

論文審査結果報告書

論文提出者氏名 原口 和也

学位論文題目 Oral cancer screening based on methylation frequency detection in hTERT gene using electrochemical hybridization assay via a multi-electrode chip coupled with ferrocenylnaphthalene diimide.

審査委員(主査) 竹内 弘



(副査) 瀬田祐司



(副査) 中島秀彰



論文審査結果の要旨

ヒト癌の80%以上に発現しているテロメラーゼはhTERT, hTR, hTERTP1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、申請者の原口和也氏は安定性の高い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。この中で、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、新たに開発された電気化学的な方法によって検出した同遺伝子のメチル化との相関を評価した。

対象は、九州歯科大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におけるhTERTタンパクの発現を、免疫組織化学染色により調べた。

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あるいはOSCCとそれ以外の患者群(OL+NOM)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、免疫組織化学的解析において、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の順に高く、それぞれの間に有意差を認めた。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。これらの結果は、口腔癌におけるhTERT遺伝子の異常メチル化を、新たに開発された電気化学的方法によって検出するシステムが口腔癌のスクリーニングに有用である可能性を示唆するものであり、非常に意義深い。

本研究の内容に関して、申請者の原口氏に対し、主査と2名の副査から、過去の類似研究との違いや新たな検出方法の機序、各実験方法から得られたデータの解釈・意義について質問したが、概ね適切な回答を得た。総じて、審査委員会では本論文を学位論文として価値あるものと判断した。