

平成22年 5月 7日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20791511  
 研究課題名(和文) 口腔癌の標的因子による抗腫瘍療法の開発を目指したN $\alpha$ アセチロームの網羅的解析  
 研究課題名(英文) The global analysis of N- $\alpha$ -acetylome that is aiming development of antitumor therapy by the target factor in oral cancer.  
 研究代表者 田窪千子 (TAKUBO KAZUKO)  
 鳥取大学・医学部附属病院・助教  
 研究者番号：90379628

## 研究成果の概要(和文)：

N-acetyltransferase human (NATH)は、タンパク質の翻訳後修飾に関与し、アポトーシスへの関与が報告されている。ヒト扁平上皮癌細胞において5フルオロウラシルの(5-FU)の細胞毒性へのNATHの関与を調べた。5-FUは量依存性的および時間依存的にNATH遺伝子発現量を減少させた。他の抗癌剤ではNATH遺伝子発現量は減少しなかった。NATHが5-FUの細胞毒性で重要な役割を果たすのを示す事が示唆された。

## 研究成果の概要(英文)：

N-acetyltransferase human (NATH) participates in a posttranslational modification of the proteins and has been reported to play a role in apoptosis. In this study, the involvement of NATH in the cytotoxic action of 5-fluorouracil (5-FU) in human squamous cell carcinoma HEp-2 cells was examined. We found that 5-FU decreased NATH expression in a dose-dependent and time-dependent manner. No change was observed after treatment with other chemotherapeutics. The results of this study suggest that NATH plays an important role in the cytotoxic activity of 5-FU.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：アセチローム  $\alpha$ アセチル化 細胞死 細胞周期

## 1. 研究開始当初の背景

口腔領域の悪性腫瘍の治療に際し、機能温存

という目的から当科では5フルオロウラシル(5-FU)の持続動注を積極的に行っている。

5-FU は臨床的に最も優れた抗腫瘍薬の一つであるが、分解酵素 (Dihydropyrimidine dehydrogenase; DPD) の存在により効果は臓器および個々により多様である。事実、DPD 活性の低い大腸癌などと比べると、DPD 活性が存在する頭頸部癌では 5-FU の効果は未だ不十分である。申請者はこれまで 5-FU による殺細胞効果の作用機序について、喉頭癌由来 HEp-2 細胞株を用いて検討を行ってきた。その結果、この細胞において 5-FU 処理によって N-acetyltransferase human (NATH) 遺伝子の発現が低下することを見出した。さらに HEp-2 の抗腫瘍薬に対する感受性について、NATH 遺伝子の強制発現による低下と、逆に発現抑制による感受性の増強を見出した。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-アセチル化修飾を受け、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質の約 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。

## 2. 研究の目的

本研究は、プロテオーム解析によって NATH の標的分子を網羅的に解析し、癌細胞における NATH を中心とするアセチロームの重要性を明らかにすることを目的としている。またこれによって、5-FU による NATH 遺伝子発現抑制の意義を見出し、アセチロームを標的とした新たな 5-FU の作用機序を解明する。さらに NATH 標的分子に対する遺伝子治療につ

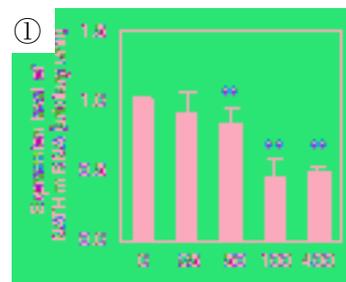
いての検討を行うことにより、扁平上皮癌の生存率の改善を目指した、アセチロームを標的とする新規治療法の開発ならびに創薬の有用性を確認する。

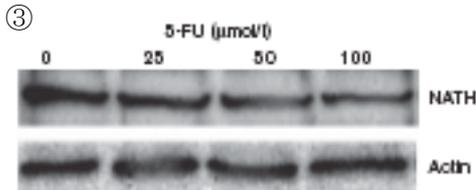
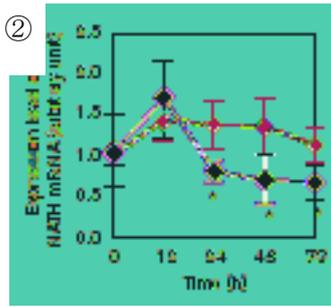
## 3. 研究の方法

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。

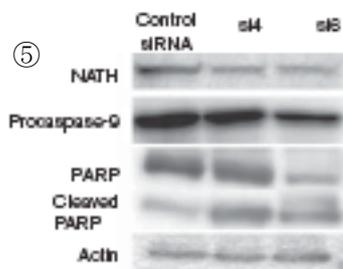
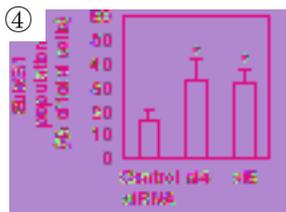
## 4. 研究成果

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 (図①、②)。また、NATH 蛋白発現量も減少した (図③)。



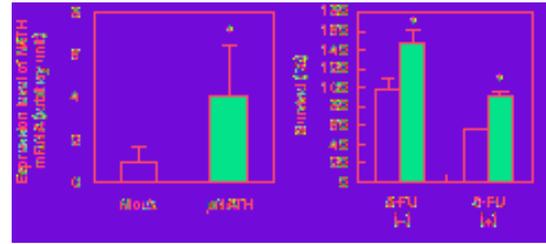


HEp-2、HSC-4、Ca9-22、KYSE70、HuH-7、DLD-1 の各細胞において、5-FU 処理により NATH 遺伝子発現量が減少した。一方、siRNA により NATH 遺伝子発現を抑制すると、フローサイトメーターにおいて subG1 の増大を認め (図④)、また Hoechst33258 染色においては NATH siRNA 群で核の凝縮を認め、そしてウェスタンブロットにおいては pro-caspase-9 の減少と cleaved-PARP を認めたことから (図⑤)、NATH siRNA によりアポトーシスが誘導されることが明らかとなった。



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 mM 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。

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 (ENO1) 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。

Table 1 Proteins identified by MALDI-TOF MS

Spot no.*	Accession no.†	Protein name	Mass weight (Da)	pI	%Ist ok	%Ist negative	Ratio of false positive	Function
<b>Upregulated proteins</b>								
159	4828868	Prdlin 1	15 216	8.44	0.85	0.30	2.85	Actin binding protein
165	75 41255	CuA	14 769	4.80	0.44	0.20	2.17	Unknown
205	4062054	RAN	34 685	7.05	0.34	0.14	1.88	GTPase
288	809185	Anxanin A5	38 640	4.84	0.38	0.22	1.81	Ca <sup>2+</sup> -dependent membrane binding protein
285	4503571	ENH1	47 481	7.01	0.40	0.18	2.19	Glycolytic protein
290	927365	EEF1A1	43 139	8.54	0.77	0.35	2.13	Elongation factor protein
<b>Downregulated proteins</b>								
146	437363	14-3-3γ	28 343	4.78	0.16	0.25	0.63	Neuronal protein
451	374 92	Tublin	50 746	5.02	0.45	0.71	0.83	Cytoskeletal protein
517	184433	NASP	85 424	4.27	0.19	0.31	0.83	Histone chaperone
554	1265315	HSP70	70 307	6.03	0.19	0.31	0.82	Molecular chaperone
562	306891	HSP90	83 554	4.97	0.87	1.20	0.51	Molecular chaperone

EEF1A1, elongation factor 1 alpha 1; ENH1, enolase 1; HSP70, heat shock protein 70; HSP90, heat shock protein 90; MALDI-TOF MS, matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry; NASP, nuclear auto antigenic sperm protein; pI, isoelectric point; RAN, ras-related nuclear protein.  
\*Spot numbers refer to Fig. 5a and 5b.  
†Description corresponds to the protein names given by National Center for Biotechnology Information database.

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Kazuko Takubo, Hiroyuki Tsuchiya, Akihiro Kurimasa, Thomas Arnesen, Kazuo Ryoke and Goshi Shiota 査読あり, Anticancer drugs, Vol.20,

[学会発表] (計 6 件)

① 田 窪 千 子、 Involvement of N-α-acetyltransferase human in the cytotoxic activity of 5-fluorouracil. 日本癌学会第 68 回総会、2009 年 10 月 3 日、パシフィコ横浜

② 田 窪 千 子、N-α-アセチルトランスフェラーゼを介した 5-フルオロウラシルによる細胞毒性活性、第 8 回中四国口腔癌研究会学術講演会、2009 年 8 月 28 日、ラヴィール岡山

③ 田 窪 千 子、5-フルオロウラシルの細胞毒性活性における N-α-アセチルトランスフェラーゼの関与、第 19 回日本サイトメトリー学会、2009 年 6 月 22 日、松江テルサ

④ 田 窪 千 子、 Involvement of N-α-acetyltransferase human in the antitumor effect of 5-fluorouracil. 第 31 回日本分子生物

学会年会、2008 年 12 月 12 日、神戸国際展示場

⑤ 田 窪 千 子、 Involvement of N-α-acetyltransferase human in the antitumor effect of 5-fluorouracil. 日本癌学会第 67 回総会、2008 年 10 月 29 日、名古屋国際会議場

⑥ 田 窪 千 子、5-フルオロウラシルの抗腫瘍作用における N-α-アセチルトランスフェラーゼの関与、第 53 回 (社) 日本口腔外科学会総会、2008 年 10 月 21 日、アスティー徳島

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

田窪千子 (TAKUBO KAZUKO)

鳥取大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90379628