

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390468

研究課題名(和文) 口腔粘膜のゲノム酸化防御機構の解明と口腔がん予防検診への応用

研究課題名(英文) A study on the response of oral mucosa to reactive oxygen species and its application to the prevention against oral cancer.

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 9,500,000円、(間接経費) 2,850,000円

研究成果の概要(和文)：正常ケラチノサイトと口腔扁平上皮癌細胞とをROS(過酸化水素)で処理して、細胞老化機構の違いを比較すると、正常ケラチノサイトではP16(INK4a)とP21(cip1)の発現が亢進していた。正常ケラチノサイトではROSによってP16(INK4a)のプロモーター領域のメチル化レベルが低下しエピジェネティック修飾を受けていた。ROSによってメチル化酵素DNMT1発現が抑制されることがP16(INK4a)の発現亢進に寄与していた。一方、口腔扁平上皮癌細胞ではメチル化抑制もDNMT1発現抑制も見られなかった。従って口腔がんの予測因子として細胞老化のエピジェネティック修飾が重要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：In order to investigate the mechanism how reactive oxygen species (ROS) induce carcinogenesis of keratinocytes, normal human keratinocytes (NHEK) and oral squamous carcinoma cells (SCCs) were treated with hydrogen peroxide, and compared for the expressions of cellular senescence-associated molecules that is thought to be one of the tumor suppressor mechanisms. Hydrogen peroxide increased the expressions of senescence associated-beta-galactosidase and p16(INK4a) and induced the growth arrest in G0/G1 phase, in NHEK, but not SCC cells. Methylation level in p16 (INK4a) promoter was reduced with hydrogen peroxide in NHEK, but not SCCs. Methylation inhibitor 5-Azac enhanced the expression of p16 (INK4a) in NHEK, but not SCCs. The expression of DNA methyltransferase DNMT1 was suppressed in NHEK, but not SCCs. The inhibition of cellular senescence through the epigenetic modification on p16 (INK4a) expression may play an important role in carcinogenesis of keratinocytes.

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：活性酸素 口腔癌 ケラチノサイト 細胞老化 癌抑制遺伝子 エピジェネティック修飾

1. 研究開始当初の背景

舌癌をはじめとする口腔癌はそのほとんどが粘膜上皮の扁平上皮細胞(ケラチノサイト)から発生する扁平上皮癌である。がん治療のめざましい進展にもかかわらず20~30年に渡って口腔癌の生存率は改善していない。生存率改善のための1つの方策は早期がんおよび前がん病変の早期発見と口腔がんの予防である。他臓器の癌と同様に口腔癌も高齢者に多い。発がん機構の1つに、炎症等で発生した活性酸素(ROS)により細胞のDNAが酸化され、例えばゲノムに生じた8-oxo-guanineにより生じるDNA複製のミスマッチがある。従って正常細胞はROSに対する様々な防御反応を有する。正常ケラチノサイトでも酸化DNAを除去する酵素の発現がROSにより上昇する。このような防御反応の1つが細胞老化であると考えられる。細胞老化には多様な特徴が含まれるが、最も重要な特徴は不可逆的な細胞周期の停止である。正常細胞はROSによりDNAにダメージを受けても細胞老化することによってがん化を防いでいると言える。逆に言うと、がん細胞は細胞老化を回避していることが考えられる。従って口腔がんのメカニズムを理解するためにはケラチノサイトの細胞老化機構にも着目する必要がある。

2. 研究の目的

細胞に対する酸化ストレスであるROSに対する正常口腔粘膜(正常ケラチノサイト)のストレス防御機構と発がんのメカニズムを明らかにするために、正常ケラチノサイトの細胞老化機構とエピジェネティック修飾を検討する。正常ケラチノサイトと口腔扁平上皮癌細胞とを培養し、ROS(過酸化水素)で処理して、細胞老化機構、特に細胞老化マーカー発現の違いを比較し、その違いの原因を探索する。また、口腔扁平上皮癌細胞の分化程度とエピジェネティック修飾との関係を

検討し、発がん予測との関係を調べる。

3. 研究の方法

1) 過酸化水素(ROS)で処理された正常ケラチノサイト(NHEK)と口腔扁平上皮癌細胞からmRNAを分離し、DNAマイクロアレイによって発現遺伝子の相違を比較する。

2) 正常ケラチノサイト(NHEK)と口腔扁平上皮癌細胞とを過酸化水素で処理し、細胞老化マーカーSA- β -galactosidaseの発現を調べる。

3) 正常ケラチノサイト(NHEK)と口腔扁平上皮癌細胞とを過酸化水素で処理し、p53^{TP53}、p21^{cip1}、p16^{INK4a}の発現をRT-PCRおよびWestern blottingで解析する。

4) 正常ケラチノサイト(NHEK)と口腔扁平上皮癌細胞とを過酸化水素で処理し、DNAメチル化酵素DNMT1の発現をRT-PCRおよびWestern blottingで解析する。

5) 正常ケラチノサイト(NHEK)と口腔扁平上皮癌細胞とをメチル化インヒビター5-Azacで処理し、p53^{TP53}、p21^{cip1}、p16^{INK4a}の発現をRT-PCRおよびWestern blottingで解析する。

6) 正常ケラチノサイト(NHEK)と口腔扁平上皮癌細胞とを過酸化水素で処理し、p16^{INK4a}遺伝子プロモーターのメチル化レベルを解析する。

7) 分化程度の異なる口腔扁平上皮癌細胞のケラチン13遺伝子発現と同遺伝子のクロマチン修飾(ヒストン修飾)とを比較する。

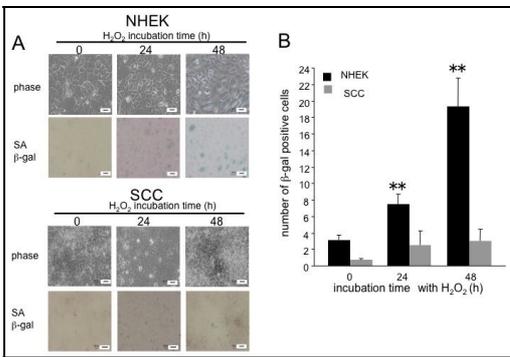
4. 研究成果

・正常ケラチノサイト(NHEK)と口腔扁平上皮癌細胞(SCC)との比較

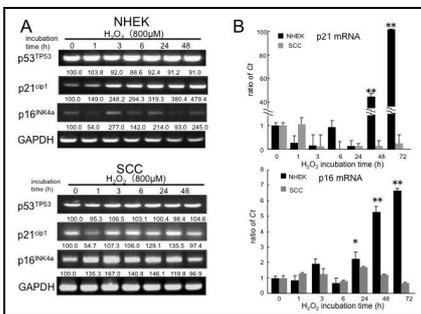
(1) DNAマイクロアレイ: 過酸化水素処理によりp21^{cip1}とp16^{INK4a}の発現はSCCよりもNHEKの方が亢進していた。

Entrez gene symbol	GeneBank accession No.	Fold change	
		NHEK	SCC
p53 (TP53)	NM_000546	0.6308215	1.2258246
p21 (CDKN1A)	NM_078467	2.7392757	1.2457686
p16 (CDKN2A)	NM_058197	1.7523187	0.940313
CDK6	NM_001259	0.4435822	1.2457686
CDK4	NM_000075	0.5053371	1.2258246
CDK2	NM_001798	0.9827361	0.9403130

(2) SA-β-galactosidase (SA-β-gal) の発現：過酸化水素処理により NHEK の SA-β-gal 発現が見られたのに対し SCC では SA-β-gal 発現が見られなかった。NHEK は ROS により細胞老化するが、がん細胞は細胞老化しないことが示された。

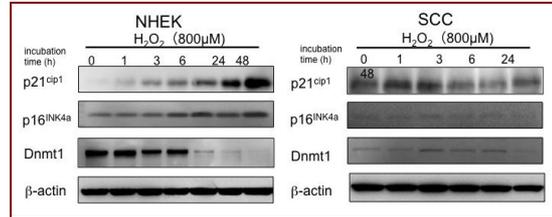


(3) p53^{TP53}, p21^{cip1}, p16^{INK4a} の発現：過酸化水素処理によって、NHEK と SCC とともに p53^{TP53} の発現に変化はなかった。しかし、p21^{cip1} と p16^{INK4a} の発現は NHEK で上昇し、SCC では変化がなかった。p21^{cip1} と p16^{INK4a} とは共に細胞老化による細胞周期停止に関与していることが報告されているため NHEK では ROS により細胞老化が生じ、SCC は細胞老化しないことを反映している。

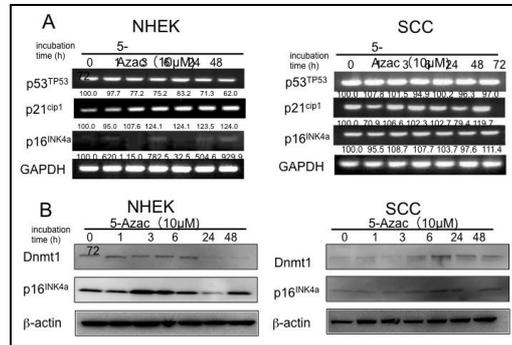


(4) DNMT1 の発現：過酸化水素処理によって NHEK の DNMT1 発現が抑制されたが、SCC の DNMT1 発現には変化がなかった。NHEK では ROS により遺伝子のメチル化レ

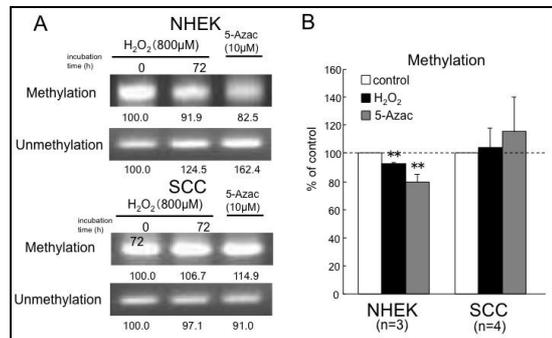
ベルが減少することが示唆された。



(5) メチル化インヒビター 5-Azac の効果：5-Azac で細胞を処理すると、NHEK では p21^{cip1} と p16^{INK4a} の発現が上昇したが、SCC では変化がなかった。ROS による p21^{cip1} と p16^{INK4a} の発現、つまり細胞老化には遺伝子のメチル化が関与していることが考えられた。

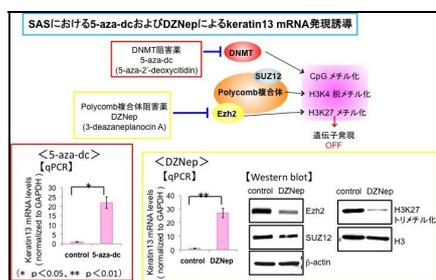
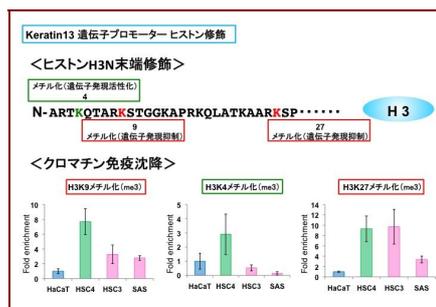


(6) p16^{INK4a} のプロモーター領域のメチル化：過酸化水素処理によって、NHEK では p16^{INK4a} プロモーター領域のメチル化レベルの低下が見られたが、SCC では変化が見られなかった。



(7) 口腔扁平上皮癌細胞 (SCC) におけるその他のエピジェネティック修飾：SCC の分化マーカーであるセラチン 13 遺伝子のクロマチン修飾を解析すると、正常セラチンサイトと比べて、SCC ではセラチン 13 遺伝子のヒストン H3N 末端 (K9, K4, K27) のメチル化

が亢進し、ケラチン 13 の発現が抑制されていることがわかった。また、Polycomb 複合体阻害薬 DZNep でがん細胞を処理することによってヒストンの脱メチル化が生じ、がん細胞にケラチン 13 遺伝子の発現を誘導できることが示された。



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)

Okamoto Y, Ohkubo T, Ikebe T, Yamazaki J. Blockade of TRPM8 activity reduces the invasion potential of oral squamous carcinoma cell lines. *Int J Oncol* 40: 1431-1440, 2012.

Ikebe T, Yamasaki K, Takamune Y, Nakayama H, Shinohara M. Reduced expression of nuclear factor κB in oral mucosa undergoing preoperative chemoradiotherapy. *Oral Science Int* 9: 33-37, 2012.

Fukawa T, Kajiya H, Ozeki S, Ikebe T, Okabe K. Reactive oxygen species stimulates epithelial mesenchymal transition in normal human epithelial keratinocytes via TGF-beta secretion. *Exp Cell Res* 318: 1926-1932, 2012.

Tanaka T, Nakayama H, Yoshitake Y, Irie A, Nagata M, Kawahara K, Takamune Y, Yoshida R, Nakagawa Y, Ogi H, Shinriki S, Ota K, Hiraki A, Ikebe T, Nishimura Y, Shinohara M. Selective inhibition of nuclear factor-κB by nuclear factor-κB essential modulator-binding domain peptide suppresses the metastasis of highly metastatic oral squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* 103: 455-463, 2012.

Ikebe T. Pathophysiology of BRONJ: Drug-related osteoclastic disease of the jaw. (review) *Oral Science Int* 10: 1-8, 2013.

Inai T, Kitagawa N, Hatakeyama Y, Ikebe T, Iida H, Fujita M. Inhibition of extracellular signal-regulated kinase downregulates claudin-2 expression and alters paracellular permeability in mouse rectum CMT93-II cells. *Tissue and Cell* 45(3):175-182. 2013.

〔雑誌論文〕(計 6 件)

〔学会発表〕(計 6 件)

〔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・口腔歯学部・教授
研究者番号：20202913

(2) 研究分担者

早川 浩 (Hayakawa Hiroshi)
福岡歯科大学・口腔歯学部・教授
研究者番号：70150422

(3) 連携研究者

鍛冶屋 浩 (Kajiya Hiroshi)
福岡歯科大学・口腔歯学部・講師
研究者番号：80177378