



Title	口腔扁平上皮癌細胞におけるsphingosine kinase 1阻害薬によるオートファジー誘導に関する研究
Author(s)	亀山, 裕泰
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/61677
rights	© The Authors 2017. This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.
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 (亀山 裕泰)

論文題名 口腔扁平上皮癌細胞におけるsphingosine kinase 1阻害薬によるオートファジー誘導に関する研究

論文内容の要旨

【緒言】

スフィンゴ脂質はスフィンゴ塩基を基本構造にもつ脂質の総称で、多くは細胞膜に存在しており、細胞構造の支持、防御障壁、細胞外タンパク質の接着といった形質膜上の構成分子としてのみならず、細胞死、増殖、分化などを制御するシグナル分子として機能している。代表的なスフィンゴ脂質の1つであるsphingosine-1-phosphate (S1P) は細胞内外のシグナル分子として、細胞増殖や細胞生存、リンパ球トラフィッキング、血管新生や炎症等の細胞学および生理学的な反応を司っている。さらに、発癌や癌の進展および癌細胞における薬剤耐性や放射線耐性に関与することが報告され、アポトーシスの阻害や細胞増殖、形質転換、血管新生、炎症等の増強によって、癌を増悪させることが示されている。S1P産生酵素の1つであるスフィンゴシンキナーゼsphingosine kinase 1 (SphK1) は主に細胞質基質に局在し、S1Pの主要な産生酵素として機能している。SphK1は癌遺伝子の1つと考えられており、頭頸部癌においても発癌や浸潤、転移、放射線増感作用に重要な役割を果たすとされ、癌治療における分子標的と考えられている。

オートファジーは細胞内でのタンパク分解系で、細胞順応における細胞構造のリモデリングや、劣化した細胞の細胞質成分のリサイクリングなどの生理反応に関与することが明らかにされている。オートファジーは栄養欠乏時の細胞生存に働いていると考えられてきたが、一方で、近年オートファジーを伴う細胞死の存在が見い出された。オートファジーが細胞生存と細胞死のいずれにも関わるという新たな概念から、癌細胞におけるオートファジーの役割の解明は新たな癌治療戦略に大きく貢献することとして注目されている。

L-Threo-dihydrosphingosine (safingol) はprotein kinase C (PKC) の阻害薬として開発された薬物で、頭頸部癌を含む固形癌に対して、シスプラチンとの併用による臨床研究ではphase I の段階にある。当教室ではこれまでに、safingolはヒト口腔扁平上皮癌squamous cell carcinoma (SCC) 細胞において、カスパーゼ非依存的にアポトーシスを誘導し、ミトコンドリアから細胞質へ放出されたendonuclease G (endoG) が核に移行してDNAを切断すること、ミトコンドリアの膜電位の低下には活性酸素種reactive oxygen species (ROS) が関与することを明らかとした。また、safingolがヒト口腔SCC細胞において、オートファジーを誘導することを報告している。さらに、safingolは、SphK1阻害薬として作用することが見い出され、臨床研究が進められているが、safingolよりSphK1に対して選択性の高い阻害薬として、最近PF-543が発表された。SphKは口腔癌の増殖や転移においても重要な役割を果たし、その阻害が抗腫瘍効果に繋がる可能性がある。そこで、本研究では、PKCならびにSphK1阻害作用のあるsafingolでの口腔癌細胞に対する先行研究を踏まえて、SphK1阻害薬として開発されたPF-543のヒト口腔SCC細胞に対する抗腫瘍効果とまだ明らかにされていないオートファジー誘導能について検討を行った。

【実験材料と方法】

ヒト口腔SCC細胞であるCa9-22細胞、HSC-3細胞、SAS細胞を用いた。SphK1阻害薬としてPF-543、オートファジー阻害薬としてwortmannin、3-methyladenine (3-MA)、bafilomycin A1を用いた。また、抗酸化薬としてN-acetyl-L-cystein (NAC) を用いた。細胞形態は位相差顕微鏡にて観察した。細胞生存率はMTT法にて測定した。イムノブロット法では、 β -actin、SphK1、LC3に対する抗体を用いた。免疫蛍光染色では抗LC3抗体を用い、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。アポトーシスは細胞をannexin V-fluorescein isothiocyanateとpropidium iodide (PI)で染色し、フローサイトメトリー解析を行った。

【結果】

- 1) ヒト口腔SCC細胞におけるSphK1の発現をイムノブロット法で検出したところ、SphK1はCa9-22細胞、HSC-3細胞、SAS細胞のいずれでも発現していたが、SAS細胞は低発現であった。
- 2) PF-543で細胞を処置したところ、25 μ M以上の濃度では、細胞は円形化し、経時的に細胞生存率は減少した。72時間後には非処置対照群に比べHSC-3が25.6%、Ca9-22が53.8%にまで低下した。
- 3) PF-543による細胞死形態を知るためフローサイトメトリー解析を行ったところ、ネクローシス細胞の割合が、

Ca9-22細胞では30.4%，HSC-3細胞では29.4%に達した。

- 4) PF-543処置したCa9-22細胞，HSC-3細胞では，オートファジーのマーカーとなるLC3-IIのバンドが増強し，免疫蛍光染色でLC3が顆粒状に集積する像がみられた。
- 5) PF-543とオートファジー阻害薬としてwortmannin, 3-MA, あるいはbafilomycin A1を併用したところ，イムノブロット法にてPF-543処置によるLC3-IIの発現増強は，wortmanninあるいは3-MAとの併用によって，低下した。一方，bafilomycin A1との併用では，形成されたオートファゴソームが維持され，PF-543単独と比較して，LC3-IIのバンドはむしろ増強した。フローサイトメトリー解析では，PF-543単独と比較してアポトーシスあるいはネクローシスが増加した。HSC-3細胞の場合，72時間後のネクローシス細胞の割合は，PF-543単独で29.4%であるのに対して，bafilomycin A1との併用で11.1%にまで低下した。一方，後期アポトーシス細胞はPF-543単独で16.7%に対して併用で28.4%まで上昇した。
- 6) HSC-3細胞においてPF-543とNACを併用したところ，フローサイトメトリー解析にて生細胞の割合は，PF-543単独処置群では28.4%まで減少し，NACの併用により47.7%まで増加した。また，ネクローシス細胞の割合はPF-543単独処置群では58.3%であったが，NAC併用により38.5%にまで減少した。

【考察】

SphK1を発現する細胞株において，SphK1阻害薬であるPF-543を作用させると，濃度・処置時間依存的な生細胞率の減少が生じた。またイムノブロット法により，PF-543がオートファゴソームを構成するLC3-IIレベルを増加することが認められた。さらに，免疫蛍光染色法において，コントロール細胞で細胞質全体にびまん性に存在するLC3が，PF-543処置により細胞質での発現が増強し，さらに顆粒状に集積することを観察した。したがって，PF-543によってオートファゴソームが形成されオートファジーが誘導されると考えられた。フローサイトメトリー解析により，PF-543によるCa9-22細胞およびHSC-3細胞の細胞死形態が，アポトーシスおよびオートファジーだけでなくネクローシスであることを認めた。オートファジーの誘導は，細胞の生存あるいは細胞死のいずれかに働くことが知られている。したがって，オートファジー誘導の阻害によって抗癌薬の薬効が影響を受けることが考えられる。本研究では，オートファジー阻害薬であるwortmannin, 3-MA, あるいはbafilomycin A1のPF-543との併用が，PF-543によるネクローシスあるいはアポトーシスを増強することを見出した。さらに，HSC-3細胞において，bafilomycin A1はPF-543誘導性ネクローシスを抑制させ，一方でアポトーシスを増加させた。詳細な分子機序については未だ不明であるが，bafilomycin A1では，PF-543誘導オートファジーによるアポトーシスの抑制作用に強く拮抗したため，(1)アポトーシスが促進して，ネクローシスが減少したこと，あるいは(2)ネクローシスをアポトーシスに移行させたことが考えられた。また，NACの前処置は，PF-543によるネクローシスを抑制したことから，PF-543による細胞傷害性の過程においてもROS産生の関与が示唆された。以上の成績より本研究では，SphK1阻害薬として開発されたPF-543が，ヒト口腔SCC細胞において，細胞死としてアポトーシス，ネクローシスを惹起すること，オートファジーを誘導すること，さらに，抗腫瘍作用を示すことを明らかとした。先行研究で，SphK1阻害作用の関与を示したsafingolは，既に既存の抗癌薬との併用効果が明らかにされている。したがって，今後PF-543についても既存の抗癌薬との併用効果に関して検討したいと考えている。

【結論】

- 1) ヒト口腔SCC細胞であるCa9-22細胞，HSC-3細胞およびSAS細胞においてPF-543は，細胞生存率を低下させた。
- 2) Ca9-22細胞，HSC-3細胞およびSAS細胞におけるPF-543による細胞傷害作用にはオートファジー誘導を伴った。また，Ca9-22細胞およびHSC-3細胞ではネクローシスの増強を，一方SAS細胞ではアポトーシスの増強を認めた。
- 3) HSC-3細胞において，PF-543とオートファジー阻害薬の併用は，アポトーシスあるいはネクローシスを増強した。
- 4) HSC-3細胞において，PF-543により誘導されたネクローシスは抗酸化薬の併用により軽減した。

以上の成績より，SphK1阻害薬PF-543による細胞傷害性にはオートファジーの誘導を伴い，誘導されたオートファジーは細胞生存に寄与することが示唆された。また，HSC-3細胞では，PF-543によってアポトーシス，ネクローシス，オートファジーが誘導されるが，オートファジーの阻害によって細胞死形態に変化が生じた。このような知見は未だ認められておらず，本解析系はPF-543の口腔癌に対する抗腫瘍活性および細胞死誘導作用機序を解明するうえで有用と考えられた。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (亀山 裕泰)		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	教授 田熊 一敬
	副 査	教授 豊澤 悟
	副 査	教授 野田 健司
	副 査	講師 岩井 聡一
<p>論文審査の結果の要旨</p> <p>本研究は、ヒト口腔扁平上皮癌細胞において、sphingosine kinase (SphK) 1 阻害薬 PF-543 による細胞傷害およびオートファジー誘導を検討し、さらに、本細胞傷害発現におけるオートファジーの役割を追究したものである。</p> <p>その成績において、PF-543 がアポトーシスならびにネクロトーシスの 2 種の細胞死を惹起するとともに、オートファジーを誘導することを見出し、このオートファジー誘導が細胞生存に働く可能性を示した。また、PF-543 による細胞傷害発現の分子機序として活性酸素種 (ROS) の関与を示唆した。</p> <p>以上の研究成果は、口腔癌に対する PF-543 の細胞傷害性すなわち抗腫瘍活性に関わる分子機序の解明に寄与するのみならず、SphK1 およびオートファジーを標的とする新たな口腔癌治療の発展に繋がるものと期待される。</p> <p>よって、博士 (歯学) の学位論文として価値のあるものと認める。</p>		