

薬剤高感受性 PC12 変異細胞内を用いた 抗がん剤作用機序の解析

加納良男 平上二九三* 元田弘敏* 井上茂樹** 友國由美子 河村顕治*

The role of antitumor reagents in drug-hypersensitive PC12 mutant cells

Yoshio KANO, Fukimi HIRAGAMI*, Hirotoshi MOTODA*,
Shigeki INOUE**, Yumiko TOMOKUNI, Kenji KAWAMURA*

要 約

プロポリスの成分の1つであるアルテピリンCは、ヒトのがん細胞に対してアポトーシスを引き起こすことによって抗癌剤として作用することが報告されている。我々は細胞のアポトーシスと分化に働くアルテピリンCの作用をPC12m3変異細胞を用いて調べた。PC12m3細胞にアルテピリンCを20 μ M作用させたところ、アルテピリンCはアポトーシスを起こさないで神経分化を誘導することが観察された。アルテピリンCによるPC12m3細胞の神経分化は、ERKの特異的阻害剤であるU0126とp38 MAPKの特異的阻害剤であるSB203580によって阻害された。興味のあることにはPC12m3細胞では、U0126によってERKの働きを阻害するとアルテピリンCによるp38 MAPKのリン酸化が阻止された。これらの見解からPC12m3細胞では、アルテピリンCはERK経路を介してp38 MAPK経路を活性化することで神経分化を誘導するということが示唆された。

キーワード：PC12m3細胞、アルテピリンC、p38 MAPキナーゼ、ERK

Key words：PC12m3 cell, Artepillin C, p38 MAP kinase, ERK

はじめに

プロポリスはミツバチが特定の樹木から集めた樹液にミツバチ自体の分泌物を調合したものである。プロポリスには200種類以上の化合物が含まれており、主なものとしてはフラボノイド類やポリフェノールそれにカフェ酸である¹⁾。カフェ酸は神経細胞死を抑制し、脳の損傷形成を予防する効果があることが報告されている^{2, 3, 4)}。アルテピリンCは、プロポリスから抽出されたポリフェノールの1種であり、その分子量は300.40である。アルテピリンCは抗菌作用の他にヒトのがん細胞にアポトーシスを誘導することによって抗がん剤としても作用する

ことが示されている^{5, 6)}。今回我々は、アルテピリンCの抗がん作用のメカニズムを調べるためにPC12細胞を用いて分析を試みた。

PC12細胞は1975年にアメリカのグリーンによってラット副腎髄質褐色細胞腫から単離された細胞であり、神経成長因子であるNGFの投与によってMAPキナーゼが活性化し、神経細胞に分化する⁷⁾。我々はこのPC12細胞から異なった形質を示す新しいPC12変異細胞であるPC12m3細胞を樹立した⁸⁾。このPC12m3細胞はNGF刺激によって正常な持続したMAPキナーゼ活性を示すにもかかわらず神経突起の形成がわずかにしか起こらない。しかし、

吉備国際大学保健科学部作業療法学科
〒716-8508 岡山県高梁市伊賀町8
*吉備国際大学保健科学部理学療法学科
〒716-8508 岡山県高梁市伊賀町8
**吉備国際大学保健福祉研究所
〒716-8508 岡山県高梁市伊賀町8

Department of Occupational Therapy, School of Health Science, KIBI International University
8, Iga-machi, Takahashi-City, Okayama, 716-8508, Japan

* Department of Physical Therapy, School of Health Science, KIBI International University
8, Iga-machi, Takahashi-City, Okayama, 716-8508, Japan

** Department of Cell Biology, Research Institute of Health and Welfare, KIBI International University
8, Iga-machi, Takahashi-City, Okayama, 716-8508, Japan

PC12m3 細胞に NGF と同時にカルシウムイオノホア⁸⁾ や免疫抑制剤 FK506⁹⁾ などの薬剤を投与するか、あるいは熱ショック¹⁰⁾、高浸透圧¹¹⁾ および電磁波刺激¹²⁾ を与えると高い神経突起の形成が見られた。

今回我々は、抗癌剤として作用することが報告されているアルテピリン C を PC12m3 変異細胞に作用させたところ、アルテピリン C はアポトーシスを起こさないで神経分化を誘導することが観察された。そこで本研究ではアルテピリン C の作用の分子メカニズムの解析を試みた。

方 法

1. 細胞と培養

実験に使用した PC12 細胞は、グリーンらによってラット副腎髄質褐色細胞腫から単離された神経分化能を有する細胞である⁷⁾。この細胞は、米国 Rockville, ME の American type culture collection より購入した。

細胞は、10% ウマ血清と 5% 牛胎児血清それに 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のカナマイシンを含む高グルコース型 DME 培地を用いて継代し維持した。細胞の培養は、炭酸ガス培養器を用い、5% CO_2 で 37℃ で行い、培地交換は 3 日おきに行った。継代は、細胞が培養シャーレ一杯になるとピペッティングし、1~3 $\times 10^4$ cells/cm² で新しいシャーレに蒔きなおすという

方法により行った。細胞は常時マイコプラズマ感染の有無を Hoechst 33258 で染色して調べ、感染のないことを確認して実験を行った。

2. 細胞へのアルテピリン C の投与

アルテピリン C は水に溶解しニトロセルロースフィルター（ポアサイズ 2 μm ）で濾過することによって作製したものである。アルテピリン C 処理を施した細胞は 7 日間培養後神経突起形成を測定した⁹⁾。

3. p38 MAP キナーゼと ERK の検出

活性化した p38 MAP キナーゼと ERK の検出は免疫ブロット方によって行った¹³⁾。方法は、PC12m3 の細胞 100 万個を 25 cm² のフラスコに蒔き、5 日間培養後無血清下で高浸透圧処理または熱処理を行い酵素活性の計測を行った。測定は細胞から全蛋白質を抽出し 10% ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分画後ポリビニールメンブレンにブロットした。ブロットした蛋白質はホスホ p38 抗体またはホスホ ERK 抗体を作用させてリン酸化した p38 MAP キナーゼと活性化した ERK の検出を行った。

結 果

1. アルテピリン C による神経突起の形成

PC12m3 の細胞 100 万個を 25 cm² のフラスコに蒔き、

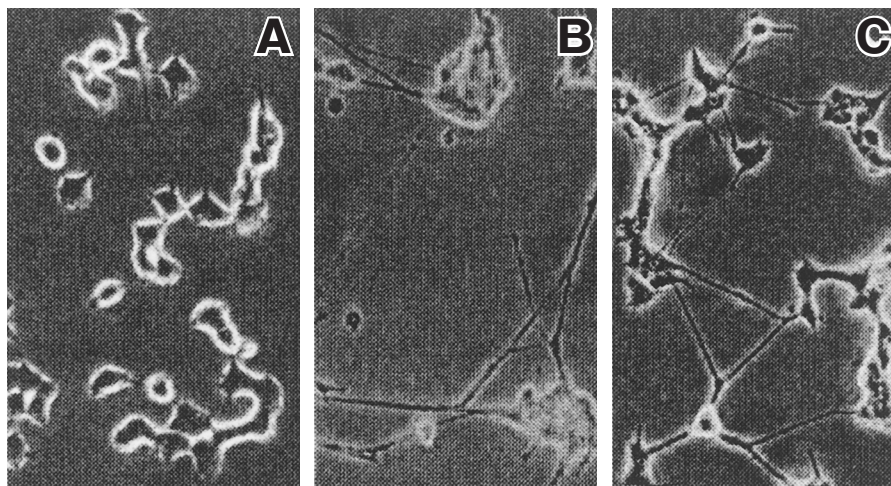


図 1 アルテピリン C による神経突起形成

神経突起形成変異細胞である PC12m3 細胞に NGF 1 μl を添加したもの (A)、NGF 1 μl とプロボリスを 0.5 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 作用させてもの (B)、NGF 1 μl とアルテピリン C を 20 μM 作用させてもの (C) を 1 週間培養し位相差顕微鏡で写真撮影を行った ($\times 200$)。

精製された NGF 1 μl とプロポリス (0.5 $\mu\text{l}/\text{ml}$) あるいはアルテピリン C を 20 μM 作用させて 1 週間培養したところ、PC12m32 細胞において、NGF のみを与えた対象に比べ非常に高い神経突起の形成

(神経分化) が観察された (図 1)。PC12m3 細胞におけるアルテピリン C による神経突起の形成は NGF を与えた PC12 親細胞には及ばないが非常に高い誘導率であった (図 2)。またアルテピリン C による神経突起形成は p38 MAP キナーゼ阻害剤である SB203580 と ERK 特異的阻害剤である U0126 によって大きく抑制された¹⁴⁾。

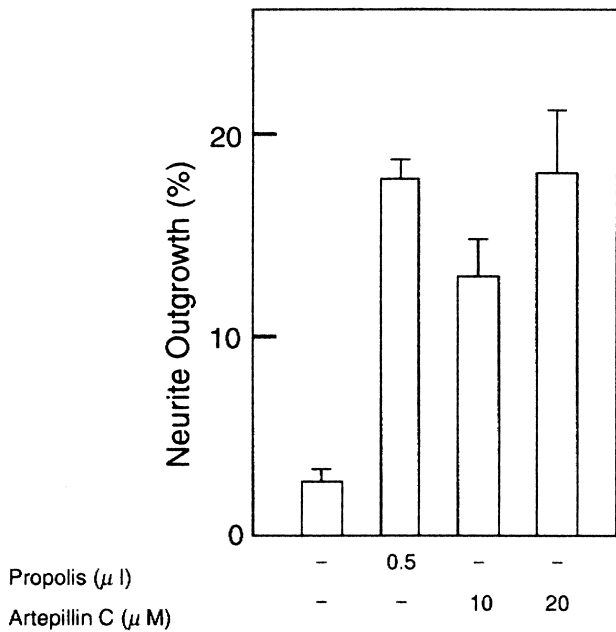


図 2 アルテピリン C による神経突起形成率

神経突起形成変異細胞である PC12m3 細胞に NGF 1 μl とプロポリスあるいはアルテピリン C を添加し 1 週間培養後、位相差顕微鏡で写真撮影を行い、おのおの 200 個の細胞について神経突起数を計測した。

2. アルテピリン C による ERK と p38 MAPK の活性化

NGF による ERK の活性化は PC12 細胞の神経分化に重要な役割をもっているが p38 MAP キナーゼはどうか。

PC12m3 の細胞 100 万個を 25 cm^2 のフラスコに蒔き、5 日間培養後無血清下でアルテピリン C 20 μM を 30 分作用させたところアルテピリン C によって高い p38 MAP キナーゼの活性が見られた (図 3)。神経突起形成変異細胞である PC12m3 細胞のアルテピリン C による p38 MAPK の活性は、ERK の特異的阻害剤である U0126 を 15 μM 添加することによって完全に失われた (図 3)。この結果は、アルテピリン C による PC12m3 細胞の神経分化は ERK 経路を介した p38 MAPK の活性化によって引き起こされることを示唆している (図 4)。

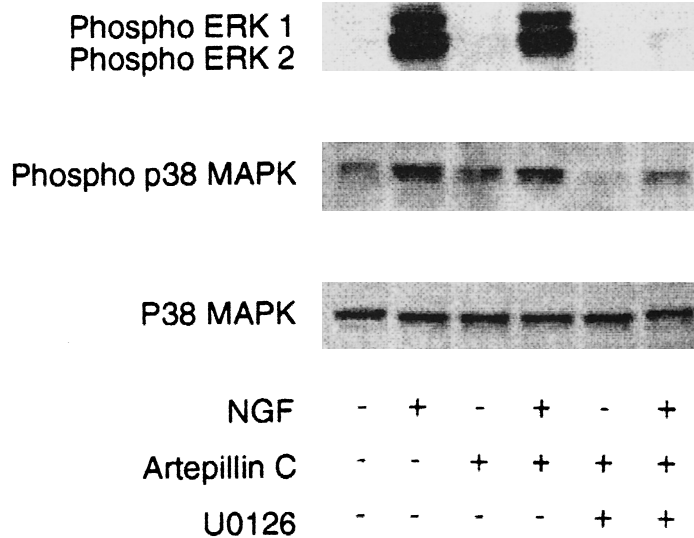


図 3 アルテピリン C による ERK と p38 MAPK の活性化

神経突起形成変異細胞である PC12m3 細胞に無血清下で NGF (30 ng/ml) あるいはアルテピリン C (20 μM) 処理を 30 分行い、免疫ブロット法により ERK と p38 MAPK の検出を行った。

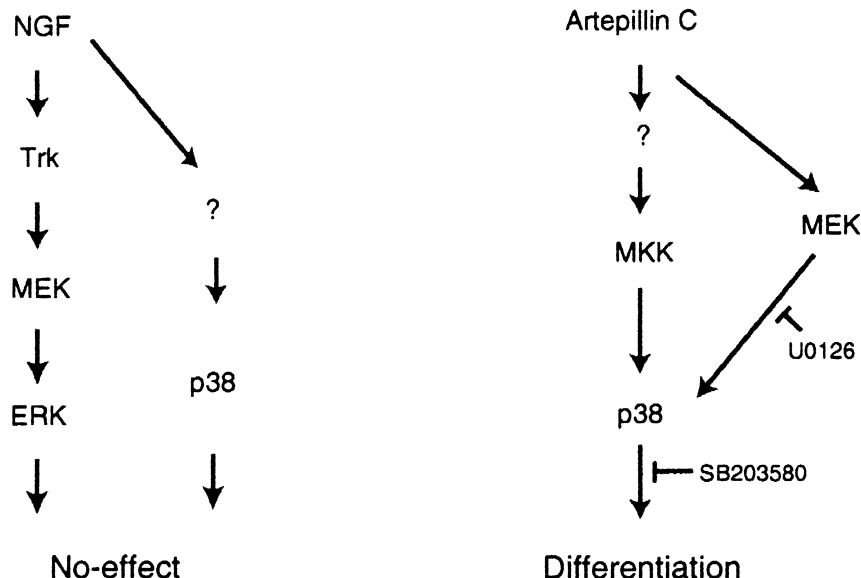


図4 アルテピリン C の神経分化誘導に働く細胞内シグナル伝達経路

神経突起形成変異細胞である PC12m3 細胞の p38 MAPK 経路は PC12 親細胞の神経分化に働く ERK 経路とは異なった新規の経路である。PC12m3 細胞では NGF による ERK の活性は神経分化に働かないが、アルテピリン C による ERK 経路を介した p38 MAPK の活性が神経分化に働く。

討 論

アルテピリン C は大腸菌など多くの種類の細菌に対して強い毒性を示す。またいくつかの研究によると、アルテピリン C は抗菌作用のみならず、いろいろながん細胞に対しても強い毒性を示すことが解った。木元らはアルテピリン C が DNA 合成を阻害してがん細胞にアポトーシスを引き起こすことを発見した⁵⁾。アルテピリン C はマウスやヒトのがん細胞に対して 66 μ M で 50% の DNA 合成阻害を示し、300 μ M では 100% の DNA 合成阻害とアポトーシスを誘導する。我々は PC12m3 細胞にアルテピリン C を 20 μ M 作用させたところ、アルテピリン C はアポトーシスを起こさずに神経分化を誘導することを観察した。しかし PC12m3 細胞にアルテピリン C を 100 μ M 作用させるとアポトーシスが誘導される。今回はアルテピリン C による神経分化誘導の作用機序を解明するために細胞内シグナル伝達系について分析を試みた。

細胞内シグナル伝達系は、ほ乳類の細胞において主として 3 種類の MAP キナーゼ経路が働いている。1 つ目は、細胞外シグナル伝達調節リン酸化酵素 (ERK) を活性化する経路であり、2 つ目は、Jun

転写因子リン酸化酵素 (JNK) を活性化する経路であり、3 つ目が p38 MAP キナーゼ (p38 MAPK) を活性化する経路である^{15, 16)}。その内 ERK 経路は主に成長因子によって活性化されるのに比べ、JNK と p38 MAPK 経路は炎症性サイトカインやストレスによって活性化される。

ERK はその働きは解明されているが、JNK と p38 MAPK はその機能は不明な点が多かった。しかし遺伝的解析の結果、JNK は主としてアポトーシスに働くことが解ってきた。また p38 MAPK はアポトーシスに働くという報告と細胞分化に働くという報告がありまだ研究段階にある。アルテピリン C による PC12m3 細胞の神経分化は、ERK の特異的阻害剤である U0126 と p38 MAPK 特異的阻害剤である SB203580 によって阻害された。興味のあることには PC12m3 細胞では、U0126 によって ERK の働きを阻害するとアルテピリン C による p38 MAPK のリン酸化が阻止された。しかし、アルテピリン C 自体は PC12m3 細胞の ERK を活性化しないが p38 MAPK を活性化し、アルテピリン C による p38 MAPK の活性は PC12m3 細胞の神経分化には必須である。

これらの見解から PC12m3 細胞では、アルテピリン C は ERK 経路を介して p38 MAPK 経路を活性化するという全く新しいシグナル伝達経路を使って神経分化を誘導するということが判明した (図 4)。アルテピリン C による神経分化はがん細胞の増殖抑制に働くことで抗がん剤として作用すると考えられ、またアルテピリン C によるアポトーシスの誘導はがん細胞を破壊することによって抗がん剤として働くがアポトーシス誘導の作用メカニズムの解明は今後の課題である。

Abstract

It has been reported that artemillin C, a component of propolis, exhibits antitumor activity by induction of apoptosis in human tumor cell lines. We examined the effects of artemillin C on apoptosis and differentiation of cells using this PC12m3 mutant cell line. When cultures of PC12m3 cells were treated with artemillin C at a concentration of 20 μ M, neuronal differentiation of PC12m3 cells was observed without induction of apoptosis. Artemillin C induced-neuronal differentiation of PC12m3 cells was inhibited by the ERK inhibitor U0126 and by the p38 MAPK inhibitor SB203580. Interestingly, inhibition of ERK by U0126 completely prevented artemillin C induced-p38 MAPK phosphorylation of PC12m3 cells. These findings suggest that artemillin C-induced activation of p38 MAPK through the ERK signaling pathway is responsible for the neurite outgrowth of PC12m3 cells.

文 献

1. Shimazawa M, Chikamatsu S, Morimoto N et al (2005) Neuroprotection by Brazilian green propolis against in vitro and in vivo ischemic neuronal damage. *eCAM* 2 : 201-207
2. Amodio R, De Ruvo C, Di Matteo V et al (2003) Caffeic acid phenethyl ester blocks apoptosis by low potassium in cerebellar granule cells. *Int J Dev Neurosci* 21 : 379-389
3. Wei X, Zhao L, Ma Z et al (2004) Caffeic acid phenethyl ester prevents neonatal hypoxic- ischaemic brain injury. *Brain* 127 : 2629-2635
4. Ilhan A, Iraz M, Gurel A et al (2004) Caffeic acid phenethyl ester exerts a neuroprotective effect on CNS against pentylenetetrazol-induced seizures in mice. *Neurochem Res* 29 : 2287-2292
5. Kimoto T, Koya-Miyata S, Hino K et al (2001) Pulmonary carcinogenesis induced by ferric nitrilotriacetate in mice and protection from it by Brazilian propolis and artemillin C. *Virchows Arch* 438 : 259-270
6. Matsuno T, Jung S-K, Matsumoto Y et al (1997) Preferential cytotoxicity to tumor cells of 3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid (Artemillin C) isolated from propolis. *Anticancer Res* 17 : 3565-3568
7. Greene L A, Tischler A S (1976) Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 73 : 2424-2428
8. Kano Y, Nohno T, Takahashi R et al (2001) cAMP and calcium ionophore induce outgrowth of neuronal processes in PC12 mutant cells in which nerve growth factor (NGF)-induced outgrowth of neuronal processes is impaired. *Neurosci Lett* 303 : 21-24
9. Kano Y, Nohno T, Hasegawa T et al (2002) Immunosuppressant FK506 induce neurite outgrowth in PC12 mutant cells with impaired NGF-promoted neuritogenesis via a novel MAP kinase signaling pathway. *Neurochem Res* 27 : 1655-1661
10. Kano Y, Nakagiri S, Nohno T et al (2004) Heat shock induces neurite outgrowth in PC12m3 cells via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Brain Res* 1026 : 302-306
11. Kano Y, Nohno T, Shimada K et al (2007) Osmotic shock-induced neurite extension via activation of p38 mitogen-activated protein kinase and CREB.

- Brain Res 1154 : 1-7
12. Inoue S, Motoda H, Koike Y et al (2007) Microwave irradiation induces neurite outgrowth in PC12m3 cells via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway Neurosci Lett 303 : 21-24
 13. Sakai T, Furuyama T, Ohoka Y (1999) Mouse semaphoring H induces PC12 cell neurite outgrowth activating ras-mitogen-activated protein kinase signaling pathway via Ca^{2+} influx. J Biol Chem 274 : 29666-29671
 14. Kano Y, Horie N, Doi S et al (2008) Artepillin C derived from propolis induces neurite outgrowth in PC12m3 cells via ERK and p38 MAPK pathways. Neurochem Res. 33 : 1795-1803
 15. Zhu X, Rottkamp CA, Hartzler A et al (2001) Activation of MKK6, an upstream activator of p38, in Alzheimer's disease. J Neurochem 79 : 311-318
 16. Huang C, Borchers CH, Schaller MD et al (2004) Phosphorylation of paxillin by p38 MAPK is involved in the neurite extension of PC-12 cells. J Cell Biol 164 : 593-602