

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591631

研究課題名(和文) TRAILとKATP阻害剤によるメラノーマ治療の基礎研究

研究課題名(英文) Melanoma therapy by TRAIL and KATP channel inhibitors

研究代表者

鈴木 良弘 (SUZUKI, Yoshihiro)

日本大学・医学部・助教

研究者番号：80206549

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：TRAILは、腫瘍細胞を殺すが、正常細胞に影響をほとんど与えないことから、腫瘍選択的な抗がん剤として期待されているが、悪性メラノーマ細胞などのいくつかのガンはこれに抵抗性である。本研究は、ATP依存性カリウムチャネル阻害剤の併用によりTRAIL抵抗性メラノーマ細胞に細胞死を誘発するしくみについて調べた。その結果、ATP依存性カリウムチャネル阻害剤は細胞膜の脱分極とこれによるミトコンドリア内活性酸素の増加によりミトコンドリアならびに小胞体の機能不全を引き起こし、細胞死を誘導することが示された。

研究成果の概要(英文)：The major findings of this research project are that:(1) the potentiation of the apoptosis by KATP channel inhibitors is a general phenomenon among cancer cells with different origins, including leukemia and lung cancer cells; (2) the effects of these channel inhibitors including depolarization induction are tumor-selective; (3) the potentiation of apoptosis occurs through upregulation of TRAIL receptors-1/2 and increased mitochondrial and endoplasmic reticulum death pathways; (4) mitochondrial reactive oxygen species (ROS) mediate the activation of death signaling pathways, and depolarization and ROS mutually regulate one another. The findings provide a molecular basis of the combined use of TRAIL and KATP channel inhibitors in the treatment of TRAIL-resistant cancer cells in connection with the emerging concept that oxidative stress is a critical mediator of mitochondrial and endoplasmic reticulum dysfunctions and serves as a tumor-selective target in cancer treatment.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：TRAIL ATP感受性カリウムチャネル メラノーマ アポトーシス ミトコンドリア 活性酸素

## 1. 研究開始当初の背景

メラノーマは、浸潤および転移しやすく、進行が進むと化学療法、放射線治療などに対して抵抗性を示すために、非常に治療が困難で、有効な治療法の開発が早急に求められているガンのひとつである。Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)は、腫瘍細胞に傷害を与える一方で、正常細胞はほとんど傷害しないことから、ガン細胞選択的抗ガン剤として期待されている。しかし臨床治験によりメラノーマなどの一部のガンは、TRAILにも抵抗性を示すこと、TRAIL感受性細胞も抵抗性となることが明らかになった。したがって、このTRAIL抵抗性を克服できる薬剤の開発がTRAIL治療の実用化のためには必要である。このような薬剤の開発のためにはガン細胞がどのようなメカニズムでTRAIL抵抗性を示すのかを解明することが重要である。

研究代表者は、TRAILによるガン細胞の細胞死(アポトーシス)誘導機構を分子レベルで研究し、その初期に細胞膜の脱分極が起きることを初めて明らかにした。さらに、この反応がアポトーシス誘導を正に制御すること、また細胞膜上に存在するATP依存性カリウム( $K_{ATP}$ )チャンネルによって負に制御されることを見出した。

## 2. 研究の目的

上記の知見から、 $K_{ATP}$ チャンネル阻害剤は、細胞膜の脱分極を亢進させて、TRAIL誘導細胞死を増強することが期待される。そこで、 $K_{ATP}$ チャンネル阻害剤とTRAILの併用によりTRAIL抵抗性メラノーマ細胞にアポトーシスを誘導できるかどうかを調べる。また、誘導が起きた時にはそのメカニズムについて調べる。

## 3. 研究の方法

ヒトメラノーマ細胞株をヒト組み換え型

TRAIL単独ならびに $K_{ATP}$ チャンネル阻害剤と併用して培養後、細胞生存率をWST-8法、細胞死およびアポトーシスをフローサイトメトリーおよび蛍光顕微鏡でそれぞれ測定した。アポトーシス関連生化学的反応は特異的プローブを用いたフローサイトメトリーならびにイムノプロットで解析した。

## 4. 研究成果

(1) 細胞膜脱分極誘導剤によるTRAIL誘導アポトーシスの増強と腫瘍選択的細胞死誘導：KCIおよび作用部位の異なる二つの $K_{ATP}$ チャンネル阻害剤(Glibenclamide, U37883A)はいずれも、TRAILによるアポトーシスを顕著に増強し、その結果、TRAIL抵抗性メラノーマ細胞を死滅させた。またこれらの薬剤は、単独でも一部のヒト腫瘍細胞にアポトーシスを誘導したが、初代培養メラノサイトには影響を与えなかった。さらに、TRAILによる脱分極誘導はdeath receptor (DR)5を介して惹起されるが、初代培養メラノサイトではDR5が発現しているにも関わらず、脱分極が誘導されないことから、この誘導が腫瘍選択的な反応であることが判明した。

(2) アポトーシス増強の分子メカニズム：このアポトーシス増強効果はカスパーゼを介することが明らかになった。そのメカニズムをさらに詳細に解析した結果、DR5の発現増強とミトコンドリアならびに小胞体を介する細胞死経路の関与が示された。さらに、細胞膜の脱分極は、ミトコンドリア内の活性酸素レベルを上昇させてこれらの細胞死経路を活性化することも明らかにした。また、細胞膜脱分極能を有するミトコンドリア分裂阻害剤、ニク由来有機イオウ化合物など多種の化合物が共通して腫瘍選択的細胞死を惹起することおよびTRAIL誘導アポトーシスを増強することを見出し、細胞膜脱分極の腫瘍細胞アポトーシスにおける普遍的役割を初めて明らかにした。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

Suzuki-Karasaki Y, Suzuki-Karasaki M, Uchida M, Ochiai T. Depolarization controls TRAIL sensitization and selective killing of cancer cells: crosstalk with ROS. **Frontiers Oncol** 査読有 4:Article 128 1-14 (2014).

Suzuki-Karasaki M, Ochiai T, Suzuki-Karasaki Y. Crosstalk between mitochondrial ROS and depolarization in the potentiation of TRAIL-induced apoptosis in human tumor cells. **Int J Oncol** 査読有 44:616-628 (2013).

Inoue T, Suzuki-Karasaki Y. Mitochondrial superoxide mediates mitochondrial and endoplasmic reticulum dysfunctions in TRAIL-induced apoptosis in Jurkat cells. **Free Radic Biol Med** 査読有 61:273-284 (2013).

Tochigi M, Inoue T, Suzuki-Karasaki M, Ochiai T, Ra C, Suzuki-Karasaki Y. Hydrogen peroxide induces cell death in human TRAIL-resistant melanoma through intracellular superoxide generation. **Int J Oncol** 査読有 42:863-872 (2013).

Murai M, Inoue T, Suzuki-Karasaki M, Ochiai T, Ra C, Nishida S, Suzuki-Karasaki Y. Diallyl trisulfide sensitizes human melanoma cells to TRAIL-induced cell death by promoting endoplasmic reticulum-mediated apoptosis. **Int J Oncol**. 査読有 41:2029-37 (2012).

Suzuki Y, Inoue T, Murai M, Suzuki-Karasaki M, Ochiai T, Ra C. Depolarization potentiates TRAIL-induced apoptosis in human melanoma cells: Role for ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels and endoplasmic reticulum stress. **Int J Oncol**. 査読有 41:465-75 (2012).

[学会発表](計 3 件)

Suzuki-Karasaki Y. L-type Ca<sup>2+</sup> channels regulate apoptosis and TRAIL sensitivities in human melanoma and

lung cancer cells (18<sup>th</sup> WCAO, Crete, Greece. 2013, 10. 12 招待講演).

Suzuki-Karasaki Y. Mitochondrial fission modulates tumor sensitivity to TRAIL (17<sup>th</sup> WCAO, Crete, Greece. 2012, 10. 11 招待講演).

Suzuki Y. Sensitization of cancer cells to TRAIL-induced apoptosis by drugs targeting mitochondrial ROS and endoplasmic reticulum. 13th Central European Lung Cancer Conference Prague, Czech, 2012. 6. 25 招待講演).

Suzuki Y. Tumor selective sensitization of NSCLC to TRAIL by Mdivi-1. 13th Central European Lung Cancer Conference Prague, Czech, 2012. 6. 25 招待講演).

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 2 件)

名称: ミトコンドリア分裂阻害剤を用いた TRAIL 抵抗性の克服

発明者: 鈴木良弘他 2 名

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2012-002840

出願年月日: 24 年 1 月 11 日

国内外の別: 国内

名称: TRAIL 抵抗性の克服

発明者: 鈴木良弘他 4 名

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2010-213645

出願年月日: 23 年 8 月 2 日

国内外の別: 外国

取得状況(計 1 件)

名称: TRAIL 感受性増強剤

発明者: 鈴木良弘他 4 名

権利者: 同上

種類：特許

番号：W2012/039197

取得年月日：24年3月29日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鈴木 良弘 (SUZUKI Yoshihiro)

日本大学・医学部・助教

研究者番号：80206549

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

落合 豊子 (OCHIAI Toyoko)

日本大学・医学部・教授

研究者番号：40133425