

論文の内容の要旨

氏名：室 伏 貴 久

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：CAY10591, a SIRT1 Activator, Suppresses Malignancy of Gingival Epithelial Carcinoma Cells

(SIRT1 活性化剤である CAY10591 は歯肉上皮癌細胞の悪性度を抑制する)

扁平上皮癌は口腔内に生じる悪性腫瘍全体の 90%以上を占めており、急速な細胞増殖と周囲組織への浸潤を特徴とする。好発部位は下口唇、舌、口腔底などであるが、歯肉原発の扁平上皮癌は全口腔内上皮癌の 10%以下に過ぎない。歯肉扁平上皮癌の臨床的所見には様々な表現型があり、歯周病等の良性疾患と病態が類似しているため、鑑別診断が非常に難しく、診断が遅れることがあり、予後不良となりやすい。それゆえに、臨床的に有用な歯肉扁平上皮癌の早期予防法の開発が求められている。

Sirtuin family は寿命の延長などの生理学的機能や、心臓疾患、神経変性疾患、肥満、糖尿病、炎症、癌などの病理発生に関与しており、これまで多くの注目を集めてきた分子群である。Sirtuin family は酵母から哺乳類まで良く保存されたタンパク質分子群であり、それらの大部分は Class-III の NAD⁺依存性ヒストン脱アセチル化酵素に分類されている。哺乳類の Sirtuin family は SIRT1 から SIRT7 の 7 種類からなり、そのうち SIRT1 が最も研究されている。SIRT1 は NAD⁺依存的に活性を有し、ヒストン以外にも p53, p300, Ku70, FoxO3, PPAR γ などの脱アセチル化に関与している。そのため、SIRT1 は複数のシグナル伝達系を調節しており、生体の様々な機能に影響を及ぼす。

SIRT1 の悪性腫瘍に対する機能については様々な議論がある。すなわち、SIRT1 が悪性腫瘍の進展を促進するという報告と、抑制するという報告の互いに相反する研究結果がある。一例をあげれば、ヒトの前立腺癌、大腸癌、急性骨髄性白血病においては SIRT1 レベルが上昇しており、人為的に SIRT1 を過剰発現させることにより、癌抑制遺伝子活性や DNA の損傷修復活性が抑制されるという報告がある一方、膠芽腫や膀胱癌では SIRT1 遺伝子発現は低く、癌抑制遺伝子 APC のヘテロ欠損マウスにおける SIRT1 の強制発現系では癌細胞の増殖が抑制されると報告されていることなどである。以上の様に SIRT1 の癌細胞における役割については、実験に使用した細胞の種類や実験デザインによって結果が大きく異なる。従って、歯肉扁平上皮癌における SIRT1 の役割について検討することには大きな意義があるといえる。本研究では、SIRT1 活性化剤である CAY10591 が歯肉扁平上皮癌細胞 Ca9-22 細胞の増殖能、浸潤能、遊走能など、癌の悪性度を判定するうえで極めて重要な諸性質に及ぼす影響に加え、癌の浸潤に関与する細胞間マトリックス分解酵素の分泌へ及ぼす影響を調べる事とした。

はじめに、CAY10591 の SIRT1 産生量とその活性に及ぼす影響について検討した。その結果、CAY10591 刺激は SIRT1 の産生量を時間および濃度依存的に増強した。また、SIRT1 活性を p53 のアセチル化状態を指標に調べたところ、未刺激の状態ではアセチル化されている p53 分子を、CAY10591 が継時的に脱アセチル化することが明らかとなった。従って、CAY10591 は SIRT1 の産生量を増加させるとともに、同分子の活性化を促進している事が示唆された。

次に、CAY10591 の癌細胞増殖能へ及ぼす影響について検討した。CAY10591 の溶媒として用いた DMSO のみの作用では、細胞増殖能への影響は認められなかったのに対し、CAY10591 は Ca9-22 細胞の増殖能を濃度依存的に抑制した。また、細胞周期を抑制する因子である p21 の産生量について検討したところ、CAY10591 は p21 産生を濃度依存的に促進した。以上のことから、CAY10591 による細胞増殖能抑制は p21 の産生増強によるものである可能性が示唆された。

さらに、腫瘍細胞の浸潤能および遊走能について検討したところ、CAY10591 処理によって細胞浸潤能が有意に抑制されることがスクラッチアッセイで明らかになるとともに、歯肉線維芽細胞培養上清への遊走能は、著名に減弱するという結果を得た。ついで、この現象のメカニズムについて調べるため、細胞浸潤や遊走に関わる遺伝子および microRNA(miRNA) の発現量について検討した。その結果、CAY10591 は細胞浸潤や遊走を促進すると報告されている CSNK2A2, FRA1, ACTB, および SLUG 遺伝子の

発現をコントロールと比較して有意に減少させ、一方、細胞浸潤や遊走を抑制すると報告されている NEDD9, FMN1 遺伝子, および hsa-miR-194-5p の発現を有意に増加させた。上皮系の癌細胞は、転移に際して、上皮-間葉転換を起こすことにより間葉系細胞の性質を有することがある。そこで、上皮、間葉系のそれぞれのマーカーである E-cadherin および N-cadherin 遺伝子発現の変化について検討したところ、CAY10591 は間葉系細胞の指標である N-cadherin 遺伝子の発現量を有意に減少させた。これらのことから、CAY10591 による Ca9-22 細胞の浸潤および遊走能の減弱は、SIRT1 の産生増加および活性化、細胞浸潤・細胞遊走能の促進に関わる遺伝子発現の減少、それらの抑制に関わる遺伝子および miRNA 発現の増強、および細胞遊走能に関与する N-cadherin 遺伝子の発現の減少による可能性が示唆された。

癌の浸潤、転移には細胞間マトリックスの分解が極めて重要である。そこで、細胞間マトリックスの分解に関与する酵素の細胞外への分泌量の変化について検討した。Ca9-22 細胞の培養上清中には、MMP-3 および MMP-9 が自発的に分泌されていたが、CAY10591 を作用させると、両分子の分泌は高度に抑制された。また、ゼラチンザイモグラフィ解析によって、培養上清中の MMP-3 および MMP-9 のゼラチン分解活性に対する CAY10591 の影響を検討したところ、MMP-3 および MMP-9 のゼラチン分解活性は顕著に抑制された。このことは、CAY10591 が MMP-3 および MMP-9 の分泌を抑制することによって、Ca9-22 細胞の組織浸潤を抑制する可能性を示唆するものであった。

以上の結果から、CAY10591 はヒト歯肉扁平上皮癌の増殖能、浸潤・遊走能を抑制し、癌細胞の組織浸潤等に関わる MMP-3 および MMP-9 の細胞外への分泌を抑制することが明らかとなり、CAY10591 はヒト歯肉癌の予防や治療に応用できる可能性が考えられた。