

令和 4 年 4 月 18 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10052

研究課題名(和文)胎内でのエピゲノム修飾に基づく口腔癌発症素因形成の分子基盤

研究課題名(英文)Molecular mechanism for predisposition to develop oral cancer based on epigenome modification in utero

研究代表者

安河内 友世(川久保友世)(Kawakubo-Yasukochi, Tomoyo)

九州大学・歯学研究院・准教授

研究者番号：70507813

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文):本研究課題では、妊娠母体の葉酸摂取状況が、次世代の発癌感受性に影響することの分子基盤の解明を行った。

研究結果として、妊娠母体の葉酸欠乏が、胎児の脱コピキチン化酵素遺伝子にメチル化異常を引き起こし、当該遺伝子の発現異常をきたすこと、さらに仔が成熟した後も当該遺伝子の発現異常は持続しており、炎症誘発への感受性が亢進していること、また、その傾向が扁平上皮組織に特に顕著であることが明らかになった。さらに、妊娠母体の葉酸欠乏が、子孫の口腔癌発癌感受性を上昇させることを明らかにした。このことから、母体の適切な葉酸摂取が、仔の将来の口腔癌発癌抑制に寄与してい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

これまで、がんにおけるエピゲノム制御については、詳細な検討がなされてきたが、母体(因)と仔(果)の因果関係について総合的把握を行った研究は非常に少ない。本研究課題では、がんの発症素因として胎内の栄養状態によるエピゲノム変異(先天的環境要因)の提示を行った。口腔癌発症素因が、母体の妊娠期栄養状態によって胎内で既定されることをその分子基盤を以て実証したことにより、栄養学を通して予防歯学の基盤確立に貢献した。また、現在まで環境素因が主な原因とされてきた口腔癌の病因論に一石を投じることになった。

研究成果の概要(英文): In this research, the effect of maternal folic acid intake in the gestational period on the carcinogenic susceptibility of the next generation was elucidated. As a result of research, maternal folic acid shortage in pregnancy caused methylation abnormalities in the deubiquitinating enzyme gene(s) in the fetal, causing abnormal expression of the gene(s), and the epigenomic change lasts even after the offspring had matured. It was demonstrated that the sensitivity to induction of inflammation was increased, and its tendency was particularly remarkable in the squamous epithelial tissue. Furthermore, it was revealed that maternal folic acid shortage in pregnancy increases the carcinogenic susceptibility of offspring to oral squamous cell cancer. This suggests that proper maternal intake of folic acid contributes to the suppression of oral cancer carcinogenesis in the offspring.

研究分野：生化学、分子生物学、薬理学

キーワード：DOHaD 口腔癌 エピゲノム 炎症 葉酸

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

口腔癌発症の原因については、従来、遺伝的要因の関与は薄く、環境的要因の及ぼす影響が大きいと考えられてきた。実際に、口腔癌発症リスク因子としては、年齢、性差、飲酒、喫煙、ウイルス感染、遺伝子異常、不適合義歯や歯の位置異常などによる物理的刺激などが推測されているが、特に若年者における口腔癌発症リスク因子は不明であり、本質的な口腔癌のリスク因子が見落とされている可能性が高い。近年、生活習慣病胎児期起源説 (DOHaD: Developmental Origins of Health and Disease) という概念が注目され、様々な疫学調査によって実証されつつある。これは、母体の妊娠期栄養状態が、児の将来の生活習慣病発症リスクを左右していることを示唆しており、妊娠期・周産期における栄養状態が世代を越えて影響し続けていくことを意味している。また、そのメカニズムとして世代を超えて受け継がれる DNA メチル化が注目されている。

そこで、そこで本研究では、妊娠母体が摂取する栄養素(特に、遺伝子にメチル基を供給するために必須の One carbon metabolism 構成栄養素である葉酸の欠乏(不足)によって胎内で生じる DNA メチル化修飾が、児の将来の口腔癌発症に与える影響に着目し、『これまで、がんの二大発生要因と考えられてきた 遺伝素因、後天的環境要因に加え、第三の要因として、先天的環境要因(胎内の栄養状態によるエピゲノム変異)を提唱できる可能性』の検証と分子メカニズムの追究を行うこととした。

### 2. 研究の目的

本研究は、口腔癌発症素因が胎内で規定されている可能性を新規に提示することで、がんの究極の先制医療の分子基盤を提供することを目的として行った。現在、メタボリックシンドローム研究領域においては、前述の DOHaD 説こそが予防医学・先制医療の基本であり、エピゲノムに可塑性の高い早期からの介入によって疾病の予防が可能であるという認識が広がりつつある。一方、がん研究の領域における DOHaD 説の認識は極めて薄く、エピゲノム異常の伝播によるがんの世代間連鎖については、ヒト検体の解析のみならず、動物実験での基礎研究も未解明のままである。メタボリックシンドロームとがんの発症が密接な関係をもつこと、さらにがんとエピゲノム変異についての連関は周知の事実であることから、この DOHaD 説は、がんの病因論にも該当することが予想された。

さらに、現在までに行われてきた栄養学的観点から解析するがん研究では、そのほとんどが着目する栄養素を摂取した個体そのものについての解析実験である。そこで、本研究では、栄養素を摂取した個体のみならず、その子孫を用いた解析実験を行うこととした。

### 3. 研究の方法

母親への各種食餌の負荷は、妊娠中のみとし、その他の期間は、すべて普通食を摂取させ、出産、授乳を経た。母体の解析については、最終的に仔の解析結果と統合的考察を行うため、栄養状態についての血清学的検査(葉酸、ビタミン B<sub>12</sub>、総ホモシステイン、コリン、アミノ酸)に加え、血球成分についてのデータも解析を行い、データを蓄積した。授乳期間は 24 日間とし、それ以降の仔の飼育はすべて普通食で行った。

その後、産仔に対する 4-Nitroquinoline 1-oxide (4NQO)を用いた口腔癌発癌実験を行った。解析は、(1)母体栄養状態(血清・血球成分)、(2)胎盤における各種栄養素のトランスポーターの発現変動、(3)臍帯血中葉酸濃度、各群の(4)前癌病変発症時期・発癌までの経過・発癌率、(5)癌組織の病理組織、(6)株化癌細胞の表現型、(7)脾リンパ球を用いた細胞傷害活性、(8)雌雄差について、(9)DNA メチル化解析の結果と総合的に解析し、仔の発癌リスクに母体の影響が反映されている可能性を検証した。

さらに、バイサルファイトシーケンスによって DNA メチル化異常が確認された遺伝子群について、その発現レベルを遺伝子およびタンパクレベルで検証し、各群の発癌進展にどのように寄与しているのか、その分子基盤を調べた。

### 4. 研究成果

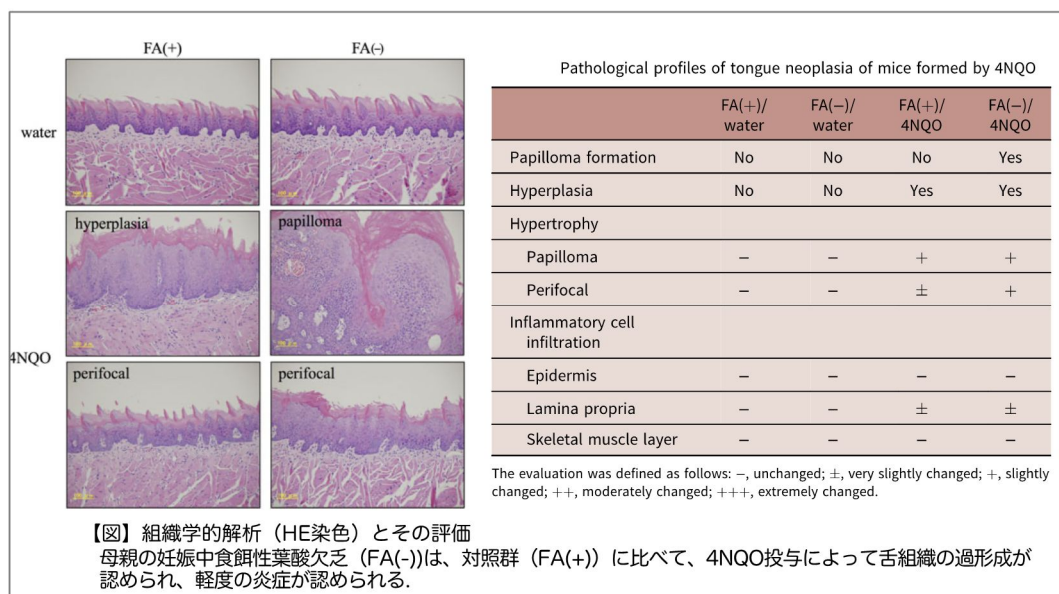
本研究課題では、DOHaD 説に基づき、妊娠母体の One carbon metabolism 関連栄養素(特に葉酸)の摂取状況が、次世代の発癌感受性に影響することの分子基盤の解明を行った。

まず、妊娠母体の葉酸欠乏が、胎児の脱ユビキチン化酵素遺伝子にメチル化異常を引き起こし、当

該遺伝子の発現 異常をきたすこと、さらに仔が成熟した後も当該遺伝子の発現異常は持続しており、炎症誘発への感受性が高めることに寄与していること、また、その傾向が扁平上皮組織に特に顕著であることを証明した。

さらに、母体と仔において、栄養状態についての血清学的検査(葉酸、総ホモシステイン、アミノ酸)を行い、統合的考察を行うことで、妊娠母体の栄養状態が、仔の将来の代謝物産生能に関与していることを実証した。また、産仔に対する発癌実験(口腔癌)を行い、妊娠母体の葉酸欠乏が、子孫の発癌感受性を上昇させることを明らかにした【図】。

さらに、これらのメカニズムに最も関与している遺伝子として、脱ユビキチン化酵素である Cylid



(Cylindromatosis)を同定し、当該遺伝子のエピゲノム(DNAメチル化)異常が、炎症を伴う口腔癌発症において重要であることを証明した。このことは、母体の葉酸欠乏が仔に炎症制御異常を生じさせている可能性を示唆しており、炎症が先行する癌の発症抑制には、胎内での適切な葉酸曝露が必須であることが示された。

近年のエピゲノム研究により、遺伝子発現レベルのエピジェネティックな制御異常は、ヒトとマウスでほぼ同様であることが分かってきていることから、本研究で証明される分子基盤について、ヒトでも同様の結果が得られる可能性は十分考えられ、将来、本研究を基盤とした臨床研究へ発展する可能性を秘めている。

上記より、本研究を通して、口腔癌発症要因が、母体の妊娠期栄養状態によって胎内で既定されうることをその分子基盤を以て実証することは、栄養学を通して予防歯学の基盤確立に貢献することとなり、さらに、現在まで環境要因が主な原因とされてきた口腔癌の病因論に一石を投じることになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Mukai S, Mizokami A, Otani T, Sano T, Matsuda M, Chishaki S, Gao J, Kawakubo-Yasukochi T, Tang R, Kanematsu T, Takeuchi H, Jimi E, Hirata M.	4. 巻 296
2. 論文標題 Adipocyte-specific GPRC6A ablation promotes diet-induced obesity by inhibiting lipolysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Biol Chem	6. 最初と最後の頁 100274
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.100274.	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 Otani T, Mizokami A, Kawakubo-Yasukochi T, Takeuchi H, Inai T, Hirata M.	4. 巻 78
2. 論文標題 The roles of osteocalcin in lipid metabolism in adipose tissue and liver.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Adv Biol Regul	6. 最初と最後の頁 100752
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbior.2020.100752.	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 1.Mizokami A, Mukai S, Gao J, Kawakubo-Yasukochi T, Otani T, Takeuchi H, Jimi E, Hirata M.	4. 巻 -
2. 論文標題 GLP-1 signaling is required for improvement of glucose tolerance by osteocalcin	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Endocrinol	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1530/JOE-19-0288	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 Hazekawa M, Nishinakagawa T, Kawakubo-Yasukochi T, Nakashima M.	4. 巻 18(4)
2. 論文標題 Evaluation of IC50 levels immediately after treatment with anticancer reagents using a real-time cell monitoring device	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Exp Ther Med	6. 最初と最後の頁 3197-3205
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/etm.2019.7876	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 Kawakubo-Yasukochi T, Morioka M, Ohe K, Yasukochi A, Ozaki Y, Hazekawa M, Nishinakagawa T, Ono K, Nakamura S, Nakashima M.	4. 巻 10(6)
2. 論文標題 Maternal folic acid depletion during early pregnancy increases sensitivity to squamous tumor formation in the offspring in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Dev Orig Health Dis	6. 最初と最後の頁 683-691
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1017/S2040174419000217	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Yasukochi A, Kawakubo-Yasukochi T, Morioka M, Hazekawa M, Nishinakagawa T, Ono K, Nakashima M, Nakamura S.	4. 巻 166(2)
2. 論文標題 Regulation of collagen type XVII expression by miR203a-3p in oral squamous cell carcinoma cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Biochem	6. 最初と最後の頁 163-173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvz024	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Hazekawa M, Nishinakagawa T, Kawakubo-Yasukochi T, Nakashima M.	4. 巻 139(3)
2. 論文標題 Glypican-3 gene silencing for ovarian cancer using siRNA-PLGA hybrid micelles in a murine peritoneal dissemination model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Pharmacol Sci	6. 最初と最後の頁 231-239
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2019.01.009	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Lee BYT, Sullivan MP, Yano E, Tong KKH, Hanif M, Kawakubo-Yasukochi T, Jamieson SMF, Soehnel T, Goldstone DC, Hartinger CG.	4. 巻 60(19)
2. 論文標題 Anthracenyl Functionalization of Half-Sandwich Carbene Complexes: In Vitro Anticancer Activity and Reactions with Biomolecules	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Inorg Chem	6. 最初と最後の頁 14636-14644
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.inorgchem.1c01675	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 該当する

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 安河内（川久保）友世、溝上顕子、木村 宗惟、中村 誠司、 自見 英治郎、 平田 雅人
2. 発表標題 胎内栄養環境に基づく糖脂質代謝制御と オステオカルシンの関与
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 溝上 顕子、大谷 崇仁、松田 美穂、安河内（川久保）友世、竹内 弘、自見 英治郎、 平田 雅人
2. 発表標題 脂肪細胞表面受容体GPCR6Aの食事誘発性肥満における役割
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安河内 篤、安河内（川久保）友世、中村 誠司
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌におけるBP180の発現制御機構
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木村宗惟、安河内（川久保）友世、中村誠司、自見英治郎
2. 発表標題 IgG4関連疾患病態形成における非コードRNAの役割
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安河内(川久保)友世、森岡政彦、樫川舞、西中川拓也、安河内篤、中村誠司、中島学
2. 発表標題 miR-200c-3pによる口腔扁平上皮癌の浸潤制御機構
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安河内(川久保)友世、森岡政彦、安河内篤、樫川舞、西中川拓也、中村誠司、中島学
2. 発表標題 妊娠母体の葉酸不足は仔の皮膚および舌において扁平上皮の発癌感受性を増強させる
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kawakubo-Yasukochi T, Kondo A, Mizokami A, Hirata M
2. 発表標題 The effect of maternal uncarboxylated osteocalcin on the metabolic properties of next generation
3. 学会等名 The 11th DOHaD World Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kawakubo-Yasukochi T, Morioka M, Atsushi Yasukochi, Hazekawa M, Nishinakagawa T, Ono K, Nakamura S, Nakashima M
2. 発表標題 The effect of maternal folic acid deficiency during early pregnancy on the carcinogen sensitivity of offspring in mice
3. 学会等名 The 11th DOHaD World Congress (国際学会)
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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
ニュージーランド	Auckland University			