

機関番号：13701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20592324

研究課題名（和文） 口腔癌における血漿中のメチル化異常遺伝子断片の検索と臨床病態との  
相関研究課題名（英文） The relationships between hypermethylation of promotor region of  
tumor suppressor gene in serum of oral squamous cell carcinoma  
patients and clinical features

研究代表者

山下 知巳 (YAMASHITA TOMOMI)

岐阜大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：80345793

研究成果の概要（和文）：

口腔扁平上皮癌患者における、術前血漿中のhypermethylationの割合は、p16が66.7%、MGMTが14.3%、RECKが4.8%であったが、CDH1、TIMP-3では確認できなかった。

術前血漿で p16 の hypermethylation を認めた症例で術後 3 ヶ月目の血漿中 p16 の hypermethylation の有無を検索した。無担癌症例でも担癌症例でもともに hypermethylation が確認された。口腔扁平上皮癌患者の血清中 p16 遺伝子のプロモーター領域のハイパーメチレーションは腫瘍切除前後で変化しなかった。

研究成果の概要（英文）：

Hypermethylation of promotor region of tumor suppressor gene in serum of oral squamous cell carcinoma patients before the tumor extirpation was p16; 66.7%, MGMT; 14.3%, RECK; 4.8%, CDH1 and TIMP-3; 0%.

The cases of hypermethylation of promotor region of p16 in serum before the tumor extirpation were investigated about hypermethylation of p16 in serum 3 months after the tumor extirpation. Hypermethylation of p16 was detected in patients with cancer and non-tumor-bearing patients. Hypermethylation of promotor region of p16 did not change before and after the tumor extirpation in serum of oral squamous cell carcinoma patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：口腔癌、血清、血漿、メチル化異常

## 1. 研究開始当初の背景

発癌は多段階の遺伝子異常による **genetic** な変化や **epigenetic** な変化により、細胞が増殖優位性を獲得することにより起こるとされ、従来の DNA 塩基配列異常による **genetic** な遺伝子異常のみならず、塩基配列異常を伴わない **epigenetic** な変化も重要な働きをしていることが明らかにされて来ている。この **epigenetic** な変化には、DNA のメチル化異常、ヒストン修飾の異常などがあり、癌における DNA メチル化異常として、ゲノム全体の低メチル化やある特定遺伝子のプロモーター領域における CpG アイランドの部分的な高メチル化が知られ、特に、プロモーター領域が高メチル化した場合に下流遺伝子の mRNA 転写抑制（サイレンシング）が生じ、結果、遺伝子の不活化により発癌が促進される現象が明らかにされて来ている。このメチル化異常において発がんとの関連が指摘されているものとして、大別すると細胞周期調節遺伝子(*p16<sup>INK4A</sup>*, *p57<sup>KIP2</sup>*, etc)、DNA 修復遺伝子(*MGMT*, *hMLH1* etc)、アポトーシス関連遺伝子(*TMS1*, *CASP8*, *APAF-1*, etc)があり、これら遺伝子のプロモーター領域のメチル化異常により各々の遺伝子発現がサイレンシングされ、がん化を促進するものと考えられている。

我々もこの点に着目し、これまでに Methylation-specific PCR (MSP) 法を用いてヒト口腔癌 55 例の原発組織の DNA メチル化異常を検索し、*p16* では 28 例(50.9%)、*MGMT* では 31 例 (56.4%) に hypermethylation が生じていることを観察している。また、同一症例の病理学的に非病変部粘膜のメチレーション状態を検索した所、*p16* では 37.5%、

*MGMT* では 60.0%と高率に周辺組織にもメチル化異常が生じており、口腔がんでも、Field cancerization を含めメチル化異常が高頻度に深く関わっていることが示されて来ている。

一方、癌症例において、血漿中に癌細胞由来のメチル化異常を来たした DNA 断片が遊出し、これが新たな腫瘍 marker となる可能性が示されて来ているが、口腔領域における末梢血の遺伝子メチル化異常の解析は 1 報告のみしか行われておらず、その検索も *p16* のみの解析にとどまり、腫瘍特異的か否かの検証も乏しい状態となっている。

## 2. 研究の目的

現在までにヒト口腔癌において高頻度にメチル化異常が報告されている遺伝子を target に絞り、ヒト口腔癌における原発巣組織 DNA および末梢血血漿中の DNA 断片のメチル化異常を検索し、ヒト原発巣 DNA と血漿中 DNA 断片に於けるメチル化異常の相関性（検出頻度の高い遺伝子の絞込みを含む）を明らかとするとともにに臨床病態との比較（担癌・非担癌）を行い新たな腫瘍 marker となり得るかを検証する。

## 3. 研究の方法

ヒト口腔癌において高頻度にメチル化異常の生じることが報告されている遺伝子 (*p16*, *MGMT*, *RECK*, *CDH1*, *TIMP-3*) についてメチル化異常を包括的に解析し、原発組織の DNA メチル化異常と血漿中 DNA 断片メチル化異常との対比を行い検証した。原発組織の DNA メチル化異常は従来通り DNA を抽出し Methylation-specific PCR を用い検討し

た。血漿中 DAN 断片メチル化異常は血液から QIAamp DNA Blood Mini Kit を用い DNA を採取し Methylation-specific PCR を用い検討した。

#### 4. 研究成果

腫瘍組織における、hypermethylationはp16とRECKで90-95%確認できた。MGMTでは20%程度と少なく、CDH1, TIPM-3ではほぼ確認できなかった。この結果から、口腔癌患者血漿中の癌抑制遺伝子プロモーター領域のhypermethylationの検討では、p16とRECKを検討することが適当であると推測された。

手術前血漿中のhypermethylationは、p16で66.7%、MGMTで14.3%、RECKで4.8%観察できたが、CDH1, TIMP-3では確認できなかった。この結果から、血漿中p16のメチル化異常に注目して、術後の継時的変化を追うことが適当であると推測された。

術前血漿で p16 の hypermethylation を認めた 14 症例での術後 3 ヶ月以降の血漿では、無担癌症例 11 例でも担癌 3 症例(後発リンパ節転移を含む)でも hypermethylation が確認され、非担癌症例での変化(消失)が確認できなかった。

#### 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 2 件)

1) Nguyen Khanh LONG, Keizo KATO, Tomomi YAMASHITA, Hiroki MAKITA, Makoto TOIDA, Daijiro HATAKEYAMA, Akira HARA\*, Hideki MORI\*, Toshiyuki SHIBATA

Hypermethylation of the RECK gene predicts poor prognosis in oral squamous cell carcinomas  
Oral Oncology 2008 44 : 1052-1058

2) Kato K, Long NK, Makita H, Toida M, Yamashita T, Hatakeyama D, Hara A, Mori H, Shibata T

Effects of green tea polyphenol on methylation status of RECK gene and cancer cell invasion in oral squamous cell carcinoma cells.

British J Cancer. 2008 Jul 29;99(4):647-54

[学会発表] (計 3 件)

1) Nguyen Khanh Long, Keizo Kato, Tomomi Yamashita, Hiroki Makita, Makoto Toida, Daijiro Hatakeyama, Akira Hara, Hideki Mori, Toshiyuki Shibata

Hypermethylation of the RECK gene predicts poor prognosis in oral squamous cell carcinomas  
9th International Conference of the Asian Clinical Oncology Society

(2010年8月27日、岐阜市、岐阜都ホテル) ワークショップ13

2) 加藤恵三、宮崎康雄、馬場政司、畠山大二郎、牧田浩樹、山下知巳、土井田誠、柴田敏之

RECK 遺伝子のメチル化と予後との相関および脱メチル化による浸潤制御の可能性  
第63回日本口腔科学会総会、2009年4月17日  
2-0-E-6 アクトシティ浜松

3) Nguyen Khanh Long, 加藤恵三、宮崎康雄、馬場政司、畠山大二郎、牧田浩樹、山下知巳、土井田 誠、柴田敏之

口腔がんにおける RECK 遺伝子のメチル化異常の検索  
第62回日本口腔科学会総会  
(2008年4月17-18日、福岡市) (1-P-F-4)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

研究者番号：

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山下 知巳 (YAMASHITA TOMOMI)  
岐阜大学・医学系研究科・准教授  
研究者番号：80345793

### (2) 研究分担者

加藤 恵三 (KATO KEIZO)  
岐阜大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：40397336

牧田 浩樹 (MAKITA HIROKI)  
岐阜大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：50345790

畠山 大二郎 (HATAKEYAMA DAIJIRO)  
岐阜大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：40397336

柴田 敏之 (SHIBATA TOSHIYUKI)  
岐阜大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：40397336

### (3) 連携研究者 ( )