

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591018

研究課題名(和文) 膵癌に対する診断・治療を目的としたナノ粒子によるバイオマーカーの確立

研究課題名(英文) Establishment of the biomarker with nanoparticles for the diagnosis and the treatment of pancreatic cancer

研究代表者

糸井 隆夫 (Itoi, Takao)

東京医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60338796

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：EGFR-TKIによるオートファジー誘導は細胞保護的に機能し、これをマクロライド化合物で阻害することで膵癌細胞死を誘導でき、chemo-sensitizerとしてのマクロライドの臨床使用の可能性が示唆された。その細胞死増強は、ERストレス負荷によるアポトーシスを想定していたが、アポトーシスはほとんど観察されず、ネクロプトーシスが誘導された。マクロライドのオートファジー阻害活性における分子標的の同定ならびにオートファジー阻害によるネクロプトーシス誘導の分子基盤は今後の検討課題である。

研究成果の概要(英文)：EGFR-TKI induced autophagy with a pro-survival role. The macrolides inhibiting the autophagy flux exhibited the enhanced cytotoxicity in pancreatic cancer cell lines. Therefore, it suggests the possibility of using macrolide as an autophagy inhibitor and a "chemosensitizer" for EGFR-TKI-therapy in pancreatic cancer patients. This pronounced cytotoxicity was not due to up-regulation of apoptosis induction but appeared to be mediated through necroptosis at least in part. It will be important to establish the underlying molecular mechanism of the enhanced non-apoptotic cell death as well as identification of the targets of macrolides.

研究分野：医歯薬学(消化器内科学)

キーワード：オートファジー 上皮成長因子受容体 マクロライド化合物 小胞体ストレス アポトーシス ネクロ
プトーシス 膵臓癌

1. 研究開始当初の背景

本研究は, gold/Cy3のナノ粒子(サイズ50-100nm)に抗 epidermal growth factor receptor(EGFR:上皮成長因子受容体)抗体で修飾を行い, 膵癌における細胞増殖抑制効果, オートファジー/アポトーシス誘導効果を観察し, そのオートファジー誘導の生物学的意義・シグナル伝達因子を解明し, より効率のよい治療法を確立することが当初の目的であった。しかし, 膵癌細胞株に対するナノ粒子の不安定性の問題から再現性のある実験が困難であり, この研究期間内に解決は困難と判断した。

我々は過去に, 肺癌細胞株に対してEGFR-TKIを添加培養することでオートファジーが誘導され, マクロライド系抗生剤であるクラリスロマイシン(CAM)併用することでオートファジーの後半のプロセスを抑制し, EGFR-TKIの殺細胞効果が増強されることを報告した。EGFRが過剰発現している膵癌細胞株に対しても, オートファジーの人為的制御による新規治療法の可能性を検証するとともに, その生物学的意義を明らかとするための研究プロジェクトに軌道修正を行った。

2. 研究の目的

- (1)膵癌細胞株に対するEGFR-TKIのオートファジー誘導能の検証
- (2)マクロライド化合物の膵癌細胞株に対するEGFR-TKIの殺細胞増強効果の検証
- (3)3種類のマクロライド化合物のオートファジー抑制効果の比較と,EGFR-TKIの殺細胞増強効果との相関性の検証
- (4)GEFとマクロライド化合物の併用療法とERストレス負荷を介したアポトーシスの検証

3. 研究の方法

- (1)種々の膵癌細胞株にEGFR-TKIであるGefitinib (GEF), Erlotinib (ERL)を添加

培養して殺細胞効果をCellTiter Blue, a cell viability assay kitを用いて定量的に評価を行った。またEGFR-TKIによるオートファジー誘導能を,LC3B抗体,lysosomal inhibitorを用いたWesterblotting法,電子顕微鏡による形態観察を用いて検証した。

(2)膵癌細胞株に3種類のマクロライド化合物であるクラリスロマイシン(CAM),アジスロマイシン(AZM),新規12員環マクロライド化合物であるEM900をGEFに加えて添加培養し,殺細胞効果の評価をCellTiter Blueで評価した。また,Westerblotting法を用いてマクロライド化合物のオートファジーの抑制能を検証し,3剤間の比較検討を行った。さらに,GFPを標識したLC3発現ベクターをK562(白血病細胞株)に転写して,GFP-LC3の凝集体数を共焦点レーザー顕微鏡で計測し,形態からもマクロライド化合物3剤間の比較を行った。

(3)GEFとマクロライド化合物添加培養によるERストレス負荷を,リアルタイムPCRを用いて評価した。またアポトーシス誘導の評価をCaspase抗体とPARP抗体を用いたWesterblotting法と電子顕微鏡による形態観察で評価した。

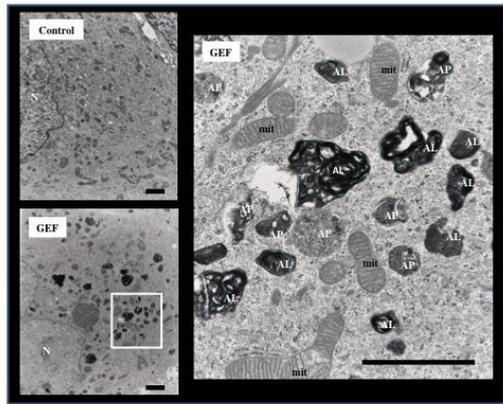
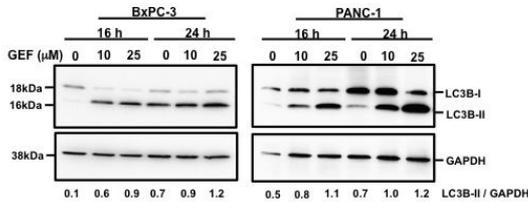
4. 研究成果

- (1)膵癌細胞株に対するEGFR-TKIの殺細胞効果

膵癌細胞株(PANC1,Capan-1,BxPC3)に対してEGFR-TKIであるGefitinib(GEF),Erlotinib(ERL)を種々の濃度で添加培養したところ,濃度依存性に殺細胞効果が認められた。その効果は,溶媒への溶解性の影響もありGEFの方が効果が強かったため,この後の実験においては主にGEFを使用した。

- (2)膵癌細胞株に対するGEFによるオートファジー誘導能

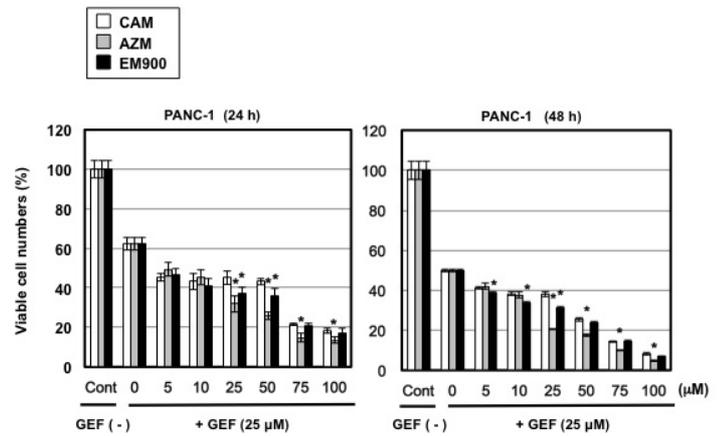
オートファゴソームの形成を LC3B-II の発現の増加で Westernblotting 法を用いて評価を行った。PANC1, BxPC3 において GEF を添加培養したところ、時間・濃度依存性に LC3B-II の発現が増加した。またオートファジー抑制する lysosomal inhibitors を併用するとさらに LC3B-II の発現が増加した。このことから GEF によるオートファジー誘導能が示唆された。さらに電子顕微鏡で形態観察を行うと、細胞質に分解処理されない数多くのオートファゴソームとオートリソソームの蓄積が認められた。



(3) 膵癌細胞株に対する EGFR-TKI とマクロライド併用による殺細胞効果の増強

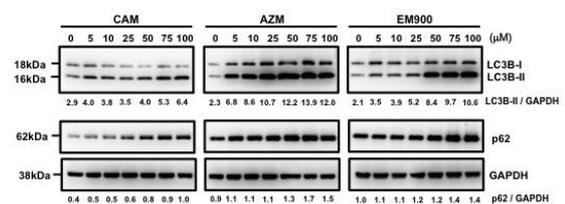
BxPC3 に3種類のマクロライド化合物であるクラリスロマイシン(CAM), アジスロマイシン(AZM), EM900 を 50μM 以下の濃度で添加培養するとほとんど細胞毒性は認められなかった。しかし, BxPC3, PANC1 に種々な濃度の GEF に3種のマクロライド (50μM) を併用すると GEF 単独より著明に殺細胞効果が増強された。その増強効果の強さは AZM, EM900, CAM の順であった。また GEF を 25μM に固定して種々な濃度のマク

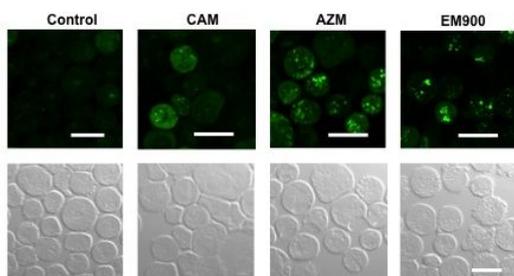
ロライド化合物を投与しても同様の結果であった。



(4) PANC1 細胞に対するマクロライド化合物のオートファジー抑制効果

PANC1 細胞にマクロライドを投与すると, LC3B-II の発現が増加する。しかし, lysosomal inhibitor を併用してもマクロライド単剤と比べて LC3B-II の発現は増加しない。この結果からマクロライド化合物はオートファジー抑制効果があると考えられる。次に, GAPDH でタンパク量の補正を行ってマクロライド3剤のオートファジー抑制効果の力価を比較すると, GEF の殺細胞増強効果と同様に AZM, EM900, CAM の順であった。さらにこのことを検証するために, GFP を標識した LC3 発現ベクターを K562(白血病細胞株)に転写して, 3剤のマクロライドで治療後に細胞質の GFP-LC3 の凝集体を共焦点レーザー顕微鏡で計測すると, 同様に凝集体の数は AZM, EM900, CAM の順であった。このことから, マクロライドによる GEF の殺細胞増強効果はオートファジー阻害活性によりもたらされているものと考えらる。

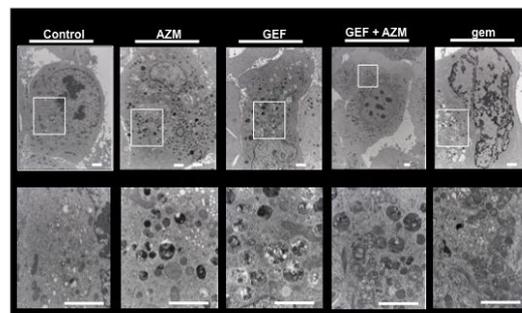




(5) 膵癌細胞株の GEF による非アポトーシス細胞死

次に GEF とマクロライド化合物を添加培養した後の ER ストレス負荷を評価した。ER ストレス負荷に関わる遺伝子である GRP78 と CHOP の発現を、リアルタイム PCR を用いて評価を行った。GEF を添加培養すると ER ストレス負荷が増加していたが、マクロライド化合物を併用しても大きな変化は認められず、マクロライド 3 剤間の比較でもオートファジー阻害活性との相関性を認めなかった。顕微鏡で形態観察を行うと、PANC1 細胞に DNA 阻害剤であるゲムシタピンを投与するとアポトーシスを示唆するクロマチンの凝集、核の断片化が認められるが、GEF とマクロライドを投与してもアポトーシスを示唆する核の変化が認められなかった。むしろミトコンドリアの膨化、オートファゴソームの蓄積など細胞質の変化が強くネクローシスによる細胞死が示唆される形態であった。アポトーシスを示唆する caspase-3 や PARP の発現がまったく認められないことから非アポトーシスによる細胞死が明らかとなった。Caspase 阻害剤である Z-VAD を投与しても GEF とマクロライドの細胞死が抑制されないことから非アポトーシスによる細胞死が示唆される。さらに RIP-1 阻害剤である necrostatin-1 を投与するとその細胞死が抑制されることからプログラムされたネクローシスであるネクロポトーシスによる細胞死が誘導されている可能性が示唆

された。



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 0 件)

* 現在投稿準備中

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

糸井 隆夫 (ITOI TAKAO)
東京医科大学・医学部・准教授
研究者番号：60338796

(2) 研究分担者

宮澤 啓介 (MIYAZAWA KEISUKE)
東京医科大学・医学部・教授
研究者番号：50209897
横山 智央 (YOKOYAMA TOMOHISA)
東京医科大学・医学部・兼任講師
研究者番号：40408240