

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：27102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10149

研究課題名(和文) RNAメチル化修飾を用いた口腔扁平上皮癌の早期診断法の確立

研究課題名(英文) Establishment of early diagnosis method of oral squamous cell carcinoma using by RNA methylated modification

研究代表者

矢田 直美 (Yada, Naomi)

九州歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：60468022

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、早期および進行した口腔扁平上皮癌におけるRNAメチル化修飾の実態を口腔潜在的悪性疾患(白板症や口腔扁平苔癬)と比較し、RNAメチル化修飾の診断学的な有用性や予後因子などの解明し、早期発見へ発展させること目的とした。m6A修飾因子の読み取り因子のMETTL3、書き込み因子のYTHDF1、YTHDC1は、扁平上皮癌で高率に発現し、白板症の上皮性異形成が扁平苔癬よりも高発現であった。口腔潜在悪性疾患から癌へ進展する段階で、RNAメチル化修飾因子が関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

早期および進行した口腔扁平上皮癌ではRNAメチル化修飾因子である、METTL3、YTHDF1、YTHDC1は口腔潜在的悪性疾患(白板症や口腔扁平苔癬)よりも高率に発現を認めた。また、口腔潜在的悪性疾患で上皮性異形成症の一部も発現が見られた。これらの因子が、口腔癌がんへと進展する予測因子となり、早期発見の一助となり、早期治療による外科的侵襲軽減につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：N6-methyladenosine (m6A) modification is involved in the tumorigenesis of various cancers. m6A modification are controlled by writers (METTL3, METTL14), erasers (FTO, ALKBH5) and reader (YTH domain family). In this study, I investigated these factors expression of oral potential malignant disorders (OPMDs: leukoplakia including epithelial dysplasia (OED), oral lichen planus (OLP)) and oral squamous cell carcinoma (OSCC) by using real-time RT-PCR and immunohistochemistry. The expression of METTL3, YTHDF1, YTHDC1 were higher in OSCC and OED than OLP. These factors might be the potential indicators of OED and OSCC.

研究分野：口腔病理

キーワード：RNAメチル化 口腔扁平苔癬 口腔扁平上皮癌 口腔細胞診

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

RNA も DNA やヒストンと同様にメチル化やアセチル化といった修飾を受ける。N6-メチルアデノシン(N⁶-methyladenosine: m⁶A)は、mRNA のアデニンのプリン環の6位窒素原子へのメチル基の付加反応、つまり mRNA のアデノシン N6 位がメチル化修飾されたものである。m⁶A は書き込み因子のメチルトランスフェラーゼ複合体の METTL3 (methyltransferase-like 3)、METTL14(methyltransferase-like 14)と WTAP (Wilm's tumor-1-associated protein)の酵素複合体により触媒されてメチル化が起こり、消去因子の FTO (fat mass and obesity protein)や ALKBH5 (alkB homolog 5)により触媒され脱メチル化が行われる。そして細胞質に存在する m⁶A 結合タンパク質である読み取り因子の RNA 結合 YTH (Y521-B homology domain-containing proteins)ドメインを有する YTHDF1~3 などによって調節されタンパク発現につながる。肺や子宮頸部扁平上皮癌での、RNA メチル化修飾と機能解析の報告は見られるが、口腔癌での報告は認めなかった。本研究によって、口腔潜在的悪性疾患、早期扁平上皮癌、進行扁平上皮癌へと進展する過程で RNA メチル化修飾の存在が明らかとなり、進行するために不可欠な修飾因子となるかもしれない。これを口腔擦過細胞診の残余検体から抽出する RNA へと応用できると、より正確な判定へとつながる。

2. 研究の目的

本研究は、早期および進行した口腔扁平上皮癌における RNA メチル化修飾の実態を口腔潜在的悪性疾患(白板症や口腔扁平苔癬など)と比較し、優位な RNA メチル化修飾因子を同定し、RNA メチル化修飾の診断学的な有用性や予後因子になるかなどの臨床学的な意義の解明、これを口腔擦過細胞診へ応用し、早期発見へ発展させること目的とした。

3. 研究の方法

対象は、口腔潜在的悪性疾患である口腔扁平苔癬 18 例、白板症(扁平上皮過形成 10 例、上皮性異形成 10 例)、扁平上皮癌 15 例の検討を行った。

mRNA メチル化の N6-メチルアデノシン(N⁶-methyladenosine: m⁶A)について、パラフィン切片上で免疫染色を行った。次にパラフィン切片より total RNA を抽出し、cDNA へ変換し、m⁶A は書き込み因子のメチルトランスフェラーゼ複合体の METTL3 (methyltransferase-like 3)、METTL14(methyltransferase-like 14)、消去因子の FTO (fat mass and obesity protein)や ALKBH5 (alkB homolog 5)、細胞質に存在する m⁶A 結合タンパク質である読み取り因子の YTHDF1 (YTH domain family 1)、核内に存在する YTHDC1 (YTH domain containing 1)について、real-time PCR 法により発現を定量した。また、この結果より、免疫染色で METTL3、YTHDF1 と YTHDC1 について発現解析を行った。

口腔擦過細胞診については、口腔細胞診判定後の残液から total RNA を抽出し、METTL3 と METTL14 のメチル化修飾因子について real-time PCR 法により発現を比較した。

4. 研究成果

m⁶A 免疫染色では、口腔扁平苔癬、白板症(扁平上皮過形成、上皮性異形成)、扁平上皮癌いずれも核陽性像が見られ、扁平上皮癌は、浸潤した腫瘍細胞の細胞質への陽性が認められた。Real-time PCR 法の発現解析では、total RNA 抽出から cDNA へと変換し、METTL3、METTL14、FTO、

ALKBH5、YTHDF1、YTHDC1 の PCR の発現解析を行った。mRNA では、METTL3、YTHDF1、YTHDC1 で扁平上皮癌症例が白板症、口腔扁平苔癬より発現が有意に上昇していた。他の因子について、発現の有意差は見られなかった。免疫染色では扁平苔癬は、扁平上皮過形成・上皮性異形成・扁平上皮癌と比較すると METTL3、YTHDF1、YTHDC1 発現が低下した。口腔扁平苔癬では m⁶A の発現が見られるものの、METTL3、YTHDF1、YTHDC1 発現は低下していた。特に上皮性異形成と扁平上皮癌はこれらのマーカーが高発現しており、口腔潜在悪性疾患から癌へ進展する段階で、RNA メチル化修飾因子が関与することが示唆された。

なお、細胞診検体について、口腔液状化細胞診検体の残液から、total RNA の抽出し、cDNA へ変換し METTL3、METTL14 について real-time PCR を試みたが、増幅不良で発現を比較することができなかった。口腔液状化細胞診検体の残液の利用については今後の検討課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kazuya Haraguchi, Shinobu Sato, Manabu Habu, Naomi Yada, Mana Hayakawa, Masaaki Sasaguri, Izumi Yoshioka, Kazuhiro Tomonaga, Shigeori Takenaka.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Evaluation of the accuracy of hTERT gene aberrant methylation using electrochemical hybridization assay and liquid-based cytology in screening for oral squamous cell carcinoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Electrophoresis	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 矢田 直美, 松尾 拓
2. 発表標題 口腔上皮性異形成における液状化細胞診(ThinPrep法)の細胞像
3. 学会等名 第63回日本臨床細胞学会総会春期大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 矢田 直美
2. 発表標題 HPV関連腫瘍としての口腔扁平上皮癌の病態と診断
3. 学会等名 第61回日本臨床細胞学会総会秋期大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------