

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：18001

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24792004

研究課題名(和文) 癌治療後に誘起される後発転移活性化機構の解明

研究課題名(英文) The analysis of developing metastasis induced by cancer treatment

研究代表者

喜名 振一郎(KINA, Shinichiro)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40422422

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)：何十年にもわたって、抗がん剤治療の主流は白金系薬剤であった。しかしながら、抗がん剤治療は、使用するにつれ抗がん剤耐性化が生じ、最終的にはきかなくなってしまう。我々は、血小板成長因子受容体PDGFRがHGF受容体であるMet蛋白質の発現上昇を促すことで、抗がん剤耐性化に関与していることを見出した。抗がん剤治療依存的にMet蛋白質の発現が上昇する。抗がん剤とPDGF受容体阻害剤を併用することで、抗がん剤単独と比較して、有意な癌細胞死の上昇が確認された。PDGF受容体阻害剤は、臨床分野で幅広く使用されており、従来の白金系抗がん剤と併用することで、抗がん剤耐性化を阻止する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：For decades, platinum drugs have been the mainstay of cancer treatment. However, over time, drug resistance develops, leaving few treatment options. Here we show that platelet-derived growth factor receptor (PDGF receptor) plays a key role in chemotherapy resistance by upregulating HGF (Hepatocyte Growth Factor) receptor protein (Met). Chemotherapy induced Met protein expression in cancer cells. Chemotherapy-induced Met protein upregulation is inhibited by PDGF receptor inhibitor Imatinib. Chemotherapy induced PDGF receptor tyrosine phosphorylation. PDGF receptor inhibition significantly increased chemotherapy-induced cancer death. PDGF receptor inhibitors are widely used in clinical settings, suggesting that the clinical translation of our findings could reduce the suffering of people from drug resistance.

研究分野：腫瘍分子生物学

キーワード：抗がん剤耐性

1. 研究開始当初の背景

癌治療や放射線治療の際に生じる活性酸素は癌の再発や、進展に関与していると推察されている。そのため、癌治療後に生じる活性酸素がどのようにして癌の再発、進展を促すかを解明することは、癌治療後の再発や進展を予防したり、再発後の治療戦略を検討するうえで重要な課題である。

癌治療の際に生じる活性酸素は、癌細胞にアポトーシスを誘導するのみならず、生存シグナルも誘起する。その生存シグナルが誘起される経路の一つに活性酸素依存的な受容体型チロシンキナーゼの活性化があげられる。これまで、抗がん剤依存的に活性化される受容体型チロシンキナーゼとしては、EGFR が有名である。我々は、受容体型チロシンキナーゼの一つである、PDGFR も活性酸素依存的に活性化されることに注目して、抗がん剤依存的に PDGFR が活性化されないか、されるとしたら、その生理的意義はどのようなものであるかを詳細に検討した。

2. 研究の目的

現在、癌治療で使用されている放射線や CDDP 等の抗がん剤の多くは活性酸素を利用して癌細胞にアポトーシスを誘導する。しかしながら、活性酸素はアポトーシスのみならず、後発転移に関与する様々な癌進展経路も誘導する(1)。そのため、活性酸素依存的にどのような後発転移活性化経路が誘導されるかということの解明することは、癌治療において重要な課題である。本研究では、放射線や抗がん剤など活性酸素を利用した癌治療を施行するうえでいかなる分子の活性化を抑制すれば癌治療依存的な後発転移を制御することができるかを見出すことを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 活性酸素依存的に活性化される受容体型チロシンキナーゼを探索した。抗がん剤としてはシスプラチン(CDDP)を使用した。活性酸素としては、過酸化水素を用いた。

(2) 癌細胞としては、酸化ストレス耐性であることが報告されている子宮頸がん細胞株を使用した。癌細胞を CDDP や過酸化水素で刺激して、どのような受容体型チロシンキナーゼ活性化されるか検討した。細胞内活性酸素の計測には、DCF 法を用いた。

(3) 癌細胞を 96 ウェルプレートで培養した。CDDP 曝露後、48 時間後 MTT を添加した。培地を除去した後、DMSO を加えた。その後 570nm の吸光度を計測した。癌細胞の生存数を吸光度の値をもとに比較した。

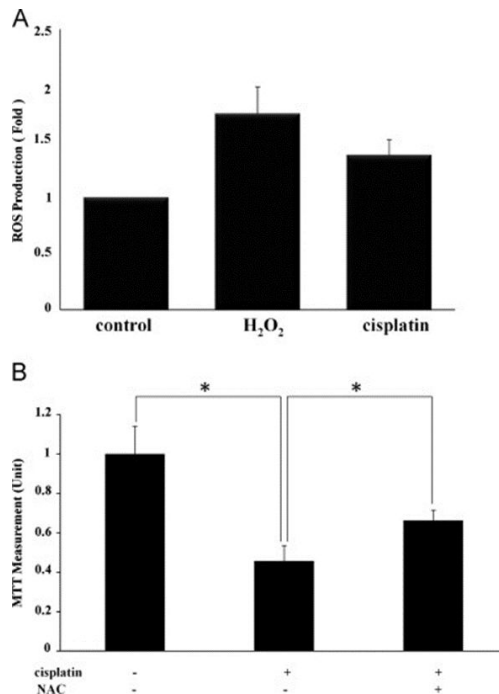
(4) 抗癌剤や活性酸素で刺激を加えた後、癌細胞を RIPA バッファーで可溶化した。可溶化したサンプルをアクリルアミドゲル

にて電気泳動後、ニトロセルロース膜に転写してウェスタンブロットを行った。シグナルは、LAS4000 を用いて検出し、内部標準として α -アクチンを用いた。

(5) PDGF 受容体を抗 PDGF 受容体抗体を使用して、免疫共沈した。免疫共沈物をアクリルアミドゲルにて電気泳動後、ニトロセルロース膜に転写した。チロシンリン酸化をチロシンリン酸化抗体(4G10)を用いて検出した。免疫共沈の効率は、抗 PDGF 受容体の量を検討することで行った。

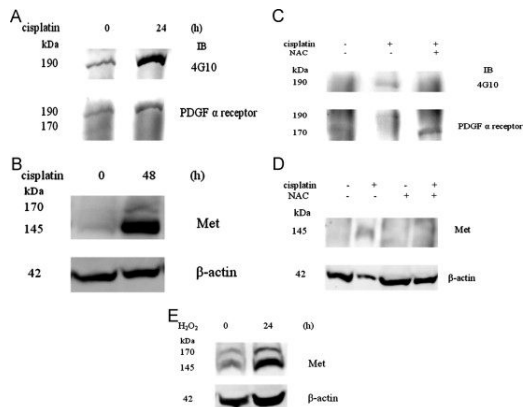
4. 研究成果

(1) 抗がん剤であるシスプラチンに曝露された子宮頸がん細胞株 SiHa 細胞中で、2', 7'-dichlorodihydrofluorescein (DCF), が増大し、細胞内で活性酸素の量が増大していることを確認した。抗酸化剤である NAC をシスプラチン曝露前に添加しておく、シスプラチン依存的な癌細胞死が有意に抑制されることを確認した。これらのことより、抗がん剤曝露後に生じる活性酸素は、癌細胞死を誘導していることが判明した。

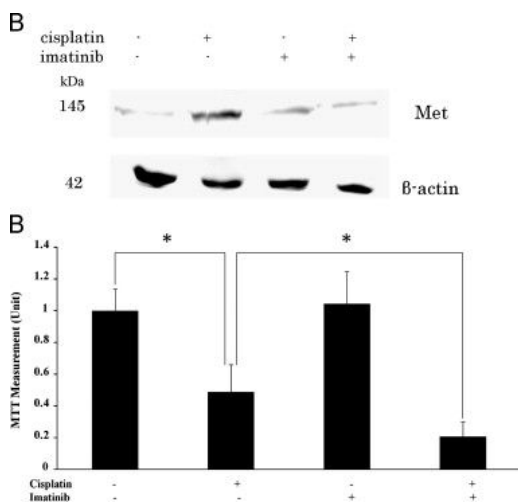


(2) シスプラチン曝露依存的に PDGF 受容体が活性化され、HGF 受容体(Met) の発現が上昇することを確認した。シスプラチンを癌細胞に曝露した後、PDGFR のチロシンリン酸化レベルを観察すると、チロシンリン酸化の上昇が確認できた。シスプラチン曝露依存的な Met タンパクの発現上昇は、抗酸化剤である NAC を前処理することで抑制された。過酸化水素刺激依存的に Met タンパクが発現上昇することも確認できた。これらのことより、抗がん剤(CDDP)曝露後に

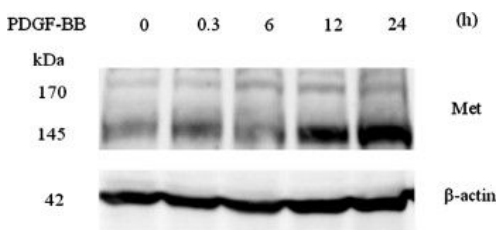
生じる細胞内活性酸素の増大が、種々の受容体型チロシンキナーゼの活性化や、発現上昇を誘導していることが判明した。



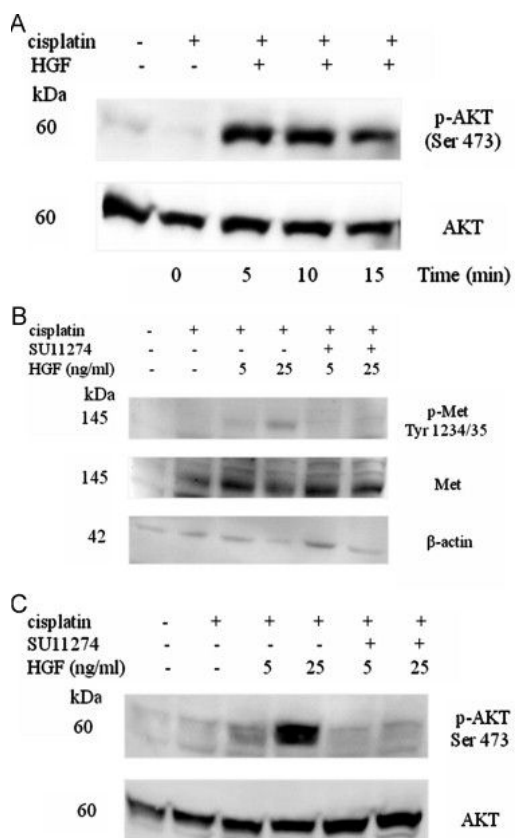
(3) シスプラチン依存性な Met タンパクの発現上昇は、PDGF 受容体阻害剤である imatinib により抑制された。PDGF 受容体阻害剤である imatinib をシスプラチンと一緒に併用すると、シスプラチン単独と比較して、有意に細胞死が増大した。これらの結果より、抗がん剤依存性な PDGF 受容体の活性化は、Met タンパクの発現上昇と、細胞の生存に寄与していることが判明した。



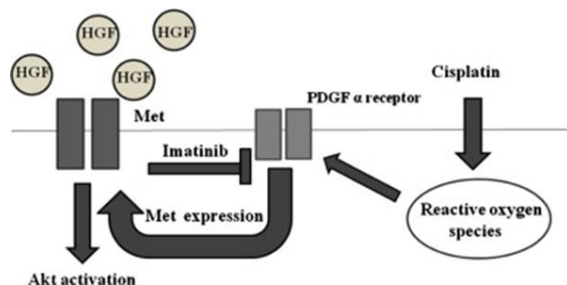
(4) PDGF 受容体のリガンドである PDGF-BB 刺激依存的に Met タンパク質の発現が上昇することを確認した。



(5) シスプラチン依存的に発現上昇した Met の活性化には、細胞外からの HGF の供給が必要であることが判明した。シスプラチン曝露後には、HGF が培地中に存在しない場合には、Akt のリン酸化は観察されなかった。HGF 依存性な Met のチロシンリン酸化は、Met 阻害剤により抑制された。シスプラチン曝露依存性な Akt のリン酸化は、Met 阻害剤により抑制された。これらのことから、シスプラチン曝露依存的に生じる HGF-Met 経路の活性化には、細胞外からの HGF の供給が必要であることが判明した。



本研究の結果、下図のような経路が存在していることが示唆された。



抗癌剤耐性化の過程では、抗がん剤曝露後に生じる活性酸素濃度の上昇の結果、Met タンパクの発現上昇が誘導される。その後、腫瘍周囲から提供される HGF があって初めて癌細胞の活性化(Akt 経路の活性化)が生じるこ

とが推察された。

(6) 今後の展望

PDGF 受容体阻害剤 imatinib は、臨床分野で幅広く使用されている分子標的薬である。そのため、使用することでどのような有害事象が発生するか、またその場合にどのような対応をすべきであるかという点に関しては、臨床上十分な知見の蓄積がなされている。今後、抗がん剤耐性を抑制する治療戦略を構築するうえで、シスプラチンと imatinib を併用することは、他の新たな分子標的薬を併用する戦略と比較して、大変なメリットがあると推察される。

<引用文献>

(1) Federica Sotgia, Ubaldo E Martinez-Outschoorn and Michael P Lisanti "Mitochondrial oxidative stress drives tumor progression and metastasis: should we use antioxidants as a key component of cancer treatment and prevention? BMC Medicine 2011, 9:62

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 1 件)

1 Shinichiro Kina, Thongsavanh Phonaphonh, Feixin Liang, Hai Kuang, Akira Arasaki, Keiichi Arakaki, Toshiyuki Nakasone, Hajime Sunakawa, "PDGF receptor is a mediator for Cisplatin-induced Met expression", European Journal of Pharmacology. 査読あり、Volume 699, Issues 1-3, 15 January 2013, Pages 227-232

〔学会発表〕(計 2 件)

1 喜名 振一郎、仲宗根 利幸、牧志 祥子、又吉 亮、丸山 哲昇、新崎 章、「舌癌に対する術前化学療法」日本口腔外科学会 2014 10/17-10/19 千葉県 幕張メッセ

2 喜名 振一郎、梁飛新、Thongsavanh PHONAPHONH、新崎章、「PDGF 受容体は、シスプラチン依存的な Met の発現誘導に關与する」日本頭頸部癌学会 2013 6/13-14 東京 京王プラザホテル

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ryukyu-oms.jp/index.jsp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

喜名 振一郎 (KINA, Shinichiro)
琉球大学大学院・医学研究科・助教
研究者番号：40422422

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：