

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07708

研究課題名(和文)細胞死の様式転換を利用した放射線化学増感とその機構の解明

研究課題名(英文) Induction of distinct cell death types and sensitization to radiation by using chemical stressors

研究代表者

趙 慶利 (ZHAO, QINGLI)

富山大学・学術研究部医学系・助教

研究者番号：90313593

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：HeLa細胞においてTempoと温熱併用によるオートファジー細胞死を誘導することが判明した。5mM Tempo-44 /20分でアポトーシスが誘導され、5mM Tempo-44 /60分でオートファジー細胞死が誘導された。この併用はカスパーゼ依存性アポトーシスを阻害しオートファジー細胞死を誘導した。遺伝子チップ解析により併用処理におけるTP53INP1遺伝子の発現を示した。Mito-Tempoと温熱併用すると、Tempoより約10倍の細胞死を誘導した。Mito-TempoはTempoより多く(約10倍)の細胞死を誘導することを示し、ユニークな温熱増感剤であることが考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

最近の研究で細胞死は極めて多様であること、細胞死の様式変換が癌治療成績に関係することが判明してきており、本研究により、全体のメカニズムの一端が分子水準で明らかになった。使用する薬剤の臨床使用可能性が判るとともに、細胞死の様式変換に関わる新たな薬剤開発に繋がる研究情報が得られる。研究結果からこのメカニズムの解明は癌の治療および治療薬の開発に寄与すると思われる。

研究成果の概要(英文)： In this study, we determined that Tempo combine treatment with hyperthermia rapidly induced autophagic cell death in HeLa cells. 5 mM Tempo-44 /20 min combination induced apoptosis, while 5 mM Tempo-44 /60 min combination induced autophagic cell death in HeLa cells. This co-treatment inhibited the processing of heat-activated procaspase-3 into active small subunits, leading to the inhibition of caspase-dependent apoptosis, and results in the induction of autophagic cell death. Furthermore, the gene chip analysis showed the up-regulation of TP53INP1 gene in the combination treatment. Subsequently, the combination of Mito-Tempo and 44 /60 min induced cell death in a dose-dependent manner. Mito-Tempo induced approximately 10-fold higher cell death than Tempo. Thus, the Mito-Tempo is a unique thermo-sensitizer which synergistically induce more apoptotic and autophagic cell death.

研究分野：放射線医学

キーワード：温熱 ROS 細胞死

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者は、特に放射線や温熱によるアポトーシスの増強について研究し、最近、細胞内酸化ストレスと温熱細胞死の増強について論文 (Wu L-H, *et al.* Apoptosis, 2014; Li P., *et al.* Cell Stress and Chaperons, 2016; Li P., *et al.* Int J Hyperthermia, 2017) で報告した。HeLa 細胞において、ニトロキシドと温熱併用による細胞死の増感について国際学会 (BIT's 10th Annual World Cancer Congress-2017.5.19-21 スペイン) および日本ハイパーサーミア学会 (第 34 回大会-2017.9.15-16, 京都) で報告した。その細胞死の様式はオートファジー細胞死であり、アポトーシスからオートファジー細胞死に転換することが非常に重要と考えられる。また、温熱増感によるアポトーシスからオートファジー細胞死転換のメカニズムについて、*TP53INP1*、*Atg5*、*p62* 遺伝子と関連することが部分的に分かったが (図 2)、放射線の化学的増感に関する細胞死の様式については、また不明な点が多い。従って、このメカニズムの解明は、放射線による癌の治療および治療薬の開発に寄与すると思われる。

2. 研究の目的

放射線による多様な細胞死の誘導と細胞死様式の転換メカニズムの解明を目的とする。最近、放射線細胞死の様式がアポトーシス、ネクロプトーシス、フェロトーシス、オートファジー細胞死等と多様であることが判明し、この制御が癌治療効果との関連で注目されている。これらの制御が効率的な細胞死誘導の鍵となる。これには細胞内酸化能が関係し、特にシスチン・グルタミン酸トランスポーターの役割が重要とされる。そこで、阻害剤である、スルファサラジン、ソラフェニブおよびエラスティンを用いて、細胞死の増強と細胞死の様式別変化を定量的に比較する。さらに、これらに関わる遺伝子発現を網羅的に検討するとともに関連タンパク質の変化について調べる。これにより細胞死様式の転換機構を解明するとともに放射線癌治療生成向上のための細胞死制御薬剤の探索・開発を目指す。

3. 研究の方法

本研究では、単独および放射線と併用による細胞死と細胞内活性酸素 (ROS) を中心にして、フローサイトメーターで調べる。次は細胞の形態変化とタンパク質発現より細胞死の様式を決める。その後マイクロアレイ遺伝子解析方法で細胞死の様式を制御する遺伝子を探す。ついで細胞死の様式に関連遺伝子のタンパク質発現を検討する。1. 細胞死の形態観察 (Giemsa 染色)、アポトーシスはフローサイトメトリーによるホスファチジルセリンの細胞膜への発現 (Annexin V-FITC/PI 染色) で検証し、オートファジー: LC3, Atg5, P62 を利用して、ウェスタンブロッティング方法で細胞死のタイプを識別する。2. 化合物および化合物による細胞増殖毒性評価: Cell Counting Kit-8 を用いる。3. 細胞内活性酸素種について、02.-.; Dihydroethidine (DHE) 色素を利用してフローサイトメトリーにより分析した。細胞内脂質過酸化関連タンパク質 SOD1, SOD2 発現についてウェスタンブロッティング法で検討した。マイクロアレイを用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。

4. 研究成果

(1) Tempo と温熱併用による細胞死の形態変化について顕微鏡で観察した。Tempo と温熱併用による顕著な細胞死増感効果を示した。(図 1)

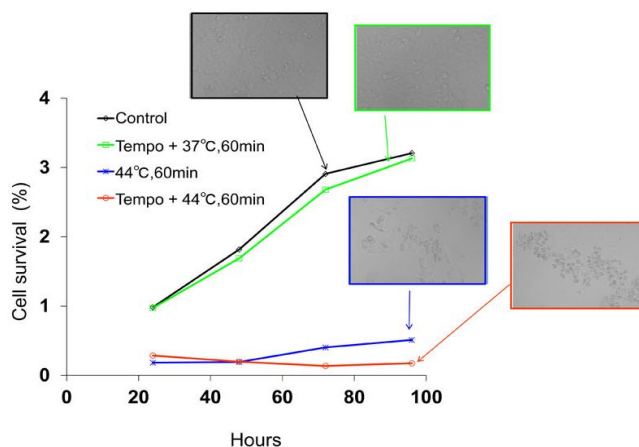


図 1

(2) ミトコンドリアに局在する Tempo 誘導体 F-TripPT と温熱併用による細胞死の形態変化を Giemsa 染色で調べた、低濃度 F-TripPT と温熱併用による Tempo より顕著な細胞死増感効果を示した。(図2)

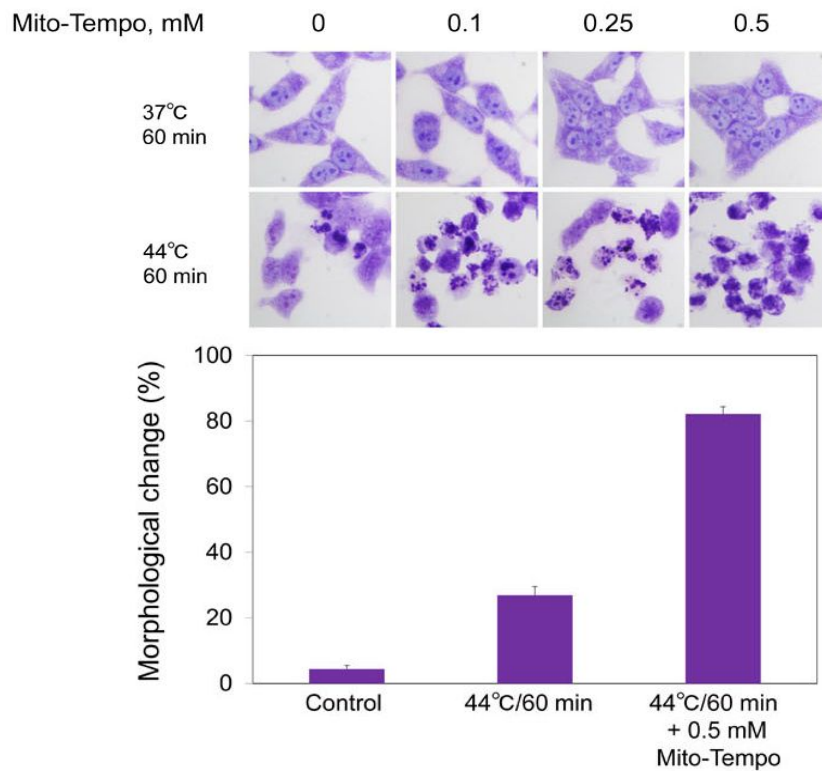


図2 Giemsa 染色

(3) Tempo と温熱併用による細胞内関連タンパクの発現についてアポトーシスは Caspase-3、オートファジーは LC3 で Western blotting 方法によって検討した。5mM Tempo と 44 60 分温熱併用による細胞死はカスパーゼ非依存性オートファジー細胞死はであることが分かった。(図3)

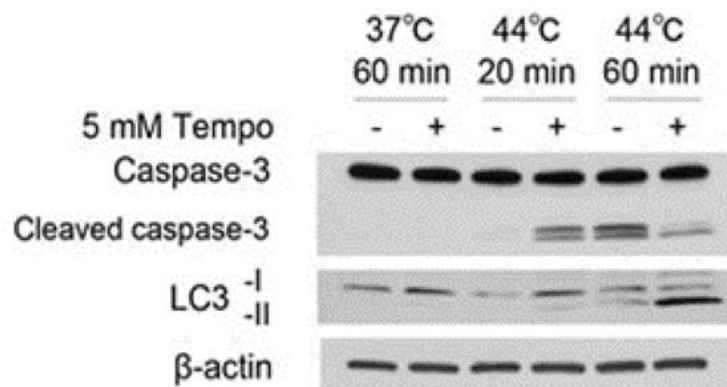


図3

(4) Tempo あるいはミトコンドリアに局在する Tempo 誘導体 F-TripPT と温熱併用による Caspase-3 の発現はニトロキシド濃度に依存する。F-TripPT は Tempo より効果的に細胞死を誘発することが分かった。(図 4)

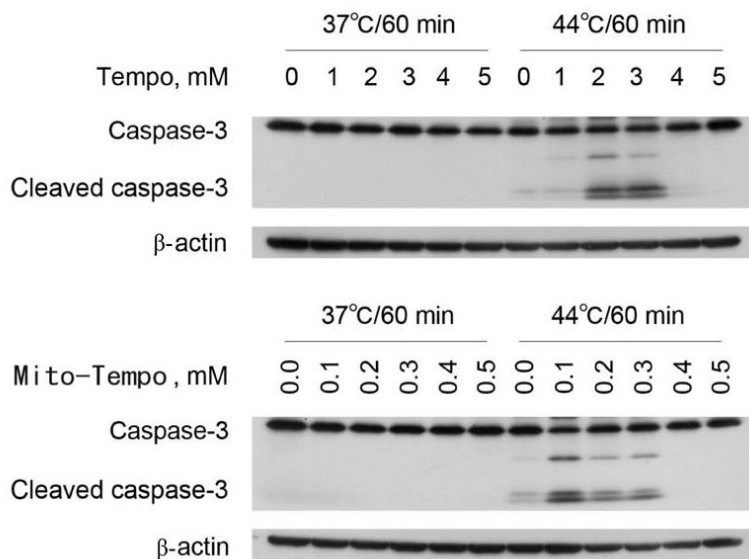


図 4

(5) Tempo と温熱併用による TP53INP1 の発現。(図 5)

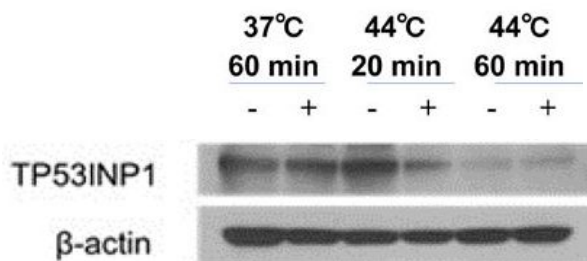


図 5

(6) Tempo と温熱併用による細胞内活性酸素 (ROS) の変化。(図 6)

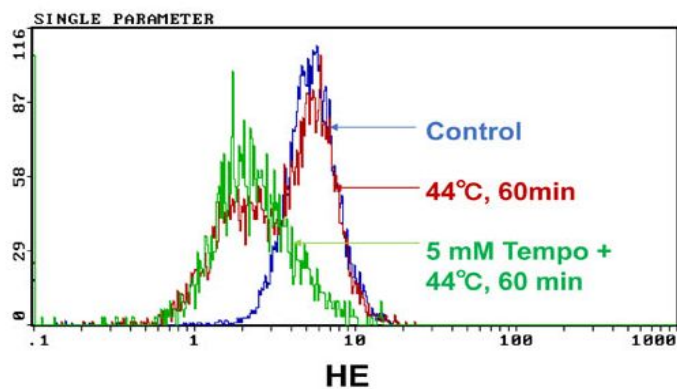


図 6

(7) Tempo と温熱併用による細胞質及び細胞内ミトコンドリアの活性酸素 (ROS) 関連タンパク質 SOD の発現。(図7)

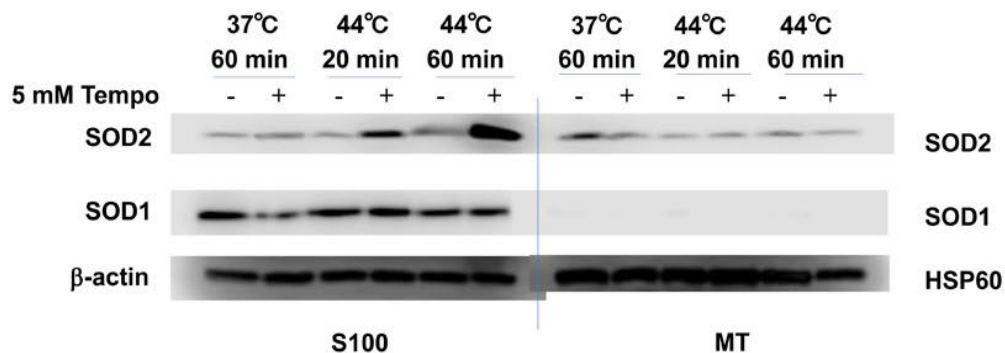


図7

〔引用文献〕

Wu L-H, Li P, Zhao Q-L, Piao J-L, Jiao Y-F, Kadowaki M, & Kondo T, Arbutin, an intracellular hydroxyl radical scavenger, protects radiation-induced apoptosis in human lymphoma U937 cells. *Apoptosis*, (2014) 19(11), 1654-1663.

Li P, Zhao Q-L, Jawaid P, Rehman, M U, Sakurai H, & Kondo, T. (2016). Enhancement of hyperthermia-induced apoptosis by 5Z-7-oxozeaenol, a TAK1 inhibitor, in A549 cells. *Cell Stress Chaperones*. doi:10.1007/s12192-016-0712-6

Li P, Zhao Q-L, Jawaid P, Rehman M U, Ahmed K, Sakurai H, & Kondo T, (2017). Enhancement of hyperthermia-induced apoptosis by 5Z-7-oxozeaenol, a TAK1 inhibitor, in Molt-4 cells. *Int J Hyperthermia*, 1-11.

5. 主な発表論文等

Zhao Q-L, Ito H, Kondo T, Uehara T, Ikeda M, Abe H, Saitoh J-I, Noguchi K, Suzuki M, & Kurachi M, Antipsychotic drugs scavenge radiation-induced hydroxyl radicals and intracellular ROS formation, and protect apoptosis in human lymphoma U937 cells. *Free Radic Res*, (2019) 1-11.

〔学会発表〕(計 3 件)

Zhao Q-L, Rehman MU, Ogawa R, Takashi K, Saitoh J-I, Noguchi K, Tempo Induces Switch between Apoptosis and Autophagy in Combination with Hyperthermia via Modulation of TP53INP1 Gene. The Society for Redox Biology and Medicine's 26th Annual Conference; 2019 Nov 20-23; Las Vegas, NV.

Zhao Q-L, Li P, Rehman MU, Ogawa R, Takashi K, Saitoh J-I, Noguchi K, Isofraxidin enhanced hyperthermia-induced apoptosis via redox modification in human lymphoma U937 cells. The 72nd Annual Meeting of Society for free Radical Research; 2019 Jun 27-28; Sapporo.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Rania Alaaeldin, Gamal El-Din A Abuo-Rahma, Qing-Li Zhao, Moustafa Fathy	4. 巻 41
2. 論文標題 Modulation of Apoptosis and Epithelial-Mesenchymal Transition E-cadherin/TGF-beta/Snail/TWIST Pathways by a New Ciprofloxacin Chalcone in Breast Cancer Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 2383-2395
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.15013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Zhao, Q-L. Ito, H. Kondo, T. Uehara, T. Ikeda, M. Abe, H. Saitoh, J-I. Noguchi, K. Suzuki, M. Kurachi, M.	4. 巻 53
2. 論文標題 Antipsychotic drugs scavenge radiation-induced hydroxyl radicals and intracellular ROS formation, and protect apoptosis in human lymphoma U937 cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Free Radical Research	6. 最初と最後の頁 304-312
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/10715762	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Zhao Q-L., Rehman M. U., Kondo T., Ogawa R., Saitoh J-I., Noguchi K.
2. 発表標題 Tempo induces switch between apoptosis and autophagy in combination with hyperthermia via modulation of TP53INP1 gene
3. 学会等名 SfRBM 2019 annual conference（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------