

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11243

研究課題名(和文)カスパーゼ非依存的アポトーシス経路の分子標的治療への応用

研究課題名(英文)Application of caspase-independent apoptosis to molecular target therapy

研究代表者

濱田 正和 (Hamada, Masakazu)

大阪大学・歯学研究科・助教

研究者番号：80506361

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：生体における細胞死には、ネクローシス、アポトーシスに加えオートファジーを介した細胞死が存在する。safingolはcaspase非依存的にアポトーシスを誘導するが、オートファジーに関しては十分に研究されていない。ヒト口腔扁平上皮癌細胞をsafingolで処理すると、アポトーシスならびにオートファジーが誘導された。safingolとオートファジー阻害剤の併用にて、safingol単剤よりもアポトーシスは増強されたことから、オートファジーは細胞生存に働いている可能性が示唆された。口腔癌の治療において、safingolと併用する薬剤として、オートファジー阻害作用を有する薬剤が有用と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Cell death includes not only necrosis and apoptosis, but also autophagic cell death. Safingol induces apoptosis in a caspase-independent manner. However, the role of autophagy in endoG-mediated apoptosis in oral squamous cell carcinoma (SCC) cells has not yet been investigated. Safingol induced apoptosis and autophagy in human oral SCC cells. The suppression of autophagy by autophagy inhibitors, such as 3-MA or bafilomycin A1 significantly augmented cell death caused by safingol. Autophagy played a protective role in endoG-mediated apoptosis, but did not induce autophagic cell death. The inhibitory effects of other anticancer agents on autophagy must be considered when they are used in combination with safingol in clinical trials.

研究分野：口腔癌

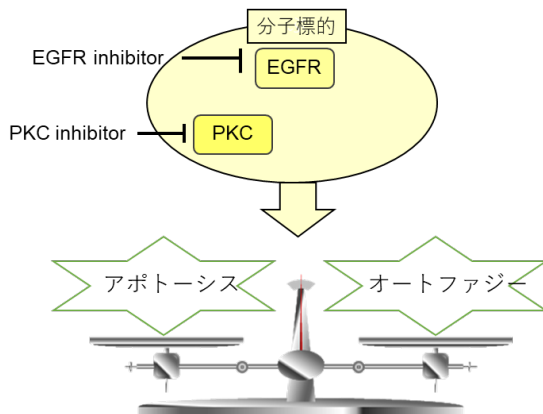
キーワード：細胞死 分子標的治療

1. 研究開始当初の背景

新規の分子標的薬の開発は目覚ましく、わが国においても 2012 年から口腔癌に対する epidermal growth factor receptor (EGFR) を標的とした抗体が承認されると、短期間で広く普及するようになってきている。これまでの使用で分かったことは、EGFR 抗体単剤での効果は限定的であり、放射線、他の抗癌剤との併用が必要なことである。今後の分子標的薬では、他薬剤との併用を念頭においた研究が求められる。シスプラチンや 5FU といった従来の抗癌剤は caspase 経路が活性化する caspase 依存的アポトーシスを誘導することが知られている。生体における細胞死の中には、ネクローシス、アポトーシスに加えてオートファジーを介した細胞死が存在する。栄養飢餓状態の間は、オートファジーは生存促進機構として働くが、行き過ぎたオートファジーは細胞死を誘導する。この細胞死の過程はアポトーシスとは形態的に異なる。近年 safinol による乳癌細胞、大腸癌細胞におけるオートファジーの誘導が報告されており (Ling LU, et al Cell Death Dis. 2011; e129) オートファジーにおける活性酸素種の関与も示唆されている。

2. 研究の目的

研究代表者は、発癌プロモーターの細胞内受容体であるプロテインキナーゼ C(PKC)に着目し、その活性を阻害する safinol を分子標的薬の候補として研究を進め、safingol による口腔癌細胞の caspase 非依存的アポトーシスを明らかにした (Hamada M, et al Apoptosis 2006;11:47)。このアポトーシスにおける活性酸素の関与を解明した (Hamada M, et al Int J Mol Sci. 2014; 15: 2660)。本研究では、safingol によるアポトーシスシグナルのさらなる解明とオートファジーの誘導に着目し、新しい分子標的治療の開発を目指す。



3. 研究の方法

ヒト口腔 SCC 細胞である SAS, Ca9-22, HSC-3 細胞を用いた。試薬は PKC 阻害剤 safinol、オートファジー阻害剤として 3-methyladenine (3-MA)、bafilomycin A1 を用いた。パンカスペーゼ阻害剤として

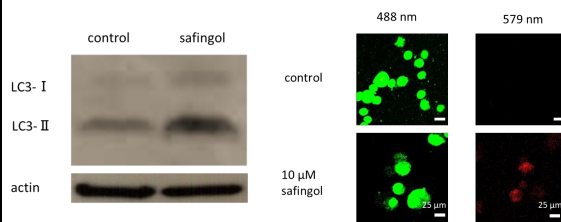
z-VAD-fmk を用いた。Reactive oxygen species (ROS) の抗酸化物質として N-acetyl-L-cysteine (NAC)を用いた。細胞生存率は MTT assay にて測定し、アポトーシス細胞は annexin V - fluorescein isothiocyanate と propidium iodide (PI)を用いて染色を行い、フローサイトメリーにより検出した。Acidic vesicular organelles (AVOs)はアクリジンオレンジ染色により検出した。イムノプロット法および免疫蛍光染色には抗 microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3)抗体、抗 endoG 抗体を用いた。ミトコンドリアの分離には Mitochondria/Cytosol Fractionation Kit を用い、細胞質の分離には NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents を用いた。endoG siRNA は標的配列を 5' -CTGGAACAACCTGGAGAAATA-3' とし、Lipofectamine 2000 を用いてリポフェクション法にてトランスフェクションを行った。

4. 研究成果

1. SAS, Ca9-22, HSC-3 細胞を各濃度の safinol 処理したところ、濃度依存的に細胞生存率は減少した。10 μM の濃度で処理すると生細胞は 48 時間で顕著に減少した。

2. Safingol 処理細胞をフローサイトメリーで解析すると、annexin V 染色 (+)で PI 染色 (-)の早期アポトーシス細胞、annexin V 染色 (+)で PI 染色 (+)の後期アポトーシス細胞が増加した。annexin V 染色 (-)で PI 染色 (+)のネクローシス細胞は増加しなかった。

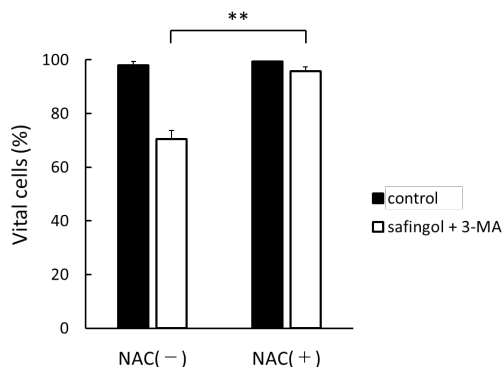
3. Safingol で処理した細胞では、オートファジーに特異的な LC3- が検出された。LC3 は免疫蛍光染色で処理細胞の細胞質に発現していた。オートファゴゾームの形成を示すアクリジンオレンジ染色陽性の AVOs も細胞質で検出された。



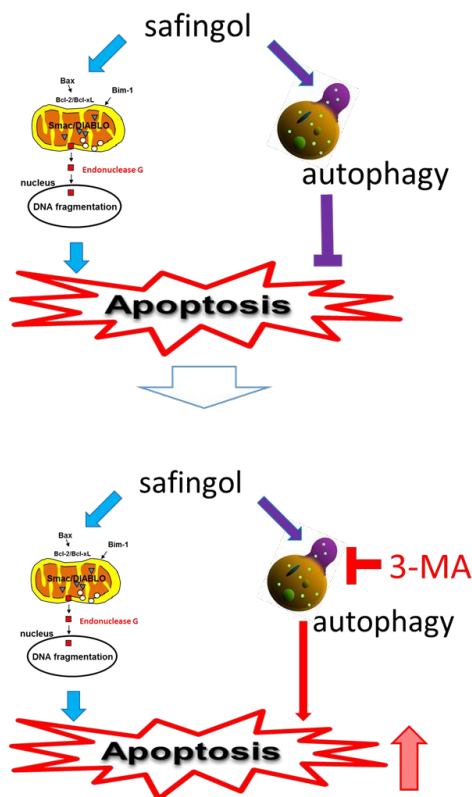
4. Safingol とオートファジー阻害剤である 3-MA あるいは bafilomycin A1 を併用すると safinol 単独と比較して細胞生存率がさらに低下し、アポトーシス細胞が増加した。

5. Safingol と 3-MA で処理すると endoG のミトコンドリアから核への移行がみられた。siRNA で endoG をノックダウンさせた細胞では、safingol あるいは safinol と 3-MA 併用による細胞生存率の減少がみられなくなった。

6. カスパーゼ阻害剤では safinol と 3-MA による細胞生存率減少に対する明らかな影響はみられなかったが、抗酸化剤 NAC は safinol と 3-MA 併用による細胞傷害性を強く阻害した。



【結論】ヒト口腔扁平上皮癌細胞由来の SAS、Ca9-22、HSC-3細胞を safinol で処理すると、アポトーシスならびにオートファジーが誘導された。SAS細胞を safinol とオートファジー阻害剤を併用して処理すると、saфинol 単剤よりもアポトーシスは増強されたことから、オートファジーは細胞の生存に働いていることが示唆された。その細胞死は endoG を介するアポトーシスであった。口腔癌の治療において、saфинol と併用する薬剤として、オートファジー阻害作用を有する薬剤が有用と考えられた。



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 9 件)
原著

Okunaga S, Takasu A, Meshii N, Imai T, Hamada M, Iwai S, Yura Y. (2015): Entry of Oncolytic Herpes Simplex Virus into Human Squamous Cell Carcinoma Cells by Ultrasound. *Viruses* (査読有) 7: 5610-5618.

Okunaga S, Takasu A, Meshii N, Imai T, Hamada M, Iwai S, Yura Y. (2015): Ultrasound as a method to enhance antitumor ability of oncolytic herpes simplex virus for head and neck cancer. *Cancer Gene Ther* (査読有) 22: 163-168.

榊井敦史、濱田正和、高須彩子、若林健、岩井聡一、由良義明(2015) : PKC 阻害剤 safinol によるオートファジーの誘導に関する検討. *口腔組織培養学会誌* (査読無) 24: 9-10.

Takasu A, Masui A, Hamada M, Imai T, Iwai S, Yura Y. (2016): Immunogenic cell death by oncolytic herpes simplex virus type 1 in squamous cell carcinoma cells. *Cancer Gene Ther.* (査読有) 23:107-113.

Masui A, Hamada M, Kameyama H, Wakabayashi K, Takasu A, Imai T, Iwai S, Yura Y. (2016): Autophagy as a Survival Mechanism for Squamous Cell Carcinoma Cells in Endonuclease G-Mediated Apoptosis. *PLoS One.* (査読有) 11: e0162786.

Hamada M, Kameyama H, Iwai S, Yura Y. (2017): Induction of autophagy by sphingosine kinase 1 inhibitor PF-543 in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Cell Death Discovery* (査読有) 3, 17047 doi:10.1038/cddiscovery.2017.47

Tada S, Hamada M, Yura Y. (2018): Proteomic analysis of secretomes of oncolytic herpes simplex virus-infected squamous cell carcinoma cells. *Cancers.* (査読有) 23;10(2).pii:E28.doi:10.3390/cancers10020028.

2 次出版

竹下彰範、岩井聡一、森田祥弘、仁木敦子、濱田正和、由良義明. (2018): Wnt5b は活性型 Cdc42 および RhoA を介して口腔扁平上皮癌の転移に重要な細胞運動能を亢進する *日本口腔外科学会雑誌* (査読)

有) 64: 98-109.

総説

Yura Y, Hamada M. (2017): Development of oncolytic virotherapy for the treatment of oral cancer - At the waiting stage for clinical use. Oral Science International (査読有) 14. 1-12.

[学会発表](計 14件)

榊井敦史、濱田正和、若林 健、高須彩子、多田晋也、岩井聡一、由良義明：口腔扁平上皮癌細胞に対する PKC 阻害剤によるアポトーシスとオートファジーの誘導に関する検討 第 39 回日本頭頸部癌学会・第 4 回アジア頭頸部癌学会合同大会 2015.6.3-6. 神戸

Hamada M, Masui A, Iwai S, Yura Y. Involvement of hydrogen peroxide in safinol-induced endonuclease G-mediated apoptosis of squamous cell carcinoma cells. 日本癌学会 2015.10.8-10. 名古屋

多田晋也、高須彩子、岸本聡子、古川禎伸、濱田正和、岩井聡一、由良義明：腫瘍融解性ウイルス感染で放出される腫瘍免疫増強因子による免疫細胞の活性化 口腔組織培養学会 2015.11.21. 徳島

岸本聡子、岩井聡一、竹下彰範、仁木敦子、多田晋也、濱田正和、由良義明：Wnt シグナルを介する口腔扁平上皮癌細胞の上皮間葉転換ならびに癌幹細胞様形態の誘導 口腔組織培養学会 2015.11.21. 徳島

Hamada M, Masui A, Iwai S, Yura Y. Autophagy supports cell survival for squamous cell carcinoma cells in endonuclease G-mediated apoptosis. 10th Joint Conference of the American Association for Cancer Research and the Japanese Cancer Association "Breakthrough in Basic and Translational Cancer Research" 2016.2.16-20. in Hawaii

亀山裕泰、濱田正和、榊井敦史、若林健、岩井聡一、由良義明 Protein kinase C 阻害剤 safinol による口腔扁平上皮癌の細胞死における mitogen activated protein kinase の関与 口腔科学会 2016.4.16-17. 福岡

Hamada M, Iwai S, Yura Y. Inhibition of autophagy induce endonuclease G-mediated apoptosis in squamous cell

carcinoma cells. 日本癌学会 2016.10.6-8. 横浜

亀山裕泰、濱田正和、由良義明 口腔扁平上皮癌細胞における sphingosine kinase 1 阻害によるオートファジー誘導に関する検討 口腔組織培養学会 2016.11.18. 金沢

岩井聡一、岸本聡子、竹下彰範、濱田正和、西山今日子、今井智章、加藤逸郎、中澤光博 新しい 3 次元組織体による口腔扁平上皮癌の遊走能、浸潤能およびリンパ管浸潤能の解析 口腔外科学会 2016.11.25-27. 千葉

岸本聡子、森田祥弘、竹下彰範、仁木敦子、多田晋也、濱田正和、岩井聡一 Wnt5 b を介する口腔扁平上皮癌細胞の上皮間葉転換ならびに癌幹細胞様形質の誘導 口腔外科学会 2016.11.25-27. 千葉

亀山裕泰、濱田正和、岩井聡一、由良義明 Sphingosine kinase 1 阻害薬 PF-543 による口腔扁平上皮癌細胞に対する細胞死におけるオートファジーの関与 口腔科学会 2017.4.25-26. 愛媛

Hamada M, Kameyama H, Iwai S. Induction of autophagy by sphingosine kinase 1 inhibitor PF-543 in oral squamous cell carcinoma cells. 日本癌学会 2017.9.28-30. 横浜

Iwai S, Kishimoto S, Nishiyama K, Takeshita A, Hamada M, Matsusaki M, Akashi M. Analysis of cancer cell invasion using a three-dimensional cultures tissue model mimics human tissue organization. 日本癌学会 2017.9.28-30. 横浜

亀山裕泰、濱田正和、岩井聡一 SphK1 阻害薬 PF-543 による口腔扁平上皮癌細胞の細胞死におけるオートファジーの関与 口腔外科学会 2017.10.20-22. 京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱田 正和 (HAMADA MASAKAZU)
大阪大学・歯学研究科・助教
研究者番号：80506361