

令和元年6月20日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K21387

研究課題名(和文) 頭頸部癌に対するマクロライド系抗菌薬を用いた新規「アミノ酸飢餓誘導療法」の確立

研究課題名(英文) Establishment of novel "amino acid starvation induction therapy" using macrolide antibiotics for head and neck cancer

研究代表者

平澤 一浩 (Hirasawa, Kazuhiro)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：90772161

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：報告者らは、マクロライド系抗菌薬であるアジスロマイシン(AZM)、クラリスロマイシン(CAM)がオートファジー阻害活性を持つことを報告してきた。頭頸部癌細胞株にAZM、CAMを添加培養したところ、通常培養条件下では細胞毒性を示さないが、アミノ酸飢餓培地では著明な殺細胞効果が誘導されることが観察された。アミノ酸飢餓条件下では細胞内アミノ酸プールが枯渇し、これを代償するためにオートファジーが亢進するが、AZM、CAMがオートファジーを阻害することで、アポトーシス誘導性転写因子CHOPを介したアポトーシスが誘導されることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌細胞は増殖が旺盛でアミノ酸の需要が高く、アミノ酸の取り込みやオートファジーの亢進によりその高い需要を満たしている。オートファジーは蛋白合成のためのアミノ酸プールを維持するのに重要で、特にアミノ酸飢餓状態では必須機構である。

近年、癌特異的アミノ酸トランスポーターの研究が進んでいる。トランスポーター阻害剤とマクロライド抗菌薬を併用し、高いアミノ酸需要を満たさず細胞死を誘導する新規治療法の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have reported that macrolide antibiotics such as azithromycin (AZM) and clarithromycin (CAM) have an inhibitory effect of autophagy flux. We found that AZM and CAM exhibited the prominent cytotoxic effect in head and neck cancer cell lines under amino acid-depleted culture conditions, while they showed no cytotoxicity in complete culture medium. This cytotoxic effect was mediated through induction of pro-apoptotic transcription factor CHOP. Under amino acid-depleted condition, autophagy was pronounced for compensating intracellular amino acid pool. Thus, blocking autophagy with AZM and CAM resulted in CHOP-mediated apoptosis induction in cancer cells under starving condition.

研究分野：頭頸部癌

キーワード：頭頸部癌 マクロライド抗菌薬 オートファジー アミノ酸 小胞体ストレス EGFR-TKI

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

頭頸部扁平上皮癌は上皮成長因子受容体(EGFR)の過剰発現例が多い。2012年に抗EGFRモノクローナル抗体であるCetuximabが適応となり、使用される頻度が増えている。著効例もあるが、耐性例や耐性獲得例も多く経験し、間質性肺炎等の致死的な合併症も報告されている。よって、副作用が少なく、安定した高い抗腫瘍効果を持つ革新的な治療法の開発が求められている。頭頸部扁平上皮癌は、EGFRシグナルにより増殖が旺盛でアミノ酸の需要が高く、アミノ酸の取り込みやオートファジーの亢進によりその高い需要を満たしている。オートファジーは細胞質成分をリソソームで分解する機構であり、蛋白合成のためのアミノ酸プールを維持するのに重要である。特に飢餓状態においては外因性のアミノ酸が欠乏し、オートファジーがアミノ酸プールの維持に必須である。ゆえにアミノ酸飢餓状態においてオートファジーが阻害されることは、アミノ酸プールの枯渇へつながると考えられる。報告者らは、マクロライド系抗菌薬の持つオートファジー阻害活性を報告してきた(Moriya S, et al. Int J Oncol. 2013.)。そこで、アミノ酸飢餓(AAD; amino acid-depleted)状態下でCAL27(舌癌細胞株)にアジスロマイシン(AZM)、クラリスロマイシン(CAM)を投与したところ、顕著に細胞死を誘導した。

2. 研究の目的

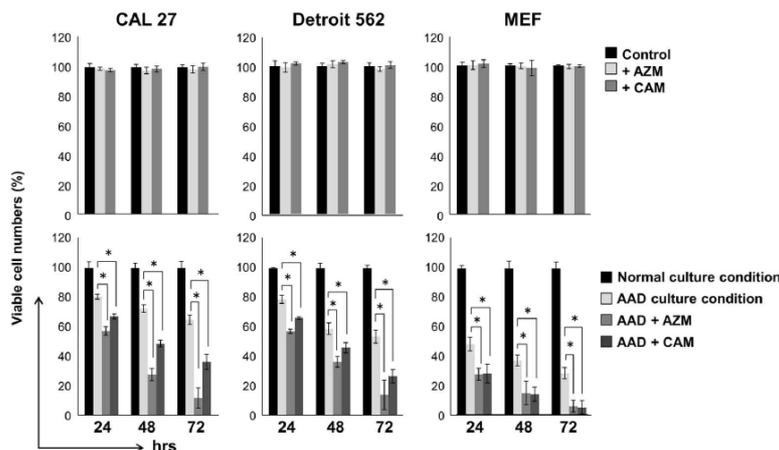
- (1) アミノ酸飢餓状態でマクロライド抗菌薬が細胞死を誘導する機序を解明する。
- (2) 近年、癌特異的なアミノ酸トランスポーターの研究が進んでいる。トランスポーター阻害剤とマクロライド抗菌薬を併用し、高いアミノ酸需要を満たさず細胞死を誘導する新規治療法の基盤形成をする。
- (3) 報告者らのグループはEGFRの分子標的薬ゲフィチニブ(GEF)がオートファジーを誘導し、マクロライド抗菌薬との併用により殺細胞効果が増強することを報告している(Shuntaro M, et al. Int J Oncol. 2016)。このGEFのアミノ酸飢餓状態下での効果を検討する。

3. 研究の方法

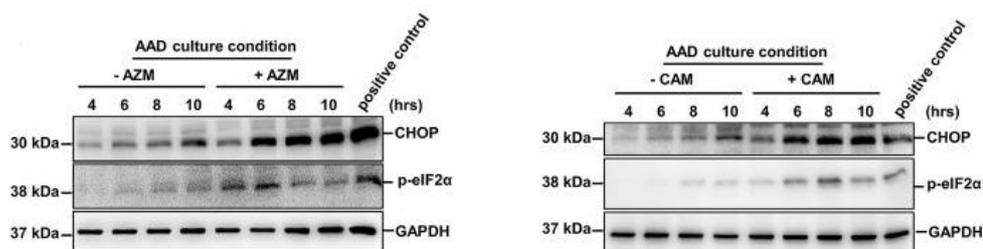
- (1) 予備実験で、アミノ酸飢餓培地(amino acid-free DMEM + 10%FBS)においてマクロライド抗菌薬の添加によりCHOPが強力に誘導されることが観察された。CAL27に対しCHOPをknockdown、wild typeのMEFとCHOP欠損のMEFでの比較、によりCHOPが細胞死に関与しているかを検討する
- (2) アミノ酸を再添加し、細胞死自体およびCHOPの誘導が抑制されるかを検討する
- (3) 通常培地とアミノ酸飢餓培地におけるGEFの効果の差異を検討する

4. 研究成果

- (1) 通常培地ではAZM、CAMは殺細胞効果を発揮しないが、AAD培地では殺細胞効果を発揮する。(縦軸：生細胞比率、横軸：時間)

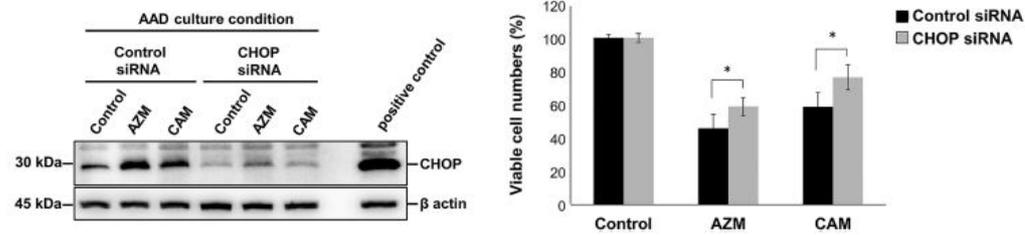


- (2) アミノ酸飢餓培地培地では経時的にCHOPが誘導されるが、マクロライド添加によりさらに強力にCHOPが誘導される。

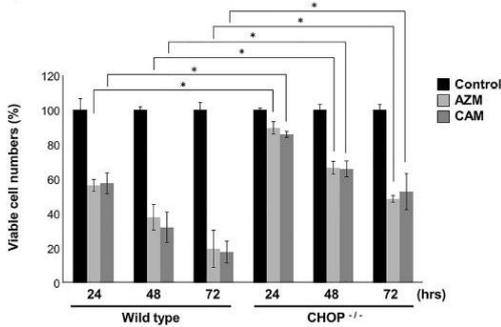


(3)

AAD 培地でのマクロライドによる殺細胞効果は、CHOP の knockdown により有意に減少する。
(下段は AAD 培地で 4 8 時間処理後の状態で、縦軸：生細胞比率)



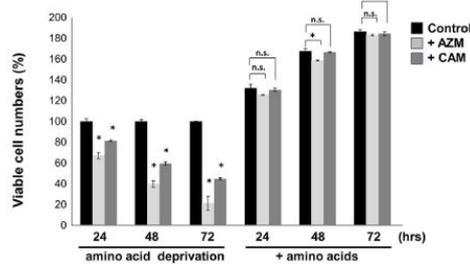
AAD 培地でのマクロライド添加時、CHOP 欠損の MEF は、Wild type の MEF より有意に細胞数の低下が減弱する。(Control は AAD 培地で培養しマクロライド非添加の状態、縦軸：生細胞比率、横軸：時間)



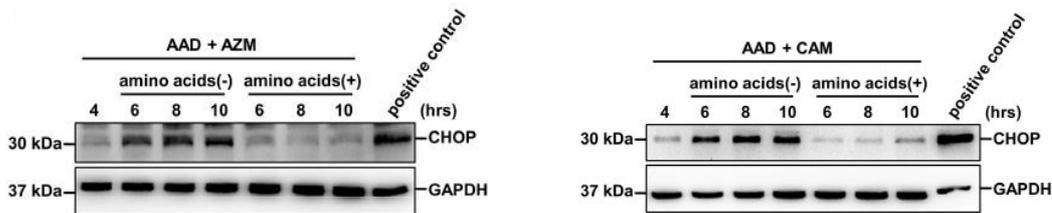
以上より、CHOP が AAD 培地におけるマクロライドの細胞死誘導因子の一つであることが示された。

(4)

AAD 培地にアミノ酸を再添加することで、AZM、CAM による細胞死は抑制される。(縦軸：生細胞比率、横軸：時間)

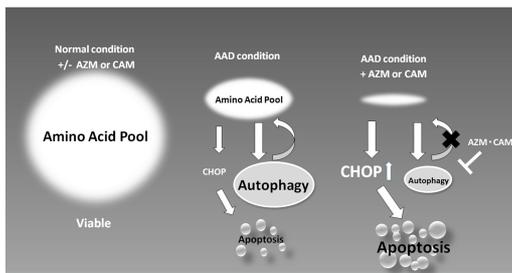


AAD 培地に AZM、CAM を添加し、4 時間経過時点でアミノ酸を添加すると CHOP が誘導されなくなる。



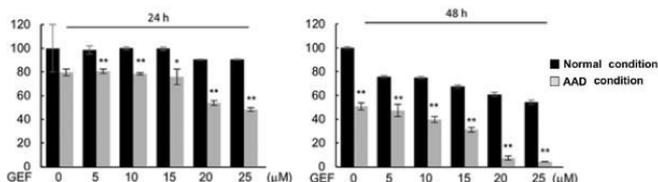
以上より、この系における細胞死および CHOP の誘導は、アミノ酸プールの枯渇によるものであることが示唆される。

(1)から(4)の結果により、アミノ酸飢餓状態で AZM、CAM でオートファジーを阻害すると、アミノ酸プールが枯渇し、CHOP を介して細胞死が誘導されることが示された。



(5)

GEF は通常培地でも CAL27 に殺細胞効果を発揮するが、AAD 培地下だとより顕著となる。



その細胞死は、アポトーシスでもオートファジー細胞死でもなく、RIPK-1 活性化を伴うネクロプトーシス様の細胞死であった。

このように、アミノ酸飢餓状態では GEF の効果が増強された。生体内の腫瘍細胞増殖では血管新生を常に伴い、腫瘍細胞は低栄養状態に曝されていることが予想される。AZM、CAM はオートファジー阻害活性を介して GEF を含む各種抗癌剤の増強効果を発揮する可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6 件)

1. Saito Y, Moriya S, Kazama H, Hirasawa K, Miyahara K, Kokuba H, Hino H, Kikuchi H, Takano N, Hiramoto M, Tsukahara K, Miyazawa K: Amino acid starvation culture condition sensitizes EGFR-expressing cancer cell lines to gefitinib-mediated cytotoxicity by inducing atypical necroptosis. *Int J Oncol*. 52: 1165-1177, 2018. doi: 10.3892/ijo.2018.4282. 査読有

2. 平澤一浩、高田大輔、西山信宏、塚原清彰: 嚔声を契機に発見された若年胸部大動脈瘤切迫破裂例. *耳鼻臨床* 111: 351-355, 2018. 査読有

3. Hirasawa K, Okamoto I, Motohashi R, Sato H, Takase S, Agata A, Takeda A, Tsukahara K: The efficacy and adverse events of radiotherapy with cetuximab for Japanese head and neck cancer patients. *Auris Nasus Larynx*. 44: 724-728, 2017. 査読有

4. Hirasawa K, Tsukahara K, Motohashi R, Endo M, Sato H, Ueda Y, Nakamura K: Deep neck cellulitis: limitations of conservative treatment with antibiotics. *Acta Oto-Laryngol*. 137:86-89, 2017. 査読有

5. Hirasawa K, Moriya S, Miyahara K, Kazama H, Hirota A, Takemura J, Abe A, Inazu M, Hiramoto M, Tsukahara K, Miyazawa K: Macrolide Antibiotics Exhibit Cytotoxic Effect under Amino Acid -Depleted Culture Condition by Blocking Autophagy Flux in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cell Lines. *PLoS One*. 11: e0164529, 2016. doi: 10.1371/journal.pone.0164529. 査読有

6. Miyahara K, Kazama H, Kokuba H, Komatsu S, Hirota A, Takemura J, Hirasawa K, Moriya S, Abe A, Hiramoto M, Ishikawa T, Miyazawa K: Targeting bortezomib-induced aggresome formation using vinorelbine enhances the cytotoxic effect along with ER stress loading in breast cancer cell lines. *Int J Oncol*. 49: 1848-1858, 2016. doi: 10.3892/ijo.2016.3673. 査読有

[学会発表](計 7 件)

1. 平澤一浩、高田大輔、西山信宏、塚原清彰: 嚔声を契機に発見された若年胸部大動脈瘤切迫破裂例. 第 80 回耳鼻咽喉科臨床学会・学術講演会 2018 年 6 月 30 日(横浜)

2. 齋藤雄、風間宏美、平澤一浩、宮原か奈、國場寛子、日野浩嗣、高野直治、平本正樹、塚原清彰、宮澤啓介: アミノ酸飢餓条件下における EGFR 発現癌細胞に対するゲフィチニブのネクロプトーシス様細胞死を介した殺細胞増強効果. 第 76 回日本癌学会学術集会 2017 年 9 月 28 日(横浜)

3. 齋藤雄、風間宏美、平澤一浩、宮原か奈、國場寛子、日野浩嗣、高野直治、平本正樹、塚原清彰、宮澤啓介: Amino Acid-Starving Culture Condition Enhances Gefitinib-Induced Cytotoxicity via Necroptosis-like Cell Death in EGFR-Expressing Cancer Cells. 第 179 回東京医科大学医学会総会 2017 年 6 月 3 日(東京)

4. 平澤一浩、森谷昇太、宮原か奈、風間宏美、廣田綾子、由田淳、阿部晃久、稲津正人、平本正樹、塚原清彰、宮澤啓介: Macrolide antibiotics exhibit cytotoxic effect under amino acid-depleted culture condition via blocking autophagy flux in head and neck squamous

cell carcinoma cell lines. 第 178 回 東京医科大学医学会総会 2016 年 11 月 5 日 (東京)

5. 平澤一浩、森谷昇太、宮原か奈、風間宏美、廣田綾子、由田淳、阿部晃久、稲津正人、平本正樹、塚原清彰、宮澤啓介：アミノ酸飢餓状態下で、マクロライド抗菌薬はオートファジー阻害により頭頸部癌細胞株の細胞死を誘導する。第 75 回日本癌学会各術集会 2016 年 10 月 8 日 (横浜)

6. 宮原か奈、森谷昇太、平澤一浩、平本正樹、小松誠一郎、石川孝、阿部晃久、宮澤啓介：ビンORELBIN は乳癌細胞株において亜久里ソーム形成を阻害することによりボルテゾミブ誘導性の細胞毒性を増強する。第 75 回日本癌学会学術集会 2016 年 10 月 8 日 (横浜)

7. 宮原か奈、森谷昇太、平澤一浩、平本正樹、小松誠一郎、石川孝、阿部晃久、宮澤啓介：Targeting bortezomib-induced aggresome formation using vinorelbine enhances the cytotoxic effect along with ER-stress loading in breast cancer cell lines. 第 177 回東京医科大学医学会総会 2016 年 6 月 4 日 (東京)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

(2) 研究協力者

宮澤 啓介 (MIYAZAWA, Keisuke)
東京医科大学・医学部・主任教授
研究者番号：50209897

森谷 昇太 (MORIYA, Shota)
東京医科大学・医学部・助教
研究者番号：30634935

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。