

## 論 文 要 旨

区 分	①・乙	氏名	佐々木 三奈	
-----	-----	----	--------	--

**Reactive oxygen species promotes cellular senescence in normal human epidermal keratinocytes through epigenetic regulation of p16<sup>INK4a</sup>.**

## 【研究目的】

内因的な細胞代謝や外因的な喫煙・紫外線などにより、生体内では活性酸素種（ROS）の産生が亢進され、酸化ストレスが過剰となる。この過剰な酸化ストレスによる DNA、RNA 及び脂質などの酸化が誘導する形質変化や突然変異が発がんの要因と考えられている。その一方で、発がんを抑制する機序の 1 つとして知られている細胞老化はテロメアの短縮や機能障害を伴わず細胞周期を停止させる機構である。しかしながら、ヒトの正常上皮角化細胞における酸化ストレスと細胞老化の誘導作用との関係は明らかではない。そこで、正常上皮角化細胞における酸化ストレスと発がん抑制機構としての細胞老化との関係について、口腔扁平上皮癌細胞と比較することで検討を行った。

## 【材料と方法】

- ・ヒト正常上皮角化細胞の細胞株として NHEK を、口腔扁平上皮癌細胞として SCC を用いた。
- ・酸化ストレスとしての ROS 刺激には過酸化水素水 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) と Menadine を用い、抗酸化剤には N-acetylcysteine (NAC) を用いた。また、脱メチル化剤には 5-azacytidine (5-Azac) を用いた。
- ・ROS 刺激による両細胞の細胞老化関連分子の変化に関して、senescence-associated beta-galactosidase (SA-β-gal) 染色法、Western Blotting 法、RT-PCR 法、Methylation-specific PCR (MSP)、FACS 法を用いて解析を行った。

## 【結果】

- ① NHEK において、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による ROS 刺激は細胞老化の指標である SA-β-gal の活性化を促進した。一方、SCC では認められなかった。
- ② NHEK への ROS 刺激により、がん抑制遺伝子 (p21<sup>cip1</sup>、p16<sup>INK4a</sup>) の発現上昇と DNA メチル化酵素 DNA-methyltransferase (DNMT) 1 の発現減少を認めた。また、ROS 刺激による p16<sup>INK4a</sup> の発現上昇は、抗酸化剤である NAC により抑制されたが、SCC では認められなかった。
- ③ 5-Azac による脱メチル化により、ROS 刺激と同様な p16<sup>INK4a</sup> の発現上昇と DNMT1 の発現減少が NHEK においてのみ認められた。
- ④ NHEK への ROS 刺激により、p16<sup>INK4a</sup> のプロモーター領域メチル化の抑制が認められたが、SCC においては認められなかった。
- ⑤ NHEK への ROS 刺激により、サイクリン依存性キナーゼ (CDK) 4/6 とリン酸化 Rb の発現減少を認めたが、SCC では認められなかった。また、NHEK において、ROS 刺激は G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期にある細胞の割合を増加させた。一方、SCC においては G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期にある細胞の割合を減少させ、G<sub>2</sub>/M 期にある細胞の割合を増加させた。

## 【考察】

ROS 刺激が惹起する酸化ストレスは、NHEK において p16<sup>INK4a</sup> のプロモーター領域のメチル化を抑制することで、p16<sup>INK4a</sup> の発現を上昇させ、CDK4/6 とリン酸化 Rb の発現を低下させることが明らかとなった。この結果、細胞周期の G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期への拘束を促進させ、最終的に細胞老化を誘導すると考えられた。また、酸化ストレスに対して、SCC では p16 のプロモーター領域のメチル化を維持することで、細胞老化への誘導が抑制的に制御されていることが示唆された。

## 【結論】

正常上皮角化細胞において、酸化ストレスに対する発がん抑制機序の 1 つとして、p16<sup>INK4a</sup> のプロモーター領域の DNA メチル化の抑制による細胞老化の誘導機構が関与すると考えられた。