The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	口腔扁平上皮癌細胞に対するプロテインキナーゼC阻害剤によるアポトーシス誘導に関する研究
Author(s)	濱田, 正和
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46403
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【15】

氏　　名	濱田正和（はまだ まさかず）
博士の専攻分野の名称	博　士（歯　学）
学位記番号	第　20216　号
学位授与年月日	平成18年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科統合機能口腔科学専攻
学位論文名	**口腔扁平上皮癌細胞に対するプロテインキナーゼC阻害剤によるアポトーシス誘導に関する研究**
論文審査委員	（主査） 教　授　由良　義明 （副査） 教　授　雫石　聡　　助教授　原田　英光　　講　師　久保　和子

論文内容の要旨

【目的】

癌の分子標的治療は癌に特徴的な分子の機能を解明しその成果をもとに特定の分子を標的として薬剤などを作用させる治療法で、その対象は癌遺伝子産物、シグナル伝達系、増殖因子、サイトカイン、転写因子、細胞周期など多岐にわたっている。プロテインキナーゼC（PKC）は発癌のプロモーターであるホルボールエステルの細胞内受容体で、現在までに少なくとも11種類の分子種が同定され、cPKC（PKCα、βI、βII、γ）、nPKC（PKCδ、ε、η、θ）、aPKC（PKCζ、λ/ι）の3グループに分けられている。PKCは細胞の増殖や癌化において重要な働きをすると考えられており、このPKCを介するシグナル伝達系も分子標的治療の標的とみなされている。

近年、PKC分子種選択的阻害剤が開発され、口腔癌、白血病、乳癌などの癌で抗腫瘍効果を検証する研究が進められている。しかしながら、口腔癌に対する各種PKC阻害剤の有効性や作用メカニズムを解析したものは極めて少ない。そこで、本研究では単一あるいは複数のPKC分子種に対して作用を示す阻害剤を用いて、口腔癌細胞に対する増殖抑制効果と効果発現のメカニズムについて検討を行った。

【材料と方法】

細胞としてヒト口腔扁平上皮癌由来Ca9-22、FI、HSC、SAS細胞を、PKC阻害剤としてdequalinium chioride（DECA）、Gö6976、safingol、staurosporineを用いた。PKC分子種のmRNAはreverse transcription-polymerase chain reaction（RT-PCR）にて検出した。細胞増殖に対するPKC阻害剤の抑制効果は3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide（MTT）法にて測定した。細胞周期は、細胞を固定しpropidium iodide染色を行ったのちflow cytometry（FCM）で解析した。ミトコンドリア膜電位の測定の際は、生細胞をrhodamine123で染色しFCM解析を行った。断片化DNAはアガロースゲル電気泳動にて検出した。caspase、poly（ADP-ribose）polymerase（PARP）、apoptosis-inducing factor（AIF）、endonuclease G、β-actinはイムノブロット法にて検出した。caspase-3活性の測定にはCaspase-3 Colorimetric Protease Assay Kitを用いた。pPKCα-EGFP、pPKCβ-EGFPのトランスフェクションにはLipofectamineを用いた。細胞を固定し抗endonuclease G抗体、Mitotracker Red CMXRos、4,6-diamidino-2-phenylindoleを用いて染色したのち、共焦点レーザー走査顕微鏡にて観察した。

【結果】

1．Ca9-22、FI、HSC、SAS 細胞における PKCα、βⅠ、βⅡ、δ、ε、η、ζの発現を RT-PCR 法で検討した結果、これら分子種がすべて発現しており、PKCα、δ、ζの発現がより顕著であった。

2．口腔癌細胞に対する PKC 阻害剤の増殖抑制効果を MTT 法で検討した結果、DECA、safingol、staurosporine による増殖抑制が認められた。PKCα選択的とされる safingol の場合、50μM の濃度で 24 時間処理すると生細胞が顕著に減少した。

3．PKC はホルボールエステルによって活性化し細胞膜へトランスロケーションすることが知られている。PKCα遺伝子を導入した細胞を safingol で前処理した場合、PKCαの活性化によるトランスロケーションは阻害された。PKCβ導入細胞ではこのようなトランスロケーションに対する阻害はみられなかった。

4．safingol 処理細胞の FCM 解析において sub-G1 の経時的増加がみられた。DNA 解析でもアポトーシスを示す断片化 DNA が検出された。

5．safingol 処理にて、ミトコンドリア膜電位低下を示すミトコンドリアからの rhodamine123 の放出が認められた。ミトコンドリア分画とサイトゾール分画に対してイムノブロット解析を行った結果、cytochrome c がミトコンドリアから細胞質へ放出されることが明らかとなった。

6．cytochrome c 放出によって caspase 経路は活性化するとされているが、safingol 処理による caspase 3 の活性化や PARP の切断はみられなかった。

7．ミトコンドリアから放出されるアポトーシス誘導因子として、cytochrome c 以外に AIF、endonuclease G が知られている。イムノブロット解析と共焦点レーザー走査顕微鏡観察の結果、safingol 処理によって endonuclease G がミトコンドリアから核内へ移動することが明らかとなった。AIF の核内への移行はみられなかった。

【考察と結論】

分子種選択的 PKC 阻害剤が抗腫瘍効果を発揮するためには目的となる PKC 分子種の発現が必須である。本研究では口腔癌細胞で多くの PKC 分子種が mRNA レベルで発現していることを確認した。各種阻害剤の処理では、PKCαを選択的に阻害する safingol で強い細胞増殖抑制効果が認められ、sub-G1 の出現と細胞核 DNA の断片化からアポトーシスの誘導が明らかとなった。safingol 処理による caspase の活性化はみられず、ミトコンドリアに存在するアポトーシス誘導因子 endonuclease G の核移動が確認された。そのため、safingol は caspase ではなく、endonuclease G を介してアポトーシスを誘導するものと考えられた。以上より、PKCα阻害剤は口腔癌細胞に対するアポトーシス誘導剤として有用であることが明らかとなった。caspase 非依存的にアポトーシスを誘導する safingol は、従来の化学療法剤とは異なった抗腫瘍薬として、単独あるいは併用療法で活用できるものと思われる。

論文審査の結果の要旨

本研究は、プロテインキナーゼ C 阻害剤の口腔扁平上皮癌細胞に対する増殖抑制効果とその作用機序について検討したものである。

その結果、PKCα阻害剤である safingol は強いアポトーシス誘導作用を示すこと、このアポトーシス誘導経路に caspase-3 ではなく、endonuclease G が関与することが明らかとなった。

以上のことから、本研究は口腔扁平上皮癌に対する PKC を標的とした分子標的療法の発展に重要な示唆を与えるものであり、博士（歯学）の学位授与に値するものと認められる。