

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2013～2016

課題番号：25305036

研究課題名(和文)スリ・ランカにおける口腔がんの化学予防的介入研究とmiRNAによるモニタリング

研究課題名(英文)Chemopreventive intervention study and miRNA monitoring of oral cancer in Sri Lanka

研究代表者

千葉 逸朗 (Chiba, Itsuo)

北海道医療大学・歯学部・教授

研究者番号：50250460

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：口腔粘膜上皮の培養細胞に対して、betel quidの成分の一つであるarecoline剤による長期的刺激を与えることによってepigeneticな変化を引き起こす培養系を確立した。この培養細胞に対して、DNA microarrayによるmRNAを網羅的に解析し、そのデータからbioinformatics解析を行ったところ、MMP-9の発現が上昇していた。

また、スリ・ランカの紅茶園の住民約4,000人のコホートにおいて、前癌病変を有するbetel quidの常習者に対してcurcuminによる介入研究を実施した。まだ観察期間が短く、現在も半年に一度現地を訪問し、経過観察を行っている。

研究成果の概要(英文)：We have established cell culture model for analyzing epigenetic changes caused by arecoline, one of ingredients of betel quid. Using DNA microarray analysis and bioinformatics analysis, we clarified that mRNA level of MMP-9 was elevated and curcumin suppressed the mRNA level.

Chemopreventive intervention study has started in the tea estates of Sri Lanka. Because of the short period of observation, we have not got the results.

研究分野：口腔衛生学、予防歯科学、腫瘍学

キーワード：betel quid 口腔がん スリ・ランカ 介入試験 curcumin MMP-9

### 1. 研究開始当初の背景

アジアでの口腔がんについて：南アジア、東南アジアでは口腔がんが多発している。原因はこの地域で習慣となっている betel quid chewing であることが明らかとなっている。スリ・ランカをはじめ、一部の国々では感染症はある程度制御されてきており、生活習慣病などの非感染症（特にがん、心疾患、糖尿病）が大きな社会問題となっている (Fig. 1, 2)。



Fig. 1



Fig. 2

### 2. 研究の目的

betel quid chewing の習慣は経済状況が劣悪で、健康教育も不十分な庶民が行っているため、口腔がん罹患すると初期の段階で病院を受診出来ず、局所への浸潤、頸部リンパ節や遠隔転移をきたしてからようやく受診する人が多い。このような人々に対して第一次予防を目的として介入研究を行うことは社会的に有意義であり、かつ、学術的価値も高い。申請者らは 1998 年より病院ベースで curcumin を用いた介入研究を行ってきた。417 名の betel quid chewers に対して介入し、10 年にわたり経過観察を行った結果、curcumin 群では placebo 群に比較して有意に、しかも早期に病変の縮小、あるいは症状の軽減を見た。このような結果を踏まえ、スリ・ランカの紅茶園において、申請者らが口腔がんの予防効果を明らかにした抗酸化剤 curcumin を用いて大規模な介入研究を行い、口腔がんの罹患を予防し、各種バイオマーカーで追跡することが本県有の目的である。これにより学術的な価値を見出し、地域レベル、国家レベルでの社会貢献を期待できる。

### 3. 研究の方法

スリ・ランカの紅茶園の住民約 4,000 人のコホートが準備できており、スワブを用いた口腔粘膜組織の収集、生活習慣に関する聞き取り、パンフレットを用いた口腔保健教育、前癌病変を有する者に対する化学予防を行う。betel quid に含まれる slaked lime (消石灰) は強力なアルカリであり、口腔粘膜下に慢性炎症を誘発する。慢性炎症が存在することによって有効成分の吸収が効率的となり、同時に発がん物質も吸収される。慢性炎症の主役は活性酸素であり、そのスカベンジャー (抗酸化剤) を用い、炎症を抑制することにより発がん物質の吸収を抑えるというのが本研究の主眼である。そこで、すでに発がん

予防剤として知られ、現地でカレーなどに含まれているスパイスの一つで、安全性、有効性の確立している curcumin (クルクミン) を用いる。

バイオマーカーはこれまで cytochrome p-450 の遺伝子多形などについて検索してきたが、今回、慢性炎症がターゲットとなるため、新たなバイオマーカーを用いる必要がある。miRNA もその候補の一つであるが、口腔粘膜上皮の培養細胞に対して薬剤による長期的刺激を与えることによって epigenetic な変化を引き起こす培養系を確立したので、betel quid の成分を作用させて、バイオマーカーとなりうる遺伝子を見出す。

### 4. 研究成果

口腔粘膜上皮の培養細胞に対して、betel quid の成分の一つである arecoline による長期的刺激を与えることによって epigenetic な変化を引き起こす培養系を確立した。この培養細胞に対して、DNA microarray による mRNA を網羅的に解析し、そのデータから bioinformatics 解析を行ったところ、arecoline を長期作用させたものでは、細胞形態がやや紡錘形をしていたことから、細胞外基質タンパクと細胞骨格を中心に検討を行った。全遺伝子中、4 倍以上の遺伝子発現増加が認められたのは 502 遺伝子、1/2 以下

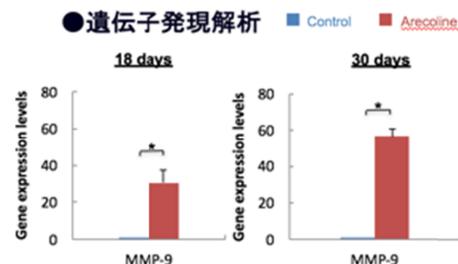


Fig. 3

の遺伝子発現低下が認められたのは 452 遺伝子であった。発現が著明に増加していたものに MMP-9 遺伝子があり、MMP-9 mRNA の発現においては経時的な上昇が確認された ( $p < 0.01$ ) (Fig. 3)。このことから MMP-9 は新たなバイオマーカーとして使用可能であることが明らかとなった。また、スリ・ランカの紅茶園の住民約 4,000 人のコホートにおいて、前癌病変を有する betel quid の常習者に対して curcumin による介入研究を実施した。まだ観察期間が短く、現在も半年に一度現地を訪問し、経過観察を行っている。

### 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 3 件)

1. Upregulated expression of MMP-9 in gingival epithelial cells induced by

- prolonged stimulation with arecoline. Uehara O. (1), Takimoto K., Morikawa T., Harada F., Takai R., **Matsuoka H. (6)**, Muthumala M., **Chiba I. (14)**, **Abiko Y. (15)** (15名) Oncology Letter, 査読有, 2017( in press)
- DNA hypermethylation of extracellular matrix-related genes in human periodontal fibroblasts induced by stimulation for a prolonged period with lipopolysaccharide derived from Porphyromonas gingivalis. Takai R., Uehara O. (2), Harada F., Utsunomiya M., **Chiba I. (9)**, **Abiko Y. (10)** (10名). J Periodontal Res. , 査読有, 2016 Aug;51(4):508-17. doi: 10.1111/jre .12330. Epub 2015 Nov 9. PMID: 26548368 2015-2016
  - アジアにおけるベテル嚙みの習慣と口腔がんの発生及びその予防. **千葉逸朗**, 杉浦千尋、小野寺麻記子 (3名) 北海道公衆衛生学雑誌, 査読有, 28(2), 2015, 27-36,  
〔学会発表〕(計8件)
  - Chiba, I.** "Oral Cancer Prevention in Sri Lanka." 2<sup>nd</sup> Annual World Congress of Oral & Dental Medicine, 2015.11.2, Dalian (中国)
  - Uehara, O. Morikawa, T. Adhikari, B. Harada, F. Yoshida, K. Ssato, J. Matsuoka, H. Nishimura, M. **Abiko Y.** and **Chiba, I.** Arecoline induces upregulated expression of MMP-9 in gingival epithelial cells. JADR2015, 2015.10.30, 福岡国際会議場 (福岡県福岡市)
  - Takai, R. Harada, F. Utsunomiya, M. Chujo, T. Uehara, O. Yoshida, K. Sato, J. Nishimura, M. **Chiba, I.** and **Abiko, Y.** DNA hypermethylation of Klotho gene by LPS derived from *P. gingivalis*. JADR2015, 2015.10.30, 福岡国際会議場 (福岡県福岡市)
  - 植原 治、瀧本紘佑、宮本一央、原田文也、小野寺麻記子、杉浦千尋、永易裕樹、**安彦善裕**、**千葉逸朗** アレコリン長期刺激による歯肉上皮細胞の MMP-9 発現の上昇. 第 60 回公益社団法人日本口腔外科学会総会・学術大会, 2015.10.16, 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)
  - 森川哲郎、植原 治、高井理衣、吉田光希、佐藤 惇、**松岡益史**、尾立達治、川上智史、**千葉逸朗**、**安彦善裕** 嚙みタバコ主成分による口腔粘膜上皮への影響. 第 8 回口腔検査学会総会・学術大会, 2015.10.3 神奈川歯科大学 (神奈川県横

- 須賀市)
- 高井理衣、植原 治、原田文也、宇津宮雅史、中條貴俊、吉田光希、佐藤 惇、西村学子、**千葉逸朗**、**安彦善裕** LPS 長期刺激による細胞外マトリックス関連遺伝子の DNA メチル化解析. 第 57 回歯科基礎医学会学術大会, 2015.9.11, 朱鷺メッセ (新潟県新潟市)
  - 高井理衣、原田文也、宇津宮雅史、中條貴俊、植原 治、吉田光希、佐藤 惇、西村学子、**千葉逸朗**、**安彦善裕** LPS 長期刺激による老化関連遺伝子の DNA メチル化解析. 第 104 回日本病理学会総会, 2015.4.30, 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)
  - 森川哲郎、植原 治、Adhikari, B.、原田文也、高井理衣、中條貴俊、佐藤 惇、西村学子、**千葉逸朗**、**安彦善裕** アレコリンによる歯肉上皮細胞の遺伝子発現の網羅的解析. 第 26 回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会, 2015.4.30, 北海道大学 (北海道札幌市)  
〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 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 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
- 研究代表者  
千葉逸朗 (CHIBA, Itsuo)  
北海道医療大学歯学部・教授  
研究者番号：5 0 2 5 0 4 6 0
  - 研究分担者  
安彦善裕 (ABIKO, Yoshihiro)  
北海道医療大学歯学部・教授

研究者番号： 5 0 5 9 8 0 9 2

松岡紘史 (MATSUOKA, Hirofumi)

北海道医療大学歯学部・講師

研究者番号： 9 0 2 6 0 8 1 9

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )