

平成 22 年 4 月 1 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20791330
 研究課題名（和文） ヒト口腔癌に対する緑茶カテキンのMAPK経路を介するアポトーシス誘導機構
 研究課題名（英文） Mechanism of green tea catechin-induced apoptosis through MAPK signaling pathway in human oral cancer cells
 研究代表者
 加賀谷 紀貴（KAGAYA NORITAKA）
 東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教
 研究者番号：40372437

研究成果の概要（和文）：本研究は、15種類のヒト口腔癌細胞株を用い、緑茶カテキン成分EGCG (epigallocatechin-3-gallate)のアポトーシス誘導機構を明らかにすることを目的とする。初めに、アポトーシス誘導性のZA株においてEGCGによって誘導される細胞内シグナルを解析し、カスパーゼ経路と同調してMAPK p38経路が活性化されることを見出した。次に、p38上流の因子として新規にc-Abl経路に注目し、EGCG処理後にc-Ablの核局在化が起こること、またc-Abl経路の阻害によりアポトーシスが抑制されることが実験により分かった。一方、アポトーシス非誘導性のHSC4株では、c-Abl遺伝子を導入することによってEGCGによるアポトーシスを誘導することができた。

研究成果の概要（英文）：In the present study, I examined the mechanism of EGCG (a green tea catechin)-induced apoptosis in human oral cancer cell lines. After EGCG treatment, PARP and caspases were activated accompanied with MAPK p38 activation in ZA cell. A non-receptor tyrosine kinase c-Abl is known to activate MAPK p38 specifically. Therefore, role of c-Abl in EGCG-induced cell apoptosis was examined using c-Abl inhibitor imatinib or c-Abl shRNA. Inhibition of c-Abl signaling effectively suppressed EGCG-induced apoptosis in ZA cell. In addition, nuclear localization of c-Abl was observed after EGCG treatment. In HSC4 cell in which apoptosis was not induced by EGCG, apoptosis was provoked by EGCG after the transfection of c-Abl gene. In conclusion, it was suggested that c-Abl have important roles in EGCG-induced cell apoptosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：分子腫瘍学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：口腔癌、カテキン、アポトーシス、p38、c-Abl

1. 研究開始当初の背景

口腔癌はタバコとアルコールを二大発癌要因とする比較的発症例の多い癌であり、頭頸部において広域発癌や転移を引き起こすと生命にとって脅威となる。これに対し、外科療法や放射線療法が一般に行われているが、副作用や炎症などの課題を残す。

2. 研究の目的

本研究では新規で安全な抗癌物質の開発を目的として緑茶カテキンの効果について検討するとともに、その作用機序の解明を目指した。さらに、口腔癌の原因物質として知られる噛みタバコに対するカテキンの発癌抑制効果についても検討を行った。

3. 研究の方法

(1) カテキンの抗癌作用に関する研究

細胞には本学で樹立した 15 種類のヒト口腔扁平上皮癌細胞株および対照として WI38 ヒト線維芽細胞を用い、これらを種々の条件下において EGCG 処理した。細胞の生物活性は WST-1 assay (Dojindo)により測定した。mRNA の定量は RNAiso Plus (TaKaRa)で核酸抽出後、RT-PCR (Bca BEST RNA PCR kit Ver1.1 (TaKaRa))により行った。各種タンパクの発現は Western blot により分析した。またタンパクの細胞内局在は、NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo Scientific) で核および細胞質タンパクを分離抽出後、Western blot により分析した。細胞周期は、細胞を固定し PI 染色した後、スライドガラス上に展開し、Laser Scanning Cytometry により解析した。Caspase-3 活性は、Caspase-Glo 3/7 Assays (Promega)を用いて測定した。細胞内シグナル阻害実験は、SB203580 (p38 阻害剤, 10 μ M) で 2h あるいは Imatinib (c-Abl 阻害剤, 10 μ M) で 16h 前処理することにより行った。また、遺伝子ノックダウン実験では、c-Abl shRNA Lentiviral Particles (Santa cruz)を導入後、安定発現したコロニーを選択して用いた。遺伝子導入実験は、c-Abl vector (Promega)を Lipofectamin2000 (Invitrogen)によりトランスフェクションして行った。

(2) カテキンの発癌抑制作用に関する研究

この実験では、当初ヒトケラチノサイトである HaCaT 細胞に対し、UV 照射や噛みタバコ成分処理により癌化誘導する予定であったが、

この系では十分に癌化が起らなかった。そこで、増殖が早く、より癌化誘導が容易な V79 チャイニーズハムスター肺線維芽細胞 (RIKEN RCB)を用いて実験を行った。癌化を測定するために、核酸合成系の酵素である HPRT (hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase) 遺伝子の変異を利用する方法を用いた。初めに V79 細胞を HAT 培地 (Sigma)で 3days 培養し、HPRT 遺伝子に変異があってサルベージ経路を利用できないものを予め除いた。続いて、細胞を EGCG で 2h 前処理した後に、噛みタバコ成分 ANE (areca nut extracts, Pure land ethnobotanicals)で 24h 処理することによって HPRT 遺伝子の変異を誘発した。その後、変異タンパク発現のために 5days 培養を行った。HPRT 遺伝子における変異を確認するためにグアニンアナログである 6-thioguanine (Sigma)含有培地で 12days セレクションを行い、ギムザ染色後に生存コロニー数をカウントした。

4. 研究成果

(1) カテキンの抗癌作用に関する研究

初めに、ヒト口腔扁平上皮癌由来の ZA 細胞株に対し、EGCG を種々の濃度で作用させた。24h 後の生物活性を測定した結果より、EGCG に濃度依存的な殺細胞効果があることがわかった (IC₇₀=0.34mM)。また、ウェスタンブロットにより、種々の EGCG 濃度条件下においてアポトーシスの指標である PARP およびカスパーゼ 3 の断片化を測定した結果、IC₇₀ 近辺に最適濃度があることがわかった。これを踏まえ、以降の実験では IC₇₀ の 0.34mM を基準濃度として用いた。

次に ZA 細胞を EGCG で処理後、各タンパクの発現レベルをタイムコースで測定した (Fig. 1)。PARP およびカスパーゼ 3 の断片化は処理後 4h から急激に増加し、6h 付近で最大値を示した。また、近年細胞死誘導への関与が多く報告されている MAPK のうち、JNK は EGCG 処理後 1h で活性化するのにに対し、p38 は 1h および 4-6h の 2 段階で活性化されることがわかった。従来の研究は、EGCG によって生成される酸化ストレスを原因と考える 1h の現象に注目したものがほとんどであるが、本研究ではカスパーゼ経路の活性化状態との比較から 4-6h における p38 の活性化に注目し、新規なアポトーシス誘導機構の提案を目指した。なお、内因性の活性酸素種の発生

についてはNF- κ Bの誘導を指標として分析したが顕著な増加は見られなかった。

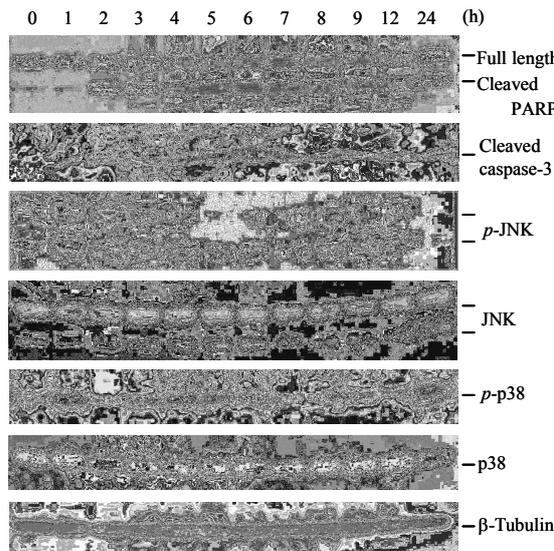


Fig.1 Western blotting analysis for activations of caspase and MAPK pathways after treatment with EGCG in ZA cell.

そこでEGCG処理後6hではp38のみ活性化されるという知見に基づいて上流シグナル因子の探索を行ったところ、c-Ablが候補として挙がり、Fig. 2(a)に示すようなモデルを仮定した。c-Ablは細胞膜非結合性のチロシンキナーゼであり、細胞接着に伴う増殖シグナルを担う一方、アポトーシスにも関与することが報告されている。ここで、p38の上流因子としてc-Ablを考慮したものの、阻害剤を用いた実験からp38自体はアポトーシスには直接関与していないことが示唆された。

次に、ZA細胞をc-Abl阻害剤であるImatinibで前処理した場合の、EGCGによって誘導されるアポトーシスへの影響について検討した。その結果ImatinibによりPARPおよびカスパーゼ3の断片化が抑制され、さらにp38のリン酸化も抑制された(Fig. 2(a))。

次に、同様の条件で処理した細胞をPIで染色後、細胞周期を解析した。EGCG処理によりsubG1領域の割合は34%まで増加したものの、Imatinibで前処理すると、その割合は半分以下に抑えられた(Fig. 2(b))。

また、カスパーゼ3活性も同様に、EGCGにより上昇した活性がImatinibにより抑制されることがわかった(Fig. 2(c))。

ZA以外の口腔癌細胞株についても同様の実験を行ったが、ほとんどの細胞株においてEGCGにより誘導されたPARPの断片化はImatinibにより抑制されることがわかった。次に、ZA細胞においてc-Abl遺伝子をノックダウンしたときの影響について検討を行った。c-Abl shRNA vectorを導入した細胞ではcontrolと比べ発現が低下していることを確

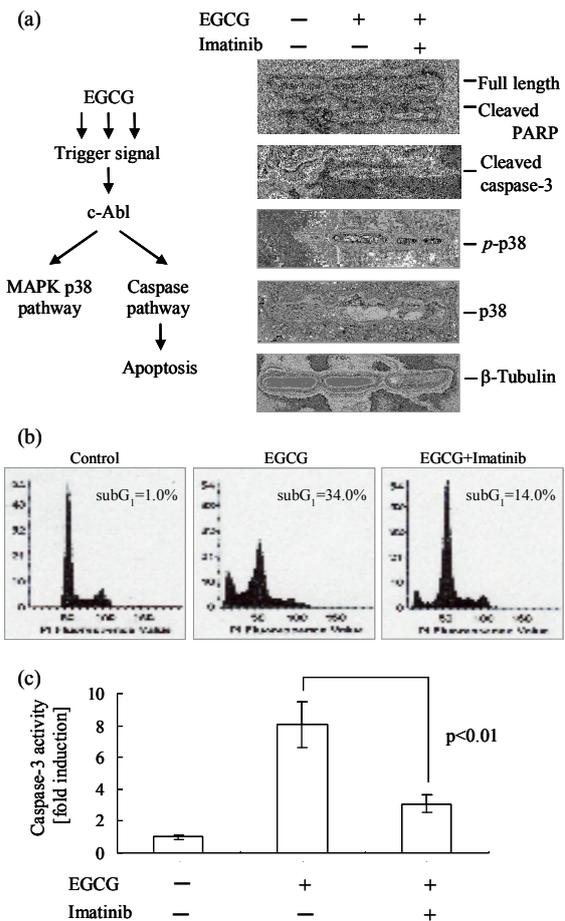


Fig.2 Effect of Imatinib, a c-Abl selective inhibitor, on EGCG-induced apoptosis in ZA cell.

認した後、各細胞における生物活性を測定した結果、controlに比べc-Abl shRNAを導入した細胞では、EGCGに対する保護作用が増強されることがわかった(Fig. 3(a))。また、等濃度のEGCGによって誘導されるPARPの断片化もcontrolと比べc-Abl shRNAでは低く抑えられた(Fig. 3(b))。

次に、当研究室で所有する15種類のヒト口腔癌細胞株および対照として正常細胞であるWI38肺線維芽細胞におけるEGCGの作用の違いについて検討を行った。初めに、各細胞株をEGCGで24h処理後の生物活性を測定した。次に、各細胞をEGCGのIC₇₀で6hあるいは12h処理した後のPARPを分析した結果、ほとんどの口腔癌細胞株でPARPの断片化が見られたものの、HSC4、Tsu、HOC605および正常細胞のWI38では検出されなかった。

そこで、これら4株についてさらに詳細に検討するために、EGCG濃度を変化させた条件においてPARPの分析を行った。このうち、TsuとHOC605では濃度を変えた場合にPARPの断片化が検出されたのに対し、HSC4ではWI38と同様全く検出されなかった。HSC4についてはさらにでタイムコースの分析も行ったが

同様に検出されなかった。

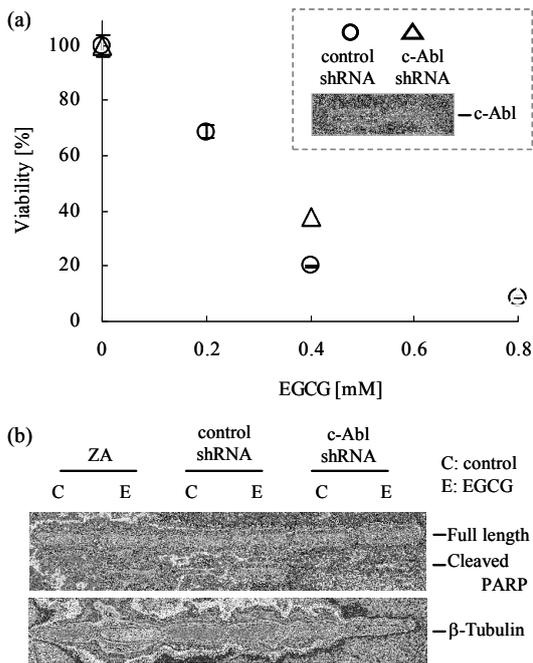


Fig.3 Effect of c-Abl gene knock-down on EGCG-induced apoptosis in ZA cell.

c-Abl が関与するアポトーシスにおいては、c-Abl の核局在化が重要と考えられており、近年、抗癌剤のような DNA damaging agent や酸化ストレスにより、処理後間もない 1h ほどで c-Abl の核局在化が起こることが報告されている。そこで、アポトーシス誘導性の ZA 株とアポトーシス非誘導性の HSC4 株において、EGCG 処理後の c-Abl の細胞内局在をタイムコースで測定した (Fig. 4)。ZA 株では EGCG 処理後 4-6 h に核における c-Abl 量が増加しているのに対し、HSC4 株においてはほとんど検出されなかった。なお、ZA 株ではカスパーゼの活性化と同様 c-Abl の核局在化は EGCG 処理後 4-6 h と比較的遅い時間に起きていることから、これまで報告されているものとは異なる作用によって c-Abl の核局在化が誘導されているものと考えられる。EGCG は培地に添加後 4 h ほどで酸化重合によるダイマーの形成がピークに達し、またダイマー形成により細胞膜への結合性が高まることが知られており、これが EGCG の作用機構の一つとして推察される。

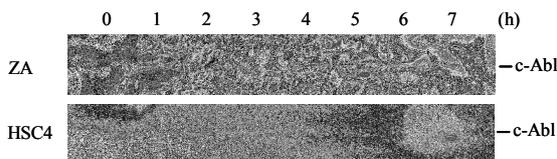


Fig.4 Effect of EGCG on the nuclear localization of c-abl in ZA and HSC4 cells.

次にアポトーシスの非誘導性の HSC4 株に対し、c-Abl ベクターを導入することにより EGCG の作用にどのような影響が現れるか検討を行った (Fig. 5)。c-Abl ベクターを導入した 2 つのクローンにおいて、control と比べ mRNA レベルおよびタンパクレベルで十分な c-Abl の発現上昇が確認された (Fig. 5(a))。次にこれらの細胞および empty vector を導入した細胞において、EGCG の作用の違いを調べた。各細胞を EGCG で 6 h 処理した場合、control および empty vector では PARP の断片化が検出されなかったのに対し、c-Abl vector を導入した場合 PARP が検出されるようになり、EGCG 誘導によるアポトーシスにおける c-Abl の重要性が示唆された (Fig. 5(b))。

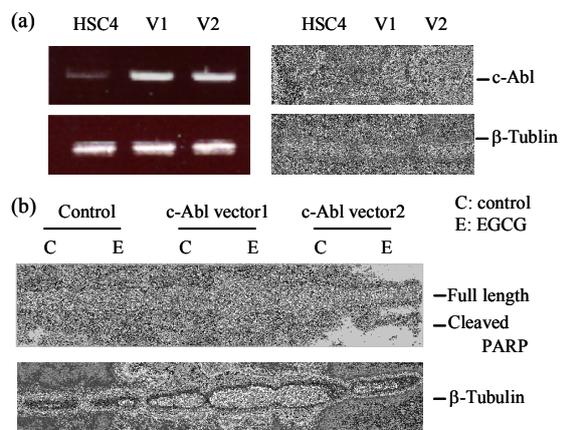


Fig.5 Effect of c-Abl gene transfection on EGCG-induced cell apoptosis in HSC4 cell.

(2) カテキンの発癌抑制作用に関する研究初めに V79 細胞に対する ANE の発癌誘導作用について最適条件の検討を行った。V79 細胞を種々の濃度の ANE で処理すると、100~150μg/ml の条件をピークとして変異コロニー数が増加することがわかった (Fig. 6(a))。次に、ANE 処理に先立ち、予め細胞を所定濃度の EGCG で処理した。このとき、EGCG 濃度は細胞毒性がなく分析に影響を与えない 100μM 以下の濃度に設定した。その後 ANE 100μg/ml で処理し、EGCG が ANE の発癌誘導作用にどのような影響を与えるか検討を行った (Fig. 6(b))。その結果、50μM 以下の EGCG では濃度依存的にコロニー数を抑制する傾向が見られたものの、その効果は十分とは言えず、逆に 100μM ではコロニー数が増加した。これは、ANE が癌化誘導すると同時に細胞障害作用を有するのに対して、EGCG が ANE の障害から細胞を保護することによって、逆に癌化を促してしまったのではないかと考えられる。

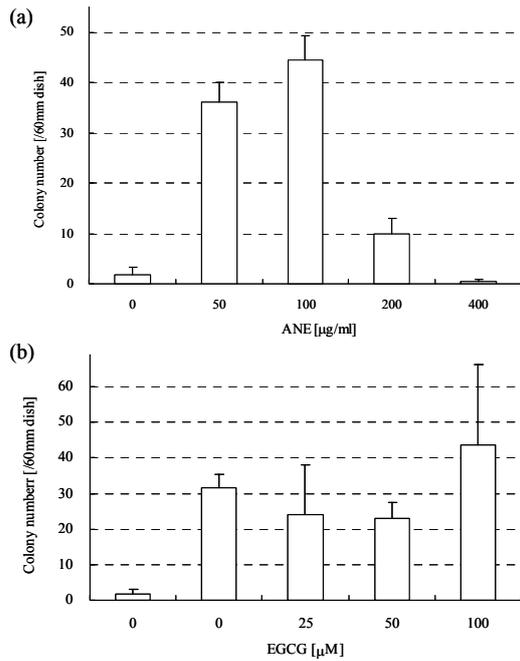


Fig.6 Effect of EGCG on ANE-induced mutagenesis in V79 cell.

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)

[学会発表] (計2件)

①加賀谷紀貴、原征彦「ヒト口腔癌細胞に対する緑茶カテキンの細胞死誘導機構」
日本分子生物学会 2008年12月9-12日
神戸ポートアイランド

②加賀谷紀貴「口腔癌細胞において緑茶カテキンが誘導するc-Ablを介するアポトーシスシグナル」
歯科基礎医学会 2009年9月9-11日 朱鷺
メッセ新潟コンベンションセンター

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加賀谷 紀貴 (KAGAYA NORITAKA)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・助教
研究者番号: 40372437

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし