



Title	口腔扁平上皮癌細胞における治療標的分子Racの機能解析
Author(s)	松岡, 裕大
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49254
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

氏 名	まつ 松 おか 岡 ゆう 裕 だい 大
博士の専攻分野の名称	博 士 (歯 学)
学 位 記 番 号	第 2 1 9 0 5 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 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おける治療標的分子 Rac の機能解析
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 古郷 幹彦 (副査) 教 授 豊澤 悟 講 師 墨 哲郎 講 師 佐伯万騎男

論 文 内 容 の 要 旨

【研究目的】

現在、口腔癌を含めた癌治療の臨床の場では、癌細胞の増殖、浸潤、および転移の各ステップでの細胞動態の制御が焦点の一つとなっている。その中でも副作用が少なく各ステップで癌細胞を抑制する物質、すなわち分子標的治療薬の開発に力が注がれている。

近年、癌細胞の増殖・浸潤・転移において活性化した低分子量 GTP 結合蛋白質の Rho ファミリーの一つである Rac の関与が注目されているが、その詳細については現在のところ不明な点が多く解析が待たれている。そこで我々は特に口腔扁平上皮癌細胞において活性化した低分子量 GTP 結合蛋白 Rac に焦点を絞り研究を進めている。今までに我々は口腔扁平上皮癌細胞において Rac を過剰発現し、活性化すると癌の基底膜浸潤能が増すことを確認している。そこで本研究では口腔扁平上皮癌細胞の Rac 活性を特異的に抑制することにより癌細胞がいかなる影響を受けるかを検討した。

【実験方法】

1. 低分子量 GTP 結合蛋白 Rac 阻害による細胞形態変化の観察

実験には口腔粘膜由来のヒト扁平上皮癌細胞で、山本・小浜分類（以下 Y-K 分類）で 4C 型の浸潤像を示す細胞株 OSC-19 細胞、および口唇より採取したヒト線維芽細胞を用いた。各々の細胞に Rac の特異的な阻害剤である NSC23766 を作用し、細胞形態変化を観察した。

2. Rac の dominant negative 遺伝子導入と低分子量 GTP 結合蛋白 Rac の発現と活性の測定

OSC-19 細胞へ低分子量 GTP 結合蛋白 Rac の 17 番目の Thr (スレオニン) を Asn (アスパラギン) に置き換えた dominant negative 遺伝子 N17Rac1 (Rac-DN) を導入した。各々の細胞における低分子 GTP 結合蛋白 Rac の定性的発現を Western blotting、その活性を pull down assay にて測定した。

3. 核の組織化学的染色とアポトーシスの測定

スライドガラス上で OSC-19 細胞および線維芽細胞を培養し、Rac 活性を阻害した際の核の形態的变化を比較検討した。また Rac 活性を阻害した OSC-19 細胞および線維芽細胞において細胞死検出 ELISA キットプラスを使用し、細胞内ヒストン結合 DNA のモノ-およびオリゴヌクレオソームレベルでの DNA 断片化を定量的に測定す

ることアポトーシスの程度を検討した。

4. Western blotting による断片化カスパーゼ-3 の検出とカスパーゼ阻害によるアポトーシスへの影響の解析
Rac 活性を阻害した OSC-19 細胞の断片化カスパーゼ-3 の定性的発現を Western blotting にて検討した。またカスパーゼ特異的阻害剤である z-VAD-fmk を作用させ、Rac 活性の阻害によるアポトーシスへの影響を検討した。
5. Western blotting によるシグナル伝達の検討と JNK および p-38 阻害によるアポトーシスへの影響の解析
Rac 活性を阻害した OSC-19 細胞および線維芽細胞の c-Jun N-terminal リン酸化酵素 (JNK) および p-38 リン酸化酵素 (p-38) の定性的発現を Western blotting にて検討した。また JNK および p-38 特異的阻害剤である SP600125 および SB203580 にて JNK および p-38 を阻害し、Rac 活性の阻害によるアポトーシスへの影響を検討した。
6. JNK の活性測定
Rac 活性を阻害した OSC-19 細胞の JNK 活性を c-Jun fusion 蛋白を用い、免疫沈降法により測定した。
7. Ser/Thr Protein Phosphatase 5 (PP5) 活性化によるアポトーシスへの影響の解析
Rac 活性を阻害した OSC-19 細胞にアラキドン酸を作用し PP5 を活性化させ、Rac 活性の阻害によるアポトーシスへの影響を検討した。
8. Ser/Thr Protein Phosphatase の活性測定
Rac 活性を阻害および PP5 活性を促進した OSC-19 細胞の Ser/Thr Protein Phosphatase 活性を測定した。

【実験結果】

1. 低分子量 GTP 結合蛋白 Rac 阻害による細胞形態変化
OSC-19 細胞は、NSC23766 を作用させることで顕著な死細胞を認めた。しかしながら線維芽細胞では同様の変化は認められなかった。
2. 低分子量 GTP 結合蛋白 Rac の発現と活性の測定
OSC-19 細胞は線維芽細胞よりも Rac 活性の亢進を認めた。また Rac-DN を導入した細胞および NSC23766 を作用させた細胞において Rac 活性の抑制が認められた。
3. 核の組織化学的染色とアポトーシスの測定
OSC-19 細胞では Rac 活性の阻害により断片化した核の染色像を示した。さらに Rac 活性の阻害により、アポトーシスが認められた。また NSC23766 の濃度に依存してアポトーシスが上昇した。
4. Western blotting による断片化カスパーゼ-3 の検出とカスパーゼ阻害によるアポトーシスへの影響
Rac 活性の阻害によりアポトーシスを起こした OSC-19 細胞では断片化したカスパーゼ-3 が認められた。また z-VAD-fmk にてカスパーゼ活性が抑制されることでアポトーシスが完全に抑制された。
5. Western blotting によるシグナル伝達の解析と JNK および p-38 阻害によるアポトーシスへの影響
Rac 活性を阻害した OSC-19 細胞では JNK および p-38 の顕著なリン酸化が認められたが、線維芽細胞では p-38 のみリン酸化が認められた。また SP600125 ではカスパーゼ活性が抑制されアポトーシスが抑制されたが、SB203580 では抑制されなかった。
6. JNK の活性測定
Rac 活性を阻害した OSC-19 細胞では顕著な JNK 活性を認めた。
7. Ser/Thr Protein Phosphatase 5 (PP5) 活性化によるアポトーシスへの影響
Rac 活性を阻害した OSC-19 細胞ではアラキドン酸を作用させることで JNK およびカスパーゼ活性が抑制されアポトーシスが抑制された。
8. Ser/Thr Protein Phosphatase の活性測定
Rac 活性を阻害した OSC-19 細胞では Ser/Thr Protein Phosphatase の活性が抑制され、アラキドン酸にて促進した。

【考察】

正常細胞である線維芽細胞は低分子量 GTP 結合蛋白 Rac の活性を阻害することでアポトーシスを示さなかったが、扁平上皮癌細胞である OSC-19 細胞ではアポトーシスが引き起こされた。そのメカニズムは、Rac 活性の阻害により JNK が顕著に活性化され、その結果、カスパーゼ依存的なアポトーシスが引き起こされることがわかった。さらにこの JNK の活性の制御については Ser/Thr Protein Phosphatase である PP5 を活性化することで JNK 活性が抑制され、Rac 活性阻害によるアポトーシスが抑制されたことより、PP5 が強く関与していることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は口腔扁平上皮癌細胞の低分子量 GTP 結合蛋白質 Rac によるアポトーシス制御のメカニズムについて研究したものであり、Rac 活性を阻害することにより JNK および PP5 が関与するカスパーゼ依存的なアポトーシスが引き起こされるメカニズムの存在を明らかにしたものである。

本研究は分子標的治療に有用な指針を与えるものであり学位授与に値する。