

論 文 要 旨

**Comprehensive epigenetic analysis using oral rinse samples
: a pilot study**

〔 口腔含嗽液を用いた包括的なエピジェネティック分析 :
パイロットスタディ 〕

楠元 孝宣

【序論および目的】

ゲノムが持つ遺伝情報の発現制御は、塩基配列だけで規定されるわけではない。遺伝情報の発現は、DNAとクロマチンの化学的修飾(エピジェネティクス)によっても影響される。発癌過程において、さまざまな遺伝子がエピジェネティックな異常により不活化されており、それらの異常を癌の診断やリスクマーカーとして応用しようという試みがなされてきている。

現在までに口腔含嗽液を用いたDNAメチル化状態の解析を行った報告は数多くあるが、ヒストン修飾状態を検索した報告はない。近年ヒストン修飾状態の検索にクロマチン免疫沈降法(ChIP)の利用が増えてきているが、ChIPには複雑な手技を行う理由から多量の細胞が必要といわれている。それゆえ、口腔含嗽液から得られる少量のサンプルからChIPを行うのは難しいと思われてきた。

一方、口腔含嗽液は他の検査と比べ、採取時間が短く、簡便、安価であり、非侵襲的にかつ何度も採取可能な試料である。よって口腔含嗽液は、今後口腔癌の早期発見や発癌リスク評価のための大規模スクリーニング検査に用いる検体として理想的であるといえる。

本研究の目的は、口腔含嗽液を検体としてChIPを用いたヒストン修飾状態の検索が可能であることを証明し、DNAメチル化、ヒストン修飾、遺伝子発現の包括的な分析プロトコルを確立することである。

【材料および方法】

11種類の癌細胞株を用いて予備実験を行ったのち、10例の口腔扁平上皮癌患者および3人の健常者から得られた口腔含嗽液を検体として用いた。本研究の標的遺伝子としては、エピジェネティックな遺伝子発現調節がなされていることが証明されており、またこれまで口腔扁平上皮癌にて多くの研究成果が報告されている癌抑制遺伝子 *CDKN2A* を選定した。*CDKN2A* の発現はRT-PCR法および免疫組織化学的染色にて評価された。DNAプロモーター部のメチル化はメチル化特異的PCR法(MSP)にて、クロマチンの修飾状況はヒストンH3-K9ジメチル化およびヒストンH3-K9アセチル化抗体を用いたChIPによって評価された。その後、得られた結果を用いて、口腔扁平上皮癌症例と健常者との間で比較検討を行った。

【結果】

各種ヒト癌細胞において*CDKN2A* 遺伝子の発現にエピジェネティック制御が関わっていることを確認するために、口腔癌、乳癌、肺癌、膵臓癌、大腸癌の細胞株を用いて RT-PCR, MSP, ChIP を行った。その結果、ヒト癌細胞株において、*CDKN2A* のエピジェネティックな遺伝子発現調節を確認できた。

次に、口腔含嗽液を用いたプロトコールの作成に着手し、16ml の生理食塩水による口腔含嗽液を用いて、包括的なエピジェネティック解析が可能であることを確認した。ヒストン修飾のうちヒストン H3-K9 ジメチル化が 9 例(90%)の口腔扁平上皮癌患者および 1 例(33%)の健常者から検出され、頻度に明らかな差を認めた。また、8 例(80%)の口腔扁平上皮癌患者からヒストン H3-K9 の非アセチル化が検出されたが、健常者からは検出されなかった($p = 0.035$, Fisher's exact test)。また、DNA 異常メチル化およびヒストンの異常修飾を総合的に検討した結果、これら全 3 種のうち 2 個以上のエピジェネティクス異常を示す頻度に 2 群間に有意差を認めた($p = 0.038$, Fisher's exact test)。

最後に、口腔含嗽液を用いた *CDKN2A* 遺伝子発現の結果の信頼性を確認するために、口腔扁平上皮癌患者の生検標本を用いて p16 タンパクの免疫組織化学検査を行ったところ、口腔含嗽液による遺伝子発現量の結果は生検組織の免疫組織化学染色の結果と矛盾しなかった。

【結論及び考察】

本研究により、口腔含嗽液を検体としてヒストン化学修飾の検出が可能であることが初めて証明された。われわれのプロトコールを用いることにより、口腔扁平上皮癌患者の口腔含嗽液から *CDKN2A* 遺伝子のヒストン化学修飾を含むエピジェネティクス異常を高頻度に検出した。

口腔含嗽液を用いた ChIP は非侵襲的であり、*CDKN2A* をはじめとするさまざまな癌抑制遺伝子を標的とすることで将来の口腔癌の診断ツールとなる可能性が示唆された。今後は、ヒストン修飾が口腔扁平上皮癌の発癌に関与しているかを詳細に評価するために、より多くの症例を対象にした検討が必要であると思われた。

(Journal of Oral and Maxillofacial Surgery 掲載予定)

論文審査の要旨

報告番号	総研第 143 号		学位申請者	楠元 孝宣
審査委員	主査	仙波 伊知郎	学位	博士 (医学・ <u>歯学</u> ・学術)
	副査	島田 和幸	副査	向井 洋
	副査	中村 典史	副査	佐藤 強志

Comprehensive epigenetic analysis using oral rinse sample: a pilot study

(口腔含嗽液を用いた包括的なエピジェネティック解析：パイロットスタディ)

近年、口腔癌の早期診断や発癌リスクのスクリーニングにはヒストン化学修飾状態の検索を含む包括的なエピジェネティック異常の解析が有用である事が報告され、また、口腔含嗽液は非侵襲性の試料として様々な検査に用いられてきている。一方、ヒストン修飾状態の検索に用いられるクロマチン免疫沈降法 (ChIP) では多量の細胞が必要とされており、現在までに口腔含嗽液を用いた ChIP による解析の報告は見られない。

本研究の目的は、口腔含嗽液を検体とした ChIP を確立するとともに、DNA メチル化、ヒストン化学修飾、遺伝子発現などの包括的分析により、口腔癌の早期発見や発癌スクリーニングが可能な検査方法を確立することである。

口腔扁平上皮癌で高頻度の異常が生じることが知られている癌抑制遺伝子産物 p16 をコードする *CDKN2A* について、11 種類の癌細胞株と、10 例の口腔扁平上皮癌患者および 3 名の健常者から得られた口腔含嗽液を検体として用い、mRNA 発現と蛋白質発現を RT-PCR 法と免疫組織化学的染色で評価し、また、*CDKN2A* のプロモータ領域の DNA メチル化をメチル化特異的 PCR 法 (MSP)、クロマチンの修飾状態をヒストン H3-K9 ジメチル化および H3-K9 アセチル化抗体を用いた ChIP により評価した結果を、口腔扁平上皮癌症例と健常者との間で比較検討した。

その結果、以下の様に、口腔含嗽液を検体として *CDKN2A* の包括的なエピジェネティック異常を確認できた。

- 1) HSC-3、HSC-4、Ca9-22、T-47D、HPAF-II、Caco2 細胞株では、*CDKN2A* 遺伝子の mRNA 発現とエピジェネティックな修飾状態は一致していた。
- 2) 口腔含嗽液を検体として、ヒストン H3-K9 ジメチル化が口腔扁平上皮癌症例の 9 例 (90%) と健常者の 1 例 (33%) に検出でき、また、ヒストン H3-K9 の非アセチル化が口腔扁平上皮癌症例の 8 例 (80%) に検出でき、健常者には見られなかった。
- 3) さらに、プロモータ領域の DNA メチル化状態と併せて、エピジェネティック異常を 2 種類以上示す頻度は口腔扁平上皮癌症例と健常者間で有意差が認められた。

本研究により、口腔含嗽液を検体としてヒストン化学修飾の検出が可能であることが初めて明らかになり、さらに、口腔扁平上皮癌症例に *CDKN2A* 遺伝子の包括的なエピジェネティック異常を高頻度に検出できた。

口腔含嗽液を用いて ChIP を可能とする本検査方法は、他の検査方法に比べて検体の採取が非侵襲的、無痛的であり、迅速、安価でもあることから、将来の大規模検診に応用することが可能であり、今後、様々な遺伝子を標的とする口腔癌の早期診断や発癌リスクをスクリーニングする方法となる可能性が示唆された。

よって、本研究は、学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 143 号		学位申請者	楠元 孝宣
審査委員	主査	仙波 伊知郎	学位	博士 (医学・ <u>歯学</u> ・学術)
	副査	島田 和幸	副査	向井 洋
	副査	中村 典史	副査	佐藤 強志

主査および副査の5名は、平成23年8月31日、学位申請者 楠元 孝宣 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) 今回の研究では口腔扁平上皮癌を対象としているのに、なぜ口腔扁平上皮癌以外の細胞株を使用しているのか? また、それらはどういう基準で使用したか?

(回答) 今回の研究で用いた種々の細胞株は、すでにメチル化異常、ヒストン化学修飾の報告のある細胞株を用いた。これらの細胞株を用いて実験系の手技的問題がない事を確認した。

質問2) 使用した細胞株は癌抑制遺伝子 CDKN2A の関与が確認されているものを使用したのか?

(回答) それぞれの細胞株は癌抑制遺伝子 CDKN2A の関与が確認されているものを用いた。

質問3) 今回、健常者を3名コントロールとして用いているが、どういう基準で選んだか?

(回答) 腫瘍、白板症や扁平苔癬などの口腔内病変がないことを基準に選んだ。

質問4) 歯周病患者などの炎症組織から取れてきた細胞にもメチル化異常があるかもしれないが、何か留意した点があるのか?

(回答) 今回は、歯周病など炎症に対して特別な考慮はしていない。

質問5) エピジェネティックな変化は年齢で差があるという報告があるが、今回の研究の中で考慮された点があるのか? また、年齢との関係がみられたか?

(回答) 加齢はエピジェネティック異常に関連すると報告されている。今回の口腔癌患者の年齢幅は30代~80代と幅があるが、症例数が少なかったので特に考慮はしていない。今回は実験系の確立を主眼とした研究であるので、今後、対象症例数を増やして、健常者についても年齢とエピジェネティック異常についても検討したい。

質問6) 唾液にはどのようにして癌関連遺伝子が混入してくるのか? また、病変部を擦過する方法と比べてどうか?

(回答) 今回は、唾液を含む含嗽液に剥がれてきた細胞からDNAまたはRNAを抽出して癌関連遺伝子の検索を行った。含嗽液を用いる方法は病変部を擦過する方法に比べ、口腔内全体の状態を反映することがメリットと考えている。

質問7) DNAメチル化、ヒストン化学修飾、タンパク発現はそれぞれどのように関連しているのか?

最終試験の結果の要旨

(回答) DNA の異常メチル化、ヒストンの化学修飾をきたすと癌抑制遺伝子である p16 はタンパク発現しないことになり、免疫染色では陰性になるが、異常メチル化の程度によって遺伝子発現の有無が変わってくるので、DNA 異常メチル化を検出しても免疫染色が陰性であるとは限らない。また、エピジェネティック異常は遺伝子発現の異常が起こる前に潜在的に進行するものともいわれている。

質問 8) DNA メチル化やヒストン化学修飾などの異常が増えれば発癌の可能性が増えるということか？

(回答) そう考えている。

質問 9) 含嗽液には正常細胞も含まれているので、将来の発癌リスクの判定に使えるのか？

(回答) 口腔癌の発生は、多段階的に潜在的に進むので、将来の発癌リスクの増大の判定ができると考えている。

質問 10) メチル化を外す酵素はあるか？

(回答) 最近、メチル化を外す酵素の報告があるが、まだ人体には応用されていない。

質問 11) 今回の研究の目的は方法論の確立ということで、生理食塩水 16ml で含嗽しているが、この量はどのように決めたのか？

(回答) DNA メチル化、ヒストン化学修飾、RT-PCR の検索等で必要となる量が決まっているので、そこから逆算をして 16ml という量に決定した。

質問 12) 何秒間含嗽しているのか？

(回答) 含嗽時間は 30 秒とし、可能な限り激しく行った。

質問 13) 採取後にそれぞれの手技に対して分注してから精製している理由はなにか？

(回答) 採取してきた含嗽液を最初にわけると RNA の抽出、DNA の抽出と違うプロセスがあるためである。

質問 14) 健常者で p16 が陰性、クロマチン異常が陽性は発癌のハイリスクと捉えるのか？

(回答) そのように捉えている。

質問 15) 最終的には大規模検診、スクリーニングに有用ということだが、どのように有用性を高めるのか？

(回答) 現在もわれわれの研究室では、さらに発展させた研究を続けており、16 種類程度の癌関連遺伝子の異常メチル化を 60 人程度の含嗽液を使って、非常に大規模なスクリーニングを行い、16 種類の DNA メチル化異常のうち 4 種類が非常に鋭敏に癌を検出することが明らかになってきている。

質問 16) 検索にはどれくらいのコストがかかるのか？大規模検索に向けてオートメーション化は可能か？

(回答) 今回の方法では、かなりのコストがかかっている。今後、より多くの大規模検診に向けて、手技の簡略化、コストダウン、症例の蓄積を行っていこうと考えている。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(歯学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。