

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：34517

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790099

研究課題名(和文)オートファジーを伴う非アポトーシス型細胞死の分子制御機構と病態生理的意義

研究課題名(英文)Regulatory mechanism of non-apoptotic cell death and autophagy in breast cancer

研究代表者

中瀬 朋夏(高谷朋夏)(TAKATANI-NAKASE, Tomoka)

武庫川女子大学・薬学部・講師

研究者番号：40434807

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：疾患の発症や悪性化に関与する細胞死機構を解析することは、細胞死制御を基盤にした治療法の開発に極めて重要である。本研究では、抗がん作用が注目されているスルファサラジンの細胞死誘導は、オートファジーが起点となっていることを明らかにした。さらに、タモキシフェン誘導オートファジー性細胞死は、乳がん周囲の環境によって、大きく性質が変わることを見出した。乳がんの亜鉛トランスポーターZIP6の発現量とその機能は、細胞死制御を介してストレス環境適応戦略の鍵を握ることを明らかにし、ZIP6は、これまで隠れていた乳がんプロセス及び重要な治療標的であることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Cell death mediates degenerative disease and cancer, and its evaluation is strongly required to develop sophisticated strategies for effective therapy. In this study, we demonstrated that autophagy was essential to cause sulfasalazine-induced apoptosis in breast cancer. Autophagosome-mediated tamoxifen-induced cell death was significantly affected by extracellular environment of breast cancer cells. Moreover, zinc transporter ZIP6 was found to be a key molecule in adaptability to environmental stress condition linked with malignant progression, and it is proposed to provide novel strategies for diagnosis and therapy of breast cancer.

研究分野：医歯薬学

キーワード：乳がん 細胞死 オートファジー 低酸素 糖尿病 癌微小環境 亜鉛トランスポーター

1. 研究開始当初の背景

細胞死は、様々な病気の発症や悪性化に大きく関与する。これまで、疾患、病態に関わる細胞死には、アポトーシスが重要な役割を担うことが明らかにされ、アポトーシス関連分子を標的とした治療戦略の構築が重視されてきた。しかし、近年、研究代表者は、虚血心筋細胞死において、アポトーシスのみならず細胞質における特徴的なオートファゴソームの形成及び、Caspase 非依存的な非アポトーシス型細胞死が深く関与することを新たに見出した(平成 21、22 年度若手研究 B)。オートファジーの基本的プロセスや、これに関与する遺伝子(ATG 遺伝子)は同定され、その生理的役割に関する知見は蓄積されつつある。一方、病態におけるオートファジーの役割は、組織や実験モデルによって異なり、結論は出ていない。

研究代表者は、これまで、細胞ストレス誘導に対する非アポトーシス型細胞死機構の解明に取り組んできた。その中で、心筋細胞では低酸素条件下、Beclin-1 を介したオートファジーを伴う細胞死において、既知のアポトーシス誘導シグナル伝達以外のシグナル経路が存在することを見出した(平成 18、19 年度若手研究スタートアップ)。さらに、エストラジオールが心筋保護のため抗アポトーシス作用を発揮するには、オートファジー機構が必須であることを明らかとした(平成 21、22 年度若手研究 B)。これは、細胞死機構を考える上で、オートファジーとアポトーシスは排他的ではなく、互いに密接に関わっており、単独の細胞死機構では説明できない、多様な細胞死制御機構の存在を予測させる。しかし、オートファジーと細胞死を結びつけるシグナル伝達経路やオルガネラを介した細胞内ネットワークを同定するまでには至っておらず、ほ乳類におけるオートファジーを伴う細胞死の分子機構はもとより、病態における機能的意義についてもほとんど明らかにされていない。

以上より、多様な細胞死機構におけるオートファジーの病態生理的意義を明らかにするため、オートファジーとアポトーシスや他の細胞死との関連を紐解く制御機構の解明が必要である。さらに、同定した制御分子の疾患への寄与を評価・解析することで、オートファジーを伴う細胞死の病態における役割を明らかにできると考える。これら研究成果は、未だ解明されていない病態における細胞死を新視点から理解し、疾患診断や治療のための薬剤の開発に対する重要な方向性を

示すことが大きく期待される。

2. 研究の目的

疾患の発症・悪性化につながる細胞死を解析することは、細胞死制御を基盤にした治療法の開発に極めて重要である。近年、オートファジーは、がん細胞に対する抗がん剤や放射線治療に対する抵抗性との関連が注目されているものの、がんにおけるオートファジーの役割については、不明な点が多い。がんの病態は、がん細胞自体の持つ特性だけでなく、がん細胞の周囲の環境とも深く関わっており、がんのストレス環境適応性は、細胞死制御機構と密接に関係してがんの悪性化に繋がると考える。本研究では、近年、日本で急激に増加傾向にある乳がんを焦点を当て、乳がんのストレス環境応答性を制御する因子と細胞死の解析から、新たな細胞死機構とオートファジーの病態生理的意義を明らかにし、未だ大部分が不明な乳がん悪性化機構を解明することを目的とした。まず、(1) 乳がん細胞のストレス環境適応性とオートファジーを伴う細胞死との関連性を評価し、多様な細胞死を制御できる因子の検討、および、(2) (1) において、明らかとなった制御分子の細胞内動態と細胞内ネットワークを明らかにすることを目的とした。本報告書では、(1)を中心に結果を述べる。

3. 研究の方法

乳がん細胞を取り巻く環境を反映した *in vitro* 実験モデルを作製し、オートファジーの関与と細胞死のタイプを評価し、多様な細胞死を制御する因子の同定、ならびに、乳がん細胞の細胞死機構におけるオートファジーの誘導意義について検討した。

細胞培養

ヒト乳がん由来細胞 MCF-7 は、5% CO₂-95% air 条件下、10% 非働化ウシ血清を含む MEM 培地(5.5 mM D-glucose)で培養した。ヒト乳がん由来細胞 MDA-MB-231 の培養は、10% 非働化ウシ血清を含む RPMI1640 を用いた。

ストレス負荷実験

生体レベル(5.5 mM D-glucose; 対照群)および高濃度グルコース(25 mM D-glucose)条件下で、MCF-7 を 1~28 日間培養後、乳がんホルモン療法剤タモキシフェンを処置した。浸透圧コントロールには、D-glucose の代わりに D-mannitol 含有培地を用いた。低

酸素環境に対する適応性を検討するため、アネロパック（三菱ガス化学）を用いた低酸素条件下でMCF-7を48時間培養し、細胞形態、細胞生存・細胞死を評価した。

細胞生存・細胞死・オートファジーの解析

細胞生存率はMTT assayを用い、細胞形態変化は、顕微鏡を用いて観察した。細胞死の様式を検証するために、アポトーシス実行酵素 caspase 阻害剤(zVAD-fmk)、オートファジー阻害剤 3-methyl adenine(3-MA)を添加し、核の形態観察、GFP 融合 LC3(オートファゴソームマーカー)の細胞内局在を解析した。細胞死関連の蛋白質の発現量の検討には、ウエスタンブロット法を用いた。

遺伝子ノックダウン実験

MCF-7に、ヒト ZIP6 を標的とする siRNA 発現プラスミドを導入し、ネオマイシン耐性遺伝子を指標として選択培養を行い、ZIP6 特異的ノックダウン細胞を作製した。

4. 研究成果

高濃度グルコース環境が乳がんホルモン療法剤タモキシフェンの薬効に及ぼす影響

がんの病態は、がん細胞自体の特性に加え、がん細胞を取り巻く環境の影響を大きく受けることから、がん治療は、がんの環境も考慮に入れ、新たな治療戦略を構築する必要がある。本研究では、糖尿病併発時の乳がん治療法の確立を目指し、乳がん薬物治療効果に關与する感受性に焦点を当て、高濃度グルコース環境が乳がんホルモン療法剤タモキシフェンの薬効に与える影響を検討した。MCF-7に17 μ M タモキシフェンを24時間処置した結果、細胞生存率は約20%であった。オートファジー阻害剤である3-MAを前処置しておく、タモキシフェン誘導細胞死を抑制したが、Caspase 阻害剤による影響は受けなかった。また、タモキシフェン処置群では、細胞内にGFP-LC3の局在がドット状に観察された。これらのことから、タモキシフェンはオートファジー性細胞死を誘導することにより、抗がん作用を発揮することが明らかとなった。タモキシフェン誘導オートファジー性細胞死に対する高グルコース環境の影響を検討した結果、高濃度グルコース28日間培養群では、コントロール群よりも細胞生存率が有意に増加し、タモキシフェンの効果が減弱した。さらに、高濃度グルコース28日間培養条件においては、細胞死抑制機能を持つタンパク質 Bcl-2 の発現レベルが増加し

た。以上のことから、MCF-7は、高濃度グルコースによるストレス環境に適応し、タモキシフェン誘導オートファジー性細胞死に対する耐性能を獲得し、その機構にBcl-2が關与している可能性が明らかになった。

乳がん細胞のストレス環境適応性を獲得するのに必要なトランスポーターの同定と細胞死制御機構における役割

本研究では、がん細胞の機能制御に重要な役割を果たすトランスポーターに焦点を当て、ストレス防御に必要なトランスポーターを同定し、細胞死制御機構との関わりを評価した。MCF-7を高濃度グルコース環境で24時間培養すると、亜鉛トランスポーターZIP6の発現量は増加し、それに伴い亜鉛イオンの取り込みも増加した。このとき、ZIP6の発現増強とZIP6を介した亜鉛イオンの供給が細胞運動性の亢進に必要であることを見出した。さらに、高濃度グルコース環境で7日間培養したMCF-7では、ZIP6の発現量低下を伴って、がん難治化の要因である低酸素耐性能とアポトーシス抵抗性を獲得した。

次に、ZIP6の役割を詳細に解析するため、ヒトZIP6を標的とする siRNA 発現プラスミドをMCF-7に導入し、ZIP6特異的ノックダウン細胞を作製した。その結果、低酸素環境条件下において、ZIP6ノックダウン細胞は、遺伝子導入していない野生型およびネガティブコントロール細胞と比較して、顕著に生存率が高く、アポトーシスの特徴を持たない非アポトーシス型細胞死の誘導を著しく抑制した。その機序として、ZIP6発現抑制を介した生存シグナル伝達キナーゼPI3K-Aktの活性が必要であることを見出した。ZIP6の発現が減少すると、アポトーシスだけでなく非アポトーシス型細胞死にも抵抗性を示すことから、ZIP6は乳がん細胞の多様な細胞死を制御できる機能を有する可能性を明らかにした。さらに、ZIP6の発現量が極めて低いトリプルネガティブ乳がん細胞MDA-MB-231においても、低酸素環境において、高い生存能力を有し、細胞運動性の著しい亢進を認めた。また、その運動制御機構に、細胞内イオン環境調節を担う主要なトランスポーターNa⁺/H⁺交換輸送体(NHE1)が必要であることを明らかにした。以上より、ZIP6は低酸素環境において発現量を巧みに変化し、直接あるいは間接的に他の分子との相互作用を介して、乳がんの悪性化進展に重要な役割を果たす可能性が明らかになった。

乳がん細胞における抗がん剤誘発細胞死におけるオートファジーの役割

近年、抗がん剤として注目されている抗炎症薬スルファサジン (SASP) を MDA-MB-231 に処置した結果、細胞内グルタチオン量の減少に伴い活性酸素種 ROS の産生が促進し、細胞増殖能を著しく抑制した。その細胞増殖抑制機序としては、オートファジーが必要なアポトーシスの誘導が関与することを明らかにした。SASP による細胞毒性の発揮において、オートファジーは、アポトーシス型細胞死を制御できる機能があることを見出した。

本研究において、乳がんの悪性化における多様な細胞死制御に、ZIP6 発現量とその機能が重要な役割を果たすことを示した。現在、多様な細胞死機構における亜鉛の細胞内動態やオルガネラを介する細胞内ネットワークと乳がん悪性化との関連を解析している。さらに、SASP の細胞死誘導は、オートファジーが起点となり、効果的に抗がん活性を示せることを明らかにした。以上より、本研究成果は、疾患の診断・治療法開発に向けて、重要な知見になりうると強く考える。

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7件)

Leptin suppresses non-apoptotic cell death in ischemic rat cardiomyocytes by reduction of iPLA2 activity.

Tomoka Takatani-Nakase and Koichi Takahashi

Biochemical and Biophysical Research Communications (2015) in press.

High Glucose Level Promotes Migration Behavior of Breast Cancer Cells through Zinc and Its Transporters.

Tomoka Takatani-Nakase, Chihiro Matsui, Sachie Maeda, Satomi Kawahara and Koichi Takahashi

PLoS One **9** (2014) e90136.

Artemisinin: a Natural Product for Fighting against Cancer.

Tomoka Takatani-Nakase

Nihon Yakurigaku Zasshi **143** (2014) 61-64.

亜鉛トランスポーター制御による新規乳がん治療法の開発

中瀬朋夏

薬剤学 **73** (2013) 362-365.

Migration Behavior of Breast Cancer Cells in the Environment of High Glucose Level and the Role of Zinc and its Transporter.

Tomoka Takatani-Nakase

Yakugaku Zasshi **133** (2013) 1195-1199.

Transcutaneous Immunization System using a Hydrotropic Formulation Induces a Potent Antigen-specific Antibody Response.

Tomoka Takatani-Nakase, Erika Tokuyama, Megumi Komai and Koichi Takahashi

PLoS One **7** (2012) e47980.

CXCR4 Stimulates Macropinocytosis:

Implications for Cellular Uptake of

Arginine-rich Cell-penetrating Peptides and HIV.

Gen Tanaka, Ikuhiko Nakase, Yasunori Fukuda, Ryo Masuda, Shinya Oishi, Kazuya Shimura, Yoshimasa Kawaguchi, Tomoka Takatani-Nakase, Ulo Langel, Astric Graslund, Katsuya Okawa, Masao Matsuoka, Nobutaka Fujii, Yasumaru Hatanaka and Shiroh Futaki

Chemistry & Biology **19** (2012) 437-346.

[学会発表](計39件)

Impact of zinc transporter on breast cancer development. (招待依頼講演)

Tomoka Takatani-Nakase

The 4th Metallomics Forum 2014.11.7-8

武蔵野大学5号館(東京都西東京市)

Role of zinc transporter on breast cancer. (招待依頼講演)

Tomoka Takatani-Nakase

第25回日本微量元素学会学術集2014.7.3-4

岡山大学創立50周年記念館(岡山県岡山市)

乳がん細胞の低酸素ストレス応答に対する亜鉛トランスポーター-ZIP6の役割(最優秀発表者賞受賞)

川原さと実、中瀬朋夏、高橋幸一

日本薬剤学会第29年会 2014.5.20-22

大宮ソニックシティビル(埼玉県さいたま市)

ヒト乳がん細胞 MCF-7 のグルコース応答性と細胞運動能(優秀発表賞受賞)

松井千紘、中瀬朋夏、前田幸千恵、高橋幸一

—

日本薬学会第134年会 2014.3.27-30

熊本大学薬学部(熊本県熊本市)

Sesquiterpenoids: phytochemicals for fight against cancer. (招待依頼講演)

Tomoka Takatani-Nakase and Koichi Takahashi

第87回日本薬理学会年会シンポジウム
2014.3.19-21 東北大学 (宮城県仙台市)
高濃度グルコース環境が乳がん細胞の動態に与える影響と亜鉛トランスポーターの役割 (平成 24 年度日本薬学会近畿支部奨励賞受賞講演)

中瀬朋夏、松井千紘、高橋幸一

第 63 回日本薬学会近畿支部総会大会
2013.10.12 同志社女子大学 (京都府京田辺市)

高濃度グルコース環境による乳がん細胞の低酸素適応応答の亢進と亜鉛トランスポーターZIP6 の役割 (講演ハイライト採択)

松井千紘、**中瀬朋夏**、川原さと実、高橋幸一

日本薬学会第 133 年会 2013.3.27-30
パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

Artemisinin: a natural product for fight against cancer. (招待依頼講演)

Tomoka Takatani-Nakase and Koichi Takahashi

第86回日本薬理学会年会シンポジウム
2013.3.21-23 福岡国際会議場 (福岡県福岡市)

高濃度グルコース環境における乳がん細胞の悪性化進展 (優秀ポスター受賞)

前田幸千恵、**中瀬朋夏**、前田美子、上田佳澄、上田綾佳、壺井莉奈、松本佳子、高橋幸一

第 62 回日本薬学会近畿支部総会大会
2012.10.20 武庫川女子大学 (兵庫県西宮市)

高グルコース環境における乳がん細胞の運動性亢進と亜鉛トランスポーターの役割 (優秀発表受賞)

中瀬朋夏、松井千紘、上田佳澄、上田綾佳、壺井莉奈、松本佳子、前田美子、前田幸千恵、川原さと実、高橋幸一

第 7 回トランスポーター研究会
2012.6.9-10 京都大学 (京都府京都市)

[図書] (計 2 件)

乳癌細胞の悪性化進展における亜鉛トランスポーターの役割

中瀬朋夏、高橋幸一

別冊・医学のあゆみ 医歯薬出版株式会社
(2014) 64-68.

トランスポーターと疾患研究の最前線
乳癌細胞の悪性化進展における亜鉛ト

ンスポーターの役割

中瀬朋夏、高橋幸一

医学のあゆみ 第 245 巻 1 号 (2013) 64-68.

[その他]

2012 年 4 月 10 日 日経バイオテク ONLINE 掲載

「高血糖状態における乳がん細胞の運動性」
乳がん細胞における亜鉛トランスポーターの機能異常は、乳がんが悪性化する原因の一つとなること、さらに、糖尿病を併発した乳がんに対し、亜鉛トランスポーターが診断・治療のターゲットになる可能性を初めて明らかにし、その研究成果が記事として取り上げられた。がん患者が併発している疾患とがんとの関係は、まだ解析が進んでいない領域であり、より適切な治療方法及び治療薬の開発に繋がる可能性が期待されることがコメントされている。

6 . 研究組織

研究代表者

中瀬 朋夏 (高谷朋夏)

(TAKATANI-NAKASE, Tomoka)

武庫川女子大学・薬学部・講師

研究者番号：40434807