

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11291

研究課題名(和文) 口腔扁平上皮癌におけるMYE0V遺伝子の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of MYE0V gene in oral squamous cell carcinoma

研究代表者

内田 堅一郎 (UCHIDA, Kenichiro)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20379986

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：われわれは、MYE0V遺伝子が口腔扁平上皮癌で高発現していることを発見した。MYE0V遺伝子の増幅と高発現は他の癌種でも報告されているが、その役割は不明である。本研究ではMYE0V遺伝子の発現抑制の影響や相互影響する遺伝子を同定し、MYE0V遺伝子の口腔癌の発生進展過程における役割を明らかにするために行った。MYE0V遺伝子のknock down (KD)を行い、RNAシーケンシングとリアルタイムPCRで遺伝子発現の変化を検討したところ、口腔癌細胞ではER01LB遺伝子やKRT6A遺伝子発現が低下していた。また、MYE0VのKDは細胞増殖能とコロニー形成能の低下を認めた。

研究成果の概要(英文)：We identified overexpression of MYE0V gene in oral squamous cell carcinoma. Amplification and overexpression of the MYE0V gene has also been reported in other cancers. However, its role is still unknown. The aim of this study is to screen the alteration of gene expression under the RNA interference of MYE0V gene and to clarify the role of MYE0V gene in the development and progression of oral squamous cell carcinoma. We performed knock down (KD) of the MYE0V gene and investigated changes in gene expression by RNA sequencing and real time PCR. As a result, expression of ER01LB gene and KRT6A gene decreased in the oral cancer cell line. In addition, KD of MYE0V showed suppression of cell proliferation and colony formation.

研究分野：外科系歯科学

キーワード：癌 遺伝子

### 1. 研究開始当初の背景

口腔扁平上皮癌では以前より 11q13 領域に増幅が生じることが知られており、それが転移や治療後の生命予後マーカーとなる可能性が報告されている。同領域に位置する CCND1 や FGF4 といった遺伝子が関連遺伝子として検討されてきた。また、最近の報告では同領域に位置する ANO1 が高発現しており、その発現抑制が頭頸部癌の制御に役立つ可能性が示唆されている。

われわれは、口腔癌の遺伝学的解析を研究テーマの一つとして行っており、科学研究費補助金の助成のもと、口腔扁平上皮癌症例 50 例の DNA コピー数異常の網羅的スクリーニングを行い、11q13.3 領域に高頻度に増幅が生じることを報告した。さらに、同領域に位置する 16 遺伝子の発現を網羅的に定量し、口腔扁平上皮癌由来細胞株では、同領域に位置する MYEOV 遺伝子が正常ケラチノサイトに比べて 3~120 倍近く高発現しているという結果を得た (図 1)。また、臨床材料から得た DNA を用いた検討では、MYEOV 遺伝子のコピー数が増加した症例では、転移や TNM Stage が高くなる傾向にあった。既存の報告では、MYEOV 遺伝子の増幅は、口腔扁平上皮癌で報告されている。また、多発骨髄腫、脳神経芽腫、大腸癌で同遺伝子の knock down が細胞増殖を抑制することが報告されているが、その機能解析を行った報告は、他の悪性腫瘍も含めて渉猟し得た限り認められない。

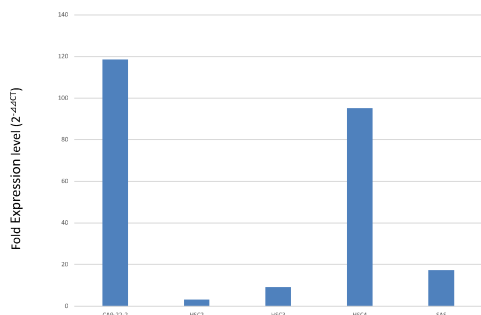


図1 口腔癌扁平上皮癌細胞におけるMYEOV遺伝子の発現レベルヒト正常ケラチノサイト由来細胞株HaCaTに比べて口腔扁平上皮癌由来細胞ではMYEOV遺伝子が高発現している。

### 2. 研究の目的

本研究では、MYEOV 遺伝子の Knock down を行い、コントロールと Knock down を行った細胞における遺伝子の発現パターンを比較することにより、MYEOV 遺伝子と関連する遺伝子を同定することを目的として行った。また、MYEOV 遺伝子の Knock down が細胞増殖や抗癌剤感受性へ及ぼす影響を検討し、MYEOV 遺伝子の口腔扁平上皮癌の発生や進展過程における役割を明らかにすることも目的として行った。

### 3. 研究の方法

(1) RNA の抽出は、全ての検討において Trizol<sup>®</sup> を用いて溶解させ、Direct-zol RNA MiniPrep kit<sup>®</sup>を用いて行った。また、cDNA の合成は i-Script Select cDNA Synthesis kit<sup>®</sup>を用いて

行った。本研究では、RNA シークエンシングを行う際に、全長の RNA を抽出する必要があったが、Nano Drop<sup>®</sup>を用いた OD 比では 260/280 1.9 以上、260/230 1.9 以上が確保できており、Qubit 3.0 を用いた RNA 量の定量でも RNA の回収量は良好であった。さらに、Oligo dT を用いた逆転写でも良好な PCR 増幅物が得られ、Agilent2100 バイオアナライザー<sup>®</sup>を用いた検討でも、RNA の分解はなかった (図 2)。

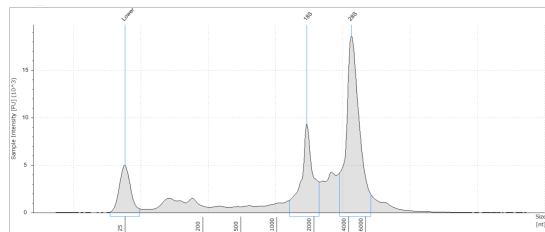


図2 Agilent2100 バイオアナライザーを用いたRNAの定量と質の評価  
18S、28Sに2峰性のピークを認め、Lowerマーカーとの間にピークがない。  
RNAの分解を伴うことなくRNAが抽出できている。

(2) SYBR GREEN 法による Real-Time PCR 法を用いて RNA の発現量を検討した。内部標準として GUSB を用いた。MYEOV, CBX4, FAM129B, PTMS, ERO1LB, IER2, SART1, TGFBI, JUNB, COL7A1, EGR1, KRT6A, KRT81 の発現を検討した。いずれのプライマーセットも Integrated Genome Technology 社でプレデザインしたものを購入した。Stratagene qPCR Standard<sup>®</sup>を用いた連続希釈系による定量性の検証において、PCR 効率がほぼ 100%かつ検量線の相関係数 R<sup>2</sup> が 0.99 以上であることと、解離曲線を作成しシングルピークであることを確認して実験に供した。Random Primer のみで逆転写して得た cDNA を実験に用いた。

(3) RNAi による検討は、ON-TARGET plus SMART pool<sup>®</sup>のライブラリーより MYEOV とコントロールの siRNA を購入し実験に供した。INTERFERin<sup>®</sup>を用い細胞内に導入した。1nM の濃度で、口腔扁平上皮癌由来細胞 HSC4 および CA9-22 において導入後 72 時間の時点で、80% 以上の knock down を達成できたため、以降の実験は 1nM で siRNA を導入した (図 3)。

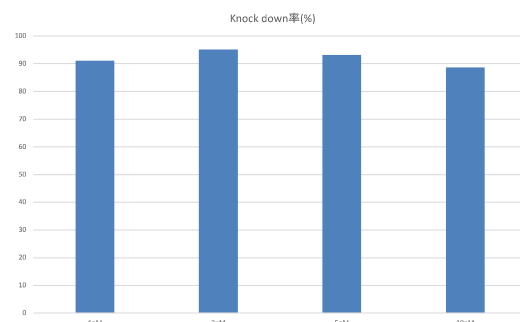


図3 HSC4細胞におけるSiRNAの導入濃度とKnock down率

(4) 口腔扁平上皮癌由来細胞株 HSC4 および CA9-22 において、MYEOV 遺伝子の knock down が引き起こす影響を、RNA シークエンシングを用いて行った。1nM で SiRNA を導入後、72 時間で RNA を抽出した。Real-Time PCR 法に

て80%以上の knock down が得られている事と、先述の方法で RNA が分解していない事を確認し、抽出した RNA から Oligo dT 精製を用いて mRNA の精製を行った。シーケンシングおよびデータ解析はユーロフィンジェノミクス株式会社 に依頼した。HiSeq2500<sup>®</sup>を用いて、リード長 125bp でペアエンド解析を行った。解析データはノーマライズ後、各遺伝子におけるコントロール siRNA を導入したサンプルと MYEOV 遺伝子の siRNA を導入したサンプルリード回数を比較し、各遺伝子の RNA の相対的な発現レベルを算出した。

(5)細胞数の測定は、CyQuant NF<sup>®</sup>を用いて測定した、625~10000 個の連続二倍希釈した培養細胞を 96 well plate に播種し、各 well における蛍光強度を計測し検量線を作成し、相関係数 R<sup>2</sup> が 0.99 以上であることを確認して実験を行った。また、Colony formation assay では MYEOV とコントロール SiRNA をそれぞれ培養細胞に導入し、導入後 24 時間後に 6well plate に各 well 1000 個ずつ播種した。14 日後にクリスタルバイオレット染色を行い、細胞が 50 個以上認められる細胞群をコロニーとしてコロニー数を計測した。

#### 4. 研究成果

(1)CA9-22 細胞に MYEOV の siRNA を導入、CA9-22 細胞にコントロール SiRNA を導入、CA9-22 細胞に MYEOV の siRNA を導入、CA9-22 細胞にコントロール siRNA を導入したサンプルをそれぞれ 72 時間後に回収し、RNA シーケンシングのサンプルとした。平均 0.26 億個のフラグメントがシーケンシングされ、平均 3257Mbp の塩基がリードされた。読み込まれた塩基の中で信頼性が 99.9%以上である塩基の割合を示す%Q30 は、平均 96.4%と比較的良好なクオリティーであった。

CA9-22 細胞における MYEOV 遺伝子の Knock down に伴う遺伝子発現変化を図 4 および図 5 に示す。サイトケラチン (KRT6A, KRT81, KRT5)、転写関連因子 (CXB4, JUNB, IER2, CAVIN1, CC2D1A)、Zinc Finger 蛋白 (EGR1, ZNF768)、膠原線維 (COL7A1, COL4A2)、リボ核タンパク (FBL, HNRNPA0)、免疫関連蛋白 (FKBP8, TNFRSF12A) 等の発現が抑制されていた。特に KRT6A は発現レベルが 0.38 倍と強く抑制された。

GeneSymbol	Ratio	Gene Function
KRT6A	0.38	Keratin
COL7A1	0.44	Type VII collagen
CBX4	0.52	Transcription Factor
ERO1B	0.54	Cell Metabolism
SART1	0.54	Proliferation
FAM129B	0.55	Cell signaling
PTMS	0.57	Immune Function
EGR1	0.59	Zinc-finger Protein
JUNB	0.60	Transcription factor
KRT81	0.61	Keratin
IER2	0.61	Transcription factor

図4 CA9-22細胞にてMYEOV遺伝子のKnock downで発現低下を認めた遺伝子

また、リボ核タンパク (RN7SL1, RN7SL2)、リボソーム蛋白 (RPS15, RPS16, RPS19, RPS28, RPL18, RPL28)、メタロチオネイン (MTA1, MT2A) 等の発現が亢進していた。最も発現が亢進していた PCDH9 においてもコントロールの 1.65 倍と、比較的変動は小さかった。

GeneSymbol	Ratio	Gene Function
PCDH9	1.65	Cell adhesion
RN7SL2	1.62	Polypeptide of signal recognition particle
RN7SL1	1.58	Polypeptide of signal recognition particle
RABAC1	1.52	Golgi protein
RPS28	1.50	Ribosomal protein
RPS15	1.48	Ribosomal protein
RPS19	1.48	Ribosomal protein
SERINC2	1.45	Metabolism
MTA1	1.45	SUMOylation
RPS16	1.44	Ribosomal protein
UBA52	1.44	Ubiquitin
HMOX1	1.43	Enzyme in heme catebolism
AGO2	1.41	Component of RISC

図5 CA9-22細胞にてMYEOV遺伝子のKnock downで発現上昇を認めた遺伝子

HSC4 細胞における検討結果を図 6 および図 7 に示す。アクチンフィラメント関連 (ENAH, AJUBA)、コラーゲン (COL12A1, COL7A1)、核内蛋白 (AHANAK, AHANAK2)、シグナル伝達関連 (HSP90AB1, FAM83C) 等の発現が抑制されていたが、50%以上発現が抑制された遺伝子は認めなかった。

GeneSymbol	Ratio	Gene Function
ENAH	0.72	Regulator of actin filaments
COL12A1	0.72	Collagen
COL7A1	0.74	Collagen
AJUBA	0.74	Chromatin and actin fillament binding
EGFR	0.77	Rceptor

図6 HSC4細胞にてMYEOV遺伝子のKnock downで発現低下を認めた遺伝子

微生物に由来するエラスターゼに対して阻害作用を有する PI3 が最も発現が亢進していたが、コントロール比較して 1.62 倍であった。

GeneSymbol	Ratio	Gene Function
PI3	1.62	Elastase specific inhibitor
TXNIP	1.41	Inhibitor of thioredoxin
CXCL8	1.40	Chemokine
LAMP3	1.33	Lysosome associated protein
SEC24A	1.29	Protein tranport

図7 HSC4細胞にてMYEOV遺伝子Knock downで発現上昇を認めた遺伝子

(2)図 4 で示した遺伝子に関して、Real-time PCR 法を用いて、発現レベルを定量した。IER2, ERO1LB, KRT6A において発現の抑制が認められており、これらの遺伝子の発現に MYEOV の発現が関与していると考えられた(図 8)。IER2 に関しては、様々な癌腫において発現が亢進しており、大腸癌においては高発現例で転移の頻度が高くなり、生命予後不良となることが報告されている。ERO1LB は細胞の

小胞体における蛋白質のプロセッシングに関与し、膵臓癌で高発現し、生命予後のマーカーとなることが報告されている。KRT6Aは、正常な口腔内の扁平上皮にCK16やCK17とともに発現しており、扁平上皮の分化や角化と密接に関わる。肺腺癌や、乳癌ではKRT6Aの高発現例において生命予後不良となることが報告されている。

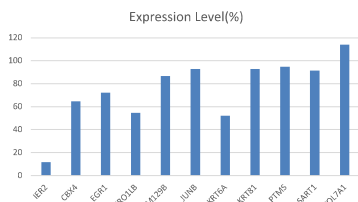


図8 Real-time PCR法を用いた、CA9-22細胞におけるMYEOV遺伝子Knock downの各遺伝子の発現変化に関する検討。

(3)HSC4 細胞における MYEOV 遺伝子の knock down が細胞増殖に及ぼす影響を検討した。Si-RNA 導入後、48 時間より有意に細胞増殖を抑制した (図 9)。

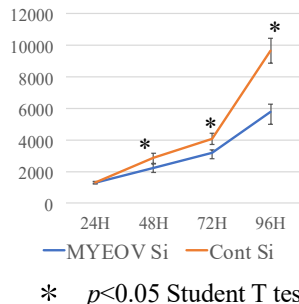


図9 CA9-22細胞におけるMYEOV遺伝子のknock downの細胞増殖に対する影響

また、細胞密度を希薄にした培養条件下ではCA9-22 細胞において MYEOV 遺伝子を knock down した細胞で、コロニー形成能が低下していた (図 10)。

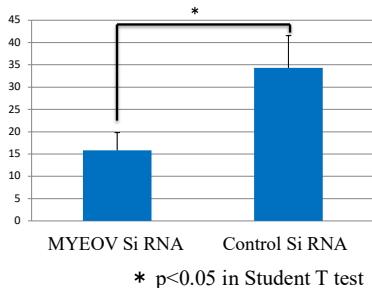
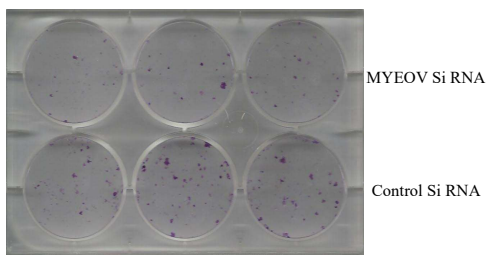


図10 CA9-22細胞におけるMYEOV遺伝子のknock downのコロニー形成能に対する影響

これは、扁平上皮の増殖、分化に関与するKRT6Aの発現や、細胞接着に影響するPCDH9、扁平上皮の基底部に認めるコラーゲンの一つであるCOL7A1等の発現変化が影響したと考えられる。

(4)CA9-22細胞にControl siRNAを導入し72時間培養した後、シスプラチンを添加した培養液内での生存を検討した。IC50値は、24時間で3.04ug/ml、48時間で1.07ug/ml、72時間で0.3ug/mlであった(図11)。

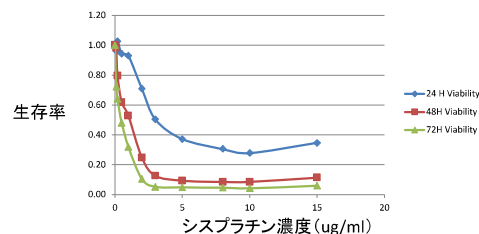


図11 シスプラチン存在下でのCA9-22細胞にControl siRNAを導入した細胞の生存曲線

次に、MYEOV 遺伝子の siRNA と Control siRNA を CA9-22 細胞に導入し、72 時間後にシスプラチンを添加した培養液を加え 48 時間培養し、生存率を比較した (図 12)。

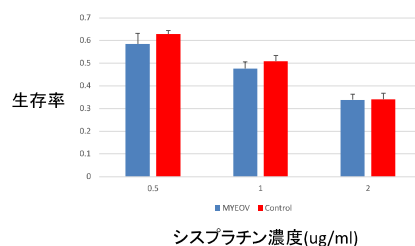


図12 シスプラチン存在下でのCA9-22細胞にControl siRNA、またはMYEOV遺伝子のsiRNAを導入した細胞の生存率

MYEOV 遺伝子の siRNA を導入した細胞では、IC50 値が 0.89ug/ml とやや低下したが、統計学的有意差は得られなかった。MYEOV 遺伝子の knock down は、口腔がん治療の key drug であるシスプラチンとの相乗効果は得られなかった。今後は、放射線治療、抗 EGFR 抗体、タキサン系抗癌剤、フッ化ピリミジン系抗がん剤との併用効果を検討する予定である。

## 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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

①内田堅一郎, 上山吉哉, 口腔扁平上皮癌における MYEOV 遺伝子の遺伝学的意義に関する検討, 第 35 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会, 2018 年 1 月 26 日, 新潟グランドホテル (新潟県新潟市)

②内田堅一郎, 竹縄隆徳, 上山吉哉, 口腔扁平

上皮癌における 11q13.3 領域増幅の分子細胞  
遺伝学的意義に関する検討, 第 62 回日本口腔  
外科学会総会・学術大会, 2017 年 10 月 20 日,  
国立京都国際会議場 (京都府京都市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

内田 堅一郎 (UCHIDA, Kenichiro)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 20379986

### (2) 研究分担者

竹縄 隆徳 (TAKENAWA, Takanori)

山口大学・医学部・特別医学研究員

研究者番号: 30711270