

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10121

研究課題名(和文) 口腔がんエピゲノム異常遺伝子の網羅的解析とエピゲノム薬による腫瘍抑制効果の検証

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of epigenomic aberrant genes in oral cancer and verification of tumor suppressive effect by epigenomic drugs.

研究代表者

永易 裕樹 (NAGAYASU, Hiroki)

北海道医療大学・歯学部・教授

研究者番号：90265075

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、DNA脱メチル化剤Zebularine(Zebu)とヒストン脱アセチル化酵素阻害剤Valproic acid(Vpa)の口腔腫瘍抑制効果を検証した。舌扁平上皮癌細胞株HSC4にZebuとVpaを添加したRNA網羅的解析で、発現上位にCNTN4を認めた。がん抑制遺伝子p16, p21, RASSF1, NPY, CNTN4では、mRNA発現上昇とDNAメチル化率低下、HDAC活性低下を認めた。HSC4移植マウスにZebuとVpaを投与した結果、がん抑制遺伝子のmRNA発現上昇及びDNAメチル化率低下を認めた。DNA脱メチル化作用とHDAC活性低下作用がmRNA発現上昇に影響した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、DNA脱メチル化剤Zebularine(Zebu)とヒストン脱アセチル化酵素阻害剤Valproic acid(Vpa)を組み合わせることで口腔腫瘍を抑制することが可能となり、その機序についてエピジェネティクスレベルで解明したものであることから、本研究結果の学術的意義は大きいものと考えられた。本研究結果は、口腔腫瘍に対する新たな治療法開発につながる基礎的データとなり得るものと考えられ、社会的に有益な意義を提供するものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the inhibitory effects of the DNA demethylating agent Zebularine (Zebu) and the histone deacetylase inhibitor Valproic acid (Vpa) on oral tumors. RNA sequencing of the tongue squamous cell carcinoma cell line HSC4 treated with Zebu and Vpa revealed CNTN4 among the top expressed genes. For the tumor suppressor genes p16, p21, RASSF1, NPY, and CNTN4, increased mRNA expression, decreased DNA methylation rates, and reduced HDAC activity were observed. In HSC4-transplanted mice treated with Zebu and Vpa, the tumor size inhibition, increased mRNA expression and decreased DNA methylation rates of tumor suppressor genes were observed. The effects of DNA demethylation and HDAC activity reduction may contribute to the increased mRNA expression of tumor suppressor genes.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔がん エピゲノム DNA脱メチル化剤

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

口腔扁平上皮癌の危険因子には、飲酒や喫煙、不良補綴物による慢性刺激や、炎症、ウイルス感染などがある。これらによって DNA 修復異常が生じることで発がんするが、様々な危険因子が存在することから完全な発がん予防は難しい。口腔扁平上皮癌の治療法として、原発巣への外科療法・頸部転移巣への頸部郭清術に加え、化学・放射線療法が行われているものの、口腔がん全体の原発巣再発率は 13~30%で、口腔がん全体の 5 年生存率は 60~70%である。本邦における口腔がんは、高齢化に伴い増加傾向にあることから、治癒率向上のための新規治療法の開発が望まれる。

一般的ながん治療では、がん細胞特有の蛋白質をブロックしてがん細胞を選択的に攻撃する分子標的薬が開発されてきた。一方で、後天的に遺伝子のオン・オフを決めるエピゲノム修飾を調べると、多くのがん細胞で正常細胞とは異なった DNA メチル化修飾やヒストンアセチル化修飾でのエピゲノム異常が明らかとなった。がん細胞に生じる遺伝子変異は非可逆的であるが、エピゲノム修飾は可逆的な為、修復可能である。これを利用し、遺伝子のエピゲノム修飾を操作してがんを治療するためのエピゲノム薬が開発され、本邦では、骨髄異形成症候群、皮膚 T 細胞性リンパ腫に対し、DNA メチル基転移酵素阻害剤 (DNA methyltransferase inhibitor, DNMTi) とヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (histone deacetylase inhibitor, HDACi) によるエピゲノム薬治療が臨床応用されているが、口腔がんへの応用には至っていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、口腔がんの DNA メチル化異常とヒストンアセチル化異常に対し DNMTi と HDACi の腫瘍抑制効果を検証し、エピゲノム異常遺伝子の同定を行うことを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞実験

##### 細胞培養

舌扁平上皮癌細胞株 HSC4 (ヒューマンサイエンス研究資源バンク) は、10%ウシ胎児血清 (Fetal bovine serum; FBS), 2%ペニシリン-ストレプトマイシン-アムホテリシン B 含有の Minimum Essential Medium Eagle, Alpha Modification 培地 (-MEM) を使用し、37℃、5%CO<sub>2</sub> 下で Outgrowth 法により培養した。

##### 細胞増殖能試験

DNMTi の Zebularine (Zeb) および HDACi の Valproic acid (Vpa) それぞれの HSC4 への至適濃度を調べるために、HSC4 を  $1 \times 10^5$  cells/mL 濃度で 100 mm culture dish に播種し、試薬添加条件を、Zebu (Tokyo Chemical Industry) を 1.0、10、100、200、400  $\mu$ M、Vpa (FUJIFILM Wako Pure Chemical) を 0.1、1.0、2.0、5.0、10 mM の各濃度で添加した。さらに Zebu・Vpa 共添加での影響を確認する為、Zebu 10  $\mu$ M・Vpa 2 mM、Zebu 100  $\mu$ M・Vpa 1 mM、Zebu 100  $\mu$ M・Vpa 2 mM、Zebu 100  $\mu$ M・Vpa 5 mM、Zebu 200  $\mu$ M・Vpa 2 mM の組み合わせで添加し 7 日間培養した。対照 (Control) には、各試薬添加群と同量の溶媒 (dimethyl sulfoxide, DMSO) を加えた。0.5% Trypan Blue 溶液にて死細胞を染色後、生細胞数を測定した結果、Zebu と Vpa の至適濃度はそれぞれ 100  $\mu$ M と 2 mM に決定し、その後の遺伝子発現変化とエピジェネティック変化について観察した。

##### RNA-sequencing

HSC4 を下記の各培養条件で 7 日間培養した、A; Control (DMSO 添加)、B; Zebu 単独添加、C; Vpa 単独添加、D; Zebu・Vpa 共添加。培養終了後、各群の細胞を TRIzol に溶解し、RNeasy Mini Kit を用いて total RNA を抽出した。それらのうち、A; Control と D; Zebu・Vpa 共添加について次世代シーケンサー (Next Generation Sequencer, NGS) による RNA 発現網羅的解析 (RNA-sequencing, RNA-seq) を行った (Rhelixa)。データ取得後、ウェブブラウザ上の iDEP.96 (<http://bioinformatics.sdstate.edu/idep96/>) を用いて遺伝子発現変化を確認した。

##### qRT-PCR 法による mRNA 発現解析

これまで報告のある、頭頸部がんにおいて高メチル化変化が遺伝子発現に影響を及ぼす遺伝子のうち、Contactin 4 (CNTN4)、cyclin dependent kinase inhibitor 2A (p16)、cyclin dependent kinase inhibitor 1A (p21)、Ras-association family member 1 (RASSF1)、Neuropeptide Y (NPY) について、定量的リアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (qRT-PCR) 法による mRNA 発現解析を行った。HSC4 の各群より抽出した RNA サンプルは、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix を用いて逆転写を行い、complementary DNA (cDNA) を合成した。cDNA、プライマー、KAPA SYBR FAST qPCR Mix を用いて LightCycler Nano により mRNA 発現解析を行った。リファレンス遺伝子として Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用い、Cq 法により各 mRNA の相対的発現レベルを比較した。

## DNA メチル化解析

ZebuによるDNAメチル化への影響を確認するために、HSC4での先述の各培養条件のうち、A; Control (DMSO 添加) B; Zebu 単独添加、D; Zebu・Vpa 共添加、での培養を行い、DNeasy Blood & Tissue Kit を使用して各群のサンプルから DNA 抽出を行った。抽出した DNA は、EpiTect Bisulfite Kits による Bisulfite 処理を行った。定量的メチル化特異的 PCR (quantitative methylation-specific PCR, qMSP) 法のために、mRNA 発現解析で変化のみられた遺伝子の CpG islands を UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/index.html>)にて検索し、Meth Primer (<http://www.urogene.org/methprimer/>)を用いてプライマー設計を行った。Bisulfite 処理された DNA、プライマー、KAPA SYBR Fast qPCR Kit を用いて、qMSP 法による DNA メチル化解析を行った。DNA メチル化率の算出には、以下の計算式を用いた(Lu L et al., Cancer Res, 2007)。

$$\text{Methylated DNA (\%)} = \frac{M}{M+U} \times 100(\%) = \frac{1}{1+\frac{U}{M}} \times 100(\%) = \frac{1}{1+2^{(-\Delta Cq)}} \times 100(\%)$$

## In situ HDAC activity assay

Vpaによるヒストン脱アセチル化酵素阻害への影響を確認するために、先述の各培養条件のうち、A; Control (DMSO 添加) C; Vpa 単独添加、D; Zebu・Vpa 共添加、での培養を行なった。各群の細胞を 0.25 % Trypsin-EDTA を用いて剥離し遠心後、96well plate へ播種し -MEM 培地で 24 時間培養後に、In Situ HDAC Activity Fluorometric Assay Kit による HDAC 活性を測定した。各群の細胞を 96well plate で 24 時間培養し、各 well に HDAC 基質を加えた後、3 時間後に Developer を加え、蛍光マイクロプレートリーダー (Infinite F200, TECAN) による励起波長 380 nm、蛍光波長 450 nm の条件下で蛍光測定を行った。

## (2) 動物実験

### 動物飼育

動物実験は、北海道医療大学動物実験委員会の承認を得たうえで行った (承認番号; 令和 4 年 018 号)。実験動物には、6-8 週齢の BALB/SIc-nu 雄性ヌードマウスを用いた。腫瘍は、マウス背部に HSC4 を  $1.0 \times 10^6$  個皮下注射し定着させた。腫瘍サイズ及び体重測定は、1 週間に 2 回行った (長径  $\times$  短径<sup>2</sup> / 2)。投与薬剤は、Zebu を double distilled water (DDW) を用いて 1000 mg/kg 濃度に、Vpa は DDW を用いて 400 mg/kg に調整した。腫瘍形成の評価は Hattori らの方法を元に、全マウスの腫瘍サイズの平均が 80mm<sup>3</sup> 以上になった日を 1 日目として評価を行った (Hattori et al., Clin Epigenetics, 2019)。その後、実験群には調整した Zebu と Vpa をマウスの腫瘍近傍に 21 日間連続投与した (Zebu・Vpa 共投与群)。対照群 (Control) には、実験群と同様の日程で DDW を投与した。最終投与後の翌日にマウスを屠殺後、腫瘍を摘出した。

### 動物実験での mRNA 発現解析および DNA メチル化解析

マウスから摘出した腫瘍を用いて、細胞実験と同様の方法で total RNA 及び DNA を抽出し、mRNA 発現解析および DNA メチル化解析を行なった。

## 4. 研究成果

### (1) 細胞実験

#### RNA-sequencing

RNA-sequencing の結果、PCoA Plot 解析では、Control 群と Zebu・Vpa 共培養群の各グループが分離されたクラスタリングを示した。発現変動遺伝子を調べる Differentially Expressed Genes (DEGs) 解析では、Control 群と比べ Zebu・Vpa 共培養群において 2 倍以上の遺伝子発現上昇を示した変動上位遺伝子に CNTN4 を認めた (図 1)。

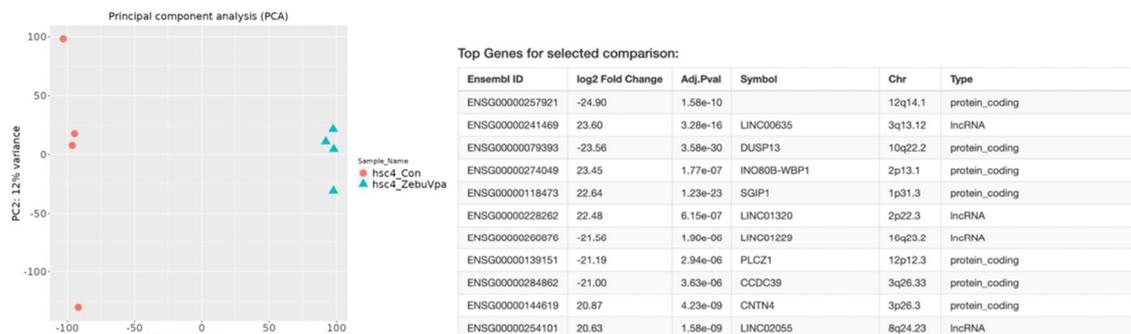


図1. RNA-sequencing

RNA-sequencingの結果、PCoA Plot解析では、Control群とZebu・Vpa共培養群の各グループが分離されたクラスタリングを示した (左図)。発現変動遺伝子を調べるDifferentially Expressed Genes (DEGs) 解析では、Control群と比べZebu・Vpa共培養群において2倍以上の遺伝子発現上昇を示した変動上位遺伝子にCNTN4を認めた (右図)。

### qRT-PCR 法による mRNA 発現解析

細胞培養での qRT-PCR 法による mRNA 発現解析の結果、Control 群と比べ、CNTN4 では Zebu・Vpa 共添加群で、p16 では Zebu 単独添加群および Zebu・Vpa 共添加群で、p21 では Vpa 単独添加群および Zebu・Vpa 共添加群で、RASSF1 では Zebu・Vpa 共添加群で、NPY では Vpa 共添加群において有意な発現上昇を認めた(図 2)。

### DNA メチル化解析

細胞培養での DNA メチル化解析の結果、Control 群と比べ、CNTN4 では Zebu・Vpa 共添加群で、p16 では Zebu 単独添加群および Zebu・Vpa 共添加群で、p21 では Zebu 単独添加群および Zebu・Vpa 共添加群で、RASSF1 では Zebu 単独添加群および Zebu・Vpa 共添加群で、NPY では Zebu・Vpa 共添加群において有意なメチル化レベルの低下を認めた(図 3)。

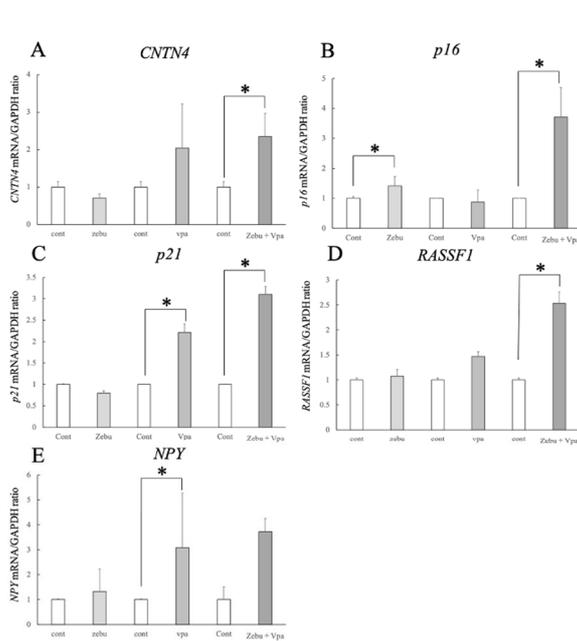


図2. 細胞培養でのqRT-PCR法によるmRNA発現解析  
細胞培養でのqRT-PCR法によるmRNA発現解析の結果、Control群と比べ、CNTN4ではZebu・Vpa共添加群で、p16ではZebu単独添加群およびZebu・Vpa共添加群で、p21ではVpa単独添加群およびZebu・Vpa共添加群で、RASSF1ではZebu・Vpa共添加群で、NPYではVpa共添加群において有意な発現上昇を認めた(\* $p < 0.05$ ; Mann-Whitney U検定,  $n=4$ ). A; CNTN4, B; p16, C; p21, D; RASSF1, E; NPY)。

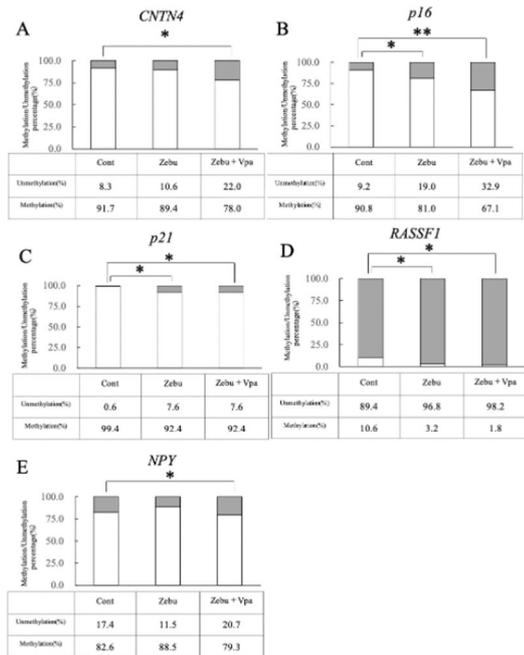


図3. 細胞培養でのDNAメチル化解析  
細胞培養でのDNAメチル化解析の結果、Control群と比べ、CNTN4ではZebu・Vpa共添加群で、p16ではZebu単独添加群およびZebu・Vpa共添加群で、p21ではZebu単独添加群およびZebu・Vpa共添加群で、RASSF1ではZebu単独添加群およびZebu・Vpa共添加群で、NPYではZebu・Vpa共添加群においてメチル化率の有意な低下を認めた(\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ; chi-square検定,  $n=3$ ). A; CNTN4, B; p16, C; p21, D; RASSF1, E; NPY)。

### In situ HDAC activity assay

In situ HDAC activity assay の結果、Control 群と比べて Vpa 単独添加群、Zebu・Vpa 共添加群において HDAC 活性の有意な減少を認めた。さらに、Vpa 単独投与群と比べても、Zebu・Vpa 共添加群において HDAC 活性の有意な減少を認めた(図 4)。

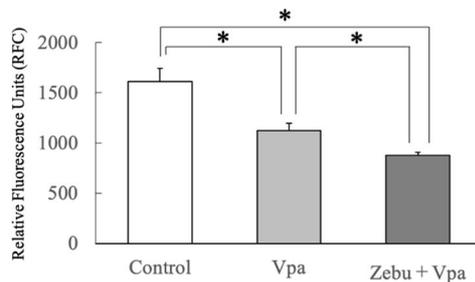


図4. In situ HDAC activity assay

In situ HDAC activity assay の結果、Control群と比べてVpa単独添加群、Zebu・Vpa共添加群においてHDAC活性の有意な減少を認めた。さらに、Vpa単独投与群と比べても、Zebu・Vpa共添加群においてHDAC活性の有意な減少を認めた(\* $p < 0.05$ ; Turkey's検定,  $n=4$ )。

(2) 動物実験

mRNA 発現解析

動物実験での mRNA 発現解析の結果、CNTN4、p16、p21、RASSF1、NPY において Control 群と比べ Zebu・Vpa 共投与群において有意な mRNA 発現上昇を認めた(図 5)。

DNA メチル化解析

動物実験での DNA メチル化解析の結果、Control 群と比べ、CNTN4、p16、p21、RASSF1、NPY において、Control 群と比べ Zebu・Vpa 共投与群でのメチル化率の有意な減少を認めた(図 6)。

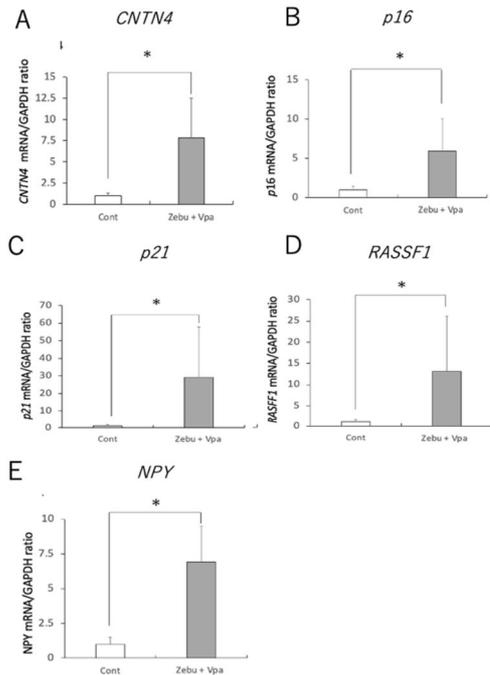


図5. 動物実験でのmRNA発現解析  
動物実験でのmRNA発現解析の結果、CNTN4、p16、p21、RASSF1、NPYにおいてControl群と比べZebu・Vpa共投与群において有意なmRNA発現上昇を認めた(\* $p < 0.05$ ; Mann-Whitney U検定,  $n=4$ ). A; CNTN4, B; p16, C; p21, D; RASSF1, E; NPY)。

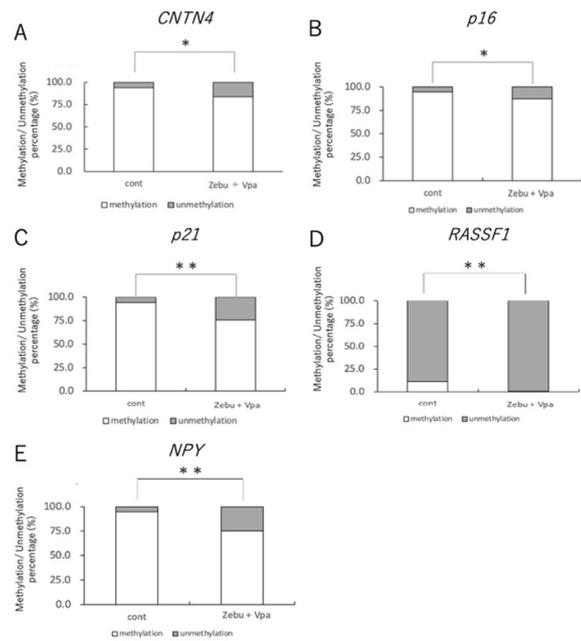


図6. 動物実験でのDNAメチル化解析  
動物実験でのDNAメチル化解析の結果、Control群と比べ、CNTN4、p16、p21、RASSF1、NPYにおいて、Control群と比べZebu・Vpa共投与群でのメチル化率の有意な減少を認めた(\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ; chi-square検定,  $n=3$ ). A; CNTN4, B; p16, C; p21, D; RASSF1, E; NPY)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Shuhei Takahahi
2. 発表標題 Tumor inhibitory effect of epigenetic agents on oral squamous cell carcinoma.
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋 周平
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌におけるエピゲノム薬の腫瘍抑制効果の検討.
3. 学会等名 ジャパンオーラルヘルス学会第24回学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Koki Yoshida, Shuhei Takahashi, Fumiya Harada, Dedy Ariwansa, Ariuntsetseg Khurelchuluun, Durga Paudel, Daichi Hiraki, Tetsuro Morikawa, Osamu Uehara, Jun Sato, Yoshihiro Abiko, Hiroki Nagayasu
2. 発表標題 Demethylation effect of 5-Azacytidine on oral squamous cell carcinoma
3. 学会等名 第34回日本口腔診断学会、31回日本口腔内科学会合同開催学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋 周平、吉田 光希、原田 文也、Ariwansa Dedy、Khurelchuluun Ariuntsetseg、Paudel Durga、平木 大地、森川 哲郎、植原 治、佐藤 惇、永易 裕樹、安彦 善裕
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌におけるエピゲノム薬の腫瘍抑制効果の検討
3. 学会等名 第53回日本臨床分子形態学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	植原 治 (UEHARA Osamu) (00709248)	北海道医療大学・歯学部・講師  (30110)	
研究分担者	吉田 光希 (YOSHIDA Koki) (30453260)	北海道医療大学・歯学部・講師  (30110)	
研究分担者	原田 文也 (HARADA Fumiya) (30824205)	北海道医療大学・歯学部・講師  (30110)	
研究分担者	安彦 善裕 (ABIKO Yoshihiro) (90260819)	北海道医療大学・歯学部・教授  (30110)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------