

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11297

研究課題名(和文) うがい液からのDNAメチル化異常検出による口腔癌発癌予測システムの開発

研究課題名(英文) Noninvasive detection of oral cancer and precancerous lesion using aberrant DNA methylation in gargle fluid samples

研究代表者

浜田 倫史 (Hamada, Tomofumi)

鹿児島大学・医歯学域附属病院・講師

研究者番号：00444894

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)：本研究の目的は、含嗽液を試料として前癌病変に特異的なメチル化異常を示す癌抑制遺伝子群を同定し、それらを用いた早期口腔癌検出システムを構築することである。白板症患者と口腔健常者から含嗽液を採取し、解析により抽出された遺伝子の異常メチル化を指標として白板症診断の精度を検討したところ、感度98%、特異度94%であった。結果より含嗽液による癌抑制遺伝子異常メチル化の検出は白板症を含む口腔癌前癌病変の非侵襲的なスクリーニング法として有効である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to find oral precancerous lesion-specific aberrant DNA methylation, and to establish the screening tool for the early detection of oral cancer/precancer. Gargle fluid samples were obtained from patients with leukoplakia and healthy subjects. Using selected cancer-related genes, the sensitivity and specificity for oral precancer detection is 98% and 94%, respectively. This novel method using aberrant DNA methylation might be useful for noninvasive screening for the patients with oral cancer/precancer.

研究分野：口腔外科

キーワード：口腔癌 がん検診 DNAメチル化 エピゲノム 前癌病変 うがい液 口腔扁平上皮癌

1. 研究開始当初の背景

【口腔癌における1次癌検診の必要性和オーダーメイド癌予防医療】

口腔癌は初期には自覚症状が乏しく、早期発見という点では必ずしも満足できる現状にない。また救命し得たとしても、生活に不可欠な咀嚼・嚥下・構音といった機能を持つ口腔の癌治療は重篤な後遺障害が残る場合も多い。そのため、口腔癌における早期発見の意義は生存予後と機能温存の両者の観点から極めて重要である。しかし口腔癌には、大腸癌の便潜血検査や胃癌のバリウム検査などのような、比較的良好な感度と特異度を有する1次検診法が確立されていない。また近年、患者安全性などの観点から、医学的検査には尿、呼気や分泌体液などを用いた非侵襲的かつ簡便な方法が求められている。

そこで我々は、口腔癌における非侵襲的な1次検診法の確立を目標として研究を進めるなかで、検査の試料としてうがい液を選択した。うがい液を選択する利点は下表1に示す通りである。

一方、口腔癌でも既に多くの遺伝子のDNAメチル化異常が報告されている。本研究では検出マーカーとして、下表2の理由からDNAメチル化に着目した。

表1. 試料としてうがい液を選択する利点

- ・非侵襲的に採取可能である。
- ・採取法が簡便、安価であり何度も採取できる。
- ・口腔粘膜全体の細胞が含まれるため、1口腔単位での発癌プロセスの進行を検知できる。
- ・専門家でなくても容易に採取でき、実用化の際に有利である。

表2. DNAメチル化をマーカーにする利点

- ・癌関連遺伝子の発現を直接的に調節する。
- ・メチル化異常は臨床的発癌の前から潜在的に蓄積されているため、早期発見や発癌リスクの評価に有用である。
- ・実験系にPCRを用いるため、微量サンプルからでも鋭敏に結果を検出する。
- ・DNAはタンパクやRNAに比べ安定であり、サンプルの長期保存や常温輸送に適している。

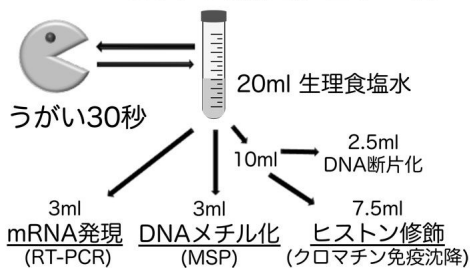
これら表1・2に掲げる理由から、「うがい液」を用いて「DNAメチル化異常」を検出する本法は、大規模スクリーニングや家庭用検査としてはまさに理想的な非侵襲的検査法である。さらに本法は既に被験者に蓄積されている癌抑制遺伝子の異常を評価できるため、病変検出のみならず、将来の罹患リスクをも判定できる可能性を有する。また個人のエピゲノム情報に基づいた発癌予測システムへの応用が期待でき、近年の癌医療の風潮である「オーダーメイド癌予防医療」の確立に寄与する。

【これまでの研究成果】

まず我々は、それまで報告のなかった「うがい液からエピゲノム異常を検出するプロ

トコル」の確立に着手し、下図1の方法を用いて少量のうがい液からDNAメチル化・ヒストン修飾・遺伝子発現を包括的に検出するを初めて示した。また口腔癌症例のうがい液からCDKN2A遺伝子のエピゲノム異常を高頻度に検出した。(J Oral Maxillofac Surg 70:1486-94, 2012.)

図1. うがい液を用いた包括的エピゲノム検出プロトコル



次に口腔癌群と健常者群からうがい液を採取し、13種類の癌抑制遺伝子の異常メチル化を検討し、その口腔癌検出法としての有用性を検討した。候補遺伝子のうちE-cadherin、TMEFF2、RAR、MGMT、FHIT、WIF-1、p16の異常メチル化が健常者に比べ口腔癌群で高頻度に認められた。さらに検査ツールとしての精度を検討したところ、4種の遺伝子を組み合わせた診断法が非常に高い感度と特異度で口腔癌を検出し得た(下表3)。(Cancer 118: 4298-308, 2012)

表3. 口腔癌検出法としての有用性

遺伝子	サンプル	異常メチル化遺伝子数		p	感度, %	特異度, %
		1以下(n)	2以上(n)			
ECAD+TMEFF2	OSCC	0	34	<0.001	100.0	87.5
+RARβ+MGMT	Control	21	3			
ECAD+	OSCC	1	33	<0.001	97.1	91.7
TMEFF2+MGMT	Control	22	2			
ECAD+	OSCC	2	32	<0.001	94.1	95.8
TMEFF2+RARβ	Control	23	1			
ECAD+RARβ	OSCC	3	31	<0.001	91.2	91.7
+MGMT	Control	22	2			

2. 研究の目的

以上の背景および研究成果より、本研究は口腔前癌病変に特異的なDNAメチル化異常を検討し、発癌超早期または発癌前に起こる癌抑制遺伝子のDNAメチル化異常を同定することで、口腔癌ハイリスク群のスクリーニング法および発癌予測システムの開発へ寄与することを目指す。

3. 研究の方法

【メチル化特異的MLPA法 (MS-MLPA) を用いた実験系の確立】

被験者に生理食塩水 20ml を 30 秒含嗽させ、全量採取する。生理食塩水での洗浄と遠心分離を 2 回繰り返しペレットにし、以後の使用

まで-80 に保存した。ペレットから市販キットで DNA を抽出し、MS-MLPA KIT(MRC-HoIland社)を用いて癌抑制遺伝子のメチル化状態を検索した。プローブセットは癌抑制遺伝子が26種含まれる ME001-C1 Tumor suppressor-1 を用いる。ハイブリダイゼーション、ライゲーション後 PCR を行い、3130 Genetic Analyser (ABI 社)を用いてフラグメント解析し、Gene Mapper (v4.1、ABI 社)を用いてピークエリアを算出し、26種の遺伝子の DNA メチル化状態を一期的に定量化した。

【被検者からの含嗽液の採取とメチル化状態の検出】

口腔内に病変がないことを確認した口腔健康者、および鹿児島大学病院口腔外科にて生検/切除され組織学的に確定された白板症症例から、生理食塩水 20ml を 30 秒含嗽させ全量採取した。また抽出された DNA を用いて MS-MLPA 法により癌抑制遺伝子群のメチル化解析を行い、データベース化して前癌病変群の対照とした。

【前癌病変に特異的なメチル化異常の選定】

統計処理を行い前癌病変群と健常群との相違を検討した。まず、26種の遺伝子ごとに両群間の DNA メチル化を Mann-Whitney U 検定にて比較した。また MLPA 法はメチル化状態を定量的にアウトプットするため、メチル化異常の「あり/なし」のカットオフ値を ROC 解析 (Receiver Operatorating Characteristic、受信者動作特性解析) にて決定した。各症例・各遺伝子のメチル化をカットオフ値により「あり/なし」の2変量に数値化し、両群間の差異をカイ2乗検定にて評価した。これにより有意差を認めた遺伝子を前癌病変検出ツールの候補遺伝子とした。

【病変検出ツールとしての評価】

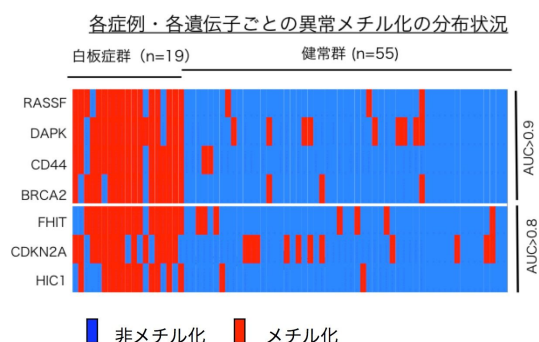
上記により得られた候補遺伝子を用いた前癌病変検出法の有用性を評価した。まず、得られた結果の前癌病変検出に対する感度および特異度をロジスティック回帰モデルにて検討した。また、診断精度の指標として AUC (area under the curve、ROC 曲線下面積) を算出した。

4. 研究成果

検討した 26 遺伝子の中のうち 7 種の遺伝子 (RASSF1、DAPK1、CD44、BRCA2、FHIT、CDKN2A、及び HIC1) に AUC 値 > 0.8 の結果が得られ、マーカー候補とした。これらの遺伝子の異常メチル化の状況を右図に示す。図の通り、健常者と白板症患者の間にメチル化プロファイルの明らかな相違を認めた。

次にそれぞれの遺伝子メチル化を用いた際の白板症の診断精度を次表に示す。表の結果から明らかな通り、いずれの遺伝子のプロモーター領域の DNA も、健常群と白板症群とを

単独で有意に識別し得ることが確認された。中でも、感度及び特異度を考慮すると、いずれも 80% 以上である RASSF1、CD44 及び BRCA2 の 3 種の遺伝子が特に有用であることが明らかとなった。



異常メチル化を指標とした白板症の検出精度

遺伝子	症例群	非メチル化	メチル化	P値	腫瘍検出の感度 (%)	腫瘍検出の特異度 (%)
RASSF1	健常者群 (n=55)	52	3	<0.001	84.2	84.2
	白板症群 (n=19)	3	16			
CD44	健常者群 (n=55)	53	2	<0.001	89.5	89.5
	白板症群 (n=19)	2	17			
BRCA2	健常者群 (n=55)	52	3	<0.001	84.2	84.2
	白板症群 (n=19)	3	16			
DAPK1	健常者群 (n=55)	46	9	<0.001	89.5	65.4
	白板症群 (n=19)	2	17			
FHIT	健常者群 (n=55)	48	7	<0.001	84.2	69.6
	白板症群 (n=19)	3	16			
HIC1	健常者群 (n=55)	53	2	<0.001	63.2	85.7
	白板症群 (n=19)	7	12			
CDKN2A	健常者群 (n=55)	44	11	<0.001	73.7	56.0
	白板症群 (n=19)	5	14			

次に、RASSF1、FHIT、DAPK1、CD44、BRCA2 を用いたロジスティック分析を行い、下記の式：

$$f = 0.6615648 \times \text{RASSF1} + 0.2922162 \times \text{FHIT} + 0.1885340 \times \text{DAPK1} + 0.5206504 \times \text{CD44} + 0.5737340 \times \text{BRCA2}$$

を得た。これによる白板症群及び健常群でそれぞれ不一致は 1 例のみであり、感度は 98.2%、特異度は 94.7% と非常に高い検出精度を得ることができた。以上より、うがい液を試料として DNA のメチル化をマーカーとして、口腔癌のみならず前癌病変をも高精度に診断することが可能であった。

うがい液は非侵襲的で安価かつ簡便に採取できることから、検査のための理想的な試料であり、一般的な健康診断の評価項目に含めることもできる。また、DNA メチル化の異常は病変の早期や発症前から見られることから、口腔癌の早期検出及び発癌リスクの評価が可能となり、被験者自身が発癌リスクを認識することで、生活習慣の改善や予防医療に貢献することができると思われた。

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 6 件)

浜田倫史、杉浦剛. 口腔扁平上皮癌における MUC4 ムチンの発現とその意義. 口腔組織培養学会誌 24(2)15-22, 2015.

Yamada N, Hasegawa Y, Yue M, Hamada T, Nakagawa S, Ogawa Y. Xist Exon7 Contributes to the Stable Localization of Xist RNA on the Inactive X-Chromosome. *PLoS Genetics*. 5;11(8):e1005430, 2015. Kamikawa Y, Fujisaki J, Nagayama T, Kawasaki K, Hirabayashi D, Hamada T, Sakamoto R, Mukai H, Sugihara K. Use of Candida-specific chicken egg yolk antibodies to inhibit the adhering of Candida to denture base materials: prevention of denture stomatitis. *Gerodontology*. 33(3):342-7 2016.

Yokoyama S, Higashi M, Kitamoto S, Oeldorf M, Knippschild U, Kornmann M, Maemura K, Kurahara H, Wiest E, Hamada T, Kitazono I, Goto Y, Tasaki T, Hiraki T, Hatanaka K, Mataka Y, Taguchi H, Hashimoto S, Batra SK, Tanimoto A, Yonezawa S, Hollingsworth MA. Aberrant methylation of MUC1 and MUC4 promoters are potential prognostic biomarkers for pancreatic ductal adenocarcinomas. *Oncotarget*. 5;7(27):42553-65, 2016.

Yokoyama S, Tsutsumida H, Wakimoto J, Hamada T, Wiest E, Matsuo K, Kitazono I, Goto Y, Guo X, Hamada T, Yamada S, Hiraki T, Yonezawa S, Batra SK, Hollingsworth MA, Tanimoto A. TET1-mediated DNA hypomethylation regulates the expression of MUC4 in lung cancer. *Genes and Cancer*. 8 (3-4):517, 2017.

Tomonari H, Takada H, Hamada T, Kwon S, Sugiura T, Miyawaki S. Micrognathia with temporomandibular joint ankylosis and obstructive sleep apnea treated with mandibular distraction osteogenesis using skeletal anchorage: a case report. *Head Face Med*. 13(1): 20. 2017.

[学会発表](計4件)

浜田倫史、熊谷直之、後藤雄一、上川善昭、杉浦剛. 含嗽液を用いた癌抑制遺伝子DNAメチル化異常の検出: 白板症と健常者との比較検討. 第69回NPO法人日本口腔科学会学術集会. 2015年05月04日. 大阪国際会議場.

浜田倫史、熊谷直之、杉浦剛. 含嗽液を用いた癌抑制遺伝子DNAメチル化異常の検出: 白板症と健常者との比較検討. 九州地区口腔癌研究会 第19回学術講演会. 2015年06月26日. 長崎ブリックホール.

浜田倫史、中村康大、大河原綾子、比地岡浩志、石田喬之、久米健一、中村典史、杉浦剛. 口腔癌早期発見に向けた当科の取り組み. 九州地区口腔癌研究会 第20回学術講演会. 2016年06月17日. 九州歯科大学講堂(福岡県北九州市)

Koudai Nakamura, Naomi Hiyake, Tomofumi Hamada, Tsuyoshi Sugiura Combination of serum microRNAs for biomarker in oral squamous cell carcinoma. 第75回日本癌学会学術総会. 2016年10月06日. パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

[産業財産権]

出願状況(計2件)

名称: 口腔前癌病検出方法.

発明者: 浜田倫史

権利者: 鹿児島大学

番号: 特開 2015-172327

出願年月日: 2015年9月1日

国内外の別: 国内

名称: 口腔前癌病変の検出方法.

発明者: 浜田倫史

権利者: 鹿児島大学

番号: PCT/JP2016/075667

出願年月日: 2016年9月1日

国内外の別: 国外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浜田 倫史 (HAMADA Tomofumi)

鹿児島大学・医歯学域附属病院・講師

研究者番号: 00444894

(2) 研究分担者

横山 勢也 (YOKOYAMA Seiya)

鹿児島大学・医学部・助教

研究者番号: 20569941

河野 憲司 (KAWANO Kenji)

大分大学・医学部・教授

研究者番号: 50214664

杉浦 剛 (SUGIURA Tsuyoshi)

鹿児島大学・医歯学域歯学系・教授

研究者番号: 40322292

(3) 連携研究者

山田 宗茂 (Yamada Norisige)

京都大学・医学研究科・研究員

研究者番号: 60625242

(4) 研究協力者

中村康大 (NAKAMURA Kodai)

鹿児島大学・附属病院・医員