

TRAIL/ジアリルスルフィドによるメラノーマ治療の基礎的研究

鈴木良弘¹⁾, 村井真由美^{1,2)}, 西田 滋³⁾, 鈴木(唐崎)美喜²⁾, 羅 智靖¹⁾, 落合豊子²⁾

TRAIL/diallyltrisulfide-induced apoptosis in human melanoma cells

Yoshihiro SUZUKI¹⁾, Mayumi MURAI^{1,2)}, Shigeru NISHIDA³⁾,
Miki SUZUKI-KARASAKI²⁾, Chisei RA¹⁾, Toyoko OCHIAI²⁾

要旨

Tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) は、TNF サイトカインスーパーファミリーのひとつで、ガン細胞にアポトーシスを誘導するが、非形質転換細胞にはほとんど毒性を示さないことから腫瘍選択的抗ガン剤として期待されている。しかしながら、悪性黒色腫(メラノーマ)は、TRAIL に対しても抵抗性を示し、また TRAIL 感受性細胞も治療の過程で抵抗性を獲得する。したがって、悪性メラノーマの TRAIL による有効な治療には、この抵抗性を解除するような薬剤の併用が必要で、その分子標的の探索と薬剤の開発が早急に求められている。著者らはニンニク成分のひとつである有機イオウ化合物ジアリルスルフィド(DATS)がヒト悪性メラノーマ細胞の TRAIL 感受性を著しく増強し、その作用には小胞体を介したアポトーシス増幅経路が重要な役割を果たすことを明らかにした。本研究の成果は、DATS の併用による悪性メラノーマに対する新たな TRAIL 治療法の開発につながることを期待される。

1. はじめに

悪性黒色腫(メラノーマ)は進展すると通常の化学、放射線、および免疫療法に非常に抵抗性であり、極めて予後が悪い。Tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) は、TNF サイトカインスーパーファミリーのひとつで、ガン細胞にアポトーシスを誘導するが、非形質転換細胞にはほとんど毒性を示さないことから腫瘍選択的抗ガン剤として期待されている。

TRAIL は、death receptor (DR) 4/TRAIL receptor (TRAIL-R) 1, DR5/TRAIL-R2, TRAIL-R3, および TRAIL-R4 に結合する^{1,2)}。DR4 および DR5 は、活性化されてアポトーシスを誘導するのに不可欠な death domain を細胞内に有するが、TRAIL-R3 および TRAIL-R4 はそれらが完全にまたは一部欠如しているために TRAIL とは結合するが、アポトーシスを誘導できない³⁾。TRAIL は、extrinsic pathway および intrin-

sic pathway を活性化してアポトーシスを誘導する^{1,3)}。しかしながら、悪性メラノーマは、TRAIL に対しても抵抗性を示し、また TRAIL 感受性細胞も治療の過程で抵抗性を獲得する。したがって、悪性メラノーマの TRAIL による有効な治療には、この抵抗性を解除するような薬剤の併用が必要で、その分子標的の探索と薬剤の開発が早急に求められている。

ジアリルスルフィド(DATS)は、ニンニクの臭気成分のひとつである有機イオウ化合物であり、グリア芽細胞腫、前立腺ガンおよび大腸ガン細胞にアポトーシスを誘導することが報告されている^{4,7)}。しかしながら DATS の TRAIL 抵抗性メラノーマ細胞に対する生物活性はほとんど知られていない。本研究では DATS 単独または TRAIL 併用のヒトメラノーマ細胞株に対する抗腫瘍効果を調べた。

1) 日本大学医学部生体機能医学系分子細胞免疫・アレルギー学分野

2) 日本大学付属駿河台病院皮膚科学分野

3) 日本大学医学部一般教育化学分野

鈴木良弘: suzuki.yoshihiro@nihon-u.ac.jp

2. 材料と方法

ヒトメラノーマ細胞株および正常ヒトメラノサイトの培養, 細胞死の評価, Caspase-3/7/12活性化, ミトコンドリア膜電位測定, ウェスタンブロッティング, および統計処理はすべて既報⁹⁾ のようにおこなった。

3. 結果

TRAILによるヒトメラノーマ細胞の細胞死を calcein-AM/EthD-1 染色を用いて測定したところ, TRAILおよびDATSは単独ではA375 (図1A), A2058細胞 (図1B) に細胞死をほとんど誘導しなかったが, 併用すると顕著な細胞死が観察された。一方,

正常ヒトメラノサイトではTRAILとDATSは単独でも併用でもほとんど影響を与えなかった (図1C)。同様の結果がannexin V/ PI二重染色法によるアポトーシス測定でも得られた (図1D)。DR5の特異的アゴニストモノクローナル抗体は単独で, 濃度依存的にアポトーシスを誘導するが, 抗DR4抗体は単独ではアポトーシスをほとんど誘導しなかった。DATSを併用すると, 抗DR5抗体, 抗DR4抗体のいずれでも相乗的にアポトーシスが增強された⁹⁾。DATSによるTRAILの細胞死の增強効果は, カスパーゼ活性全体の阻害剤であるz-VAD-fmkによりほぼ完全に抑制され, caspase-8選択的阻害剤 (z-IETD-fmk), ならびにcaspase-9選択的阻害剤 (z-LEHD-

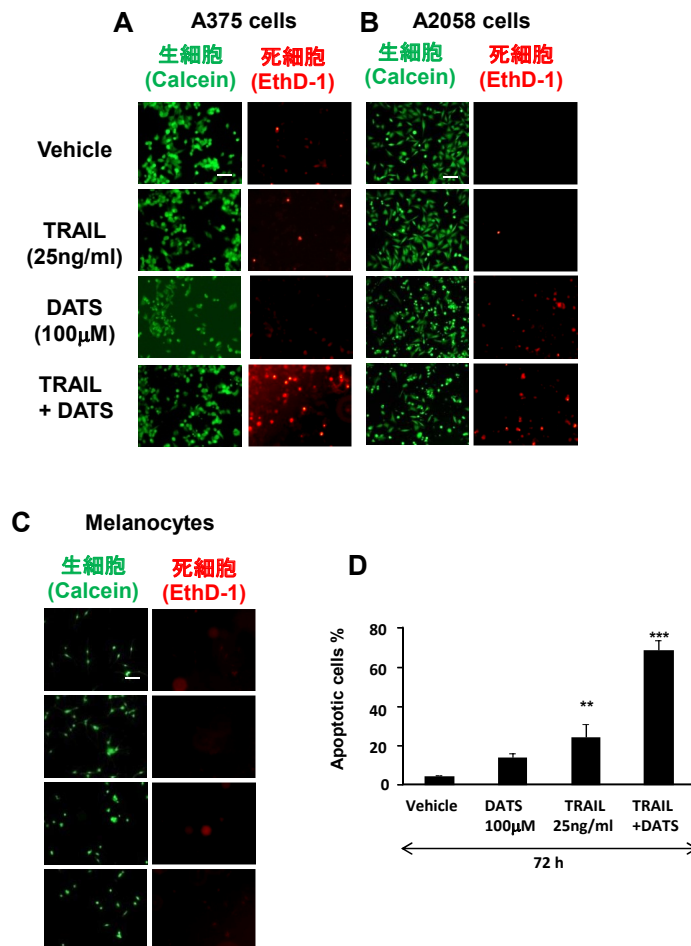


図1 (A-C) A375細胞 (A), A2058細胞 (B), 正常ヒトメラノサイト (C) を8穴チャンバースライドにまき, 25 ng/ml TRAILおよび100 μM DATS単独, または両方で24時間インキュベートした。上清を除去後, 細胞をcalcein-AMとEthd-1で二重染色し, 蛍光顕微鏡で観察した。生細胞はcalcein-AMで緑色に, 死細胞はEthd-1で赤色にそれぞれ染色される。Scale bar = 100μm. (D) A375細胞を24孔プレートにまき (1 × 10⁵/well), 上記と同様に処理した。細胞をアネキシンV/PI二重染色後にFACSCaliburで測定し, CellQuestソフトウェアで解析した。アネキシンV陽性細胞をアポトーシス細胞とした。n=3-9, **p<0.01; ***p<0.001。

fmk) で強い抑制効果が見られた (最大75%) のに対して, caspase-3/7 選択的阻害剤 (z-DEVD-fmk) の抑制効果はそれより常に弱かった (最大50%)⁹⁾。ミトコンドリア経路の関与をさらに確認するために, TRAIL 処理後ミトコンドリア膜電位 ($\Delta\Psi_m$) と caspase-3/7 活性を測定した。TRAIL は $\Delta\Psi_m$ の低下と caspase-3/7 活性化を濃度依存的, 時間依存的に誘導した。しかし, TRAIL (25 ng/ml) 72 時間インキュベーションではアポトーシスはほとんど増加しなかった。TRAIL と DATS の併用で, アポトーシスと相関して, 強い $\Delta\Psi_m$ の低下と caspase-3/7 の活性化がみられた⁹⁾。さらに, 抗 DR4 抗体は単独では caspase-3/7 活性, $\Delta\Psi_m$ にほとんど影響を与えないが, 抗 DR5 抗体は濃度依存的に caspase-3/7 活性化と $\Delta\Psi_m$ の脱分極を増強した。DATS は単独では caspase-3/7 活性, $\Delta\Psi_m$ にほとんど影響を与えないが, TRAIL, 抗 DR4 抗体, 抗 DR5 抗体による caspase-3/7 活性化, および $\Delta\Psi_m$ の脱分極を増強した⁹⁾。さらに, caspase-3/7 の活性化をウェスタンブロッティング法で調べたところ, 24 時間インキュベーション後, TRAIL (100 ng/ml) ならびに抗 DR5 抗体は単独で caspase-3/7 のプロセッシングを誘導したのに対して, アポトーシスと相関して, DATS は単独では caspase-3/7 のプロセッシングを誘導しなかったが, TRAIL, 抗 DR5 抗体による caspase-3/7 のプロセッシングを増強した⁹⁾。DATS と TRAIL が小胞体ストレス反応である unfolded protein response (UPR) を引き起こすかどうかを知るために, その分子マーカー GRP78, XBP1 の発現を調べた。TRAIL, ならびに抗 DR5 抗体は XBP-1 の発現を誘導し, DATS との併用で, GRP78 の発現は減少し, XBP-1 の発現は増強された (図 2A)。一方, 抗 DR4 抗体は単独でも DATS との併用でもほとんど影響を示さなかった (図 2A)。また陽性コントロールのタプシガーギン (Tg) では GRP78 の発現は増強したが, XBP-1 発現には影響がみられなかった (図 2A)。また, 72 時間処理後の DATS と TRAIL によるアポトーシスは, caspase-12 選択的阻害剤 (z-ATAD-fmk) で強く抑制されたが, caspase-4 選択的阻害剤 (z-LEVD-fmk) ではほとんど抑制されなかった (図 2B)。caspase-12 酵素活性は, TRAIL 単独で濃度依存的, 時間依存的に増加し (図 3A), DATS との併用で増強がみられた (図 3B)。抗 DR5 抗体は濃度依

的に caspase-12 を活性化し, その作用は DATS 併用で増強された。抗 DR4 抗体は単独では caspase-12 を活性化しなかったが, DATS との併用で有意な活性化が観察されたが, メラノサイトでは TRAIL, DATS は単独でも併用でも caspase-12 の活性化を誘導しなかった (図 3B)。また, 24 時間処理後の caspase-12 のプロセッシングをウェスタンブロッティング法で調べると, TRAIL, 抗 DR5 抗体は単独で caspase-12 のプロセッシングを誘導し, その作用は DATS により増強されたが, 抗 DR4 抗体は単独でも DATS との併用でも caspase-12 のプロセッシングは弱かった⁹⁾。

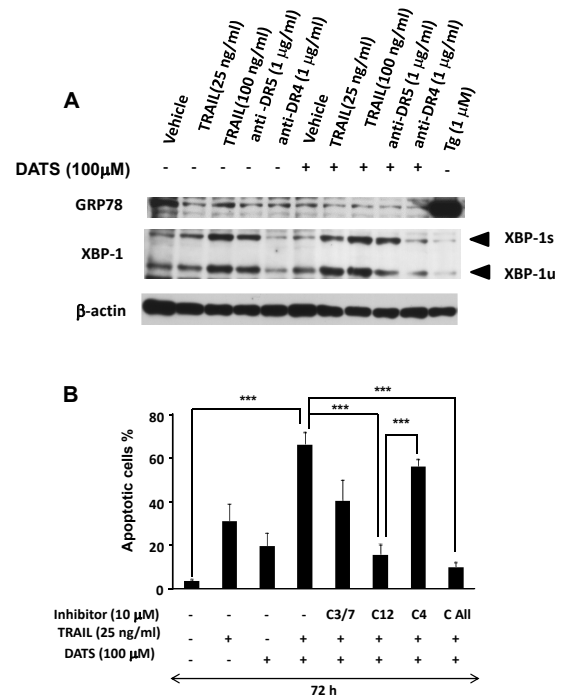


図 2 (A) A375 細胞を 6 穴プレートにまき (1×10^6 /well), 各濃度の TRAIL, 1 μg/ml 抗 DR5/DR4 抗体, および 100 μM DATS 単独, または両方で 37°C, 24 時間処理した。サンプルのタンパク質を還元条件下にて SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離後, PVDF 膜に転写した。PVDF 膜上の GRP78 または XBP-1 を特異抗体で検出した。また, 各サンプルのタンパク量が均一であることを確認するために, PVDF 膜を特異的抗 β-actin 抗体でリプローブした。(B) A375 細胞を 24 穴プレートにまき, 10 μM の各阻害薬 (z-DEVD-fmk; C3/7), z-ATAD-fmk (C12), z-LEVD-fmk (C4), または z-VAD-fmk (C All) 存在下で 25 ng/ml TRAIL, および 100 μM DATS 単独, または両方で, 37°C, 72 時間インキュベーションし, アネキシン V/PI で二重染色した。染色細胞は FACSCalibur で測定し, CellQuest ソフトウェアで解析した。アネキシン V-陽性細胞をアポトーシス細胞とした。n=3, ***p<0.001。

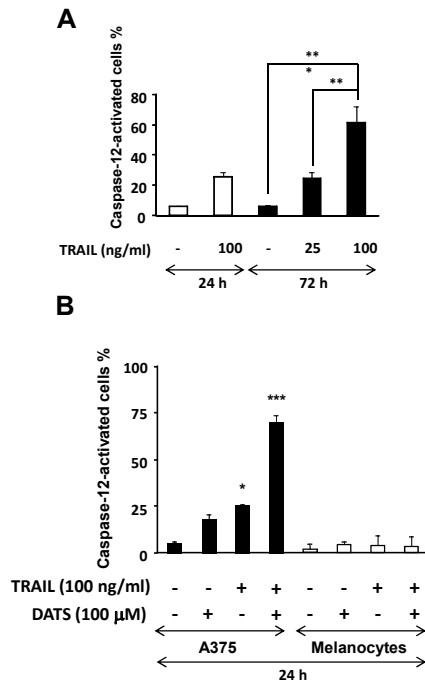


図3 (A) A375細胞を24穴プレートにまき、25または100 ng/ml TRAILで37℃、24または72時間インキュベーションした。Caspase-12活性化をCaspGLOW Fluorescein Caspase-12 Staining Kitを用いてFACSCaliburで測定し、CellQuestソフトウェアで解析した。n=3, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001。(B) D,E) A375細胞またはメラノサイトを24穴プレートにまき (2×10^5 /well), 100 ng/ml TRAILおよび100 μM DATS単独、または両方で、37℃、24時間インキュベーションした。Caspase-12活性化をCaspGLOW Fluorescein Caspase-12 Staining Kitを用いてFACSCaliburで測定し、CellQuestソフトウェアで解析した。n=3, *p<0.05, ***p<0.001。

4. 考察

本研究でわれわれは、DATSがヒトメラノーマ細胞のDRを介するアポトーシスを増強することを示した。TRAILは腫瘍細胞のみにアポトーシスを誘導し、正常細胞には影響しないが¹⁰⁾、DATSによるアポトーシスも腫瘍細胞選択的であることが報告されている¹¹⁾。これらの報告と一致して、正常ヒトメラノサイトでは、TRAIL、DATSは単独でも併用でも、ほとんど細胞死を誘導せず、メラノーマ細胞のみに選択的に作用することが示された。DATSなどのアリルポリスルフィド化合物がグリオブラストーマ、前立腺癌、大腸癌、乳癌^{4-7, 12)}など様々な種類の腫瘍細胞にアポトーシスを誘導することがこれまでに報告されている。これらの報告では、10–100 μM

のDATSは24時間以内で十分な細胞死を誘導し、50 μM程度で完全な細胞死を誘導する。これに対して、本研究で使用した全てのメラノーマ細胞では100 μM DATSで24時間処理しても弱いアポトーシス (<20%)しか観察されないことから、メラノーマはDATSに対しても抵抗性であることが示された。

DATSによる細胞死の誘導^{4,7)}や、前立腺癌におけるTRAIL誘導性細胞死のDATSによる増強効果¹³⁾にはintrinsic pathwayが重要であると考えられている。本研究で見出されたDATSのTRAILによるアポトーシス増強効果にもintrinsic pathwayが関与していたが、caspase-9やcaspase-3/7の選択的阻害剤がDATSによるTRAIL増幅作用を完全に抑制しなかったこと、ミトコンドリア膜電位の減少とcaspase-3/7活性化はアポトーシスと必ずしも相関しなかったことからこの経路だけでは十分ではないと考えられる。intrinsic pathwayによるアポトーシスの誘導は、従来の化学療法の主なメカニズムとして考えられている。メラノーマが化学療法ならびにTRAILに抵抗性である¹⁴⁻¹⁷⁾ことは、intrinsic pathwayを増強するだけでは、メラノーマには十分な細胞死を誘導できないという考えを支持する。メラノーマ細胞において強いアポトーシスを誘導するためには、他のカスパーゼ依存性経路が重要な役割を果たすことが示唆された。そこで、extrinsic pathwayやintrinsic pathwayとは別のアポトーシス経路に着目した。ブドウ糖の欠乏、低酸素、小胞体内の変性タンパク質の蓄積、カルシウムホメオスタシスの乱れ、過剰な活性酸素産生などによる小胞体のストレスは、IREα, ATF6, Perkなどのストレスセンサー分子によって感知され、タンパク質合成の低下、タンパク質分解の促進、GRP78/Bipなどのシャペロンタンパク質の増加などのストレス適応反応UPRが誘導されて恒常性を保とうとする。しかし、小胞体ストレスがUPRによる適応機能を超えると、アポトーシスが誘導される^{18,19)}。XBP-1はDR5発現をアップレギュレーションさせ、アポトーシスを増強させることが報告されている²⁰⁾が、本研究でメラノーマ細胞においてTRAILがXBP-1を活性化し、DATSがこれを増強することが初めて明らかとなった。さらに、小胞体を介するアポトーシス経路で重要な役割を果たすcaspase-12²¹⁻²³⁾の関与が示された。以上から、DATSは、従来のミトコンドリア経路だけでなく、

小胞体ストレスによって誘導されるアポトーシス経路を活性化してTRAILの効果を増強することが示唆された。

5. 結語

本研究ではTRAILによるヒトメラノーマ細胞のアポトーシスをDATSが増強し、この増強効果には小胞体を介した新たなアポトーシス増幅経路が重要であることを明らかにした。今後、DATSの併用による悪性メラノーマに対する新たなTRAIL治療法の開発につながる事が期待される。

文献

- 1) Yerbes R, Palacios C, Lopez-Rivas A. The therapeutic potential of TRAIL receptor signaling in cancer cells. *Clin Transl Oncol* 2011; **13**: 839-847.
- 2) Wang S. The promise of cancer therapeutics targeting the TNF-related apoptosis-inducing ligand and TRAIL receptor pathway. *Oncogene* 2008; **27**: 6207-6215.
- 3) LeBlanc, HN, Ashkenazi A. Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors. *Cell Death Differ* 2003; **10**: 66-75.
- 4) Das A, Banik NL, Ray SK. Garlic compounds generate reactive oxygen species leading to activation of stress kinases and cysteine proteases for apoptosis in human glioblastoma T98G and U87MG cells. *Cancer* 2007; **110**: 1083-1095.
- 5) Kim YA, Xiao D, Xiao H et al. Mitochondria-mediated apoptosis by diallyl trisulfide in human prostate cancer cells is associated with generation of reactive oxygen species and regulated by Bax/Bak. *Mol Cancer Ther* 2007; **6**: 1599-1609.
- 6) Xiao D, Choi S, Johnson DE et al. Diallyl trisulfide-induced apoptosis in human prostate cancer cells involves c-Jun N-terminal kinase and extracellular-signal regulated kinase-mediated phosphorylation of Bcl-2. *Oncogene* 2004; **22**: 5594-5606.
- 7) Busch C, Jacob C, Anwar A et al. Diallylpolysulfides induce growth arrest and apoptosis. *Int J Oncol* 2010; **36**: 743-749.
- 8) Suzuki Y, Inoue T, Murai M et al. Depolarization potentiates TRAIL-induced apoptosis in human melanoma cells: Role for ATP-sensitive K⁺ channels and endoplasmic reticulum stress. *Int J Oncol* 2012; **41**: 465-475.
- 9) Murai M, Inoue T, Suzuki-Karasaki M et al. Diallyl trisulfide sensitizes human melanoma cells to TRAIL-induced cell death by promoting endoplasmic reticulum-mediated apoptosis. *Int J Oncol* 2012; **41**: 2029-2037.
- 10) Ashkenazi A, Pai R, Fong S et al. Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Invest* 1999; **104**: 155-162.
- 11) Powlony AA, Singh SV. Multitargeted prevention and therapy of cancer by diallyl trisulfide and related Allium vegetable-derived organosulfur compounds. *Cancer Lett* 2008; **269**: 305-314.
- 12) Lee BC, Park BH, Kim SY et al. Role of Bim in diallyl trisulfide-induced cytotoxicity in human cancer cells. *J Cell Biochem* 2011; **112**: 118-127.
- 13) Shankar S, Chen Q, Ganapathy S et al. Diallyl trisulfide increases the effectiveness of TRAIL and inhibits prostate cancer growth in an orthotopic model: molecular mechanisms. *Mol Cancer Ther* 2008; **7**: 2328-2338.
- 14) Balch CM, Buzzaid AC, Soong SJ et al. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 2001; **19**: 3635-3648.
- 15) Dimberg LY, Anderson CK, Camidge R et al. On the TRAIL to successful cancer therapy? Predicting and counteracting resistance against TRAIL-based therapeutics. *Oncogene* 2012; **14**: 1-10.
- 16) Dyer MJ, MacFarlane M, Cohen GM. Barriers to effective TRAIL-targeted therapy of malignancy. *J Clin Oncol* 2007; **25**: 4505-4506.
- 17) Hersey P, Zhang XD. How melanoma cells evade trail-induced apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2001; **12**: 4-6.
- 18) Breckenridge DG, Germain M, Mathai JP et al. Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene* 2003; **22**: 8608-8618.
- 19) Boyce M, Yuan J. Cellular response to endoplasmic reticulum stress: a matter of life or death. *Cell Death Differ* 2006; **13**: 363-373.
- 20) Liu H, Jiang CC, Lavis CJ et al. 2-Deoxy-D-glucose enhances TRAIL-induced apoptosis in human melanoma cells through XBP-1-mediated up-regulation of TRAIL-R2. *Mol Cancer* 2009; **8**: 122.
- 21) Hitomi J, Katayama T, Eguchi, Y et al. Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and a beta-induced cell death. *J Cell Biol* 2004; **165**: 347-356.
- 22) Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H et al. An endoplasmic reticulum stress-specific Caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of Caspase-9 by Caspase-12. *J Biol Chem* 2002; **277**: 34287-34294.
- 23) Nakagawa T, Zhu H, Morishima N et al. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 2000; **403**: 98-103.