

令和元年5月8日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08782

研究課題名(和文)パーキンソン病患者には何故癌の発症が少ないのか？ - 癌発症予防の基礎的研究 -

研究課題名(英文) Why do Parkinson's disease patients have fewer histories of cancer?: A basic study for cancer prevention.

研究代表者

福島 哲仁 (FUKUSHIMA, Tetsuhito)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：90208942

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々の研究からメチルニコチンアミドが脳内complex 1でラジカルを産生し、パーキンソン病の発症に關与していることが示唆され、同様の現象が全身に起こり、活性酸素に弱い癌細胞が増殖を抑制されるという仮説をもとに、活性酸素による癌細胞増殖抑制効果を検証した。マウス肝臓癌細胞が死に、正常細胞が生き残る最も治療効果が高いパラコートの濃度は、培養2日目までは3 μ M、7日目では1-2 μ Mであることがわかった。ヒト培養細胞では、乳腺においては、乳癌細胞より正常乳腺細胞がパラコートラジカルへの感受性が高く、肝臓では、培養7日目で肝臓癌細胞が正常肝細胞よりパラコートラジカルへの感受性が高いという結果であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

パーキンソン病やアルツハイマー病等の神経疾患と癌の発症が逆相関することはよく知られており、一方が他方の発症を抑制している可能性がある。パーキンソン病患者では、nicotinamide N-methyltransferase活性が亢進し、体内で1-methylnicotinamide産生が増加しており、全身の細胞で活性酸素が比較的多く発生するため癌細胞は増殖しにくい。長期の活性酸素の影響で神経細胞のミトコンドリアの機能異常が生じ、パーキンソン病に至るといふ仮説が導き出された。この仮説をもとに、活性酸素に対する癌細胞と正常細胞の感受性の差に注目して癌の治療に活かさないかと考えた。

研究成果の概要(英文)：In our previous study, it was suggested that reactive oxygen species produced by 1-methylnicotinamide via cerebral complex 1 involved in onset of Parkinson's disease. The reactive oxygen species produced in the whole body might attenuate cancer cell proliferation. Based on this hypothesis, the difference of sensitivity to reactive oxygen species between cancer cells and healthy cells was examined with paraquat. In the culture experiments with mouse cells, the optimum concentrations at which hepatoma cells die and healthy cells survive were 3 μ M paraquat on days 1 and 2, and 1 or 2 μ M on day 7. In the culture experiments with human mammary gland cells, sensitivity of healthy cells to paraquat radical was higher than that of cancer cells. But in the culture experiment with human liver cells, sensitivity of cancer cells to paraquat radical was higher than that of healthy cells on day 7.

研究分野：予防医学

キーワード：癌細胞 パラコート ラジカル感受性 パーキンソン病

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

1. 研究開始当初の背景

ビタミンの一種であるニコチンアミド(ナイアシンはニコチン酸とニコチンアミドの総称)は、nicotinamide N-methyltransferase (NNMT) により体内で 1-methylnicotinamide (MNA) に代謝される。我々は、MNA が、脳内のミトコンドリア呼吸鎖酵素複合体 complex I を介してラジカルを産生し、ミトコンドリアを傷害すること、ラットの中脳黒質に微量の MNA を注入すると、線条体のドーパミン含有量が低下することから、生体内における MNA の神経毒性について提起した。ニコチンアミドの神経への影響については、海外の研究者からも報告されている。また、パーキンソン病患者においては、NNMT 活性が亢進していることが知られており、脳内で MNA 産生が増加し、発生する活性酸素の影響を強く受けることになる。パーキンソン病は、ナイアシン摂取等の環境要因と NNMT 活性の遺伝的要因との相互作用によって脳内ミトコンドリアの機能異常が蓄積して生じる“局所の老化の進行”と考えている。

一方、パーキンソン病やアルツハイマー病等の神経疾患と癌(前立腺癌、悪性黒色腫を除く)の発症が逆相関することはよく知られており、一方が他方の発症を抑制している可能性がある。このメカニズムが明らかとなれば、パーキンソン病等の神経疾患と癌双方の発症を予防する方法が見つかるのではないかと考えた。

癌細胞では、好氣的環境においても解糖系に抑制がかからない Warburg 効果がよく知られている。なぜ癌細胞が好氣的環境下においてもエネルギー産生効率のよいミトコンドリア内の酸化的リン酸化を主に利用しないのかよく分かっていないが、酸化的リン酸化を利用しないことによって、ミトコンドリアにおける活性酸素発生を抑制しているのかもしれない。また、解糖系の亢進により癌細胞内で乳酸が大量に作られ、酸性に傾く。我々のこれまでの研究結果から、パラコートによるミトコンドリア内の活性酸素発生は、アルカリ側で増強し、酸性側で減弱することがわかっている。同様の現象が、MNA を用いた実験でも観察されたことから、癌細胞は、あえて不利な解糖系を駆使し、産生した乳酸により酸性の環境を作り出し、ミトコンドリアの活性酸素発生を抑制し、その攻撃から逃れようとしているかに見える。

2. 研究の目的

NNMT 活性は、脳や肝臓を含む多くの臓器で認められている。パーキンソン病患者では、NNMT 活性が亢進し、体内で MNA 産生が増加しており、発生する活性酸素の影響は全身に及ぶ。従って、若年時から NNMT 活性が亢進し、MNA 産生が増加して全身の細胞で活性酸素が比較的多く発生する集団は、癌細胞は増殖しにくい、長期の活性酸素の影響で神経細胞のミトコンドリアの機能異常が生じ、細胞死によってパーキンソン病に至るといふ仮説が導き出された。この仮説をもとに、活性酸素に対する癌細胞と正常細胞の感受性の差に注目してこれを癌の治療に活かさないかと考えた。

3. 研究の方法

マウス細胞を用いた実験 1

マウス肝臓癌細胞として Hepa 1-6 (mouse hepatoma cell line)、マウス正常肝細胞として NCTC Clone 1469 (Normal cell line from mouse liver) を用い、パラコートが細胞に及ぼす影響について比較した。DMEM (high glucose type)、10% horse serum 培地で細胞を 5% CO₂ インキュベーターにて適宜増殖させた後、プレートの各 well に 200μl の培養液にて 4,000 個 (2.0×10⁴ cell/ml) の細胞を播種し、培養した。培養を始めて 2 日後に、各グループ 12well ずつ、パラコートの最終濃度が 0μM (control)、1μM、5μM、10μM、50μM になるようパラコートを添加した。パラコート添加後、1 日目、2 日目、4 日目に細胞生存率を測定した。

マウス細胞を用いた実験 2

肝臓癌細胞が死に、正常肝細胞が生き残る最も治療効果の高い濃度を決定するため、実験 1 と同様の実験系で、パラコート 0μM (control)、1μM、2μM、3μM、4μM、5μM の濃度添加後、1 日目、2 日目、7 日目に細胞生存率を測定し感受性の差を比較した。さらに、同様の実験系で、パラコートの代わりにニコチンアミドと MNA に対する感受性を比較した。細胞を 5% CO₂ インキュベーターで適宜増殖させた後、プレートの各 well に 200μl の培養液にて 4,000 個 (2.0×10⁴ cell/ml) の細胞を播種し、培養した。培養を始めて 2 日後に、各グループ 12well ずつ、ニコチンアミド又は MNA の最終濃度が 0mM (control)、0.01mM、0.1mM、1mM になるよう添加し、添加後、1 日目、2 日目、4 日目、7 日目に細胞生存率を測定した。

ヒト細胞を用いた実験

ヒト肝臓癌細胞、ヒト乳癌細胞について、パラコートによる治療効果を確認するための実験を行った。用いた細胞は、正常肝細胞として HP-NP2 (Human Hepatocyte)、肝臓癌細胞として Hep G2 (Human Hepatoma cell line, hepatocellular carcinoma 由来)、正常乳癌細胞として HMEC (Human Mammary Epithelial Cells)、乳癌細胞として MCF 7 (Human Breast Cancer cell line, Breast adenocarcinoma 由来)。培地は、HP-NP2 には、Plating Medium として DMEM (high glucose type)、Maintenance Medium として Williams E Medium、Hep G2 には、2 種類の培地を用い、正常肝細胞と同じ Williams E Medium または DMEM+10% horse serum 培地、HMEC と MCF 7 には、同じ HuMEC 培地を用いた。凍結細胞を 5% CO₂ インキュベーター下で 96well プレートに各 200μl

(2.0×10^4 cell/ml=4000cell/well)播種、培養した。2日後、パラコートの最終濃度が0(Control)、1、2、3、4、5 μ M(それぞれ12wellずつ)になるように培地交換を行った。その後のパラコートの濃度を保つため3日ごとに培地交換を行った。細胞生存率を、パラコート添加の翌日(1日目)、2日目、4日目、7日目に測定した。Cell Count Reagent SFを使用し、Controlの吸光度を100%としてそれぞれの生存率を計算した。

Controlと比較のための検定は、すべてDunnett t testを用いた。

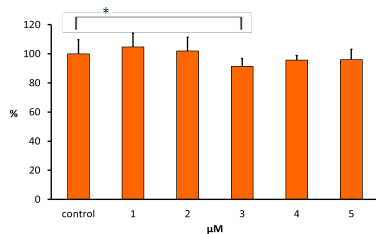
4. 研究成果

(1) マウス細胞を用いた実験1

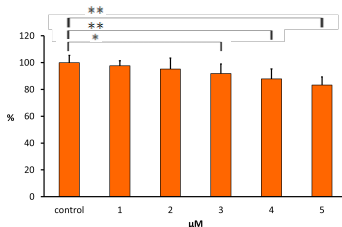
肝臓癌細胞は、5 μ M以上の濃度群で、どの日目でもコントロールと比較して細胞数が有意に減少したが、正常肝細胞では、1日目と2日目では10 μ M以上で、4日目では5 μ M以上の濃度群でコントロールと比較して細胞数が有意に減少した。1-5 μ Mの間に、肝臓癌細胞が死に、正常細胞が生き残る最も治療効果の高い濃度が存在することが明らかとなった。

(2) マウス細胞を用いた実験2

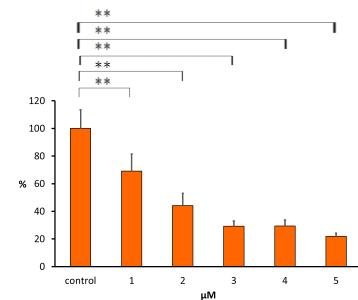
肝臓癌細胞は、3 μ M以上の濃度群で、どの日目でもコントロールと比較して細胞数が有意に減少したが、正常肝細胞では、1日目ではどの濃度でも、2日目では3 μ Mまで、7日目では2 μ Mまでの濃度群でコントロールと比較して細胞数の減少が見られなかった。この結果、肝臓癌細胞が死に、正常細胞が生き残る最も治療効果の高いパラコートの濃度は、2日目までは3 μ M、7日目では1-2 μ Mであることがわかった。



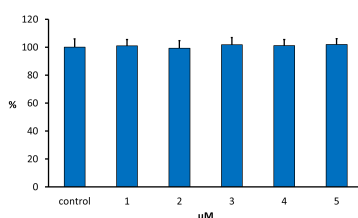
肝臓癌細胞 1日目



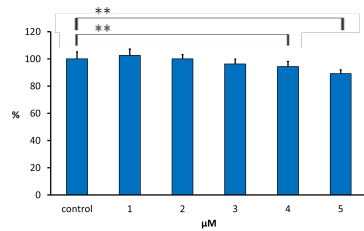
肝臓癌細胞 2日目



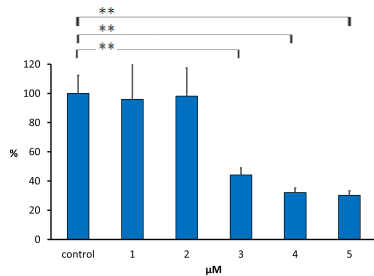
肝臓癌細胞 7日目



正常肝細胞 1日目



正常肝細胞 2 日目



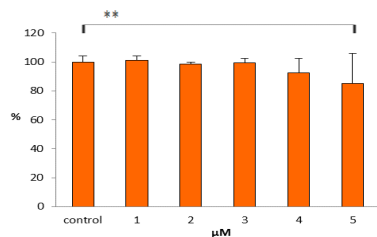
正常肝細胞 7 日目

Fig. 1. The difference of sensitivity to ROS between mouse hepatoma cells and mouse healthy liver cells. The orange graph is for hepatoma cells, and the blue one is for healthy liver cells. **, P<0.01, *, P<0.05

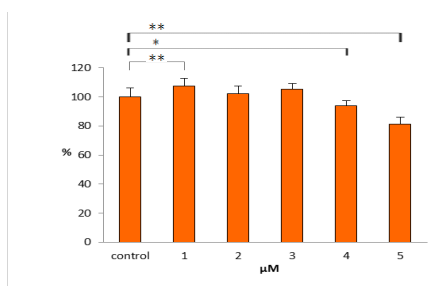
ニコチンアミドを添加した肝臓癌細胞は、どの濃度、どの日目においても細胞数の有意な減少は見られず、正常肝細胞は、1mM の濃度で 7 日目に減少した。MNA も同様で、肝臓癌細胞は、どの濃度、どの日目においても細胞数の有意な減少は見られず、正常肝細胞は、1mM の濃度で 4 日目、7 日目に減少した。この結果、ニコチンアミドと MNA については、治療効果が期待される濃度の設定はできなかった。

(3) ヒト細胞を用いた実験

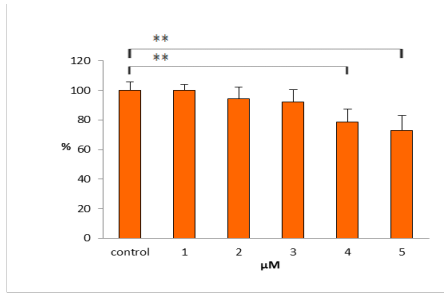
同じ培地を使った肝臓の細胞の実験では、両者の差は明瞭ではなく、4 日目、7 日目になると両者ともどの濃度でも生存率が低下しなくなった。それぞれの専用培地を使った実験では、4 日目までは、正常肝細胞の生存率がパラコート濃度 2μM 以上で肝臓癌細胞より先に生存率の低下が始まったが、7 日目では、肝臓癌細胞がパラコート濃度 3μM 以上で生存率が低下したにもかかわらず、正常肝細胞は 5μM になってから低下した。



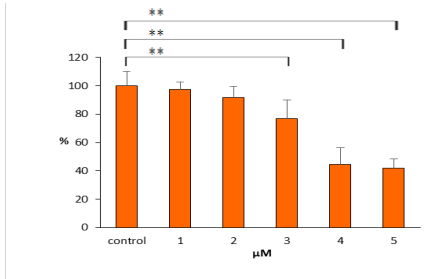
肝臓癌細胞 1 日目



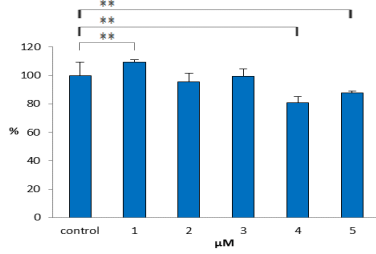
肝臓癌細胞 2 日目



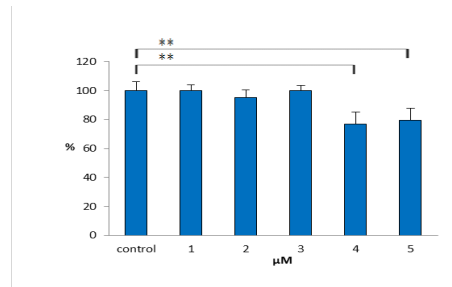
肝臟癌細胞 4 日目



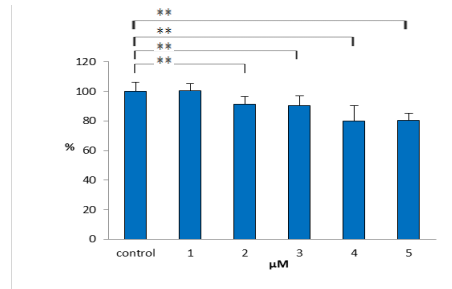
肝臟癌細胞 7 日目



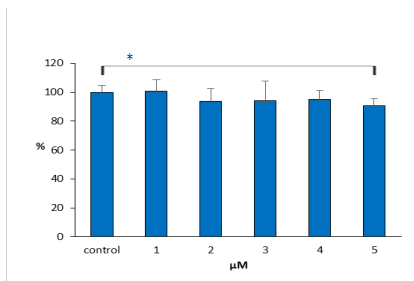
正常肝細胞 1 日目



正常肝細胞 2 日目



正常肝細胞 4 日目



正常肝細胞 7 日目

Fig. 2. The difference of sensitivity to ROS between human hepatoma cells and human healthy liver cells. The orange graph is for hepatoma cells, and the blue one is for healthy liver cells. **, P<0.01, *, P<0.05

乳腺の細胞の実験では、乳癌細胞は、1日目から7日目までパラコート濃度4 μ M以上で生存率が低下したが、正常乳腺細胞は、2日目までは、4 μ M以上で生存率が低下し、4日目では3 μ M以上で、7日目では2 μ M以上で生存率が低下した。

乳腺においては、乳癌細胞より正常乳腺細胞がパラコトラジカルへの感受性が高いという結果であった。肝臓では、それぞれの専用培地を使った実験で、7日目では、肝臓癌細胞が正常肝細胞よりパラコトラジカルへの感受性が高いという結果であった。

マウスとヒトの肝臓細胞を用いた実験から、肝臓癌は活性酸素への感受性が正常肝細胞と比較して高い可能性があり、今後さらに活性酸素による効果を検証して行く必要がある。

5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 1件)

Tetsuhito FUKUSHIMA, Yayoi MORI, Yusuke MASUISHI, Shota ENDO, Tomoo HIDAKA, Takeyasu KAKAMU, Tomohiro KUMAGAI. Why do Parkinson's disease patients have fewer histories of cancer? : A possibility that exposure to relatively low levels of reactive oxygen species prevents cancer. The 13th International Conference of the Asian Clinical Oncology Society (ACOS), 2018年2月23-25日, チェンマイ, タイ.

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：熊谷 智広

ローマ字氏名：KUMAGAI, Tomohiro

所属研究機関名：福島県立医科大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号(8桁)：20528111

(2)研究協力者

なし