

## 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 6 月 2 日 現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22791955

研究課題名（和文） エピジェネティクスに基づいた口腔前癌病変悪性化のメカニズムの解明

研究課題名（英文） Elucidation of epigenetic abnormalities which lead oral malignancy from oral premalignant lesion

## 研究代表者

阿部 雅修 (ABE MASANOBU)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10392333

## 研究成果の概要（和文）：

MeDIP-CGI microarray 法により口腔扁平上皮癌細胞株 2 系統（Ca9-22、HSC-2）においてプロモーター領域の高度 DNA メチル化を有する遺伝子を 324 個同定した。また脱メチル化剤を用いた遺伝子発現回復網羅的解析より上記の口腔扁平上皮癌細胞株 2 系統において 5-aza-dC 投与後に 3 倍以上上昇している遺伝子を 351 個同定した。両解析の結果から、プロモーター領域の DNA メチル化により不活化されている遺伝子を 125 個抽出した。

## 研究成果の概要（英文）：

324 of highly methylated genes at promoter region were identified by MeDIP-CGI microarray assay in oral squamous cell carcinoma cell lines (Ca9-22, HSC-2). Furthermore, the global expression levels between before and after 5-aza-dC treatment in oral squamous cell carcinoma cell lines (Ca9-22, HSC-2) were analyzed and 351 of highly up-regulated genes by the treatment were identified. Finally, 125 of silencing genes by promoter methylation were identified in oral squamous cell carcinoma cell lines.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 22 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
平成 23 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：臨床腫瘍学

## 1. 研究開始当初の背景

口腔白板症は口腔粘膜に生じた摩擦によって除去できない白色の板状あるいは斑状の角化性病変であり、臨床的あるいは病理組織学的に他のいかなる疾患にも分類されない白斑である。前癌病変として知られ、しばしば扁平上皮癌に移行し、癌化率は 17～24%

と報告される。細胞異形成の程度は口腔癌に発展するリスクファクターにはならないため、癌化を予測し得るリスクマーカーが必要とされる。また前癌病変の悪性化メカニズムの解明は治療方法や予防法を確率する上で重要であるが、未だ明らかとなっていない。しかしながら 9p21 や 3p14 の染色体欠失の報

告など悪性化との関与が疑われる知見もあり、今後の展開が期待される。ヒストン修飾と並び、エピジェネティクスの代表的かつ基本的な現象である DNA のメチル化は、発生や分化など、基本的な生命現象において重要な役割を果たす。また癌をはじめ様々な疾患と深く関わっている。特にプロモーター領域 CpG アイランドの DNA メチル化による下流遺伝子のサイレンシングは、突然変異や欠失とならび、多くの癌で遺伝子不活化の要因となっている。口腔白板症等の前癌病変においては、p16 や RARβ2 遺伝子の異常メチル化の報告があるが、既知の癌抑制遺伝子のみならず、癌化の初期に関与する新規重要遺伝子もしくは変異を探索する必要があると思われる。申請者はこれまで癌および発生学の分野においてエピジェネティクスの研究を一貫して行ってきた。中でも DNA メチル化を用いた予後マーカーの開発のプロジェクトにおいては臨床応用可能なマーカーの開発に成功した実績を持つ。また、これまで多くのサイレンシング遺伝子を同定している。以上のことからエピジェネティクスという切り口から、口腔前癌病変が癌化に向かう過程におけるリスクマーカーの同定と悪性化の鍵となる変異の同定が実現する可能性は高い。

## 2. 研究の目的

本研究ではエピジェネティクスの視点から口腔前癌病変の悪性化の指標となるリスクマーカーの開発、同時に悪性化の過程においてプロモーター領域の DNA メチル化によりサイレンシングを受ける癌抑制遺伝子の候補の同定を目的とした。

## 3. 研究の方法

正常口腔粘膜上皮の DNA と口腔扁平上皮癌 DNA におけるメチル化の差を MeDIP-CGI microarray 法を用いてゲノムワイドに探索を行った。口腔扁平上皮癌に特異的な DNA メチル化異常が得られた場合、口腔白板症粘膜上皮におけるメチル化異常の有無を解析する。フラグメントが CpG アイランドに由来する遺伝子に関しては、網羅的遺伝子発現解析を行い、プロモーター領域の DNA メチル化と発現が相関するか否かを検討する。また臨床サンプルを用いて、リスクマーカーとしての有用性を評価する。

## 4. 研究成果

MeDIP-CGI microarray法により、口腔扁平上皮癌細胞株2系統 (Ca9-22, HSC-2) においてメチル化異常が認められたCpGアイランドのフラグメントはのべ約40,000個であった。そ

のうち遺伝子のプロモーター領域 (転写開始点から5'上流300bpまでの領域) に存在するフラグメントは324個であった。

さらにプロモーター領域の DNA メチル化と発現が相関するか否かを検討するため、脱メチル化剤による遺伝子発現回復解析を行った。Ca9-22 および HSC-2 に対して 5-aza-dC を5日間投与し、Isogen および RNAeasy により RNA を抽出、1st,2nd strand の cDNA を作成、cRNA を合成、断片化を行い、Affymetrics の genechip を用いて、5-aza-dC 投与前後で、発現が回復する遺伝子を検索した。その結果、Ca9-22, HSC-2 のいずれかにおいて発現が 5-aza-dC 投与後に3倍以上上昇している遺伝子は351個であった。

そのうち MeDIP-CGI microarray 法によりプロモーター領域のメチル化が認められた遺伝子は125個であった。既知の口腔癌関連遺伝子を除外、発がんに重要と考えられる遺伝子、機能的に情報の少ない遺伝子を選択、抽出し、それら遺伝子のプロモーター領域の CpG アイランドにおいて、メチル化異常がどの程度存在するか否かを口腔扁平上皮癌細胞株5種類 (Ca9-22, HSC-2, HSC-3, HO-1-N-1, SCC-4) を用いて解析を行った。メチル化解析の方法としては Methylation-Specific PCR(MSP)法を用いた。MSP 法においては、解析を行うそれぞれの遺伝子のプロモーター領域の CpG サイトをターゲットに、メチル化 DNA 特異的プライマーおよび非メチル化 DNA 特異的プライマーを各々デザインした。プライマーが特異的であるかどうかをチェックするために、コントロールとして、メチル化 DNA (Sss1 DNA メチラーゼによって処理されたヒト DNA)、非メチル化 DNA (ゲノム DNA 増幅薬 Genomiphi によって処理されたヒト DNA) を用いた。DNA サンプルは制限酵素で断片化、Bisulfite (重亜硫酸ナトリウム) 処理による塩基置換を行った後、精製し、解析に用いた。一回の Bisulfite 処理には、信頼できる結果を得るために各々最低500ナノグラムの DNA を用いた。

現在は上記の解析において、メチル化異常が認められた遺伝子に関して手術材料を用いて解析を進めている。

## 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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

(1) 阿部雅修、森良之、西條英人、安部貴大、杉山田、古賀陽子、高戸毅 口腔前癌病変悪性化におけるエピジェネティクスを指標としたリスクマーカーのゲノム網羅的探索 第35回日本頭頸

部癌学会 愛知、2011年6月

(2)阿部雅修、森良之、西條英人、杉山円、高戸毅  
DNAメチル化異常を指標とした口腔前癌病変悪  
性化のリスクマーカーの探索 第29回日本口  
腔腫瘍学会総会・学術大会、熊本、2011年1月

〔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

阿部雅修 (ABE MASANOBU)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 10392333

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号:

