

口腔扁平苔癬におけるE-cadherin, -catenin, p16ink4a, MGMTのメチル化解析

著者	中條 貴俊
学位名	博士(歯学)
学位授与機関	北海道医療大学
学位授与年度	平成28年度
学位授与番号	30110甲第287号
URL	http://id.nii.ac.jp/1145/00064486/

論文要旨

口腔扁平苔癬における
E-cadherin, β -catenin, p16^{ink4a}, MGMT のメチル化解析

平成 28 年度
北海道医療大学大学院歯学研究科
中條 貴俊

【緒言】

口腔扁平苔癬(OLP)は、口腔粘膜の角化異常を示す慢性炎症性疾患である。基本的に原因は不明といわれているが、歯科用金属や薬剤によるアレルギー、ウイルス感染といった環境因子の関与が示唆されている。

この環境因子が引き起こす遺伝子変化の代表的なものにエピジェネティックな修飾がある。エピジェネティクスは、DNA塩基配列の変化を伴わず遺伝子発現が変わる現象であり、代表的なメカニズムにDNAのメチル化がある。口腔がんや前癌病変では、DNAの高メチル化を介してE-cadherinや β -catenin、またp16^{ink4a}やO⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT)などの遺伝子発現が低下をしているとの報告がある。OLPにおいて、E-cadherinや β -cateninが発現減少しているとの報告があり、またp16^{ink4a}はOLPの悪性化の関与を示唆する報告がある。MGMTについてはSCCではp16^{ink4a}と同様に発現の低下や高メチル化が観察されているものの、OLPでMGMTについて観察した報告はみられない。

そこで本研究では、OLPについて上皮接着関連分子であるE-cadherin、 β -catenin、がん抑制遺伝子であるp16^{ink4a}およびDNA修復遺伝子であるMGMTをターゲットとし、これらの遺伝子上のプロモーター領域におけるDNAのメチル化の程度を検討した。同時に非炎症性組織(Non-I)、歯根嚢胞(RC)、口腔扁平上皮がん(SCC)でのメチル化の程度を検討し、OLPの結果と比較検討した。

【材料および方法】

1. 材料

材料として、北海道医療大学個体差医療科学センター倫理委員会より承認済み(受付番号2012-005号)である1996年から2014年までの生検・手術材料のホルマリン固定されたパラフィンブロック包埋標本を使用した。OLP 26検体、RC 30検体、SCC 25検体および陰性コントロールとしてNon-I 25検体を使用した。これらをMicrotomeで厚さ5 μ mに薄切し、2枚の切片を、0.5 μ L PCRチューブに回収し使用した。

2. DNA精製

1)DNAの抽出

切片は EpiTect Plus FFPE Lysis kit[®] を用いてプロトコールに従い、PCR Thermal Cycler を用いて切片を溶解しクロスリンクされた DNA を抽出した。

2) Bisulfite 処理

抽出した DNA を 500 ng/ μ l の濃度になるように調整し、EpiTect Plus DNA Bisulfite Kit[®]を用いて、Bisulfite 処理を施した。

3. プライマーの設計

DNA メチル化レベルを検討するため、E-cadherin, β -catenin, p16^{ink4a}, および MGMT のプロモーター領域における高メチル化領域の CpG 配列部位に焦点を絞り、その領域の Bisulfite 処理後の DNA に対応した Methylation Specific PCR (MSP) プライマーを用いた。

4. 半定量的 MSP 法

メチル化の発現状態を確認するためにアガロースゲルを用いた電気泳動法にてバンドの観察を行った。

5. 定量的 MSP 法

Bisulfite 処理した DNA, MSP プライマー, SYBR[®] Green PCR Master Mix を用いて、SYBR Green 法による定量的 MSP 法でメチル化発現解析を行った。得られた結果から CT 値を算出し、その値を定量値に変換しメチル化レベルの算出を行った。

6. 統計分析処理

算出されたメチル化レベル(%)は Kruskal-Wallis 検定にて比較検討を行った ($p < 0.05$)。

7. 免疫組織化学的検索

DNA 高メチル化がタンパク発現に影響を与えているかを組織学的に観察するために、免疫組織化学染色を行った。免疫染色後の評価は、1枚のスライドからランダムに3ヵ所観察し、光学顕微鏡400倍の視野中から上皮内の陽性細胞数を計測し、陽性率50%以上を強陽性の++、25~50%を陽性の+、10~25%を弱陽性の±、10%未満を陰性の-として判定した。

【結果】

1. MSP 法による DNA メチル化程度の検討

E-cadherin のメチル化程度を半定量的 MSP 法により観察すると、OLP や SCC ではメチル化のバンドが強く発現し、Non-I や RC では非メチル化のバンドが強く発現した。定量的 MSP 法により比較したところ、OLP は Non-I や RC と比べ、有意に高いメチル化率を示した ($P < 0.01$)。一方、SCC とは明確な有意差は認められなかった。

β -catenin のメチル化程度を半定量的 MSP 法で観察すると、OLP や SCC ではメチル化のバンドが強く発現し、Non-I や RC では非メチル化のバンドが強く発現した。定量的 MSP 法により比較したところ、OLP は Non-I ($p < 0.05$)、RC ($p < 0.05$)、SCC ($p < 0.01$) の 3 つよりも有意に高値を示した。

p16^{ink4a} のメチル化程度を半定量的 MSP 法で観察すると、OLP や SCC ではメチル化のバンドが強く発現し、Non-I や RC では非メチル化のバンドが強く発現した。定量的 MSP 法で比較したところ、OLP は RC よりも有意に高値を示したが ($p < 0.01$)、Non-I とは有意差を認めなかった。また SCC と比べると有意に低値を示した ($p < 0.01$)。

MGMT のメチル化程度を半定量的 MSP 法で観察すると、OLP や SCC ではメチル化のバンドが強く発現し、Non-I や RC では非メチル化のバンドが強く発現した。定量的 MSP 法により比較したところ、OLP は Non-I や RC と比べ、有意に高いメチル化率を示した ($p < 0.01$)。一方、SCC とは明確な有意差は認められなかった。

2. 免疫組織化学的検索

E-cadherin の陽性率は、Non-I および RC で強陽性、OLP および SCC では陽性となった。

β -catenin の陽性率は、Non-I および RC で強陽性、OLP および SCC では陽性となった。

p16^{ink4a} の陽性率は、RC で強陽性、OLP、SCC および Non-I では陽性となった。

MGMT の陽性率は、Non-I と RC で陽性、OLP および SCC では陰性となった。

【結論】

以上の結果から、E-cadherin、 β -catenin、MGMT の高メチル化が口腔扁平

苔癬の発症に関与していることが示唆された。

また、これらの遺伝子の高メチル化が口腔扁平苔癬における予後診断への応用や、治療のターゲットとなる可能性が示唆された。