

令和元年6月17日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09313

研究課題名(和文) オートファジー選択的基質p62を標的とした新しい大腸癌治療法の開発

研究課題名(英文) Development of new colorectal cancer treatment targeting p62

研究代表者

岡本 耕一 (OKAMOTO, Koichi)

徳島大学・病院・講師

研究者番号：60531374

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：大腸癌細胞を標的にオートファジー選択的基質であるp62をノックダウンすると caspase8依存性アポトーシスが強く抑制されることを見出した。p62ノックアウト大腸癌細胞株及びWT細胞を樹立し、in vitro、in vivoで5-FU、CPT-11の殺細胞効果の検討を行った結果、WT細胞では腫瘍の著明な縮小効果を認め、p62ノックアウト大腸癌細胞株はわずかに縮小した程度であった。この結果よりp62がオートファジーとアポトーシスのクロストークを担う重要な因子であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の特色は、抗癌剤とオートファジー阻害剤を併用することにより、p62自体が直接caspase8を凝集、活性化し、強いアポトーシスを誘導するという新しい抗腫瘍活性(Aの機序を解明することである。また、p62を標的とした癌治療法を開発するという点がきわめて独創的であると考え。p62がオートファジーとアポトーシスのクロストークを担う重要な因子であることが明らかとなれば、大腸癌のみならず、他癌腫においてもp62を標的とした新しい癌治療法の開発に繋がると考える。

研究成果の概要(英文)：We found that p62 can regulate a caspase-8-dependent apoptosis in response to 5-FU and CPT-11 against colorectal cancer. We investigated cytotoxic effect of 5-FU and CPT-11 using p62 knocked down colon cancer cell lines in vitro and in vivo. P62 Knockdown attenuated apoptosis compared with control cell line. In addition, expression of LC3-II, C3 and C8 were enhanced in control cell line compared with p62 knocked down cell. These results suggest that p62 may be a mediator of cross-talk between autophagy and apoptosis and provide a mechanism by which autophagy inhibition can promote tumor cell death.

研究分野：大腸癌の診断、治療

キーワード：p62 オートファジー

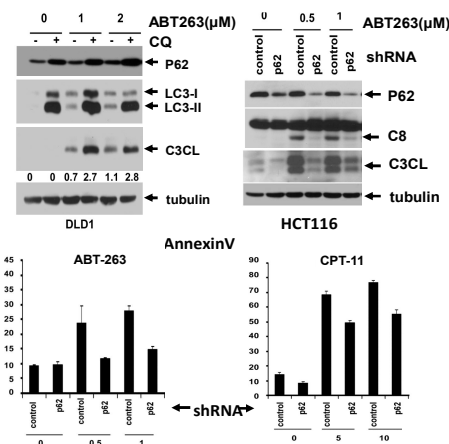
様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

国内の大腸癌患者はこの30年間で約6倍に急増し、死亡者数は男性では肺癌、胃癌について第三位、女性では第一位であり、有効な治療法の開発が切望されている。特に遠隔転移を有する切除不能進行大腸癌は予後不良であり、昨今、分子標的治療薬が臨床応用されているが、いまだ満足すべき治療効果が得られておらず、新しい治療法の開発が望まれている。

オートファジー (以下 AtP) は、自己蛋白質を分解する手段の1つであり、栄養素の確保や細胞内に生じた不良蛋白質などの除去を効率的に行う。そのため、正常細胞においては、上記理由により腫瘍形成を抑制すると考えられている。一方、大腸癌や膵癌などの RAS 変異を有する癌細胞では AtP が恒常的に亢進しており、これを阻害すると増殖が抑制されることが報告されている。また、AtP は従来の抗癌剤や放射線治療の耐性化機序に関与することが示されている。実際に、抗癌剤単独投与では、癌細胞が AtP を介して生き残り、十分な殺細胞効果が認められないのに対し、AtP 阻害剤を併用することにより、抗癌剤の効果が著明に増強されることが報告されている。このように、AtP を阻害もしくは調節することにより、アポトーシス (以下 Apo) を誘導することが可能であることから、AtP 制御による新しい癌治療戦略が注目されている。しかし、AtP と Apo 相互のシグナル伝達や AtP 阻害に伴う Apo の誘導の機序の詳細は不明である。p62 は、AtP の選択的基質と考えられており、ユビキチン化蛋白質と結合して凝集体を形成し、AtP により分解されることが報告されている。また、オートファジーの能力を全身で欠損したマウス (Atg5 ノックアウトマウス) では p62 が過剰に蓄積されることが報告されている。このように、p62 は AtP において重要な役割を果たすと考えられるが、p62 の生理的意義やシグナル伝達の詳細は不明である。申請者らはこれまでに、大腸癌細胞株に AtP と Apo を誘導可能な新規抗癌剤 ABT263 (Navitoclax: Bcl 阻害剤) や殺細胞性抗癌剤 CPT-11 (SN38) と AtP 阻害剤である chloroquine を併用すると p62 の過剰発現を認め、用量依存性に Apo を誘導すること、大腸癌細胞株の p62 をノックダウンすると caspase8 依存性に Apo が強く抑制されることを新たに見出した (図 1)。

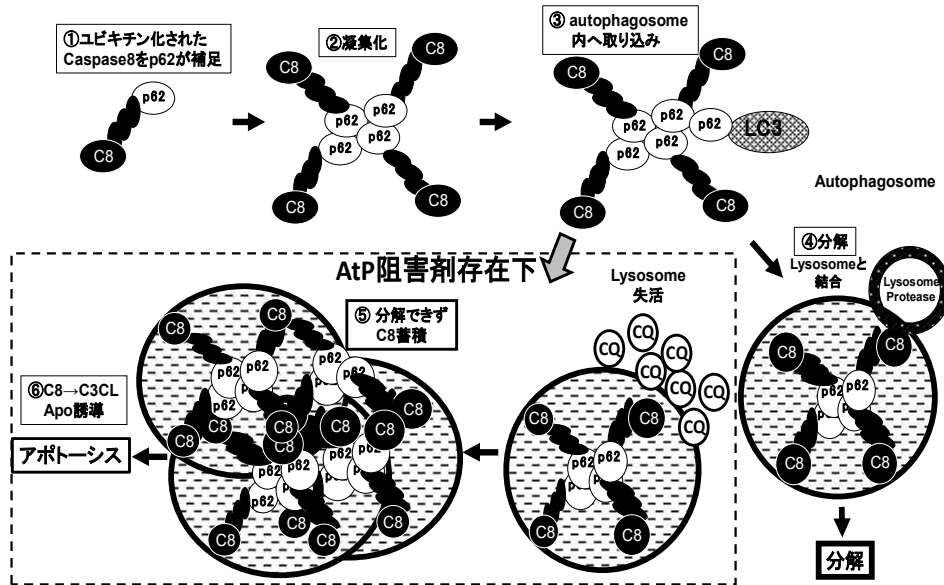
図 1: AtP 阻害剤による Apo の増強と p62 抑制に伴う Caspase8 依存性 Apo の抑制



すなわち、通常では、まず、caspase8 がユビキチン化されて p62 に補足され、p62 が(caspase8 とともに)凝集する。p62 凝集体は、LC3 によりオートファゴソーム内に取込まれ、ライソゾーム酵素により分解されると考えられる。しかし、chloroquine などの AtP 阻害剤が存在すると、ライソゾーム・プロテアーゼの阻害によりオートファゴ-ライソゾーム内での蛋白分解が阻害される。その結果、オートファゴ-ライソゾームが機能失活状態となり、p62 及び自ら捕捉した caspase8 が細胞質内に過剰に蓄積し、caspase8 が凝集、活性化して Apo が誘導される、という機序が推定される。つまり、p62 はユビキチン化 caspase8 を凝集化する hub の役割を果たし、下流のカスパーゼの活性化を効率的に促進し、Apo を誘導すると考えられる (図 2)。

一方、最近 chloroquine より 10 倍以上高い活性を有する AtP 阻害剤 Lys05 が報告され、in vivo において単剤でも抗腫瘍効果を有することが報告され注目されている。以上より、大腸癌細胞に AtP 阻害剤と抗癌剤を併用すると、AtP 選択的基質である p62 とともに caspase8 が蓄積し、次いで caspase8 が凝集、活性化することにより相乗的に強い Apo を誘導することが期待される。

図 2: AtP 阻害に伴う Apo 誘導機序の仮説



2. 研究の目的

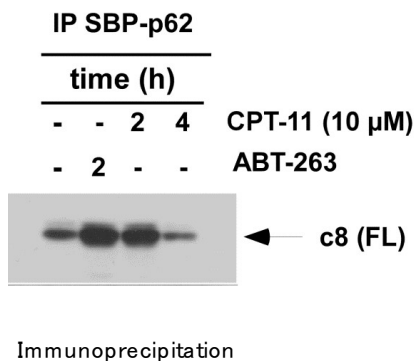
癌細胞において AtP を阻害すると細胞増殖が抑制されることから、抗癌剤と AtP 阻害剤を併用して効率的に癌細胞を死滅させる治療法が考案されている。しかし、AtP の阻害により Apo が誘導される機序の詳細は不明である。申請者らはこれまで、大腸癌細胞を標的に AtP 選択的基質である p62/sequestosome1 (以下 p62) をノックダウンすると caspase8 依存性 Apo が強く抑制されることを見出した。そこで本研究では、AtP の阻害による p62 の蓄積が Caspase8 を活性化し、抗癌剤による Apo を増強する機序を *in vitro*、*vivo* で明らかにし、新たな AtP と Apo のクロストークの分子生物学的機序を解明する。また、新規 AtP 阻害剤を使用し、AtP 選択的基質 p62 を標的とした新しい大腸癌治療法を開発するための基盤を構築する。

3. 研究の方法

大腸癌細胞株 (HCT116, DLD1) を用い、新規抗癌剤 ABT263 と殺細胞性抗癌剤 (CPT11, 5FU) を AtP 阻害剤 (CQ) を併用し、その相乗効果を検討する。感受性試験 (MTT assay) により種々の濃度を組み合わせて Cell viability を測定する。その中で強く相乗効果が見られた抗癌剤、濃度の条件で WB 法により AtP、Apo の signal 伝達に関わる蛋白 (p62, LC3, Caspase3, 8, 9) の発現を検討する。次に caspase8 依存性 Apo が強く誘導された条件で p62 過剰発現、p62 ノックダウン大腸癌細胞株 (Lenti, Retro virus system) を用い Apo が増強、減弱されるかアネキシン V、WB 法にて検討する。p62、LC3、Caspase8 の共在化の有無を免疫沈降法、蛍光二重染色法にて検討する。

p62 過剰発現、p62 ノックダウン大腸癌細胞株を用い、それらが増強、減弱されるかを検討する。申請者らは以前の研究において p62 過剰発現大腸癌細胞株 (DLD1) において ABT263、CPT-11 存在下で p62 抗体を用いた免疫沈降法を施行したところ、p62 と Caspase8 の共在化を既に確認している (図 3)。

図 3: p62 と C8 の共在化



よって、他の抗癌剤においても同様の共在化を確認できる可能性が高い。次に、p62 過剰発現大腸癌細胞ではなく、AT 阻害剤存在下での内因性レベルでの p62 発現と Caspase8 の共在化の無も同様に免疫沈降法及び蛍光二重染色法にて検討する。

新しいゲノム編集技術である CRISPR Cas にて大腸癌細胞株の single p62 ノックアウト細胞株を樹立する。p62 ノックアウト細胞株を樹立後、in vivo での実験の前に in vitro でこれまで得られた結果と同様の結果が得られるかを確認する。樹立した p62 ノックアウト大腸癌細胞株及び WT 細胞を、それぞれマウスの大腸に移植する。マウスはヌードマウス (Male Nude Mouse:5-6 weeks old, CLEA Japan) または Bald/c/nu mice(Charles River Laboratories, Inc) を用いる。WT 大腸癌細胞株で十分な縮小腫瘍効果が得られた後、マウスから癌細胞を摘出し、AtP、Apo に関わる因子 (p62, LC3, C3, C8, C9) を Taqman PCR、WB、免疫染色法 (IHC) 等にて発現が増強、減弱されているかを確認し、p62 の AtP と Apo のクロストークに関わる役割を検討する。

#### 4. 研究成果

大腸癌細胞株 (HCT116, DLD1) を用い、新規抗癌剤 ABT263、殺細胞性抗癌剤 (Oxaliplatin, CPT11, 5FU) と AtP 阻害剤(クロロキン (CQ)) を併用し MTT assay を施行したところ、全ての薬剤において CQ 非併用群と比較し細胞増殖が抑制された。また WB 法にて AtP、Apo の signal 伝達に関わる蛋白の発現 (p62, LC3、Caspase3、8、9) を検討したところ、p62 の過剰発現を認め、用量依存性に Apo を誘導した。また、大腸癌細胞株の p62 をノックダウンすると caspase8 依存性に Apo が強く抑制された。

さらに免疫沈降法、培養細胞の蛍光二重染色にて p62 と Caspase8 の共在化を確認した。また、新しいゲノム編集技術である CRISPR Cas にて大腸癌細胞株の single p62 ノックアウト細胞株を樹立した。また、同時に WT(Wild type)大腸癌細胞株も 樹立し、樹立細胞から TotalRNA を抽出し、Real time PCR による遺伝子発現解析によって、そのノックアウト効率の確認を行った。p62 ノックアウト細胞株を樹立後、in vivo での実験の前に in vitro でこれまで得られた結果と同様の結果が得られるかを確認したところ、全ての薬剤において caspase8 依存性に Apo が強く抑制された。

次に p62 ノックアウト大腸癌細胞株及び WT 細胞を、それぞれマウスの大腸に移植した。マウスに殺細胞性抗癌剤 (5-FU, CPT-11) を 投与後、in vivo imaging で観察を行った結果、WT 細胞では腫瘍の著明な縮小効果を認めたが、p62 ノックアウト大腸癌細胞株はわずかに縮小した程度であった。腫瘍の縮小効果が得られた WT 大腸癌細胞株、p62 ノックアウト大腸癌細胞株をそれぞれマウスから摘出し、Atp、Apo に関わる因子 (p62, LC3, C3, C8, C9) を Taqman PCR、免疫染色法 (IHC) にて発現を確認したところ WT 大腸癌細胞株は p62 ノックアウト大腸癌細胞株と比較して LC3、C3、C8 の強い発現を認めた。この in vivo の 結果より p62 が Atp と Apo のクロストークを担う重要な因子であることが明らかとなった。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Sato Y, Hirakawa M, Ohnuma H, Takahashi M, Okamoto T, Okamoto K, Miyamoto H, Muguruma N, Furuhashi T, Takemasa I, Kato J, Takayama T. A triplet combination with capecitabine/oxaliplatin/irinotecan (XELOXIRI) plus cetuximab as first-line therapy for patients with metastatic colorectal cancer: a dose escalation study. *Cancer Chemother Pharmacol.* (査読あり)2017;80:1133-1139. (doi: 10.1007/s00280-017-3458-7)
- ② Okada Y, Kimura T, Nakagawa T, Okamoto K, Fukuya A, Goji T, Fujimoto S, Sogabe M, Miyamoto H, Muguruma N, Tsuji Y, Okahisa T, Takayama T. EGFR Downregulation after Anti-EGFR Therapy Predicts the Antitumor Effect in Colorectal Cancer. *Mol Cancer Res.* (査読あり) 2017;15:1445-1454. (doi: 10.1158/1541-7786.MCR-16-0383)
- ③ Fujino Y, Takeishi S, Nishida K, Okamoto K, Muguruma N, Kimura T, Kitamura S, Miyamoto H, Fujimoto A, Higashijima J, Shimada M, Rokutan K, Takayama T. Downregulation of microRNA-100/microRNA-125b is associated with lymph node metastasis in early colorectal cancer with submucosal invasion. *Cancer Sci.* (査読あり)2017;108:390-397. (doi: 10.1111/cas.13152)

[学会発表] (計 2 件)

- ① Nakamura F, Okamoto K, Tanaka K, Fujino Y, Miyoshi J, Kitamura S, Miyamoto H, Sato Y, Muguruma N, Takayama T. Clinicopathological Analyses of Colorectal Polyps and Cancers in Serrated Polyposis Syndrome. DDW2018, June 2-5, 2018, Washington, D.C., Walter E. Washington Convention Center
- ② Kagemoto K, Okamoto K, Takaoka T, Okada Y, Tanaka K, Hirao A, Kitamura S, Kimura T, Miyamoto H, Muguruma N, Okahisa T, Tsuneyama K, Takayama T. Detection of Aberrant Crypt Foci Using Image-Enhanced Endoscopy. DDW2017, May 6-9, 2017, Chicago, McCormick Place

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：高山 哲治

ローマ字氏名：(TAKAYAMA, Tetsuji)

所属期間名：徳島大学

部局名：大学院医歯薬学研究部（医学域）

職名：教授

研究者番号：10284994

研究分担者氏名：北村 晋志

ローマ字氏名：(KITAMURA, Shinji)

所属期間名：徳島大学

部局名：大学院医歯薬学研究部（医学域）

職名：助教

研究者番号：60564490

研究分担者氏名：六車 直樹

ローマ字氏名：(MUGURUMA, Naoki)

所属期間名：徳島大学

部局名：大学院医歯薬学研究部（医学域）

職名：准教授

研究者番号：90325283

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。