

口腔扁平上皮癌細胞に対するメチル基転移酵素阻害剤とヒストン
脱アセチル化酵素阻害剤の併用処理による細胞傷害作用の増強

牛尾 亮介

明海大学大学院歯学研究科

歯学専攻

(指導：山本 信治)

**Enhanced Cytotoxic Effects of Combination Treatment with Methyltransferase Inhibitors
and Histone Deacetylase Inhibitors on Human Oral Squamous Cell Carcinoma Cells**

Ryosuke USHIO

Meikai University Graduate School of Dentistry

(Mentor: Prof. Nobuharu YAMAMOTO)

要 旨

細胞のがん化は、遺伝子変異や染色体転座などのゲノム異常とDNAのメチル化やヒストンタンパク質のメチル化、アセチル化などの修飾により起こるエピゲノム異常が関与している。がん細胞の増殖やがん関連遺伝子の発現制御におけるDNAメチル基転移酵素阻害剤(DNA methyltransferase inhibitor: DNMTi), ヒストンメチル基転移酵素阻害剤(histone methyltransferase inhibitor: HMTi), ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (histone deacetylase inhibitor: HDACi)の単剤効果については検討されているが、口腔扁平上皮癌に対するこれら阻害剤の併用効果やその抗がん作用の分子機構については十分には明らかにはされていない。本研究では口腔扁平上皮癌細胞に対するDNMTi, HMTi, HDACiの併用処理による細胞傷害作用と、その分子機構について検討を行った。

ヒト口腔扁平上皮癌細胞株Ca9-22細胞, HSC-2細胞に種々な濃度のDNMTi (5-Aza-2'-deoxycytidine : 5-Aza-dC, RG108), HMTi (3-deazaneplanocin A: DZNep), HDACi (trichostatin A : TSA)を添加し、細胞増殖率を測定した。5-Aza-dC, TSAは、各々単独処理で濃度依存的にCa9-22細胞, HSC-2細胞の細胞増殖率を低下させた。低濃度の5-Aza-dCとTSA, RG108とTSAの併用処理により両細胞の細胞増殖率のさらなる低下が認められた。またCa9-22細胞ではDZNepとTSAの併用処理によっても細胞増殖率のさらなる低下を認めた。この細胞増殖率の低下がアポトーシスあるいは細胞周期の停止によるものなのか、caspase 3/7活性および細胞周期について検討した。その結果、Ca9-22細胞ではTSAの単独処理によりcaspase 3/7の活性化が認められたが、5-Aza-dCとTSA, RG108とTSAの併用処理による増強は認められなかった。しかし、DZNepとTSAの併用処理によりcaspase 3/7活性の有意な増強が認められた。一方、HSC-2細胞ではTSAの単独処理および併用処理によるcaspase 3/7活性の増強は認められなかった。

細胞周期解析からCa9-22細胞ではDZNepとTSAの併用処理によりS期の増加が認められ、またRG108とTSA, DZNepとTSAの併用処理によりG2/M期の増加が認められた。HSC-2細胞では、5-Aza-dCとTSA, DZNepとTSAの併用処理によりS期の増加が認められた。さらに5-Aza-dCとTSAの

併用処理により顕著なG2/M期の増加が認められた。この細胞周期の停止にDNA損傷が関わっているか、二本鎖DNA切断の指標であるヒストンバリエントH2AXのリン酸化(γ H2A.X)についてwestern blot法にて検討した。その結果、Ca9-22細胞では5-Aza-dC, DZNep, TSAの単独処理により約2倍の γ H2A.Xの上昇が認められ、さらに5-Aza-dCとTSA, RG108とTSA, DZNepとTSAとの併用処理により γ H2A.Xは増強された。またHSC-2細胞においても5-Aza-dCの単独処理により1.5倍の γ H2A.Xの上昇が認められ、5-Aza-dCとTSA, RG108とTSA, DZNepとTSAとの併用処理により γ H2A.Xは増強された。

以上の結果から、5-Aza-dC, RG108とTSAの併用処理による細胞増殖率の低下は、アポトーシス単独によるものではなくDNA傷害によるS期、G2/M期での細胞周期の停止が関与していることが示唆された。一方、Ca9-22細胞では、DZNepとTSAの併用処理でcaspase 3/7の活性の増強が認められたことからアポトーシスとS期、G2/M期での細胞周期の停止が関与していることが示唆された。本研究から得られた知見は、低濃度のDNMTi, HMTi, HDACiの併用によるエピゲノム療法が口腔扁平上皮癌に対して有効であることを示唆するものである。

索引用語：口腔扁平上皮癌細胞, DNAメチル基転移酵素阻害剤, 5-Aza-dC, ヒストンメチル基転移酵素阻害剤, DZNep, ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤, TSA, 細胞増殖, 細胞周期, アポトーシス, H2A.X

Abstract

Carcinogenesis involves genomic abnormalities such as gene mutations and chromosomal translocations, and epigenomic abnormalities caused by DNA methylation and the modifications of histone methylation and acetylation. The treatment with DNA methyltransferase inhibitors (DNMTi), histone methyltransferase inhibitors (HMTi), and histone deacetylase inhibitors (HDACi) in regulating cancer cell growth and cancer-related gene expression have been investigated. However, the combined effects of these inhibitors on oral squamous cell carcinoma cells and the molecular mechanisms of their anticancer effects have not been fully elucidated. In this study, we investigated the cytotoxic effects of combination treatment with DNMTi, HMTi, and HDACi on oral squamous cell carcinoma cells and their molecular mechanisms.

Human oral squamous cell carcinoma cell lines Ca9-22 and HSC-2 were treated with various concentrations of DNMTi (5-Aza-deoxycytidine: 5-Aza-dC, RG108), HMTi (3-deazaneplanocin A: DZNep), and HDACi (trichostatin A: TSA). 5-Aza-dC and TSA decreased the cell proliferation rate of Ca9-22 and HSC-2 cells in a concentration-dependent manner. Combined treatment with low concentrations of 5-Aza-dC or RG108 and TSA further decreased the cell proliferation of both cells. In Ca9-22 cells, the combined treatment with DZNep and TSA further decreased the cell proliferation rate. To determine whether the decrease in cell proliferation was due to apoptosis or cell cycle arrest, caspase activity and cell cycle were assessed. In Ca9-22 cells, although activation of caspase 3/7 was detected in TSA alone, no further increase in the caspase activity was observed in the combination of 5-Aza-dC or RG108 and TSA. However, the combination with DZNep and TSA significantly increased the caspase activity in Ca9-22 cells. In HSC-2 cells, there was no enhancement of caspase 3/7 activity by TSA alone or by the combined treatment with 5-Aza-dC or RG108 and TSA. Cell cycle analysis showed that in Ca9-22 cells, treatment with 5-Aza-dC, DZNep and TSA alone or in combination with DZNep and TSA increased S phase, and combined treatment with RG108 and TSA or with DZNep and TSA increased G2/M phase. In HSC-2 cells, S phase was increased by treatment with 5-Aza-dC and RG108 alone, and by combined treatment with 5-Aza-dC and TSA, DZNep and TSA. Furthermore, treatment with 5-Aza-dC alone or in combination with 5-Aza-dC and TSA resulted in a significant increase in G2/M phase. To

determine whether DNA damage was involved in the cell cycle arrest, the phosphorylation of the histone variant H2A.X (γ H2A.X), which is a marker of double-stranded DNA breaks (DDB), was examined by western blotting. In Ca9-22 cells, the treatment with 5-Aza-dC, RG108, DZNep and TSA alone increased the γ H2A.X by about 2-fold, and the combined treatment with 5-Aza-dC, RG108, DZNep and TSA enhanced the phosphorylation. In HSC-2 cells, 5-Aza-dC alone increased the γ H2A.X by 1.5-fold, and the combined treatment with 5-Aza-dC, RG108, DZNep and TSA enhanced the phosphorylation.

These results suggest that the decrease in cell proliferation caused by the combined treatment of 5-Aza-dC, RG108 and TSA is not due to apoptosis alone, but also involves cell cycle arrest in the S and G2/M phase due to DNA damage. These results suggest that epigenomic therapy with a combination of low concentrations of DNMTi, HMTi, and HDACi is effective against oral squamous cell carcinoma.

Key words : Oral squamous cell carcinoma cells, DNA methyltransferase inhibitor, 5-Aza-dC, histone methyltransferase inhibitor, DZNep, histone deacetylation inhibitor, TSA, cell proliferation, cell cycle, apoptosis, H2A.X

緒言

細胞のがん化は、がん原遺伝子の活性化やがん抑制遺伝子の不活性化を起こす遺伝子異常により起こる¹⁾。これらの遺伝子異常は、遺伝子変異や染色体転座などのゲノム異常とDNAのメチル化やヒストンタンパク質のメチル化、アセチル化などの修飾により起こるエピゲノム異常が関与している¹⁻³⁾。エピゲノム異常は、DNAやヒストンのメチル化やアセチル化などの化学修飾により、高次のクロマチン構造が変化し、その結果、遺伝子の発現異常がもたらされる^{2,3)}。一般に、DNAメチル化は転写抑制に、ヒストンのアセチル化は転写活性化に作用し、多くのがんのエピゲノム状態は正常細胞とは異なることが報告されている^{2,3)}。このため、エピゲノムを標的としてこれを制御するエピゲノム薬が開発され、種々な悪性腫瘍に対してある程度の治療効果が示されている⁴⁾。

DNAメチル化は、DNAメチル基転移酵素 (DNA methyltransferase : DNMT) によって CpG dinucleotides 配列のシトシンの炭素元素へのメチル基の導入による⁵⁾。癌抑制遺伝子である Retinoblastoma tumor suppressor gene (*Rb*), *p16^{INK4a}*, Breast-cancer susceptibility gene (*BRCA1*)などのプロモーター領域では、CpGアイランドの高頻度メチル化が観察されている²⁾。これらの癌抑制遺伝子のプロモーター領域にDNAメチル化が起こると、転写因子の結合が阻害され、コリプレッサー複合体と相互作用するメチル化CpG結合タンパク質によって、遺伝子発現が抑制される⁶⁾。このエピゲノム異常により発現抑制された癌抑制遺伝子の発現を回復させることが、がん治療の一つの戦略として考えられおり、これまでいくつかのDNAメチル化阻害剤が開発されてきている⁴⁾。ヌクレオシド系のDNMT阻害剤 (DNMT inhibitor: DNMTi) である5-aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-dc) は、DNA複製時にDNA鎖に取り込まれ、DNMT1に不可逆的に結合し、その活性を阻害することでDNAの脱メチル化が誘導される⁷⁾。新規の非ヌクレオシド系低分子DNMTiであるRG108は、細胞毒性が低く、DNMTの活性部位を阻害することで発現抑制された癌抑制遺伝子を脱メチル化することが示されている⁸⁾。しかしながらRG108の口腔扁平上皮癌細胞に対する抗腫瘍効果やエピゲノム薬の併用効果については、明らかにされていない。

DNAのメチル化以外にも、ヒストンタンパク質のN-末端部のリジン残基のメチル化やアセチル化などの翻訳後修飾が遺伝子制御に関与している⁹⁾。クロマチンの基本単位であるヌクレオソームは、コア

ヒストンであるヒストンH2A, H2B, H3, H4が2分子ずつ集まり8量体を形成し、その周囲を146 bpのDNAが巻き付いている⁹⁾。一般的にヒストンのアセチル化は、DNAとヒストンとの結合を緩め、オープンでアクティブなクロマチン状態をもたらす。ヒストンのメチル化は修飾されたリジン残基の位置に応じて遺伝子発現の活性化や抑制など多様な効果をもたらす⁹⁾。ヒストンメチル基転移酵素 (histone methyltransferase: HMT)であるEnhancer of zeste homolog 2 (EZH2)¹⁰⁾は、ヒストンH3の27番目のリジン残基のトリメチル化 (H3K27me3) を誘導し、遺伝子発現を抑制する¹¹⁾。EZH2の過剰発現は前立腺癌や乳癌など、進行性・転移性の表現型を持つ多くの固形癌で観察されている¹²⁻¹⁴⁾。EZH2のヒストンメチル化酵素活性は、HMT阻害剤 (HMT inhibitor: HMTi) である3-deazaneplanocin A (DZNep)によって抑制される¹⁵⁾。DZNepの効果は口腔扁平上皮癌を含む多数の固形腫瘍で報告されているが^{16,17)}、DNMTiとの併用による抗腫瘍効果については明らかにされていない。

ヒストンのアセチル化は、ヒストンアセチル化酵素 (histone acetyltransferases: HAT) によってヒストンH3およびH4にアセチル基が付加されることによって誘導され、転写の活性化したクロマチン状態をもたらす¹⁸⁾。この転写活性化は、HATによるヒストンのリジン残基のアセチル化によりリジンの塩基性電荷が失われ、ヒストンのDNAへの結合力が弱まり、その結果転写因子の結合が促進されることによる¹⁹⁾。ヒストン脱アセチル化酵素 (histone deacetylase: HDAC) は、アセチル化されたヒストンから負に荷電したアセチル基を取り除くことによりクロマチン構造が凝縮され、遺伝子発現が抑制される^{20,21)}。HDACは転写抑制複合体に多く含まれており、メチル化されたDNA領域にリクルートされ、ヒストンを脱アセチル化して転写抑制状態をさらに強化する^{5,20)}。またHDACは、DNA複製やDNA損傷修復にも関係する非ヒストンタンパク質の制御にも関わっており、HDACの阻害によりDNA損傷の修復が抑制され、癌細胞の細胞死を誘導する²²⁾。そのため、HDAC阻害剤 (HDAC inhibitor: HDACi) は、その治療効果の可能性から抗がん剤として注目されている^{23,24)}。Trichostatin A (TSA) は、強力で特異的なHDACiであり^{25,26)}、クロマチンの再構成や転写因子複合体のタンパク質の構造変化によって、遺伝子の転写を変化させることが示されている²⁷⁾。口腔扁平上皮癌を含めた頭頸部扁平上皮癌細胞において、TSAなどのHDACiは、細胞周期の停止、アポトーシスの誘導や遺伝子発現に対する影響について多くの報告がなされ

ている²⁸⁻³³⁾。HDACiの抗腫瘍作用は、血液系腫瘍に対する前臨床試験では有効であるとされているが、固形腫瘍に対するHDACiの単剤療法は限定的であることが報告されている³⁴⁾。そのためHDACiとDNMTiを含む他の抗がん剤やエピゲノム薬との併用療法は、抗腫瘍効果を高めるために多くの固形腫瘍で検討されている³⁵⁻⁴⁰⁾。しかし、口腔扁平上皮癌細胞に対するHDACiとDNMTiなどのエピゲノム薬との併用による抗腫瘍効果の有効性とそのメカニズムについては十分には明らかにされていない⁴¹⁻⁴³⁾。

このようにDNAのメチル化とヒストンの翻訳後修飾による遺伝子発現制御は密接に関連していることから、多くの悪性腫瘍においてエピゲノム薬の併用療法の有効性について検討がなされている⁴²⁾、⁴⁴⁻⁴⁶⁾。しかしながら口腔扁平上皮癌に対するこれらエピゲノム薬の併用効果やその抗がん作用の分子機構については未だ不明な点が多い。本研究では口腔扁平上皮癌細胞に対するDNMTi, HMTi, HDACiの併用処理による細胞傷害作用とその分子機構について検討を行い、口腔扁平上皮癌に対するエピゲノム療法の有効性について検討した。

材料と方法

1. 試薬

5-Aza-dCは、Selleck Chemicals (Houston, TX, USA)から、またRG108およびHMTi であるDZNepは、Tocris Bioscience (Bristol, UK) から入手した。TSAはMerk (Darmstadt, Germany) からまた、dimethyl sulfoxide (DMSO)、ヨウ化プロピジウム、プロテアーゼ阻害剤 cocktail、および脱リン酸化酵素阻害剤 cocktailは、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)から購入した。Cell counting kit-8は、同仁 (熊本, 日本) から入手した。Caspase-Glo 3/7 Assay Systemは、Promega (Madison, WI, USA)より入手した。5-Aza-dC, RG108, TSAはDMSOに溶解し、DZNepは蒸留純水に溶解し、使用するまで-20°Cで保存した。

2. 細胞培養

ヒト口腔扁平上皮癌細胞株Ca9-22 (cat# JCRB0625) およびHSC-2 (cat# JCRB0622) は、Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB) セルバンク (大阪) から入手した。Ca9-22細胞は歯肉癌の原発巣から⁴⁷⁾、またHSC-2細胞は口腔底に由来する頸部リンパ節転移巣から⁴⁸⁾分離された細胞株であり、病理組織学的には高分化型とされている^{47,48)}。細胞培養には、非働化した10% 牛胎仔血清 (fetal bovine serum: FBS; Bio West, Miami, FL, USA), 1% penicillin G/streptomycin sulfate (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA)を含むRPMI1640培地 (Thermo Fisher Scientific)(以下 完全培地) 中で、37°C, 5% CO₂の条件下で培養し、3日ごとに継代した。継代には、phosphate-buffered saline (PBS; Thermo Fisher Scientific)にて細胞を洗浄後、0.25% trypsin / 0.01% EDTA (Thermo Fisher Scientific)を用いて単一細胞懸濁液を得て所定の細胞数に調整し、継代および実験に用いた。

3. 細胞増殖率の測定

Ca9-22細胞およびHSC-2細胞は、96穴平底プレート (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA) に 3×10^3 cells/wellの細胞密度で播種し、完全培地を用いて37°C, 5%CO₂の条件下で24時間培養した後、種々な濃度のDNMTi (5-Aza-dc, RG108) , HMTi (DZNep) , HDACi (TSA) を添加し、

24, 48, 72, 96時間処理した。対照群には、阻害剤添加量と同量の溶媒DMSOを加えた。所定時間培養後、Cell counting Kit-8 (同仁) のWST-8試薬 (10 μ l)を各ウェルに添加し、37°C、5%CO₂条件下で2時間培養し、マイクロプレートリーダー (Multiskan Bichromatic; Labsystems Diagnostics, Helsinki, Finland) を用いて450 nmの吸光度で測定した。細胞増殖率は、対照群の細胞増殖率を100%として阻害剤添加群の増殖率の割合 (%)を算出した。

4. Caspase活性の測定

Caspase 活性は、Caspase-Glo 3/7 Assay System (Promega) を用いて測定した。Ca9-22 細胞, HSC-2 細胞を細胞増殖率の測定と同じ細胞数で96 穴白色平底プレート (Thermo Fisher Scientific) に播種し、完全培地を用いて 37°C、5%CO₂の条件下で 24 時間培養した後、種々な濃度の阻害剤を添加し、24 時間処理した。阻害剤処理後、各ウェルから 100 μ l の培養上清を除去し、Caspase-Glo 3/7 Assay 試薬 (化学発光体 ルンフェリンを付加させたcaspase 3/7 の基質) 100 μ l を各ウェルに添加し、プレート用シール (BM Bio, 東京)を貼付し、30 秒間震盪後、37°C、30 分間反応させルミノメーター (centroXS3 LB960, BERTHOLD, Bad Wildbad, Germany)を用いて化学発光を測定した。Caspase 活性は、対照群の caspase 活性を1.0 とし、阻害剤添加群のcaspase 活性の倍率として算定した。

5. 細胞周期解析

Ca9-22 細胞および HSC-2 細胞をそれぞれ3.6 $\times 10^5$ cells/well および 1.8 $\times 10^5$ cells/well の細胞密度で 6 cm dish (Becton Dickinson Labware) に播種し、完全培地で24 時間培養後、各種阻害剤を添加し、48, 72, 96 時間培養した。培養後、0.25% trypsin/ 0.01% EDTA (Thermo Fisher Scientific) を用いて細胞を回収し、氷冷した PBS で洗浄後、70%冷エタノール (和光純薬, 川越)で固定した。その後、細胞を 250 μ g/ml の RNase A (ニッポンジーン, 東京) で 37°C、30 分間処理した後、50 μ g/ml のヨウ化プロピジウム (propidium iodide: PI; Sigma-Aldrich) を添加し4°C、30 分間処理した。細胞周期解析は、PI 染色した1 $\times 10^4$ 個の細胞をフローサイトメーター (Cell Sorter SH800, Sony, 東京) で分析し、細胞周期の異なるステ

ージにある細胞の割合 (%) は, Cell Sorter Software Ver 2.1 (Sony) を用いて解析した.

6. 細胞抽出液の調整

Ca9-22 細胞および HSC-2 細胞をそれぞれ 1×10^6 cells/dish および 5×10^5 cells/dish の細胞密度で 10 cm dish (Becton Dickinson Labware) に播種し, 完全培地で 24 時間培養後, 各種阻害剤を添加し, 48, 72 時間培養した. 培養後, 氷冷した PBS で洗浄し, セルスクレーパー (CORNING, Corning, NY, USA) を用いて細胞を回収し, 4°C , $2,400 \times g$ で 3 分間遠心し, 沈殿した細胞に 300 μl の IP kinase buffer (50 mM HEPES [pH 8.0], 150 mM NaCl, 2.5 mM EGTA, 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol [DTT], 0.1% Tween 20, 10% glycerol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride [PMSF], 1% プロテアーゼ阻害剤 cocktail, 1% 脱リン酸化酵素阻害剤 cocktail #2, #3, 1 mM NaF, 1 mM NaVO_4) を加えて懸濁した. この細胞懸濁液を氷上で 10 分間静置した後, 超音波破碎機 (Bioruptor UCW-310, Sonicbio, 神奈川) で細胞を破碎し, $12,000 \times g$ で 10 分間遠心分離して上清を細胞抽出液とした. 得られた細胞抽出液のタンパク質濃度は, タンパク質色素試薬 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用いて Bradford 法⁴⁹⁾で測定した.

7. Western blot 法

細胞抽出液は, $4 \times$ Laemmli Sample buffer (BioRad) を用いて, 一定のタンパク質量に調製した. その後, 95°C , 5 分間で熱変性させた後, 4-20% Mini-PROTEAN TGX Stain-Free Precast Gels (Bio-Rad) を用いて SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った. 泳動終了後, 各レーンの総タンパク質の画像を Chemi Doc MP イメージングシステム (Bio-Rad) を用いてデジタル化した後, セミドライ式転写装置 (Trans-Blot Turbo, Bio-Rad) を用いて, polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜 (Bio-Rad) に転写した. 転写終了後, PVDF 膜は, 5% bovine serum albumin (BSA, Roche, Basel, Switzerland) を含む Tris buffered saline (TBS)-Tween buffer (20 mM Tris-HCl [pH 7.4], 137.5 mM NaCl, 0.1% Tween-20) を用い, 室温にて 1 時間ブロッキング処理を行った. ブロッキング後, rabbit anti-human phospho-H2A.X (Ser139) monoclonal 抗体 (希釈倍率 1/1,000; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) を 4°C , 12 時間反応後, その膜を TBS-Tween buffer で 3 回洗浄し, 二次抗体として horseradish peroxidase を

標識した donkey anti-rabbit IgG antibody (希釈倍率 1/2,000; GE Healthcare, Chicago, IL, USA)を添加した。二次抗体反応後、その膜にWest Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce, Rockford, IL, USA) を用いて化学発光させ、化学発光シグナルを Chemi Doc MP イメージングシステム (Bio-Rad) を用いてデジタル画像化した。一次抗体により検出された特異的バンドの発現量は、総タンパク質量に対して標準化し、対照群に対する倍率として算出した。

7. 統計解析

統計学的解析は、解析ソフトGraphPad Prism9 (Version 9.1.0, GraphPad Software, San Diego, CA, USA)を用いて行い、3群以上の多群間の比較には一元配置分散分析 (one-way analysis of variance: one-way ANOVA) による有意性を確認した後、対照群との多重比較検定にはDunnett法、各群の比較検定にはTurkey法を用いた。有意水準は、0.05とし、 $p < 0.05$ を統計学的に有意差ありとした。

結果

1. 口腔扁平上皮癌細胞に対するDNMTiの細胞増殖率に及ぼす影響

まず始めに口腔扁平上皮癌細胞に対するDNMTiの処理時間を決定するため、Ca9-22細胞およびHSC-2細胞に5-Aza-dC (2 μ M)または溶媒としてのDMSOを添加し、細胞増殖率を経時的にCell counting kit-8を用いて測定した (Fig 1A, B). その結果、5-Aza-dC添加後、72時間よりCa9-22細胞、HSC-2細胞の細胞増殖率の有意な低下が認められた。次に5-Aza-dCの最小有効濃度を決定するために、種々な濃度の5-Aza-dCを添加し、72時間後の細胞増殖率を測定した (Fig 1C, D). 5-Aza-dCは、濃度依存的にCa9-22細胞およびHSC-2細胞の細胞増殖率を有意に低下させた。Ca9-22細胞、HSC-2細胞に対する5-Aza-dCの最小有効濃度は、それぞれ0.05 μ M, 0.1 μ Mであった。以下の実験で行うエピゲノム薬の併用処理では、HSC-2細胞の細胞増殖率の低下が認められた0.1 μ M の濃度の5-Aza-dCを使用することにした。

次に作用機序の異なる非ヌクレオシド系DNMTiであるRG108のCa9-22細胞、HSC-2細胞の細胞増殖率に及ぼす影響を検討した (Fig 2). RG108 100 μ Mの添加後、24時間から96時間における両細胞の増殖率に有意な低下は認められなかった (Fig 2A, B). そこで種々な濃度のRG108を添加し、72時間後の細胞増殖率を調べたところ、5 μ M, 10 μ Mの低濃度のRG108は、Ca9-22細胞、HSC-2細胞の増殖率を低下させる傾向を示した。しかしながら対照群であるDMSO処理との間に統計学的な有意差は認められなかった。以下の実験で行うエピゲノム薬の併用処理では増殖率の低下傾向を示した 5 μ M の濃度のRG108を使用することにした。

2. 口腔扁平上皮癌細胞に対するHMTiの細胞増殖率に及ぼす影響

つぎにHMTiであるDZNepのCa9-22細胞、HSC-2細胞の細胞増殖率に及ぼす影響について検討した (Fig 3) . DZNep (1 μ M)は、Ca9-22細胞において72時間より細胞増殖率の低下傾向が認められたが統計学的な有意差は認められなかった(Fig 3A). 一方、HSC-2においては72時間より有意な細胞生存率の低下が認められた (Fig 3B).

次に種々な濃度のDZNepの細胞増殖率に対する作用を検討したところ、Ca9-22細胞では濃度依存的な細胞増殖率の低下傾向が見られたが、統計学的な有意な差は認められなかった (Fig 3C) . 一方、低濃度のDZNep (0.1 μ M, 0.2 μ M) は、HSC-2細胞の増殖率を有意に低下させた (Fig 3D) . 以上の結果から、以下の実験で行うエピゲノム薬の併用処理に用いるDZNepの濃度は、0.2 μ Mとした。

3. 口腔扁平上皮癌細胞に対するHDACiの細胞増殖率に及ぼす影響

最後にHDACiであるTSAのCa9-22細胞およびHSC-2細胞の細胞増殖率に及ぼす影響について検討した (Fig 4) . TSA (1 μ M)は、Ca9-22細胞において72時間より (Fig 4A) , またHSC-2においては48時間より (Fig 4B) 有意な細胞増殖率の低下が認められた。そこで種々な濃度のTSAの細胞増殖率に対する作用を検討したところ、Ca9-22細胞およびHSC-2細胞で濃度依存的な細胞増殖率の低下が見られ、両細胞ともにTSA濃度 0.05 μ Mより有意な細胞増殖率の低下が認められた (Fig 4CD) . この結果から以下の実験で行うエピゲノム薬の併用処理で用いるTSAの濃度は、0.05 μ Mとした。

以上のエピゲノム薬の単独処理の結果から、Ca9-22細胞およびHSC-2細胞をRG108, DZNepで単独処理した場合には、細胞増殖率にわずかな影響しか与えなかったが、5-Aza-dc, TSAで処理した場合には細胞増殖率が著しく低下することが明らかとなった。これらの結果に基づき、次にCa9-22および、HSC-2細胞の細胞増殖率に対する最小有効濃度のDNMTi, HMTi およびHDACiの併用処理について検討した。

4. 口腔扁平上皮癌細胞に対するDNMTi, HMTi, HDACiの併用処理の細胞増殖率に及ぼす影響

Fig 5にDNMTi, HMTi, HDACiの併用処理後、72時間におけるCa9-22細胞, HSC-2細胞の細胞増殖率を示す。Ca9-22細胞では5-Aza-dCまたはRG108とTSAの併用処理は、単独処理と比較して有意な細胞増殖率の低下を示した (Fig 5A, lane 7, 10) . またDZNepとTSAの併用処理でも、細胞増殖率が有意に低下した (Fig 5A, lane 11) . さらに5-Aza-dcまたはRG108とDZNepおよびTSAの3剤併用処理では、Ca9-22細胞の細胞増殖率がさらに低下した (Fig 5A, lane 8, 12) . しかし5-Aza-dCまたはRG108とDZNep

の併用処理は、単独処理による細胞増殖率の低下と比較してわずかな効果しか示さなかった (Fig 5A, lane 6, 9) .

HSC-2細胞では、5-Aza-dCまたはRG108とTSAの併用処理で、細胞増殖率に対する抑制効果は増強されたが (Fig 5B, lane 7, 10) , Ca9-22細胞に比べて抑制効果は小さかった. 興味深いことに、Ca9-22細胞で観察されたDZNepとTSAの併用処理 (Fig 5B, lane 11) , およびDNMTi (5-Aza-dc, RG108)とDZNep, TSAの3剤併用処理(Fig 5B, lane 8, 12) による細胞増殖率の抑制の増強作用は認められなかった.

以上の結果から、最小有効濃度のDNMTi (5-Aza-dC, RG108) とHDACi であるTSAの併用処理は、単独処理に比べてCa9-22細胞およびHSC-2細胞の細胞増殖率を有意に減少させることが明らかとなった. またCa9-22細胞ではDZNepとTSAの併用処理によっても細胞増殖率を有意に減少させることが明らかとなった.

5. 口腔扁平上皮癌細胞に対するDNMTi, HMTi, HDACiの併用処理によるcaspase 3/7活性に及ぼす影響

次にこのDNMTi, HMTi, HDACiの併用処理による細胞増殖率の低下がどのようなメカニズムにより誘導されたのか検討するため、アポトーシスの実効分子であるcaspase 3/7 活性^{50,51})について解析した (Fig 6). Ca9-22細胞を各種阻害剤で24時間処理し、caspase 3/7 活性について検討したところ、5-Aza-dC, RG108, DZNepの単独処理によるcaspase 3/7 活性の上昇は認められなかったが (Fig 6A, lane 2,3,4), TSAの単独処理によりcaspase 3/7 活性は約3倍上昇した (Fig 6A, lane 5) . しかし、5-Aza-dCとTSA, RG108とTSAの併用処理によるcaspase 3/7 活性の増強効果は認められなかった (Fig 6A, lane 6, 7) .対照的にDZNepとTSAの併用処理は、Ca9-22細胞のcaspase 3/7 活性を有意に増強させた (Fig 6A, lane 8) . 一方、HSC-2細胞におけるこれらのエピゲノム薬の単独処理および併用処理によるcaspase 3/7活性の有意な上昇は認められなかった (Fig 6B). これらの結果は、DNMTi, HMTi, HDACiの併用処理による細胞増殖率の低下は、アポトーシス単独によるものではないことを示している.

6. 口腔扁平上皮癌細胞に対するDNMTi, HMTi, HDACiの併用処理による細胞周期に及ぼす影響

次にこのDNMTi, HMTi, HDACiの細胞周期に対する影響について検討した。Fig 7にCa9-22細胞におけるエピゲノム薬添加後、48時間における細胞周期の各期の割合を示す。阻害剤添加によるG0/G1期の増加は認められなかったが (Fig 7A), 5-Aza-dC, DZNep, およびTSAの単独処理(Fig 7B, lane 2, 4, 5), およびDZNepとTSAの併用処理(Fig 7B, lane 8)によりS期の増加が認められ, またRG108とTSA, DZNepとTSAの併用処理(Fig 7C, lane 7, 8)によりG2/M期の増加が認められた。

HSC-2細胞では5-Aza-dC, RG108の単独処理 (Fig 7E, lane 2, 3), および5-Aza-dCとTSA, DZNepとTSAの併用処理(Fig 7E, lane 6, 8)によりS期の増加が認められた。また5-Aza-dCの単独処理および5-Aza-dCとTSAの併用処理により顕著なG2/M期の増加が認められ(Fig 7F, lane 2, 6), このG2/M期の増加に伴いG0/G1期の減少が認められた (Fig 7D, lane 2, 6)。

以上の結果から, DNMTi, HMTi, HDACiの単独処理, および併用処理によりCa9-22細胞, HSC-2細胞のS期, G2/M期での細胞周期の停止が誘導されることが明らかとなった。

7. 口腔扁平上皮癌細胞に対するDNMTi, HMTi, HDACiの併用処理によるヒストンH2A.Xのリン酸化に及ぼす影響

次にこの細胞周期の停止にDNA損傷が関わっているか, 二本鎖DNA切断の指標であるヒストンバリエントH2A.Xのリン酸化 (γ H2A.X)⁵²⁾についてwestern blot法にて検討した(Fig 8)。Ca9-22細胞, HSC-2細胞に各種阻害剤を添加し, 72時間後に細胞抽出液を調製し, stain-free gelを用いて分離し, 総タンパク量を測定した。その後, 抗リン酸化H2A.X抗体を用いてwestern blot法により γ H2A.Xの発現を検出し, その発現量は, 総タンパク量に対して標準化した。Ca9-22細胞では5-Aza-dC, DZNep, TSAの単独処理により約2倍の γ H2A.Xの上昇が認められ(Fig 8A, lane 2, 4, 5), さらに5-Aza-dCとTSA, RG108とTSA, DZNepとTSAとの併用処理によりそのリン酸化は増強された(Fig 8A, lane 6, 7, 8)。またHSC-2細胞においても5-Aza-dCの単独処理により1.5倍の γ H2A.Xの上昇が認められ(Fig 8B,

lane 2), 同様に5-Aza-dC, RG108, DZNepとTSAとの併用処理によりそのリン酸化は増強された(Fig 8B, lane 6, 7,8).

この結果は, DNMTi, HMTi, HDACiの単独処理により二本鎖DNA切断が起き, さらに併用処理によりDNA損傷が増強された結果, γ H2A.Xの発現増強が誘導されたことを示唆している. 以上の結果から, DNMTi, HMTi, HDACiの併用処理は, Ca9-22細胞、HSC-2細胞の細胞増殖率を低下させ, その低下はアポトーシスだけでなく細胞周期の停止も関わっていることが明らかとなった.

考 察

細胞のがん化は、遺伝子変異だけでなくDNAのメチル化やヒストンタンパク質のメチル化、アセチル化などによるエピゲノム異常も関与しており、エピゲノムを標的とした薬物療法が臨床応用されている⁴⁾。しかし口腔扁平上皮癌に対するエピゲノム療法の有効性やその分子機構については未だ十分には明らかにされていない。本研究では口腔扁平上皮癌細胞株 Ca9-22細胞, HSC-2細胞に対する低濃度のDNMTi, HMTi, HDACiの併用処理による細胞傷害作用の増強とその分子機構について検討を行った。その結果, DNMTiとして用いた5-Aza-dC, RG108とHDACiとして使用したTSAとの併用処理により, Ca9-22細胞, HSC-2細胞の細胞増殖率が有意に低下した。またCa9-22細胞においては, HMTiであるDZNepとTSAとの併用処理によっても細胞増殖率の低下が認められた。これらのエピゲノム薬の併用による細胞増殖率の低下の分子機構に, アポトーシスとDNA損傷によるS期, G2/M期における細胞周期の停止が関わっていることが示唆された。

DNMTiとHDACiとの併用による細胞増殖率の低下の増強は, 種々な癌細胞株で報告されており³⁵⁻⁴⁰⁾, その分子機構には, エピジェネティックに発現抑制されている癌抑制遺伝子や アポトーシス関連遺伝子などの再活性化によるメカニズム^{35,38-40)}と遺伝子発現誘導に依存しない機構が存在する⁵³⁾。メチル化されたDNA領域には, メチル化CpG結合タンパク質であるmethyl-CpG-binding protein (MeCP2)が結合し, HDACsと複合体を形成し, ヒストンを脱アセチル化して転写抑制状態をさらに強化している^{5,20)}。このDNAメチル化とヒストン脱アセチル化による遺伝子の強固な発現抑制は, TSAと低濃度5-Asa-dCにより再活性化され, 癌抑制遺伝子, 細胞増殖制御遺伝子, アポトーシス関連遺伝子などの発現が誘導されることが報告されている³⁸⁻⁴⁰⁾。一方, DNMTiとHDACiとの併用処理による細胞生存率の低下は, DNA損傷によっても増強することも報告されている⁵³⁾。HDAC は, DNA複製やDNA損傷修復にも関係するAtaxia-telangiectasia mutated (ATM)などの非ヒストンタンパク質の発現制御にも関わっている⁵⁴⁾。HDACは, 種々な癌細胞で発現増強が認められており²⁴⁾, HDACの阻害によりATMなどのDNA修復遺伝子の発現が低下し, DNA損傷の修復が抑制されることで癌細胞の細胞周期の停止, 細胞死が誘導される²²⁾。したがってDNMTiである5-Aza-dCによるDNA損傷が誘導されると^{55,56)}, HDACiによるDNA修復遺伝子の発現

低下により不十分なDNA修復反応が生じ、その結果、DNA損傷が持続することによりG2/M期での細胞周期の停止が誘導される⁵⁴⁾。本研究においてもDNMTiとHDACiの併用処理により、二本鎖DNA切断の指標である γ H2A.X⁵²⁾の発現増強が認められ、その結果、S期、G2/M期での細胞周期の停止が誘導されたと考えられる。

本研究ではHMTiであるDZNepとHDACiであるTSAの併用処理によっても、Ca9-22細胞において細胞生存率の有意な低下が認められた。HMTiであるDZNepは、ポリコーム・リプレッサー複合体2 (Polycomb repressor complex 2 : PRC2)の構成因子であるヒストンメチル基転移酵素EZH2を抑制し、遺伝子発現の抑制的なヒストンコードであるH3K27のトリメチル化 (H3K27me3) を抑制する¹⁵⁾。大腸癌細胞においては、DZNepとTSAとの併用処理により、抑制的ヒストンコードであるH3K27me3の減少と、活性化ヒストンコードであるH3K4のトリメチル化 (H3K4m3)の増加が観察されており、抑制的なクロマチン状態が活性的な状態に変換され、遺伝子発現の大きな変化が認められることが報告されている⁵⁷⁾。また乳癌細胞、急性骨髄性白血病細胞においてはDZNepとTSAとの併用処理によりG2/M期における細胞周期の停止、およびアポトーシスの誘導が認められている^{58,59)}。本研究においてもDZNepとTSAとの併用処理によりS期ならびにG2/M期での細胞周期の停止とcaspase 3/7活性の増強が認められることから、細胞周期制御遺伝子、アポトーシス関連遺伝子の発現が誘導された可能性が考えられる。

本研究では、5-Aza-dCは単独処理によっても濃度依存的に細胞生存率の低下を誘導した。この5-Aza-dCによる細胞生存率の低下は、DNAの脱メチル化に依存しない機序による細胞生存率の低下が考えられる。5-Aza-dCは、ヌクレオシド類似体で、DNA複製時にDNA鎖に取り込まれ、DNMT1に不可逆的に結合し、その活性を阻害することでDNAの脱メチル化が誘導されるが⁷⁾、このとき取り込まれた5-Aza-dCはDNA複製を阻害し、DNA損傷を誘導することが知られている^{55,56)}。本研究では、5-Aza-dCの単独処理によりCa9-22細胞、HSC-2細胞においてDNA二本鎖切断の指標である γ H2A.X⁵²⁾の発現が認められたことから5-Aza-dCが二本鎖DNA切断を招き、細胞周期の停止が誘導されたと考えられる。

RG108は、DNMT1の活性部位を阻害するように設計されたDNMTiであり、大腸癌細胞や前骨髄性白血病細胞において細胞毒性が低いことが報告されている^{8,60)}。本研究においてもRG108は、72時間まで

の単独処理では口腔扁平上皮癌細胞の細胞増殖率の低下を誘導しなかった。しかしRG108とTSAとの併用処理により、Ca9-22細胞、HSC-2細胞の細胞増殖率を低下させた。この併用処理により γ H2A.X⁵²の発現が増強されたことから、同様に二本鎖DNA切断による細胞周期の停止による増殖抑制と考えられる。一方、子宮内膜癌細胞、食道扁平上皮癌細胞においては、RG108は単独処理により細胞生存率の低下を誘導し、また放射線感受性を高めアポトーシスとG2/M期での細胞周期を停止させることが報告されている^{61,62}。このRG108に対する癌細胞の感受性の違いは、染色体の安定性維持に關与するセントロメアのメチル化状態やユークロマチン領域のメチル化の違いに依存している可能性が示唆されている⁸。

本研究では、Ca9-22細胞とHSC-2細胞のエピゲノム薬に対する感受性の違いが認められた。Ca9-22細胞ではHDACiであるTSAの単独処理、またHMTiであるDZNepとTSAとの併用処理により、細胞増殖率が有意に低下し、caspase 3/7活性の増強効果が認められた。一方、HSC-2細胞ではTSAに対する感受性が低く、DZNepとTSAとの併用処理によるcaspase 3/7の活性化や細胞増殖率の低下も認められなかった。このCa9-22細胞とHSC-2細胞でのエピゲノム薬に対する感受性の違いが何に起因しているかについては、本研究では検討していないが、細胞生存や増殖に關与する遺伝子の発現制御に關わる転写因子 nuclear factor κ B (NF- κ B)の恒常的な活性化の違いや^{63,64}癌抑制因子p53 (*TP53*) の変異の違い⁶⁵が關与している可能性が考えられる。NF- κ Bは、多くの癌細胞において恒常的な活性化が認められ、細胞の生存、増殖に關与する遺伝子発現を介して化学療法や放射線療法に対する抵抗性に関わっている⁶⁶。本研究で供試したHSC-2細胞は恒常的なNF- κ Bの活性化が認められることから⁶³、TSAに対する感受性の低下に關与している可能性が考えられる。また癌抑制因子であるp53は、細胞周期の進行、DNA修復、細胞死などを制御し、細胞の悪性転換を抑制する機能を有する⁶⁷。*TP53*は、口腔扁平上皮癌において高頻度に変異が認められ⁶⁸、本実験で供試したCa9-22細胞、HSC-2細胞においても*TP53*の変異の存在が報告されている⁶⁵。この変異には、野生型p53の機能の喪失が認められる変異と、野生型p53とは異なる機能獲得(gain of function)型変異が存在する⁶⁹。HSC-2細胞における*TP53*の変異はエクソン6とイントロン6の境界部のスプライシングドナーのポイントミューテーション (G>A)により、フレームシフトが起こり、エクソン7に終止コドンが出現することが報告されている⁶⁵。予備実験において、HSC-2細胞で

はp53タンパク質の発現が認められないことを確認している (data not shown). 一方, Ca9-22細胞の *TP53*の変異は*TP53*変異のホットスポットであるDNA結合ドメインにおけるミスセンス変異により248番目のアルギニン (R)がトリプトファン (W)に変換したものであり (R248W)⁶⁵⁾, 完全長のp53が産生され, DNA結合活性ならびにタンパク質相互作用を有する性質を持つ⁷⁰⁾. したがって, Ca9-22細胞におけるDZNepとTSAとの併用処理によるアポトーシスの誘導は, 機能獲得型変異p53によりアポトーシス関連遺伝子の発現誘導による可能性が考えられる. 先行研究では急性骨髄性白血病細胞に対する5-Aza-dCとHDACiとの併用処理は, p53R428W変異を有する白血病細胞においてcaspase 3の活性化を誘導することが報告されている⁷¹⁾. またHDACiに対する癌細胞の感受性もp53が失われた細胞よりも機能獲得型変異p53を有する細胞の方が高いことも報告されており⁷²⁾, 本研究結果におけるCa9-22細胞とHSC-2細胞のTSAに対する感受性の違いと一致する. したがって口腔扁平上皮癌に対するエピゲノム療法を考えるとときは恒常的なNF- κ Bの活性化や*TP53*の変異の性状について解析することが重要である.

口腔扁平上皮癌の治療においては外科的切除による顔貌の変化や摂食嚥下障害など患者のQOLの低下が生じる可能性が考えられ, より侵襲性が少なくかつ有効な治療法の開発が必要とされている. 近年, programmed cell death protein-1/2 (PD-1, PD-2) や cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4 (CTLA-4)を標的とする免疫チェックポイント阻害剤による免疫療法は, 第4の治療法として臨床応用されている⁷³⁾. しかしこれらの免疫療法は, 一部の患者に高い抗腫瘍効果を示す一方, 有効性が認められない症例もある^{74,75)}. その不応答性の原因の一つに遺伝子のエピゲノム異常が関与していることが報告されており⁷⁴⁾, 前臨床試験において, エピゲノム薬との併用が免疫療法の奏功性を高めることが示されている⁷⁶⁾. 本研究は, 低濃度のエピゲノム薬の併用が口腔扁平上皮癌に対する化学療法として有効であることを示すとともに, 本研究で得られた知見は免疫療法とエピゲノム療法による併用療法の有効性の分子機構の理解にも貢献するものと考えられる.

結 論

口腔扁平上皮癌細胞株 Ca9-22細胞、HSC-2細胞に対するDNMTi, HMTi, HDACiの併用処理による細胞傷害作用を検討し、以下の結果が得られた。

1. DNMTi である5-Aza-dC, RG108とHDACiであるTSAとの併用処理でCa9-22細胞, HSC-2細胞の増殖率を有意に低下させた。
2. またCa9-22細胞ではHMTiであるDZNepとTSAとの併用処理によっても細胞増殖率の有意な低下が認められた。
3. この併用処理による細胞増殖率の低下の増強作用はアポトーシス単独によるものではなく、二本鎖DNA切断によるS期, G2/M期での細胞周期の停止による増殖抑制も関与していることが示唆された。
4. 本研究結果から、低濃度のメチル基転移酵素阻害剤とHDAC阻害剤の併用によるエピゲノム療法が口腔扁平上皮癌に対して有効であることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるに当たり、本研究に対し終始ご懇切なるご指導とご校閲を賜りました明海大学歯学部 病態診断治療学講座 口腔顎顔面外科学分野 山本信治教授に深甚たる感謝の意を表します。また実験指導、論文作成に終始ご教授、ご校閲を賜りました、口腔生物再生医工学講座 微生物学分野 大森喜弘教授、病態診断治療学講座 高齢者歯科学分野 竹島浩教授ならびに病態診断治療学講座 病理学分野 菊池建太郎教授に厚く御礼申し上げます。また細胞周期解析の技術指導をいただきました 生化学分野 坂東健二郎講師 ならびに終始、実験指導いただいた基礎生物学分野 廣井美紀講師に厚く感謝申し上げます。

Abbreviations

5-Aza-dc	5-aza-2'-deoxycytidine
ATM	Ataxia-telangiectasia mutated
BRCA1	Breast-cancer susceptibility gene
BSA	bovine serum albumin
DNMT	DNA methyltransferase
DNMTi	DNA methyltransferase inhibitor
DTT	dithiothreitol
DZNep	3-deazaneplanocin A
EZH2	Enhancer of zeste homolog 2
HAT	histone acetyltransferases
HDAC	histone deacetylase
HDACi	histone deacetylase inhibitor
HMT	histone methyltransferase
HMTi	histone methyltransferase inhibitor
γ H2A.X	phosphorylated histone variant H2A.X
PBS	phosphate-buffered saline
PI	propidium iodide
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
PRC2	Polycomb repressor complex 2 PVDF polyvinylidene fluoride
Rb	Retinoblastoma tumor suppressor gene
TBS	Tris buffered saline

引用文献

- 1) Hanahan D and Weinberg RA: Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-674, 2011
- 2) Esteller M: Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* **358**, 1148-1159, 2008
- 3) Kanwal R and Gupta S: Epigenetics and cancer. *J Appl Physiol* (1985) **109**, 598-605, 2010
- 4) Hillyar C, Rallis KS and Varghese J: Advances in Epigenetic Cancer Therapeutics. *Cureus* **12**, e11725, 2020
- 5) Bird AP and Wolffe AP: Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin. *Cell* **99**, 451-454, 1999
- 6) Clouaire T and Stancheva I: Methyl-CpG binding proteins: specialized transcriptional repressors or structural components of chromatin? *Cell Mol Life Sci* **65**, 1509-1522, 2008
- 7) Christman JK: 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene* **21**, 5483-5495, 2002
- 8) Brueckner B, Garcia Boy R, Siedlecki P, Musch T, Kliem HC, Zielenkiewicz P, Suhai S, Wiessler M and Lyko F: Epigenetic reactivation of tumor suppressor genes by a novel small-molecule inhibitor of human DNA methyltransferases. *Cancer Res* **65**, 6305-6311, 2005
- 9) Kouzarides T: Chromatin modifications and their function. *Cell* **128**, 693-705, 2007
- 10) Chase A and Cross NC: Aberrations of EZH2 in cancer. *Clin Cancer Res* **17**, 2613-2618, 2011
- 11) Simon JA and Lange CA: Roles of the EZH2 histone methyltransferase in cancer epigenetics. *Mutat Res* **647**, 21-29, 2008
- 12) Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M, Barrette TR, Kumar-Sinha C, Sanda MG, Ghosh D, Pienta KJ, Sewalt RG, Otte AP, Rubin MA and Chinnaiyan AM: The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* **419**, 624-629, 2002
- 13) Klee CG, Cao Q, Varambally S, Shen R, Ota I, Tomlins SA, Ghosh D, Sewalt RG, Otte AP, Hayes DF, Sabel MS, Livant D, Weiss SJ, Rubin MA and Chinnaiyan AM: EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 11606-11611, 2003
- 14) Duan R, Du W and Guo W: EZH2: a novel target for cancer treatment. *J Hematol Oncol* **13**, 104, 2020
- 15) Miranda TB, Cortez CC, Yoo CB, Liang G, Abe M, Kelly TK, Marquez VE and Jones PA: DZNep is a global histone methylation inhibitor that reactivates developmental genes not silenced by DNA methylation. *Mol Cancer Ther* **8**, 1579-1588, 2009
- 16) Li Z, Wang Y, Qiu J, Li Q, Yuan C, Zhang W, Wang D, Ye J, Jiang H, Yang J and Cheng J: The polycomb group protein EZH2 is a novel therapeutic target in tongue cancer. *Oncotarget* **4**, 2532-2549, 2013
- 17) Hatta M, Naganuma K, Kato K and Yamazaki J: 3-Deazaneplanocin A suppresses aggressive

- phenotype-related gene expression in an oral squamous cell carcinoma cell line. *Biochem Biophys Res Commun* **468**, 269-273, 2015
- 18) Yang XJ and Seto E: Collaborative spirit of histone deacetylases in regulating chromatin structure and gene expression. *Curr Opin Genet Dev* **13**, 143-153, 2003
 - 19) Strahl BD and Allis CD: The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**, 41-45, 2000
 - 20) de Ruijter AJ, van Gennip AH, Caron HN, Kemp S and van Kuilenburg AB: Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J* **370**, 737-749, 2003
 - 21) Li Z and Zhu WG: Targeting histone deacetylases for cancer therapy: from molecular mechanisms to clinical implications. *Int J Biol Sci* **10**, 757-770, 2014
 - 22) Miller KM, Tjeertes JV, Coates J, Legube G, Polo SE, Britton S and Jackson SP: Human HDAC1 and HDAC2 function in the DNA-damage response to promote DNA nonhomologous end-joining. *Nat Struct Mol Biol* **17**, 1144-1151, 2010
 - 23) Bolden JE, Peart MJ and Johnstone RW: Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* **5**, 769-784, 2006
 - 24) Li Y and Seto E: HDACs and HDAC Inhibitors in Cancer Development and Therapy. *Cold Spring Harb Perspect Med* **6**, 2016
 - 25) Yoshida M, Kijima M, Akita M and Beppu T: Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J Biol Chem* **265**, 17174-17179, 1990
 - 26) Finnin MS, Donigian JR, Cohen A, Richon VM, Rifkind RA, Marks PA, Breslow R and Pavletich NP: Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature* **401**, 188-193, 1999
 - 27) Xu WS, Parmigiani RB and Marks PA: Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene* **26**, 5541-5552, 2007
 - 28) Suzuki T, Yokozaki H, Kuniyasu H, Hayashi K, Naka K, Ono S, Ishikawa T, Tahara E and Yasui W: Effect of trichostatin A on cell growth and expression of cell cycle- and apoptosis-related molecules in human gastric and oral carcinoma cell lines. *Int J Cancer* **88**, 992-997, 2000
 - 29) Duan J, Friedman J, Nottingham L, Chen Z, Ara G and Van Waes C: Nuclear factor-kappaB p65 small interfering RNA or proteasome inhibitor bortezomib sensitizes head and neck squamous cell carcinomas to classic histone deacetylase inhibitors and novel histone deacetylase inhibitor PXD101. *Mol Cancer Ther* **6**, 37-50, 2007
 - 30) Anh TD, Ahn MY, Kim SA, Yoon JH and Ahn SG: The histone deacetylase inhibitor, Trichostatin A, induces G2/M phase arrest and apoptosis in YD-10B oral squamous

- carcinoma cells. *Oncol Rep* **27**, 455-460, 2012
- 31) Jang B, Kim LH, Lee SY, Lee KE, Shin JA and Cho SD: Trichostatin A induces apoptosis in oral squamous cell carcinoma cell lines independent of hyperacetylation of histones. *J Cancer Res Ther* **14**, S576-S582, 2018
 - 32) He L, Gao L, Shay C, Lang L, Lv F and Teng Y: Histone deacetylase inhibitors suppress aggressiveness of head and neck squamous cell carcinoma via histone acetylation-independent blockade of the EGFR-Arf1 axis. *J Exp Clin Cancer Res* **38**, 84, 2019
 - 33) Kakiuchi A, Kakuki T, Ohwada K, Kurose M, Kondoh A, Obata K, Nomura K, Miyata R, Kaneko Y, Konno T, Kohno T, Himi T, Takano KI and Kojima T: HDAC inhibitors suppress the proliferation, migration and invasiveness of human head and neck squamous cell carcinoma cells via p63mediated tight junction molecules and p21mediated growth arrest. *Oncol Rep* **45**, 2021
 - 34) Hontecillas-Prieto L, Flores-Campos R, Silver A, de Alava E, Hajji N and Garcia-Dominguez DJ: Synergistic Enhancement of Cancer Therapy Using HDAC Inhibitors: Opportunity for Clinical Trials. *Front Genet* **11**, 578011, 2020
 - 35) Cameron EE, Bachman KE, Myohanen S, Herman JG and Baylin SB: Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nat Genet* **21**, 103-107, 1999
 - 36) Zhu WG, Lakshmanan RR, Beal MD and Otterson GA: DNA methyltransferase inhibition enhances apoptosis induced by histone deacetylase inhibitors. *Cancer Res* **61**, 1327-1333, 2001
 - 37) Chai G, Li L, Zhou W, Wu L, Zhao Y, Wang D, Lu S, Yu Y, Wang H, McNutt MA, Hu YG, Chen Y, Yang Y, Wu X, Otterson GA and Zhu WG: HDAC inhibitors act with 5-aza-2'-deoxycytidine to inhibit cell proliferation by suppressing removal of incorporated abases in lung cancer cells. *PLoS One* **3**, e2445, 2008
 - 38) Chen MY, Liao WS, Lu Z, Bornmann WG, Hennessey V, Washington MN, Rosner GL, Yu Y, Ahmed AA and Bast RC, Jr.: Decitabine and suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) inhibit growth of ovarian cancer cell lines and xenografts while inducing expression of imprinted tumor suppressor genes, apoptosis, G2/M arrest, and autophagy. *Cancer* **117**, 4424-4438, 2011
 - 39) Ahrens TD, Timme S, Hoepfner J, Ostendorp J, Hembach S, Follo M, Hopt UT, Werner M, Busch H, Boerries M and Lassmann S: Selective inhibition of esophageal cancer cells by combination of HDAC inhibitors and Azacytidine. *Epigenetics* **10**, 431-445, 2015
 - 40) Abou Najem S, Khawaja G, Hodroj MH, Babikian P and Rizk S: Adjuvant Epigenetic Therapy of Decitabine and Suberoylanilide Hydroxamic Acid Exerts Anti-Neoplastic Effects in Acute Myeloid Leukemia Cells. *Cells* **8**, 2019
 - 41) De Schutter H, Kimpe M, Isebaert S and Nuyts S: A systematic assessment of radiation dose

- enhancement by 5-Aza-2'-deoxycytidine and histone deacetylase inhibitors in head-and-neck squamous cell carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **73**, 904-912, 2009
- 42) Cao W, Zhang ZY, Xu Q, Sun Q, Yan M, Zhang J, Zhang P, Han ZG and Chen WT: Epigenetic silencing of MAL, a putative tumor suppressor gene, can contribute to human epithelium cell carcinoma. *Mol Cancer* **9**,296, 2010
- 43) Hodjat M, Jourshari PB, Amirinia F and Asadi N: 5-Azacitidine and Trichostatin A induce DNA damage and apoptotic responses in tongue squamous cell carcinoma: An in vitro study. *Arch Oral Biol* **133**,105296, 2021
- 44) Minucci S and Pelicci PG: Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat Rev Cancer* **6**, 38-51, 2006
- 45) Linnekamp JF, Butter R, Spijker R, Medema JP and van Laarhoven HWM: Clinical and biological effects of demethylating agents on solid tumours - A systematic review. *Cancer Treat Rev* **54**, 10-23,2017
- 46) Li Y, Li Z and Zhu WG: Molecular Mechanisms of Epigenetic Regulators as Activatable Targets in Cancer Theranostics. *Curr Med Chem* **26**, 1328-1350, 2019
- 47) Kamata N, Chida K, Rikimaru K, Horikoshi M, Enomoto S and Kuroki T: Growth-inhibitory effects of epidermal growth factor and overexpression of its receptors on human squamous cell carcinomas in culture. *Cancer Res* **46**, 1648-1653, 1986
- 48) Momose F, Araida T, Negishi A, Ichijo H, Shioda S and Sasaki S: Variant sublines with different metastatic potentials selected in nude mice from human oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* **18**, 391-395, 1989
- 49) Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254, 1976
- 50) Shi Y: Caspase activation, inhibition, and reactivation: a mechanistic view. *Protein Sci* **13**, 1979-1987, 2004
- 51) Julien O and Wells JA: Caspases and their substrates. *Cell Death Differ* **24**, 1380-1389, 2017
- 52) Georgoulis A, Vorgias CE, Chrousos GP and Rogakou EP: Genome Instability and gammaH2AX. *Int J Mol Sci* **18**, 2017
- 53) Luszczyk W, Cheriya V, Mekhail TM and Borden EC: Combinations of DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibitors induce DNA damage in small cell lung cancer cells: correlation of resistance with IFN-stimulated gene expression. *Mol Cancer Ther* **9**, 2309-2321, 2010
- 54) Thurn KT, Thomas S, Raha P, Qureshi I and Munster PN: Histone deacetylase regulation of ATM-mediated DNA damage signaling. *Mol Cancer Ther* **12**, 2078-2087, 2013
- 55) Sampath D, Rao VA and Plunkett W: Mechanisms of apoptosis induction by nucleoside analogs. *Oncogene* **22**, 9063-9074, 2003

- 56) Ewald B, Sampath D and Plunkett W: Nucleoside analogs: molecular mechanisms signaling cell death. *Oncogene* **27**,6522-6537, 2008
- 57) Jiang X, Tan J, Li J, Kivimae S, Yang X, Zhuang L, Lee PL, Chan MT, Stanton LW, Liu ET, Cheyette BN and Yu Q: DACT3 is an epigenetic regulator of Wnt/beta-catenin signaling in colorectal cancer and is a therapeutic target of histone modifications. *Cancer Cell* **13**, 529-541, 2008
- 58) Hayden A, Johnson PW, Packham G and Crabb SJ: S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibition by 3-deazaneplanocin A analogues induces anti-cancer effects in breast cancer cell lines and synergy with both histone deacetylase and HER2 inhibition. *Breast Cancer Res Treat* **127**, 109-119, 2011
- 59) Valiuliene G, Stirblyte I, Jasnauskaite M, Borutinskaite V and Navakauskiene R: Anti-leukemic effects of HDACi Belinostat and HMTi 3-Deazaneplanocin A on human acute promyelocytic leukemia cells. *Eur J Pharmacol* **799**, 143-153, 2017
- 60) Savickiene J, Treigyte G, Borutinskaite VV and Navakauskiene R: Antileukemic activity of combined epigenetic agents, DNMT inhibitors zebularine and RG108 with HDAC inhibitors, against promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Cell Mol Biol Lett* **17**, 501-525, 2012
- 61) Yang L, Hou J, Cui XH, Suo LN and Lv YW: RG108 induces the apoptosis of endometrial cancer Ishikawa cell lines by inhibiting the expression of DNMT3B and demethylation of HMLH1. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **21**, 5056-5064, 2017
- 62) Ou Y, Zhang Q, Tang Y, Lu Z, Lu X, Zhou X and Liu C: DNA methylation enzyme inhibitor RG108 suppresses the radioresistance of esophageal cancer. *Oncol Rep* **39**, 993-1002, 2018
- 63) Hiroi M and Ohmori Y: Constitutive nuclear factor kappaB activity is required to elicit interferon-gamma-induced expression of chemokine CXC ligand 9 (CXCL9) and CXCL10 in human tumour cell lines. *Biochem J* **376**, 393-402, 2003
- 64) Almeida LO, Abrahao AC, Rosselli-Murai LK, Giudice FS, Zagni C, Leopoldino AM, Squarize CH and Castilho RM: NFkappaB mediates cisplatin resistance through histone modifications in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *FEBS Open Bio* **4**, 96-104, 2014
- 65) Sakai E and Tsuchida N: Most human squamous cell carcinomas in the oral cavity contain mutated p53 tumor-suppressor genes. *Oncogene* **7**, 927-933, 1992
- 66) Li F and Sethi G: Targeting transcription factor NF-kappaB to overcome chemoresistance and radioresistance in cancer therapy. *Biochim Biophys Acta* **1805**, 167-180, 2010
- 67) Bieging KT, Mello SS and Attardi LD: Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nat Rev Cancer* **14**, 359-370, 2014
- 68) Lindemann A, Takahashi H, Patel AA, Osman AA and Myers JN: Targeting the DNA Damage Response in OSCC with TP53 Mutations. *J Dent Res* **97**, 635-644, 2018
- 69) Yue X, Zhao Y, Xu Y, Zheng M, Feng Z and Hu W: Mutant p53 in Cancer: Accumulation, Gain-

of-Function, and Therapy. *J Mol Biol* **429**, 1595-1606, 2017

- 70) Yamamoto S and Iwakuma T: Regulators of Oncogenic Mutant TP53 Gain of Function. *Cancers (Basel)* **11**, 2018
- 71) Nishioka C, Ikezoe T, Yang J, Udaka K and Yokoyama A: Simultaneous inhibition of DNA methyltransferase and histone deacetylase induces p53-independent apoptosis via down- regulation of Mcl-1 in acute myelogenous leukemia cells. *Leuk Res* **35**, 932-939, 2011
- 72) Li D, Marchenko ND and Moll UM: SAHA shows preferential cytotoxicity in mutant p53 cancer cells by destabilizing mutant p53 through inhibition of the HDAC6-Hsp90 chaperone axis. *Cell Death Differ* **18**, 1904-1913, 2011
- 73) Baumeister SH, Freeman GJ, Dranoff G and Sharpe AH: Coinhibitory Pathways in Immunotherapy for Cancer. *Annu Rev Immunol* **34**, 539-573, 2016
- 74) Wang Z and Wu X: Study and analysis of antitumor resistance mechanism of PD1/PD-L1 immune checkpoint blocker. *Cancer Med* **9**, 8086-8121, 2020
- 75) Yi M, Jiao D, Xu H, Liu Q, Zhao W, Han X and Wu K: Biomarkers for predicting efficacy of PD-1/PD-L1 inhibitors. *Mol Cancer* **17**, 129, 2018
- 76) Mazzone R, Zwergel C, Mai A and Valente S: Epi-drugs in combination with immunotherapy: a new avenue to improve anticancer efficacy. *Clin Epigenetics* **9**, 59, 2017

Figure 1

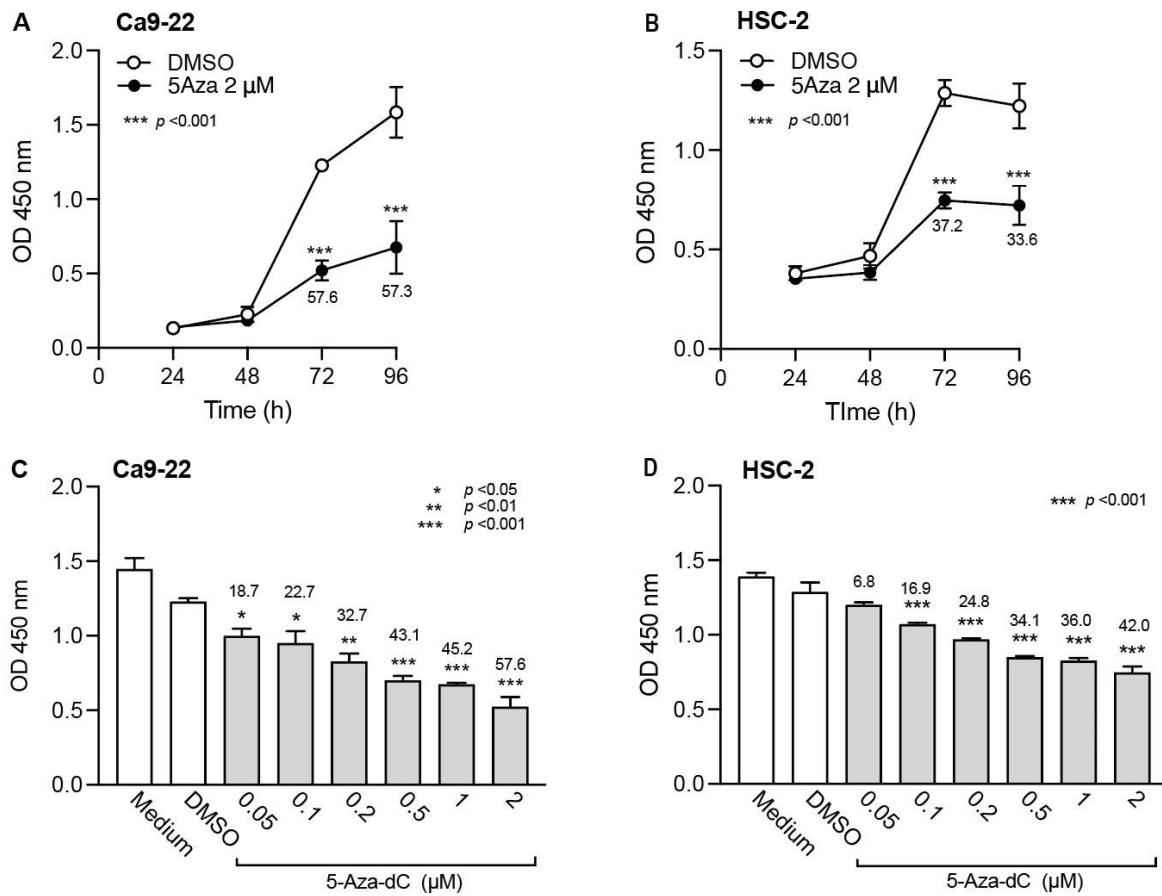


Figure 1. Effect of DNMTi 5-Aza-dC on cell proliferation of Ca9-22 and HSC-2.

Exponentially growing Ca9-22 (A) or HSC-2 (B) cells were treated with 5-Aza-dC (2 μ M) or DMSO for the indicated periods of time, and cell proliferation was measured using a cell counting kit. Various concentrations of 5-Aza-dC were added to exponentially growing Ca9-22 (C) or HSC-2 (D) and cultured for 72 h before measurement of cell proliferation. Data are presented as mean \pm SEM of three independent experiments. Significance for the inhibition of cell proliferation between DMSO-treated and DNMTi-treated samples is indicated. The percentage inhibition of cell viability is shown in the figure.

Figure 2

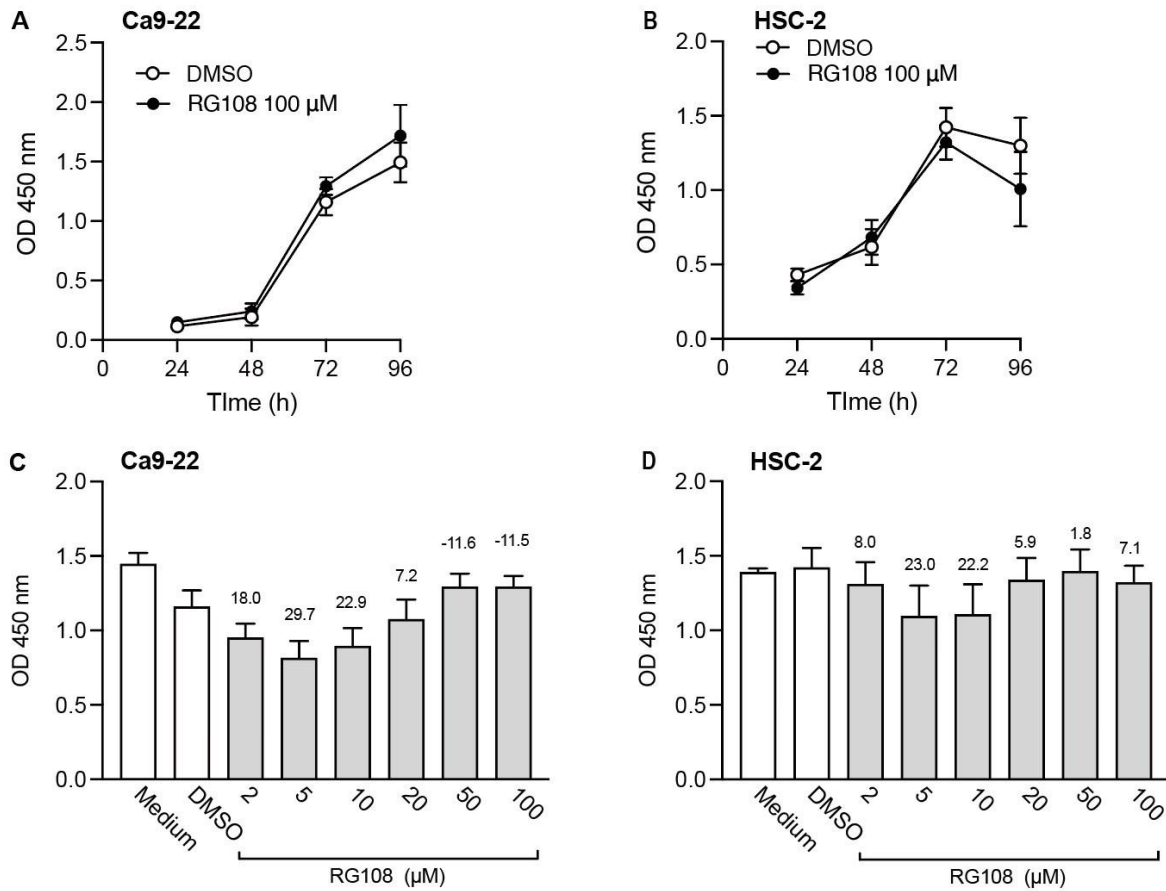


Figure 2. Effect of DNMTi RG108 on cell proliferation of Ca9-22 and HSC-2.

Exponentially growing Ca9-22 (A) or HSC-2 (B) cells were treated with RG1058 (100 μ M) or DMSO for the indicated periods of time, and cell proliferation was measured using a cell counting kit. Various concentrations of RG108 were added to exponentially growing Ca9-22 (C) or HSC-2 (D) and cultured for 72 h before measurement of cell proliferation. Data are presented as mean \pm SEM of three independent experiments. No significance for the inhibition of cell proliferation between DMSO-treated and RG108-treated samples was observed. The percentage inhibition of cell viability is shown in the columns.

Figure 3

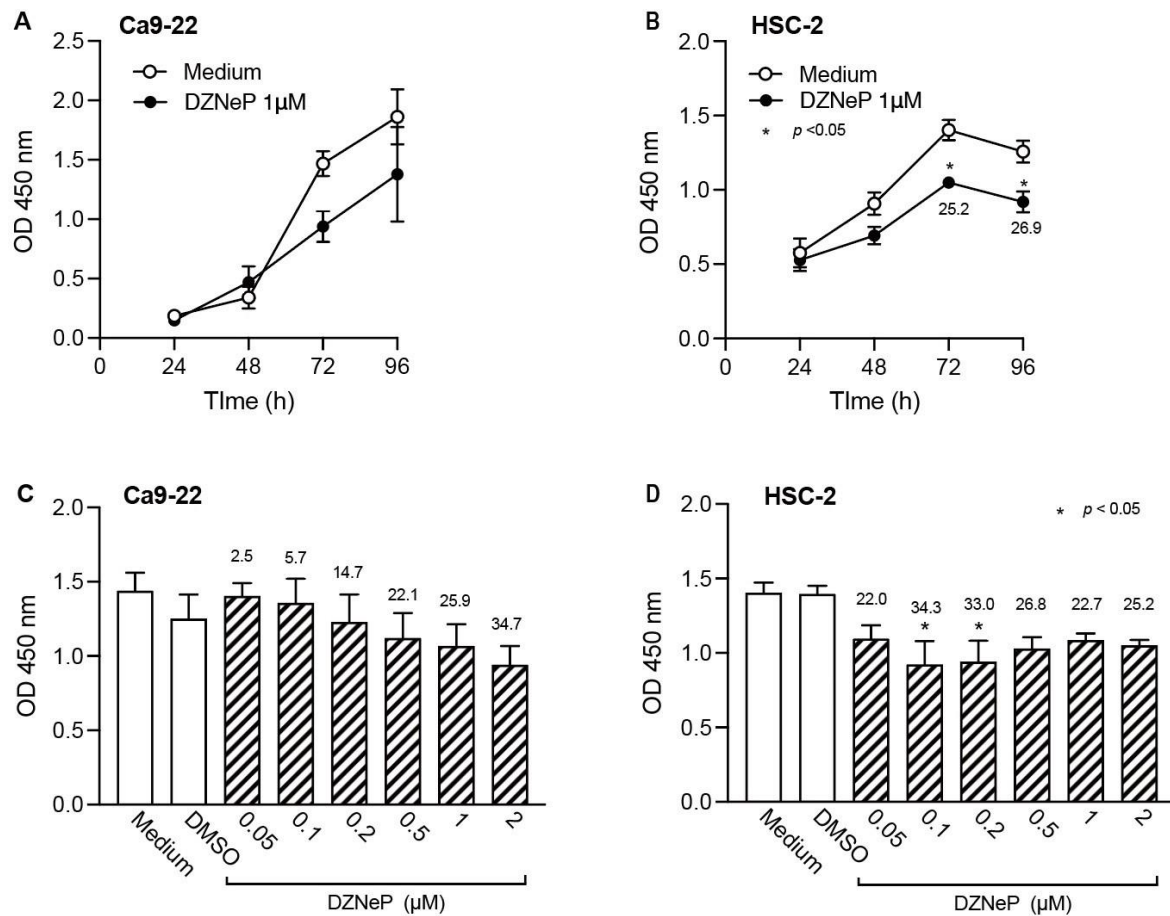


Figure 3. Effect of HMTi DZNep on cell proliferation of Ca9-22 and HSC-2.

Exponentially growing Ca9-22 (A) or HSC-2 (B) cells were treated with DZNep (1 μM) or DMSO for the indicated periods of time, and cell proliferation was measured using a cell counting kit. Various concentrations of DZNep were added to exponentially growing Ca9-22 (C) or HSC-2 (D) and cultured for 72 h before measurement of cell proliferation. Data are presented as mean ± SEM of three independent experiments. Significance for the inhibition of cell proliferation between DMSO-treated and DZNep-treated samples is indicated. The percentage inhibition of cell proliferation is shown in the figure.

Figure 4

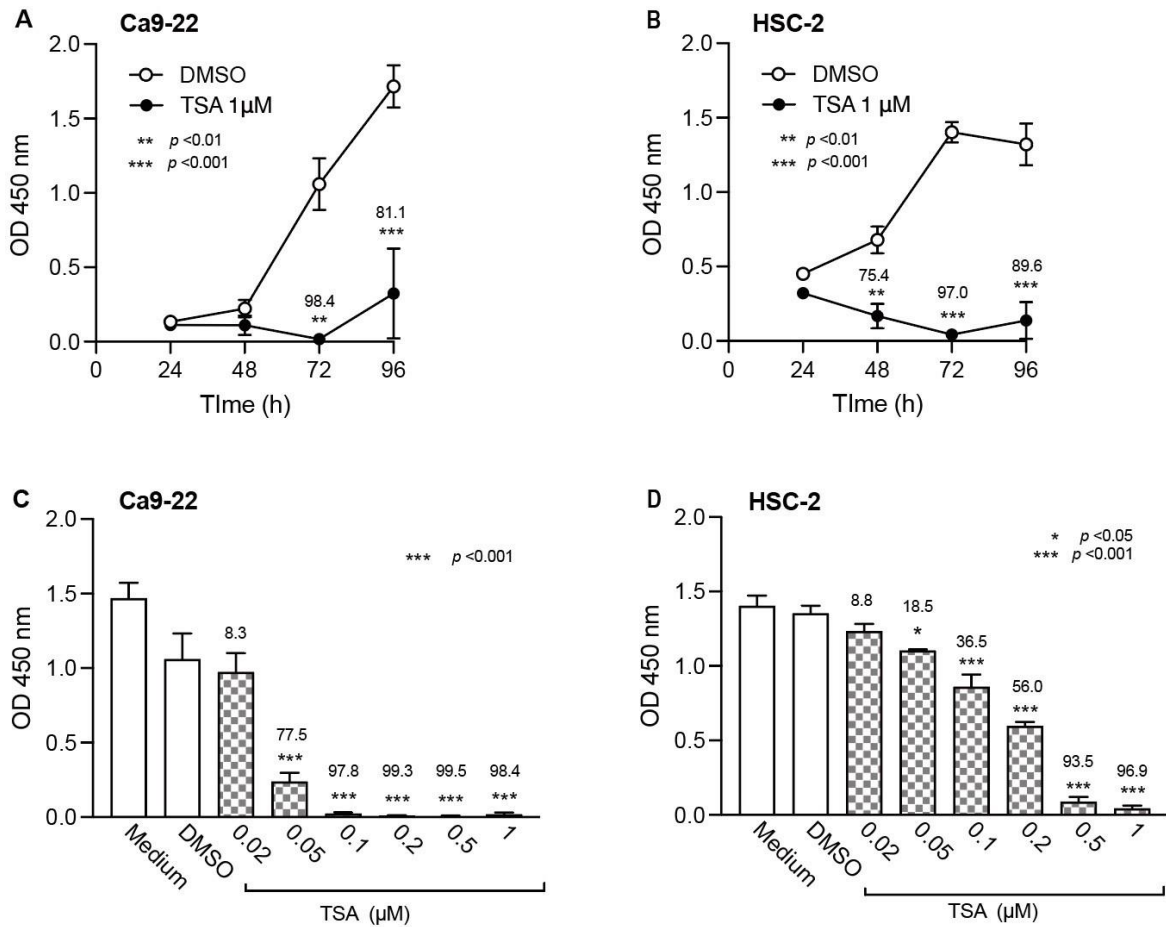


Figure 4. Effect of HDACi TSA on cell proliferation of Ca9-22 and HSC-2.

Exponentially growing Ca9-22 (A) or HSC-2 (B) cells were treated with TSA (1 μM) or DMSO for the indicated periods of time, and cell proliferation was measured using a cell counting kit. Various concentrations of TSA were added to exponentially growing Ca9-22 (C) or HSC-2 (D) and cultured for 72 h before measurement of cell proliferation. Data are presented as mean ± SEM of three independent experiments. Significance for the inhibition of cell viability between DMSO-treated and TSA-treated samples is indicated. The percentage inhibition of cell proliferation is shown in the figure.

Figure 5

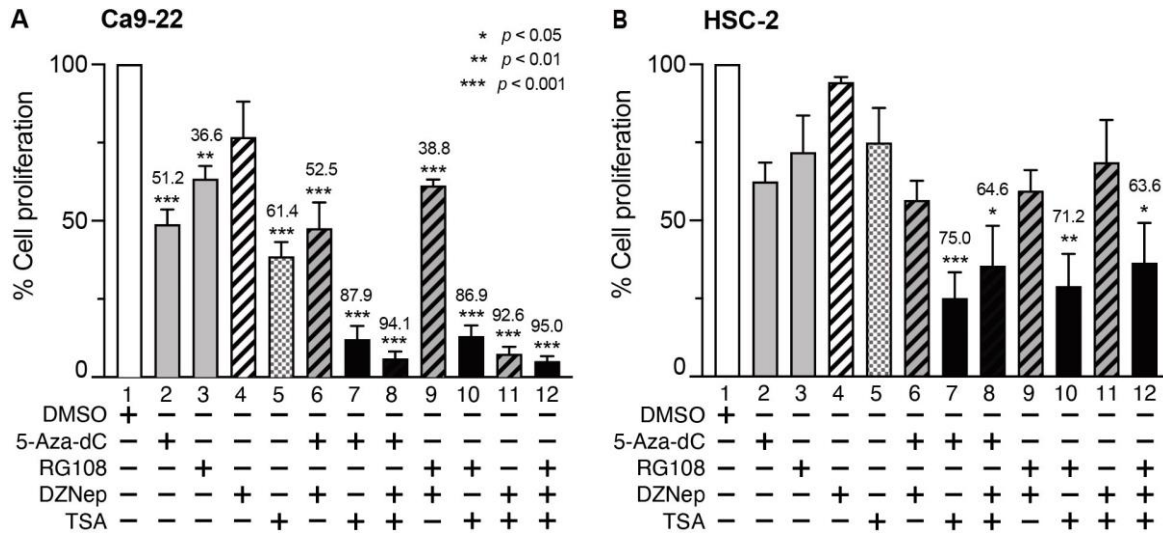


Figure 5. Effect of combination treatment with minimum effective concentration of DNMTi, HMTi, and HDACi on cell proliferation of Ca9-22 and HSC-2 cells.

Exponentially growing Ca9-22 (A) or HSC-2 (B) cells were treated with either alone or combination of 5-Aza-dC (0.1 μM), RG108 (5 μM), DZNep (0.2 μM) and/or TSA (0.05 μM) for 72 h, and cell proliferation was measured as described above. Data are presented as mean \pm SEM of three independent experiments. Significance for the inhibition of cell proliferation between DMSO-treated and inhibitor-treated samples is indicated. The percentage inhibition of cell proliferation is shown in the in the columns.

Figure 6

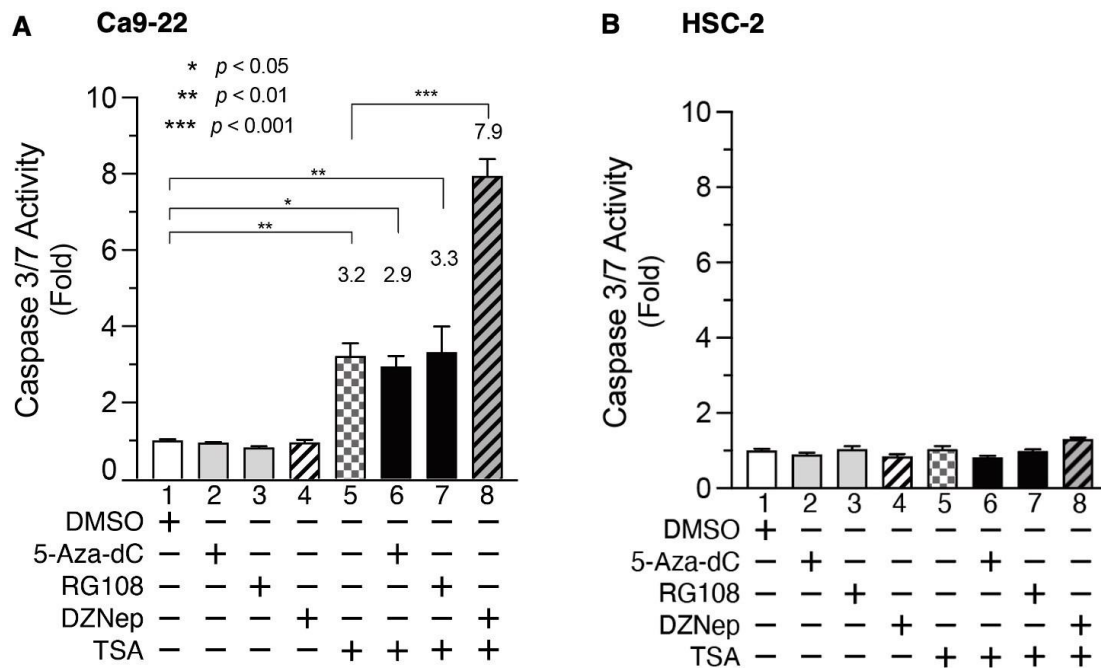
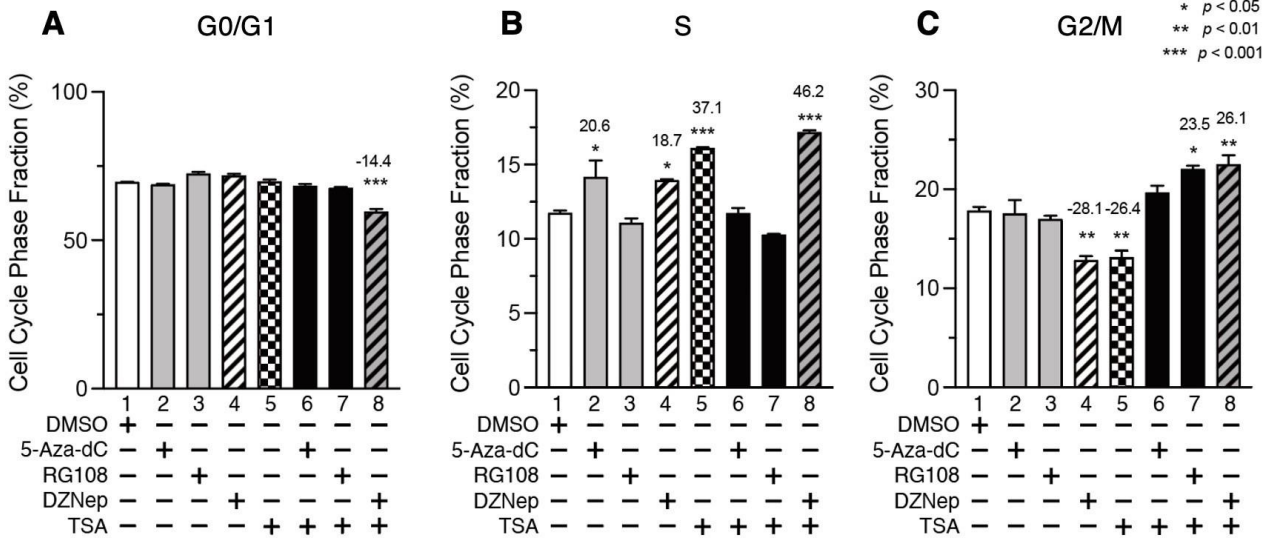


Figure 6. Caspase 3/7 activity in Ca9-22 and HSC-2 cells treated with minimum effective concentration of DNMTi, HMTi, and HDACi.

Exponentially growing Ca9-22 (A) or HSC-2 (B) cells were treated with either alone or combination of 5-Aza-dC (0.1 μ M), RG108 (5 μ M), DZNep (0.2 μ M) and/or TSA (0.05 μ M) for 24 h, and caspase 3/7 activity was measured as described in the Materials and Methods. Caspase activity in cells treated with inhibitors expressed as fold relative to DMSO-treated cells. Data are presented as mean \pm SEM of three independent experiments. Significance for the increase in the caspase activity between DMSO-treated and inhibitors-treated samples is indicated. The fold induction of caspase is shown above the columns.

Figure 7

Ca9-22



HSC-2

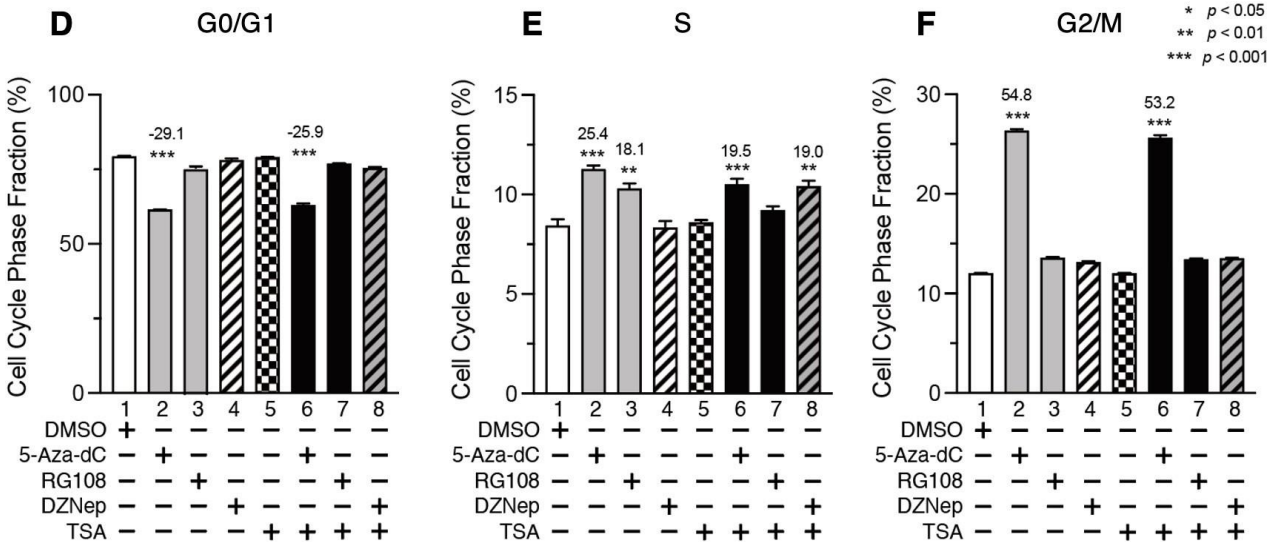


Figure 7. Distribution of cell cycle phase in Ca9-22 and HSC-2 cells treated with minimum effective concentration of DNMTi, HMTi, and HDACi.

Exponentially growing Ca9-22 (A-C) or HSC-2 (D-F) cells were treated with either alone or combination of 5-Aza-dC (0.1 μ M), RG108 (5 μ M), DZNep (0.2 μ M) and/or TSA (0.05 μ M) for 48 h, and percentage of cell cycle distribution (G0/G1: A, D; S: B, E; G2/M: C, F) was measured using a flow cytometer as described in the Materials and Methods. Data are presented as mean \pm SEM of three independent experiments. Significance for the difference of cell cycle phase between DMSO-treated and inhibitors-treated samples is indicated. The percentage difference of cell cycle phase is shown in the in the columns.

Figure 8

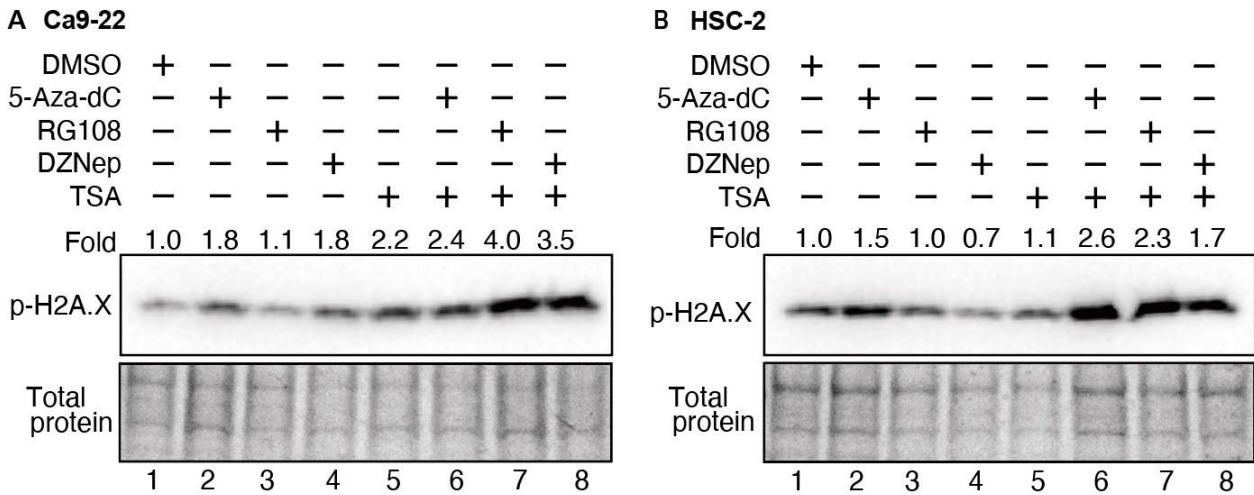


Figure 8. Phosphorylation of histone H2A.X in Ca9-22 and HSC-2 cells treated with minimum effective concentration of DNMTi, HMTi, and HDACi.

Exponentially growing Ca9-22 (A) or HSC-2 (B) cells were treated with either alone or combination of 5-Aza-dC (0.1 μ M), RG108 (5 μ M), DZNep (0.2 μ M) and/or TSA (0.05 μ M) for 72 h before preparation of total cellular lysate. Total cellular lysates were then separated by SDS-PAGE and analyzed by western blotting using an antibody against phospho-histone H2AX, a marker for DNA double-strand breaks. Levels of p-H2A.X are normalized to the total loading protein, and the fold expression of p-H2A.X relative to DMSO-treated sample is shown above the blots.

図の説明

Figure 1. Effect of DNMTi 5-Aza-dC on cell proliferation of Ca9-22 and HSC-2. Exponentially growing Ca9-22 (A) or HSC-2 (B) cells were treated with 5-Aza-dC (2 μ M) or DMSO for the indicated periods of time, and cell proliferation was measured using a cell counting kit. Various concentrations of 5-Aza-dC were added to exponentially growing Ca9-22 (C) or HSC-2 (D) and cultured for 72 h before measurement of cell proliferation. Data are presented as mean \pm SEM of three independent experiments. Significance for the inhibition of cell proliferation between DMSO-treated and DNMTi treated samples is indicated. The percentage inhibition of cell viability is shown in the figure.

Figure 2. Effect of DNMTi RG108 on cell proliferation of Ca9-22 and HSC-2. Exponentially growing Ca9-22 (A) or HSC-2 (B) cells were treated with RG1058 (100 μ M) or DMSO for the indicated periods of time, and cell proliferation was measured using a cell counting kit. Various concentrations of RG108 were added to exponentially growing Ca9-22 (C) or HSC-2 (D) and cultured for 72 h before measurement of cell proliferation. Data are presented as mean \pm SEM of three independent experiments. No significance for the inhibition of cell proliferation between DMSO-treated and RG108-treated samples was observed. The percentage inhibition of cell viability is shown in the columns.

Figure 3. Effect of HMTi DZNep on cell proliferation of Ca9-22 and HSC-2. Exponentially growing Ca9-22 (A) or HSC-2 (B) cells were treated with DZNep (1 μ M) or DMSO for the indicated periods of time, and cell proliferation was measured using a cell counting kit. Various concentrations of DZNep were added to exponentially growing Ca9-22 (C) or HSC-2 (D) and cultured for 72 h before measurement of cell proliferation. Data are presented as mean \pm SEM of three independent experiments. Significance for the inhibition of cell proliferation between DMSO-treated and DZNep-treated samples is indicated. The percentage inhibition of cell proliferation is shown in the figure.

Figure 4. Effect of HDACi TSA on cell proliferation of Ca9-22 and HSC-2. Exponentially growing Ca9-22 (A) or HSC-2 (B) cells were treated with TSA (1 μ M) or DMSO for the indicated periods of time, and cell proliferation was measured using a cell counting kit. Various concentrations of TSA were added to exponentially growing Ca922 (C) or HSC-2 (D) and cultured for 72 h before measurement of cell proliferation. Data are presented as mean \pm SEM of three independent experiments. Significance for the inhibition of cell viability between DMSO-treated and TSA-treated samples is indicated. The percentage inhibition of cell proliferation is shown in the figure.

Figure 5. Effect of combination treatment with minimum effective concentration of DNMTi, HMTi, and HDACi on cell proliferation of Ca9-22 and HSC-2 cells.

Exponentially growing Ca9-22 (A) or HSC-2 (B) cells were treated with either alone or combination of 5-Aza-dC (0.1 μ M), RG108 (5 μ M), DZNep (0.2 μ M) and/or TSA (0.05 μ M) for 72 h, and cell proliferation was measured as described above. Data are presented as mean \pm SEM of three independent experiments. Significance for the inhibition of cell proliferation between DMSO-treated and inhibitor-treated samples is indicated. The percentage inhibition of cell proliferation is shown in the columns.

Figure 6. Caspase 3/7 activity in Ca9-22 and HSC-2 cells treated with minimum effective concentration of DNMTi, HMTi, and HDACi.

Exponentially growing Ca9-22 (A) or HSC-2 (B) cells were treated with either alone or combination of 5-Aza-dC (0.1 μ M), RG108 (5 μ M), DZNep (0.2 μ M) and/or TSA (0.05 μ M) for 24 h, and caspase 3/7 activity was measured as described in the Materials and Methods. Caspase activity in cells treated with inhibitors expressed as fold relative to DMSO-treated cells. Data are presented as mean \pm SEM of three independent experiments. Significance for the increase in the caspase activity between DMSO-treated and inhibitors-treated samples is indicated. The fold induction of caspase is shown above the columns.

Figure 7. Distribution of cell cycle phase in Ca9-22 and HSC-2 cells treated with minimum effective concentration of DNMTi, HMTi, and HDACi.

Exponentially growing Ca9-22 (A-C) or HSC-2 (D-F) cells were treated with either alone or combination of 5-Aza-dC (0.1 μ M), RG108 (5 μ M), DZNep (0.2 μ M) and/or TSA (0.05 μ M) for 48 h, and percentage of cell cycle distribution (G0/G1: A, D; S: B, E; G2/M: C, F) was measured using a flow cytometer as described in the Materials and Methods. Data are presented as mean \pm SEM of three independent experiments. Significance for the difference of cell cycle phase between DMSO-treated and inhibitors-treated samples is indicated. The percentage difference of cell cycle phase is shown in the in the columns.

Figure 8. Phosphorylation of histone H2A.X in Ca9-22 and HSC-2 cells treated with minimum effective concentration of DNMTi, HMTi, and HDACi.

Exponentially growing Ca9-22 (A) or HSC-2 (B) cells were treated with either alone or combination of 5-Aza-dC (0.1 μ M), RG108 (5 μ M), DZNep (0.2 μ M) and/or TSA (0.05 μ M) for 72 h before preparation of total cellular lysate. Total cellular lysates were then separated by SDS-PAGE and analyzed by western blotting using an antibody against phospho-histone H2AX, a marker for DNA double-strand breaks. Levels of p-H2A.X are normalized to the total loading protein, and the fold expression of p-H2A.X relative to DMSO-treated sample is shown above the blots.