

TFAP2E の過剰発現が歯肉癌由来株化細胞 Ca9-22 の増殖能と
細胞周期に与える影響

酒井 嶺

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻

(指導：佐藤秀一教授，藤原恭子准教授)

Effect of TFAP2E-overexpression in gingival squamous carcinoma cell
line, Ca9-22, on cell proliferation and cell cycle

Ryo Sakai

Nihon University Graduate School of Dentistry,

Major in Periodontology

(Directors: Prof. Shuichi Sato and Assoc. Prof. Kyoko Fujiwara)

要旨

目的：口腔領域の扁平上皮癌（OSCC）の増殖能や細胞周期に、癌抑制遺伝子 transcription factor activator-protein ϵ （TFAP2E）が及ぼす影響を検討した。

方法：TFAP2E の発現ベクターを Ca9-22 に遺伝子導入し、TFAP2E が過剰発現したクローン（pTFAP2E）とベクターのみを導入したコントロールクローン（pN/C）を得た。pTFAP2E と pN/C の増殖能の測定には、WST8 試薬を使用した。細胞周期は、フローサイトメーターによって分析した。二重チミジンブロックによって両クローンの細胞周期を G1 期の終わりに同調させて、周期分布の変化と cyclin B の発現を比較した。さらに、ノコダゾール処理で両クローンを M 期の直前に同調させて、周期分布の変化の詳細について調べた。

結果：pN/C と比較して pTFAP2E の増殖能は低かったが、生存率には差がなかった。また、pTFAP2E はチミジン除去後、G1 期の増加と G2/M 期の減少、および cyclin B1 の発現上昇が見られる時期が、pN/C と比較して 2 時間程度遅かった。一方、ノコダゾール処理後 3 時間までの両クローンの周期分布に違いはなかった。

結論：TFAP2E による Ca9-22 の増殖能の低下は、G2 期および G2 期から M 期への進行の遅延に起因し、OSCC の増殖を抑制することで、その進展を防いでいる可能性が示唆された。

キーワード：transcription factor activator protein2 ϵ ，細胞増殖，細胞周期，口腔扁平上皮癌，cyclin B1

Abstract

Purpose: This study aimed to clarify the effect of transcription factor activator-protein ϵ (TFAP2E) on the proliferation or cell cycle of oral squamous cell carcinoma (OSCC), using an TFAP2E over-expressed OSCC cell line.

Methods: TFAP2E cDNA was transfected into Ca9-22, and clones overexpressing TFAP2E (pTFAP2E) and expressing vector (pN/C) were established. Cell proliferation was determined by WST8 reagent, and distribution of cell cycle was analyzed by flow cytometer. To obtain more information concerning cell-cycle and cyclin B1 expression, cells were synchronized at the end of G1-phase and the start of M-phase by double thymidine block and nocodazole treatment, respectively.

Results: Cell proliferation activity of pTFAP2E was lower than pN/C. At 10 to 14 h after thymidine removal, higher level of G1-phase and lower level of G2/M-phases were detected in pTFAP2E than pN/C. However, no change in distribution of G1- and G2/M-phases were observed between both clones after nocodazole removal.

Furthermore, cyclin B1 expressed 2-hour later in pTFAP2E than pN/C after thymidine removal.

Conclusion: These results indicated pTFAP2E might delay G2-phase and transition from G2- to M-phases, then leading to low cell proliferation of OSCC.

Keywords: transcription factor activator protein2 ϵ , cell proliferation, cell cycle, oral squamous carcinoma, cyclin B1

緒言

頭頸部にみられる扁平上皮癌は悪性腫瘍の中でも発生率が比較的高く、2018年の新規患者数は約830,000人、死者数は約430,000人と報告されている¹⁾。このうち口腔領域に発生する扁平上皮癌(OSCC)の発生率が最も高く、2015年の新規罹患患者数は約300,000人、死者数は約145,000人であり¹⁾、2018年の新規患者数は約355,000人、死者数は約177,000人で、明らかに上昇傾向を示している²⁾。癌治療法の進歩に伴い、癌の治癒率は向上しているものの、現時点でのOSCCの5年生存率は70%に留まっている³⁾。OSCCは舌、口唇および口腔底に好発し、喫煙とアルコールの摂取がその発生の主なリスク因子となっている⁴⁾。その他に、放射線への暴露や高リスク型パピローマウイルス(HPV)の感染などが、OSCCの発生率を上昇させている⁴⁾。近年、OSCCのゲノム解析によって、発生原因と関連するいくつかの遺伝子変異が同定された。一例として、喫煙が原因で発生するOSCCは、癌抑制遺伝子のtumor protein p53(TP53)やcyclin-dependent kinase inhibitor(CDK)2Aの変異が発見されている⁵⁻⁷⁾。しかし、HPV陽性OSCCにはTP53とCDKN2Aの変異は確認できていない⁷⁾。したがってこれらの知見はOSCCの新規治療標的の同定や、その増殖または進行の機序を解明する上で重要と考えられる。

Transcription factor activator-protein ϵ (TFAP2E)は、核内転写因子 activator protein-2 epsilon ϵ (AP-2)をコードする遺伝子で、AP-2遺伝子ファミリーに属している⁸⁾。このファミリーに含まれる5つの遺伝子TFAP2A、TFAP2B、TFAP2C、TFAP2DおよびTFAP2Eは、共通したhelix-span-helixモチーフと

DNA 結合ドメインの α -helix 構造を有し、初期発生に重要な役割を担っている^{9,10}。すなわち、マウスでは、TFAP2E は主に神経組織にみられ、嗅球や網膜の発生に関与している¹¹⁻¹³。また、ヒトあるいはマウス間葉系幹細胞の軟骨細胞への分化にともない TFAP2E 発現が認められる^{14,15}。一方、マウス有棘細胞癌において TFAP2E 遺伝子の第 3 イントロンに多くみられる CpG アイランド (GpGi) にメチル化が生じていることから、TFAP2E が癌の発生と増殖に何らかの影響を及ぼす遺伝子として注目されている¹⁶。

最近の研究から、TFAP2E は癌抑制遺伝子として機能していることが明らかにされた。例えば、ヒトの TFAP2E は染色体 1p34 に位置するが、このゲノム領域は前癌病変の結腸直腸腺腫で欠失している¹⁷。また、マウス有棘細胞癌の TFAP2E の第 3 イントロンに同定された CpGi のメチル化は、ヒト大腸癌や胃癌においても観察されている。この CpGi のメチル化によって TFAP2E の発現レベルが減少し、抗癌剤 5-フルオロウラシル (5-FU) の反応性が低くなる^{18,19}。前立腺癌患者の尿中ゲノム DNA にも、正常成人男性と比較して、メチル化した TFAP2E が多く検出されている²⁰。さらに、神経芽腫患者では、TFAP2E の発現が予後を左右し、そのレベルが低いほど、生存期間が短くなる²¹。OSCC 患者においても低レベルの TFAP2E 発現が予後を悪化させるという見解が得られているが²²、TFAP2E が OSCC の増殖と進行を抑制する詳しい分子メカニズムは明らかにされていない。

そこで本研究では、OSCC における TFAP2E の役割を解明する一助として、TFAP2E をヒト歯肉癌由来株化細胞 Ca9-22 に過剰発現させることによって、

細胞増殖と細胞周期の変化について検討した。

材料および方法

1. 細胞の培養

ヒト歯肉癌由来株化細胞 Ca9-22 は、国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 JCRB 細胞バンク（大阪）から購入した。細胞を、minimal essential medium（ナカライテスク，京都）に 10%牛胎児血清（FBS，ニチリョー，東京），600mg/L glutamine, 100 IU/mL penicillin（Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA）と 100mg/mL streptomycin（Thermo Fisher Scientific）を添加した培地で，湿度100%，37°Cおよび 5% CO₂ の条件で培養した。

2. TFAP2E の過剰発現

ネオマイシン耐性遺伝子をコードし，CMV プロモーターの下流に TFAP2E の open reading frame が挿入された発現ベクターを GenScript（Piscataway, NJ, USA）から購入した。またコントロールベクターとして pcDNA3.1（Thermo Fisher Scientific）を使用した。Ca9-22 を 1×10^5 細胞/ml の密度で播種し，24 時間後に lipofectamine 3000（Thermo Fisher Scientific）と混合した TFAP2E 発現ベクターあるいはコントロールベクターを培養液に加え遺伝子導入した。その後，50 mg/ml の G418 存在下で培養を続け，各ベクターがゲノム DNA に組み込まれたクローンを得た。このうち TFAP2E 過剰発現クローン (pTFAP2E) とコントロールベクター導入クローン (pN/C) の各 1 つを選び実験に供した。

3. 細胞増殖能と生存率の測定

1×10^4 個/ml の細胞を 96 well plate に播種し、1～5 日目までの経日的な増殖能を WST8 試薬（ナカライテスク）で測定した。1 日ごとにウェルから培地を除去し、1/10 濃度の WST8 試薬を含む 100 μ l の培地を加え、1 時間の培養後、プレートリーダーの SpectraMax ABS Plus (Molecular Devices, San Jose, CA, USA) を使用して波長 450 nm の吸光度を計測した。なお、バックグラウンドとして細胞が播種されていないウェルを使用し、計測した吸光度からバックグラウンドの値を引いた数値を増殖能として評価した。

また、抗癌剤のシスプラチン (CDDP, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を加えたときの生存率も調べた。 5×10^4 個/ml の細胞を 96 well plate に播種し、24 時間後に 1 μ M あるいは 5 μ M の CDDP を投与し、3 日目に 100 μ l の WST8 試薬を含む培地と交換し、1 時間の培養後に 450 nm の吸光度を測定した。CDDP に対する細胞の生存率は、CDDP 非投与で得られた吸光度を 100% として算出した。全ての測定は 1 条件につき 4 ウェルずつ行った。

4. 細胞周期の検討

2×10^4 個/ml の細胞を直径 60 mm の培養シャーレに播種し、72 時間後、浮遊細胞と付着細胞を含むすべての細胞を一緒に回収し、phosphate buffer saline (PBS) で洗浄後、70%エタノール中に浮遊させた。4°Cで 24 時間のインキュベート後、0.1%ウシ血清アルブミン、25 mg/ml propidium iodide、および 200 mg/ml RNase A を含む PBS で細胞を 15 分間懸濁させ、フローサイトメータ

(FACSCalibur, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) によって細胞周期を分析した。

G1 期の終わりに細胞周期を同調させるため、二重チミジンブロックを利用した²³⁾。 2×10^4 個/ml の細胞を直径 60 mm の培養シャーレに播種し、24 時間後に 2 mM のチミジンを添加した。培養 18 時間後に培地を除去して PBS で 3 回洗浄し、今度はチミジンを含まない培地に置換した。そこから 9 時間培養を続け、再度 2 mM のチミジンを添加した。さらに 18 時間の培養後、培地を除去して PBS で 3 回洗浄し、再度チミジンを含まない培地を加えた。この時点から培養 0 時間とし、その後、14 時間まで、2 時間ごとに細胞を回収し、フローサイトメーターで細胞周期を分析した。

細胞周期を M 期のはじめに同調させるために、ノコダゾールを使用した。 5×10^4 個/ml の細胞を直径 100 mm の培養シャーレに播種し、24 時間後に 100 ng/ml のノコダゾールを添加した。12 時間の培養後、G2/M 期に入り球形をした細胞を mitotic-shake off 法²⁴⁾によって回収し、ノコダゾールを含まない培地に置換した。この時点から培養 0 時間として 1 時間ごとに細胞を回収し、3 時間まで細胞周期の変化を調べた。

5. Quantitative real-time RT-PCR (qPCR)

RNA の抽出は RNeasy mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) を、RNA から cDNA の合成は、iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, USA) を使用した。TFAP2E と 18S rRNA の qPCR は TaqMan プローブ法

²⁵⁾で、cyclin B1 と β -2 microglobulin (B2M) はインターカレーター法 ²⁶⁾によって行なった。TFAP2E の検出プライマーは、Hs00698734_m1 (Thermo Fisher Scientific) を、18S rRNA は Hs99999901_s1 (Thermo Fisher Scientific) を使用した。それぞれのプライマーは cDNA とともに Premix ExTaq Perfect Real Time (タカラバイオ, 草津) の反応液中で、95°C, 30 秒の前処理後、95°C, 5 秒および 60°C, 30 秒の反応を 40 回繰り返した。また、cyclin B1 の検出はプライマー 5'-CAG TCA GAC CAA AAT ACC TAC TGG GT-3' と、5'-ACA CCA ACC AGC TGC AGC ATC TTC TT-3' を、B2M は 5'-ATG TCT CGC TCC GTG GCC TTA-3' と、5'-ATC TTG GGC TGT GAC AAA GTC-3' (ユーロフィンジェノミクス, 東京) を使用した。Cyclin B1 のプライマーと cDNA は SYBR Premix Ex Taq II (タカラバイオ) の反応液中で、95°C, 30 秒の前処理後、95°C, 5 秒と 58°C, 30 秒を 40 回繰り返して cyclin B1 遺伝子を増幅した。同じく、B2M プライマーと cDNA を 95°C, 30 秒の前処理後、95°C, 5 秒、55°C, 10 秒および 72°C, 30 秒を 40 回繰り返し B2M 遺伝子の増幅を行なった。サーマルサイクラーは CFX Maestro (Bio-Rad laboratories) を利用し、測定は全て 3 回ずつ実施した。なお、Ca9-22 の RNA から合成した cDNA を段階希釈したものから標準曲線を作成し、各遺伝子の相対的な発現レベルを求めた。また、TaqMan プローブ法では 18S rRNA の値を、インターカレーター法では B2M の値を内因性コントロールとして用いた。

6. Western blot

pN/C と pTFA2E は、プロテアーゼ阻害剤（ナカライテスク）とフォスファターゼ阻害剤（ナカライテスク）を含む RIPA buffer（Thermo Fisher Scientific）で溶解し、 -80°C で一度凍結した。解凍後、27G の針をつけた 1ml の注射筒に複数回出し入れすることで、DNA を断片化した。その後、Bio-Rad DC kit（Bio-Rad laboratories）によってタンパク量を計測した。10 μg のタンパクを含む細胞溶解液は 4-12% SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分画後、Immobilon-P メンブレン（Millipore, Billerica, MA, USA）へ転写した。Blocking one（ナカライテスク）中、 4°C で 24 時間メンブレンを浸漬し、1 次抗体と反応させた。1 次抗体は、ウサギ抗ヒト TFAP2E 抗体（ProSci, Poway, CA, USA）、マウス抗ヒト cyclin B1 抗体（Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA）、ウサギ抗ヒト GAPDH 抗体（Abcam, Cambridge, UK）、マウス抗ヒト β -actin 抗体（Sigma-Aldrich）を使用した。メンブレンは、CanGet Signal（ナカライテスク）で 500 倍から 1,000 倍に希釈した 1 次抗体と、 4°C で 24 時間反応させた後、0.1% tween 20 を含む tris-buffered saline（TBS-T）で洗浄し、2 次抗体と室温で 1 時間反応させた。2 次抗体は horseradish peroxidase で標識した抗マウス IgG または抗ウサギ IgG（GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK）を使用し、Chemi-Lumi-One Super（ナカライテスク）によって化学発光させ、LAS4000（富士フイルム、東京）で撮影した。バンドのシグナル強度は、Image J（NIH, Bethesda, MD, USA）を用いて数値化した²⁷⁾。

7. 統計解析

2 群間の有意差検定は Student-*t* 検定を、また複数グループ間の有意差検定は two-way ANOVA と Turkey 検定で行なった。全ての統計解析は、統計解析ソフト JMP バージョン 11.2 (SAS Institute, Cary, NC, USA) を用いた。データは、全て 3 回あるいはそれ以上の実験の平均値 \pm standard deviation (SD) で表し、P 値 0.05 以下を統計学的に有意とした。

結果

1. TFAP2E が Ca9-22 の増殖能と生存率に与える影響

TFAP2E の mRNA とタンパクの発現レベルを pN/C と pTFAP2E で比較した。pN/C は TFAP2E の mRNA とタンパクの発現をほとんど検出できなかったが、pTFAP2E ではどちらも強い発現が確認できた (図 1A, B)。

pN/C と pTFAP2E の増殖能を調べた結果、両クローンともに培養 5 日目まで経日的な増加を示したが、pTFAP2E の増殖能は pN/C に比べて低かった (図 2A)。pTFAP2E の増殖能の減少が、細胞の生存率と関係しているか検討するために、異なる濃度 (1 および 5 μ M) の CDDP を pN/C と pTFAP2E に加えて培養した。CDDP は濃度依存的な細胞死を誘導し、5 μ M の CDDP によって pN/C と pTFAP2E の生存率は約 35%まで減少した。しかし、両クローン間の生存率の違いについては有意差は認められなかった (図 2B)。

2. TFAP2E の過剰発現が細胞周期の分布に与える影響

pTFAP2E の増殖能を減少させた原因を探るため、培養 24, 48 および 72 時間の pN/C と pTFAP2E の細胞周期の分布と死細胞の割合を調べた。24 時間の細胞周期をみると、pN/C は G1 期 42.4%, S 期 12.63%, G2/M 期 24.62%, および pTFAP2E は G1 期 36.25%, S 期 22.64%, G2/M 期 21.58%を示し、48, 72 時間もほぼ同じ周期の分布だった。死細胞が含まれる sub-G1 画分は、24 時間の pN/C で 3.35%, pTFAP2E では 2.08%という値を示し、48, 72 時間も同様の傾向を示した (図 3)。

3. 二重チミジンブロックによる細胞周期の時系列的な変化

二重チミジンブロックによって pN/C と pTFAP2E の細胞周期を G1 期の終わりに同調させ、G1 期, S 期, G2/M 期の割合を 0 から 14 時間まで、2 時間ごとに比較した (図 4, 表 1)。その結果、pN/C の 0 時間と 12 時間の細胞周期の分布パターンがほぼ同じことから、Ca9-22 はチミジン除去後、約 12 時間で 1 回の細胞周期が完結することが分かった。チミジン除去直後 (0 時間) の pN/C は G1 期 91.8%, S 期 3.2%, G2/M 期 4.9%, pTFAP2E は G1 期 81.8%, S 期 6.0%, G2/M 期 12.2%で、両クローン間に大きな違いは認められなかった。チミジン除去後 2 時間では、pN/C に比べて pTFAP2E の G1 期の割合が低く (pN/C 94.3% > pTFAP2E 77.6%), S 期の割合と G2/M 期の割合が高かった (S 期 : pN/C 2.5% < pTFAP2E 15.3%, G2/M 期 : pN/C 3.2% < pTFAP2E 7.0%)。しかし、チミジン除去後 4 時間をみると、0 および 2 時間と比較し

て両クローンの G1 期が大きく減少し、S 期の増加がみられた。ただし、4 時間の pN/C と pTFAP2E を比較した場合、pTFAP2E は S 期の割合が低く (pN/C 83.7% > pTFAP2E 63.1%), G2/M 期の割合が高かった (pN/C 2.8% < pTFAP2E 22.5%)。その後、6, 8 時間の両クローンの細胞周期は、ほぼ同じパターンを示し、4 時間と比較すると S 期の割合が減少し、G2/M 期の割合が増加した。このうち 6 時間をみると pN/C に比べて pTFAP2E の S 期の割合が高く (pN/C 12.1% < pTFAP2E 20.9%)、G2/M 期の割合が低かった (pN/C 79.3% > pTFAP2E 66.3%)。チミジン除去後、10, 12, 14 時間は、8 時間に比べて両クローンともに G1 期が急激に増加し、G2/M 期が減少した。しかし、pN/C と pTFAP2E を比較した場合、pTFAP2E は、それぞれの時間で G1 期が低く、S 期および G2/M 期が高い結果となった。なお、10, 12 および 14 時間の両クローンの周期分布の割合を表 1 に示した。

4. ノコダゾール処理による細胞周期の時系列的な変化

ノコダゾールを培養系に加えて pN/C と pTFAP2E の細胞周期を M 期のはじめに同調させ、周期分布の変化を 1 時間ごとに比較した (図 5)。なお、ノコダゾール除去直後 (0 時間) の pN/C の細胞周期が図 4 の 8 時間とほぼ同等なパターンを示すことから、今回は 3 時間までの周期分布を計測した。0 時間の pN/C は G1 期 12.3%, S 期 9.2%, G2/M 期 78.5% であり、pTFAP2E は G1 期 20.8%, S 期 7.2%, G2/M 期 72.0% となり、両クローンの周期間には大きな変化はなかった。その後、3 時間まで両クローンの周期分布には顕著な差は認

められず、ほぼ一定の割合の S 期と経時的な G1 期の増加と G2/M 期の減少が確認できた。両クローンの周期分布の割合を表 2 に示した。

5. pTFAP2E の cyclin B1 の発現

pN/C と pTFAP2E を二重チミジンブロックによって G1 期の終わりに同調させ、G2 期から M 期の初めに高発現することが知られている cyclin B1²⁸⁾ のタンパク発現を継時的に比較した (図 6A)。pN/C は 0 時間から cyclin B1 の発現が検出でき、8 時間で強くなり、その後 10 時間でピークに達し、12 時間で急激に減少した。一方、pTFAP2E は 4 時間から弱い発現が検出でき、10 時間で pN/C とほぼ同じレベルになり、12 時間では pN/C と同じレベルまで減少した。特に、8 時間の pTFAP2E で発現している cyclin B1 の遺伝子発現レベルが pN/C と比べて弱いことから、この時間での G2 期から M 期への遅延したことが明らかになった。一方、タンパク発現とは異なり、cyclin B1 の遺伝子発現は違いが認められなかった (図 6B)。

考察

pTFAP2E の増殖能の低下は、TFAP2E の過剰発現による細胞周期の遅延や細胞死の誘導、あるいは細胞に加わるストレス抵抗性の低下などによるものと考えられる。そこで、細胞に加わるストレスに着目し、CDDP を pTFAP2E に作用させることによって、その生存率に及ぼす影響について pN/C と比較した。

その結果、CDDPによって pN/C と pTFAP2E の多くは死滅したが、両クローンの間の生存率に差はなく、pN/C と pTAFAP2E のストレスに対する抵抗性は同程度であると推測できた。Ca9-22 は、変異型 TP53 を持つことが知られている²⁹⁾。野生型の TP53 は、CDKN1A や growth arrest and DNA damage inducible 45 (GADD45) の発現を活性化することで、細胞死を誘導するが、変異型 TP53 ではこれらの機能が減弱していた³⁰⁾。今回、Ca9-22 において TFAP2E を過剰発現させても、CDDP に対する抵抗性がコントロール細胞と同程度であったことは、変異型 TP53 が影響している可能性がある。TFAP2E と TP53 との関係は、今後の検討が必要であるが、pTFAP2E の増殖能の低下は、ストレスに起因するものでなく、細胞周期の遅延や細胞死が原因である可能性が示唆された。

しかし、pN/C と pTFAP2E の細胞周期を比較した結果、G1 期、S 期、G2/M 期の比率には大きな変化は認められず、全細胞中に占める死細胞の割合もほぼ同じであった。細胞周期は DNA 合成準備期の G1 期から、DNA 複製期の S 期、そして細胞分裂準備期の G2 から細胞分裂期の M 期に進行し、再度、G1 期へ戻る²⁸⁾。この一回の周期に費やす時間は、細胞の種類によって大きく異なる。例えば、正常線維芽細胞では 52 時間³¹⁾、大腸癌細胞株 HCT116 では 18 時間³²⁾、および子宮頸癌細胞株 HeLa は 11 時間³³⁾と報告されている。また、図 4 の結果から Ca9-22 の 1 回の周期が 12 時間であった。pTFAP2E では、増殖能が低下していたものの、pN/C と pTFAP2E の死細胞の割合に違いなかったことから、pTFAP2E は細胞周期の進行が遅れている可能性が考えられた。

しかし、図 3 に示したような細胞周期が同調していない細胞集団を調べる方法では、進行の遅れを検出することが難しいと考え、pN/C と pTFAP2E を一定の周期に同調させ、時系列的な周期分布の変化について検討することにした。

そこで、二重チミジンブロックによって、pN/C と pTFAP2E の細胞周期を G1 期の終わりに同調させ、2 時間ごとに各周期の割合を検討した。その結果、10, 12, 14 時間で pTFAP2E の G1 期の割合が pN/C と比べて低く、G2/M 期の割合が多かった。また、8 時間以前の細胞周期の進行は pTFAP2E と pN/C の間で大きな違いが見られなかったことから、pTFAP2E は「G2 期」「G2 期から M 期」、「M 期の進行」、そして「M 期から G1 期への移行」のどこかで遅延が生じている可能性が考えられた。

TFAP2E と同じように細胞周期の進行に影響を及ぼす癌抑制遺伝子がいくつか報告されている。例えば、14-3-3 σ を悪性黒色腫細胞に過剰発現させると、G2/M 期が増加し、増殖能が減少する³⁴⁾。また、ヒト子宮頸癌由来株化細胞 Hela の adenosine monophosphate-activated protein kinase $\alpha 2$ の発現を抑制した場合、S 期から G2/M 期への進行が遅れる³³⁾。本実験の結果は、TFAP2E が Ca9-22 の細胞周期の進行を遅延させ、細胞の増殖能を低下させることを示した最初の報告と言える。

チミジンブロックによって pN/C と pTFAP2E の細胞周期を G1 期のはじめに同調させたものの、チミジン除去直後 (0 時間) の pN/C は S 期 3.2%、G2/M 期 4.9%、あるいは pTFAP2E では S 期 6%、G2/M 期 12.5%が含まれており、

全ての細胞を G1 期に合わせることはできなかった。その原因の一つとして、チミジンの取り込量が細胞間で均一ではないことが考えられた。チミジンの取り込み量は細胞の種類によって異なるため³⁵⁾、全ての細胞を G1 期に同調させることは難しく、一般的に G1 期の細胞の割合が 70~80%であれば実験に使用されている^{36,37)}。また、チミジン除去後 4 時間で pN/C と pTFAP2E の S 期の割合が一過性上昇した。同じような現象が Hela やヒト肝細胞癌由来株化細胞の Sk-Hep-1 でも観察されており^{33,37)}、チミジン除去後、2~3 時間で S 期の割合が増加している。しかし、4 時間みられた S 期の急激な増加が Ca9-22 の特性と判断するには、より細かい時間間隔での周期分布の計測が必要と考えられる。

TFAP2E が、Ca9-22 の細胞周期の遅延を誘導する時期を詳しく特定するため、ノコダゾール処理によって pN/C と pTFAP2E を M 期の直前に同調させ、周期の進行を検討した。その結果、両クローンの中の G1 期、S 期、G2/M 期の割合に大きな違いは認められなかった。すなわち、TFAP2E は「M 期の進行」と「M 期から G1 期への移行」ではなく、「G2 期」または「G2 期から M 期のはじめ」に作用し、その進行を遅延させることが明らかとなった。この時期は、DNA の複製が終了して細胞分裂が開始する段階であり、DNA の損傷や DNA 複製エラーあるいは紡錘体の形成不全が認められる^{38,39)}。細胞分裂時のエラーを防ぐために、細胞には細胞周期チェックポイントが備わっており、細胞周期の進行を遅延または停止させることで、エラーを修復し、変異が蓄積するとともに、拡大することを防いでいる。しかし、CDDP によって両クロ

ーンの生存率に違いがなかったことから、pTFAP2 は G2/M 期のチェックポイントに影響を及ぼさず、エラーを起こした細胞は pN/C と同じ割合で死滅するものと考えられた。

Cyclin B1 は G2 期に多く合成され、CDK1 との複合体を形成することで CDK1 を脱リン酸化し、細胞は G2 期から M 期へ進行する^{40,41)}。今回、Western blot によって検出できた pTFAP2E の cyclin B1 の発現は pN/C よりも、2 時間ほど遅れて、10 時間で急激に増加してピークに達した。つまり、pTFAP2E は pN/C よりも、G2 期から M 期への進行が 2 時間ほど遅延していることが示された。また、両クローンにおける cyclin B1 の発現変化は二重チミジンブロックとノコダゾール処理によって得られた結果、すなわち TFAP2E が「G2 期」または「G2 期から M 期のはじめ」に影響を及ぼすことを裏付ける一つの根拠となったと考えられる。一方、タンパク発現とは異なり、cyclin B1 mRNA の発現レベルに差はなかった。実際に、cyclin B1 は、転写量が同じでもユビキチンプロテアソーム系の活性化によってタンパクとして翻訳される量が変動することが知られている⁴²⁾。Cyclin B1 タンパクの翻訳や安定化に TFAP2E がどのように影響しているのか、今後の検討の必要性が考えられた。

結論

OSCC において癌抑制遺伝子として働く TFAP2E の作用メカニズムを明らかにするため、ヒト歯肉癌由来株化細胞 Ca9-22 に TFAP2E を過剰発現させた結果、以下の結論を得た。

1. TFAP2E は Ca9-22 の細胞増殖を抑制した。
2. TFAP2E は Ca9-22 のシスプラチンに対する抵抗性に影響を及ぼさなかった。
3. TFAP2E は Ca9-22 の「G2 期」または「G2 期から M 期のはじめ」の進行を遅らせた。

以上のことから、TFAP2E は OSCC の G2/M 期に作用し、細胞増殖を抑制することで、癌の進展を防いでいる可能性が考えられた。

謝辞

本研究を進めるにあたり、フローサイトメーターを利用させていただきました日本大学医学部研究支援部門に心よりお礼申し上げます。また、終始多大なるご協力とご指導を賜りました本学部歯科保存学第Ⅲ講座及び解剖学Ⅰ講座の皆様には深く感謝いたします。本論文に関して、開示すべき利益相反はありません。

参考文献

- 1) Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A (2018) Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 68, 394-424.
- 2) Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F (2015) Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 136, E359-386.
- 3) SEER Cancer Statistics Review (CSR) 1975-2018. https://seer.cancer.gov/csr/1975_2018/. Released 15 April 2021. (2021年12月10日アクセス)
- 4) Kumar M, Nanavati R, Modi TG, Dobariya C (2016) Oral cancer: etiology and risk factors: a review. *J Cancer Res Ther* 12, 458-463.
- 5) Cruz I, Snijders PJ, Van Houten V, Vosjan M, Van der Waal I, Meijer CJ (2002) Specific p53 immunostaining patterns are associated with smoking habits in patients with oral squamous cell carcinomas. *J Clin Pathol* 55, 834-840.
- 6) The Cancer Genome Atlas Network (2015) Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature* 517, 576-582.
- 7) Batta N, Pandey M (2019) Mutational spectrum of tobacco associated oral squamous carcinoma and its therapeutic significance. *World J Surg Oncol* 17, 198.

- 8) Feng W, Williams T (2003) Cloning and characterization of the mouse AP-2 epsilon gene: a novel family member expressed in the developing olfactory bulb. *Mol Cell Neurosci*, 24, 460-475.
- 9) Kołat D, Kałuzińska Ż, Bednarek AK, Płuciennik E (2019) The biological characteristics of transcription factors AP-2 α and AP-2 γ and their importance in various types of cancers. *Biosci Rep* 39, BSR20181928.
- 10) Eckert D, Buhl S, Weber S, Jäger R, Schorle H (2005) The AP-2 family of transcription factors. *Genome Biol* 6, 246.
- 11) Wang HV, Vaupel K, Buettner R, Bosserhoff AK, Moser M (2004) Identification and embryonic expression of a new AP-2 transcription factor, AP-2. *Dev Dyn* 231, 128-135.
- 12) Feng W, Simoes-de-Souza F, Finger TE, Restrepo D, Williams T (2009) Disorganized olfactory bulb lamination in mice deficient for transcription factor AP-2 ϵ . *Mol Cell Neurosci* 42, 161-171.
- 13) Jain S, Glubrecht DD, Germain DR, Moser M, Godbout R (2018) AP-2 ϵ expression in developing retina: contributing to the molecular diversity of amacrine cells. *Sci Rep* 8, 3386.
- 14) Wenke AK, Grässel S, Moser M, Bosserhoff AK (2009) The cartilage-specific transcription factor Sox9 regulates AP-2 ϵ expression in chondrocytes. *FEBS J* 276, 2494-2504.
- 15) Wenke AK, Rothhammer T, Moser M, Bosserhoff AK (2006) Regulation of

integrin $\alpha 10$ expression in chondrocytes by the transcription factors AP-2epsilon and Ets-1. *Biochem Biophys Res Commun* 345, 495-501.

- 16) Fujiwara K, Ghosh S, Liang P, Morien E, Soma M, Nagase H (2015) Genome-wide screening of aberrant DNA methylation which associated with gene expression in mouse skin cancers. *Mol Carcinog* 54, 178-188.
- 17) Giaretti W, Molinu S, Ceccarelli J, Prevosto C (2006) Chromosomal instability, aneuploidy, and gene mutations in human sporadic colorectal adenomas. *Cell Oncol* 26, 301-305.
- 18) Ebert MP, Tänzer M, Balluff B, Burgermeister E, Kretzschmar AK, Hughes DJ, Tetzner R, Lofton-Day C, Rosenberg R, Reinacher-Schick AC, Schulmann K, Tannapfel A, Hofheinz R, Röcken C, Keller G, Langer R, Specht K, Porschen R, Stöhlmacher-Williams J, Schuster T, Ströbel P, Schmid RM (2012) TFAP2E-DKK4 and chemoresistance in colorectal cancer. *N Engl J Med* 366, 44-53.
- 19) Sun J, Du N, Li J, Zhou J, Tao G, Sun S, He J (2016) Transcription factor AP2 ϵ : a potential predictor of chemoresistance in patients with gastric cancer. *Technol Cancer Res Treat* 15, 285-295.
- 20) Payne SR, Serth J, Schostak M, Kamradt J, Strauss A, Thelen P, Model F, Day JK, Liebenberg V, Morotti A, Yamamura S, Lograsso J, Sledziewski A, Semjonow A (2009) DNA methylation biomarkers of prostate cancer: confirmation of candidates and evidence urine is the most sensitive body fluid for non-invasive detection. *Prostate* 69, 1257-1269.

- 21) Hoshi R, Watanabe Y, Ishizuka Y, Hirano T, Nagasaki-Maeoka E, Yoshizawa S, Uekusa S, Kawashima H, Ohashi K, Sugito K, Fukuda N, Nagase H, Soma M, Ozaki T, Koshinaga T, Fujiwara K (2017) Depletion of TFAP2E attenuates adriamycin-mediated apoptosis in human neuroblastoma cells. *Oncol Rep* 37, 2459-2464.
- 22) Fujiwara K, Sakai R, Takahashi T (2021) Transcription factor TFAP2E is involved in the regulation of G2/M transition in oral squamous cell carcinoma derived cells. *J Oral Biosci Suppl*, 249.
- 23) Chen G, Deng X (2018) Cell synchronization by double thymidine block. *Bio Protoc* 8, e2994.
- 24) De Wever V, Lloyd DC, Nasa I, Nimick M, Trinkle-Mulcahy L, Gourlay R, Morrice N, Moorhead GB (2012) Isolation of human mitotic protein phosphatase complexes: identification of a complex between protein phosphatase 1 and the RNA helicase Ddx21. *PLoS One* 7, e395.
- 25) Navarro E, Serrano-Heras G, Castaño MJ, Solera J (2015) Real-time PCR detection chemistry. *Clin Chim Acta* 439, 231-250.
- 26) Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HR (2005) Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn* 5, 209-219.
- 27) Abramoff MD, Magelhaes PJ, Ram SJ (2004) Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International* 11, 36-42.

- 28) Morgan MO (2007) The cell cycle: principle of control. Sinauer Associates, Sunderland, MA, US: 中山敬一, 中山啓子監訳 (2008) 細胞周期 細胞増殖の制御メカニズム. メディカル・サイエンス・インターナショナル, 東京, 2-9.
- 29) Nakazawa S, Sakata KI, Liang S, Yoshikawa K, Iizasa H, Tada M, Hamada JI, Kashiwazaki H, Kitagawa Y, Yamazaki Y (2019) Dominant-negative p53 mutant R248Q increases the motile and invasive activities of oral squamous cell carcinoma cells. Biomed Res 40, 37-49.
- 30) Stark GR, Taylor WR (2006) Control of the G2/M transition. Mol Biotechnol 32, 227-248.
- 31) Oh JH, Gertych A, Tajbakhsh J (2013) Nuclear DNA methylation and chromatin condensation phenotypes are distinct between normally proliferating/aging, rapidly growing/immortal, and senescent cells. Oncotarget 4, 474-493.
- 32) Imanis Life Sciences. HCT116 (Colorectal Carcinoma).
<https://imanislife.com/collections/cell-lines/hct116-cells/> (2021年12月25日アクセス)
- 33) Lee IJ, Lee CW, Lee JH (2015) CaMKK β -AMPK α 2 signaling contributes to mitotic Golgi fragmentation and the G2/M transition in mammalian cells. Cell Cycle 14, 598-611.
- 34) Schultz J, Ibrahim SM, Vera J, Kunz M (2009) 14-3-3 σ gene silencing during melanoma progression and its role in cell cycle control and cellular senescence.

Mol Cancer 30, 53.

- 35) Haugland R (2005) Assays for cell viability, proliferation, and function. In: the handbook: a guide to fluorescent probes and labeling technologies, 10th ed, Invitrogen Corp, Waltham, MA, 699-776.
- 36) Jung HW, Park I, Ghil S (2014) Cannabinoid receptor activation inhibits cell cycle progression by modulating 14-3-3 β . Cell Mol Biol Lett 19, 347-360.
- 37) Chen YC, Chen IS, Huang GJ, Kang CH, Wang KC, Tsao MJ, Pan HW (2018) Targeting DTL induces cell cycle arrest and senescence and suppresses cell growth and colony formation through TPX2 inhibition in human hepatocellular carcinoma cells. Onco Targets Ther 11, 1601-1616.
- 38) Hartwell LH, Weinert TA (1989) Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. Science 246, 629-634.
- 39) Matthews HK, Bertoli C, de Bruin RAM (2021) Cell cycle control in cancer. Nat Rev Mol Cell Biol, <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00404-3>.
- 40) Ferrell JE Jr (2013) Feedback loops and reciprocal regulation: recurring motifs in the systems biology of the cell cycle. Curr Opin Cell Biol 25, 676-686.
- 41) Lara-Gonzalez P, Moyle MW, Budrewicz J, Mendoza-Lopez J, Oegema K, Desai A (2019) The G2-to-M transition is ensured by a dual mechanism that protects cyclin B from degradation by cdc20-activated APC/C. Dev Cell 51, 313-325.
- 42) Tarn WY, Lai MC (2011) Translational control of cyclins. Cell Div 6, 5.

表 1 二重チミジンブロック後の細胞周期の時系列的な変化

pN/C								
	0h	2h	4h	6h	8h	10h	12h	14h
G1	91.8	94.3	13.5	8.6	10.4	67.6	91.5	92.8
S	3.2	2.5	83.7	12.1	9.0	5.9	2.9	2.6
G2/M	5.0	3.2	2.8	79.3	80.6	26.5	5.6	4.6

pTFAP2E								
	0h	2h	4h	6h	8h	10h	12h	14h
G1	81.8	77.6	14.5	12.8	11.6	24.4	53.8	62.6
S	6.0	15.3	63.1	20.9	12.8	15.1	15.7	13.9
G2/M	12.2	7.0	22.5	66.3	75.7	60.5	30.5	23.5

各周期に分布する細胞の割合 (%) を表示する。

表 2 ノコダゾール処理後の細胞周期の時系列的な変化

pN/C				
	0h	1h	2h	3h
G1	12.3	13.1	39.1	60.4
S	9.2	8.9	8.8	8.4
G2/M	78.5	78.0	52.1	31.2

pTFAP2E				
	0h	1h	2h	3h
G1	20.8	14.8	45.5	68.5
S	7.2	4.0	6.9	5.2
G2/M	72.0	81.2	47.5	26.3

各周期に分布する細胞の割合 (%) を表示する。

図1

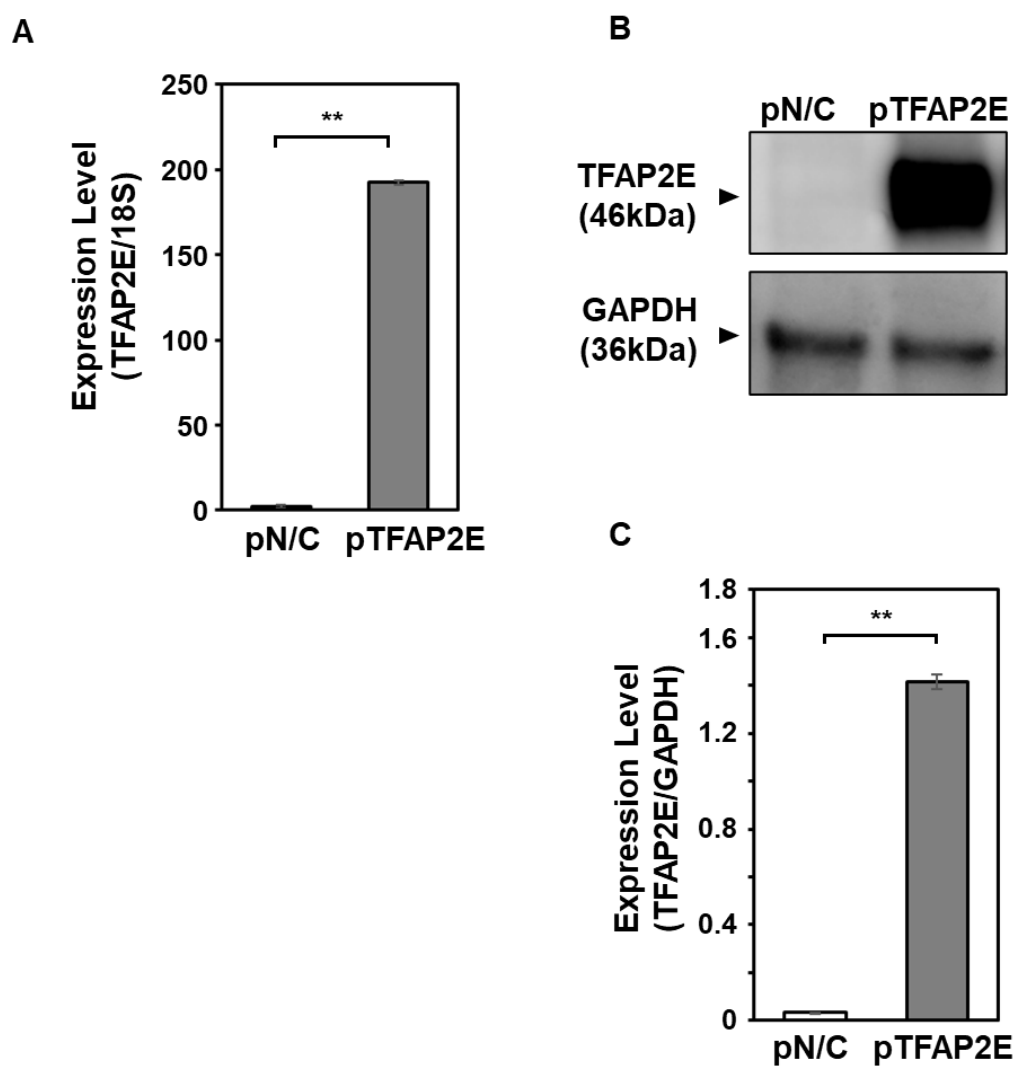


図1 遺伝子導入クローンにおけるTFAP2Eの発現

Ca9-22にTFAP2Eの発現ベクターを導入したクローン (pTFAP2E) とベクターのみを導入したコントロールクローン (pN/C) を樹立した。(A) 各クローンのTFAP2E mRNAの発現をqPCRで調べた。測定値は、3回の結果の平均値 \pm SDで表した。** $P < 0.01$ (B) 各クローンのTFAP2E タンパクの発現をWestern blotによって調べ、(C) バンドのシグナル強度をImageJ を用いて計測した。結果は3回の計測値の平均値 \pm SDで表した。** $P < 0.01$

図2

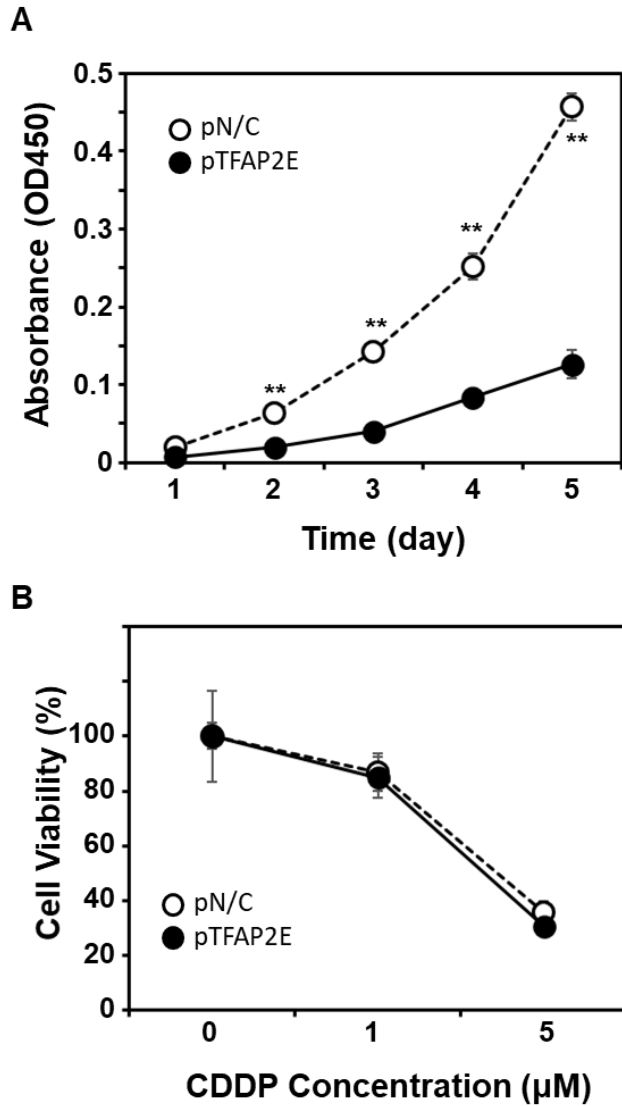


図2 細胞の増殖能と生存率

pTFAP2E（実線）とpN/C（破線）の増殖能と生存率を計測した。（A）1～5日間の増殖能の変化を表した。（B）pTFAP2E（実線）とpN/C（破線）の培養系に1または5 μM のCDDPを加え、72時間後の生存率を計測した。測定値は平均値 \pm SDで示した。** $P < 0.01$

図3

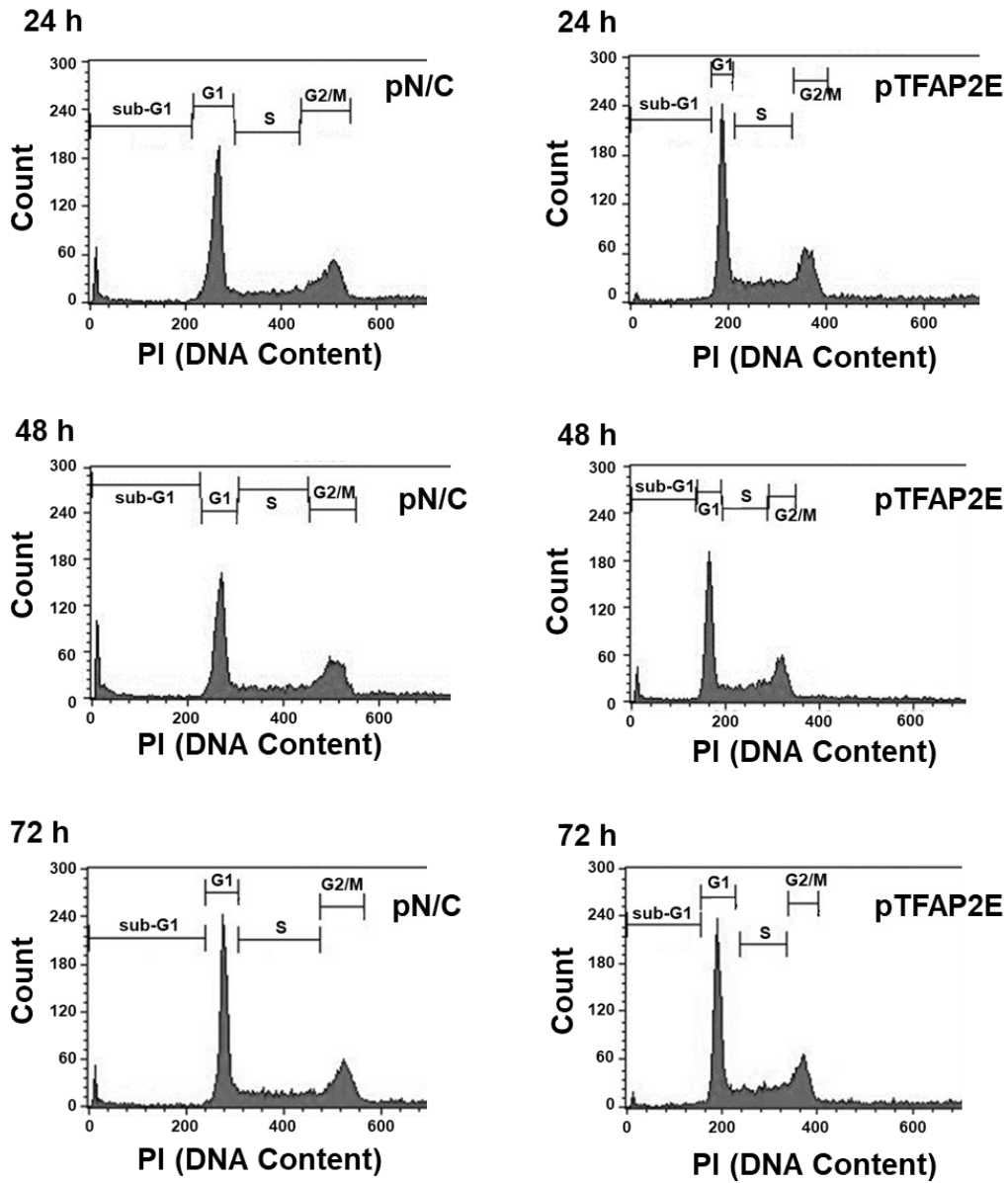


図3 フローサイトメーターによる細胞周期の分析
pN/C-1とpTFAP2E-1を播種後、24、48、72時間の細胞周期を示す。死細胞はsub-G1で表した。

図4

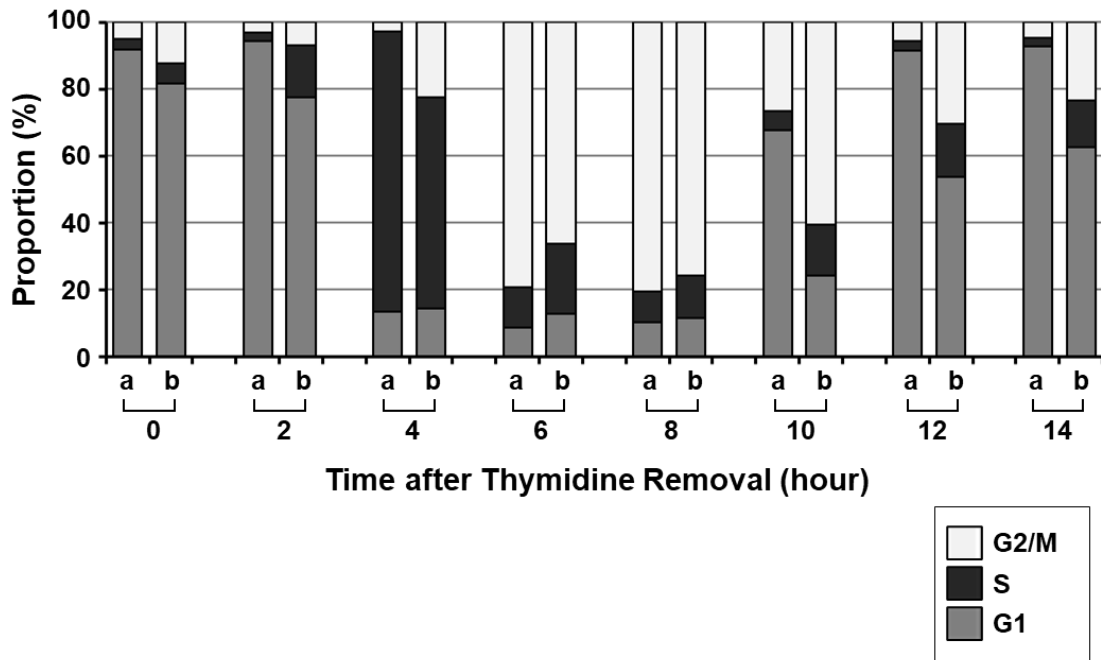


図4 二重チミジンブロック後の細胞周期の時系列的な変化
pN/C (a) と pTFAP2E (b) を二重チミジンブロックによってG1期の終わりに同調させ、0~14時間までの細胞周期の変化について2時間ごとに調べた。

図5

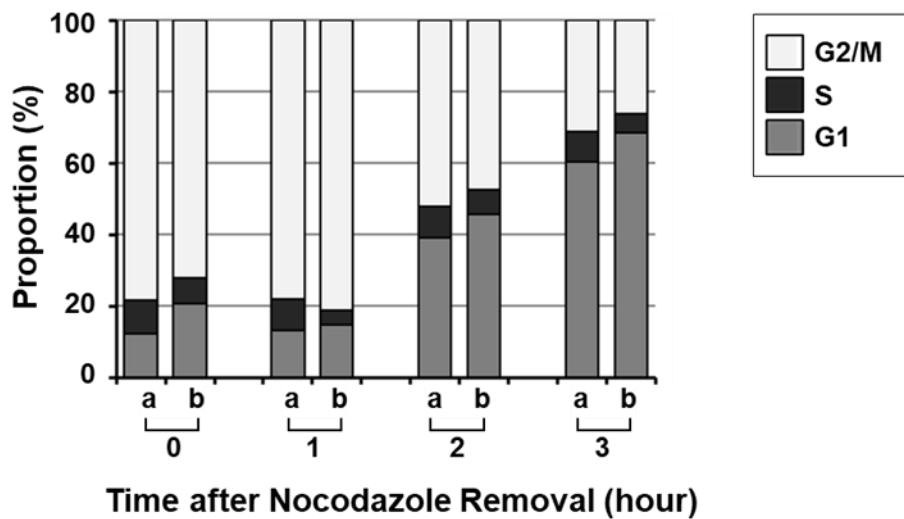


図5 ノコダゾール処理後の細胞周期の時系列的な変化
pN/C (a) と pTFAP2E (b) をノコダゾールによってM期のはじめに同調させ、
0～3時間の細胞周期の変化について、1時間ごとに調べた。

図6

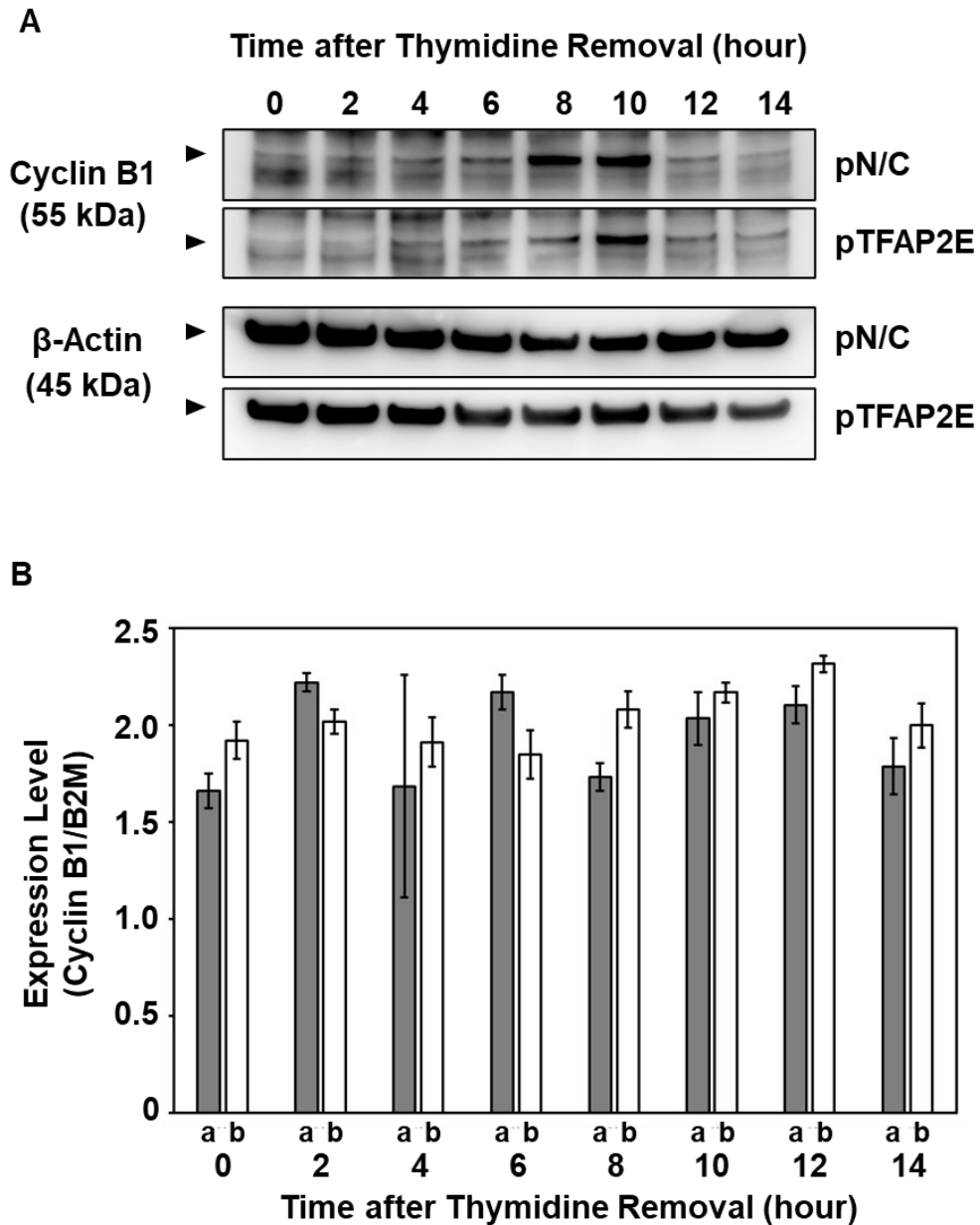


図6 Cyclin B1の遺伝子・タンパク発現

A : pTFAP2EとpN/Cを二重チミジンブロックでG1期の終わりに同調させ、0～14時間までのcyclin B1の発現をWestern blotによって検出した。B : 同じくpN/C (a) とpTFAP2E (b) のcyclin B1の発現レベルをqPCRによって2時間ごとに調べた。qPCRの測定値は、3回の測定結果の平均値 ± SDで表した。