

令和 5 年 4 月 7 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07987

研究課題名(和文)ポリリン酸がミトコンドリア活性を調節して放射線感受性を制御するメカニズムの解明

研究課題名(英文) Role of inorganic polyphosphate on regulation of radio-sensitivity by modulating mitochondrial activity

研究代表者

堤 香織 (Tsutsumi, Kaori)

北海道大学・保健科学研究所・助教

研究者番号：80344505

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)：本研究では、ポリリン酸によるヒト肺非小細胞癌由来細胞株H1299の放射線感受性増感メカニズムを解明することを目標とした。ミトコンドリア膜電位はポリリン酸処理によってピルビン酸依存的に、細胞内ATP量はピルビン酸非依存的に減少した。乳酸分泌量やグルコース-6-リン酸脱水素酵素活性はポリリン酸処理群とコントロール群に差異は見られず、解糖系やペントースリン酸回路の関連性はみられなかった。ポリリン酸による細胞内ATP量の低下はミトコンドリア膜透過性遷移孔(mPTP)活性阻害剤シクロスポリンA存在下においても観察され、ポリリン酸によるATP量低下はmPTP活性とは別の経路に起因すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、ポリリン酸による腫瘍の放射線感受性増感効果や細胞内ATP量の低下を確認していたが、その作用機序については不明であった。本研究によって、ミトコンドリア膜透過性遷移孔(mPTP)活性への関与や解糖系、ペントースリン酸回路への関連性がみられなかったことから、これらの経路以外にポリリン酸が作用している可能性が明らかとなった。ポリリン酸は放射線感受性を高めるだけでなく、腫瘍の転移抑制効果を併せ持つことが報告されている。また、生体内高分子であるため生体への安全性は高い。今後の更なるメカニズムの解明により、ポリリン酸利用した効果的な放射線治療薬研究の発展が期待される。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to elucidate the mechanism of radio-sensitization of the human lung non-small cell lung cancer cell line (H1299) by inorganic polyphosphate (polyP). The mitochondrial membrane potential was decreased by polyP treatment in a pyruvate-dependent manner, while the intracellular ATP levels were decreased in a pyruvate-independent manner. The amount of lactate secretion and the glucose-6-phosphate dehydrogenase activity were not different respectively between the polyP-treated and control groups, and there was no association with the glycolytic system or pentose phosphate circuit. The polyP-induced decrease in intracellular ATP was also observed in the presence of cyclosporine A, an inhibitor of mitochondrial membrane permeability transition pore (mPTP) activity, suggesting that the polyP-induced decrease in ATP was caused by a pathway other than mPTP activity.

研究分野：放射線科学

キーワード：ポリリン酸 放射線感受性 ミトコンドリア アデノシン三リン酸

1. 研究開始当初の背景

本研究では、ポリリン酸で処理したヒト肺非小細胞癌由来細胞株 H1299 がどのようにミトコンドリアに作用して放射線感受性を増感させるのか、そのメカニズムを解明することを目標とした。ポリリン酸は無機リン酸が数個から数千個直鎖状に結合した生体内高分子であり、ヒトを含むほ乳類の様々な臓器、細胞内器官に局在する。長くマウスやヒト細胞での機能が未明であったが、近年ではポリリン酸による腫瘍の転移抑制効果(Han et al. Biochem J. 2007) が報告され、安全性の高い腫瘍治療薬としての期待が高まっている。

一方、我々の先行研究において、ポリリン酸で処理したヒト肺非小細胞癌由来細胞株 H1299 は、放射線感受性が高く、放射線照射後の細胞内 ATP 量の増加抑制がみられたことから(図1)、ポリリン酸が腫瘍に対する放射線感受性増感剤としての機能が期待された。ポリリン酸は、元来生体内に存在する高分子化合物であることから、生体親和性も高く、安全性の高い腫瘍治療薬となりうる可能性を秘めている。しかしながら、ポリリン酸がどのようなメカニズムで腫瘍の放射線感受性を高めているのか、その作用機序はわかっていない。

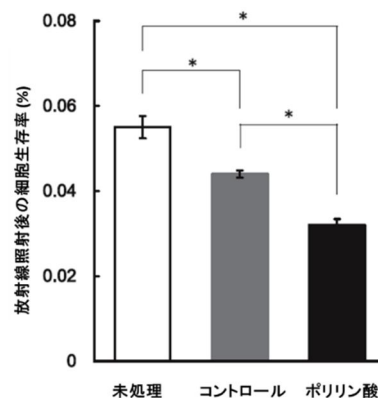


図1 ポリリン酸による放射線感受性増感作用

ポリリン酸は、カルシウム依存的にミトコンドリア機能を調節して細胞死を誘導することや(Abramov et al., PNAS 2007)、ミトコンドリア膜透過性遷移孔(mPTP)の開口をカルシウム依存的に制御すること(Solesio et al., Biochem Soc Trans. 2016, Elustondo et al., Cell Death Discov. 2016)などの重要な役割が報告されていることから、ポリリン酸が腫瘍のミトコンドリアに作用することで放射線感受性に影響を与えている可能性を考えられた。mPTPの開口制御は細胞のストレス耐性と密接に関連しており、カルシウムイオン依存的な開口によってはアポトーシスやネクローシスが誘導されることから、ポリリン酸がmPTPの開口に作用することで放射線感受性を高めている可能性は極めて高い。

ポリリン酸は放射線感受性を高めるだけでなく、腫瘍の転移抑制効果を併せ持つことが報告されている。また、生体内高分子であるため生体への安全性は高いため、ポリリン酸利用した新規放射線治療薬が期待される。本研究はその基礎研究に位置づけられる。

2. 研究の目的

本研究では、ポリリン酸が腫瘍細胞のATP代謝やミトコンドリア活性調節、ミトコンドリア膜透過性遷移孔の制御を介して放射線感受性を向上させる可能性を考え、ポリリン酸による放射線感受性制御メカニズムの解明を目標とした。本研究によって作用機序の詳細を明らかにすることが出来れば、ポリリン酸の放射線感受性増感剤として利用する基礎研究の大きな前進となる。

3. 研究の方法

ヒト肺非小細胞癌由来細胞株 H1299 とヒト神経膠芽腫由来細胞株 T98G を 1 mM の長鎖ポリリン酸(平均鎖長 120)で 24 時間前処理した。その後 10Gy 6 MV の X 線を照射し、放射線感受性をコロニー形成法によって評価した。ポリリン酸添加時の細胞増殖能は MTS アッセイ法により観察した。ミトコンドリア膜電位の変化は、Cell Meter™ JC-10 Mitochondrion Membrane Potential Assay Kit (AAT Bioquest) を用いて測定した。細胞内の ATP 量は Cell Titer Gro (Promega) によって 0-72 時間まで経時的に測定した。グルコース-6-リン酸脱水素酵素(G6PD)の活性はウェスタンブロット法によりリン酸化 G6PD の発現により観察した。乳酸分泌量を測定するための培養上清は 0-24 時間ごとに採取し、液体窒素で直ちに凍結したのち -80 で保存した。乳酸量は Lactate Colorimetric Assay Kit II (BioVision) を用いて比色的に測定した。培地に添加するピルビン酸は 1 mM とした。ミトコンドリア膜透過性遷移孔の活性阻害にはシクロスポリン A (CsA) を 200 nM 添加した。全ての実験におけるポリリン酸処理に対するコントロールとしてリン酸ナトリウム(Na-phosphate, pH6.8)を使用した。コントロールとしては、ポリリン酸、リン酸ナトリウムとも未添加のコントロールも用意した。

4. 研究成果

ポリリン酸処理後のヒト肺非小細胞癌由来細胞株 H1299 とヒト神経膠芽腫由来細胞株 T98G の細胞内 ATP 量はともにコントロールと比較して低下した (図 2)。放射線感受性増感効果については H1299 でのみ観察された。また、酵母由来ポリリン酸合成酵素を細胞質内で高発現させた H1299 においても放射線感受性が向上が観察された。細胞増殖能は、ポリリン酸処理の有無に関わらず経時的に増加した。以後、放射線感受性の向上がみられた H1299 でのみポリリン酸の影響を観察した。ポリリン酸処理による細胞内 ATP 量の変化はピルビン酸非依存的、ミトコンドリアの膜電位の変化はピルビン酸依存的であった。しかし、ミトコンドリア膜透過性遷移孔活性阻害剤シクロスポリン A (CsA) を添加してもポリリン酸処理後の ATP 量に差異はみられなかった (図 3)。ポリリン酸処理後 3 日目にミトコンドリア膜電位の低下がみられたが、培地中にピルビン酸を添加することによりポリリン酸処理細胞とコントロール細胞との間にミトコンドリア膜電位の差がみられなくなった。一方、ポリリン酸処理による細胞内 ATP 量の低下は培地中のピルビン酸の有無に関わらず低下を維持した。ポリリン酸による解糖系、ペントースリン酸回路への影響を検証した。グルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G6PD) 活性は、ピルビン酸の有無、ポリリン酸処理の有無に関わらずコントロール群との間に差は認められず、ペントースリン酸回路への影響はみられなかった。ポリリン酸処理細胞の乳酸分泌量をコントロール群と比較したが、差異は認められず解糖系への影響もみられなかった。

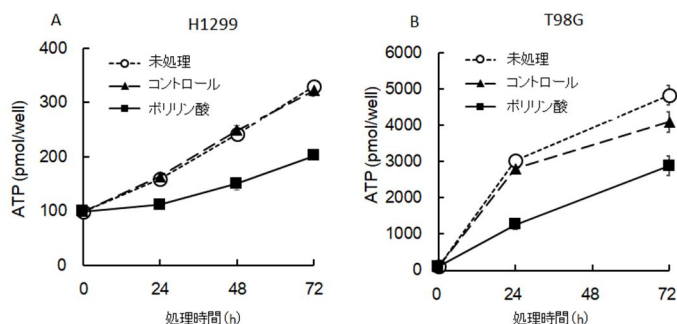


図 2 ポリリン酸処理後の細胞内 ATP 量の変化

以上、本研究課題により、細胞外からのポリリン酸処理はヒト肺非小細胞癌由来細胞株 H1299 の ATP 量の減少やミトコンドリア膜電位の低下を導き放射線感受性を向上させるが、解糖系やペントースリン酸回路には影響を与えないことを確認した。また、ポリリン酸による細胞内 ATP 量の低下はミトコンドリア膜透過性遷移孔 (mPTP) の活性調節を介さない経路に起因すると考えられた。

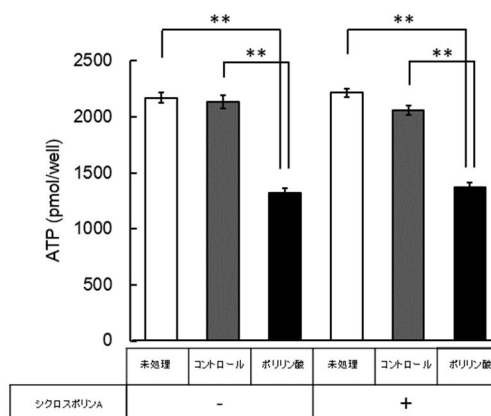


図 3 CsA 添加時の細胞内 ATP 量

ポリリン酸は放射線感受性を高めるだけでなく、腫瘍の転移抑制効果を併せ持つことが報告されている。今後の更なるメカニズムの解明により、ポリリン酸利用した効果的な放射線治療薬研究の発展が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------