

令和元年6月13日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10459

研究課題名(和文) 分化誘導剤コチレニンAと癌分子標的薬による固形癌細胞の増殖抑制とその分子基盤解析

研究課題名(英文) Induction of solid tumor growth inhibition induced by a differentiation inducer cotylenin A and molecular target agents and its molecular mechanism

研究代表者

粕壁 隆 (KASUKABE, Takashi)

島根大学・学術研究院医学・看護学系・特任教授

研究者番号：50152658

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は白血病細胞の新規分化誘導剤が固形癌細胞への増殖抑制効果をも発揮する可能性があること、およびその分子基盤を明らかにし、新しい作用機序による固形癌の治療法を確立することを目的とした。この研究では、我々が新たに見出した分化誘導剤コチレニンAと植物成分由来の活性酸素誘導剤を併用すると相乗的に固形癌細胞の増殖を阻害出来ることを見出した。これら併用効果の分子機構には代表的な細胞死機構であるアポトーシスとはことなるフェロトーシス誘導が関与していることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではコチレニンAとある種の活性酸素誘導剤で難治性の膵癌細胞に対してフェロトーシスを介した細胞死を誘導できることを見出した。フェロトーシスはアポトーシスやネクロトーシスとは異なる機序で誘導される新規の細胞死であり、これまでの抗癌剤に耐性となった癌細胞に対してもフェロトーシスを介した細胞死を誘導できる可能性が示唆されている。現時点では、フェロトーシス誘導剤の報告は少なく、フェロトーシス誘導による新たな膵癌治療法を確立するためにも、膵癌細胞のフェロトーシス誘導剤を見出すことは意味があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We have examined whether a new differentiation inducer of leukemia cells can suppress the proliferation of solid tumor cells. In this study we found that cotylenin A plus phenethyl isothiocyanate (PEITC), an inducer of reactive oxygen species(ROS) and a dietary anticarcinogenic compound, or piperlongumine (PL), a natural product with cytotoxic properties restricted to cancer cells, synergistically inhibited the proliferation of human pancreatic cancer cells. The combined treatment with CN-A plus PEITC or PL synergistically induced the generation of ROS. Antioxidants, ferroptosis inhibitors and iron chelators canceled the synergistic cell death. These results show that synergistic cell death induced by the combined treatment with CN-A plus PEITC or PL is mainly due to the induction of ferroptosis. These results suggest that the combination of CN-A plus PEITC or PL has potential as a novel therapeutic strategy against pancreatic cancer.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：コチレニンA 分化誘導剤 活性酸素誘導剤 膵癌細胞 併用効果 フェロトーシス アポトーシス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 現在、広く使用されている抗癌剤の多くは癌細胞を殺すことにより、その治療効果を発揮する。しかし、膵臓癌などの固形癌に対しては未だ不十分である。そこで、今までとは異なる作用機構に基づいた治療法の開発が望まれている。我々は、白血病が分化調節機構の破綻に深く関わっていることに注目し、がん細胞の分化異常を克服する分化誘導剤の開発を進めてきた。このような分化誘導剤は、多数の遺伝子の発現を修飾しており、遺伝子発現修飾物質とも考えられ、固形癌細胞の細胞生物学的性質をも変化させる可能性がある。そこで、これまでに白血病細胞で有効と見出してきた分化誘導剤が固形癌細胞の増殖制御にも応用できるか否かを検討することは、今までとは異なる作用機構に基づいた癌治療法の開発につながる可能性がある。

(2) 我々が新たに見出した分化誘導剤コチレニン A は、現在白血病の分化誘導剤として臨床的に用いられているレチノイン酸と同様に強い分化誘導活性を示した。そこで、我々はこの新規で強力な分化誘導剤コチレニン A が単独または癌分子標的薬剤との併用で固形癌細胞の増殖を抑制できるか検討した。最近、低濃度の三酸化ヒ素(arsenic trioxide, ATO)が前骨髄球性白血病細胞のコチレニン A による分化を顕著に促進することを見出した。そこで、この併用処理がヒト乳癌細胞に対して有効な抗癌作用を示すか検討した結果、コチレニン A は ATO によるヒト乳癌細胞(MCF-7, MDA-MB-231)の増殖抑制を顕著に促進することを見出した。さらに、コチレニン A と ATO の併用処理による増殖抑制効果は、抗酸化剤 N-acetyl-L-cysteine (NAC) により、部分的に消失することを明らかにした。これらの結果は、コチレニン A と活性酸素(ROS)誘導剤との併用処理が、難治性の膵臓癌を含む固形癌に対する効果的な抗癌作用を示す可能性を示唆する。しかし、膵臓癌細胞に対するこれらの併用効果およびその作用機序は緒についたばかりである。

2. 研究の目的

(1) 我々は新たに見出した白血病細胞に対する分化誘導剤コチレニン A が、単独または癌分子標的薬剤との併用で固形癌細胞の増殖をも抑制できるか検討してきた。これまでに乳癌細胞を用いて分化誘導剤コチレニン A とラパマイシン等の癌分子標的薬を併用処理することで顕著な増殖抑制効果があることを見出してきた。本研究は分化誘導剤コチレニン A と癌分子標的薬をさらに膵臓癌のような難治性固形癌細胞に対しても検討すること、また、その増殖抑制の分子メカニズムの解明を行い、新しい分子標的治療法の確立を目指す。

(2) 最近、コチレニン A と ATO の併用処理による増殖抑制効果には ROS 誘導が関与することを見出した。そこで、ROS 誘導剤として植物由来で癌化学予防剤としても期待されている phenethyl isothiocyanate (PEITC) を用い、コチレニン A との併用効果を難治性固形癌である膵臓癌細胞に対する効果を検討する。コチレニン A と PEITC との併用処理によるヒト膵臓癌細胞 MIAPaCa-2 および PANC-1 細胞に対する増殖抑制効果を検討する。さらに、この細胞死誘導のメカニズムに最近明らかになってきたフェロトーシス(non-apoptotic, iron-dependent, oxidative cell death)の関与が含まれるか否かを検討する。

(3) ROS 誘導剤として知られている PEITC 以外の植物成分としてインドナガコショウ由来の piperlongumine (PL) とコチレニン A との併用効果を膵臓癌細胞(PANC-1, MIAPaCa-2, BxPC-3, CFPAC-3)に対して検討する。コチレニン A と PEITC との併用処理で誘導されたフェロトーシスによる細胞死誘導がこのコチレニン A と PL 併用処理での効果に含まれるか否かを様々な細胞死誘導の阻害剤を用いて明らかにする。

3. 研究の方法

細胞増殖は MTT assay または Trypan blue dye exclusion test で測定した。ROS はジヒドロエチジウムを用いて、細胞の ROS を蛍光で測定するキット (Muse Oxidative Stress Kit) を使用し、Muse Cell Analyzer で測定した。細胞内グルタチオン量は GSH-Glo™ Glutathion Assay Kit (Promega) を用いて定量した。Annexin V 陽性細胞の検出は Muse Annexin V & Dead Cell Kit を使用し、Muse Cell Analyzer で行った。

4. 研究成果

(1) 我々はこれまでに、コチレニン A が低濃度の三酸化ヒ素によるヒト乳癌細胞(MCF-7, MDA-MB-231)の増殖抑制を顕著に促進することを見出している。このコチレニン A と三酸化ヒ素の併用処理による増殖抑制効果は、抗酸化剤 NAC により、部分的に消失することを明らかにした。これらの結果は、コチレニン A と活性酸素(ROS)誘導剤との併用処理が、効果的な抗癌作用を示す可能性を示唆する。そこで 28 年度では、ROS

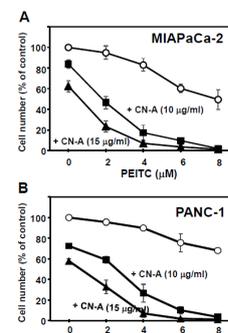


図 1 コチレニン A と PEITC による膵臓癌細胞の増殖抑制効果

誘導剤として植物由来で癌化学予防剤としても期待されている PEITC を用い、コチレニン A との併用効果を難治性固形癌である膵臓癌細胞に対する効果を検討した。その結果、コチレニン A と PEITC との併用処理はヒト膵臓癌細胞 MIA PaCa-2 および PANC-1 細胞の増殖を相乗的に抑制することを見出した (図 1)。この併用処理の増殖抑制の効果は細胞死誘導によるものであった。コチレニン A は PEITC による ROS の誘導を顕著に増強した。さらに、このコチレニン A と PEITC の併用処理による細胞死誘導効果は抗酸化剤 NAC や Trolox によりほぼ完全に消失し、さらに、フェロトキシシス阻害剤 ferrostatin-1 (Ferr-1) や liproxstatin-1 や鉄キレート剤 deferoxamine で顕著に消失した (図 2)。これらの結果から、この細胞死誘導のメカニズムにはフェロトキシシス (non-apoptotic, iron-dependent, oxidative cell death) が関与していることを明らかにした。

(2) 次に、ROS 誘導剤として知られている PEITC 以外の植物成分について膵臓癌細胞 (PANC-1、MIA PaCa-2、BxPC-3、CFPAC-3) を用いて検討した。その結果、アポトーシス誘導剤として知ら

れているインドナガコショウ由来の piperlongumine (PL) の比較的高濃度での細胞死誘導はアポトーシス阻害剤やネクローシス阻害剤では阻害されず、フェロトキシシス阻害剤と鉄キレート剤、過酸化脂質合成阻害剤で阻害された (図 3)。さらに、細胞内グルタチオン濃度の低下も認めることから、PL は単独でフェロトキシシス誘導を介した膵がん細胞死を誘導することを明らかにした。PL による膵癌細胞死は、単独では細胞生存率に影響を与えない濃度のコチレニン A との併用処理で顕著に増加した。コチレニン A は PL による ROS 産生を増強し、この併用処理による細胞死も ROS 阻害剤やフェロトキシシス阻害剤、鉄キレート剤で阻害されたが、アポトーシス阻害剤やネクローシス阻害剤では阻害されなかった。また、PL とフェロトキシシスを誘導することが報告されている臨床試薬 sulfasalazine (SSZ) との併用処理で膵がん細胞死は著明に増加した。この併用処理による細胞死も ROS 阻害剤やフェロトキシシス阻害剤、鉄キレート剤で阻害された。さらに、PL とコチレニン A および SSZ の 3 剤併用処理は、さらに効率よく膵癌細胞死を誘導した (図 4)。PL は膵癌細胞の GSH レベルを顕著に低下させた。また、フェロトキシシスを誘導することが知られているリウマチ薬 SSZ も GSH レベルを低下させることが知られている。しかし、そのメカニズムは異なり、SSZ は細胞膜の System Xc- トランスポーターを阻害することで、一方で PL はグルタチオン S トランスポラーゼおよび GSH と複合体を形成

し、その結果 GSH レベルを低下させると考えられている。このような作用機序の違いが PL と SSZ 併用処理による相乗的なフェロトキシシス誘導に繋がった可能性が考えられた。また、最近、フェロトキシシス誘導にはヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) が介在しているとの報告もある。我々はコチレニン A が HO-1 を誘導していることを定量 PCR で確認しており、この HO-1 の誘導が PL とコチレニン A との併用効果に関連している可能性も考えられた。また、コチレニン A の分子内にはエポキシド構造が存在しており、このエポキシド構造を持たないコチレニン A 模倣体は PL によるフェロトキシシス誘導を促進できないことを確認した。したがって、コチレニン A と PL の顕著な併用効果にはコチレニン A 分子内のエポキシド構造が重要であることが示唆された。フェロトキシシスはアポトーシスやネクローシスとは異なる機序で誘導される新規の細胞死であり、これまでの抗癌剤に耐性となった癌細胞に対してもフェロトキシシスを介した細胞死を誘導できる可能性が示唆されている。現時点では、フェロトキシシス誘導剤の報告は少なく、フェロトキシシス誘導による新たな膵癌治療法を確立するためにも、膵癌細胞のフェロトキシシス誘導剤を見出すことは意味があると考えられた。本研究では PL は単独で膵癌細胞のフェロトキシシスを誘導すること、さらに、コチレニン A や SSZ と併用処理することで相乗的にフェロトキシシスを誘導することを見出した。さらに、当研究室で樹立したゲムシタピン抵抗性膵癌細胞でも親株細胞と同様に PL 単独、または SSZ およびコチレニン A との併用処理でフェロトキシシスによる顕著な細胞死を誘導できることを見出した。これらの結果から、本研究において膵癌細胞のフェロトキシシス誘導剤として見出した PEITC または PL と SSZ やコチレニン A との併用療法が新たな膵癌治療法となる可能性が出てきた。

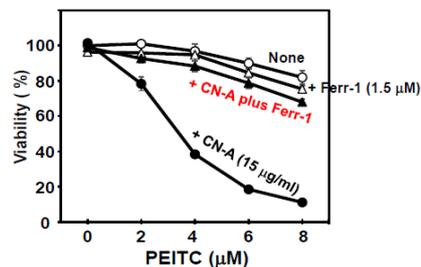


図 2 コチレニン A と PEITC による増殖抑制効果のフェロトキシシス阻害剤による解除

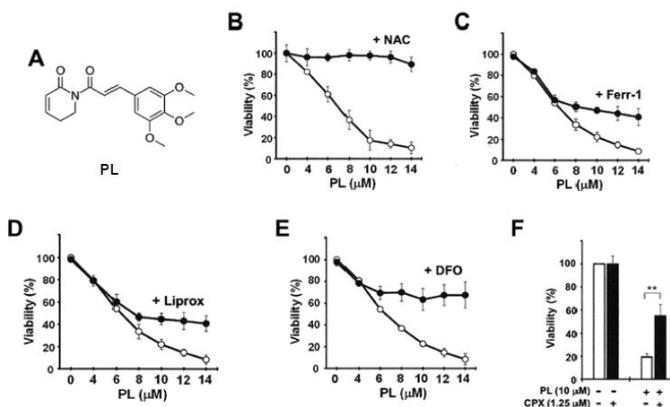


図 3 PL による増殖抑制効果の ROS 阻害剤やフェロトキシシス阻害剤および鉄キレート剤による解除

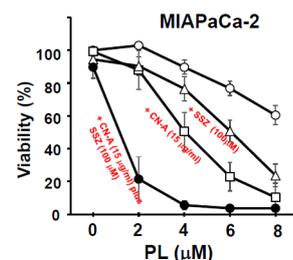


図 4 PL とコチレニン A および SSZ の 3 剤併用処理による膵臓癌細胞の効果的増殖抑制効果

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

Kumakura S., Yamaguchi Y., Murakawa Y., Kasukabe T. Effect of cytokines and hyperthermia on phagocytosis and phosphatidylserine externalization: implication for the pathophysiology of hemophagocytic syndrome. *Ann.Clin. Lab. Sci.* 48, 2018, 314-322. 査読有

DOI: 0091-7370/18/0300-314

Yamaguchi Y., Kasukabe T., Kumakura S. Piperlongumine rapidly induces the death of human pancreatic cancer cells mainly through the induction of ferroptosis. *Int. J. Oncol.* 52, 2018, 1011-1022. 査読有

DOI: 10.3892/ijo.2018.4259

Ikejiri F., Honma Y., Kasukabe T., Urano T., Suzumiya J. TH588, an MTH1 inhibitor, enhances phenethyl isothiocyanate-induced growth inhibition in pancreatic cancer cells. *Oncol. Lett.* 15, 2018, 3240-3244. 査読有

DOI: 10.3892/ol.2017.7713

Okabe-Kado J., Hagiwara-Watanabe Y., Niitsu N., Kasukabe T., Kaneko Y. NM23 downregulation and lysophosphatidic acid receptor EDG2/lpa1 upregulation during myeloid differentiation of human leukemia cells. *Leuk. Res.* 66, 2018, 39-48. 査読有

DOI: 10.1016/j.leukres.2018.01.003

Kasukabe T., Honma Y., Higuchi Y., Kato N., Kumakura S. Combined treatment with cotylenin A and phenethyl isothiocyanate induces strong antitumor activity mainly through the induction of ferroptotic cell death in human pancreatic cancer cells. *Oncol. Rep.* 36, 2016, 968-976. 査読有

DOI: 10.3892/or.2016.4867

〔学会発表〕(計2件)

粕壁 隆、Cotylenin A enhances piper longumine plus sulfasalazine-induced ferroptotic cell death in pancreatic cancer cells. 第76回 日本癌学会学術総会、2017年
粕壁 隆、Cotylenin A and phenethyl isothiocyanate synergistically induce ferroptotic cell death in human pancreatic cancer cells. 第75回 日本癌学会学術総会、2016年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.shimane-u-education.jp/>