

研究成果報告書

事業名（補助金名）： 基盤的研究開発育成事業（若手研究補助金）
研究開発テーマ名： 喫煙者の正常口腔粘膜、歯肉炎でのエピジェネティクスな変化
研究代表者名： 西村 学子 【 北海道医療大学 歯学部 / 助手 】

【背景・目的】

タバコは、肺がんや口腔がんの外因の代表的なものの一つである。がん化の過程で数多くのがん遺伝子や、がん抑制遺伝子に変異のみられることが報告されてきた。遺伝子の変異は直接的に細胞の産生物や動態に影響を及ぼすことが多いが、最近では DNA の塩基配列が同じでも、周囲の化学的修飾が異なるために細胞の産生物や動態に影響を及ぼすことが知られてきており、これらの修飾はエピジェネティクスな変化と呼ばれている。実際に喫煙者に生じた肺がんや口腔がんのエピジェネティックな変化の一つである CpG island の高メチル化が起こると報告がなされてきている。また、がんにおける高メチル化に加齢や炎症性変化やウイルス、細菌感染の関与していることも明らかになってきている。さらに、発がんの前段階で既に生じていると考えられている。しかしながら、正常な口腔粘膜上皮での高メチル化を検索した報告はみられない。本研究では、1) 病変のみられない口腔粘膜上皮では喫煙によりどの程度の高メチル化が起こっているのか、2) タバコが増悪因子となっている歯肉炎では高メチル化がみられるのかというエピジェネティックな変化を検索する目的の前段階として口腔粘膜上皮異形病変でのメチル化の有無について検討した。

【内容・方法】

1. サンプルの採取

喫煙者およびコントロールとして非喫煙者の口腔粘膜および歯肉より、スワブによりサンプルを採取する。喫煙者は、総喫煙タバコ数を1日あたりの平均的喫煙数×年数で算出する。口腔組織からのサンプルは、Mild dysplasia（44 症例）、Severe dysplasia（20 症例）と診断されたもの、および正常口腔粘膜上皮（10 症例）の Paraffin section を作製し、DNA を抽出することとした。

2. DNA の抽出

1 のスワブサンプルより QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen) にて DNA の抽出、精製を行う。
また、Paraffin section sample については、WAX extraction kit (CHEMICON) により DNA 抽出を行った。

3. Bisulfite 処理

ゲノム DNA について CpGenome TM DNA Modification Kit (Serologicals Corp, GA) にて Bisulfite 処理を行った。この処理により、メチル化を受けていないシトシンはウラシルへと変化する。しかし、メチル化シトシンは構造上安定なため変化を受けず、メチル化 DNA と非メチル化 DNA に塩基配列の違いが生じ、この違いをうまく利用した方法である。

4. DNA の増幅

目的の DNA 領域を片側がビオチンラベルされたプライマーセットを用いて PCR 増幅し、ビーズを使った前処理により 1 本鎖化させた。

5. メチル化の解析

Pyrosequencing TM 法にて DNA ポリメラーゼの伸長反応をリアルタイムに検出することで、塩基配列を解読し、メチル化の割合を算出した。

6. 統計処理

Frequency distribution と Mann-Whitney U test を ordinal date に用いた。

【結果・成果】

1) p15, p16 メチル化による遺伝子発現について

エピジェネティクスの代表的なものの一つである DNA のメチル化は、ゲノム DNA 中の CpG 配列のシトシンをメチル化して遺伝子の転写や発現に関わる因子や酵素を阻害し、遺伝子発現を構造的に妨害している。癌抑制遺伝子や DNA 修復遺伝子のメチル化は、転写活性の低下や阻害を起こし正常なタンパク発現量を減少させ、細胞周期に異常をきたし、発癌過程においても重要な影響をおよぼしていると考えられている。特に癌抑制遺伝子 p15, p16 の CpG island の高メチル化は、その機能抑制により発癌を引き起こす要因になっていると考えられている。Methylation specific PCR(MSP)法のためのプライマーのデザインは、NCBI PubMed からの遺伝子情報をもとに、Software Sequence Analysis 1.6 により設計した(Fig. 1)。MSP 法に用いるメチルプライマー配列には CG が含まれており、これにより p15, p16 遺伝子領域の CpG 配列中のメチル化シトシンの発現量について確認することができる。口腔粘膜上皮から採取された DNA を用いて p15, p16 癌抑制遺伝子メチル化デザインプライマーの発現確認を行った。MSP 法の結果、正常口腔粘膜上皮、Mild dysplasia, Severe dysplasia でのメチル化発現の違いが認められ、プライマーの安定性も確認された。

Fig.1)MSP 法に用いた Primer design

Methyl primer p15) -sense; gcgttcgtattttg~~cg~~gtt /-antisense; cgtacaataac~~cg~~aacgaccga
Unmethyl primer p15) -sense; tgtgatgtgtttgtattttg~~tg~~gtt /-antisense; ccatacaataac~~ca~~aacaaccaa
Methyl primer p16) -sense; ttattagaggggtgggg~~cg~~gatcgc/-antisense; gaccccgaaccg~~cg~~accgtaa
Unmethyl primer p16) -sense; ttattagaggggtgggg~~tg~~gattgt/-antisense; caaccccaaacca~~ca~~accataa

2)口腔粘膜上皮での p15, p16 メチル化の検索

Mild dysplasia 44 症例、Severe dysplasia 20 症例、正常口腔粘膜上皮 10 症例からそれぞれ抽出された DNA により p15, p16 メチル化解析を行った。MSP 法によりメチル化発現の確認されたプライマーを用い、メチル化発現量を検索したところ、正常な口腔粘膜上皮に比べ上皮異形成症例で高頻度に p15, p16 の高メチル化が確認された。また、メチル化の程度は mild~severe と異型度の悪性化を示すにつれメチル化が増加する傾向にあった。特に、p15 のメチル化は severe dysplasia で 65% と高頻度に認められ、p15 と p16 を比較すると 10% の割合で p15 の高メチル化がみられた。正常口腔粘膜上皮での高メチル化は認められなかった。

【今後の展望】

以上の結果から、dysplasia を示す上皮において p15, p16 の CpG island に高メチル化が確認された。このことは、口腔前がん病変である白板症やタバコにより誘発された dysplasia を示す口腔粘膜上皮でのメチル化の有無が、がんあるいは前がん病変発生リスク診断として有用であると考えられた。今後喫煙者口腔粘膜から DNA を採取し、喫煙と歯肉炎での p15, p16 メチル化パターンを探ることによりそれらの相関関係についても検索していきたい。将来的には臨床の場でがん発生の予測マーカー、歯周炎の増悪因子としての禁煙へのモチベーション効果として示すことができると考えている。

【付図・説明】

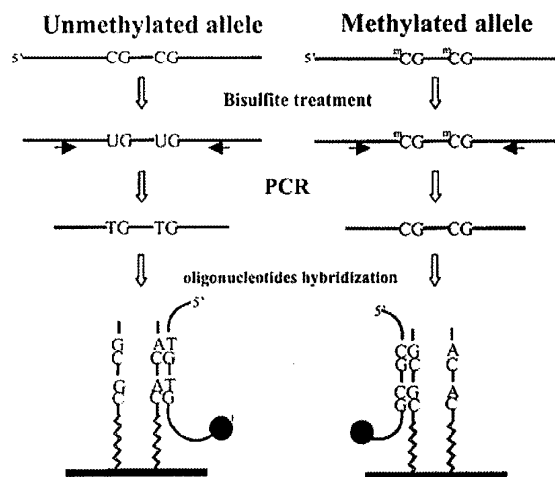


Fig.2) MSP 法の原理

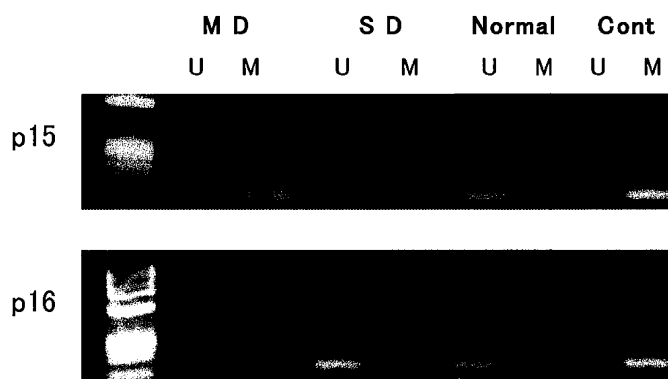


Fig.3) MS-PCR の結果

口腔粘膜上皮の上皮異型度による p15, p16 のメチル化による遺伝子発現の違いを観察した。また、メチル化バンドの発現の強弱によりメチル化の有無を判定した。特に Severe dysplasia で p15, p16 とも強いメチル化バンドが確認された。

MD; Mild dysplasia, SD; Severe dysplasia, Normal; Normal Oral Epithelium, Cont; Positive control. U; Unmethyl, M; Methyl.

Sample (cases)	Hypermethylation	
	p15	p16
Normal epithelium(10)	0 (0%)	0 (0%)
Mild dysplasia (44)	22 (50.0%)	8 (18.2%)
Severe dysplasia (20)	13 (65%)	11 (55%)

Fig.4)口腔粘膜上皮での p15, p16CpG island における高メチル化頻度

正常口腔粘膜上皮、Mild dysplasia, Severe dysplasia でのメチル化発現について比較検討した。