



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)	榎井, 敦史
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/52354
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

学 位 論 文

「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」

大阪大学大学院歯学研究科 統合機能口腔科学専攻
顎口腔病因病態制御学講座 口腔外科学第二教室

柾井 敦史

緒　　言

Protein kinase C(PKC)は古典的なアイソフォームである α , β I, β II, γ に加え, δ , ε , η , θ や非定型の λ , ζ からなるファミリーを形成するセリン・スレオニンキナーゼで, 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, 基質には MAP キナーゼ, 転写因子阻害タンパク質, Raf キナーゼや上皮成長因子受容体があり, 細胞内シグナル伝達において特に中心的な役割を担っていると考えられており, ヒト口腔 SCC (扁平上皮癌; squamous cell carcinoma)では PKC α や PKC β I が高発現するとされている^{1,2)}。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^{3,4)}。最近の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⁵⁾。

Safingol(*L-threo*-dihydrosphingosine)は PKC 阻害剤として開発された薬剤で, なかでも PKC α に選択性を示すとされている。ヒト口腔 SCC 細胞をはじめ胃癌, 乳癌細胞に対して, 細胞増殖抑制効果を示し, 5-FU, マイトマイシン C などの抗腫瘍薬との併用効果が報告されており, 臨床では safingol とシスプラチニあるいはドキソルビシンを併用する研究が

phase I の段階にある⁶⁻¹⁰⁾。

アポトーシスは、大きく death receptor を介する経路とミトコンドリアを介する経路に分けられている。ミトコンドリア経路では、ミトコンドリア膜電位の低下を生じてミトコンドリアの内膜と外膜の間に存在するシトクローム c が細胞質に放出され、カスパーゼ 9 に続いてカスパーゼ 3 が活性される¹¹⁾。活性化カスパーゼ 3 の働きで、caspase-activated deoxyribonuclease (CAD)を抑制している CAD inhibitor (ICAD)が不活性されると、CAD は核内に移行して、染色体 DNA を断片化しアポトーシスが進行する¹²⁾。一方で、ミトコンドリアの内膜と外膜の間に存在するアポトーシス誘導因子である endonuclease G (endoG)や apoptosis-inducing factor (AIF)を介するカスパーゼ非依存的経路も存在する^{13,14)}。われわれは、ヒト口腔 SCC 細胞 SAS を用いた研究で、safingol を 25 μM , 50 μM の濃度で作用させた場合、ミトコンドリアから細胞質へ放出された endoG が直接、核内に移行して DNA を切断しアポトーシスを誘導することを報告した^{15,16)}。ミトコンドリア膜電位の低下には safingol による ROS (活性酸素種; reactive oxygen species) 産生が関与することも分かっている^{17,18)}。

最近、safingol がアポトーシスだけでなく、大腸癌細胞や乳癌細胞、前立腺癌細胞でオートファジーを誘導することが報告されている^{17,19)}。オートファジーは、2 重膜の細胞内構造として発見されたもので、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²⁰⁾。オートファジー経路では, phosphatidylinositol 3-phosphate kinase (PI3k), Akt, mammalian target of rapamycin (mTOR) が主要な因子として働く²¹⁾。正常時は増殖因子からのシグナルが mTOR に収束されて細胞増殖, タンパク合成, オートファジーの抑制が行われている。薬剤や栄養素欠乏によってこのシグナル伝達経路が遮断されるとオートファジーが誘導される。まず, 細胞質において 2 重膜構造のファゴフォアが形成され, これが延長するとともに microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3)が動員されてオートファゴソームが形成され, 次にリソソームと結合してオートリソソームとなり, 内包物が分解され細胞内で再利用される²²⁾。このように, オートファジーは栄養素欠乏時の細胞生存に関わるが, その後, オートファジーを伴う細胞死 (autophagic cell death)も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²³⁾。

Safingol による endoG を介するアポトーシス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 safingol によるヒト口腔 SCC 細胞の 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。

実験材料と方法

1. 細胞と方法

実験にはヒト口腔 SCC 細胞由来の細胞株 SAS 細胞, Ca9-22 細胞, HSC-3 細胞を用いた。SAS 細胞, HSC-3 細胞は Riken Bioresource Center (Tsukuba, Japan) から購入した。Ca9-22 細胞は Japanse Collection of Research Bioresources (Tokyo, Japan) から購入した。細胞株は, 5% 牛胎児血清 (FBS), 4 mM L-glutamine, 100 µg/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin を含む Dulbecco 変法 Eagle 培地 (DMEM; Nissui, Tokyo, Japan) で 37°C, 5% CO₂ 培養器中で培養した。

2. 試薬

PKC α 選択的阻害剤として safingol, パンカスパーゼ阻害剤として z-VAD-fmk は Calbiochem-Novabiochem (San Diego, CA, USA) より購入した。オートファジー阻害剤として 3-methyladenine (3-MA), bafilomycin A1 は Sigma (St. Louis, MO, USA) より購入した。アクリジンオレンジ, 抗酸化剤として N-acetyl-L-cysteine (NAC) は Wako (Osaka, Japan) より購入した。

3. 細胞増殖能の測定

96 well カルチャープレート (Corning, NY, USA)に 5% FBS 含有 DMEM 培地に 1 well あたり 1×10^4 個に調整した細胞を播種し, 24 時間 培養した。実験終了後に 5 mg/ml の 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromide (MTT) 液 10 μ l を各 well に加え, さらに 37°C で 4 時間培養し, 0.04N HCl を含む isopropanol を 100 μ l 加え, 生 成物を溶解した。その後, Benchmark plus microplate spectrophotometer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)を用い, 対照波長を 630 nm として 570 nm の波長で吸光度を測定した。

4. フローサイトメトリー解析

6 well カルチャープレート (Corning)に 5% FBS 含有 DMEM 培地に 1 well あたり 2×10^5 個に調整した細胞を播種し, 24 時間培養した。実験終了後に, 細胞を 0.25% trypsin, 0.02% Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)を含む Phosphate buffered saline (PBS)で処理して回収した。細胞上清も含め単一とし, 1,000 $\times g$ で 5 分間遠心分離し, 全細胞を回収した。Vybrant Apoptosis Assay Kit #3 (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA)を用い, 100 μ l の binding buffer (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂, pH 7.4)に 5 μ l の FITC-annexin V と 1 μ l の propidium iodide (PI)を加え, 室温で 15 分間処理した。その後, フローサイトメーター (FACSCalibur; Becton Dickinson,

Franklin Lakes, NJ, USA)を用いてフローサイトメトリー解析を行い, annexin V(−)PI(−)の生細胞, 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, annexin V(−)PI(+)のネクローシス細胞の割合を求めた。

アクリジンオレンジ染色は, 回収した細胞を最終濃度 1 μ g/ml として 15 分間反応させた。その後, フローサイトメーターを用いて染色細胞を赤色蛍光励起波長 564-606 nm の範囲で検出し, ヒストグラム解析を行った。

5. 細胞分画

Mitochondria / Cytosol Fractionation Kit (BioVision, Milpitas, CA, USA)を用いて, ミトコンドリア画分を分離した。セルスクレーパーにて細胞回収後に PBS で洗浄した後に extraction buffer で懸濁後に 10 分間反応させた。細胞をホモジナイザー (As One, Osaka, Japan)で 30~40 回粉碎後に 4°C, 1,000 \times g で 10 分間遠心し, その上清を 4°C, 10,000 \times g で 30 分間遠心した後の沈殿物を回収しミトコンドリアとした。

NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo Scientific, Walthman, MA, USA)を用いて核画分を分離した。細胞を 0.25% trypsin, 0.02% EDTA を含む PBS で処理して回収した。細胞上清も含め单一とし, 1,000 \times g で 5 分間遠心分離し, 全細胞を回収した。PBS で懸濁し 1.5 ml マイクロチューブに移し, 4°C, 500 \times g で 3 分間遠心分

離し、上清を除去した後に氷上で可能な限りペレットを乾燥させた。細胞と hypotonic buffer を反応させた後に $15,000 \times g$ で 5 分間遠心し上清を核画分とした。

6. イムノプロット法

細胞を PBS で洗浄後、20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.1 % sodium dodecyl sulfate (SDS), 1 % Triton X-100, 1 % sodium deoxycholate, 1% protease inhibitor cocktail 含有のバッファーに溶解した。氷上でソニッケーター (TOMY, Tokyo, Japan) を用いて細胞を粉碎後、4°C, $15,000 \times g$ で 10 分間遠心し、上清を回収した。タンパク質の定量には DC protein assay Kit (Bio-Rad Laboratories) を用いた。検体を 0.125 M Tris-HCl, 4 % SDS, 25 % glycerol, 0.5 % bromophenol blue, pH 6.8 を含む sample buffer に溶解し、100°C で 5 分間熱処理後、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行った。泳動後、タンパク質をセミドライ式ブロッティング装置 (Bio-Rad Laboratories) を用いて polyvinylidene difluoride (PVDF) メンブレン (Millipore, Bedford, MA, USA) に転写し、PBS で 5 % スキムミルクを調整し、1 時間ブロッキングを行った。一次抗体として、抗 β -actin マウスモノクローナル抗体 (1:5000) (Sigma), 抗 LC3 マウスモノクローナル抗体 (1:1000) (MBL, Nagoya, Japan), 抗 endoG ラビットポリクローナル抗体 (1:500) (Sigma) を用い、それぞれ室温で 1 時間反応させた。二次抗体として、ペ

ルオキシダーゼ標識した抗マウス IgG 抗体 (1:1000) (Sigma) もしくは抗ラビット IgG 抗体 (1:1000) (Sigma) を室温で 1 時間反応させたのち, enhanced chemiluminescence Kit (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) を用いて検出した。

7. 共焦点レーザー顕微鏡による観察

カバーガラス (MATSUNAMI, Osaka, Japan) を敷いた 6well カルチャープレート (Corning) に 5% FBS 含有 DMEM 培地に 1 wellあたり 2×10^5 個に調整した細胞を播種し, 24 時間培養した。実験終了後に培地を除去し, 細胞を PBS で洗浄し, 4 % パラホルムアルデヒド (Wako) により室温で 15 分間固定した。PBS で洗浄後, 一次抗体として抗 LC3 マウスモノクローナル抗体 (1:500), 抗 endoG ラビットポリクローナル抗体 (1:100) を室温で 1 時間反応させた。PBS で洗浄後, 二次抗体として Alexa Fluor 488 goat anti-mouse antibody (1:500) あるいは Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit antibody (1:500) (Life Technologies Corporation) を室温で 1 時間反応させた。ProLong Gold Antifade Reagent with DAPI (Life Technologies Corporation) で封入し, 共焦点レーザー顕微鏡 (Leica TCS SP8; Leica Microsystems, Mannheim, Germany) にて拡大率 630 倍で観察した。

また, 核染色については 6well カルチャープレート (Corning) に 5% FBS 含有 DMEM 培地に 1 wellあたり 2×10^5 個に調整した細胞を播種

し，24時間培養した。実験終了後に培養上清を含め400×gで5分間遠心し，細胞回収後に4%パラホルムアルデヒドにより室温で30分間固定した。PBSで洗浄後，20μlのPBSに4μlのHoechst 33342を加えて染色し，共焦点レーザー顕微鏡にて拡大率630倍で観察した。

8. small interfering RNA (siRNA)の導入

endoGを標的としたendoG siRNA（標的配列：5'-CTGGAACAAACCTGGAGAAATA-3'）とAllStars negative control siRNA (nonsense siRNA)はQIAGEN (Valencia, CA, USA)から購入した。6 wellカルチャープレート (Corning)に5% FBS含有および抗菌薬不含有DMEM培地に細胞を播種し，コンフルエントの約30%になった時点でsiRNAを最終濃度20 pmolになるように調整しLipofectamine 2000 (Life Technologies Corporation)を用いてリポフェクション法にてトランسفェクションを行った。siRNA導入後24時間の細胞を各々の実験に用いた。

9. 有意差検定

有意差検定は，Student-*t*検定を行って統計学的に比較した。実験結果は平均値±標準偏差と表記した。p<0.01を有意差有りと判断した。

結 果

1. Safingol が細胞死に及ぼす影響

Safingol の口腔 SCC 細胞に対する傷害性を知るために, 5-25 μM の safingol 存在下で SAS 細胞を 24 時間培養し, 生細胞を MTT 法により測定した。その結果, 細胞増殖は濃度依存的に抑制され 10 μM の safingol での生細胞の割合は非処理対照の 83.0%まで低下し, 25 μM の safingol では 16.1%まで低下した (図 1A)。また, SAS 細胞を 10 μM の safingol 存在下で経時的に生細胞を測定したところ, 24 時間までは 86.2%であったが, 48 時間では 47.4%まで減少した (図 1B)。口腔 SCC 細胞として, Ca9-22 細胞および HSC-3 細胞を用いて, 5-25 μM の safingol 存在下で 24 時間培養した場合も, 濃度依存的に生細胞率の減少を認めた (図 2)。

2. Safingol がアポトーシスに及ぼす影響

Safingol による生細胞の減少がアポトーシスによるか否かを明らかにするため, フローサイトメトリーによる解析を行った。すなわち, 5-25 μM の safingol 存在下で SAS 細胞を 24 時間培養し, FITC-annexin V, propidium iodide (PI)で染色したのちフローサイトメトリー解析を行った。その結果, safingol 濃度が高くなるに従って, annexin V 染色陽性を示す細胞が増加し, なかでも annexin V (+)PI (+)の割合が最も高く,

25 μM では 33.9% であった。10 μM では 11.6% であった。Annexin V (-)PI (+) のネクローシス細胞は高い safingol の濃度でも明らかな増加を示すことはなかった (図 3)。Ca9-22 細胞と HSC-3 細胞を safingol で処理した場合も annexin V (+) を示すアポトーシス細胞は濃度依存的に上昇した (図 4)。

3. Safingol がオートファジーに及ぼす影響

LC3 は哺乳類で始めて発見されたオートファゴソーム膜結合タンパク質であり、現在オートファジーのマーカーとして広く用いられている²⁴⁾。オートファゴソームに必要な LC3-II は LC3-I から形成される。SAS 細胞を 10 μM の safingol 存在下で 24 時間培養し、イムノプロット法で LC3-II を検出した。未処理コントロールと比較し safingol 処理細胞では LC3-II の発現増加を認めた (図 5A)。

次に抗 LC3 抗体を用いて免疫化学染色を行った。コントロールでは LC3 は細胞質全体にびまん性に存在していたが、10 μM の safingol で処理した細胞では細胞質内で点状あるいは顆粒状に集積しており、より明瞭に染色された (図 5B)。Ca9-22 細胞と HSC-3 細胞を safingol で処理した場合も同様に LC3 の集積を認めた (図 5C)。

オートファジーを誘導した細胞を塩基性蛍光色素アクリジンオレンジ存在下に培養すると acidic vesicular organelles (AVOs) は赤色の染色像として観察される。10 μM の safingol で処理した SAS 細胞をアクリジ

ンオレンジで染色した結果、赤色染色の顕著な増加がみられた（図 5D）。この赤色信号をフローサイトメーターによるヒストグラム解析で定量化すると、コントロールと比較して赤色領域の染色像を示す細胞は 25% 増加していた（図 5E）。

4. オートファジー阻害剤が safingol 誘導細胞死に及ぼす影響

オートファジー阻害剤として 3-MA, bafilomycin A1 を用いて検討を行った。まず、3-MA による細胞傷害性を知るために SAS 細胞を 1, 3, 5 mM の 3-MA で 24 時間処理した場合、生細胞率は 1 mM では 104% であったが、3 mM, 5 mM ではそれぞれ 84.6%, 73.7% まで低下した。Bafilomycin A1 の場合、5 nM では処理後の生細胞率はコントロールの 98.8% であった。そこで、safingol と併用するオートファジー阻害剤の濃度を 3-MA は 1 mM と bafilomycin A1 は 5 nM とした¹⁷⁾。次に、1 mM の 3-MA が 10 μM の safingol によるオートファジーを阻害することを確認する実験を行った。Safingol と 3-MA を併用して処理した細胞において、LC3-II をイムノプロット法で検出したところ control ならびに safingol と比較して減少していた（図 5A）。免疫蛍光染色を行ったところ、細胞質での LC3 の発現は低下し（図 5B）、アクリジンオレンジ染色では、AVOs 形成による赤色の反応が抑制された（図 5D,E）。SAS 細胞を safingol で 24 時間処理すると生細胞率は 81.5% であったが、safingol に 3-MA を併用した場合、66.5 % であり、bafilomycin A1 との

併用では 65.3 % にまで低下した (図 6A)。

Safingol とオートファジー阻害剤により誘導される細胞死をフローサイトメトリーで解析すると, annexin V (+)PI (+) の後期アポトーシス細胞が増加した (図 6B)。また, SAS 細胞を safingol と 3-MA の併用で処理し Hoechst 33342 にて核染色した場合, アポトーシスに特徴的な核の断片化を示す細胞が認められた (図 6C)。

5. Safingol と 3-MA の併用が endoG の局在に及ぼす影響

すでに, SAS 細胞を 25 μ M, 50 μ M の safingol で処理すると endoG を介したアポトーシスが誘導されることが示されている^{15,16)}。10 μ M の safingol と 1 mM の 3-MA の併用による endoG の局在の変化を蛍光免疫染色にて検討した。この濃度の safingol で処理しても単独ではコントロールと比較して endoG の明らかな局在の変化を認めなかつたが, safingol と 3-MA を併用すると核内における発現が顕著に認められた (図 7A)。細胞からミトコンドリアあるいは核画分を調整し, イムノプロット法を行った場合, safingol と 3-MA の併用処理を行った細胞では, endoG はミトコンドリア画分で減少し, 核画分で増加した (図 7B)。

6. endoG のノックダウンが safingol と 3-MA の併用効果に及ぼす影響

次に, endoG に対するターゲット配列を有する small interfering RNA (siRNA) を用いたノックダウン実験を行った。SAS 細胞に endoG siRNA

をトランスフェクションし, 48 時間後にイムノプロット法ならびに蛍光免疫染色で endoG の発現は低下した(図 8)。nonsense siRNA あるいは endoG siRNA をトランスフェクションした細胞を safingol と 3-MA の併用で 24 時間処理した場合, 生細胞率はそれぞれコントロールの 72.2%, 97.3% であり, endoG siRNA をトランスフェクションした細胞では safingol と 3-MA による細胞傷害性の低下がみられた(図 9)。

7. カスパーゼ阻害剤ならびに抗酸化剤が safingol と 3-MA 併用による細胞傷害性に及ぼす影響

細胞死におけるカスパーゼの関与を知るため, パンカスパーゼ阻害剤 z-VAD-fmk で 2 時間前処理し, その後 safingol と 3-MA で処理したが, カスパーゼ阻害剤で処理しない細胞と比較して生細胞率の差はなかった(図 10)。

SAS 細胞を 15 μ M の safingol で処理すると endoG を介するアポトーシスを生じるが, その際 ROS の産生が明らかとなっている¹⁸⁾。そこで, 抗酸化剤 NAC の効果をフローサイトメトリー解析で検討した。その結果, NAC 存在下では safingol と 3-MA 併用による annexin V (-)PI (-) である生細胞率の低下は抑制された(図 11)。

考 察

近年，細胞死の形態としてアポトーシスやネクローシス以外にオートファジーを介する細胞死の存在が知られるようになっている²⁵⁾。これは細胞死にともなってオートファジーが誘導されるもので，この細胞死ではアポトーシスでみられるようなDNAの断片化はない。

PKCとオートファジーの関係を調べた研究は限られており，統一的な見解は得られていない。現に，アセトアミノフェンによる肝毒性の発現において，PKC阻害剤がオートファジーを介する生存シグナルを亢進するが，その一方でパルミチン酸による細胞死ではPKCの誘導がオートファジーを低下させるといった相反する結果が報告されている^{26,27)}。われわれは口腔SCC由来のSAS細胞をPKC阻害剤であるsafingolを25μMあるいは50μMの濃度で処理するとendoGのミトコンドリアからの放出と核移行，DNAの断片化を生じること，カスパーゼ3の活性化はなく，ミトコンドリアの上流でROSが関与することを報告している^{14,15)}。細胞系は違うが，最近のsafingolを用いた研究で，15μMのsafingol処理でオートファジーが生じること，また5μMのsafingolで長時処理するとネクローシスとオートファジーもみられる¹⁷⁾。そこで，口腔SCC細胞の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き検討を行った。

本研究では、まず SAS 細胞ならびに他の口腔 SCC 由来の Ca9-22 細胞, HSC-3 細胞を用いて, safingol の細胞傷害性を生細胞率で調べたが、いずれの細胞でも 5-25 μ M で濃度依存的な細胞増殖の抑制効果がみられた。アポトーシスの関与を確認するため、annexin V, PI 染色後にフローサイトメトリー解析を行った^{28,29)}。Safingol の濃度依存的に annexin V 染色陽性の早期ならびに後期アポトーシス細胞が増加したが、PI 染色のみ陽性のネクロシス細胞は safingol の濃度を上昇させても増加しなかった。他の口腔 SCC 由来細胞でも同様に濃度依存的な生細胞率の低下と annexin V 染色陽性のアポトーシス細胞の増加がみられたことから、safingol による細胞死はアポトーシスがその大部分を占めるものと考えられた。

SAS 細胞において safingol でアポトーシスが誘導される条件下のオートファジー誘導を検討したが、safingol 処理細胞ではイムノプロット法で LC3-II の増加がみられ、蛍光抗体法では細胞質内において LC3-II が顆粒状に集積した³⁰⁾。さらに、アクリジンオレンジで赤色に染色される AVOs が増加したことから、safingol 処理によって SAS 細胞でオートファジーが確認された³¹⁾。同じ口腔 SCC 由来の Ca9-22 細胞と HSC-3 細胞でも LC3 の顆粒状集積を認めた。したがって、safingol は口腔 SCC 細胞において、アポトーシスだけでなくオートファジーも誘導すると考えられた。

3-MA はオートファゴソーム形成前を阻害し, baflomycin A1 はオートファゴゾームとリソソームの癒合を阻害する²²⁾。SAS 細胞を 1 mM の 3-MA あるいは 5 nM の baflomycin A1 で処理したところ, 細胞増殖に影響を与えたかった。なお, 高い濃度で safingol を使用するとアポトーシスによる細胞傷害作用が強く表れるため, オートファジー阻害剤の効果が明らかでなかった。そこで, safingol の濃度を 10 μM として, オートファジー阻害剤との併用効果を検討したところ, safingol 単剤と比較してより強く細胞増殖を減少させることができた。したがって, 乳癌細胞や大腸癌細胞と同様に口腔 SCC 細胞においても, 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生細胞率の上昇に繋がったものと考えられた。そして, フローサイトメトリー解析で, annexin V (+)PI (+)の後期アポトーシス細胞の増加がみられたことから, オートファジー阻害剤は safingol によるアポトーシスを助長すると考えられた。

Safingol で SAS 細胞を処理すると endoG を介するアポトーシスが誘導されることが分かっている¹⁵⁾。今回, 10 μM の safingol で処理した細胞における endoG の局在を免疫蛍光染色で観察したところ, safingol 単剤では endoG の核への明らかな凝集は認めなかった。しかし, safingol と 3-MA を併用したときには, endoG の核内での凝集が確認された。ミトコンドリアおよび核画分を調整して行ったイムノプロット解析でも

endoG はミトコンドリアで減少し、核で増加しており、safingol と 3MA の併用によって、endoG はミトコンドリアから核へトランスポーションすると考えられた。さらに、endoG siRNA の導入により endoG をノックダウンすると、safingol と 3-MA 併用による SAS 細胞に対する増殖抑制効果が減弱することから、endoG が SAS 細胞の細胞死に重要な役割を果たすことが明らかとなった。一方、パンカスパーゼ阻害剤である z-VAD-fmk で 2 時間前処理をしたのちに safingol と 3-MA で処理しても細胞増殖への影響はなく、safingol と 3-MA の併用によるアポトーシスにはカスパーゼの関与はないといえる。

頭頸部癌細胞に対してシスプラチニンを用いると後期のアポトーシスにおいて ROS を介した endoG が関与すると報告されており、SAS 細胞を safingol で細胞を処理しても細胞内で ROS の発生がみられる^{15,32)}。本研究で抗酸化剤 NAC の効果を調べたところ、safingol と 3-MA による生細胞率の低下は抑制された。したがって、オートファジー阻害剤によって増強される細胞死においても ROS が endoG の上流で働いているものと考えられた。

様々な抗腫瘍薬がオートファジーを誘導する。乳癌細胞において tamoxifen は protein kinase B/Akt の発現を抑制してオートファジーを介する細胞死を誘導する^{33,34)}。グリオーマ細胞では rapamycin で mTOR を阻害してもオートファジーを介する細胞死をきたすことが知られている³⁵⁾。これに対して、オートファジーの阻害が細胞死の増強に繋がる場

合もある。Liu ら³⁶⁾は食道癌細胞においてシスプラチニンがオートファジーを誘導する条件下で 3-MA でオートファジーを阻害すると、シトクローム c を介するアポトーシスが増強したと報告している。この場合、オートファジーは細胞生存に働くことになる。本研究では、口腔 SCC 細胞で safingol がアポトーシスだけでなくオートファジーを誘導すること、3-MA を併用してアポトーシスが増強されることを明らかにした。したがって、口腔 SCC 細胞における endoG を介するアポトーシスの系でもオートファジーは細胞生存に働いていており、その阻害が細胞死の増強に繋がることが示唆された。

Safingol は他の薬剤との併用で用いられることが多い。本研究の結果から、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であると考えられる。

結 語

- 1) ヒト口腔扁平上皮癌細胞由来の SAS 細胞, Ca9-22 細胞, 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。
- 2) 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が増加した。
- 3) SAS 細胞を safingol とオートファジー阻害剤 3-MA を併用して処理すると endoG の核内移行を認め, その細胞死は endoG siRNA による endoG のノックダウンで抑制された。
- 4) Safingol と 3-MA を併用した時の細胞死は, パンカスパーゼ阻害剤処理の影響を受けなかったが, 抗酸化剤処理で抑制された。

以上より, safingol により誘導されるオートファジーは細胞生存に働いており, その阻害は safingol による endoG を介するアポトーシスの増強につながることが示唆された。

謝　　辞

稿を終えるにあたり，本研究を行う機会を与えて頂き，御指導，御校
閲を賜りました大阪大学大学院歯学研究科顎口腔病因病態制御学講座
(口腔外科学第二教室)，由良義明教授に謹んで感謝の意を表します。ま
た，本研究に対し特別のご配慮，御協力を頂きました本学部口腔外科第
二教室の教室員の皆様に厚く御礼申しあげます。

参考文献

- 1) Musi, E., Ambrosini, G., Stanchina, E. and Schwartz, G. K. (2014): The Phosphoinositide 3-kinase α selective inhibitor BYL719 enhances the effect of the protein kinase C inhibitor AEB071 in GNAQ/GNA11-mutant uveal melanoma cells. *Mol Cancer Ther*, 13:1044-1053.
- 2) Arany, I., Adler-Storzhz, K., Chen, Z., Tyring, S. K., Brysk, H. and Brysk, M. M. (1997): Differentiation markers in oral carcinoma cell lines and tumors. *Anticancer Res*, 17:4607-4610.
- 3) Nishizuka, Y. (1992): Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science*, 258:607-614.
- 4) Carvajal, R. D., Merrill, A. H., Dlais, H., Barbl, A. and Schwartz, G. K. (2006): A phase I clinical study of safingol followed by cisplatin: promising activity in refractory adrenocortical cancer with novel pharmacology. *Clin Oncology*, 24:13044.
- 5) Christophe, L. T., Sandrine, F. and Lillian L. S. (2007): Molecular targeted therapy of head and neck cancer: review and clinical development challenges. *Eur J cancer*, 43:2457-2466.

6) USP Dictionary of USAN and International Drug Names; *US Pharmcopia* (2000): Rockville, MD, 636.

7) Schwartz, G. K., Haimovitz-Friedman, A., Dhupar, S. K., Ehleiter, D., Maslak, P., Lai, L. and et al. (1995): Potentiation of apoptosis by treatment with the protein kinase C-specific inhibitor safingol in mitomycin C-treated gastric cancer cells. *J Natl Cancer Inst*, 87, 1394-1399.

8) Haffmann, T. K., Leenen, K., Hafner, D., Balz, V., Gerharz, C. D., Grund, A. and et al. (2002): Antitumor activity of protein kinase C inhibitors and cisplatin in human head and neck squamous cell carcinoma lines. *Antitumor Drugs*, 13, 93-100.

9) Dickson, M. A., Carvajal, R. D., Merrill, A. H., Gonen, M., Cane, L. M. and Schwartz, G. K. (2011): A Phase I Clinical trial of safingol in combination with cisplatin in advanced solid tumors. *Clin Cancer Res*, 17:2484-2492.

10) Schwartz, G. K., Ward, D., Saltz, L., Casper, E. S., Spiess, T. and Mullen, E. (1997): A Pilot clinical/pharmacological study of the protein kinase C-specific inhibitor safingol alone and in combination with doxorubicin. *Clin Cancer Res*, 3:537-543.

11) Fulda, S., Galluzzi, L. and Kroemer, G. (2010): Targeting mitochondria for cancer therapy, *Nature*, 9:447-464.

12) Sakahira, H., Enari, M. and Nagata, S. (1998): Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*, 391:96-99.

13) Li, L. Y., Luo, X. and Wang, X. (2001): Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*, 412:27, 95-99.

14) Joza, N., Susin, S. A., Daugas, E., Stanford, W. L., Cho, S. K., Li, C. Y. and et al. (2001): Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*, 410:549-554.

15) Hamada, M., Sumi, T., Iwai, S., Nakazawa, M. and Yura, Y. (2006): Induction of endonuclease G-mediated apoptosis in human oral squamous cell carcinoma cells by protein kinase C inhibitor safingol. *Apoptosis*, 11:47-56.

16) Noda, T., Iwai, S., Hamada, M., Fujita, Y. and Yura, Y. (2009): Induction of apoptosis of detached oral squamous cell carcinoma cells by safingol. Possible role of Bim, focal adhesion kinase and endonuclease G. *Apoptosis*, 14:287-297.

17) Ling, L. U., Tan, K. B., Lin, H. and Chiu, G. N. (2011): The role of reactive oxygen species and autophagy in safingol-induced cell death. *Cell Death Dis*, 2:e129.

18) Hamada, M., Wakabayashi, K., Masui, A., Iwai, S., Imai, T. and Yura, Y. (2014): Involvement of hydrogen peroxide in safingol-induced endonuclease G-mediated apoptosis of squamous cell carcinoma cells. *Int J Mol Sci*, 15:2660-2671.

19) Coward, J., Ambrosini, G., Musi, E., Truman, J. P., Haimovitz-Friedman, A. and Allegood, J. C. (2009): Safingol (L-threo-sphinganine) induces autophagy in solid tumor cells through inhibition of PKC and the PI3-kinase pathway. *Autophagy*, 5:184-193.

20) Eskelinen, E. L., Reggiori, F., Baba, M., Kovács, A. L. and Seglen, P. O. (2011): Seeing is believing: The impact of electron microscopy on autophagy research. *Autophagy*, 7:935-956.

21) Jin, M. and Klionsky, D. J. (2014): Regulation of autophagy: Modulation of the size and number of autophagosomes. *FEBS Lett*, 588:2457-2463.

22) Klionsky, D. J., Abdalla, F. C., Abielovich, H., Abraham, R. T., Acevedo-Arozena, A., Adeli, K. and et al. (2008): Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy*, 4:151-175.

23) Kondo, Y. and Kondo, S. (2006): Autophagy and cancer therapy. *Autophagy*, 2:85-90.

24) Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T. and Noda, T. (2000): LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J*, 19:5720-5728.

25) Kirisako, T., Baba, M., Ishihara, N., Miyazawa, K., Ohsumi, M., Yoshimori, T. and et al. (1999): Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast. *J Cell Biol*, 147:435-446.

26) Shi, H. T., Guanghou, S., Jing, Z., Jasmine, J. E., Boon-Huat, B. and Markus, R. W. (2012): Induction of autophagy by palmitic acid via protein kinase C-mediated signaling pathway independent of mTOR. *J Biol Chem*, 287:14364-14376.

27) Saberi, B., Ybanez, M. D., Johnson, H. S., Gaarde, W. A., Han, D. and Kaplowitz, N. (2014): Protein kinase C (PKC) participates in acetaminophen hepatotoxicity through c-jun-N-terminal kinase (JNK)-dependent and -independent signaling pathways. *Hepatology*, 59:1543-1554.

28) Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H. and Reutelingsperger, C. (1995): A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol*

Methods, 184:39-51.

- 29) Brumatti, G., Sheridan, C. and Martin, S. J. (2008): Expression and purification of recombinant annexin V for the detection of membrane alterations on apoptotic cells. *Methods*, 44:235-240.
- 30) Mizushima, N. and Yoshimori, T. (2007): How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy*, 3:542-545.
- 31) Paglin, S., Hollister, T., Delohery, T., Hackett, N., McMahill, M., Sphicas, E. and et al. (2001): A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles. *Cancer Res*, 61:439-444.
- 32) Kim, J. S., Lee, J. H., Jeong, W. W., Choi, D. H., Cha, H. J., Kim, D. H. and et al. (2008): Reactive oxygen species-dependent Endo G release mediates cisplatin-induced caspase-independent apoptosis in human head and neck squamous carcinoma cells. *Int J Cancer*, 122:672-680.
- 33) Bursch, W., Ellinger, A., Kienzl, H., Török, L., Pandey, S., Sikorska, M. and et al. (1996): Active cell death induced by the anti-estrogens tamoxifen and ICI 164 384 in human mammary carcinoma cells (MCF-7) in culture: the role of autophagy. *Carcinogenesis*, 17:1595-1607.

34) Scarlatti, F., Bauvy, C., Ventruti, A., Sala, G., Cluzeaud, F., Vandewalle, A. and et al. (2004): Ceramide-mediated macroautophagy involves inhibition of protein kinase B and up-regulation of beclin 1. *J Bio Chem*, 279:18384-18391.

35) Takeuchi, H., Kondo, Y., Fujiwara, K., Kanzawa, T., Aoki, H., Mills, G. B. and et al. (2005): Synergistic augmentation of rapamycin-induced autophagy in malignant glioma cells by phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B inhibitors. *Cancer Res*, 65:3336-3346.

36) Liu, D., Yang, Y., Liu, Q. and Wang, J. (2011): Inhibition of autophagy by 3-MA potentiates cisplatin-induced apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma cells. *Med Oncol*, 28:105-111.

図.1

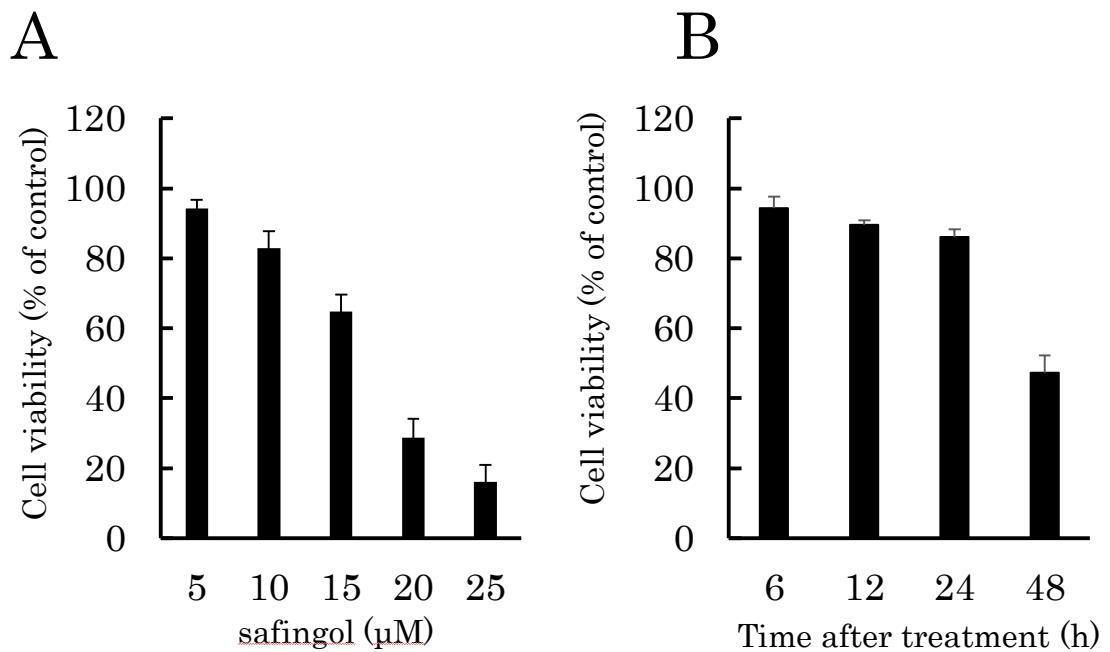


図 1. Safingol が SAS 細胞の生細胞率に及ぼす影響

SAS 細胞に対して 5-25 μM の safingol で 24 時間処理 (A), あるいは 10 μM で 6-48 時間処理 (B) し, MTT 法で生細胞率を測定した ($n=6$)。

図.2

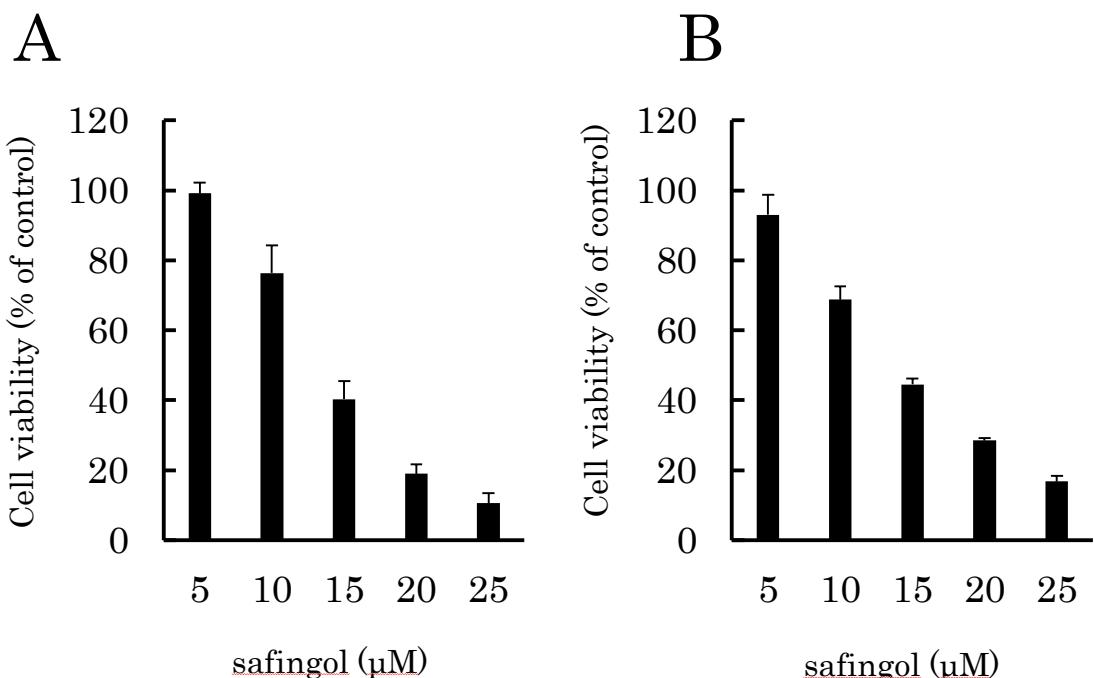


図 2. Safingol が Ca9-22 細胞, HSC-3 細胞の生細胞率に及ぼす影響

5-25 μM の safingol 存在下で Ca9-22 細胞 (A), HSC-3 細胞 (B)を 24 時間処理し, 生細胞率を MTT 法により測定した (n=6)。

図.3

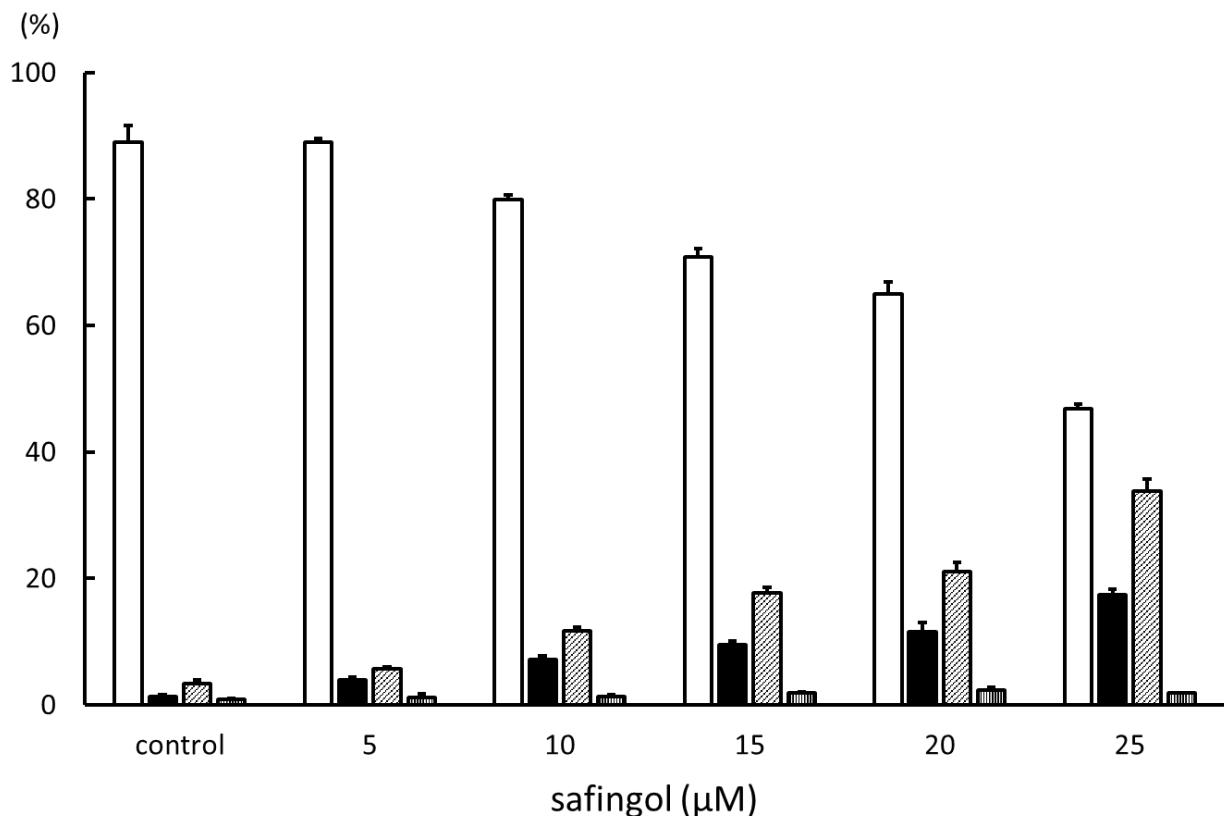
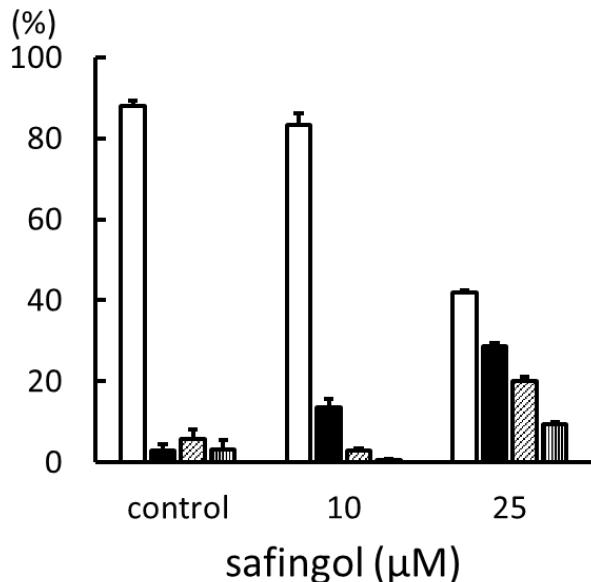


図 3. Safingol が SAS 細胞のアポトーシスに及ぼす影響

5-25 μM の safingol 存在下で SAS 細胞を 24 時間処理したフローサイトメトリー解析結果から annexin V(-)PI(-) (□), annexin V(+)PI(-) (■), annexin V(+)PI(+) (▨), annexin V(-)PI(+) (▨▨) の割合を求めグラフ化した。 (n=3)。

図.4

A



B

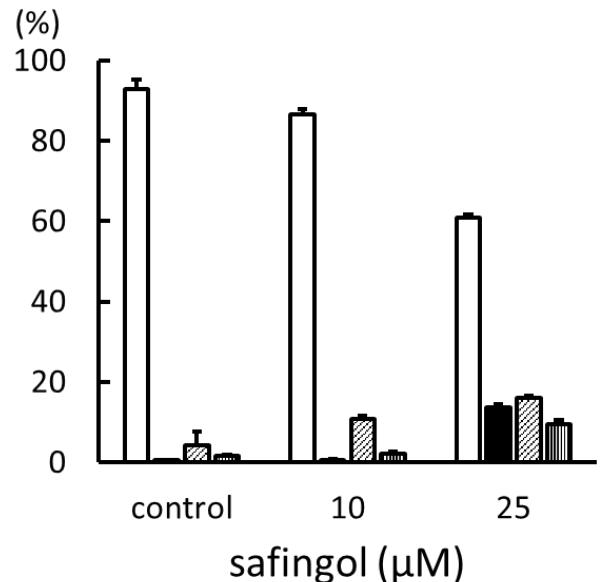


図 4. Safingol が Ca9-22 細胞, HSC-3 細胞のアポトーシスに及ぼす影響
10, 25 μM の safingol 存在下で Ca9-22 細胞 (A), HSC-3 細胞 (B) を

24 時間処理しフローサイトメトリー解析の結果から annexin V(-)PI(-) (□), annexin V(+)PI(-) (■), annexin V(+)PI(+) (▨), annexin V(-)PI(+) (▨) の割合を求めた (n=3)。

図.5A

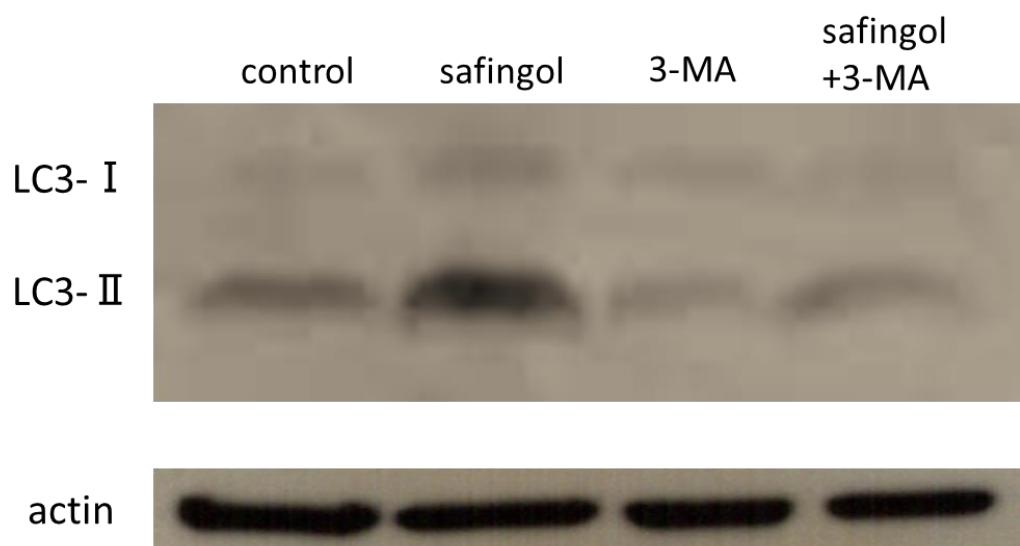


図 5A. Safingol ならびに 3-MA が LC3-I, LC3-II の発現に及ぼす影響
10 μ M の safingol ならびに 1 mM の 3-MA 存在下で SAS 細胞を 24 時間処理し, イムノブロット法にて LC3 を検出した。

図.5B

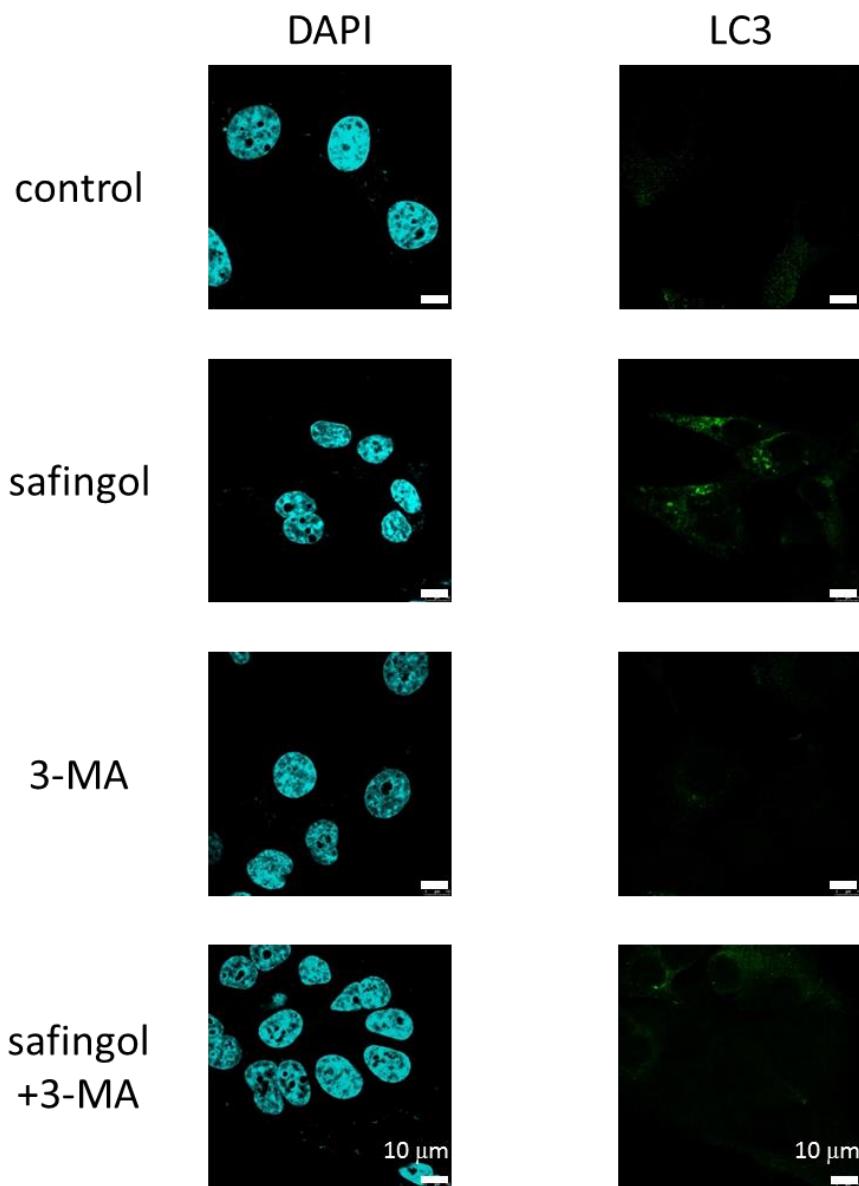


図 5B. Safingol ならびに 3-MA が SAS 細胞における LC3 の局在に及ぼす影響

10 μ M の safingol ならびに 1 mM の 3-MA 存在下で SAS 細胞を 24 時間処理し、免疫蛍光染色にて LC3 を検出した。

図.5C

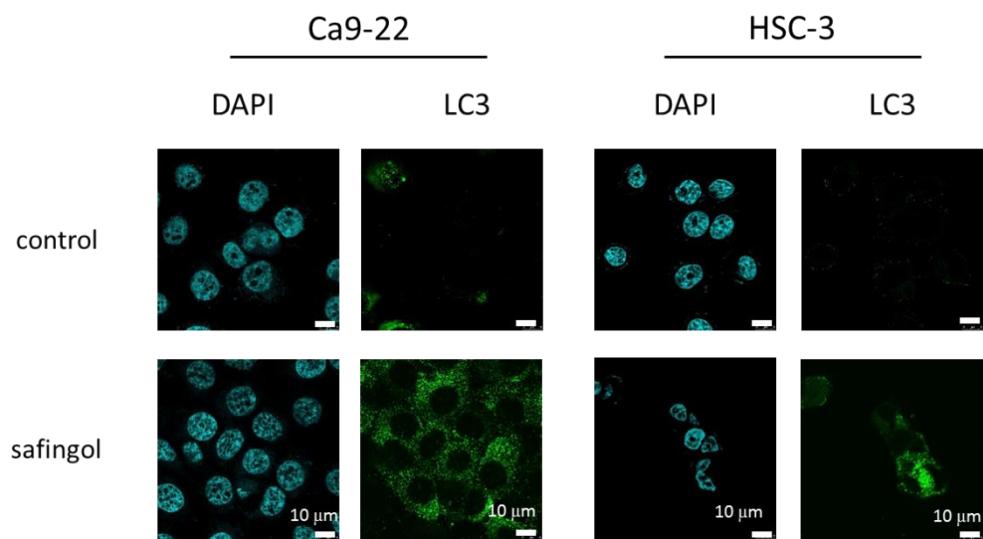


図 5C. Safingol ならびに 3-MA が Ca9-22 細胞, HSC-3 細胞における LC3 に及ぼす影響

10 μ M の safingol 存在下で Ca9-22 細胞, HSC-3 細胞を 24 時間処理した後に免疫蛍光染色にて LC3 を検出した。

図.5D

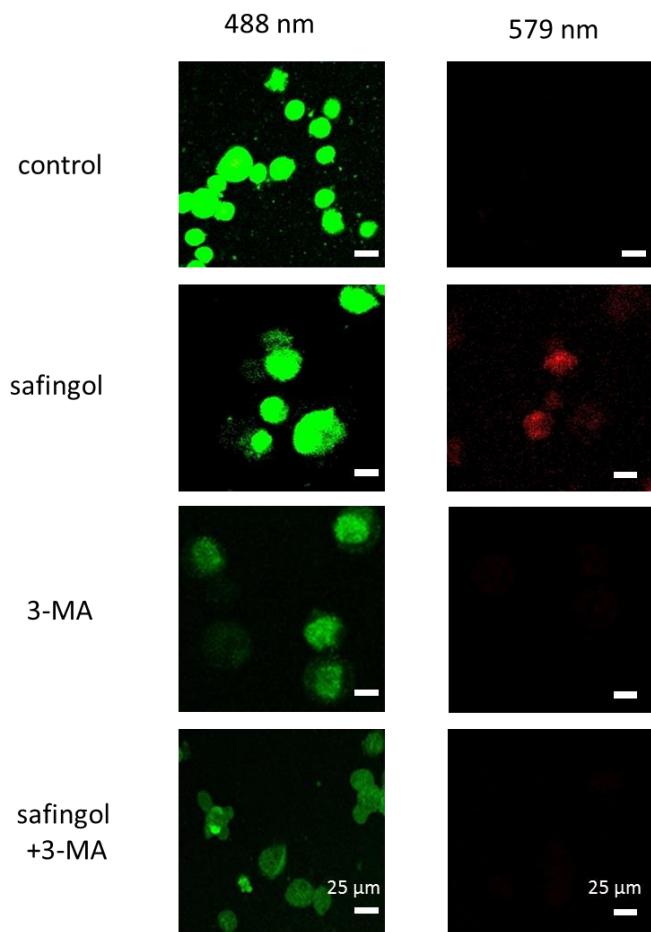


図 5D. Safingol ならびに 3-MA が SAS 細胞における AVOs 形成に及ぼす影響

10 μ M の safingol ならびに 1 mM の 3-MA 存在下で SAS 細胞を 24 時間処理し、アクリジンオレンジ染色を行い AVOs を検出した。

図.5E

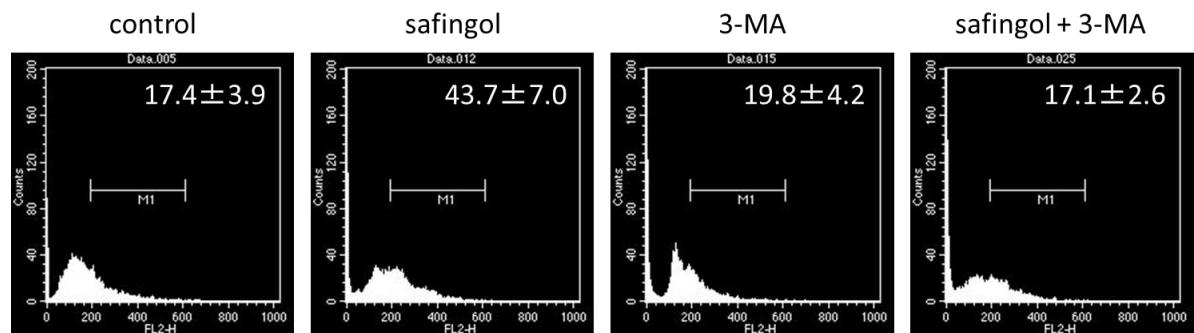


図 5E. Safingol ならびに 3-MA が SAS 細胞における AVOs に及ぼす影響

10 μ M の safingol および 1mM の 3-MA 存在下で SAS 細胞を 24 時間処理した後にアクリジンオレンジ染色を行いフローサイトメトリーの結果につきヒストグラム解析を行った。

図.6A

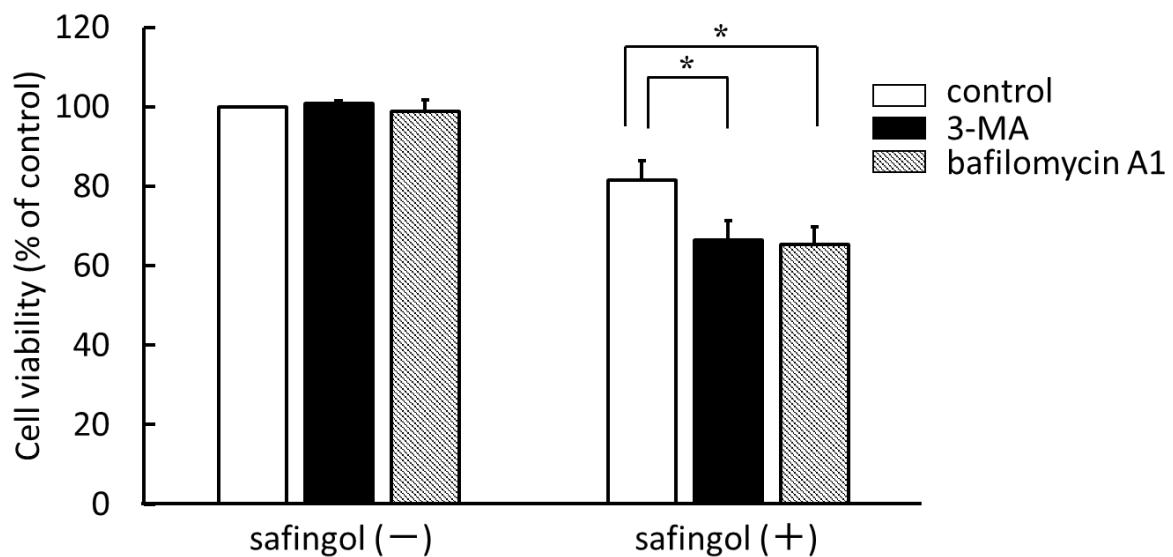


図 6A. Safingol とオートファジーの阻害剤が生細胞率に及ぼす影響

10 μ M の safingol 存在・非存在下で 1 mM の 3-MA あるいは 5 nM の baflomycin A1 により SAS 細胞を 24 時間処理し、生細胞率を MTT 法により測定した (n=6) (*:p<0.01)。

図.6B

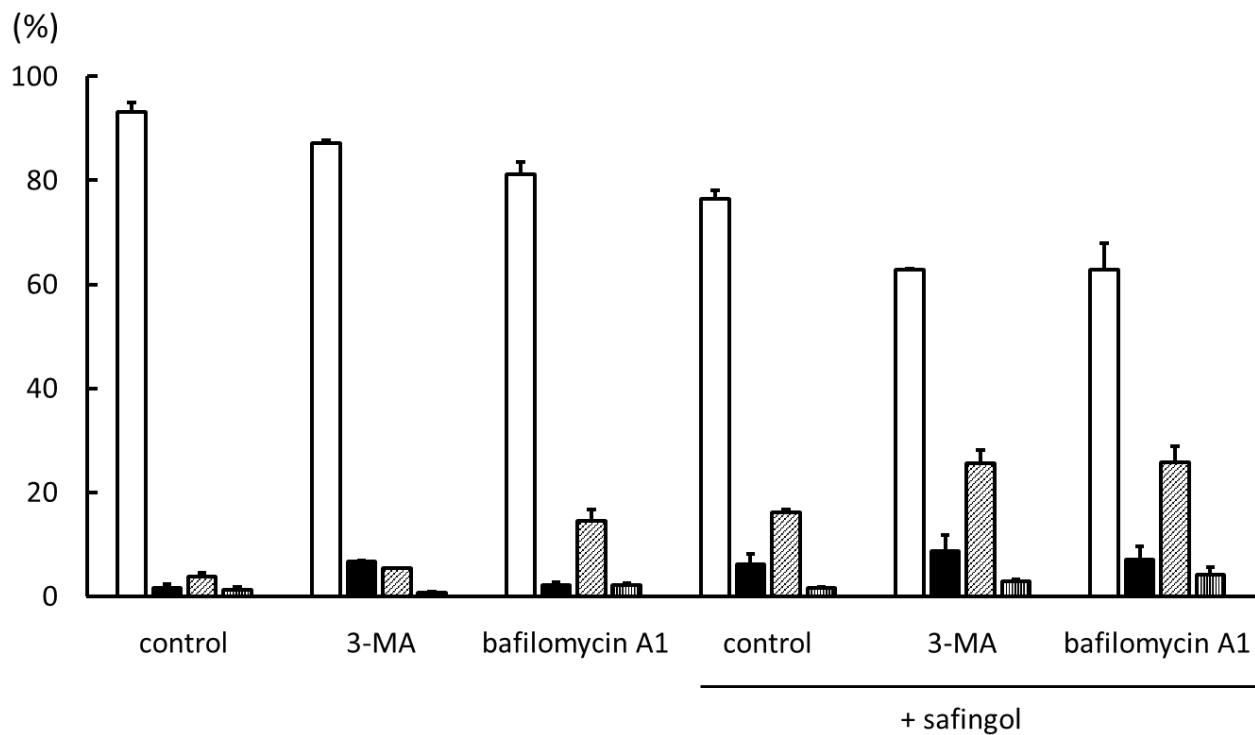


図 6B. Safingol とオートファジーの阻害剤がアポトーシスに及ぼす影響

10 μ M の safingol 存在・非存在下で 1 mM の 3-MA あるいは 5 nM の baflomycin A1 により SAS 細胞を 24 時間処理しフローサイトメトリー解析の結果から annexin V(-)PI(-) (□), annexin V(+)PI(-) (■), annexin V(+)PI(+) (▨), annexin V(-)PI(+) (▨▨) の割合を求めた (n=3)。

図.6C

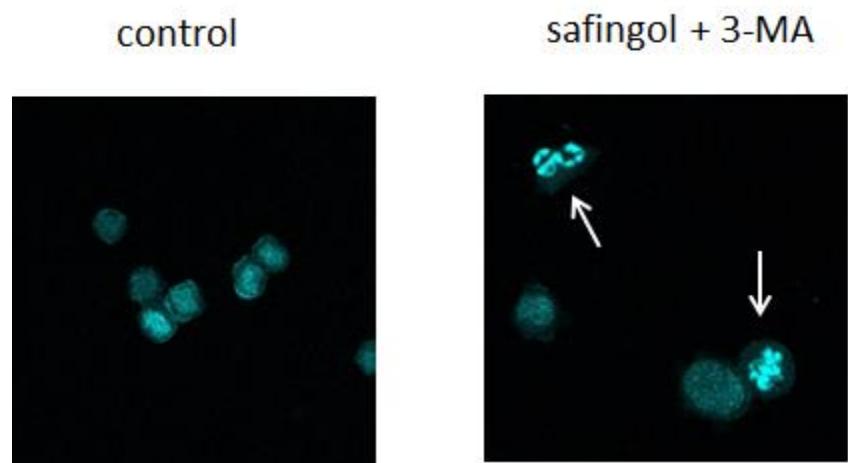


図 6C. Safingol と 3-MA が細胞核形態に及ぼす影響

10 μ M の safingol と 1 mM の 3-MA 存在下で SAS 細胞を 24 時間処理し, Hoechst 33342 にて核染色を行った。

図.7A

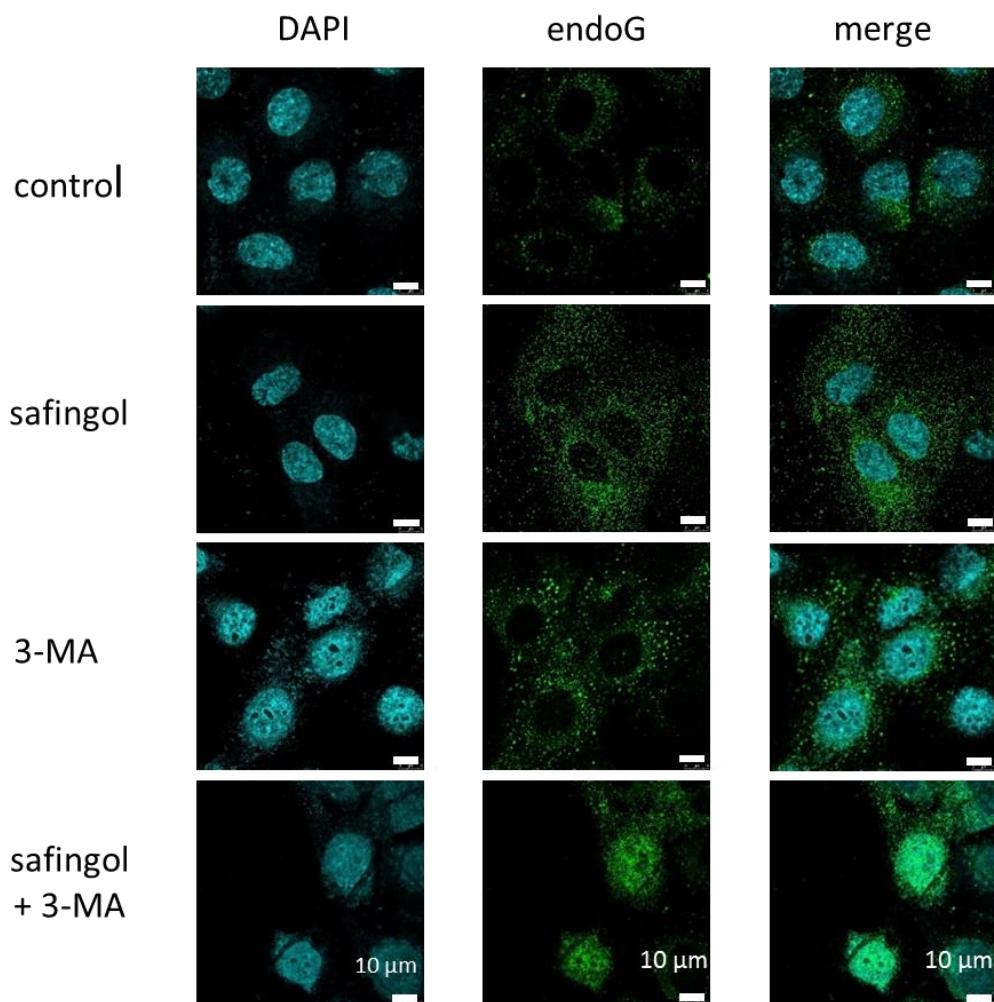


図 7A. Safingol と 3-MA の併用が endoG の核内移行に及ぼす影響

10 μ M の safingol および 1mM の 3-MA 存在下で SAS 細胞を 24 時間処理した後に蛍光免疫染色にて endoG を検出した。

図.7B

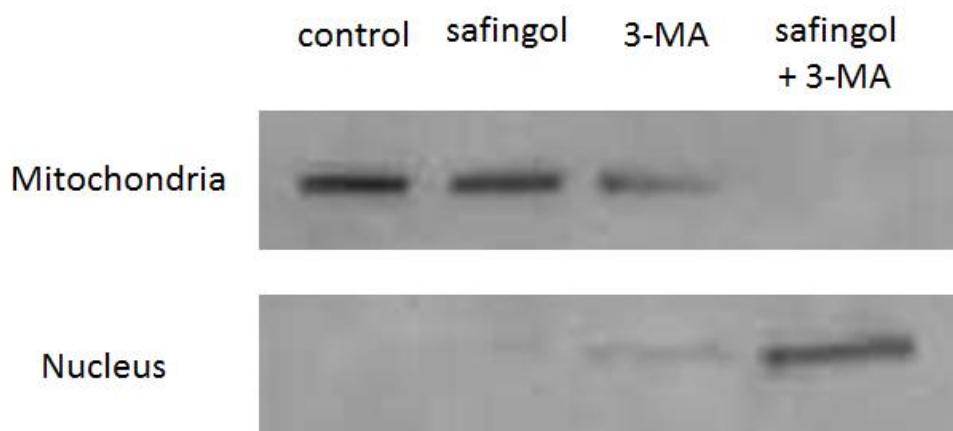
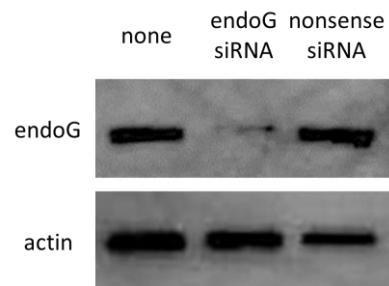


図 7B. Safingol と 3-MA の併用が endoG のミトコンドリアと核での局在に及ぼす影響

10 μ M の safingol および 1mM の 3-MA 存在下で SAS 細胞を 24 時間処理した後にミトコンドリア画分および核画分を調整し、イムノブロット法にて endoG を検出した。

図.8

A



B

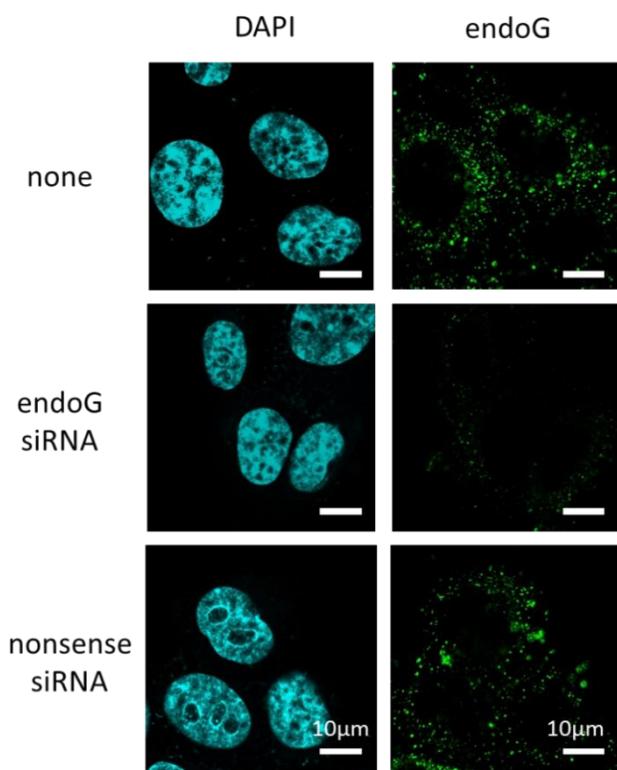


図 8. endoG siRNA の導入が endoG 発現に及ぼす影響

endoG siRNA 導入 24 時間後の細胞における endoG 発現をイムノブロット (A) および免疫蛍光染色 (B) にて検出した。

図.9

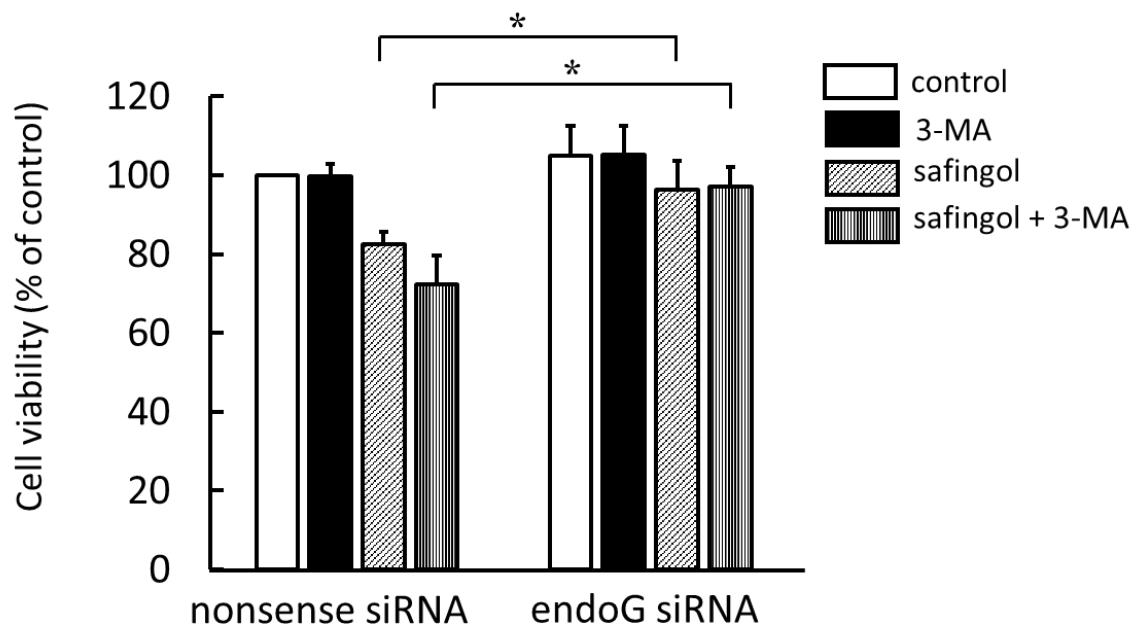


図 9. endoG siRNA を導入した SAS 細胞における safingol および 3-MA が生細胞率に及ぼす影響

10 μ M の safingol および 1 mM の 3-MA 存在下で endoG siRNA 導入 SAS 細胞を 24 時間処理し、生細胞率を MTT 法により測定した (n=6) (*:p<0.01)。

図.10

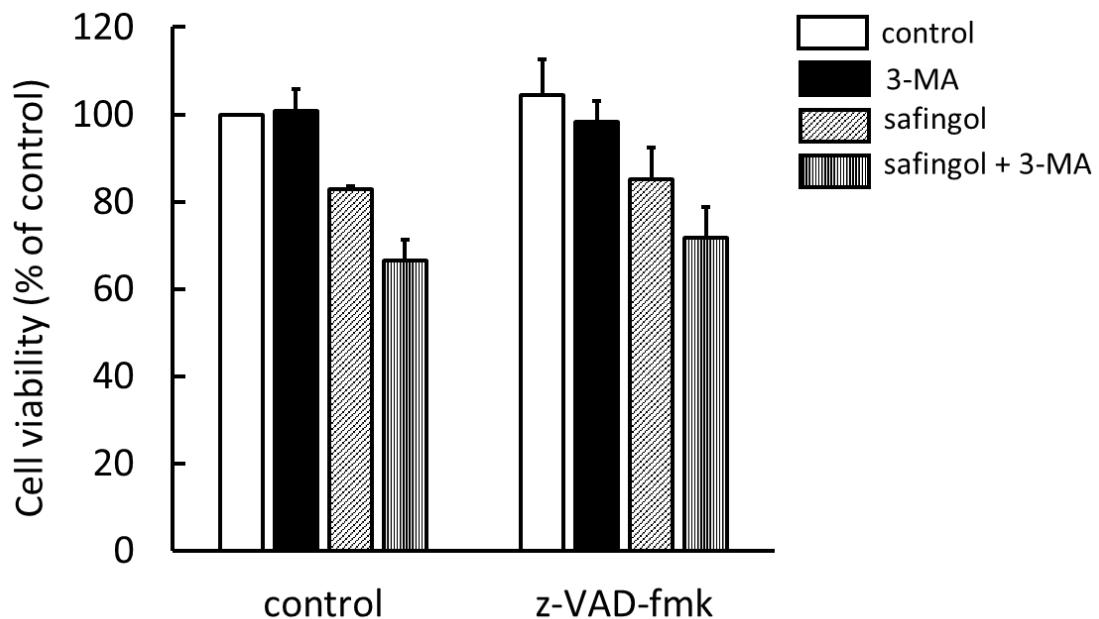


図 10. パンカスパーゼ阻害剤が safingol と 3-MA による細胞傷害性に及ぼす影響

パンカスパーゼ阻害剤 z-VAD-fmk で 2 時間前処理をした後に 10 μ M の safingol および 1 mM の 3-MA 存在下で SAS 細胞を 24 時間処理し, 生細胞率を MTT 法により測定した (n=6)。

図.11

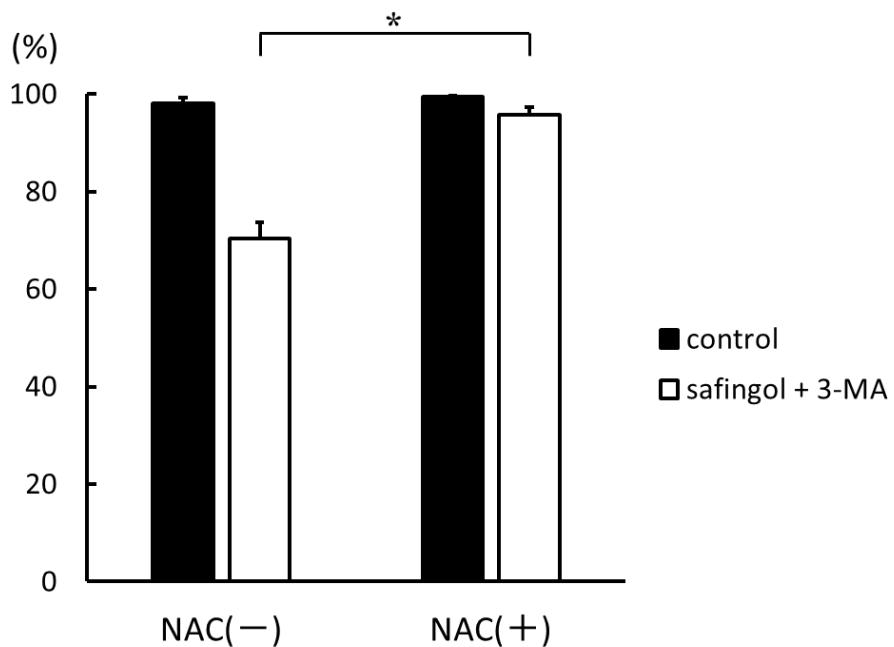


図 11. 抗酸化剤 NAC が safingol と 3-MA による細胞傷害性に及ぼす影響

10 μ M の safingol, 1 mM の 3-MA および 10 mM の NAC 存在下で SAS 細胞を 24 時間処理し, annexin V, PI 染色後にフローサイトメトリー解析し, annexin V(-)PI(-)である生細胞の割合を求めた (n=3) (*:p<0.01)。