

平成 30 年 9 月 10 日現在

機関番号：37107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08102

研究課題名(和文) 肝臓がんに対するシスプラチン/カフェイン併用化学療法の有用性に関する研究

研究課題名(英文) Development of cisplatin / caffeine combined chemotherapy for hepatocellular carcinoma.

研究代表者

有森 和彦 (Kazuhiko, Arimori)

第一薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：70253739

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：カフェインは、単剤処理において細胞死を誘導することなく肝細胞がん細胞株の細胞増殖能を低下させた。カフェインとシスプラチンの併用処理においては、カフェインのATM阻害効果によりp53を介したDNA修復機構が阻害され、さらにカフェインによるPI3K阻害作用によりアポトーシス抑制因子であるBcl2やSurvivinの発現量が低下することでアポトーシス細胞を増加させた。しかし、HepG2においてはカフェインによるATM阻害効果によるp53を介したDNA修復阻害効果に抵抗性が見られた。今後、このカフェイン抵抗性メカニズムの解明が必要である。

研究成果の概要(英文)：Caffeine inhibits the proliferation of HCC cells by suppressing cell cycle progression without causing cell death. In combination therapy with caffeine and cisplatin, caffeine inhibits the ATM pathway activated by cisplatin, and the process of DNA repair is interfered with. Caffeine also inhibits the cisplatin-activated Akt pathway, and inhibits the functional molecules suppressing mitochondria-dependent cell death. These two functions of caffeine will likely enhance the cell death effect caused by cisplatin, and the interaction of caffeine with cisplatin would be primarily through the pharmacodynamic mechanism. However, HepG2 showed resistance to the enhancer action of caffeine. It will be necessary to investigate the mechanism of resistance to the action of caffeine in the future.

研究分野：がん化学療法

キーワード：カフェイン シスプラチン 肝細胞癌

1. 研究開始当初の背景

1) 我が国における肝臓がんの現状

我が国における肝臓がんの死亡数は、全がん種の中で4番目に多く、毎年約34,000人もの死者数となっている。また、5年相対生存率においても17.1%と膵臓がんに次いで2番目に生存率が低い状況である。肝臓がんは、全身化学療法が未だ確立されておらず、進行肝臓がんへの肝動注化学療法の生存期間中央値が2.8~12ヶ月と非常に短い。さらに、肝臓がんは、発症初期において、目立った症状がなく進行した状態で発見されることが多い。現状においては肝臓がんと診断が確定した時点で進行肝臓がんであった場合、治療して完全に治すことがほぼ不可能に近い状況であり、より効果的な化学療法の新規開発が待ち望まれている状況にある。

2) 肝臓がん治療にカフェインの応用を考えた経緯とこれまでの研究成果

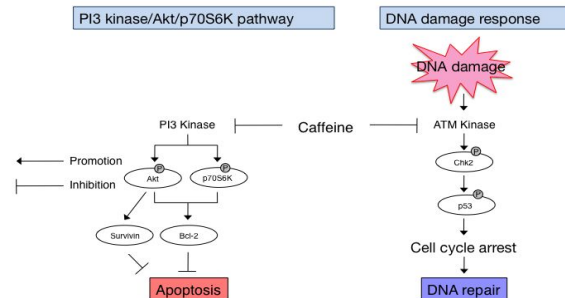
先に述べた肝臓がん治療の現状を打開すべく、申請者は、骨肉腫において生存期間の延長をきたすカフェインに注目した。カフェインは、本院でも整形外科において、シスプラチン、ドキシソルピシンと併用して臨床で使用されており、この療法を最初に行った金沢大学整形外科に限ると、骨肉腫で初診時に肺転移の見られなかった症例では、5年生存率が93%であり、全国平均が60~70%であるのに対し非常に優れた臨床成績を残している。申請者は、肉腫でこのような生存期間延長効果があるのであれば、がん腫でも同様な効果が期待できることを考えた。肝臓がんは、前述したように化学療法の治療成績が悪いため、肝臓がんの生存期間の延長、若しくは全治させることができれば社会的に多大なる貢献ができることは間違いない。これまでの申請者による研究成果において、肝臓がん細胞株においてがん細胞特異的にシスプラチンによる細胞死誘導作用を増強させることを発見し報告した。(Kawano et al, Bio Pharm Bull.2012)そこで、我々は、肝臓がんにおけるカフェインの有用性を更に詳細に検討することで臨床における肝臓がん治療に役立てたいと考えた。

2. 研究の目的

リン酸化キナーゼの中でPI-3 kinase(Phosphoinositide 3-kinase)は、がんの進行において重要な調節的役割を担うことから注目を浴びてきたAkt(Protein kinase B)や、その下流で働くp70S6 kinaseといったがん細胞の増殖、細胞死に対する抑制的な働きをしている分子をリン酸化することにより活性化させる役割を担っており、PI-3 kinase/Akt/p70S6K 経路として知られている(図1)。また、ATM(Ataxia telangiectasia mutated) kinaseは、DNA損傷時にDNA修

復に重要なキナーゼである。申請者は、カフェインとシスプラチンを併用することで、シスプラチンにより誘導されるアポトーシスを増大させることを報告した。さらに詳細に両剤併用によるアポトーシス誘導増強メカニズムを検討するため、先に述べたようにATM kinase、PI3 kinaseを解析の標的とし、図1に示すような仮説を立てた。

図1. カフェインの作用機構の仮説



PI3 kinaseはAkt、p70S6Kの活性化を介したアポトーシス抑制因子のsurvivin、Bcl-2の活性化によりアポトーシスの抑制に関与しており、ATM kinaseはchk2、p53の活性化を介した細胞周期停止によりDNAの修復に関与している。カフェインはこの両キナーゼを抑制すると考え、PI3K/Akt/p70S6K経路それに関わるアポトーシス関連分子、およびATM kinaseの関わるDNA修復関連分子のシグナル変化の検討を行おうと考えている。

3. 研究の方法

ヒト肝臓がん培養細胞株を用いて、カフェイン単剤での影響とシスプラチンと併用することによる殺細胞効果を検討する。次に、DNA損傷時の細胞周期DNAチェックポイント、PI3K/Akt/p70S6K経路でのカフェインの作用メカニズムを明らかにすることにより、カフェインが肝臓がん治療に有用であるというエビデンスを確立する。

1) カフェインの肝臓がん細胞株における作用機序の検討

①PI3K/Akt/p70S6K経路への影響の確認

使用する細胞株:HepG2、HuH-7、HLF、LI-7(肝細胞がん由来細胞株)

・フローサイトメーターを用いたアポトーシスの解析

PI、Annexin Vを用いた解析をカフェイン単独、シスプラチンとカフェインの併用時において行い死細胞の解析を行う。この方法によりアポトーシスにより引き起こされる細胞膜の変化(Phosphatidylserin(PS)の細胞表層への移動)を検出しシスプラチン/カフェイン併用による細胞死メカニズムを証明する。

・カフェイン単独、シスプラチンとカフェインの併用時におけるPI3K/Akt/p70S6K経路への影響をウエスタンブロッ

ティング法により細胞内シグナルの変化を検討する。

カフェインは、PI3K を低濃度(0.075-1mM)で阻害することが知られている。そのため、カフェインの作用機序の解明を行う上で PI3K がリン酸化する標的分子でがん細胞の増殖、アポトーシスの抑制に関わる分子の活性の変化を見ることは重要であると考え、PI3K/Akt/p70S6K 経路のシグナル変化に加え、アポトーシス抑制因子の survivin、Bcl-2 の活性変化を観察する。

2) カフェインの細胞周期への影響の確認

- ・フローサイトメーターにより Propidium iodide(PI)を用いて細胞周期の観察を行い、細胞周期における G₁、S、G₂、M 期にある細胞の割合を計測する。この方法により、カフェイン単独による細胞周期への影響やシスプラチンにより誘導された G₂/M 期での細胞周期の停止 (DNA 修復作用) へのカフェインの影響を観察する。
- ・カフェイン単独、シスプラチンとカフェインの併用時における G₂/M チェックポイント関連分子への影響をウエスタンブロッティング法により検討する。

4 . 研究成果

1) カフェインの肝臓がん細胞株における作用機序の検討

HepG2、HuH-7、HLF、LI-7 (肝臓がん由来細胞株)を用いてカフェイン/シスプラチン併用によるアポトーシス誘導増強機構を検討した。その結果、カフェイン、シスプラチン単独、両剤の併用による 48 時間暴露群において、72 時間暴露させた結果と同様にシスプラチンにより誘導される早期、後期アポトーシス細胞の割合がカフェインを併用することにより増大することが HLF、LI-7、HuH-7 の 3 つの HCC 細胞株で明らかとなった。しかしながら、HepG2 においては、早期アポトーシス細胞にわずかな増大が見られたものの、後期アポトーシス細胞の割合が増大するような傾向は見られなかった。Western blotting 法により PI3K/Akt/p70S6K 経路とそれに関わるアポトーシス関連分子、ATM kinase の関わる DNA 修復関連分子のシグナル変化を観察した。まず、PI3K/Akt/p70S6K 経路それに関わるアポトーシス関連分子においては、シスプラチン/カフェイン併用では HepG2、LI-7、HuH-7 の 3 つの HCC 細胞株においてカフェインの濃度依存的に Akt、p70S6K、Bcl-2 の減少が見られた。一方で、カフェインの濃度依存的に caspase9、caspase3 と PARP の活性化が強くなり、ミトコンドリア膜を経由したアポトーシスの増大が起こっていることが示された。しかしながら、HepG2 においては、caspase9、caspase3 と PARP の活性化が弱く、Survivin のタンパク量の上昇が見られた。また、HLF においては、bcl-2 の発現が見られ

なかったが caspase9、caspase3 と PARP の活性化は、カフェインの濃度を上昇させるに従って活性化が強くなった。

検討を行った PI3K/Akt/p70S6K 経路それに関わるアポトーシス関連分子のシグナル変化を見ると、カフェインは PI3 kinase を阻害することで Akt のリン酸化を抑制し、その下流にある Bcl-2 のタンパク量を減少させた。Bcl-2 は Bcl-2 ファミリータンパク質の一種でアポトーシスを抑制するタンパク質であり、ミトコンドリアの膜透過性を調整し、シトクロム c の細胞質への放出を制御している。つまり、Bcl-2 タンパク質の現象により細胞質に流出したシトクロム c が Caspase9 を活性化し、Caspase3 の活性化を経て、アポトーシスの増大を引き起こしていると考えられる。Caspase ファミリーはアポトーシスの実行因子であり、Caspase の活性化には主に 2 つの経路が存在している。ミトコンドリア経路でシトクロム C により Caspase9 が活性化される経路とデスレセプター経路で Caspase8 が活性化される経路である。本検討では Caspase9 の活性化が確認され、アポトーシスの最終実行因子である Caspase3 の活性化及びその基質である PARP の断片化も確認されたことから、カフェインは、ミトコンドリアを介したアポトーシス細胞を増加させることが明らかとなった。

次に、ATM kinase の関わる DNA 修復関連分子のシグナル変化においては、全ての HCC 細胞株において chk2 のリン酸化が抑制され、濃度依存的に ATM kinase が阻害されることが明らかとなった。しかし、p53 の活性においては 2 種類の変化が見られた。まず、HLF、HuH-7 においては過去の報告と同様に p53 のリン酸化がカフェインの濃度依存的に抑制された。しかしながら HepG2 では、p53 のタンパク量が増加し、リン酸化にも変化が見られなかった。さらに、Li-7 では、p53 の欠損が確認され、p53 への影響は見られなかった。

2) カフェインの細胞周期への影響の確認

全ての HCC 細胞株において S 期での集積が見られた。そして、HepG2、HuH-7 でのみ G₂/M 期での集積も見られた。これらの結果を踏まえると、今回用いた HCC 細胞株では、S 期もしくは G₂/M 期にて DNA の修復が行われていると考えられる。そして、カフェインは S 期もしくは G₂/M 期を濃度依存的に減少させたが、HepG2 においては S 期の減少傾向は見られたが G₂/M 期の減少は見られなかった。

カフェインは、ATM kinase を介した S 期もしくは G₂/M 期又は両方での DNA 修復機能を抑制したのと考えられる。Li-7 P53(-)での G₂/M 期の集積が見られなかったことから G₂/M チェックポイントの活性化には p53 の関与が強いと考えられ、HepG2 での p53 タンパク量の増加が G₂/M チェックポイントの活性化をカフェインが抑制できなかった原因なのではないかと考えられた。そして、HLF

Rb(-)では、Rb タンパクの欠損により G1 期での集積ができないため最終的に G₂/M 期で集積し細胞死に及んだものと考えられる。さらに、Li-7 P53(-)において S 期の集積効果が強く S 期チェックポイントの活性化には p53 を介さない経路が働いていることが明らかとなった。

以上、肝細胞がんにおけるシスプラチンによる細胞死誘導増強作用はカフェインによる DNA 修復阻害作用とアポトーシス促進作用の 2 つのメカニズムが機能していることを見出した。

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 1 件)

- 1) Kawano Y, Nagata M, Kohno T, Ichimiya A, Iwakiri T, Okumura M, Arimori K.: Caffeine increases the antitumor effect of cisplatin in human hepatocellular carcinoma cells. *Biol. Pharm. Bull.* 35 (3): 400-407 (2012).

〔学会発表〕(計 2 件)

- 1) Arimori K, Kawano Y, Nagata M, Kohno T, Ichimiya A, Toyama T, Iwakiri T, Okumura M: Effect of caffeine on the antitumor effect of cisplatin in human hepatocellular carcinoma cells. Pharmacy World Congress 2016, 76th International Congress of FIP, (2016/8/29-9/3), Buenos Aires, Argentina.
- 2) Kawano Y, Nagata M, Arimori K, Kohno T, Nohara M, Uehara K, Saito M, Ichimiya A, Aoyama T: Caffeine increases cisplatin induced apoptosis via inhibition of Akt pathway and ATM mediated cell cycle checkpoint pathway in HCC cell lines. 2017 AAPS Annual Meeting and Exposition, (2017/11/12-15), San Diego Convention Center, USA.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有森和彦 (KAZUHIKO ARIMORI)
第一薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：70253739

(2) 研究分担者

青山隆夫 (TAKAO AOYAMA)
東京理科大学・薬学部・教授
研究者番号：60262028

河野洋平 (YOUHEI KAWANO)
東京理科大学・薬学部・助教
研究者番号：80779025

(3) 研究協力者

奥村 学 (MANABU OKUMURA)