

令和 6 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：2021～2023

課題番号：21K07614

研究課題名(和文) ミトコンドリアレドックスを介した放射線及び温熱の化学増感機構とその治療応用の検討

研究課題名(英文) Exploring the mechanism of a mitochondria redox-mediated chemical enhancement of cell death induced by radiation and hyperthermia, and its application for cancer therapy

研究代表者

趙 慶利 (Zhao, Qing-Li)

富山大学・学術研究部医学系・助教

研究者番号：90313593

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアを標的とするニトロキシドであるMito-Tempoは、温熱(42℃)によるアポトーシスを増感することを明らかにした。Mito-Tempoと温熱併用により、細胞内の活性酸素種(ROS)の生成が促進され、アポトーシス関連タンパク質Bax、Caspase-3およびオートファジー関連タンパク質LC3-IIとp62の発現が上昇した。この併用処理による細胞死のメカニズムについて、細胞内オートファジーの機能障害との関係があることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

放射線、ハイパーサーミア癌治療においては、高精度照射技術が進み治療効果が向上しているが、治療抵抗性細胞(低酸素性細胞や癌幹細胞)の存在が新たな課題である。ミトコンドリアを標的とするニトロキシドであるMito-Tempoは温熱による細胞死増感の分子機構を解明することによる癌治療抵抗性機構の抑制および癌治療の成績を高めることができる。新たな癌治療法および癌治療薬開発への貢献が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Hyperthermia (HT) alone often falls short in inducing substantial cancer cell death. Here, we unveil Mito-Tempo as a potent thermosensitizer that amplifies cell death in human cervical cancer (HeLa cells). Co-treatment with MT (0.4 mM) and HT (42°C) significantly increased apoptosis. This combination heightened intracellular reactive oxygen species (ROS) generation while reducing mitochondrial membrane potential, culminating in elevated Bax expression and decreased Mcl-1, activating caspase-3. Concurrently, we observed autophagy alterations, marked by increased LC3-II and p62 expression. The combination inhibited autophagic flux and lysosomal function, evidenced by reduced LAMP-1 and Cathepsin D, and increased lysosomal pH. Notably, the apoptosis intensification with an autophagy inhibitor (Chloroquine; CQ) underscores the significance of autophagy disruption in this process. MT enhances HT-induced apoptosis in HeLa cells, implicating autophagy flux disruption as a key mechanism.

研究分野：放射線医学

キーワード：温熱 細胞死

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

申請者は、細胞死、特に放射線や温熱によるアポトーシスの増強についての研究に長く従事し、細胞内酸化ストレスと放射線、温熱及び化合物による細胞死について多くの論文（最近の例：Li P., *et al.* Cell Stress and Chaperons, 2016; Li P., *et al.* Int J Hyperthermia 2017; Moniruzzaman, *et al.* Free Radic Biol Med. 2018; Han LG., *et al.* Free Radic Biol Med. 2019; Zhao QL., *et al.* Free Radic Res. 2019; Fathy M., *et al.* Anticancer Res. 2020) を出版している。ニトロキシドと温熱併用による細胞死の増感について国際学会（The Society for Redox Biology and Medicine's 26<sup>th</sup> Annual Conference; 2019 Nov 20-23; Las Vegas, NV.）で報告した。

### 2. 研究の目的

放射線、ハイパーサーミア癌治療においては、高精度照射技術が進み治療効果が向上しているが、治療抵抗性細胞（低酸素性細胞や癌幹細胞）の存在が新たな課題である。抗癌剤や放射線治療に対する抵抗性にも関わっていることが報告されており、これらに対応しうる癌の物理・化学療法により、その抵抗性を抑えることが期待されている。本研究計画において、ミトコンドリアを標的する Mito-Tempo を利用して、細胞死および酸化ストレスの制御による放射線及びハイパーサーミア増感のメカニズムの解明を目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究では細胞内酸化ストレス関連の Mito-TEMPO を使って、単独および放射線あるいはマイルドハイパーサーミアとの併用により引き起こされる細胞死と細胞内活性酸素種 (ROS) の解析をフローサイトメーターで測定した。次は細胞の形態変化と遺伝子発現並びにタンパク質解析により細胞死を制御する遺伝子を探索した。細胞実験では、これまで使用してきたヒト子宮頸癌由来の HeLa 細胞を利用する。細胞死の形態観察は Giemsa 染色で判定した。細胞増殖毒性評価は Cell Counting Kit-8 で評価した。核の形態観察は、DAPI 蛍光染色で、アポトーシスはフローサイトメトリーおよび蛍光顕微鏡によるホスファチジルセリンの細胞膜への発現 (Annexin V-FITC/PI 染色) で評価した。アポトーシスおよびオートファジー関連タンパク質の発現をウェスタンブロッディング法などにより検出した。細胞内活性酸素種の検出：過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) には特異的蛍光プローブ 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCF) を、 $O_2^{\cdot-}$  には Dihydroethidine (DHE), をそれぞれ利用してフローサイトメトリーで評価した。ミトコンドリアの膜電位については、Tetramethyl rhodamine methyl ester (TMRM) 色素を利用してフローサイトメトリーおよび蛍光顕微鏡で解析した。

### 4. 研究成果

ミトコンドリアを標的するニトロキシドである Mito-Tempo は温熱(42°C)によるアポトーシスを増感することを明らかにした。Mito-Tempo と温熱併用により、細胞内の活性酸素種(ROS)の生成が促進され、アポトーシス関連タンパク質 Bax、Caspase-3 およびオートファジー関連タンパク質 LC3-II と p62 の発現が上昇した。この併用処理による細胞死のメカニズムについて、細胞内オートファジーの機能障害と関係があることを示した。

(1) Mito-Tempo の化学式と Mito-Tempo による細胞毒性評価 (図 1)。

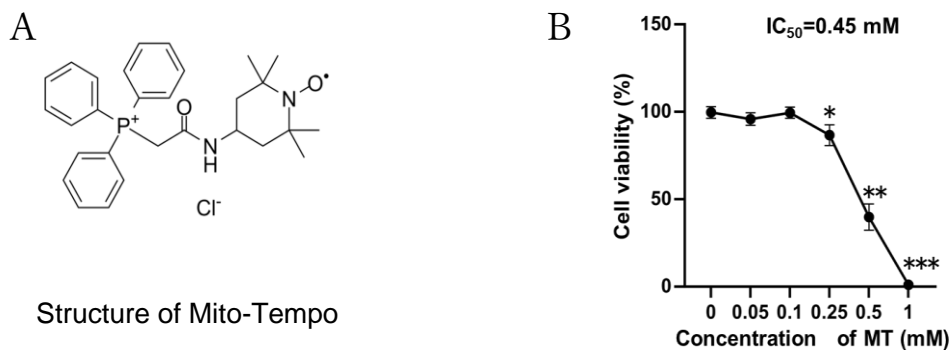


図 1

(2) Mito-Tempo と温熱併用による細胞死の形態変化を Giemsa 染色で調べた、Mito-Tempo と温熱併用による細胞死増感効果 (図 2)。

### MT Enhances HT-Induced Cell Death in HeLa Cells

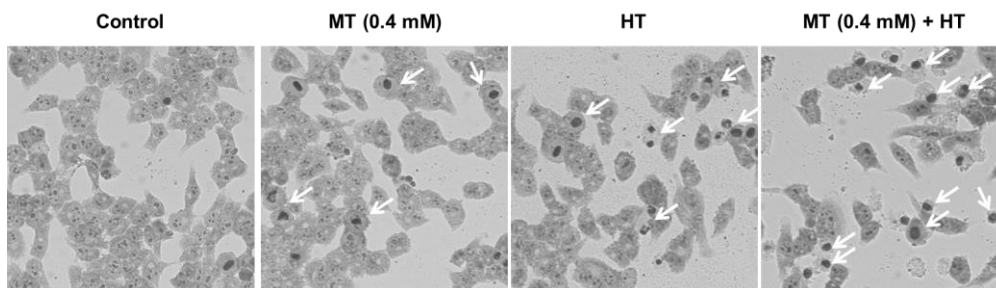


図 2

(3) Mito-Tempo と温熱併用によるアポトーシスを Annexin-V-FITC/PI を利用してフローサイトメトリーで調べた、Mito-Tempo と温熱併用によるアポトーシス増感効果 (図 3)。

### MT Enhances HT-Induced Apoptosis in HeLa Cells

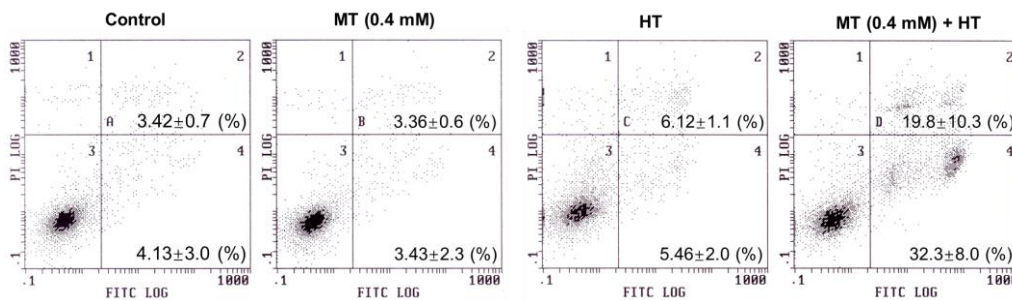


図 3

(4) Mito-Tempo と温熱併用による細胞内活性酸素 (ROS) の変化 (図 4)。

### MT Synergizes with HT to Heighten ROS Production in HeLa Cells

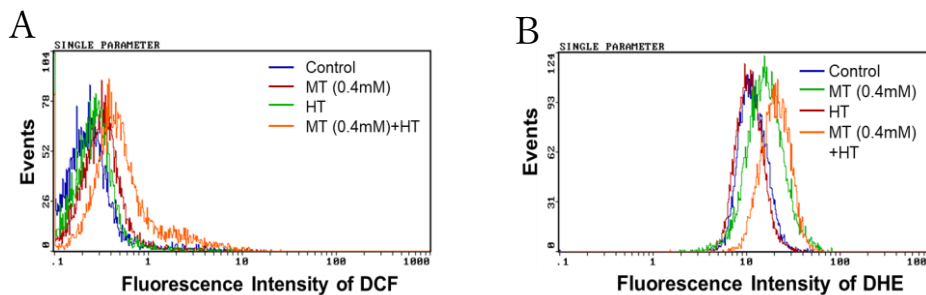


図 4

(5) Mito-Tempo と温熱併用によるミトコンドリア膜電位低下 (図5)。

### MT and HT Induces Mitochondrial Membrane Potential Loss in HeLa Cells

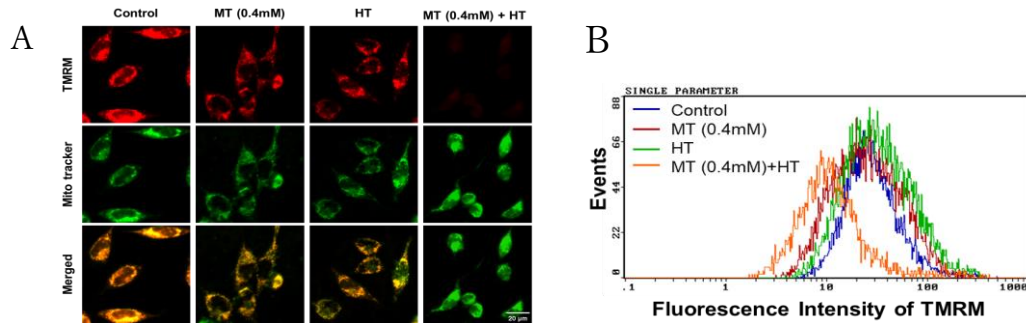


図5

(6) Mito-Tempo と温熱併用による細胞内関連タンパクの発現 (図6)。

### Expression of Apoptosis and Autophagy Related Proteins in HeLa Cells

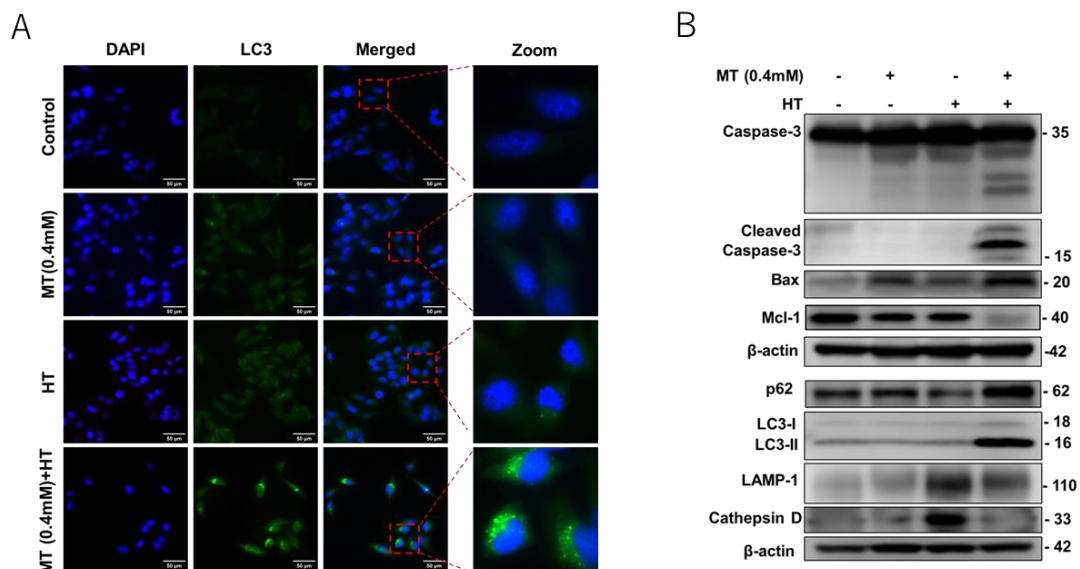


図6

#### [参考文献]

- ① Zhao Q-L, Ito H, Kondo T, Uehara T, Ikeda M, Abe H, Saitoh J-I, Noguchi K, Suzuki M, & Kurachi M. Antipsychotic drugs scavenge radiation-induced hydroxyl radicals and intracellular ROS formation, and protect apoptosis in human lymphoma U937 cells. *Free Radic Res* (2019) 53(3):304-312.
- ② Li P, Zhao Q-L, Jawaid P, Rehman, M U, Sakurai H, & Kondo T. Enhancement of hyperthermia-induced apoptosis by 5Z-7-oxozeaenol, a TAK1 inhibitor, in A549 cells. *Cell Stress Chaperones* (2016) 21(5):873-81.
- ③ Li P, Zhao Q-L, Jawaid P, Rehman M U, Ahmed K, Sakurai H, & Kondo T. Enhancement of hyperthermia-induced apoptosis by 5Z-7-oxozeaenol, a TAK1 inhibitor, in Molt-4 cells. *Int J Hyperthermia* (2017) 33(4):411-418.
- ④ Han L-G, Zhao Q-L, Yoshida T, Okabe M, Soko C, Rehman M U, Kondo T, Nikaido T. Differential response of immortalized human amnion mesenchymal and epithelial cells against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* (2019) 135, 79-86.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Alaaeldin Rania, Abdel-Rahman Islam M., Ali Fares E. M., Bekhit Amany AbdIrehim, Elhamadany Eyad Y., Zhao Qing-Li, Cui Zheng-Guo, Fathy Moustafa	4. 巻 27
2. 論文標題 Dual Topoisomerase I/II Inhibition-Induced Apoptosis and Necro-Apoptosis in Cancer Cells by a Novel Ciprofloxacin Derivative via RIPK1/RIPK3/MLKL Activation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 7993 ~ 7993
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules27227993	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 該当する
1. 著者名 Alaaeldin Rania, Hassan Heba Ali, Abdel-Rahman Islam M., Mohyeldin Reham H., Youssef Nancy, Allam Ahmed E., Abdelwahab Sayed F., Zhao Qing-Li, Fathy Moustafa	4. 巻 44
2. 論文標題 A New EGFR Inhibitor from Ficus benghalensis Exerted Potential Anti-Inflammatory Activity via Akt/PI3K Pathway Inhibition	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Current Issues in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 2967 ~ 2981
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cimb44070205	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 該当する
1. 著者名 Li Peng, Zhao Qing-Li, Rehman Mati, Jawaid Paras, Cui Zheng-Guo, Ahmed Kanwal, Kondo Takashi, Saitoh Jun-Ichi, Noguchi Kyo	4. 巻 27
2. 論文標題 Isofraxidin enhances hyperthermia?induced apoptosis via redox modification in acute monocytic leukemia U937 cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular Medicine Reports	6. 最初と最後の頁 1 ~ 11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/mmr.2023.12928	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 該当する
1. 著者名 Alaaeldin Rania, Abdel-Rahman Iman A. M., Hassan Heba Ali, Youssef Nancy, Allam Ahmed E., Abdelwahab Sayed F., Zhao Qing-Li, Fathy Moustafa	4. 巻 26
2. 論文標題 Carpachromene Ameliorates Insulin Resistance in HepG2 Cells via Modulating IR/IRS1/PI3k/Akt/GSK3/FoxO1 Pathway	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 7629 ~ 7629
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules26247629	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 該当する

〔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
研究 分 担 者	小川 良平  (Ogawa Ryohei)  (60334736)	富山大学・学術研究部医学系・准教授   (13201)	
研究 分 担 者	崔 正国  (Cui Zheng-Guo)  (90572115)	福井大学・学術研究院医学系部門・講師   (13401)	

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
---------	---------