

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：13201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670551

研究課題名(和文) TAK1を標的とした放射線・温熱癌治療戦略の確立

研究課題名(英文) Effects of a TAK1 inhibitor on radiation-and heat-induced cell killing

研究代表者

近藤 隆 (KONDO, Takashi)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・教授

研究者番号：40143937

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトKRAS変異肺がんに対する有効な治療法探索のため、A549細胞を用いて、温熱とTAK1 (Transforming growth factor-beta-activated kinase 1) 阻害剤5Z-7-oxozeaenol の併用効果を検討した。細胞死についてアポトーシスおよびコロニー形成法により調べた。さらに、ミトコンドリア膜電位低下、細胞内活性ROS産生、および細胞内Caイオン濃度を検討したところ、併用でこれらの指標は増強された。また、Chop発現が増えたことより、ERストレスを介したアポトーシスの増加が関係することを示した。同様の結果はヒト白血病細胞株を用いた系でも得られた。

研究成果の概要(英文)：Transforming growth factor-beta-activated kinase1 (TAK1) appears to play an anti-apoptotic role in response to multiple stresses and has been reported to be a responsive kinase that regulates cell survival in KRAS-dependent cells. In this study, we focused on the synergistic effects of 5Z-7-oxozeaenol, a TAK1 inhibitor, with hyperthermia (HT) in KRAS mutant lung cancer cell line A549 cells. Here, enhancement in apoptosis induced by HT exposure was observed, when the cells were pre-incubated with 5Z-7-oxozeaenol. The enhancement was accompanied by significant increase in reactive oxygen species generation and mitochondrial membrane potential loss. In addition, the drug promoted HT-induced expressions of cleaved caspase-3, cleaved caspase-8, HSP70 and decreased HT-induced expressions of Bcl-2, p-p38, p-JNK and LC3. Taken together, our data provides further insights of the mechanism of action of 5Z-7-oxozeaenol and HT treatment for patients with KRAS mutant lung cancer.

研究分野：放射線基礎医学

キーワード：TAK1 放射線 温熱 細胞死

1. 研究開始当初の背景

Transforming growth factor β -activated kinase 1 (TAK1) 阻害による癌治療に関しては、最近、1) ヒトすい臓癌細胞で、TAK1 の siRNA および TAK1 阻害剤 LYTAK1 は、NF- κ B 活性化を抑制し、ゲムシタピン、SN38、オキサリプラチンの抗腫瘍効果を増強すること、2) TAK1 の siRNA は正常上皮細胞には影響を与えずヒト乳癌細胞および結腸癌において、カンプトテシンの抗腫瘍効果を増強することが報告されている。TAK1 の siRNA および TAK1 阻害剤 LYTAK1 が TRAIL のアポトーシスおよびオートファジー誘導効果を増強する事例もあるが、放射線に関する増強効果の報告は、我々の報告 (Furusawa et al. *Radiat. Res.*, 2012) が初めてであり、その詳細な機構の解明や温熱との併用効果については、未だ報告はない。

2. 研究の目的

そこで、本研究では TAK1 を標的とした放射線・温熱癌治療戦略の確立を目的とする。TAK1 は、炎症性サイトカインによる NF- κ B, p38 MAPK, JNK などのリン酸化に関与し、種々のストレスに対して細胞保護的な役割を担うことが知られている。一方、放射線や温熱等の癌治療因子作用下における TAK1 の役割については解明されていない。そこで我々は、TAK1 を標的とした放射線や温熱による癌治療戦略を検討する。そのために、TAK1 阻害剤である 5Z-7-oxozeaenol を用いて、放射線および温熱感受性の変化を検討するとともに、細胞死の分子機構の解析等を通じて TAK1 の新たな生理機能の解明を目指すとともに、癌治療に繋げる学術的基盤を確立する。

3. 研究の方法

TAK1 は抗アポトーシスに働き、KRAS 変異細胞では生存調節に働くキナーゼである。本研究ではヒト KRAS 変異肺がんに対する有効な治療法を見出すために、同変異肺がん A549 細胞を用いて、温熱 (44 度、20 分) と TAK1 阻害剤 5Z-7-oxozeaenol の併用効果を検討した。また、細胞死の機序について、PI/アネキシン V-FITC によるアポトーシス解析およびコロニー形成法により調べた。さらに、ミトコンドリア膜電位変化、細胞内活性酸素 (ROS) の産生、アポトーシス関連タンパク質発現、および細胞内カルシウムイオン濃度を検討した。

また、ヒト白血病細胞株 Mol1t-4 を用いても調べた。放射線照射群についても温熱と同様の併用効果を検討した。

4. 研究成果

(1) TAK1 阻害剤と温熱の併用をコロニー形成法により調べたところ、両者併用群で、生存率の低下を認めた (図 1)。さらにフローサイトメトリーで早期および後期アポトーシスについて調べたところ、薬剤単独では毒性

を示さないが、併用群で有意なアポトーシスの増強を認めた (図 2)。

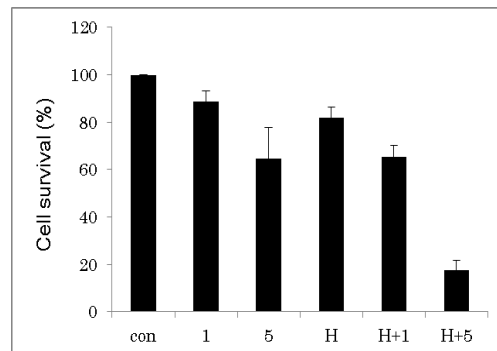


図 1 コロニー形成法による結果

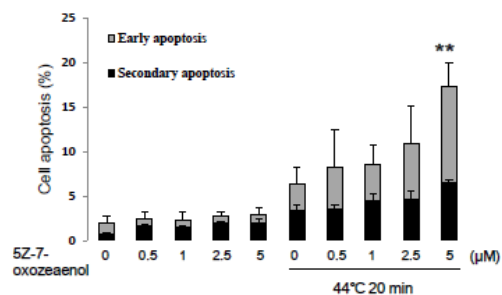


図 2 温熱および TAK1 阻害剤併用によるアポトーシス増強

(2) アポトーシス増強に関して関連の指標を調べた。ミトコンドリア膜電位の低下 (図 3)、ROS 産生の亢進、さらにアポトーシス関連 caspase-3、caspase-8 の活性化の促進効果が認められた。一方で、Bcl-2、p-p38、p-JNK および LC3 の発現は低下した (図 4, 5)。

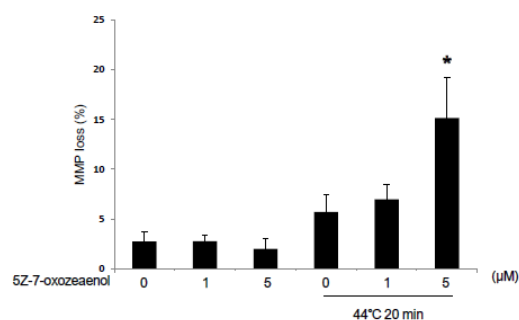


図 3 温熱および薬剤併用によるミトコンドリア膜電位の低下した細胞数の増加

(3) 両者の併用が ER ストレスの指標である細胞内カルシウムイオン濃度および Chop 発現に与える影響について検討したところ両者の増加が認められた (図 6, 7)。これらの結果は、ER ストレスを介したアポトーシスの増加が関係することを示唆する。

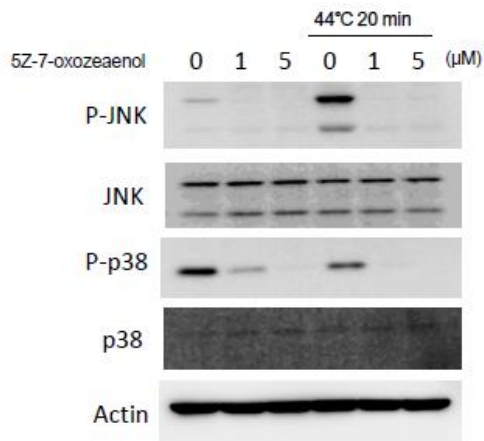


図4 温熱および薬剤併用の JNK, p38 およびリン酸化に及ぼす影響

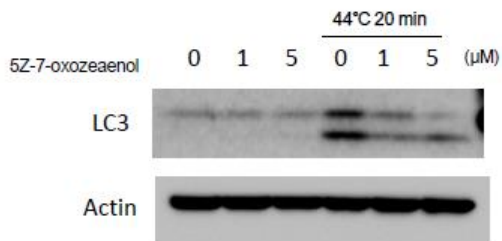


図5 温熱および薬剤併用の LC3 に及ぼす影響

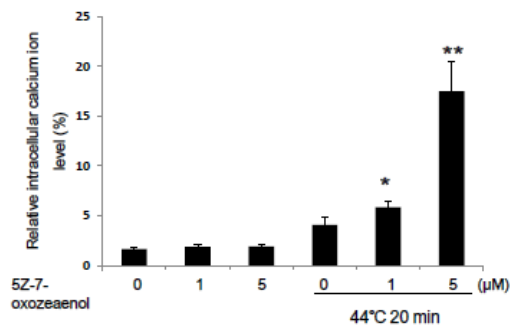


図6 温熱および薬剤併用の細胞内カルシウムイオン濃度に及ぼす影響

(4) TAK1 阻害剤 5Z-7-oxozeaenol と温熱および放射線との併用効果について検討した。放射線では、顕著な増強効果は認められなかったが、温熱との併用では、ヒト KRAS 変異肺がん細胞株やヒト白血病細胞株で、有意な細胞死(アポトーシス)増強効果が認められた。以上の結果は固形癌ではその遺伝子背景に依存するが、TAK1 阻害剤と温熱併用効

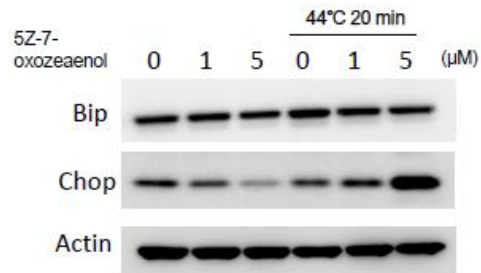


図7 温熱および薬剤併用の Bip および Chop に及ぼす影響

果の有用性を示すものである。

<引用文献>

- ① Furusawa Y, Wei ZL, Sakurai H, Tabuchi Y, Li P, Zhao Q-L, Nomura T, Saiki I, and Kondo T: TGF-beta-activated kinase 1 promotes cell cycle arrest and cell survival of X-ray-irradiated HeLa cells dependent on p21 induction but independent of NF-kB, p38 MAPK and E:76-7 RK phosphorylations. Radiat Res 177: 766-774, 2012.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 13 件)

- ① Jawaid P, Rehman MU, Hassan MA, Zhao QL, Li P, Miyamoto Y, Misawa M, Ogawa R, Shimizu T, and Kondo T: Effect of platinum nanoparticles on cell death induced by ultrasound in human lymphoma U937 cells. Ultrason Sonochem 31: 206-215, 2016. doi: 10.1016/j.ultsonch.2015.12.013.
- ② Rehman MU, Jawaid P, Zhao QL, Li P, Narita K, Kato T, Shimizu T, and Kondo T: Low dose spiruchostatin-B, a potent histone deacetylase inhibitor enhances radiation-induced apoptosis in human lymphoma U937 cells via modulation of redox signaling Free Radic Res 24: 1-15, 2016.
Doi N, Cui ZG, Morii A, Watanabe A, Kanayama S, Yoneda Y, Kondo T and Ogawa R: The acquired radioresistance in HeLa cells under conditions mimicking hypoxia was attenuated by decreased expression of HIF subunit genes induced by RNA interference. Exptl Cell Res 333: 249-260, 2015.
doi: 10.1016/j.yexcr.2015.03.009.
- ③ Sakata K, Kondo T, Mizuno N, Shoji M, Yasui H, Yamamori T, Inanami O, Yokoo H, Yoshimura N, Hattori Y: Roles of ROS and PKC-βII in ionizing radiation-induced eNOS activation in human vascular

- endothelial cells. *Vascular Pharmacol* 70: 55-65, 2015.
doi: 10.1016/j.vph.2015.03.016.
- ④ Yunoki T, Tabuchi Y, Hayashi A, and Kondo T: BAG3 protects against hyperthermic stress by modulating NF-κB and ERK activities in human retinoblastoma cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 253: 399-407, 2015.
doi: 10.1007/s00417-014-2874-1.
- ⑤ Buldakov MA, Hassan MA, Jawaid P, Cherdyntseva NV, Kondo T: Cellular effects of low-intensity pulsed ultrasound and X-irradiation in combination in two human leukemia cell lines. *Ultrason Sonochem* 23: 339-346, 2015.
doi: 10.1016/j.ultsonch.2014.08.018.
- ⑥ Wu LH, Li P, Zhao QL, Piao JL, Kadowaki M and Kondo T: Arbutin, an intracellular hydroxyl radical scavenger, protects radiation-induced apoptosis in human lymphoma U937 cells. *Apoptosis* 19: 1654-1663, 2014.
- ⑦ Rehman MU, Jawaid P, Yoshihisa Y, Li P, Zhao QL, Narita K, Katoh T, Kondo T, Shimizu T: Spiruchostatin A and B, novel histone deacetylase inhibitors, induce apoptosis through reactive oxygen species-mitochondria pathway in human lymphoma U937 cells. *Chemico-Biological Interaction* 221: 24-34, 2014.
- ⑧ Li P, Zhao QL, Wu LH, Jawaid P, Jiao YF, Kadowaki M, Kondo T: Isofraxidin, a potent reactive oxygen species (ROS) scavenger, protects human leukemia cells from radiation-induced apoptosis via ROS/mitochondria pathway in p53-independent manner. *Apoptosis* 19(6): 1043-1053, 2014.
doi: 10.1007/s10495-014-0984-1.
- ⑨ Jawaid P, Rehman MU, Yoshihisa Y, Li P, Zhao QL, Hassan MA, Miyamoto Y, Shimizu T and Kondo T: Effects of SOD/catalase mimetic platinum nanoparticles on radiation-induced apoptosis in human lymphoma U937 cells. *Apoptosis* 19(6):1006-1016, 2014.
doi: 10.1007/s10495-014-0972-5.
- ⑩ Kariya A, Furusawa Y, Yunoki T, Kondo T, and Tabuchi Y: A microRNA-27a mimic sensitizes human oral squamous cell carcinoma HSC-4 cells to hyperthermia through down-regulation of Hsp110 and Hsp90. *Int J Mol Med* 34(1):334-340, 2014.
doi: 10.3892/ijmm.2014.1758.
- ⑪ Cui ZG, Piao JL, Rehman MU, Ogawa R, Li P, Zhao QL, Kondo T, Inadera H: Molecular mechanisms of hyper-thermia-induced apoptosis enhanced by withaferin A. *Eur J Pharmacol* 15;723:99-107, 2014.

doi: 10.1016/j.ejphar.2013.11.031.

- ⑫ Buldakov MA, Feril LB Jr, Tachibana K, Cherdyntseva NV, Kondo T: Low-intensity pulsed ultrasound enhances cell killing induced by X-irradiation. *Ultrason Sonochem* 21:40-42, 2014.

[学会発表] (計 1件)

- ① Li P, Zhao QL, Jawaid P, Rehman MU, Sakurai H, and Kondo T: TAK1inhibitor 5Z-7-oxozeaenol enhanced hyperthermia-induced apoptosis in Molt-4 cells. 日本ハイパーサーミア学会第32回大会, 2015. 9. 4-5, 大阪.

[図書] (計 2件)

- ① Rehman MU, Kondo T, Shimizu T: Chapter 7. Ultraviolet-induced photoaging in the skin: The role of inflammatory cytokine, macrophage migration inhibitory factor” In “Skin Aging and Photoaging: Physiology, Clinical Aspects and Emerging Therapies”. edited by Graham E, p. 165-180, Nova Science Publishers, Inc, New York, 2015.
- ② Kondo T: Chapter 9. Application of ultrasound in medicine and biotechnology” In “Sonochemistry and the Acoustic Bubble”, edited by Grieser F, Choi PK, Enomoto N, Harada H, Okitsu K, and Yasui K, p. 207-230, Elsevier, Inc, New York, 2015.

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.u-toyama.ac.jp/radsci/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 隆 (KONDO Takashi)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・教授

研究者番号 : 40143937

(2) 研究分担者

櫻井 宏明 (SAKURAI Hiroaki)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬学)・教授

研究者番号 : 00345571

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 : 93013593