

平成22年 4月22日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19591456
 研究課題名（和文） 転写因子NF- κ B阻害剤パルテノライドによるアポトーシス誘導促進機構の解明
 研究課題名（英文） The investigation of mechanisms about apoptosis induction by transcription factor NF- κ B inhibitor parthenolide.
 研究代表者
 林 幸子 (HAYASHI SACHIKO)
 福井大学・医学部・助教
 研究者番号：00218570

研究成果の概要（和文）：PTLは *wtp53* 遺伝子を保有するヒト肺癌 A549 細胞において有意な抗腫瘍増感効果を示した。そのメカニズムは転写因子 NF- κ B 活性の阻害により細胞周期の G₁ arrest、apoptosis の誘導によるが NF- κ B シグナル経路には p53-independent であった。

研究成果の概要（英文）：It was cleared that PTL showed enhancement effects of the antitumor in human lung adenocarcinoma A549 cells with *wtp53*, which mechanisms were due to induction of apoptosis and G₁ cell-cycle arrest by inhibition of NF- κ B through p53-independent manner on the signaling.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：放射線治療学（集学的癌治療の基礎）

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：アポトーシス、NF- κ B、パルテノライド、A549細胞、放射線増感効果

1. 研究開始当初の背景

(1) 癌放射線療法、癌温熱療法及び癌化学療法では治療中に現れる治療抵抗性を克服するために通常種々の療法を組み合わせた集学的がん治療が行われる。しかしながら経験則から行われている場合が多く科学的根拠に基いた集学的がん治療の確立が望まれている。

(2) 一方、分子レベルからの科学的根拠に基いた分子標的治療薬の開発が精力的に行わ

れているが、未だそれらによる癌治療法の確立に至っていない。

2. 研究の目的

(1) NF- κ B 分子標的治療薬であるパルテノライドと放射線或いは温熱との併用処理による増感効果の作用機構及びそれらに対する *p53* 遺伝子の関与を明らかにすることで科学的根拠に基いた集学的癌治療法の確立に貢献することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 転写因子 NF- κ B 阻害剤である植物由来セスキテルペン類パルテノライドを用いて、放射線、温熱、薬剤等の抵抗性に関与する *K-ras* 遺伝子の変異型を保有するヒト肺癌 A549 細胞における放射線或いは温熱増感効果をコロニー形成法により検討した。

(2) 放射線或いは温熱増感効果のメカニズムを Flow Cytometry を用いてアポトーシス誘導動態、細胞周期画分及び cell cycle arrest を、Western Blot 法により転写因子 *p53* 遺伝子の発現誘導及び転写因子 NF- κ B 活性阻害効果を解析した。

4. 研究成果

(1) セスキテルペン類パルテノライドはヒト肺癌 A549 細胞において有意な増感効果を示した。(図)

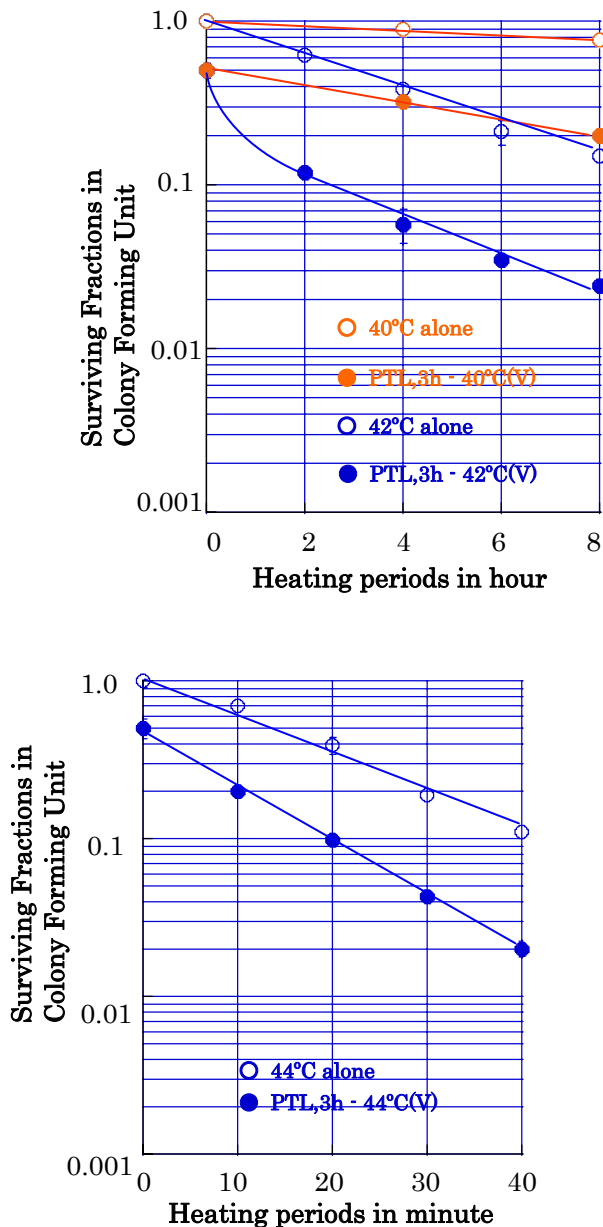


Table I. T_0 values of A549 cells in survivals from treatment with hyperthermia at 40°C, 42°C or 44°C and combination with PTL.

	Hyperthermia alone	PTL, 3 hr - Hyperthermia	Enhancement Ratio
	T_{01}	T_{02}	T_{01}/T_{02}
40°C	27.14 h	6.54 h	4.15
42°C (*1)	1.74 h	0.70 h	2.49
42°C (*2)	2.96 h	2.37 h	1.25
44°C	15.50 m	11.50 m	1.35

(2) PTLによる細胞周期位相応答をコロニー形成法により行った。Hydroxyurea を用いて G_1 -S 期に同調した A549 細胞における PTL の細胞周期位相応答は処理濃度に応じて感受性を示し S 期に高感受性であった。即ち、PTL は増殖期の細胞をターゲットとすることが示唆された。

(3) PTL, Hyperthermia の単独及び併用における細胞周期の画分を Flow Cytometry により解析した。アポトーシスを示す Sub- G_1 は単独処理よりも併用処理した細胞のほうが有意に増加したことから抗腫瘍増感効果はアポトーシスの誘導によるものであることが明らかになった。また G_0/G_1 は併用処理群が各単独に比べて処理直後から有意に増加したことから G_1 期の cell-cycle arrest からアポトーシスへと誘導されたことが明らかになった。

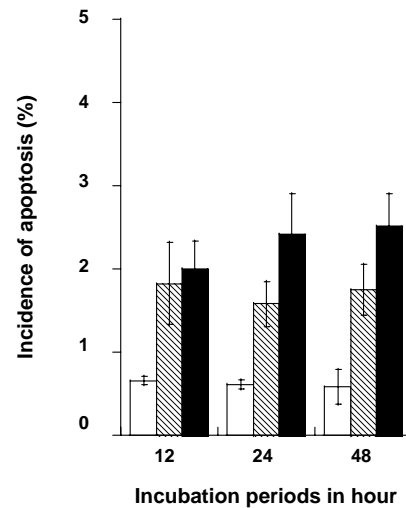
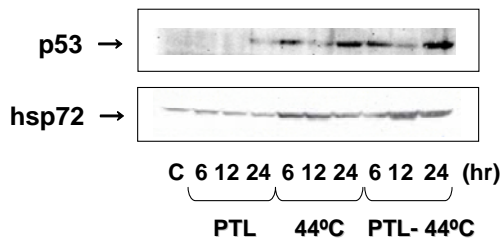


図 Kinetics of apoptosis induction at 12, 24 and 48 h of incubation periods after 44°C hyperthermia, PTL or the combined treatment. At indicated time, A549 cells stained with Höchst 33342 were observed under a fluorescent microscope. The cells of DNA fragmented nuclei with typical morphological features of apoptosis were counted as apoptotic cells. Ordinate: percentages of apoptosis in the total cells. Abscissa: 37°C incubation periods in hours after treatment. Columns represent 44°C hyperthermia for 15 min, PTL (0.02 μ M) for 3 h and the combined treatments in order from the left. Incidence of apoptosis following combined treatment with hyperthermia and PTL was induced additively to single treatment with those.

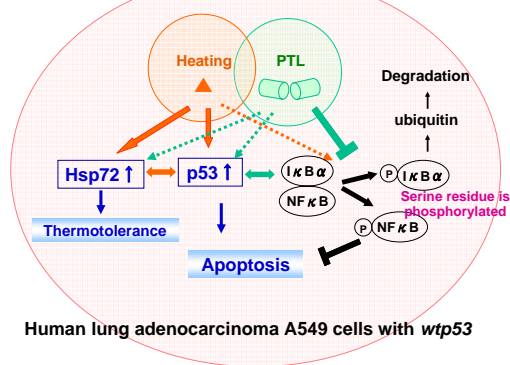
(4) 転写因子 NF- κ B は活性化によりリン酸化されると核に移行してシグナル伝達経路のスイッチが ON になり腫瘍の増殖に関与することが明らかにされている。PTL, Hyperthermia の単独及び併用における NF- κ B 活性阻害効果を Western blot 法により解析した。I- κ B とヘテロに結合していた p-NF- κ B (p-p65) は Hyperthermia 単独による処理の直後は阻止されたが処理後 12 時間でその効果は減弱した。NF- κ B 活性は PTL の併用により完全に阻止された。

(5) ヒト肺腺癌 A549 細胞は *p53* 遺伝子が wild type で *K-ras* 遺伝子が mutant であることが報告されている。我々は *p53* 遺伝子の誘導動態について解析した結果、PTL の抗腫瘍増感効果におけるメカニズムは NF- κ B シグナル経路に *p53*-independent であることを明らかにした。また Hyperthermia による耐性の出現に関与する *hsp72* についても independent であったことを明らかにし論文で報告した。



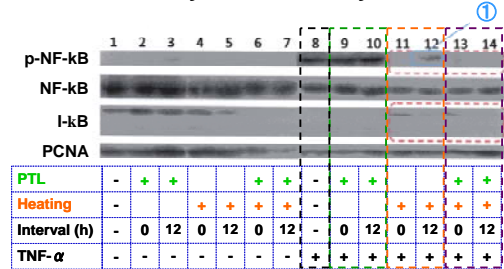
Western blot analysis of cellular amounts of p53 (upper panel) and hsp72 (lower panel) at graded periods of incubation intervals after treatment of A549 cells with PTL (0.02 μ M) for 3 h in LD50, hyperthermia at 44°C for 15 min in LD50 and a sequential combination of both. Numerals on horizontal line of the panel represent 37°C incubation intervals in hour between those treatments and the blotting, respectively and the 'C' on the left of the panel represent the lane for p53 or hsp72 of the non-treated control A549 cells.

パルテノライド及び温熱併用による抗腫瘍効果



This illustration shows the expected antitumor mechanism of PTL and heating in A549 cells with *wtp53*. Intracellular NF- κ B exist as heterozygosis with I- κ B α . When their serine-residue are phosphorylated, they become phospho-NF- κ B and phospho-I- κ B α , respectively and are activated. PTL inhibit the phosphorylation of NF- κ B. We studied whether *p53* or *hsp72* take part in the induction of apoptosis via NF- κ B signal pathway when combination therapy of PTL with heating is performed.

Western blot analysis of NF- κ B by PTL and heating



- ① Inhibition of NF- κ B was diminished after 12 h-interval, treated with heating alone.
- ② The activation of NF- κ B was inhibited by combined treatment with PTL and heating.

This figure shows the western blot analysis of the kinetics of NF- κ B in A549 cells treated with PTL, heating alone and these combination. The cells were stimulated by TNF- α after treatment, because intra-cellular NF- κ B were inactive in state. The activation of NF- κ B were inhibited right after treatment with heating alone as shown No.①, but not inhibited after 12 hour-interval as shown No.②. But the combination treatment induced continuous inhibition of phospho-NF- κ B shown No.③ and ④.

更に癌治療のネックとなる耐性の原因の一つである *K-ras* 遺伝子が関与する MAPK シグナルへの関与を解明する予定である。

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2件)

- ① Hayashi S, Sakurai H, Hayashi A, Tanaka Y, Hatashita M, Shioura H: Inhibition of NF- κ B by combination therapy with parthenolide and hyperthermia and kinetics of apoptosis induction and cell cycle arrest in human lung adenocarcinoma cells. Int J Mol Med 25: 81-87, 2010. 査読有
- ② Matsumoto H, Tomita M, Ohtsuka K, Hatashita M: A new paradigm in radioadaptive response developing from microbeam research. J Radiat Res 50 Suppl: A67-A79, 2009. 査読有

[学会発表] (計4件)

- ① 日本放射線影響学会第52回大会(広島)
「ヒト肺癌A549細胞におけるパルテノライド及び温熱併用によるNF- κ Bの阻害効果とアポトーシス誘導」
林幸子、櫻井宏明、他
2009年11月13日
- ② 日本ハイパーサーミア学会第26回大会(千葉)
「A549細胞における温熱及びパルテノライド併用によるNF- κ Bの阻害効果」林幸子、櫻井宏明、他
2009年9月12日
- ③ 第11回関西ハイパーサーミア研究会
第20回高温度療法臨床研究会(大阪)
「ヒト肺癌A549細胞におけるパルテノライド及び温熱併用によるNF- κ B活性阻害効果とアポトーシス誘導」林幸子、畑下昌範、他 2009年7月25日
- ④ 25th Annual Meeting of the European Society for Hyperthermic Oncology.
(Verona in Italy)
“The effects of combination therapy with hyperthermia and parthenolide on survivals of human lung cancer A549 cells.” Hayashi S, Hatashita M, et al. 4, June, 2009

[図書] (計0件)

[産業財産権]
○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 幸子 (HAYASHI SACHIKO)

福井大学・医学部・助教

研究者番号：00218570

(2) 研究分担者

松本 英樹 (MATSUMOTO HIDEKI)

福井大学・高エネルギー医学研究センター・准教授

研究者番号：40142377