

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 25 年 5 月 24 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤 C

研究期間：2010-2012

課題番号：22592211

研究課題名（和文） 4NQO 誘発ラット舌癌モデルにおけるヒストン修飾の解析

研究課題名（英文） The analysis of histone modification in 4NQO-induced rat tongue cancer model

研究代表者

米本 和弘 (KAZUHIRO YONEMOTO)

岐阜大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80422731

研究成果の概要（和文）：4NQO 誘発ラット舌癌モデルにおいて、ヒストン H3K4 トリメチル化、H3-K9 ジメチル化、トリメチル化のレベルを western blotting 法を用いて測定することにより口腔発癌モデルとしての有益性を検証することを目的とした。本研究において、4NQO 投与開始から 32 週後のラット舌扁平上皮癌において、H3-K9 ジメチル化のレベルの上昇が示唆された事より、ヒト口腔発癌モデルとしての有用性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We aim to examine the usefulness of 4-NQO induced rat tongue cancer as human oral carcinogenesis model. In order to verify whether changes in the overall level of H3K4, H3K9 histone methylation, the level of H3K4me3, H3K9me2, me3 were measured in 4-NQO induced rat tongue cancer model by western blotting. Our results suggest that the level of H3K9me2 was increased in squamous cell carcinoma of rat at 32 weeks from beginning of administration. Therefore, 4-NQO induced rat tongue cancer model is suggested the usefulness as human oral carcinogenesis model.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでの口腔癌の epigenetic な

解析において、ヒト口腔癌で *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に生じていること (Kato K, et al: J Cancer Res Clin Oncol, 2006) 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、予後にも *RECK* 遺伝子が関与している可能性を明らかにしてきた。

現在、我々は 4NQO 誘発ラット舌癌モデルを用いて遺伝子メチル化異常など epigenetic な変化の解析をすすめており、*p16* 癌抑制遺伝子が発癌過程の比較的早期にメチル化異常を生じることを見出しており、さらに *E-cadherin* など他の癌抑制遺伝子においても同様な解析を進めている最中であるが、epigenetic のもうひとつの機構であるヒストン修飾についても解析をすすめる必要性を感じている。

当初、ヒストンタンパク質のアセチル化が染色体上での転写活性に必須の修飾であり、ヒストン脱アセチル化が転写反応の不活性化を導き発がんに関与すると考えられ、染色体の活性化・不活性化の最上流に位置すると考えられてきたが、現在はヒストンのメチル化・脱メチル化が発がんにおいてより上流に位置すると考えられている。ヒストンのメチル化修飾は最近解析が飛躍的に進んでおり、ヒストン H3N 末端から 4 番目、36 番目、79 番目のリシン (H3-K4、H3-K36、H3-K79) のメチル化修飾は転写活性と関与し、H3-K9、H3-K27、H4-K20 のメチル化修飾は転写抑制に関与することが明らかになってきた。しかし、

口腔癌においては、ヒト扁平上皮癌、前癌病変における H3-K4 のモノ、ジ、トリメチル化レベルを western blotting 法にて解析した報告 (Acta Biochim Pol. 2009;56(3):405-10) などがあるのみで、詳細な解析は進んでおらず、口腔発癌におけるヒストン修飾の関与においては依然不明な点が多い。

2. 研究の目的

4NQO 誘発ラット舌癌モデルを用いて、発癌へのヒストン修飾 (ヒストンメチル化) の関与を明らかにする事により、ヒト口腔発癌モデルとしての有用性を検証することを目的とした。その結果は、今後発展すると考えられる epigenetic な異常修復を動物モデルで確認する事を可能にし、口腔癌治療に有効な口腔発癌抑制物質の新たな開発につながるものと考えられる。

3. 研究の方法

(1) 4-NQO 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た。

・グループ 1 : 20ppm 4-NQO 飲水投与群 45 匹

・グループ 2 : 非処置群 9 匹。

グループ 1 は、実験開始より 8 週間 20ppm の 4-NQO の飲水投与を行い、32 週後にラット (40 匹) を犠牲死し舌組織を採取した。舌組織は 2 分割し、一方はホルマリン固定 (病理検索用) し、一方は -80°C で凍結保存した (タンパク抽出用)。グループ 2 は、32 週後 (9 匹) に犠牲死し舌組織をグループ 1 と同様に採取・保存した。

(2) 病理組織学的検索

ホルマリン固定を行った組織はパラ

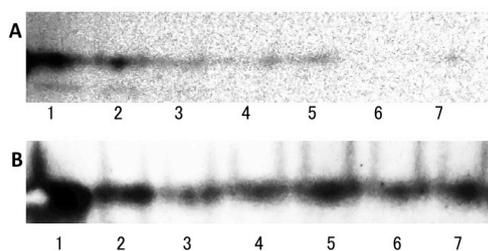
フィン包埋し、病理組織学的検索用に連続切片を作成した。病理組織学的検索には H・E 染色を行い、組織型の分類（正常粘膜、過形成粘膜、異形成粘膜{軽度・中等度・高度}、乳頭腫、早期癌、浸潤癌）を行った。

(3)western blotting 法によるヒストン修飾レベルの測定

グループ 1 から舌扁平上皮癌 (5 匹) とグループ 2 から正常舌組織 (2 匹) を採取し、これらよりタンパクを抽出した。3 種類の 1 次抗体 (抗 H3-K4me3, 抗 H3-K9me2, 抗 H3-K9me3 抗体) を用い、western blotting 法にて、H3-K4me3, H3-K9me2, H3-K9me3 を測定した。更に western blotting 法より得られたバンドの intensity を定量化するために、画像解析ソフト (Image J) を使用し、扁平上皮癌と正常組織の H3-K4me3, H3-K9me2, H3-K9me3 の発現レベルを対比・比較した。

4. 研究成果

H3-K4me3 においては、舌扁平上皮癌および舌正常組織ともに高分子量のシグナルが発現し、バンドは確認できなかった。一方、H3-K9me2 および H3-K9me3 においては下図如くバンドが確認された。(図 1)

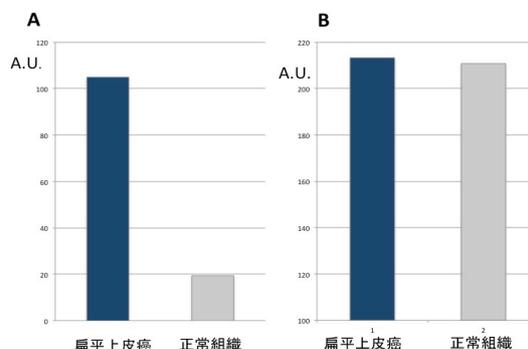


(図 1) Western Blot 法による H3-K9me2, me3 の測定

A : H3-K9 me2 B : H3-K9 me3

Lane 1~5 : 扁平上皮癌 Lane6, 7: 正常組織

これらの結果を、画像解析ソフト (Image J) を用いて解析を行ったところ、H3-K9me3 においては両者に差は認められなかったが、H3-K9me2 においては、舌正常組織と比べ舌扁平上皮癌ではジメチル化の増加が示唆された。(図 2)



(図 2) H3-K9 me2, me3 の発現レベル
A: H3-K9me2 B: H3-K9me3

以上より、4NQO 誘発ラット舌癌モデルにおいて H3-K9 ジメチル化レベルの上昇が示唆されたことにより、ヒト口腔発癌モデルとしての有用性が示唆された。今後は他の 35 匹においても同様の解析を行い、扁平上皮癌における H3-K9me2 の発現増加に有意差がある事を確認するとともに、その他のヒストンメチル化修飾 (H3-K4me1, me2, me3, H3-K9me1, me2, me3, H3-K27me1, me2, me3 など) においても解析を行っていく予定である。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[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

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

(2)研究分担者

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

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