

令和元年6月11日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K00537

研究課題名(和文)植物由来化合物ピペロングミンによる活性酸素種代謝異常と腫瘍細胞特異的致死の解析

研究課題名(英文) Analysis of neoplastic cell-specific fatal effects with reactive oxygen species abnormality derived from compound from plant species, piperlongumine

研究代表者

田野 恵三 (Tano, Keizo)

京都大学・複合原子力科学研究所・准教授

研究者番号：00183468

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ピペロングミンの腫瘍細胞特異的致死効果について、DT40のDNA修復遺伝子破壊細胞を用いて解析し、ピペロングミンが種々のDNA損傷を誘発し、二本鎖切断相同組み換え修復も阻害することを見出した。また、腫瘍細胞微細環境の低酸素下でのチラパザミンの作用について同様の解析を行った。チラパザミンによるDNA損傷はTopoisomerase-DNA複合体によるものであることを確認し、DNA-Ligase反応における異常中間体5'-AMP-DNAによる損傷の可能性も示唆され、これら損傷誘発が低酸素特異的な構造変化によること、それに伴う酸化ストレスの増加によるDNA酸化損傷で致死効果が増大することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍細胞特異的な致死効果を持つピペロングミンの解析結果は、正常細胞への影響を最小限に抑える新規抗がん剤の開発に繋がることが期待される。また、腫瘍細胞特有の微細環境(低グルコースや低酸素)に着目し、その環境下でのみ細胞致死効果が得られる薬剤の探索も同様の意義を持つと考える。低酸素下で特異的な致死効果をもたらすチラパザミンが、細胞内活性酸素種のアンバランスによりDNA損傷を誘発するとの結果は、腫瘍細胞内微細環境を利用した新規抗がん剤のスクリーニングにヒントを与えるものである。

研究成果の概要(英文)：We assessed genotoxic potentials of Piperlongumine (PL) and Tirapazamine (TPZ) by utilizing DT40 cell lines. Our result showed that PL sensitized the cells deficient in homologous recombination related genes. The increase in frequency of the chromosome breaks and the accumulation of the Rad51 protein to chromatin were observed. It indicates that PL is a clastogenic and cytotoxic chemical that induces DSBs. TPZ is converted to a radical intermediate in hypoxia and this intermediate interacts with intracellular macromolecules including DNA, tdp1, tdp2, parp1, and aptx1 cells displayed hyper-sensitivity to TPZ only in hypoxic conditions. These suggest that the accumulations of topo I or topo II-trapped DNA complex and abortive ligation products with 3'-AMP are the potential cause of TPZ-induced killing of hypoxic cells. We conclude that TPZ induces oxidative DNA damage both in normoxia and hypoxia, and introduces abortive topo-DNA complexes and unligatable DNA ends selectively in hypoxia.

研究分野：放射線生物学

キーワード：DNA損傷修復 細胞内微細環境 活性酸素種

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Raji らは、Piperlongumine (PL) による癌細胞特異的な致死効果と細胞内活性酸素種 (ROS) の増加を報告した (Nature 475, 231-234 2011)。申請者らは、DNA 損傷誘発応答に焦点を当て、ニワトリリンパ細胞由来の DT40 細胞の遺伝子損傷修復関連遺伝子欠損細胞パネルを用いて以下の点を明らかにした。1) PL が DNA 二重鎖切断 (DSB) を誘発すること、2) その切断修復のための相同組換え (HR) をも阻害すること、3) 家族性乳がん原因遺伝子の一つである BRCA1 の欠損細胞で高感受性を示すことを見出した (Genes Cancer, 2014)。これらは抗癌剤、放射線治療用増感剤としての PL の可能性を示唆した。

2. 研究の目的

1) PL による DSB 誘発と HR 阻害の作用機構を分析し、癌細胞への選択的致死効果との因果関係を明らかにすることを目的とする。

2) さらに ROS の増加が、どのようなシグナルを通じて DNA 損傷経路にインパクトを与えるかを検証し、さらに腫瘍細胞内の微細環境下で PL と同様に細胞内 ROS の増加を伴い腫瘍細胞特異的な致死効果をもたらす薬剤の探索を目的とする。

これらの目的の初期設定は PL による抗癌作用の検証実験に留まらず、正常細胞と腫瘍細胞における細胞内 ROS 制御機構の相違点についても基礎的な知見を得るものとして期待できると考えた。

3. 研究の方法

主に2つのアプローチを試みた。

1) 永澤らによる新規 PL 様作用薬剤の合成検索と既存の薬剤の中からの PL 様薬剤の検索

PL の分子構造のうち、C2-C3 Olefin が ROS の産生と細胞毒性に関わるとの報告がある。しかしながらこれらをベースとした新規合成は出来なかった。既存の薬剤の中で腫瘍細胞特異的な致死効果が期待できる薬剤の検索を試みた。

2) PL の作用機序の解析と新規 PL 様物質の作用機序の比較

PL の作用機序については申請者が既に報告した特徴的な新規の経路の探索及び既存の薬剤の中で腫瘍細胞特異的な致死性を示す作用機序の検索を試みた。

4. 研究成果

1) Tirapazamine (TPZ) は低酸素下 DNA 損傷を伴う特異的な致死効果を示す。

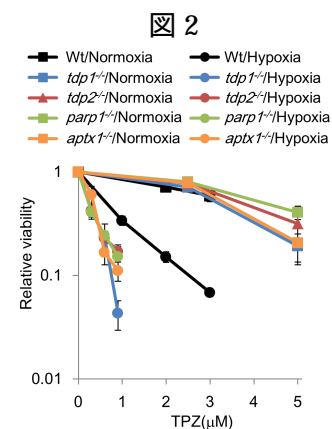
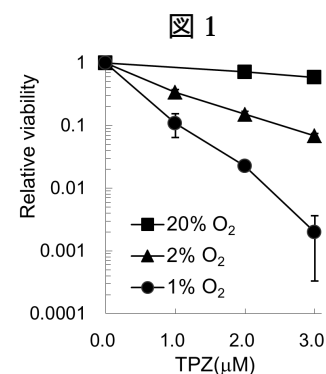
腫瘍細胞微細環境の一つである低酸素下で細胞致死効果を示す薬剤は腫瘍細胞特異的な致死効果が期待できる。TPZ は通常培養状態 (20 パーセント酸素分圧) に比べて、低酸素分圧濃度に依存して致死効果が増加するのを見出した (図 1)。

さらに低酸素下 (2 パーセント酸素分圧) で TPZ を処理することにより処理濃度に依存して DNA 損傷 (染色体断裂) を生じるのを見出した。これらの一連の結果はチラパザミンが低酸素下で DNA 損傷を生じることで細胞死を誘発することを示唆している。

2) 低酸素下で TPZ は種々の DNA 損傷を誘発する。

低酸素下での DNA 損傷依存的な致死効果を解析するためにニワトリ DT40 細胞の DNA 損傷修復遺伝子欠損細胞パネルを用いて解析した。DNA 損傷修復経路の中で特に TDP1、TDP2 (Topo-DNA タンパククロスリンク損傷修復遺伝子) 及び APTX1 (DNA リガーゼ異常中間体産物 5' -AMP-DNA 末端の修復遺伝子) の欠損細胞で強い感受性を示した (図 2)。これら欠損細胞での低酸素下特異的な DNA 鎖誘発をアルカリコメットで確認した。

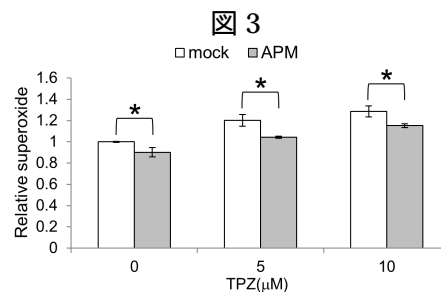
3) TPZ は PL と同様に低酸素下で細胞内 ROS ストレスを増加させる。



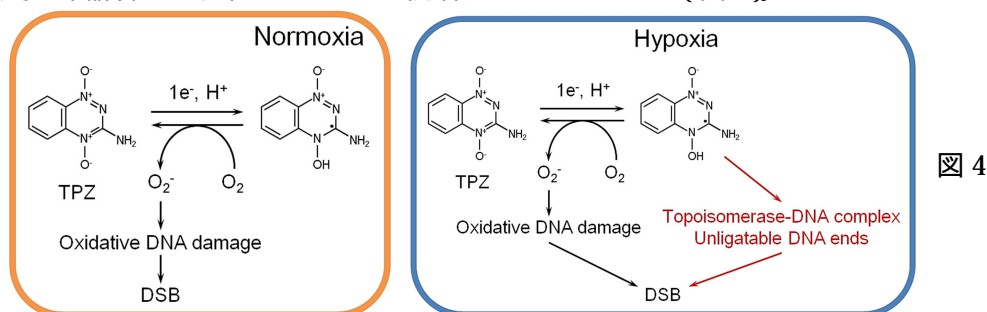
TPZ による細胞内 ROS の挙動を細胞質の総 ROS 及びミトコンドリア由来の ROS である SOD 量を CeIIROX と Bes-So-AM を用いて定量を試みた。両者とも通常酸素圧下に比べて TPZ の処理濃度に依存して有意に上がっていた。

4) TPZ による低酸素特異的致死効果は ROS の増加に依存している。

申請者らは既にアスコルビン酸ナトリウム (APM) が細胞内総 ROS 量及び細胞質起因、ミトコンドリア起源の SOD 量を抑制できること、さらにこれらを抑制することで細胞死を免れることを報告している (文献)。TPZ の細胞死をアスコルビン酸で抑制できるか解析した。アスコルビン酸存在したでは低酸素下でもミトコンドリア由来の SOD の増加を有意に抑制できた (図 3)。さらに APM 存在下では細胞致死効果も低酸素状態で抑制することを見出した。以上の結果より、TPZ も PL と同様に細胞内 ROS 環境を錯乱することで細胞致死効果を生じさせることが明らかになった。また TPZ が腫瘍細胞の微細環境の一つである低酸素環境を利用して細胞死を誘発できることから、腫瘍細胞特異的環境を利用した制がん剤の有効性を示唆した。



最終的に申請者らは以下のスキームを提唱することができた (図 4)。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

Masunaga S, Kobayashi J, Tano K, Sanada Y, Suzuki M and Ono K, The Effect of p53 Status on Radio-Sensitivity of Quiescent Tumor Cell Population Irradiated With γ -Rays at Various Dose Rates., *J. Clin. Med. Res., J. Dermatol.*, 10(11), 815-821, 2018
DOI: 10.14740/jocmr3610w

Masunaga S, Tano K, Sanada Y, Sakurai Y, Tanaka H, Suzuki M, Kondo N, Watanabe T, Takata T, Maruhashi A and Ono K, Effect of Tirapazamine, Metformin or Mild Hyperthermia on Recovery from Radiation-Induced Damage in Pimonidazole-Unlabeled Quiescent Tumor Cells., *World J. Oncol.*, 8(5), 137-146, 2017
DOI: 10.14740/wjon1058w

Çağlayan M, Prasad R, Krasich R, Longley MJ, Kadoda K, Tsuda M, Sasanuma H, Takeda S, Tano K, Copeland WC and Wilson SH, Complementation of aprataxin deficiency by base excision repair enzymes in mitochondrial extracts., *Nucleic Acids Res.*, 45(17), 10079-10088, 2017
DOI: 10.1093/nar/gkx654

Kadoda K, Moriwaki T, Tsuda M, Sasanuma H, Ishiai M, Takata M, Ide H, Masunaga S, Takeda S and Tano K, Selective cytotoxicity of the anti-diabetic drug, metformin, in glucose-deprived chicken DT40 cells., *PLOS ONE*, 12(9), e0185141, 2017
DOI: 10.1371/journal.pone.0185141

Moriwaki T, Okamoto S, Sasanuma H, Nagasawa H, Takeda S, Masunaga S and Tano K, Cytotoxicity of tirapazamine (3-amino-1, 2, 4-benzotriazine-1, 4-dioxide)-induced DNA damage in chicken DT40 cells., *Chem. Res. Toxicol.*, 30(2), 699-704, 2017
DOI: 10.1021/acs.chemrestox.6b00417

Masunaga S, Tatebe H, Nishimura Y, Tano K, Sanada Y, Moriwaki T, Sakurai Y, Tanaka H, Suzuki M, Kondo N, Maruhashi A and Ono K, Effect of oxygen pressure during incubation with a 10B-carrier on 10B uptake capacity of cultured p53 wild-type and mutated tumor cells: dependency on p53 status of tumor cells and types of 10B-carriers, *Int. J. Rad. Biol.*, 92(4), 187-194, 2016.
DOI: 10.3109/09553002.2016.1137104

〔学会発表〕(計10件)

藤池 春奈、Mahmoud Shoulkamy、Amir Salem、津田 雅貴、笹沼 博之、増永 慎一郎、武田 俊一、井出 博、田野 恵三、脊椎動物細胞における DNA-タンパク質クロスリンク損傷修復への TDP1、TDP2 遺伝子産物の関与、第 41 回日本分子生物学会年会、2018

藤池 春奈、Mahmoud Shoulkamy、Amir Salem、笹沼 博之、高田 穰、武田 俊一、増永 慎一郎、井出 博、田野 恵三、DNA タンパククロスリンク損傷修復における FANC 及び TDP1 遺伝子産物の関与、日本環境変異原学会第 46 回大会、2017

藤池 春奈、Mahmoud Shoulkamy、Amir Salem、笹沼 博之、高田 穰、武田 俊一、増永 慎一郎、井出 博、田野 恵三、DNA タンパククロスリンク損傷修復における FANC 及び TDP1 遺伝子産物の関与、第 40 回日本分子生物学会年会、2017

角田 圭、森脇 隆仁、藤池 春奈、津田 雅貴、笹沼 博之、高田 穰、井出 博、武田 俊一、増永 慎一郎、田野 恵三、DT40 ノックアウト細胞を用いた Biguanide 系薬剤 Metformin によるグルコース枯渇下細胞致死作用の解析、第 39 回日本分子生物学会年会、2016

角田 圭、森脇 隆仁、藤池 春奈、津田 雅貴、笹沼 博之、高田 穰、井出 博、武田 俊一、増永 慎一郎、田野 恵三、低グルコースにて致死作用をもつメトフォルミンとフェンフォルミンの作用機序の解析、日本環境変異原学会第 45 回大会、2016

Kadoda K, Moriwaki T, Fujiike H, Tsuda M, Sasanuma H, Takata M, Takeda S, Masunaga S, Tano K, Anti-diabetic biguanide drugs, metformin and phenformin have genotoxicity upon glucose deprivation in chicken DT40 cells, The 10th 3R Symposium, 2016

角田 圭、森脇 隆仁、藤池 春奈、津田 雅貴、笹沼 博之、高田 穰、武田 俊一、増永 慎一郎、田野 恵三、DT40 ノックアウト細胞パネルを用いたグルコース枯渇下で細胞致死作用を持つ Biguanide 薬剤の作用機序の解析、日本放射線影響学会第 59 回大会、2016

角田 圭、森脇 隆仁、津田 雅貴、笹沼 博之、武田 俊一、増永 慎一郎、田野 恵三、DT40 ノックアウト細胞パネルを用いたグルコース枯渇下で細胞致死作用を持つ Biguanide 2 種の作用機序の解析、日本環境変異原学会第 44 回大会、2015

森脇 隆仁、岡本 紗季、笹沼 博之、永澤 秀子、武田 俊一、増永 慎一郎、田野 恵三、DT40 細胞の DNA 修復欠損細胞パネルを用いた酸素濃度に依存したチラパザミンの DNA 誘発損傷と細胞致死効果の解析、第 68 回日本酸化ストレス学会学術集会、2015

Moriwaki T, Okamoto S, Sasanuma H, Nagasawa H, Takeda S, Masunaga S and Tano K, Characteristics of differential cytotoxicity profile of tirapazamine between normoxia and hypoxia, 15th International Congress of Radiation Research, 2015

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.rri.kyoto-u.ac.jp/rb-rri/index.html>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：増永 慎一郎

ローマ字氏名：MASUNAGA, Shin-ichiro

所属研究機関名：京都大学

部局名：複合原子力科学研究所

職名：教授

研究者番号(8桁)：80238914

(2)研究協力者

研究協力者氏名：永澤 秀子

ローマ字氏名：NAGASAWA, Hideko

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。