

論 文 要 旨

Amoxicillin, a β -lactam antibiotic, enhances cisplatin sensitivity in cancer cells affecting mitochondria.

〔 β -ラクタム系抗菌薬のアモキシシリンは、がん細胞のミトコンドリアに影響を与え、シスプラチンの感受性を高める 〕

高見 芳野

【序論および目的】

ミトコンドリアは、エネルギー産生に加えてがん細胞の増殖と分化にも関与しており、ミトコンドリア由来活性酸素 (mitochondrial reactive oxygen species: mtROS) は腫瘍形成に重要な役割を担うことが報告されている。また、がんの進行には鉄が関わるということが知られているが、ミトコンドリアは主たる鉄利用細胞内小器官であり、mtROSはこの鉄代謝にも関わっている。したがって、ミトコンドリア機能とがんの進行は密接に関係していると考えられる。さらに最近になって、鉄依存性細胞死形態であるフェロトーシスが提唱され、フェロトーシスと抗がん薬に対する感受性との関連が報告されるなど、ミトコンドリアはがん治療のターゲットとして注目されている。一方、チゲサイクリンなどの一部の抗菌薬はミトコンドリア動態に影響を与え、抗がん作用を示すことが報告されている。しかし、歯科領域で使用頻度の高いアモキシシリン (Amoxicillin: AMPC) についての報告はほとんど見受けられず、ミトコンドリア動態にどのような影響を与えるかについても未だ不明な点が多い。AMPCは細菌の細胞壁に作用する抗菌薬であり、真核生物の細胞にはほとんど影響しないと考えられてきた。ところが近年、ペプチドトランスポーターである PEPT1 および PEPT2 がヒト細胞で AMPC の細胞内取り込みに関与し、ミトコンドリア膜にも存在することが報告され、ヒト細胞にも影響が出る可能性が示されている。そこで本研究では、AMPCはミトコンドリア動態に影響を与え、ミトコンドリア標的のがん治療に対する感受性を高める可能性があるかと仮定し、この仮説を検証するため、mtROS 増大により抗がん作用を示すシスプラチンを用いて、AMPCがミトコンドリア動態に与える影響、抗がん薬に対するがん細胞の感受性を高める能力、およびがん治療に応用できる可能性について解明することを目的とした。

【材料および方法】

① 細胞培養、使用薬物

細胞は、SAS (口腔扁平上皮がん由来細胞株) および HeLa (子宮頸がん由来細胞株) と、正常細胞である VA-13 (胎児肺由来細胞) と HPLF (ヒト歯根膜由来細胞) を使用した。HPLF は 10% 非働化ウシ胎仔血清を加えた RPMI 1640、その他の細胞は 5% のウシ胎仔血清を加えた RPMI 1640 で培養された。抗菌薬は AMPC に加え、アンピシリン (Ampicillin: ABPC)、カナマイシン (Kanamycin: KN) についても検討した。細胞それぞれに AMPC を 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、ABPC と KN は 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で処理した。シスプラ

チンおよびドセタキセルはその 30 分後に作用させた。また、フェナントロリン (Phenanthroline: Phe) は AMPC と同時に 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で作用させた。

② mtROS、ミトコンドリア膜電位 (ϕm)、 Fe^{2+} 量の測定

mtROS 産生量は mito-SOX、 ϕm は JC-10、細胞内およびミトコンドリア内 Fe^{2+} 量は Mito-FerroGreen で検出して BZ-8000 で蛍光画像を取得し、ImageJ を使用して蛍光強度を測定した。

③ 細胞生存率

96 ウェルプレートに各細胞を 5000 個ずつ播種し 24 時間培養した。その後抗菌薬を作用させて 2 時間培養したあと、抗がん剤を処理しさらに 48 時間培養した。その後、Cell Counting Kit-8 (CCK-8) を添加し、マイクロプレートリーダーにて各ウェルの吸光度を計測し細胞生存率を調べた。

④ 定量 PCR

ISOGEN を用いて各細胞から RNA を抽出して、PEPT 1 および PEPT2 の発現量を測定した。内在性コントロールとして β アクチンを用いた。

【結果】

- ・ 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の AMPC 処理により、HeLa および SAS の mtROS 産生量が有意に上昇したが、正常細胞では変化がみられなかった。また、KN および ABPC 処理では mtROS 量に変化はみられなかった。

- ・ 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の AMPC 処理により、HeLa および SAS の ϕm は有意に上昇し、ミトコンドリア内 Fe^{2+} 量は有意に低下した。この効果は正常細胞では見られなかった。

- ・ シスプラチンと AMPC を併用したとき、コントロール群と比較して HeLa では 1 μM 、SAS では 0.1 μM および 1.0 μM の濃度で細胞生存率が有意に低下した。ドセタキセルでは AMPC の併用の効果はみられなかった。

- ・ シスプラチンと AMPC 処理前に Phe を作用させると、AMPC によるがん細胞の生存率低下がみられなくなった。

- ・ PEPT1 および PEPT2 の発現量は、正常細胞と比較しがん細胞で有意に上昇していた。

【結論および考察】

本研究により、AMPC がシスプラチンの抗がん効果を増強することが示され、正常細胞に影響を与えないことがわかった。したがって AMPC を抗がん剤と併用することによって特定のがん治療効果を高めることができ、抗がん剤使用量を減少させ、副作用を軽減できる可能性がある。AMPC と ABPC は化学的に構造が類似しているにもかかわらず AMPC のみに効果がみられたのは、水溶性の違いや PEPT2 への結合親和性の違いによるものと考えられる。したがって、より高濃度の ABPC 処理を行うことで同様の効果が得られる可能性がある。Phe 処理により AMPC とシスプラチンの相乗効果がみられなくなったことから、これらの併用によりフェロトシスが起きていると考えられ、フェロトシス誘導薬の併用によりさらなる抗がん効果が得られる可能性が示唆された。ミトコンドリア動態に影響を与える抗菌薬としては、AMPC 以外にアジスロマイシンとクリンダマイシンが知られており、ドキシソルビシンは ROS を生成して抗癌効果を発揮する抗菌薬である。これらの抗菌薬とシスプラチンとの併用効果が見られるかどうか、また AMPC とドキシソルビシンの併用効果が得られるか、さらには HeLa や SAS 以外の他の組織由来のがん細胞にも効果がみられるのかを検討していき、最終的には臨床応用ができるよう今後さらに研究を進めていきたい。

