

## 論文の内容の要旨

氏名：松 江 彦 兆

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：*In vitro* 光線力学療法モデルにおける口腔癌細胞のアポトーシスとオートファジーの調節

光線力学療法（photodynamic therapy, PDT）は、光感受性物質を腫瘍細胞に取り込ませた後、励起光の照射で発生する reactive oxygen species（ROS）によって腫瘍細胞を障害する治療法である。照射光の深達度が限られるために、臓器・組織の表在性病変が PDT の対象として注目されている。

一般に細胞の死は形態学的にアポトーシス、非アポトーシス細胞死であるオートファジーおよびネクローシスに分類されている。PDT による細胞死の分子メカニズムは未だ十分には解明されていないものの、これまでの報告ではアポトーシスによる細胞死を誘導することが示されている。

本研究は PDT の口腔癌細胞に対する障害効果のメカニズムを明らかにするため、光感受性物質である 5-aminolevulinic acid（ALA）を用いた *in vitro* ALA-PDT モデルを作製し、口腔扁平上皮由来の癌細胞株である HSC-3 細胞を用いてアポトーシスおよびオートファジー誘導に注目して解析をおこなった。

口腔癌の *in vitro* PDT システムは、発光ダイオード（LED）光源（LXHL-FD3C, LUMILEDS）、直流安定化電源ユニット（PMC18-2, 菊水電子）とデジタルタイマー（LT4H, Panasonic 電工）で作製した。

HSC-3 細胞は JCRB 細胞バンクから購入し、10%（v/v）仔ウシ血清添加 RPMI1640 培養液（Gibco RBL）で培養した。培養液に 2 mM の ALA（コスモバイオ株式会社）を加え、遮光条件下で 2 時間培養した。細胞を RPMI1640 培養液で洗浄した後、励起波長  $638 \pm 5$  nm の LED を用い光エネルギー量として  $100 \text{ J/cm}^2$  の照射をおこなった。なお ALA 濃度 0 mM かつ LED 照射を行わないものをコントロールとして用いた。

アポトーシス誘導を TUNEL（TdT-mediated dUTP nick end labeling）で測定した。4 穴チャンバースライド（旭テクノグラス）に細胞を播種し、48 時間後に ALA-PDT をおこなった。ALA-PDT の 3 および 24 時間後に細胞を洗浄し、風乾させた後、氷冷した 4% パラホルムアルデヒド-PBS を加え、60 分間固定した。細胞を 3% 過酸化水素溶液で 5 分間の処理をおこない、ウサギ抗ヒトサイトケラチン抗体（Dako）、次いでローダミンイソチオシアネート標識抗ウサギ IgG 抗体（Millipore）をそれぞれ室温で 1 時間反応させた。細胞に 0.1% クエン酸ナトリウム、0.1% Triton X-100 水溶液を加え、氷上で 2 分間静置した。次いで、*in situ* cell death detection kit POD（Roche Applied Science）を用いて TUNEL をおこなった。細胞にフルオレセイン標識された核酸とターミナルトランスフェラーゼを混合した TUNEL 反応液を反応させた。TUNEL によって核が標識された細胞をアポトーシスが生じている細胞とし、蛍光顕微鏡システム（Leica Microsystems）を用いて、一視野に観察される細胞のうちアポトーシスの生じている細胞数を計測し、アポトーシス誘導率を算出した。

c-Jun 発現を realtime-PCR で検討した。RNA 抽出を、RNeasy mini-prep kit（Qiagen）でおこない、500 ng の全 RNA を realtime-PCR に供した。cDNA の合成は PrimeScript RT reagent（Takara Bioscience）を用いておこない、得られた cDNA は SYBR Premix Ex Taq（Takara Bioscience）と特異的プライマーが含まれた反応溶液とともに、c-Jun の発現量を半定量的に解析した。

免疫細胞化学でオートファゴソーム形成を検討した。直径 35 mm ディッシュ底面に滅菌カバーグラスを設置し、 $1 \times 10^5$  個の HSC-3 細胞を播種して接着させた。上記の条件で細胞に LED 照射をおこなった後に、氷冷した 4% パラホルムアルデヒド-PBS で 5 分間固定した。洗浄後、カバーグラス上の細胞に 1 次抗体のウサギ抗 microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3（LC3）ポリクローナル抗体（MBL バイオサイエンス）を室温で 1 時間反応させた。2 次抗体としてビオチン標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体（Vector Laboratories）を反応させた後、免疫複合体を FITC 標識ストレプトアビジン（Vector Laboratories）で可視化した。

LC3 の免疫細胞化学によって、細胞質内で微細顆粒状に陽性を示したオートファゴソームを指標として、オートファジーが惹起された細胞数を計測し、オートファジー陽性細胞率を算出した。

Western blot にはタンパク量で 40  $\mu\text{g}$  の細胞溶解液を使用した。10% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、polyvinylidene difluoride（PVDF）膜に転写した。PVDF 膜を blocking reagent（東洋紡）で処理した後、

1次抗体のウサギ抗 LC3 ポリクローナル抗体 (MBL) と反応させた。次いで、2次抗体の西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) と反応させ、免疫複合体を ECL plus detection system (GE Healthcare Biosciences) を使用して、Kodak Biomax フィルム (GE Healthcare Biosciences) 上に検出した。さらに現像したフィルムをスキャナー (CanoScan 8800F, Canon) でデジタル画像化して TIF ファイル (Tagged Image File) に保存した後に、LC3 I と LC3 II の発現量を ImageJ (National Institutes of Health) で 3 回測定し、総 LC3 発現レベルに対する LC3 II 発現レベルの割合 (LC3 II / LC3 比) を半定量的に測定した。

ALA-PDT が口腔扁平上皮癌細胞株 HSC-3 細胞のアポトーシス、c-Jun 発現およびオートファジーにおよぼす影響を検討し、以下の結果を得た。

1. HSC-3 細胞は ALA-PDT によって、細胞の萎縮や膨化などの形態変化を示し、ALA-PDT 後 3 時間で 6.7%、24 時間で 25.1% の細胞にアポトーシスが誘導されていた。
2. c-Jun 遺伝子は ALA-PDT 後 1 時間でコントロールの 7.5 倍までに急増し、その後 3 時間に 2.2 倍まで減少したものの、依然として優位な発現上昇を示した。
3. 免疫細胞化学および Western blot では、ALA-PDT によって LC3 陽性のオートファゴソーム形成が確認された。オートファジーを起こしている細胞の割合は、経時的に有意な増加がみられた。さらに LC3 II の発現増加を Western blot で検出した。

以上のことから、ALA-PDT は口腔扁平上皮癌症例に対してアポトーシスおよびオートファジーを誘導することが明らかとなり、口腔癌の新規治療方法として臨床応用可能であると考えられた。