

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09750

研究課題名(和文) ミトコンドリア形態動態を標的とするメラノーマ治療の基礎研究

研究課題名(英文) Melanoma treatment by targeting the mitochondrial dynamics

研究代表者

鈴木 良弘 (SUZUKI, Yoshihiro)

日本大学・医学部・研究員

研究者番号：80206549

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍細胞を選択的に傷害する腫瘍壊死因子関連アポトーシス誘発リガンド(TRAIL)ががん細胞だけに断片化などのミトコンドリアの形態異常を起こすことを見出した。そこで、このミトコンドリアのネットワークの変化が細胞死において果たす役割についてヒトメラノーマ細胞をモデルとして調べた。その結果、ミトコンドリアの断片化・膨潤・凝集が、細胞死の要因となること、これらがミトコンドリアの酸化ストレスや細胞膜電位およびカルシウム動態の変調を介して誘導されること、がん細胞の方が正常細胞よりも酸化ストレスに弱いことが腫瘍選択的なミトコンドリアの形態異常と抗がん効果の要因であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) has emerged as a next-generation anticancer drug owing to its tumor-specific cytotoxicity. However, the mechanisms underlying the tumor-selective cell killing remain mostly unclear. We found that TRAIL evoked mitochondrial network aberration in human malignant melanoma cells, but not in non-transformed cells. Excessive fragmentation, swelling, and clustering of the mitochondria played critical roles in triggering cell killing. Hydrogen peroxide and superoxide within the mitochondria participated in the pro-death mitochondrial network aberration, and melanoma cells were more susceptible than melanocytes to oxidative stress. Moreover, we found that plasma membrane depolarization and calcium dysregulation promoted the mitochondrial network aberration and TRAIL effectiveness. Our findings indicate that TRAIL elicits its tumor-selective anticancer activity by targeting the mitochondrial network remodeling.

研究分野：生化学、腫瘍学

キーワード：TRAIL メラノーマ 腫瘍選択性 ミトコンドリア 活性酸素 酸化ストレス カルシウム 細胞膜脱分極



ATP 依存性カルシウムチャネル阻害剤 Glibenclamide ならびに U37883A でも同様に TRAIL によるミトコンドリアの断片化、膨潤、ならびに凝集が観察され、強い細胞死が誘発された。Glibenclamide による細胞死増強はカスパーゼ阻害剤 Z-VAD-FMK によって抑制されたが、U37883A による細胞死増強はその影響を受けなかった ( 図 1 )。

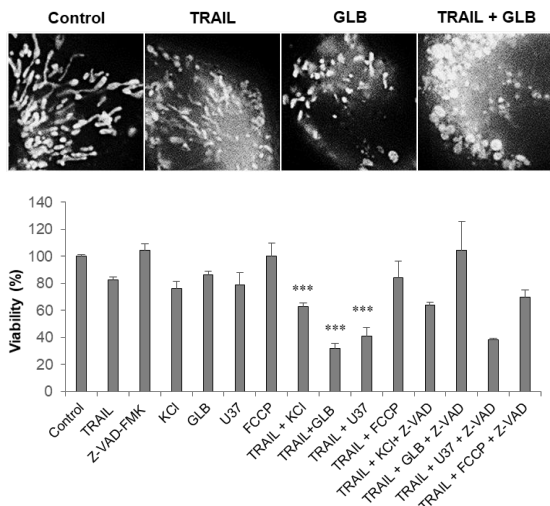


図 1 . 脱分極誘発剤による TRAIL 耐性悪性メラノーマ細胞 A2058 に対する TRAIL の抗がん効果とミトコンドリアネットワーク異常の増強

(3)カルシウムはミトコンドリアネットワーク変化を抑制して TRAIL 耐性に関与する：細胞膜脱分極は、電位差依存性カルシウムチャネルの活性化を介して細胞内カルシウム動態を変化させる。そこでカルシウムキレーターの TRAIL によるアポトーシスに対する作用を調べた。その結果、細胞外カルシウムを除去する EGTA、細胞内カルシウムを除去する BAPTA-AM の両方が TRAIL によるアポトーシスを増強した。さらに、両者は TRAIL によるミトコンドリアネットワーク変化を増強した。

(4)ミトコンドリア内カルシウムがミトコンドリアネットワークを制御する： TRAIL は、濃度依存的、持続的に  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  を増加させた。一方、 $[Ca^{2+}]_{mit}$  の増加は実験間で異なり、濃度依存的な場合と、高濃度でむしろ増加の程度が減少する場合とが見られた。この現象が  $[Ca^{2+}]_{mit}$  の流出によるかどうかを調べるためにその主要経路である  $Na^+/Ca^{2+}$  交換因子 (NCLX<sub>mit</sub>) ならびにミトコンドリア透過性亢進遷移孔 (mPTP) それぞれを特異的阻害剤である CGP-37157 と Cyclosporin A で阻害したところ、CGP-37157 だけが  $[Ca^{2+}]_{mit}$  を有意に増加させた。また、CGP-37157 は悪性メラノーマ細胞を TRAIL に対して感作させ、その効果は Z-VAD-FMK によって完全に抑制された ( 図 2 )。さらに、この細胞死の増強には、ミトコンドリアの断片化、膨潤、ならびに凝集が観察された。 $[Ca^{2+}]_{mit}$  はまた、ミトコンドリアカルシウムユニポーター (MCU) を介する小胞体からの流入によっても調節されている。MCU の特異的阻害剤 Ruthenium360 は、 $[Ca^{2+}]_{mit}$  を減少させ、TRAIL によるミトコンドリアネットワーク変化を増強した。

らの流入によっても調節されている。MCU の特異的阻害剤 Ruthenium360 は、 $[Ca^{2+}]_{mit}$  を減少させ、TRAIL によるミトコンドリアネットワーク変化を増強した。

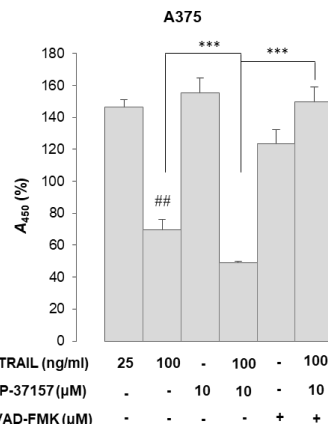


図 2 . CGP-37157 の TRAIL 感作作用 ( ##p < 0.01 vs コントロール; \*\*\*p < 0.001 vs TRAIL (N = 3) )

(5) TRPV1 アンタゴニスト AMG9810 ならびに Capsazepine は TRAIL と相乗的には  $[Ca^{2+}]_{mit}$  を減少させ、アポトーシスを誘発する：

Thapsigargin とは異なり、TRAIL は小胞体からのカルシウム流入を起こさず、ストア依存性カルシウムチャネル (SOCE) の活性化は見られなかった。TRAIL によるカルシウム変化が部分的に抗酸化剤で抑制されることから、関与する陽イオンチャネルは ROS 感受性であると推定された。ROS 感受性陽イオンチャネルのひとつである TRPV1 の阻害剤である AMG9810 (AMG) ならびに Capsazepine (CPZ) はともに単独で  $[Ca^{2+}]_{mit}$  を減少させ、TRAIL と併用すると相乗的に作用した。これらの阻害剤は、共通してミトコンドリアの分裂を抑制し、TRAIL との併用により、ミトコンドリアの断片化、膨潤、ならびに凝集を惹起した ( 図 3 )。AMG と CPZ は TRAIL による細胞死も増強し、その効果は Z-VAD-FMK によって抑制されたが、Necrostatin-1 では抑制されなかった。

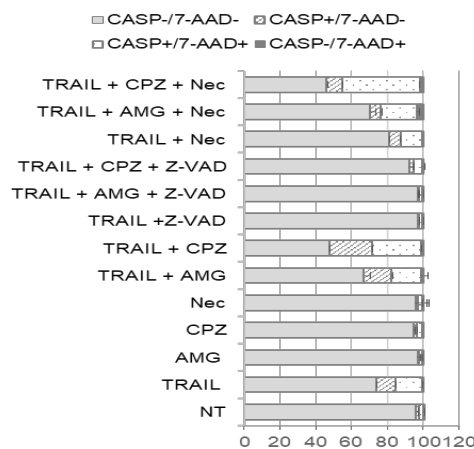


図 3 . TRPV1 アンタゴニストによる TRAIL 細胞死増強

## (6) 研究の主な成果・国内外における位置づけとインパクト、今後の展望

本研究は、ミトコンドリアの形態異常が TRAIL による細胞死誘発に深く関与することを初めて明らかにした。ミトコンドリアの形態異常は刺激の程度、時間に応じて短縮化・断片化・膨潤・凝集と段階的に起り、その凝集がキーとなる細胞死シグナルであることが示唆された。ミトコンドリアの形態変化の細胞死調節における役割は、最近の分子生物学のトピックのひとつであり、またパーキンソン病、心臓病、糖尿病など様々な疾病に深く関与することが明らかになりつつあることから、基礎ならびに応用の両面から注目を集めている。TRAIL による細胞死誘発のメカニズムは国内外で精力的に研究されているが、これによるミトコンドリアの形態異常誘発はわれわれが初めて見出したもので、他にこれを研究しているグループはない。しかし、いくつかの国外のグループが、TRAIL 感作にはミトコンドリアの形態変化が伴うことを報告しており、本研究の結果と一致する。正常細胞では、TRAIL によるミトコンドリアの形態異常は限定的で、短縮化のみが見られ、断片化、膨潤、および凝集は見られなかった。ミトコンドリアは生理的条件下においても、細胞内で分裂・融合を絶えず繰り返してその形態と機能を維持している。この動的過程の主要な仕組みは GTPase 活性を持つ Dynamin 関連タンパク質群であり、このうち Dynamin-related protein1(Drp1)の Ser616 のリン酸化が分裂に必須と考えられている。本研究の結果、TRAIL はこのリン酸化を時間依存性に増加させることが分かった。その増加のタイムコースはミトコンドリアの短縮化、断片化と一致することから、Drp1 依存性であると考えられた。この考えに一致して、Drp1 の阻害剤 Mdivi-1i やノックダウンにより分裂は抑制された。一方、ミトコンドリアの断片化、膨潤ならびに凝集は、Drp1 の機能抑制によって阻害されず、むしろ増強された。この発見は、少なくともヒト悪性メラノーマ細胞では生理的なミトコンドリアの分裂が、細胞死に関連する Drp1 非依存性のミトコンドリアの形態異常を抑制することを示唆している。ミトコンドリアの断片化はミトファジーによっても誘発される。ミトファジーは、本来傷害されたミトコンドリアを除去してミトコンドリアの機能を維持するための細胞保護的な反応であるが、神経変性疾患などではこれが異常亢進することがミトコンドリアの形態異常と細胞死の要因となることが報告されている。本研究で明らかにしたように、悪性メラノーマ細胞のミトコンドリアでは酸化ストレスが起りやすいためにその傷害が正常細胞に比べて頻度が高いと考えられ、これに対するミトファジーも活性化されやすいと考えられる。この仮説の立証は今後の課題である。

本研究により断片化・膨潤したミトコンド

リアの凝集には、細胞膜脱分極が必要であることが示された。細胞膜脱分極は、アポトーシスの初期に見られ、カスパーゼ活性化に必要であることが明らかにされている。代表者はこれまで、TRAIL が細胞膜脱分極を誘発し、これが TRAIL による細胞死誘発のメディエーターであることを報告してきたが、本研究の成果はこれまで不明であったその分子メカニズムの一端を明らかにするものであり、がん細胞死のメカニズムの分子レベルでの理解に大きく貢献できる。

本研究の結果、 $[Ca^{2+}]_{mit}$  の変化がミトコンドリアの形態異常の推進因子であることが明らかとなった。近年、がん治療の新たな標的としてカルシウムの動態が注目されている。その理由は、その動態に関して、種々の腫瘍が特異的な性質を持ち、それが造腫瘍性、悪性形質、薬剤耐性、増殖増加、アポトーシスからの回避、ならびに細胞生存に関与することがわかってきたからである。本研究によって小胞体からミトコンドリアへのカルシウムの充填に関与するカルシウム経路がミトコンドリアの形態異常を抑制して、細胞をアポトーシスから保護することが明らかになった。この充填は SOCE と関連しており、SOCE が細胞増殖ならびに生存に関与することが報告されていることはこの発見と矛盾しない。一方  $[Ca^{2+}]_{mit}$  の増加は適度なミトコンドリアの分裂を誘発し、これがミトコンドリアの断片化、膨潤ならびに凝集を抑制することが示唆された。従って、ミトコンドリアのカルシウム動態の変調が SOCE のような細胞生存性のカルシウム経路を介する細胞保護的なミトコンドリアの形態変化を妨げて、その致死的な形態異常を惹起する可能性が示された。このシナリオの検証が今後の課題である。

本研究のもう一つの大きな成果は、ROS によるミトコンドリアの酸化ストレスならびに細胞膜脱分極誘発に対してがん細胞が正常細胞よりも感受性が高いことが TRAIL の腫瘍選択性のメカニズムの一端であることを明らかにしたことである。ミトコンドリアの酸化ストレスは、その形態変化のトリガーであり、細胞膜脱分極はその促進因子であることが示された。従って、これらのプロセスは腫瘍選択的な細胞傷害作用または TRAIL の抗がん効果の増強作用を持つ薬剤の探索における有力な標的となることが期待される。

<引用文献>

Mitochondrial division inhibitor-1 induces mitochondrial hyperfusion and sensitizes human cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. Akita M, Suzuki-Karasaki M, Fujiwara K, Nakagawa C, Soma M, Yoshida Y, Ochiai T, Tokuhashi Y, Suzuki-Karasaki Y. *International Journal of Oncology* 2014; 45:1901-1912. doi: 10.3892/ijo.2014.2608.

Depolarization Controls TRAIL-Sensitization and Tumor-Selective Killing of Cancer Cells: Crosstalk with ROS. Suzuki-Karasaki Y, Suzuki-Karasaki M, Uchida M, Ochiai T. *Frontiers in Oncology* 2014 May 30;4:128. doi: 10.3389/fonc.2014.00128. eCollection 2014.

#### 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 5 件)

Cold PSM, but not TRAIL, triggers autophagic cell death: A therapeutic advantage of PSM over TRAIL. Ito T, Ando T, Suzuki-Karasaki M, Tokunaga T, Yoshida Y, Ochiai T, Tokuhashi Y, Suzuki-Karasaki Y. *International Journal of Oncology* 査読有 In press.

Plasma-stimulated medium kills TRAIL-resistant human malignant cells by promoting caspase-independent cell death via membrane potential and calcium dynamics modulation. Tokunaga T, Ando T, Suzuki-Karasaki M, Ito T, Onoe-Takahashi A, Ochiai T, Soma M, Suzuki-Karasaki Y. *International Journal of Oncology* 査読有 2018 52:697-708. doi: 10.3892/ijo.2018.4251.

Disrupting mitochondrial  $Ca^{2+}$  homeostasis causes tumor-selective TRAIL sensitization through mitochondrial network abnormalities. Ohshima Y, Takata N, Suzuki-Karasaki M, Yoshida Y, Tokuhashi Y, Suzuki-Karasaki Y. *International Journal of Oncology* 査読有 2017 51:1146-1158. doi: 10.3892/ijo.2017.4096.

Mitochondrial  $Ca^{2+}$  removal amplifies TRAIL cytotoxicity toward apoptosis-resistant tumor cells via promotion of multiple cell death modalities. Takata N, Ohshima Y, Suzuki-Karasaki M, Yoshida Y, Tokuhashi Y, Suzuki-Karasaki Y. *International Journal of Oncology* 査読有 2017 51:193-203. doi: 10.3892/ijo.2017.4020.

Tumor-selective mitochondrial network collapse induced by atmospheric gas plasma-activated medium. Saito K, Asai T, Fujiwara K, Sahara J, Koguchi H, Fukuda N, Suzuki-Karasaki M, Soma M, Suzuki-Karasaki Y.

Oncotarget 査読有 2016 7:19910-19927. doi: 10.18632/oncotarget.7889.

〔学会発表〕(計 4 件)

徳永智彦、小野江明日香、相馬正義、落合豊子、鈴木(唐崎)良弘. Plasma-stimulated medium (PSM)の悪性黒色腫に対する抗腫瘍効果 第 33 回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会 2017 年 秋田.

Suzuki-Karasaki Y. Tumor-targeting killing of multidrug-resistant human aggressive cancer cells by plasma-activated media via mitochondrial and endoplasmic reticulum damages. *21th World Congress on Advances in Oncology & 19th International Symposium on Molecular Medicine* 6-8 October, Athens, Greece 2016 (招待講演)

Suzuki-Karasaki M, Suzuki-Karasaki M, Suzuki-Karasaki Y. MnTBaP-sensitive ROS-driven pro-survival pathway prevents cancer cells from mitochondrial and endoplasmic reticulum damages. *21th World Congress on Advances in Oncology & 20th International Symposium on Molecular Medicine Athens*, October, Athens, Greece 2016.

高橋明日香、藤川一穂、鈴木(唐崎)美喜、落合豊子、鈴木(唐崎)良弘. ヒトメラノーマ細胞の TRAI 耐性におけるオートファジーの関与 第 32 回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会 2016 年 鹿児島.

〔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：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

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

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 良弘 (SUZUKI Yoshihiro)

日本大学・医学部・研究員

研究者番号：80206549

(2) 連携研究者

落合 豊子 (OCHIAI Toyoko)

日本大学・医学部・教授

研究者番号：40133425