

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26830116

研究課題名(和文)悪性中皮腫における腫瘍生存・増殖、抗がん剤抵抗性機序の解明とその応用

研究課題名(英文)Elucidation of mechanism for cell survival, proliferation and anti-cancer drug resistance in mesothelioma, and its application.

研究代表者

篠原 義康 (Shinohara, Yoshiyasu)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：60723509

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、悪性中皮腫におけるオートファジーの役割を明らかにすることを目的として行われ、以下の成果が得られた。悪性中皮腫細胞株では、正常中皮細胞や不死化中皮細胞株に比べてLC3の発現が高かった。GFP-LC3発現悪性中皮腫細胞株を用いて、GFP-LC3(オートファゴソーム)を観察すると、GFP-LC3は、通常の培地による培養でも悪性中皮腫細胞内に観察された。飢餓培地では悪性中皮腫細胞内のGFP-LC3は増加した。オートファジー阻害剤は、オートファジーを阻害し、悪性中皮腫細胞株の細胞増殖を抑制した。悪性中皮腫細胞では、恒常的にオートファジーが活性化し、細胞増殖に関与する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Aim of this study is to clarify the role of autophagy in malignant mesothelioma. The expression level of LC3 was higher in mesothelioma cell lines compared with normal mesothelial cells and immortalized mesothelial cell line. When we used GFP-LC3 expression mesothelioma cell lines to observe autophagy, autophagy were observed in mesothelioma cell lines by culture of normal medium. GFP-LC3 were increased in mesothelioma cell lines by culture of starvation medium. Autophagy inhibitors suppressed autophagy and cell proliferation in mesothelioma cells. These results suggest that mesothelioma cells are constantly activated autophagy and related to cell proliferation.

研究分野：悪性中皮腫

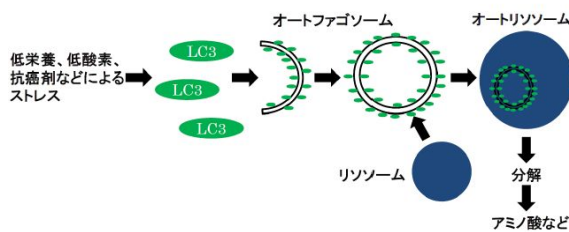
キーワード：悪性中皮腫 オートファジー 細胞増殖

1. 研究開始当初の背景

悪性中皮腫は、アスベスト曝露を原因とする極めて予後不良な悪性腫瘍である。アスベスト曝露から悪性中皮腫の発症までの潜伏期間は数十年であり、高度経済成長期の1970-90年頃に大量のアスベストが使用されたことから、悪性中皮腫の患者は増加の一途を辿り、2025年頃にピークを迎えると推測されている(*N Engl J Med.* 353:1591-1603, 2005)。悪性中皮腫では、一般的に、外科療法、化学療法および放射線療法からなる集学的治療が行われる(*J Clin Oncol.* 27:1413-1418, 2009)。化学療法では、シスプラチン(DNA合成阻害剤)とペメトレキセド(葉酸合成阻害剤)の併用が用いられているが、十分な治療成績は得られていない。

一方、オートファジーは、細胞の自己成分を分解して再利用することで、細胞の恒常性維持を担う細胞内分解機構である。オートファジーが活性化されると、LC3蛋白質が集積し、オートファゴソームを形成する。オートファゴソームは、オルガネラや蛋白質を取り囲み、その後、リソソームと融合してオルガネラや蛋白質を分解する(*Cell.* 147:728-741, 2011)(図1)。

図1 オートファゴソーム形成の過程



腫瘍細胞において、オートファジーの活性化が生存・増殖機構として働くことが見出されている(*Gene Dev.* 25: 717-721, 2011)。また、抗癌剤治療時には、オートファジーが活性化されて、抗癌剤からのストレスに適応する細胞の防御機構としてオートファジーが働くことで腫瘍細胞が細胞死を回避すると報告されている(*Clin. Cancer. Res.* 15: 5308-5316, 2009)。

以上より、オートファジーを阻害することは、悪性中皮腫を抑制する新規治療法になる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、悪性中皮腫の細胞増殖、抗癌剤抵抗性におけるオートファジーの役割を明らかにし、新規治療法の開発に繋げることである。

3. 研究の方法

(1) LC3蛋白質の検出

オートファジー活性化の指標として、ウエスタンブロットングによるオートファゴソームのマーカーであるLC3蛋白質の検出が有用とされている。そこで、不死化中皮細胞株、正常中皮細胞、悪性中皮腫細胞株におけるLC3蛋白質の発現をウエスタンブロット法で調べた。また、悪性中皮腫細胞株(MSTO-211H, MM56)を培養している培地中にシスプラチン(cis)、ペメトレキセド(pmx)を添加し、LC3蛋白質の発現をウエスタンブロット法で調べた。

(2) オートファゴソームの観察

オートファゴソームを構成するLC3は、GFP-LC3融合蛋白質として細胞に発現させることで、蛍光顕微鏡下で細胞内のオートファゴソームの局在や動態を可視化することが可能になる。そこで、悪性中皮腫細胞株(MSTO-211H, MM16, MM56)にレトロウイルスを用いてGFP-LC3を遺伝子導入し、GFP-LC3を安定的に発現するGFP-LC3発現悪性中皮腫細胞株を作製した。GFP-LC3発現悪性中皮腫細胞株を通常の培地、飢餓培地のそれぞれで培養し、悪性中皮腫細胞株の細胞内のオートファゴソームを蛍光顕微鏡下で観察した。また、シスプラチン、ペメトレキセドをそれぞれ培地中に添加し、細胞内のオートファゴソームを蛍光顕微鏡下で観察した。

(3) 細胞増殖試験

細胞増殖は、Cell titer blue (Promega)を用いて測定した。

オートファジー阻害剤による影響

悪性中皮腫細胞株(MSTO-211H, MM16, MM56)を培養している培地中にオートファジー阻害剤である3-メチルアデニン(3-MA)、ヒドロキシクロロキン(HQ)を様々な濃度で添加した。それぞれの細胞で、濃度0の増殖率を100%として、各濃度における増殖率を算出した。

抗癌剤による影響

GFP-LC3発現悪性中皮腫細胞株(MSTO-211H, MM56)を培養している培地中にシスプラチン、ペメトレキセドをそれぞれ添加した。それぞれの細胞で、濃度0の増殖率を100%として、各濃度における増殖率を算出した。

オートファジー阻害剤と抗癌剤との併用による影響

GFP-LC3 発現悪性中皮腫細胞株 (MSTO-211H, MM56) を培養している培地中に以下の単剤及び多剤を添加し、72 時間培養した。

control (溶媒のみ)、 cis、 pmx、 3-MA、 HQ、 cis+3-MA、 pmx+3-MA、 cis+HQ、 pmx+HQ、 cis+pmx、 cis+pmx+3-MA、 cis+pmx+HQ
それぞれの細胞で、control の増殖率を 100% として、増殖率を算出した。

4. 研究成果

(1) 悪性中皮腫細胞株における恒常的な LC3 蛋白質の高発現

悪性中皮腫細胞株、不死化中皮細胞株、正常中皮細胞における LC3 蛋白質の発現を調べると、悪性中皮腫細胞株では、不死化中皮細胞株、正常中皮細胞に比べて LC3 の発現が高かった(図 2)。

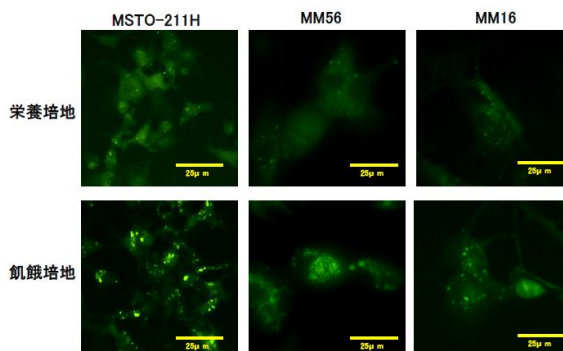
図 2 LC3 蛋白質の発現



(2) 悪性中皮腫細胞株における恒常的なオートファゴソームの形成

GFP-LC3 発現悪性中皮腫細胞株内のオートファゴソームを観察した。通常の培養条件で培養した細胞において、細胞質内にドット状のオートファゴソームが観察された。また、無血清培地(飢餓培地)で培養した細胞では、細胞内のオートファゴソームは増加した(図 3)。

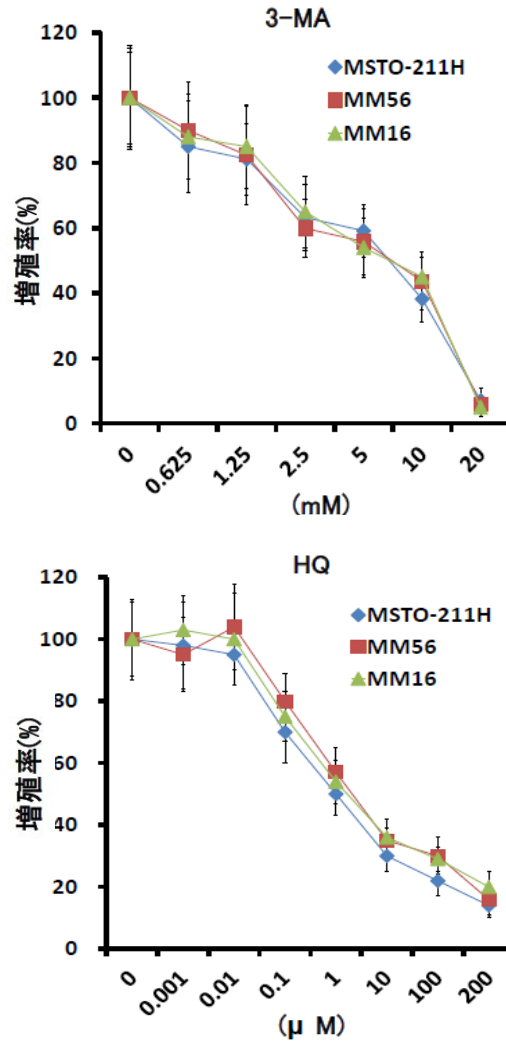
図 3 GFP-LC3 発現悪性中皮腫細胞株内のオートファゴソーム



(3) オートファジー阻害剤による細胞増殖抑制

3-メチルアデニン、ヒドロキシクロロキンを培地に添加して 72 時間培養した悪性中皮腫細胞株において、濃度依存的に細胞増殖は抑制された(図 4)。

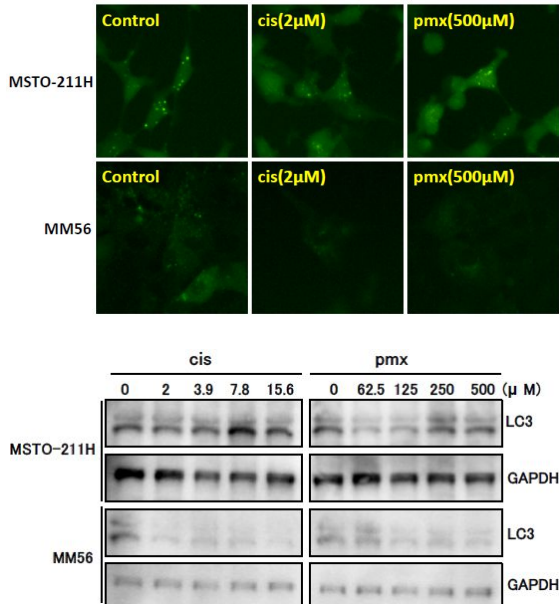
図 4 オートファジー阻害剤による細胞増殖率の変化



(4) 抗癌剤によるオートファゴソーム形成への影響

GFP-LC3 発現悪性中皮腫細胞株を培養している培地中にシスプラチン、ペメトレキセドを添加し、細胞内のオートファゴソームを経時的に観察すると、コントロールとシスプラチン、ペメトレキセドを培地に添加した細胞において、オートファゴソームのドット量に変化はなかった。また、ウエスタンブロットで LC3 の発現を調べると、コントロールとシスプラチン、ペメトレキセドを培地中に添加した細胞で発現量に差はなかった (図 5)。

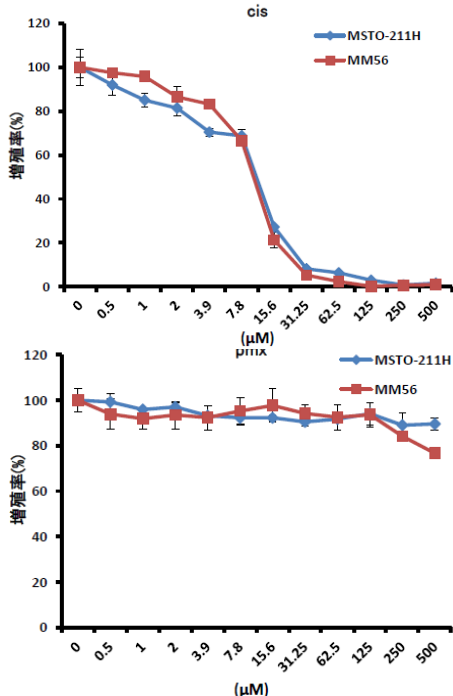
図 5 抗癌剤のオートファゴソーム形成への影響



(5) 抗癌剤による細胞増殖抑制

GFP-LC3 発現悪性中皮腫細胞株を培養している培地中にシスプラチン、ペメトレキセドを添加し、72 時間後に細胞増殖を測定すると、シスプラチンを添加した細胞では濃度依存的に細胞増殖は抑制された。また、ペメトレキセドを添加した細胞では、濃度依存的にわずかに細胞増殖は抑制された (図 6)。

図 6 抗癌剤による細胞増殖率の変化



(6) 抗癌剤とオートファジー阻害剤との併用による細胞増殖抑制

悪性中皮腫培養細胞株に以下の単剤 (増殖抑制が 10-20%程度になるような濃度) 及び多剤を培地中に添加し、72 時間後、細胞増殖の変化について調べると、シスプラチンやペメトレキセドにそれぞれ 3-メチルアデニン、ヒドロキシクロロキンを併用すると、単剤に比べて 2 剤併用の方が細胞増殖は抑制された。また、シスプラチンとペメトレキセド併用にそれぞれ 3-メチルアデニン、ヒドロキシクロロキンを併用した 3 剤併用では、2 剤併用 (シスプラチンと 3-メチルアデニン、ペメトレキセドとヒドロキシクロロキン、シスプラチンとペメトレキセド) に比べて細胞増殖が抑制された (図 7)。

control (溶媒のみ)

cis (2 μM)

pmx (500 μM)

3-MA (1mM)

HQ (0.1 μM)

cis+3-MA

pmx+3-MA

cis+HQ

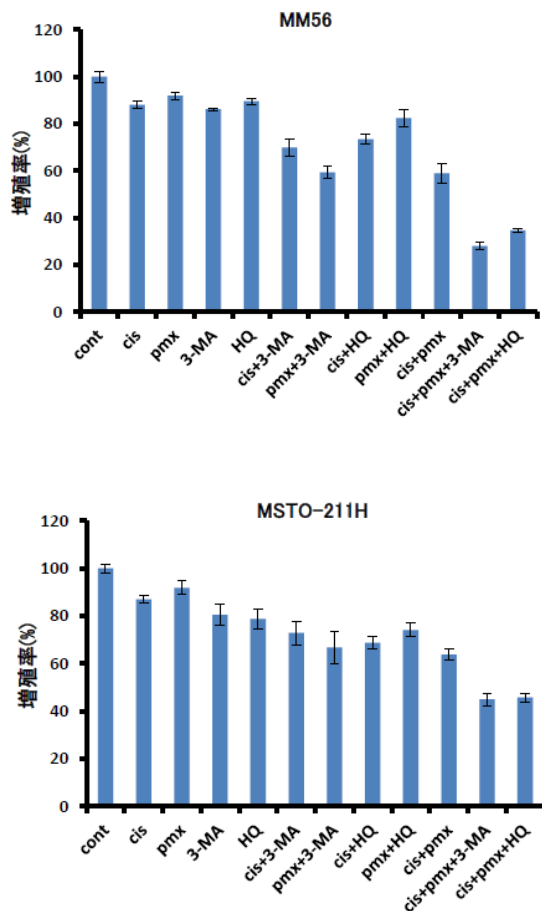
pmx+HQ

cis+pmx

cis+pmx+3-MA

cis+pmx+HQ

図 7 抗癌剤、オートファジー阻害剤の単剤、多剤併用による細胞増殖率の変化



(7) 総括

悪性中皮腫細胞株では、不死化中皮細胞株、正常中皮細胞に比べて、LC3 の発現が高く、悪性中皮腫細胞株内のオートファゴソームを観察すると、通常の培養条件下であってもドット状のオートファゴソームが観察されたことから、悪性中皮腫細胞では、恒常的にオートファジーが活性化していることが示唆された。一方、抗癌剤であるシスプラチンやペメトレキセドは、オートファジーを活性化しなかったことより、悪性中皮腫において、抗癌剤抵抗性は、オートファジーの活性化に関与しない可能性がある。また、オートファジー阻害剤である 3-メチルアデニン、ヒドロキシクロロキンにより、悪性中皮腫細胞株のオートファジーを阻害すると細胞増殖が抑制されたことから、オートファジーは悪性中皮腫の細胞増殖に深く関与していると考えられた。さらに、抗癌剤にオートファジー阻害剤を併用すると、細胞増殖の抑制を増強することは、現在、悪性中皮腫で行われている化学療法であるシスプラチンとペメトレキセド併用より、より有効な治療法になる可能性がある。悪性中皮腫で恒常的に活性化しているオートファジーの分子機序解明や悪性中皮腫の抗癌剤抵抗性の機序の解明は、今後、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 0 件)

[学会発表](計 1 件)

篠原義康、佐藤鮎子、隅田亜由美、辻村亨、悪性中皮腫におけるオートファジーの役割、第 105 回日本病理学会、2016 年 5 月、仙台国際センター(宮城県仙台市)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

篠原 義康 (Shinohara, Yoshiyasu)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：60723509

(1) 連携研究者

辻村 亨 (Tsujimura, Tohru)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：70207661

佐藤 鮎子 (Sato, Ayuko)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：20419823