

論 文 要 旨

Melting curve analyses in the quantitative real-time polymerase chain reaction of methylated/non-methylated DNA toward the detection of oral cancer using gargle fluid

含嗽液を用いたリアルタイム PCR における融解曲線分析により
DNA メチル化を評価する口腔癌検出法の検討

【序論及び目的】

口腔扁平上皮癌 (OSCC) は、口腔領域の悪性腫瘍で最も多い組織型であり、口腔癌の 90%以上を占めている。OSCC の 5 年生存率はステージ I および II の早期癌においては 80%以上であるのに対し、ステージ III、IV の進行癌においては 50%程であり、早期発見と速やかな治療開始が重要であることは現在も変わらない。OSCC の確定診断には外科的組織生検が必要であるが、侵襲的な処置であり経過観察中の頻回な検査は困難である。また、組織生検は口腔外科専門医が行うため検査できる地域は限られる。そのため、OSCC 診断を容易に行う簡便で、専門性の必要ない検査方法が求められている。

エピジェネティック機構である DNA メチル化は臓器特異的な遺伝子発現を制御しており、癌抑制遺伝子のメチル化は癌のバイオマーカーとして期待され、広く研究されている。我々はこれまで、OSCC 患者の口腔含嗽液に含まれる腫瘍細胞を検体として DNA メチル化解析を行い、OSCC の非侵襲的な診断方法を報告してきた。しかし、現在の MS-MLPA 法などのメチル化解析方法は操作が煩雑であり、解析に時間を要することが問題点である。

近年の研究では DNA メチル化があると DNA 二重らせん構造の熱安定性が高まり、リアルタイム PCR (qPCR) の増幅効率が減少し、それに伴い融解曲線の形状に変化を及ぼすことが実証されている。また、qPCR を行い融解曲線の形状・面積を用いて、核酸定量を行う簡便で精度の高い方法が報告されている。本研究では、これらの報告を基に、口腔含嗽液を検体とし、qPCR における融解曲線を用いて非侵襲かつ簡便に口腔癌診断を行うことが可能であると仮説を立て検討した。

【材料及び方法】

対象は 2022 年 5 月から、2023 年 7 月に鹿児島大学病院口腔外科を受診し、口腔癌または口腔潜在的悪性疾患 (OPMD) の臨床診断とした 90 名とした。組織生検の直前に滅菌精製水 20ml で 30 秒間含嗽し、全量採取した。組織生検にて扁平上皮癌 (SCC)、または上皮内癌 (CIS) の診断を得た 30 例を悪性群としてその後の解析を行った。また、対照群として 2023 年 4 月から 7 月に同施設を受診した口腔粘膜にびらん、潰瘍、腫瘍を認めない 30 名から含嗽液を採取した。さらに組織生検にて上皮異形成の診断を得た 10 例についても検討した。採取した含嗽液から DNA 抽出 (DNeasy Blood and Tissue Kit) を行い、従来のメチル化解析法である Methylation Specific-Multiplex Ligation dependent Probe Amplification (MS-MLPA) 法と本研究で開発した qPCR を用いた新規口腔癌診断法を行い比較検討した。本研究は、鹿児島大学疫学研究等倫理委員会の承認を得て行った。(承認番号:210340)

・ MS-MLPA 法

DNA に癌抑制遺伝子のプローブをハイブリダイズさせ、ライゲーション反応と同時に制限酵素 HhaI で処理させる。この際、メチル化領域のプローブは切断されず PCR 増幅されるが、非メチル化領域はプローブが切断され PCR 増幅が起こらない。制限酵素処理データと未処理データを比較し相対的なメチル化量を算出した。

・ qPCR による簡便な口腔癌診断の新規方法の開発

DNA メチル化が起こると PCR 効率に影響し融解曲線の形状が変化することに着目した。対象遺伝子は予備実験にて口腔癌患者で MS-MLPA 法のメチル化頻度が高かった BRCA2、CDH13 を標的遺伝子とした。また、口腔癌患者、健常者においてメチル化頻度の差が無かった MLH1 をコントロール遺伝子に選択した。各遺伝子のプライマーは MS-MLPA 法の解析領域が含まれるように設計し PCR 反応を行い、融解曲線を作成した。メチル化を認めないコントロールサンプルの融解温度を基準点とし、基準点周囲の融解曲線の面積比を評価値 (RTAV) として算出した。メチル化により融解曲線の形状が変化すると RTAV が変化することを利用して悪性群と健常群の比較検討を行った。

トレーニングセットの 40 例 (悪性 20 例、健常 20 例) で qPCR による新規の口腔癌診断方法を確立し、テストセット 20 例 (悪性 10 例、健常 10 例) でその診断方法の有用性を検証した。

【結果】

非メチル化 DNA、メチル化 DNA の qPCR を行い融解曲線が変化することを実際に確認した。トレーニングセットにおける MS-MLPA 法では悪性群において BRCA2、CDH13 遺伝子の DNA メチル化傾向を認めた。qPCR による融解曲線面積の評価では RTAV は悪性群において低い傾向にあり MS-MLPA 法との相関があった。RTAV を用いて悪性群の検出をエンドポイントとした ROC 曲線を作成すると、AUC は BRCA2 で 0.757、CDH13 で 0.641 であった。診断性能を向上させるため線形回帰分析を行い、2 つの遺伝子の RTAV 組み合わせによる回帰式を作成し診断すると AUC=0.780 であり、単一遺伝子の場合よりも向上した。確立した診断式をテストセットにて検証すると AUC=0.830 と診断性能の再現性を認めた。さらに、上皮異形成 10 例と健常群 30 例の qPCR を行うと BRCA2、CDH13 ともに RTAV は上皮異形成で低い傾向があった。

【結論及び考察】

近年、口腔癌スクリーニングとして簡便で費用対効果の高い方法が求められている。我々はこれまで、口腔癌患者の含嗽液の DNA メチル化に着目して非侵襲的な口腔癌診断方法を開発したが、メチル化解析方法は複雑であり高コスト、時間を要していた。また、DNA メチル化はエピジェネティックな変化であり、含嗽液検体から抽出した DNA は、同じ遺伝子であっても不均一にメチル化されている可能性が高く、この不均一なメチル化を定量するのが課題であった。近年の報告では qPCR の融解曲線形状が DNA メチル化の影響を受け、変化することが実証されている。また、核酸が少ない場合に CT 値よりも融解曲線の面積を利用して定量的に評価する方法が報告されており、これらの研究を基に本研究の口腔癌診断方法を開発した。融解曲線形状に変化を及ぼすのは DNA メチル化のみならず、塩基配列の変異も影響している。特に、プライマー結合部位の変異は、qPCR の増幅効率を低下させるが、このことは本研究の新規方法において口腔癌診断を行うのに有利に働くと考えられる。競合技術として細胞診や口腔内蛍光観察装置があるが、これらは検査者の技術の習熟や病理医の診断が必要であり専門家がない地域においては検査困難である。それに対して含嗽液を検体とした新規方法は口腔癌の専門医が不在でも安全かつ適切に採取可能でありスクリーニング検査として有用である。

研究の限界として含嗽液検査では舌根部の病変や内向性病変の細胞は採取することができない可能性や、本研究で解析した部位は癌抑制遺伝子プロモーター領域の一部にすぎないこと、サンプルサイズが小さいことが挙げられる。今後、サンプルサイズを増やし、また、口腔癌発症に関与するとされる他の遺伝子についても検証し診断性能をより向上させる必要がある。

結論として、本研究で開発した qPCR の融解曲線を用いる口腔癌診断方法は従来のメチル化解析よりも簡便であり、解析時間の短縮と低コストから大規模スクリーニングに適しており、社会実装が期待される。