

平成 21 年 12 月 28 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19592290

研究課題名（和文） 4NQO誘発ラット舌癌モデルにおける遺伝子メチル化異常の解析

研究課題名（英文） Aberrant DNA methylation analysis of 4NQO-induced rat tongue cancer

研究代表者

牧田 浩樹（MAKITA HIROKI）

岐阜大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50345790

研究成果の概要： 4NQO 誘発ラット舌癌モデルを用いて、ヒト口腔癌でメチル化異常が報告されている癌抑制遺伝子プロモーター領域の発癌過程における遺伝子メチル化異常を解析し、ヒトの口腔発癌との類似性を検討した。方法として、メチル化特異的 PCR (MSP)法と免疫染色法を用いた。4NQO 投与（8 週間）開始から投与終了後の 12 週までの舌組織では、p16 癌抑制遺伝子のメチル化はほとんど検出されなかった。しかし、20 週以降では舌背後部部の病変（異型上皮、癌）や周囲組織においてメチル化が検出された。扁平上皮癌においては、より明らかな p16 のメチル化が検出された。また、20 週以降では癌の発生が少ない舌前方部の正常組織においてもメチル化を検出したものを認めた。同様に、E-cadherin 癌抑制遺伝子においても MSP 法でメチル化を検索したが、メチル化はすべてにおいて検出されなかった。p16 の免疫染色では 4NQO 非投与群に比べ、4NQO 投与群は舌背後方正常上皮において p16 陽性率が高かった。また、正常上皮に比べ、異型上皮では、p16 陽性率が高く、癌（早期癌、浸潤癌）において p16 の陽性率の低下がみられた。以上から、4NQO 誘発ラット舌癌モデルでは前癌病変やその周囲組織においてメチル化異常が認められ、p16 のメチル化による早期の発癌への関与が示唆された。これはヒト口腔癌と同様の現象であり、4NQO 誘発ラット舌癌モデルのヒト口腔癌での類似性が示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,200,000	660,000	2,860,000

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：癌、動物、遺伝子

1. 研究開始当初の背景

発癌は多段階の遺伝子異常とエピジェネ

ティックな異常により、細胞が非可逆的な増殖優位性を獲得することにより起こるとき

れ、それは口腔発癌においても同様である。癌におけるエピジェネティックな異常には、DNAメチル化の異常、ヒストン修飾の異常、ゲノムインプリンティングの異常などがあり、特に癌におけるDNAメチル化異常の特徴として、ゲノム全体の低メチル化とある特定遺伝子のプロモーター領域におけるCpGアイランドの部分的な高メチル化がある。プロモーター領域が高メチル化した場合、下流の遺伝子のmRNAへの転写が抑制(サイレンシング)され、遺伝子の不活化を引き起こすことが示されてきた。また、一部の癌では、癌抑制遺伝子のサイレンシングによる不活性化が高頻度に認められ、p16、E-cadherinなど多くの重要な癌抑制遺伝子のDNAメチル化異常とそのサイレンシングが重要な役割を果たしていることが注目を集めてきた。

DNAメチル化異常の検出によく用いられる手技としてmethylation-specific PCR (MSP)法があり、多くの非メチル化DNAが混在する場合でも高感度に検出可能となり、我々もこれまでにこの方法を用いてヒト口腔癌のp16、MGMTのDNAメチル化異常を報告してきた。また、そのほかにp15、E-cadherinなどのメチル化異常がヒト口腔癌において報告されており、ヒト口腔発癌においてもDNAメチル化異常の関与が示唆されてきた。

一方、4-ニトロキノリン1-オキサイド(4NQO)誘発ラット舌癌モデルは、口腔発癌機序を検索するためのモデルとして頻用され、我々もこのモデルを用いて様々な口腔発癌化学予防物質を報告すると同時に多段階発癌モデルとしての有用性を示してきた。

しかしながら、この4NQO誘発ラット口腔癌の遺伝子メチル化異常の解析はp16のDNAメチル化異常の報告が1例あるのみで、発癌過程における経時的解析は全く研究されていない状態であった。また、他の遺伝子での報告はなく不明な点が多いままとなっていた。

2. 研究の目的

4NQO誘発ラット舌癌モデルを用いて、ヒト口腔癌でメチル化異常が報告されている遺伝子において、その発癌過程における遺伝子メチル化異常を解析し、ヒトの口腔発癌との類似性を検討し、今後の新たな口腔発癌抑制物質やDNAメチル化阻害剤の開発において、4NQO誘発ラット舌癌モデルが口腔発癌モデルとして有用であるかどうかについても検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 4-NQO誘発ラット舌癌モデルの作製

6週齢F344ラットを以下のグループに分けた。

- ・グループ1: 4-NQO投与群 83匹。
- ・グループ2: 非処置群 24匹。

グループ1は、実験開始より8週間20ppmの4-NQOの飲水投与を行った。4NQOがメチル化異常に直接的に関与する遺伝子についても解析するため、開始2週後(8匹)、4週後(10匹)、6週後(10匹)、8週後(10匹)、10週後(10匹)、12週後(10匹)、20週後(12匹)、32週後(13匹)にラットを犠牲死し舌組織を採取した。舌組織は2分割し、一方はホルマリン固定し、もう一方は-80°Cで凍結保存した。グループ2は、非処置群で開始2週後(3匹)、4週後(3匹)、6週後(3匹)、8週後(3匹)、10週後(3匹)、12週後(3匹)、20週後(3匹)、32週後(3匹)に犠牲死とし舌組織をグループ1と同様に採取・保存した。

(2) 病理組織学的検索

ホルマリン固定をおこなった組織はパラフィン包埋し、病理組織学的検索、免疫組織化学的検索用に連続切片を作製した。病理組織学検索にはH・E染色を行い、組織型の分類(正常粘膜、過形成粘膜、異形成粘膜[軽度・中等度・高度]、乳頭腫、早期癌、浸潤癌)を行った。

(3) ゲノムDNA抽出

凍結標本から、DNA抽出を行った。DNA抽出のための組織は病変のできやすい舌背後方と比較のために舌背前方の上皮組織から採取し、病変がある場合はH・E染色標本を参考に病変を採取した。

(4) methylation-specific PCR (MSP)法によるDNAメチル化異常の解析

抽出したDNAをバイスルファイト処理した後、メチル化異常をmethylation-specific PCR (MSP)法にて検出し、評価検討した。解析する遺伝子は、ヒト口腔扁平上皮癌においてDNAの高メチル化が報告されているp16とE-cadherinとした。プライマーはNiwa T, Yamashita S, Tsukamoto T. et al. Whole-genome analyses of loss of heterozygosity and methylation analysis of four tumor-suppressor genes in N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced rat stomach carcinomas. Cancer Sci. 2005 Jul;96(7):409-13. を参考に下記のものを用いた。

p16(M)

F: GAGGAGGAGAGATTTTCGATTTTC

R: AAAATACTAAACTCCTTTTCGAACG

p16(U)

F: AGGAGGAGAGATTTTGATTTT

R: AATACTAAACTCCTTTCAAACA

E-cadherin(M)

F: GTTTTTAGTTAATTAGCGGCGTC

R: AAACCTCAATAATACGCCGCG

E-cadherin(U)

F: GTGTTTTAGTTAATTAGTGGTGT

R: CTTAAAACTCAATAATACACCACA

(5) 免疫染色によるメチル化異常遺伝子の不活化についての解析

p16 遺伝子について、マウスモノクローナル抗体 (F-12, sc-1661, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) を用いて免疫染色 [Envision+キット/HRP(DAB)使用] を行い、遺伝子の不活化の有無について確認した。

4. 研究成果

(1) 4NQO 投与開始から 12 週までの検体では、p16 のメチル化はほとんど検出されなかった。しかし、20 週以降では舌背後方部の病変 (異型上皮、癌) や周囲組織においてメチル化が検出された。扁平上皮癌においては、より明らかな p16 のメチル化が検出された。また、20 週以降では舌前方部の正常組織においてもメチル化を検出したものを認めた (図 1)。

Methylation status of p16 promoter

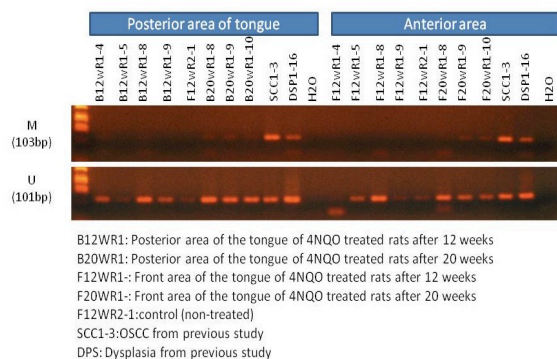


図 1 4NQO 投与ラットの舌組織における MSP 法による p16 のメチル化の検出

(2) 同様に、E-cadherin においても遺伝子プロモーター領域のメチル化異常を MSP 法で検索したが、メチル化はすべての標本において検出されなかった。

(3) p16 の免疫染色では 4NQO 非投与群に比べ、4NQO 投与群は舌背後方正常上皮において p16 陽性率が高かった。また、正常上皮に比べ、異型上皮では p16 陽性率が高かったが、癌 (早期癌、浸潤癌) において p16 の陽性率の低下 (p16 遺伝子の発現の低下) がみられた。

以上の結果から、p16 癌抑制遺伝子は

4NQO 誘発ラット舌癌モデルにおいても、前癌病変やその周囲の正常組織においてメチル化異常が認められ、p16 のプロモーター領域のメチル化による早期の発癌への関与が示唆された。これはヒト口腔癌や他の癌と同様の現象であり、同モデルのヒト口腔癌での類似性も示唆される結果となった。特に 4NQO 投与 (8 週間) 開始から 20 週目の時期は舌粘膜上皮が p16 のプロモーター領域が高度にメチル化状態になり、癌化と正常状態の維持との境界にあると思われる。さらに、32 週目においてもほとんどがメチル化を検出しており、病理組織学的に正常な粘膜であっても遺伝子的には p16 のメチル化異常は継続していることが示唆された。もし、有用な候補とされる DNA メチル化阻害剤が存在し、このモデルにおいてその効果をテストするならば、12 週以降に投与すれば、よいと思われる。また、同様に脱メチル化剤であれば、20 週以降に投与し、効果を確認するのがよいと思われる。

ただし、MSP 法では組織別のメチル化の割合が不明であり、今後、リアルタイム PCR 法による解析を予定している。

一方、免疫染色において正常上皮に比べ、異型上皮の方が p16 の陽性率が高かった点はメチル化異常の検出結果と相反する結果となった。この結果から、癌化の過程で p16 癌抑制遺伝子は、プロモーター領域のメチル化による転写抑制による不活化はあるが、一方で前癌状態においては、p16 の発現が活性化され、癌化の抑制に働いていることが推察された。しかし、これはまだ推論にすぎず、今後のさらなる研究課題となった。

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 3 件)

- ① Kato K, Long NK, Makita H, Toida M, Yamashita T, Hatakeyama D, Hara A, Shibata T: Effect of green tea polyphenol on methylation status of RECK gene and cancer cell invasion in oral squamous cell carcinoma cells. Br J Cancer. 99(4), 647-654, 2008 査読あり
- ② Long NK, Kato K, Yamashita T, Makita H, Toida M, Hatakeyama D, Hara A, Mori H, Shibata T: Hypermethylation of the RECK gene predicts poor prognosis in oral squamous cell carcinomas. Oral Oncol. 44, 1052-1058, 2008 査読あり
- ③ Long NK, Makita H, Yamashita T, Toida M, Kato K, Hatakeyama D, Shibata T:

Chemopreventive effect of fermented brown rice and rice bran on 4-nitroquinoline 1-oxide-induced oral carcinogenesis in rats. Oncol Rep. 17(4), 879-85, 2007 査読あり

6. 研究組織

(1) 研究代表者

牧田 浩樹 (MAKITA HIROKI)
岐阜大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：50345790

(2) 研究分担者

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 KEIZO)
岐阜大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：40397336
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