

論文の内容の要旨

氏名：酒 井 嶺

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：TFAP2E の過剰発現が歯肉癌由来株化細胞 Ca9-22 の増殖能と細胞周期に与える影響

Transcription factor activator-protein ϵ (TFAP2E) は、核内転写因子 activator protein-2 (AP-2) ϵ をコードする遺伝子で、AP-2 遺伝子ファミリーに属している。このファミリーに含まれる 5 つの遺伝子 TFAP2A, TFAP2B, TFAP2C, TFAP2D, TFAP2E は、共通した helix-span-helix モチーフと DNA 結合ドメインの α -helix 構造を有し、初期発生に重要な役割を演じている。最近の研究から、TFAP2E は癌抑制遺伝子として機能していることが明らかになった。例えば、ヒトの TFAP2E は染色体 1p34 に位置するが、このゲノム領域は前癌病変の結腸直腸腺腫で欠失している。また、TFAP2E の第 3 イントロンに位置する CpG アイランドがメチル化すると TFAP2E の発現レベルが減少し、抗癌剤 5-フルオロウラシル (5-FU) への反応性が低くなることがヒト大腸癌や胃癌にも観察されている。さらに、神経芽腫患者では、TFAP2E の発現が予後を左右し、そのレベルが低いほど、生存期間が短くなる。Oral squamous cell carcinoma (OSCC) 患者の癌組織に検出される低レベルの TFAP2E 発現が予後を悪化させるという見解を得ているが、TFAP2E が OSCC の増殖と進行を抑制する詳しい分子メカニズムは明らかでない。そこで、本研究は、OSCC における TFAP2E の役割を解明する一助として、TFAP2E をヒト歯肉癌由来株化細胞 Ca9-22 に過剰発現させて、細胞増殖と細胞周期の変化について検討した。

Ca9-22 にリポフェクション法を用いて TFAP2E 発現ベクターあるいはコントロールベクターを導入し、50 mg/ml の G418 存在下で培養を続けることで、各ベクターがゲノム DNA に組み込まれたクローンを得た。このうち TFAP2E 過剰発現クローン (pTFAP2E) とコントロールベクター導入クローン (pN/C) の各 1 つを選び実験に供した。細胞を 96 well plate に播種し、1~5 日目までの経日的な増殖能を WST8 アッセイによって評価した。また、抗癌剤のシスプラチン (CDDP) を加えたときの生存率も WST アッセイによって調べた。次に、浮遊細胞と付着細胞を回収し、フローサイトメータによって細胞周期を分析した。G1 期の終わりに細胞周期を同調させるため、二重チミジンブロックを利用した。また、細胞周期を M 期のはじめに同調させるためにノコダゾールを使用した。Real-time RT-PCR は TaqMan プローブ法とインターカレーター法によって行ない、TFAP2E と cyclin B1 の遺伝子発現レベルを調べた。さらに、Western blot によって TFAP2E と cyclin B1 のタンパク発現を検討した。

pN/C と pTFAP2E の増殖能を調べた結果、両クローンともに培養 5 日まで経日的な増加を示したが、pTFAP2E の増殖能は pN/C に比べて低かった。pTFAP2E の増殖能の減少が、細胞の生存率と関係しているか検討するため、異なる濃度 (1 および 5 mM) の CDDP を pN/C と pTFAP2E に加えて培養した。CDDP は濃度依存的な細胞死を誘導し、5 mM の CDDP によって pN/C と pTFAP2E の生存率は約 35% まで減少した。しかし、両クローン間の生存率の違いについては有意な差は認められなかった。pTFAP2E の増殖能を減少させた原因を探るため、培養 24, 48, 72 時間の pN/C と pTFAP2E の細胞周期の分布と死細胞の割合を調べた。24 時間の細胞周期をみると、両クローン間で差は認められず、48, 72 時間もほぼ同じ周期の分布だった。また、死細胞が含まれる sub-G1 画分も両クローン間で差はなかった。次に、二重チミジンブロックによって pN/C と pTFAP2E の細胞周期を G1 期の終わりに同調させ、G1 期、S 期、G2/M 期の割合を 0 から 14 時間まで、2 時間ごとに比較した。チミジン除去直後 (0 時間) には両クローンの間に大きな違いはなかったが、チミジン除去後 2 時間では、pN/C に比べて pTFAP2E の G1 期の割合が低く、S 期の割合と G2/M 期の割合が高かった。チミジン除去後 4 時間を見ると、0 および 2 時間と比較して両クローンの G1 期が大きく減少し、S 期の増加がみられた。ただし、4 時間の pN/C と pTFAP2E を比較した場合、pTFAP2E は S 期の割合が低く、G2/M 期の割合が高かった。その後、6, 8 時間の両クローンの細胞周期は、ほぼ同じパターンを示し、4 時間と比較すると S 期の割合が減少し、G2/M 期の割合が増加した。チミジン除去後、10, 12, 14 時間は、8 時間に比べて両クローンともに G1 期が急激に増加し、G2/M 期が減少した。しかし、pN/C と pTFAP2E を比較した場合、pTFAP2E はそれぞれの時間で G1 期が低く、S 期および G2/M 期が高い結果となった。この結果から pTFAP2E では「G2 期」「G2 期から M 期」、「M 期の進行」、そして「M 期から G1 期への移行」のどこかの時点で遅延が生じていると考えられた。そこで、正確な遅延時期を絞り込むために、

ノコダゾールを培養系に加えて pN/C と pTFAP2E の細胞周期を M 期のはじめに同調させ、周期分布の変化を 1 時間ごとに比較した。培養 0 時間の両クローンの細胞周期には大きな変化はなかった。その後、3 時間まで両クローンの周期分布には差は認められず、ほぼ一定の割合の S 期と経時的な G1 期の増加と G2/M 期の減少が確認できた。二重チミジンブロックによって G1 期の終わりに同調させた pN/C と pTFAP2E における cyclin B1 のタンパク発現を比較した。pN/C は培養 0 時間から cyclin B1 の発現が検出でき、8 時間で強くなり、その後 10 時間でピークに達し、12 時間で急激に減少した。一方、pTFAP2E は 4 時間から弱い発現が検出でき、10 時間で pN/C とほぼ同じレベルになった。特に、8 時間の pTFAP2E で発現している cyclin B1 のレベルが pN/C と比べて弱いことから、G2 期から M 期への遅延が明らかになった。

本研究の結果から、以下の結論を得た。

1. TFAP2E は Ca9-22 の細胞増殖を抑制した。
2. TFAP2E は Ca9-22 のシスプラチンに対する抵抗性に影響を及ぼさなかった。
3. TFAP2E は Ca9-22 の「G2 期」または「G2 期から M 期のはじめ」の進行を遅らせた。

以上の結論から、TFAP2E は OSCC の G2/M 期に作用し、細胞増殖を抑制することで、癌の進展を防いでいる可能性が考えられた。