

平成 22 年 5 月 8 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間： 2008～ 2009  
 課題番号：20791512  
 研究課題名 (和文) ヒト口腔癌における EZH2 の役割と EZH2siRNA による抗腫瘍効果の検討  
 研究課題名 (英文) A role of EZH2 in the human oral cancer and examination of the antitumor effect by EZH2siRNA  
 研究代表者  
 木谷 憲典 (KIDANI KAZUNORI)  
 鳥取大学 医学部 助教  
 研究者番号：60403391

研究成果の概要 (和文)： EZH2 の siRNA を腫瘍細胞内に導入して抗腫瘍効果の確認のため、EZH2SiRNA を 5 種類設計した。癌細胞は HSC-3, SCC-KN, HSC-4 を用い、細胞培養用にアテロアレイ (KOKEN) を用いた。EZH2 siRNA の配列 (GTGTATGAGTTTAGAGTCA) (#4) は他の配列に比べ mRNA 抑制率および細胞増殖抑制率ともに抑制効果を示した。# 4 は高効率で mRNA 発現を抑制。次にアテロコラーゲンに EZH2SiRNA を混入して癌細胞を移植したヌードマウスに注射したところ癌の縮小効果が見られた。結果として EZH2SiRNA は口腔癌においても抗腫瘍効果が見られた。

研究成果の概要 (英文)： We studied siRNA of EZH2 in tumor cells and, for confirmation of the antitumor effect, designed EZH2siRNA five kinds. The cancer cell used HSC-3, SCC-KN, HSC-4 and used Atelocollagen® (KOKEN) for cell culture. As for sequence (GTGTATGAGTTTAGAGTCA) (#4) of EZH2 siRNA, mRNA inhibition and cell proliferation inhibition showed depression effect as compared with other sequence together. # 4 inhibits mRNA manifestation in high efficiency. The reduction effect of the cancer was found when we injected it into the nude mouse which we mixed EZH2SiRNA with atelocollagen, and transplanted a cancer cell. As a result, as for EZH2siRNA, antitumor effect was found in the oral cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：口腔癌, SCC, EZH2, アテロコラーゲン, siRNA

## 1. 研究開始当初の背景

個体発生における位置情報を担う重要な Hox 遺伝子の研究において見つかった Polycomb 遺伝子群は、発現していない遺伝子を抑制状態に保つ機能、また trithorax 遺伝子群は活性化遺伝子の発現を維持する機能がありこの2つの遺伝子群のエピジェネティカルな制御の発現維持によって染色体上の各ドメインの活性化状況を細胞分裂をしても維持することが出来ると考えられている。このバランスが崩れ、polycomb 遺伝子群が優位になると gene silencing が引き起こされるといわれている。

近年癌研究において gene silencing の研究が進められ、中でも Polycomb 遺伝子群の中に含まれる EZH2 はヒストン H3 の Lys-27 をメチル化する酵素活性を持ち、クロマチン構造の不活化との関わりや細胞増殖、P53 経路との関わりが報告されている。また近年、前立腺癌や乳癌などの転移性の癌や様々な癌において、EZH2 と悪性度や予後との関連性に関する多くの報告があり、中でも Varamvall yらは DNA マイクロアレイ法を用いて前立腺癌細胞中において EZH2 が活性化されると多くの癌抑制遺伝子を gene silencing し、腫瘍の進行を転移方向へ加速させると報告している。(Varamvall y .S Nature. 2002 Oct 10;419(6907):624-9) しかし、EZH2 と癌との関連は依然不明な点が多い。申請者らは口腔癌においても EZH2 が腫瘍の進行に関し関連性があるのではないかと考え正常上皮 10 例、上皮異形成 50 例、未治療の扁平上皮癌 102 例を対象に免疫組織学的手法を用いて Ki-67、P53、P27、P21、アポトーシス、と臨床病理学的因子との関連性について組織学的検討を行い以下の点を明らかにしている。

1) EZH2 は western blot、免疫組織化学において口腔癌細胞株や切除標本において発現した。

2) EZH2 発現は正常上皮より異形成、さらに癌部において発現が増加した。

3) EZH2 が増殖因子マーカーの Ki-67 や P53 との正の関連性がある。

4) EZH2 発現と印象病理学的因子との関連を解析した結果、EZH2 と分化度、Stage、腫瘍径、

リンパ節転移など口腔癌における悪性度との関連性が示唆された。

5) 予後の検討を行ったところ有意に EZH2 の高発現群は有意に予後が悪化した。以上のデータは口腔癌における EZH2 の発現上昇によって癌抑制遺伝子が抑制されて癌化、あるいは腫瘍の進行が起こった可能性が示唆される。

しかしながら、口腔癌における EZH2 が高発現した場合の癌抑制遺伝子の同定はなされておらず、臨床に結びづく研究もなされていない。

## 2. 研究の目的

ヒト口腔癌細胞における EZH2 発現のメカニズムを解析および EZH2 siRNA を用いた口腔癌抑制の検討を目的としている。本研究の特徴として、すでに口腔癌で EZH2 が発現することを確認し、悪性度や予後との関連性を見出しており、本研究において得られるデータは臨床的に有用なマーカーとなる可能性が極めて高い。悪性度との関連性、細胞増殖との関連性があることが今までの研究データで分かっており、Vitro においての EZH2 siRNA を用いることによって口腔癌のどのような機能が抑制されるかを検討する。

## 3. 研究の方法

1) ヒト口腔癌細胞を用い EZH2 発現と腫瘍の増大の検討。

免疫不全マウスの皮下に口腔癌細胞株と EZH2siRNA を導入した細胞を接種し腫瘍の増大量を検討する。

2) EZH2 siRNA による抗腫瘍効果の検討  
免疫不全マウスの皮下に口腔癌細胞株を接種し腫瘍が増大させる。増大した腫瘍に対し作製した EZH2siRNA にアテロコラーゲンを混入して皮下注射を行い、腫瘍抑制効果を検討する。

アテロコラーゲンは最近の報告で siRNA の効果を持続させる効果があるといわれている。

(Takeshita F, PNAS. 2005;102(34): 12177-12182)

#### 4. 研究成果

Polycomb 遺伝子群の EZH2 は細胞増殖および転移性の癌や様々な癌において、癌の悪性度や予後との関連性について報告があり、本研究において口腔癌においても発現し、口腔扁平上皮癌では PCR にて低分化の方が高分化より EZH2 の発現量が多く見られた。免疫組織化学にて EZH2 の高発現であれば、低分化で、リンパ節転移が多く、予後の悪化との関連性が見られた。EZH2 の SiRNA を腫瘍細胞内に導入して抗腫瘍効果を確認するために、癌細胞を移植したヌードマウスを用いて EZH2SiRNA をアテロコラーゲンに混入して皮下注射を行い抗腫瘍効果をを確認する目的に、EZH2SiRNA を 5 種類設計した。また癌細胞は HSC-3(低分化),SCC-KN(中分化),HSC-4(高分化)を用いた。細胞培養用にアテロコラーゲンが敷いてある実験用シャーレであるアテロアレイ (KOKEN) を用いた。EZH2 濃度条件や細胞播種数を検討し、複数回の試験を実施した。このうち RT-PCR による mRNA 抑制率の解析については計 3

回、細胞増殖試験については計 2 回実施した。

結果 1. EZH2 siRNA の配列 (GTGTATGAGTTTAGAGTCA) (以下、siRNA #4) は他の配列に比べ mRNA 抑制率および細胞増殖抑制率ともに顕著な効果を示した。mRNA 抑制傾向と細胞増殖抑制傾向の結果はほぼ一致した。2、siRNA # 4 は高効率で mRNA 発現が抑制されたが (mRNA の発現量の 70-80%を抑制)、増殖抑制効果は僅かであった (細胞数の 20-30%を抑制)。これは、Takeshita et al., PNAS., 2000,などの文献と同様であった。(他の文献で EZH2 RNAi による細胞増殖抑制効果は、導入 6 日目や 8 日目など比較的長期間の培養後に顕著に現れている。しかし、長期培養のために少ない数で播種を行うと、特に HSC-3 細胞と SCCKN 細胞において、細胞数に極端な差異が出る、細胞が増殖しないなどの問題が顕在化したため、長期培養は実施しなかった。)次にアテロコラーゲンに EZH2SiRNA を混入して癌細胞を移植したヌードマウスに注射したところ癌の縮小効果が、見られたが、濃度や条件の設定など実験の継続中である。結果として EZH2SiRNA は口腔癌においても抗腫瘍効果が見られた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

①Kidani K, Ito H: High expression of EZH2 is associated with tumor proliferation and prognosis in human oral squamous cell carcinomas.

Oral oncology 45 : 39~46 2009

[学会発表] (計 1 件)

①Prognostic Significance of EZH2 in Oral Squamous Cell Carcinoma Kidani K, Ryoke K: 8th Asian Congress on Oral and Maxillofacial Surgery, Bangkok Thailand 2008

6. 研究組織

(1)研究代表者

木谷 憲典 (KIDANI KAZUNORI)

鳥取大学 医学部 助教

研究者番号 : 60403391