

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：13401
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22591381
 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放射線増感とその分子メカニズムの解明
 研究課題名（英文） Radio-enhancement effects by Parthenolide, NF- κ B inhibitor, and analysis of these molecular mechanism.
 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 はヒト前立腺癌に対し有意な放射線及び温熱増感効果を示した。それは NF- κ B の上流において Ras/Raf/MAPK シグナリングの p38, ERK1/2, SAPK/JNK の 3 cascade を経由したアポトーシス或いは G₂M cell cycle の誘導に依るものであることを解明した。

研究成果の概要（英文）：

PTL showed significant radio- and thermo-sensitization in human prostate cancer cells. It was suggested that lethal damage of cells was due to the induction of apoptosis or G₂M cell cycle arrest via the 3 cascades to Ras/Raf/MAPK signaling upstream of NF- κ B.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

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：NF- κ B 阻害剤、パルテノライド、Apoptosis、
 ras/raf/MAPK、DU145 細胞

1. 研究開始当初の背景

死因 1 位の座を確固たるものとしている「癌」の克服は日本における重要な社会問題の一つである。また癌患者の多くは高齢であるため外科療法には無理があり、放射線療法を主とした集学的癌治療が行われる場合が多い。癌放射線治療及び癌化学療法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

学的癌治療が行われているが、その抗腫瘍効果増強のメカニズムについては臨床適用時の不確実要素が多く、科学的根拠に基づいた詳細な検討が必要である。生薬から抽出されたセスキテルペン類パルテノライドは転写因子 NF- κ B 活性を阻害する (Garcia-PAJ et al.: J. Biol. Chem. 276: 39713 - 20, 2001) ことが明らかにされており、抗癌剤として注目を集めている。し

かしながら、そのメカニズムについては種々の報告が蓄積されているものの未だ明らかにされていない部分が多い。

本研究の遂行により、NF- κ B 分子標的治療薬であるパルテノライド及び放射線の併用処理による作用機構及びその科学的基盤となる分子機序について、細胞増殖に深く関与している変異型 Ras/Raf におけるストレス応答性 MAPK 経路の抑制因子として働く JNK 及び p38 の関与を明らかにすることで、放射線治療抵抗性癌細胞に対する集学的癌治療法の確立に貢献することが可能となり急務の研究課題と考える。

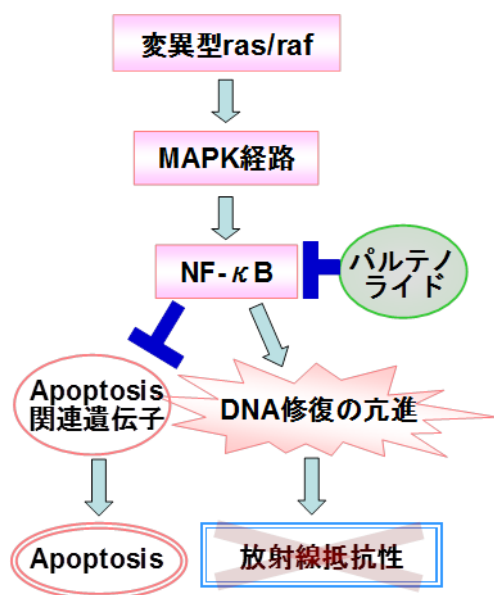


図1. 放射線感受性増強の分子メカニズム

2. 研究の目的

変異型 ras 遺伝子を保有する癌細胞は、PI3K/Raf を介した増殖シグナルにより異常増殖し放射線抵抗性の表現型を呈する。そのメカニズムの一つとして、変異型 Ras/Raf からのシグナルによって活性化された転写因子 NF- κ B による DNA 損傷修復能の亢進が考えられる。癌細胞の放射線抵抗性の克服のために、野生型 K-ras 遺伝子を保有したヒト頭頸部扁平上皮癌 HNSCC/wtK-ras 細胞、それ以外の遺伝的背景を同一にした DNA 組換え HNSCC/mK-ras 細胞及びそれらのヌードマウス移植腫瘍を用いて、NF- κ B 阻害剤パルテノライドにより Ras/Raf/MAPK を介した経路をブロックすることでアポトーシス誘導促進に作用する JNK 及び p38 カスケードにおける分子機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) HNSCC/wtK-ras 細胞、DNA 組換え変異型 K-ras 遺伝子導入した HNSCC/mK-ras 細胞及び A549/mK-ras 細胞を用い、パルテノライド単独処理による、(i) 抗腫瘍効果への JNK 及び p38 の関与を明らかにする、(ii) アポトーシス誘導への JNK 及び p38 の関与を明らかにする、(iii) NF- κ B の活性阻害作用への JNK 及び p38 の関与を明らかにする、(iv) Ras-Raf-1 シグナル伝達経路 (MAPK カスケード) への影響について検討し、この作用への JNK 及び p38 の関与を明らかにする、(v) パルテノライド/X 線併用処理後の上記 (i)~(iv) について検討し、パルテノライド/X 線併用処理による抗腫瘍効果・アポトーシス誘導・NF- κ B の活性阻害作用への JNK 及び p38 の役割及び変異型 K-ras 遺伝子の関与を明らかにする。また同時に対照として放射線 (X 線) 単回照射したサンプルを用いて (i)~(iv) について比較検討し、パルテノライドによる放射線増感効果の分子機構を明らかにする。

(2) 同様に、上記 (i)~(iv) 及び (v) を HNSCC/wtK-ras 細胞、その変異型 K-ras 遺伝子導入 HNSCC/mK-ras 細胞及び比較として A549/mK-ras 細胞株を用い、ヌードマウス移植系 (Xenograft モデル) を用いた in vivo 実験を行い、パルテノライドによる放射線増感効果及びその機構解明を行う。

4. 研究成果

細胞レベルの癌治療において温熱耐性が誘導される Step-up 加温 (42°C - 44°C) に先駆けて NF- κ B 阻害剤 Parthenolide (PTL) を前処理すると温熱耐性の出現を阻止し相乗的な温熱増感効果を示した。また FCM による Cell-cycle distribution から PTL と 44°C 加温との併用処理により Apoptosis の誘導動態はそれぞれの単独処理に比べ有意に増加した。同様に G2M arrest が増加し処理後 0, 12, 24, 48 時間の経時的観察では 24 時間で最大となり、48 時間後には減少した。一方、FCM で Apoptosis を表す sub-G1 の画分は処理後 48 時間で著しく増加した。このことから PTL と 44°C 加温との併用処理により G2M arrest が増加し、その後 G2M 期を経て sub-G1 に移行し Apoptosis が更に誘導されたと考えられる。Western blot analysis による ERK1/2 は同処理により殆ど活性化されなかった。一方、p38 及び SAPK/JNK は併用処理により僅かに活性化された。結論として PTL はヒト前立腺癌細胞において有意な増感効果を示した。そのことは細胞の致死効果が NF- κ B の上流の Ras/Raf/MAPK signaling の 3 経路、ERK1/2、SAPK/JNK 及び p38 の check point を経由し

て Apoptosis を誘導し、G₂M cell-cycle arrest から Apoptosis を行うことに依り致死効果を上げていることが示唆された。

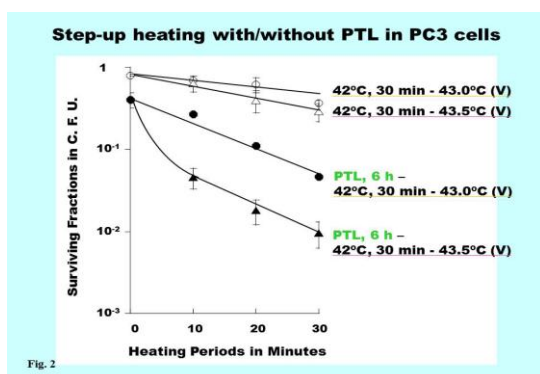


Fig. 2

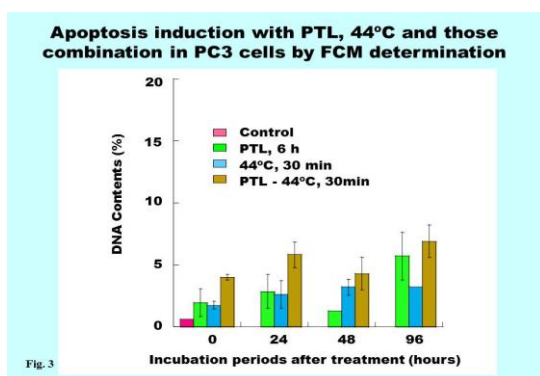


Fig. 3

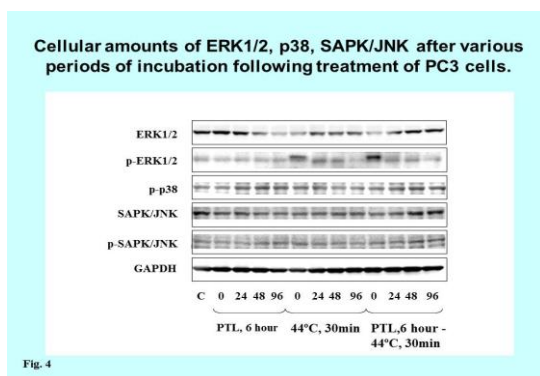


Fig. 4

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 SACHIKO HAYASHI, KEN KOSHIBA, MASANORI HATASHITA, TAKEFUMI SATO, YUTAKA JUJO, RYUTA SUZUKI, YUKIE TANAKA and HIROKI SHIOURA:

Thermosensitization and induction of apoptosis or cell-cycle arrest via the MAPK cascade by parthenolide, an NF- κ B inhibitor, in human prostate cancer androgen-independent cell lines. *International Journal of Molecular Medicine* 28: 1033-1042, 2011 査読有り

doi: 10.3892/ijmm.2011.760.

- ② SACHIKO HAYASHI, HIROAKI SAKURAI, AKIO HAYASHI, YUKIE TANAKA, MASANORI HATASHITA and HIROKI SHIOURA: 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. *International Journal of Molecular Medicine* 25: 81-87, 2010 査読有り

[学会発表] (計 7 件)

- ① 17th World Congress on Advances in Oncology & 15th International Symposium on Molecular Medicine. Sachiko Hayashi, Masanori Hatashita, Ken Koshiba, Takefumi Sato, Yutaka Jujo, Ryuta Suzuki, Hisaya Shiozaki: "Thermosensitization by parthenolide, a NF- κ B inhibitor, and apoptosis induction or cell-cycle arrest via the MAPK cascade." 2012. 10. 12. (Crete, Greece)
- ② 11th International Conference on Hyperthermic Oncology & 第 29 回日本ハイパーサーミア学会. Sachiko HAYASHI, Ken KOSHIBA, Hisaya SHIOZAKI, Masanori HATASHITA, Takefumi SATO, Yutaka JUJO, Ryuta SUZUKI: "Thermosensitization and induction of apoptosis or cell-cycle arrest via the MAPK cascade by parthenolide, an NF- κ B inhibitor, in human prostate cancer cell lines." 2012. 8. 30. (Kyoto)
- ③ 第 54 回日本放射線影響学会 林 幸子, 畑下昌範, 田中幸枝: "ヒト前立腺癌細胞における NF- κ B 阻害剤パルテノライドの温熱増感効果と MAPK cascade 経路 apoptosis 誘導及び cell-cycle arrest" 2011. 11. 18. (神戸)
- ④ 第 28 回日本ハイパーサーミア学会

林 幸子、畑下昌範、塩浦宏樹：” ヒト前立腺癌細胞におけるバルテノライドによる温熱増感効果と apoptosis 誘導及び cell-cycle arrest” 2011.9.9. (愛知)

- ⑤ 14th International Congress Radiation Research, Poland.
SACHIKO HAYASHI, MASANORI HATASHITA, HIROKI SHIOURA, and YUKIE TANAKA: “Enhancement of radiosensitivity by topoisomerase II inhibitor, amrubicin and amrubicinol, in human lung adenocarcinoma A549 cells and kinetics of apoptosis and necrosis induction” 2011.8.29. (Warsaw, Poland)
- ⑥ 第13回関西ハイパーサーミア研究会
林 幸子、畑下昌範、塩浦宏樹：” ヒト前立腺癌細胞におけるバルテノライドの温熱増感効果と apoptosis 誘導及び cell-cycle arrest.” 2011.7.2. (長岡京市)
- ⑦ 第53回日本放射線影響学会
林 幸子、畑下昌範、塩浦宏樹：” アンドロゲン非依存性前立腺癌細胞における NF- κ B 阻害剤 Parthenolide の温熱増感効果及び MAPK カスケードへの影響.” 2010.10.21. (京都)

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・高エネルギー研究センター・
准教授
研究者番号：40142377