

研究種目：若手研究（B）	
研究期間：2007～2008	
課題番号：19791533	
研究課題名（和文）	含嗽液からのエピジェネティック異常検出による口腔癌スクリーニング法の確立
研究課題名（英文）	Analysis of epigenetic alteration using oral rinse in oral cancer patients.
研究代表者	
	浜田 倫史（HAMADA TOMOFUMI）
	鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・助教
	研究者番号：00444894

研究成果の概要：

エピジェネティック異常は多臓器の腫瘍・前癌病変で報告があり、癌の診断や予後予測に有用であることが示唆されている。一方、口腔含嗽液は、患者に侵襲を与えることなく簡便かつ短時間に採取でき、診断の際の理想的な試料になりうる。そこで本研究では、含嗽液を用いて癌関連遺伝子群のエピジェネティック異常を検討し強力な遺伝子マーカーを同定することで、癌のハイリスク群のスクリーニングや早期診断の際の簡便かつ非侵襲的な診断方法を確立することを目的とした。

口腔癌症例および健常者からわれわれの考案したプロトコルに従い含嗽液を採取し、DNA異常メチル化およびヒストン修飾状態の検索が可能であるかを検討した。標的遺伝子としては、p16^{INK4a}を対象とした。口腔癌患者の含嗽液より得られたサンプルを対象にした実験では8例中5例にp16遺伝子の発現抑制を認め、MSPで異常メチル化を検出した。症例8例中6例においてmRNA発現とChIP Assay結果に矛盾がなかった。これにより、われわれが作成したオリジナルプロトコルにおいて、含嗽液を用いたエピジェネティック異常の検索が可能であることが初めて明らかになった。

口腔含嗽液を用いた診断法は非侵襲的かつ簡便であり、ヒストン修飾状況とDNAメチル化状態と合わせてさまざまな腫瘍抑制遺伝子のエピジェネティクス異常を検索することにより、口腔癌の強力な診断ツールとなると思われた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2004年度			
2005年度			
2006年度			
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,200,000	360,000	3,560,000

研究分野：口腔外科学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：(1)口腔癌 (2)エピジェネティクス (3)含嗽液 (4) $p16^{INK4a}$ (5)DNA メチル化 (6)ヒストン修飾 (7)ChIP 法 (8)分子腫瘍マーカー

1. 研究開始当初の背景

口腔顎顔面領域の腫瘍性病変は、その解剖学的位置から比較的発見しやすい部位に発症する。しかし、早期の口腔癌や前癌病変などはしばしば自覚症状が乏しく放置される傾向があり、早期発見という点では必ずしも満足できる現状にあるとは言えない。また、白板症などの前癌病変はしばしば悪性化することから、発癌リスクの評価は非常に重要である。これらの背景から、癌の早期発見やハイリスク群のスクリーニングのための分子マーカーの登場が待たれている。

エピジェネティックな機構 (DNA プロモーター領域のメチル化やヒストン蛋白のアセチル化など) は、遺伝子の発現を転写レベルで調節する。この調節機構の異常 (=エピジェネティック異常) は多臓器の腫瘍・前癌病変で報告があり、癌の診断や予後予測に有用であることが示唆されている。

一方われわれは、口腔含嗽液は患者に侵襲を与えることなく簡便かつ短時間に採取でき、診断の際の理想的な試料になりうると考えた。

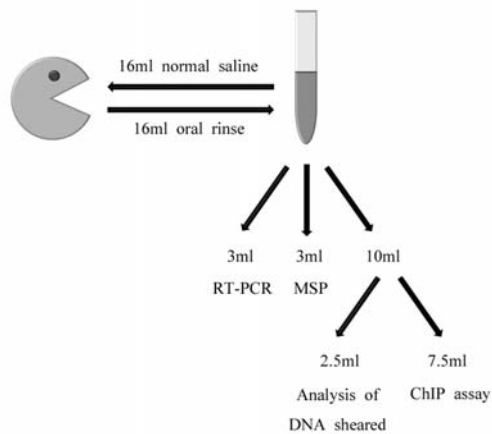
2. 研究の目的

本研究では、含嗽液を用いて癌関連遺伝子群のエピジェネティック異常を検討し強力な遺伝子マーカーを同定することで、癌のハイリスク群のスクリーニングや早期診断の際の簡便かつ非侵襲的な診断方法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) まずわれわれは、口腔領域で癌におけるエピジェネティック異常が報告されている $p16^{INK4a}$ を標的遺伝子とし、培養細胞株において予備実験を行った。mRNA の定量にはリアルタイム RT-PCR を、プロモーターDNA のメチル化の状態を Methylation specific PCR 法 (MSP 法)、ヒストンの修飾状態をクロマチン免疫沈降法 (ChIP 法) にて検索し、それぞれの結果の良好な整合性を確認した。培養細胞における実験系の確立に際しては ACC3 (唾液腺由来癌細胞、 $p16$ 発現陽性) および T-47D (乳腺由来癌細胞、 $p16$ 発現陰性) を用いた。細胞株および含嗽液からの DNA 抽出・Bisulfite 処理は Methylamp whole cell bisulfite modification kit (EPIGENTEK) を用いて行った。MSP に際しては QIAGEN Fast Cycling PCR kit (QIAGEN) を用いた。リアルタイム RT-PCR は ABI7000 を用いて Taqman プロブ (CDKN2A, Hs00233365) により通法通り行われ、GAPDH の発現量によりノーマライズされた。

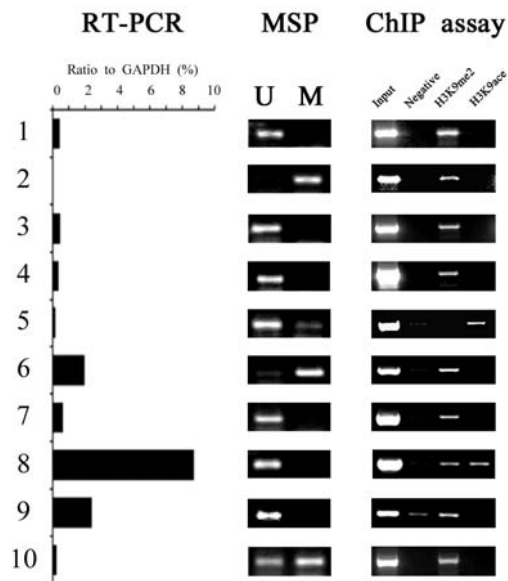
(2) さらに、口腔癌症例および健常者からわれわれの考案したプロトコル (次ページ図 1) に従い含嗽液を採取し、 $p16^{INK4a}$ 遺伝子のエピジェネティック異常を検索した。採取された含嗽液は DNA 抽出用、mRNA 抽出用、タンパク質精製用にそれぞれ 3, 3, 9ml に分注され、2000rpm で 5 分間遠心分離されたのち以後のステップに使用された。



(図1. 口腔含嗽液採取のプロトコル)

4. 研究成果

口腔癌患者の含嗽液より得られたサンプルを対象にした実験では8例中5例にp16遺伝子の発現抑制を認め、MSPで異常メチル化を検出した。症例8例中6例においてmRNA発現とChIP Assay結果に矛盾がなかった。これにより、われわれが作成したオリジナルプロトコルにおいて、含嗽液を用いたChIPによるヒストン化学修飾状態の検索が可能であることが初めて明らかになった(図2)。



(図2. 口腔癌患者から得た含嗽液におけるp16遺伝子の発現状況とエピジェネティックステータス)

口腔含嗽液を用いたChIP法は非侵襲的かつ簡便であり、DNAメチル化状態と合わせてp16をはじめとするさまざまな腫瘍抑制遺伝子のエピジェネティクス異常を検索することにより、口腔癌の強力な診断ツールとなると思われた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1件)

(1) Yamada N, Nishida Y, Tsutsumida H, Hamada T, Goto M, Higashi M, Nomoto M, Yonezawa S

MUC1 expression is regulated by DNA methylation and histone H3 lysine 9 modification in cancer cells.

Cancer Research 68 2708-2716 2008. 査読有り

[学会発表] (計 4件)

(1) 楠元孝宣、浜田倫史、山田宗茂、後藤正道、米澤傑、向井洋、杉原一正

口腔含嗽液からの腫瘍抑制遺伝子プロモーター領域におけるDNA異常メチル化とヒストン修飾状態の検討

第62回日本口腔科学会総会

2008.04.17 福岡市

(2) Norishige Yamada, Hideaki Tsutsumida, Masamichi Goto, Yukari Nishida, Tomofumi Hamada, Michiyo Higashi, Mitsuharu Nomoto, Suguru Yonezawa

MUC1 expression is regulated by DNA methylation and histone H3-K9 modification in cancer cell lines.

99th AACR Annual Meeting

2008.04 San Diego, CA

(3) 浜田倫史、楠元孝宣、若松常信、向井洋、杉原一正

口腔含嗽液からのDNAメチル化異常検出による口腔癌および発癌ハイリスク群スクリーニング法の確立

第26回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会

2008.01.25 別府市

(4) 楠元孝宣、浜田倫史、山田宗茂、後藤正道、米澤傑、向井洋、杉原一正

口腔含嗽液を用いた腫瘍抑制遺伝子におけるヒストン修飾状態の検討

第26回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会

2008.01.25 別府市

[その他]

研究計画に関わる倫理の観点からの検討事項：

本研究は鹿児島大学大学院医歯学総合研究科倫理委員会の承認の上、実施した。鹿児島大学医学部・歯学部附属病院口腔外科にて治療を受けた患者からの各種の検体を用いて研究を行い、全例に対してインフォームドコンセントを得たうえで検体を採取した。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浜田 倫史 (HAMADA TOMOFUMI)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号：00444894

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

楠元孝宣 (KUSUMOTO TAKANOBU)

(2007年度、2008年度)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・大学院生

山田宗茂 (YAMADA NORISHIGE)

(2007年度、2008年度)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・大学院生