

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 9 月 20 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592570

研究課題名（和文） 4-NQO誘発ラット舌発癌モデルにおける遺伝子変異機構の解析

研究課題名（英文） The analysis of epigenetic events in rat tongue carcinogenesis induced by 4-NQO

研究代表者

牧田 浩樹 (MAKITA HIROKI)

岐阜大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：50345790

研究成果の概要（和文）：4-NQO 誘発ラット舌癌モデルでは、4-NQO 投与開始から 32 週後の扁平上皮癌、前癌病変や一部の正常粘膜上皮において、癌抑制遺伝子である p16 のプロモーター領域の高メチル化が検出され、同時に扁平上皮癌における p16 タンパク質発現の欠失を認めた。4-NQO 誘発ラット舌癌モデルでは、p16 のプロモーター領域の高メチル化が発癌に関与していることが示唆され、ヒト口腔癌の発癌過程におけるエピジェネティックな変化を解析するための有用なモデルであることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：A high frequency of hypermethylation of p16 promoter was detected in tongue squamous cell carcinomas(SCC), pre-cancerous lesions and some normal epithelia at 32 weeks from start of 4-NQO exposure. In SCC with higher p16 methylation level, loss of the protein expression was detected. Our results suggest p16 promoter hypermethylation may play an important role in development of 4-NQO induced tongue cancer in rat. Therefore, to understand human oral carcinogenesis, 4-NQO induced oral carcinogenesis model may be the best available model for epigenetic alterations.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
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：病態検査学

1. 研究開始当初の背景

癌における DNA メチル化異常の特徴として、ある特定遺伝子のプロモーター領域の CpG アイランドの部分的な高メチル化による下流遺伝子の mRNA への転写抑制・遺伝子不活化（サイレンシング）があり、現在まで p16 など多くの癌抑制遺伝子の DNA メチル化とそ

の不活化が発癌や悪性化進展に重要な役割を果たしていることが報告されて来ている。また、DNA ミスマッチ修復遺伝子の異常によるマイクロサテライト不安定性 (Microsatellite instability : MSI) はヒトの発癌に密接に関連し、胃癌や大腸癌の前癌病変においてミスマッチ修復遺伝子 hMLH1 のメチル化異常に

よる MSI への関与が示されて来ている。さらに、ヒト口腔癌においても、MSI の関与や癌抑制遺伝子プロモーター領域の高メチル化の検出は報告されているが、発癌過程における DNA メチル化異常については明らかになっておらず、4NQO 誘発ラット舌癌モデルにおいても同様となっている。

これまでに、我々はヒト口腔癌において、p16 (癌抑制遺伝子)、MGMT (DNA 修復遺伝子) の DNA メチル化異常が高頻度の生じていること (Kato K, et al: J Cancer Res Clin Oncol, 2006) や、ヒト白板症において組織学的変化に p16 のメチル化異常の頻度が相関すること (M Takeshima, et al: J Oral Pathology and Medicine 2008) や癌の浸潤増殖に関与する RECK 遺伝子のメチル化異常がヒト口腔癌の予後に影響すること (Long NK, et al: Oral Oncol. 2008)、緑茶ポリフェノールである epigallocatechin-3-gallate (EGCG) が口腔癌細胞内のメチル化により不活化した RECK 遺伝子を脱メチル化し、癌の浸潤能を抑制すること (Kato K, et al: Br J Cancer. 2008) を報告し、病変の進行のみならず、予後 (ヒト癌細胞の悪性化進展度) にも関与している可能性を明らかにしている。

一方、4-ニトロキノリン1-オキサイド (4NQO) 誘発ラット舌癌モデルは、口腔癌発癌機序を検索するためのモデルとして頻用され、我々もこのモデルを用いて様々な口腔癌化学予防物質を報告すると同時に多段階発癌モデルとしての有用性を示してきた。我々は、本研究の準備段階として、4NQO 誘発ラット舌癌モデルにおいて、p16 癌抑制遺伝子が発癌過程にメチル化異常を生じることを見出し、このモデルの発癌機構に DNA メチル化異常が強く関与している可能性を見出している。また、ヒト健常口腔粘膜において喫煙習慣と p16 メチル化異常の関係も明らかとなりつつあり、これが組織学的な病変発症前のバイオマーカーとなる可能性も見出しつつある。

しかしながら、この 4NQO 誘発ラット口腔癌の遺伝子メチル化異常の解析は p16 の DNA メチル化異常の報告があるのみで、発癌過程における経時的解析は全く研究されていない状態であった。また、他の遺伝子での報告はなく不明な点が多いままとなっていた。

2. 研究の目的

病変進行と癌抑制遺伝子メチル化異常の推移

4NQO 誘発ラット舌癌モデルを用いて、発癌過程 (正常粘膜、軽度異型粘膜～高度異型粘膜、乳頭腫) から癌 (早期癌、浸潤癌) までの検体を採取し、現在までにヒト口腔癌で DNA メチル化異常が報告されている癌抑制

遺伝子を候補遺伝子として、これら遺伝子のプロモーター領域の DNA メチル化異常と組織型を解析し、4NQO 発癌モデルにおける病変の進行過程と DNA メチル化異常の推移やミスマッチ修復遺伝子 MLH1 などの癌抑制遺伝子メチル化異常の重積の関与の有無について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 4NQO 誘発ラット舌癌モデルの作製
6 週齢 F344 ラットを以下のグループに分け、経時的に舌組織を採取し、検体は 2 分割し、一方はホルマリン固定し、もう一方は -80℃ で凍結保存し、病理組織学的検索や DNA メチル化異常の検索に用いた。

・グループ 1 : 20ppm 4-NQO 飲水投与群 46 匹。4-NQO 飲水開始 20 週後 (11 匹)、32 週後 (35 匹) にそれぞれ犠牲死。

・グループ 2 : 非処置群 6 匹。4-NQO 飲水開始 20 週後 (3 匹)、32 週後 (3 匹) にそれぞれ犠牲死。

(2) 病理組織学的検索・ゲノム DNA 抽出
①ホルマリン固定をおこなった組織はパラフィン包埋し、病理組織学的検索、免疫組織化学的検索用に連続切片を作製した。病理組織学検索には H・E 染色を行い、組織型の分類 (正常粘膜、過形成粘膜、異形成粘膜、乳頭腫、早期癌、浸潤癌) を行った。

②凍結標本から、DNA 抽出を行った。DNA 抽出のための組織は病変のできやすい舌背後方と比較のために舌背前方の上皮組織から採取し、病変がある場合は H・E 染色標本を参考に病変を採取した。

(3) DNA メチル化異常の解析

病理組織別 (正常粘膜、過形成粘膜、異形成粘膜、乳頭腫、早期癌、浸潤癌) に抽出した DNA をバイスルファイト (亜硫酸水素塩) 処理した後、methylation-specific PCR (MSP) 法にて検出した。DNA メチル化異常のターゲットとして、ヒト口腔扁平上皮癌において癌抑制遺伝子プロモーター領域の高メチル化が報告されている p16(Cdkn2a)、Cdh1(E-cadherin)、Rassf1a、Mlh1、p15 を候補遺伝子として網羅的に解析した。

プライマーは下記のものを用いた。

p16 (Cdkn2a) (M)

F: GAGGAGGAGAGATTTTCGATTTTC

R: AAAATACTAAACTCCTTTTCGAACG

p16 (Cdkn2a) (U)

F: AGGAGGAGAGATTTTGATTTT

R: AATACTAAACTCCTTTCAAACA

p15 (M)

F: GGAGGATTATTTTGTACGGATC

R: GACGTTAAAATCTACGCCGAC
 p15 (U)
 F: GAGGATTATTTTTGTTTATGGATTGG
 R: TAACAACATTAATAATCTACACCAAC

Mlh1 (M)
 F: CGTGAATTTTGACGCGTAAGCGC
 R: CCTTCACCTTAAACCGACCGCCG
 Mlh1 (U)
 F:
 GGATTGTGAATTTTGATGTGTAAGTGT
 R: TTCTTCCTTACCTTAAACCAACCA

Cdh1 (M)
 F: AAACCTCAATAATACGCCGCG
 R: GTTTTTAGTTAATTAGCGGCGTC
 Cdh1 (U)
 F: CTTAAAACTCAATAATACACCACA
 R: GTGTTTTAGTTAATTAGTGGTGT

Rassf1a (M)
 F: TTTTTTTCGGTTTTTTTTTCGTC
 R: CAACTAATAAATTCGTAACGAACG
 Rassf1a (U)
 F: TGTTTTTTTTGGTTTTTTTTTGTT
 R: TAACAACATAAATTCATAACAAACA

B-actin (for Real Time PCR)
 F: GGGATTTTGGTTTTGAGTGG
 R: AAAAATCACTCCCCCTTACTAACA

(4) Real-Time MSP 法による p16 のメチル化レベルの検討

4-NQO 飲水 20 週後、32 週後のそれぞれの舌前方、後方の正常上皮の DNA をバイスルフアイト処理後、SYBR® Green I (TaKaRa SYBR® Premix Ex Taq™ II) を用いた Real-Time MSP 法により、p16 プロモーター領域のメチル化レベルを測定した。

(5) 免疫染色によるメチル化異常遺伝子の不活化についての解析

p16 遺伝子について、マウスモノクローナル抗体 (F-12, sc-1661, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) を用いて免疫染色 [Envision+ キット / HRP(DAB), Dako 使用] を行い、遺伝子の不活化の有無について確認した。

4. 研究成果

(1) 4-NQO 飲水 20 週後 (11 匹)、32 週後 (35 匹) のそれぞれの病変は以下の通りである (図 1)。

Incidence of tongue epithelial lesions

	Normal epithelia & Hyperplasia (%)	Mild dysplasia (%)	Moderate dysplasia (%)	Severe dysplasia & CIS (%)	SCC (%)
20w	5 (45.5)	5 (45.5)	1 (9)	0 (0)	0 (0)
32w	7 (20.0)	8 (22.9)	3 (8.6)	4 (11.4)	13 (37.1)

図 1 4-NQO 飲水 20 週後と 32 週後の舌病変の発生率

(2) DNA メチル化異常の解析

① 4-NQO 誘発ラット舌扁平上皮癌では、MSP 法において、p16 のプロモーター領域の高メチル化が検出された。4-NQO 投与開始から 20 週において、一部で前癌病変が認められ始めるが、p16 のプロモーター領域の明らかなメチル化は MSP 法では検出されなかった。4-NQO 投与後 32 週では、前癌病変から SCC において、p16 のプロモーター領域のメチル化が検出された。また、舌前方の正常粘膜においても p16 のメチル化が検出された (図 2)。

MSP analysis of p16 promoter of 4-NQO treated rat tongues After 32 weeks (normal epithelia, precancerous lesions and SCC)



図 2 4-NQO 投与後 32 週における正常上皮から前癌病変、SCC の p16 のメチル化の検出

②一方、p15、Mlh1、Cdh1 と Rassf1a のプロモーター領域におけるメチル化はすべての癌において検出されなかった (図 3)。

MSP analysis of tumor-suppressor genes in 4-NQO induced rat tongue SCC

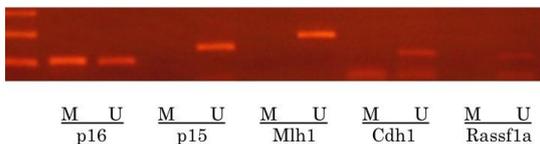


図 3 4-NQO 誘発ラット舌扁平上皮癌における MSP 法におけるメチル化の検出

③Real-Time MSP 法による p16 のメチル化レベルでは 4-NQO 投与開始から 32 週後のラット舌正常組織では、20 週後に比べて p16 のメチル化のレベルが、舌前方、後方のいずれにおいても高い結果となった (図 4)。

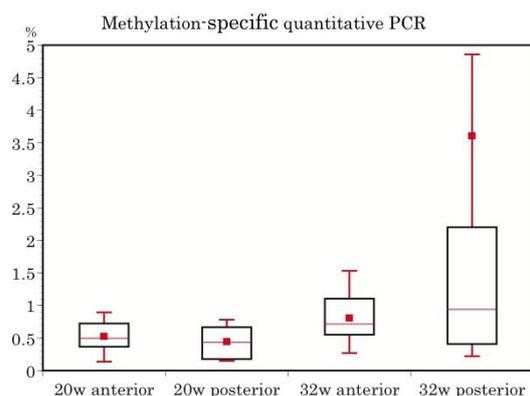


図4 Real-Time MSP 法による p16 のメチル化レベル

(4) 免疫染色によるメチル化異常遺伝子の不活化についての解析では、p16 タンパク質の発現においては、p16 の高メチル化が検出された扁平上皮癌では発現が認められなかった。しかし、メチル化が認められた前癌病変（異型上皮）や隣接する正常粘膜において、p16 タンパク質の発現の増加が認められる部位があった。

以上より 4NQO 誘発ラット舌癌モデルでは、前癌病変やその周囲組織の p16 癌抑制遺伝子のプロモーター領域のメチル化による発癌への関与が示唆されたが、ミスマッチ修復遺伝子である MLH1 など他の癌抑制遺伝子のメチル化の関与は認められなかった。今後、ヒストン修飾の関与について検討し、この口腔発癌モデルの分子生物学的解明を進めたい。

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)

[学会発表] (計 2 件)

①牧田浩樹、4NQO 誘発ラット舌癌モデルにおける遺伝子メチル化異常の解析、第 55 回(社)日本口腔外科学会総会・学術大会、2010 年 10 月 16 日～18 日、千葉、幕張メッセ

②牧田浩樹、4NQO 誘発ラット舌癌モデルにおける遺伝子変異機構の解析、第 69 回日本癌学会学術総会、2010 年 9 月 22 日～24 日、大阪、大阪国際会議場リーガロイヤルホテル

[その他]

ホームページ等

<http://www1.gifu-u.ac.jp/~oralsurg/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

牧田 浩樹 (MAKITA HIROKI)

岐阜大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：50345790

(2) 研究分担者

米本 和弘 (YONEMOTO KAZUHIRO)

岐阜大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80422731

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

柴田 敏之 (SHIBATA TOSHIYUKI)

岐阜大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：50226172

山下 知巳 (YAMASHITA TOMOMI)

岐阜大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：80345793

H21, H22：研究分担者

土井田 誠 (TOIDA MAKOTO)

岐阜大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：90313890

H21：研究分担者