

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 5 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592519

研究課題名（和文）口腔癌とその周囲に広がる異型上皮の段階的なエピジェネティック変化を探索する

研究課題名（英文）The search of graded epigenetic change of oral cancer and Neighboring epithelial dysplasia

研究代表者

藤田 一 (FUJITA HAJIME)

新潟大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：60271805

研究成果の概要（和文）：下顎歯肉癌 2 例の摘出標本から健常部（N）、異型上皮部（D）、癌部（C）の組織検体を採取し、ゲノム DNA を抽出、illumina HumanMethylation27 にて DNA メチル化解析し、統計解析を行った。N 群→D 群→C 群で段階的にメチル化レベルが上昇した遺伝子は、EPDR1、FOXL1、FLJ21159、HOXB4、PRAC、DAPK1、FLJ46156、WDR8、BARHL2、NFAM1 など、一方、段階的にメチル化レベルが低下した遺伝子は、MEGEA3、GJB7、MFAP2、GPLD1、LOC348645、MEGEA6、FCN2、CCL1、SLC24A2、C9orf84 などであった。今後、個人差解消のため症例を増やす必要がある。

研究成果の概要（英文）： We obtained a tissue specimen of normal tissue (N), epithelial dysplasia (D) and cancer (C), and extracted genomic DNA from the sample of two carcinoma of mandibular gingiva. We analyzed DNA methylation using illumina HumanMethylation27 and conducted the statistical analysis of the results. The gene which a methylation level rose to progressively in N group → D group → C group was EPDR1, FOXL1, FLJ21159, HOXB4, PRAC, DAPK1, FLJ46156, WDR8, BARHL2, NFAM1. Conversely, the gene which a methylation level decreased progressively was MEGEA3, GJB7, MFAP2, GPLD1, LOC348645, MEGEA6, FCN2, CCL1, SLC24A2, C9orf84. For the cancellation of the individual difference, it will be necessary to increase cases in future.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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： (1) 口腔扁平上皮癌 (2) 異型上皮 (3) エピジェネティクス (4) DNA メチル化 (5) 多段階発癌

1. 研究開始当初の背景

癌の発生や進展には、癌遺伝子の活性化と癌抑制遺伝子の不活性化が関与しており、現

在までに様々な癌に関して、突然変異や染色体欠失など、塩基配列の変化すなわちジェネティックな変化を中心に解明が進められて

きた。これに対して近年、個体の発生や分化の際のプログラム制御、様々な疾患における遺伝子発現制御の機構として、塩基配列の変化を伴わないエピジェネティックな変化が注目されている。特に癌に認められるエピジェネティックな変化には、①ゲノムワイドな低メチル化、②特定ゲノム領域の高メチル化があり、①はゲノム不安定性を誘発して発癌に関与していると考えられ、②は癌抑制遺伝子のプロモーター領域の CpG アイランドのメチル化により、癌抑制遺伝子を不活性化する機構として知られている。

口腔扁平上皮癌のエピジェネティックな変化に関しては、最近盛んに研究が進められ、これまでに CDKN2A, CDH1, MGMT, DAPK1 (Ha PK, Califano JA. Lancet Oncol 7: 77-82, 2006), LRP1B (Nakagawa T, et al. Cancer Sci 97: 1070-1074, 2006), PRTFDC1 (Suzuki E, et al. Oncogene 26: 7921-7932, 2007), RASSF2 (Imai T, et al. Cancer Sci 99: 958-966, 2008), MTNR1A (Nakamura E, et al. Cancer Sci 99: 1390-1400, 2008)などの癌抑制遺伝子の高メチル化が発癌に関与していると報告されている。

ところで、DNA の異常メチル化には、加齢やウイルス感染、炎症など様々な環境要因に影響を受けている。大腸においては、潰瘍性大腸炎に伴う異型上皮で様々な遺伝子に高メチル化が認められ、その異型度に相関して有意にメチル化が増加している(Sato F, et al. Cancer Res 62: 1148-1151, 2002; Sato F, et al. Cancer Res 62: 6820-6822, 2002)。また、正常上皮でも、異型上皮を認める症例では、異型上皮を認めない症例よりも有意にメチル化レベルが高い。これらから大腸上皮では、前癌段階でエピジェネティックな変化が起こり、その後、様々な遺伝子発現の抑制を介して癌化を生じるのではないかと考えられる。

一方、口腔扁平上皮癌は、浸潤癌周囲に白色病変(異型上皮)が拡がっていることが多く、その周囲の一見正常上皮と思える箇所でも、何らかの異形成が認められることを多く臨床経験している。これらは、大腸上皮と同様に、口腔粘膜でも加齢や炎症などの影響でエピジェネティックな変化を生じ、その後、多段階のエピジェネティックな変化によって異型上皮から発癌へと進行しているものと予想されるが、これまでに同一個人における異型上皮を含めた段階的なエピジェネティックな変化に関する検索はなされていない。

欧米では、最近、癌におけるエピジェネティクス制御異常の解除を目指した治療が試みられている。これは、ジェネティックな変化が非可逆的であるのに対し、エピジェネテ

ティックな変化は可逆的であり、DNA メチル化阻害剤などにより脱メチル化し、遺伝子発現を正常化させることが可能であり、骨髄異形成症候群などにおいてその有用性が報告されている。

したがって口腔扁平上皮癌において、前癌病変である異型上皮からの段階的なエピジェネティックな変化を検索することは、口腔扁平上皮癌に発癌メカニズムを明らかにし、更に癌のみならず前癌段階で生じた変化をリプログラミングの手法により正常化させる新たな治療の開発が期待され、加えて異型上皮発症前の診断および予防法の確立にも寄与するものと思われる。

2. 研究の目的

(1) 口腔扁平上皮癌および異型上皮に早期から生じるエピジェネティックな変化を明らかにする。

口腔扁平上皮癌とその周囲に拡がる異型上皮および正常粘膜の DNA メチル化解析を行って、発癌過程の早期から生じるエピジェネティックな変化を明らかにする。

(2) 異型上皮から発癌に至る段階的なエピジェネティックな変化を明らかにする。

患者毎に異型上皮と浸潤癌の両者あるいは一方に高メチル化を認める癌抑制遺伝子の同定とその程度を検証し、診断に有用なマーカーの選定し、今後の治療法や予防法の開発への応用を目指す。

3. 研究の方法

(1) 組織検体の採取

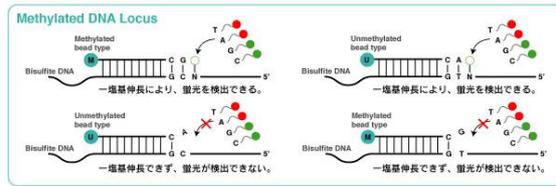
新潟大学歯学部倫理委員会の審査と承認(承認番号 21-R29-10-03)を受け、新潟大学医歯学総合病院口腔外科顎顔面外科診療室を受診した口腔癌患者のうち、口腔扁平上皮癌の周囲に白色病変(異型上皮)を認めた 2 症例に、研究の主旨を説明して同意書に署名をいただき、手術時に切除した摘出標本から、癌病巣部(C)、異型上皮部(D)、安全域として余剰に切除した正常粘膜部(N)からそれぞれ研究用検体を採取した。

症例の内訳は、症例 1 は 70 歳男性、症例 2 は 48 歳男性で、いずれも下顎歯肉癌であった。

(2) DNA メチル化解析

組織検体は、MBL 社の DNA マイクロアレイ受託解析に外注してゲノム DNA を抽出後、バイサルファイト処理、全ゲノム増幅(1000 倍以上)と断片化(300~600bp 程度)処理をした後、illumina HumanMethylation27 のアッセイにてビーズチップとのハイブリダイゼーション、ポリマーゼによる一塩基伸長を行った後、スキャナによりデータを読み取り、14,000 以上の遺伝子から選択された 27,578 の CpG サイトの DNA メチル化レベ

ルの定量化を行った。



(3) 統計解析

得られたデータは、それぞれの検体間の差分解析を行った後、抽出・比較分析を行って2症例のN群、D群、C群と段階的にDNAメチル化レベルが変化していた遺伝子を抽出した。

差分解析において、メチル化レベルが高い(1に近い)場合は赤、低い(0に近い)場合は緑で表示した。また、信頼性の低い値は除外し、2検体間の β の差分を取ったものを本解析の結果とした。なお、2検体間に0.15以上の差が見られた場合、メチル化レベルに違いがあると判定した。

抽出・比較分析においては、 β 値に差のないCpGサイトを抽出するため、2症例間で差分値0.15未満のものを抽出後、 β 差分値0.05以上かつ変動係数0.2以上のCpGサイトを除外し、各群の2データの平均を取って、3群の差分値および変動比を計算した。

なお、本来は有意差検定の方が理想ではあるが、3症例以上でなければ有意差検定を用いることができないため、本研究では、以上の方法にて統計解析を行った。

4. 研究成果

(1) 結果

2症例間でメチル化レベルの差が少なく(β 差分差0.15未満)、N群→D群でメチル化レベルが上昇した遺伝子は、ELMO1(+0.3862)、CD38、TRIM58、EPDR1、FLT3、SHANK2、SORCS3、RGS7、ONECUT2、POU4F1などで、D群→C群でメチル化レベルが上昇した遺伝子は、HOXB4(+0.4321)、NFAM1、HSF4、DLEC1、DAPK1など、メチル化レベルが低下した遺伝子は、GPLD1(-0.4360)、MFAP2、GJB7、MAGEA3、CCL1などであった。また、N群→C群においてメチル化レベルが上昇した遺伝子は、CA8(+0.6906)、ZNF625、ZNF132、ZNF542、WNT9B、ZFP41、FLJ37549、EPHA5、GPX7、ADCY4などであった。

2症例間でメチル化レベルの差が少なく、N群、D群、C群で段階的にメチル化レベルが上昇した遺伝子は、EPDR1、FOXL1、FLJ21159、HOXB4、PRAC、DAPK1、FLJ46156、WDR8、BARHL2、NFAM1、ST6GALNAC5、DLEC1、DCC、ADAMTSL1、ATP5G2、EOMES、POU4F2、TSPYL5、

POU3F1、LYN、RBP5、SERPING1などであった。一方、段階的にメチル化レベルが低下した遺伝子は、MEGEA3、GJB7、MFAP2、GPLD1、LOC348645、MEGEA6、FCN2、CCL1、SLC24A2、C9orf84、FLJ38451、FAM12B、SFTPD、Cxorf20、FABP1、RUNX2などであった(下図)。

TargetID	遺伝子名	N群	D群	C群	差		
					N→D	D→C	N→C
ce0449325	EPDR1	0.1392	0.4860	0.7042	0.3468	0.2192	0.5650
ce0699715	FOXL1	0.2089	0.4818	0.7650	0.2729	0.2832	0.5661
ce03616357	FLJ21159	0.0632	0.3210	0.5932	0.2678	0.2782	0.5460
ce21546671	HOXB4	0.0852	0.1886	0.6207	0.1034	0.4321	0.5355
ce14468834	HOXB4	0.0844	0.2378	0.6294	0.1435	0.3915	0.5351
ce12374721	PRAC	0.1443	0.3644	0.6713	0.2201	0.3069	0.5270
ce15746719	DAPK1	0.1789	0.3239	0.6892	0.1450	0.3643	0.5093
ce18871276	FLJ46156	0.0941	0.2395	0.5933	0.1454	0.3538	0.4992
ce26128092	WDR8	0.1509	0.4267	0.6472	0.2759	0.2205	0.4963
ce17241310	BARHL2	0.1876	0.4627	0.6754	0.2651	0.2227	0.4878
ce17568996	NFAM1	0.1354	0.2054	0.6189	0.0700	0.4136	0.4835
ce13823136	ST6GALNAC5	0.0327	0.1726	0.4971	0.1399	0.3245	0.4644
ce23881725	DLEC1	0.1268	0.2242	0.5906	0.0975	0.3664	0.4638
ce01839464	DCC	0.1538	0.4291	0.6096	0.2753	0.1805	0.4558
ce00116234	ADAMTSL1	0.0663	0.1651	0.5109	0.0988	0.3468	0.4446
ce08995424	ATP5G2	0.0273	0.1261	0.4703	0.0988	0.3442	0.4430
ce119540820	EOMES	0.1217	0.3754	0.5460	0.2537	0.1706	0.4243
ce02624705	DCC	0.1649	0.4217	0.5860	0.2568	0.1643	0.4211
ce24199834	POU4F2	0.1477	0.4074	0.5635	0.2597	0.1561	0.4159
ce15747595	TSPYL5	0.2854	0.5372	0.6821	0.2508	0.1449	0.3957
ce21243096	POU3F1	0.1204	0.3817	0.5117	0.2613	0.1301	0.3914
ce03973663	LYN	0.2680	0.2878	0.6256	0.0198	0.3378	0.3576
ce15669340	RBP5	0.0351	0.0396	0.3753	0.0044	0.3357	0.3402
ce03061733	SERPING1	0.4183	0.6686	0.7356	0.2502	0.0670	0.3172
ce1946401	RUNX2	0.6527	0.6491	0.3259	-0.0036	-0.3232	-0.3268
ce13910382	FABP1	0.8171	0.7998	0.4762	-0.0172	-0.3236	-0.3408
ce13845843	Cxorf20	0.8217	0.8030	0.4660	-0.0188	-0.3370	-0.3557
ce08468487	SFTPD	0.6937	0.6653	0.3366	-0.0284	-0.3287	-0.3571
ce15842430	FAM12B	0.8170	0.7783	0.4315	-0.0387	-0.3468	-0.3855
ce24678320	FLJ38451	0.8673	0.8456	0.4795	-0.0217	-0.3661	-0.3878
ce13314167	C9orf84	0.8784	0.8211	0.4648	-0.0573	-0.3563	-0.4136
ce12348970	SLC24A2	0.8856	0.8204	0.4660	-0.0652	-0.3546	-0.4197
ce20565988	CCL1	0.8407	0.7898	0.4169	-0.0510	-0.3729	-0.4239
ce2614184	FCN2	0.8777	0.8078	0.4527	-0.0698	-0.3592	-0.4250
ce15408454	MAGEA6	0.9158	0.8341	0.4890	-0.0818	-0.3460	-0.4278
ce15149938	LOC348645	0.8453	0.7679	0.4140	-0.0774	-0.3539	-0.4313
ce14023451	GPLD1	0.8065	0.8036	0.3676	-0.0030	-0.4360	-0.4390
ce08477744	MFAP2	0.8041	0.7602	0.3591	-0.0438	-0.4011	-0.4460
ce22884082	GJB7	0.7497	0.6656	0.2708	-0.0841	-0.3948	-0.4789
ce07545232	MAGEA3	0.9180	0.8188	0.4327	-0.0992	-0.3861	-0.4853

(2) 考察

潰瘍性大腸炎に伴う異型上皮では、様々な遺伝子に高メチル化が認められ、その異型度に相関して有意にメチル化が増加している。一方、口腔扁平上皮癌に関して様々な癌抑制遺伝子の高メチル化が報告がされているが、浸潤癌周囲に拡がる異型上皮のエピジェネティックな変化との関連について検索した報告はなかった。

そこで私たちは、口腔扁平上皮癌の発癌過程において、前癌段階の早期にエピジェネティックな変化が生じ、その後、多段階のエピジェネティックな変化が加わって、異型上皮から発癌へと進行しているものと予測し、これには同一人の浸潤癌とその周囲に拡がる異型上皮および正常粘膜におけるメチル化状態を定量的に解析し、多人数について比較検討を行う必要があると考えた。

しかしながら、今回の研究では、得られた症例は2例のみであり、以上のデータは、個体差による影響が大きいと考えられるため、今後は症例数を増やし、再検討を行っていく必要がある。

将来的には、口腔粘膜に生じる炎症(歯周

炎や金属アレルギー等)や前癌状態(口腔扁平苔癬等)にも検索を拡げ、口腔粘膜に特徴的なエピジェネティックな変化を明らかにし、発癌メカニズムの解明、発癌リスクの予測に役立つものと考えている。

更に、口腔扁平上皮癌の発癌メカニズムの一端が明らかになることにより、口腔扁平上皮癌患者においては、エピジェネティクス制御異常の解除を目指した新たな治療法の開発が期待でき、QOLの向上、治療成績の向上につながり、患者にとって多くの利益をもたらすと考えられる。

また、前癌段階の早期に認めるエピジェネティックな変化や発癌過程での段階的変化を明らかにすることにより、異型上皮や正常粘膜の段階での発癌リスクの診断、早期に生じたエピジェネティックな変化を可逆的に正常化させる新たな癌予防法の開発が期待でき、癌発症前の国民にとっても有意義なものと考えられる。

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 2 件)

① Fujita H, Kobayashi T, Tai H, Nagata M, Hoshina H, Nishizawa R, Takagi R, Yoshie H: Assessment of 14 functional gene polymorphisms in Japanese patients with oral lichen planus: a pilot case-control study. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 査読有, 38(9), 2009, 978-983.

② Hirano C, Nagata M, Noman A, Kitamura N, Ohnishi M, Ohyama T, Suzuki K, Yoshizawa K, Izumi N, Fujita H, Takagi R: Tetraspanin gene expression levels as potential biomarkers for malignancy of gingival squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*, 査読有, 124, 2009, 2911-2916.

[学会発表] (計 1 件)

① 藤田 一, 池田順行, 齋藤太郎, 高木律男, 林 孝文, 山崎 学, 朔 敬: 下顎骨エナメル上皮腫・腺様歯原性腫瘍ハイブリッド腫瘍の1例. 第55回日本口腔外科学会総会, 2010年10月16~18日, 千葉市.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 一 (FUJITA HAJIME)
新潟大学・歯学部・非常勤講師
研究者番号: 60271805

(2) 研究分担者

高木 律男 (TAKAGI RITSUO)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号: 20143795
星名 秀行 (HOSHINA HIDEYUKI)
新潟大学・医歯学総合病院・講師
研究者番号: 30173587
永田 昌毅 (NAGATA MASAKI)
新潟大学・医歯学総合病院・講師
研究者番号: 10242439
池田 順行 (IKEDA NOBUYUKI)
新潟大学・医歯学系・助教
研究者番号: 70419282

(3) 連携研究者

なし