

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：24402

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06550

研究課題名(和文)オートファジーとアポトーシスのクロストーク機構に着目した癌治療法の開発

研究課題名(英文) Crosstalk mechanism between autophagy and apoptosis for the development of novel cancer therapy

研究代表者

土井 賢一郎(Doi, Kenichiro)

大阪市立大学・大学院医学研究科・病院講師

研究者番号：80382050

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：近年、オートファジーとアポトーシスのクロストーク・メカニズムの解明が、癌治療分野においても世界的な潮流である。癌細胞は薬剤抵抗性や浸潤・転移能力などを容易に獲得するため、生物学的多様性を考慮した治療法の開発が不可欠である。「諸刃の剣」とも揶揄されるオートファジーが、癌細胞の生存にとって有益なのかという点を見定め、癌細胞死を効率よく誘導する併用療法の開発は重要である。本研究課題においては、ラット腎癌細胞株と肺高転移株を用い、薬剤併用によってオートファジーを抑制または誘導し、各種阻害剤を併用して主に薬理学的手法によってこの問題に取り組んでおり、この分野において新たな知見が深まることを期待します。

研究成果の概要(英文)：In recent years, elucidation of crosstalk mechanisms of autophagy and apoptosis is a global trend in the field of cancer treatment. Since cancer cells are easy to acquire drug resistance and infiltration / metastasis ability, it is essential to develop therapeutic methods that take biodiversity into consideration. It is important to develop a combination therapy to efficiently induce cancer cell death by confirming whether autophagy is also called "double-edged sword" and whether it is beneficial for cancer cell survival. In this research project we examined rat kidney cancer cell line and highly lung metastatic lines and confirmed that combinations of drugs with various inhibitors in order to suppress or induce autophagy. Pharmacological methods were mainly used to address this problem and we hope to find a novel evidence in cancer therapeutics.

研究分野：分子病理学、薬理学

キーワード：オートファジー アポトーシス 癌治療 薬剤併用療法

1. 研究開始当初の背景

- (1) 癌は日本人の2人に1人が一生のうちに罹患し、国民の1/3が癌で死亡する。分子標的薬が次々と開発されているが癌細胞は容易に薬剤抵抗性を獲得、あるいは浸潤・転移能力などの更なる悪性形質転換を来す。
- (2) オートファジーとアポトーシスのクロストーク・メカニズムの解明は、癌治療分野において世界的な潮流である。がん細胞死の形態から、Type-1:アポトーシス、Type-II:オートファジー、Type-III:ネクロトーシスに大別され、更に最近ではネクロプトーシスや、複数の細胞死形態が連続報告されている。
- (3) 分子標的薬が癌細胞に対しアポトーシス以外の細胞死を誘導するかどうかは未解明である。がん治療薬の中には、濃度依存性にオートファジーとアポトーシスの両方を誘導するものもある。アンメットニードの高い癌細胞の生物学的多様性を考慮した、薬物併用による癌治療法の開発が急務である。

2. 研究の目的

- (1) オートファジーの機能障害により癌など多くの病因となっていることが明らかとなっている。一方、がん細胞ではむしろオートファジーの活性化によって薬剤抵抗性を獲得し、オートファジーが癌細胞の生存にとって有利に機能する可能性もある。しかるに、オートファジーは「諸刃の剣」とも揶揄され、使い方によって疾患病因ともなるし、癌の発生原因ともなり得る。オートファジー活性化が本当に、癌細胞にとって有益なものであるのか否かを検索することを第一の課題とした。
- (2) 次に薬剤併用により、癌細胞でのオートファジーを抑制し、アポトーシスやネクロトーシス細胞死を効率よく誘導しうる薬剤併用の可能性を検索した。従来の抗がん剤との併用により癌細胞特異的な分子機構を抑制し、癌細胞死を効率よく誘導する併用療法のありかたを模索した。

3. 研究の方法

(1)細胞培養

当教室では伝統的にげっ歯類を用いた化学発がん研究を行って来ており、その中で EHEN (N-Ethyl-N-Hydroxyethyl-Nitrosamine)誘発ラット

腎発がんモデルで得られた腎癌細胞を樹立した。更に親株をラット腎被膜下に同所移植し肺転移を来した細胞を、別のラット腎被膜下に移植することで結果的に、肺高転移性腎癌細胞を樹立した(本報告書では詳細を省かせていただきます)。今回の実験では、親株と共に高転移株クローン # 3 と # 7 細胞株を選択した。一方、非腫瘍性上皮細胞として、不死化ラット膀胱上皮細胞である MYP3 を用いた。腎癌細胞に対する基本培地は、Gibco の DMEM + 10%FBS + 1%ペニシリン/ストレプトマイシン添加培地を用い、37℃、5%CO₂ 環境下で維持した。MYP3 のみ DMEM/Ham's F-12 培地を用いた。

(2)化合物(薬剤)と阻害剤

クロロキン (Chloroquine diphosphate salt, MW515.86) とビンブラスチン (Vinblastine sulfate salt, MW909.05) は Sigma から、ラパマイシン (Rapamycin, MW914.18) は Selleck Chemicals から購入した。Pan-caspase inhibitor の Z-VAD-FMK、Caspase-8 inhibitor の Z-IETD-FMK は MBL から、ネクロプトーシス阻害剤の Necrostatin-1 はサンタクルズからそれぞれ購入した。各種化合物や阻害剤は 100mM の濃度で DMSO ストック溶液を作製し、使用まで -20℃ で保管した。アザシチジン (5-Azacytidine: Aza) は 1mM で、シスプラチン (Cisplatin: CDDP) は 10mM で当教室で従来から使用していたストックを共用した。

(3)Cell Viability の評価

共通項目として、細胞は基本培地を用いて 96 穴プレートに 9000 細胞ずつ撒き、翌日に薬剤を投与し、指定された時間を培養後、MTS アッセイ (吸光度 510nm: CellTiter96 Aqueous One Solution Cell Proliferation キット) または ATP アッセイ (冷光: CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay キット) にて測定した (Promega 社製)。全ての実験で n=3 ずつ確保し、Excel でグラフを作成後、SigmaPlot (Ver.6.0) にて EC50 値 (50%細胞生存での薬剤濃度) を求めた。

(4)細胞死の薬理学的評価

誘導された細胞死がアポトーシスなのか、オートファジーなのか、ネクロプトーシスなのかを判別するため、各種インヒビターを被検化合物の 1 時間前に事前投与しておき、その後化合物を一定時間投与し細胞

Viability を測定した。薬剤併用の場合は、2 種類の化合物を同時に投与した。

4. 研究成果

(1) 薬剤単独投与時の細胞所見

クロロキンは長年に渡り抗マラリア剤として臨床応用されており、人体に対する毒性や安全性などは確立している。クロロキンはオートライソソーム内 pH を変化させることで蛋白分解を阻害することから、オートファジー阻害物質として実験的に汎用されていると共に、アメリカでは抗白血病薬との併用による臨床試験も実施されている。また抗がん剤として臨床応用されている微小管阻害薬のビンブラスチンは、オートファゴソームとライソソームの結合を阻害して、オートファジーを抑制する。これらを単独で上記 4 種類の細胞に投与した。

クロロキンの効果

クロロキンはオートファジー阻害物質とみなされるため、オートファジーに生存を依存している細胞でより CQ に対する感受性が増すと仮定した。そこで CQ を 40 時間投与した場合の各細胞に対する EC50 値は (MTS アッセイ) MYP3 で 25.4uM、親株で 38.0uM、#3 で 31.9uM、#7 で 38.1uM と大差無い結果であった。しかしながら 50uM での Viability は #3 で 2% と低値であり、その他 3 種の細胞での 35~45% とは大きくかけ離れており、よりオートファジー依存性である可能性がある (図 1)。また同条件で培養した場合の細胞写真を図 2 に示す。

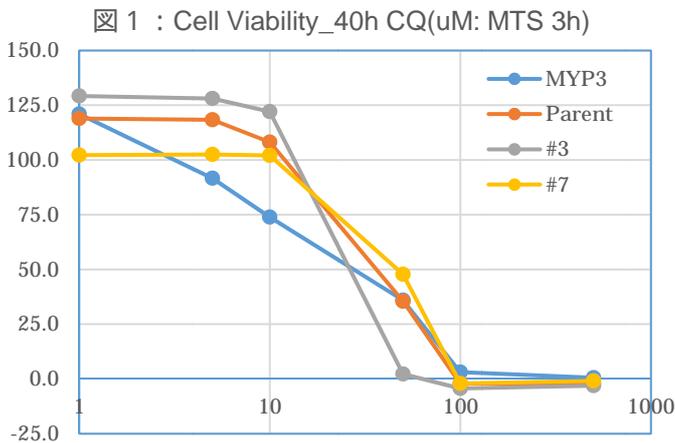


図 1 : Cell Viability_40h CQ(uM: MTS 3h)

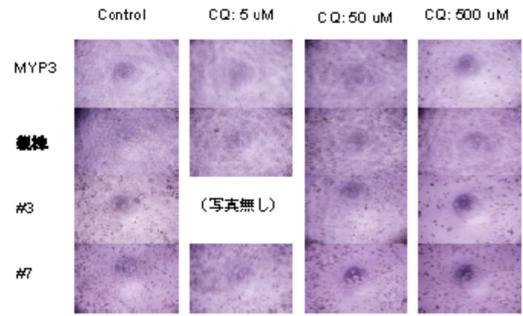


図 2 (上図)

ビンブラスチンの効果

ビンブラスチンも CQ とは異なる作用機序にてオートファジーを阻害すると考えられており、オートファジー依存性細胞でより感受性が高まるとの仮説を立てた。その結果、各細胞における EC50 値は MYP3 で 83.8nM、親株で 76.2nM、#3 で 53.7nM、#7 で 270.4nM となり、MYP3 と親株では同等に、#3 はより高感受性であり、#7 ではより抵抗性であった。従って以降の実験では、MYP3 を外して親株と高転移株でのみ比較した。同条件で培養した場合の細胞写真を図 4 に示す。

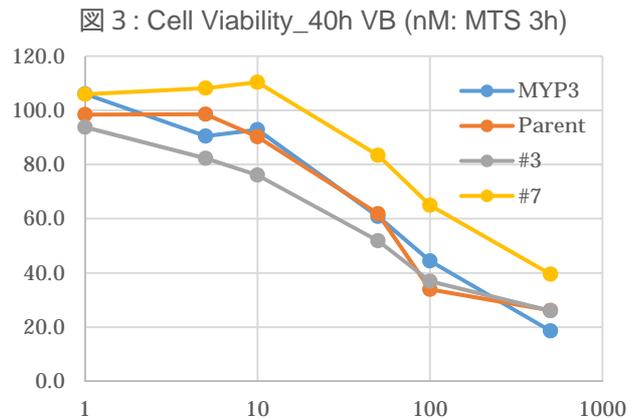


図 3 : Cell Viability_40h VB (nM: MTS 3h)

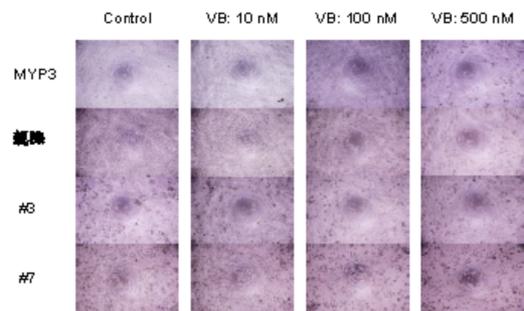


図 4 (上図)

(2) 多剤併用効果 : クロロキシンとラパマイシンの併用

ラパマイシン (シロリムス) は mTOR 阻害剤であり、ULK1 活性化によりオートファジーの初期段階を惹

起するとされている。従って Rapa 投与でオートファジーが活性化され、高転移株の生存により有利に働いて薬剤抵抗性になる可能性がある。一方、ヒトでもげっ歯類でも腎癌の形成過程において、mTOR 活性化が重要であるとの報告もあり、腎癌細胞株にて mTOR 阻害剤が有効であると考えられている。これら相反する事象を検討するために、親株と共に高転移株 2 種に Rapa 単独で 24 時間投与した。その結果 EC50 値は親株で 8.4uM、#3 で 15.4uM、#7 で 22.3uM と高転移株では明らかに親株よりも Rapa 抵抗性であり、オートファジー活性化がより生存に有利に働く可能性が見えてきた。これは腎癌の治療において、より悪性形質転換を来した高転移性癌細胞が、mTOR 阻害薬に対しより治療抵抗性であることを示唆している。

次に Rapa 投与で autophagic flux が細胞内に蓄積した状況下で CQ を併用した場合、オートファジー分解が抑制されるために細胞内の異常蛋白が過剰蓄積し、細胞内ストレスが増大する結果、細胞死が誘導される可能性がある。そこで 15uM の CQ と Rapa を併用投与した。その結果、併用時の Rapa の EC50 値は親株で 4.6uM に、#3 で >10uM (計算不能)、#7 で 6.9uM と #3 以外はいずれも感受性が亢進し、その反応性は元来抵抗性であった #7 高転移株でより顕著であった。尚 15uM の CQ のみでは 24 時間で全く細胞死が誘導されなかった。

CQ+Rapa 併用時の細胞死がアポトーシスである可能性を疑い、pan-caspase inhibitor である Z-VAD-FMK を 40uM で 1 時間事前に投与してから、同様に CQ+Rapa を 24 時間併用投与した。その結果、Rapa の EC50 値は親株で 8.7uM に、#3 で 25.1uM に、#7 では 19.8uM へと増加し、CQ 併用時の増感効果が完全に打ち消された。つまりアポトーシス阻害によって、CQ + Rapa 併用時の細胞死を免れたことになる。

(3) エピジェネティック機構の関与

アザシチジンは DNA メチル基転移酵素 (DNMT) 阻害剤であり、癌細胞における過剰なメチル化を阻害して、マスクされていた癌抑制遺伝子蛋白発現を回復させて、抗がん作用を発揮すると報告されており、実際に Aza (ビダーザ) は骨髄異形成症候群の治療薬として臨床応用されている。然るに癌細胞におけるエピジェネ

ティクスの異常が、癌化の原因の重要な機序であると解されている。そこで我々は、DNA メチル化とオートファジーの関連を検索すべく、Aza と CDDP、Aza と CQ、Aza と Rapa との併用投与を試みた。

Aza 単独投与 (50nM ~ 10uM)、CDDP 単独投与 (10nM ~ 5uM)

48 時間投与後の MTS アッセイにて、3 種類いずれの腎癌細胞株においても Aza 単独投与での細胞死はほとんど認めず、明らかな用量依存性は認められなかった。つまり Aza 単独での治療効果は甚だ乏しい。同様に CDDP 単独投与で 48 時間投与した場合、3 種類すべての細胞株が抵抗性であった (EC50 > 5uM)。

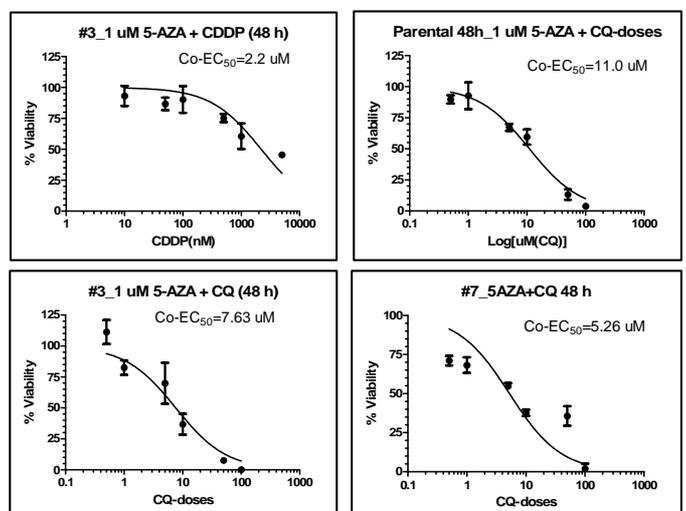
Aza+CDDP 併用効果 (48 時間、MTS アッセイ)

次に 1uM の Aza と CDDP を併用した場合、親株での EC50 値は > 5uM で、特に CDDP 1uM までは Viability が 100% を超えていて効果は極めて乏しかった。同様に #7 でも EC50 値が > 5uM で併用効果は無かった。ところが、#3 では 2.2uM と明らかな用量依存性が認められた (図 5 左上)。

Aza+CQ 併用効果 (48 時間、MTS アッセイ)

CQ 単独での EC50 値は前述のとおりである。そこで 1 uM の Aza と CQ との併用投与を試みた。その結果、CQ の EC50 値は親株で 11.0uM に低下、#3 では 7.63uM へ、#7 では 5.26uM へと低下し、いずれの細胞株でも著しい用量依存性変化が認められた。この結果、低用量 Aza と CQ の併用は極めて有効性が高いことが示唆され、特に高転移性株では併用効果が著明であった (図 5)。尚、1uM の Aza のみでは 3 種類いずれの細胞でも Viability は全く低下しなかった。CQ によるオートファジー抑制作用と Aza による脱メチル化の相乗効果が認められた。

図 5 : Aza との併用効果



各種阻害剤の存在下での Aza + 併用投与
(24 時間、ATP)

Aza との併用効果が絶大であることが判明したが、その細胞死誘導機序は未解明であり想像の域を超えない。そこで Z-VAD-FMK、Z-IETD-FMK、Nec-1 の各阻害剤を 3 種類の細胞株に 50uM で 1 時間事前投与しておき、その後 2uM の Aza + 15uM の CQ 併用、2uM の Aza + 5uM の Rapa 併用投与を 24 時間行った。その結果、いずれの阻害剤によっても惹起された細胞死を有意に抑制することはできなかった。従って、Aza との併用時の細胞死が、アポトーシスなのか、ネクロプトーシスなのか、それ以外なのかが未解明のままである。しかしながら、Aza+Rapa 併用時では、Nec-1 の存在下で若干であるがレスキューが認められた (図 6)。

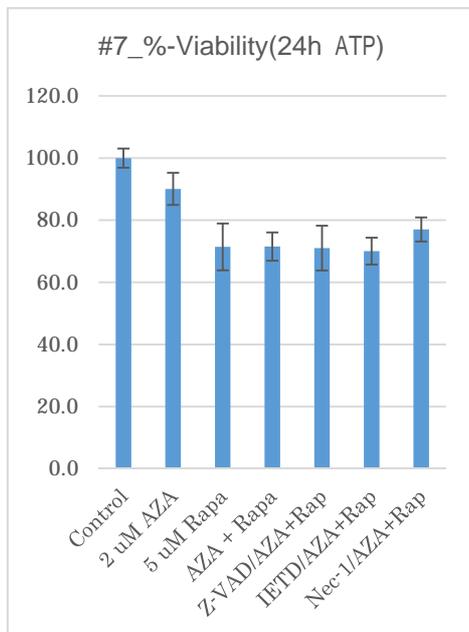


図 6 : 各種阻害剤存在下での Aza+Rapa (#7)

各種阻害剤の存在下での CQ+Rapa (24 時間、ATP)
最後に、15uM の CQ+5uM の Rapa 併用時における各種阻害剤の効果を、上記と同様の実験方法にて検索した。その結果、3 種類いずれの細胞株にても低用量 CQ と低用量 Rapa の併用効果が認められたものの、阻害剤によるレスキューは親株では全く認めず、#3 では Nec-1 によるレスキューが 7.6%認められ、#7 では Z-VAD-FMK によるレスキューが 9.7%認められた。また CQ + Rapa による併用効果は、前回の実験同様に#7 で最大であった (図 7)。

以上より、CQ+Rapa 併用時の細胞死機構は未解明であるが、#3 ではネクロプトーシスの関与が、#7 ではア

ポトーシスの関与が示唆されており、高転移株の中でも異なる。#7 は元来 CQ 抵抗性が強いが、Rapa との併用効果が最も大きく今後の解明が待たれる。

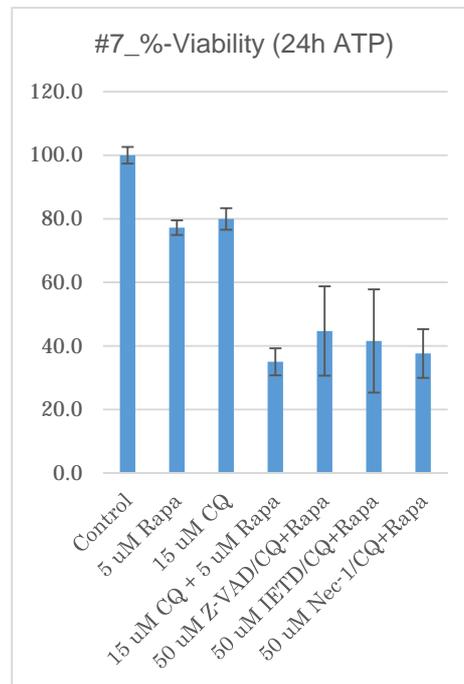


図 7 : 各種阻害剤存在下での CQ+Rapa (#7)

(5) 考察

本研究では主に薬理的な手法を用いて、アポトーシスとオートファジーのクロストーク機構を探索することを試みた。癌細胞には多様性があり、薬剤投与時の細胞死形態が複雑な分子機構に基づいて決定される。今回用いた高転移株クローン#3 は形態上、親株と類似して 2 次元平面上に拡がって増殖する。一方クローン#7 は突起を出して 3 次元にコロニーを形成して増殖する。つまり#7 は平面では一定の距離を置いて増殖し決して 100%コンフルエントにはならない特性がある。これらの細胞特性については、どのような分子機構が働いているのかが未解明であるが、薬剤投与時のふるまいは親株とは大きく異なっていた。

(6) まとめ

親株と肺高転移株を比較すると、ラット腎癌細胞の悪性形質獲得にオートファジーの活性化が関与している可能性がある。CQ と Rapa の併用では協調効果が認められ、アポトーシス細胞死が誘導されていることが示唆された。#3 と#7 という高転移株でも、その細胞死誘導機構には大きな差があると考えられる。アザシチジンとの併用で CQ の効果が著しく増感され、

エピジェネティクスの関与が極めて大きいことが示唆されるが、細胞死機構の解明には至らなかった。しかし Aza と他剤との併用療法は、血液がん以外の治療にも応用できる可能性があり、今後の研究（特に臨床応用）が待たれる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

Doi K, Fujioka M, Sokuza Y, Ohnishi M, Gi M, Takeshita M, Kumada K, Kakehashi A, Wanibuchi H. Chemopreventive action by ethanol-extracted Brazilian green propolis on post-initiation phase of inflammation-associated rat colon tumorigenesis. *in vivo*. 2017, Vol.31, 187-198. (査読あり)

Yamaguchi T, Gi M, Yamano S, Fujioka M, Tatsumi K, Kawachi S, Ishii N, **Doi K**, Kakehashi A, Wanibuchi H. A chronic toxicity study of diphenylarsinic acid in F344 rats in drinking water for 52 weeks. *Exp Toxicol Pathol*. 2017, Vol.69, 1-7. (査読あり)

Fujioka M, Gi M, Kawachi S, Tatsumi K, Ishii N, **Doi K**, Kakehashi A, Wanibuchi H. Examination of in vivo mutagenicity of sodium arsenite and dimethylarsinic acid in gpt delta rats. *J Environ Sci (China)*. 2016, Vol.49, 125-130. (査読あり)

Tan SF, Liu X, Fox TE, Barth BM, Sharma A, Turner SD, Awwad A, Dewey A, **Doi K**, et al (9 番目著者). Acid ceramidase is upregulated in AML and represents a novel therapeutic target. *Oncotarget*. 2016, Vol.7, 83208-83222. (査読あり)

Kakehashi A, Ishii N, Fujioka M, **Doi K**, Gi M, Wanibuchi H. Ethanol-Extracted Brazilian Propolis Exerts Protective Effects on Tumorigenesis in Wistar Hannover Rats. *PLoS One*. 2016, Vol.11, e0158654. (査読あり)

Yamano S, Gi M, Tago Y, **Doi K**, Okada S, Hirayama Y, Tachibana H, Ishii N, Fujioka M, Tatsumi K, Wanibuchi H. Role of deltaNp63(pos)CD44v(pos) cells in the development of N-nitroso-tris-chloroethylurea-induced peripheral-type mouse lung squamous cell

carcinomas. *Cancer Sci*. 2016, Vol.107, 123-32. (査読あり)

[学会発表] (計 4 件)

土井賢一郎、熊田賢次、魏民、奥野高裕、武下正憲、鰐淵英機、有機砒素化合物 Dimethylarsinic acid 誘発ラット膀胱癌に対する抗酸化物質 Apocynin の化学予防効果、第 106 回日本病理学会、2017 年 4 月 27 日、京王プラザホテル（新宿区）

熊田賢次、**土井賢一郎**、藤岡正喜、魏民、武下正憲、鰐淵英機、Dimethylarsinic acid 誘発ラット膀胱癌に対する NADPH oxidase 阻害剤 Apocynin の抑制効果、第 33 回日本毒性病理学会、2017 年 1 月 26 日、ビッグアイ（堺市）

土井賢一郎、鰐淵英機、三浦克之、王洪剛、抗アポトーシス蛋白 Mcl-1 を標的とした低分子抗がん活性物質の前臨床期開発、日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月 28 日、パシフィコ横浜（横浜市）

土井賢一郎、鰐淵英機、魏民、梯アンナ、石井真美、山野莊太郎、Mcl-1 蛋白を標的とする低分子抗がん物質の毒性と有効性の評価、第 32 回日本毒性病理学会、2016 年 1 月 29 日、かがわ国際会議場（高松市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土井 賢一郎 (DOI, Kenichiro)

大阪市立大学・大学院医学研究科・病院講師

研究者番号：80382050