

転写因子 TFAP2E の発現抑制が誘導する口腔扁平上皮癌細胞の遺伝子発現変化

酒井 嶺^{1,2} 藤原 恭子^{3,4} 永島 利通^{5,6}
 清水 なつ生^{1,7} 大橋 晶子^{3,4} 佐藤 秀一^{2,7}
 本吉 満^{8,9} 外木 守雄^{6,10} 高橋 富久^{3,4}

¹ 日本大学大学院歯学研究科歯学専攻 応用口腔外科学

² 日本大学歯学部歯科保存学第Ⅲ講座

³ 日本大学歯学部解剖学第Ⅰ講座

⁴ 日本大学歯学部総合歯学研究所機能形態学部門

⁵ 日本大学大学院歯学研究科歯学専攻 口腔構造機能学分野

⁶ 日本大学歯学部口腔外科学第Ⅰ講座

⁷ 日本大学歯学部総合歯学研究所高度先端医療研究部門

⁸ 日本大学歯学部歯科矯正学講座

⁹ 日本大学歯学部総合歯学研究所臨床研究部門

¹⁰ 日本大学歯学部総合歯学研究所生体防御部門

要旨:

目的: 転写因子 activator protein-2 epsilon をコードする TFAP2E は、神経系や軟骨の発生に必要な分子であり、また、その一方で癌抑制遺伝子としても注目されている。しかし、TFAP2E の詳しい作用機序はほとんど明らかにされていない。本研究では、TFAP2E の機能を解明するための一助とし、ヒト歯肉癌由来株化細胞 Ca9-22 に TFAP2E shRNA を導入して、得られたクローン (shTFAP2E-1, shTFAP2E-2) とコントロールクローンの中で発現レベルの異なる遺伝子を同定した。

方法: 網羅的な遺伝子解析はマイクロアレイで、遺伝子発現については real-time PCR によって検討した。さらに、enrichment 解析は DAVID functional annotation tool を利用した。

成績: shTFAP2E-1 において 2 倍以上の発現上昇がみられた遺伝子を 110 個、また 171 個の発現が低下した遺伝子を同定した。shTFAP2E-1 で発現低下を示した遺伝子は PI3K-Akt signaling pathway に含まれ、このうち RERG と CDKN1A を絞り込んだ。どちらも shTFAP2E-1 と shTFAP2E-2 の両方で、顕著な発現低下が認められた。

結論: RERG と CDKN1A が TFAP2E の標的分子であり、TFAP2E の癌抑制遺伝子としての機能と関連している可能性が示された。

キーワード: TFAP2E, 口腔扁平上皮癌, RERG, CDKN1A

Effect of TFAP2E knockdown on gene expression in oral squamous cell carcinoma cells

Ryo Sakai^{1,2}, Kyoko Fujiwara^{3,4}, Toshimichi Nagashima^{5,6}, Natsuo Shimizu^{1,7}, Akiko Ohashi^{3,4},
 Shuichi Sato^{2,7}, Mitsuru Motoyoshi^{8,9}, Morio Tonogi^{6,10}, Tomihisa Takahashi^{3,4}

¹Division of Applied Oral Science, Nihon University Graduate School of Dentistry

²Department of Periodontology, Nihon University School of Dentistry

³Department of Anatomy, Nihon University School of Dentistry

⁴Division of Functional Morphology, Dental Research Center, Nihon University School of Dentistry

⁵Division of Oral Structural and Functional Biology Nihon University Graduate School of Dentistry

⁶Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Nihon University School of Dentistry

⁷Division of Advanced Dental Treatment, Dental Research Center, Nihon University School of Dentistry

⁸Department of Orthodontics, Nihon University School of Dentistry

(受付: 令和 3 年 12 月 10 日)

責任著者連絡先: 藤原恭子

日本大学歯学部解剖学第Ⅰ講座

日本大学歯学部総合歯学研究所機能形態部門

〒101-8310 東京都千代田区神田駿河台 1-8-13

TEL: 03-3219-8120

FAX: 03-3219-8318

E-mail: fujiwara.kyoko@nihon-u.ac.jp

⁹Division of Clinical Research, Dental Research Center, Nihon University School of Dentistry

¹⁰Division of Immunology and Pathobiology, Dental Research Center, Nihon University School of Dentistry

Abstract: Purpose: Transcription factor AP-2 epsilon (TFAP2E), a member of the AP2 transcription factor family, plays pivotal roles in regulation of early development of the nervous system and chondrocytes. Recent studies strongly suggested that it acts as a tumour suppressor in several types of cancer cells. Recently, we established shTFAP2E-1 and shTFAP2E-2 clones by stably transducing a TFAP2E short harpin RNA (shRNA) expressing vector into the human gingival carcinoma-derived Ca9-22 cells. To identify target genes of TFAP2E and elucidate the molecular mechanisms underlying its tumor suppressor function, we conducted global gene expression analysis to compare gene expression pattern between shTFAP2E-1 and shN/C-1.

Methods: Global gene expression was examined by microarray analysis. Gene expression analyses in the clones were performed by real-time PCR (qPCR), and enrichment analysis was performed using the DAVID functional annotation tool.

Results: Microarray analysis identified 110 and 171 genes showed > 2-fold up- or downregulation in shTFAP2E-1 compared to the control clone, shN/C-1, respectively. qPCR and enrichment analysis demonstrated downregulation of RERG and CDKN1A, which are components of the PI3K-Akt signalling pathway, in shTFAP2E-1 and shTFAP2E-2 compared to the control clones, shN/C-1 and shN/C-2.

Conclusions: This study suggested that the tumour suppressive function of TFAP2E is mediated by regulation of RERG and CDKN1A transcription.

Keywords: TFAP2E, oral squamous cell carcinoma, RERG, CDKN1A

緒 言

Activator protein-2 (AP-2) ファミリーに属する転写因子は、胚発生や発癌に関連する多くの遺伝子の発現を調節する^{1,2)}。AP-2 遺伝子ファミリーは TFAP2A, TFAP2B, TFAP2C, TFAP2D および TFAP2E の 5 つのメンバーで構成され、各メンバーは二量体形成に必要な C 末端側の helix-span-helix モチーフや、中央部の DNA 結合ドメインにみられる α -helix 構造等、高度に保存された共通配列をもつ¹⁾。AP-2 ファミリーメンバーの一つである TFAP2E は、マウス胚発生の過程で、中枢神経系に発現する遺伝子として同定されている³⁾。さらに詳細な解析の結果、発生過程のマウス網膜のアマクリン細胞に発現することや⁴⁾、マウスの嗅球の発生において必須の遺伝子である⁵⁾ことが判明した。また、TFAP2E はマウスおよびヒトの軟骨分化の過程でも発現し、軟骨の形成において重要な働きをもつインテグリン $\alpha 10$ の発現制御に関与することが報告されている⁶⁾。すなわち、TFAP2E をノックアウトしたマウスでは関節軟骨の matrix metalloproteinase 13 の発現が亢進し、人為的に誘導した変形性関節症の重症度が野生型マウスと比較して亢進していた⁷⁾。

これらの報告に加え、TFAP2E はヒト染色体の 1p34 に位置するが、このゲノム領域が多くの癌で欠失していること⁸⁾から TFAP2E が癌抑制遺伝子として機能することが知られている。また、マウス皮膚有棘細胞癌では、TFAP2E の第 3 イントロンに位置する CpG island が、正常皮膚と比べて高メチル化しており、TFAP2E の発現

も低下している⁹⁾。このゲノム領域のメチル化は、ヒト大腸癌や胃癌での抗癌剤耐性と関係しており、この領域が高メチル化するほど、TFAP2E の発現レベルが低下し、5-フルオロウラシル (5-FU) への反応性が鈍くなる^{10,11)}。また、神経芽腫患者では、腫瘍組織の TFAP2E の発現レベルが低いほど生存期間が短いことや、神経芽腫由来株化細胞における TFAP2E の発現抑制はシスプラチンや放射線照射などで生じる DNA 損傷や、それにとまなう細胞死を阻害することが報告されている¹²⁾。これらの報告は、TFAP2E が癌抑制遺伝子として機能していることを示すものであるが、その詳細な作用機序については不明な点が多い。

我々は、舌、口唇、口腔底に好発する口腔扁平上皮癌 (OSCC)¹³⁾にみられる TFAP2E の発現を shRNA によって抑制することで、OSCC の発生や悪性化における TFAP2E の役割について検討している。OSCC の罹患率と死亡率は年々上昇傾向にあり、2019 年の統計では日本で 1 年間に約 7,000 人が死亡している¹⁴⁾。一般的に、OSCC の治療は外科的な切除が主体であり、病期や部位、組織型あるいは患者の健康状態等に応じて、放射線治療あるいは抗癌剤治療が術後の補助療法として選択される¹⁵⁾。しかし、口腔やその周辺領域の外科的治療は、咀嚼、嚥下、構音等の機能や顔貌に大きな変化をもたらすため、温存療法が強く求められている。そのため、近年では放射線治療と抗癌剤治療が並行しておこなわれ、寛解した場合は外科治療を回避することも選択されるようになった¹⁵⁾。また、根治治療後の OSCC の再発に際しては、さらに放射線治療と抗癌剤治療との比重が高くなる¹⁵⁾。し

たがって、有効かつ安全性の高い抗腫瘍薬の開発を行うために、OSCC の新規治療標的となる分子を同定し、OSCC の発生または悪性化の機序を解明することが極めて重要となる。

本研究では、OSCC に発現している癌抑制遺伝子の TFAP2E の機能を解明するための一助とするため、TFAP2E shRNA 発現ベクターを導入したヒト歯肉癌由来株化細胞 Ca9-22 において特異的に発現している遺伝子を網羅的にスクリーニングし、TFAP2E の標的候補として可能性の高い分子の同定を試みた。

材料および方法

1. shRNA の導入と細胞の培養

TFAP2E mRNA を標的とした shRNA または、特定の標的を持たないコントロール shRNA をコードする二本鎖オリゴ DNA を pLV-H1-EF1a-puro ベクター (Biosettia, San Diego, CA, USA) に挿入した。これらのベクターはウイルス・パッケージング・ベクター・ミックス pLV-PACK 500 (Biosettia) とともに 293 T 細胞へ導入し、shRNA ベクターを内包するレンチウイルスを得た。Ca9-22 を 1×10^5 細胞/ml の密度で播種し、24 時間後に shRNA 含有レンチウイルスを $6 \mu\text{g}/\text{mL}$ のポリブレン存在下で細胞に感染させた。その後、 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ のピューロマイシン存在下で培養することによって、shRNA ベクターが導入された細胞を選択し、いくつかのクローンを得た。このうち TFAP2E shRNA ベクター導入クローン (shTFAP2E-1, shTFAP2E-2) とコントロール shRNA ベクター導入クローン (shC/N-, shC/N-2) を本研究に使用した。

培養は α -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), 600 mg/L のグルタミン, 1 ng/mL のピューロマイシン (富士フィルム和光純薬, 大阪), 100 IU/mL のペニシリン (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) と 100 mg/mL のストレプトマイシン (Thermo Fisher Scientific) を添加した培地を使用した。全ての細胞は湿度 100%, 37 °C, 5%CO₂ に設定したインキュベータで培

養した。

2. 網羅的遺伝子発現解析

shTFAP2E-1 と shC/N-1 の間で発現レベルが異なる遺伝子を同定するため、マイクロアレイを利用した。各細胞を 5×10^3 個/mL の密度で直径 10 cm の培養皿に 3 枚ずつ播種し、24 時間後に細胞から全 RNA を抽出した。抽出には RNeasy mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) を使用し、カラムに RNA を吸着させた状態で DNase I 処理をおこない、付属バッファーで洗浄後、超純水によって溶出した。抽出した RNA のマイクロアレイ解析は、マクロジェン社に委託した。マイクロアレイは Clariom S Assay Human (Thermo Fisher Scientific) を使用し、各細胞からの RNA を 3 サンプルずつ実験に供した。得られたデータは、affymetrix power tools (APT; affymetrix-power-tools.html) と R 3.3.3 (<https://www.r-project.org/>) で解析した。全てのデータは signal space transformation-robust multichip analysis (SST-RMA) アルゴリズムによって標準化したのち、有意差検定を実施した。

3. Enrichment 解析

マイクロアレイによって、shTFAP2E-1 と shC/N-1 の間で 2 倍以上の発現差を認めた遺伝子を対象に、DAVID functional annotation tool (<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>) を利用して、enrichment 解析を実施した。なお、P value が 0.05 以下を統計的有意とした。この解析で有意差のあった遺伝子カテゴリーのうち、Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway に属するものを絞り込んだ。

4. Real-time RT-PCR (qPCR)

細胞を 5×10^3 個/mL の密度で直径 6 cm の培養皿に播種し、24 時間後に RNeasy mini kit を使用して細胞から全 RNA を抽出した。cDNA の合成は、iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, USA) を利用した。TB Green Premix Ex Taq (タカラバイオ, 草津) で増幅することで、各遺伝子の発現レベルを qPCR によって調べた。使用したプライマーを表 1 に示す。qPCR はサーマルサイクラーの CFX Maestro

表 1 プライマーの配列

Gene	Forward (5' - 3')	Reverse (5' - 3')
MMP13	CCTTGATGCCATTACCACTCTCC	AAACAGCTCCGCATCAACCTGC
SMARCA1	AACCTGGCAAGTGCTGATGTGG	CAGTGTGTGTCAGTGATGAGACGG
TNFRSF9	TCTTCCTCACGCTCCGTTTCTC	TGGAATCGGCAGCTACAGCCA
PTPRB	TCTTCCCACAAAGTGTTGTGG	AGCCAGGAAACGCTGAGGTAAGT
MMP10	TCCAGGCTGTATGAAGGAGAGG	GGTAGGCATGAGCCAAACTGTG
RERG	CAACCTACCGACACCAAGCAAC	TGTCGTAGACCAGCACAAAGCC
TNFRSF10D	CTGCTGGTCCAGTGAATGACG	TTTTCCGAGCCACCAGTTGGT
FBXO32	CACTGGTCCAAAGAGTCGGCAA	GCACAAAGGCAGGTCAGTGAAG
CDKN1A	AGGTGGACCTGGAGACTCTCAG	TCCTCTTGGAGAAGATCAGCCG

(Bio-Rad laboratories)を使用し、95℃で30秒間反応させた後、95℃、5秒間と60℃、30秒間の反応を40回繰り返した。測定はすべて3回ずつ実施した。なお、Ca9-22から抽出したRNAを鋳型に合成したcDNAの段階希釈液から、各遺伝子の標準曲線を算出した。Student *t* 検定は、統計解析ソフト JMP バージョン 11.2 (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA) を利用した。

結 果

1. shTFAP2E と shN/C の間で発現レベルが異なる遺伝子のスクリーニング

マイクロアレイによって、shTFAP2E-1 と shN/C-1 の間で発現レベルの異なる遺伝子を網羅的に解析した。その結果、shN/C-1 と比較して shTFAP2E-1 で2倍以上高い発現レベルを示した遺伝子が110個、逆に171個の2倍以上発現が低下した遺伝子が確認できた。これらの遺伝子は表2、3に列記した。このうち TFAP2E の標的遺伝子が存在するか確認するため、マイクロアレイによって解析したクローン (shTFAP2E-1, shN/C-1)、およびマイクロアレイ解析を実施しなかったクローン (shTFAP2E-2, shN/C-2) にみられる遺伝子の発現パターンを qPCR によってそれぞれ比較検討した。TFAP2E の発現抑制によって発現レベルが低下した遺伝子は TFAP2E の直接的な標的である可能性が高いため、shTFAP2E-1 で発現低下を示した遺伝子群 (表3) のうち、特に shN/C-1 との差が大きかったものについて詳細

に確認した。プライマーが問題なく合成でき、再現性の高いデータが得られた遺伝子の解析結果を図1に示す。マイクロアレイで示された通り、これらの遺伝子が shN/C-1 よりも shTFAP2E-1 で高い発現を示したことは、qPCR でも確認できた。また、解析した遺伝子の中で、ras-related and estrogen-regulated growth inhibitor (RERG) のみが、shTFAP2E-1 と shTFAP2E-2 の両クローンにおいて低い発現を示した。

2. shTFAP2E で発現低下した遺伝子群の特徴

shTFAP2E-1 と shN/C-1 の間で有意な発現差がみられた遺伝子の中で、機能的に共通した特徴をもつ遺伝子グループが存在するかどうかを、enrichment 解析によって調べた。shN/C-1 と shTFAP2E-1 の間で2倍以上の有意な発現差がみられた遺伝子の中で、統計的に有意な遺伝子カテゴリーを抽出し、KEGG pathway に属するものを絞り込んだ。その結果、shTFAP2E-1 で発現が低下した遺伝子群の中に、24種類のKEGG pathway が含まれていることが確認できた (表4)。一方、shTFAP2E-1 において発現が上昇していた遺伝子群の中には、有意に多く含まれる KEGG pathway は認められなかった。

shTFAP2E-1 で発現が低下した遺伝子群に特徴的な24種類の pathway の特徴について調べたところ、8種類が細菌やウイルスの感染に関わるもの、別の8種類が免疫系の反応に関わるものであった。shTFAP2E-1 は shN/C-1 と比べて高い生存率を示すことがわかっているが、得られた24種類の pathway のうち、細胞増殖や細

表2 shTFAP2E-1 で発現が上昇していた遺伝子

Gene Symbol	Description	Fold change	p value
CPA4	carboxypeptidase A4	6.173	0.E+00
IFI44	interferon-induced protein 44	6.125	0.E+00
CXCL16	chemokine (C-X-C motif) ligand 16	6.022	0.E+00
GALNT10	polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 10	4.621	0.E+00
EGR1	early growth response 1	4.404	0.E+00
EPAS1	endothelial PAS domain protein 1	4.231	0.E+00
PLCB4	phospholipase C, beta 4	4.199	0.E+00
SLC9A3R2	solute carrier family 9, subfamily A (NHE3, cation proton antiporter 3), member 3 regulator 2	4.114	0.E+00
DDX60	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 60	3.811	0.E+00
ADAM12	ADAM metallopeptidase domain 12	3.697	1.E-12
PRKAG2	protein kinase, AMP-activated, gamma 2 non-catalytic subunit	3.460	0.E+00
ZNF850	zinc finger protein 850	3.408	3.E-13
TIMM17A	translocase of inner mitochondrial membrane 17 homolog A (yeast)	3.296	0.E+00
RAB7B	RAB7B, member RAS oncogene family	3.237	2.E-07
ITGB2	integrin, beta 2 (complement component 3 receptor 3 and 4 subunit)	3.228	1.E-06
SEMA3B	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3B	3.196	4.E-06
ZNF385B	zinc finger protein 385B	3.188	0.E+00
EZH2	enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit	3.141	0.E+00
SLC31A2	solute carrier family 31 (copper transporter), member 2	3.001	0.E+00

胞死に関連するものとして hsa04151 (PI3 K-Akt signaling pathway) が含まれていた。shTFAP2E-1 において有意に発現が低下した遺伝子が、PI3 K-Akt signaling pathway のどこに位置するかを図2に示した。発現低下がみられた各遺伝子は、この pathway 中に広く分布していた。このうち、CDKN1A (p21) は細胞周期の抑制に働くことが知られている。そこで、qPCR によって CDKN1A の発現レベルを調べた結果、shTFAP2E-1 と shTFAP2E-2 の両方のクローンで、CDKN1A の発現が低かった(図3)。

考 察

OSCC に発現している TFAP2E の機能を解明するため、歯肉癌由来株化細胞 Ca9-22 に TFAP2E shRNA を導入したクローンの shTFAP2E-1 とコントロールクローンの shN/C-1 の間で発現レベルに差が認められた遺

伝子を、マイクロアレイによって同定した。発現差の大きい幾つかの遺伝子について、それらの発現レベルを比較した結果、shN/C-1 および shN/C-2 に比べて、shTFAP2E-1 および shTFAP2E-2 の両方で、RERG の発現が低いことが判明した。RERG は、低分子 GTPase の RAS スーパーファミリーに属する遺伝子であり、広く様々な正常組織で発現が認められる¹⁶⁾。一方、乳癌や卵巣癌、腎癌、大腸癌など、多くの悪性腫瘍組織では RERG の発現が低下していることが知られている¹⁷⁾。さらに、RERG を過剰発現させることで乳癌細胞株¹⁶⁾や上咽頭癌細胞株¹⁸⁾の細胞増殖能が低下する報告があるため、RERG は癌抑制遺伝子として機能している可能性が高い。今回の研究から、RERG が TFAP2E の標的遺伝子の1つであり、TFAP2E mRNA の発現抑制によって RERG の発現が低下した可能性が考えられる。

次に、shTFAP2E-1 で発現が低下した遺伝子に特徴的

表3 shTFAP2E-1 で発現が低下していた遺伝子

Gene Symbol	Description	Fold change	p value
MMP13	matrix metalloproteinase 13	-10.345	1.E-65
SMARCA1	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 1	-9.036	1.E-40
TNFRSF9	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9	-8.795	4.E-57
CHAC1	ChaC glutathione-specific gamma-glutamylcyclotransferase 1	-8.759	2.E-92
SLITRK6	SLIT and NTRK-like family, member 6	-8.460	6.E-34
ADAM28	ADAM metalloproteinase domain 28	-6.218	5.E-19
HAS2	hyaluronan synthase 2	-4.896	8.E-49
PTPRB	protein tyrosine phosphatase, receptor type, B	-4.726	1.E-14
MMP10	matrix metalloproteinase 10	-4.665	5.E-13
DUSP10	dual specificity phosphatase 10	-4.664	3.E-41
RERG	RAS-like, estrogen-regulated, growth inhibitor	-4.602	3.E-19
EMP3	epithelial membrane protein 3	-4.496	9.E-24
PTH1LH	parathyroid hormone-like hormone	-4.484	2.E-39
ALDH1A3	aldehyde dehydrogenase 1 family, member A3	-4.403	8.E-72
MMP16	matrix metalloproteinase 16 (membrane-inserted)	-4.372	2.E-12
TNFRSF10D	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10d, decoy with truncated death domain	-4.044	1.E-10
FBXO32	F-box protein 32	-3.928	5.E-23
MMP1	matrix metalloproteinase 1	-3.908	4.E-51
C16orf62	chromosome 16 open reading frame 62	-3.823	1.E-16
HGSNAT	heparan-alpha-glucosaminide N-acetyltransferase	-3.474	1.E-47
C3	complement component 3	-3.401	5.E-13
ITGB8	integrin beta 8	-3.379	5.E-17
CLU	clusterin	-3.267	5.E-19
TNC	tenascin C	-3.213	1.E-29
CTNND1	catenin (cadherin-associated protein), delta 1	-3.177	1.E-33
HERPUD1	homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1	-3.144	4.E-35
DDIT4	DNA damage inducible transcript 4	-3.100	1.E-46
OCRL	Transcript Identified by AceView, Entrez Gene ID(s) 4952	-3.068	3.E-05
SLC7A11	solute carrier family 7 (anionic amino acid transporter light chain, xc-system), member 11	-3.052	5.E-33
ASNS	asparagine synthetase (glutamine-hydrolyzing)	-3.045	6.E-32

な分子経路を enrichment 解析によって絞り込んだ。その結果、細胞増殖や細胞死に関連する pathway として、PI3 K-Akt signaling pathway が含まれていることがわかった。PI3 K-Akt signaling pathway は、細胞増殖を促進するために働くため、癌化はこの経路を活性化する¹⁹⁾。また、多くの癌腫で、TFAP2E の発現低下は抗癌剤効果の細胞死を阻害し、細胞の生存を維持するため¹⁰⁻¹²⁾、shTFAP2E-1 において PI3 K-Akt signaling pathway 遺伝子群の発現低下は、一見矛盾しているように思われた。一方、この pathway の中に位置する p21 (CDKN1A) は、細胞周期の進行を抑制する機能をもつことがよく知られている²⁰⁾。そこで、CDKN1A の発現レベルを各クローン間で比較した結果、コントロールクローンの shN/C-1 あるいは shN/C-2 と比較して、

shTFAP2E-1 と shTFAP2E-2 の両方で、CDKN1A の発現レベルが有意に低かった。この結果は、TFAP2E の発現低下が癌細胞の抗癌剤に対する耐性獲得につながることを示した報告¹⁰⁻¹²⁾と一致しており、CDKN1A が TFAP2E の標的分子の 1 つであると考えられた。

今回、TFAP2E の標的候補分子として、REGG と CDKN1A を同定したが、TFAP2E の発現抑制によって確認できた REGG と CDKN1A の発現減少が、実際に OSCC の生存率の上昇に直接繋がっているか検討する必要がある。具体的には、1) OSCC にみられる REGG や CDKN1A の発現を抑制することで、OSCC の細胞増殖能が亢進するか、2) OSCC に TFAP2E を過剰発現させることによって REGG と CDKN1A の発現が促進するか、さらに、3) TFAP2E が REGG あるいは CDKN1A

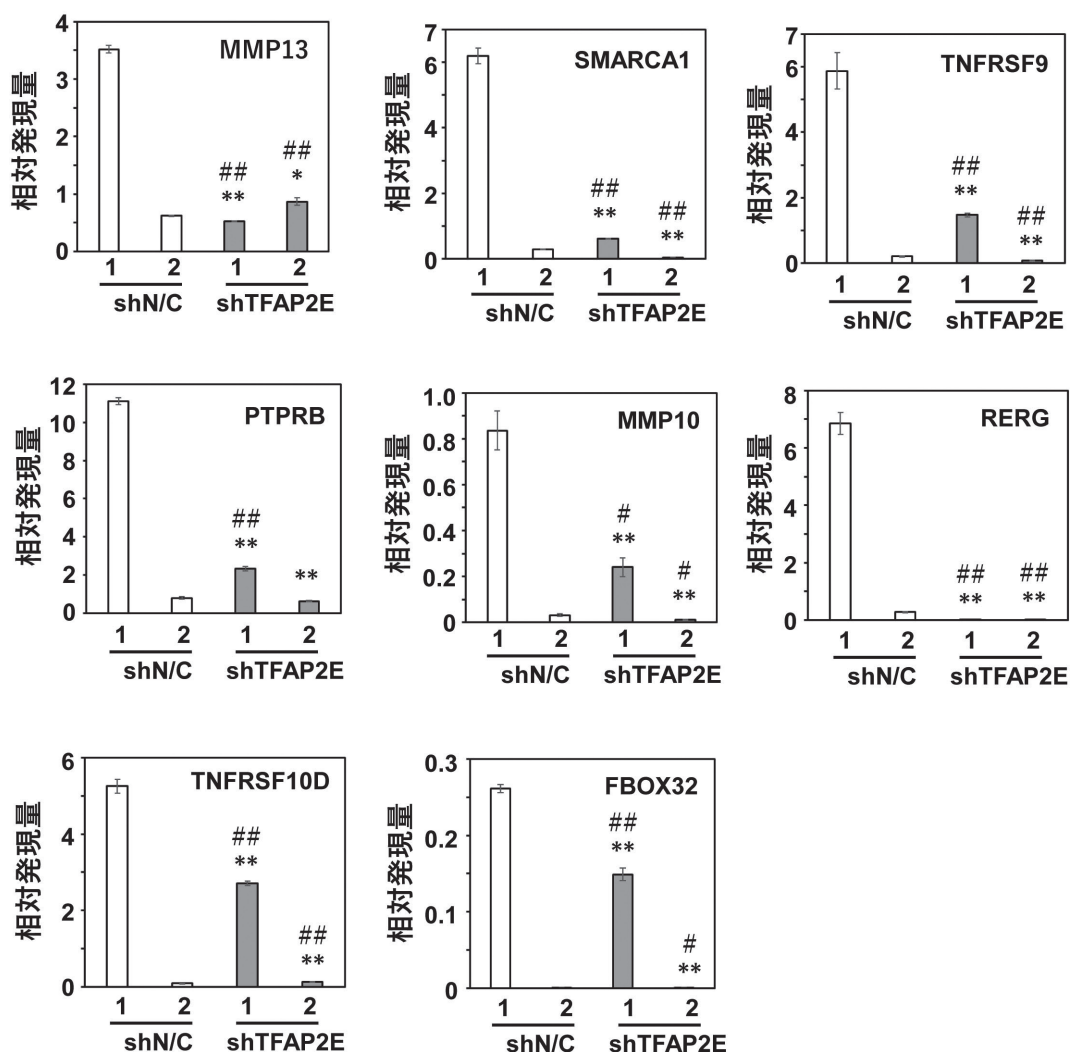


図1 マイクロアレイ解析によって得られた候補遺伝子の解析
 マイクロアレイによって shN/C-1 と比較して shTFAP2E-1 で有意な発現低下を示した遺伝子の発現レベルを、qPCR によって検討した。shTFAP2E-1, shTFAP2E-2, shN/C-1, shN/C-2 の 4 クローンにおける各遺伝子の発現レベルは、それぞれ 3 回測定し、その結果を平均値 ± SD で表した。*, ** は shN/C-1, #, ## は shN/C-2 との有意差を示す。*, #P < 0.05, **, ##P < 0.01。

の遺伝子のプロモーターに直接結合することができるかを、今後の課題としたい。ところで、shTFAP2E-1 で有意に発現低下を示した遺伝子群が属する 24 種類の pathway の大半は、感染または免疫反応に関係するものであったが、これらの遺伝子リストの中には主要組織適合性抗原をコードする HLA-DRB5 と HLA-DOB も含まれていた。この二つの分子は、細胞増殖や細胞死に関連する機能はほとんどもっていない。shTFAP2E-1 において HLA-DRB5 と HLA-DOB の遺伝子発現が低下していたことが、細胞機能の維持にどのような影響を与えるのかは不明であるが、今後、検討を加える必要がある。

結 論

ヒト歯肉癌由来株化細胞の Ca9-22 へ TFAP2E shRNA を導入し、TFAP2E の発現が持続的に低下したクローン (TFAP2E-1 と TFAP2E-2) とコントロールクローン (shN/C-1 と shN/C-2) との間で、発現レベルに違いがある遺伝子をマイクロアレイによって同定した結果、以下の結論を得た。

1. shTFAP2E-1 で有意に 2 倍以上に発現が上昇した遺伝子を 110 個、逆に発現が低下した 171 個の遺伝子を同定した。
2. これらの遺伝子のうち、RERG の発現は、shN/C-1 と shN/C-2 と比較して TFAP2E-1 と TFAP2E-2 のどちらも低かった。
3. shTFAP2E-1 で発現が低かった 171 個の遺伝子に特徴的な pathway を enrichment 解析によって絞り込んだ結果、PI3 K-Akt signaling pathway が該当した。PI3 K-Akt signaling pathway に含まれる CDKN1A の遺伝子発現は、shN/C-1 と shN/C-2 に比較して、TFAP2E-1 と TFAP2E-2 の両方で低かった。

なお、本研究の一部は、日本大学総合歯学研究所研究費(B)、日本大学歯学部佐藤研究費、および JSPS 科研費 20 K09999 によって行なわれた。

本論文に関して、開示すべき利益相反はない。

表 4 shTFAP2E-1 で発現が低下していた遺伝子に特徴的な KEGG pathway

Pathway	Count	%	PValue	Genes
hsa05140:Leishmaniasis	8	5.0	7.27E-06	IRAK1, HLA-DRB5, PTGS2, HLA-DOB, C3
hsa05164:Influenza A	11	6.9	1.01E-05	HLA-DRB5, TNFRSF10D, PIK3CD, NXT2, IKBKE, IRF9, HLA-DOB
hsa04514:Cell adhesion molecules (CAMs)	9	5.7	9.61E-05	NEGR1, HLA-DRB5, CNTN1, ITGB8, CDH2, HLA-DOB
hsa05150:Staphylococcus aureus infection	6	3.8	2.17E-04	HLA-DRB5, HLA-DOB, C3
hsa05310:Asthma	5	3.1	2.33E-04	HLA-DRB5, HLA-DOB
hsa05169:Epstein-Barr virus infection	8	5.0	2.41E-04	IRAK1, HLA-DRB5, PIK3CD, CDKN1A, TNFAIP3
hsa05416:Viral myocarditis	6	3.8	2.80E-04	SGCB, HLA-DRB5, HLA-DOB
hsa05332:Graft-versus-host disease	5	3.1	3.40E-04	HLA-DRB5, HLA-DOB
hsa05330:Allograft rejection	5	3.1	5.32E-04	HLA-DRB5, HLA-DOB
hsa04940:Type I diabetes mellitus	5	3.1	8.68E-04	HLA-DRB5, HLA-DOB
hsa04672:Intestinal immune network for IgA production	5	3.1	0.0013299	HLA-DRB5, HLA-DOB
hsa05320:Autoimmune thyroid disease	5	3.1	0.0019418	HLA-DRB5, HLA-DOB
hsa05323:Rheumatoid arthritis	6	3.8	0.0020496	MMP1, HLA-DRB5, HLA-DOB
hsa05168:Herpes simplex infection	8	5.0	0.0026587	HLA-DRB5, IKBKE, IRF9, HLA-DOB, C3
hsa05321:Inflammatory bowel disease (IBD)	5	3.1	0.0041534	HLA-DRB5, HLA-DOB
hsa05412:Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC)	5	3.1	0.0048958	ITGB6, SGCB, ITGB8, DSC2, CDH2
hsa05145:Toxoplasmosis	6	3.8	0.0053775	IRAK1, HLA-DRB5, HLA-DOB
hsa04612:Antigen processing and presentation	5	3.1	0.0076458	HLA-DRB5, HLA-DOB
hsa05152:Tuberculosis	7	4.4	0.0095784	IRAK1, HLA-DRB5, HLA-DOB, C3
hsa05322:Systemic lupus erythematosus	6	3.8	0.0121339	HLA-DRB5, HLA-DOB, C3
hsa05166:HTLV-I infection	8	5.0	0.0153089	HLA-DRB5, LCK, PIK3CD, CDKN1A, HLA-DOB
hsa04145:Phagosome	6	3.8	0.0189555	HLA-DRB5, HLA-DOB, C3
hsa04151:PI3K-Akt signaling pathway	9	5.7	0.0249399	ITGB6, TNC, SPP1, EIF4EBP1, ITGB8, CREB5, PIK3CD, CDKN1A, DDIT4
hsa04650:Natural killer cell mediated cytotoxicity	5	3.1	0.0368217	TNFRSF10D, LCK, PIK3CD, PTK2B

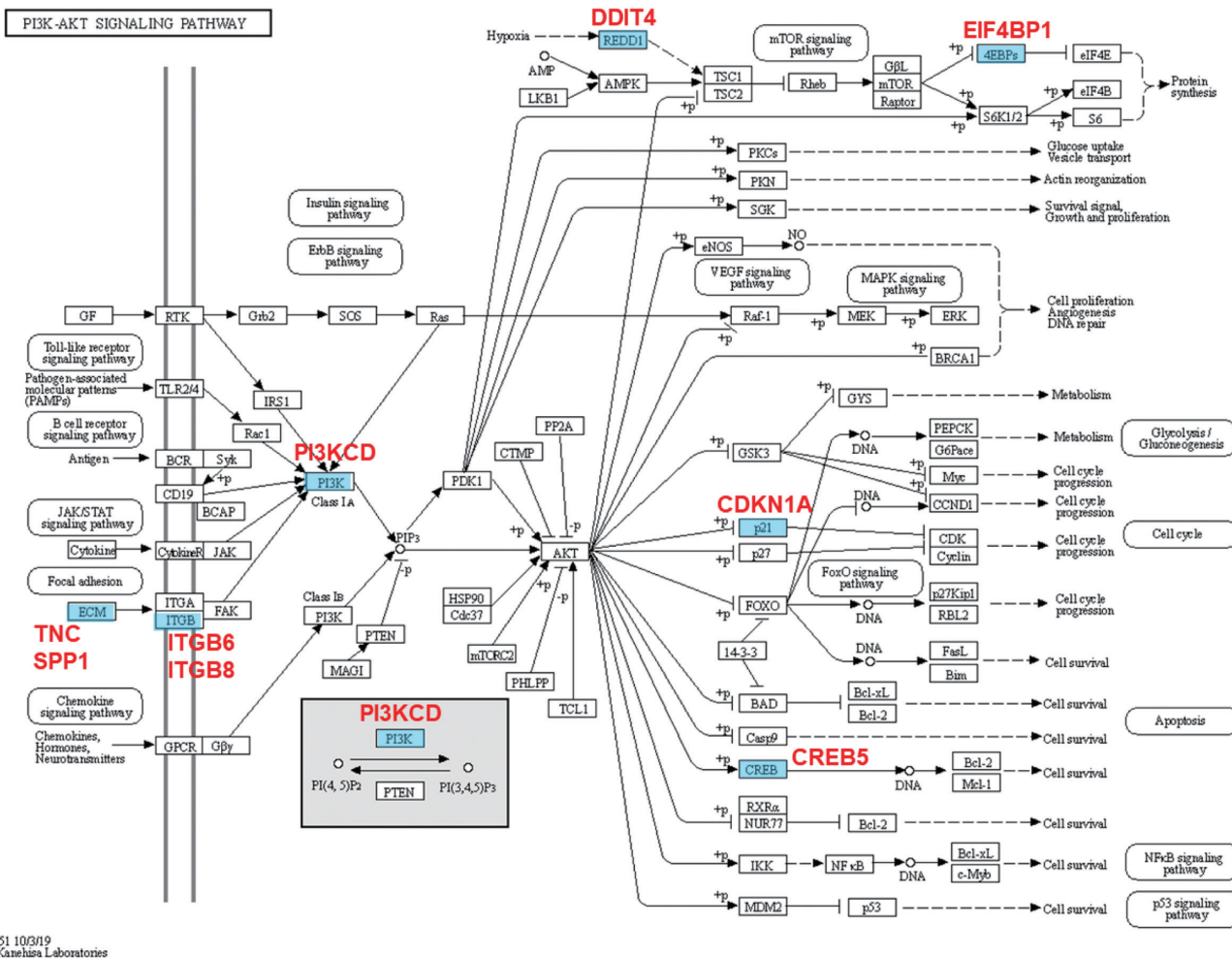


図 2 shTFAP2E-1 で低発現を示した遺伝子の PI3K-Akt signaling pathway 上での分布
 マイクロアレイによって shN/C-1 と比較して shTFAP2E-1 で 2 倍以上の発現低下を示した遺伝子のうち、KEGG pathway および hsa04151 (PI3 K-Akt signaling pathway) に属するものを青色で示した。表 4 のリストの名前を赤字で表した。

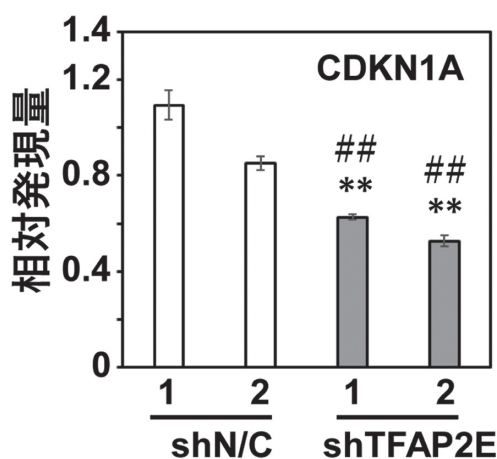


図 3 CDKN1A の発現レベルの解析
 shTFAP2E-1, shTFAP2E-2, shN/C-1, shN/C-2 の 4 クローンにみられる CDKN1A の発現レベルを qPCR で調べた。それぞれ 3 回測定し、その結果を平均値 ± SD で表した。*, ** は shN/C-1, *, ## は shN/C-2 との有意差を示す。*, #P < 0.05, **, ##P < 0.01。

文献

- 1) Eckert D, S. Buhl, S. Weber, R. Jäger, H. Schorle (2005) The AP-2 family of transcription factors. *Genome Biol* 6, 246.
- 2) Pellikainen JM, Kosma VM (2007) Activator protein-2 in carcinogenesis with a special reference to breast cancer—a mini review. *Int J Cancer* 120, 2061-2067.
- 3) Wang HV, Vaupel K, Buettner R, Bosserhoff AK, Moser M (2004) Identification and embryonic expression of a new AP-2 transcription factor, AP-2 epsilon. *Dev Dyn* 231, 128-135.
- 4) 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.
- 5) Feng W, Simoes-de-Souza F, Finger TE, Restrepo D, Williams T (2009) Disorganized olfactory bulb lamination in mice deficient for transcription factor AP-2ε. *Mol Cell Neurosci* 42, 161-171.
- 6) Wenke AK, Rothhammer T, Moser M, Bosserhoff AK

- (2006) Regulation of integrin $\alpha 10$ expression in chondrocytes by the transcription factors AP-2 ϵ and Ets-1. *Biochem Biophys Res Commun* 345, 495-501.
- 7) Niebler S, Schubert T, Hunziker EB, Bosserhoff AK (2015) Activating enhancer binding protein 2 epsilon (AP-2 ϵ)-deficient mice exhibit increased matrix metalloproteinase 13 expression and progressive osteoarthritis development. *Arthritis Res Ther* 17, 119.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) Kumar M, Nanavati R, Modi TG, Dobariya C (2016) Oral cancer: etiology and risk factors: a review. *J Cancer Res Ther* 12, 458-463.
- 14) 国立がん研究センター. がん統計「口腔・咽頭」. https://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/stat/cancer/3_oral.html (2021年11月8日アクセス).
- 15) 日本癌治療学会. がん診断ガイドライン「口腔がん」. <http://www.jsco-cpg.jp/oral-cavity-cancer/guideline/#VI> (2021年11月8日アクセス).
- 16) Finlin BS, Gau CL, Murphy GA, Shao H, Kimel T, Seitz RS, Chiu YF, Botstein D, Brown PO, Der CJ, Tamanoi F, Andres DA, Perou CM (2001) RERG is a novel ras-related, estrogen-regulated and growth-inhibitory gene in breast cancer. *J Biol Chem* 276, 42259-42267.
- 17) Key MD, Andres DA, Der CJ, Repasky GA (2006) Characterization of RERG: an estrogen-regulated tumor suppressor gene. *Methods Enzymol* 407, 513-527.
- 18) Zhao W, Ma N, Wang S, Mo Y, Zhang Z, Huang G, Midorikawa K, Hiraku Y, Oikawa S, Murata M, Takeuchi K (2017) RERG suppresses cell proliferation, migration and angiogenesis through ERK/NF- κ B signaling pathway in nasopharyngeal carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 36, 88.
- 19) Rascio F, Spadaccino F, Rocchetti MT, Castellano G, Stallone G, Netti GS, Ranieri E (2021) The pathogenic role of PI3K/AKT pathway in cancer onset and drug resistance: an updated review. *Cancers (Basel)* 13, 3949.
- 20) Kreis NN, Louwen F, Yuan J (2015) Less understood issues: p21(Cip1) in mitosis and its therapeutic potential. *Oncogene* 34, 1758-1767.