

【35】

氏 名	齋藤正浩
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	乙第800号
学位授与の日付	令和2年10月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項
学位論文題目	Troglitazone, a selective ligand for PPARγ, induces cell-cycle arrest in human oral SCC cells （PPARγの選択的リガンドであるTroglitazoneはヒト口腔扁平上皮癌細胞の細胞周期を停止する）
論文審査委員	（主査）教授 白 瀧 博 通 （副査）教授 釜 井 隆 男 教授 菱 沼 昭

論 文 内 容 の 要 旨

【背 景】

口腔扁平上皮癌の治療法には、臨床的病期および患者のパフォーマンスステータスに基づいて、手術、放射線治療、化学療法などがある。従来の化学療法の有効性は、患者によって異なり、完全な耐性を示すこともある。したがって、口腔扁平上皮癌患者の予後を改善できる新しいアプローチが必要である。

ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 γ （Peroxisome proliferator-activated receptor γ : PPAR γ ）は、リガンド活性化転写因子の核内ホルモン受容体スーパーファミリーであり、脂質代謝及び脂肪細胞分化のマスター因子として機能している。そして、レチノイドX受容体とヘテロ二量体を形成し、Troglitazoneのようなリガンドによって活性化される。PPAR γ リガンドは脂肪肉腫、乳癌、前立腺癌、肺癌、結腸癌、胃癌、膀胱癌、食道癌、膵臓癌など様々な癌細胞の増殖を阻害することが報告されている。われわれは、ヒト口腔扁平上皮癌（Squamous cell carcinoma : SCC）組織と細胞におけるPPAR γ 遺伝子発現、Troglitazoneのヒト口腔SCC細胞の成長と細胞周期や細胞死の誘導に対する影響について検討した。

【目 的】

ヒト口腔SCC組織と細胞におけるPPAR γ 遺伝子発現、そのリガンドであるTroglitazoneのヒト口腔SCC細胞増殖と細胞周期、細胞死に対する影響を明らかにすることを目的とした。

【対象と方法】

本研究は後ろ向き研究であり、研究の施行においては患者からインフォームド・コンセントを取得し、獨協医科大学生命倫理委員会の承認を得て（生命倫理申請番号：R-24-18J）指針に従った。対象は当院を受診し、SCCの確定診断を得た患者47例の組織と口腔SCC細胞2株（CA9-22およびHSC-4）で、PPAR γ 遺伝子発現の有無とTroglitazoneの細胞増殖と細胞周期、細胞死に対する影響を詳細に調べた。方法は、以下の1)～5)の通りである。

1) PPAR γ mRNAの発現

腫瘍組織及び培養細胞からRNAを抽出するためにISOGENを使用し、組織及び培養細胞から全RNAを抽出した。ランダムオリゴヌクレオチドプライマー及びモロニー Maus 白血病ウイルス逆転写酵素を用いてcDNAを合成した。さらに目的のcDNAをPCRにより増幅した。PPAR γ 特異的オリゴヌクレオチドプライマーを用いて、ヒト口腔SCC組織におけるPPAR γ mRNAの発現を調べた。

2) in vitroでのヒト口腔SCC細胞増殖に対するTroglitazoneの効果

CA9-22細胞、HSC-4細胞を異なる濃度（0-100 μ M）のTroglitazoneを含む培地で3日間処理し、血球計算盤を用いて細胞数を計数し、細胞増殖への影響を評価した。

3) TUNEL assay

CA9-22細胞、HSC-4細胞を異なる濃度（10、50、100 μ M）のTroglitazoneで処理し、アポトーシス細胞の誘導をApoptosis in situ detection kitを使用しTUNEL法で分析した。

4) DNA fragmentation

細胞をTroglitazoneを含む培地で2日間培養し、The apoalert LM-PCR ladder assay kitを使用し、DNA fragmentationの解析をした。陽性対照群として、前骨髄球性白血病細胞HL-60を使用した。

5) Flow Cytometryによる細胞周期解析

48時間Troglitazone処理したCA9-22細胞のDNAをFACSCalibur™により測定した。

【結 果】

PPAR γ mRNAは、47例の口腔SCC組織のうち20例とヒト口腔SCC細胞（CA9-22とHSC-4）2株で検出された。Troglitazoneは、用量依存的にCA9-22およびHSC-4細胞の成長を抑制し、形態学的変化は観察されなかった。TUNEL assayでは、Troglitazoneは、HSC-4とCA9-22の両方の細胞において陽性細胞を認めず、形態学的にアポトーシスを誘導しなかった。DNA fragmentationでは、陽性対照群として前骨髄球性白血病細胞HL-60ではあきらかに誘導を認めたが、Troglitazone処理HSC-4およびCA9-22細胞ではDNA fragmentationを観察されなかった。Flow Cytometryでは、未処理のCA9-22細胞が、G₁期、S期、およびG₂/M期の細胞画分がそれぞれ36.6%、38.1%、25.2%の積極的な増殖能を示し、subG₁画分が10.8%を示した。一方、50 μ MのTroglitazoneで48時間処理したCA9-22細胞は、未処理の細胞と比較して、G₁期の割合の増加（63.3%）、SおよびG₂-M期の割合の減少を示した。しかし、Troglitazoneで処理したCA9-22細胞のsubG₁画分増加は認められなかった。

【考 察】

この研究では、PPAR γ リガンドであるTroglitazoneがヒト口腔SCC細胞（CA9-22、HSC-4）のA

ポトーシスを誘導しないが、G₁期で細胞周期を停止することにより細胞の増殖を阻害することが実証された。G₁期で細胞周期が停止することに関しては、FACS分析により実証され、アポトーシスを誘導しないことに関しては、TUNEL assayで陽性細胞の検出を認めず、DNA fragmentationの未検出、さらにTroglitazone処理したCA9-22細胞のsubG₁画分の割合が増加しなかったことから結論づけた。また、Troglitazone未処理のCA9-22細胞がsubG₁画分を示した理由は、ほぼコンフルエントに達したCA9-22細胞をこの分析に使用したため、細胞のパイルアップ、終末分化を生じたか、接触阻害による細胞死による可能性が考えられた。

TroglitazoneがG₁期での細胞周期の停止を促し、p27kip1の増加により膵臓癌細胞の増殖を阻害した報告、CA9-22細胞とHSC-4細胞ではp53の変異を認めることを考え合わせると、TroglitazoneのCA9-22細胞とHSC-4細胞に対する細胞周期停止および増殖阻害はp53非依存性経路によって誘導された可能性がある。

【結 論】

Troglitazoneはヒト口腔SCC細胞のアポトーシスを誘導しなかったが、G₁期で細胞周期を停止させることにより細胞の増殖を抑制した。PPAR γ リガンドは、従来の化学療法または放射線療法と組み合わせ、ヒト口腔SCCのための化学療法剤として使用することができる可能性がある。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

【論文概要】

ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ : PPAR γ) は、リガンド活性化転写因子の核内ホルモン受容体スーパーファミリーであり、脂質代謝及び脂肪細胞分化のマスター因子として機能しており、レチノイドX受容体とヘテロ二量体を形成してTroglitazoneのようなリガンドによって活性化される。PPAR γ リガンドは乳癌、前立腺癌、肺癌、結腸癌、胃癌、膀胱癌、食道癌、膵臓癌など様々な癌細胞や脂肪肉腫などの増殖を阻害することが報告されている。化学療法によって得られる延命期間は腫瘍増殖停止期間に大きく依存し、新しい概念として、癌休眠療法 (tumor dormancy therapy) が提唱されている。申請論文では、PPAR γ が口腔扁平上皮癌 (squamous cell carcinoma : SCC) に対する癌休眠療法における標的分子になりうるかを目的として、ヒト口腔SCC組織と培養ヒト口腔SCC細胞におけるPPAR γ mRNA量、Troglitazoneのヒト口腔SCC細胞の増殖、細胞周期、細胞死の誘導への影響を検討している。結果、1) PPAR γ mRNAが47個の口腔SCC組織のうち20個と2株のヒト口腔SCC細胞 (CA9-22、HSC-4) で検出されたこと、2) Troglitazoneがヒト口腔SCC細胞 (CA9-22、HSC-4) 増殖を濃度依存的に抑制したこと、3) Troglitazoneがヒト口腔SCC細胞 (CA9-22、HSC-4) にアポトーシス誘導しなかったこと、4) Troglitazoneがヒト口腔SCC細胞 (CA9-22) の細胞周期をG₁で停止させたことを明らかにしている。これらの結果から、PPAR γ は口腔扁平上皮癌の癌休眠療法の標的分子となる可能性があると結論づけている。

【研究方法の妥当性】

申請論文では、獨協医科大学病院にて口腔SCCの確定診断を得た患者47例の癌組織と、金沢大学歯科口腔外科より提供されたヒト口腔SCC細胞（CA9-22、HSC-4）に対し、PPAR γ mRNAの発現、ヒト口腔SCC細胞増殖に対するTroglitazoneの効果、TUNEL assay、DNA fragmentation、Flow Cytometryによる細胞周期解析をしている。対象設定、PPAR γ mRNAの発現の評価方法、Troglitazoneの細胞増殖への効果評価方法、TUNEL assayの方法および評価方法、DNA fragmentationの方法および評価方法、Flow Cytometryによる細胞周期解析の方法および評価方法いずれも妥当である。

【研究結果の新奇性・独創性】

ヒト口腔SCC細胞に対するPPAR γ の選択的リガンドであるTroglitazoneの効果の報告はあるが、これまでに解析されていない細胞株に対する効果を確認し、細胞周期を停止するが、細胞死を誘導していないことを明らかにしている。さらに、PPAR γ は口腔SCCの癌休眠療法 of 標的分子となる可能性に着目したことにおいて、新奇性・独創性に優れた研究と評価できる。

【結論の妥当性】

申請論文では、適切な対象群の設定の下、確立された実験手法を用いて、PPAR γ のリガンドであるTroglitazoneが細胞死を誘導せずにヒト口腔SCCの細胞周期を停止させることを明らかにしている。結論は、論理的に矛盾するものではなく、関連領域における知見を踏まえても妥当なものである。

【当該分野における位置付け】

申請論文では、脂肪細胞分化のマスター因子であるPPAR γ が、ヒト口腔SCCに対する癌休眠療法における標的分子になりうるかを検討している。ヒト口腔SCCは再発・転移を起こすと有効な化学療法剤は少なく、治療に難渋する疾患である。申請者は、PPAR γ は口腔SCCの癌休眠療法 of 標的分子となる可能性があることを示し、Troglitazoneが口腔SCC患者の予後を改善できる新しいアプローチとなりうることを示しており、申請論文は大変意義深い研究と評価できる。

【申請者の研究能力】

申請者は、PPAR γ に関する知識を得たうえで、作業仮説を立て、研究計画を立案した後、適切に本研究を遂行し、貴重な知見を得ている。その研究結果は当該領域の国際誌へ掲載されており、申請者の研究能力は高いと評価できる。

【学位授与の可否】

本論文は独創的で質の高い研究内容を有しており、当該分野における貢献度も高い。よって博士(医学)の学位授与に相応しいと判定した。

(主論文公表誌)

Anticancer Research

(40 : 1247-1254, 2020)