

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 14 日現在

機関番号：27102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463074

研究課題名(和文) テロメラーゼ関連遺伝子のメチル化を指標とした簡便で高精度な細胞診システムの開発

研究課題名(英文) Development of simple and highly accurate cytodiagnostic system with methylation of telomerase related gene.

研究代表者

富永 和宏 (Tominaga, Kazuhiro)

九州歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：40188793

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：口腔癌の早期発見・早期治療が重要であるが他の口腔粘膜疾患と類似するものもあり、診断に苦慮することも多い。ゆえに口腔癌の早期診断の一助となるスクリーニングシステムの開発が重要である。テロメラーゼは癌患者の80%以上に発現しており、われわれはテロメラーゼの構成要素であるhTERTに着目し、同遺伝子プロモーター領域の異常メチル化を検出することで口腔癌の早期発見が可能かどうか検討した。その結果、口腔癌患者では、正常口腔粘膜と比較して、hTERT遺伝子プロモーター領域のメチル化頻度が有意に高く、hTERT遺伝子の異常メチル化を測定することで、口腔癌の早期発見の一助となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Early detection and early treatment of oral cancer is important, but some oral cancers are similar to other oral mucosal diseases, and diagnosis is often difficult. Therefore, it is important to develop a screening system that will help to diagnose oral cancer at an early stage. Telomerase is expressed in more than 80% of cancer patients and we focus on hTERT which is a component of telomerase and investigate whether early detection of oral cancer can be made by detecting aberrant methylation of the hTERT gene promoter region. As a result, in oral cancer patients, the methylation frequency of the hTERT gene promoter region is significantly higher than that of the normal oral mucosa, and by measuring the aberrant methylation of the hTERT gene, it helps the early detection of oral cancer Possibility was suggested.

研究分野：口腔外科学

キーワード：hTERT 異常メチル化 テロメラーゼ 口腔癌 白板症 電気化学的測定法

1. 研究開始当初の背景

口腔は咀嚼、嚥下、発音などヒトが生きていくうえで必要な機能に重要な働きをしており、口腔機能の維持は健康寿命の延伸に重要である。

胃癌や大腸癌など他部位の癌と同様に、口腔癌の罹患者数、死亡者数ともに年々増加傾向にある。

口腔扁平上皮癌は口腔に発生する悪性腫瘍のうち 90%以上を占め、舌や下唇、頬粘膜、歯肉、口腔底に好発する。白板症は「口腔粘膜に生じた摩擦によって除去できない白色の板状あるいは斑状の角化性病変で、臨床的あるいは病理組織学的に他のいかなる疾患にも分類されないような白斑」と定義されており前癌病変の一つである。白板症の癌化率は 4-20%と報告されている。

口腔癌患者はしばしば進行した状態で診断される。もし発見が遅れ、進行した状態で診断されると術後の機能障害も大きくなり、QOL の大幅な低下をもたらす。

そのため、口腔癌の早期発見、早期治療が重要であるが、他の口腔粘膜疾患と類似するものもあり、診断に苦慮することもしばしばある。また、口腔癌へ進行するリスクが高い前癌病変を診断し、早期に治療することが重要である。

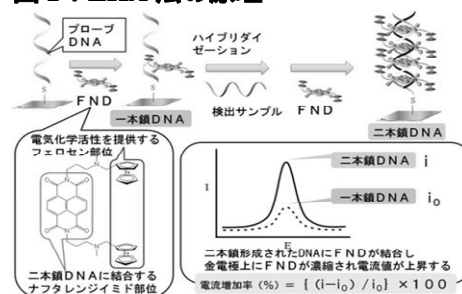
ゆえに口腔癌を含む口腔粘膜疾患の早期診断の一助となるスクリーニングシステムの開発が重要である。しかしながら、口腔癌は直視直達可能な部位に発生するにも関わらず、口腔癌の早期発見に有用なスクリーニングシステムは存在しないのが現状である。

2. 研究の目的

健康寿命の延伸において、口腔癌を含む口腔粘膜疾患の早期診断の一助となるスクリーニングシステムの開発が重要であると考えられることから、口腔癌のスクリーニングシステムの開発のためにわれわれはテロメラーゼに着目した。癌の特徴である不死化はテロメアを伸長させるテロメラーゼに負うところが大きく、正常体細胞においては通常発現していないが、癌患者では 80%以上に発現していることが確認されていることから、われわれは平成 26 年度から 28 年度の科学研究費(基盤 C)により、テロメラーゼを指標とした新たな口腔癌のスクリーニングシステムの可能性を確認した。すなわち、口腔内全体をスポンジブラシで拭って得た剥離細胞、病変の上を歯間ブラシで擦過して得た剥離細胞、病変の小組織片、の 3 種類のサンプルのテロメラーゼ活性を共同研究施設である九州工業大学で開発された電気化学的テロメラーゼ測定法(ECTA)で測定し、どのサンプルでも高い感度と特異度を持って口腔癌を発見できることを確認した。は患者自身による家庭での自己検診、は歯科診療所などでの通常の剥離細胞診をイメージしたサンプル採取法であり、テロメラーゼを

指標としたスクリーニングが可能であることを証明できた。しかし、テロメラーゼは酵素複合体であり、サンプル採取後ただちに測定を行わないと活性が失われるため、のような家庭で採取されたサンプルの測定は事実上不可能である。また、の場合でも各歯科診療所に測定機器を設置する必要があり、コストの面で普及に問題がある。そこで、今回われわれは長期的に安定で、スクリーニングシステムに適していると考えられる DNA に着目した。テロメラーゼの活性制御は、テロメラーゼの main subunit である hTERT(human Telomerase Reverse Transcriptase)発現によって調整され、hTERT 発現は hTERT 遺伝子プロモーター領域のメチル化によって調節されていることが報告されていることから、hTERT 遺伝子のプロモーター領域におけるメチル化を、ECTA と同じく九州工業大学で開発された電気化学的ハイブリダイゼーションアッセイ(EHA: 図 1)を用いて解析した。また、DNA のメチル化はヒト発癌過程の早期で生じることが複数の遺伝子で報告されていることから、hTERT 遺伝子の異常メチル化を検出することで、悪性転化する可能性が高い前癌病変の検出も可能になることが示唆される。すなわち、hTERT 遺伝子の異常メチル化を検出することにより、口腔癌および前癌病変である白板症の早期発見の一助となりうるかどうかを検討した。

図 1: EHA 法の原理



3. 研究の方法

九州歯科大学附属病院顎顔面外科および口腔内科を受診し、本研究に同意を得られた口腔癌、白板症を有する患者と健常ボランティアを対象とした。検体は口腔内全体を拭って採取された剥離細胞(口腔癌 n=21、白板症 n=20、正常口腔粘膜 n=29)と病変局所からの剥離細胞(口腔癌 n=22、白板症 n=24、正常口腔粘膜 n=23)病変から採取した組織片(口腔癌 n=35、白板症 n=25、正常口腔粘膜 n=34)とした。各検体から DNA を抽出、亜硫酸処理し PCR で増幅したのち、hTERT 遺伝子のメチル化頻度を測定した。測定には九州工業大学竹中研究室が開発した Electrochemical Hybridization Assay (EHA)を用いた。また、手術時および生検時に採取した組織(口腔癌 n=27、白板症 n=19、正常口腔粘膜 n=4)を使

用して、免疫染色（ストレプトアビジン・ビオチン法）により hTERT タンパク発現を調べた。

4. 研究成果

口腔癌患者では検体の採取方法に依らず正常口腔粘膜と比較し、hTERT 遺伝子の CpG 部位における異常メチル化が高率に見られた。白板症患者は口腔癌患者と健常者の中間を示した。疾患群（口腔癌 + 白板症）と正常口腔粘膜あるいは口腔癌とそれ以外の患者群（白板症 + 正常口腔粘膜）の識別を行うために ROC 解析を行った結果、高い正診率を示した（図 2）。hTERT タンパク発現量は口腔癌、白板症、正常口腔粘膜の順で増加し、3者それぞれの間に有意差を認めた（図 3）。また、hTERT タンパク発現と hTERT 遺伝子の異常メチル化は有意な相関関係を示した（図 4）。

図 2

A: 口腔粘膜疾患群（扁平上皮癌 + 白板症）と正常粘膜との判別

組織	Threshold value	OSCC	白板症	正常粘膜	accuracy rate	AUC
組織	74.6%	33/35	16/25	30/34	84% (79/94)	0.906
局所剥離細胞	71.4%	22/22	18/24	22/23	90% (62/69)	0.919
口腔全剥離細胞	63.2%	21/21	14/19	14/19	88% (61/69)	0.904

B: 口腔扁平上皮癌とその他（白板症+正常粘膜）との判別

組織	Threshold value	OSCC	白板症	正常粘膜	accuracy rate	AUC
組織	96.0%	30/35	18/25	33/34	86% (81/94)	0.927
局所剥離細胞	134.0%	19/22	20/24	23/23	90% (62/69)	0.936
口腔全剥離細胞	96.6%	20/21	14/19	29/29	91% (63/69)	0.97

図 3 : 疾患別 hTERT タンパク発現量

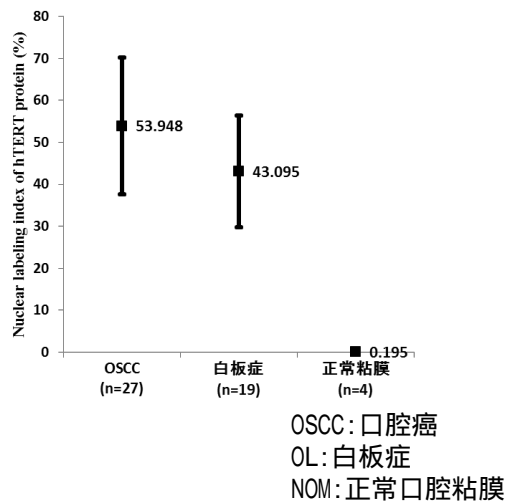
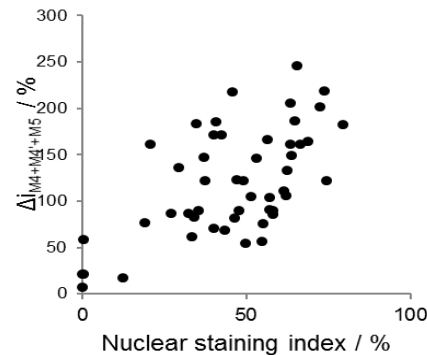


図 4 : EHA 法の結果と hTERT タンパク発現との関係



相関係数：0.56

縦軸：EHA 法の結果（hTERT 遺伝子の異常メチル化）

横軸：hTERT タンパク発現量

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)

Oral cancer screening based on methylation frequency detection in *hTERT* gene using electrochemical hybridization assay via a multi-electrode chip coupled with ferrocenylnaphthalene diimide. Haraguchi, K., Sato, S., Habu, M., Yada, N., Hayakawa, M., Takahashi, O., Yoshioka, I., Matsuo, K., Tominaga, K., Takenaka, S. *Electroanalysis*, 2017, in press.

The methylation status and expression of human telomerase reverse transcriptase is significantly high in oral carcinogenesis. Haraguchi, K., Yada, N., Sato, S., Habu, M., Hayakawa, M., Takahashi, O., Sasaguri, M., Takenaka, S., Yoshioka, I., Matsuo, K., Tominaga, K. *APMIS*, in press.

Hayakawa, M., Kodama, M., Sato, S., Tomoeda-Mori, K., Haraguchi, K., Habu, M., Takenaka, S., Tominaga, K. Electrochemical telomerase assay for screening for oral cancer. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 54, 301-5, 2016.

Hayakawa, M., Sato, S., Diala, I., Kodama, M., Tomoeda-Mori, K., Haraguchi, K., Tominaga, K., Takenaka, S. Screening for Oral Cancer Using Electrochemical Telomerase assay. *Electroanalysis.* 28, 503-7, 2016.

〔学会発表〕(計 9 件)

原口和也、土生学、早川真奈、上原雅隆、笹栗正明、矢田直美、松尾拓、吉岡泉、冨永和宏、hTERT 遺伝子の異常メチル化検出による口腔癌スクリーニングシステムの構築、第 60 回（公社）日本口腔外科学会総会・学

術大会 平成 27 年 10 月 16 日(金)~18 日(日) 名古屋国際会議場

Kazuya Haraguchi, Manabu Habu, Mana Hayakawa, Masataka Uehara, Masaaki Sasaguri, Naomi Yada, Kou Matsuo, Izumi Yoshioka, Kazuhiro Tominaga, Oral cancer screening system by detection of aberrant methylation in hTERT gene、第 63 回国際歯科研究学会日本部会総会・学術大会 (JADR 2015)、平成 27 年 10 月 30 日(金)~31 日(土) 福岡国際会議場

Kazuya Haraguchi, Shinobu Sato, Manabu Habu, Mana Hayakawa, Masataka Uehara, Masaaki Sasaguri, Naomi Yada, Kou Matsuo, Izumi Yoshioka, Shigeori Takenaka, Kazuhiro Tominaga, Oral cancer screening system by detection of aberrant methylation in hTERT gene、Interdisciplinary of Medical, Dental and Soft-material Researchers on the move -Showcase Review in Kitakyushu-、平成 28 年 1 月 22 日(金)~23 日(土) 北九州国際会議場

原口和也、土生学、早川真奈、上原雅隆、笹栗正明、吉岡泉、富永和宏、hTERT 遺伝子の異常メチル化検出による口腔癌スクリーニングシステムの構築、第 70 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会、平成 28 年 4 月 15 日(金)~17 日(日) 福岡国際会議場

Kazuya Haraguchi, Manabu Habu, Mana Hayakawa, Masataka Uehara, Masaaki Sasaguri, Izumi Yoshioka, Kazuhiro Tominaga, Oral cancer screening system by detection of aberrant methylation in hTERT gene、第 57 回大韓口腔顎顔面外科学会 The 57th Congress of the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons (KAOMS 2016)、平成 28 年 4 月 22 日(金)~24 日(日) Korea, Gunsan

Kazuya Haraguchi, Shinobu Sato, Manabu Habu, Naomi Yada, Mana Hayakawa, Masataka Uehara, Masaaki Sasaguri, Kou Matsuo, Izumi Yoshioka, Shigeori Takenaka, Kazuhiro Tominaga, Oral cancer screening system by detection of aberrant methylation in hTERT gene、Asia-Pacific Conference in Fukuoka 2016 -International Symposium on Oral Education and Research in Kitakyushu-、平成 28 年 5 月 11 日(水) 九州歯科大学講堂

原口和也、土生学、矢田直美、早川真奈、上原雅隆、笹栗正明、松尾拓、吉岡泉、富永和宏、hTERT 遺伝子の異常メチル化検出による口腔癌スクリーニングシステムの構築、第 20 回九州地区口腔癌研究会、平成 28 年 6 月 17 日(金) 九州歯科大学講堂

原口和也、矢田直美、土生学、早川真奈、上原雅隆、笹栗正明、松尾拓、吉岡泉、富永和宏、hTERT 遺伝子の異常メチル化検出による口腔癌スクリーニングシステムの構築、先

端歯学スクール 2016、平成 28 年 9 月 29 日(木)~30 日(金) WITH THE STYLE FUKUOKA 原口和也、土生学、矢田直美、早川真奈、上原雅隆、笹栗正明、松尾拓、吉岡泉、富永和宏、口腔扁平上皮癌および白板症における hTERT protein 発現と臨床病理学的所見との関係、第 61 回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会、平成 28 年 11 月 25 日(金)~27 日(日) 幕張メッセ

〔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

富永 和宏 (TOMINAGA KAZUHIRO)
九州歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：40188793

(2) 研究分担者

土生学 (HABU MANABU)
九州歯科大学・歯学部・助教
研究者番号：00360058

上原 雅隆 (UEHARA MASATAKA)
九州歯科大学・歯学部・講師
研究者番号：10243685

(3) 連携研究者

竹中 繁織 (SHIGEORI TAKENAKA)
九州工業大学・大学院工学研究院・教授
研究者番号：60188208

佐藤しのぶ (SATO SHINOBU)
九州工業大学・大学院工学研究院・准教授
研究者番号：80510677

(4)研究協力者

()