

令和 2 年 4 月 27 日現在

機関番号：34512

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14996

研究課題名(和文) シスプラチン耐性獲得機構におけるミトコンドリア機能不全の役割の解明

研究課題名(英文) Role of Mitochondrial dysfunction in cisplatin-reistance

研究代表者

堀部 紗世 (Horibe, Sayo)

神戸薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：50389110

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：抗がん剤治療の問題点の一つに抗がん剤に対する多剤耐性がある。耐性改善薬の開発には、抗がん剤に対する耐性獲得機構の解明が必要である。肺がんの治療で用いられるシスプラチン(CDDP)に対して耐性を獲得した細胞において、ミトコンドリア機能が低下していることを見出した。さらに、その要因を探索したところ、CDDP耐性細胞にだけ存在するミトコンドリアDNA変異を同定した。この変異により、ミトコンドリアの機能およびCDDPに対する感受性が低下することも見出した。本研究では、CDDP耐性獲得機構におけるミトコンドリアDNA変異がシスプラチン耐性獲得機構に関与することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シスプラチン(CDDP)に対する耐性を獲得する機構については、様々な原因が報告されているが、CDDPに対する感受性を評価するバイオマーカーや耐性を改善する治療薬がないのが現状である。本研究により、ミトコンドリアDNA変異によるミトコンドリア機能低下がCDDPの耐性獲得に関与することを見出した。本研究より、ミトコンドリアDNAの変異がCDDPに対する感受性のバイオマーカーの候補になる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Cisplatin (CDDP) is widely used as an anti-cancer platinum agent known to be effective in various solid tumors including lung cancer. The acquired resistance during long-term cisplatin (CDDP) administration leads to a failure of chemotherapy. CDDP preferentially adducts to mitochondrial DNA (mtDNA), which is necessary for normal mitochondrial function. We previously established human lung cancer A549 cell-derived cisplatin resistant (ACR20) cells. We found that mitochondrial function was deteriorated in ACR20 cells. Mutations in several mitochondrial DNA (mtDNA)-encoded complex subunits were only identified in ACR20 cells. We constructed cybrids (HeLamA549 or HeLamACR20) by fusing enucleated A549 cells or ACR20 cells with mtDNA-depleted OHeLa cells. In HeLamACR20 cells, IC50 of CDDP was about 2.5 times higher, complex activity were decreased compared with HeLamA549 cells. The present results suggest that mtDNA mutations play a role in the acquired resistance to CDDP.

研究分野：医療薬学

キーワード：シスプラチン 耐性獲得 ミトコンドリアDNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺がんの抗がん剤治療において中心的役割を果たしているシスプラチン (CDDP) は、長期使用により耐性を生じると、化学構造や作用機序の全く異なる他の抗がん剤に対しても耐性を示す多剤耐性が治療上の問題となっている。したがって、CDDP 耐性を生じる機序と他の抗がん剤の耐性を生じる機序には共通の機構が存在している可能性がある。しかし、多数の研究者により CDDP に対する耐性獲得機構の解析が進められているにも関わらず、耐性を改善する治療薬は上市されていないため、耐性改善薬の開発には、従来の報告と異なる CDDP 耐性獲得機構の解明が必要である。これまでに、ヒト肺がん由来 A549 細胞を用いて CDDP に対して高度に耐性を獲得した ACR20 細胞を樹立した。ACR20 細胞ではコントロールの親細胞に比べて CDDP によるアネキシン陽性細胞数の増加およびカスパーゼ 3 の活性化が抑制されていることより、CDDP によるアポトーシスに対して抵抗性が生じていることを見出している。さらに、新しい CDDP 耐性獲得機構を解析した結果、ACR20 細胞ではミトコンドリア機能が低下していることを見出している。これらの結果から、CDDP の長期投与よりミトコンドリア機能が低下し、アポトーシスに対して抵抗性を生じることにより、CDDP に対して耐性を獲得した可能性が考えられた。しかし、CDDP 耐性獲得機構におけるミトコンドリア機能不全の役割とミトコンドリア機能不全が生じる分子機構は不明である。

2. 研究の目的

- (1) CDDP 耐性細胞におけるミトコンドリア機能
- (2) 耐性獲得機構におけるミトコンドリア機能不全の役割
- (3) CDDP 長期投与によりミトコンドリア機能不全が生じる分子機構

3. 研究の方法

細胞: ヒト肺がん由来 A549 細胞を親細胞として CDDP に対して耐性を示した ACR20 細胞を用いた。さらに、エチジウムブロマイドを 14 日間処理し、ミトコンドリア DNA (mtDNA) を欠損させて ⁰A549 細胞を作製した。HeLa 細胞の mtDNA を欠失させた細胞 (⁰HeLa 細胞) に A549 細胞および ACR20 細胞のミトコンドリアをそれぞれ融合させたサイブリッド (HeLamtA549 細胞および HeLamtACR20 細胞) を樹立した (図 1)。

ミトコンドリア機能: ミトコンドリアにおける酸素消費量を細胞外フラックスアナライザーで計測した。ミトコンドリアで産生される活性酸素種 (ROS) の指示薬である Mitosox (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) で細胞を染色し、蛍光顕微鏡で観察して Mitosox 陽性細胞数を計測した。各細胞からミトコンドリアを回収し、複合体 I の活性を MitoCheck Complex I Activity Assay Kit (Cayman Chemical, MI, USA) を用いて計測した。

ウエスタンブロット法: アポトーシス阻害タンパク質である c-IAP1、c-IAP2 および XIAP の発現およびその遺伝子発現を調節する転写因子である NF- κ B と I κ B- α のリン酸化はウエスタンブロット法で評価した。

mtDNA 量: mtDNA を抽出し、変異が少ない COX1 の発現量をミトコンドリア量として real-time PCR 法を用いて評価した。

Real-time PCR 法: Total RNA を抽出し、mtDNA の量を調節する Mitochondrial transcription factor A (TFAM) および RNA polymerase mitochondrial (POLRMT) の mRNA 発現を real-time PCR 法で評価した。

シスプラチンに対する感受性: 様々な濃度のシスプラチンを添加して 72 時間後に、細胞をクリスタルバイオレット染色して、細胞生存率を算出して評価した。

mtDNA の変異の同定: mtDNA を抽出して PCR で増殖後、Eurofins Genomics に委託して DNA シークエンス解析をした。CLC Genomics Workbench soft を用いて mtDNA の変異部位を同定した。

mtDNA 変異による立体構造変異: Altif Laboratories Inc. (Tokyo, Japan) に委託して、変異による立体構造解析を行い、ミトコンドリア機能低下を引き起こす変異を推察した。

4. 研究成果

(1) ACR20 細胞における CDDP 誘発アポトーシスの抵抗性に、細胞質内の ROS に対する抵抗性が関与する可能性が考えられた。しかし、実際に細胞質内の ROS を計測したところ、予想に反して ACR20 細胞では CDDP 未処置の状態でも細胞質内の ROS が増加していた。ROS は、アポトーシス阻害タンパク質 (IAPs) の遺伝子発現を調節する転写因子である NF- κ B と I κ B- α を活性化することが知られている。そこで、細胞質内で増加した ROS により I κ B- α および NF- κ B が活性化しているかどうかを明らかにするために、抗酸化剤である N-アセチルシステイン (NAC) を用いてウエスタンブロット法で評価した。ACR20 細胞におけるリン酸化された I κ B- α および NF- κ B の発現は、A549 細胞と比較して有意に増加し、その増加は NAC で処理することにより有意に抑制された (図 2)。さらに、細胞質内で増加した ROS により IAPs である c-IAP1、c-IAP2 および

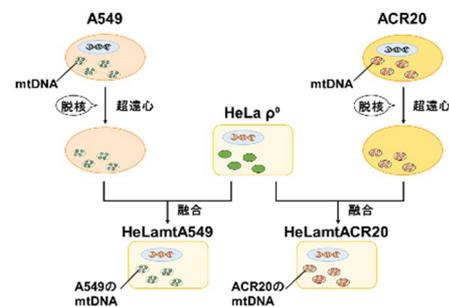


図 1 サイブリッドの樹立

XIAP の発現が増加しているかどうかを明らかにするために、NAC を用いてウエスタンブロット法で評価した。ACR20 細胞における c-IAP1、c-IAP2 および XIAP の発現はいずれにおいても A549 細胞と比較して有意に増加し、その増加は NAC で処理することにより有意に抑制された。さらに、IAPs の発現に調節する細胞質内で増加した ROS が CDDP に対する感受性の低下に關与するか検討した。80 μ M の CDDP で処理した A549 細胞の細胞生存率は 9.8% となり、ほとんどの細胞が死滅していた。80 μ M の CDDP で処理した ACR20 細胞の細胞生存率は 93.1% となり、ほとんどの細胞が生存していたが、NAC で前処理することにより細胞生存率は 60.1% に低下し、CDDP に対する感受性が改善された。細胞質内の活性酸素の増加により、NF- κ B の活性化を介した IPAs の発現増加が CDDP に対する感受性の増悪に關与することが示された。

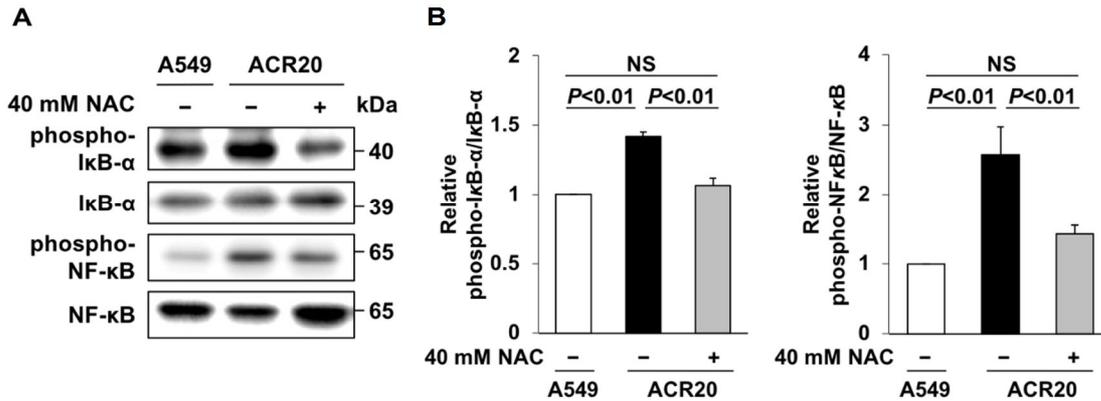


図2 A549 および ACR20 細胞における ROS を介した I κ B- α および NF- κ B の活性化
40 mM の NAC で 24 時間処理後、phospho-I κ B- α および I κ B- α 、phospho-NF- κ B および NF- κ B のタンパク質発現はウエスタンブロット法を用いて AI600 で検出した (A)。各バンドはデンシトメトリー解析を行い、A549 細胞における I κ B- α に対する phospho-I κ B- α および NF- κ B に対する phospho-NF- κ B のタンパク質発現量を 1 とし、相対的に比較した (B)。得られた値は平均値 \pm 標準誤差として表示した (n = 4)。NS: 有意差なし

(2) A549 および ACR20 細胞におけるミトコンドリアの細胞外酸性化速度 (ECAR) および酸素消費速度 (OCR) を計測した結果、ECAR は A549 および ACR20 細胞で有意な差はなかったが、OCR は A549 細胞と比較して ACR20 細胞で有意に減少していた。さらに Mitosox 陽性細胞数も、ACR20 細胞で有意に減少していた。電子伝達系複合体 I の活性は、ACR20 細胞で有意に低下していた。これらの結果より、ACR20 細胞におけるミトコンドリア機能は、A549 細胞と比較して低下していることが示された。

(3) 実際にミトコンドリア機能低下がシスプラチンに対する感受性に影響を及ぼすか、 ρ^0 A549 細胞を用いて検討した。その結果、A549 細胞の CDDP の増殖阻害曲線に対して、 ρ^0 A549 細胞における CDDP の増殖阻害曲線は、A549 細胞より右側にシフトした。この増殖阻害曲線から 50% 増殖阻害濃度 (IC₅₀) を算出した結果、それぞれ $4.64 \pm 1.04 \mu$ M および $11.56 \pm 2.26 \mu$ M であり、CDDP に対する耐性は A549 細胞に比べて ρ^0 A549 細胞は 2.49 倍に増加していた。この結果より、ミトコンドリア機能が低下すると CDDP に対する感受性が低下することが示された。

(4) ACR20 細胞におけるミトコンドリア機能低下の原因を明らかにするため、mtDNA 量に着目して検討した。mtDNA 量は変異が少ないといわれている COX1 の発現量で評価した。ACR20 細胞における COX1 の発現量は A549 細胞と比較して ACR20 細胞で有意に増加していた。mtDNA の発現を調節する TFAM および POLRMT の mRNA 発現を検討した。A549 細胞と比較して、TFAM および POLRMT の mRNA は ACR20 細胞で有意に増加していた。これら結果より、予想に反して ACR20 細胞における mtDNA 量は増加しており、その増加は TFAM や POLRMT の発現増加が起因している可能性が示された。

(5) mtDNA の質の変化が ACR20 細胞におけるミトコンドリア機能低下に關与するか、まず、A549 および ACR20 細胞における mtDNA の変異を同定した。ACR20 細胞では、A549 細胞で観察されなかった変異が 4 か所同定された。これらはすべて過去に報告されていない変異であり、ミトコンドリアにおける電子伝達系複合体 I を構成するサブユニットのタンパク質をコードしていた。ACR20 細胞で観察された mtDNA の変異がミトコンドリア機能を低下させ、CDDP 耐性獲得に關与するか、HeLamtA549 および HeLamtACR20 細胞を用いて検討した。HeLamtACR20 細胞における電子

伝達系複合体 I の活性は、HeLamtA549 と比較して有意に低下しており、HeLamtACR20 細胞における CDDP の増殖阻害曲線は、HeLamtA549 細胞より右側にシフトしていた。HeLamtA549 および HeLamtACR20 の細胞増殖阻害曲線から IC_{50} 値を算出した結果、それぞれ $0.27 \pm 0.021 \mu\text{M}$ 、 $0.69 \pm 0.039 \mu\text{M}$ であり、CDDP に対する耐性度は HeLamtA549 細胞に比べて HeLamtACR20 細胞は 2.6 倍であった (図 3)。この結果より、ACR20 細胞の mtDNA 変異によりミトコンドリア機能低下が生じ、CDDP 感受性も低下することが示された。

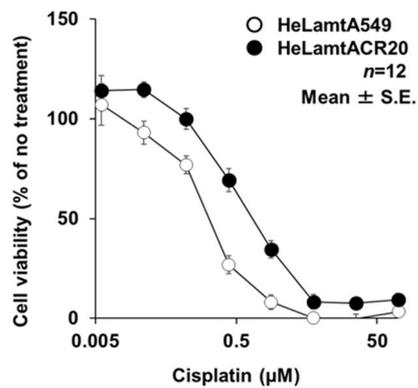


図3 HeLamtA549細胞およびHeLamtACR20細胞におけるCDDPの細胞増殖阻害曲線

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Horibe Sayo, Kawauchi Shoji, Tanahashi Toshihito, Sasaki Naoto, Mizuno Shigeto, Rikitake Yoshiyuki	4. 巻 507
2. 論文標題 CD44v-dependent upregulation of xCT is involved in the acquisition of cisplatin-resistance in human lung cancer A549 cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 426 ~ 432
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2018.11.055	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 堀部紗世、力武良行
2. 発表標題 Role of Mitochondrial Dysfunction in Acquired Resistance to Cisplatin in A549 cell-derived Cisplatin-resistant cells
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松友結花、堀部紗世、常岡眞帆、前寄友香里、河内正二、佐々木直人、力武良行
2. 発表標題 シスプラチンに対する耐性獲得機構におけるミトコンドリア機能の役割
3. 学会等名 第68回日本薬学会近畿支部総会・大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 前寄友香里、堀部紗世、常岡眞帆、松友結花、河内正二、佐々木直人、力武良行
2. 発表標題 シスプラチン耐性獲得にはミトコンドリア機能低下が関与する
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 常岡眞帆、堀部紗世、松友結花、河内正二、佐々木直人、力武良行
2. 発表標題 ミトコンドリアDNA変異によるミトコンドリア機能低下はシスプラチン耐性獲得に関与する
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 楠見里紗、堀部紗世、豊田真世子、牧野夢叶、河内正二、佐々木直人、石川香、中田和人、力武良行
2. 発表標題 シスプラチン耐性獲得における電子伝達系複合体サブユニットタンパク質をコードするミトコンドリアDNA変異の役割
3. 学会等名 第69回 日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 豊田真世子、堀部紗世、楠見理紗、牧野夢叶、河内正二、佐々木直人、石川香、中田和人、力武良行
2. 発表標題 シスプラチン耐性獲得機構におけるミトコンドリアDNA変異の役割
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 牧野夢叶、堀部紗世、楠見里紗、豊田真世子、河内正二、佐々木直人、高良恒史、力武良行
2. 発表標題 活性酸素の増加はシスプラチン耐性獲得に関与する
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----