

論文の内容の要旨

論文題目 植物抽出物(スルフォラファン)の大腸癌及び血管内皮細胞に
及ぼす影響に関する研究

指導教員 名川弘一 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 18 年 4 月入学

医学博士課程
外科学専攻
氏名 西川武司

研究の背景と目的

ブロッコリーやキャベツなどのアブラナ科野菜に豊富に含まれるイソチオシアネートの一種であるスルフォラファン(SUL)は、Glutathione S-transferase(GST)、quinine reductase(QR)、UDP-glucuronosyltransferase (UGT) などの第II相解毒酵素群を強く誘導し、発癌物質をより毒性の低い、排泄されやすいものへと変換し、発癌物質によるDNA損傷から細胞を守る役割を持つことが知られている。また、様々な癌種(大腸癌、前立腺癌、膀胱癌、Jurkat T細胞白血病など)に対するSULの増殖抑制効果が注目されており、そのメカニズムとして、アポトーシス誘導や細胞周期の停止が報告されている。さらに、SULの抗血管新生作用、すなわち腫瘍の増殖・進展に必要不可欠である血管新生の阻害作用も確認されており、我々の研究室もSULの血管内皮細胞、血管内皮前駆細胞のアポトーシス誘導作用について報告してきた。以上のように、SULは、癌細胞に対する直接作用と抗血管新生作用を併せ持つ物質として癌治療への応用が期待されている。しかし、SUL単独で抗がん作用や抗血管新生作用を発揮するためには、食餌から摂取し、吸収される量の数倍以上の比較的高濃度のSULが必要という問題がある。臨床応用の実現には、副作用などの出現し難い、より低濃度での有効性を発揮する方策が重要であると考えられる。

そこで、本研究では、SULの抗がん作用および抗血管新生作用を増強する方法として、癌細胞のオートファジー誘導に着目した検討を行った。オートファジー(自食作用)は、細胞が様々なストレス(アミノ酸飢餓の状態や、異常タンパク質の蓄積)に曝された際に

誘導され、細胞内の一部のタンパク質が分解され、より重要性の高いタンパク質合成に用い、細胞の生命活動を維持しようとするメカニズムである。しかし、オートファジーによる上記のストレス回避はあくまでも一時的なものであり、オートファジーが長く続いた場合、または過度に進行した場合は、細胞が自分自身を「食べ尽くし」てしまい、細胞が死に至ると考えられている。

癌細胞におけるオートファジー誘導が抗癌剤などへの暴露に対する防御反応として働くと仮定すれば、オートファジー誘導阻害により抗癌剤などの抗腫瘍効果を増強できると考え、以下の研究を行った。すなわち、各濃度の SUL を大腸癌細胞株および血管内皮細胞に作用させ、オートファジー誘導の有無を確認し、次いで、オートファジー阻害によるアポトーシス誘導の増強効果について検討した。

方法・結果

1) 大腸癌細胞株に及ぼす SUL の影響

SUL は、ヒト大腸癌細胞株 WiDr 細胞の増殖を濃度依存的に抑制した。今回使用した最高濃度(80 μ M)の SUL 処理ではアポトーシスが強く誘導されたが、より低濃度(20-40 μ M)ではアポトーシス誘導をほとんど認めず、オートファジーの特徴的な所見、すなわち acidic vesicular organelles(AVOs)形成および light chain 3(LC3)局在を認めた。Western blot にて LC3-II および LC3-I の発現が、SUL の濃度依存的に増加することを確認した。また、Bcl-2 の発現は SUL の濃度依存的に低下した。SUL 処理による細胞の生死の影響をコロニー形成能で評価すると、SUL20 μ M 処理細胞は、培養 4 日目のコロニー形成能がコントロール細胞の約 10%と低下していたが、培養 8 日目には約 75%と回復していた。以上の結果は、癌細胞の多くがオートファジー誘導により静止状態になり、細胞増殖が遅延することを意味すると考えられた。次いで、オートファジーの特異的阻害剤である 3-methyladenine(3-MA)を併用した系で、SUL によるアポトーシス誘導を検討した。3-MA 併用の系では、SUL による AVOs 形成は抑制され、SUL によるアポトーシス誘導作用が増強した。同アポトーシス誘導には caspase-8 の活性化、cytochrome-c の放出、caspase-9 の活性化、caspase-3 の活性化を伴っていた。さらに、オートファジー阻害により、より低濃度の SUL 処理によってもコロニー形成能が著明に抑制されたが、その効果はアポトーシス誘導による細胞増殖抑制によるものと考えられた。

2) 血管内皮細胞に及ぼす SUL の影響

腫瘍新生血管のモデルとしてヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVECs)を用いて実験を行った。SUL は、濃度依存的に HUVEC の増殖を抑制した。大腸癌細胞に比べ HUVECs では、より低濃度の SUL で抑制効果が認められた。今回使用した最高濃度(80 μ M)の SUL 処理細胞では、アポトーシスが強く誘導され、より低濃度(20-40 μ M)の SUL 処理では大腸癌同様に、AVOs 形成および LC3 局在を特徴とするオートファジーの誘導を認めた。Western blot にて、LC3-II の発現増加が確認された。細胞の生死をコロニー形成能で評価したところ、SUL20 μ M 処理した細胞は、培養 4 日目にはコントロール未処理細胞の約 30%のコロニー形成能と低下していたが、培養 8 日目には約 80%に回復していた。このことは

大腸癌細胞同様、血管内皮細胞もオートファジー誘導により静止状態に陥り、その結果として増殖遅延を示したと考えられた。次いで、オートファジー特異的阻害剤である 3-MA を併用し、SUL の効果を検討したところ、血管内皮細胞のアポトーシス誘導作用の増強が認められた。そのアポトーシス誘導は同様に caspase-8 の活性化、cytochrome-c のミトコンドリアからの放出そして caspase-9 の活性化、caspase-3 の活性化を伴っていた。3-MA の併用により血管内皮細胞のコロニー形成能は有意に低下し、それはアポトーシス誘導による増殖抑制効果によるものと考えられた。さらに、血管内皮細胞の機能に及ぼすオートファジー阻害および SUL 処理の影響について検討したところ、Matrigel 上での管腔形成能は、SUL の単独処理でも濃度依存的に抑制されたが、オートファジー阻害により、より低濃度の SUL において同様の抑制作用を示すことが確認された。

考察

本研究は、大腸癌細胞におけるオートファジー誘導が、抗腫瘍薬に対する治療耐性を獲得するメカニズムの一つであるという仮説に基づいて以下の検討を行った。

まず、種々の SUL 濃度および作用時間におけるオートファジー誘導とアポトーシスの有無、程度を確認し、アポトーシスを起こさない条件を予め確認した。そして同条件下における SUL の濃度依存的なヒト大腸癌細胞株(WiDr)のオートファジー誘導を確認した。SUL 処理(20-40 μ M)によって、AVOs の発現は増加し、さらには LC3-II の発現も増強した。また、SUL の単独作用では、コロニー形成能が一時的に抑制されるものの、多くの細胞がコロニー形成能を回復することから、SUL 処理により細胞は死滅したのではなく、静止状態に陥ったのみであることが示唆された。

次に、オートファジーの特異的阻害剤である 3-MA により WiDr のオートファジーを阻害したところ、アポトーシスが強く誘導され、結果としてコロニー形成能も抑制された。SUL によるオートファジー誘導に関する報告は、前立腺癌細胞株(PC-3, LNCaP)でのみ認められる。私の大腸癌に関する検討結果と同様、比較的高濃度の SUL(40 μ M)を 16 時間処理することによって前立腺癌でオートファジーの典型的な変化が確認されている。SUL によるアポトーシス誘導、そして細胞周期の停止は、様々な癌種において確認され、癌種などとともに SUL の濃度や作用時間によって得られる効果が異なると報告されている。以上より、SUL の濃度および作用時間は重要な因子であり、今回検討した濃度(20-40 μ M)および作用時間(16 時間)は、オートファジー誘導の制御という本研究の目的を達成するために適切なものと考えられた。

本研究結果と同様、抗 HER-2 モノクローナル抗体(Trastuzumab, Tzb)に曝された HER-2 高発現乳癌細胞がオートファジーを誘導し、Tzb の増殖抑制効果に対する抵抗性が出現することが報告されている。悪性神経膠腫の前駆細胞(CD133+細胞)における、オートファジー誘導が放射線耐性に関与しているという報告もある。また、オートファジー阻害剤であるクロロキンの作用により、大腸癌の vorinostat (histone deacetylase (HDAC)の阻害物質)誘発アポトーシスが増強されることが確認されるとのオートファジー阻害によるアポトーシス誘発物の増強効果を示唆する報告もみられる。一方、オートファジー誘導により放射線増感効果が期待できるという報告もあり、vitamin D または類似物質の処理

によって乳癌細胞はオートファジーを誘導し、その結果として放射線増感効果が得られると報告している。坪井らの報告によると、電離放射線照射した神経膠腫細胞株はアポトーシスでなく、オートファジーを誘導し、オートファジー阻害剤である 3-MA の処理によって放射線増感効果は低下すると報告している。以上より、癌細胞におけるオートファジー誘導は治療に対する防御反応であるとする説とともに、逆に、オートファジーにより細胞が死滅するという説も存在しており、オートファジーが細胞死あるいは細胞生存のいずれのメカニズムであるかについては、結論が出ていない。

本研究の結果は、前者、すなわち、オートファジーの誘導は癌細胞の治療に対する防御反応であるという仮説を強く支持するものである。そして癌細胞のみならず、血管内皮細胞でも同様の現象が確認されたことから、オートファジー阻害薬の抗がん治療あるいは抗血管新生療法への併用の有用性が示唆されたと考える。特に SUL のような癌および癌の栄養血管の両方に作用する物質との併用は極めて理想的であると考えられる。さらに、細胞の防御機構を選択的に阻害し得る薬物(3-MA)の併用により必要な薬剤(SUL)の濃度を低減化すれば、臨床応用の重大な阻害要因となる重篤な副作用予防につながるものと考えられた。今後、癌細胞や腫瘍新生血管内皮細胞に対するより特異性の高いオートファジー阻害剤が開発され、臨床応用への道が開かれることを期待している。