

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

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、エピジェネティクス変化の一つであるCpG islandの高メチル化が喫煙者に生じる肺がんや口腔がんに関与しているとの報告がなされている。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、喫煙者における正常口腔粘膜上皮および歯肉炎でのエピジェネティクス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X年数で算出する。

口腔組織は、mild dysplasia、severe dysplasiaと診断されたもの、および正常口腔粘膜上皮を用いた。

2. DNAの抽出

スワブサンプルは、QIAamp DNA Mini KitにてDNAの抽出を行った。

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にてBisulfite処理を行うと、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、発癌過程に重要な影響をおよぼし、特に癌抑制遺伝子p15、p16のCpG islandの高メチル化による機能抑制により癌を引き起こす要因になっていると考えられている。そこで、採取されたDNAを用いてp15、p16癌抑制遺伝子のメチル化について検索した。

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)。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できた。

Fig.1) MSP法に用いたPrimer design

Methyl primer p15)

-sense: gcgttcgtatttgcggtt

/-antisense; cgtacaataac~~cg~~aacgaccga

Unmethyl primer p15)

-sense: tgttatgtgtttgtattttg~~tgg~~ttt

/-antisense; ccatacaataac~~ca~~aacaaccaa

Methyl primer p16)

-sense: ttattagagggtgggg~~cg~~gatcgc

/-antisense; gaccccgaaacc~~cg~~accgtaa

Unmethyl primer p16)

-sense: ttattagagggtgggg~~tgg~~attgt

/-antisense; caaccccaaacc~~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の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、喫煙と歯肉炎との相関関係についても検索を加える予定である。