

低温大気圧プラズマによる
癌細胞傷害性オートファジーの誘導
(要約)

日本大学大学院医学研究科博士課程
外科系整形外科学専攻

伊藤 友久

修了年 2018 年

指導教員 齋藤 修

低温大気圧プラズマによる癌細胞障害性オートファジーの誘導

伊藤 友久

背景

骨肉腫や悪性黒色腫は複数の抗癌剤に対して高い耐性を示す、代表的な治療抵抗性腫瘍である。低温大気圧プラズマは腫瘍細胞を死滅させる一方、正常細胞に対しては影響が非常に少ないという高い腫瘍選択性を持つことから、有望な癌治療ツールとして注目されている。私の所属研究室では細胞培養液に低温大気圧プラズマを照射した **cold plasma-stimulated medium (PSM)** の抗腫瘍効果を利用した新規な治療法の開発を進めている。以前の報告では、PSM によるヒト悪性黒色腫 (MM) ならびに骨肉腫 (OS) の細胞死が、それまでに他の細胞種で報告されていたようなカスパーゼ依存性の典型的なアポトーシスとは異なることを明らかにしている。今回はその他の細胞死形態として、オートファジーに注目した。オートファジーはストレス負荷や低栄養などの細胞増殖に好ましくない状態に対して、細胞内の恒常性を維持するために働く生理的過程であるが、条件によっては、これを介する細胞死が誘発されること、逆にオートファジーはアポトーシスを負に制御しており、種々の癌の薬剤抵抗性に関与することなどが明らかになってきた。そこで我々は、PSM による細胞死とオートファジーの関連性を解明するために研究を行った。また、同じく腫瘍選択性が高く、アポトーシス細胞死の誘導物質として注目されている **Tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis inducing ligand (TRAIL ; 腫瘍壊死因子関連アポトーシス誘発リガンド)** の抗腫瘍効果におけるオートファジーの関連性についても、併せて検討を行った。

目的

PSM の抗腫瘍効果にオートファジーが関与するかどうかを明らかにする。

対象と方法

PSM 刺激したヒト骨肉腫、ヒト悪性黒色腫細胞株を用いて、蛍光顕微鏡によるオートファゴソーム観察、WST-8 法による細胞生存率測定、ウェスタンブロットティングによるオートファジー関連分子の発現解析を行った。また、**Tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis inducing ligand (TRAIL ; 腫瘍壊死因子関連アポトーシス誘発リガンド)** の作用を併せて検討した。

結果

1. PSM は特異的にバックグラウンドオートファジーを抑制する

蛍光顕微鏡での形態イメージングにおいて、PSM による時間処理は、HOS、A549 細胞を顕著に傷害した。その結果、接着性の紡錘形細胞は丸くなり、一部は接着性と膜の統合性を失った。これに付随して、バックグラウンドの CYTO-ID ドットは顕著に減少した。一方、正常の HDF ではバックグラウンドの CYTO-ID ドットをほとんど認められず、PSM 処理による変化もなかった。この結果は、PSM が特異的にバックグラウンドオートファジーを抑制することを示す。

2. 高濃度 PSM は特異的にミトファジーを誘発する

未処理の A375 細胞核の周囲にフィラメント状のミトコンドリアが、細胞質に散在したオートファゴソームがそれぞれ観察され、両者の局在は異なっていた。これに対して PSM 処理を施した場合は、ミトコンドリアを著しく断片化・凝集させ、これらの傷害された丸い細胞では、CYTO-ID ドットはクラスターを形成した。さらに、二つの蛍光をオーバーレイすると、CYTO-ID ドットと MitoTracker シグナルがかなりの部分で重なり黄色の蛍光が見られ、ミトファジーが誘導された。また、高濃度 PSM 処理によってミトコンドリアの著しい断片化とクラスター形成に加えて、ミトコンドリアとオートファゴソームの共在がより多く見られた。

3. ミトファジーの誘発は細胞死と相関する

A2058 ならびに HOS 細胞株の生存率を測定すると、いずれの細胞でも高濃度 PSM では細胞死が誘導されているが、低濃度 PSM では細胞死は誘導されず、顕微鏡下の観察結果と一致した。ウエスタンブロッティングにおいても、高濃度 PSM は添加後 36 から 48 時間でオートファジー関連アダプター p62 分子と LC3-II 両者のレベルを増加させた。

4. PSM は細胞条件によってオートファジー細胞死または非アポトーシス/非オートファジー細胞死を誘発する

HOS・MG63 細胞株では、3-Methyladenine (3-MA) ならびに Bafilomycin

A1 (Baf) 両者で PSM による細胞死が抑制された。SAOS-2 細胞では 3-MA では効果が見られなかったが、Baf で細胞死が抑制された。これらのオートファジー阻害剤の効果は、PSM 濃度が低いほど顕著であった。その一方、HOS, 143B, A2058 細胞を用いた他の実験では、3-MA, Baf, Chloroquine Diphosphate (CQ) のいずれのオートファジー阻害剤によっても細胞死は抑制されなかった。また、これらの細胞死はカスパーゼ阻害剤 z-VAD-FMK では抑制されなかった。一方、HOS, 143B 細胞株では、これらの細胞死は抗酸化剤 MnTBAP によって抑制され、この効果も PSM 濃度が低いほど顕著であった。これらの結果は、PSM は細胞条件によってオートファジー細胞死または非アポトーシス/非オートファジー細胞死を誘発することを示す。

5. TRAIL は基本的に細胞保護的オートファジーを誘発する

TRAIL で 72 時間処理し、WST-8 法に A2058, SAOS-2, HOS 細胞いずれも生存率はほとんど低下しなかった。細胞毒性の低い濃度の 3-MA を併用すると TRAIL による細胞死が増強され、HOS 細胞ではこの増強効果が z-VAD-FMK によって抑制された。顕微鏡下では TRAIL 単独は HOS 細胞で、CYTO-ID ドットを増加させ、3-MA はそれらを消失させた。また、ミトコンドリアは TRAIL によって過剰融合し、一方 3-MA によって分裂し、凝集した。しかし、いずれの場合でも CYTO-ID ドットはミトコンドリアと別な位置に観察された。TRAIL と 3-MA を併用すると、CYTO-ID ドットは大きなクラスターを形成し、ミトコンドリアと共存した。よって、TRAIL は細胞保護的なオートファジーを誘発し、その抑制は細胞種によって異なるモードの細胞死を促進して TRAIL の抗腫瘍効果を増強することが示唆される。

考察

本研究は、PSM のオートファジーに対する作用をヒト MM および OS 細胞で解析した。ウエスタンブロッティング分析の結果、致死的な濃度の PSM がオートファゴソーム形成に必須な LC3-II を増加させたのに対して、非致死的な濃度の PSM ではそのような効果は見られなかった。さらに、この PSM の細胞毒性は薬理的なオートファジー阻害剤である 3-MA や Baf により強く抑制されたことから、このオートファジーが細胞死の要因であると考えられる。形態イメージングでは、PSM 処理後オートファゴソームはフォーカスを形成して、クラス

ター化したミトコンドリアと共存した。これらの結果より、本研究で見出された現象がミトファジーである可能性を考慮した。ミトファジーは、本来損傷されたミトコンドリアを排除して、ミトコンドリアの品質管理ならびに細胞生存に寄与する、生理的で細胞保護的な仕組みである。しかし、何らかの異常で、過度のミトファジーが生じると、様々な病理学的状態を引き起こし、神経変性疾患、糖尿病、癌等の様々な病態の原因となることが明らかにされてきた。すなわち、PSM 処理によって本来生体防御的に働くミトファジーが過度に活性化され、細胞傷害的に働いていることが推察される。

また、TRAIL はオートファゴソーム形成を増加させたが、その細胞毒性は 3-MA で抑制されずむしろ増強される傾向があったことから、これらの癌細胞において TRAIL は基本的に細胞保護的なオートファジーを促進することが示唆された。さらに、TRAIL と 3-MA を併用した場合には、細胞保護的オートファジーが 3-MA によって抑制される結果、TRAIL によるアポトーシス細胞死に対する抑制が解除され細胞死が誘導される事が推察された。

今回、PSM が TRAIL や他の抗がん剤が誘発できない細胞障害性オートファジーを強く誘発して、高い薬剤耐性を持つ MM および OS 細胞を効率的に死滅させることを初めて明らかにした。この発見は、現行の治療法では十分な治療効果が得られない腫瘍に対して、PSM は代替療法として十分に期待されるものであることを示している。

結語

本研究により PSM が特異的に細胞傷害性オートファジーを MM 並びに OS 細胞に誘発することで、抗腫瘍効果を示すことが示唆された。