

平成21年 9月

田窪千子 学位論文審査要旨

主 査 清 水 英 治
副主査 汐 田 剛 史
同 領 家 和 男

主論文

Involvement of N-acetyltransferase human in the cytotoxic activity of 5-fluorouracil

(5-フルオロウラシルの細胞毒性活性におけるN-アセチルトランスフェラーゼの関与)

(著者：田窪千子、土谷博之、栗政明弘、Thomas Arnesen、領家と男、汐田剛史)

平成21年 Anti-Cancer Drugs 20巻 668頁～675頁

学 位 論 文 要 旨

Involvement of N-acetyltransferase human in the cytotoxic activity of 5-fluorouracil (5-フルオロウラシルの細胞毒性活性におけるN-アセチルトランスフェラーゼの関与)

蛋白質のアセチル化は、翻訳後修飾の一つである。ヒストンは、ヒストンアセチルトランスフェラーゼによりN-ε-アセチル化修飾をうけ、細胞の増殖、分化、細胞死にとって重要なプロセスとして報告されている。一方、真核生物の可溶性蛋白の約70%がN-α-アセチル化修飾を受けることが知られているが、蛋白質のN-α-アセチル化修飾と細胞機能に関してはあまり知られていない。近年、この修飾に重要であるN-α-acetyltransferase human (NATH) が甲状腺癌において正常組織に比べ高発現していることや、細胞死に関与することが報告されている。本研究ではヒト頭頸部癌細胞においてNATH遺伝子が5-フルオロウラシル(5-FU)処理により発現が減弱することを見出だしており、ヒト頭頸部癌細胞株において5-FUの細胞毒性活性におけるNATHの関与と機能を検討した。

方 法

ヒト頭頸部扁平上皮癌細胞株HEp-2、ヒト舌癌細胞株HSC-3およびHSC-4、ヒト歯肉癌細胞株Ca9-22、ヒト食道癌細胞株KYSE70、ヒト膵癌細胞株PANC-1、ヒト肝癌細胞株HuH-7、ヒト大腸癌細胞株DLD-1を用いた。mRNA発現量はreal-time RT-PCRにより、細胞生存率はWSTアッセイによりそれぞれ定量した。NATHの発現ベクターおよびsiRNAは、それぞれエレクトロポレーションおよびLipofectAMINE2000により細胞内へ導入した。アポトーシスの解析はフローサイトメーター、Hoechst33258染色およびウェスタンブロット (caspase-9、PARP) により行った。また、NATH特異的siRNAおよび陰性対照siRNAをそれぞれ導入した細胞においてプロテオーム解析を行った。

結 果

HEp-2細胞を5-FUを処理すると、NATH遺伝子発現量は、濃度および時間依存的に減少した。また、NATH蛋白発現量も減少した。HEp-2、HSC-4、Ca9-22、KYSE70、HuH-7、DLD-1の各細胞において、5-FU処理によりNATH遺伝子発現量が減少した。一方、siRNAによりNATH遺伝子発現を抑制すると、フローサイトメーターにおいてsubG1の増大を認め、またHoechst 33258染色においてはNATH siRNA群で核の凝縮を認め、そしてウェスタンブロットにおいて

はpro-caspase-9の減少と cleaved-PARPを認めたことから、NATH siRNAによりアポトーシスが誘導されることが明らかとなった。一方、NATH遺伝子の強制発現により、HEp-2細胞の増殖が促進された。5-FU処理とNATHの強制発現を同時に行うと、5-FUによる細胞死は部分的に抑制された。また、siRNAによるNATH遺伝子発現の抑制により、thymidylate synthase (TS) 発現量は減少したが、5-FU処理では100 μ MでのみTS発現量は低下した。HEp-2細胞株を種々の抗癌剤 (bleomycin、mitomycin C、nedaplatin、methotrexate) で処理した際、NATH 遺伝子発現量の減少を認めなかった。siRNAによるNATH発現抑制のすると、プロテオーム解析により34蛋白質の発現変動を認めた。このうち18蛋白質は発現が上昇し、16蛋白質は発現が低下していた。

考 察

ヒト頭頸部扁平上皮癌細胞株HEp-2は、5-FU処理によりNATH発現量が低下した。また、siRNAによりNATH遺伝子発現量を抑制すると、アポトーシスが誘導された。さらに、NATH 遺伝子の強制発現によりHEp-2細胞の増殖が促進されることや、5-FUの作用がNATHの強制発現により一部抑制されたことから、5-FUの細胞毒性にNATH発現低下が関与することが示唆された。また、5-FUの細胞毒性作用にTSが重要と報告されているが、NATH遺伝子発現抑制によりTS遺伝子発現が抑制されることも明らかとなった。しかし、bleomycin、mitomycin C、nedaplatin、methotrexateにより、NATH遺伝子発現量は変化しないことから、NATH遺伝子低下は5-FUに特異性が高いことが示唆された。またプロテオーム解析にて発現低下した heat shock protein 70 (HSP70)、enolase 1 (EN01)や、発現増加したras-related nuclear protein (RAN)は大腸癌細胞株SW480において5-FU処理により同様の結果が報告されており、これらの蛋白質の発現変動が5-FUの細胞毒性に関連している可能性が示唆された。

結 論

5-FUの細胞毒性活性の新規の作用機序として、NATHの発現低下が示唆された。