

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：34512

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07169

研究課題名(和文) シスプラチンに耐性化したがんに対する普遍的治療における光線力学療法の応用

研究課題名(英文) Application of photodynamic therapy of cisplatin-resistant cancer

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)：シスプラチンに対する耐性は、がんの治療成績を低下させる。ヒト肺がん由来A549細胞から樹立したシスプラチン耐性細胞(ACR20細胞)を用いて、シスプラチン耐性獲得のメカニズムを検討した。ACR20細胞では、ミトコンドリア機能低下による活性酸素(ROS)の産生増加がシスプラチン耐性獲得機構に関与していた。さらに、ACR20細胞では、A549細胞と異なるミトコンドリアDNA変異が4か所あり、PCR-RFLPおよび立体構造解析より、そのうちのND2 F40Lがミトコンドリア機能低下に関与する可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、シスプラチン耐性獲得機構にミトコンドリアDNA変異によるミトコンドリア機能低下が関与していることを明らかにした。本研究結果は、シスプラチンに対する耐性を示したがんの治療において、新しい治療標的を提唱することができ、またシスプラチンに対する感受性を評価するためのバイオマーカーとしてミトコンドリアDNAに着目することの意義を提案することができた。

研究成果の概要(英文)：The acquired cisplatin (CDDP) resistance is a major obstacle to successful treatment. In this study, we examined the mechanisms underlying acquired CDDP resistance using ACR20 cells, which are CDDP-resistant cells derived from A549 lung cancer cells. Reactive oxygen species (ROS) levels were elevated in ACR20 cells not treated with CDDP. Notably, evaluation of mitochondrial oxygen consumption rate and mitochondrial superoxide levels revealed a deterioration of mitochondrial function in ACR20 cells. Mitochondrial DNA PCR-RFLP analysis revealed four mutations with varying percentage levels in ACR20 cells. Analysis of three-dimensional structure data indicated that a mutation (ND2 F40L) may impact the proton translocation pathway, thereby affecting mitochondrial complex I activity. Together, these findings suggest that intrinsic ROS levels were elevated by loss of mitochondrial function via mitochondrial DNA mutations, which decreased the sensitivity to CDDP in ACR20 cells.

研究分野：医療薬学

キーワード：シスプラチン耐性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

抗がん剤に対して耐性化したがんの治療法の確立は急務である。光線力学療法 (PDT) は、光感受性物質と一定波長の光照射を組み合わせる治療法で、早期のがんや加齢性黄斑の治療に用いられている。一般に、光感受性物質は、正常組織に比べて腫瘍組織に集積しやすい特性を有し、光照射により活性酸素を生じて殺細胞作用を示す。ミトコンドリアで内在性の光感受性物質である protoporphyrin (PpIX) に変換される 5-アミノレブリン酸 (5-ALA) を用いた PDT は、他の光感受性物質を用いた PDT と比較して光線過敏症などの副作用が少なく、様々ながんに対する基礎研究がすすめられている。

近年、細胞小器官であるミトコンドリアの機能低下が糖尿病や神経変性疾患に関与することが報告されている。申請者が樹立したシスプラチン耐性細胞において、ミトコンドリア機能が低下していることを明らかにしている。ミトコンドリア機能低下による抗がん剤耐性化が PDT に与える影響は不明である。

2. 研究の目的

シスプラチンに耐性化したがんに対する普遍的治療法として、PDT に着目し、「**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低下の関与**」と「**ミトコンドリア集積性のある光感受性物質を用いた PDT の有効性**」を明らかにする。

3. 研究の方法

「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低下の関与」

ヒト肺がん由来 A549 細胞から樹立したシスプラチン耐性細胞である ACR20 細胞を用いて、ミトコンドリア機能低下の要因を明らかにするために、ミトコンドリア DNA のシーケンス解析を行い、ACR20 細胞のみで観察されるミトコンドリア DNA 変異を同定した。さらにミトコンドリア機能低下に関わるミトコンドリア DNA 変異を推察するために、PCR-RFLP 法による変異の割合を算出し、さらにアルティフ・ラボラトリーズ社へ委託して、立体構造を解析した。

シスプラチン耐性獲得機構におけるミトコンドリア DNA 変異によるミトコンドリア機能低下が普遍的に関与するか明らかにするため、ヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞から樹立したシスプラチン耐性細胞である HeLa/CDDP を用いて、ミトコンドリア DNA のシーケンス解析をおこなった。

「ミトコンドリア集積性のある光感受性物質を用いた PDT の有効性」

ミトコンドリア集積性のある光感受性物質として、ミトコンドリア内で光感受性物質 PpIX に変換される 5-ALA を用いて PDT の有効性について検討した。5-ALA 処理 6 時間後の細胞内 PpIX 蓄積量および 5-ALA 処理 6 時間後に 625 nm の光を照射し、24 時間後の細胞生存率を算出した。さらに、スピアマン順位相関係数を用いて、細胞内 PpIX 蓄積量と 5-ALA-PDT 後の細胞生存率との相関関係を評価した。

シスプラチン耐性担がんマウスを用いた 5-ALA-PDT の有効性を明らかにするために、シスプラチン耐性担がんマウスの作出を行った。ACR20 細胞を皮下移植後、腫瘍体積が 100 mm³ 以上になってから、2 mg/kg のシスプラチンを 1 週間に 3 回計 19 回投与し、腫瘍体積および腫瘍重量を計測して、シスプラチンの抗腫瘍効果について検討した。

4. 研究成果

「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低下の関与」

ND5 (P271Q) および ND6 (S21Y) は、A549 細胞ではそれぞれ 0% であったが、ACR20 細胞ではそれぞれ 44.9% および 53.9% であった。ND2 (F40L) および ND4 (L209I) の割合は、A549 細胞でそれぞれ 44.0%、4.28% であったのに対し、ACR20 細胞ではいずれも 100% であった (表 1)。ND2 (F40L) のみが H⁺ 輸送経路の構造上に存在し、フェニルアラニンからロイシンへの置換による極性の変化が、H⁺ 輸送経路の構造を変化させる可能性が示された (図 1)

表 1 ACR20 細胞におけるミトコンドリア DNA 変異の割合

Mutations	Amino acid change	Gene	Mutation (%)	
			A549 cells	ACR20 cells
4587T>C	P40L	MT-ND2	44.0	100
11384C>A	L209I	MT-ND4	4.28	100
13148C>A	P271Q	MT-ND5	0	44.9
14612G>T	S21Y	MT-ND6	0	53.9

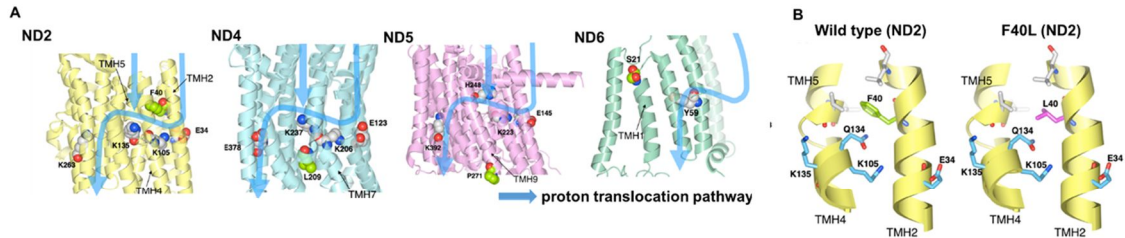


図1 NADHデヒドロゲナーゼの立体構造

- A. ND2、ND4、ND5、ND6の立体構造を示した。H⁺輸送経路は青い矢印で示した。変異が生じたアミノ酸の位置を緑色で示した。
 B. 野生型と変異型(F40L)のND2の構造を示した。

ACR20 細胞ではミトコンドリア DNA 変異によるミトコンドリア機能低下を介した細胞内活性酸素種 (ROS) の増加がアポトーシス阻害タンパク質の発現を増加させ、シスプラチン誘発アポトーシスに対して抵抗性を示したことから、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シスプラチン耐性獲得に関与していることを示した。HeLa/CDDP 細胞では、HeLa 細胞と異なる mtDNA 変異は認められなかったが、ACR20 細胞と同様に ROS が増加していた。したがって、A549 細胞とは異なる機序で細胞内 ROS を増加させ、シスプラチン耐性獲得に関与している可能性が考えられた。

「ミトコンドリア集積性のある光感受性物質を用いた PDT の有効性」

シスプラチン耐性細胞では、5-ALA 処理 6 時間後の細胞内 PpIX 蓄積量は増加し、PDT による殺細胞効果が増強していた (図 2A と B)。スピアマンの順位相関係数から、細胞内 PpIX 蓄積量と PDT 後の細胞生存率が負の相関関係を示した (図 2C)。

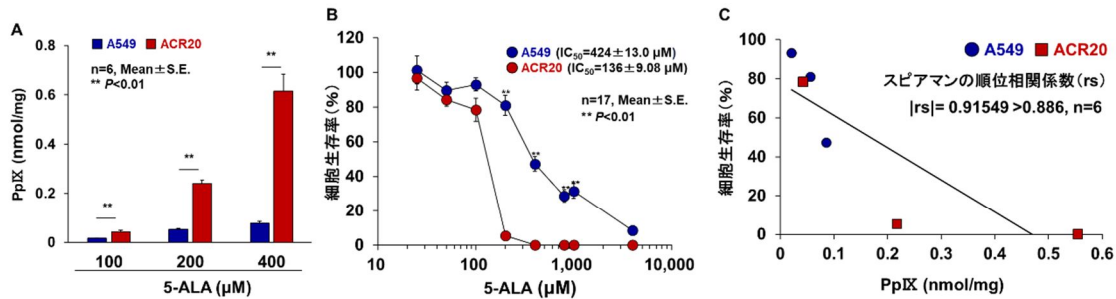


図2 シスプラチン耐性ACR20細胞にける5-ALA-PDTの殺細胞効果の増強

- A. 5-ALA処理6時間後の細胞内PpIXの蓄積量。B. 5-ALA-PDTによる細胞増殖阻害曲線。
 C. PpIX蓄積量と5-ALA-PDT後の細胞生存率の相関関係。

SCID マウスに A549 細胞を皮下移植した担がんマウスでは、シスプラチンによる抗腫瘍効果を観察することができたが、ACR20 細胞を移植した担がんマウスでは、シスプラチンによる抗腫瘍効果は観察されなかった (図 3)。したがって、シスプラチン耐性細胞を移植したマウスをシスプラチン耐性担がんマウスとして、今後、in vivo の実験に使用する予定である。

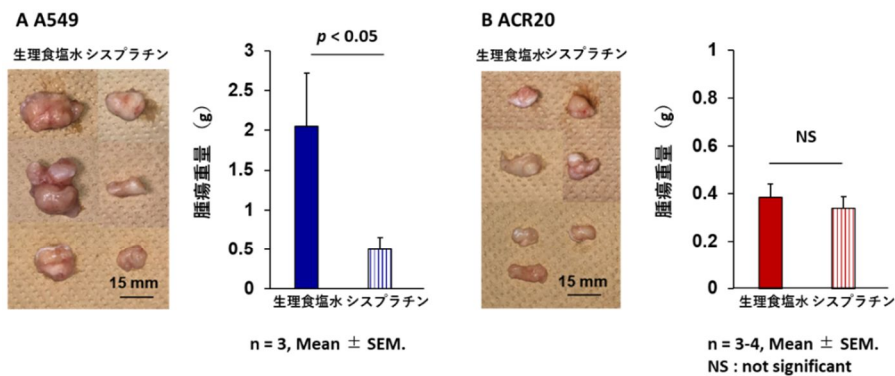


図3 A549細胞およびACR20細胞移植マウスにおけるシスプラチンによる抗腫瘍効果
 A549細胞(A)およびACR20細胞(B)を移植したマウスに生理食塩水および2 mg/kgのシスプラチンを1週間に3回計19回投与し、摘出した腫瘍の写真および重量。

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 1件）

1. 著者名 Horibe S, Ishikawa K, Nakada K, Wake M, Takeda N, Tanaka T, Kawauchi S, Sasaki N, Rikitake Y.	4. 巻 47
2. 論文標題 Mitochondrial DNA mutations are involved in the acquisition of cisplatin resistance in human lung cancer A549 cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Oncol Rep.	6. 最初と最後の頁 32
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/or.2021.8243.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------