

論 文 要 旨

Aberrant DNA Methylation of Tumor-Related Genes in Oral Rinse: A Noninvasive Method for Detection of Oral Squamous Cell Carcinoma

〔 口腔含嗽液における癌関連遺伝子の異常メチル化 〕
— 口腔扁平上皮癌検出のための非侵襲的方法 —

永田 聡

【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く、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。エピジェネティクスの一つであるDNAメチル化は、DNAのプロモーター領域のCG部位にメチル基が結合し、遺伝子発現を抑制する。近年、口腔癌においてもこの機構との関与が報告されており、種々の癌抑制遺伝子がDNAメチル化により異常に発現制御されている (=異常メチル化) ことが示されてきた。

そこで、本研究はDNAの異常メチル化に着目し、非侵襲的かつ簡易的に採取可能な口腔含嗽液を用いて癌関連遺伝子の異常メチル化状態を検索することにより、非侵襲的で正確な口腔癌検出法を確立することを目的とした。

【材料および方法】

口腔含嗽液は 2007 年から 2010 年までに鹿児島大学医学部・歯学部附属病院、口腔外科を受診した 34 例の口腔扁平上皮癌 (以下、OSCC) 患者 (以下、OSCC 群) と 24 例の口腔内健常者 (以下、健常群) から採取した。対象となる遺伝子は *E-cadherin*、*MGMT*、*DAPK*、*RAR β* 、*p16*、*p15*、*TMEFF2*、*TIMP3*、*HIN-1*、*WIF-1*、*FHIT*、*SPARC*、*APC* の 13 遺伝子のメチル化状態を検索した。各遺伝子のメチル化状態はメチル化特異的 PCR 法 (MSP 法) で検索され、マイクロチップ電気泳動装置を用いて半定量化した。それぞれのプロモーターのメチル化状態は受信者動作特性分析 (ROC 分析) を用いてスクリーニングを行い、各遺伝子のメチル化状態の相違を統計学的に検討した。異常メチル化状態により、単一遺伝子またはそれぞれの遺伝子の組み合わせによる口腔癌検出ツールとしての有用性を評価した。

【結 果】

異常メチル化を検索した 13 遺伝子のうち、*E-cadherin*、*TMEFF2*、*RAR β* 、*MGMT*、*FHIT*、*WIF-1*、*DAPK*、*p16* の 8 遺伝子において、OSCC 群では健常群より高いレベルで DNA 異

常メチル化を認めた ($p < 0.05$, Mann-Whitney U 検定)。特に *E-cadherin*、*TMEFF2*、*RAR β* 、*MGMT* の 4 遺伝子では、非常に高い有意差をもって OSCC 群に異常メチル化を認めた ($p < 0.001$, Mann-Whitney U 検定)。また、ROC 分析に基づいたカットオフ値による選別においても、*E-cadherin*、*TMEFF2*、*RAR β* 、*MGMT*、*FHIT*、*WIF-1*、*DAPK*、*p16* の 8 遺伝子は、OSCC 群で健常者群より高いレベルで DNA メチル化を認めた ($p < 0.05$, Fisher's 検定)。なかでも *E-cadherin*、*TMEFF2*、*RAR β* 、*MGMT* の 4 遺伝子では、高い感度と特異性 (75%以上) で OSCC を検出できた。さらに *E-cadherin*、*TMEFF2*、*RAR β* 、*MGMT* の 4 遺伝子の組み合わせた検出法では、OSCC を感度 100%、特異度 87.5% で検出でき、*E-cadherin*、*TMEFF2*、*MGMT* の 3 遺伝子の組み合わせでは感度 97.1%、特異度 91.7% であり、非常に高い感度と特異性をもって OSCC を検出することができた。

【結論及び考察】

口腔含嗽液を検体として、*E-cadherin*、*TMEFF2*、*RAR β* 、*MGMT* の 4 遺伝子の異常メチル化を組み合わせることにより、90%以上の感度と特異性をもつ新たな口腔癌検出法を見出した。口腔含嗽液を用いた遺伝子マーカーのメチル化検出は、非侵襲的であり、様々な癌関連遺伝子の高いレベルの DNA 異常メチル化を組み合わせることにより、将来の OSCC 診断ツールとなる可能性が示唆された。

(Cancer 掲載予定)

論文審査の要旨

報告番号	総研第 193 号		学位申請者	永田 聡
審査委員	主査	中村 典史	学位	博士 (歯学)
	副査	島田 和幸	副査	於保 孝彦
	副査	佐藤 強志	副査	向井 洋

Aberrant DNA Methylation of Tumor-Related Genes in Oral Rinse: A Noninvasive Method for Detection of Oral Squamous Cell Carcinoma

(口腔含嗽液における癌関連遺伝子の異常メチル化—口腔扁平上皮癌検出のための非侵襲的方法—)

遺伝子の後天的な異常であるエピジェネティクスは近年注目されている研究である。そのエピジェネティクスの一つであるDNAメチル化は、DNAのプロモーター領域のCG部位にメチル基が結合し、mRNA発現を制御する。口腔癌においてもメチル化の関与が報告されており、なかでも口腔癌患者の唾液からメチル化検出を認めた報告もあることから、申請者は含嗽液からメチル化検出を行う着想に至った。含嗽液は非侵襲的、簡易的、低コストといった特徴を有し、将来スクリーニング検査に用いる検体としての有用性が期待される。そこで、含嗽液を用いてメチル化を検索し、癌関連遺伝子の異常メチル化状態を評価することで、非侵襲的で正確な口腔癌検出法の確立を目指した。

口腔含嗽液は 2008~2010 年に鹿児島大学病院、口腔外科を受診した 34 例の口腔扁平上皮癌 (以下、OSCC 群) と 24 例の口腔内健常者 (以下、健常群) から採取した。癌関連遺伝子は *E-cadherin*、*MGMT*、*DAPK*、*RARβ*、*p16*、*p15*、*TMEFF2*、*TIMP3*、*HIN-1*、*WIF-1*、*FHIT*、*SPARC*、*APC* の 13 種を検索した。含嗽液中の細胞から DNA を抽出し、メチル化特異的 PCR 法 (MSP 法) でメチル化を検索後、マイクロチップ電気泳動装置を用いて半定量化した。それぞれのメチル化状態は受信者動作特性分析 (ROC 分析) を用いて評価し、各遺伝子のメチル化状態の相違を統計学的に検討した。さらに、遺伝子を組み合わせた口腔癌検出法の有用性を評価した。

その結果、本研究では以下の知見が明らかにされた。

- 1) 13 遺伝子のうち、*E-cadherin*、*TMEFF2*、*RARβ*、*MGMT*、*FHIT*、*WIF-1*、*DAPK*、*p16* の 8 遺伝子において、健常群より高いレベルで OSCC 群に異常メチル化を認めた ($p < 0.05$)。特に *E-cadherin*、*TMEFF2*、*RARβ*、*MGMT* の 4 遺伝子では、非常に高い有意差をもって OSCC 群に異常メチル化を認めた ($p < 0.001$)。
- 2) カットオフ値を用いた異常メチル化検出においても、1) と同等の結果が得られ、なかでも *E-cadherin*、*TMEFF2*、*RARβ*、*MGMT* の 4 遺伝子では、感度・特異度が 75% 以上の高い割合で OSCC を検出できた。
- 3) これら 4 遺伝子を組み合わせた検出法では、OSCC を感度 100%、特異度 87.5% で、*E-cadherin*、*TMEFF2*、*MGMT* の 3 遺伝子の組み合わせでは感度 97.1%、特異度 91.7% で、感度・特異度ともに 90% 以上の非常に高い割合で OSCC を検出することができた。

以上のことより、含嗽液を検体として、*E-cadherin*、*TMEFF2*、*RARβ*、*MGMT* の 4 遺伝子の異常メチル化を組み合わせることで、90% 以上の感度と特異性をもつ非侵襲的、簡易的で新たな口腔癌検出法を見出した。

本研究は、含嗽液から OSCC 群と健常群における癌関連遺伝子の異常メチル化状態を検討し、その結果 4 種の遺伝子の異常メチル化を組み合わせることによって 90% 以上の非常に高い感度と特異度で口腔癌を検出できたことは、非常に興味深い。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 193 号	学位申請者	永田 聡
審査委員	主査	中村 典史	学位 博士 (歯学)
	副査	島田 和幸	副査 於保 孝彦
	副査	佐藤 強志	副査 向井 洋

主査および副査の5名は、平成24年4月19日、学位申請者 永田 聡君に面接し、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) 口腔癌は病理組織学的に種々あると思うが、特に口腔扁平上皮癌に対する診断の有用性ということか。

(回答) 扁平上皮癌は口腔癌の約90%を占めるので今回の検討は扁平上皮癌を対象とした。

質問2) 含嗽液を使っているが、炎症などの口腔内の状況は影響されないのか。

(回答) 今回は癌関連遺伝子に特異的なプライマーを用いてMSPで検索しているので、影響はないと考えている。

質問3) 口腔粘膜表面の病巣の検出のみならず、口腔扁平上皮癌の初期段階でもこの検査法は有用であるか。また、病理組織学的な結果と併せての評価であるのか。それともこの含嗽液の結果だけで判断したのか。

(回答) 以前に当科の楠元が含嗽液からメチル化とヒストン修飾を検索した報告をしているが、その際に病理組織学的事項と含嗽液による検索との比較でこの両者が一致する結果が得られている。また、今回の論文には含めなかったが、白板症症例で5例中5例にメチル化を認めた良好な結果が得られており、初期段階でも有用と考える。

質問4) 13種類の癌関連遺伝子を用いているが、これらはすべて癌に抑制的に働くものなのか。

(回答) 基本的に癌を抑制するものを取り上げている。そのため、遺伝子発現を抑制する異常メチル化に着目した。

質問5) 背景で高メチル化、低メチル化とあるが、M/(U+M)が高い、低いということか。それとは別か。

(回答) 別であり、メチル化の状態を評価するために非メチル化にも着目して、この数式を適用した。

質問6) マイクロチップ電気泳動結果の数値化はバンドの濃度をみているのか。

(回答) 濃度と面積を検出でき、今回は濃度をみている。この数値を数式にあてはめている。

質問7) 過去に唾液を用いた検査の報告があるが、今回の含嗽液も同じと考えていいのか。

(回答) 唾液であれば唾液腺由来のものの影響も出てくると考えられる。唾液は血液由来であり、DNAの採取は可能と考えられる。しかし、腫瘍由来のDNAの検出は少なくなると考えられる。

質問8) 含嗽液では落屑口腔粘膜上皮が含まれると考えられるが、唾液の検査より有用な点は何か。

(回答) 含嗽液のメリットは口腔内腫瘍の表層が一層剥離されることであり、口腔癌の診断も可能だが、field cancerizationをふまえた口腔内全体の診査にも有用であると考えられる。唾液を用いた場合、十分量得るには患者に負担があるが、含嗽は短時間で十分な量を採取できるため、含嗽が有用と考える。

質問9) 13遺伝子中4遺伝子に関連があるとされているが、他の関連のなかった残りの遺伝子が癌発生にどのように関わりがあったか。

(回答) 遺伝子の機能において検索したが共通した結果は得られず、関連ははっきり認めなかった。

質問10) 4遺伝子のうち3種の組み合わせの中で、E-cadherinを除いた組み合わせの結果はどうだったのか。

(回答) 他の報告を越える感度・特異度90%以上を満たす結果とならなかったため、今回の結果から除外した。

最終試験の結果の要旨

質問 1 1) 口腔細菌由来の DNA の影響はないのか。

(回答) MSP に用いたプライマーはヒト特異的な癌関連遺伝子に設定されているため、影響はないと考える。

質問 1 2) 20ml の含嗽液でどのくらいの数の細胞が採取できるのか。

(回答) 最終的に DNA が約 50~100 ng/ μ l の溶液が 30 μ l 採取でき、量的な問題はなかった。

質問 1 3) 含嗽を用いた他の領域における疾患の診断の報告があるが、それらの影響はなかったのか。

(回答) 臨床的に他癌は認められず、癌抑制遺伝子の MSP はプライマーを特異的に設定しており影響ないと考える。

質問 1 4) 過去のメチル化の報告より今回の結果がクリアになった理由として、手法の違いは何であったか。マイクロチップ電気泳動装置が差を生み出したのか。

(回答) はっきりとは言えないが、そう考えられる。

質問 1 5) 含嗽で癌組織以外のタンパクなど色々なものが含まれると思うが、それらによる診断とこのメチル化にターゲットを絞ったこの診断と比較してこの有用性は何か。

(回答) DNA を用いた PCR は高感度に検出できる。また、異常メチル化によって mRNA の発現が抑制されタンパク発現など抑えられる。そのため DNA のメチル化は早い段階での異常を検出でき、より有用であると考えられる。

質問 1 6) 4つの遺伝子に注目し、2つ以上のメチル化が OSCC 群に認められるとあるが、健常群でも2つ以上メチル化を認めた症例もある。その症例は発癌のリスクが高いと考えていいのか。

(回答) そう考えられる。ただ、メチル化の原因として喫煙、飲酒、加齢による影響も考えられる。

質問 1 7) 将来的には重複癌のような異所性の癌の検出や経過観察中の予測としての検出も可能か。

(回答) 今回は 2008 年からの検索であり、経時的な変化や予後と比較することはできなかった。しかし、異常メチル化が増えれば重複癌などのリスクは高くなると考えられる。

質問 1 8) 含嗽に細菌、ウイルス、食渣などが含まれると思うが、これらを否定するためにどうしたか。

(回答) ヒトに特異的なプライマーを用いて検索を行った。

質問 1 9) 癌組織そのもののメチル化の確認は行っていないが、含嗽でも癌と同じようなことを確認できるのか。

(回答) 楠元論文でも相関を得られており、DNA メチル化と臨床病理学的な診断との相関性があると考えられる。

質問 2 0) 楠元先生はメチル化とヒストン修飾の報告であったが、ヒストン修飾を検索しなかった理由は何か。

(回答) 今回は検診などに用いる簡易的な検査法として有用とならないかを検討した。そのため、ヒストン修飾の検索は手技の問題や時間やコストがかかるため行わなかったが、メチル化検索のみでも良い結果が得られた。

質問 2 1) メチル化は加齢でも起こるとあるが、具体的には健常者でどの程度の比率でメチル化が起こるのか。

(回答) 具体的にどの程度かわからないが、加齢に伴い刺激や影響も受けるため、メチル化されやすくなると考える。

質問 2 2) 健常群の年齢の平均が OSCC 群と差があるが、この理由は何か。

(回答) 60 歳代以上の含嗽を多く集められなかったのが原因であり、この論文の弱点と考えている。

質問 2 3) 注目した 4つの遺伝子同士の引き合いはないのか。

(回答) 遺伝子の機能ごとでも結果を着目したが、関連した傾向や結果は得られなかった。

質問 2 4) 患者の家族歴との関連はなかったか。

(回答) 今回は家族歴との比較は行わなかった。

質問 2 5) カットオフ値の決定は統計ソフトを用いてできるのか。

(回答) カットオフ値まで求められるソフトもあるが、今回は得られた感度・特異度からカットオフ値を求めた。

質問 2 6) MSP バンドは DNA 量が異なれば濃度が変わってくると思うが、同じプローブを用いているのか。

(回答) その通りである。さらに $M/(U+M) \times 100$ の式に当てはめ、誤差を解消している。

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。