

ポリリン酸による口腔扁平上皮がん細胞の 抗がん剤感受性増強効果

学位論文内容の要旨

ポリリン酸は 10 数個から数百個の正リン酸が直鎖状に結合したポリマーで、ほとんど全ての生物に存在することが知られている。ポリリン酸の生物学的機能については、これまで主に微生物で検討されており、1) ATP の代換物となりエネルギー源となる 2) リン酸のリザーバー 3) 二価陽イオンのキレート剤 4) アルカリ性ストレスに対する緩衝作用 5) 糖質とアデニル酸キナーゼのドナー 6) ストレス刺激や細胞死の調節などの機能があることが報告されているが、真核細胞では、ポリリン酸が FGF を安定化することや骨芽細胞の石灰化を促進することなどが最近報告されている程度で、報告は少ない。

口腔扁平上皮がんではがん抑制遺伝子である p53 の変異が高頻度に認められている。p53 の変異は、細胞周期の停止やアポトーシスの誘導などの細胞 DNA 損傷に関与する遺伝子の調節に反応に深く関わっており、腫瘍細胞を殺滅する目的で行われる放射線療法や化学療法に対する抵抗性の一部は p53 の変異によるものであることが示されている。しかし、シスプラチンをはじめとする抗がん剤に対する抵抗性と p53 変異との関連性についてはほとんどわかっていない。

HSC-3 は口腔扁平上皮がん由来細胞株で、変異型 p53 をゲノムにもち、シスプラチンのような抗がん剤に抵抗性を示すことが報告されている。今回、著者はシスプラチンによる細胞死誘導におよぼすポリリン酸の影響について検索した。

1. シスプラチンとポリリン酸による細胞死の誘導効果

コロニーフォーメーションアッセイでゲノムに変異型 p53 をもつ口腔扁平上皮がん細胞株 HSC-3 のシスプラチンによる細胞増殖におよぼすシスプラチンとポリリン酸の効果を検討した。通常の培養を行った際、6 穴ウェル 1 個当たり 3000 個の HSC-3 細胞をまき時間培養した際には 97.6 ± 6.1 個のコロニーが認められた。1mM のポリリン酸を培養液に加えるとコロニー数は 143.3 ± 3.1 個と有意に増加した。5 μ g/ml の濃度のシスプラチン単独処理では、コロニー数は 73.8 ± 5.9 個に有意に減少し、ポリリン酸とシスプラチンの共処理でコロニー数は 52.8 ± 6.9 個とさらに有意の減少をみた。MTS アッセイにより、HSC-3 細胞のシスプラチンの濃度による細胞死誘導および、こ

の細胞死におよぼすポリリン酸の影響について検索した。その結果、HSC-3 細胞はシスプラチンの濃度が $0.5 \mu\text{g/ml}$ ではシスプラチンに抵抗性を示したが、 $1 \mu\text{g/ml}$ では 78.4%に減少し、 $2.5 \mu\text{g/ml}$ では 64.7%、 $5 \mu\text{g/ml}$ では 37.9%に減少し、シスプラチンの濃度依存性に細胞死が誘導された。ポリリン酸との共処理ではシスプラチン単独では抵抗性を示した $0.5 \mu\text{g/ml}$ の濃度でも細胞濃度は 73.3%に減少し、シスプラチン単独処理に比べて有意に低値を示した。シスプラチン濃度 $1 \mu\text{g/ml}$ でもポリリン酸との共処理することによりシスプラチン単独処理の 77.5%に細胞数は有意に減少し、 $2.5 \mu\text{g/ml}$ でも単独処理の 90.9%と有意に低い値を示し、ポリリン酸処理によりシスプラチンが低濃度でも細胞死の誘導が生じることが明らかになった。

2. シスプラチンとポリリン酸によるアポトーシス誘導タンパクの発現

シスプラチン処理およびシスプラチンとポリリン酸で共処理した HSC-3 細胞から抽出したタンパクの Western blot でアポトーシス関連タンパクの発現について検索した。シスプラチン単独処理により、HSC-3 細胞で Bax、活性型 Caspase-9、PARP の発現亢進がみられたが、ポリリン酸との共処理で、Bax はシスプラチン単独処理の 1.2 倍、活性型 Caspase-9 の発現は 1.9 倍、活性型 PARP の発現も 1.2 倍に増加した。

抗がん剤はがん細胞に、主にストレス経路によるアポトーシスを誘導することで効果を現すことが明らかになっており、この際には野生型 p53 が重要な役割を演じていることが明らかになっているが、変異型 p53 をゲノムにもつ腫瘍細胞でのアポトーシス誘導機構の詳細は明らかではない。

本研究では、変異型 p53 をもつ HSC-3 細胞も高濃度のシスプラチンで処理することにより細胞増殖の抑制・細胞死の誘導が起こった。この際、アポトーシス誘導因子である Bax の発現亢進とその下流に位置する Caspase-9 の活性化、PARP の活性化が認められた。これは p53 非依存性に細胞内でのストレス経路の活性化が生じ細胞死が誘導されたことを示唆している。

さらに、抗がん剤に抵抗性を有することが示されている変異型 p53 をゲノムにもつ口腔がん細胞でも、ポリリン酸と共処理することで、より低濃度のシスプラチン処理で細胞死の誘導が認められ、効果的な抗がん作用が認められることが明らかになった。ポリリン酸は単独では細胞増殖を促すがアポトーシスは誘導しないため、シスプラチンによる細胞死誘導が生じた際に、その細胞内でのアポトーシスを誘導する分子に対して効果的にはたらいものと考えられる。ポリリン酸をシスプラチンと共処理することで、Bax の発現がより亢進した。Bax の発現は転写亢進によるところが大きく、ポリリン酸はシスプラチン処理により細胞に生じた Bax の転写をより活性化したものと考えられる。Bax の転写調節領域には p53 の結合部位の他に Ets、Myc、ARF などがあることが示されている。ポリリン酸はタンパクの安定化にはたらくことが既に示されており、細胞内での転写因子の安定化により Bax 発現がより亢進した可能性がある。Caspase-9 と PARP の活性化もシスプラチン単独処理の場合に比べより亢進することが認められた。これは Bax の発現亢進に

よるところが大きいと思われるが、原核細胞においてはポリリン酸がエネルギー源となることや細胞内でのリン酸の濃度が上昇し ATP 濃度を超えた際には ATP を置き換えることが知られており、真核細胞でもポリリン酸が Caspase-9 や PARP の活性化にはたらいた可能性が考えられる。

変異型 p53 は抗がん剤による細胞死誘導に抵抗性にはたらくことが示されており、高濃度の抗がん剤投与でも効果が得られない場合があるが、今回の結果は、ポリリン酸がシスプラチンの抗がん作用を高め、シスプラチン耐性細胞にも有用であることが示され、シスプラチンの用量を減らすことによって副作用を軽減することができる可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 戸 塚 靖 則

副 査 教 授 進 藤 正 信

副 査 教 授 鈴 木 邦 明

学 位 論 文 題 名

ポリリン酸による口腔扁平上皮がん細胞の

抗がん剤感受性増強効果

審査は、審査員全員出席の下に、申請者に対して提出論文とそれに関連した学科目について口頭試問により行われた。審査論文の概要は、以下の通りである。

ポリリン酸は 10 数個から数百個の正リン酸が直鎖状に結合したポリマーで、ほとんど全ての生物に存在することが知られている。ポリリン酸の生物学的機能については、主に微生物で検討されており、真核細胞では、ポリリン酸が FGF を安定化することや骨芽細胞の石灰化を促進することなどが報告されているにすぎない。がんの治療において、放射線療法や化学療法に対する抵抗性の一部は p53 の変異によるものであることが示されているが、シスプラチンをはじめとする抗がん剤に対する抵抗性と p53 変異との関連性についてはほとんどわかっていない。本研究は、ゲノムに変異型 p53 をもち、シスプラチンに抵抗性を示すことが知られている口腔扁平上皮がん由来細胞株 HSC-3 を対象として、シスプラチンの細胞死誘導に及ぼすポリリン酸の影響について検索したものである。

最初に、コロニーフォーメーションアッセイで、口腔扁平上皮がん細胞株 HSC-3 の細胞増殖に及ぼすシスプラチンとポリリン酸の効果を検討した。6 穴ウェル 1 個当たり 3000 個の HSC-3 細胞をまき、48 時間通常の培養を行った際には 97.6 ± 6.1 個のコロニーが認められた。1mM のポリリン酸の添加で、コロニー数は 143.3 ± 3.1 個と有意に増加した。一方、 $5 \mu\text{g/ml}$ の濃度のシスプラチン単独処理で、コロニー数は 73.8 ± 5.9 個と有意に減少し、ポリリン酸とシスプラチンの共処理ではコロニー数は 52.8 ± 6.9 個とさらに有意に減少した。次、に MTS アッセイにより、HSC-3 細胞のシスプラチンの濃度による細胞死の誘導、および細胞死に及ぼすポリリン酸の影響について検索した。その結果、HSC-3 細胞はシスプラチンの濃度が $0.5 \mu\text{g/ml}$ の場合はシスプラチンに抵抗性を示したが、 $1 \mu\text{g/ml}$ では細胞数は 78.4% に減少し、 $2.5 \mu\text{g/ml}$ では 64.7%、 $5 \mu\text{g/ml}$ では 37.9% と、シスプラチンの濃度依存性に細胞死が誘導されることが示された。ポリリン酸との共処理では、シスプラチン単独では抵抗性を示した $0.5 \mu\text{g/ml}$ の濃度でも、細胞数は 73.3% と有意に減少した。

シスプラチン濃度 $1 \mu\text{g/ml}$ ではシスプラチン単独処理の場合の 77.5%, $2.5 \mu\text{g/ml}$ では単独処理の 90.9%と、いずれも細胞数は有意に減少した。ポリリン酸は単独ではアポトーシスを誘導しないことから、これらの結果は、ポリリン酸がシスプラチン処理により細胞に生じた細胞死誘導をさらに活性化し、低濃度のシスプラチンでも細胞死を誘導できるように作用したことを示唆している。

抗がん剤による細胞死はアポトーシス誘導によることが示されている。この際、野生型 p53 が重要な役割を演じているが、HSC-3 細胞の p53 は変異型であることから、今回のシスプラチンとポリリン酸の共処理により生じた細胞死は、p53 非依存性にストレス経路の活性化が生じて細胞死が誘導されたことを示唆している。実際に、シスプラチン処理およびシスプラチンとポリリン酸で共処理した HSC-3 細胞から抽出したタンパクを対象に行った Western blot で、Bax、活性型 Caspase-9、PARP の発現はシスプラチン単独処理の場合に比べて Bax では 1.2 倍、活性型 Caspase-9 は 1.9 倍、活性型 PARP は 1.2 倍に発現が亢進した。ポリリン酸はタンパクの安定化に働くことが示されていることから、p53 以外の転写因子の安定化にポリリン酸がはたらき、シスプラチン処理により生じた Bax の転写をより活性化し、ストレス経路によるアポトーシス誘導経路を刺激したものと考えられた。

論文の審査にあたって、論文申請者による研究の要旨の説明後、本研究ならびに関連する研究について質問が行われた。

主な質問事項は、

- 1) ポリリン酸の機能、とくにエネルギー供与体としての役割について
- 2) アポトーシス誘導機構における Caspase 9 や PARP の活性化はどのように生じるか
- 3) 変異型 p53 をもつ口腔がん細胞が抗がん剤に対して抵抗性をもつのはどうしてか
- 4) 細胞増殖能および細胞毒性を検索した MTS アッセイの原理について
- 5) 実験に用いたポリリン酸とシスプラチン濃度の妥当性 等であった。

いずれの質問についても、論文申請者から明快な回答が得られ、また将来の研究の方向性についても具体的に示された。本研究は、ポリリン酸がシスプラチンの抗がん作用を高め、抗がん剤に抵抗性を有する変異型 p53 をゲノムにもつがん細胞にも有用であること、またシスプラチンの用量を減らすことによって副作用を軽減する可能性を示したことが高く評価された。本研究の業績は、口腔外科の分野はもとより、関連領域にも寄与するところ大であり、博士（歯学）の学位授与に値するものと認められた。