

令和 2 年 6 月 26 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11916

研究課題名(和文) 噛みタバコによる口腔ガンの予防に向けた発がん機構メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the carcinogenic mechanism for the prevention of oral cancer caused by betel quid chewing

研究代表者

永易 裕樹 (NAGAYASU, Hiroki)

北海道医療大学・歯学部・教授

研究者番号：90265075

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：In vitroでヒト歯肉上皮前駆細胞(HGEP)にアレコリンを長期に作用させたサンプルを用い遺伝子の変化を網羅的に解析した。結果、SIRT1が探索され、アレコリン添加群でSIRT1遺伝子発現が低下し、DNAメチル化レベルが上昇していた。SIRT1は癌抑制遺伝子であり、噛みタバコは口腔がんの原因としてSIRT1に影響を与えることが推察された。

また、スリランカの噛みタバコ習慣者(BQC)および噛みタバコ習慣のない者(NC)の口腔細菌叢(OF)を解析したその結果ベテル噛みはOFを大きく変化させ、特に歯周病原細菌の割合が上昇することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、アレコリンによる口腔粘膜のエピジェネティックな変化を明らかにし、Betel quidによる発がんの予防的治療へと応用することを目的とした。研究成果から、Betel quidが発がんに関わる機序を明らかにした。また、口腔内細菌叢への影響を明らかにしたことから、Betel quid習慣者に重点的に口腔衛生指導を行うことで口腔内細菌叢へのdysbiosis(共生バランスの失調)を防ぐ可能性が高い。

研究成果の概要(英文)：In vitro genetic changes were comprehensively analyzed using samples of human gingival epithelial progenitor cells (HGEPs) treated with arecoline for a prolonged period of time. The results showed that SIRT1 gene expression was down-regulated and DNA methylation levels were up-regulated in the arecolyne-treated group, suggesting that betel quid chewing may affect oral cancer via altering SIRT1, since SIRT1 is a tumor suppressor gene.

We also analyzed the oral flora (OF) of Sri Lanka betel nuts habitants (BQC) and non-chewing habitants (NC), suggesting that betel chewing significantly altered the OF and, in particular, increased the percentage of periodontal pathogenic bacteria.

研究分野：口腔悪性腫瘍

キーワード：betel quid アレコリン 口腔がん

1. 研究開始当初の背景

Betel-quid chewing 訳してベテル噛みは世界の消費量がたばこ、アルコール、カフェインにつぐ第4位とされる嗜好品である。ベテル噛みはアレカナッツを細く切ったもの、あるいはすり潰したものを、キンマの葉にくるみ、少量の石灰と一緒に噛むことで軽い酩酊感が得られる。古くから滋養強壮目的に用いられてきたが、アジア太平洋地域の口腔癌の主な原因であり、口腔がん、白板症や粘膜下線維症の多くがベテル噛みに起因していることが明らかになっている。しかしこれらの分子学的な発生機序については明らかになっていない。また、ベテル噛みによる口腔フローラの変化についても詳細は不明のままである。

2. 研究の目的

Betel quid の主成分であるアレコリンが、発がんや DNA のメチル化に関わることが報告されているが、その機序の詳細は不明である。本研究では *in vitro* および現地住民の検体を用いて、発がんに関わる遺伝子を網羅的に解析し、メチル化との関連および口腔内細菌叢への symbiosis (共生バランスの調和) に与える影響を解析した。この解析結果をベテル噛みによる発がんの予防的治療へと応用することを目的とする。

3. 研究の方法

(1). アレコリンによるエピジェネティクス変化の網羅的解析

① 細胞培養:

HGEP は Epithelial Culture Medium に Arecoline hydrobromide (アレコリン) 50 µg/ml 添加および非添加を3日間毎に繰り返し、1ヶ月間培養を行う。コントロールには超純水を添加したものをを用いた。上記培養について既に予備実験にて長期培養方法も確立している。

② DNA メチレーションアレイ: DNA 抽出は、DNeasy&Blood & Tissue kit を用い、添付書のステップに従って行った。網羅的 DNA メチル化プロファイル解析は、CpG アイランドと定義されている領域 (27,800 個) をタイリングしたアレイ (Agilent Technologies) により測定した。ゲノム DNA のメチル化解析は Agilent Certified Service Provider (Genomic Tree) によるアレイプラットフォームを使用した。

(2). (1) で確認されたデータが転写活性に及ぼす影響

DNA メチレーションアレイの結果の信頼性・再現性の確認: マイクロアレイによって絞られたターゲット遺伝子の信頼性を確認するために、アレコリン添加群とコントロール群からのそれぞれの DNA サンプルを用いて行った。既に研究実績のあるメチル化特異的 PCR (MSP) 法 (J Oral Pathol Med 2008 37:475-9) によってメチル化異常遺伝子の領域を確定した。

(3). Betel quid を噛む習慣のある患者 (BQC) および健常者 (NC) から採取されたパラフィンサンプルでの探索

組織切片におけるエピジェネティック修飾の検討: 今回同定された遺伝子について、エピジェネティック修飾の頻度について統計的に検討した。BQC および NC の口腔扁平上皮癌 (OSCC) とコントロール (正常粘膜) を用いて、DNA および RNA、タンパクをそれぞれ抽出し、発現の解析を行った。

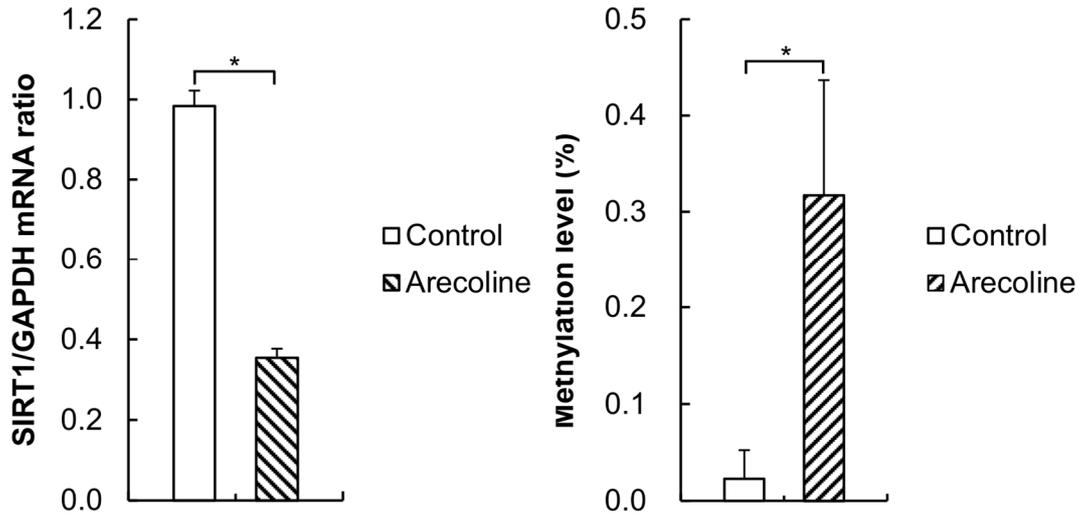
(4). 現地住民の口腔内細菌叢の解析

スリランカのベテル噛み習慣者 (BQC) およびその習慣のない者 (NC) を対象に次世代シーケンサー (NGS) を用いて口腔内細菌叢の解析を行った。口腔粘膜からスワブで採取し DNA を抽出した。DNA を 16s rRNA の V3-4 領域を PCR で増幅し、そのアンプリコンをもとに NGS MiSeq を用いデータを取得した。得られたデータを基に QIIME を用いサンプル内菌種多様性、サンプル間の相関関係 (主座標解析 PCoA) および階層毎の菌種組成 (Taxonomy プロット) を解析した。さらに菌種組成のデータから LEfSe によるバイオマーカーの探索を行った。

4. 研究成果

(1). アレコリンによるエピジェネティクス変化の網羅的解析で確認されたデータが転写活性に及ぼす影響

キーノード解析ネットワークから SIRT1 のネットワークが探索されたことから、マイクロアレイで mRNA 発現が著明に増加し DNA 低メチル化が起こっていた SIRT1 遺伝子に対し、再現性の確認を行った。その結果、アレコリン添加群で SIRT1 遺伝子発現が低下し、DNA メチル化レベルが上昇することが明らかになった。SIRT1 遺伝子は癌抑制遺伝子であり、betel quid を噛む習慣のある人々の口腔がんの原因として SIRT1 が影響を与えることが推察された。



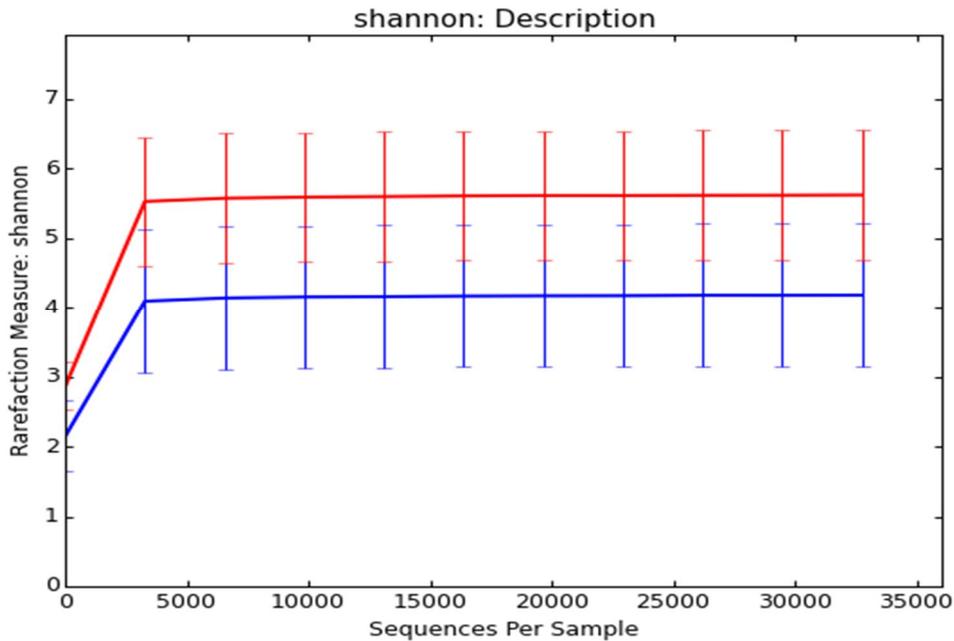
(2). Betel quid を噛む習慣のある患者から採取されたパラフィンサンプルでの探索

SIRT1 のプロモーター領域における CpG アイランドのメチル化率は BQC の口腔扁平上皮癌 (OSCC) で 45.5%、NC の OSCC で 23.7%、正常上皮では 13.6% だった ($p < 0.001$)。また、SIRT1 の mRNA の発現は BQC で NC に比べ有意に低下しており、タンパク発現は BQC で NC に比べ低下していた。

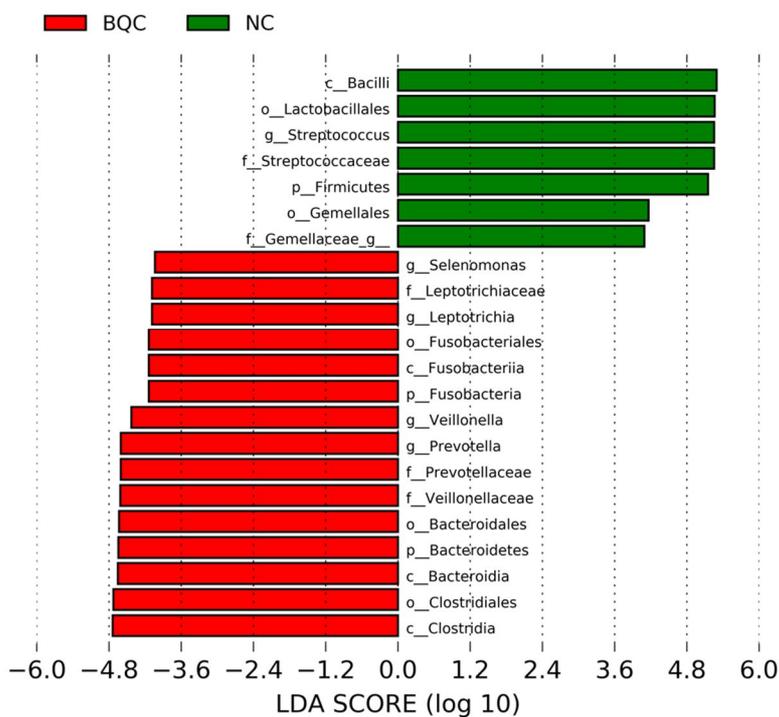
(3). 現地住民の口腔内細菌叢の解析

多様性の指標である Shannon index において BQC および NC に統計学的な有意差が認められた。PCoA 解析では、BQC および NC に異なったクラスターを形成していた。属レベルでの細菌種構成は、BQC で歯周病原細菌ある *Veillonella*、*Prevotella* の割合が増加する一方で、*Streptococcus* 属の割合が減少していた。BQC のバイオマーカーも同様に *Veillonella*、*Prevotella* の LDA スコアの値が上昇していた。BQC を対象に適切な口腔保健管理を行うことができれば、OF における Dysbiosis (共生バランスの失調) 発現を阻止できる可能性が高い。

【Shannon index】



【PCoA 解析】



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 森川哲郎、植原 治、平木大地、虎谷斉子、Puja Neopane、Durga Paudel、原田文也、高井理衣、吉田光希、永易裕樹、千葉逸朗、安彦善裕	4. 巻 11
2. 論文標題 クルクミンがアレコリン誘発性マトリックスプロテアーゼに与える影響	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本口腔検査学会雑誌	6. 最初と最後の頁 25-30
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15041/jsedp.11.25	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Uehara Osamu, Takimoto Kousuke, Morikawa Tetsuro, Harada Fumiya, Takai Rie, Adhikari Bhoj Raj, Itatsu Ryoko, Nakamura Tomohisa, Yoshida Koki, Matsuoka Hirofumi, Nagayasu Hiroki, Saito Ichiro, Muthumala Malsantha, Chiba Itsuo, Abiko Yoshihiro	4. 巻 14
2. 論文標題 Upregulated expression of MMP-9 in gingival epithelial cells induced by prolonged stimulation with arecoline	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 1186 ~ 1192
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2017.6194	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Islam Shajedul, Uehara Osamu, Matsuoka Hirofumi, Kuramitsu Yasuhiro, Adhikari Bhoj Raj, Hiraki Daichi, Toraya Seiko, Jayawardena Asiri, Saito Ichiro, Muthumala Malsantha, Nagayasu Hiroki, Abiko Yoshihiro, Chiba Itsuo	4. 巻 12
2. 論文標題 DNA hypermethylation of sirtuin 1 (SIRT1) caused by betel quid chewing? a possible predictive biomarker for malignant transformation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Epigenetics	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1186/s13148-019-0806-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 原田文也、植原 治、志茂 剛、安彦善裕、永易裕樹
2. 発表標題 ペテル噛みの口腔粘膜への影響
3. 学会等名 第73回日本口腔科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平木大地, 植原治, 虎谷斉子, Shajedul Islam, 高井理衣, 藤田真理, 松岡紘史, 藏満保宏, 千葉逸朗, 安彦善裕
2. 発表標題 噛みタバコによる口腔フローラの変化
3. 学会等名 第67回日本口腔衛生学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Islam Shajedul, Uehara Osamu, Kuramitsu Yasuhiro, Nagayasu Hiroki, Chiba Itsuo
2. 発表標題 DNA methylation of sirtuin-1 gene could be a novel biomarker for early prediction of betel quid-induced oral cancer
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	植原 治 (UEHARA Osamu) (00709248)	北海道医療大学・歯学部・助教 (30110)	
研究分担者	高井 理衣 (TAKAI Rie) (50781085)	北海道医療大学・健康科学研究所・助教 (30110)	
研究分担者	安彦 善裕 (ABIKO Yoshihiro) (90260819)	北海道医療大学・歯学部・教授 (30110)	