

平成 22 年 5 月 12 日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2006～2009

課題番号：18390535

研究課題名（和文） ヒト口腔粘膜病変における遺伝子メチル化異常の関与

研究課題名（英文） Effects of DNA hypermethylation on the oral mucosal diseases

研究代表者

柴田 敏之 (SHIBATA TOSHIYUKI)

岐阜大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：50226172

研究成果の概要（和文）：

本研究は口腔粘膜病変における DNA メチル化異常を解析し口腔粘膜病変における epigenetic な変化の関与を明らかにするために行った。口腔がん・白板症の p16、MGMT 遺伝子のメチル化異常を検索した所、口腔がんではメチル化異常が高い頻度で検出され、周囲健常部分においても約 50% の高い頻度で検出された。同様の現象は白板症でも見出された。また、末梢血においてもメチル化異常が検出され腫瘍マーカーとしての意義も見出された。さらに、アルコール・喫煙習慣によっても異常の生じる事が示された（加齢は関係なし）。RECK 遺伝子のメチル化制御と浸潤能の変化を検討した所、脱メチル化剤である DAC, EGCG 処理にて制御され、浸潤能の抑制も得られた。また、RECK メチル化異常が予後因子となることも臨床結果より示された。以上より、口腔粘膜病変に遺伝子メチル化異常が深く関与していると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

This study was carried out to reveal the effects of DNA hypermethylation status on the oral mucosal diseases. Then, we analyzed the methylation status of these human samples including cancer, precancerous lesions, peripheral blood and so on. As the results of this study, we obtained several findings as follows.

Analysis of p16 and MGMT methylation status in oral cancer was carried out. In half number of tissues, hypermethylation were found out and also in about 50% of these samples same hypermethylation was found out in the adjacent normal tissues diagnosed pathologically normal. Furthermore, hypermethylation ratio of these genes was well correlated to the severity of leukoplakia. These phenomenons strongly suggested that hypermethylation might play an important role of carcinogenesis in oral mucosa. To reveal the effects of aging and/or several habits including alcohol consumption and smoking on the p16 and MGMT methylation status of oral mucosa and some habits might affect the epigenetic alternation of oral mucosa rather than aging. To reveal the effects of DNA methylation status on the malignant ability of oral cancer, we analyzed the methylation status of RECK gene in human oral cancer cell lines and DAC and EGCG demethylated the hypermethylation status and inhibited the production of MMP and invasion ability in 3D gel invasion model. Thereafter, we analyzed the relationship between RECK gene methylation status and clinical prognosis retrospectively and RECK gene methylation status could be a novel candidate next to lymph node status as a predictable factor of prognosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2007年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2008年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2009年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			
総計	13,200,000	3,960,000	17,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：oral cancer, methylation, hypermethylation, carcinogenesis

1. 研究開始当初の背景

近年の分子生物学の進展により、がんの発生・悪性化進展には遺伝子の変異や欠失などの genetic な変化が蓄積することが重要であることが明らかとされて来ている。しかし、最新の知見では DNA 自体の変異のみならず DNA メチル化異常

(hypermethylation) の様な遺伝子配列に異常を示さない epigenetic な変化も発がん要因として重要な役割をしていることが示され、注目を集めて来ている。

このメチル化異常で発がんとの関連が指摘されているものとして、大別すると細胞周期調節遺伝子(p16^{INKA4}, p57^{KIP2}, etc)、DNA 修復遺伝子(MGMT, hMLH1 etc)、アポトーシス関連遺伝子(TMS1, CASP8, APAF-1, etc)があり、これら遺伝子のプロモーター領域のメチル化異常により各々の遺伝子発現が不活化され、がん化を促進するものと考えられている。事実、肺扁平上皮がん症例においては p16^{INKA4}、MGMT 遺伝子プロモーター領域のメチル化異常 (hypermethylation) が高頻度に検出され、肺がんの早期検出、ハイリスク・グループのスクリーニングに有効であることが検証されている。

我々もこの点に注目し、ヒト口腔がん 55 例について検討した所、p16^{INKA4} では 28 例 (50.9%)、MGMT では 31 例 (56.4%) に hypermethylation を観察している。また、同一症例の病理学的に非病変部粘膜のメチレーション状態を検索した所、p16^{INKA4} では 37.5%、MGMT では 60.0% と高率に周辺組織にもメチル化異常が生じており、口腔がんでも肺がんと同様に、これらのメチル化異常が深く関わっていることが示されつつある。また、一般にこれらのメチル化異常

は、加齢や炎症に伴っても生じることも明らかにされつつあるが、口腔粘膜の加齢・生活習慣 (タバコ・アルコール etc) による変化、がん以外の口腔粘膜病変での変化についての包括的知見が得られていないのも現状である。

2. 研究の目的

本研究では、研究期間を最長の 4 年とし、期間内に可及的に多くのサンプリングを行い口腔がんを高率に検出している p16^{INKA4}、MGMT 遺伝子プロモーター領域のメチル化異常を検索し、

#1: 口腔がんおよび周囲健常部におけるメチル化異常の頻度

#2: 白板症等におけるメチル化異常の頻度

#3: 口腔粘膜の加齢・生活習慣によるメチル化異常の頻度

を検討し、

#1: ヒト口腔がん発生に於けるメチル化異常の関連・意義

#2: ヒト口腔発がんリスク・予後予測の指標としてのメチル化異常の意義

を解明する。

3. 研究の方法

(1) 臨床サンプルの収集

サンプル採取対象者および対象疾患:

口腔がん症例

他粘膜疾患 (白板症等)

他疾患にて研究協力の得られた方 (特に喫煙者: 各年代・性別)

(2) サンプル採取・分析方法:

方法: 口腔がん・白板症等

粘膜疾患に関しては、通常の病理組織学的診断を行い、一部を DNA メチル化分析に用いる。また、擦過サ

ンプルの採取を行う。

(3) 分析対象

口腔がん症例

- ・初診時生検標本の一部と擦過サンプルを用い比較検討する
- ・切除標本にて病理組織学的に確認される病変部・非病変部の組織を用い比較検討する
- ・擦過サンプルを用い比較検討する

白板症等

- ・初診時生検標本の一部と擦過サンプルを用い比較検討する
- ・擦過サンプルを用い比較検討する
- ・擦過サンプルによる術後経過観察時の経時的变化を比較検討する

上記により、口腔がんにおけるメチル化異常の頻度・広がりおよび経時的变化を検証する

(4) DNAメチレーション分析

- ・対象遺伝子の候補
- ・細胞周期調節遺伝子 (p16^{INKA4}, p57^{KIP2})、
- ・DNA修復遺伝子 (MGMT, hMLH1)、
- ・アポトーシス関連遺伝子 (TMS1, CASP8, APAF-1)

尚、上記のものの中、これまでの分析結果を活用するために p16^{INKA4}、MGMT を基本対象とし行う。

(5) 分析方法

p16^{INKA4}、MGMT 遺伝子のメチル化異常 (hypermethylation) については DNA を bisulfite処理後、methylation specific PCR法を応用して promotor 領域の hypermethylationを検討する。

(6) 研究計画申請後に関連して検索した内容

- ①口腔がん症例にて、血液（血清）サンプルを採取し、primary の DNA メチル化異常と血液に見出されるメチル異常との相関性を検討に加えた。即ち、計画立案後に DNA メチル化異常の状態が腫瘍マーカーとしての意義のあることが報告されるようになったため、口腔がん症例でも同様の結果が得られるか否かを検討した。
- ②DNA メチル化異常が口腔がんの性状（悪性形質等）に及ぼす影響と近年開発が検討されている脱メチル化による治療方法を探るために、RECK (MMP の産生制御に関わり浸潤転移を制御する) のメチル化制御を検討した。即ち、ヒト口腔がん細胞株を用いたメチル化制御と浸潤能の変化と臨床材料によるメチル化異常の状態と臨床病期および予後との

関連を検索した。

4. 研究成果

(1) 口腔がんにおける DNA メチル化異常

口腔がん組織における p16、MGMT 遺伝子のメチル化異常を検索した所、全体として約半数の組織 (primary tissue) でメチル化異常が検出された。また、異常の認められた標本においては、切除標本の辺縁部の正常組織切片 (病理組織学的に健常部分) においても遺伝子のメチル化異常が約 50% の高い頻度で検出され、epigenetic なレベルでは広範囲な病変の拡大 (field cancerization) があり得ることが示唆された (J Cancer Res Clin Oncol. 2006; 132: 735-743.)。

(2) 生活習慣が口腔粘膜の DNA メチル化異常に及ぼす影響

加齢との関係も示唆されているため、90歳代 (6人) 80歳代 (12人) 70歳代 (9人) 60歳代 (10人) 50歳代 (21人) 40歳代 (16人) 30歳代 (20人) 20歳代 (18人) の計 124 人の臨床的に健常頬粘膜から擦過サンプルを採取し、p16^{INKA4}、MGMT のメチル化異常を検索した所、60歳代 (2 / 10人) 50歳代 (7 / 21人) 40歳代 (2 / 16人) 30歳代 (4 / 20人) の計 15名に異常が検出された。しかし、90~70歳代の高齢者からは1例も検出されなかった。また、これにアルコール習慣・喫煙習慣を加味し検討した所、メチル化異常の頻度は；

アルコールと喫煙習慣あり	8/30 (26.7%)
アルコール又は喫煙習慣あり	6/60 (10.0%)
アルコール及び喫煙習慣なし	1/34 (2.9%)

となり、口腔粘膜のメチル化異常に作用する因子としては、年齢因子よりアルコールや喫煙の習慣の因子が強く作用する可能性が示唆された。したがって、口腔がん症例のメチル化異常検索をする場合、生活因子的な背景も理解し進める必要があると考えられた。

(3) 白板症における DNA メチル化異常

国内に於ける白板症例の集積に限りがあるため、嚙みタバコ習慣により白板症の多発する SriLanka 症例標本 74 例にて検討した。Normal(10cases), Mild Dysplasia (44cases), Severe Dysplasia (20cases) の p14, p15, p16 のメチル化異常を解析した所、p14 では

Normal	0 / 10 (0%)
Mild Dysplasia	34 / 44 (77%)
Severe Dysplasia	13 / 20 (65%)

p15 では

Normal	0 / 10 (0%)
--------	-------------

Mild Dysplasia	22 / 44	(50%)
Severe Dysplasia	13/ 20	(65%)
p16 では		
Normal	0 / 10	(0%)
Mild Dysplasia	8 / 44	(77%)
Severe Dysplasia	11/ 20	(65 %)

p14, p15, p16 伴に、病変の進行に応じたメチル化異常の頻度の増加が観察され、がん化との関連も示唆された(J Oral Pathology and Medicine Med Mol Morphol.)。

(4)DNA メチル化異常が口腔がんの形質に及ぼす影響と脱メチルによる変化

ヒト口腔がん細胞株を用いたメチル化制御と浸潤能の変化を検討するために SSC9 と HSC3 を用い RECK 遺伝子 (MMP の産生制御に関わり浸潤転移を制御する) のメチル化状態と脱メチル化による比較を行った。その結果、RECK 遺伝子のメチル化異常のあるこれら 2 ラインにおいて MMP の産生、3D ゲルモデルでの浸潤能は脱メチル化剤である DAC, EGCG 処理にて抑制された。また、緑茶成分である EGCG は DAC と同等以上の脱メチル化作用を有し治療薬ないしは化学発がん予防薬としての有用性が示された。また、epigenetic な変化でも口腔がんの悪性形質に大きく影響することが示された (Br J Cancer)。

(5)口腔がんの予後因子としての DNA メチル化異常の関与

RECK のメチル化異常と臨床病期および予後との関連を検索した
治療後 5 年間、経過観察され予後がほぼ確定したと考えられる 40 例を検索した。

予後因子として

•Age (≤ 65 yr, > 65 yr) •Clinical stage (stage I/II vs. III/IV) •Lymph node status (N- vs. N+) • Histologic differentiation (Well vs. moderately/poorly differentiated) • RECK methylated を検討した。結果、RECK のメチル化異常は 21

例に見出され予後との比較を行った所、以下の結果を得た (Log-rank test)。

•Age	0.519
Clinical stage	0.036
Lymph node status	0.005
Histologic differentiation	0.065
RECK methylated	0.023

この結果より、RECK 遺伝子のメチル化異常が、N status に次いで独立した予後因子となり得ることが示された (Oral Oncology)。

(6)末梢血からのメチル化異常 DNA の検出
口腔がん症例にて、血液 (血清) サンプルを採取し、primary の DNA メチル化異常と血液

中に見出されるメチル異常との相関性を検討した。尚、検索項目として p16, MGMT, RECK, TIMP, CDH1 を行った。

primary では p16 と RECK のメチル化が高い頻度で認められたが、その他では検出は 10% 以下の低頻度であった。このため、primary で p16 のメチル化異常のあった 20 例の末梢血 (血清) サンプルの p16 のメチル化状態を検索した所、検出可能であった 16 例中 14 例の非常に高い頻度で検出された (5 例はメチルのバンドもアンメチルのバンドも検出限界以下であった)。また、RECK も高い頻度で検出され、これらは biomarker 的に用いることが可能ではないかと考えられた (MGMT も primary tissue では既報結果の様に高頻度に検出されるが、末梢血ではメチルもアンメチルも検出限界以下の場合が多く、実用には工夫が必要と考えられた)。

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 9 件)

① Baba S, Hara A, Kato K, Long NK, Hatano Y, Kimura M, Okano Y, Yamada Y, Shibata T. Aberrant promoter hypermethylation of the CHFR gene in oral squamous cell carcinomas. *Oncol Rep.* 2009 Nov;22(5):1173-9.

(査読あり)

② Baba S, Yamada Y, Hatano Y, Miyazaki Y, Mori H, Shibata T, Hara A. Global DNA hypermethylation suppresses squamous carcinogenesis in the tongue and esophagus. *Cancer Sci.* 2009 Jul;100(7):1186-91. *Epub* 2009 Apr 21

(査読あり)

③ Kato K, Long NK, Makita H, Toida M, Yamashita T, Hatakeyama D, Hara A, Mori H, Shibata T. Effects of green tea polyphenol on methylation status of RECK gene and cancer cell invasion in oral squamous cell carcinoma cells. *Br J Cancer.* 2008 Aug 19;99(4):647-54. *Epub* 2008 Jul 29.

(査読あり)

④ Miyazaki Y, Hara A, Oyama T, Yamada Y, Mori H, Shibata T. The effect of hypoxic microenvironment on matrix metalloproteinase expression in xenografts of human oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol.* 2008 Jan;32(1):145-51.

(査読あり)

⑤ Haniffa, AM Saitoh M, Abiko, Y, Takeshima M, Yamazaki M, Nagayasu H, Sugiura C, Muthumala M, Kaku T, Chiba I, T Shibata. Expression pattern of p63 in oral epithelial lesions and submucous fibrosis associated with betel-quid chewing in Sri Lanka. *Med Mol Morphol.* 2007 Dec;40(4):203-7. *Epub* 2007 Dec 21.

(査読あり)

- ⑥NK Long, K Kato, T Yamashita, H Makita, M Toida, D Hatakeyama, A Hara, H Mori, T Shibata: Hypermethylation of the RECK gene predicts poor prognosis in oral squamous cell carcinomas Oral Oncology 2008 May 14 [Epub ahead of print]

(査読あり)

- ⑦ M Takeshima, Saitoh M, Kusano K, Nagayasu H, Kurashige Y, Malsantha M, Arakawa T, Takuma T, Chiba I, Shibata T, YAbiko Y.: High frequency of hypermethylation of p14, p15 and p16 in oral pre-cancerous lesions associated with betel-quid chewing in Sri Lanka. J Oral Pathology and Medicine 2008 Feb 16 [Epub ahead of print].

(査読あり)

- ⑧Makita H, Mutoh M, Maruyama T, Yonemoto K, Kobayashi A, Fujituka H, Toida M, shibata T, Miyamoto S, Yasui Y, Suzuki R, Wkabayashi K, Tanaka T: A prostaglandin E2 receptor subtype EP1-selective antagonist, ONO-8711, suppresses 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis. Carcinogenesis 28(3) 677-684, 2007

(査読あり)

- ⑨ Kato K, Hara A, Kuno T, Mori H, Yamashita T, Toida M, Shibata T. Aberrant promoter hypermethylation of p16 and MGMT genes in oral squamous cell carcinomas and the surrounding normal mucosa. J Cancer Res Clin Oncol. 2006; 132: 735-743.

(査読あり)

[学会発表] (計 2件)

- ①加藤恵三 et al 7名
RECK 遺伝子のメチル化と予後との相関
および脱メチル化による浸潤制御の可能性
第63回 日本口腔科学会総会
2009年4月17日 アクトシティ浜松
(浜松市)

- ②K Kato, et al, T Shibata
Examination of Hypermethylation of RECK
gene in squamous cell carcinoma celllines and
effect of antimethylation agent
89th回 AAOMS 2007年9月10日
Honolulu City

[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：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者
柴田 敏之 (SHIBATA TOSHIYUKI)
岐阜大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：50226172

(2) 研究分担者
山下 知巳 (YAMASHITA TOMOMI)
岐阜大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：80345793

土井田 誠 (TOIDA MAKOTO)
岐阜大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：90313890

加藤 恵三 (KATO KEIZOU)
岐阜大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：40397336

原 明 (HARA AKIRA)
岐阜大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：10242728

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：