

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04904

研究課題名(和文) がん幹細胞のレドックス制御に基づいた放射線増感治療法の創成

研究課題名(英文) Radiosensitization based on intracellular redox control in cancer stem cells

研究代表者

近藤 隆 (Kondo, Takashi)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・名誉教授

研究者番号：40143937

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：シスチン輸送体の阻害剤であるスルファサラジン(SSZ)は、がん幹細胞内のGSH濃度を下げ、抗癌剤や放射線治療が効きやすくなると期待される。そこで、本研究では、放射線誘発アポトーシスに与えるSSZの影響について検討した。実験にはヒト白血病細胞Molt-4をモデル細胞に用いた。アポトーシスおよび関連指標を調べた。SSZ併用群ではX線照射群に比べて、アポトーシスが増強された。また、幹細胞の基礎的特性を調べるためヒト羊膜由来の不死化した間葉系細胞および上皮性細胞について、X線照射および過酸化水素に対する感受性の違いとその分子機構についても検討したところ、後者での酸化ストレス抵抗性が判明した。

研究成果の概要(英文)：Sulfasalazine (SSZ) is an inhibitor of the cystine-glutamate antiporter known to reduce intracellular glutathione level and increase cellular oxidative stress, giving its anti-tumor potential. SSZ enhanced radiation-induced apoptosis in Molt-4 cells via the involvement of both intrinsic and extrinsic apoptotic pathways. In addition, to understand characteristics of stem cells, the immortalized human amniotic mesenchymal cells (iHAMs) and immortalized human amniotic epithelial cells (iHAEs) were utilized. To reveal response of these cells against X-rays and hydrogen peroxide, intracellular reactive oxygen species (ROS), cell viability, and apoptosis were examined. Intracellular ROS level significantly increased in iHAMs after treatment, consequently cell viability also significantly decreased in iHAMs, but not in iHAEs. Radiation-induced apoptosis was also higher in iHAMs. Furthermore, proteins related to oxidative stress were also determined and detailed mechanism was discussed.

研究分野：放射線基礎医学

キーワード：スルファサラジン 幹細胞 放射線

### 1. 研究開始当初の背景

癌治療における放射線治療重要性が増しているが、克服すべき問題点の一つに、癌幹細胞による放射線治療抵抗性がある。これは、CD44 を介した酸化ストレス回避機構、即ちシスチン取り込みによるグルタチオン量上昇による抗酸化能の亢進によることが報告されている。また、最近の臨床報告として、高圧酸素療法や過酸化水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)を用いた増感法の有用性が示され、がん細胞の活性酸素制御が放射線治療に貢献することが明らかになってきた。

申請者らは、放射線や温熱による、特にアポトーシスの増強について研究し、細胞内酸化ストレスの亢進と放射線・温熱細胞死の増強の関係について報告してきた(1-3)。これらの成果を基盤として、レドックス (Reduction (還元) と Oxidation (酸化) を合体させた化学用語で、酸化・還元反応の均衡を意味する) 制御が放射線による癌細胞死とりわけ、癌幹細胞死に関係すると考え、本研究を行った。

### 2. 研究の目的

癌幹細胞のレドックス制御に基づいた放射線増感治療法の創成を目的とする。そのため、人工的に癌幹細胞を作製し、これに有効なレドックス修飾薬剤の探索と開発を行い、治療効果の増強法の確立を目指すことにした。候補薬剤としてシスチン輸送体の阻害剤であるスルファサラジン (SSZ) およびこれを構成している薬剤 5-アミノサリチル酸 (5-ASA) およびスルファピリジンとした。

最近、再生医療法の細胞供給源として、分娩後に廃棄される羊膜が新たな細胞源として着目されている。羊膜は、胚盤葉上層由来の羊膜上皮細胞、および胚外中胚葉の間葉系細胞から構成されており、両方に多能性幹細胞が含まれている。本学の再生医学講座では、不死化した両細胞を樹立したので、これらの酸化ストレス応答を調べることで、幹細胞の特性を明らかにしようとした。

### 3. 研究の方法

細胞死についてはアポトーシスの機構解明のため、実験にはヒト白血病細胞 Molt-4 を用いた。アポトーシス指標として、細胞膜表面上へのフォスファチジルセリンの発現 DNA 断片化、形態変化、関連タンパク質の発現等を検討した。CCK8 を用いて全細胞死、各種蛍光試薬を用いて細胞内活性酸素種 (ROS) 生成についても調べた。また、関連するタンパク質についても調べた。

幹細胞研究のためには羊膜由来の不死化した間葉系細胞と羊膜上皮細胞を用いて、さらに対照としてヒト皮膚繊維芽細胞を使用した。

### 4. 研究成果

人工的に癌幹細胞の作製を試みたが、樹立

することが困難であり、SSZ の効果の検証を第一に実施した。また、放射線による ROS の効果を比較するため、水溶液中では極めて大量の ROS を生成する大気圧プラズマについても検討した。SSZ 併用群は X 線照射あるいは He プラズマ処理群に比べて、用いたアポトーシス関係の指標では同様の増強効果を示した(図 1)。但し、CCK8 を用いた測定では増強の程度は低く、また、X 線照射および He プラズマ処理群での比較で、特に Fas の関与は前者で認められたが、後者ではなく、作用機序の違いが判明した。

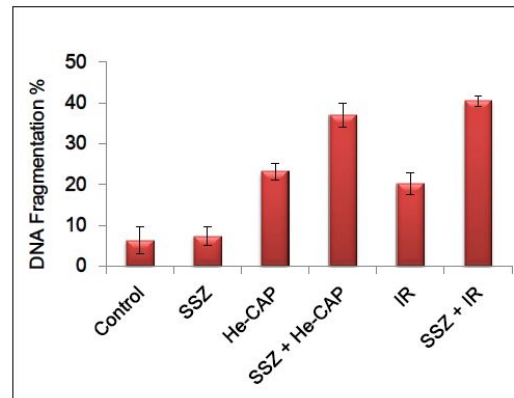


図 1 スルファサラジン (SSZ) によるアポトーシス増強効果。

SSZ の濃度は 0.25 mM, He-CAP (大気圧プラズマ) 1 分間および放射線 2 Gy 照射後、6 時間後に DNA 断片化を指標にアポトーシスを測定した。

構成薬剤である 5-ASA およびスルファピリジンについて調べたところ、前者では X 線照射あるいは He プラズマ処理で相対的な増強が認められたが、後者では有意な増強効果はなかった。これより、相乗効果は SSZ によるシスチン輸送体の阻害効果により、5-ASA による増強効果はキノン骨格による細胞内 ROS 産生によるものと思われる。

次に癌幹細胞の特性を探るために、多分化能を有するヒト羊膜細胞由来の上皮系細胞に注目して、放射線および酸化ストレスの代表である過酸化水素処理に関する細胞応答について調べた。酸化ストレスは癌やアルツハイマー病、糖尿病などのさまざまな変性疾患において、重要な役割を担っていることが明らかになっている。酸化ストレスの主な原因物質の ROS は、主にミトコンドリアで生成され、細胞に取り込まれる酸素の多くはシトクロム C で消費され H<sub>2</sub>O になるが、その過程で ROS も同時に放出される。一方、細胞はこれらの ROS に対抗する抗酸化系を有している。ヒト羊膜細胞は受精後 8 日目に胚盤葉上層が二分して形成され、外胚葉由来の上皮細胞と中胚葉由来の間葉系細胞からなる。そのため幹細胞の特性を調べる材料としても優れている。これらの細胞の抗酸化特性についての詳細な報告はなく、酸化ストレスに

対する応答および分子機構を調べることは幹細胞の特長を知る一助となる。

本研究では酸化ストレスとして、X線および過酸化水素を用いた。細胞内ROS水準は間葉系細胞でX線(10 Gy)および過酸化水素(0.05 mM)処理後に有意に増加した。Viabilityは間葉系細胞とヒト皮膚繊維芽細胞で有意に低下したが羊膜上皮細胞ではなかった。Annin V-FITC およびPI染色で調べた放射線誘発アポトーシスは羊膜上皮細胞に比べて間葉系細胞で有意に高かった。間葉系細胞の特徴はcaspase-3, Nrf2 (nuclear factor erythroid 2 related factor 2), およびTrxR-1 (thioredoxin reductase -1)の高い発現と放射線によるcaspase-8 およびBaxの上向き調節であり、Bcl-XL, HO-1, Nrf2, およびTrxR-1の下向き調節である。これに対して羊膜上皮細胞の特徴は極めて高いSOD2の発現とHO-1発現、加えて放射線によるHO-1発現の上向き調節である。放射線によるBaxの発現上昇は弱かった。羊膜上皮細胞はSOD2の高度な発現とHO-1放射線によるHO-1発現により、ROSに対して相対的に高い抵抗性を示すのに対して、間葉系細胞はcaspase-3の発現、Baxの上向き調節、Nrf2, およびTrxR-1の下向き調節等により、感受性を示すことが明らかとなった。これらにより、羊膜由来の間葉系および上皮系細胞のROS応答が特徴づけられ、上皮由来である癌幹細胞の性質の一端が明らかとなった。

## 引用文献

Kondo T: Chapter 1. The mechanism of radiation induced cell death and its application for cancer therapy. In "Cellular Response to Physical Stress and Therapeutic Applications" edited by Shimizu T and Kondo T, p. 1-14, Nova Science Publishers, Inc, New York, 2013.

Ahmed K, Tabuchi Y, Kondo T: Hyperthermia: an effective strategy to induce apoptosis in cancer cells. A review. *Apoptosis* 20, 1411-1419, 2015.  
Rehman MU, Jawaid P, Zhao QL, Li P, Narita K, Kato T, Shimizu T, Kondo T: Low dose spiruchostatin-B, a potent histone deacetylase inhibitor enhances radiation-induced apoptosis in human lymphoma U937 cells via modulation of redox signaling *Free Radic Res* 24: 1-15, 2016.

## 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 20件)

Moniruzzaman R, Rehman MU, Zhao QL, Jawaid P, Takeda K, Ishikawa K, Hori M, Tomihara K, Noguchi K, Kondo T, Noguchi M: Cold atmospheric helium plasma causes synergistic enhancement in cell death with hyperthermia and an additive enhancement with radiation. *Sci Rep* 7(1): 11659, 2017.

DOI: 10.1038/s41598-017-11877-8.

Mitsuhashi Y, Furusawa Y, Aradate T, Zhao QL, Moniruzzaman R, Kanamori M, Noguchi K, Kondo T: 3-O-trans-p-coumaroyl-alphitolic acid, a triterpenoid from *Zizyphus jujuba*, leads to apoptotic cell death in human leukemia cells through reactive oxygen species production and activation of the unfolded protein response. *PLoS One* 12(8):e0183712, 2017.

DOI: 10.1371/journal.pone.0183712.

Furusawa Y, Yamanouchi Y, Iizumi T, Zhao QL, Mitsuhashi Y, Morita A, Enomoto A, Tabuchi Y, Kondo T: Checkpoint kinase 2 is dispensable for regulation of the p53 response but is required for G<sub>2</sub>/M arrest and cell survival in cells with p53 defects under heat stress. *Apoptosis* 22: 1225-1234, 2017.

DOI: 10.1007/s10495-017-1402-2.

Yunoki T, Tabuchi Y, Kondo T, Ishii Y, Hayashi A: Overexpression of the anti-apoptotic protein BAG3 in human choroidal melanoma. A case report. *Oncol Lett* 13(6): 4169-4172, 2017

DOI: 10.3892/ol.2017.5958.

Li P, Zhao QL, Jawaid P, Rehman MU, Ahmed K, Sakurai H, Kondo T: Enhancement of hyperthermia-induced apoptosis by 5Z-7-oxozeaenol, a TAK1 inhibitor, in Molt-4 cells. *Int J Hyperthermia* 22:1-11, 2017.

DOI: 10.1080/02656736.2017.1278629

Yoshihisa Y, Rehman MU, Kondo T, Shimizu T: Role of macrophage migration inhibitory factor in heat-induced apoptosis in keratinocytes. *FASAB J* 30: 3870-3877, 2016.

DOI:10.1096/fj.201600408RR

Li P, Zhao QL, Jawaid P, Rehman MU, Sakurai H, Kondo T: Enhancement of hyperthermia-induced apoptosis by 5Z-7-oxozeaenol, a TAK1 inhibitor, in A549 cells. *Cell Stress Chaperon* 21:873-881, 2016.

DOI: 10.1007/s12192-016-0712-6.

Jawaid P, Rehman MU, Zhao QL, Takeda K, Ishikawa K, Hori M, Shimizu T, Kondo T: Helium based cold atmospheric plasma-induced reactive oxygen species-mediated apoptotic pathway attenuated by platinum nanoparticles. *J. Cell Mol Med* 20(9):1737-1748, 2016.

DOI: 10.1111/jcmm.12880.

Furusawa Y, Zhao QL, Hattori Y, Tabuchi Y, Iwasaki T, Nomura T, Kondo T: Comprehensive and computational analysis of genes in human umbilical vein endothelial cells responsive to X-irradiation. *Genomics Data* 8: 126-130, 2016.

DOI: 10.1016/j.gdata.2016.05.007

Yunoki T, Tabuchi Y, Hayashi A, Kondo T: Gene network analysis of genes involved in enhancement of hyperthermia sensitivity by knockdown of BAG3 in human oral squamous cell carcinoma cells. *Int J Mol Med* 38: 236-242, 2016.

DOI: 10.3892/ijmm.2016.2621

Andocs G, Rehman MU, Zhao QL, Tabuchi Y, Kanamori M, Kondo T: Comparison of biological effects of modulated electro-hyperthermia and conventional heat treatment in human lymphoma U937 cells. *Cell Death and Discovery* 2: 16039, 2016.

DOI: 10.1038/cddiscovery.2016.39

Rehman MU, Jawaid P, Zhao QL, Li P, Narita K, Kato T, Shimizu T, Kondo T: Low dose spiruchostatin-B, a potent histone deacetylase inhibitor enhances radiation-induced apoptosis in human lymphoma U937 cells via modulation of redox signaling. *Free Radic Res* 24: 1-15, 2016.

DOI: 10.3109/10715762.2015.1115029

Tabuchi Y, Uchiyama H, Zhao QL, Yunoki T, Andocs G, Nojima N, Takeda K, Ishikawa K, Hori M, Kondo T: The effects of nitrogen on apoptosis and changes in gene expression in human lymphoma U937 cells exposed to argon-cold atmospheric pressure plasma. In *J Mol Med* 37:1706-1714, 2016.

DOI: 10.3892/ijmm.2016.2574

Rehman MU, Jawaid P, Uchiyama H, Kondo T: Comparison of free radicals formation induced by cold atmospheric plasma, ultrasound, and ionizing radiation. *Arch Biochem Biophys* 605: 19-25, 2016.

DOI: 10.1016/j.abb.2016.04.005.

Doi N, Cui ZG, Morii A, Watanabe A, Kanayama S, Yoneda Y, Kondo T, Ogawa R: The acquired radioresistance in HeLa cells under conditions mimicking hypoxia was attenuated by decreased expression of HIF subunit genes induced by RNA interference. *Exptl Cell Res* 333: 249-260, 2015.

DOI: 10.1016/j.yexcr.2015.03.009

Uchiyama H, Zhao QL, Hassan M.A., Andocs G, Nojima N, Takeda K, Ishikawa K, Hori M, Kondo T: EPR-spin trapping and flow cytometric studies of free radicals generated using cold atmospheric argon plasma and X-ray irradiation in aqueous solutions and intracellular milieu. *PLoS One* 10 (8): e0136956, 2015.

DOI: 10.1371/journal.pone.0136956

Yunoki T, Tabuchi Y, Hayashi A, and Kondo T: BAG3 protects against hyperthermic stress by

modulating NF- $\kappa$ B and ERK activities in human retinoblastoma cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 253: 399-407, 2015.

DOI: 10.1007/s00417-014-2874-1

Nagane M, Yasui H, Sakai Y, Yamamori T, Niwa K, Hattori Y, Kondo T, Inanami O: Activation of eNOS in endothelial cells exposed to ionizing radiation involves components of the DNA damage response pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 456: 541-546, 2015.

DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.12.002

Sakata K, Kondo T, Mizuno N, Shoji M, Yasui H, Yamamori T, Inanami O, Yokoo H, Yoshimura N, Hattori Y: Roles of ROS and PKC- $\beta$ II in ionizing radiation-induced eNOS activation in human vascular endothelial cells. *Vascular Pharmacol* 70: 55-65, 2015.

DOI: 10.1016/j.vph.2015.03.016

Ahmed K, Tabuchi Y, Kondo T: Hyperthermia: an effective strategy to induce apoptosis in cancer cells. *Apoptosis* 20: 1411-1419, 2015.

DOI: 10.1007/s10495-015-1168-3

#### [学会発表](計4件)

Rehman MU, Moniruzzaman R, Zhao QL, Jawaid P, Kondo T: Combination of cold atmospheric helium plasma and mild hyperthermia causes a synergistic enhancement in cell death mainly via up-regulation of intracellular reactive oxygen species. 23<sup>rd</sup> annual meeting of the society of redox biology and medicine, a joint meeting with society for free radical research international (SFRBM/SFRRRI 2016), 2016. 11.16-19, San Francisco.

Jawaid P, Rehman MU, Zhao QL, Kondo T: Differential role of small sized gold nano-particles on X-irradiation and ultrasound induced cell death. 23<sup>rd</sup> annual meeting of the society of redox biology and medicine, a joint meeting with society for free radical research international (SFRBM/SFRRRI 2016), 2016. 11.16-19, San Francisco.

Rehman MU, Jawaid P, Zhao QL, Narita K, Katoh T, Shimizu T, Kondo T: Spiruchostatin-B, potent histone deacetylase inhibitor enhances radio-sensitivity in human leukemia cells by Fas-mitochondria pathway. The 15<sup>th</sup> International Congress of Radiation Research; 2015 May 25-29; Kyoto.

Zhao QL, Rehman MU, Igarashi Y, Kondo T: The lysolipin I enhances radiation-induced apoptosis. The 15<sup>th</sup> International Congress of Radiation Research; 2015 May 25-29; Kyoto.

〔図書〕(計3件)

Tabuchi Y, Ahmed K, Kondo T: Chapter 2. Induction of oxidative stress by hyperthermia and enhancement of hyperthermia-induced apoptosis by oxidative stress modification. In “Hyperthermic Oncology from Bench to Bedside”, edited by Kokura S, Yoshikawa T, and Ohnishi T., Springer, Singapore. pp. 7-18. 2016.

Kondo T: Chapter 9. Application of Ultrasound in Medicine and Biotechnology” In “Sonochemistry and the Acoustic Bubble”. edited by Grieser F, Choi PK, Enomoto N, Harada H, Okitsu K, and Yasui K, p. 207-230, Elsevier Inc, New York, 2015 .

近藤 隆：第3章 2放射線による細胞死と細胞の修復。放射線生物学、第1版。監修編集 稲波 修、浅沼武敏、久保喜平、中山智宏、林 正信、藤田道郎、宮原和郎、p.47-55、近代出版、東京、2015。

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.u-toyama.ac.jp/radsci/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

近藤 隆 (KONDO, Takashi)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・  
名誉教授

研究者番号：40143937

(2)研究分担者

田淵 圭章 (TABUCHI, Yoshiaki)

富山大学・研究推進機構・研究推進総合支援センター・教授

研究者番号：20322109

松谷 祐二 (MATSUYA, Yuji)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・  
教授

研究者番号：50255858

小川 良平 (OGAWA, Rhohei)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・  
准教授

研究者番号：60334736

趙 慶利 (ZHAO, Qing-Li)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・  
助教

研究者番号：90313593