

Title	PKC α 阻害剤safingolのヒト口腔扁平上皮癌細胞に対する細胞死誘導に関する研究
Author(s)	若林, 健
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59288
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

【9】

氏 名	わか ばやし けん 若 林 健
博士の専攻分野の名称	博 士 (歯学)
学 位 記 番 号	第 2 5 0 1 7 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 24 年 3 月 22 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	P K C α 阻害剤 safingol のヒト口腔扁平上皮癌細胞に対する細胞死誘導 に関する研究
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 由良 義明 (副査) 教 授 米田 俊之 准教授 竹村 元秀 准教授 大倉 正也

【目的と意義】

プロテインキナーゼ C (PKC) は細胞の増殖や癌化において重要な作用をすると考えられており、このシグナル伝達系は分子標的の一つとみなされている。L-threo-dihydrospingosine (safingol) は PKC α の選択的阻害剤で、口腔扁平上皮癌細胞に対してミトコンドリアからアポトーシス誘導因子 endonuclease G (endo G) の放出を促すことが明らかにされている。また、ミトコンドリアでは fusion と fission といった形態の動的変化が起こっており、fusion はミトコンドリア DNA や呼吸活性の維持に必要とされ、fission はアポトーシスに必要とされている。一方、アントラサイクリン系などの抗腫瘍薬は細胞内で活性酸素 (ROS) を発生させること、神経細胞では ROS でミトコンドリアからの endo G の放出をきたすことが知られている。

そこで、本研究では safingol による抗腫瘍効果のメカニズムを解明するため、safingol と ROS である H₂O₂ が口腔扁平上皮癌細胞における ROS 産生量ならびにミトコンドリアの形態・膜電位に及ぼす影響について検討を行った。

【材料と方法】

1. 細胞として、ヒト口腔扁平上皮癌由来 SAS 細胞、薬剤は H₂O₂、safingol、抗酸化剤 N-acetylcysteine (NAC)、ミトコンドリア分裂因子 dynamin-related protein 1 (Drp1) の阻害剤 mitochondrial division inhibitor (mdivi-1) を用いた。
2. トリパンブルーで染色されない生細胞と染色される死細胞を判別した。Hoechst 33342 染色で核の断片化したアポトーシス細胞を検出した。ROS は細胞を凍結融解したのち、BIOXTECH H₂O₂-560 を添加し、得られる吸光度で測定した。
3. ミトコンドリア膜電位の測定では、JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit で蛍光染色し、共焦点レーザー顕微鏡で画像を取得し、これをソフトウェア WinROOF で解析した。ミトコンドリアの形態は MitoTracker Red CMXRos で蛍光染色して観察した。
4. endo G あるいは Drp1 に対する siRNA はリポフェクタミンを用いてトランスフェクションした。その後、細胞タンパク質を回収して可溶化し、イムノブロット法で発現タンパク質を検出した。

【結果】

1. SAS 細胞を H₂O₂ あるいは safingol で処理したところ、細胞内 ROS を示す吸光度は非処理対照と比較して、約 2 倍にまで増加した。
2. NAC で前処理したのち、H₂O₂ 処理を行って死細胞の割合を求めたところ、H₂O₂ 単独で 33% であったものが 8% にまで低下した。safingol 処理では死細胞は 31% から

10% にまで低下した。アポトーシス細胞でも同様の結果であった。

3. endo G siRNA あるいは nonsense siRNA をトランスフェクションした細胞を H₂O₂ で処理したところ、死細胞はそれぞれ 13% と 33% であり、safingol 処理では、17% と 27% であった。アポトーシス細胞でも同様の結果が得られた。
4. H₂O₂ あるいは safingol で処理し、ミトコンドリアを蛍光染色したところ、ミトコンドリアの短小化がみられた。Drp1 の阻害剤 mdivi-1 による前処理で、H₂O₂ 処理による fission 細胞は 60% から 23%、safingol では 50% から 23% に低下した。Drp1 siRNA をトランスフェクションした細胞でも H₂O₂、safingol による fission 細胞の増加は抑制された。
5. mdivi-1 による前処理で、H₂O₂ による死細胞は 33% から 10% に、safingol では 31% から 9% に低下した。アポトーシス細胞でも同様であった。Drp1 siRNA をトランスフェクションしても、死細胞ならびにアポトーシス細胞の割合が低下した。
6. 蛍光染色で視野全体に対する膜電位が低下したミトコンドリアを示す緑色が占める面積比を求めたところ、非処理で 29% であったものが、H₂O₂ あるいは safingol 処理で、それぞれ 63%、65% へ増加し、mdivi-1 での前処理で減少した。

【考察】

safingol 処理でも H₂O₂ と同じように細胞内 ROS 量の上昇が認められ、NAC で阻害されることから、safingol 処理によって癌細胞で産生される ROS がアポトーシスに関与するものと考えられる。endo G を siRNA でノックダウンさせた場合、アポトーシスも阻害され、H₂O₂ による癌細胞の細胞死にも endo G が関与することが分かった。また、safingol、H₂O₂ 処理でもミトコンドリアが fission を示す細胞が増加した。そこで、ミトコンドリア分裂因子 Drp1 に対する阻害剤 mdivi-1 と siRNA でその働きを阻害すると、safingol、H₂O₂ による fission が抑制され、アポトーシス誘導が低下し、ミトコンドリア膜電位低下も抑制された。したがって、safingol 処理は Drp1 によるミトコンドリア fission の促進から、ミトコンドリア膜電位の低下を経て、染色体 DNA を切断してアポトーシスを実行する endo G のミトコンドリアからの放出に繋がるものと考えられた。

論文審査の結果の要旨

本研究は、PKC α 阻害剤 safingol のヒト口腔扁平上皮癌細胞に対する細胞死誘導経路の解明を目的に検討したものである。その結果、safingol はヒト口腔扁平上皮癌細胞に対し、活性酸素を介してミトコンドリアの分裂を促進し、endonuclease G の関与により細胞死を誘導することが明らかとなった。

以上の研究結果は、safingol のヒト口腔扁平上皮癌に対する作用メカニズムを明らかにする上で

重要な示唆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。