

脱メチル化関連遺伝子 TET1 に着目した口腔癌新規 エピゲノム治療法の検討に関する研究

名古屋大学医学部附属病院

歯科口腔外科 医員 市村典久

名古屋大学大学院医学系研究科

頭頸部・感覚器外科学講座 顎顔面外科学 教授 日比英晴

名古屋大学医学部附属病院

歯科口腔外科 講師 山本憲幸

病院助教 西川雅也

1. 研究の背景・目的

2011年に発表された全エキソーム解析から、口腔癌では予想をはるかに超えるゲノム・エピゲノム異常の集積が明らかとなった。Ten-eleven translocation : TET 遺伝子群 (TET1,TET2,TET3) は DNA の 5 メチルシトシン (5mC)を 5 ヒドロキシメチルシトシン (5hmC) へ変換する水酸化酵素群として作用し、細胞の発生やリプログラミングに関与する。近年血液腫瘍及び固形癌における TET 遺伝子群の機能が徐々に明らかとなり、特に TET1はDNAの脱メチル化を介して癌化に寄与するエピゲノム関連遺伝子として認識されるようになった。一方これまで口腔癌におけるメチル化異常の研究は散見されるが、脱メチル化の観点からエピゲノム異常を検討した研究は皆無であり、その可能性は未知である。本研究は口腔癌における TET1 の機能を明らかにし、臨床病期や生命予後との関連を解析するものであり、新規エピゲノム治療法の開発を目指す上で、TET1 が関与する脱メチル化機構が治療標的と成り得るかを検討するものである。

2. 研究の対象ならびに方法

8種類の口腔癌細胞株 (HSC-2,HCS-3,HSC-4,SAS,Ca9-22,Sa3,HSQ-89,HO-1-u-1) および口腔ケラチノサイト(HOK)を用い TET1 の発現を RT-PCR 法および Western blotting 法にて解析し、Bisulfite-pyrosequencingにて TET1 遺伝子プロモータ領域の DNA メチル化レベルを解析した。siRNAにて TET1 を knockdown した口腔癌細胞内の 5mC 量および 5hmC 量をドットプロット法にて解析した。さらに MTT assayにて細胞増殖能を解析し、細胞増殖関連

遺伝子の発現を RT-PCR 法にて確認した。TET1 の臨床における意義については、The Cancer Genome Atlas : TCGA を用いて、口腔癌患者の正常および癌組織における TET1 の発現および DNA メチル化レベルを解析し患者背景および臨床病期との相関を検討した。

3. 研究成果

口腔ケラチノサイト細胞と口腔癌細胞株 で TET1 遺伝子の発現を mRNA レベル、蛋白レベルで解析したところ、口腔癌細胞株で有意に TET1 の発現上昇を認めた。一方口腔癌細胞株で TET1 の高メチル化を認めた細胞は、Ca9-22 1 種類のみであった。また siRNA にて TET1 を knock down したところ、癌細胞内の 5hmC 量の減少を認め、細胞増殖能の有意な減少を認めた。さらに PCNA や TOP II α 等の細胞増殖関連遺伝子の発現の低下を認めた。

次に TCGA にて口腔癌患者の正常組織と癌組織を比較したところ、細胞実験と同様、癌組織で有意に TET1 の発現上昇を認めた。さらに TET1 の高発現を認めた症例では、有意に原発腫瘍の広がりが大きかった。

4. 考察

本結果より TET1 は口腔癌において oncogene としての機能を有し、エピゲノム異常に着目した新規治療標的となり得る可能性が示唆された。今後は siRNA にて TET1 を knock down した際に発現の変動する遺伝子をマイクロアレイを用いて網羅的に解析し、TET1 の標的遺伝子の同定を試みる予定である。また当講座に保管された切除標本も解析対象に加え、検体数を増やして TET1 の発現と臨床病期についてより詳細に解析を行う予定である。

5. 文献

1. Agrawal N, Frederick MJ, Pickering CR, Bettegowda C, Chang K, et al (2011). Exome sequencing of head and neck squamous cell carcinoma reveals inactivating mutations in NOTCH1. *Science* 26: 1154-1157.
2. Stransky N, Egloff AM, Tward AD, Kostic AD, Cibulskis K, et al (2011). The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. *Science* 26: 1157-1160.
3. Ichimura N, Shinjo K, An B, Shimizu Y, Yamao K, et al (2015). Aberrant TET1 Methylation Closely Associated with CpG Island Methylator Phenotype in Colorectal Cancer. *Cancer Prevention Research* 8: 702-712.