博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏　　名　伊藤　元貴
学　　位　博　士（歯学）
学位記番号　新大院博（歯）第502号
学位授与の日付　令和4年3月23日
学位授与の要件　学位規則第4条第1項該当
博士論文名　口腔扁平上皮癌細胞におけるアセチル CoA カルボキシラーゼの機能解析と抗癌薬の標的としての有用性の検討

論文審査委員　主査　教 授 照沼 美穂
副査　教 授 冨原 圭
副査　教 授 泉 健次

博士論文の要旨

口腔扁平上皮癌（Oral Squamous Cell Carcinoma: OSCC）の悪性度は高く、罹患患者も近年増加傾向にあることから、新規治療標的の同定や治療薬の開発は急務である。アセチル CoA カルボキシラーゼ（ACC）は様々な細胞の脂肪酸合成における律速酵素として知られており、ヒトでは ACC1 と ACC2 の 2 種類のアイソフォームが存在している。ACC1 は細胞質に局在して脂肪酸の原料となるマロニル CoA を産生するが、ミトコンドリア表面に局在する ACC2 は、エネルギー産生過程の 1 つである β 酸化の抑制に作用する。種々の癌細胞において、ACC1 および ACC2 が細胞増殖や細胞の生存に関与することが知られており、ACC の重要性は認められているものの、OSCC におけるその役割については詳しくわかっていない。そこで本研究は、OSCC における ACC の役割を明らかにし、新規治療標的としての ACC の可能性についても検討することを目的として、ヒト OSCC 細胞株を用いて生化学的ならびに細胞生物学的手法を用いて研究を行った。

まず OSCC 細胞における脂肪酸合成関連酵素群の発現量を正常な細胞と比較検討した。ヒト口腔粘膜角化細胞（Oral Mucosal Keratinocyte: OMK）を正常な細胞とし、歯肉癌由来の Ca9-22 細胞と舌癌由来の SAS 細胞とで ACC1、ACC2、脂肪酸合成酵素 FASN の発現量を比較した。その結果、ACC1 の発現量には有意な差は認められなかったが、ACC2 と FASN の発現量は有意に増加していた。ACC2 の OSCC への生存や悪性度の影響は不明なことから、ACC2 の siRNA を Ca9-22 細胞に導入して ACC2 をノックダウン（KD）した ACC2-KD Ca9-22 細胞（ACC2-KD 細胞）を製作した。siRNA 導入後 48、72 時間で ACC2 の発現量が 70%程度減少した時の ACC2-KD 細胞の増殖能を調べるために生細胞数を計測したところ 72 時間で有意に減少していたが、死細胞数には差は見られなかった。このことから、Ca9-22 細胞の ACC2 は細胞増殖に関与していることが考えられた。

ACC2-KD 細胞で細胞増殖が抑制されたことから、次に ACC の阻害が OSCC 細胞に抗癌効果をもたらすかを検討することにした。ACC2 阻害剤には、ACC1 と ACC2 を共に阻害する PF-05175157 を使用した。PF-05175157 刺激後 48 時間で、Ca9-22 細胞の ACC2 と ACC1 の発現量はともに有意に減少した。そこで Ca9-22 細胞の細胞増殖能を調べたところ、72 時間で生細胞数は有意に減少し、対照的に死細胞数は有意に増加した。この時、Annexin-V 陽性細胞が有意に増加していたことから、PF-05175157 は Ca9-22 細胞にアポトーシスを誘導することがわかった。

ACC2 のノックダウンでは細胞増殖を抑制するのみでアポトーシスは生じさせなかったが、

ACC 阻害剤 PF-05175157 ではアポトーシスも同時に起きた。そのため、PF-05175157 が誘導するアポトーシス関連シグナルを検討したところ、ACC の上流で働く代謝酵素として、細胞の飢餓状態によって活性化する AMP 活性化型プロテインキナーゼ（AMPK）があることが判明した。AMPK はリン酸化されると活性化状態になり、アポトーシスを誘導することが知られていることから、siRNA 導入後 48、72 時間経過した ACC2-KD 細胞と、PF-05175157 で 48 時間刺激後の Ca9-22 細胞において、AMPK の活性を解析した。その結果、ACC2-KD 細胞では導入後 48、72 時間では AMPK のリン酸化の増加はみられなかったが、PF-05175157 刺激では AMPK のリン酸化が有意に増加した。このことから、PF-05175157 によるアポトーシスの誘導は AMPK の活性化によるものと考えられた。

本研究により、OSCC では ACC2 の発現が増加し、細胞増殖が促進されていることわかった。ACC2 を阻害するのみでは細胞死を誘導できないが、ACC 阻害剤 PF-05175157 を用いると AMPK の活性化を介したアポトーシスの誘導ができることがわかったことから、ACC とその関連分子を標的にすることで、効率良く抗癌作用を得ることができると考える。

審査結果の要旨

口腔がんは、人口の高齢化とともにその罹患数は増加しており、昨今の集学的治療の発展にも関わらず、各種の治療法に抵抗性を示す高悪性度がんの存在は課題の多いところである。がん細胞は一般に、正常細胞とは異なる代謝経路が利用されていることが知られており、これが増殖や浸潤を活発にしている要因の一つである。本研究で着目している脂質代謝においても、がん細胞では *de novo* 脂肪酸合成が盛んであることが知られており、これまでに様々ながん細胞株やがん組織において、脂肪酸合成に関与する分子の変化が報告されている。本研究では、口腔がんに特徴的な変化をもたらす脂肪酸合成関連タンパク質 ACC2 を見出し、この分子が新たな口腔がん治療に対する分子標的となり得ることを明らかにした研究であり、基礎科学的にもまた臨床的にも重要な研究である。

本研究ではまず、高悪性度で知られる口腔がん細胞の中からヒト舌扁平上皮がん由来の細胞株である SAS 細胞と、ヒト歯肉扁平上皮がん由来の Ca9-22 細胞を用いて、脂肪酸合成関連分子の変化を正常細胞である口腔粘膜角化細胞と比較し、ACC2 の発現上昇を見出している。これまでに報告されているがん細胞や組織では、ACC1 や FASN の発現上昇が広く示されている。一方、口腔がんのように ACC2 にのみ過剰発現がみられるのは、検索できた中では喉頭扁平上皮がんの報告が 1 つあるのみである。こうしたことからも、ACC2 の過剰発現は頭頸部がんの特性であることが考えられ、非常に興味深い。この結果を受けて、本研究では ACC2 に標的を絞って研究を進展させているが、口腔がんにおける ACC2 の新規作用の解明に重点をおくことは、合理的であると言える。

本研究では、口腔がんにおいて ACC2 が過剰発現している理由を解明するために、siRNA を用いてノックダウン（KD）細胞を作成している。数ある siRNA の中から効率よくノックダウンできる siRNA を見出し、がん細胞の特徴を生化学的、分子細胞生物学的手法を用いて網羅的に調べていることは高く評価できる。今回の研究では、ACC2 の KD 細胞でのβ酸化の亢進による ATP の産生増加と、同時に、ACC2 以外の FASN や SREBP-1 といった脂肪酸合成関連タンパク質の発現減少していたことから、脂肪酸量も減少していると推測している。今後、より詳しく解析を進めることで、ACC2 を中心においた時に、がん細胞内でどのようなシグナリングカスケードが動くのかが明らかになると、口腔がんにおける ACC2 の役割がより明らかになり、他のがんには無い口腔がんのシグナリングの特性を解明することになる。これらは、治療薬の開発に大きく貢献することができるのではないかと考える。

後半のACC阻害剤を用いた研究では、細胞を日本人由来の歯肉扁平上皮がんであるCa9-22細胞に限定して実験している。人種不明の細胞株よりも日本人由来と判明している細胞株の方が、*in vitro* での日本人のOSCC細胞の性質として調べることができると考えたとのことから、きちんと理由を持って本研究を進めていることが伺えた。

本研究に用いた ACC 阻害剤 PF-05175157 は ACC2 特異的なものではない。これは、ACC の酵素活性部位（アセチル CoA をカルボキシル化する部分）に結合することによって、ACC を直接阻害する薬剤であることから、ACC1 及び ACC2 に作用する。本来ならば活性のみを阻害するはずであるが、本研究では、ACC1 と ACC2 の発現低下、そして FASN の発現量の低下が認められた。この阻害剤が脂肪酸合成関連分子の発現をも低下させることはこれまでに報告がなく、全く新しい知見である。加えて、本研究ではその原因についても解明を試みており、AMPK の活性化による ACC1、ACC2、FASN などの転写調節因子である SREBP-1 の抑制を、その可能性として示している。ACC 阻害剤が様々ながん細胞の抗がん薬としての可能性を研究されている中で、これらの新しい知見は、より効率性の高い脂肪酸代謝を標的とした抗がん剤の開発に役立つと考える。

また本研究では、ACC1 と ACC2 の両方を阻害すると、Ca9-22 細胞に細胞増殖の抑制とアポトーシスの誘導による抗癌効果を示している。これまでにも ACC の KD や ACC の阻害剤によって、アポトーシスが誘導されたという報告は多数あったが、その原因については明らかになっていない。本研究では、ACC2 の KD 細胞の解析結果も踏まえて、ACC1 の発現減少がアポトーシスの誘導に関与していることを示している。今後口腔がんにおいて、ACC1 と ACC2、二つの ACC のそれぞれの機能と役割が明らかになると、ACC1 と ACC2 が共に高発現しているがん細胞、ACC2 のみが高発現しているがん細胞、ACC 1 のみが高発現しているがん細胞など、そのがんの特徴に応じたテーラーメイドの治療を提案することも可能になるのではないかと考える。

今後は、本研究で得られた成果をさらに発展してより効果的な標的分子や分子の組み合わせを見出すことを期待すると共に、臨床応用を見据えての、in vivo での解析などに進展することを期待する。

以上のように、本研究は臨床歯学における学術的重要性が高く、臨床的発展性が期待される優れた内容である。質疑応答に際しても、研究の目的、研究結果の解釈および今後の課題について明確な回答がなされたと判断した。