

機関番号：37114

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592383

研究課題名 (和文)

生活環境ストレスによる舌粘膜の分子的損傷の診断法についての研究

研究課題名 (英文)

A study on the diagnostic method for detecting the molecular injury occurring in tongue mucosa under environmental stress

研究代表者 池邊 哲郎 (IKEBE TETSURO)

福岡歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：20202913

研究成果の概要 (和文)：

ヒト正常角化細胞、HaCaT 細胞 (ヒト不死化角化細胞) およびヒト口腔扁平上皮癌細胞を培養し、過酸化水素で刺激し、8-oxoguanine を分解できる酵素 MTH1、MTH2 および NUDT5 の発現変化を調べると、口腔癌細胞と HaCaT 細胞ではそれらの発現に変化がないが、正常細胞では過酸化水素刺激によって NUDT5 の発現が経時的に増大することが PCR 法とウエスタンブロット法によって確かめられた。その際、細胞質の NUDT5 発現増大が著名であるが、核内の NUDT5 の発現も増大した。MTH1 および NUDT5 に対する siRNA を作製して正常角化細胞に作用させると、8-oxoguanine の発現増大が細胞免疫染色によって確認された。これらのことから、口腔粘膜の発がんには 8-oxoguanine と NUDT5 もしくは MTH1 とのバランスが関与することが考えられ、特に NUDT5 の発現は酸化ストレスによる口腔粘膜の分子的損傷の回復に寄与していることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

An oxidized form of guanine, 8-oxoGua, is known to have a potential to induce genetic mutations, thereby causing carcinogenesis. Mammalian cells hence have various mechanisms to eliminate 8-oxoGua in DNA and nucleotide pools. Since MutT-related enzymes, MTH1 and NUDT5, can hydrolyze 8-oxoGua-containing nucleotides in nucleotide pools, the expressions of MTH1 and NUDT5 are likely to be involved in controlling oxidation-induced carcinogenesis. In the present study, we examined the expressions of 8-oxoGua, MTH1 and NUDT5 in human normal keratinocytes and human oral squamous carcinoma cells treated with H₂O₂. As a result, the immunofluorescent study demonstrated that the localization of 8-oxo-dGTP changed from cytoplasm to nucleus in the treatment with H₂O₂. The Western blotting analysis as well as RT-PCR revealed that H₂O₂ enhanced the expression of NUDT5, but not MTH1, in normal keratinocytes. The increased NUDT5 proteins were also detected in the nuclear extracts of keratinocytes treated with H₂O₂. In contrast, H₂O₂ had no effects on the expressions of NUDT5 and MTH1 in squamous carcinoma cells. NUDT5 may thus be involved in preventing the carcinogenic mutations in keratinocytes under oxidative stress.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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、酸化ストレス、活性酸素、発がん、酸化 DNA

1. 研究開始当初の背景

口腔粘膜は食物や嗜好品などの生活環境因子から様々な刺激を受ける。それらの刺激、つまりストレスは粘膜の最表層にある扁平上皮の分子（核酸やタンパク質）に変化を生ぜしめ、その集積が口腔粘膜疾患をもたらすと考えられる。このような疾患の最大の問題は口腔発がんであろう。外部からのストレス因子による DNA や RNA の変化（ミスマッチ、突然変異、ゲノム不安定化）が蓄積し、遺伝子の変異を招き、その結果、正常口腔粘膜が前がん病変となり、最終的に口腔がんとなるであろう。このような発がんの前段階で、外的ストレスによって細胞分子にもたらされる潜在的な修飾や変化は分子的損傷と云える。口腔発がんの発症予防を考えるためには、前がん病変の初期の段階やその前の潜在的段階で、細胞内の分子的損傷の実態を検出することが大切である。

2. 研究の目的

口腔粘膜細胞の分子的損傷を考える際に、どの分子に焦点を絞るかが問題となるが、本研究では、分子的損傷として突然変異の原因となることが報告されている酸化 DNA の 8-オキソグアニンに着目し、その発現を解析し、同時に 8-オキソグアニンの分解酵素である MutT 関連タンパクの発現を調べることとした。また、分子的損傷をもたらす環境ストレスとして、活性酸素をはじめとする酸化ストレス、タバコ、放射線および炎症因子を中心に据える。そこで酸化ストレスなどが口腔粘膜上皮にがん化のリスクに関与した分子的損傷を与えるという仮説を設定し、口腔粘膜、特に舌粘膜の分子的損傷を診断する方法を構築することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

ヒト正常角化細胞（ケラチノサイト）、ヒト不死化角化細胞（HaCaT 細胞）およびヒト口腔扁平上皮癌細胞を培養し、過酸化水素およびメナジオンで刺激し、細胞内の 8-オキソグアニンの発現を免疫蛍光染色によって解析した。また MutT 関連タンパクである MTH1、MTH2 および NUDT5 の発現を RT-PCR および Western blot 法で解析した。さらに MutT 関連タンパクに対する siRNA を作製し、細胞内の MutT 関連タンパクの発現をノックダウンすることによって 8-オキソグアニンの発現等を解析した。

4. 研究成果

ヒト正常角化細胞、HaCaT 細胞（ヒト不死化角化細胞）およびヒト口腔扁平上皮癌細胞をそれぞれ培養し、過酸化水素で刺激すると、

すべての細胞種で、8-oxoguanine の発現が細胞質から核内に局在が変化した。24 時間後には核内から再び細胞質に局在がもどった。8-oxoguanine を分解できる酵素 MTH1、MTH2 および NUDT5 の発現変化を過酸化水素刺激の有無で調べると、癌細胞と不死化細胞ではそれらの発現に変化がないが、正常細胞では過酸化水素刺激によって NUDT5 の発現が経時的に増大することが PCR 法とウエスタンブロット法によって確かめられた。また、細胞染色をすると MTH1、MTH2 および NUDT5 はともに細胞質に局在していたが、過酸化水素刺激によって NUDT5 のみ発現が増加した。MTH1 および NUDT5 に対する siRNA を作製して正常角化細胞に作用させると、8-oxoguanine の発現増大が細胞免疫染色によって確認された。これらのデータは、口腔粘膜のがん化予防には、MTH よりも NUDT5 が関与することを示唆している。

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）

Shuji Nakayama, Hiroshi Kajiya, Koji Okabe, Tetsuro Ikebe: Effects of oxidative stress on the expressions of 8-oxoguanine and its eliminating enzymes in human keratinocytes and squamous carcinoma cells. Oral Science International in press

〔学会発表〕（計 2 件）

1) 中山修二、来海慶一郎、岡本愛彦、大関悟、池邊哲郎 ケラチノサイトと口腔扁平上皮癌細胞における MTH1 と NUDT5 の発現
第 64 回日本口腔科学会学術集会 平成 22 年 6 月 24 日 札幌

2) 中山修二、来海慶一郎、府川晃久、太田信敬、大関悟、池邊哲郎 ケラチノサイト、HaCaT 細胞及び SCC 細胞における MutT 関連タンパクの発現についての研究
第 29 回日本口腔腫瘍学会学術大会 平成 23 年 1 月 27 日 熊本

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池邊 哲郎 (IKEBE TETSURO)
福岡歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：20202913

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

