

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09991

研究課題名(和文)がん細胞のレドックス制御による放射線増感と分子機構の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanism of radio-sensitization by redox modification in cancer cells

研究代表者

趙 慶利 (ZHAO, QING-LI)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・助教

研究者番号：90313593

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではxCT阻害剤スルファサラジン、糖ペプチド合成阻害物lysolipin Iと新規抗腫瘍抗生物BU-4664L、ニトロキッドTEMPOを利用して、放射線および温熱による細胞死への影響を調べることである。U937およびMolt-4細胞においてLysolipin IおよびBU-4664Lは処理濃度に依存して細胞死を誘発した。HeLa細胞においてTEMPOは温熱との併用により温熱細胞死の増感効果を示し、その細胞死の様式はオートファジー細胞死であることを明らかにした。アポトーシスからオートファジー細胞死に転換するのはTP53NP1, CDKN1B及びCDKN2D遺伝子が関与することが判明した。

研究成果の概要(英文)：In this study, the efficacy of some compounds was investigated to modify radiation or hyperthermia induced cell death. Lysolipin I or BU-4664L induced apoptosis in U937 and Molt-4 cells. In addition, Lysolipin I also enhanced radiation-induced apoptosis while, the low concentration BU-4664L have a protecting effect on radiation induced apoptosis. In this study, we determined that Tempo combine treatment with hyperthermia rapidly induced autophagic cell death. Tempo 5 mM -44 /20 min combination induced apoptosis, while Tempo 5 mM -44 /60 min combination induced autophagic cell death in HeLa cells. This co-treatment inhibited the processing of heat-activated procaspase-3 into active small subunits, leading to the inhibition of caspase-dependent apoptosis, and results in the induction of autophagic cell death. Furthermore, the gene chip analysis showed the up-regulation of TP53INP1 and cyclin-dependent kinase inhibitor (CDKI) genes in the combination treatment.

研究分野：放射線医学

キーワード：細胞死 放射線 温熱

1. 研究開始当初の背景

放射線治療重要性が増しているが、問題点の一つに、がん幹細胞による放射線治療抵抗性がある。これはシスチン取り込みによるグルタチオン量上昇による抗酸化能の亢進による (*Cancer Cell* 19: 387, 2011)。申請者は、放射線及び温熱によるアポトーシスの増強について研究し、薬剤自身が細胞毒性を示さない程度に、できればがん細胞に選択的に細胞内酸化ストレスを上げることが放射線細胞死を増強する可能性を見出した。レドックス (Redox) とは、Reduction (還元) と Oxidation (酸化) を合体させた化学用語で、酸化・還元反応の均衡を意味する。治療目的にこれを修飾することは、細胞内外での酸化型・還元型グルタチオン比 (GSSG/GSH)、酸化型・還元型チオレドキシンの変化や過酸化水素 (H_2O_2)、脂質ヒドロペルオキシド (LOOH) の蓄積によって、細胞間情報の制御を通じて、細胞死 (アポトーシス、ネクローシス、オートファジー様細胞死) を増やすことに通じる。重要な点は、細胞内の ROS の活性種の種類と量であり、これらの時間的制御が放射線抵抗性の克服に繋がることである。

2. 研究の目的

レドックス修飾による放射線がん細胞死の増強と治療成績の向上を目的とする。放射線治療の抵抗性の一つにがん幹細胞があり、その治療抵抗性の原因に細胞内のグルタチオン量の増加による抗酸化能の亢進がある。最近の臨床知見では、高圧酸素療法や過酸化水素の併用による放射線治療の有効性の向上が報告されており、本研究では、化学的手法によりがん細胞の抗酸化能の低下と酸化ストレスを誘導し、放射線細胞死の増強を目指す。そのため、放射線によるがん細胞死増強のための有効なレドックス修飾薬剤の探索・開発とこれによる治療効果の増強法の確立をめざす。増強効果が得られた様式について分子機構を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、シスチンの取り込み阻害剤スルファサラジン、糖ペプチド合成阻害物質 Lysolipin I を利用し、放射線細胞死の増強効果をヒト白血病 Molt-4 細胞株およびヒト大腸がん細胞株 (HCT-15, HCT116) で検証し、その細胞死の分子機構について、ミトコンドリアの機能 (ROS の生成、膜電位の消失、ATP 合成阻害)、ER ストレス、Casapases の活性化、細胞死 (アポトーシス、オートファジー様細胞死) 関連タンパク質発現変化を検討する。

4. 研究成果

本研究では xCT 阻害剤スルファサラジン、糖ペプチド合成阻害物 Lysolipin I と新規抗腫瘍抗生物 BU-4664L、ニトロキシド TEMPO を利用して、放射線および温熱による細胞死 (ア

ポトーシス、オートファジー細胞死) への影響を調べることである。U937 および Molt-4 細胞において BU-4664L および Lysolipin I は処理濃度に依存して細胞死を誘発した (図 1, 2)。また、Molt-4 細胞において、Lysolipin I と放射線併用は細胞死を増強することが確認された (図 2)。同様に、スルファサラジンと放射線併用による細胞死を増強することが確認された。一方、BU-4664L については低濃度で放射線の防護効果が認められた。U937 細胞において、Isofraxidin と温熱併用は細胞死を増強することが確認された。HeLa 細胞において TEMPO は温熱との併用により温熱細胞死の増感効果を示し、その細胞死の様式はオートファジー細胞死であることを明らかにした。アポトーシスからオートファジー細胞死に転換することが非常に重要と考えられる。そのメカニズム解析にマイクロアレイ遺伝子解析法を利用したところ、アポトーシスからオートファジー細胞死に転換するのは *TP53NP1*, *CTSV*, *CDKN1B* 及び *CDKN2D* 遺伝子が関与することが判明した (図 3)。タンパク質発現の結果は TP53INP1, Atg5, p62 及び LC3 タンパク質と関連することが判明した (図 4)。分子シャペロン HSPs と温熱感受性について、HeLa 細胞を用いて調べた。温熱単独で HSP70 を誘導し、TEMPO 併用では HSP70 を抑制した。HSP70 は TEMPO による温熱細胞死の増感に関与することが判明した (図 5)。

図 1 BU-4664L によるアポトーシス

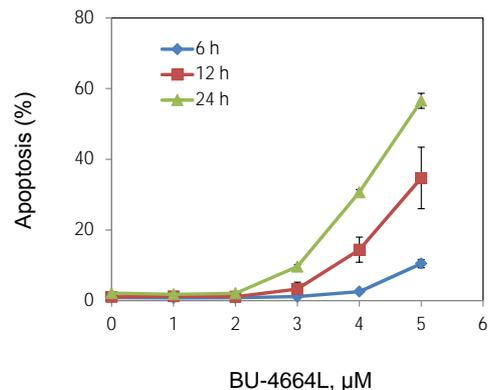


図 2 Lysolipin I によるアポトーシス

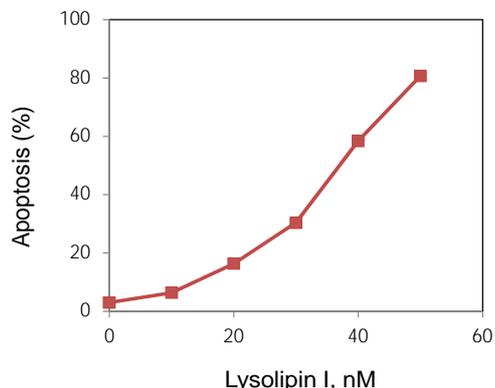


図3 Lysolipin I による放射線アポトーシスの増強

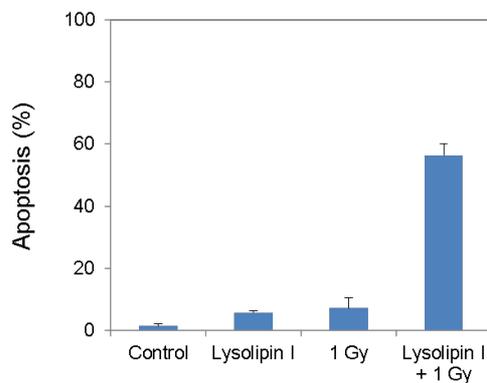
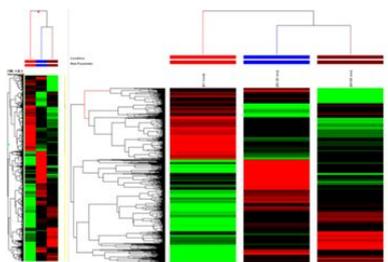


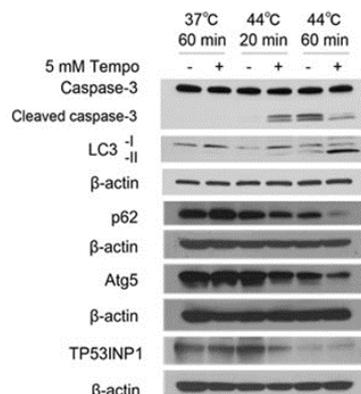
図4 TEMPO と温熱併用による細胞死の増強と関連遺伝子の発現



オートファジー細胞死関連遺伝子

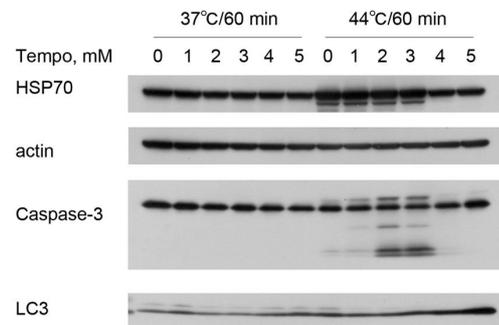
vs 20 min	vs 60 min	GeneSymbol
1.76	0.93	CTSV
0.86	1.43	CDKN1B
2.29	1.16	CDKN2D
1.93	3.22	TP53INP1

図5 遺伝子検索結果で得られ TP53INP1 の低下を、ウエスタンの結果で証明



TEMPO と温熱併用による TP53INP1 の発現が抑制された。

図6



5. 主な発表論文等

[学会発表](計 5 件)

— Zhao QL, Fujiwara Y, Kondo T. Combination of Tempo and Hyperthermia Induced Autophagic Cell Death in HeLa Cells. BIT 's 10th Annual World Cancer Congress-2017; 2017 May 19-21; Barcelona.

— Zhao QL, Rehman MU, Noguchi K, Kondo T. Gene expression changes and autophagic cell death induced by hyperthermia in the presence of Tempo. 日本ハイパーサーミア学会第 34 回大会; 2017 Sep 15-16; 京都.

— 趙 慶利, 李鵬, Rehman MU, Jawaid P, 櫻井宏明, 近藤 隆. Isofraxidin による温熱細胞死の増強. 第 19 回癌治療増感研究シンポジウム; 2017 Feb 3-4; 奈良.

— Zhao QL, Fujiwara Y, Kondo T. Nitroxide, Tempo enhanced hyperthermia induced cell killing in HeLa cells. 第 18 回癌治療増感研究シンポジウム; 2016 Feb 5-6; 奈良.

— 趙 慶利. 富山の放線菌由来の新規物質 BU-4664L によるアポトーシス誘発メカニズム解析と放射線・温熱併用効果の検討. Toyama Science GALA 2016; 2016 Sep 30; 富山.

6. 研究組織

(1)研究代表者

趙 慶利 (ZHAO, Qing-Li)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・助教

研究者番号: 90313593

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

李 鵬 (Li, Peng)