

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06175

研究課題名(和文) グルタチオン感受性蛍光プローブを用いた頭頸部癌における酸化ストレス耐性機構の解明

研究課題名(英文) Research of oxidative stress tolerance mechanism in head and neck cancer using glutathione-sensitive fluorescent probes

研究代表者

吉田 昌史 (Yoshida, Masafumi)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80396754

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：グルタチオン(GSH)という生体における主たる抗酸化物質をターゲットとした蛍光プローブの開発を行った。既存のプローブの問題点解決のため可逆的な蛍光制御機構を有するFRET型の蛍光プローブQuicGSHシリーズを開発した。本プローブを用いたイメージングにより培養細胞内のGSHの定量に加え、過酸化水素負荷によるGSH低下及び回復の様子をリアルタイムに測定可能とするなど酸化ストレス耐性機構に関する新たな知見が得られた。本研究で得られた知見をもとにがん細胞の治療抵抗性のさらなる解明や治療への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：We developed fluorescent probe targeted for glutathione (GSH). To overcome the problems of existing probes, we developed the FRET type fluorescent probe, named QuicGSH series, using a reversible fluorescence control mechanism. In addition to the quantification of GSH in cultured cells, new findings on oxidative stress tolerance mechanism were achieved. Based on the findings obtained in this study, further elucidate the resistance to treatment of cancer cells and application for cancer therapy are expected.

研究分野：頭頸部外科学

キーワード：頭頸部癌 酸化ストレス 蛍光イメージング

1. 研究開始当初の背景

癌の治療抵抗性の一因に酸化ストレス耐性が知られている。すなわち癌細胞は細胞内の主たる還元剤であるグルタチオン(GSH)を正常細胞より高濃度に維持しており、これにより放射線や化学療法への抵抗性を有するとされているが、この酸化ストレス耐性の維持機構に関しては不明な点が多いのが現状である。この機構を解明し酸化ストレス耐性を制御することにより、がん治療へと応用できる可能性がある」と期待される。

2. 研究の目的

GSH をターゲットとした蛍光プローブを開発し、蛍光イメージングにより癌細胞、特に頭頸部癌細胞におけるレドックス状態の評価を行うとともに酸化ストレス耐性機構の解明を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

既存の蛍光プローブでは GSH 濃度の定量及びリアルタイムでの観察が困難であったため、まずは上記測定を可能とする GSH 感受性蛍光プローブの開発を行い、これを用いたイメージング実験により種々の解析を行った。FRET 型蛍光プローブによる解析は、2つの蛍光波長の比をとって画像化し、GSH 溶液中での測定をもとに作成した検量線から細胞内 GSH 濃度を推定することとした。

4. 研究成果

先行研究にて開発されていた可逆的な蛍光制御機構を有する FRET 型グルタチオン感受性蛍光プローブ(Quic GSH(QG)0.6 と命名)をもとに癌細胞の GSH 濃度に適したダイナミックレンジを有する新規蛍光プローブ QG3.0 を開発し、イメージング実験条件の最適化を図った(プローブ名の 0.6, 3.0 はそれぞれのプローブの GSH との解離定数 $K_{d,GSH}$ がそれぞれ 0.6mM, 3.0mM であることを示している)。

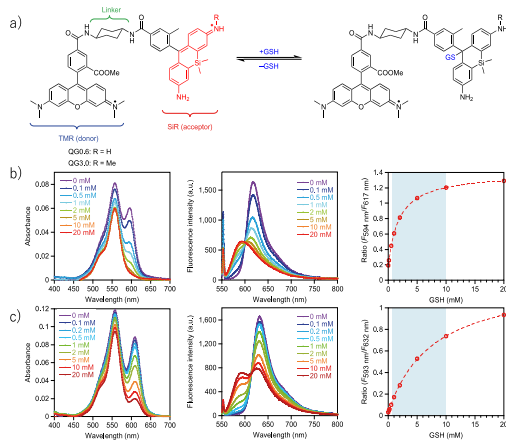


図1 新規蛍光プローブ QG0.6/3.0

QG3.0 を用いて培養細胞系にてイメージング実験を行い、以下の知見を得た。

・培養細胞中の GSH の定量

図のごとく種々の培養細胞によって GSH 濃度は異なる結果となった。GSH 濃度が高い A549、SHIN3 は GSH 代謝酵素である GGT 活性が高いことが先行研究で示されており、GGT 活性が GSH 濃度維持に重要であることが示唆された。またイメージング結果より同じ培養細胞においても細胞によって GSH 濃度が異なるという結果が得られ、細胞レベルでの GSH 濃度の違いを検出できているものと考えられた。

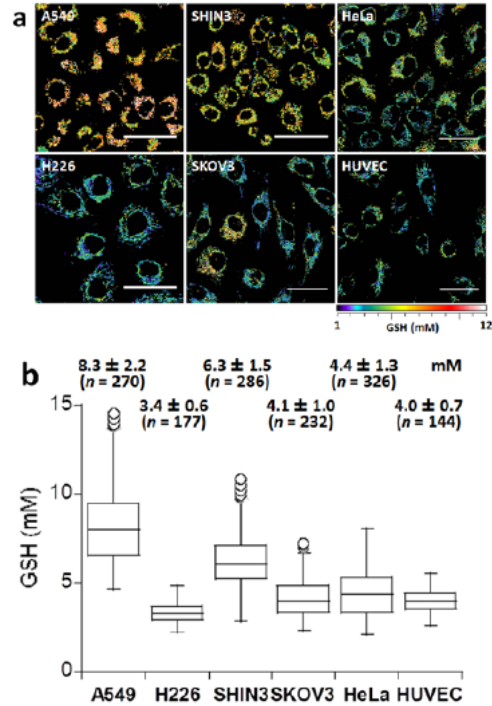


図2 培養細胞における GSH 濃度の定量

・過酸化水素負荷条件での GSH 濃度変化及び回復過程の観察

実験的に酸化ストレス負荷をかける条件として培養細胞の培地中に過酸化水素を添加して GSH 濃度の変化を観察した。結果 A549 細胞、HUVEC 細胞(正常細胞)ともに過酸化水素負荷により速やかに GSH 濃度が低下したが、これを washout すると A549 細胞の方が速やかに GSH の回復が起こることが明らかになった。これは参加されて GSSG となった GSH がグルタチオン還元酵素(GR)により再び GSH となる過程を見ているものと考えられ、GR の阻害剤である BCNU を添加した場合には回復がほとんど起きないことからこのことが裏付けられた。すなわち GSH と GSSG の平衡は非常に早い時間単位で維持されていることが明らかとなり、これは急な参加ストレスに対する対応が可能とするための機構と考えられた。

・グルコース代謝と GSH 濃度維持との関連

癌細胞はエネルギー源として主にグルコースを利用しており、酸素が十分にある状況でも嫌氣的解糖系が優位に働いていることが知られている(ワールブルグ効果)。糖の取り込みを利用した FDG-PET 検査は癌の検出に臨床に

において広く利用されている。頭頸部癌は FDG-PET は特に有用なことが多く、よりこの傾向が強いと考えられる。嫌氣的解糖系により生じた NADPH は GSSG を GSH に加減するのに使われており、GSH 濃度維持に重要と考えられたそこで培地中のグルコース濃度を変化させて GSH 濃度をモニタリングした。A549 細胞及び舌癌由来である HSC-2 細胞を用いて実験を行った結果、グルコースを枯渇させると数分のオーダーで GSH 濃度の低下がみられ、グルコース濃度を戻すと速やかに回復する過程が見て取れた。

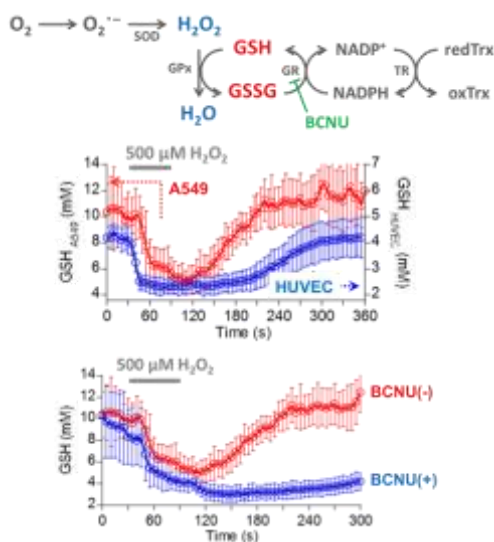


図3 過酸化水素負荷時の GSH 濃度変化

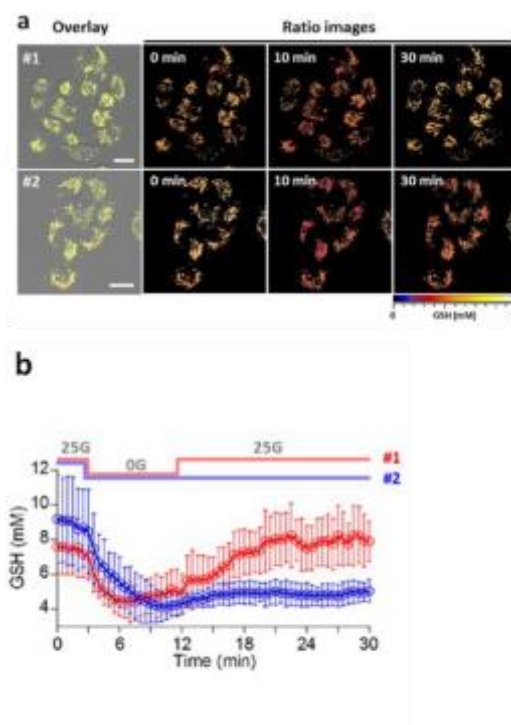


図4 A549細胞におけるグルコース濃度変化条件下での GSH 濃度の測定

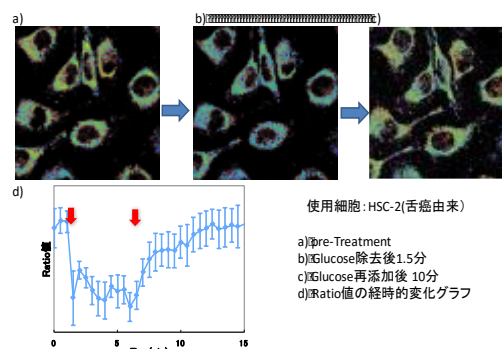


図5 HSC-2 細胞におけるグルコース濃度変化条件下での GSH 濃度の測定

まとめ

本研究による成果として、新規に開発した GSH 感受性蛍光プローブを用いたイメージング実験により癌細胞の GSH 濃度維持機構に関して新たな知見が得られた。GSH 濃度のバランスは秒～分のオーダーという早い時間で変化することが分かり、これは急な参加ストレスの変化に対応するためと考えられた。また GGT 活性と GSH 濃度との関連やグルタチオン還元酵素の活性が正常細胞に比して癌細胞において亢進していることなど、治療のターゲットとしての候補も見いだすことができた。本研究で得られた知見をもとに研究を継続することにより、癌細胞の酸化ストレス耐性維持機構のさらなる解明及び治療への応用が期待される。

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)

Keitaro Umezawa, Masafumi Yoshida (equal contribution), Mako Kamiya, Tatsuya Yamasoba & Yasuteru Urano Rational design of reversible fluorescent probes for live-cell imaging and quantification of fast glutathione dynamics.

Nature Chemistry 9, 279-286 (2017)

[学会発表] (計 2 件)

1. 吉田昌史 齊藤祐毅 安藤瑞生 山唄達也 DPP-4 をターゲットとした癌特異的蛍光プローブによる頭頸部癌検出法の有用性の検討 第 40 回日本頭頸部癌学会 2016 年 6 月 9 日 大宮ソニックシティ (埼玉県・さいたま市)

2. 吉田昌史 齊藤祐毅 安藤瑞生 山唄達也 可逆的な蛍光制御機構による FRET 型新規グルタチオン感受性蛍光プローブの開発と頭頸部癌への適用 第 117 回日本耳鼻咽喉科学会通常総会・学術講演会 2016 年 5 月 19 日

名古屋国際会議場（愛知県・名古屋市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 昌史 (YOSHIDA, Masafumi)

(東京大学・医学部附属病院・講師)

研究者番号：80396754

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

浦野 泰照 (URANO, Yasuteru)