

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462867

研究課題名(和文) 多発性口腔扁平上皮癌におけるDNAメチル化に関する研究

研究課題名(英文) Investigation of DNA methylation in the multiple oral squamous cell carcinomas

研究代表者

嶋 香織 (Shima, Kaori)

鹿児島大学・医学域歯学系・助教

研究者番号：10343526

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：鹿児島大学病院口腔外科で2001年から2010年の期間に口腔癌(上皮内癌含む)の治療を受けた症例は、438症例であった。そのうち、同時性及び異時性多発の扁平上皮癌は27例に認められた。この27例の内訳は、男性11例、女性16例で、初発時年齢は55歳から92歳で、平均年齢は71.5歳であった。発生部位の数は2から7で、平均は3.2部位であった。これらのうち、3例は浸潤癌の治療のために放射線照射を受けており、照射野に含まれた粘膜由来の扁平上皮由来と考えられた。これらの症例について領域発がんの観点から、癌組織におけるDNAのメチル化について検索中である。

研究成果の概要(英文)：We have been investigating DNA methylation of the promoter region of tumor suppressor genes in the multiple oral squamous cell carcinomas with the concept of field cancerization. The twenty-seven multiple oral squamous cell carcinomas were picked up from among the 438 primary oral squamous cell carcinomas from our institutional pathology records. The three cases were suspected radiation for the primary lesion induced second carcinoma at other site.

研究分野：口腔病理学

キーワード：口腔扁平上皮癌 多発癌 メチル化 エピジェネティクス 前癌病変 領域発がん

## 1. 研究開始当初の背景

口腔扁平上皮癌発生の危険因子として過度の喫煙や飲酒の習慣、劣悪な口腔衛生状態などが代表的なものとして挙げられる。従って、口腔扁平上皮癌はこれまで、中高年以降の男性での発生率が高いとされてきた。しかしながら、近年では、喫煙や飲酒の習慣のない女性における口腔扁平上皮癌の発生率が徐々に上昇している (Oral Precancer, Thomson, 2012)。さらに、高齢者女性の発生例の中で、口腔内での多発癌、あるいは他臓器との多重癌症例が増加している。

口腔扁平上皮癌は、多臓器の癌と同様、多段階発生すると考えられているが、その過程は、多数の研究結果が発表されているにもかかわらず、ほとんど明らかにされておらず、大腸腺癌における、APC、p53 や KRAS のような critical な分子あるいは pathway は、いまだ発見されていない。一方で、口腔扁平上皮癌は日常臨床経験的な evidence として「前癌病変」を経て癌化するという一般的な概念が浸透しており、多発性口腔扁平上皮癌発生においては、1953 年に Slaughter が提唱した、"field cancerization" の概念 (Slaughter, *et al.*, Cancer, 1953) が、広く受け入れられている。これを受けて、Braakhuis らは、1990 年代より今日まで、多発性口腔扁平上皮癌における染色体上の特定領域の LOH を報告し、多発癌発生のモデルを提唱している (Braakhuis, *et al.* The Oncologist, 2005)。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究は、口腔内に同時性、異時性に発生した多発 (重複) 性重層扁平上皮癌において、各病変部での epigenetic 変化 (DNA メチル化) を検索し、その発生機序や予後との関係を明らかにすることを目的とする。

本研究では、発生例が少ないため、まだ明らかとされていない多発性口腔扁平上皮癌症例の epigenetic 変化について、以下の仮説を検討する。多発性口腔扁平上皮癌症例では、1) 単発例と比較し Genome DNA の hypomethylation が見られる、2) 病変および病変のない口腔粘膜に共通した Genome DNA の hypomethylation、癌抑制遺伝子や転写制御因子の CpG island methylation が見られる、3) DNA メチル化は、独立した予後関連因子である。

(2) データベースの構築の途中、浸潤癌に至らない上皮内癌症例が、近年の症例中、割合が増加していた。早期発見が可能になった背景があるが、それと同時に、上皮内癌やその前段階である上皮異形成が、口腔内に多発する症例が漸増しつつある。これらの症例は、浸潤癌へと移行していくが、その経過は症例ごとに異なる。口腔扁平上皮癌の早期発見の観点から、診断基準の確立、バイオマーカー

の探索のための研究やエビデンスの共有が求められている。我々も日常的に行う形態診断の他に、これらの病変に特異的なマーカーの検索や、その発現を評価しクライテリアを確立することが早急の課題だと考えられた。

## 3. 研究の方法

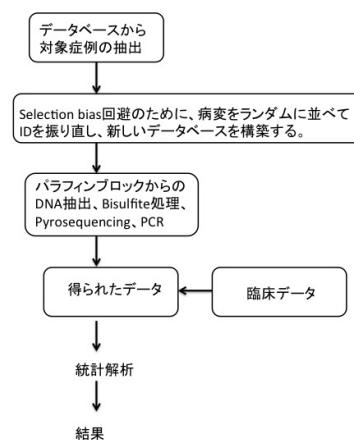
(1) 多発性口腔扁平上皮癌組織における epigenetic 変化 (DNA メチル化) の検索を以下のように行う。

鹿児島大学病院口腔外科で口腔扁平上皮癌と診断され治療を行った症例の抽出。

パラフィンブロックが入手可能な症例の腫瘍組織および周囲の正常組織から DNA を抽出し、bisulfite 処理をする。

LINE-1 のメチル化と癌抑制遺伝子のプロモーター領域のメチル化を定量的に検索する。

データベースを整備 (病理組織データと臨床データ、実験結果の統合) し、分析モデルの構築と統計学的解析を行う。



(2) 口腔粘膜の発がんとその進展について検索する目的で、口腔扁平上皮癌の初期病変及び前駆病変として、口腔粘膜の上皮異形成、上皮内癌、初期浸潤癌と診断された 170 症例で、日常病理診断にルーチンで用いている cytokeratin13、cytokeratin17、Ki-67、TP53 の病変部と正常粘膜部での発現パターンの相違と発現境界の有無を再評価し、HE 所見の構造異型、細胞異型および境界形成を比較検討した。

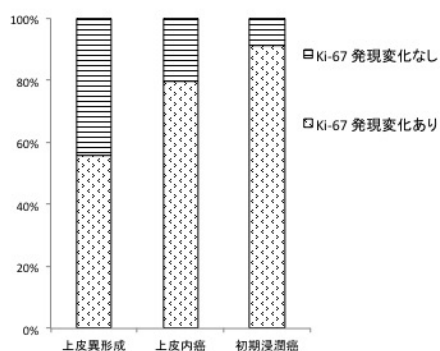
## 4. 研究成果

(1) 鹿児島大学病院口腔外科で 2001 年から 2010 年の期間に口腔癌 (上皮内癌含む) の治療を受けた症例は、438 症例であった。そのうち、同時性及び異時性多発の扁平上皮癌は 27 例に認められた。この 27 例の内訳は、男性 11 例、女性 16 例で、初発時年齢は 55 歳から 92 歳で、平均年齢は 71.5 歳であった。

発生部位の数は2から7で、平均は3.2部位であった。これらのうち、3例は浸潤癌の治療のために放射線照射を受けており、照射野に含まれた粘膜由来の扁平上皮由来と考えられた。これらの症例について領域発がんの観点から、癌組織におけるDNAのメチル化について、本学医歯学総合研究科の倫理委員会の承認を受けて検索中である。

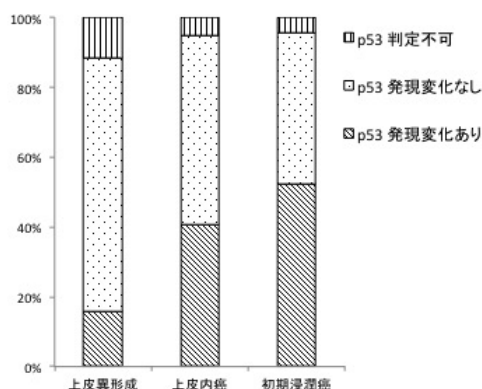
しかし、当初に計画していた臨床データの約半数で、初期治療時のTNM分類などの基本的な臨床データ及び予後データの蓄積がなされていない、あるいはデータが失われている症例が多数、存在することが、研究開始後に明らかとなり、分析モデル構築が困難となった。本研究の開始時と同時期に、前向きに新規症例の臨床情報収集を開始した経緯があり、計画の遂行は大幅に遅れている。

(2) 上皮内癌の検索例全例において、病変部で4つのマーカーの発現変化が見られ、上皮異形成では72%に見られた。多発性癌の症例では、部位や発生時期が異なっても、同一症例においては、マーカーの発現変化は全く同様に認められた。Ki-67は、正常口腔粘膜上皮では傍基底細胞層に一層、発現が見られるが、病変部では、基底細胞から数層にわたって発現が見られるのが特徴で、このような発現変化を認める上皮内癌、上皮異形成症例の割合が80%で、非常に感度が高いことが分かった(図1)。一方では、腫瘍性病変以外の炎症などの反応性の粘膜病変でも、Ki-67の発現変化が見られることがあり、判定には注意を要すると考えられた。



(図1)

口腔及び咽頭の扁平上皮癌で高頻度に変異の認められるTP53は、上皮異形成では18%、CISでは40%、初期浸潤癌では50%で正常粘膜上皮との発現境界が認められた。これらの症例はメチル化ではなく、遺伝子変異を反映していると考えられた。多発症例では、TP53の発現変化は症例によって異なっていた(図2)。



(図2)

## 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 3 件)

嶋香織、仙波伊知郎 診療領域別特別プログラム研究講演会 15 口腔癌の前駆・初期病変の病理診断—組織学的特徴と診断クライテリア「口腔粘膜上皮内病変における免疫組織化学染色の評価」. 第 105 回日本病理学会総会 2016.5.14 仙台国際センター会議棟・展示棟、宮城県仙台市

嶋香織、楠山譲二、比地岡浩志、仙波伊知郎、肉芽腫性リンパ節炎を併発した舌扁平上皮癌の 1 例. 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

新田哲也、松井竜太郎、坂元亮一、今村晴幸、浜田倫史、山口孝二郎、上川善昭、嶋香織、杉浦剛 口腔内の第三がんとして発生した舌背部扁平上皮がんの 1 例. 第 27 回日本口腔診断学会・第 24 回日本口腔内科学会合同学術大会 2014.9.9 九州大学医学部 百年講堂、福岡県福岡市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6．研究組織

(1)研究代表者

嶋 香織 ( SHIMA Kaori )

鹿児島大学・医歯学域歯学系・助教

研究者番号：10343526

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし