



|              |                                                                             |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| Title        | PKC阻害剤safingolによる口腔扁平上皮癌細胞におけるオートファジーの誘導に関する研究                              |
| Author(s)    | 榊井, 敦史                                                                      |
| Citation     | 大阪大学, 2015, 博士論文                                                            |
| Version Type | VoR                                                                         |
| URL          | <a href="https://doi.org/10.18910/52354">https://doi.org/10.18910/52354</a> |
| rights       |                                                                             |
| Note         |                                                                             |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

論文内容の要旨

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| 氏 名 ( 榊 井 敦 史 )                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                |
| 論文題名                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | PKC阻害剤safingolによる口腔扁平上皮癌細胞におけるオートファジーの誘導に関する研究 |
| 論文内容の要旨                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                |
| <p>緒 言</p> <p>Protein kinase C (PKC)は細胞増殖と細胞分化を司る多くのシグナル経路で多彩な役割を果たしている。癌細胞で発現するPKCは、腫瘍の進行や浸潤、抗腫瘍薬に対する耐性において重要な役割を有しており、ヒト口腔扁平上皮癌(SCC)ではPKC<math>\alpha</math>やPKC<math>\beta</math> Iが高発現するとされている。そのため、癌細胞で発現するPKCを分子標的として阻害する分子標的治療の研究も進められている。分子標的薬を用いる口腔癌の治療では、他の薬剤や放射線治療と併用が行われており、今後、他の薬剤との併用効果の研究も重要と考えられる。Safingol, L-threo-di-hydrosphingosine, はPKC<math>\alpha</math>の選択的阻害剤であり、頭頸部癌、胃癌といった固形癌に対して、シスプラチンやマイトマイシンCなどとの併用効果が基礎的ならびに臨床的に研究されている。Safingolはヒト口腔SCC細胞にアポトーシスを誘導するが、その過程でミトコンドリアからアポトーシス誘導因子endonuclease G (endoG)が核内へ移行することが重要とされている。最近の研究では、safingolが乳癌や大腸癌細胞においてオートファジーを誘導することも報告されている。</p> <p>オートファジーは細胞順応やリモデリング、劣化した細胞の細胞質成分を再生利用するなどの機能が判明している。オートファジーは栄養素欠乏時の細胞生存に関わるが、抗癌剤による腫瘍細胞の細胞死の際、オートファジーの誘導が確認され、オートファジーを伴う細胞死 (autophagic cell death) が明らかとなっている。したがって、オートファジーは場合によって細胞生存や細胞死に関わることになる。</p> <p>しかし、endoGを介する経路におけるオートファジーの役割を明らかにした報告はない。そこで、本研究ではヒト口腔SCC細胞において、safingolによるendoGを介するアポトーシスにおけるオートファジーの関与について検討を行った。</p> <p>材料と方法</p> <p>ヒト口腔SCC細胞であるSAS, Ca9-22, HSC3細胞を用いた。試薬はPKC阻害剤safingol, オートファジー阻害剤として3-methyladenine (3-MA), bafilomycin A1を用いた。パンカスパーゼ阻害剤としてz-VAD-fmkを用いた。Reactive oxygen species (ROS)の抗酸化剤としてN-acetyl-L-cysteine (NAC)を用いた。細胞生存率はMTT法にて測定し、アポトーシス細胞はannexin V-fluorescein isothiocyanateとpropidium iodide (PI)を用いて染色を行い、フローサイトメトリーにより検出した。Acidic vesicular organelles (AVOs)はアクリジンオレンジ染色により検出した。免疫ブロット法および免疫蛍光染色には抗microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3)抗体、抗endoG抗体を用いた。ミトコンドリアの分離にはMitochondria / Cytosol Fractionation Kitを用い、細胞質の分離にはNEPER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagentsを用いた。endoG siRNAは標的配列を5'-CTGACAACCCTGAGAAATA-3'とし、Lipofectamine 2000を用いてリポフェクション法にてトランスフェクションを行った。</p> |                                                |

## 結 果

1. SAS, Ca9-22, HSC 3細胞を各濃度のsafingolで処理したところ、濃度依存的に細胞生存率は減少した。10  $\mu$ Mの濃度で処理すると生細胞は48時間で顕著に減少した。2. Safingol 処理細胞をフローサイトメトリーで解析すると、annexin V(+)PI (-)の早期アポトーシス細胞、annexin V(+)PI (+)の後期アポトーシス細胞が増加した。annexin V(-)PI (+)のネクローシス細胞は増加しなかった。3. Safingol で処理した細胞では、オートファジーに特異的なLC3-IIが検出された。LC3は免疫蛍光染色で処理細胞の細胞質に発現していた。オートファゴゾームの形成を示すアクリジンオレンジ染色陽性のAVOsも細胞質で検出された。4. Safingol とオートファジー阻害剤である3-MAあるいはbafilomycin A1を併用するとsafingol 単独と比較して細胞生存率がさらに低下し、アポトーシス細胞が増加した。5. Safingol と3-MAで処理するとendoGのミトコンドリアから核への移行がみられた。siRNAでendoGをノックダウンさせた細胞では、safingol あるいはsafingol と3-MA併用による細胞生存率の減少がみられなくなった。6. カスパーゼ阻害剤ではsafingol と3-MAによる細胞生存率減少に対する明らかな影響はみられなかったが、抗酸化剤NACはsafingol と3-MA併用による細胞傷害性を強く阻害した。

## 考 察

ヒト口腔SCC細胞由来の3種類の細胞を用いて、safingolの細胞傷害性を検討したところ、いずれの細胞でも濃度依存的に生細胞数の低下がみられ、これらはいずれもannexin V(+)PI (-)およびannexin V(+)PI (+)のアポトーシス細胞であり、特に後期のアポトーシス細胞の増加によるものであると考えられた。このようなアポトーシスを誘導する条件下において、イムノプロット法でオートファジーマーカーとなるLC3-IIが検出されるようになり、免疫蛍光染色ではコントロールで細胞質全体にびまん性に存在していたLC3が、safingol 処理で点状あるいは顆粒状に集積し、より明瞭に染色された。さらに、オートファジー後期を示すAVOsの出現も認めたことから、10  $\mu$ M safingol はアポトーシスだけでなくオートファジーも同時に誘導しているものと考えられた。オートファジーの阻害剤である3-MAあるいはbafilomycin A1をsafingol と同時に作用させたところ、safingol による細胞傷害性はさらに増強され、アポトーシス細胞も増加した。したがって、safingol で誘導されるオートファジーは、SAS細胞に対するsafingol による細胞傷害性に対してこれを防御する耐性機構として働いており、オートファジーの阻害が細胞生存率の低下に繋がったものと考えられた。Safingol と3-MAを併用して処理した細胞のフローサイトメトリー解析の結果、annexin V (+)PI (+)の後期アポトーシス細胞の増加がみられ、endoGの核内移行があり、endoGをダウンレギュレーションした細胞ではこれら薬剤の効果もみられなかった。一方、パンカスパーゼ阻害剤の効果もなかった。したがって、誘導された細胞死はendoGに依存したアポトーシスと考えられた。また、endoGの上流に位置する因子としてROSが明らかにされているが、safingol と3-MA併用の場合もROSが重要な役割を担うと考えられた。

## 結 論

ヒト口腔 SCC細胞由来の SAS, Ca9-22, HSC 3細胞を safingol で処理すると、アポトーシスならびにオートファジーが誘導された。SAS細胞を safingol とオートファジー阻害剤を併用して処理すると、safingol 単剤よりもアポトーシスは増強されたことから、オートファジーは細胞の生存に働いていることが示唆された。その細胞死は endoGを介するアポトーシスであった。口腔癌の治療において、safingol と併用する薬剤として、オートファジー阻害作用を有する薬剤が有用と考えられる。

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

| 氏 名 ( 梶 井 敦 史 )                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |     |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----------|
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | (職) | 氏 名       |
| 論文審査担当者                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 主 査 | 教授 由良 義明  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 副 査 | 教授 野田 健司  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 副 査 | 准教授 大倉 正也 |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 副 査 | 講師 村上 智彦  |
| <p><b>論文審査の結果の要旨</b></p> <p>本研究は、Protein kinase C阻害剤 safinol がヒト口腔扁平上皮癌細胞において誘導する細胞死について検討したものである。</p> <p>その結果、safingol はアポトーシスとオートファジーを誘導すること、3-Methyladenine (3-MA) でオートファジーを阻害すると safinol による endonuclease Gを介するアポトーシスが增強されることが示唆された。</p> <p>以上の研究結果は、safingol の作用メカニズムの解明と臨床応用において有益な情報を与えるものであり、博士（歯学）の学位取得に値するものと認める。</p> |     |           |