

令和元年6月11日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16040

研究課題名(和文)悪性胸膜中皮腫に対するネクロプトーシス誘導と抗癌剤耐性機構との関連性の解析

研究課題名(英文)The correlation between introducing necroptosis on malignant mesothelioma and chemoresistance

研究代表者

石綿 司 (ISHIWATA, TSUKASA)

千葉大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：50791480

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：悪性胸膜中皮腫細胞株を用い、既知のネクロプトーシス誘導方法の誘導効率を比較検討した。TNF- $\alpha$  + IAP(アポトーシス阻害因子)阻害薬 + Caspase阻害薬、の併用法が最も細胞死を誘導し、Necrostatin-1による細胞死阻害、RIPK1/RIPK3/MLKLのリン酸化蛋白の増加、および電子顕微鏡画像による形態確認、をもってネクロプトーシスを確認した。ネクロプトーシスの誘導はシスプラチン耐性株で効率が高いことが明らかとなった。シスプラチン耐性と関連することで知られるMDR1,MRP1,MRP2の発現レベルとネクロプトーシスの誘導効率との相関を検討したが、明らかな相関は示されなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性胸膜中皮腫はアスベスト曝露と密接に関連し、壁側胸膜の中皮細胞から発生する極めて予後不良の腫瘍である。今後わが国で増加すると予想されている悪性腫瘍のひとつである。しかしながら、悪性胸膜中皮腫に対する有効な治療法の確立は遅れており、新しい治療法が待たれている。悪性胸膜中皮腫に対するネクロプトーシス誘導の報告は少ない。今回我々が誘導に成功した方法を用い、ネクロプトーシス誘導を悪性胸膜中皮腫の治療として発展させるための基本的アプローチ方法として今後応用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We assessed the efficacy of introducing necroptotic cell death on malignant mesothelioma cells. The method of combination with TNF- $\alpha$ , IAP inhibitor and pan-caspase inhibitor showed the highest efficacy in introducing necroptosis. We confirmed the necroptosis by inhibition of cell death using necrostatin-1, increase the amount of phosphorylate proteins of RIPK1, RIPK3 and MLKL, and morphological change observed by the electron microscope. In cisplatin-resistant malignant mesothelioma cells, the cell deaths through necroptosis were observed more compared to in wild type or pemetrexed-resistant type. The expression level of MDR1, MRP1 and MRP2 that are related to cisplatin resistance did not show a correlation to the efficacy of necroptosis.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：悪性胸膜中皮腫 ネクロプトーシス

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

### 1. 研究開始当初の背景

悪性胸膜中皮腫はアスベスト曝露と密接に関連し、壁側胸膜の中皮細胞から発生する極めて予後不良の腫瘍である。今後わが国で増加すると予想されている悪性腫瘍のひとつである。しかしながら、悪性胸膜中皮腫に対する有効な治療法の確立は遅れている。申請者らはこれまでに悪性胸膜中皮腫を対象として様々な治療法の探索に取り組んできた。

ネクロプトーシスは、細胞死の一つの形態であり、「プログラムされたネクロシス(壊死)」とも呼ばれる。これまでネクロシスは、プログラムされない偶発的に起こる細胞死と認識されてきた。しかし近年、RIPK1 と RIPK3 といったキナーゼ活性依存的に誘導される、ネクローシス様の細胞死の存在が明らかにされ、「ネクロプトーシス」というプログラムされた細胞死として認識されるようになってきた<sup>1</sup>。ネクロプトーシスはウイルス感染の排除、薬剤誘導性肺炎、還流障害などとの関与が報告されている。最近では、種々の癌の細胞株においてネクロプトーシスを誘導できることが報告されており、抗腫瘍治療への発展が期待されている。

ネクロプトーシスの機序を概説する。ネクロプトーシスの典型機序としては、細胞表面に存在する Death receptor からのシグナルを発端とする。通常、TNF- $\alpha$ 、TRAIL、Fas リガンドなどによって Death receptor が刺激された際、Caspase-8 などの働きによりアポトーシスが誘導され、細胞死に至る。この時、Caspase-8 が抑制された状態にあると、アポトーシスは生じず、RIPK1、RIPK3 のリン酸化による活性化を介して、最終的に MLKL が活性化され、MLKL のオリゴマーが形成されることで細胞膜は破壊される<sup>2</sup>。また RIPK1 の阻害薬として Necrostatin-1、RIPK3 の阻害薬として GSK '872 などが知られており、ネクロプトーシス誘導条件においてこれらの阻害薬を加えるとネクロプトーシス誘導が阻害されることがわかっている。

### 2. 研究の目的

#### 【研究の全体構想】

本研究は悪性胸膜中皮腫に対する新たな薬物治療方法の探索を目的として、ネクロプトーシスを誘導することによる抗腫瘍効果を in vitro で明らかにするものである。

#### 【本研究の具体的な目的】

- (1) 悪性胸膜中皮腫株に対し、各種ネクロプトーシス誘導物質を曝露させることによりネクロプトーシスが誘導されることを確認し、またその誘導効率を誘導物質ごとに調べ比較する。
- (2) われわれが樹立した薬剤耐性悪性胸膜中皮腫株に対し、ネクロプトーシスを誘導し、親株への抗腫瘍効果と比較する。ネクロプトーシスの抗腫瘍効果と薬剤耐性機構との関連を調べる。

### 3. 研究の方法

#### (1) 悪性胸膜中皮腫株におけるネクロプトーシス誘導の確認

ネクロプトーシスを誘導することができる物質は複数知られているが、悪性胸膜中皮腫に対する最適な誘導物質は知られていない。これまでに他癌腫株において報告されている方法を用い、悪性胸膜中皮腫株に対し効率的にネクロプトーシスが誘導できる物質を探索する。

誘導方法候補 : TNF- $\alpha$ 、Z-VAD (caspase 阻害薬)、Smac mimetic (アポトーシス阻害因子 (IAP) アンタゴニスト) の併用法

誘導方法候補 : TRAIL、Z-VAD、Smac mimetic の併用法

誘導方法候補 : Shikonin の単独法

細胞の生存率は ATP 検出を行う発光法を用いて算出した。(CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay; Promega)

ネクロプトーシスの確認方法を以下に示す。

#### A. ネクロプトーシス発現過程の発現蛋白の増加を確認

ネクロプトーシスの発現過程において、RIPK1、RIPK3、MLKL と連続的にリン酸化が誘導され、最終的にリン酸化された MLKL が多量体を形成し、細胞膜に穴をあけるといふモデルが提唱されている。よって、これら RIPK1、RIPK3、MLKL のリン酸化蛋白の増加を検出することによりネクロプトーシス誘導の確認が可能である。

#### B. Necrostatin-1 によるネクロプトーシス阻害

Necrostatin-1 は RIPK1 の特異的阻害薬であり、ネクロプトーシスを阻害することが知られている。Necrostatin-1 によって抑制される細胞死は、ネクロプトーシスによるものと推察できる。

#### C. 形態学的な確認 (電子顕微鏡)

形態学的にネクロプトーシスは従来知られていたネクロシスと同様である。細胞小器官の膨潤、細胞質の透明化、細胞形質膜構造の破綻などが特徴的であり、アポトーシスで見られるような細胞膜表面の blebbing や核の断片化は認められない。これを透過型電子顕微鏡で確認する。

#### D. RIPK1/RIPK3/MLKL 蛋白のリン酸化の確認

前述の通り、ネクロプトーシスの Key protein である RIPK1、RIPK3、MLKL はそれぞれリン酸化されることで最終的にネクロプトーシスによる細胞死に寄与する。よってこれらのリン酸化蛋白の増加を western blotting で確認する。

(2) 抗癌剤耐性悪性胸膜中皮腫株におけるネクロプトーシス誘導効率の評価および薬剤耐性機構との関連の解析

A. 抗癌剤耐性悪性胸膜中皮腫株に対するネクロプトーシスの誘導

悪性胸膜中皮腫に対する抗癌剤のキードラッグはシスプラチンおよびペメトレキセドである。我々の研究室ではすでにシスプラチン耐性またはペメトレキセド耐性の悪性胸膜中皮腫株を樹立している。これらの株を用い、上記に述べたネクロプトーシス誘導効率の最も高い方法でネクロプトーシスを誘導する。親株に対するネクロプトーシス誘導効率と抗癌剤耐性株に対する誘導効率を、Cell viability assay を用いて比較する。

4. 研究成果

(1) 悪性中皮腫細胞株へのネクロプトーシス誘導

H226, H28 株, およびそれぞれに対してシスプラチン耐性株 (H226c, H28c), ペメトレキセド耐性株 (H226p, H28p) を作成し, 計 6 株を用いて, TNF- $\alpha$  + BV-6 (IAP antagonist) + Z-VAD (pan-caspase inhibitor) (以下, TBZ) を FBS 含有培地内で曝露させた。いずれの細胞株においても TBZ の曝露により細胞減少をきたし, BV-6 単独, Z-VAD 単独曝露の軽度細胞減少と比較して, 有意な減少を示しており, 併用によるシナジー効果が確認された。TBZ による細胞減少はいずれも Necrostatin-1 および GSK '872 で抑制されており, ネクロプトーシスによる細胞死であると推定された (図 1)。また死細胞の確認のために SYTOX green 染色を行い, TBZ 曝露に比べ, TBZ + Necrostatin-1 併用下において SYTOX green 陽性細胞が減少していることが示された (図 2)。同時に, 電子顕微鏡を用いて細胞レベルで観察を行ったところ, TBZ 曝露によりネクロシス形態を示す死細胞が多数確認された (図 3)。

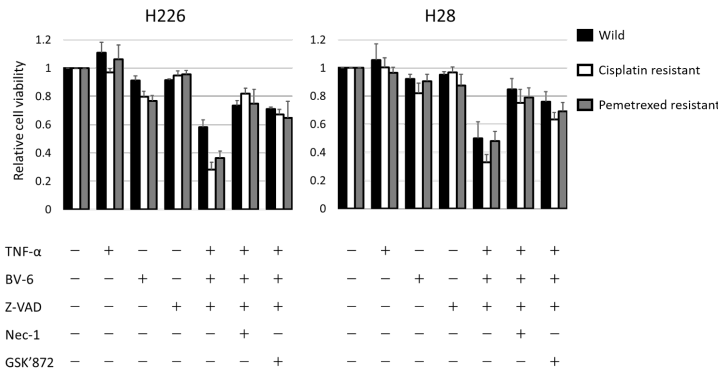


図 1 . H226, H226c, H226p, H28, H28c, H28p 株における TBZ 併用療法の効果

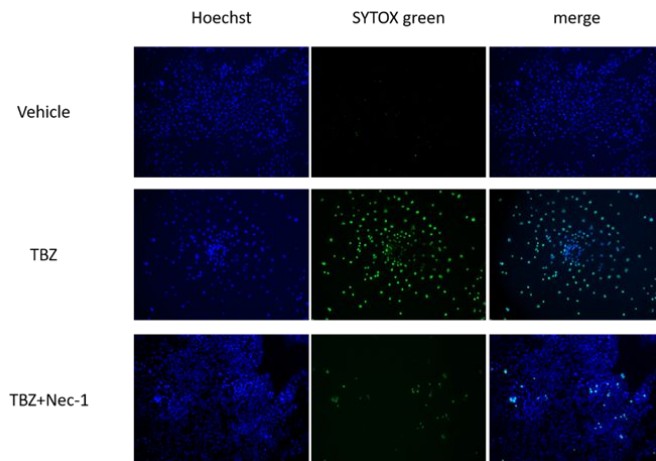


図 2 . H28 株における TBZ による死細胞の評価 (蛍光免疫染色)

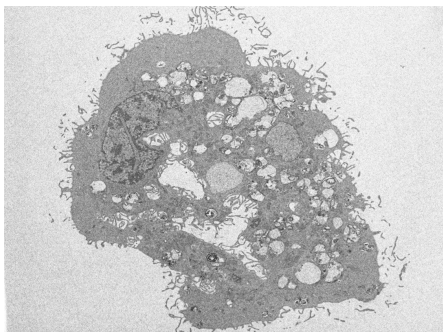


図 3 . TBZ 曝露下 H28 株の電子顕微鏡像

TNF- の代わりに、TRAIL を用いて、TRAIL + BV-6 + Z-VAD 併用の効果も評価した。この方法でも細胞死は観察されたが、Necrostatin-1 や GSK '872 によってその細胞減少が有意に抑制されなかった。さらに他癌種へのネクロプトーシス誘導の方法として知られている Shikonin を用いた方法（以下、SHK 法）<sup>3</sup> を実施した。SHK 法では低濃度域で明らかな細胞減少が観察され、Necrostatin-1 による細胞死抑制も観察された。しかし、TBZ 法と比較して Necrostatin-1 による抑制効果が小さく、ネクロプトーシスを効率的に誘導する方法としては SHK 法よりも TBZ 法がより最適と思われた。

次に、蛋白抽出を行い、Western blot 法にて RIPK1/RIPK3/MLKL およびそれぞれのリン酸化蛋白の発現について評価した。TBZ 曝露によって pRIPK1, pRIPK3, pMLKL が増加していることが明らかとなった。このことから TBZ 曝露によってネクロプトーシス経路によって細胞死が引き起こされていることが示唆された。

さらに、siRNA を用いて、RIPK1/RIPK3/MLKL の発現を阻害した場合に、TBZ 曝露による細胞死割合が変化するかについて検討した（図 4）。特にシスプラチン耐性株においてそれぞれの発現阻害の細胞生存に対する影響は顕著であった。H226c 株、H28c 株いずれにおいても siRNA を用いて RIPK1/RIPK3/MLKL の発現を阻害させた場合、TBZ 曝露による細胞死は抑制された。H226c 株では RIPK1 のノックダウンによる影響は RIPK3 や MLKL の影響よりも小さいことがわかった。H28c 株でも同様の傾向が観察された。

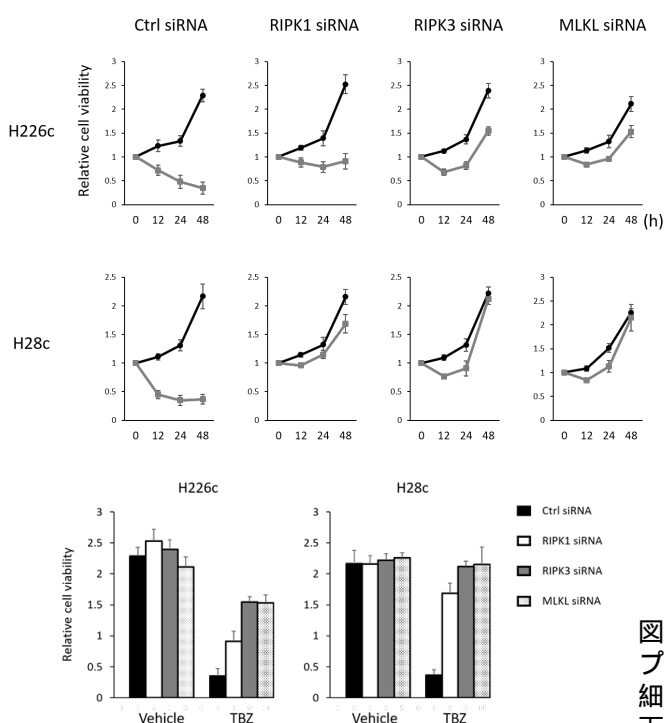


図 4 . RIPK1/RIPK3/MLKL 発現抑制下シスプラチン耐性株における TBZ 併用による細胞数の変化。  
下段は 48 時間後の細胞数の比較。

## (2) 薬剤耐性機構とネクロプトーシス誘導効率の関係性

シスプラチン耐性株において、ABC トランスポーター (P 糖タンパク質) である MDR1, MRP1, MRP2 の発現上昇が関与していることが知られている。シスプラチン耐性悪性中皮腫株を作成する過程においてシスプラチン曝露時間の異なる数株を保存し、それぞれの MDR1, MRP1, MRP2 発現を qPCR にて定量評価した。そして、TBZ 法によるネクロプトーシス誘導効率（死細胞割合）との相関を検討した。結果としては、 $r = -0.203$  と明らかな相関は示されなかった。

これまで悪性胸膜中皮腫において報告されたネクロプトーシス誘導方法は Diarachidonoylphosphoethanolamine (DAPE) のみであった<sup>4</sup>。我々は卵巣癌においてネクロプトーシスの誘導が報告されている TNF- + IAP (アポトーシス阻害因子) 阻害薬 + Caspase 阻害薬の併用方法<sup>5</sup> を用いて悪性胸膜中皮腫細胞にネクロプトーシスが誘導されることを確認した。さらにその誘導効果は殺細胞性抗癌剤に対し耐性をきたした株においても効果があることを示した。つまり標準治療が無効になった進行悪性胸膜中皮腫に対しネクロプトーシス誘導が有効な治療である可能性を秘めていることを示唆する。

## < 引用文献 >

Vanden Berghe et al. Nat Rev Mol Cell Biol. 2014 Feb;15(2):135-47.

Wang H, et al. Mol Cell. 2014, 10;54(1):133-146.  
Wang Y, et al. Int J Biol Sci. 2018, 20;14(13):1883-1891.  
Kaku Y, et al. Cell Signal. 2015, 27(9):1713-9  
McCabe KE, et al. Cell Death Dis. 2014, 30;5:e1496.

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Ishiwata T, Terada J, Nakajima T, Tsushima K, Tatsumi K. Transbronchial evaluation of peripheral pulmonary lesions using ultrasonic spectrum analysis in lung cancer patients. Respirology. 2019. doi: 10.1111/resp.13534. 査読有

Ebata T, Shimoi T, Ishiwata T, Iwasawa S, Bun S, Yunokawa M, Yonemori K, Takiguchi Y, Tamura K. Amrubicin Monotherapy for Patients with Platinum-Pretreated Non-Gastrointestinal Non-Pancreatic Extrapulmonary Neuroendocrine Carcinoma. Oncology. 2017;93(3):177-182. doi: 10.1159/000475669. 査読有

Ishiwata T, Ebata T, Iwasawa S, Matsushima J, Ota S, Nakatani Y, Tsushima K, Tada Y, Tatsumi K, Takiguchi Y. Nivolumab-induced Acute Fibrinous and Organizing Pneumonia (AFOP). Intern Med. 2017 Sep 1;56(17):2311-2315. doi: 10.2169/internalmedicine.8271-16. 査読有

〔学会発表〕(計 1 件)

石綿 司. 既治療進行肺癌の気管支鏡下再生検における Rapid on-site evaluation (ROSE) の有用性. 第 58 回日本呼吸器学会学術集会 (2018.4.27-29, 大阪)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)