

学術交流・研究推進プロジェクト 成果報告書

研究代表者 所属 病態生化学研究室
職・氏名 講師・小池 敦資

研究テーマ：

膵がん細胞におけるネクロプトーシス関連分子 MLKL の機能解明

研究期間：

2020 年 4 月 1 日 ～ 2022 年 3 月 31 日

研究担当者：

研究代表者 小池 敦資（大阪医科薬科大学・薬学部・講師）

研究目的：

膵臓がん（膵がん）は、5 年生存率の最も低いがんの一つであり、この 30 年間で予後の改善がほとんどみられていない。放射線や抗がん剤の効果も極めて限定的であるため、新たな治療法の確立が切望されている。近年、様々ながんに対する新たな治療標的として、アポトーシスやネクローシスとは異なる細胞死機構、ネクロプトーシスに注目が集まっている。Mixed lineage kinase domain-like protein (MLKL) はネクロプトーシスの誘導に関与するタンパク質として知られており、MLKL やその関連分子を標的とした治療法の開発が精力的に行われている。しかし、いくつかのがん細胞やがん組織において、MLKL は細胞増殖や放射線に対する抵抗性獲得に必要であることや、MLKL の発現量とがんの悪性度との間に正の相関があることが報告されている。さらに、申請者はこれまでに、膵がん細胞において MLKL を阻害すると、細胞死が誘導されることを見出した。これらの報告や申請者の研究結果より、MLKL は従来のネクロプトーシスの誘導とは異なる機能を持つことを示唆している。本研究では、膵がん細胞における MLKL の機能を解明し、膵がんの新たな治療法の提案を行うことを目的とする。

研究内容および研究成果：

1. 膵がん細胞における MLKL 阻害剤の影響

膵がん細胞はヒト膵がん細胞株の MIA PaCa-2, SUIT-2, QGP-1 を用い、MLKL 阻害剤は necrosulfonamide (NSA) を用いた。細胞を 1×10^5 cells/mL の濃度で播種後、NSA を 0 - 20 μ M の濃度になるように添加し、37°C で 2 日間培養した。その結果、MIA PaCa-2, SUIT-2, QGP-1 において、それぞれ 5 μ M, 20 μ M, 10 μ M 以上の NSA 処理によって顕著な生細胞率の低下がみられた (図 1)。その他の細胞への NSA の影響を調べるために、正常細胞であるヒト胎児由来肺正常線維芽細胞、MRC5 やヒト肺がん由来細胞株、A549 を用いて NSA の細胞障害性について調べた。その結果、NSA の濃度が 20 μ M までは、MRC5, A549 とともに生細胞率の低下はみられなかった (結果示さず)。次に、NSA と異なる MLKL 阻害剤の GE806742X (GW) を用いて、膵がん細胞への影響を調べた。その結果、NSA と同様に GW は濃度依存的に MIA PaCa-2 の生細胞率を低下させた (図 2)。以上の結果よ

り、MLKL 阻害剤は膵がん細胞に細胞障害を誘導することが示された。

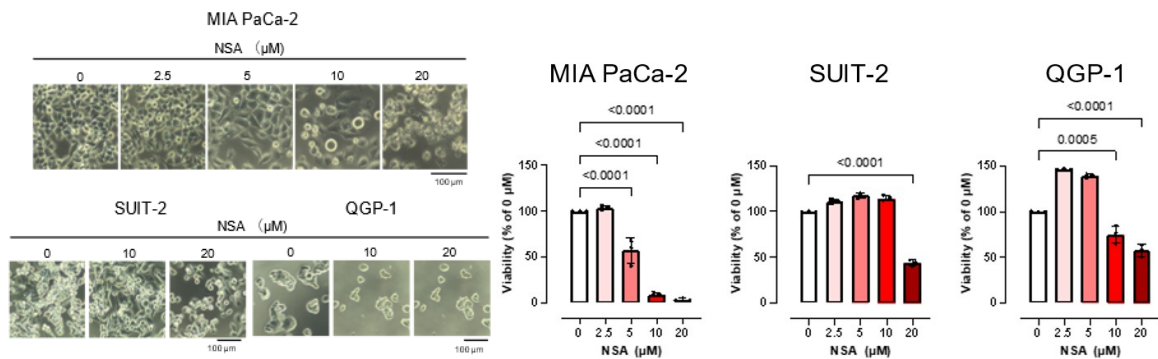


図 1. 膵がん細胞における necrosulfonamide の影響

ヒト膵がん細胞株, MIA PaCa-2, SUI-2, QGP-1 に necrosulfonamide (NSA) を 0 - 20 μM になるように添加し, 48 時間培養した. その後, 顕微鏡観察 (左), 生細胞率の測定 (右) を行った.

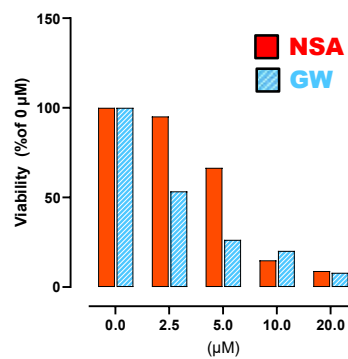


図 2. 膵がん細胞における GW80647X の影響

ヒト膵がん細胞株, MIA PaCa-2 に necrosulfonamide (NSA) あるいは GW80647X (GW) を 0 - 20 μM になるように添加し, 48 時間培養した. その後, 生細胞率の測定を行った.

2. NSA によって誘導される細胞障害に関与する分子の探索

NSA によって誘導される膵がん細胞の細胞障害に関与する分子の探索を行った。ネクロプトーシス阻害剤 (necrostatin-1; Nec-1), アポトーシス阻害剤 (Z-VAD-FMK, BOC-D-FMK), ネクローシス阻害剤 (IM-54), フェロトーシス阻害剤 (deferoxamine, ferrostatin-1), 抗酸化剤 (N-acetyl cysteine; NAC) を用いて, NSA による細胞障害への影響を調べた。その結果, MIA PaCa-2 において, Z-VAD-FMK, BOC-D-FMK および NAC の前処理によって, NSA による細胞障害が抑制されることが示された (図 3)。次に, Z-VAD-FMK や BOC-D-FMK はカスパーゼを阻害することから, アポトーシスの実行因子であるカスパーゼ 3 や 7 の活性化における NSA の影響を調べた。その結果, NSA の添加は, 濃度および時間依存的にカスパーゼ 3, 7 を活性化することが示された (図 4A)。また, 抗酸化剤である NAC によって NSA の細胞障害が抑制されたことから, 活性酸素 (ROS) の産生に対する NSA の影響を調べた。その結果, NSA を添加した MIA PaCa-2 において, ROS の産生の顕著な増加がみられた (図 4B)。以上の結果より, NSA によって誘導される膵がん細胞の細胞障害にはカスパーゼ 3, 7 や ROS が関与することが示唆された。

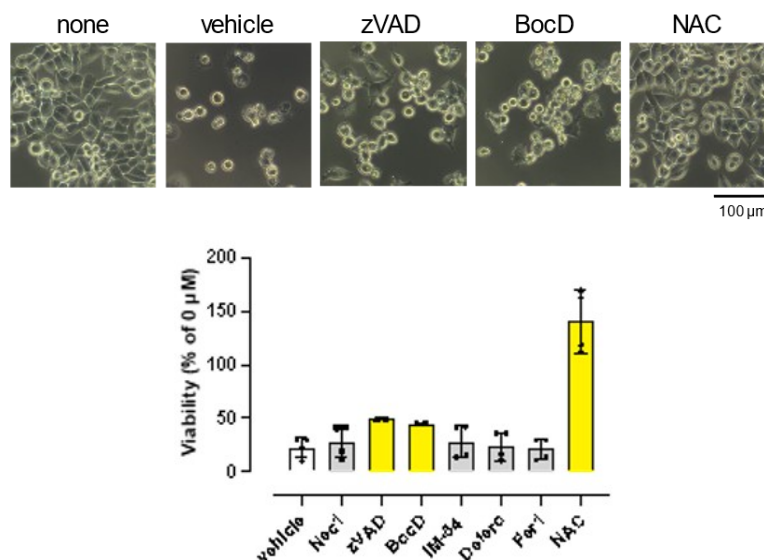


図 3. necrosulfonamide によって誘導される細胞障害に対する阻害剤の影響

ヒト膵がん細胞株, MIA PaCa-2 に各種阻害剤を添加し, 1 時間前培養後, necrosulfonamide (NSA) を 20 μM になるように添加し, 48 時間培養した。その後, 顕微鏡観察 (上), 生細胞率の測定 (下) を行った。

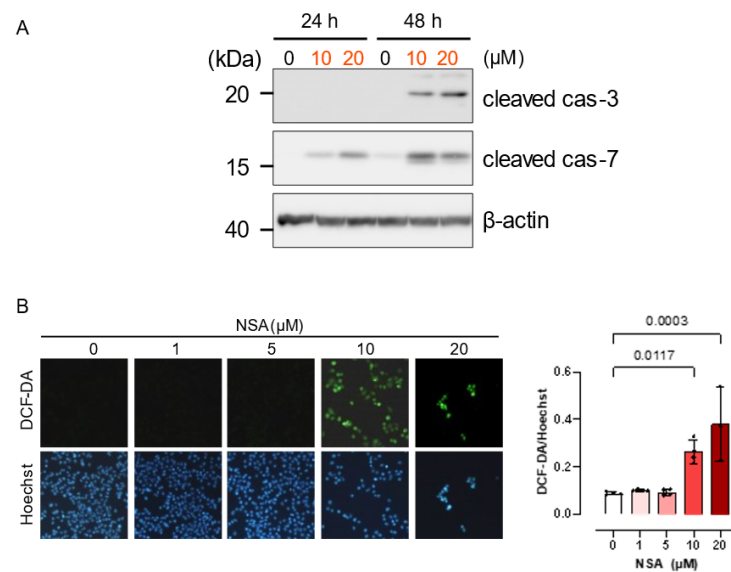


図 4.カスパーゼの活性化や ROS の産生に対する necrosulfonamide の影響

(A) ヒト膵がん細胞株, MIA PaCa-2 を necrosulfonamide (NSA) を 10 あるいは 20 μM で処理し, 24 または 48 時間培養した. その後, タンパク質を抽出し, 活性化型 (断片化) カスパーゼ 3 (cleaved cas-3) およびカスパーゼ 7 (cleaved cas-7) をウェスタンブロッティングによって調べた. (B) MIA PaCa-2 を NSA で 0 - 20 μM で処理し, 48 時間培養した. その後, 細胞内の ROS を蛍光色素 (DCF-DA) で検出し, 顕微鏡観察 (左), その蛍光強度の測定 (右) を行った.

3. 膵がん細胞における MLKL ノックダウンの影響

NSA 阻害剤による膵がん細胞の細胞障害の誘導にはカスパーゼや ROS が関与することが示唆されたことから, siRNA を用いて MLKL をノックダウンした際の膵がん細胞における細胞増殖や酸化ストレスに対する影響を調べた. まず, siRNA は最終濃度が 20 nM になるようにリポフェクション法によって導入した. ノックダウン効率を調べた結果, ネガティブコントロールの siRNA (N.C. siRNA) を導入した細胞と比べて MLKL を標的とした siRNA を導入した細胞では, MLKL 遺伝子の発現量は約 20%に抑制されており, タンパク質の発現レベルも大きく抑制されていることが確認できた (図 5A). 次に, siRNA を導入後, 3 日間培養した際の細胞増殖への影響を調べた. その結果, 軽微 (約 10%) ではあるが, MLKL をノックダウンすることによって細胞増殖は抑制されることが示された (図 5B). 最後に, 過酸化水素 (H_2O_2) による酸化ストレスに対する MLKL ノックダウンの影響を調べた. 1000 μM までの H_2O_2 を培地中に添加した場合, N.C. siRNA を導入した細胞では H_2O_2 の濃度依存的に緩やかな生細胞率の低下がみられ, 1000 μM の H_2O_2 を添加した場合でも生細胞率の低下は約 40%にとどまっていた (図 5C). 一方, MLKL をノックダウンした細胞では, 200 μM の H_2O_2 の添加によって生細胞率は約 40%低下し, 600 μM 以上の H_2O_2 では, 生細胞率は 80%以上低下した (図 5C). 以上の結果より, MLKL をノックダウンすることによって H_2O_2 に対する耐性が顕著に低下することが示唆された.

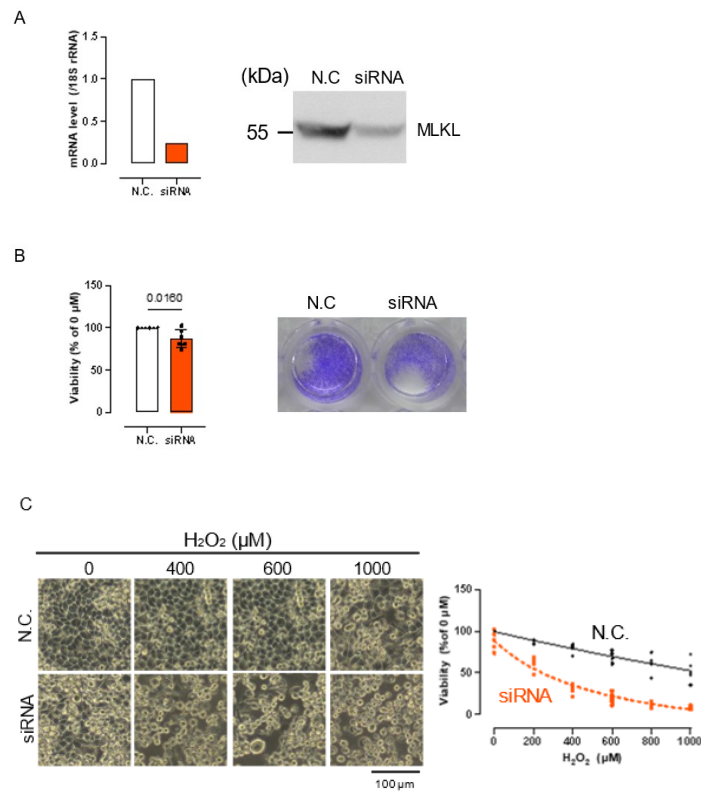


図 5. MIA PaCa-2 細胞における MLKL ノックダウンの影響

(A) ヒト膵がん細胞株, MIA PaCa-2 に negative control siRNA (N.C. siRNA)あるいは MLKL の siRNA を 20 nM になるように導入し, 48 時間培養した. その後, 細胞から RNA またはタンパク質を抽出し, MLKL の遺伝子の発現レベル (左) やタンパク質の発現 (右) を調べた. (B) MIA PaCa-2 に N.C. siRNA または MLKL の siRNA を 20 nM になるように導入後, 72 時間培養した. その後, 生細胞率の測定 (左) あるいは crystal violet 染色 (右) を行った. (C) MIA PaCa-2 に N.C. siRNA または MLKL の siRNA を 20 nM になるように導入後, 72 時間培養した. 次いで, 培地中に H₂O₂ を図に示す濃度で添加し, 24 時間培養した. その後, 顕微鏡観察 (左), 生細胞率の測定 (右) を行った.

本研究によって, MLKL 阻害剤は膵がん細胞において細胞障害を誘導することが示された. また, MLKL は細胞増殖や酸化ストレスに対する耐性に関与することが示唆された. 今後, 酸化ストレス応答における MLKL の役割について明らかにしていきたい.

本研究の一部は, 2020 年度学術交流・研究推進プロジェクトの助成を受けて実施したものであり, この場を借りて深謝いたします.

成果発表:

<原著論文>

投稿準備中

<学会発表>

なし

<その他>

なし