

Title	口腔扁平上皮癌細胞に対するゲラニルゲラニルトランスフェラーゼ阻害剤を用いた分子標的治療に関する研究
Author(s)	三木, 哲英
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/57613
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	三木哲英
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第23729号
学位授与年月日	平成22年3月23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対するゲラニルゲラニルトランスフェラーゼ阻害剤を用いた分子標的治療に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 由良 義明 (副査) 教授 脇坂 聡 准教授 大倉 正也 講師 久保 和子

論文内容の要旨

【目的】

Ras 遺伝子産物は GTP と GTP の交換を介して、細胞内シグナル伝達のスイッチ機能を果たす低分子量 G タンパク質で、相同性の高い Rho, Rab, Arf とともに Ras スーパーファミリーに属している。これら低分子量 G タンパク質は癌化、増殖、血管新生、浸潤、転移などに関与するが、機能を発揮するためには、翻訳後にファルネシル化あるいはゲラニルゲラニル化といった脂質修飾(プレニル化)を受ける必要がある。この反応に関与するのがファルネシルトランスフェラーゼ (FTase) とゲラニルゲラニルトランスフェラーゼ I (GGTase I) である。そのため、FTase, GGTase I は分子標的として注目されており、各種の FTase 阻害剤 (FTI) と GGTase I 阻害剤 (GGTI) が開発されている。一方、プロテインキナーゼ C (PKC) も有望な分子標的とされ、すでに各種の阻害剤が開発されている。PKC 阻害剤と他の抗癌薬を併用する研究も進められている。そこで、本研究では口腔扁平上皮癌細胞 (OSCC) に対する GGTI の増殖、浸潤、プレニル化への影響ならびに他の分子標的治療薬として PKC 阻害剤との併用効果について検討を行った。

【材料と方法】

1. 細胞として、ヒト OSCC 細胞由来の Ca9-22, HSC-3, SAS を用いた。2. GGTI と

して GGTI-298, GGTI-2133, GGTI-2147, PKC 阻害剤としては, Gö6976, dequalinium chloride (DECA), staurosporine, safingol を用いた。3. 細胞増殖は MTT 法にて測定し、細胞周期は flow cytometry (FCM) で解析した。4. 細胞遊走能は transwell chamber assay と wound healing assay, 細胞浸潤能は matrigel invasion assay にて測定した。5. 低分子量 G タンパク質とサイクリンキナーゼインヒビター (CKI) の発現は, Ras, RalA, RalB, RhoA, p21, p27 に対する抗体を用いたイムノブロット法で検出した。6. 細胞質画分と細胞膜画分は ProteoExtract Subcellular Proteome Extraction Kit を用いて分画した。7. アクチン細胞骨格は Phalloidin-AlexaFluor546 を用いて蛍光染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。8. RalA, RalB に対する siRNA を lipofectamine2000 を用いてトランスフェクションした。9. GGTI と PKC 阻害剤との併用効果は Fraction 法を用いて評価した。10. 細胞の断片化 DNA はアガロースゲル電気泳動で検出した。

【結果】

- OSCC 細胞を 3 種類の GGTI を用いて 5~15 μ M の濃度で処理し、細胞増殖能を MTT 法で測定したところ、いずれの阻害剤でも濃度依存的に細胞増殖が抑制され、OSCC 細胞の増殖を 5~35% 抑制した。
- GGTI-298 で SAS 細胞を処理して細胞周期を FCM で解析したところ、経時的に G₀/G₁ 期細胞の割合が増加し、G₁ 期停止を示した。アポトーシスを示す subG₁ の増加はみられなかった。15 μ M の GGTI 処理後に CKI である p21 の発現をイムノブロット法で検出すると、経時的な増強がみられた。
- GGTI が OSCC 細胞の遊走能に及ぼす影響を transwell chamber assay にて測定した結果、5 μ M の濃度で細胞遊走能は低下した。wound healing assay でも、傷害部位の修復が遅延した。同様に細胞浸潤能も低下した。
- 低分子量 G タンパク質はゲラニルゲラニル化を受けると細胞膜に移行する。そこで、GGTI が Ras, RalA, RalB, RhoA の細胞内局在に及ぼす影響について細胞質、細胞膜画分で発現を調べた。その結果、RalB と RhoA が細胞質で増加し細胞膜で減少した。
- 細胞を GGTI で処理し、アクチン細胞骨格について蛍光染色を行ったところ、細胞の円形化に伴ってアクチンストレスファイバーと細胞突起の消失がみられた。
- siRNA による RalA, RalB の発現の阻害は細胞増殖には影響を与えなかったが、RalB の発現の阻害により細胞遊走能は大きく低下した。
- GGTI-298 と PKC 阻害剤の DECA, Gö6976 あるいは staurosporine の併用では相加効果、safingol との併用では相乗効果が認められた。
- GGTI-298 と safingol 併用で、subG₁ の増加がみられた。細胞 DNA のアガロースゲル電気泳動を行ったところ、併用の場合に DNA の断片化を示す DNA ラダーが検出された。

【考察と結論】

GGTI は濃度依存的に OSCC 細胞の増殖を抑制するが、これには GGTI 処理による p21

の誘導と G₁ 期停止が関与すると考えられた。GGTI 処理で細胞遊走能ならびに細胞浸潤能は強く抑制され、RalB, RhoA の細胞膜への移行も顕著に抑制され、アクチンファイバーの再構成もみられたことから、GGTI は RalB, RhoA のプレニル化を強く阻害して、細胞の運動能を低下させると考えられた。PKC 阻害剤の safinol は GGTI との間で相乗的な細胞増殖抑制効果を示し、併用で OSCC 細胞にアポトーシスを誘導することがわかった。以上より、低分子量 G タンパク質の翻訳後修飾に与る GGTase I の阻害剤として開発された GGTI は、OSCC の転移、浸潤を抑制する分子標的治療薬としての有用性が高いこと、PKC 阻害剤 safinol との併用で OSCC に対する細胞傷害性を発揮できることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は geranylgeranyltransferase I (GGTase I) を分子標的としてその阻害剤 (GGTase I 阻害剤) の口腔扁平上皮癌細胞に対する効果とそのメカニズムならびに、他の分子標的治療薬との併用効果について検討したものである。

その結果、GGTI が低分子量 G タンパク質の脂質修飾を阻害して癌細胞の増殖、遊走・浸潤を抑制すること、プロテインキナーゼ C 阻害剤 safinol との併用によりアポトーシスを誘導することが示唆された。

以上の結果は、口腔扁平上皮癌の分子標的療法の発展に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。