

論文要旨

氏名	原口 和也
タイトル	Oral cancer screening based on methylation frequency detection in <i>hTERT</i> gene using electrochemical hybridization assay via a multi-electrode chip coupled with ferrocenylnaphthalene diimide.

論文の要旨

ヒト癌の80%以上に発現しているテロメラーゼはhTERT, hTR, hTEP1から構成されており、その活性はhTERT発現により調節されると報告されている。また、hTERT発現は、同遺伝子プロモーター領域の異常メチル化により引き起こされる可能性が示唆されている。テロメラーゼは酵素複合体であるため、テロメラーゼを対象とした癌スクリーニングシステムを開発しようとした場合、検体採取後直ちに測定しなければならず、一般臨床には適応しづらいと考えられる。そのため、今回は安定性の高いhTERT遺伝子プロモーター領域のCpG部位における異常メチル化を指標としたスクリーニングの可能性を検討した。また、同遺伝子のメチル化は発癌の初期段階で生じるため、前癌病変への応用についても検討した。加えてhTERTタンパク発現を免疫組織学的に検出し、同遺伝子のメチル化との相関を評価した。

対象は、本学附属病院顎顔面外科および口腔内科外来を受診し、本研究に同意が得られた口腔癌(OSCC)、白板症(OL)を有する患者と正常口腔粘膜(NOM)を有する健常ボランティアを対象とした。検体は口腔内全体を拭って採取された剥離細胞(EOC-E)と病変局所からの剥離細胞(EOC-L)、病変から採取した組織(Tissue)とした。各検体からDNAを抽出、亜硫酸処理しPCRで増幅したのち、hTERT遺伝子のメチル化頻度を測定した。測定には九州工業大学竹中研究室が開発したElectrochemical Hybridization Assay(EHA)を用いた。また、手術時に採取した組織を使用して、免疫染色(ストレプトアビジン・ビオチン法)によりhTERTタンパクの発現を調べた。

結果を以下に示す。OSCC患者では検体の採取方法に依らずNOMと比較して、hTERT遺伝子のCpG部位における異常メチル化が高率に見られた。OL患者はOSCC患者と健常者の中間を示した。疾患群(OSCC+OL)とNOM(表1)あるいはOSCCとそれ以外の患者群(OL+NOM)(表2)の識別を行うためにROC解析を行った結果、高い正診率を示した。また、hTERTタンパクの免疫染色の結果を以下に示す。hTERTタンパクはOSCCではほぼすべての上皮細胞に発現していたが、NOMではほとんど発現がみられずOLでは粘膜上皮の1/2から全層にわたって発現がみられた。発現量はOSCC、OL、NOM増加し、3者それぞれの間には有意差を認めた(p<0.05)。また、hTERTタンパク発現とhTERT遺伝子の異常メチル化は有意な相関関係を示した。以上より口腔癌におけるhTERT遺伝子の異常メチル化は口腔癌のスクリーニングシステムとして有用である可能性が示唆された。

表1

表2

	M5+M4+M4/ OSCC					M5+M4+M4/ OSCC+OL					
	OSCC	OL	HL	accuracy rate	AUC	OSCC	OL	HL	accuracy rate	AUC	
Tissue	30/35	18/25	33/34	86% (81/94)	0.927	Tissue	33/35	16/25	30/34	84% (79/94)	0.906
EOC-L	19/22	20/24	23/23	90% (62/69)	0.936	EOC-L	22/22	18/24	22/23	90% (62/69)	0.919
EOC-E	20/21	14/19	29/29	91% (63/69)	0.97	EOC-E	21/21	14/19	26/29	88% (61/69)	0.904