

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792217

研究課題名(和文) 卵母細胞処理口腔扁平上皮癌細胞のエピジェネティックなリプログラミングの検討

研究課題名(英文) Epigenetic reprogramming of oral squamous cell cancer cells with oocyte extracts

研究代表者

福井 康人 (FUKUI, YASUTO)

広島大学・医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号：90363085

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：当研究室で樹立した口腔扁平上皮癌株ZA(無血清培養下で培養)における癌抑制遺伝子(プロモーターの高メチル化が報告されている。E-cadherin、p16、MGMT、DAP-K、MLH1)の発現をRT-PCRを用いて検討を行った。その結果、MGMT、DAP-K、MLH1では、その発現が消失していたため、フリカツメガエル卵母細胞および未受精卵抽出液をZA細胞5,000個に対して1 μ lの量で無血清培地中に添加し、21 $^{\circ}$ Cで無血清培養を行い、培養3、6、9時間後に各癌細胞よりRNAを抽出し、RT-PCRで上記の癌抑制遺伝子の発現上昇の有無の検討および、適切な培養時間の検討を行ったが、有意差は認めなかった。

研究成果の概要(英文)：I examined the expression of tumour suppressor gene (E-cadherin,p16,MGMT,DAP-K,MLH1) in oral squamous cell carcinoma cell line ZA using RT-PCR. MGMT,DAP-K and MLH1 were not expressed in ZA. ZA cells were added to Xenopus oocyte extracts (5,000 cells/ μ l extract) and incubated for 3,6,9 hours. Cells were collected and processed for RNA extraction. I examined the expression of tumour suppressor gene (MGMT,DAP-K,MLH1) in treated cells using RT-PCR. However, I did not recognize the significant difference.

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：歯学 リプログラミング 卵母細胞

1. 研究開始当初の背景

癌に伴うエピジェネティックな変化として最もよく研究されているのが DNA のメチル化の異常である。一般に癌化の過程でゲノム全体の DNA のメチル化は減少し、特定領域(一部のプロモーター領域 CpG アイランド)においての過剰 DNA メチル化が起こるとされている。乳癌、卵巣癌、子宮頸癌、脳腫瘍などにおいてゲノムの低メチル化が起こることが報告されており (Narayan, A., et al. *Int. J. Cancer*, 77, 833-839, 1998 Qu, G. et al. *Mutat. Res.* 423.91-101, 1999 Kim, Y. et al. *Cancer*, 74, 893-899, 1994 Gama-Sosa, M. A. et al. *Nucleic Acids Res*, 11, 6883-6894, 1993)、肺癌、肝癌、頭頸部扁平上皮癌などでは p16 遺伝子領域の過剰メチル化が報告されてきた (Belinsky, S. A. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 11891-11896, 1998 Kaneto, H. et al. *Gut*. 48. 372-377, 2001 Sanchez-Cespedes, M. et al. *Cancer Res.*, 60, 892-895, 2000)。これらの変化は前癌病変の段階ですでにみられていることであり、過形成、上皮内癌と病態が進行するとともに、メチル化が増強されることが報告されている。この異常メチル化された CpG アイランドがプロモーター領域にある場合、下流の遺伝子はサイレンシングされる。癌抑制遺伝子の不活化機構はこれまでは突然変異や染色体欠失が重要な原因として考えられてきたが、このサイレンシングによる癌抑制遺伝子の不活化の方が高頻度に認められることが判ってきた (Jones, P. A. et al. *Nat. Rev. Genet.*, 3, 415-428, 2002)。最近では、癌関連遺伝子の同定に異常メチル化をマーカーとすることが定着しつつあり、異常メチル化している遺伝子の解析が、がん研究の大きな分野として確立しつつある。

両生類は一度に多くの卵を産み、そのサイズも比較的大きいため、古くから多くの研究に使用されてきた。また、両生類の卵母細胞

は哺乳類と比較して大きく、操作しやすいため外来遺伝子を導入し、その発現系を検討する研究で頻りに利用されている。卵母細胞抽出液は以前より DNA の複製、転写、転写物のプロセッシング、翻訳、及び翻訳されたタンパク質の修飾等の研究等に利用されており、その抽出方法が確立されている。さらに、両生類の卵母細胞抽出液は哺乳類の体細胞をリプログラミングする能力を有すること (Alberio R. et al. *Exp Cell Res.*, 307, 131-141, 2005) や DNA メチル化とヒストン修飾異常を修復する能力を有していることが報告されており (Bian Y. et al., *Epigenetics*, 4, 194-202, 2009)、Allegracci らが行った、乳癌細胞株を両生類 (メキシコイモリおよびアフリカツメガエル) 卵母細胞抽出液により処理を行った報告 (*Molecular Cancer*, 10:7 2011) では、癌抑制遺伝子である、RARβ, CST6, CCND2, GAS2, CDKN2A の発現上昇、癌抑制遺伝子のプロモーター領域の脱メチル化、*in vivo* における造腫瘍能の低下などが示されており、肺癌細胞が両生類卵母細胞抽出液処理によりエピジェネティックにリプログラミングされたと結論付けられている。同様の結果は、口腔扁平上皮癌細胞株においても得られる可能性が高いと考える。

2. 研究の目的

本研究では、口腔扁平上皮癌細胞株に対して、アフリカツメガエルの卵母細胞もしくは未受精卵より抽出した抽出液を処理することにより、癌細胞にリプログラミングが生じるか否かの検討を行う。具体的には、抽出液処理による癌抑制遺伝子の発現上昇の有無、プロモーター領域の DNA 脱メチル化によるサイレンシングされた癌抑制遺伝子の re-activation の有無、処理された癌細胞の *in vitro* における形態変化や増殖能の検討、また、*in vivo* における造腫瘍能の変化の有

無に関して検討を行う。DNA メチル化は、DNA の 1 次構造の変化を伴わない、エピジェネティックな異常であり、プロモーターの高メチル化により不活性化された遺伝子は、DNA メチル化阻害剤や、ヒストンの脱アセチル化酵素阻害剤によりその発現を回復させることができる。これまで、骨髄異形成症候群、慢性骨髄性白血病症例に対してメチル化阻害剤が化学療法と併用することにより奏功することが報告されている (Issa, J.P. et al. *J Clin. Oncol.*, 23,3948-3956, 2005)。しかしながらどの遺伝子が発現誘導され、それらの生物学的効果が表れているかについては不明な点が多い。それは口腔扁平上皮癌においても同様である。本研究では、口腔癌細胞株において脱メチル化され、造腫瘍能の低下が生じる癌抑制遺伝子を同定することができる。これは、特定遺伝子を目標とした口腔癌治療の確立に寄与するものと考え。さらに発癌のメカニズムの解明にも重要な効果をもたらすものと考え。

3. 研究の方法

1) アフリカツメガエルの卵母細胞および未受精卵からの抽出液の抽出

卵母細胞および未受精卵からの抽出液の抽出は Hutchison らの方法 (C.J.Hutchison, et al., *Development*, 103, 553-566, 1988) に準じて行う。メスのアフリカツメガエルにヒト絨毛性性腺刺激ホルモンを注射し、人工的に排卵を誘発させ未受精卵を回収する。脱ゼリー後、洗浄を行い、 $10,000 \times g$ で 10 分遠心を行い、細胞質の層を回収後、 $50 \mu g/ml$ cytochalasin B を加え、 $10,000 \times g$ で 30 分遠心を行う。その透明な上澄みを回収し、未受精卵からの抽出液とする。卵母細胞の抽出は、アフリカツメガエルを 30 分以上氷中において冬眠状態にしたのち、下腹部に切開を加え、卵巣を摘出する。取り出した卵巣を顕微鏡下でほぐし、卵母細胞を摘出後、ステージ 4~6 の卵母細胞を選別し、それらから未

受精卵と同様の方法を用いて抽出液の抽出を行う。

2) 口腔扁平上皮癌細胞株の癌抑制遺伝子の発現の検討

当研究室で樹立した口腔扁平上皮癌株 KO, UE, KN (無血清培養下で培養した細胞株) における癌抑制遺伝子の発現を RT-PCR を用いて検討する。検討する癌抑制遺伝子は、口腔癌において、プロモーターの高メチル化が報告されている (F.I.Daniel, et al., *Cancer*, 117(4), 677-87, 2011) *p15*, *p16*, *MGMT*, *DAP-K*, *RAR* に対して行う。これらの癌抑制遺伝子の著しい発現低下もしくは発現消失を認める細胞株を続く研究に用いることとする。

3) 卵母細胞および未受精卵抽出液処理による口腔扁平上皮癌細胞株の癌抑制遺伝子発現の検討

Alberio らの報告 (*Exp Cell Res*, 307, 131-141, 2005) に従い、細胞の透過性を高進させた口腔扁平上皮癌細胞株 (2×10^6 個) に対し、先に用意した、アフリカツメガエル卵母細胞および未受精卵抽出液を細胞 5,000 個対して $1 \mu l$ の量で無血清培地中に添加する。この際、Allegracci らの報告 (*Molecular Cancer*, 10:7 2011) に従い、energy regenerating system ($150 \mu g/ml$ creatine phosphokinase, $60mM$ phosphocreatine, $1mM$ ATP) とともに添加し、21 日無血清培養を行う。培養 3 時間、6 時間、9 時間後に抽出液未処理および抽出液処理癌細胞よりそれぞれ RNA を抽出し、RT-PCR で上記の癌抑制遺伝子の発現上昇の有無の検討および、適切な培養時間の検討を行う。さらに、発現上昇を認めた癌抑制遺伝子に関しては、定量 PCR にて定量的に発現上昇の比較検討を行う。以降の検討には、最も癌抑制遺伝子の発現上昇を認めた口腔扁平上皮癌細胞株および培養時間で処理した癌細胞を使用する。

4) 抽出液処理による癌抑制遺伝子の CpG 領域の脱メチル化の検討

プロモーター領域 CpG アイランドの脱メチル化解析法は Bisulfite 処理を利用した解析を用いる。Bisulfite 処理により、DNA のメチル化されていないシトシンはウラシルに変換され、メチル化されたシトシンはそのまま残る。この原理を利用した MSP 法を用いて解析を行う。まず、プロモーター領域 CpG アイランドに非メチル化 DNA とメチル化 DNA 各々に特異的なプライマーの設計を行う。その後、抽出液処理、未処理癌細胞より回収した DNA (先の実験にて検討した培養時間で処理した癌細胞) を Bisulfite 処理を行ったのち、設計した非メチル化 DNA 用プライマーもしくはメチル化 DNA 用プライマーを用いて PCR を行い、プロモーター領域の脱メチル化の有無を検討する。その際、PCR による検討で比較が困難であれば、さらに定量 PCR を行い、抽出液処理、未処理による脱メチル化を定量的に検討する。さらに、長期間にわたり、プロモーター領域 CpG アイランドの脱メチル化が維持されるか否かの検討のため、培養期間7日の抽出液処理、未処理癌細胞より DNA を回収し、MSP 法により脱メチル化の解析を行う。

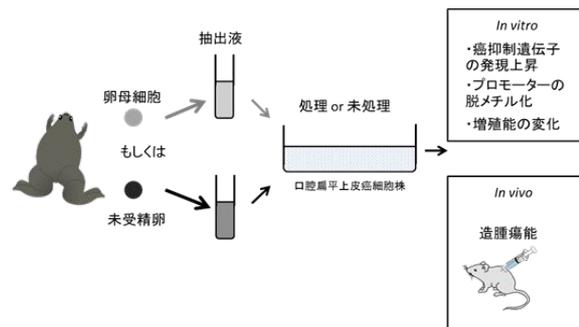
5) *in vitro*での細胞増殖能の検討

抽出液処理、未処理の口腔扁平上皮癌細胞株を無血清培養を行い、その増殖能を検討する。また、無血清浮遊培養系を用いた検討を行う。無血清浮遊培養系は、癌幹細胞を特異的に増殖させる培養方法で、癌幹細胞を濃縮できることや、*in vivo*での腫瘍形成能とよく相関することが知られている。そこで、無血清浮遊培養系を用いて、両者の口腔扁平上皮細胞の浮遊細胞塊 (sphere) 形成能 (数、大きさ) を比較検討し、腫瘍原生成能を検討する。

6) *in vivo*における腫瘍造生能の検討

無血清培養にて培養した、抽出液処理、未処理口腔扁平上皮癌細胞株を 1.5×10^6 個 / $200 \mu\text{l}$ で回収し、ヌードマウスの背部皮下

に注入し、その造腫瘍能を検討する。さらに、形成された腫瘍を摘出し、ホルマリン固定、切片を作成後、HE 染色を行い、それぞれの組織の評価を行う。また、作成した切片を癌抑制遺伝子に特異的な抗体を用いて、免疫組織染色を行い、タンパクレベルでの癌抑制遺伝子の発現の程度をそれぞれの癌抑制遺伝子に対して比較検討を行う。



4. 研究成果

アフリカツメガエルの卵母細胞および未受精卵からの抽出液を Hutchison らの方法に準じて抽出を行い、以下の実験に用いるよう準備した。次に、当研究室で樹立した口腔扁平上皮癌株 NA、KN、ZA、KO、Ca9-22 (無血清培養下で培養した細胞株) における癌抑制遺伝子 (プロモーターの高メチル化が報告されている。E-cadherin, p16, MGMT, DAP-K, MLH1) の発現を RT-PCR を用いて検討を行った。その結果、すべての遺伝子の発現低下もしくは、発現消失を認める細胞株は認めなかったが、細胞株 ZA において、MGMT、DAP-K、MLH1 においては、その発現が消失していたため、今後の研究に使用することとした。Iberio らの報告 (Exp Cell Res, 307, 131-141, 2005) に従い、細胞の透過性を高進させた口腔扁平上皮癌細胞株 ZA (2×10^6 個) に対し、先に用意した、アフリカツメガエル卵母細胞および未受精卵抽出液を細胞 5,000 個対して $1 \mu\text{l}$ の量で無血清培地中に添加し、21 日 で無血清培養を行う。培養 3 時間、6 時間、9 時間後に抽出液未処理および抽出液処理癌細胞よりそれぞれ RNA を抽出し、RT-PCR で上記の癌抑制遺

伝子の発現上昇の有無の検討および、適切な培養時間の検討を行ったが、有意差は認めなかった。

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)

虎谷茂昭、谷亮治、福井康人、神田拓、高田隆、岡本哲治 下顎に生じた扁平資源性腫瘍の1例 日本口腔科学会雑誌、査読有、62巻、2013年、P281-285

〔学会発表〕(計1件)

Nguyen T.T.、福井康人、岡本哲治 Immunohistochemical expression of FGFBP-1/HBp17, p53, Ki67 and CD34 in ameloblastomas 第67回NPO法人日本口腔科学会学術集会(宇都宮)、2013.5.22-24

6．研究組織

(1)研究代表者

福井 康人 (YASUTO FUKUI)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・助教
研究者番号：90363085