

LXR アゴニストはコレステロール排出を促進して
口腔扁平上皮癌細胞の細胞増殖を抑制する

分子細胞病理学分野

菅野 千敬

要旨

【背景と目的】 コレステロールは生体に必須の脂質であり、細胞膜の形態保持やシグナル伝達、膜輸送において重要な役割を果たしている。Liver X Receptor (LXR) はコレステロール代謝や糖代謝、抗炎症作用、細胞増殖抑制作用などに関与する転写因子であり、標的分子の一つである ATP binding cassette transporter A1 (ABCA1) の発現制御を介して細胞内からのコレステロール排出を調節している。LXR は、コレステロール排出作用により高脂血症や動脈硬化を改善するだけでなく、乳癌等の癌細胞において細胞増殖を抑制することが報告されている。私の所属する研究室では LXR の癌細胞増殖抑制作用に着目し、これまでに口腔扁平上皮癌細胞における LXR の発現や、LXR アゴニストによる細胞増殖抑制作用について研究を行い、発表してきた。しかし実際のヒト口腔扁平上皮癌組織における LXR の発現や、LXR アゴニストによる細胞増殖抑制作用の詳細なメカニズムは全く分かっておらず、本研究ではその解明を目的に検討を行った。

【方法】 まず、実際の口腔扁平上皮癌切除組織における LXR の発現を検討した。次に、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株 SAS を用いて、LXR アゴニスト (T0901317) による細胞増殖抑制作用のメカニズム解明を *in vitro*, *in vivo* の両面から行った

【結果】 ヒト口腔扁平上皮癌組織において、LXR α は正常上皮に比べ発現が亢進し、LXR β は発現が低下することが明らかとなった。次に、SAS 細胞を T0901317 で処理し細胞周期の解析を行ったところ、G1 期停止細胞の増加を認めた。また、T0901317 処理により ABCA1 発現は亢進し、細胞内コレステロール量は低下した。一方、ABCA1 発現をノックダウンすると、細胞増殖は亢進し、細胞内コレステロール量が増加した。また、ABCA1 発現ノックダウンにより、T0901317 の細胞増殖抑制効果、細胞内コレステロール量の低下作用は減弱した。更に、SCID マウス皮下へ SAS 細胞を移植し T0901317 の抗腫瘍効果を検討したところ、腫瘍重量の減少や細胞増殖能の低下、腫瘍組織内の ABCA1 発現亢進やコレステロール量の低下を認めた。

【結論】 本研究では、ヒト口腔扁平上皮癌組織における LXR の発現分布を明らかにした。また、T0901317 による細胞増殖抑制作用が、ABCA1 の発現亢進を介した細胞内コレステロール量の減少によるものであること、担癌マウスにおいても T0901317 は、ABCA1 を介した作用メカニズムにより抗腫瘍効果を示すことが示唆された。本研究により LXR アゴニストが、口腔扁平上皮癌に対する新たな機序を介した有用な治療薬となる可能性が示唆された。

序論

口腔癌は舌、歯肉、頬粘膜、口蓋などに発生する悪性腫瘍であり、その罹患率は全癌患者の1~2%の割合を占める。口腔癌の組織型としては扁平上皮癌が90%以上を占め、初診患者の約半数はステージ3期もしくは4期と進行した状態であり、その5年生存率は3期で50%程度、4期で40%以下と予後は不良であることが特徴である。また、口腔は咀嚼、嚥下、構音といった人間が生活する上で非常に重要な機能を有する器官であるため、外科的な癌組織の切除による患者のQOLの低下が大きく、正常組織の温存を考慮した治療に難渋する。このような背景から、有効かつ副作用の少ない新規口腔癌治療薬の開発が望まれている。

コレステロールは細胞膜を構成する生体に必須の脂質であり、細胞膜の形態保持やシグナル伝達、細胞の増殖や分化において重要な役割を果たしている(1)。また、細胞膜におけるシグナル伝達や膜輸送に関わる領域として注目されている脂質ラフトでは、コレステロールがその構成の中心となっており、ラフトの安定性や流動性の維持を左右する(2,3)。コレステロールは食事による摂取の他、生体内において大部分が肝臓にて生合成され、リポタンパクとして血中を運搬され全身へ供給される。コレステロールはステロイドホルモンの前駆体であり、また排出時に胆汁酸を形成するなど生体の恒常性維持に必須であることから(4)、細胞内コレステロールレベルは複雑かつ厳密にコントロールされている。

細胞内コレステロールの調節機構には、Sterol Regulatory Element Binding Protein (SREBPs)とLiver X Receptor (LXR)の2分子が主に関与している。転写因子SREBPsファミリーは同一遺伝子にコードされるSREBP-1a及びSREBP-1cと、異なる遺伝子にコードされるSREBP-2からなる。その中でもSREBP-2は、LDL(低比重リポタンパク質)受容体の発現を亢進させることでコレステロールの生合成や取り込みを促進させ、細胞内のコレステロールレベルを上昇させる(5,6)。また近年、PC-3やLNCaPなどのヒト前立腺癌細胞株において、SREBP-2の活性と細胞生存率との強い相関関係が報告されるなど(7)、癌細胞におけるその役割が注目されている。

一方で、LXRは核内受容体スーパーファミリーに属するリガンド依存性転写因子であり、Retinoid X Receptor (RXR)とヘテロダイマーを形成することで標的遺伝子のプロモーター領域に存在するLXR応答配列に結合し、転写を活性化する(8)。LXRは α と β の2つのサブタイプを持ち、ヒトLXR α 遺伝子は11番染色体短腕11.2バンド、

LXR β 遺伝子は 19 番染色体長腕 13.3 バンドにそれぞれ存在する (9)。LXR α は肝や脂肪組織など脂質代謝が活発な組織に、LXR β は普遍的に全身臓器に発現している。LXR はコレステロールの取り込み、貯蔵、分解、排出に関わる遺伝子や脂肪の合成に関わる遺伝子の発現を制御することで、コレステロール代謝および脂質代謝の調節を行う (10)。

LXR の内因性リガンドは、コレステロール代謝産物であるオキシステロール類 (22(R)-hydroxycholesterol, 24(S)-hydroxycholesterol, 27-hydroxycholesterol) であり、その骨格を基として合成アゴニストが合成されている。代表的な合成アゴニストとして、T0901317 や GW3965、臓器選択型の GW6340 が報告されており (11)、T0901317 は LXR α , β の両方に選択性なく強力に作用し、LXR の標的遺伝子の発現を亢進させる。近年、LXR は高脂血症や動脈硬化の治療ターゲットとしての研究が進んでおり、マクロファージにおける LXR を介したコレステロール排出は動脈硬化の予防や軽減、心血管系疾患のリスクを低下させることが *in vivo* 及び *in vitro* において明らかになっている (12-14)。また、LXR は細胞増殖抑制作用を持つことが分かっており、正常細胞では血管平滑筋細胞やリンパ球、肝細胞などで (15-17)、癌細胞では乳癌や前立腺癌、大腸癌などにおいて細胞増殖を抑制することが報告されている (18-21)。

LXR の標的遺伝子としては、胆汁酸合成因子である cholesterol 7- α -hydroxylase 1 (Cyp7a1) や、コレステロール排出因子である ATP binding cassette A1 (ABCA1)、ABCG1、ApoE などが挙げられる (22-24)。また前述の SREBPs や末梢へのコレステロール輸送阻害因子である Inducible degrader of the LDL Receptor (IDOL) も LXR の標的遺伝子であることが分かっている (25)。本研究において着目した ABC トランスポーターは、細胞膜に存在する膜タンパクであり、7 種類のファミリーに分類され、ヒト染色体上には 49 種類の ABC タンパク質遺伝子が存在する。ABC トランスポーターは ATP 加水分解のエネルギーを利用した脂質や薬物、基質の輸送など生理的に重要な役割を果たしていることが分かっている。LXR の標的遺伝子である ABCA1 は、肝細胞やマクロファージ細胞において高発現していることが分かっている。その機能としては、細胞内の遊離コレステロールを Apo A-1 へ受け渡し High Density Lipoprotein (HDL) を形成し、コレステロールを肝へ逆輸送することで、血管内皮細胞やマクロファージ細胞などにおいて、細胞内への過剰なコレステロール蓄積を防ぎ、細胞内コレステロール排出において重要な役割を果たしている (26, 27)。また、肝細胞における ABCA1 は、コレステロール含有の少ない HDL を形成し血中へ循環させ、末梢からのコレステロール輸送をさらに促進させる (28)。ABCA1 の異常により引き起こされる疾患として、先天的な ABCA1 欠損により細胞内へコレステロールが過剰蓄積し動脈

硬化を引き起こす Tangier 病が知られている (29)。また ABCA1 欠損マウスではマクロファージからのコレステロール排出や、LXR アゴニストによる血漿 HDL レベルの上昇も阻害されることが報告されている (30)。このように ABCA1 は細胞レベルでのコレステロール代謝の中心的役割を担っており、細胞増殖においても重要な役割を果たしていることが示唆されている。更に、LXR アゴニストによる細胞増殖抑制機構に ABCA1 が関与していることが、マクロファージや血管内皮細胞、前立腺癌や大腸癌細胞において報告されている (20, 26, 31)。

我々の研究室ではこれまでに、LXR がラット口腔粘膜やヒト口腔扁平上皮癌細胞株において発現していること、また T0901317 はヒト扁平上皮癌細胞株において細胞増殖能を低下させ、細胞数を減少させることを明らかにした (32)。しかしながら、LXR アゴニストによる細胞増殖抑制メカニズムについて、ABCA1 を介したコレステロール代謝制御を、系統立てて明確にした報告はなく、詳細な作用機序は未だ不明である。そこで本研究では、ヒト口腔扁平上皮癌細胞における LXR アゴニストの細胞増殖抑制効果について、LXR の標的遺伝子である ABCA1 を介したコレステロール代謝に着目し、*in vivo*、*in vitro* 両面からの検討により機序の解明を試みた。

材料と方法

細胞培養

ヒト口腔扁平上皮癌細胞株 SAS は、理研バイオリソースセンターより供与を受けた (セルバンク, 茨城, 日本)。SAS 細胞は、Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM) Low Glucose (WAKO, 大阪, 日本)、10% Fetal bovine serum (FBS) (GIBCO) の培養液にて、37°C、5%CO₂の条件下で培養した。また、細胞の継代は 0.25%トリプシン-Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)液を用いて行った。

動物

8 週齢のオス免疫不全マウス (SCID-ICR マウス) (日本クレア, 東京, 日本) を 7 匹使用し胸部または背部皮下に、1×10⁶個の SAS 細胞を 100 μl の PBS に溶解し皮下移植した。移植翌日から T0901317 もしくは Dimethyl sulfoxide (DMSO) を、マウス体重 1g あたり 10 μg を 2 日おきに腹腔内投与した。マウスを使用した実験については、福島県立医科大学動物実験委員会の承認を受け、福島県立医科大学動物実験規程を順守し行った。

ヒト扁平上皮癌組織

福島県立医科大学附属病院 歯科口腔外科にて、口腔扁平上皮癌の切除手術を受けた患者より供与された組織を使用した。内訳は歯肉癌 4 例 (65-83 才)、舌癌 5 例 (52-82 才)、頬粘膜癌 1 例 (82 才) であり、全ての患者へ実験主旨の説明を行い文書での同意を得た。組織は 10%ホルマリン固定後、パラフィンにて包埋し Hematoxylin eosin (HE) 染色、免疫組織化学染色を行った。また、本実験は福島県立医科大学倫理委員会の承認を受け、臨床研究に関わる倫理指針を順守し行った。

試薬および抗体

LXR アゴニストである, T0901317 [N-(2,2,2-trifluoroethyl)-N-[4-[2,2,2-trifluoro-1-hydroxyl-1(trifluoromethyl)ethyl]-benzenesulfonamide]] (Alexis Biochemicals, Lausen, Switzerland) は、100 μM の濃度になるように DMSO にて溶解し、-20°C で保管した。他に、本実験では、抗 LXR α マウスモノクローナル抗体 (以下抗 LXR α 抗体) (Persus Proteomics, 東京, 日本)、抗 LXR β ヤギポリクローナル抗体 (以下抗 LXR β 抗体) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)、抗 ABCA1 ラビットポリクローナル抗体 (以下抗 ABCA1 抗体) (Novus Biologicals, USA)、抗 Bromodeoxyuridine (BrdU) ラットモノクローナル抗体 (以下抗 BrdU 抗体) (Serotec, Oxford, UK)、抗 Actin マウスモノクローナル抗

体 (以下抗 Actin 抗体) (Sigma-Aldrich) を使用した。

免疫組織化学的染色

切片は脱パラフィン、脱キシレン後、0.3%過酸化水素加メタノールで室温 20 分間処理し、内因性ペルオキシダーゼを除去した。LXR α の染色では pH6.0 クエン酸ナトリウムバッファー中で、121°C、15 分間オートクレーブ処理して抗原の賦活化を行った。5%スキムミルク (森永乳業, 東京, 日本) でブロッキングを行い、2% BSA/PBS で 500 倍に希釈した抗 LXR α 抗体および抗 LXR β 抗体をそれぞれ 4°C で一晩反応させた。二次抗体反応は、ヒストンファインシンプルステイン MAX-PO MULT キット (ニチレイ, 東京, 日本) を用いて室温下で 30 分行った。その後、3,3'-Diaminobenzidine (DAB) 溶液 (0.05 M トリスバッファー 100 ml, DAB 0.02 g, 30% 過酸化水素水 17 μ l) にて発色反応を室温下で 5 分間行った後、ヘマトキシリンで核染色を行い封入した。観察は光学顕微鏡 (OLYMPUS BX61, OLYMPUS, 東京, 日本) を用いて行い、DP controller ソフトウェア (OLYMPUS) にて画像を撮影した。1 つの標本につき 3 ケ所の異なる視野を撮影し、視野内の全細胞数 (1 視野 400 個程度) と陽性細胞数をカウントし、その比率を算出した。

ウエスタンブロッティング

各培養細胞を氷冷 PBS で 2 回洗浄後、Radio Immunoprecipitation assay (RIPA) Buffer (25 mM Tris-HCl pH7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS) にタンパク質分解酵素阻害剤 (Complete mini EDTA-free; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)、5 mM NaF、1mM Na₃VO₄ 及び 1 mM Phenyl methanesulfonyl fluoride Solution (PMFS) を添加した可溶化液を加え、氷上で 5 分静置後、セルスクレーパーにて回収した。回収後 30 分間氷上にて静置し、その後 15000 \times g にて 10 分間遠心分離した上清を細胞溶解液とした。また、マウス移植腫瘍は摘出およびトリミング後にホモジナイザーで粉碎し、培養細胞と同様の方法でタンパク質を回収した。細胞中の総タンパク濃度は Bicinchoninic acid (BCA) 法 (BCA Protein Assay Kit; Thermo, Rockford, USA) で定量した。全ての細胞溶解液は 2 \times サンプルバッファー (100mM Tris-HCl [pH6.8]、4% SDS, 20% Glycerol、10% β -メルカプトエタノール、0.2% ブロモフェノールブルー) と等量で混ぜ、95°C で 5 分間熱処理しサンプルとした。サンプルを 7.5% アクリルアミドゲルを用いた Sodium dodecyl sulfate Poly acrylamide gelelectrophoresis (SDS-PAGE) 法で分離し、Polivinylidenedi Fluoride (PVDF) 膜 (Immobilion-P Transfer Membrane; Millipore, USA) にウェット式ブロッティング装置を用いて転写した。転写後の PVDF 膜は 10% スキムミルクを溶解した TBS-T により室温下で 1 時間ブロッキング後、抗 ABCA1 抗体、抗 Actin 抗体を 1:1000 で使用し、一次抗体反応を 4°C で一晩行った。二次抗体反応は、HRP 標識抗ラビット IgG (GE Healthcare, UK)、マウス IgG (GE Healthcare, UK) を

1:10000 で室温下 1 時間反応させた。Ez WestLumi plus (ATTO,東京,日本) により化学発光後、Image Quant LAS4000 (GE Health care) を用い検出を行った。バンドの発現強度は Image J ソフトウェアを用いて数値化した。

蛍光免疫染色

細胞は 8 well チャンバースライドに 5×10^3 個/well で播種した。BrdU 染色の場合は、固定前に $10 \mu\text{M}$ の BrdU を添加し 60 分間培養した。培養後の細胞は 4%パラホルムアルデヒドで 30 分間室温にて固定した。0.1% Triton X-100 で 10 分間処理した後、2% BSA/PBS で 30 分間室温にてブロッキングを行い、一次抗体反応は抗 BrdU 抗体を 1:500 で使用して、 4°C で一晩反応させた。二次抗体は蛍光標識された抗ラット抗体を 1:500 で使用し、室温で 45 分間反応させた。最後に、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)を 1:1000 で 45 分間遮光下にて反応させてから封入した。観察は蛍光顕微鏡 (OLYMPUS BX61) で行い、画像は DP controller ソフトウェア (OLYMPUS) で撮影した。BrdU 染色では濃染細胞を陽性細胞としてカウントし、3 つの視野内の全細胞数 (1 視野 400 個程度)との比率を算出した。

細胞増殖能の評価

細胞は 96 well ディッシュに 2×10^3 個/well ずつ播種し、 $10 \mu\text{M}$ の T0901317 もしくは DMSO で 72 時間処理後に解析を行った。解析は Cell proliferation assay kit II (XTT) (Roche) を用いた。XTT 溶液との反応で培養細胞において生成される、テトラゾリウム塩の還元による可溶性のフォルマザン色素の吸光度を測定し評価した。

細胞周期解析

細胞を 10 cm ディッシュに播種後、 $10 \mu\text{M}$ の T0901317 もしくは DMSO で 72 時間処理し、回収前 24 時間は無血清培地にて培養した。siRNA ノックダウン実験においては、siRNA 導入 12 時間後から T0901317 もしくは DMSO 処理下で 48 時間培養し、回収前 24 時間は無血清培地にて培養した。Cell cycle phase determination kit II (Cayman chemicals) を使用し 1×10^6 個の細胞を Propidium Iodide (PI) にて 30 分間室温で染色した後、細胞周期の測定をフローサイトメーター (FACS Canto II, BD) にて行った。

コレステロール測定

細胞を 10 cm ディッシュに播種し $10 \mu\text{M}$ の T0901317 もしくは DMSO で 72 時間処理後、 1×10^6 個ずつ回収した。マウス移植腫瘍は $100 \mu\text{g}$ の組織を測定用として用いた。測定には Cholesterol Quantitative kit (Bio vision) を使用した。コレステロールはコレステロールオキシダーゼと反応すると H_2O_2 を生じ、この H_2O_2 はコレステロールプローブと反応するとレゾルフィンを生じる。レゾルフィンの 570nm における吸光度を

測定した。

ABCA1 発現ノックダウン

1×10⁶個の細胞を 500 μl の PBS で懸濁し、500 pmol の siRNA を加え、Gene Pulser II (BIO RAD) を用いて 0.2 kV, 975 μF の条件で導入後、10 cm ディッシュに播種した。また、ABCA1 ノックダウンの確認を導入 48 時間後に行った。

標的配列は下記を使用した。

ABCA1 (#1): 5'-GGU CAA ACU UGA AGC UUC AAG AUU U -3',

ABCA1 (#2): 5'-CAG UAC ACA UUU GUC AGC AAU GAU G -3'

コントロール siRNA: Mission_Negative control SIC-001 (Sigma)

RT-PCR

Total RNA は、Trizol reagent (Invitrogen) を用いて抽出した。逆転写反応は SuperScript III First-standard Synthesis system (Invitrogen) を、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) は Advantage cDNA PCR kit (clontech) を用い、GAPDH を内部標準遺伝子として使用した。各遺伝子特異的な PCR プライマーの配列は下記を使用した。

ABCA1 :F-5'-AACAGTTTGTGGCCCTTTTG-3' R-5'-AGTTCCAGGCTGGGGTACTT-3',

GAPDH :F-5'-GAAGGTGAAGGTTCGGAGTC-3' R-5'-GAAGATGGTGTATGGGATTTTC-3'

PCR のサイクル数は 30 サイクルで行った。アニーリングの温度は 60°C とした。PCR 産物は 1%アガロースゲルにて泳動し、エチジウムブロマイドで染色後に Image Quant LAS4000 にてシグナル検出を行った。

統計解析

ヒト口腔扁平上皮癌組織における LXR の発現、細胞周期解析、BrdU 陽性細胞率、XTT 法、腫瘍重量測定、Ki67 陽性細胞率の有意差検定は Student の t 検定にて行い、コレステロール測定の有意差検定は Wilcoxon の符号順位和検定にて行った。いずれも $P < 0.05$ を有意差ありとした。

結果

LXR α はヒト口腔扁平上皮癌組織において高発現する

これまで私の所属する研究室では、LXR α は正常細胞株に比べてヒト口腔扁平上皮癌細胞株において発現が高く、LXR β は発現が低いという結果を得ている。そこで、実際のヒト口腔扁平上皮癌切除組織を用いて、免疫染色法により LXR α 、 β の発現を検討した。その結果、LXR α 陽性細胞の発現割合は正常上皮組織では $31.8 \pm 11.3\%$ 、癌組織では $45.0 \pm 11.8\%$ と癌組織において発現の亢進が認められ ($P < 0.05$)、また、LXR β では正常組織では $32.4 \pm 9.1\%$ 、癌組織では $17.5 \pm 15.6\%$ と発現の低下が認められた ($P < 0.05$) (図 1, 表 1)。

T0901317 は細胞周期を調節する

SAS 細胞において、T0901317 が細胞周期に与える影響を FACS 解析により検討した。その結果、G0+G1 期細胞の割合は、DMSO 群では $61.1\% \pm 4.6\%$ であったが、T0901317 群では $74.6\% \pm 4.1\%$ と T0901317 群において有意に増加した ($P < 0.01$)。S 期細胞の割合は DMSO 群では $15.7\% \pm 0.9\%$ 、T0901317 群では $8.1\% \pm 0.8\%$ と T0901317 群において有意に低下した ($P < 0.001$) (図 2)。これらの結果より、T0901317 は SAS 細胞において、細胞周期を G1 期で停止させ、細胞増殖を抑制していることが示唆された。

T0901317 は細胞内コレステロールを減少させ、ヒト口腔扁平上皮癌細胞の増殖を抑制する

次に、LXR アゴニストの細胞増殖抑制効果にコレステロール代謝が関与しているかを明らかにするため、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株の細胞内コレステロール量に LXR アゴニストが与える影響を検討した。その結果、SAS 細胞における遊離コレステロール量は、1well あたり DMSO 群では $11.0 \pm 7.4\mu\text{g}$ で、T0901317 群では $7.9 \pm 3.9\mu\text{g}$ と T0901317 群において低下した (図 3A)。総コレステロール量 (遊離コレステロール+コレステロールエステル) は 1well あたり $11.2 \pm 5.6\mu\text{g}$ で T0901317 群では $8.7 \pm 4.2\mu\text{g}$ と T0901317 群において優位な低下を認めた (図 3B)。更に、T0901317 のヒト口腔扁平上皮癌細胞増殖抑制効果に対するコレステロール及び HDL の影響について、細胞培養液にコレステロールまたは HDL を添加し、抗 BrdU 抗体による免疫染色法 BrdU 標識法により検討した。SAS 細胞における BrdU 陽性細胞率は、DMSO 単独群では $62.1 \pm 10.6\%$ で、T0901317 単独群では $43.2 \pm 8.9\%$ と T0901317 群において優位に低下したが、T0901317+コレステロール群では、 $60.6 \pm 10.2\%$ と増殖抑制効果が優位に減弱した ($P < 0.05$)。また、HDL 単独群では $51.4 \pm 13.2\%$ であり優位に抑制したが、

T0901317 と併用しても相乗効果はみられなかった (図 4)。以上の結果から、T0901317 は細胞内コレステロール量を減少させることにより、SAS 細胞の増殖を抑制することが示唆された。

T0901317 は ABCA1 を介して細胞増殖抑制効果を示す

T0901317 は細胞内コレステロール量を減少させることが明らかとなったことから、LXR の標的遺伝子であり、コレステロール代謝に関わる ABCA1 に着目し、ABCA1 の発現が T0901317 による細胞増殖抑制効果に関与しているかどうかについて検討した。まず SAS 細胞において、T0901317 処理によって ABCA1 の発現が亢進することが、RT-PCR 法およびウエスタンブロッティング法により明らかとなった (図 5A,B)。

次に、ABCA1 の発現を RNAi 法によりノックダウンさせた SAS 細胞における、細胞内コレステロール量を検討した。まず、T0901317 処理下においても、siRNA により ABCA1 の発現がノックダウンされていることが確認された (図 6A)。次に、遊離コレステロール量は、コントロール siRNA 群の DMSO 処理群では 1well あたり $9.03 \pm 7.1 \mu\text{g}$ で、T0901317 処理群では $6.61 \pm 5.1 \mu\text{g}$ と T0901317 群において減少した。ABCA1 ノックダウン群の DMSO 処理群では $10.8 \pm 8.2 \mu\text{g}$ でありコントロール siRNA 群の DMSO 群に比べ上昇を認めた。更に、ABCA1 ノックダウン群の T0901317 群では $9.54 \pm 7.2 \mu\text{g}$ であり、T0901317 処理によるコレステロール減少作用は減弱し、コントロール siRNA 群と比較しても大きな差はみられなかった (図 6B)。また、総コレステロール量においても同様の結果を認めた (図 6C)。これらのことから、T0901317 による細胞内コレステロール量の減少作用は、ABCA1 を介していることが示唆された。

T0901317 の細胞内コレステロール減少作用に ABCA1 が関与していることが示唆されたことから、ABCA1 が細胞増殖に関与しているかを検討した。まず、細胞増殖率を XTT 法により検討したところ、コントロール群 (T0901317-, negative control siRNA) に比べ T0901317 処理群において細胞増殖の有意な低下を認めたが ($P < 0.05$)、ABCA1 のノックダウンにより T0901317 の細胞増殖抑制効果は減少した (図 7A)。更に、細胞増殖能について BrdU の免疫染色法により検討した結果、コントロール群では BrdU 陽性率が $52.6 \pm 4.5\%$ であるのに対し、T0901317 処理群では $32.6 \pm 2.9\%$ と有意な低下を認め ($P < 0.001$)、コントロール群と ABCA1 ノックダウン群の比較では、ABCA1 siRNA#1 が $61.6 \pm 3.7\%$ ($P < 0.05$)、ABCA1 siRNA#2 では $60.1 \pm 5.6\%$ と、ABCA1 ノックダウン群において陽性率の増加を認めた。また、T0901317 処理による BrdU 陽性率の低下作用は、ABCA1 ノックダウンにより減弱した (図 7B)。これらの結果より、T0901317 は ABCA1 の発現を亢進させ、細胞内コレステロール量を低下させることで細胞増殖を抑制することが示唆された。

T0901317 は口腔扁平上皮癌細胞移植マウスにおいて細胞増殖抑制効果を示す

培養細胞実験における検討において、T0901317 は ABCA1 の発現を亢進させることによりコレステロール排出を促進し、口腔扁平上皮癌細胞の増殖を抑制することが示唆された。そこで、次にオス SCID マウスを用いて、癌細胞移植実験における T0901317 の効果を検討した。具体的には、SAS 細胞を皮下に移植し、移植翌日から 2 日おきに T0901317 を腹腔内投与し、移植 15 日目に腫瘍を摘出し各種解析を行った。その結果、ヒト口腔扁平上皮癌細胞移植マウスにおいて、T0901317 投与により腫瘍重量は体重 1g あたり DMSO 群では $7.7 \pm 2.7\text{g}$ で、T0901317 群では $2.7 \pm 0.9\text{g}$ と T0901317 群において優位に減少した (図 8A)。また、摘出腫瘍組織における Ki67 陽性率は、DMSO 群では $33.7 \pm 3.9\%$ 、T0901317 投与群では $25.7 \pm 2.5\%$ と、T0901317 群で有意な陽性率の低下を認めた ($P < 0.01$) (図 8B)。

次に摘出腫瘍組織における ABCA1 タンパク質の発現をウエスタンブロッティング法にて検討した結果、T0901317 投与群では ABCA1 の発現亢進を認めた (図 8C)。また、摘出腫瘍組織内の遊離コレステロール量は、DMSO 群では $47.1 \pm 21.8\mu\text{g}$ であるのに対し、T0901317 投与群では $36.8 \pm 14.9\mu\text{g}$ と T0901317 群において有意に低下を認めた ($P < 0.05$) (図 9A)。総コレステロール量も同様に DMSO 群に比べ T0901317 投与群で低下を認めた (図 9B)。T0901317 投与開始時から腫瘍摘出時までの体重の増加値は DMSO 群では $0.67 \pm 0.8\text{g}$ で T0901317 は $1.1 \pm 0.3\text{g}$ と優位な差は認めなかった (図 10A)。また、血液検査ではトリグリセリドが DMSO 群では $106.6 \pm 27\text{mg/dl}$ であったのに対し T0901317 群では $220.8 \pm 63.3\text{mg/dl}$ と T0901317 群において優位な上昇を認めた (図 10D)。遊離コレステロール、総コレステロール、LDL、HDL は優位な差を認めなかった。

以上の結果から、*in vitro* と同様に *in vivo* においても、ABCA1 によるコレステロール排出を介した T0901317 の細胞増殖抑制機構が存在していることが示唆された。

考察

本研究では、ヒト口腔扁平上皮癌組織における LXR の発現パターンや LXR アゴニストによるヒト口腔扁平上皮癌細胞の増殖抑制作用を初めて明らかにした。また、これまでは断片的であった LXR アゴニストの細胞増殖抑制作用のメカニズムについて、ABCA1 の発現誘導により細胞内コレステロールの排出が促進され、細胞内コレステロールが枯渇し、増殖が抑制されるという機序の存在を初めて明確にした。

コレステロールの代謝異常は様々な疾患の原因となり、特に細胞内コレステロールの過剰蓄積は動脈硬化、心臓血管疾患の原因となる。これまでにコレステロール代謝と癌の増殖や転移との関連については数多くの報告がされており、癌細胞はその迅速な増殖、浸潤のために、正常細胞と比較して多量のコレステロールを必要とすること (33-35)、豊富なコレステロールを有することが報告されている (36, 37)。また、コレステロールはエストロゲンやアンドロゲンといった腫瘍促進ホルモンの前駆体であり、癌細胞は自らコレステロールを合成する能力を持つこと (38)、高コレステロール血症マウスでは腫瘍の増殖や転移が促進されること (35, 39)、血中コレステロールレベルの高値は癌患者の不良な予後と高い相関があることが分かっている (40)。その機序として、癌細胞は細胞周期において細胞内コレステロールが S 期では G1 期の 2 倍になることや (41)、コレステロールが主要な構成成分である脂質ラフトにおいて、コレステロールレベルの低下は脂質ラフトの脆弱化を引き起こし、Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) 及びその下流の Akt 回路の活性化が阻害され、アポトーシスを引き起こすなどの報告がある (3, 42)。

このように癌の増殖や転移、そして予後との関連性があるコレステロールを治療の標的とする研究も行われており、代表的なものとして HMG-CoA 阻害剤であるスタチンに着目した研究が挙げられる。スタチンは肝でのコレステロール生合成の抑制や、LDL 受容体の発現を誘導することにより血中 LDL コレステロールレベルを低下させるなどの作用を持つことから、脂質異常症治療において広く用いられている薬剤である (43)。癌細胞においてスタチンは、血中コレステロールレベルを低下させることで抗腫瘍効果を発揮する他、メバロン酸経路の抑制によって Ras のファルネシル化などの下流シグナルを阻害し、さらには細胞周期調節因子であるサイクリン依存性キナーゼ 2 (CDK 2) の活性低下や p21 及び p27 の分解を抑制することで、細胞周期を G1 期で停止させ細胞増殖を抑制する (44, 45)。スタチンによる細胞増殖抑制効果は多くの種類の癌において報告があり、実際の癌患者におけるスタチン服用の有無による生存率を検討する臨床試験も行われているが (46, 47)、その効果について一定の見解は得られておらず、重篤な副作用であるミオパシーの発症にも注意が必要であり、更なる検証

が必要とされている。

スタチンがコレステロールの生合成、末梢への輸送を阻害するのに対し、LXR は細胞内からのコレステロールの排出機構に密接に関与している。LXR は過剰な細胞内コレステロールの蓄積が起これるとその発現が亢進し、LXR 下流分子の発現と活性化が誘導され、コレステロールの排出を促進させる。一連のコレステロール排出機構は Reverse Cholesterol Transport (RCT) と呼ばれ、細胞内の過剰なコレステロールを排出し、細胞膜の恒常性を保つ重要な生理機構である。

実際に、LXR アゴニストによる癌細胞の細胞増殖抑制効果についての報告は、乳癌や前立腺癌、大腸癌などにおいてなされている (18-21)。また、Yvan-Charvet らは LXR、ABCA1/ABCG1 及び HDL が、コレステロール排出機構を介して造血幹細胞や多能性前駆細胞の増殖を抑制することを報告している (48)。我々はこれらの報告を基に、T0901317 は ABCA1 の発現を亢進させることで細胞内からのコレステロール排出を促進し、口腔扁平上皮癌細胞に対してコレステロール枯渇状態を作り出し、細胞の増殖を抑制しているという仮説を立て検討を行った。その結果、まず T0901317 未処理の状態でも HDL を投与することで細胞増殖は抑制されることが明らかとなった。この結果は、HDL がコレステロール排出を促進させ、細胞増殖を抑制するという Yvan-Charvet らの報告と一致した。また、T0901317 とコレステロールの併用処理により、T0901317 単独処理に比べて細胞増殖抑制作用の減弱が認められたが、T0901317 と HDL の併用処理では細胞増殖抑制効果のさらなる増強は見られなかった。これは、細胞内コレステロールの過剰な排出を防ぐメカニズムが存在することによるものと我々は考えている。

次に、口腔扁平上皮癌細胞における LXR のコレステロール排出機構に ABCA1 が関与しているかを検討した。その結果、まず T0901317 処理により ABCA1 の発現亢進がみられた。また、ABCA1 ノックダウンにより細胞内コレステロール量は増加し、細胞増殖が亢進した。そして ABCA1 の発現が低下することにより、T0901317 による細胞増殖抑制効果や細胞内コレステロール低下作用の減弱がみられた。これらの結果から、ABCA1 が T0901317 による癌細胞増殖抑制機構の中心的役割を担っていることが示唆され、細胞内コレステロールレベルの低下が、癌細胞の増殖を抑制するという仮説が裏付けられた。

更に、T0901317 はコレステロール排出機構を介して細胞周期を調節することにより、細胞増殖を抑制することが報告されている (26)。本研究では、SAS 細胞において T0901317 処理により細胞内コレステロール量が顕著に減少し、細胞周期解析では G0+G1 期細胞の割合の増加を認めた。この結果は、G1 期から S 期への移行において、細胞は多量のコレステロールを必要とするという説を支持するものであり (41)、細胞内コレステロールが減少し、細胞周期が G1 期で停止し細胞増殖を抑制していることが示唆された。細胞内コレステロールレベルの低下と G1 期停止については、ア

ポトーシスの増加を認めるものと (3, 42)、認めないもの (49)の両方について様々な報告があり一様でない。本研究において T0901317 処理によりアポトーシスの増加は認めおらず、この機序の解明は今後の検討課題である。

本研究では、LXR アゴニストの臨床応用への有用性を踏まえ、ヒト口腔癌患者の癌組織を用いて LXR 発現の検証を行った。結果は、口腔扁平上皮癌組織において LXR α は正常組織に比べ癌組織での発現が高く、LXR β は正常組織に比べ癌組織での発現が低下していた。ヒト口腔扁平上皮癌細胞株と表皮由来細胞株癌の比較では、癌細胞株で LXR α の発現が亢進し LXR β の発現は低下するため、細胞株での実験と同様の結果であった (32)。進行度との相関をステージ別に検討すると、ステージ 1, 2 の初期癌では LXR α の発現亢進は軽度だが、ステージ 3, 4 の進行癌では LXR α の発現亢進が強くなる傾向を認めた。一方で、LXR β は進行度との相関を認められなかった (データ未掲載)。癌細胞では LXR α の発現量が多いほど T0901317 に対する感受性が高いとの報告もあることから (19)、実際の癌組織においても T0901317 は同じメカニズムで機能する可能性があると考えられ、癌細胞選択的に細胞増殖抑制効果を示すことが期待される。また、LXR α ノックダウンにより T0901317 によるコレステロール排出が減少するという報告もあり (50)、LXR α は T0901317 の細胞増殖抑制作用において重要な役割を果たしていると考えられる。

更に、口腔扁平上皮癌細胞移植マウスにおいても、T0901317 は明らかな抗腫瘍効果を示した。T0901317 投与による腫瘍重量の低下や、癌細胞増殖抑制、ABCA1 の発現亢進や癌細胞内コレステロール量の低下という結果は、培養細胞での検討と同様の結果であり、生体内においても LXR アゴニストは癌細胞増殖抑制効果を示すことが明らかとなった。

LXR アゴニストの副作用としては、LXR の標的遺伝子である SREBP1c の発現亢進によると考えられる脂肪肝や、血中トリグリセリド (TG) レベルの上昇が報告されている (51, 52)。今回使用した T0901317 投与量は、Terasaka らのマウスを用いた高脂血症治療に関する研究を参考に決定したが (14)、その研究において血中 TG レベルが投与開始初期にのみ軽度上昇することが報告されている。本研究において、T0901317 投与により血中トリグリセリドレベルの優位な上昇を認めたが、脂肪肝は認めず、体重の増加にも優位な差はなく他の明らかな副作用は認めなかった。Terasaka らの報告では、投与 5 週目までは血中トリグリセリドが、最大でコントロール群の 6 倍と優位な上昇を認め、8 週目には有意差を認めないまでに低下している。本実験においてもこの報告と同様に投与初期のみの優位な上昇を認めたと考えられる。

今回結果として示したオスマウスにおいては、T0901317 による顕著な抗腫瘍効果を認めた。一方で未掲載データであるが、メスマウスに行った同様の実験では、T0901317 による抗腫瘍効果はオスに比べ減弱した。コレステロールの代謝物である 27HC (27-hydroxycholesterol) は乳癌において腫瘍増殖を亢進させることや、エストロ

ゲン受容体と相互作用することが報告されているおり (53, 54)、メスマウスにおける T0901317 の抗腫瘍効果の減弱は、エストロゲン受容体の発現亢進に起因すると考えられる。具体的には、コレステロールを 27HC に変換する酵素である CYP27A1 は乳癌細胞および乳癌組織において高発現しており、乳癌において T0901317 の作用により血中に排出されたコレステロールは 27HC に変換される。そして、変換された過剰な 27HC がエストロゲン受容体へ作用し、腫瘍細胞の増殖を惹起しているものと考えられる (54)。口腔扁平上皮癌細胞における 27HC やエストロゲン受容体の作用は分かっていないが、本研究の結果から口腔扁平上皮癌も乳癌と同様のメカニズムを介している可能性があると考えられる。今後は、メスマウスにおける T0901317 の抗腫瘍効果や、エストロゲンなどコレステロール代謝産物などとの相関性の有無、更にはその作用機序の解明を行う必要がある。それにより、口腔扁平上皮癌並びに他の癌に対する LXR アゴニストの臨床応用への可能性が前進し、副作用の少ない新規抗癌剤の開発に繋がると考えられる。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、指導教官として終始懇篤な御指導、御助言を賜りました福島県立医科大学基礎病理学講座、千葉英樹教授に深厚なる誠意を表します。

また、実験計画から実験方法にいたるまで懇切丁寧に御指導、御助言頂きました、井村徹也准教授、富川直樹講師、柏木維人助教、田中瑞子助教、杉野隆博士研究員、穂積あゆみ主任医療技師、三浦富子主任医療技師に深く感謝いたします。

さらに、本研究遂行のために尊い命を捧げてくれた、マウスたちに深く感謝すると共に、ご冥福をお祈りいたします。

休日夜間まで、共に実験し楽しく励まし合い大学院生活を支えてくれた大学院生、MD PhD の学生の皆様に感謝いたします。

追記

本学位論文は修正の上、2015年10月1日付で *Oncotarget* 誌に原著論文として発表した。

<https://doi.org/10.18632/oncotarget.5428>

参考文献

1. Silvente-Poirot S, Poirot M. Cholesterol epoxide hydrolase and cancer. *Current opinion in pharmacology*. 2012;12:696-703.
2. Edidin M. The state of lipid rafts: from model membranes to cells. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*. 2003;32:257-83.
3. Zhuang L, Lin J, Lu ML, Solomon KR, Freeman MR. Cholesterol-rich lipid rafts mediate akt-regulated survival in prostate cancer cells. *Cancer research*. 2002;62:2227-31.
4. Edwards PA, Ericsson J. Sterols and isoprenoids: signaling molecules derived from the cholesterol biosynthetic pathway. *Annual review of biochemistry*. 1999;68:157-85.
5. Hua X, Wu J, Goldstein JL, Brown MS, Hobbs HH. Structure of the human gene encoding sterol regulatory element binding protein-1 (SREBF1) and localization of SREBF1 and SREBF2 to chromosomes 17p11.2 and 22q13. *Genomics*. 1995;25:667-73.
6. Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell*. 1997;89:331-40.
7. Krycer JR, Phan L, Brown AJ. A key regulator of cholesterol homeostasis, SREBP-2, can be targeted in prostate cancer cells with natural products. *The Biochemical journal*. 2012;446:191-201.
8. Willy PJ, Umesono K, Ong ES, Evans RM, Heyman RA, Mangelsdorf DJ. LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes & development*. 1995;9:1033-45.
9. Parikh M, Patel K, Soni S, Gandhi T. Liver X receptor: a cardinal target for atherosclerosis and beyond. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*. 2014;21:519-31.
10. Repa JJ, Mangelsdorf DJ. The liver X receptor gene team: potential new players in atherosclerosis. *Nature medicine*. 2002;8:1243-8.
11. Yasuda T, Grillot D, Billheimer JT, Briand F, Delerive P, Huet S, et al. Tissue-specific liver X receptor activation promotes macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2010;30:781-6.

12. Joseph SB, Tontonoz P. LXRs: new therapeutic targets in atherosclerosis? *Current opinion in pharmacology*. 2003;3:192-7.
13. Zanotti I, Poti F, Pedrelli M, Favari E, Moleri E, Franceschini G, et al. The LXR agonist T0901317 promotes the reverse cholesterol transport from macrophages by increasing plasma efflux potential. *Journal of lipid research*. 2008;49:954-60.
14. Terasaka N, Hiroshima A, Koieyama T, Ubukata N, Morikawa Y, Nakai D, et al. T-0901317, a synthetic liver X receptor ligand, inhibits development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *FEBS letters*. 2003;536:6-11.
15. Blaschke F, Leppanen O, Takata Y, Caglayan E, Liu J, Fishbein MC, et al. Liver X receptor agonists suppress vascular smooth muscle cell proliferation and inhibit neointima formation in balloon-injured rat carotid arteries. *Circulation research*. 2004;95:e110-23.
16. Bensinger SJ, Bradley MN, Joseph SB, Zelcer N, Janssen EM, Hausner MA, et al. LXR signaling couples sterol metabolism to proliferation in the acquired immune response. *Cell*. 2008;134:97-111.
17. Lo Sasso G, Celli N, Caboni M, Murzilli S, Salvatore L, Morgano A, et al. Down-regulation of the LXR transcriptome provides the requisite cholesterol levels to proliferating hepatocytes. *Hepatology*. 2010;51:1334-44.
18. Vedin LL, Lewandowski SA, Parini P, Gustafsson JA, Steffensen KR. The oxysterol receptor LXR inhibits proliferation of human breast cancer cells. *Carcinogenesis*. 2009;30:575-9.
19. Fukuchi J, Kokontis JM, Hiipakka RA, Chuu CP, Liao S. Antiproliferative effect of liver X receptor agonists on LNCaP human prostate cancer cells. *Cancer research*. 2004;64:7686-9.
20. Lo Sasso G, Bovenga F, Murzilli S, Salvatore L, Di Tullio G, Martelli N, et al. Liver X receptors inhibit proliferation of human colorectal cancer cells and growth of intestinal tumors in mice. *Gastroenterology*. 2013;144:1497-507, 507 e1-13.
21. Chuu CP, Chen RY, Hiipakka RA, Kokontis JM, Warner KV, Xiang J, et al. The liver X receptor agonist T0901317 acts as androgen receptor antagonist in human prostate cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2007;357:341-6.
22. Lehmann JM, Kliewer SA, Moore LB, Smith-Oliver TA, Oliver BB, Su JL, et al. Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272:3137-40.

23. Repa JJ, Turley SD, Lobaccaro JA, Medina J, Li L, Lustig K, et al. Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science*. 2000;289:1524-9.
24. Laffitte BA, Repa JJ, Joseph SB, Wilpitz DC, Kast HR, Mangelsdorf DJ, et al. LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98:507-12.
25. Zelcer N, Hong C, Boyadjian R, Tontonoz P. LXR regulates cholesterol uptake through Idol-dependent ubiquitination of the LDL receptor. *Science*. 2009;325:100-4.
26. Noghero A, Perino A, Seano G, Saglio E, Lo Sasso G, Veglio F, et al. Liver X receptor activation reduces angiogenesis by impairing lipid raft localization and signaling of vascular endothelial growth factor receptor-2. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2012;32:2280-8.
27. Tontonoz P, Mangelsdorf DJ. Liver X receptor signaling pathways in cardiovascular disease. *Molecular endocrinology*. 2003;17:985-93.
28. Singaraja RR, Van Eck M, Bissada N, Zimetti F, Collins HL, Hildebrand RB, et al. Both hepatic and extrahepatic ABCA1 have discrete and essential functions in the maintenance of plasma high-density lipoprotein cholesterol levels in vivo. *Circulation*. 2006;114:1301-9.
29. Bodzioch M, Orso E, Klucken J, Langmann T, Bottcher A, Diederich W, et al. The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nature genetics*. 1999;22:347-51.
30. Brunham LR, Kruit JK, Pape TD, Parks JS, Kuipers F, Hayden MR. Tissue-specific induction of intestinal ABCA1 expression with a liver X receptor agonist raises plasma HDL cholesterol levels. *Circulation research*. 2006;99:672-4.
31. Kappus MS, Murphy AJ, Abramowicz S, Ntonga V, Welch CL, Tall AR, et al. Activation of liver X receptor decreases atherosclerosis in *Ldlr*^{(-)/(-)} mice in the absence of ATP-binding cassette transporters A1 and G1 in myeloid cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2014;34:279-84.
32. 哲治 金. ヒト口腔扁平上皮癌細胞における Liver X Receptor の発現とそのアゴニストによる増殖抑制効果. 福島県立医科大学大学院 博士論文. 2011;甲 437.
33. Benn M, Tybjaerg-Hansen A, Stender S, Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG. Low-density lipoprotein cholesterol and the risk of cancer: a mendelian randomization study. *Journal of the National Cancer Institute*. 2011;103:508-19.

34. Chan KK, Oza AM, Siu LL. The statins as anticancer agents. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2003;9:10-9.
35. Alikhani N, Ferguson RD, Novosyadlyy R, Gallagher EJ, Scheinman EJ, Yakar S, et al. Mammary tumor growth and pulmonary metastasis are enhanced in a hyperlipidemic mouse model. *Oncogene*. 2013;32:961-7.
36. Kolanjiappan K, Ramachandran CR, Manoharan S. Biochemical changes in tumor tissues of oral cancer patients. *Clinical biochemistry*. 2003;36:61-5.
37. Yoshioka Y, Sasaki J, Yamamoto M, Saitoh K, Nakaya S, Kubokawa M. Quantitation by (1)H-NMR of dolichol, cholesterol and choline-containing lipids in extracts of normal and pathological thyroid tissue. *NMR in biomedicine*. 2000;13:377-83.
38. Silvente-Poirot S, Poirot M. Cancer. Cholesterol and cancer, in the balance. *Science*. 2014;343:1445-6.
39. Llaverias G, Danilo C, Mercier I, Daumer K, Capozza F, Williams TM, et al. Role of cholesterol in the development and progression of breast cancer. *The American journal of pathology*. 2011;178:402-12.
40. Jacobs D, Blackburn H, Higgins M, Reed D, Iso H, McMillan G, et al. Report of the Conference on Low Blood Cholesterol: Mortality Associations. *Circulation*. 1992;86:1046-60.
41. Singh P, Saxena R, Srinivas G, Pande G, Chattopadhyay A. Cholesterol biosynthesis and homeostasis in regulation of the cell cycle. *PloS one*. 2013;8:e58833.
42. Adam RM, Mukhopadhyay NK, Kim J, Di Vizio D, Cinar B, Boucher K, et al. Cholesterol sensitivity of endogenous and myristoylated Akt. *Cancer research*. 2007;67:6238-46.
43. Ness GC, Zhao Z, Lopez D. Inhibitors of cholesterol biosynthesis increase hepatic low-density lipoprotein receptor protein degradation. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1996;325:242-8.
44. Keyomarsi K, Sandoval L, Band V, Pardee AB. Synchronization of tumor and normal cells from G1 to multiple cell cycles by lovastatin. *Cancer research*. 1991;51:3602-9.
45. Jakobisiak M, Bruno S, Skierski JS, Darzynkiewicz Z. Cell cycle-specific effects of lovastatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991;88:3628-32.

46. Konings IR, van der Gaast A, van der Wijk LJ, de Jongh FE, Eskens FA, Sleijfer S. The addition of pravastatin to chemotherapy in advanced gastric carcinoma: a randomised phase II trial. *European journal of cancer*. 2010;46:3200-4.
47. Graf H, Jungst C, Straub G, Dogan S, Hoffmann RT, Jakobs T, et al. Chemoembolization combined with pravastatin improves survival in patients with hepatocellular carcinoma. *Digestion*. 2008;78:34-8.
48. Yvan-Charvet L, Pagler T, Gautier EL, Avagyan S, Siry RL, Han S, et al. ATP-binding cassette transporters and HDL suppress hematopoietic stem cell proliferation. *Science*. 2010;328:1689-93.
49. Candelaria NR, Addanki S, Zheng J, Nguyen-Vu T, Karaboga H, Dey P, et al. Antiproliferative effects and mechanisms of liver X receptor ligands in pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *PloS one*. 2014;9:e106289.
50. Ishibashi M, Filomenko R, Rebe C, Chevriaux A, Varin A, Derangere V, et al. Knock-down of the oxysterol receptor LXRalpha impairs cholesterol efflux in human primary macrophages: lack of compensation by LXRbeta activation. *Biochemical pharmacology*. 2013;86:122-9.
51. Joseph SB, McKilligin E, Pei L, Watson MA, Collins AR, Laffitte BA, et al. Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99:7604-9.
52. Peng D, Hiipakka RA, Xie JT, Dai Q, Kokontis JM, Reardon CA, et al. A novel potent synthetic steroidal liver X receptor agonist lowers plasma cholesterol and triglycerides and reduces atherosclerosis in LDLR(-/-) mice. *British journal of pharmacology*. 2011;162:1792-804.
53. Nelson ER, Wardell SE, Jasper JS, Park S, Suchindran S, Howe MK, et al. 27-Hydroxycholesterol links hypercholesterolemia and breast cancer pathophysiology. *Science*. 2013;342:1094-8.
54. Wu Q, Ishikawa T, Sirianni R, Tang H, McDonald JG, Yuhanna IS, et al. 27-Hydroxycholesterol promotes cell-autonomous, ER-positive breast cancer growth. *Cell reports*. 2013;5:637-45.

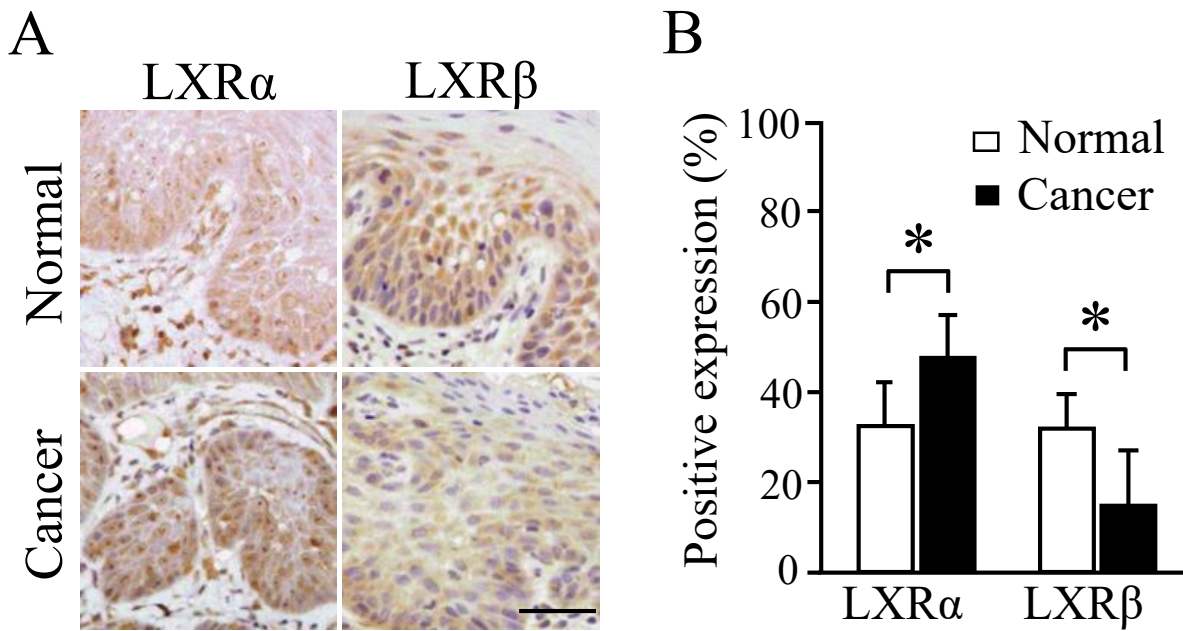


図1. ヒト口腔扁平上皮癌組織 10例におけるLXRα, βの発現。

(A) 正常口腔粘膜組織およびヒト口腔扁平上皮癌組織におけるLXRα及びLXRβの発現を免疫組織化学染色法で検討した。バーの長さ：50 μm

(B) 同一組織標本内の正常組織、癌組織のそれぞれにおけるLXRα, βの発現を免疫組織化学染色法にて検討し、陽性細胞率を示した。* $P < 0.05$

Gender	Region	Positive expression (%)			
		LXRα		LXRβ	
		Normal	Cancer	Normal	Cancer
F	tongue	53.5	53.5	36.9	19.3
F	tongue	49.2	52.7	28.6	14.7
M	tongue	35.5	33.1	40.0	29.9
M	tongue	12.4	48.5	22.0	15.5
M	tongue	15.6	25.0	60.3	45.1
M	gingiva	24.9	56.0	19.8	1.5
M	gingiva	27.6	44.8	26.2	8.6
F	gingiva	27.1	36.9	46.5	11.8
F	gingiva	30.2	45.2	33.5	11.2
M	buccal mucosa	39.3	58.1	37.5	1.3
mean ± SD		31.8 ± 11.0	*45.0 ± 11.8	32.4 ± 9.1	*17.5 ± 15.6

表1. 免疫組織化学染色を行った各組織サンプルのLXRα及びLXRβの陽性率を示した。* $P < 0.05$

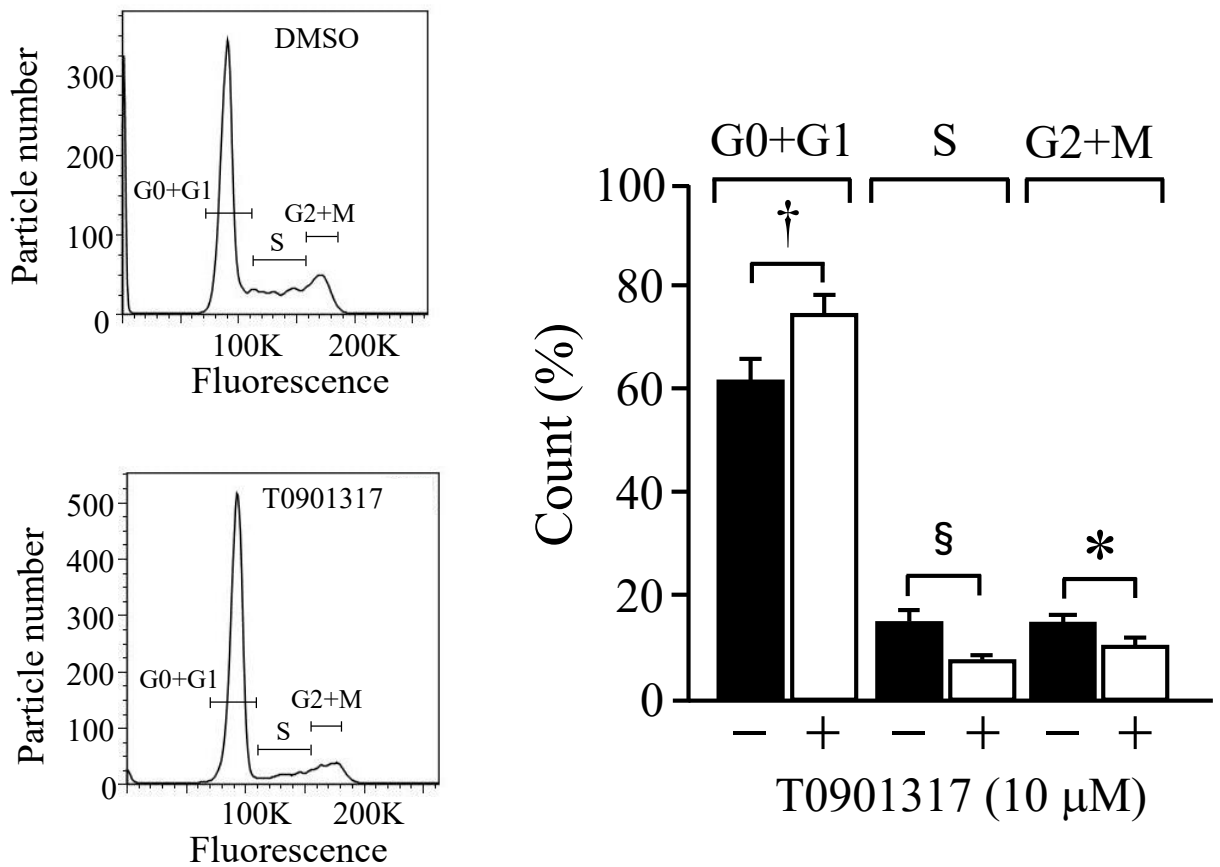


図2. T0901317がヒト口腔扁平上皮癌細胞株の細胞周期に及ぼす影響。
 ヒト口腔扁平上皮癌細胞株 SASを10 μMのT0901317で72時間処置後（コントロールはDMSO処置） 1×10^6 個ずつ回収し、PI染色後にフローサイトメトリーで解析した。
 実験は5回行い、その平均値と標準偏差を示した。
 * $P < 0.05$, † $P < 0.01$, § $P < 0.001$

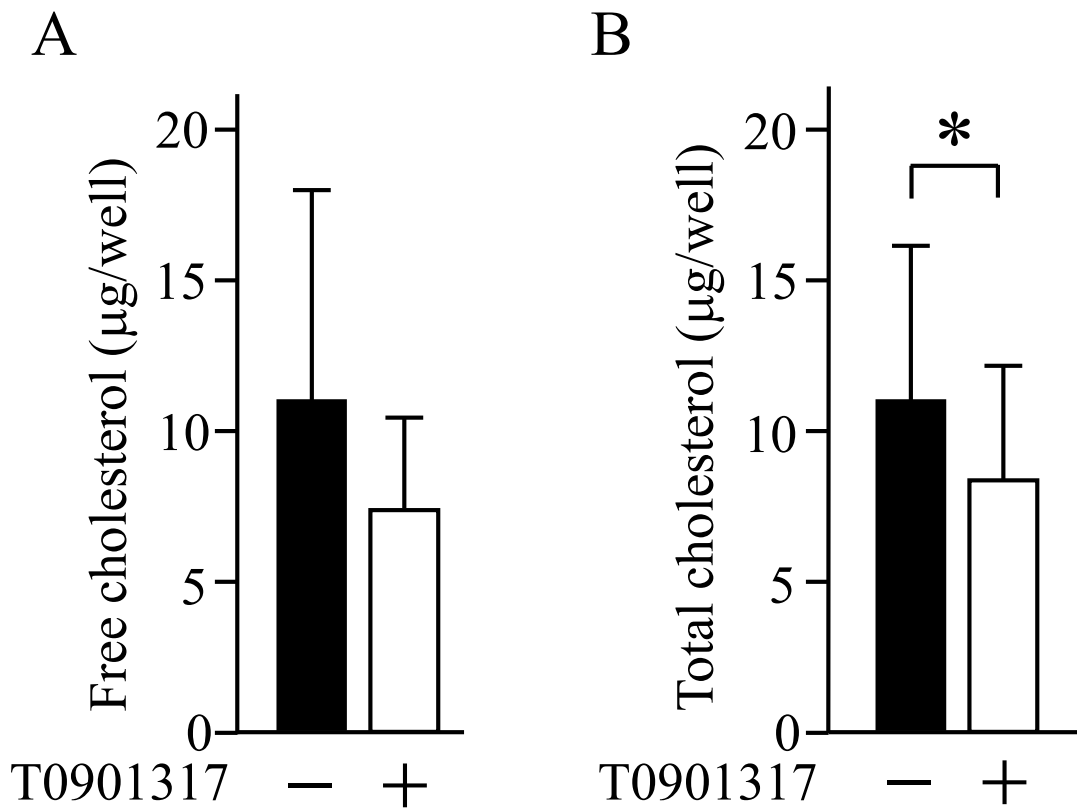


図3. T0901317がヒト口腔扁平上皮癌細胞株の細胞内コレステロール量に及ぼす影響。

ヒト口腔扁平上皮癌細胞株 SASを、10 µMのT0901317で72時間処置後（コントロールはDMSO処置）、 1×10^6 個ずつ回収し解析した。（A）は遊離コレステロール量、（B）は総コレステロール量を示した。実験は5回行い、その平均値と標準偏差を示した。* $P < 0.05$

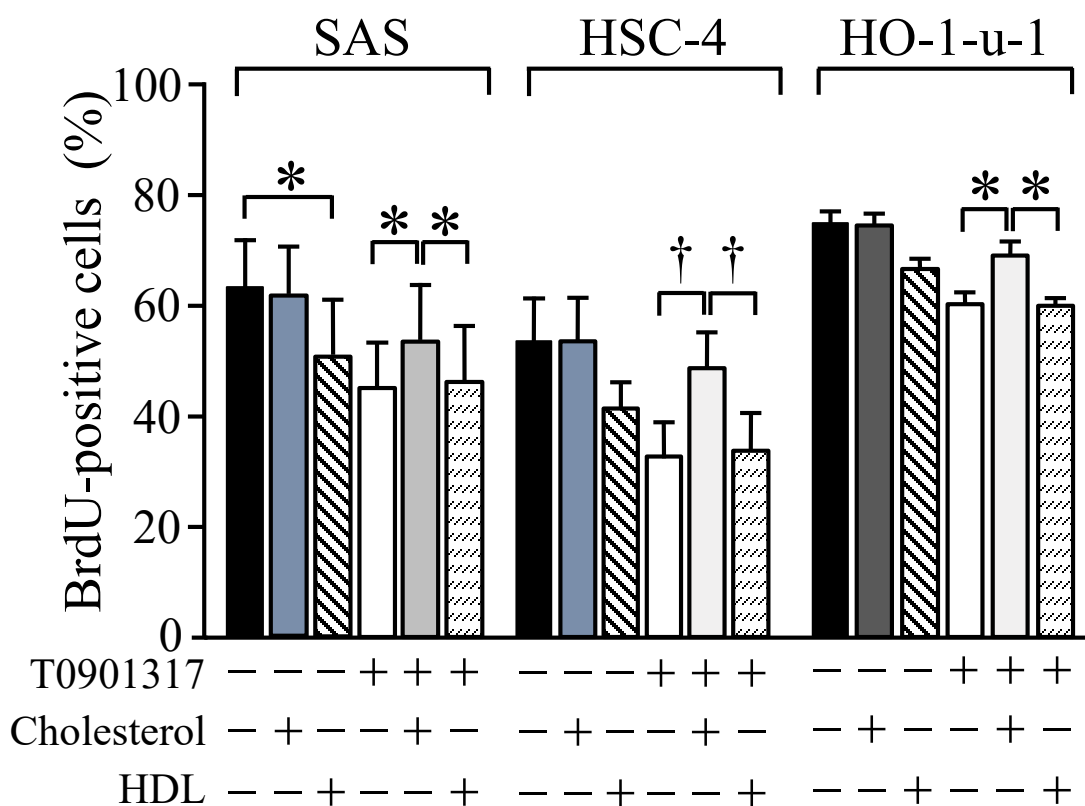


図4. ヒト口腔扁平上皮癌細胞株におけるコレステロール、HDLがT0901317の細胞増殖抑制作用に及ぼす影響。

ヒト口腔扁平上皮癌細胞株 SAS, HSC-4, HO1-u-1を10 μ MのT0901317、1 mg/mlのコレステロール及び、50 μ g/mlのHDLでそれぞれ72時間処置後（T0901317未処置群はDMSO処置）、免疫蛍光染色法にてBrdU陽性細胞率を計測した。実験は3回行い、その平均値と標準偏差を示した。* $P < 0.05$ 、† $P < 0.01$

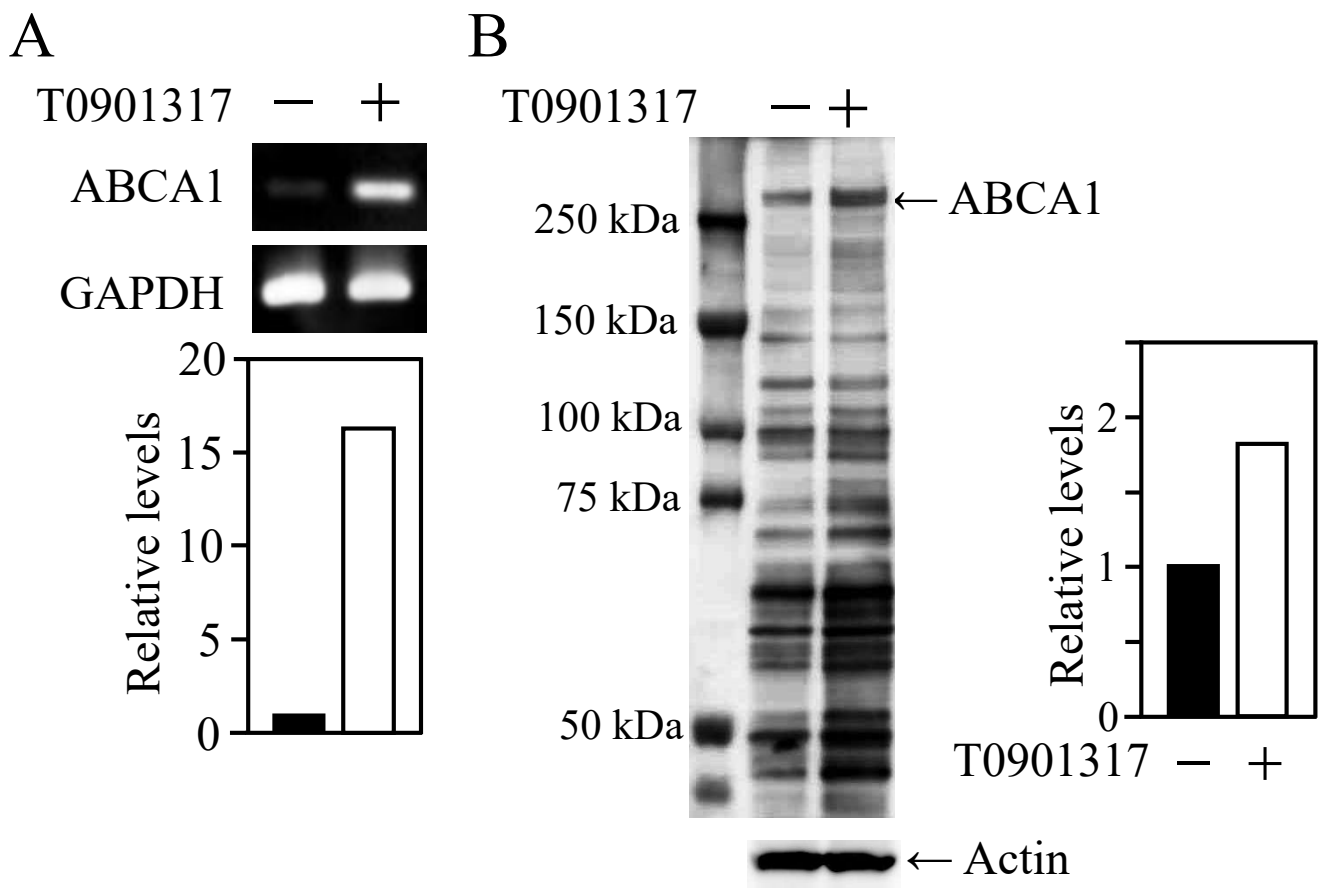


図5. T0901317がヒト口腔扁平上皮癌細胞株のABCA1発現に及ぼす影響。ヒト口腔扁平上皮癌細胞株SASを10 μ MのT0901317で72時間処置後（コントロールはDMSO処置）、RT-PCR (A)、ウエスタンブロット法 (B) を行い、発現強度をImage J ソフトウェアで解析した。ABCA1の発現はGAPDH及びActinの発現レベルでそれぞれ補正し、コントロール群の発現を1として表示した。

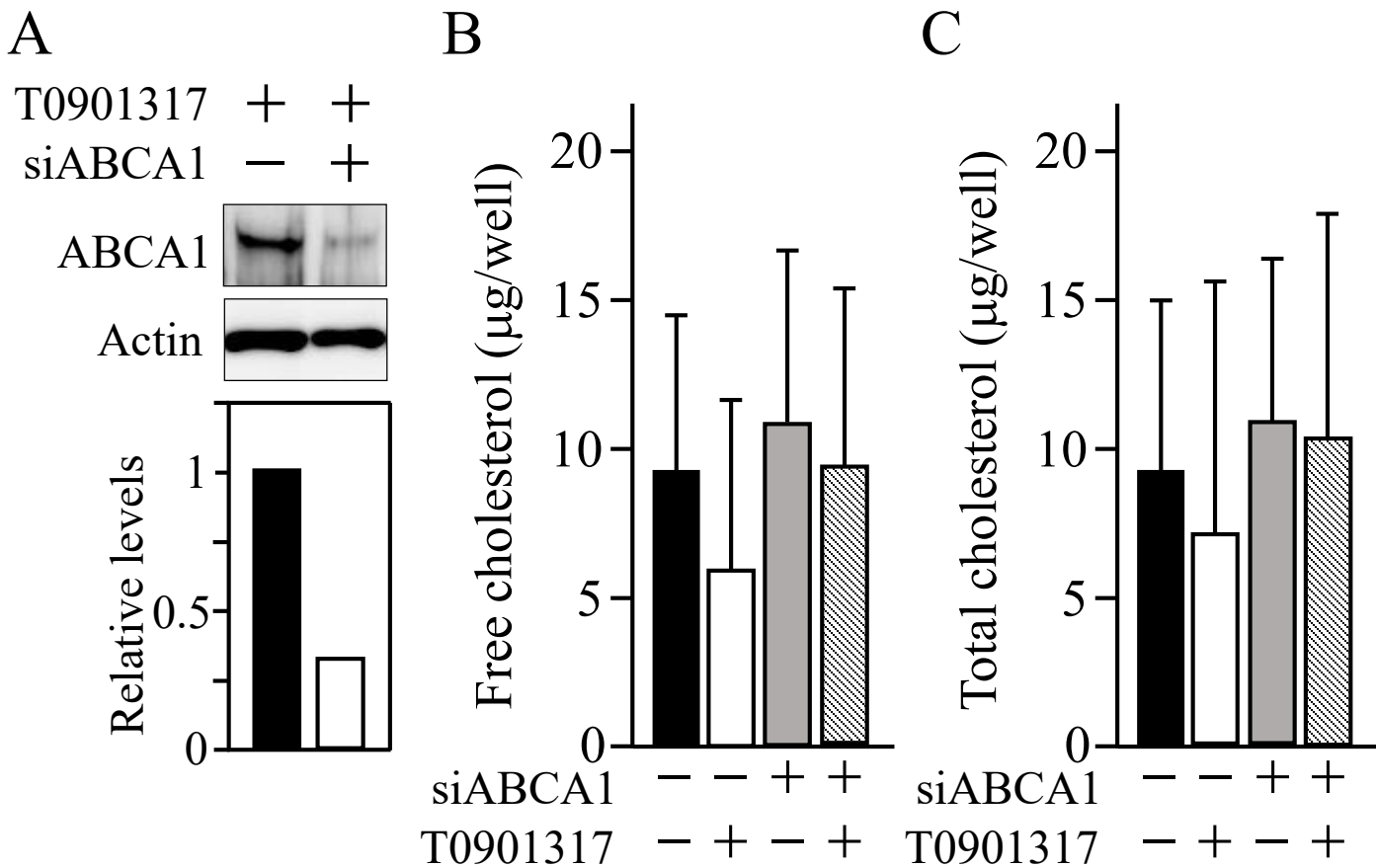
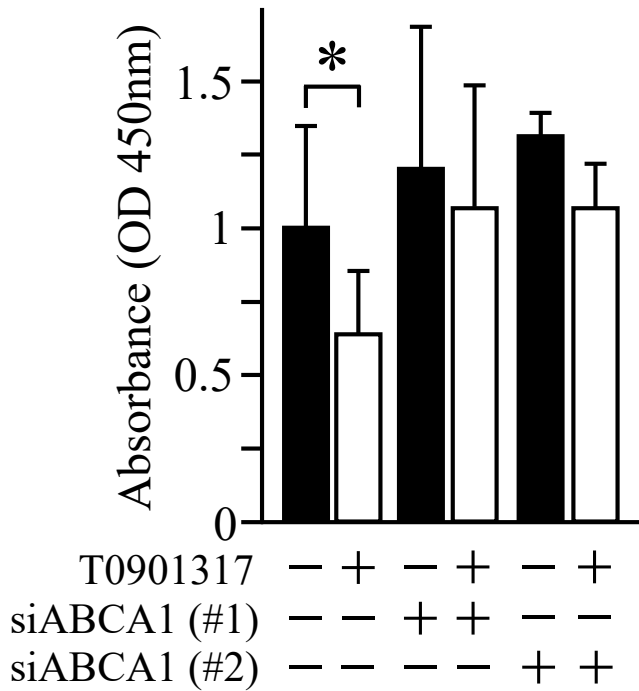


図6. RNAi法によるABCA1ノックダウン。

(A) ヒト口腔扁平上皮癌細胞株 SASに500 pmolのsiRNA #1をelectroporation法を用いて導入し、10 μM のT0901317で36時間処置後、ウエスタンブロット法を行い発現強度をImage Jで解析した。ABCA1の発現はActinの発現レベルで補正し、コントロールsiRNA群の発現を1として表示した。

(B, C) SAS細胞を10 μM のT0901317で72時間処置後（コントロールはDMSO処置）、 1×10^6 個あたりのコレステロール量を測定した。(B) は遊離コレステロール、(C) は総コレステロール量を示した。コントロールsiRNA群を100%として各群の相対値を示した。

A



B

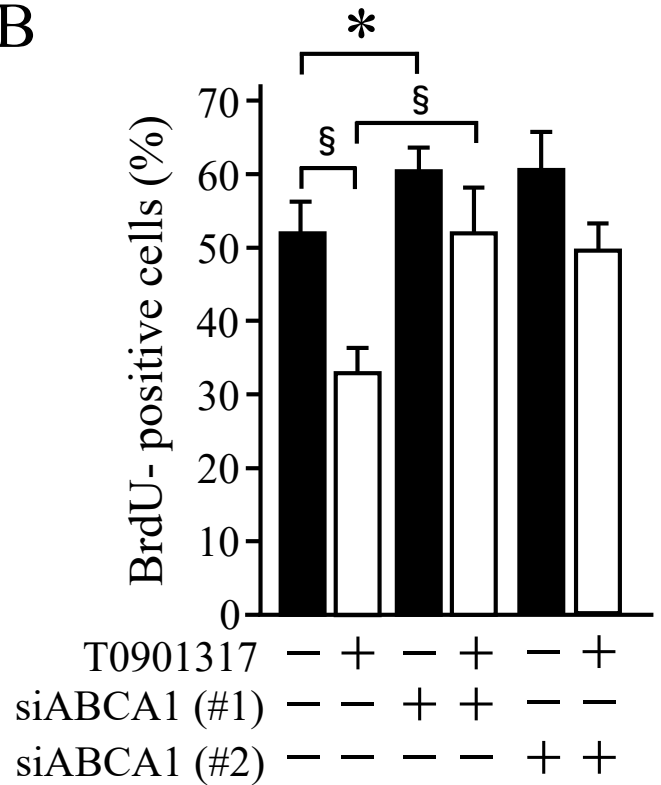


図7. ABCA1ノックダウンがヒト口腔扁平上皮癌細胞株の細胞増殖に及ぼす影響。SAS細胞においてABCA1をノックダウンし、10 μ MのT0901317で72時間処置後(コントロールはDMSO処置)、XTTアッセイ及びBrdU免疫組織化学染色法で評価した。各群の(A) 450 nmにおける吸光度、(B) BrdU陽性細胞率を示した。

* $P < 0.05$, § $P < 0.001$

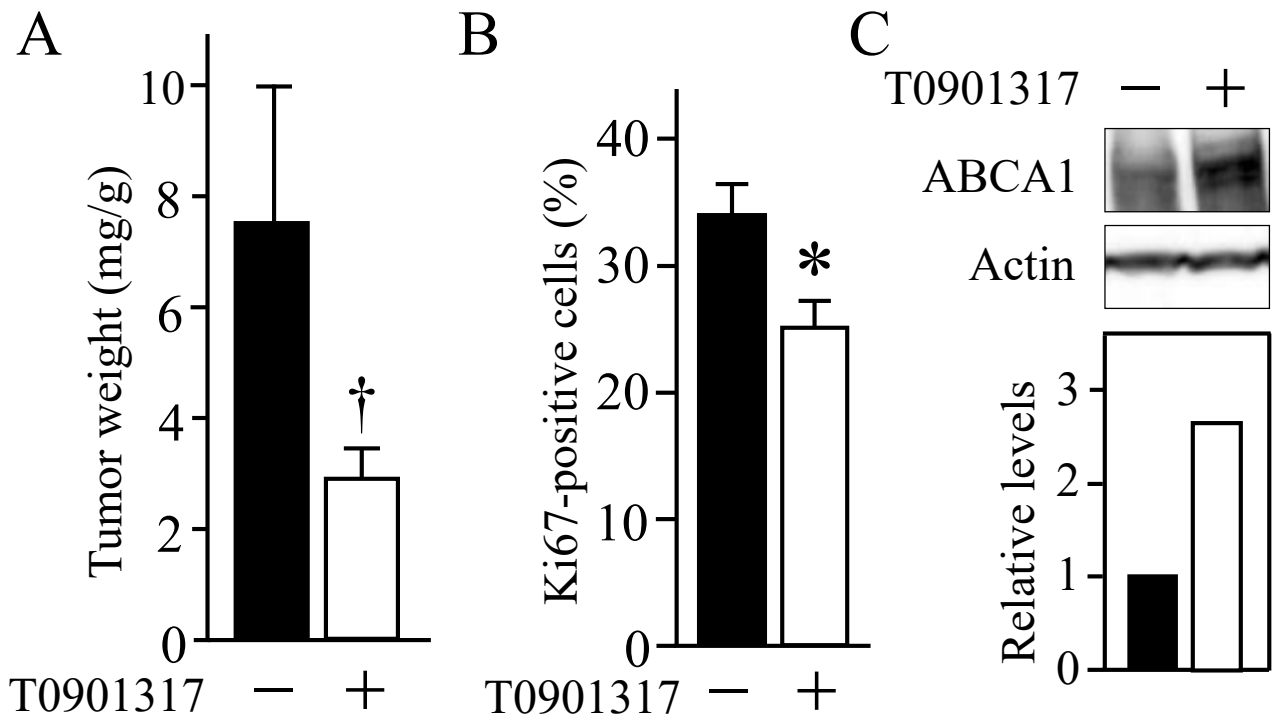


図8. ヒト口腔扁平上皮癌細胞移植マウスにおけるT0901317の抗腫瘍効果。
 オスSCIDマウスの胸部もしくは背部皮下にヒト口腔扁平上皮癌細胞株SASを
 1×10^6 個移植し、移植翌日より体重1gにつき10 μ g量のT0901317を3日に1回腹腔内
 投与し(コントロールはDMSO処置)、15日目に解剖した。
 マウスは各群7匹ずつとし、その平均値を結果とした。(A) 摘出腫瘍重量をマウス
 体重1gあたりの重量として示した。(B) 摘出腫瘍におけるKi67陽性細胞率を示し
 した。(C) 摘出腫瘍におけるABCA1発現をウエスタンブロット法で検討した。
 ABCA1の発現はActinの発現レベルで補正し、DMSO群の発現を1として表示した。
 * $P < 0.05$, † $P < 0.01$

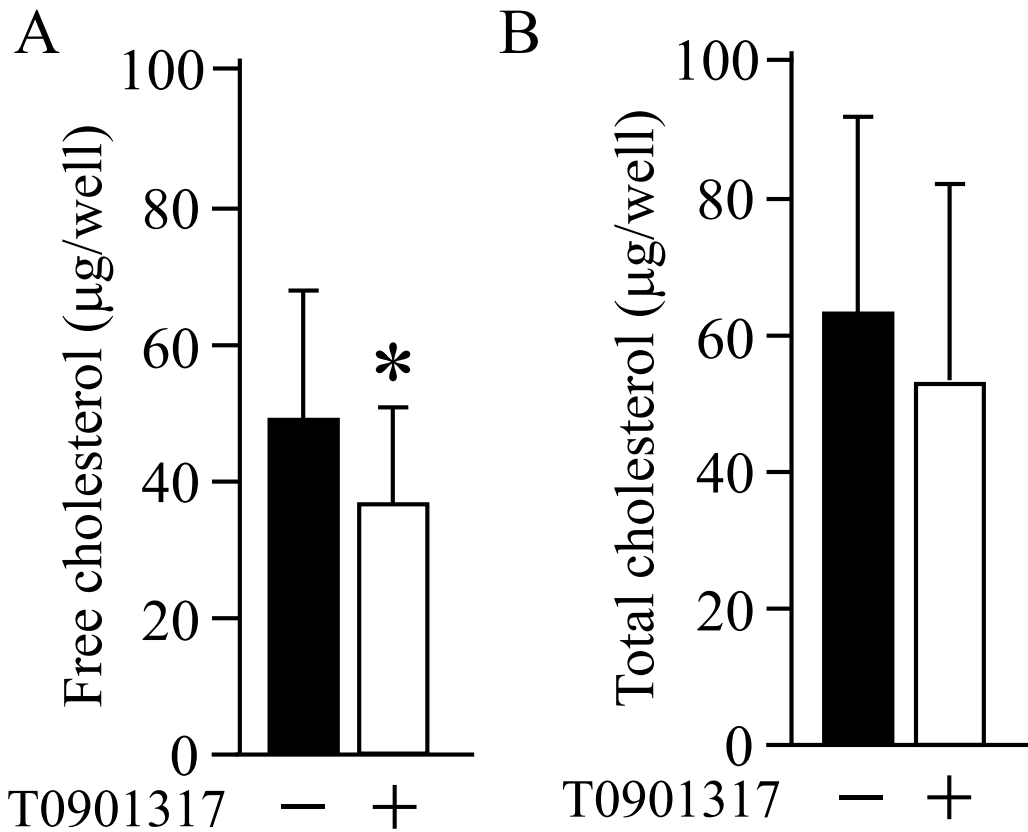


図9. ヒト口腔扁平上皮癌細胞移植マウスにおけるT0901317の抗腫瘍効果。
 図8と同様の方法でマウスを処置し、摘出腫瘍10 mgあたりのコレステロール量を測定した。(A)は遊離コレステロール量、(B)は総コレステロール量を示した。
 * $P < 0.05$

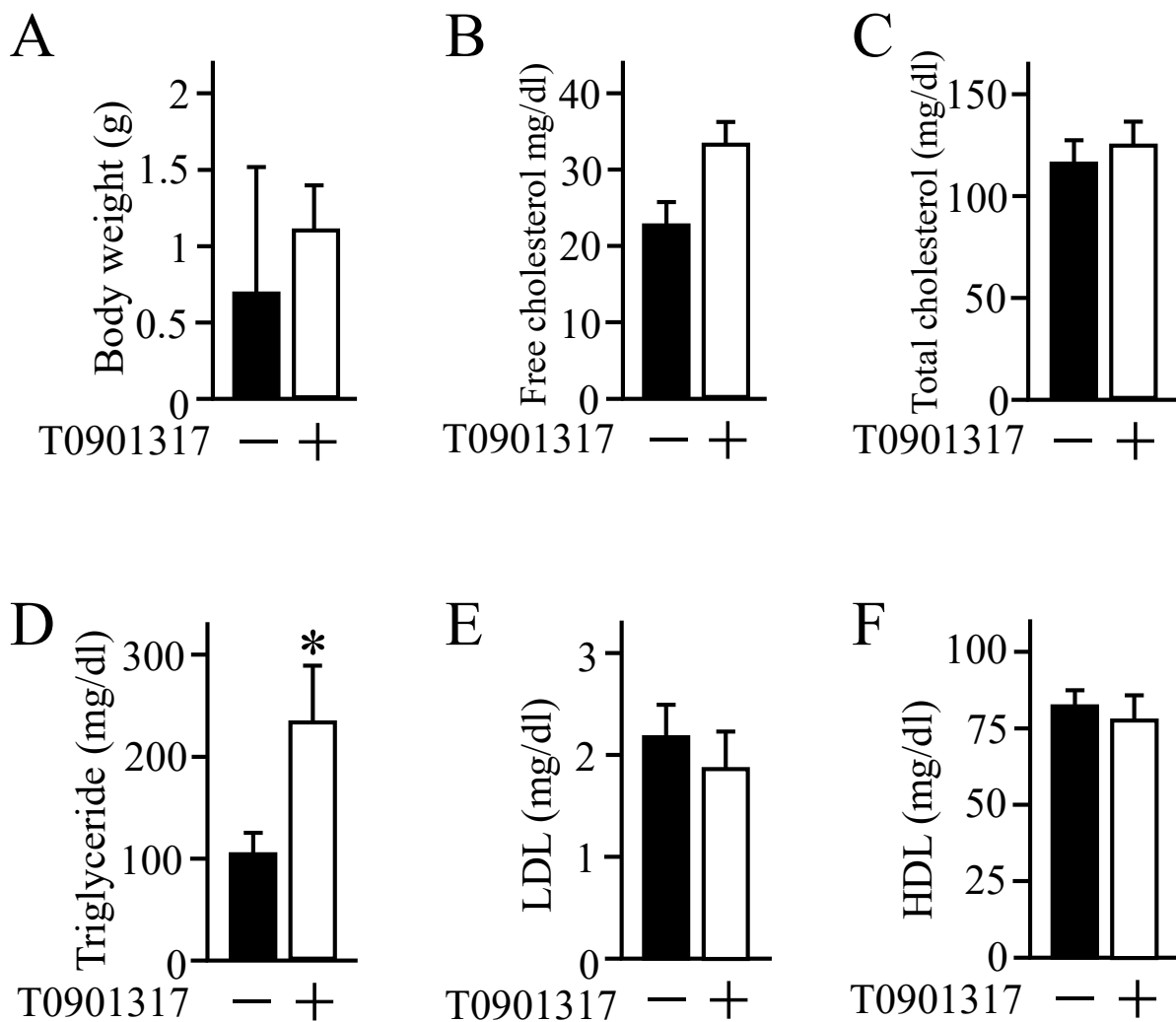


図10. ヒト口腔扁平上皮癌細胞移植マウスにおけるT0901317の抗腫瘍効果。
 図8,9と同様の方法でマウスを処置し、マウスの体重と血中の各項目を測定した。
 (A)は初回投与時から解剖時までの体重の増加値を、(B)は遊離コレステロール、
 (C)は総コレステロール、(D)はトリグリセリド、(E)はLDL、(F)はHDLの測定値を
 示した。* $P < 0.05$