

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

要 旨

口腔扁平苔癬は口腔粘膜の角化異常を示す慢性炎症性疾患で、前癌状態疾患の一つとしても挙げられている。基本的に原因は不明だが、様々な環境因子の関与が示唆されている。その環境因子が引き起こす遺伝子変化にエピジェネティックスがあり、代表的なものに DNA のメチル化がある。

本研究では、口腔扁平苔癬における DNA メチル化の状態を明らかにするために、E-cadherin, β -catenin, p16^{INK4a} および O⁶-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) のプロモータ領域のメチル化状態について非炎症性組織、歯根嚢胞、および口腔扁平上皮がんとの比較検討を行った。さらに、これらの遺伝子発現との関連性について免疫組織化学的に観察した。

材料および方法として、生検・手術材料のパラフィンプロック包埋標本を薄切し、プロトコールに従い DNA を抽出し、EpiTect Plus DNA Bisulfite Kit[®]を用いて、Bisulfite 処理を施し Methylation Specific PCR 法を行った。

その結果、口腔扁平苔癬において、非炎症性組織や歯根嚢胞と比較し、E-cadherin, β -catenin および MGMT の高メチル化および同タンパクの発現低下が確認された。E-cadherin のメチル化の上昇は、非炎症性組織と比較し、口腔扁平苔癬 ($p < 0.01$)、口腔扁平上皮がん ($p < 0.01$)、および歯根嚢胞 ($p < 0.05$) でみられた。また、同タンパクの発現低下は非炎症性組織や歯根嚢胞と比較し、口腔扁平苔癬および口腔扁平上皮がんを確認された。 β -catenin のメチル化の上昇は、非炎症性組織と比較し、口腔扁平苔癬 ($p < 0.01$) だけにみられたが、同タンパクの発現低下は非炎症性組織や歯根嚢胞と比較し、口腔扁平苔癬および口腔扁平上皮がんを確認された。p16^{ink4a} のメチル化の上昇は、非炎症性組織と比較し、口腔扁平上皮がんのみで認められた ($p < 0.01$)。MGMT のメチル化の上昇と、タンパクの発現低下は、非炎症性組織と比較し、口腔扁平苔癬と口腔扁平上皮がんを確認された ($p < 0.01$)。

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。

目次

I	緒言	1
II	材料および方法	4
	1. 材料	4
	2. DNA 精製	4
	1) DNA の抽出	4
	2) Bisufite 処理	4
	3. プライマーの設計	4
	4. 半定量的 MSP 法	5
	5. 定量的 MSP 法	5
	6. 統計分析処理	6
	7. 免疫組織化学的検索	6
III	結果	7
	1. MSP 法による DNA メチル化程度の検討	7
	2. 免疫組織化学的検索	8
IV	考察	10
	1. MSP 法について	10
	2. 口腔扁平苔癬の DNA メチル化の程度について	10
	(1) 上皮接着関連分子である E-cadherin と β -catenin について	10
	(2) がん抑制遺伝子 p16 ^{ink4a} と DNA 修復遺伝子 MGMT について	12
	3. 口腔扁平苔癬における DNA メチル化の臨床的意義について	13
V	結論	15
VI	謝辞	16

VII 文献	17
--------------	----

表・付図

I 緒 言

口腔扁平苔癬は、口腔粘膜の角化異常を示す慢性炎症性疾患で前がん状態疾患の一つとしても挙げられている (Sugerman et al., 2002; Scully et al., 2008; Farhi et al., 2010). 基本的に原因は不明といわれているが、内分泌異常、免疫異常などに加え、歯科用金属や非ステロイド性抗炎症薬などの薬剤によるアレルギー、Hepatitis C virus, Human papilloma virus, Herpes virus などの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 (Boorghani et al., 2010; Torrente-Castells et al., 2010; Srinivas et al., 2011; Gupta, Jawanda, 2015).

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、主に DNA のメチル化やヒストン修飾、クロマチン構造の形成、クロマチンリモデリングなどが知られている (Egger et al., 2004). エピジェネティクスの代表的なメカニズムの1つである DNA のメチル化は、主に悪性腫瘍の発症に関与したものが報告されてきたが (Qiu et al., 2004; García et al., 2012; Jithesh et al., 2013), 最近になり糖尿病や自己免疫疾患、アレルギー、神経性疾患などでもみられることが明らかになってきている (Collison et al., 2013; Costa-Reis et al., 2013; Dang et al., 2013).

口腔がんや前がん病変では、E-cadherin や β -catenin, p16^{ink4a}, O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) が重要な役割を果たし、DNA の高メチル化を介して遺伝子発現が低下をしているとの報告がある (Santos-García et al., 2006; Ebrahimi et al., 2008; Kato et al., 2006; Vered et al., 2012; Su et al., 2010; de Freitas et al., 2013; Bhatia et al., 2014), また口腔扁平苔癬では、E-cadherin や β -catenin の遺伝子発現減少が (Ebrahimi et al., 2008), p16^{ink4a} においては、口腔扁平苔癬の悪性化の関与を示唆する報告がある (Montebugnoli et al., 2011).

E-cadherin は細胞間接着を担う上皮細胞接着分子の一つであり、細胞膜上に発現し、カルシウム依存的に細胞と細胞を接着させる作用を持つものであ

る (Braga, 2016). β -catenin は Cadherin-catenin 複合体を形成する接着分子で, E-cadherin と α -catenin との結合を担っており (Halbleib & Nelson, 2006), また Wnt/ β -catenin シグナルの転写制御因子としての役割もある (Willert & Jones, 2006). これら上皮接着分子の変異, 発現低下することで, 上皮接着が弱くなり, 腫瘍胞巣から増殖した腫瘍細胞の剥離が生じ, 転移が生じる (Hirohashi, 1998). p16^{ink4a} はヒトの cyclin dependent kinase inhibitor 2A 遺伝子によりコードされているがん抑制タンパク質で, 細胞周期の調整に重要な役割を果たしている (Rayess et al., 2012). MGMT は DNA 修復遺伝子の一つで, アルキル化によってグアニンに結合したメチル基を脱離し, 遺伝子を修復する (Cabrini et al., 2015). 通常では, DNA 複製する前に修復が行われるが, 修復が行われなかった時には, 2 回の DNA 複製を経てグアニン-シトシンの対がアデニン-チミンへ突然変異を引き起こす. この変異した DNA が蓄積されることで がん化に向かうと言われている (Christmann et al., 2011; Cabrini et al., 2015; Fujikane et al., 2016).

口腔扁平苔癬において, 遺伝子のメチル化状態を検索した報告はわずかにあるものの (Dang et al., 2013; Bediaga et al., 2014), これら 4 つの遺伝子のメチル化状態を観察した報告はみられない. 口腔扁平苔癬では, 前述のように外的要因によるエピジェネティック変化のみられることが推測されるが, これは発症のメカニズムの解明につながるのみならず, 従来の治療により改善が困難な症例に対しての, 新たな創薬のターゲットともなりうるものと考えられる. 口腔扁平苔癬の薬物療法としてはこれまで, ステロイドの局所投与や (Scully et al., 2008), セファランチンやビタミン剤, 抗不安薬や抗アレルギー薬などの全身投与が行われてきたが (Eisen, 1993; Guarneri et al., 2014; Yang et al., 2016), 必ずしも多くの症例で良好な結果を得ているとは言い難い (Torti et al., 2007). エピジェネティクス変化をターゲットとしたエピジェネティック創薬は, 新たな治療戦略となるものと考えられる.

そこで本研究では, 前癌病変および慢性炎症性疾患である口腔扁平苔癬について発症メカニズムに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、歯根嚢胞、口腔扁平上皮がんでのメチル化の程度を検討し、口腔扁平苔癬の結果と比較検討した。

II 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(表 1)．口腔扁平苔癬 26 検体，組織上で炎症反応を含んだ歯根嚢胞 30 検体，扁平上皮がん 25 検体，および陰性コントロールの非炎症性口腔粘膜組織 25 検体を使用した．これらの検体は Microtome を使用して厚さ 5 μm に薄切し，2 枚のパラフィン切片を 0.5 μL PCR チューブに回収し使用した．

2. DNA 精製

1) DNA の抽出

パラフィン切片は EpiTect Plus FFPE Lysis kit[®] (Qiagen, Venlo, Netherlands)を用いてプロトコールに従い，PCR Thermal Cyclers (TaKaRa Bio, Shiga, Japan)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．抽出した DNA は NanoDROP[®] ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Massachusetts, USA)を用いて濃度を測定した．

2) Bisulfite 処理

抽出した DNA を 500 ng/ μl の濃度になるように調整し，EpiTect Plus DNA Bisulfite Kit[®] (Qiagen)を用いて，プロトコールに従い Bisulfite 処理を施した．Bisulfite 処理によりメチル化したシトシンはシトシンのまま変換されないが，非メチル化のシトシンはウラシルに変換される．これによってメチル化 DNA と非メチル化 DNA の異なる塩基配列を持つこととなり，メチル化 DNA としての認識が可能となる．

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 Bisulfite 処理後の DNA に対応した Methylation Specific PCR (MSP)

プライマーを用いた。β-catenin については GenBank からプロモーター領域の塩基配列を検索し、その領域を Peking Union Medical College Hospital Chinese Academy of Medical Sciences の MethPrimer (<http://www.urogene.org/methprimer/>) を用いて Bisulfite 変換後の配列を検索し、MSP プライマーを設計した(表 2, 図 1)。E-cadherin, p16^{ink4a} および MGMT については、過去の文献より設計されたものを引用し使用した (Graff et al., 2000; Nakagawachi et al., 2003; Kudo et al., 2004; Kato et al., 2006)。

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。Bisulfite 処理をした DNA, MSP プライマー, および TaKaRa EpiTaq™ HS (for bisulfite-treated DNA) (TaKaRa Bio) を用いた。PCR 条件は、熱変性を 94℃ 30 秒, アニーリングを 58℃ 30 秒, 伸長反応を 72℃ 30 秒に設定し, 40 サイクル施行した。得られた PCR 産物は 3%アガロースゲルによる電気泳動法にて確認した。

5. 定量的 MSP 法

Bisulfite 処理した DNA, MSP プライマー, 反応検出試薬である SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, California, USA) 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。MSP 法には 7500 Real-time System (Applied Biosystems) を用い, 反応溶液総量を 25 μl/tube とし Bisulfite 処理 DNA を 1.0 μl, プライマー溶液を各々 1.0 μl, PCR Master Mix 12.5 μl とした。PCR 条件は 50℃ 2 分, 95℃ 10 分で反応後, 95℃ 15 秒 プライマー毎にアニーリング温度を 56℃ から 60℃ で 1 分に設定し 45 サイクル施行した。

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のレベルの算出を次の計算式で求めた (Lu L et al., 2007)。

$$\text{Methylated(\%)} = \frac{M}{M+U} \times 100 = \frac{1}{1 + \frac{U}{M}} \times 100 = \frac{1}{1 + 2^{(-\Delta ct)}} \times 100$$

$$\Delta ct = ct_U - ct_M$$

6. 統計分析処理

得られた結果は，統計ソフト IBM SPSS Statistics 20.0J および Microsoft excel 2013 を用いて分析を行った．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．有意水準 $p < 0.05$ を有意差ありとした．

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．一次抗体として Monoclonal Mouse Anti-Human E-Cadherin (Dako, Tokyo, Japan), Polyclonal Rabbit Anti beta Catenin (Abcam, Tokyo, Japan), Monoclonal Rabbit Anti clone EPR1473 p16 (Abcam), Monoclonal Mouse Anti MT3.1 MGMT (Abcam), 二次抗体として，EnVision+System-HRP Labelled Polymer Anti-mouse (Dako) および EnVision+System-HRP Labelled Polymer Anti-Rabbit (Dako)を使用した (表 3)．免疫組織化学染色は通法に従い，パラフィン切片を脱パラフィン後，圧力鍋による抗原賦活化を行い，一次抗体を 37℃1 時間，二次抗体を常温 30 分間反応させ，DAB peroxidase substrate (Dako)にて発色させた．免疫染色後の評価は，1 枚のスライドからランダムに 3 ヲ所観察し光学顕微鏡 (BX50, OLYMPUS, Tokyo, Japan) 400 倍の視野中から上皮内の陽性細胞数を計測し，Özyalvaçlı らおよび Sridevi らの方法に準じて，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 (Özyalvaçlı et al., 2015; Sridevi et al., 2015)．また，比較対象として Hematoxylin-Eosin 染色を通法に従い行った．

III 結 果

1. MSP 法による DNA メチル化程度の検討

口腔扁平苔癬，非炎症性組織，歯根嚢胞および口腔扁平上皮がんにおける E-cadherin, β -catenin, p16^{ink4a} および MGMT のメチル化の程度はアガロースゲル電気泳動法を用いた半定量的 MSP 法により観察し，定量的な比較を SYBR Green 法を用いた定量的 MSP 法により行った．

E-cadherin のメチル化程度を半定量的 MSP 法により観察すると，メチル化のバンドおよび非メチル化のバンドは 145bp に観察され，口腔扁平苔癬や口腔扁平上皮がんではメチル化のバンドが発現し，非炎症性組織や歯根嚢胞では非メチル化のバンドが発現した(図 2)．E-cadherin のメチル化程度を定量的 MSP 法により比較したところ，口腔扁平苔癬および口腔扁平上皮がんは非炎症性組織や歯根嚢胞と比べ，有意に高いメチル化率を示した($p<0.01$)．一方，口腔扁平上皮がんとは明確な有意差は認められなかった(図 3)．

β -catenin のメチル化程度を半定量的 MSP 法で観察すると，メチル化のバンドおよび非メチル化のバンドは 190bp に観察され，口腔扁平苔癬や口腔扁平上皮がんではメチル化のバンドが発現し，非炎症性組織や歯根嚢胞では非メチル化のバンドが発現した(図 2)． β -catenin のメチル化程度を定量的 MSP 法により比較したところ，口腔扁平苔癬は非炎症性組織，歯根嚢胞($p<0.05$)，口腔扁平上皮がん($p<0.01$)の 3 つよりも有意に高値を示した(図 4)．

p16^{ink4a} のメチル化程度を半定量的 MSP 法で観察すると，メチル化のバンドおよび非メチル化のバンドは 150bp に観察され，口腔扁平苔癬や口腔扁平上皮がんではメチル化のバンドが発現し，非炎症性組織や歯根嚢胞では非メチル化のバンドが発現した(図 2)．p16^{ink4a} のメチル化程度を定量的 MSP 法で比較したところ，口腔扁平苔癬は歯根嚢胞よりも有意に高値を示した($p<0.01$) が，非炎症性組織とは有意差を認めなかった．また口腔扁平上皮がんと比べると有意に低値を示した($p<0.01$) (図 5)．

MGMT のメチル化程度を半定量的 MSP 法で観察すると，メチル化のバンドは 81bp，非メチル化のバンドは 93bp で観察され，口腔扁平苔癬や口腔扁平上皮がんではメチル化のバンドが発現し，非炎症性組織や歯根嚢胞では非メチル

化のバンドが発現した(図 2). MGMT のメチル化程度を定量的 MSP 法により比較したところ, 口腔扁平苔癬は非炎症性組織や歯根嚢胞と比べ, 有意に高いメチル化率を示した($p < 0.01$). 一方, 口腔扁平上皮がんとは明確な有意差は認められなかった(図 6).

2. 免疫組織化学的検索

口腔扁平苔癬, 非炎症性組織, 歯根嚢胞および口腔扁平上皮がんでの Hematoxylin-Eosin 染色(図 7)と対比し, E-cadherin, β -catenin, p16^{ink4a} および MGMT の発現状態について免疫組織化学的に観察した結果, 上皮接着関連分子である E-cadherin では, 口腔扁平苔癬では棘細胞層から基底細胞層の細胞間隙に陽性を呈し, 角化層での発現はみられなかった. 非炎症性組織, 歯根嚢胞では口腔扁平苔癬よりも強く陽性を呈した. 口腔扁平上皮がんでは口腔扁平苔癬とほぼ同様の強度の陽性を呈した. 陽性率は非炎症性組織および歯根嚢胞で陽性率 50%以上の強陽性, 口腔扁平苔癬および口腔扁平上皮がんでは陽性率 25~50%の陽性となった(図 8).

もう一つの上皮接着関連分子である β -catenin は, 口腔扁平苔癬では, E-cadherin と同様に棘細胞層から基底細胞層にかけて細胞間隙に発現がみられた. 非炎症性組織および歯根嚢胞では, E-cadherin と同様に口腔扁平苔癬よりも著明な発現がみられた. 口腔扁平上皮がんでは, 口腔扁平苔癬とほぼ同様の局在が観察された. 陽性率は非炎症性組織および歯根嚢胞で強陽性, 口腔扁平苔癬および口腔扁平上皮がんでは陽性となった(図 9).

がん抑制遺伝子である p16^{ink4a} は, 全ての群において, 棘細胞層および基底細胞層相当部の細胞核に比較的明瞭な発現がみられた. 陽性率は, 歯根嚢胞で強陽性, 口腔扁平苔癬, 口腔扁平上皮がんおよび非炎症性組織では陽性となった(図 10).

DNA 修復遺伝子である MGMT は, 口腔扁平苔癬では, 上皮内における MGMT の発現がみられなかった. 一方, 非炎症性組織および歯根嚢胞では, 基底層の細胞核を中心に発現が観察された. 口腔扁平上皮がんでは, 口腔扁平苔癬と同様に上皮内における MGMT の発現がみられなかった. 陽性率は非炎症性組織と歯根嚢胞で陽性, 口腔扁平苔癬および口腔扁平上皮がんは陽性率 0~10%の

陰性となった(図 11).

以上より口腔扁平苔癬では，非炎症性組織や歯根嚢胞と比較すると，E-cadherin, β -catenin および MGMT における発現が低下していることが確認された(表 4).

IV 考 察

1. MSP 法について

メチル化の程度を観察する方法として、大別すると個別領域を解析する方法とゲノム網羅的に解析する方法の二つがある。いずれにしても、DNA メチル化を解析する方法の多くは Bisulfite 処理を利用したものであり、半定量的・定量的 MSP 法、MethyLight 法、Bisulfite シークエンス法、Pyrosequence 法、MassARRAY®法および、COBRA 法などが挙げられる(Herman et al., 1996; Eads et al., 2000; Colella et al., 2003; Tost et al., 2003; Stanssens et al., 2004; Ehrich et al., 2005)。

このうち、今回用いた MSP 法は Bisulfite 処理した DNA を鋳型とし、メチル化 DNA もしくは非メチル化 DNA を由来とした配列に特異的なプライマーを用いて PCR を行う方法で(Herman et al., 1996)、多くの非メチル化 DNA 中のメチル化 DNA を検出できるため、広く用いられている(Herman et al., 1996; Laird, 2003)。そこで本研究には、アガロースゲル電気泳動による半定量的な MSP 法および SYBR 法による定量的 MSP 法の 2 種類を用いた。MSP 法は DNA を抽出して行われる方法で、今回のようなパラフィン切片や口腔粘膜の swab でも比較的安定した結果が得られやすいことと、PCR 法は、既に臨床検査の場で日常的に用いられている方法であることから、本手法は臨床検査においてメチル化を検索するのに最も優れているものであると思われる。

2. 口腔扁平苔癬の DNA メチル化の程度について

(1) 上皮接着関連分子である E-cadherin と β -catenin について

口腔扁平苔癬のメチル化率において、E-cadherin では、非炎症性組織や歯根嚢胞と比べて有意に高いメチル化率を示したが、口腔扁平上皮がんとは有意差が認められず、 β -catenin はいずれのものより有意に高いメチル化率を示した。免疫組織化学染色では、E-cadherin、 β -catenin にともに、口腔扁平苔癬と口腔扁平上皮がんでは非炎症性組織や歯根嚢胞と比べて染色率の低下が認められた。これらのことから、免疫組織化学染色による両者の染色性の低下には、高メチル化の関わっていることが示唆された。これまで、口腔

扁平苔癬ではE-cadherinと β -cateninの発現は低下しているとの報告があるが(Ebrahimi et al., 2008), 本研究は, その要因の一つが高メチル化によるものであることを示唆した最初の報告である.

E-cadherin は細胞間接着を担う上皮細胞接着分子の一つであり, 細胞膜上に発現し, カルシウム依存的に細胞と細胞を接着させる作用を持つものである(Braga, 2016). β -catenin は Cadherin-catenin 複合体を形成する接着分子で, E-cadherin と α -catenin との結合を担っており(Halbleib, Nelson, 2006), また Wnt/ β -catenin シグナルの転写制御因子としての役割もある(Willert, Jones 2006). これまでに E-cadherin の高メチル化は, 様々な悪性腫瘍で観察されており(Santos-García et al., 2006; Guo et al., 2009; Zhong et al 2015), 高メチル化により E-cadherin の発現が減少すると上皮細胞間の接着が弱くなり, 悪性腫瘍の発生や進展に関わると考えられている(Pannone et al., 2014). β -catenin の異常は悪性腫瘍を始めとして, 骨の形成異常, 動脈硬化の促進, 慢性関節リウマチ, アルツハイマー病, 統合失調症など, 様々な疾患の発症や進行に関与していることが報告されてきており(Sen et al., 2002; Wilson, Houart 2004; Rapoport et al., 2005; Polakis 2007; De Ferrari et al., 2007; Mani et al., 2007), 最近では, 発現低下が老化促進に関わっているとの報告もある(Zhang et al., 2005; Ye et al., 2007). β -catenin の発現低下を起こす要因の一つに遺伝子の高メチル化があり, 様々な悪性腫瘍での報告が多い(Wang et al., 2015; Ashktorab et al., 2016). E-cadherin も β -catenin も, 口腔がんや前がん病変での高メチル化の報告もあり, これらの発症や進行に両者の高メチル化が関わっていることが示唆されている(Maeda et al., 2007; Supić et al., 2009; Asokan et al., 2014; Shiah et al., 2016). 口腔扁平苔癬は, 前がん状態の範疇とされていることから(Sugerman et al., 2002; McCartan et al., 2008), 本研究での E-cadherin と β -catenin での高メチル化はこのことを裏付けている結果と考えられる. しかしながら, 口腔扁平苔癬から悪性腫瘍が発生するのは極めて稀であることや(Sugerman et al., 2002; McCartan et al., 2008), 本研究では, β -catenin のメチル化率は口腔扁平上皮がんよりも高かったことから, 他の因子の影響についても考える必要がある.

例えば、E-cadherin の高メチル化は、歯周炎でもみられるとの報告がある (Loo et al., 2010; Zhang et al., 2013). これらのことから、感染が本研究における口腔扁平苔癬の E-cadherin や β -catenin の高メチル化を引き起こしている因子であることも考えられる. しかしながら、感染による E-cadherin や β -catenin の高メチル化が口腔扁平苔癬を引き起こしているのか、口腔扁平苔癬に二次的に感染が加わり高メチル化を生じたのか、口腔扁平苔癬の病変の進行に伴いその結果として高メチル化が生じたのかなど、高メチル化の起こった機序については不明である. 高メチル化の程度や発症機序は症例によって異なっているものとも考えられるため、感染の有無や、同一症例でのがん関連遺伝子の発現の違いなどを検索し、症例毎の検討が必要であるものと思われる.

(2) がん抑制遺伝子 p16^{ink4a} と DNA 修復遺伝子 MGMT について

口腔扁平苔癬のメチル化率において、p16^{ink4a} のメチル化率は、非炎症性組織と有意差がなく、口腔扁平上皮がんと比べると有意に低値を示し、MGMT では非炎症性組織および歯根嚢胞と比べ、有意に高いメチル化率を示したが、口腔扁平上皮がんとは有意差は認められなかった. 免疫組織化学染色では、p16^{ink4a} の染色性は非炎症性組織と有意差がなく、MGMT では、口腔扁平苔癬と口腔扁平上皮がんでは非炎症性組織と比べて染色率の低下が認められた. これらのことから、免疫組織化学染色による MGMT の染色性の低下には、高メチル化の関わっていることが示唆された.

p16^{ink4a} はヒトの cyclin dependent kinase inhibitor 2A 遺伝子によりコード化されているがん抑制タンパク質で、細胞周期の調整に重要な役割を果たしている (Rayess et al., 2012). この高メチル化が、がん抑制タンパクとしての働きを抑えて、がん化に直接的に影響を与えていると考えられており、多くの悪性腫瘍で p16^{ink4a} プロモーター領域での高メチル化が観察されている (Huang et al., 2011; Wang et al., 2012; Nikolic et al., 2015). MGMT は DNA 修復遺伝子の一つで、アルキル化によってグアニンに結合したメチル基を脱離し、遺伝子を修復する (Cabrinini et al., 2015). 通常では、DNA 複製する前に修復が行われるが、修復が行われなかった時には、2 回の DNA 複製を

経てグアニン-シトシンの対がアデニン-チミンへ突然変異を引き起こす。この変異した DNA が蓄積されることで がん化に向かうと言われており (Christmann et al., 2011; Cabrini et al., 2015; Fujikane et al., 2016), 様々な悪性腫瘍で MGMT のプロモーター領域での高メチル化が報告されている (Zou et al., 2009; Supic et al., 2011; Shilpa et al., 2014). p16^{ink4a}, MGMT いずれも口腔がんでの高メチル化を介した発現の低下が示されており, 口腔がんの発症, 進展に関与していることが示唆されている (Kato et al., 2006). 特に p16^{ink4a} は, 口腔前がん病変のうち, がん化へ移行したもので高メチル化を示すものの割合が高いことから, 口腔前がん病変の予後を推測するためのマーカーとしても期待されている (Shridhar, 2016). p16^{ink4a} は悪性腫瘍以外にも, 感染や炎症で高メチル化がみられるとの報告がある。すなわち, p16^{ink4a} は Papilloma virus や (Silveira et al., 2015; Lee, Lee, 2016), Helicobacter pylori などの発がんに関わる感染での高メチル化が報告されている (Wang et al., 2011). 本研究では, 口腔扁平苔癬のメチル化は非炎症性組織と有意差がなく, 口腔扁平上皮がんより低い値を示したことから, 用いた口腔扁平苔癬はがん化傾向が高くないものと思われた。高メチル化の起こった機序については, 上皮関連遺伝子である E-cadherin や β -catenin の発現低下による影響も考えられるものの, 上皮関連遺伝子と同様に不明であり, 高メチル化の程度や発症機序は症例によって異なっているものとも考えられるため, 症例毎の検討が必要であるものと思われる。

3. 口腔扁平苔癬における DNA メチル化の臨床的意義について

本研究では, 口腔扁平苔癬において, E-cadherin, β -catenin および MGMT のメチル化率が非炎症性組織より有意に高い値となっていた。この臨床的な意義として, 予後診断への応用や, 治療のターゲットとしての可能性が考えられる。予後診断への応用としては, 今回検討した遺伝子はいずれも悪性腫瘍で高メチル化を示すものであることから (Kato et al., 2006; Santos-García et al., 2006; Guo et al., 2009; Wang et al., 2015; Zhong et al., 2015; Ashktorab et al., 2016), 悪性化の指標の一つとして用いられる可能性がある。しかしながら, 前述のようにこれらのメチル化は悪性化に向かう

際にのみ起こるものではなく、様々な感染や炎症、金属イオンなどによっても起こりうることから、今回の遺伝子のみをターゲットにして悪性の予後診断を行うことは困難である。その他の様々な遺伝子やタンパク質発現等を組み合わせることによって可能になると考えられる。また、これらの高メチル化が口腔扁平苔癬の病変の発症、進行に関わっていることが明らかとなると、治療のターゲットとなる可能性がある。現在のところ、口腔扁平苔癬の多くは難治性であり、治療としてはステロイド剤の投与に頼るところが多い (Scully et al., 2008)。ステロイド剤により一時的には病変が消退することであっても、再発を繰り返す症例も多い (Torti et al., 2007)。近年、メチル化やヒストン修飾をターゲットとしたエピジェネティック創薬が試みられ、実際に臨床応用が行われてきている (Itzykson & Fenaux, 2011)。例えば、エピジェネティクス創薬の一つであるアザシチジンは造血器腫瘍の一つである骨髓異形成症候群に対しての治療薬として 2011 年に承認され、使用されている。アザシチジンは、腫瘍細胞の DNA メチル化を阻害する作用を持つ。高メチル化した細胞は安定に維持されるが (Cedar, Bergman, 2009)、一方では、脱メチル化剤により簡単に可逆的変化を引き起こすことから (Lod et al., 2014)、異常な高メチル化を伴った病変の治療への効果が期待される。本研究で示した様に口腔扁平苔癬では遺伝子によっては高メチル化のみられることから、症例によっては、脱メチル化剤が効果的なものもあるように推測される。臨床応用までには通常の薬剤と同様な多くの研究が必要であるが、特にヒトの口腔扁平苔癬を完全に反映したモデル動物が無いことから、脱メチル化剤を臨床応用するまでにはかなりの検討が必要であると思われる。

V 結 論

本研究では、口腔扁平苔癬におけるエピジェネティクス修飾を観察するため、口腔がんや前がん病変で報告されてきている DNA 高メチル化をターゲットとし、メチル化の程度を、非炎症性組織、歯根嚢胞および口腔扁平上皮がんとで比較検討した結果、以下のような結果が得られた。

1. 口腔扁平苔癬において、非炎症性組織や歯根嚢胞と比較し、E-cadherin, β -catenin および MGMT の高メチル化および同タンパクの発現低下が確認された。
2. E-cadherin のメチル化の上昇は、非炎症性組織と比較し、口腔扁平苔癬、口腔扁平上皮がん、そして歯根嚢胞でみられた。また、同タンパクの発現低下は非炎症性組織や歯根嚢胞と比較し、口腔扁平苔癬および口腔扁平上皮がんを確認された。
3. β -catenin のメチル化の上昇は、非炎症性組織と比較し、口腔扁平苔癬だけにみられたが、同タンパクの発現低下は非炎症性組織や歯根嚢胞と比較し、口腔扁平苔癬および口腔扁平上皮がんを確認された。
4. p16^{ink4a} のメチル化の上昇は、非炎症性組織と比較し、口腔扁平上皮がんのみで認められた。
5. MGMT のメチル化の上昇と、タンパクの発現低下は、非炎症性組織と比較し、口腔扁平苔癬と口腔扁平上皮がんを確認された。

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。

VI 謝 辞

本稿を終えるにあたり，研究精進のため御指導御高閲を賜りました北海道医療大学歯学部生体機能・病態学系臨床口腔病理学分野 安彦善裕 教授に感謝の意を表します．また，本研究を行うにあたり，御助言，御協力いただきました，臨床口腔病理学分野 西村学子 講師，佐藤 惇 講師，吉田光希 助教，個体差健康科学研究所人類遺伝学分野 高井理衣 助教をはじめ，諸先生に心よりお礼申し上げます．

VII 文 献

- Ando T, Yoshida T, Enomoto S, Asada K, Tatematsu M, Ichinose M, Sugiyama T, Ushijima T. DNA methylation of microRNA genes in gastric mucosae of gastric cancer patients: its possible involvement in the formation of epigenetic field defect. *Int J Cancer* 124(10):2367-74, 2009.
- Ashktorab H, Shakoori A, Zarnogi S, Sun X, Varma S, Lee E, Shokrani B, Laiyemo AO, Washington K, Brim H. Reduced Representation Bisulfite Sequencing Determination of Distinctive DNA Hypermethylated Genes in the Progression to Colon Cancer in African Americans. *Gastroenterol Res Pract* 2102674, 2016.
- Asokan GS, Jeelani S, Gnanasundaram N. Promoter hypermethylation profile of tumour suppressor genes in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma. *J Clin Diagn Res* 8(10):ZC09-12, 2014.
- Bediaga NG, Marichalar-Mendia X, Aguirre-Urizar JM, Calvo B, Echebarria-Goicouria MA, de Pancorbo MM, Acha-Sagredo A. Global DNA methylation: uncommon event in oral lichenoid disease. *Oral Dis* 20(8):821-6, 2014.
- Bhatia V, Goel MM, Makker A, Tewari S, Yadu A, Shilpi P, Kumar S, Agarwal SP, Goel SK. Promoter region hypermethylation and mRNA expression of MGMT and p16 genes in tissue and blood samples of human premalignant oral lesions and oral squamous cell carcinoma. *BioMed Res Int* 248419, 2014.
- Boorghani M, Gholizadeh N, Taghavi Zenouz A, Vatankhah M, Mehdipour

- M. Oral lichen planus: clinical features, etiology, treatment and management; a review of literature. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects* 4(1):3-9, 2010.
- Braga V. Spatial integration of E-cadherin adhesion, signalling and the epithelial cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* 42:138-145, 2016.
- Cabrini G, Fabbri E, Lo Nigro C, Dechecchi MC, Gambari R. Regulation of expression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase and the treatment of glioblastoma (Review). *Int J Oncol* 47(2):417-28, 2015.
- Cedar H, Bergman Y Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat Rev Genet.* 10(5):295-304, 2009.
- Christmann M, Verbeek B, Roos WP, Kaina B. O(6)-Methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) in normal tissues and tumors: enzyme activity, promoter methylation and immunohistochemistry. *Biochim Biophys Acta* 1816(2):179-90, 2011.
- Colella S, Shen L, Baggerly KA, Issa JP, Krahe R. Sensitive and quantitative universal Pyrosequencing methylation analysis of CpG sites. *Biotechniques.* 35(1):146-50, 2003.
- Collison A, Siegle JS, Hansbro NG, Kwok CT, Herbert C, Mattes J, Hitchins M, Foster PS, Kumar RK. Epigenetic changes associated with disease progression in a mouse model of childhood allergic asthma. *Dis Model Mech* 6(4):993-1000, 2013.
- Costa-Reis P, Sullivan KE. Genetics and epigenetics of systemic lupus erythematosus. *Current Rheumatology Reports* 15(9):369, 2013.

- Dang J, Bian YQ, Sun JY, Chen F, Dong GY, Liu Q, Wang XW, Kjems J, Gao S, Wang QT. MicroRNA-137 promoter methylation in oral lichen planus and oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 42(4): 315-21, 2013.
- Dang MN, Buzzetti R, Pozzilli P. Epigenetics in autoimmune diseases with focus on type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 29(1):8-18, 2013.
- De Ferrari GV, Papassotiropoulos A, Biechele T, Wavrant De-Vrieze F, Avila ME, Major MB, Myers A, Sáez K, Henríquez JP, Zhao A, Wollmer MA, Nitsch RM, Hock C, Morris CM, Hardy J, Moon RT. Common genetic variation within the low-density lipoprotein receptor-related protein 6 and late-onset Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(22):9434-9, 2007.
- De Freitas Silva BS, Yamamoto-Silva FP, Pontes HA, Pinto Júnior Ddos S. E-cadherin downregulation and Twist overexpression since early stages of oral carcinogenesis. *J Oral Pathol Med* 43(2):125-31, 2013.
- Don KR, Ramani P, Ramshankar V, Sherlin HJ, Premkumar P, Natesan A. Promoter hypermethylation patterns of P16, DAPK and MGMT in oral squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Indian J Dent Res* 25(6):797-805, 2014.
- Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, Saltz LB, Blake C, Shibata D, Danenberg PV, Laird PW. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res.* 28(8):E32, 2000.

- Ebrahimi M, Boldrup L, Wahlin YB, Coates PJ, Nylander K. Decreased expression of the p63 related proteins beta-catenin, E-cadherin and EGFR in oral lichen planus. *Oral Oncology* 44(7):634-8, 2008.
- Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 429(6990):457-63, 2004.
- Ehrich M, Nelson MR, Stanssens P, Zabeau M, Liloglou T, Xinarianos G, Cantor CR, Field JK, van den Boom D. Quantitative high-throughput analysis of DNA methylation patterns by base-specific cleavage and mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(44):15785-90, 2005.
- Eisen D. The therapy of oral lichen planus. *Crit Rev Oral Biol Med* 4(2):141-58, 1993.
- Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of the DNA - Repair Gene MGMT and the Clinical Response of Gliomas to Alkylating Agents *N Engl J Med* 343(19):1350-4, 2000.
- Farhi D, Dupin N Pathophysiology, etiologic factors, and clinical management of oral lichen planus, part I: facts and controversies. *Clin Dermatol* 28(1):100-8, 2010.
- Fitzpatrick SG, Hirsch SA, Gordon SC. The malignant transformation of oral lichen planus and oral lichenoid lesions: a systematic review. *J Am Dent Assoc* 145(1):45-56, 2014.
- Fujikane R, Komori K, Sekiguchi M, Hidaka M. Function of high-mobility group A proteins in the DNA damage signaling for the induction of

- apoptosis. *Sci Rep* 6:31714. 2016.
- García MP, García-García A. Epigenome and DNA methylation in oral squamous cell carcinoma. *Methods Mol Biol* 863:207–219, 2012.
- Graff JR, Gabrielson E, Fujii H, Baylin SB, Herman JG. Methylation patterns of the E-cadherin 5' CpG island are unstable and reflect the dynamic, heterogeneous loss of E-cadherin expression during metastatic progression. *J Biol Chem* 275(4):2727–32, 2000.
- Guarneri F, Guarneri C, Marini H. Oral lichen planus and neurogenic inflammation: new observations and therapeutic implications from four clinical cases. *Dermatol Ther* 27(4):206–10, 2014
- Guo W, Dong Z, Guo Y, Kuang G, Yang Z, Chen Z. Detection of promoter hypermethylation of the CpG island of E-cadherin in gastric cardiac adenocarcinoma. *Eur J Med Res* 14(10):453–8, 2009.
- Gupta S, Jawanda MK. Oral Lichen Planus: An Update on Etiology, Pathogenesis, Clinical Presentation, Diagnosis and Management. *Indian J Dermatol* 60(3):222–9, 2015.
- Halbleib JM, Nelson WJ. Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis. *Genes Dev* 20(23):3199–214, 2006
- Harada S, Rodan GA. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* 423(6937):349–55, 2003.
- Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG

- islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(18):9821-6, 1996.
- Hirohashi S. Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. *Am J Pathol* 153(2):333-9, 1998.
- Huang LW, Pan HS, Lin YH, Seow KM, Chen HJ, Hwang JL. P16 methylation is an early event in cervical carcinogenesis. *Int J Gynecol Cancer* 21(3):452-6, 2011.
- Itzykson R, Fenaux P. [Hypomethylating agents for the treatment of myelodysplastic syndromes]. *Bull Cancer* 98(8):927-34, 2011.
- Jithesh PV, Risk JM, Schache AG, Dhanda J, Lane B, Liloglou T, Shaw RJ. The epigenetic landscape of oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 108(2):370-9, 2013.
- Kato K, Hara A, Kuno T, Mori H, Yamashita T, Toida M, Shibata T. Aberrant promoter hypermethylation of p16 and MGMT genes in oral squamous cell carcinomas and the surrounding normal mucosa. *J Cancer Res Clin Oncol* 132(11):735-43, 2006.
- Kordi-Tamandani DM, Moazeni-Roodi AK, Rigi-Ladiz MA, Hashemi M, Birjandian E, Torkamanzei A. Promoter hypermethylation and expression profile of MGMT and CDH1 genes in oral cavity cancer. *Arch Oral Biol* 55(10):809-14, 2010.
- Kudo Y, Kitajima S, Ogawa I, Hiraoka M, Sargolzaei S, Keikhaee MR, Sato S, Miyauchi M, Takata T. Invasion and metastasis of oral cancer cells require methylation of E-cadherin and/or degradation of membranous beta-catenin. *Clin Cancer Res* 10(16):5455-63, 2004.

Laird PW The power and the promise of DNA methylation markers. *Nat Rev Cancer* 3(4):253-66, 2003.

Lee H, Lee EJ. HPV infection and p16 promoter methylation as predictors of ASC-US/LSIL progression. *Cancer Cytopathol* 124(1):58-65, 2016.

Lod S, Johansson T, Abrahamsson KH, Larsson L. The influence of epigenetics in relation to oral health. *Int J Dent Hyg* 12(1):48-54. 2014.

Loo WT, Jin L, Cheung MN, Wang M, Chow LW. Epigenetic change in E-cadherin and COX-2 to predict chronic periodontitis. *J Transl Med* 8:110, 2010.

Lu L, Katsaros D, de la Longrais IA, Sochirca O, Yu H. Hypermethylation of let-7a-3 in epithelial ovarian cancer is associated with low insulin-like growth factor-II expression and favorable prognosis. *Cancer Res* 67(21):10117-22, 2007.

Ma B, Hottiger MO. Crosstalk between Wnt/ β -Catenin and NF- κ B Signaling Pathway during Inflammation. *Front Immunol* 7:378, 2016.

Maeda G, Chiba T, Aoba T, Imai K. Epigenetic inactivation of E-cadherin by promoter hypermethylation in oral carcinoma cells. *Odontology* 95(1):24-9, 2007.

Maekita T, Nakazawa K, Mihara M, Nakajima T, Yanaoka K, Iguchi M, Arii K, Kaneda A, Tsukamoto T, Tatematsu M, Tamura G, Saito D,

- Sugimura T, Ichinose M, Ushijima T. High levels of aberrant DNA methylation in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosae and its possible association with gastric cancer risk. *Clin Cancer Res* 12(3 Pt 1):989-95, 2006.
- Mani A, Radhakrishnan J, Wang H, Mani A, Mani MA, Nelson-Williams C, Carew KS, Mane S, Najmabadi H, Wu D, Lifton RP. LRP6 mutation in a family with early coronary disease and metabolic risk factors. *Science* 315(5816):1278-82, 2007.
- McCartan BE, Healy CM. The reported prevalence of oral lichen planus: a review and critique. *J Oral Pathol Med* 37(8):447-53, 2008.
- Miyazaki T, Murayama Y, Shinomura Y, Yamamoto T, Watabe K, Tsutsui S, Kiyohara T, Tamura S, Hayashi N. E-cadherin Gene Promoter Hypermethylation in *H. pylori*-Induced enlarged Fold Gastritis. *Helicobacter* 12(5):523-31, 2007.
- Montebugnoli L, Venturi M, Gissi DB, Leonardi E, Farnedi A, Foschini MP. Immunohistochemical expression of p16(INK4A) protein in oral lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 112(2):222-7, 2011.
- Nagata S, Hamada T, Yamada N, Yokoyama S, Kitamoto S, Kanmura Y, Nomura M, Kamikawa Y, Yonezawa S, Sugihara K. Aberrant DNA methylation of tumor-related genes in oral rinse: a noninvasive method for detection of oral squamous cell carcinoma. *Cancer* 118(17):4298-308, 2012.
- Nakagawachi T, Soejima H, Urano T, Zhao W, Higashimoto K, Satoh Y,

- Matsukura S, Kudo S, Kitajima Y, Harada H, Furukawa K, Matsuzaki H, Emi M, Nakabeppu Y, Miyazaki K, Sekiguchi M, Mukai T. Silencing effect of CpG island hypermethylation and histone modifications on O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) gene expression in human cancer. *Oncogene* 22(55):8835-44, 2003.
- Nikolic N, Anicic B, Carkic J, Simonovic J, Toljic B, Tanic N, Tepavcevic Z, Vukadinovic M, Konstantinovic VS, Milasin J. High frequency of p16 and p14 promoter hypermethylation and marked telomere instability in salivary gland tumors. *Arch Oral Biol* 60(11):1662-6, 2015.
- Niwa T, Tsukamoto T, Toyoda T, Mori A, Tanaka H, Maekita T, Ichinose M, Tatematsu M, Ushijima T. Inflammatory processes triggered by *Helicobacter pylori* infection cause aberrant DNA methylation in gastric epithelial cells. *Cancer Res* 70(4):1430-40, 2010.
- Polakis P. The many ways of Wnt in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 17(1):45-51, 2007.
- Prakash S, Swaminathan U, Nagamalini BR, Krishnamurthy AB. Beta-catenin in disease. *J Oral Maxillofac Pathol* 20(2):289-99, 2016.
- Qiu GH, Tan LK, Loh KS, Lim CY, Srivastava G, Tsai ST, Tsao SW, Tao Q. The candidate tumor suppressor gene BLU, located at the commonly deleted region 3p21.3, is an E2F-regulated, stress-responsive gene and inactivated by both epigenetic and genetic mechanisms in nasopharyngeal carcinoma. *Oncogene* 23(27):4793-806, 2004.
- Rapoport JL, Addington AM, Frangou S, Psych MR. The neurodevelopmental

model of schizophrenia: update 2005. *Mol Psychiatry* 10(5):434-49, 2005.

Rayess H, Wang MB, Srivatsan ES. Cellular senescence and tumor suppressor gene p16. *Int J Cancer* 130(8):1715-25, 2012.

Santos-García A, Abad-Hernández MM, Fonseca-Sánchez E, Julián-González R, Galindo-Villardón P, Cruz-Hernández JJ, Bullón-Sopelana A. E-cadherin, laminin and collagen IV expression in the evolution from dysplasia to oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 11(2):E100-5, 2006.

Scully C, Carrozzo M. Oral mucosal disease: Lichen planus *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 46(1):15-21, 2008.

Sen M, Reifert J, Lauterbach K, Wolf V, Rubin JS, Corr M, Carson DA. Regulation of fibronectin and metalloproteinase expression by Wnt signaling in rheumatoid arthritis synoviocytes. *Arthritis Rheum* 46(11):2867-77, 2002.

Shilpa V, Bhagat R, Premalata CS, Pallavi VR, Ramesh G, Krishnamoorthy L. Relationship between promoter methylation & tissue expression of MGMT gene in ovarian cancer. *Indian J Med Res* 140(5): 616-23, 2014.

Shintani S, Nakahara Y, Mihara M, Ueyama Y, Matsumura T. Inactivation of the p14(ARF), p15(INK4B) and p16(INK4A) genes is a frequent event in human oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 37(6):498-504, 2001.

- Siddiqui KR, Laffont S, Powrie F. E-cadherin marks a subset of inflammatory dendritic cells that promote T cell-mediated colitis. *Immunity* 32(4):557-67, 2010.
- Silveira FA, Almeida G, Furtado Y, Silva KS, Maldonado P, Cavalcanti S, Carvalho Mda G. HPV DNA genotyping and methylation of gene p16 INK4A in cervical LSIL. *Exp Mol Pathol* 98(2):308-11, 2015.
- Srinivas K, Aravinda K, Ratnakar P, Nigam N, Gupta S. Oral lichen planus - Review on etiopathogenesis. *Natl J Maxillofac Surg* 2(1):15-6, 2011.
- Stanssens P, Zabeau M, Meersseman G, Remes G, Gansemans Y, Storm N, Hartmer R, Honisch C, Rodi CP, Böcker S, van den Boom D. High-throughput MALDI-TOF discovery of genomic sequence polymorphisms. *Genome Res* 14(1):126-33, 2004.
- Sugerman PB, Savage NW, Walsh LJ, Zhao ZZ, Zhou XJ, Khan A, Seymour GJ, Bigby M The pathogenesis of oral lichen planus. *Crit Rev Oral Biol Med* 13(4):350-65, 2002.
- Su PF, Huang WL, Wu HT, Wu CH, Liu TY, Kao SY. p16(INK4A) promoter hypermethylation is associated with invasiveness and prognosis of oral squamous cell carcinoma in an age-dependent manner. *Oral Oncol* 46(10):734-9, 2010.
- Supić G, Kozomara R, Branković-Magić M, Jović N, Magić Z. Gene hypermethylation in tumor tissue of advanced oral squamous cell carcinoma patients. *Oral Oncol* 45(12):1051-7, 2009.

- Supic G, Kozomara R, Jovic N, Zeljic K, Magic Z. Prognostic significance of tumor-related genes hypermethylation detected in cancer-free surgical margins of oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 47(8):702-8, 2011.
- Tolg C, Sabha N, Cortese R, Panchal T, Ahsan A, Soliman A, Aitken KJ, Petronis A, Bāgli DJ. Uropathogenic *E. coli* infection provokes epigenetic downregulation of CDKN2A (p16INK4A) in uroepithelial cells. *Lab Invest* 91(6):825-36, 2011.
- Torrente-Castells E, Figueiredo R, Berini-Aytés L, Gay-Escoda C. Clinical features of oral lichen planus. A retrospective study of 65 cases. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 15(5):e685-90, 2010.
- Torti DC, Jorizzo JL, McCarty MA. Oral lichen planus: a case series with emphasis on therapy. *Arch Dermatol* 143(4):511-5, 2007.
- Tost J, Dunker J, Gut IG. Analysis and quantification of multiple methylation variable positions in CpG islands by Pyrosequencing. *Biotechniques* 35(1):152-6, 2003.
- Vered M, Allon I, Buchner A, Dayan D. E-cadherin in oral SCC: an analysis of the confusing literature and new insights related to its immunohistochemical expression. *Histol Histopathol* 27(2):141-50, 2012.
- Viswanathan M, Tsuchida N, Shanmugam G. Promoter hypermethylation profile of tumor-associated genes p16, p15, hMLH1, MGMT and E-cadherin in oral squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 105(1):41-6, 2003.

Wang J, Zhang K, Wang J, Wu X, Liu X, Li B, Zhu Y, Yu Y, Cheng Q, Hu Z, Guo C, Hu S, Mu B, Tsai CH, Li J, Smith L, Yang L, Liu Q, Chu P, Chang V, Zhang B, Wu M, Jiang X, Yen Y. Underexpression of LKB1 tumor suppressor is associated with enhanced Wnt signaling and malignant characteristics of human intrahepatic cholangiocarcinoma. *Oncotarget* 6(22):18905-20, 2015.

Wang L, Tang L, Xie R, Nie W, Chen L, Guan X. p16 promoter hypermethylation is associated with increased breast cancer risk. *Mol Med Rep* 6(4):904-8. 2012.

Wang P, Mei J, Zhang N, Tao J, Tian H, Fu GH. *Helicobacter pylori* upregulates the expression of p16(INK4) in gastric cancer cells. *Hepatogastroenterology* 58(107-108):846-53, 2011.

Willert K, Jones KA. Wnt signaling: is the party in the nucleus? *Genes Dev.* 20(11):1394-404, 2006.

Wilson GA, Lechner M, Köferle A, Caren H, Butcher LM, Feber A, Fenton T, Jay A, Boshoff C, Beck S. Integrated virus-host methylome analysis in head and neck squamous cell carcinoma. *Epigenetics* 8(9): 953-61, 2013.

Wilson SW, Houart C. Early steps in the development of the forebrain. *Dev Cell* 6(2):167-81, 2004.

Yang H, Wu Y, Ma H, Jiang L, Zeng X, Dan H, Zhou Y, Chen Q. Possible alternative therapies for oral lichen planus cases refractory to steroid therapies. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*

121(5):496-509, 2016.

Ye X, Zerlanko B, Kennedy A, Banumathy G, Zhang R, Adams PD.

Downregulation of Wnt signaling is a trigger for formation of facultative heterochromatin and onset of cell senescence in primary human cells. *Mol Cell* 27(2):183-96, 2007.

Zhang R, Poustovoitov MV, Ye X, Santos HA, Chen W, Daganzo SM, Erzberger JP, Serebriiskii IG, Canutescu AA, Dunbrack RL, Pehrson JR, Berger JM, Kaufman PD, Adams PD. Formation of MacroH2A- containing senescence-associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA. *Dev Cell* 8(1):19-30, 2005.

Zhang S, Barros SP, Moretti AJ, Yu N, Zhou J, Preisser JS, Niculescu MD, Offenbacher S. Epigenetic regulation of TNFA expression in periodontal disease. *J Periodontol* 84(11):1606-16, 2013.

Zhong K, Chen W, Xiao N, Zhao J. The clinicopathological significance and potential drug target of E-cadherin in NSCLC. *Tumour Biol* 36(8): 6139-48, 2015.

Zou XP, Zhang B, Zhang XQ, Chen M, Cao J, Liu WJ. Promoter hypermethylation of multiple genes in early gastric adenocarcinoma and precancerous lesions. *Hum Pathol* 40(11):1534-42, 2009.

表・付図

表 1. 患者標本

Non-i	年齢	性別
No.1	56	M
No.2	45	M
No.3	71	M
No.4	34	F
No.5	68	M
No.6	60	F
No.7	74	M
No.8	60	F
No.9	54	F
No.10	55	F
No.11	56	F
No.12	76	F
No.13	60	F
No.14	34	F
No.15	47	F
No.16	82	M
No.17	64	F
No.18	47	M
No.19	69	F
No.20	47	F
No.21	53	F
No.22	32	F
No.23	80	F
No.24	26	M
No.25	65	F

RC	年齢	性別
No.1	42	M
No.2	62	M
No.3	52	F
No.4	51	M
No.5	55	F
No.6	21	F
No.7	83	F
No.8	35	F
No.9	55	F
No.10	52	F
No.11	41	M
No.12	52	M
No.13	62	F
No.14	44	M
No.15	40	M
No.16	35	F
No.17	71	M
No.18	64	M
No.19	27	M
No.20	31	M
No.21	34	M
No.22	66	M
No.23	83	M
No.24	44	F
No.25	25	M
No.26	36	F
No.27	47	M
No.28	42	M
No.29	55	M
No.30	59	M
No.31	60	M

OLP	年齢	性別
No.1	72	F
No.2	59	F
No.3	55	F
No.4	65	F
No.5	46	M
No.6	67	M
No.7	67	F
No.8	61	M
No.9	34	M
No.10	59	F
No.11	53	F
No.12	37	F
No.13	69	M
No.14	51	M
No.15	53	F
No.16	62	F
No.17	70	F
No.18	61	F
No.19	73	F
No.20	67	M
No.21	54	M
No.22	72	F
No.23	60	F
No.24	62	F
No.25	72	F
No.26	75	F

SCC	年齢	性別
No.1	72	F
No.2	60	M
No.3	82	M
No.4	72	F
No.5	61	F
No.6	76	M
No.7	48	F
No.8	74	M
No.9	82	M
No.10	59	M
No.11	64	M
No.12	85	F
No.13	72	M
No.14	70	M
No.15	70	M
No.16	44	F
No.17	75	M
No.18	70	F
No.19	62	M
No.20	80	F
No.21	51	M
No.22	33	M
No.23	66	M
No.24	56	M
No.25	63	M

Non-i: 非炎症性組織, Radicular cyst: 歯根嚢胞, Lichen planus: 口腔扁平苔癬, SCC: 口腔扁平上皮がん.

表 2. MSP 法で使したプライマー

genename	sequences	size
E-cadherin: Methyl-F	5'-TTAGGTTAGAGGGTTATCGCGT-3'	145bp
E-cadherin: Methyl-R	5'-TAACTAAAAATTACCTACCGAC-3'	
E-cadherin: Unmethyl-F	5'-TAATTTTAGGTTAGAGGGTTATTGT-3'	
E-cadherin: Unmethyl-R	5'-CACAACCAATCAACAACACA-3'	
β -catenin: Methyl-F	5'-GATTTAGGTTTAGTAGGGAGTGTGC-3'	190bp
β -catenin: Methyl-R	5'-AAAATCCTAAAAAACGAAATTCG-3'	
β -catenin: Unmethyl-F	5'-ATTTAGGTTTAGTAGGGAGTGTGTG-3'	
β -catenin: Unmethyl-R	5'-AATCCTAAAAAACAAAATTCAAA-3'	
p16 ^{ink4a} : Methyl-F	5'-TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC-3'	150bp
p16 ^{ink4a} : Methyl-R	5'-GACCCCGAACCGCGACCGTAA-3'	
p16 ^{ink4a} : Unmethyl-F	5'-TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT-3'	
p16 ^{ink4a} : Unmethyl-R	5'-CAACCCCAAACCAACAACCATAA-3'	
MGMT: Methyl-F	5'-TTTCGACGTTTCGTAGGTTTTTCGC-3'	81bp
MGMT: Methyl-R	5'-GCACTCTTCCGAAAACGAAACG-3'	
MGMT: Unmethyl-F	5'-TTTGTGTTTTGATGTTTGTAGGTTTTTGT-3'	93bp
MGMT: Unmethyl-R	5'-AACTCCACACTCTTCCAAAAACAAAACA-3'	

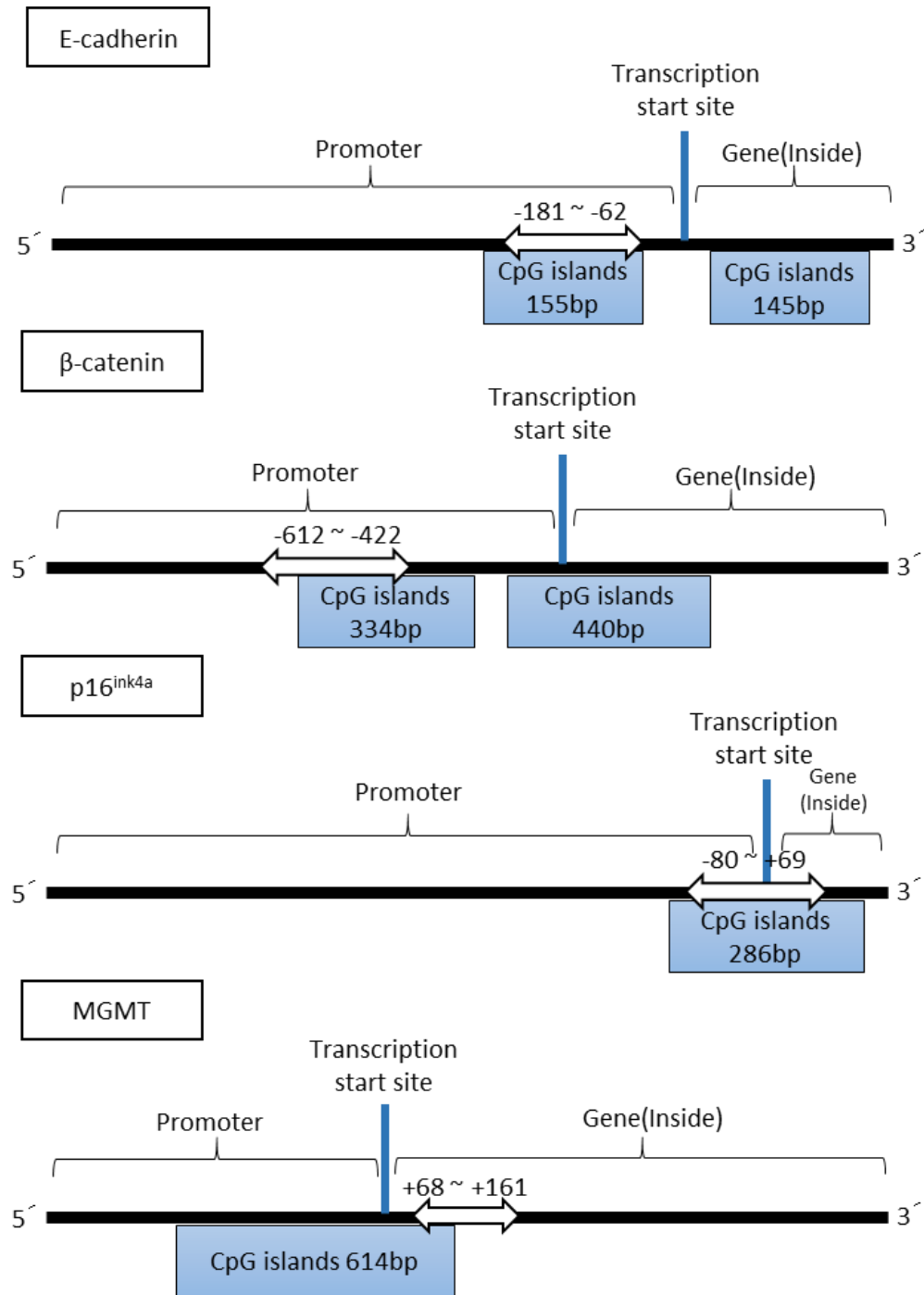


図 1. 各遺伝子の CpG island と MSP の関係

↔ : MSP Primer の設計位置

MGMT は CpG islands の上流および下流で高メチル化領域が認められ、その一方、あるいは両方のメチル化することで遺伝子転写の抑制がみられる報告があることから (Nakagawachi et al., 2003), 上記の位置で問題ない。

表 3. 免疫組織化学染色に用いた抗体

	Primary antibody	Dilution rate	Secondary antibody
E-cadherin	Monoclonal Mouse Anti-Human E-Cadherin (Dako)	×50	EnVision+System-HRP Labelled Polymer Anti-mouse (Dako)
β-catenin	Polyclonal Rabbit Anti beta Catenin (Abcam)	×1000	EnVision+System-HRP Labelled Polymer Anti-Rabbit (Dako)
p16 ^{ink4a}	Monoclonal Rabbit Anti clone EPR1473 p16 (Abcam)	×500	EnVision+System-HRP Labelled Polymer Anti-Rabbit (Dako)
MGMT	Monoclonal Mouse Anti MT3.1 MGMT (Abcam)	×50	EnVision+System-HRP Labelled Polymer Anti-mouse (Dako)

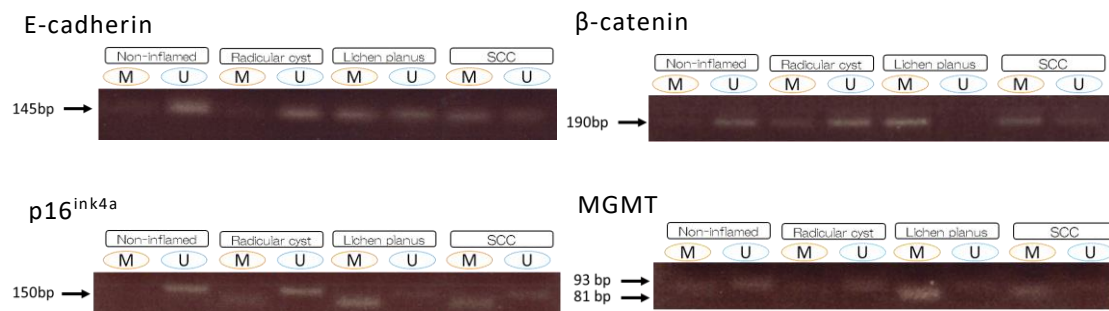


図 2. 半定量的 MSP 法

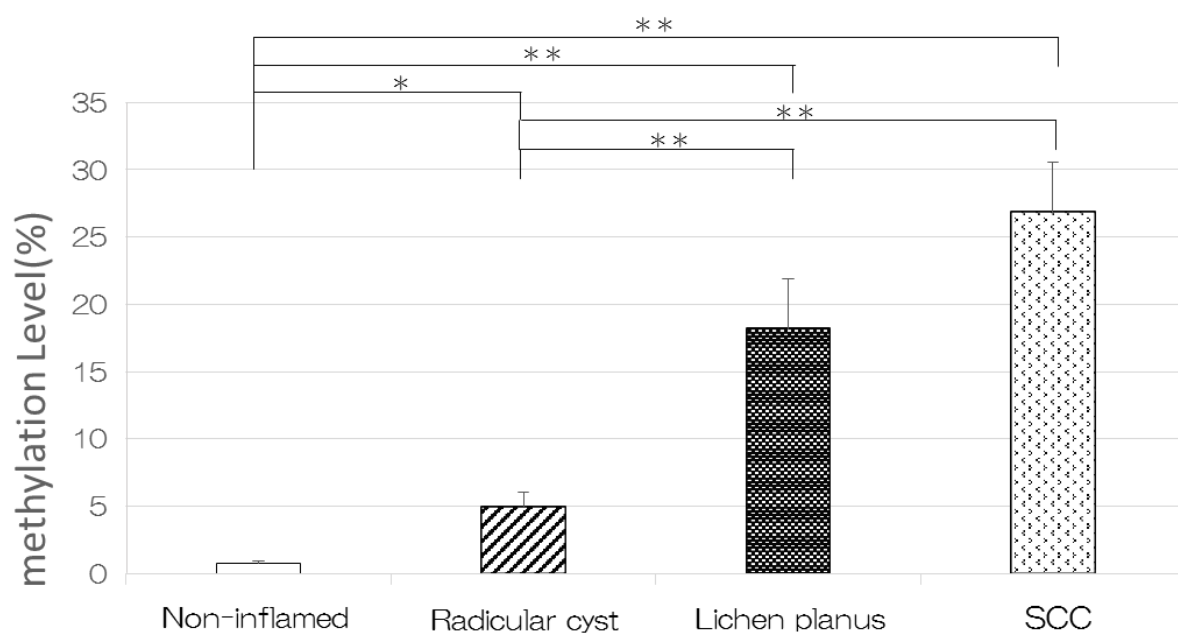
E-cadherin におけるメチル化 (M) のバンドおよび非メチル化 (U) のバンドは 145bp に観察され、口腔扁平苔癬や口腔扁平上皮がんではメチル化のバンドが発現され、非炎症性組織や歯根嚢胞では非メチル化のバンドが発現された。

β -catenin におけるメチル化 (M) のバンドおよび非メチル化 (U) のバンドは 190bp に観察され、口腔扁平苔癬や口腔扁平上皮がんではメチル化のバンドが発現され、非炎症性組織や歯根嚢胞では非メチル化のバンドが発現された。

$p16^{\text{ink4a}}$ におけるメチル化 (M) のバンドおよび非メチル化 (U) のバンドは 150bp に観察され、口腔扁平苔癬や口腔扁平上皮がんではメチル化のバンドが発現され、非炎症性組織や歯根嚢胞では非メチル化のバンドが発現された。

MGMT におけるメチル化 (M) のバンドは 81bp、非メチル化 (U) のバンドは 93bp で観察され、口腔扁平苔癬や口腔扁平上皮がんではメチル化のバンドが発現され、非炎症性組織や歯根嚢胞では非メチル化のバンドが発現された。

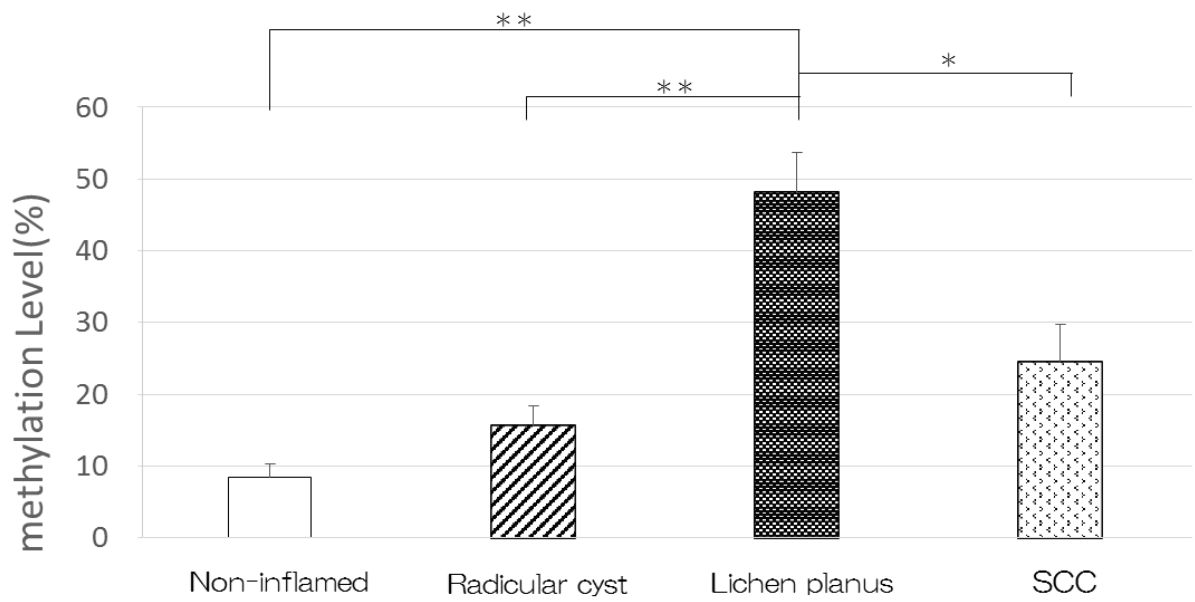
Non-inflamed; 非炎症性組織, Radicular cyst; 歯根嚢胞, Lichen planus; 口腔扁平苔癬, SCC; 口腔扁平上皮がん.



methylation Level	Non-inflamed	Radicular cyst	lichen planus	SCC
Ave.	0.78	4.95	18.17	26.86
Min	0.15	0.05	1.99	2.46
Max	2.91	23.13	87.96	79.40

図 3. E-cadherin における定量的 MSP 法

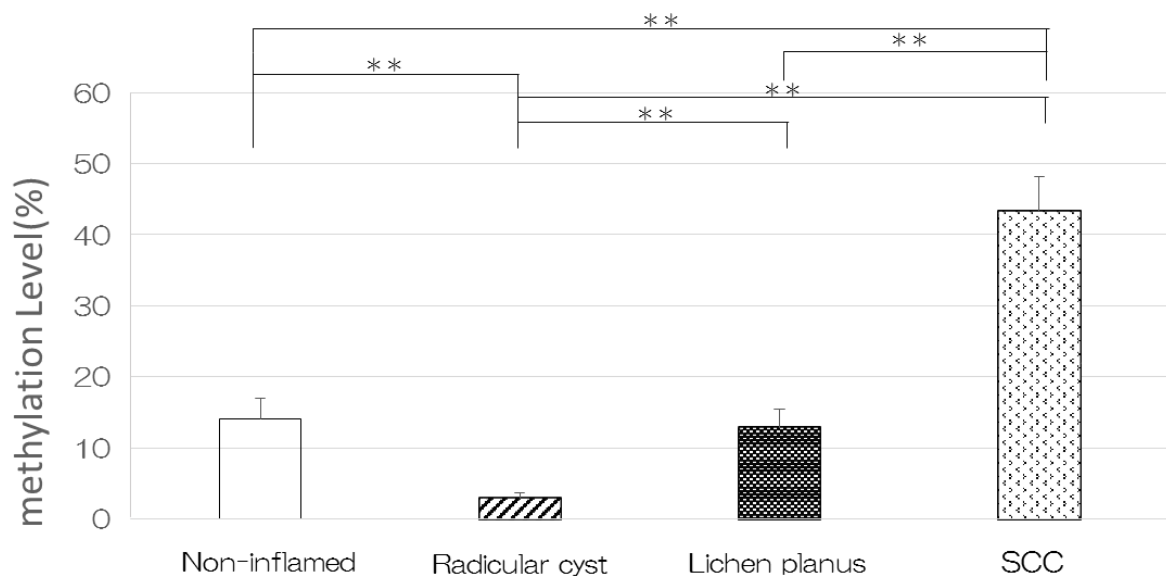
E-cadherin における定量的 MSP 法の結果， 口腔扁平苔癬および口腔扁平上皮がんは非炎症性組織や歯根嚢胞と比べ， 有意に高いメチル化率を示した．一方， 口腔扁平苔癬と口腔扁平上皮がんの間では明確な有意差は認められなかった (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). Non-inflamed; 非炎症性組織， Radicular cyst; 歯根嚢胞， Lichen planus; 口腔扁平苔癬， SCC; 口腔扁平上皮がん．



methylation Level	Non-inflamed	Radicular cyst	lichen planus	SCC
Ave.	8.40	15.68	48.09	24.51
Min	0.91	0.23	2.40	0.68
Max	32.77	42.83	87.96	80.43

図 4. β -catenin における定量的 MSP 法

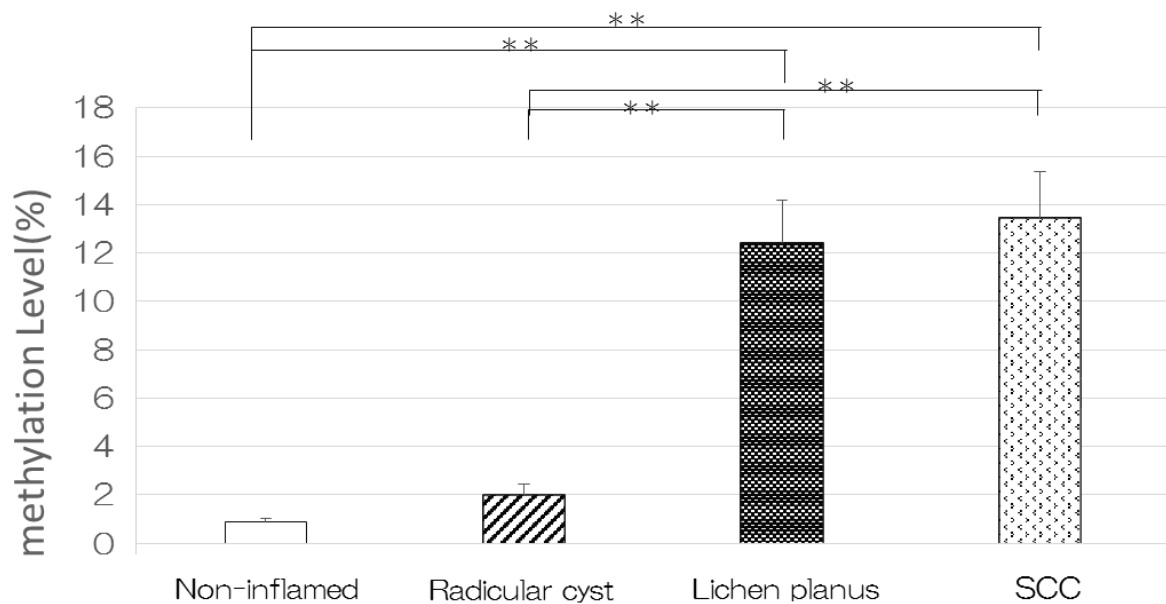
β -catenin における定量的 MSP 法の結果, 口腔扁平苔癬は非炎症性組織, 歯根嚢胞, 口腔扁平上皮がんの 3 つよりも有意に高値を示した (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). Non-inflamed; 非炎症性組織, Radicular cyst; 歯根嚢胞, Lichen planus; 口腔扁平苔癬, SCC; 口腔扁平上皮がん.



methylation Level	Non-inflamed	Radicular cyst	lichen planus	SCC
Ave.	14.4	2.96	12.85	43.34
Min	2.20	0.54	1.57	12.65
Max	59.83	20.41	48.82	90.08

図 5. p16^{ink4a} における定量的 MSP 法

p16^{ink4a} における定量的 MSP 法の結果，口腔扁平苔癬は歯根嚢胞よりも有意に高値を示したが，非炎症性組織とは有意差を認めなかった．また口腔扁平上皮がんと比較すると有意に低値を示した (**p<0.01)．Non-inflamed；非炎症性組織，Radicular cyst；歯根嚢胞，Lichen planus；口腔扁平苔癬，SCC；口腔扁平上皮がん．



methylation Level	Non-inflamed	Radicular cyst	lichen planus	SCC
Ave.	0.89	1.98	12.41	13.42
Min	0.29	0.46	6.28	4.83
Max	2.43	12.98	49.62	43.63

図 6. MGMT における定量的 MSP 法

MGMT における定量的 MSP 法の結果，口腔扁平苔癬は非炎症性組織や歯根嚢胞と比べ，有意に高いメチル化率を示した (** $p < 0.01$)．一方，口腔扁平上皮がんとは明確な有意差は認められなかった．Non-inflamed；非炎症性組織，Radicular cyst；歯根嚢胞，Lichen planus；口腔扁平苔癬，SCC；口腔扁平上皮がん．

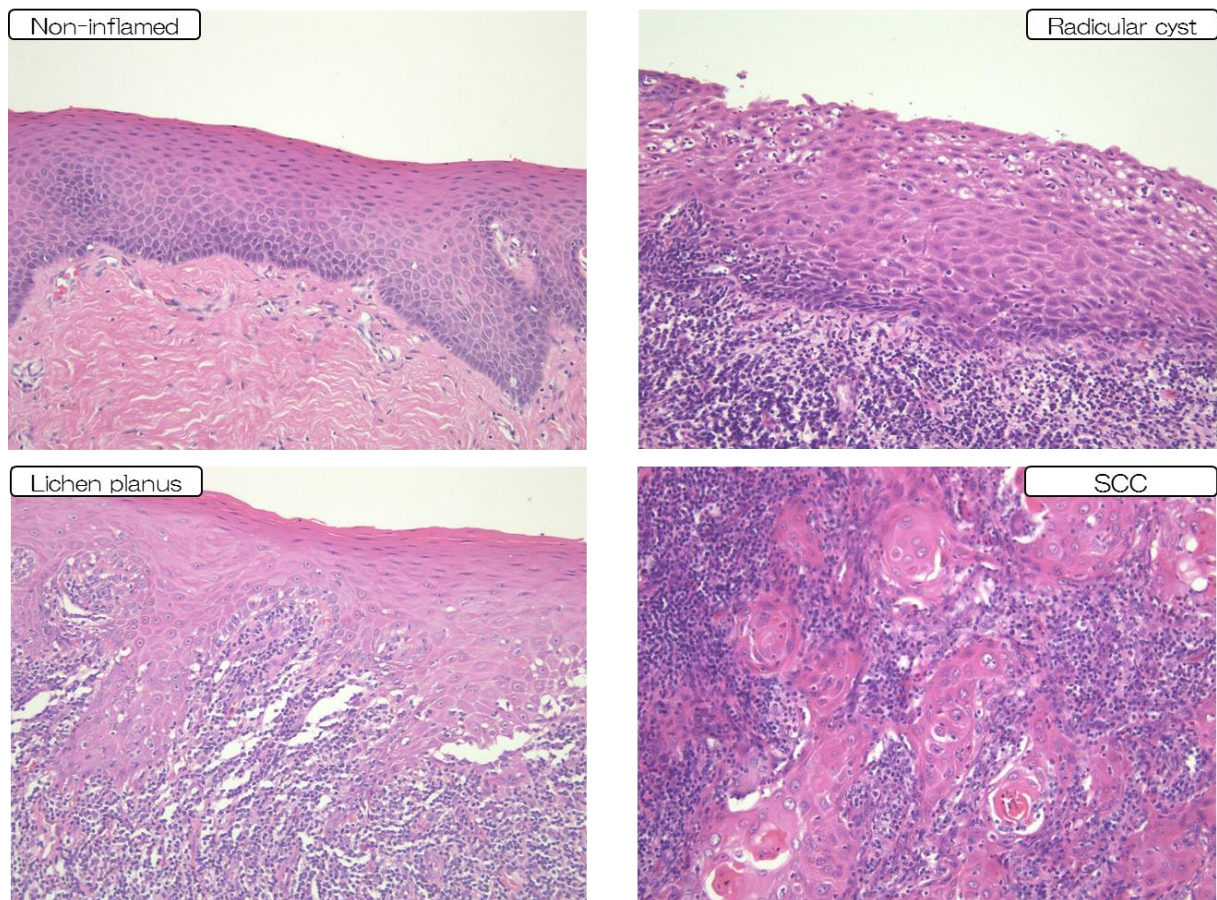


図 7. Hematoxylin-Eosin 染色(光学顕微鏡 200 倍像)

Hematoxylin-Eosin 染色による組織の代表例を示す．非炎症性組織では，正常口腔粘膜である錯角化重層扁平上皮による被覆を認め，上皮下結合組織に炎症細胞の浸潤はほとんどみられなかった．歯根嚢胞では，非角化重層扁平上皮による裏層を認め，上皮下にはリンパ球・形質細胞主体の慢性炎症細胞浸潤を認めた．口腔扁平苔癬では，軽度の角化亢進を伴った錯角化重層扁平上皮の被覆を認め，上皮下のリンパ球の帯状浸潤や上皮釘脚の鋸歯状変化が観察された．口腔扁平上皮がんでは，上皮下組織への癌真珠を伴う多数の癌胞巣浸潤を認めた．Non-inflamed; 非炎症性組織，Radicular cyst; 歯根嚢胞，Lichen planus; 口腔扁平苔癬，SCC; 口腔扁平上皮がん．

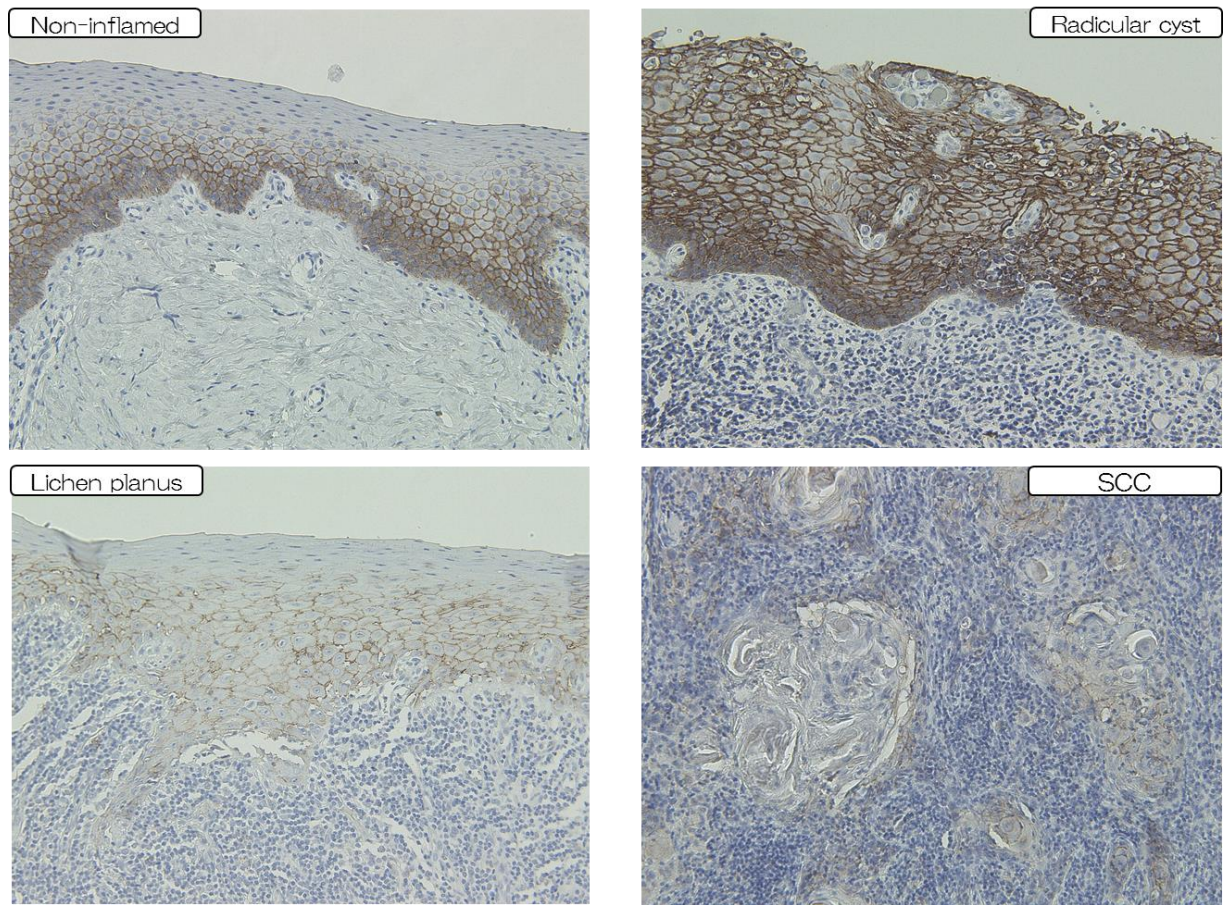


図 8. E-cadherin の免疫組織化学染色 (光学顕微鏡 200 倍像)

E-cadherin の免疫組織化学染色の結果，口腔扁平苔癬では，棘細胞層から基底細胞層の細胞間隙に陽性を呈し，角化層での発現はみられなかった．非炎症組織および歯根嚢胞では口腔扁平苔癬よりも強く陽性を呈した．口腔扁平上皮がんでは，口腔扁平苔癬とほぼ同様の強度の陽性を呈した．陽性率は非炎症性組織および歯根嚢胞で陽性率 50%以上の強陽性，口腔扁平苔癬および口腔扁平上皮がんでは陽性率 25～50%の陽性となった．Non-inflamed；非炎症性組織，Radicular cyst；歯根嚢胞，Lichen planus；口腔扁平苔癬，SCC；口腔扁平上皮がん．

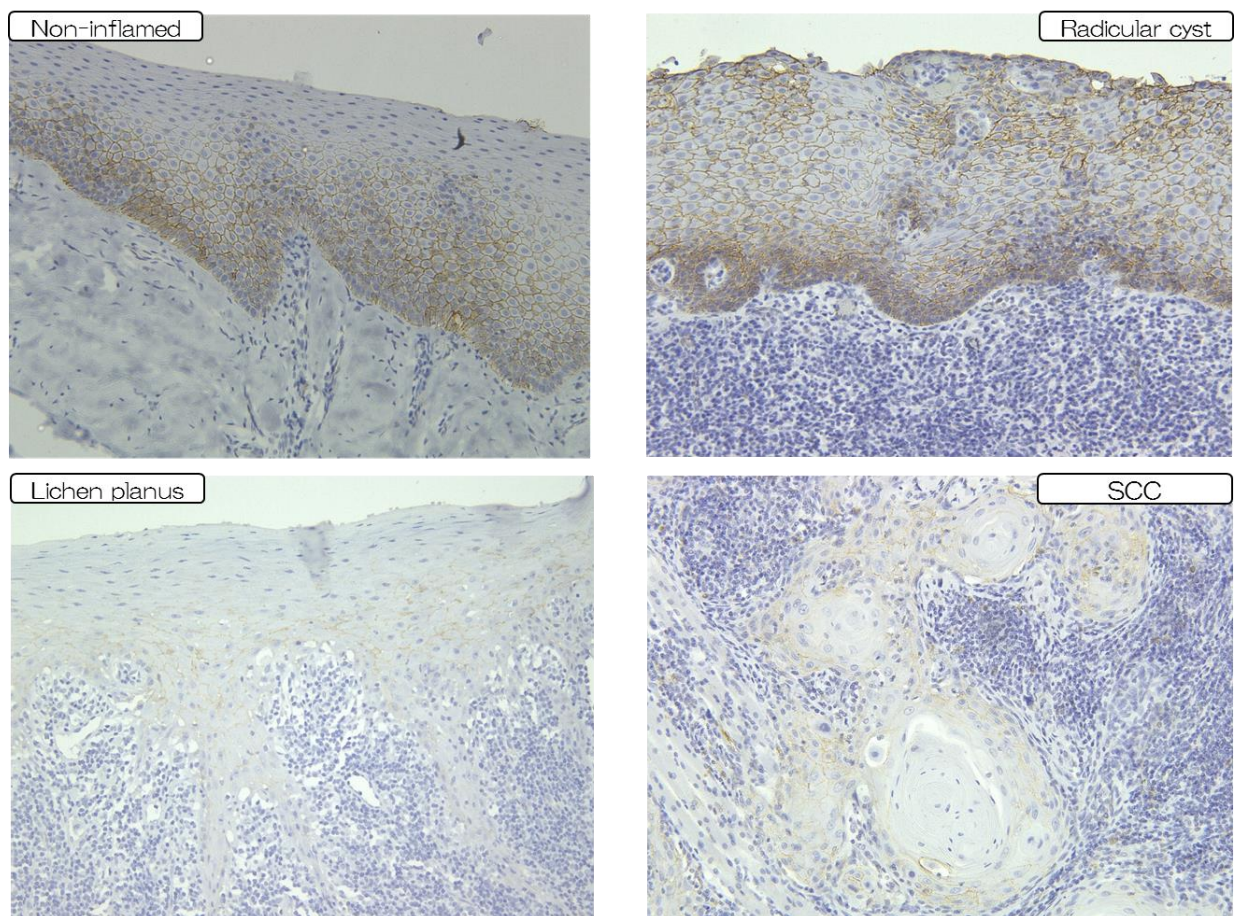


図 9. β -catenin の免疫組織化学染色 (光学顕微鏡 200 倍像)

β -catenin の免疫組織化学染色の結果，口腔扁平苔癬では，E-cadherin と同様に棘細胞層から基底細胞層にかけて，細胞間隙に発現がみられた．非炎症性組織および歯根嚢胞では，E-cadherin と同様に口腔扁平苔癬よりも著明な発現がみられた．口腔扁平上皮がんでは，口腔扁平苔癬とほぼ同様の局在が観察された．陽性率，は非炎症性組織および歯根嚢胞で強陽性，口腔扁平苔癬および口腔扁平上皮がんでは陽性となった．Non-inflamed；非炎症性組織，Radicular cyst；歯根嚢胞，Lichen planus；口腔扁平苔癬，SCC；口腔扁平上皮がん．

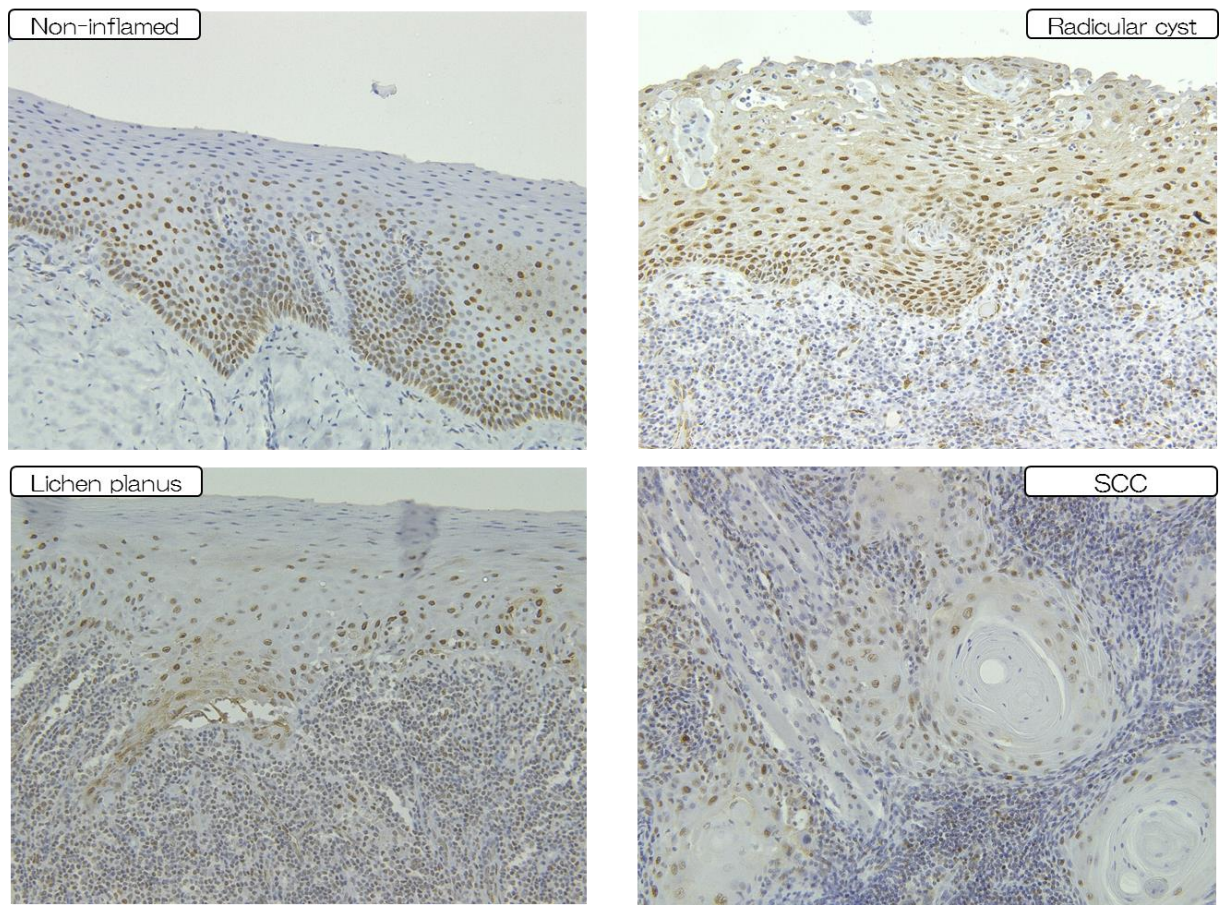


図 10. p16^{ink4a} の免疫組織化学染色 (光学顕微鏡 200 倍像)

p16^{ink4a} の免疫組織化学染色の結果，全ての群において棘細胞層および基底細胞層相当部の細胞核に比較的明瞭な発現がみられた．陽性率は，歯根嚢胞で強陽性，口腔扁平苔癬，口腔扁平上皮がんおよび非炎症性組織では陽性となった．Non-inflamed；非炎症性組織，Radicular cyst；歯根嚢胞，Lichen planus；口腔扁平苔癬，SCC；口腔扁平上皮がん．

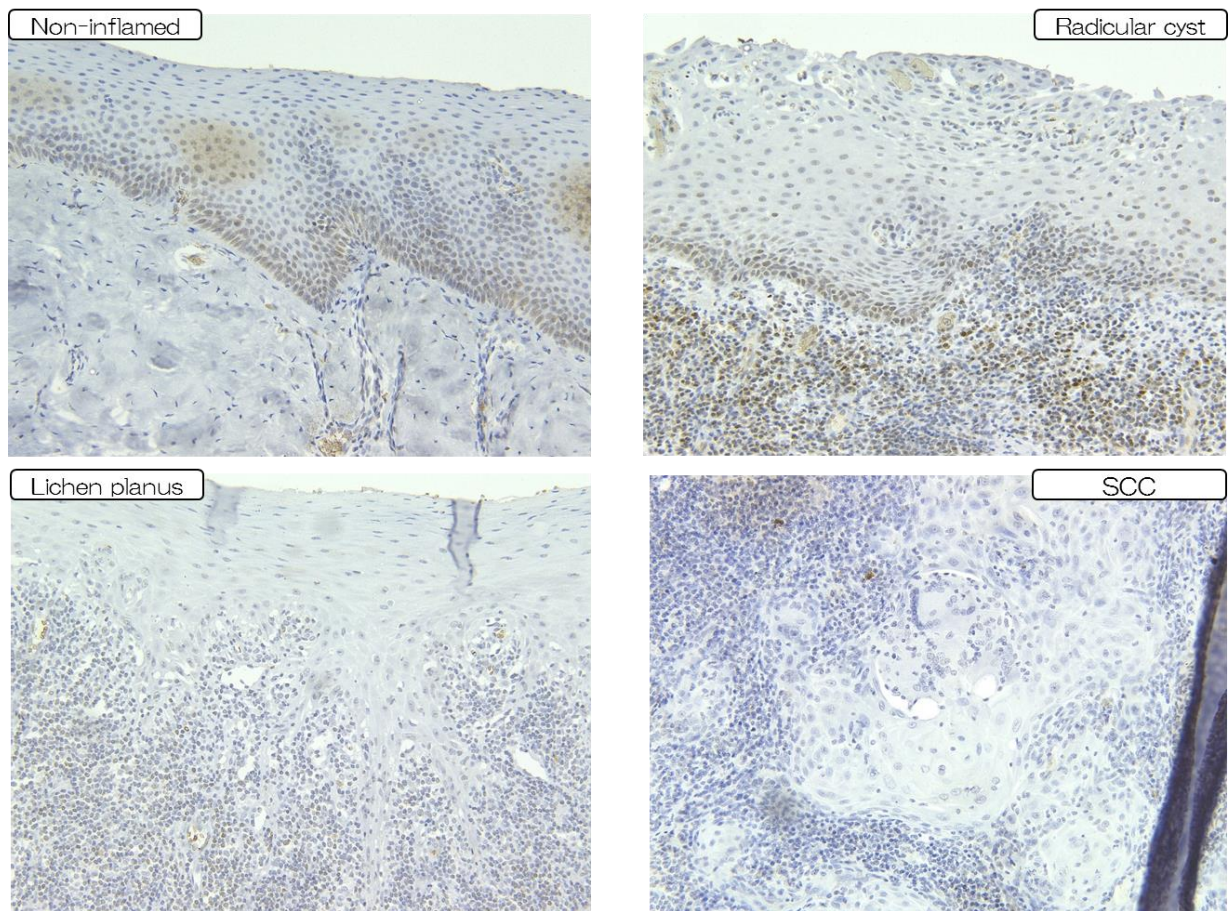


図 11. MGMT の免疫組織化学染色(光学顕微鏡 200 倍像)

MGMT の免疫組織化学染色の結果，口腔扁平苔癬では上皮内では MGMT の発現がみられなかった．一方，非炎症性組織および歯根嚢胞では，基底層の細胞核を中心に発現が観察された．口腔扁平上皮がんでは，口腔扁平苔癬と同様に上皮内に MGMT の発現がみられなかった．陽性率は非炎症性組織と歯根嚢胞で陽性，口腔扁平苔癬および口腔扁平上皮がんでは陽性率 0～10%の陰性となった．Non-inflamed；非炎症性組織，Radicular cyst；歯根嚢胞，Lichen planus；口腔扁平苔癬，SCC；口腔扁平上皮がん．

表 4. 免疫染色の結果のまとめ

	E-cadherin	β -catenin	p16 ^{ink4a}	MGMT
非炎症性組織	++	++	+	+
歯根嚢胞	++	++	++	+
口腔扁平苔癬	+	+	+	—
口腔扁平上皮がん	+	+	+	—
陽性率50%以上	陽性率 25% - 50%		陽性率 10% - 25%	陽性率10%未満
++	+		±	—