

令和 元年 5 月 24 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2014～2018

課題番号：26305035

研究課題名(和文) 東南アジアの噛みタバコ習慣と口腔粘膜DNAメチル化異常の擦過標本による検討

研究課題名(英文) Study on the DNA methylation status of oral mucosa affected by the betel quid chewing habit using the swab samples in south Asia

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、口腔癌発生におけるDNAメチル化異常の関与を明らかにするために、噛みタバコの習慣による病変のDNAメチル化異常を口腔粘膜擦過標本にて検証した。本研究の大前提となる擦過標本の正確性を検証するために擦過標本と組織標本との相関性を検討した所、両標本でほぼ同等であった。口腔癌症例において採取された擦過標本を解析した所、p16、MGMTともに陽性率10%を示した。口腔癌患者の血清中のメチル化異常DNA断片を検索した所、p16で高率に観察され、マーカーとして有望と考えられた。また、DNAメチル化異常はp53遺伝子変異を観察する前段階で観察され、早期発見に有望と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、口腔癌の発生機序におけるDNAメチル化異常の関与を明らかにするために、噛みタバコの習慣による口腔癌・前癌病変の多発する東南アジアを含むフィールドでDNAメチル化異常を口腔粘膜擦過標本にて検証した(最終的な目標は、前癌病変(状態)を擦過標本で検出することを遠望している)。その結果、癌病変の擦過標本で組織標本と同等の(相関性のある)DNAメチル化異常が検出された。また、種々のDNAメチル化異常はp53遺伝子変異を観察する前段階で観察され、口腔粘膜の擦過標本のDNAメチル化異常の検索が、口腔癌・口腔前癌病変の早期発見に有用と考えられた。

研究成果の概要(英文)：To reveal the DNA methylation status of oral mucosa affected by the betel quid chewing habit using the swab samples in south Asia, we carried out the analysis of lesions in in betel quid chewers. Firstly, we evaluated the swab sample accuracy using swab and tissue samples in promoter region of p16 and MGMT so on. DNA methylation status was well correlated between swab and tissue samples. Then, we analyzed DNA methylation status of Taiwan swab samples using pyrosequencing method focused on p16 and MGMT. 10% samples of oral cancer patients indicated positive. Furthermore, we examined the methylation positive of p16 in cancer patients and detected it in high ratio (almost 100%). These results possibly suggested the usefulness of p16 analysis as a biomarker in oral cancer.

研究分野：外科系歯学

キーワード：口腔 粘膜病変 メチル化異常 東南アジア

1. 研究開始当初の背景

周知の如く、東南アジア地域の多くの国々では、噛みタバコの習慣(Betel chewing)により、口腔癌が多発し、全癌の20~30%を占め大きな社会問題となっている。一方、この発癌機序については、疫学・病理組織学的研究にとどまり、分子疫学的検討は未開の分野となっている。我々は、これまで東南アジア地域のスリランカにて口腔癌における genetic な変化を明らかにするために海外研究を展開し、噛みタバコの習慣を有する症例の前癌病変(白板症、粘膜下線維症)および癌病変(約500症例)の検体から、癌抑制遺伝子 p53 の変異が Exon 5 に集中する他に類を見ない特徴を持つが、前癌病変には認められず、単純な1つの p53 の mutation で発癌に到る訳では無いことを示して来た(Oncogene 1998, Int. J. Cancer 1999)。また、血球 DNA の解析により、ニトロソアミン類活性化酵素 CYP2A6 と活性化ニトロソアミン類代謝酵素 GSTM1 の個体差(SNPs)が、口腔癌の発症に重要な背景因子となっていることも示して来ている(Carcinogenesis 2002)。

一方、最新の知見では、先に述べた癌の発生・悪性化進展に遺伝子の変異や欠失などの genetic な変化の蓄積以外に、DNA メチル化異常(hypermethylation)の様な遺伝子配列に異常を示さない epigenetic な変化も発癌要因として重要な役割をしていることが示されて来ている。即ち、細胞周期調節遺伝子(p16INKA4, p57KIP2, etc)、DNA 修復遺伝子(MGMT, hMLH1 etc)、アポトーシス関連遺伝子(TMS1, CASP8, APAF-1, etc)などのプロモーター領域のメチル化異常により各々の遺伝子発現が不活化され、癌化が促進されるものと考えられている。また、これら DNA メチル化異常は、genetic な変化とは異なり脱メチル化によって修復可能な変化であること、発癌の先駆的な Biomarker となり得る可能性も示されつつある。事実、我々の検討でも、ヒト口腔癌(国内例)55例について検索した所、p16INKA4では28例(50.9%)、MGMTでは31例(56.4%)に異常を観察し、また、同一症例の病理学的に非病変部粘膜においても p16INKA4では37.5%、MGMTでは60.0%と高率に周辺「正常」組織にもメチル化異常が生じていることも示されている(J Cancer Res Clin Oncol. 2006)。さらに、メチル化異常は生活習慣(タバコ・アルコール etc)によっても生じ、国内の擦過標本の解析から口腔病変発症における先駆的な変化を検知する Biomarker となり得る可能性を報告して来ている。しかしながら、口腔粘膜においてメチル化異常が検出された場合、それが、どの程度の発癌のリスクを示すかの評価は母集団の関係もあり正確には評価し切れていないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では、噛みタバコの習慣にて白板症~口腔癌の多発する東南アジアをフィールドとして、この習慣に暴露されている口腔粘膜から『擦過標本』を経時的に採取・分析し、噛みタバコが口腔粘膜の DNA メチル化異常に及ぼす影響と病変発症との関連を明らかにする。また、メチル化異常の検索が口腔粘膜の健康度を測る Biomarker となり得るかを検証し、口腔がん予防対策への応用を検討する。特に重要な点は、『擦過標本』を用いた病変発症前の DNA メチル化異常の頻度を検索する事(病変発症前の方から組織標本は得られない)にあり、これをがんや白板症などの病変を持つ方と比較し、病変発症前の DNA メチル化異常の意義を明確化する点にある。さらに、『擦過標本』であるため母集団の規模拡大が容易であり、確度の高い結果を得ると考えられる。そこで、本研究では、噛みタバコの習慣者で病変の無い者、白板症症例、癌病変例を対象として、口腔癌で高率に検出している p16INKA4、MGMT 遺伝子プロモーター領域のメチル化異常を Target に、噛みタバコ習慣者の口腔粘膜メチル化異常、白板症および周囲健常部におけるメチル化異常、口腔がんおよび周囲健常部におけるメチル化異常を調査し、「ヒト口腔病変・がん発症過程に於けるメチル化異常の意義」の解明を目指す。また、擦過標本と組織標本の相関性についても病変組織標本と比較検討する。遠望として本研究により、メチル化異常の検出が口腔病変発症の先駆的な Biomarker(予知因子)となることが示されれば、口腔健康増進における啓蒙的意義があると考えられる。

3. 研究の方法

本研究では、噛みタバコの習慣者で病変の無い者、白板症症例、癌病変例を主たる対象として、口腔癌で高率に検出している p16INKA4、MGMT 遺伝子プロモーター領域のメチル化異常を指標に、噛みタバコ習慣者の口腔粘膜、白板症、口腔癌および周囲健常部におけるメチル化異常の頻度を調査し、「ヒト口腔癌発症過程に於けるメチル化異常の意義」の解明を目指す。また、病変組織標本のあるものでは擦過標本と比較し、擦過標本の信頼性を検証する。

・調査・分析対象

・臨床サンプルの収集

各ケースにおいて以下の基本情報を共通項目として記録収集し data 化する

基本情報:

・噛みタバコの習慣の状況

サンプル採取対象者および対象疾患:

・噛みタバコ習慣者(病変の診られない者)

- ・ 白板症症例・粘膜下線維症
- ・ 口腔癌症例

対象疾患別サンプル分析方法

白板症

- ・ 初診時生検標本の一部と擦過サンプル
- ・ 口腔粘膜全体（各部位）より得られる擦過サンプル
- ・ 経時的擦過サンプル（経過観察例および切除後の経過観察例）

口腔がん症例

- ・ 初診時生検標本の一部と擦過サンプル
- ・ 切除標本にて病理組織学的に確認される病変部・非病変部の組織
- ・ 口腔粘膜全体（各部位）より得られる擦過サンプル

DNA メチレーション分析

p16INKA4, MGMT 遺伝子のメチル化異常(hypermethylation)については DNA の抽出を QIAamp DNA Micro kit (Qiagen) にて行い、メチル化については pyrosequence 法にて定量化して網羅的に p16, MGMT の promotor 領域の hypermethylation を検討する。
(パイロシーケンスの primer には以下のものを用いた)

Table 1. Targets CpG islands and the primers for pyrosequencing

Gene	Primer	Size(bp)
P16	Forward	5'-AGGGGTTGGTTGTTATTAG-3'
	Biotinylated-reverse	5'-CTACCTACTCTCCCCCTCTC-3'
	Sequencing primer	5'-GGTTGGTTATTAGGGGT-3'
MGMT	Forward	5'-GTTTAGGATATGTTGGATAGT-3'
	Biotinylated-reverse	5'-CCACCCAAACACTCACCAAAT-3'
	Sequencing primer	5'-GTTGGGATAGTTAGAGTTTAAAGAA-3'
RECK	Forward	5'-GTTTAGGGAGGTTTGGAAATAT-3'
	Biotinylated-reverse	5'-CCCCCACCCCTTAACTAACT-3'
	Sequencing primer	5'-GGAAATATTGTAGGTAGG-3'

4. 研究成果

本研究では、口腔癌の発生機序における DNA メチル化異常の関与を明らかとするために、喫みタバコの習慣にて白板症～口腔癌の多発する東南アジアをフィールドとして、口腔粘膜の DNA メチル化異常と病変発症との関連性を検証することを目的としている。本研究では、喫みタバコの習慣者で病変の無い者、白板症症例、癌病変例を主たる対象として、口腔癌で高率に検出している p16INKA4, MGMT 遺伝子プロモーター領域のメチル化異常を癌病変、前癌病変（白板症）において解析した。

(1) 擦過標本の信頼性の評価

このために、国内口腔癌で高率に検出している p16INKA4, MGMT 遺伝子プロモーター領域のメチル化異常を Target に擦過標本と組織標本との相関性(擦過標本の信頼性)を検討した。擦過標本と組織標本間の相関性については、擦過標本と組織標本において、pyrosequence 法にて相関係数 0.6 前後と一定の相関性を観察し、両者はほぼ同等の頻度でメチル化異常が検出された。尚、MGMT の検出頻度は p16 に比べ低値であった。また、その他の当初の検索対象項目であった細胞周期調節遺伝子 p57KIP2), DNA 修復遺伝子 (hMLH1)、アポトーシス関連遺伝子(TMS1, CASP8, APAF-1) 及び RECK では、検出頻度が低く信頼性・相関性にも乏しい結果であった。これらのことより口腔癌・前癌病変の DNA メチル化異常の評価には p16INKA4 および MGMT に的を絞ることが重要と考えられた (p16 では同一症例における病変部および対側(健常側)から得られた擦過標本から DNA を抽出しパイロシーケンス法にて CpG-1 から CpG-6 の範囲で網羅的な検索を行った)。

(2)上記の結果を基に、擦過標本をパイロシーケンス法にて解析した所、p16INKA4, MGMT とともに陽性率 10%程度であった。この結果は、これまでにバンド法を用いて行ってきた結果であるヒト口腔癌(国内例)のメチル化異常陽性率 p16INKA4 50.9%、MGMT 56.4%に比べ低値であった。また、同一症例の病理学的に非病変部粘膜においても p16INKA4 では 37.5%, MGMT では 60.0% と高率に周辺「正常」組織にもメチル化異常が生じていたことに比べても低値であった。さらに、前癌病変である白板症を異型度とメチル化異常の関連を解析したところ、p16 のメチル化異常が mild dysplasia で 12/29(41.1%) severe dysplasia で 10/20(50%), 扁平上皮癌 16/29(55.2%)と移行的な頻度の増加を観察した結果に比べても DNA メチル化異常の頻度・陽性率は低値であった。本来、感度が高いはずであるパイロシーケンス法においてバンド法に比べ低値である理由について、サンプル採取の問題とこれまでのバンド法における false positive がかなり混在しているも可能性が考えられた。

(3)DNA. 血清中のメチル化異常 DNA 断片の検索

本研究の過程において得られた口腔癌患者の血清を用い、血清中のメチル化異常を示す DNA 断片の検索を目的に同一症例における血清および癌組織から DNA を抽出し検討した所 p16 では原発組織 21 例中 20 例にメチル化異常が検出され、血清では 21 例中 14 例で検出された。

尚，血清では5例が正常・異常ともに検出されておらず，血清で異常が検出された14例では何れも組織で異常が検出されていた。これらの事からも口腔癌において p16 の DNA メチル化異常を検索する意義は高いと推察された。

(4) DNA メチル化異常の生じる時期と検出意義

口腔癌で発現頻度の最も高かった p16 を用いて，口腔癌，前癌病変である白板症を解析した所，mild dysplasia，severe dysplasia，扁平上皮癌と順次 p16 の DNA メチル化異常の頻度が病変の程度に応じて高くなっているのが観察された。また，p53 の遺伝子変異と比較すると，p53 の変異のあるものでは p16 の DNA メチル化異常が観察され，p53 の変異が観察されないものの中にも p16 の DNA メチル化異常が散見された。この結果については，更なる検証が必要であるが，p53 遺伝子異常に先立って DNA メチル化異常が生じている，即ち，DNA メチル化異常が癌化に先立って生じている可能性を示唆し，先の血清中 DNA メチル化異常と合わせて口腔粘膜病変の評価として有用な Biomarker となると推察された。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 12 件)

Islam S, Muthumala M, Matsuoka H, Uehara O, Kuramitsu Y, Chiba I, Abiko Y. How Each Component of Betel Quid Is Involved in Oral Carcinogenesis: Mutual Interactions and Synergistic Effects with Other Carcinogens-a Review Article. *Curr Oncol Rep*. 2019 Apr 26;21(6):53. 査読あり
doi: 10.1007/s11912-019-0800-8. Review.

Inoue Keisuke, Hatano Kiichi, Hanamatsu Yuki, Saigo Chiemi, Kito Yusuke, Bunai Katsuaki, Shibata Toshiyuki, Takeuchi Tamotsu. Pathobiological role of cleft palate transmembrane protein 1 family proteins in oral squamous cell carcinoma. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 145, 851-859, 2019. 査読あり
doi: 10.1007/s00432-019-02843-0

Islam Shajedul, Abiko Yoshihiro, Uehara Osamu, Chiba Itsuo. Sirtuin 1 and oral cancer (Review) *Oncology Letters in press* 2018
doi: 10.3892/ol.2018.9722

Bunai Katsuaki, Okubo Hiroshi, Hano Kimika, Inoue Keisuke, Kito Yusuke, Saigo Chiemi, Shibata Toshiyuki, Takeuchi Tamotsu. TMEM207 hinders the tumour suppressor function of WWOX in oral squamous cell carcinoma. *J. Cellular and Molecular Medicine* 22, 1026-1033, 2018. 査読あり
doi: 10.1111/jcmm.13456

Chiba Takahiro, Ishisaki Akira, Kyakumoto Seiko, Shibata Toshiyuki, Yamada Hiroyuki, Kamo Masaharu. Transforming growth factor- β 1 suppresses bone morphogenetic protein-2-induced mesenchymal epithelial transition in HSC-4 human oral squamous cell carcinoma cells via Smad1/5/9 pathway suppression. *Oncol Rep*. 37, 713-720, 2017. 査読あり
doi: 10.3892/or.2016.5338

Nakashima Takayuki, Tomita Hiroyuki, Hirata Akihiro, Ishida Kazuhisa, Hisamatsu Kenji, Hatano Yuichiro, Kanayama Tomohiro, Niwa Ayumi, Noguchi Kei, Kato Keizo, Miyazaki Tatsuhiko, Tanaka Takuji, Shibata Toshiyuki, Hara Akira. Promotion of cell proliferation by the proto-oncogene DEK enhances oral squamous cell carcinogenesis through field cancerization. 査読あり
Cancer Med. 6, 2424-2439, 2017.
doi: 10.1002/cam4.1157

Ishida Kazuhisa, Tomita Hiroyuki, Nakashima Takayuki, Hirata Akihiro, Tanaka Takauji, Shibata Toshiyuki, Hara Akira. Current mouse models of oral squamous cell carcinoma: Genetic and chemically induced models. *Oral Oncol*. 73 16-20, 2017. 査読あり
doi: 10.1016/j.oraloncology.2017.07.028

Adhikari BR, Uehara O, Matsuoka H, Takai R, Harada F, Utsunomiya M, Chujo T, Morikawa T, Shakya M, Yoshida K, Sato J, Arakawa T, Nishimura M, Nagayasu H, Chiba I, Abiko Y. Immunohistochemical evaluation of Klotho and DNA methyltransferase 3a in oral squamous cell carcinomas. *Med Mol Morphol*. 2017. 査読あり
doi: 10.1007/s00795-017-0156-9.

Takai R, Uehara O, Harada F, Utsunomiya M, Chujo T, Yoshida K, Sato J, Nishimura M, Chiba I, Abiko Y. DNA hypermethylation of extracellular matrix-related genes in human periodontal fibroblasts induced by stimulation for a prolonged period with lipopolysaccharide derived from Porphyromonas gingivalis. J Periodontol Res. 51 508-517 2016. 査読あり
doi: 10.1111/jre.12330.

Noro D, Kurashige Y, Shudo K, Takahashi A, Abiko Y, Saitoh M. Effect of epithelial cells derived from periodontal ligament on osteoblast-like cells in a Transwell membrane coculture system. Arch Oral Biol. 60 1007-1012, 2015. 査読あり
doi: 10.1016/j.archoralbio.2015.02.016

Uehara O, Abiko Y, Saitoh M, Miyakawa H, Nakazawa F. Lipopolysaccharide extracted from Porphyromonas gingivalis induces DNA hypermethylation of runtrelated transcription factor 2 in human periodontal fibroblasts. J Microbiol Immunol Infect. 47(3) 176-181, 2014. 査読あり
doi: 10.1016/j.jmii.2012.08.005.

Kamino Y, Kurashige Y, Uehara O, Sato J, Nishimura M, Yoshida K, Arakawa T, Nagayasu H, Saitoh M, Abiko Y. HBD-2 is downregulated in oral carcinoma cells by DNA hypermethylation, and increased expression of hBD-2 by DNA demethylation and gene transfection inhibits cell proliferation and invasion. Oncol Rep 32(2) 462-468, 2014. 査読あり
doi: 10.3892/or.2014.3260.

[学会発表](計 8 件)

Toshiyuki Shibata

Hypermethylation status of oral cancer and Dental pulp stem cell biology as a new resource for the regenerative medicine

第 27 回台湾顎顔面口腔外科学会学術大会 (招待講演)
2015 年 台北市 (台湾)

中島教行, 富田弘之, 原明, 柴田敏之

腫瘍性タンパク DEK は扁平上皮がんの腫瘍増殖と悪性への形質転換を促進する
第 75 回日本癌学会学術総会 2016 年 パシフィコ横浜 (横浜市)

中島教行, 吉田浩明, 米本和弘, 加藤恵三, 牧田浩樹, 柴田敏之

口腔扁平上皮癌における DEK 発現の検討
第 71 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会 2017

武内勝章, 井上敬介, 波野公香, 柴田敏之

新規標的遺伝子 TMEM207 の役割とその機能解析および, in situ PLA 法を用いた病理組織標本上における分子間相互作用の視認化の可能性
第 28 回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会 2017

武内勝章, 牧田浩樹, 加藤恵三, 米本和弘, 畠山大二郎, 柴田敏之

口腔扁平上皮癌における新規標的タンパク TMEM207 の役割とその機能解析
第 62 回日本口腔外科学会総会・学術大会 2017

波野 公香, 武内勝章, 井上敬介, 米本和弘, 加藤恵三, 柴田敏之

口腔扁平上皮癌の浸潤・増殖における C1qTNF6 の機能解析
第 72 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会 2018

武内勝章, 加藤恵三, 米本和弘, 畠山大二郎, 柴田敏之

膜タンパク TMEM207 は WWOX の腫瘍抑制作用を妨げ MAPK 経路および HIF1, GLUT1 を亢進する
第 63 回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会 2018

石田和久, 中島教行, 井上敬介, 武内勝章, 加藤恵三, 柴田敏之

P16INK4a 欠損は浸潤性口腔がんの発症を促進する
第 63 回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会

[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]

ホームページ等 該当事項無し

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：加藤 恵三

ローマ字氏名：(KATO keizou)

所属研究機関名：岐阜大学

部局名：医学部附属病院

職名：講師

研究者番号：40397336

研究分担者氏名：牧田 浩樹

ローマ字氏名：(Makita hiroki)

所属研究機関名：岐阜大学

部局名：大学院医学系研究科

職名：講師

研究者番号：50345790

研究分担者氏名：米本 和弘

ローマ字氏名：(YONEMOTO kazuhiko)

所属研究機関名：岐阜大学

部局名：医学部附属病院

職名：助教

研究者番号：80422731

研究分担者氏名：安彦 善裕

ローマ字氏名：(ABIKO yoshihiro)

所属研究機関名：北海道医療大学

部局名：歯学部

職名：教授

研究者番号：90260819

(2)研究協力者

該当者なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。