

令和元年5月8日現在

機関番号：27102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07043

研究課題名(和文) hTERT遺伝子やその他癌関連遺伝子の異常メチル化検出による口腔癌スクリーニング

研究課題名(英文) Oral cancer screening by detecting aberrant methylation of hTERT gene and other cancer related genes.

研究代表者

原口 和也 (Haraguchi, Kazuya)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：90807471

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：テロメラーゼは癌患者で高発現しており、新たな癌マーカーとして期待されている。テロメラーゼはhTERT、hTRなどからなる酵素複合体であり、本研究ではhTERT遺伝子プロモーター領域のCpG部位における異常メチル化を指標としたスクリーニングの可能性を検討した。本研究にはElectrochemical Hybridization Assay (EHA)を用いた。結果、口腔癌患者では正常口腔粘膜と比較して、hTERT遺伝子のCpG部位における異常メチル化が高率に見られた。これより口腔癌におけるhTERT遺伝子の異常メチル化は口腔癌のスクリーニングシステムとして有用である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌患者および癌による死亡者数は増加傾向にあり、口腔癌においても例外ではない。そのため、癌の早期発見、早期治療の重要性が叫ばれている。しかしながら、口腔癌は直視できる部位に生じるにも関わらず、早期発見が可能な確立されたスクリーニングシステムが存在しない。本研究は口腔癌早期発見のためのスクリーニングシステムの確立を目標として行った。本研究ではテロメラーゼを対象とし、その構成遺伝子であるhTERT遺伝子の異常メチル化をターゲットとしてスクリーニングシステムの確立を目指した。本研究が臨床応用されることで、口腔癌の早期発見、早期治療が可能となり、国民の健康増進の一助になりうる可能性があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Telomerase is highly expressed in cancer patients and is expected as a novel cancer marker. Telomerase is an enzyme complex consisting of hTERT, hTR, etc. In this study, we examined the possibility of screening using abnormal methylation at the CpG site of the hTERT gene promoter region as an index. Electrochemical Hybridization Assay (EHA) was used for this study. As a result, abnormal methylation at the CpG site of the hTERT gene was found at a high rate in oral cancer patients compared to normal oral mucosa. These results suggest that aberrant methylation of hTERT gene in oral cancer may be useful as a screening system for oral cancer.

研究分野：口腔外科学

キーワード：hTERT遺伝子 異常メチル化 口腔癌スクリーニングシステム 口腔癌 白板症 電気化学的測定法 テロメラーゼ

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

癌による死亡者数は年々増加傾向にあり、口腔癌を含む頭頸部癌でも例外ではない。あらゆる癌において**早期発見、早期治療の重要性が叫ばれている**が、口腔癌においても例外ではない。**白板症は口腔の代表的な前癌病変であり、その癌化率は4-20%程度と報告されている**。また、**口腔扁平苔癬は、代表的な前癌状態である**。口腔癌の発見が遅れ、進行した状態で発見されると術後の機能障害が大きくなり、発音機能、会話機能、嚥下機能、呼吸機能などの低下を引き起こし、**QOLの大幅な低下をもたらす**。そのため、**口腔癌の早期発見、早期治療が重要であるが、他の口腔粘膜疾患と類似するものも多くあり、診断に苦慮することがしばしばある**。また、口腔癌に進行する前の前癌病変あるいは前癌状態の段階で早期発見し、早期に治療介入することが重要と考えられる。しかしながら、**口腔は直視直達可能な部位であるにもかかわらず、口腔癌を早期発見するためのスクリーニングシステムは存在しない**。ゆえに、口腔癌を含む口腔粘膜疾患の早期診断の一助となるスクリーニングシステムの開発が重要である。

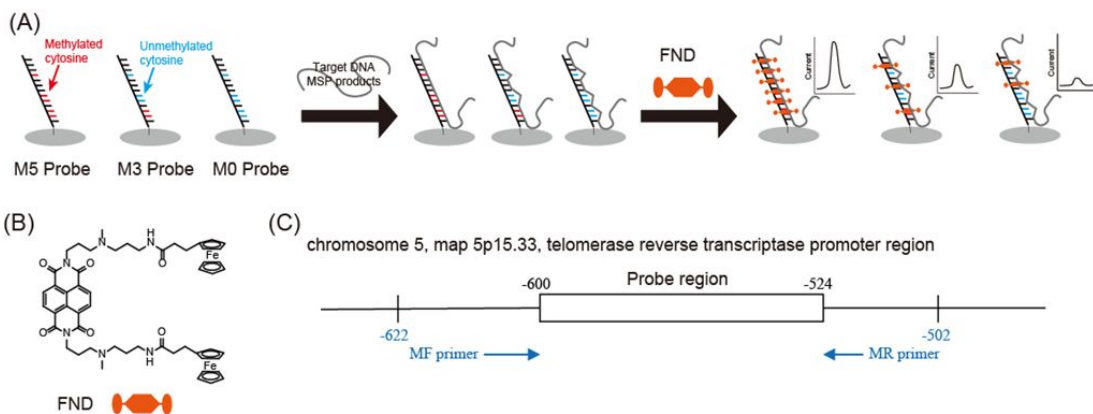
### 2. 研究の目的

**テロメラーゼ**は染色体末端に存在し、逆転写酵素活性を有する特殊なRNA-タンパク質複合体である。テロメラーゼは細胞分裂の間にテロメア反復配列 **TTAGGG** を付与することでテロメア長を維持し、その活性は**染色体安定性に重要**である。テロメラーゼは**正常細胞においては通常発現していないが、多くのヒト癌細胞や生殖細胞、幹細胞において発現していることが示されている**。そのため、種々の癌の早期発見を目的としてテロメラーゼを診断マーカーとした研究が多く行われている。

テロメラーゼは**酵素複合体**であり、テロメラーゼの構成要素は RNA template(hTR)、telomerase associated protein(TEP-1)、human telomerase reverse transcriptase(hTERT)と特定されている。このうち hTR と TEP-1 は普遍的に発現している。しかしながら **hTERT 発現は高度に調節されており、発癌過程で増加する**。また、**hTERT 発現はテロメラーゼ活性とよく相関していることが示されている**。すなわち、hTERT 発現がテロメラーゼ活性の主な調節因子であるといえる。また、テロメラーゼは、酵素複合体であるため、検体採取後直ちに測定しなければならず、一般臨床には適さない。そのため、今回は安定性の高い hTERT 遺伝子プロモーター領域の CpG 部位における異常メチル化を指標としたスクリーニングの可能性を検討した。また、同遺伝子のメチル化は発癌の初期段階で生じるため、前癌病変への応用についても検討した。加えて hTERT タンパク発現を免疫組織学的に検出し、同遺伝子のメチル化との相関を評価した。以上の方法を使用して、口腔癌のスクリーニングシステムの確立を目的とした。

### 3. 研究の方法

九州歯科大学附属病院口腔外科を受診し、本研究に同意を得られた口腔癌、白板症を有する患者と健常ボランティアを対象とした。検体は口腔内全体を拭って採取された剥離細胞と病変局所からの剥離細胞、病変から採取した組織とした。各検体から DNA を抽出、亜硫酸処理し PCR で増幅したのち、hTERT 遺伝子のメチル化頻度を測定した。測定には九州工業大学竹中研究室が開発した Electrochemical Hybridization Assay (EHA) を用いた。手術時に採取した組織を使用して、免疫染色により hTERT タンパク発現を調べた。



### 4. 研究成果

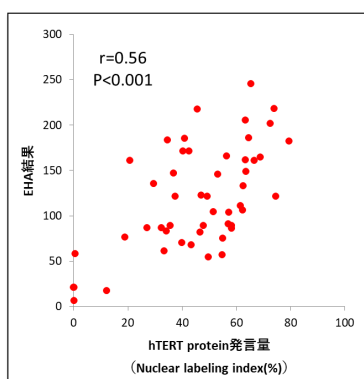
**口腔癌患者では検体の採取方法に依らず正常口腔粘膜と比較して、hTERT 遺伝子の CpG 部位における異常メチル化が高率に見られた**。白板症患者は癌患者と健常者の中間を示した。EHA による検討で、疾患群 (口腔癌+白板症) と正常口腔粘膜あるいは口腔癌とそれ以外の患者群 (白板症+正常口腔粘膜) の識別で有意差を認めた。**hTERT タンパク発現と hTERT**

遺伝子の異常メチル化は有意な相関関係を示した。  
以上より口腔癌におけるhTERT遺伝子の異常メチル化は口腔癌のスクリーニングシステムとして有用である可能性が示唆された。

Fig1. ROC analysis in the case of the detection of OSCC from all samples.

	M5+M4+M4'/ OSCC			accuracy rate	AUC
	OSCC	oral leukoplakia	healthy volunteers		
Tissue	30/35	7/25	1/34	86% (81/94)	0.927
EOC-L	19/22	4/24	0/23	90% (62/69)	0.936
EOC-E	20/21	5/19	0/29	91% (63/69)	0.970

Fig2. hTERT 遺伝子の異常メチル化 (EHA 結果) と hTERT protein 発言量との相関関係



## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年 :

国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。