

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24501353

研究課題名(和文)ミトコンドリア依存性抗がん剤耐性機構におけるグルココルチコイドの役割

研究課題名(英文)The role of glucocorticoid in mitochondria-dependent resistance to anticancer therapy

研究代表者

笠原 恵美子 (KASAHARA, EMIKO)

大阪市立大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：30468269

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：がんに伴う痛みに加え抗がん剤治療の副作用による激しいストレスも、がんの治療効果に大きく影響することが臨床で知られている。しかしながらその作用機序については不明な点が多い。本研究では、ストレス関連ホルモンであるグルココルチコイドが、抗がん剤の作用へ及ぼす影響について検討した。その結果、グルココルチコイドが細胞の小器官であるミトコンドリアの呼吸機能を抑制して、ミトコンドリア依存性抗がん剤の感受性を低下させることが明らかとなった。また、これらグルココルチコイドによるシスプラチンに対する耐性は、グルココルチコイド受容体を介する作用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Those intense stress by a side effect of chemotherapy as well as the pain with the cancer also influence the therapeutic effects of the anticancer agents. However, little is known about the mechanisms of these untoward actions. In this study, we investigated the influence of glucocorticoids, which is a stress-related hormone on anticancer drug actions. Our results suggest that stress-induced glucocorticoids attenuate the action of anticancer drug through the alteration of mitochondrial function.

研究分野：生化学

キーワード：グルココルチコイド ミトコンドリア 抗がん剤 ストレス 中皮腫

1. 研究開始当初の背景

抗がん剤治療においては、薬剤反応性における個体差や耐性獲得が臨床しばしば報告されるがその機序は不明な点が多い。我々は、ストレス応答反応のひとつであるグルココルチコイドの分泌上昇が、抗がん剤の作用に影響している可能性を検討した。

(1) 心身のストレスと抗がん剤の治療効果：さまざまな抗がん剤が開発されては臨床応用されているが、薬剤耐性はいつも大きな壁となって立ちふさがる。その耐性機序の研究はさまざまな角度からなされているが、がんに伴う痛みに加え抗がん剤治療の副作用による激しいストレスも、がんの治療効果に大きく影響することが報告されている。しかしながら、このような治療中の患者にみられる生体のストレス状態と、薬剤感受性への影響に関する研究は非常に少なく、その作用機序についても不明な点が多い。常に心身の変化を伴う患者において、ストレス応答反応が抗がん剤効果に影響を及ぼしている可能性が考えられた。

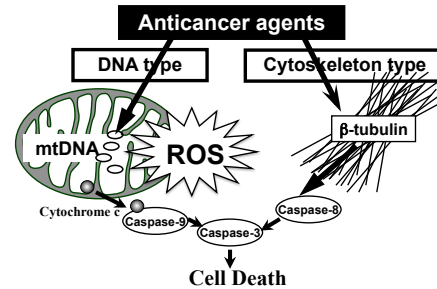
(2) ストレス負荷に対する生体応答の分子学的背景：本申請者らは心身へのストレスが中枢のみならず末梢へ及ぼす影響についてその分子生物学的な背景を明らかにしてきた(科研若手 B H21-23; 研究代表者、科研基盤 A H20-23; 研究分担者)。これらの研究から得られた知見より、神経-内分泌-免疫ネットワーク応答因子の1つとしてミトコンドリア代謝が著明に変動しており、この代謝の歪がストレスにおける病態に関与していることを明らかとしてきた。更に、ストレス関連ホルモンであるグルココルチコイドが、ミトコンドリアの代謝変動に深く関与している可能性が考えられた。

(3) 抗がん剤耐性におけるミトコンドリアの関与：これまでに我々は、ミトコンドリアがDNA標的型抗がん剤感受性を決定するのに重要な役割を担っていることを明らかにしてきた(図1, J Pharmacol Exp Ther. 2011)。これまで、放射線療法や多くの抗癌剤は活性酸素を増産させ、細胞の核DNAを主な標的として細胞死を誘起すると信じられてきた。環状DNAを有するミトコンドリアは、活性酸素産生の主要な小器官であり、ヒストン様の保護蛋白を持たない為に核DNAの10倍以上もの速度で変異する事が知られている。この点に着目し、我々はDNA標的型(シスプラチンやブレオマイシン)、分子標的型(ハーセプチンやイレッサ)、および細胞骨格標的型(パクリタキセル)などの中で、DNA標的型抗がん剤による細胞死誘導反応がミトコンドリアを起爆剤としており、ミトコンドリア密度と正に相関することを明らかにした(図2)。

(4) ミトコンドリア代謝とグルココルチコイドの作用：近年、ミトコンドリアにはグルココルチコイドレセプターが発現していることが明らかになり、グルココルチコイドによる直接的なミトコンドリア機能制御が報

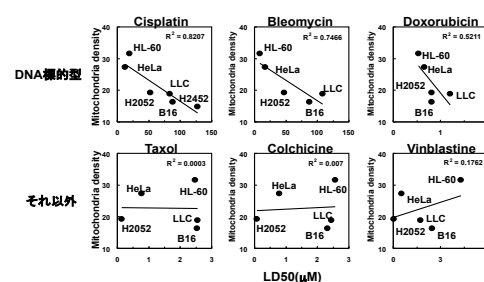
告されつつある。従って、生体へのストレス負荷によるグルココルチコイドの分泌上昇が、ミトコンドリア依存性の抗がん剤の感受性に関与している可能性が考えられた。

図1. DNA標的型抗がん剤による細胞死のメカニズム



DNA標的型抗がん剤はミトコンドリアのsuperoxideを増産し、caspase依存性の細胞死を誘導

図2. 各種抗がん剤とミトコンドリア密度との相関性



DNAを標的とする抗がん剤が誘導する細胞死は、ミトコンドリア密度と正相関する。

2. 研究の目的

本研究では、重要なストレス関連ホルモンの1つであるグルココルチコイドが、ミトコンドリア代謝を制御して抗がん剤作用へ及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。前述にあるように、我々は種々の抗がん剤の中でDNA標的型抗がん剤(シスプラチンやブレオマイシン)の感受性がミトコンドリア密度と正に相関する事、抗がん剤耐性獲得機構の分子背景にミトコンドリアを介するシグナルが関与する事を明らかにしてきた。これらの知見から、ミトコンドリア代謝を制御する生体内因子はDNA標的型抗がん剤の感受性に影響することが推察され、この事が臨床における抗がん剤耐性やがんの再発、および抗がん剤治療による種々の副作用に関与しているのではないかという着想に至った。生体のストレス応答時に分泌が上昇するグルココルチコイドが、ミトコンドリアの機能および抗がん剤感受性に及ぼす影響について検討した。

本研究では対象として、悪性中皮腫を標的にしているが、本疾患は未だ標準的治療法が確立されていない極めて予後不良の悪性腫瘍である。薬剤反応性における個体差や耐性獲得がしばしばみられ、胸膜中皮腫においては、胸膜の肥厚と癒着による痛み及び呼吸苦を伴う場合が多い。ストレスと抗がん剤耐性機構を研究する対象疾患としては当を得ていると思われた。

### 3. 研究の方法

(1) グルココルチコイドがヒト中皮腫細胞に及ぼす影響:

① グルココルチコイド暴露によるミトコンドリアへの影響: グルココルチコイドががん細胞のミトコンドリアに及ぼす影響を知る為に、ヒト中皮腫細胞株の培地にグルココルチコイド (1~1000 nM) を添加して培養した後、ミトコンドリア呼吸活性とミトコンドリア密度を生化学的手法 (PCR 法、Western blotting 法、ELISA 法、オキシメーターなど) により測定した。

② グルココルチコイドを暴露したヒト中皮腫細胞における抗がん剤感受性への影響: 生体のストレス環境を想定した濃度のグルココルチコイドをヒト中皮腫細胞株に添加培養し、各種抗がん剤 (シスプラチン、パクリタキセル) に対する細胞応答を検討 (MTT assay 法、FACS system, PCR 法、apoptosis 検出) した。また、グルココルチコイド受容体阻害剤 (RU-486) を用いて、グルココルチコイドによる直接的な作用を確認した。

(2) ストレス環境化におけるグルココルチコイド分泌のミトコンドリアへの作用と抗がん剤に対する感受性を、マウスを用いて検討した。

① グルココルチコイドの分泌を上昇させたマウスにおける検討: マウスに拘束ストレス負荷 (あるいは、予めグルココルチコイドを腹腔投与) し、ストレス環境下におけるグルココルチコイドの分泌上昇作用とグルココルチコイド分泌上昇によるミトコンドリア機能への影響を生化学的手法 (ELISA, Western blotting 法、オキシメーターなど) により検討した。

② 副腎皮質刺激ホルモンレセプター欠損マウス (グルココルチコイド分泌不全マウス) を用いた検討: 中枢へのストレス負荷においては、視床下部-下垂体-副腎軸を介する応答系が生体の恒常性を維持するために重要である。このときに視床下部から放出される副腎皮質刺激ホルモン (adrenocorticotrophic hormone; ACTH) は副腎皮質に作用してグルココルチコイドを分泌させる。従って、ACTH レセプター欠損 (MC2R<sup>-/-</sup>) マウスは強度なストレス環境において ACTH を過剰に分泌しているにも関わらず、グルココルチコイドを分泌することができない。また、グルココルチコイドによる中枢へのネガティブフィードバック能力を欠損しているため、血中 ACTH は常に異常高値を示す。我々は、ストレス負荷におけるミトコンドリア機能変化がグルココルチコイドを介する作用であるか否かを確認するために、MC2R<sup>-/-</sup> マウス (グルココルチコイドの分泌不全) および MC2R<sup>+/-</sup> (グルココルチコイドを正常に分泌できる) マウスを用いて検討した。また、これらのマウスにシスプラチンを投与し、シスプラチンの重要な副作用である腎毒性および個体の生存率を検討した。

### 4. 研究成果

(1) グルココルチコイドがヒト中皮腫細胞に及ぼす影響:

① グルココルチコイドを添加して培養したヒト中皮腫細胞では、ミトコンドリアの数と呼吸活性がグルココルチコイドの濃度依存的に低下し (図3)、DNA 標的抗がん剤であるシスプラチンによる殺細胞作用が著しく低下していた (図4)。また、これらの作用は、グルココルチコイド受容体阻害剤である RU-486 の添加により阻害されたことより、グルココルチコイド受容体を介する作用であることが示唆された。

② 一方、シスプラチンに対して耐性を獲得した中皮腫細胞株は、ミトコンドリア密度およびミトコンドリア DNA 量が低下していた (図5)。また、がん患者より得られた悪性中皮腫の組織は、正常中皮組織と比較してミトコンドリア密度が低下していた。

図3. グルココルチコイド暴露によるミトコンドリア密度の低下

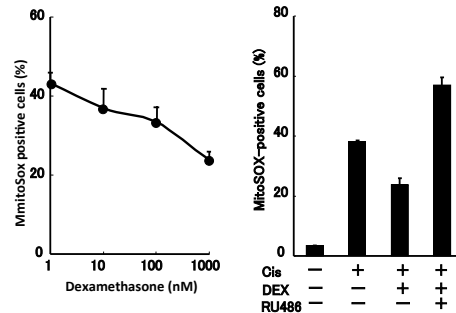
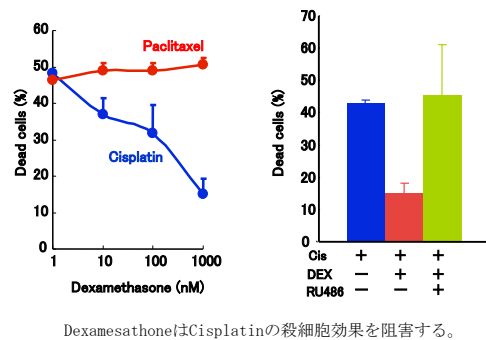
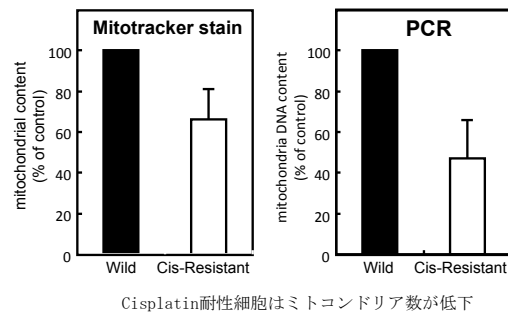


図4. グルココルチコイド暴露による抗がん剤感受性の低下



DexamethasoneはCisplatinの殺細胞効果を阻害する。

図5. シスプラチン耐性ヒト中皮腫細胞のミトコンドリア数



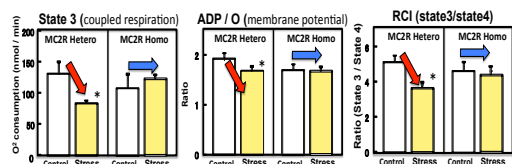
Cisplatin耐性細胞はミトコンドリア数が低下

(2) ストレス環境化におけるグルココルチコイドのミトコンドリアへの作用と抗がん

剤に対する感受性：

①マウスに拘束ストレスを負荷すると、グルココルチコイドの分泌上昇に伴いミトコンドリアの呼吸活性が低下した。一方グルココルチコイド分泌不全マウス (MC2R<sup>-/-</sup>) では、ストレス負荷によるこれらのミトコンドリア呼吸機能の変化は認められなかった (図6)。更に、ストレスを負荷するかわりに、グルココルチコイドを投与したマウスにおいては、ストレス負荷マウスと同様のミトコンドリアへの作用が認められた。

図6. グルココルチコイドはミトコンドリアの呼吸活性を低下させる

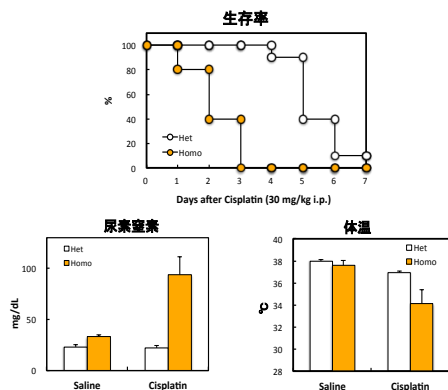


ストレスによるグルココルチコイド分泌上昇はミトコンドリアの呼吸活性を低下させる。グルココルチコイド分泌不全マウスにおいては、ストレスを負荷してもミトコンドリア呼吸活性には変化はみとめられなかった。

②上記①の結果より、ストレスがグルココルチコイドを介してミトコンドリアの呼吸活性を低下させることが示唆されたので、次にミトコンドリア標的型抗がん剤であるシスプラチンの作用について検討を行った。解析の結果、マウスに予めグルココルチコイドを投与しておく、シスプラチンによるミトコンドリアからの活性酸素の産生上昇が抑制されて酸化ストレスが軽減され、シスプラチンによる抗腫瘍効果が減弱した。

一方で、シスプラチンはがん細胞以外の正常細胞のミトコンドリアにも作用して酸化ストレスを誘起し、腎機能障害や胃腸障害などの副作用を引き起こすことが良く知られている。マウスに過剰量のシスプラチンを投与しておく、生存率の低下や腎機能障害 (血中尿素窒素の上昇)、深部体温の低下が認められたが、グルココルチコイド分泌不全マウスではこれらの副作用が著明に増強された (図7)。また、グルココルチコイドを予め投与したマウスにおいては、これらシスプラチンの副作用も減弱されていた。

図7 グルココルチコイド分泌不全はシスプラチンの副作用を強くする



本研究結果より、ストレス環境下においては、血中に上昇してくるグルココルチコイドは、シスプラチンによるミトコンドリアの酸化ストレスを抑制して、中皮腫細胞への殺細胞効果を減弱させることが明らかとなった。一方で、これらグルココルチコイドの作用はがん細胞に特異的ではなく、シスプラチンによる正常細胞への傷害 (副作用) も軽減することが示唆された。これらのことはDNA標的型の抗がん剤 (シスプラチンなど) を用いた化学療法においては、生体のストレス反応 (グルココルチコイドの分泌上昇) が抗がん剤の副作用を抑えて生体防衛的に働くと考えられる。一方で、抗がん剤のがん細胞に対する効果を考えた場合、がん細胞特異的にグルココルチコイドの作用を抑制できれば、抗がん剤耐性を回避することが可能になるかもしれない。今後、更なる検討が必要である。

## 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 6 件)

① Kasahara E, Sekiyama A, Hori M, Kuratsune D, Fujisawa N, Chida D, Hiramoto H, Li J, Okamura H, Inoue M, Kitagawa S. Stress-Induced Glucocorticoid Release Upregulates Uncoupling Protein-2 Expression and Enhances Resistance to Endotoxin-Induced Lethality. (査読有り) *Neuroimmunomodulation*. [Epub ahead of print] 2015 DOI:10.1159/000368802

② Kasahara E, Inoue M. Cross-talk between HPA-axis-increased glucocorticoids and mitochondrial stress determines immune responses and clinical manifestations of patients with sepsis. (査読有り) *Redox Rep.* 20, 1-10. 2015 doi:10.1179/1351000214Y.000000107.

③ Takagi-Kimura M, Yamano T, Tagawa M, Kubo S. Oncolytic virotherapy for osteosarcoma using midkine promoter-regulated adenoviruses. (査読有り) *Cancer Gene Ther.* 21 126-32. 2014 doi: 10.1038/cgt.2014.7.

[学会発表] (計 7 件)

① E Kasahara, A. Sekiyama, M. Hori, D. Chida, H. Okamura, M Inoue, S Kitagawa. Role of the HPA-axis and mitochondria in LPS-induced septic shock. 6th Joint Meeting of the Societies for Free Radical Research, 2013 年 9 月 12 日, Sydney (Australia)

② 笠原恵美子、  
ミトコンドリアと癌医療（若手研究者講演）  
第 29 回 臨床フリーラジカル会議、2012 年  
12 月 7 日、京都亀岡・けぶり河（京都府・亀  
岡市）

③ 笠原恵美子、  
ストレス応答とミトコンドリア代謝（招待講  
演） 第 3 回 生殖ミトコンドリア研究会、  
2012 年 11 月 17 日、IVF なんばクリニックマ  
ーメイドホール（大阪府・大阪市）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

笠原 恵美子（KASAHARA, Emiko）  
大阪市立大学・医学（系）研究科（研究院）・  
講師  
研究者番号：30468269

### (2) 研究分担者

久保 秀司（KUBO, Shuji）  
兵庫医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：10441320

### (3) 連携研究者

関山 敦生（SEKIYAMA, Atsuo）  
大阪大学・薬学研究科・教授  
研究者番号：30403702