

# AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

耳鼻咽喉科免疫アレルギー (2002.06) 20巻2号:158~159.

口腔扁平上皮癌におけるcDNA microarray法による遺伝子発現の検討

片山昭公, 岸部 幹, 高原 幹, 林 達哉, 野中 聡, 原湊保  
明

## 67. 口腔扁平上皮癌における cDNA microarray 法による遺伝子発現の検討

〇片山昭公, 岸部 幹, 高原 幹, 林 達哉, 野中 聡, 原渕保明

旭川医科大学耳鼻咽喉科学教室

Analysis of gene expression in oral squamous cell carcinoma with cDNA microarray

Katayama A, Kishibe K, Takahara M, Hayashi T, Nonaka S, Harabuchi Y

Dept. of Otolaryngology, Asahikawa Medical College

はじめに

近年、分子生物学的手法の発達とともに口腔扁平上皮癌において種々の遺伝子発現変化が報告されてきている。最近、遺伝子発現の違いを検討する手段として cDNA array 法が確立された。今回この cDNA array 法を用いて、口腔扁平上皮癌細胞株、口腔扁平上皮癌組織と正常口腔粘膜組織間での遺伝子発現異常をスクリーニングし、RT-PCR 法による遺伝子発現の半定量的解析を行った結果、興味深い予研が得られたので報告する。

### 1. 対象

口腔扁平上皮癌細胞株 SAS、HSC3、HSC4 の三種を用いた。組織検体として、当科で治療を行った口腔扁平上皮癌組織 7 検体（舌扁平上皮癌 5 例、口腔底扁平上皮癌 1 例、頬粘膜扁平上皮癌 1 例）と正常口腔粘膜組織 3 検体を用いた。

### 2. 方法

#### A) cDNA array 法

口腔扁平上皮癌細胞株、口腔扁平上皮癌組織と正常口腔粘膜組織より各々、核酸抽出用特殊試薬（セパゾール RNA I : ナカライタスク社）を用い、total RNA 抽出。Pure Total RNA Labeling System (clontech 社) を用いて、total RNA の DNase 処理、total RNA 50  $\mu$ g より mRNA を濃縮、 $^{32}$ P 標識 cDNA プローブの作成をした。cDNA プローブを cDNA アレイ (Atlas Human Cancer 1.2 Array : clontech 社) にし 68 $^{\circ}$ C、over night でハイブリダイズし、洗浄の後、フォスフォイメージャー (BAS2000 解析システム : 富士フィルム社) にて解析した。得られたシグナルの口腔扁平上皮癌細胞株または口腔扁平上皮癌組織/正常組織比 2.0

以上を発現上昇とした。

#### B) RT-PCR 法による半定量的解析

口腔扁平上皮癌細胞株、口腔扁平上皮癌組織と正常口腔粘膜組織より各々、核酸抽出用特殊試薬（セパゾール RNA I : nacalai tesque 社）を用い、total RNA 抽出。total RNA の DNase (Matsuda Clean kit : Gene Hunter 社) 処理を行い、total RNA より逆転写反応でテンプレート DNA 合成。サーマルサイクラー (PTC-100 : MJ Research 社) を用い、94 $^{\circ}$ C 1 分  $\rightarrow$  55 $^{\circ}$ C 1 分  $\rightarrow$  72 $^{\circ}$ C 1 分、30 サイクルにて PCR 反応を行った。内部標準遺伝子のプライマーとしては  $\beta$ -actin 遺伝子のプライマーを用いた。今回目的遺伝子のプライマーとして、SUMO-1 遺伝子のプライマーを作成した。SUMO-1 遺伝子のプライマーは EXON1 から EXON5 まで 4 つの INTORON を挟み、301 mer の塩基が増幅される様にデザインした。PCR 産物のアガロースゲル電気泳動を行い、出現したバンド濃度はデンストメーター (SION IMAGE : SCION 社) にて測定した。それぞれのレーンで、SUMO-1/ $\beta$  actin 比を算出し、Mann-Whitney U test で検定にて統計学的検討を行った。

### 3. 結果

cDNA array 法の結果、正常口腔粘膜組織 1 検体に比較し口腔扁平上皮癌細胞株 3 検体、口腔扁平上皮癌組織 1 検体で共通して発現上昇している遺伝子の一つに SUMO-1 (small ubiquitin related modifier 1) が確認された。SUMO-1 シグナルの対  $\beta$ -actin シグナル比は、口腔扁平上皮癌細胞株 SAS、HSC3、HSC4、口腔扁平上皮癌組織でそれぞれ 2.61、2.41、3.97、2.50 であった。

RT-PCR 法による半定量的解析で、口腔扁平上

皮膚癌細胞株3検体、口腔扁平上皮癌組織7検体、正常口腔粘膜組織3検体でのSUMO-1/ $\beta$  actin発現比を測定した。口腔扁平上皮癌細胞株群と口腔扁平上皮癌組織群の間にはSUMO-1/ $\beta$  actin発現比の差を認めなかったが、正常口腔粘膜組織群と比べ口腔扁平上皮癌細胞株群と口腔扁平上皮癌組織群ではSUMO-1/ $\beta$  actin発現比は有意に高値であった ( $p=0.049$ ,  $P=0.030$ )。また、口腔扁平上皮癌細胞株と口腔扁平上皮癌組織を加算したにおいても、正常口腔粘膜組織群と比べSUMO-1/ $\beta$  actin発現比は有意に高値であった ( $p=0.018$ ) (図1)。この結果、口腔扁平上皮癌においてSUMO-1遺伝子の発現が上昇している事が示された。

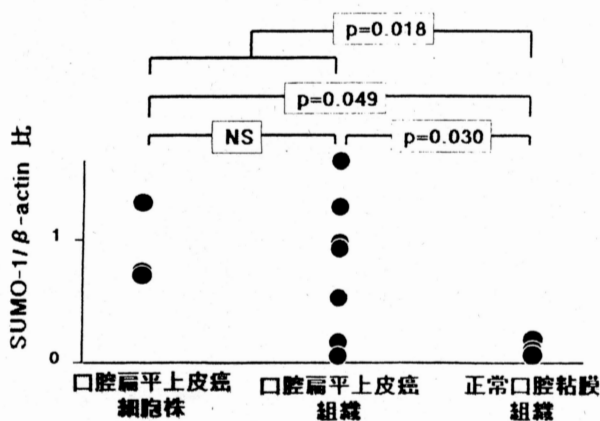


図1 SUMO-1 遺伝子発現の半定量的解析

#### 4. 考察

SUMO-1 (small ubiquitin related modifier 1) はユビキチン類似の分子構造を有し、ユビキチンに似た酵素反応により標的タンパク質に結合し、その機能を制御する<sup>1,2,3)</sup>。現在のところSUMO-1の修飾を受ける標的タンパク質として、核膜輸送に関するRanGAP1<sup>4)</sup>、核内構造体のND10<sup>2)</sup>、癌抑制遺伝子PML<sup>2)</sup>、自己免疫疾患におけるヒト抗体が認識する抗原Sp100<sup>2)</sup>、NF $\kappa$ Bの制御因子I $\kappa$ B $\alpha$ <sup>5)</sup>、癌抑制遺伝子p53<sup>6)</sup>、MDM2遺伝子<sup>7)</sup>などが次々に同定されてきている。癌の分野では、MDM2に

よるp53制御におけるSUMO-1の役割が注目を集めている<sup>7)</sup>。今回、我々は口腔扁平上皮癌においてSUMO-1遺伝子の発現が亢進していることを示した。しかし、SUMO-1は発見後、まだ5年しか経っておらず、癌におけるSUMO-1によるタンパク修飾の制御や機能についての多くのことは不明であり、今後口腔癌におけるSUMO-1の標的タンパクの同定とその分子生物学的機能の研究が必要であると示唆された。

#### (参考文献)

- 1) Bayer, P., et al.: Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1. *J. Mol. Biol.* 280: 275-286. 1999.
- 2) Kamitani, T., et al.: Referential modification of nuclear protein by a novel ubiquitin-like molecule. *J. Biol. Chem.* 272: 1401-1404, 1997.
- 3) Kretz-Remy, C., et al.: SUMO/sentrin: protein modifiers regulating important cellular functions. *Biochem. cell. Biol.* 77: 299-309. 1999.
- 4) Mahajan, R., et al.: A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell.* 88: 97-101. 1997.
- 5) Destro, JM., et al.: SUMO-1 modification of I $\kappa$ B $\alpha$  inhibits NF $\kappa$ -B activation. *Mol. Cell.* 2: 233-239. 1998.
- 6) Rodoriguez, MS., et al.: SUMO-1 modification activates the transcriptional response of p53. *EMBO.* 18: 6455-6461. 1999.
- 7) Buschmann, T., et al.: SUMO-1 modification of mdm2 prevents its self-ubiquitination and increase mdm2 ability to ubiquitinates p53. *Cell.* 101: 753-762. 2000.