The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | プロテインキナーゼC阻害剤safingolの口腔扁平上皮癌細胞に対するアノイキス誘導作用に関する研究 |
| Author(s) | 野田, 隆之 |
| Citation | 大阪大学, 2008, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/49222 |
| 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、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>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

【６】

| | |
|---|---|
| 氏　　名 | 野（の）　田（だ）　隆（たか）　之（ゆき） |
| 博士の専攻分野の名称 | 博　士（歯　学） |
| 学　位　記　番　号 | 第　２１９０８　号 |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平成 20 年３月 25 日 |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第４条第１項該当<br>歯学研究科統合機能口腔科学専攻 |
| 学　位　論　文　名 | **プロテインキナーゼＣ阻害剤 safingol の口腔扁平上皮癌細胞に対するアノイキス誘導作用に関する研究** |
| 論 文 審 査 委 員 | （主査）<br>教　授　由良　義明<br>（副査）<br>教　授　豊澤　　悟　　准教授　大倉　正也　　准教授　竹村　元秀 |

## 論　文　内　容　の　要　旨

【研究目的】

アノイキスは多くの正常細胞でみられる細胞と細胞外基質との接着が失われることによって誘導されるアポトーシスである。癌細胞では細胞接着が失われても容易に細胞死に陥ることはなく、これが癌細胞の浸潤・転移を可能とする一つの要因と考えられている。

プロテインキナーゼ C（PKC）は様々な細胞機能の調節に関与するシグナル伝達物質で、少なくとも 10 種類のサブタイプが知られている。PKC は発癌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として働くため、細胞の癌化や増殖の過程に関与するが、癌細胞の細胞外基質への接着にも関与することが知られている。

safingol はこの PKC に対して阻害作用を示すことから、PKC を分子標的とした抗腫瘍薬と考えられる。本研究では PKC のなかで PKCα を選択的に阻害するとされる safingol が、アノイキスを介して口腔扁平上皮癌（OSCC）細胞に抗腫瘍効果を示す可能性につき検討を行った。

【実験方法】

１．細胞として OSCC 細胞 SAS を用いた。培養プレートへの細胞の接着を阻害するため、polyhydroxyethyl methacrylate（poly-HEMA）で表面処理した培養プレートを用いた。２．細胞増殖は MTT 法で測定した。死細胞はトリパンブルー分染法を用いて検出した。３．細胞分画には Mitochondria/Cytosol Fractionation Kit、NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagent を用いた。４．イムノブロットによって、Bim、Bcl-2、Bcl-xL、cytochrome c、endonuclease G、focal adhesion kinase（FAK）、リン酸化 FAK、integrin-linked kinase（ILK）を検出した。５．細胞周期の解析にはフローサイトメトリー（FCM）を用い、DNA 断片化はアガローズゲル電気泳動により検出した。６．caspase 3 活性は細胞抽出物と Colorimetric Activity Assay Kit を用いて測定した。７．PKCα に対する siRNA の導入はリポフェクション法により行った。

【結果】

１．単層に増殖させた SAS 細胞を safingol で処理すると、経時的に接着した細胞の遊離が増加し、25μM では 24 時間後に 76%の細胞が浮遊した。

２．浮遊状態にした SAS 細胞の接着を防ぐために poly-HEMA 処理した培養プレートで培養しこの浮遊細胞をトリパ

ンブルーで染色すると、24 時間後でも 94%は生細胞であった。これに対して、safigol 処理を行うと 7 %にまで低下した。

3．浮遊状態で safingol 処理した細胞の FCM 解析では、sub-G1 期細胞が出現し、24 時間後にはその割合は 63%となった。さらに、アガロースゲル電気泳動法でアポトーシスを示す DNA の断片化がみられた。

4．ミトコンドリア経路のアポトーシスに関与する Bcl-2 ファミリーの発現をイムノブロット法で測定したところ、safingol にて Bim の発現が上昇し、Bcl-2、Bcl-xL の発現は低下した。cytochrome c のミトコンドリアからの放出はみられたが、caspase 3 の活性化はなかった。ミトコンドリアのアポトーシス誘導因子である endonuclease G の核への移行がみられた。

5．safingol 処理によって細胞接着シグナル関連因子である FAK のリン酸化が低下し、FAK タンパクの発現も減少した。ILK 発現に変化はみられなかった。

6．PKC α を標的とした siRNA の導入で死細胞が増加し、クロマチンの凝集がみられた。さらに、Bim の発現増加、Bcl-xL の発現抑制、endonuclease G の核への移行、リン酸化 FAK の発現低下も認められた。

【考察】

OSCC 細胞を safingol で処理すると、アノイキスが誘導されることが明らかとなった。safingol によるアノイキスでは、Bim の発現上昇、Bcl-2、Bcl-xL の発現低下が起こり、ミトコンドリアから endonuclease G が核内に移行して DNA を切断すると考えられた。さらに、safingol 処理細胞では FAK のリン酸化低下、FAK の発現低下があり、細胞接着を介する細胞生存のシグナルが阻害されると考えられた。これらのことは siRNA により PKC α をノックダウンした実験でも確認された。

以上より、safingol によるアノイキスでは、ミトコンドリア経路のアポトーシスを促進する Bim ならびにインテグリンシグナルを伝達する FAK が中心的役割を担うことが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は新規抗腫瘍薬である safingol のアノイキス誘導作用について口腔扁平上皮癌細胞を用いて研究したものである。その結果、safingol は口腔扁平上皮癌細胞にアノイキスを誘導すること、アノイキス誘導過程で接着因子やミトコンドリアが関連していることを明らかにした。

本研究の結果は、口腔扁平上皮癌の化学療法の作用機序について重要な知見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る。