

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463077

研究課題名(和文)環境因子による口腔粘膜メチル化異常の経時的解析と脱メチル化による影響の解析

研究課題名(英文)Diachronic analysis of the oral mucosa methylation abnormality by the environmental parameter and Analysis of the influence by demethylation agent

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：1)液状化細胞診を応用して口腔病変の診査を行った。液状化細胞診は客観的な評価が可能であることが示唆された。2)脱メチル化剤(EGCG)を応用し病理学的な評価を行った。EGCG投与前に散見されていた異型細胞の数・程度が、投与後には減少する現象が観察され、EGCGが細胞異型を改善する作用があることが示唆された。3)EGCG投与前後に口腔細胞の採取を行い、p16とMGMTのメチル化の改善についてpyrosequence法で検討し、症例によってはp16とMGMTのメチル化の改善を認めた。これらの事象からEGCGは脱メチル化作用が期待されるが、投与量、投与期間、投与方法については更なる検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：1) We applied liquid based cytology and examined the oral lesion. As a result, the liquid based cytology was available for the objective evaluation of the oral lesion, and it was suggested that liquid based cytology was a useful method. 2) We applied demethylation agent(EGCG) and performed a pathological evaluation. A few atypical cells were seen before the EGCG dosage. But after the EGCG dosage, the number of atypical cells were decreased, and the improvement of the cell variant was observed. It was suggested that EGCG improved a cell variant. 3) We gathered the oral cells, before and after the dosage of EGCG. Furthermore, we examined the improvement of methylation of the p16 and MGMT gene using pyrosequence method. As a result, improvement of methylation of p16 and MGMT gene was seen in some cases. By these facts, demethylation of EGCG is expected. However, further examination about dose, dosage period and dosage method is necessary.

研究分野：口腔外科学

キーワード：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、これまでにわれわれも以下のような研究を行ってきている。

1: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た(Kato et al.: J. Cancer Res. Clinic. Oncol.2006)。

2: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)を明らかにした。

3: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(Kato et al.: J. Cancer Res. Clinic. Oncol.2006)。また、メチル化は口腔領域の危険な環境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(投稿準備中)。

4:口腔領域の前癌病変においてメチル化が生じることが報告されており(Takeshima et al.: J.Oral pathol. Med.2008)、口腔が環境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。これらを明らかにするため4NQO誘発ラット舌癌モデルを用いて実証研究を進行中であり、脱メチル化剤によるメチル化の改善についても明らかにしつつある。

上記1~4の結果により、口腔は喫煙・アルコールなどの環境因子に暴露されることにより、肉眼的に異常のない早期からメチル化異常が生じている可能性があると考えられ、特に*p16*, *MGMT*, *RECK*などの遺伝子は高率でメチル化していることが示唆される。これら*p16*, *MGMT*, *RECK*などの遺伝子は前がん病変、悪性腫瘍でもメチル化が確認されており、口腔癌などの病変の発症、進展に関わる重要な遺伝子と考えられる。さらにメチル化については可逆的な変化であり脱メチル化剤(epigallocatechin-3-gallate(EGCG))で脱メチル化が可能であることが推察される。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た。

これまでヒトにおいて口腔からDNAを採

取するためには主に擦過による標本採取が行われてきた。綿棒による採取は細胞診で一般的に行われ侵襲が少なく簡便であるが、artifactが出やすい、細胞成分のロスがあるなどの欠点も指摘されていた。婦人科領域ではガラス面への直接塗抹ではなく、採取検体を一度液状検体化してから処理し、均質な検体を作製する液状化細胞診(Liquid Based Cytology:LBC)が普及しつつある。液状化細胞診とは、細胞診における細胞検体処理法の一つで、本法では採取した細胞診検体を分散液(保存液)中で攪拌・分散した後、細胞を回収しスライドガラス上へ薄く転写・塗沫し、固定した後、染色を行い細胞診標本作製する方法であり、効率よく細胞を回収でき、免疫組織化学的検索ならびに遺伝子検索も問題なく行える。これらの長所は口腔領域の経時的な観察、および遺伝子検索を必要とする本研究に適した採取法である。

遺伝子メチル化異常などのepigeneticな変化はわれわれのこれまでの研究(前述)で示される様に脱メチル化剤にて可逆的な変化であり、本研究において環境因子の暴露期間と遺伝子のメチル化異常、さらに脱メチル化による発癌制御との関係が示されれば、新たな口腔癌予防ならびに口腔癌治療の可能性を拓くものと期待される。

### 2. 研究の目的

研究期間内に以下の項目を明らかにすることを目的とする。

1) 環境因子とメチル化の相関について明らかにする。

飲酒歴・喫煙歴などの環境因子で分類し、それぞれをLBCで病理組織学的な評価を行うとともにメチル化についての評価を行う。病理組織学的評価・メチル化の評価は3ヶ月毎に行い経時的な変化を観察するとともに、臨床像(肉眼的な異常)もあわせて評価する。

2) 上記1を発展させ脱メチル化剤(EGCG)の応用を試みる。EGCGにより各種遺伝子の脱メチル化が経時的にどのように生じるのかを明らかにし、かつ臨床病態とどのように相関するかを評価する。

3) 脱メチル化が生じた患者においてEGCGを中断することにより再度メチル化が生じるかを検証する。再度メチル化が生じた場合、EGCGを再開することにより再度の脱メチル化が可能かを明らかにする。

### 3. 研究の方法

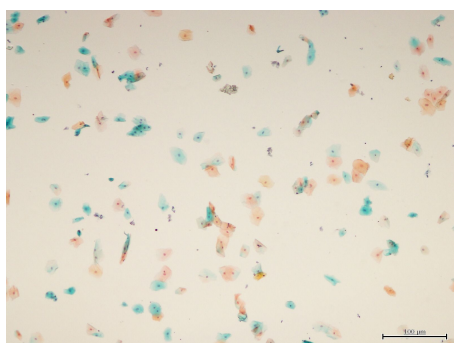
環境因子(喫煙歴、飲酒歴)を有する患者を曝露期間により分類し、LBC法により細胞を採取、分子病態学的(pyrosequencing法)に評価を行いメチル化について検討する。あわせて病理組織学的に評価を行う。

脱メチル化剤としてEGCGの経口投与錠を使用し、臨床病態・メチル化についての変化について検討する。

#### 4. 研究成果

##### 1) 液状化細胞診について

液状化細胞診(LBC)で評価する場合の最適な細胞採取方法を評価するため種々の方法を試みた。その結果、従来使用されてきた綿棒や婦人科領域で使用されるブラシよりも口腔内細胞診用のブラシ( orcellex (MBL))が有用であることが明らかとなった。また、LBCは従来の細胞診に比して細胞の重なりが少なく、背景がきれいであり、客観的な評価が容易であることから LBC は口腔細胞診の有用な方法であることが示唆された。下図は実際のLBCの1例である。細胞の重なりがなく、評価しやすい所見である。

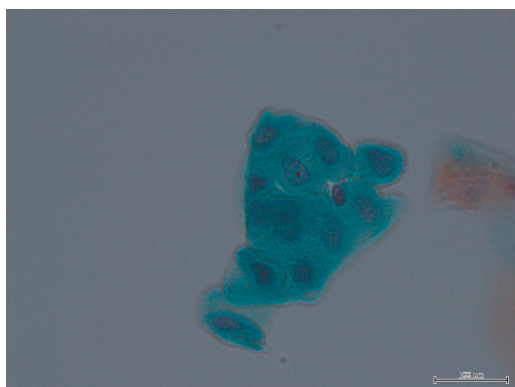


##### 2) 脱メチル化剤を応用した病理学的評価

脱メチル化剤(EGCG)を応用し細胞の形態的な変化について臨床で使用される分類を参考に評価を行った。

その結果、EGCG投与前に散見されていた異型細胞の数・程度が、投与後にはいずれも減少する現象が観察され、EGCGが細胞異型を改善する作用があることが示唆された。

下図はEGCG投与前の軽度異型細胞の写真である。EGCG投与後にこれらの異型細胞は認められなくなった。



##### 3) 脱メチル化剤によるメチル化の改善について

EGCGを一定期間投与した前後で細胞の採取を行い、p16, MGMT 遺伝子のメチル化の改善について検討した。メチル化の改善については pyrosequence 法により検討した。その結果、症例によっては有意なメチル化の改善は確認できなかった。しかし、症例によっては p16, MGMT のメチル化の改善について一定の相関がみられた。

これらの事象から EGCG は一定の脱メチル化作用が期待されるものの、投与量、投与期間、投与方法、対象とする疾患などについてさらなる検討が必要であることが明らかとなった。

#### 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

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

玉置 也剛 (TAMAOKI, Naritaka)  
岐阜大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：40585303

柴田 敏之 (SHIBATA, Toshiyuki)  
岐阜大学・医学(系)研究科(研究院)・教授  
研究者番号：50226172

田中 卓二 (TANAKA, Takuji)  
岐阜大学・医学(系)研究科(研究院)・非常勤講師

研究者番号：40126743

原 明 (HARA, Akira)  
岐阜大学・医学(系)研究科(研究院)・  
教授  
研究者番号：10242728

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：