

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

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

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

桝井 敦史

緒 言

Protein kinase C(PKC)は古典的なアイソフォームである a, 6I, 6II, y 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、ヒトロ腔 SCC (扁平上皮癌; squamous cell carcinoma)では PKCa や PKC6 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 PKCa に選択性を示すとされている。ヒトロ腔 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 とシスプラチン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 化されると、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 apoptosisinducing 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、ヒトロ腔 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

 $\mathbf{2}$

機能が判明している²⁰⁾。オートファジー経路では, phosphatidylinositol 3-phosphase 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 microtubuleassociated 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した報告はない。そこで、本研究では safingol に よるヒトロ腔 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。

3

実験材料と方法

1. 細胞と方法

実験にはヒトロ腔 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 Japansese 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℃, 5% CO2 培養器中で培養した。

2. 試薬

PKCa 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。

4

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 $3 \cdot (4,5 \cdot \text{dimethylthiazol} \cdot 2 \cdot \text{yl}) \cdot 2,5 \cdot$ diphenyltetrazolium · bromide (MTT)液 10 µl を各 well に加え, さらに $37 \degree$ で4時間培養し, 0.04N HCl を含む isopropanol を 100 µl 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 2×10⁵ 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×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 µl の binding buffer (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂, pH 7.4)に 5 µl の FITCannexin V と 1 µl 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 µg/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 回粉砕後に 4℃, 1,000 ×g で 10 分間遠心し、その上清を 4℃, 10,000 ×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 も含め単一とし, 1,000×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℃, 500×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×g で 5 分間遠心し上清を核画分とした。

6. イムノブロット法

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)を用いて細胞を粉砕後, 4℃, 15,000 ×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℃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) $\checkmark \lor \lor \lor \lor \lor$ (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 B-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 2×10⁵ 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 2×10⁵ 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'-CTGGAACAACCTGGAGAAATA-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 ンスフ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* 検定を行い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。

9

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 μ M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 μ M では 33.9%であった。10 μ M 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⁾。 オートファゴゾームに必要な LC3-II は LC3-I から形成される。SAS 細 胞を 10 μ M の safingol 存在下で 24 時間培養し,イムノブロット法で 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をイムノブ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,細胞質内での 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ったが、 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、イムノブロ 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 時間後にイムノブ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 µM 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)。

14

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 25 µM あるいは 50 µM 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,15 μM の safingol 処 理でオートファジーが生じること, また 5 μM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 µM 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 み陽性のネクローシス細胞は 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ブロット 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。

16

3-MA はオートファゴソーム形成前を阻害し, bafilomycin 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 bafilomycin A1 で処理したところ, 細胞増殖に 影響を与えなかった。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判明した。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ブロット解析でも 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ヘトランスロケーショ 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

- ヒトロ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。
- 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。

20

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

- 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.
- Arany, I., Adler-Storrhz, 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.
- 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.

- 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 cicplatin 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.
- 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 apopotosis 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 safingolinduced 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-threosphinganine) 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., Abeliovich, 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 yaest. 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 mammery 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 upregulation 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. 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. 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. Safingol が SAS 細胞のアポトーシスに及ぼす影響

5-25µM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. 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 10µM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 µM 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 µM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 µM 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. Safingol ならびに 3-MA が SAS 細胞における AVOs に及ぼす影響

10 μM 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. 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 µM の safingol 存在・非存在下で 1 mM の 3-MA あるいは 5 nM の bafilomycin 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. 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 µM の safingol 存在・非存在下で 1 mM の 3 MA あるいは 5 nM の bafilomycin 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

control



safingol + 3-MA



図 6C. Safingol と 3-MA が細胞核形態に及ぼす影響

10 µM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 µM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 μM 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



В



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 µM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 μM 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. 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 µM 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 一解析し, annexin V(-)PI(-)である生細胞の割合を求めた (n=3) (*:p<0.01)。