

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：27102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11319

研究課題名(和文) 口腔扁平苔癬におけるDNAメチル化の研究

研究課題名(英文) DNA methylation status of oral lichen planus

研究代表者

矢田 直美 (Yada, Naomi)

九州歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：60468022

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,500,000円

研究成果の概要(和文)：口腔扁平苔癬のDNAプロモーター領域のメチル化が、慢性炎症の継続や癌化に関与するのではないかの推測のもと研究を行った。炎症細胞が放出するサイトカインをネガティブフィードバック機構により抑制することで炎症を抑制し、また、細胞増殖と関連する因子のSOCS 3 (suppressor of cytokine signaling 3)のDNAメチル化が口腔扁平苔癬では高率に見られ、mRNAの発現量が低下した。口腔扁平苔癬では、SOCS3のDNAプロモーター領域のメチル化により、サイトカイン発現の抑制機能が働かず、サイトカイン発現量が増加することで、慢性炎症の持続や癌化に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Oral lichen planus (OLP) is a disease of unknown etiology affecting oral mucosa by mediated chronic inflammation and is classified as a potentially malignant oral disorder. SOCS3 in the SOCS family have been identified as negative regulators of the cytokine-activated JAK/STAT pathway responsible for inflammatory reaction and carcinogenesis. SOCS3 was methylated in 25/29 (86.2%) cases with OLP. DNA methylation status of SOCS3 were negatively correlated with the expression level of SOCS3 mRNA. We posit frequent methylation of the SOCS3 gene promoter, theoretically resulting in the increase of cytokines expression, might be associated with the etiological mechanism of OLP.

研究分野：口腔病理

キーワード：口腔扁平苔癬 DNAメチル化 SOCS1 SOCS3

1. 研究開始当初の背景

口腔扁平苔癬 (oral lichen planus; OLP) は、口腔粘膜に角化異常を伴う慢性炎症性疾患であり、基底膜直下での T 細胞を主体としたリンパ球浸潤を特徴とする。また、OLP は数%で癌化が見られ、WHO では口腔前癌状態 (2017 年 WHO 分類では口腔潜在性悪性疾患) に分類されている。近年、加齢や慢性炎症が DNA メチル化異常の誘発に関与し、癌化を引き起こしているとも考えられている。

2. 研究の目的

OLP における DNA メチル化異常を検索し、OLP の DNA メチル化異常の癌化への関与と予測因子になりうるかを検討する。

3. 研究の方法

OLP、扁平上皮癌 (oral squamous cell carcinoma: OSCC) のパラフィン切片より DNA と total RNA を抽出した。抽出した DNA に bisulfite 処理を行い、total RNA は cDNA に変換した。

対照として、正常頬粘膜の口腔擦過細胞診検体を使用した。

(1) リンパ球 T 細胞に関連するサイトカインのプロモーター領域の DNA メチル化検索

リンパ球 T 細胞に関連するサイトカインのプロモーター領域から作成したプライマー (*IL-5*, *-6*, *-8*, *-10*, *-13*, *INF-*) を用いて methylation-specific PCR (MS-PCR) を行った。total RNA を抽出し、cDNA へ変換し、各サイトカインプライマー (*IL-5*, *-6*, *-8*, *-10*, *-13*, *INF-*) について、real-time PCR 法により発現を定量した。

(2) 炎症の抑制や細胞増殖に関わっている SOCS ファミリーの DNA メチル化検索と mRNA 発現量

炎症の抑制や細胞増殖に関わっている SOCS (suppressor of cytokine signaling) ファミリーの SOCS1 と SOCS3 について MS-PCR

法を用いてプロモーター領域のメチル化および real-time PCR 法にて mRNA 量の検索を行った。

(3) 免疫組織化学的検索によるサイトカイン発現と SOCS1 と SOCS3 の発現分布

パラフィン包埋切片上で、*IL-6*, *INF-*, SOCS1 と SOCS3 抗体を使用し、SABC 法による免疫染色を行い、その分布を検討した。

4. 研究成果

(1) リンパ球 T 細胞に関連するサイトカインのプロモーター領域の DNA メチル化検索

OLP 26 例、OSCC 6 例について、*IL-5*, *IL-6*, *INF-* のプロモーター領域について検索を終了した。MS-PCR の結果は、OLP 26 例では *IL-5* はメチル化・非メチル化が 22 例・4 例、*IL-6* は、19 例・7 例、*INF-* は 1 例・25 例、扁平上皮癌 6 例では、*IL-5* は 6 例・0 例、*IL-6* と *INF-* はいずれもすべて非メチル化であった。OLP 由来の OSCC 1 例は、*IL-5*, *IL-6* が部分メチル化で、*INF-* は非メチル化であった。

IL-8, *IL-10*, *IL-13* について検索を行ったが、MS-PCR での結果を得ることができなかった。

OLP に関連するサイトカインのメチル化の検索を行ったが、有意な結果を得ることができなかったため、炎症の抑制や細胞増殖に関わっている SOCS (suppressor of cytokine signaling) ファミリーの SOCS1 と SOCS3 についての検索へ変更をした。

(2) 炎症の抑制や細胞増殖に関わっている SOCS ファミリーの DNA メチル化検索と mRNA 発現量

SOCS1 と *SOCS3* の DNA メチル化について *SOCS1* のメチル化は OLP で 14/29 例 (48.3%)、OSCC 7/15 例 (46.7%)、正常粘膜 0/10 例 (0%)、*SOCS3* のメチル化は OLP で 25/29 例 (86.2%)、OSCC 11/15 例 (73.3%)、正常粘膜 0/10 例 (0%) に認められた。

SOCS1 と SOCS3 の mRNA 発現について

MS-PCR で検出可能であった検体について、リアルタイム RT-PCR による SOCS1 と SOCS3 遺伝子の mRNA 発現量の検出を行った。SOCS1 は OLP の mRNA 発現量が OSCC および正常粘膜に比べ有意に高値であった (OSCC: $p < 0.01$ 正常粘膜: $0.01 < p < 0.05$) (図 1)。SOCS3 の mRNA 発現量は正常粘膜、OLP、OSCC の順に高くなり、正常粘膜と OLP、OLP と OSCC の間に有意差は見られなかった (図 2)。

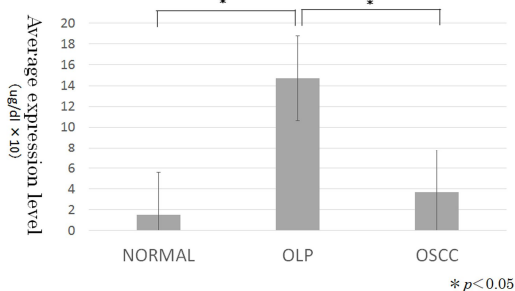


図 1. SOCS1 の mRNA 発現量

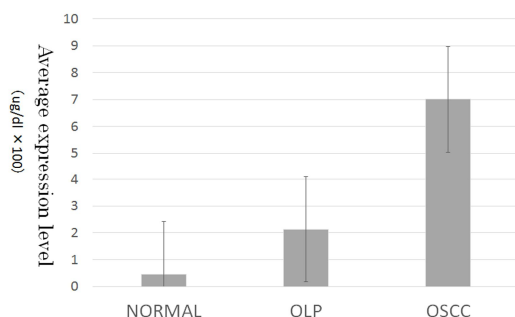


図 2. SOCS3 の mRNA 発現量

SOCS1 と SOCS3 の DNA メチル化と mRNA 発現について

mRNA 発現量は、OLP と OSCC とともに SOCS1 メチル化群の発現量が非メチル化群よりも増加し、メチル化と mRNA 発現量での相関がなかった (図 3)。SOCS3 メチル化症例では、OLP と OSCC のいずれも、メチル化群が非メチル化群の mRNA の発現量よりも減少し、メチル化と mRNA 発現量との間に関連が見られた (図 4)。

(2) ~ の結果より、OLP は、SOCS3 の DNA プロモーター領域のメチル化により、サイトカイン発現の抑制機能が働かず、サイトカイン発現量が増加することで、慢性炎症の持

続や癌化に関与することが示唆された。

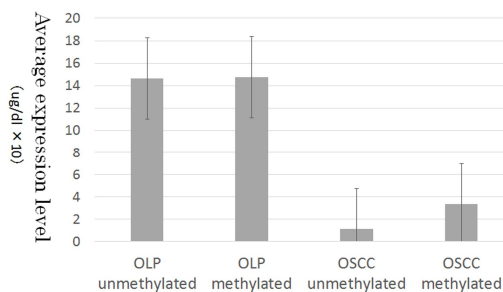


図 3. SOCS1 DNA メチル化と mRNA 発現量

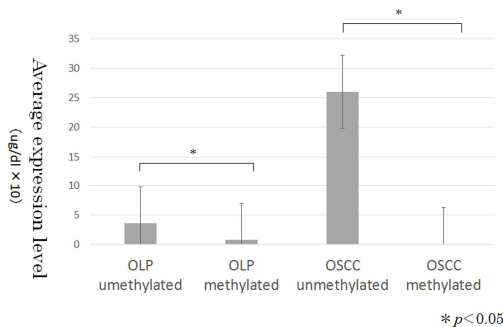


図 4. SOCS3 DNA メチル化と mRNA 発現量

(3) 免疫組織化学的検索によるサイトカイン発現と SOCS1 と SOCS3 の発現分布

IL-6, INF, SOCS1 と SOCS3 の免疫染色を行い、上皮、上皮下と分け評価をした。OLP, OSCC いずれの抗体も陽性例は見られたが、規則的な発現を見出すことはできなかった。

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 1 件)

Kurara Yoshimura, Naomi Yada, Kou Matsuo, Hisako Hikiji, Daigo Yoshiga, Manabu Habu, Masaaki Sasaguri, Kazuhiro Tominaga. Methylation and expression status of SOCS1 and SOCS3 in oral lichen planus. Open Journal of Stomatology, 査読有, 8, 2018, 168-181
DOI: 10.4236/ojst.2018.85016

〔学会発表〕(計 1 件)

吉村 くらら, 矢田 直美, 松尾 拓, 引地 尚子, 吉賀 大午, 土生 学, 笹栗 正明, 富永 和宏. 口腔扁平苔癬の SOCS1 遺伝子の異常メチル化. 第 71 回日本口腔科学会学術集会. 2017 年.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

矢田 直美 (YADA, Naomi)
九州歯科大学・歯学部歯学科・准教授
研究者番号：60468022

(2)研究協力者

吉村 くらら (YOSHIMURA, Kurara)