

## 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 25 年 5 月 18 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592212

研究課題名（和文）4NQO 誘発ラット舌発癌モデルにおける早期メチル化異常と脱メチル化による影響の解析

研究課題名（英文）Analysis of the early aberrant DNA methylation and influence of demethylation agent in the 4NQO-induced rat tongue cancer model

研究代表者

加藤 恵三（KATO KEIZO）

岐阜大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：40397336

研究成果の概要（和文）：

ヒトの発がん過程において epigenetic な変化が注目されているが、病変のない早期にヒトにおいて詳細に検討することは困難であるため、4NQO 誘発舌発癌ラットモデルにて p16 と MGMT を対象遺伝子として検討した。同時にエピガロカテキンガレート(EGCG)を投与し脱メチル化についても検索した。その結果、メチル化は 3 週、6 週、9 週のいずれも著明な変化は生じなかったが、タンパクレベルにおいて、EGCG 投与群は抑制する傾向がみられた。これらにより発癌物質などは早期から epigenetic な変化をもたらすわけではなく、長期間の曝露が関与することが示された。また EGCG は長期間投与で効果がある可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：

Epigenetic alteration attracts attention of the carcinogenesis process. However, it is difficult to examine at early time without the lesion. Therefore we examined in 4NQO-induced rat tongue carcinogenesis model. The gene examined p16 and MGMT. In addition, we examined epigallocatechin gallate (EGCG) about demethylating ability. As a result, the significant change of the methylation status did not occur in each period. However, slightly controlled tendency was seen in the protein level in EGCG group. By these results, the carcinogenesis agent does not bring the epigenetic alteration, immediately. It was shown that long-term sustained influence participated. Furthermore, the possibility was shown that EGCG was effective by the long-term dosage.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
2012 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：癌 メチル化

## 1. 研究開始当初の背景

ヒト発癌過程において、遺伝子メチル化異常などのepigeneticな変化は重要な役割を果たし、種々の癌抑制遺伝子、DNA修復遺伝子などのプロモーター領域CpGアイランドのメチル化によるサイレンシング（不活化）とこれに連鎖する癌関連遺伝子異常の誘発、microsatellite instability(MSI)等を生じさせ、genome wideなメチル化異常（CpG island methylator phenotype: CIMP）などを経て発癌に向かうことが示唆されてきている。

口腔癌と遺伝子メチル化異常については、近年、多くの報告がなされる様になり、我々も肺癌にて予後因子ともなっている癌抑制遺伝子(*p16*)・DNA修復遺伝子(*MGMT*)に着目し、ヒト口腔扁平上皮癌でこれらの遺伝子に高い割合でメチル化異常を確認し、これらのサイレンシングが生じていることを報告してきている（Kato et al.: J. Cancer Res. Clinic. Oncol.2006）。さらに、細胞外マトリクス分解酵素(MMPs)の産生を制御(抑制)する*RECK*遺伝子のメチル化異常によるサイレンシングと予後とが良く相関すること、*in vitro*の検討ではあるが、脱メチル化により浸潤抑制が可能であること（Kato. et al.: Br. J. cancer 2008）を明らかにしてきており、口腔癌においても遺伝子メチル化異常などのepigeneticな因子が発癌・悪性化進展に深く関与していることが示されつつある。

これまでにわれわれは口腔癌患者の正常口腔粘膜においてすでにメチル化が生じていることを確認している。また、メチル化は口腔領域の発癌因子と考えられる喫煙・アルコール摂取とも関係があることを明らかにしてきている。

さらに口腔領域の前癌病変からもメチル化は報告されており（Takeshima et al.: J.Oral pathol. Med.2008）、口腔が発癌因子に暴露されることで、かなり早期からメチル化異常が生じていることが示唆される。しかしながら、ヒトの臨床材料のため、発癌過程におけるこれらの現象の連鎖や重積の評価は困難となっている。

メチル化異常は外部からの様々な刺激・物質により生じることが示されつつあり、われわれも、生活習慣(タバコ・アルコール)が、ヒト健常口腔粘膜(肉眼的)において*p16*メチル化異常が生じていることを明らかにしつつある。しかしながら、ヒトにおいてこの検証を詳細に進めることは倫理的に困難であり、本研究により、ヒト口腔癌におけるDNAメチル化異常との相関性が示されれば、詳細な検討を可能にすると考えられる。また、DNAのメチル化異常はgeneticな遺伝子変異とは異なり、脱メチル化作用のある物質(緑茶中に多く含まれるEpigallocatechin-3-Gallate等)により修復することが可能であり、脱メ

チル化によりメチル化の進展、ならびに臨床病態の制御が可能となれば新たな予防策・治療法・治療薬開発への道も拓くと考えられる。

## 2. 研究の目的

4NQO誘発ラット舌発癌モデルを用いてメチル化の経時的推移を明らかにする。さらに脱メチル化剤を応用し、脱メチル化と臨床病態との相関を確認することで、脱メチル化による発癌予防、病態の進行の制御の可能性を探る。

## 3. 研究の方法

### (1) 4NQO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 コントロール群
- ・グループ2 エピガロカテキンガレート投与群(3週・6週・9週)
- ・グループ3 4NQO投与群(3週・6週・9週)
- ・グループ4 4NQO+エピガロカテキンガレート投与群(3週・6週・9週)

グループ2・3・4は実験開始より終了まで20ppmの4NQO投与をおこなった。各グループを3週、6週、9週で安楽死させた後、舌を摘出、半分はホルマリン固定を行い、病理組織学的評価として、残りは-80度で凍結保存を行い、メチル化などの分子生物学的評価目的に保存した。

### (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。HE標本を作製した後、組織型の分類を行い評価した。また、免疫染色はP16、MGMTにて染色をおこない、タンパクレベルの評価をおこなった。

### (3) 分子生物学的検索

*p16*・*MGMT*遺伝子のメチル化の評価についてはDNAを採取しておこなった。DNAの採取は舌背の上皮から行い、pyrosequence法により定量的にメチル化を評価することにより、経時的な変化を数値にしておこなった。Primerの設計は以下に示した。

*p16* forward

5'-AGGGGTTGGTTGGTTATTAG-3'

biotinylated reverse

5'-CTACCTACTCTCCCCCTCTC-3'

Sequencing primer

5'-GGTTGGTTATTAGAGGGT-3' MGMT

forward 5'-GTTTAGGATATGTTGGGATAGT

-3' biotinylated reverse

5'-CCACCCAAACACTCACCAAAT-3'

Sequencing primer

5'-GTTGGGATAGTTAGAGTTTTTAGAA-3'

(4) 免疫染色によるがん抑制遺伝子のタンパクレベルの解析

p16についてはp16 (F-12):sc-1661 マウスモノクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology, inc) を使用し、MGMT については anti-MGMT antibody (SPM287), prediluted マウスモノクローナル抗体 (abcam) を使用してタンパクレベルの評価を行った。

#### 4. 研究成果

(1) pyrosequence 法によるメチル化の解析  
p16, MGMT 遺伝子について pyrosequence 法によりメチル化を定量化して検討した。いずれの遺伝子も9週間という短期間ではメチル化が生じないことが明らかとなった。すなわち、4NQO という発癌物質において、長期間曝露することによって epigenetic な変化が惹起するということが示唆された。

(2) 免疫染色によるタンパクレベルでの解析  
MGMT についてはメチル化とよく相関し、タンパクレベルでも MGMT 遺伝子の発現はみられなかった。しかし p16 についてはメチル化はみられないもののタンパクレベルの増加が3週という早期から観察された。この増加は time dependent に増加することが観察された。

(3) エピガロカテキнгаレートの効果  
メチル化については p16, MGMT とも変化がみられなかったが、タンパクレベルについては p16 において time dependent に減少させる傾向が示された。

これらの結果により発癌物質の曝露期間とメチル化の相関については、3~9週という早期においてはメチル化は生じないものと考えられた。これはヒトにおける喫煙、飲酒などの環境因子も少量、短期間であれば影響が少ないということとも関連し、矛盾のない結果と考えられる。これら環境因子は長期間の曝露が継続すれば、当然メチル化頻度、タンパクレベルとも上昇し、発癌の一因となりうると考えられた。

脱メチル化剤としてのエピガロカテキнгаレートの効果であるが、早期から効果が得られるという結果ではなかった。カテキンの作用として抗酸化作用があげられるが、これは長期間持続的に応用することで効果を発現すると考えられ、今回の結果でもメチル化の数値には大きな変動がないことから、短期間での使用では即効性がないことが裏付けられた。しかし、タンパクレベルにおいては9週では若干の発現を抑制する傾向がみられ、この点からも長期間の持続的な応用で効果を発現することが示唆された。

今回の検討において、メチル化については

プロモーター領域の一部を検索しているにすぎず、primer の設計などでも再検討の余地があると考えられた。また、検討期間においても比較短期間の検討であったことや、エピガロカテキンの至適濃度についてもさらなる検討が必要と考えられた。しかし、エピガロカテキンはタンパクレベルではわずかではあるが抑制効果を認めたことから、さらに対象とする遺伝子を増やし、期間を延長して検討することも重要であることが示唆された。

#### 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 4 件)

- 1) Kato H, Kanematsu M, Kato Z, Teramoto T, Mizuta K, Aoki M, Makita H, Kato K. Necrotic cervical nodes: Usefulness of diffusion-weighted MR imaging in the differentiation of suppurative lymphadenitis from malignancy. *Eur J Radiol. Jan; 82 (1): e28-35. 2013* (査読あり)
- 2) Hatakeyama D, Tamaoki N, Iida K, Yonemoto K, Kato K, Makita H, Toida M, Shibata T. Simple bone cyst of the mandibular condyle in a child: report of a case. *J Oral Maxillofac Surg. 70(9): 2118-23. 2012* (査読あり)
- 3) Hata K, Kubota M, Shimizu M, Moriwaki H, Kuno T, Tanaka T, Hara A, Hirose Y. Monosodium glutamate-induced diabetic mice are susceptible to azoxymethane-induced colon tumorigenesis. *Carcinogenesis. 33(3): 702-7. 2012* (査読あり)
- 4) Kudo Y, Iizuka S, Yoshida M, Nguyen PT, Siriwardena SB, Tsunematsu T, Ohbayashi M, Ando T, Hatakeyama D, Shibata T, Koizumi K, Maeda M, Ishimaru N, Ogawa I, Takata T. Periostin directly and indirectly promotes tumor lymphangiogenesis of head and neck cancer. *PLoS One. 7(8): Epub 2012* (査読あり)

[学会発表] (計 3 件)

- 1) 第 69 回日本癌学会総会  
4NQO 誘発ラット舌発癌モデルにおける遺伝子変異機構の解析 (2010. 9. 22-24 大阪)  
牧田浩樹、加藤恵三、柴田敏之
- 2) 第 55 回日本口腔外科学会総会  
4NQO 誘発ラット舌発癌モデルにおける遺伝子メチル化異常の解析 (2010. 10. 16-18 千葉)  
牧田浩樹、米本和弘、加藤恵三、畠山大二郎、山下知巳、柴田敏之

3) 第 19 回日本がん予防学会  
ヒト口腔扁平上皮がんにおける DNA メチル化  
異常の検討-擦過標本と組織標本の相関性-  
(2012. 6. 22-23 岐阜)  
加藤恵三、玉置也剛、飯田一規、米本和弘、  
畠山大二郎、牧田浩樹、山下知己、柴田敏之

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

加藤 恵三 (KATO KEIZO)  
岐阜大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：40397336

### (2) 研究分担者

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  
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  
牧田 浩樹 (MAKITA HIROKI)  
岐阜大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号：50345790  
山下 知己 (YAMASHITA TOMOMI)  
岐阜大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：80345793