

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591835

研究課題名(和文) ミトコンドリアを標的とした放射線および温熱細胞死の増強と分子機構の解明

研究課題名(英文) The enhancement of radiation and hyperthermia induced, mitochondria targeted cell death

研究代表者

趙 慶利 (Zhao, Qing-Li)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・助教

研究者番号：90313593

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではU937およびHeLa細胞でニトロキッドであるTempoと温熱併用によるオートファジー細胞死を誘導することが判明した。Tempoを温熱処理と併用すると温熱によるカスパーゼ-3の活性化を阻害し、カスパーゼ依存性アポトーシスの阻害につながる。その原因はカスパーゼの活性化部位-CysSHの酸化から生じる可能性が高い。併用処理はミトコンドリア機能障害およびオートファジーの誘導に寄与しているBeclin 1の遊離が認められた。併用によるオートファジー細胞死は回復不能の細胞増殖抑制を認めた。Tempoは温熱併用時に増感剤として作用し、回復不能なオートファジー細胞死を誘導することが判明した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we identified that Tempo combine treatment with hyperthermia rapidly induced autophagic cell death in U937 and HeLa cells. This co-treatment inhibited the processing of heat-activated procaspase-3 into active small subunits, leading to the inhibition of caspase-dependent apoptosis, and instead caused the induction of autophagy. The inactivation of caspases, a key event, could result from oxidation of active-site-CysSH of all caspases by a prooxidant oxo-ammonium cation, an intermediate derived Tempo during dismutation of hyperthermia-induced superoxide anion. In addition, the co-treatment caused mitochondrial dysfunction, and liberation of Beclin 1 from the Bcl-2/Beclin 1 complex, all of which contributed to induction of autophagy. These autophagic cells are leading to the complete proliferative inhibition. Thus, Tempo is a unique thermosensitizer to synergistically induce apoptosis and autophagic cell death.

研究分野：放射線基礎医学

キーワード：細胞死 温熱 放射線

### 1. 研究開始当初の背景

ニトロキシドは生体内での酸素濃度のセンサーとして注目されオーバーハウザー効果を利用したMRIやEPRの分子イメージング剤としても利用されている。Tempoはニトロキシド類の一つで、常温で安定なフリーラジカルである。OH基を有するTempolに比べると疎水性は高い。多様な生物活性を有し、SOD様作用を有するとともに、一定の酸化ストレス条件では、顕著な温熱アポトーシスとautophagic cell deathの増感作用をもち(Zhao Q-L, et al. Apoptosis 15,1165-1176, 2010)。近年、Tempo誘導体の合成が進み、ミトコンドリアを標的としたF-TriPPT(Fluorescein triphenylphosphonium Tempo)も合成され、蛍光imagingも可能になった。F-TriPPTはミトコンドリアに局在し、濃度比較でTempoの10倍以上の有効性をもつ(予備検討結果)。そのSOD様作用は細胞内では温熱によってミトコンドリア電子伝達鎖(ETC, とくにcomplex I)から生成される $H^+$ と $O_2^-$ を同時に消費し、mitochondrial dysfunctionを起こすと予測した。本研究は併用によるapoptosisに加え、とくにautophagyを経る細胞死の機構の解明を目指し、癌治療に有用な基礎情報を得ることで、癌治療の1つの選択として抗がん剤・放射線との温熱併用が有効であるので、本研究の成果は化学的温熱増感という新しい細胞分子生物学的理論づけと将来の臨床的に有用な化学温熱増感剤の開発に寄与すると思われる。一方、ニトロキシドの放射線増感の機構は不明であるので、検討を加えたい。

### 2. 研究の目的

本研究では、子宮頸癌由来のHeLa細胞を用い、放射線および温熱とTempoおよびミトコンドリアを標的とするTempo誘導体F-TriPPTとの併用によるアポトーシス(apoptosis)およびオートファジー(autophagy)様細胞死の増強とその分子機構の解明を目的とする。申請者は、ヒト白血病U937細胞で既に温熱併用時ニトロキシドであるTempoが酸化ストレス増強によりカスパーゼ類の完全阻害を誘発し、apoptosisからautophagy様細胞死への変換と不可逆的に細胞増殖を阻害することを認め、報告した(Zhao Q-L, et al. Apoptosis 15,1165-1176, 2010)。この知見は放射線および温熱治療にミトコンドリアを標的とする新しい治療応用の展望を与える。F-TriPPTの併用による細胞死およびその変換機構について、siRNAや分子標的阻害剤を用いて、情報伝達機構を解明し、癌治療への新たな糸口を探ることを目的とする。

### 3. 研究の方法

放射線および温熱とニトロキシド(TempoまたはF-TriPPT)との併用によるapoptosisおよびautophagy、とくにautophagic cell

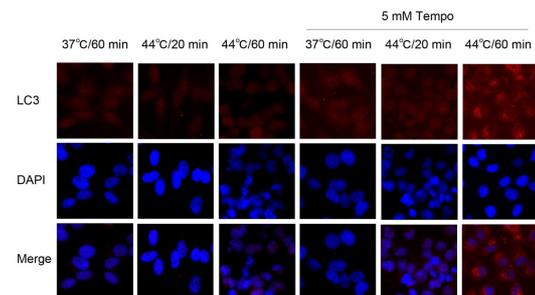
death誘発の分子機構について、(1)ミトコンドリア(MT)の機能障害( $O_2^-$ 消費、膜電位消失、ATP合成阻害)とapoptosis、とくにautophagic cell deathの誘発との関係、(2)Bax/Bakの直接活性化(intrinsic pathway)とFasL/Fas DISC caspase-8, Bid tBid Bax/Bak活性化(extrinsic pathway)の関与の選別、(3)caspasesの活性化、(4)分子シャペロンHSP27, HSP70とHSP90がどの分子細胞死シグナリング過程を標的にするか、を解析する。

### 4. 研究成果

子宮頸癌由来のHeLa細胞を用い、温熱とTempoおよびミトコンドリアを標的とするTempo誘導体F-TriPPTとの併用によるアポトーシス(apoptosis)およびオートファジー(autophagy)様細胞死の増強とその分子機構について実験で観察して部分的に解明した。温熱(44℃/30-60分)、Tempo(1~10mM)、F-TriPPT(0.1~0.5mM)単独および併用により誘発するapoptosisとnecrosisをannexin V-FITC/PI flow cytometryで検討した。形態学的変化についてGiemsa染色で、autophagy特異タンパクLC3は免疫染色とWestern blotによって検討した。

(1)温熱とTempo併用はautophagosomeをもつ特異的細胞形態を示し、autophagosome指標であるLC3抗体とWestern blotおよび免疫染色によってautophagy細胞死を誘発することを確認した。(図1)

図1



(2)ミトコンドリアに局在するTempo誘導体F-TriPPTと温熱の併用によるautophagyとautophagic cell deathの誘導を検討した。F-TriPPTはTempoより効果的に細胞死を誘発することが分かった。(図2 A、B)

図 2 A

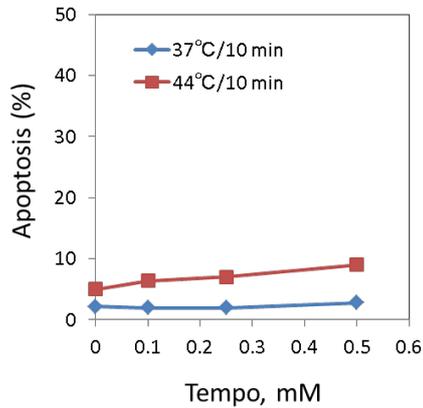
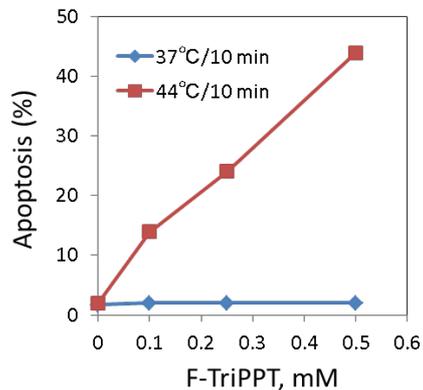


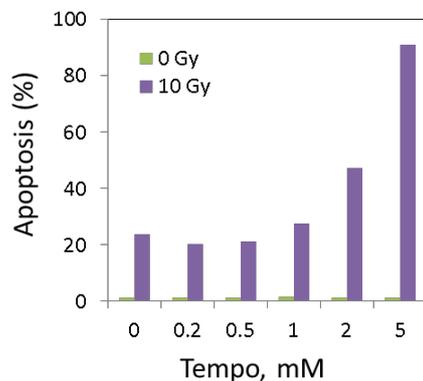
図 2 B



(3) 関連タンパクの発現について Bax, Bcl-2 と Caspase-3 の発現を Western blot によって検討した。autophagy 細胞死は caspase-3 非依存性であることが分かった。

(4) ヒト白血病 U937 細胞で放射線と Tempo の併用効果を検討中で、Tempo の濃度に依存して、低濃度で放射線保護効果、高濃度では放射線増感を示すことが分かった。(図 3)

図 3



(5) 分子シャペロン HSPs の発現について、HeLa, U937, Jurkat-T, Molt-4, THP-1, HL-60 細胞を用いて、温熱とニトロオキシドの併用後に HSPs の発現およびアポトーシスを観察した。HSPs の発現は癌細胞によって異なることを判明した。(図 4、図 5)

図 4

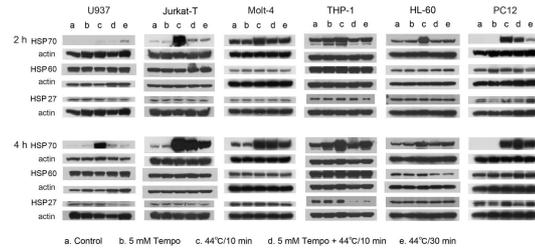
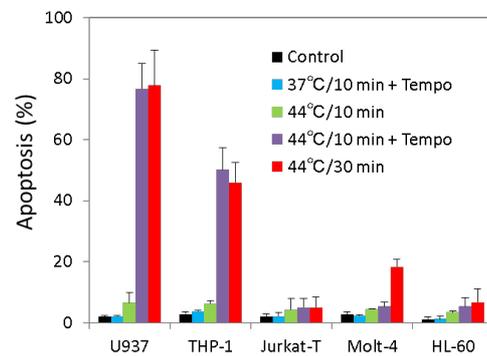


図 5



〔引用文献〕

Zhao Q.-L., Fujiwara Y., and Kondo T. Synergistic induction of apoptosis and caspase-independent autophagic cell death by a combination of nitroxide Tempo and heat shock in human leukemia U937 cells. *Apoptosis* 15: 1270-1283, 2010.

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 3 件)

Zhao QL, Fujiwara Y, Kondo T. Tempo combined treatment with hyperthermia, switches the cell death from apoptosis to autophagy. BIT 's 7<sup>th</sup> Annual World Congress of Cancer-2014; 2014 May 16-18; Nanjing, China.

Zhao Q-L, Fujiwara Y, Kondo T: Heat induced cell death and HSPs in human leukemia cell lines. The 11th International Congress of

Hyperthermic Oncology (ICHO) & The  
29th Japanese Congress of Thermal  
Medicine, 2012, 8, 28-31, Kyoto,  
Japan.

趙 慶利、藤原美定、近藤 隆 : TEMPO  
enhanced heat-or radiation-induced  
apoptotic and autophagic cell death.  
日本放射線影響学会 2012, 9, 6-8, 仙台.

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

趙 慶利 (ZHAO, Qing-Li)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (医)・

助教

研究者番号 : 90313593

### (2)研究協力者

藤原美定 (FUJIWARA, Yoshisada)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (医)・

協力研究員 (神戸大学名誉教授)

近藤 隆 (KONDO, Takashi)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (医)・

教授