

論 文 要 旨

口腔扁平上皮癌におけるエピジェネティック薬
(Zebularine および Valproic acid) の
腫瘍抑制効果の検討

令和 4 年度

北海道医療大学大学院歯学研究科

高橋 周平

【緒言】

口腔がんの罹患率は全がんの中で 6 番目に多く (Rivera, 2015), 口腔がんの組織型としては約 90%を口腔扁平上皮癌 (Oral squamous cell carcinoma, OSCC) が占めている (Khurshid et al., 2018). これまでのがん治療法としては, 腫瘍を直接取り除く外科療法をはじめ, 非外科的治療法として放射線療法, 化学療法などが行われているものの成功率が低く, 患者への影響が大きいことが問題とされている. そのため, がんの治癒率を向上の為, 新規治療法の開発が望まれる.

そこで本研究では, エピジェネティクス薬である DNA メチル基転移酵素阻害剤 (DNA methyltransferase inhibitors: DNMTi) の Zebularine (Zebu) とヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (histone deacetylase inhibitors: HDACi) の Valproic acid (Vpa) との併用による OSCC に対する腫瘍抑制効果を検証するために, ヒト口腔扁平上皮癌由来細胞株を用いた *in vitro* および *in vivo* による実験を行った.

【材料および方法】

1. Zebu および Vpa 添加による SAS および HSC4 への細胞毒性試験

Zebu および Vpa の SAS および HSC4 への至適濃度を調べるために, Zebu を 1.0, 10, 100, 200, 400 μ M, Vpa を 0.1, 1.0, 2.0, 5.0, 10 mM, Zebu・Vpa 共添加を Zebu 10 μ M・Vpa 2 mM, Zebu 100 μ M・Vpa 1 mM, Zebu 100 μ M・Vpa 2 mM, Zebu 100 μ M・Vpa 5 mM, Zebu 200 μ M・Vpa 2mM の各濃度で添加し, 1, 3, 7 日後に 0.5%Trypan Blue 溶液を用いて行った.

2. Zebu および Vpa 添加による SAS および HSC4 の RNA-seq

細胞毒性試験により決定した試薬濃度 (100 μ M Zebu, 2.0 mM Vpa) を用いて, SAS および HSC4 を 7 日間培養した. 7 日目に total RNA を抽出し次世代シ

ーケンサー (Next Generation Sequencer, NGS) による網羅的解析 (RNA sequence) を行った。

3. qRT-PCR 法による mRNA 発現解析

RNA sequence での結果から, SAS および HSC4 において遺伝子発現上昇が上位 3 遺伝子に含まれた *CNTN4*, および頭頸部癌において高メチル化変化を引き起こす *p16*, *p21*, *RASSF1*, *NPY* および内在性 Control である *GAPDH* を用いて, 定量的 real-time PCR (qRT-PCR) 法により解析を行った。

4. SAS および HSC4 における DNA メチル化解析

Zebu 単独および Zebu と Vpa 併用による DNA メチル化への影響を確認するために, *CNTN4*, *p16*, *p21*, *RASSF1*, *NPY* について, 定量的メチル化特異的 PCR 法 (qMSP) 法によるメチル化解析を行った。

5. in situ HDAC activity assay

Vpa 単独および Zebu と Vpa 併用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, InSitu HDAC Activity Fluorometric Assay Kit を用いて, HDAC 活性を測定した。

6. ノードマウスへの腫瘍移植, 薬剤投与, 体重測定, サイズ測定

実験動物には, 6-8 週齢の BALB/SIc-nu 雄性ノードマウスを用いた。腫瘍はマウス背部に SAS または HSC4 をそれぞれ 1.0×10^6 個皮下注射し定着させ, 腫瘍サイズ及び体重測定は, 1 週間に 2 回行った。投与薬剤は Zebu 1000 mg/kg, Vpa 400 mg/kg に調整し (Cheng et al., 2003; Hattori et al., 2019; Park et al., 2020), マウスの腫瘍近傍に 21 日間連続投与した。対照群には同量の DDW を投与した。

7. in vivo での mRNA 発現解析

in vitro 実験で発現変化が認められた遺伝子 *CNTN4*, *p16*, *p21*, *RASSF1*, *NPY*

および内在性 Control である *Gapdh* を用いて、定量的 real-time PCR (qRT-PCR) 法により解析を行った。

8. in vivo での DNA メチル化解析

in vitro 実験で発現変化が認められた遺伝子 *CNTN4*, *p16*, *p21*, *RASSF1*, *NPY* について、定量的メチル化特異的 PCR 法 (qMSP) 法によるメチル化解析を行った。

【結果および考察】

1. Zebu 及び Vpa による口腔がん細胞の増殖抑制効果

Zebu 添加において SAS は 3 日目, 7 日目に 200 μ M と 400 μ M の濃度において細胞数が Control と比較し有意に減少した。HSC4 は 1 日目, 3 日目, 7 日目で 200 μ M と 400 μ M の濃度において細胞数が Control と比較し有意に減少した。vpa 添加において SAS は 1 日目に 10 mM, 3 日目, 7 日目では 5 mM と 10 mM 濃度において細胞数が Control と比較し有意に減少した。HSC4 は Vpa 添加において, 3 日目, 7 日目に 5 mM と 10 mM の濃度において細胞数が Control と比較し有意に減少した。Zebu・Vpa 共添加においては 3 日目, 7 日目に Zebu 10 μ M, Vap 2 mM および Zebu 100 μ M Vap 1 mM では有意な細胞増殖抑制がみられなかったものの, Zebu 100 μ M, Vpa 2 mM, Zebu 100 μ M, Vpa 4 mM, Zebu 200 μ M, Vpa 2 mM の濃度による組み合わせにおいて細胞数が Control と比較し有意に減少した。これらの結果から, Zebu・Vpa 併用投与は, それぞれの薬剤の効果を増強させることが示唆された。

2. Zebu および Vpa 添加による SAS および HSC4 の RNA-seq

SAS, HSC4 共に *CNTN4* が遺伝子発現上昇上位 3 遺伝子として認められた。*CNTN4* は肺腺癌においては発現上昇が肺腺癌細胞の増殖, 移動, 浸潤を抑制することが明らかになっているが, 胃がんにおいては予後不良となることも報告されてい

る。これまで、CNTN4 の口腔扁平上皮がんでの役割については明らかとなっておらず、がん抑制遺伝子として働く可能性が示唆された。

3. Zebu 及び Vpa 併用によるがん抑制遺伝子のエピジェネティック解析

Zebu および Vpa 併用投与により SAS, HSC4 共に *CNTN4*, *p16*, *p21*, *RASSF1*, *NPY* において有意な mRNA 発現上昇およびメチル化レベルの低下を認めた。これらの結果から、DNA メチル化レベルの変化は mRNA 発現に関与している可能性が示唆された。

in situ HDAC activity assay の結果、Control 群に比べ Vpa 単独添加群および Zebu・Vpa 共添加群において有意な HDAC 活性低下を認めた。また、Vpa 単独添加群と比べても Zebu・Vpa 共添加群において有意な HDAC 活性低下を認めた。DNMTi と HDACi の併用療法はそれぞれの効果を増強させることが知られていることから、口腔扁平上皮癌においても各薬剤の単独添加と比べ共添加を行うことにより効果を増強させることが示唆された。

4. in vivo での SAS, HSC4 腫瘍形成マウスにおける Zebu, Vpa の腫瘍抑制効果

SAS では Control 群が平均 3056 mm³, Zebu・Vpa 共投与群では平均 2409 mm³ であり、Zebu・Vpa 共投与群では有意差は認められなかった。HSC4 では Control 群では平均 1176mm³ に対し、Zebu・Vpa 共投与群では平均 391mm³ であり、投与 4 回目以降から腫瘍サイズが Control 群と比べ有意に減少した。mRNA 発現解析では SAS, HSC4 共に *CNTN4*, *p16*, *p21*, *RASFF1*, *NPY* において Control 群と比べ Zebu・Vpa 共投与群で有意差を認めた。DNA メチル化解析では SAS で *RASFF1*, *NPY* と *CNTN4* のみでのメチル化レベルの有意な低下を認め、HSC4 では *CNTN4*, *p16*, *p21*, *RASFF1*, *NPY* 全ての遺伝子においてメチル化レベルの有意な低下を認めた。腫瘍における分化度の違いが予後に影響することが知られており、また、エピジェネ

テイクス変化は可逆的であり, DNA の再メチル化を引き起こす事が知られている. これらの結果からも分化度の違いが腫瘍の悪性度および治療抵抗性に影響することか推測された.

【結論】

エピジェネティック薬である DNMTi (Zebu) および HDACi (Vpa) の併用投与は, 高分化型口腔扁平上皮癌細胞株 (HSC4) に対して腫瘍抑制効果を示す事が示唆された.

【文献】

- Rivera C. Essentials of oral cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 1:8(9), 2015.
- Khurshid Z, Zafar MS, Khan RS, Najeeb S, Slowey PD, Rehman IU. Role of Salivary Biomarkers in Oral Cancer Detection. *Adv Clin Chem.* 86:23-70, 2018.
- Cheng JC, Matsen CB, Gonzales FA, Ye W, Greer S, Marquez VE, Jones PA, Selker EU. Inhibition of DNA methylation and reactivation of silenced genes by zebularine. *J Natl Cancer Inst.* 2003 5:95, 2003.
- Hattori N, Sako M, Kimura K, Iida N, Takeshima H, Nakata Y, Kono Y, Ushijima T. Novel prodrugs of decitabine with greater metabolic stability and less toxicity. *Clin Epigenetics.* 1:11(1), 2019.
- Park HK, Han BR, Park WH. Combination of Arsenic Trioxide and Valproic Acid Efficiently Inhibits Growth of Lung Cancer Cells via G2/M-

Phase Arrest and Apoptotic Cell Death. *Int J Mol Sci.* 10:21(7),
2020.