

令和元年6月18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：16K21388

研究課題名(和文) 不良タンパク質の微小管輸送およびアグリソーム形成を標的とする転移性乳癌の新規治療

研究課題名(英文) Novel therapeutic strategy in metastatic breast cancer by targeting misfolded protein-transport along microtubules and aggresome formation

研究代表者

風間 宏美 (Kazama, Hiromi)

東京医科大学・医学部・助手

研究者番号：00339350

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)：乳癌細胞株MDA-MB231のERAI-Venus安定導入株を作成し、IncuCyteを用いてXBP1-Venus蛍光強度を測定することで、ERストレス定量解析法を試みた。この解析法を用いて、プロテアソーム、オートファジーならびにアグリソーム形成の同時阻害を意図して、ボルテゾミブ、クラリスロマイシン、ボリノスタットの3剤同時添加処理を行ったところ、いかなる2剤の組み合わせに比べてERストレスが最大限に誘導され、かつ、最も強力な殺細胞効果が誘導された。細胞内不良タンパク質処理機構を計画的に阻害し、ERストレスを最大限に負荷することで細胞死を誘導する「ERストレス誘導療法」の可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新薬の開発には莫大な予算とリスクが伴い、前臨床試験から第I～III相臨床試験を経て承認に至る確率は極めて低い。本研究では既存薬の薬剤コンビネーションによりERストレスを最大限に負荷し、かつ、強力な乳癌細胞に対する殺細胞効果を誘導することを示した。“Drug Re-positioning”の観点からも今後、動物実験で治療効果が検証されれば、臨床試験への移行は比較的容易であり、かつ、難治性乳がんの治療成績の向上に寄与できれば、費用対効果および社会貢献度は極めて高いと考える。

研究成果の概要(英文)：We sought to establish a quantitative assay for monitoring ER stress loading. MDA-MB231 cells stably transfected with the ERAI-Venus vector exhibited a strong XBP1 splicing signal in response to ER stress. Using the IncuCyte cell imaging system, we monitored the fluorescence intensity of XBP1-Venus as an ER stress indicator. Assessment of the XBP1-Venus signal during exposure to various drug combinations revealed that simultaneous inhibition of the proteasome, autophagy, and aggresome formation such as by using bortezomib, clarithromycin, and vorinostat led to more effective ER stress loading and higher cytotoxicity than inhibition of only two components. Thus, rational inhibition of a coordinated intracellular network for coping with the accumulation of misfolded proteins enhance killing of cancer cells subjected to pronounced ER stress loading, that we call “ER stress-loading therapy”.

研究分野：腫瘍学

キーワード：乳がん アグリソーム オートファジー 小胞体ストレス

1. 研究開始当初の背景

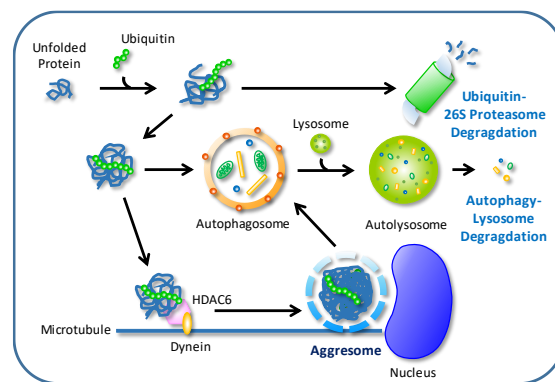
転移・再発乳癌の治療法は、テトラサイクリン系、タキサン系、ビンカアルカロイド系等の抗癌剤の他、ホルモン剤、分子標的薬などの薬剤が用いられている。しかし一度、転移、再発をきたした乳癌において、現在の治療法で治癒を目指すことは極めて困難である。

近年、研究代表者が所属する研究室は、乳癌細胞や多発性骨髄腫細胞において、細胞内の二大タンパク質分解系であるユビキチン・プロテアソーム系とオートファジー・リソソーム系を同時阻害することで、過度な小胞体 (ER) ストレス負荷から癌細胞のアポトーシスが強力に誘導されることを報告し、国内外より注目されている。(Komatsu S, Biochem Biophys Res Commun. 2013, Moriya S, Int J Oncol. 2015.)

ER ストレスとは、正常な立体構造として折り畳みが行われないタンパク質 (unfolded protein) が小胞体内に蓄積した状態である。これに適応するため、不良タンパク質を小胞体外に搬出し、ユビキチン (Ub) 化してプロテアソームあるいはオートファジーで分解する機構が作動する。しかし、この細胞処理能力を超える不良タンパク質が過度に蓄積すると、転写因子 CHOP の誘導等によりアポトーシスが惹起される。上記の当研究室での研究成果は、この現象を癌治療に応用したものである。

乳癌細胞や骨髄腫細胞では、行き場を失った不良タンパク質の凝集体 (aggregate) を、ダイニンモータータンパクと HDAC6 とが共同して、微小管上を核近傍の中心体へ逆行輸送し、アグリソームとして“封入”する。このアグリソーム形成が ER ストレスの緩和、すなわち、細胞保護的に機能していることを近年明らかにした (Komatsu S, Biochem Biophys Res Commun. 2013)。

転移・再発乳癌治療に実臨床使用されているタキサン系抗癌剤は微小管の脱重合阻害作用を、また、ビンカアルカロイド系抗がん剤のビノレルビンは微小管の重合阻害作用を有することから、微小管輸送のスカフォールド (足場) が構築されなくなり、これにより unfolded protein の微小管輸送能も阻止されることが容易に予想される。研究代表者は、これら薬剤によるアグリソーム阻害効果が期待されることに着目し、プロテアソーム・オートファジー阻



害剤と併用することで、ER ストレス負荷を介した癌細胞死を強力に誘導するという発想に至った。さらに癌組織は、常に血管新生を必要とする低酸素・低栄養状態にあり、正常細胞に比較してオートファジー依存度が高く、かつ、恒常的に ER ストレスに曝されている。これより、癌細胞に対する「ER ストレス療法」の選択性が示唆される。

2. 研究の目的

細胞内の不良タンパク質 (unfolded protein) はユビキチン化され、プロテアソーム・オートファジーで分解される。この分解処理能を越えて蓄積する不良タンパク質は、微小管に沿って核近傍の中心体へ逆行輸送されて凝集塊 (アグリソーム) が形成される。研究代表者らは、乳癌細胞において①アグリソーム形成が小胞体 (ER) ストレスの緩和に寄与すること、② HDAC6 阻害剤によりアグリソーム形成阻害することで ER ストレス負荷を介したアポトーシスが強力に誘導される結果を得た。本研究ではアグリソーム形成過程における unfolded protein/aggregate の微小管輸送に着目し、微小管重合・脱重合とモータータンパク機能の観点より、効率的なアグリソーム阻害法を確立し、難治性乳癌の ER ストレス負荷を介した新規治療法の基盤形成を目指す。

3. 研究の方法

乳癌細胞をプロテアソーム阻害剤で処理するとアグリソームが形成される。このアグリソームの形成阻害による ER ストレス負荷を介した効率的な細胞死を誘導する手法を以下の順に従い確立する。① ER ストレスの定量解析法を確立する。②アグリソーム形成阻害の比活性の高い薬剤を、既存薬を中心に探索し、アグリソーム阻害剤とプロテアソーム阻害剤・オートファジー阻害剤の各薬剤の組み合わせにおける ER ストレス負荷とアポトーシス誘導能の相関性を検証する。これにより細胞死誘導の至適条件を決定し、in vivo の治療効果を検証ならびに臨床試験に向けての基礎データとする。

4. 研究成果

1) ER ストレス定量解析法の確立

ER ストレスの定量的モニタリング法の確立を試みた。転移性乳癌細胞株 MDA-MB231 細胞に ERAI-Venus ベクターを導入し、ER ストレスセンサー IRE1 に応答して XBP1 のスプライシングを受けて十分な Venus 蛍光強度を発現する安定導入株を樹立した。

様式 C-19, F-19-1, Z-19, CK-19 (共通)

これにライブセルイメージングシステム IncuCyte を連動させ、経時的に測定した Venus 蛍光強度を各時点の細胞密度で補正することで、ER ストレスの定量化が可能となった (図 1)。

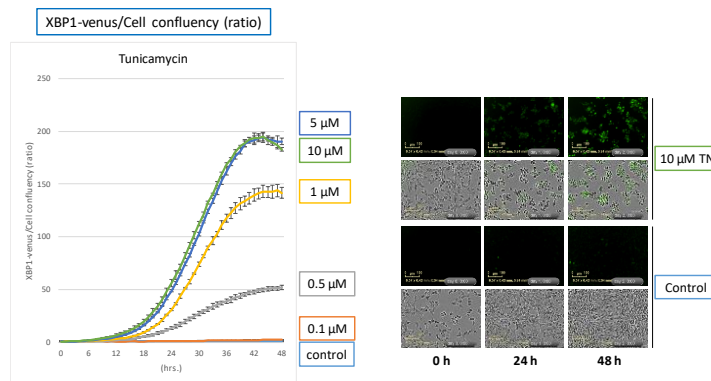


図 1. MDA-MB231-XBP1-Venus 細胞株に ER ストレス剤であるツニカマイシン (TN) を 0.1–10 μ M を添加し、経時的に XBP1-Venus の蛍光強度を測定し、細胞密度 (cell-confluency: C-C) で補正した。

2) プロテアソームとオートファジーならびにプロテアソームとアグリソームの同時阻害による ER ストレス負荷の評価

MDA-MB231-XBP1-Venus システムを用いて、プロテアソーム阻害剤としてボルテゾミブ (BZ), オートファジー阻害剤としてマクロライド抗生剤クラリスロマイシン (CAM) とアジスロマイシン (AZM) による ER ストレス負荷の定量を試みた。

BZ 単独と比較して、BZ+CAM, BZ+AZM との併用により ER ストレス負荷は著増した。ER ストレス増強効果は CAM が AZM より優っており、これと連動して殺細胞効果も増強した (図 2 A-C)。不良タンパク質 (Unfolded protein) は、HDAC6 とダイニン モータータンパク質との共同作用により微小管上を逆行輸送され、微小管形成中心に集簇しアグリソームが形成される。Unfolded protein 輸送の足場 (scaffold) となる微小管形成の阻害がアグリソーム形成阻害となることを想定し、微小管重合阻害剤ビノレルビン (VNR) と微小管脱重合阻害剤パクリタキセル (PTX) と BZ との併用効果を検討した。BZ+VNR は BZ+PTX に比べて ER ストレス負荷が増強し、かつ、殺細胞効果が増強した (図 2 D-F)。

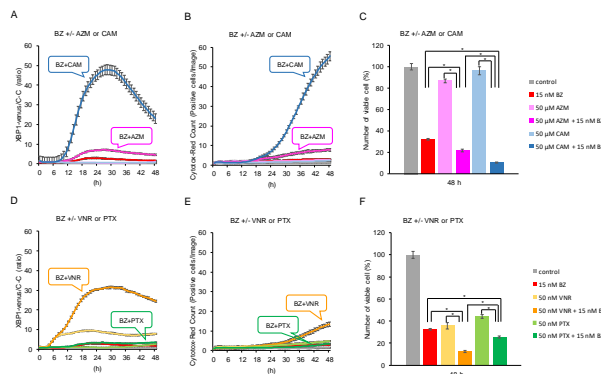


図 2. MDA-MB231-XBP1-Venus 細胞株を用いて A. BZ 単独 (15 nM), BZ+CAM (50 μ M), BZ+AZM (50 μ M) 併用による ER ストレス負荷と殺細胞効果 (B) ならびに生細胞数 (C) の比較検討を行った。D. BZ+VNR (50 nM), BZ+PTX (50 nM) の ER ストレス負荷ならびに殺細胞効果 (E) と生細胞数 (F) を検討した。

3) プロテアソーム, オートファジー, アグリソームの 3 者間の細胞内ネットワークを計画的に遮断することで ER ストレス負荷が増強し、強力な殺細胞効果が誘導される。

HDAC6 阻害活性を有するポリノスタット (SAHA) を用いて、以下の 3 剤のコンビネーションによる ER ストレス負荷の定量を行った。BZ±CAM±VNR あるいは BZ±CAM±SAHA, 3 剤併用は 2 剤のいかなる組み合わせの場合に比べて ER ストレス負荷が著増し、かつ殺細胞効果が増強した。

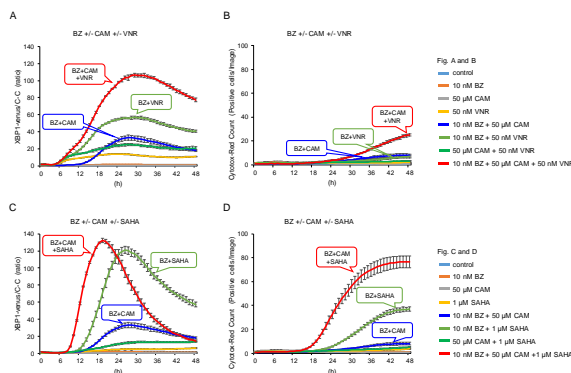


図 3. MDA-MB231-XBP1-Venus 細胞株を用いて BZ±CAM±VNR の ER ストレス負荷 (A) ならびに殺細胞効果 (B) を検討した。また、BZ±CAM±SAHA (1 μ M) の ER ストレス負荷 (C) ならびに殺細胞効果 (D) を検討した。

様式 C-19, F-19-1, Z-19, CK-19 (共通)

以上より、プロテアソーム、オートファジー、アグリソーム3者間の細胞内ネットワークが想定され、このネットワークを効率的に遮断することで、ERストレス負荷を介した強力な殺細胞効果を誘導することが明らかとなった(図4)。

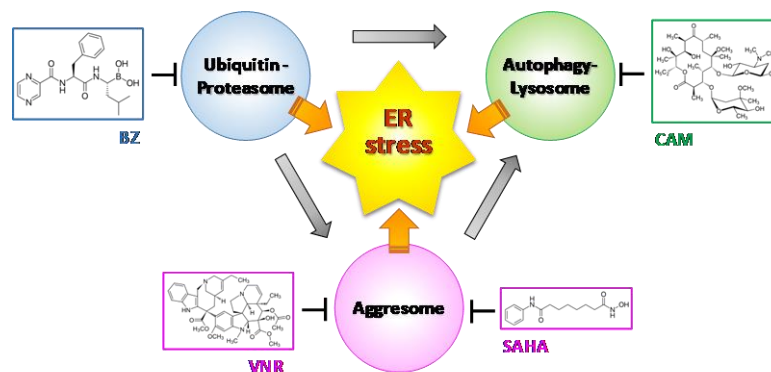


図4. プロテアソーム、オートファジー、アグリソームの細胞間ネットワーク

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

1. Ota K, Okuma T, Lorenzo A D, Yokota A, Hino H, [Kazama H](#), Moriya S, Takano N, Hiramoto M, Miyazawa K. Fingolimod sensitizes EGFR wild-type non-small cell lung cancer cells to lapatinib or sorafenib and induces cell cycle arrest. *Oncol Rep.* 2019. doi: 10.3892/or.2019.7140. 査読有.
2. [Kazama H](#), Hiramoto M, Miyahara K, Takano N, Miyazawa K. Designing an effective drug combination for ER stress loading in cancer therapy using a real-time monitoring system. *Biochem Biophys Res Commun.* 501:286-292. 2018. doi:10.1016/j.bbrc.2018.05.001. 査読有.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Mukai S, Moriya S, Hiramoto M, [Kazama H](#), Kokuba H, Che Xiao-Fang, Yokoyama T, Sakamoto S, Sugawara A, Sunazuka T, Omura S, Handa H, Itoi T, Miyazawa K. Macrolides sensitize EGFR-TKI-induced non-apoptotic cell death via blocking autophagy flux in pancreatic cancer cell lines. *Int J Oncol.* 48:45-54. 2016. doi: 10.3892/ijo.2015.3237. 査読有.

[学会発表] (計 6 件)

1. 宮原 か奈, [風間 宏美](#)他, 再発乳癌に対する「小胞体ストレス負荷療法」の確立を目的としたMDA-MB-231-ERAI-venus システムの応用, 第26回 日本乳癌学会学術総会, 2018.
2. [風間 宏美](#)他, MB231-ERAI-venus システムを用いた難治性乳癌に対する「ERストレス負荷療法」の確立, 第180回 東京医科大学医学会総会, 2017.

様式 C-19, F-19-1, Z-19, CK-19 (共通)

3. Hiromi Kazama 他, Determination of effective combination of agents for ER-stress loading in breast cancer cells with ERAI-venus system, 第76回 日本癌学会, 2017.
4. 宮原 か奈, 風間 宏美他, 乳癌細胞株におけるアグリソーム形成を標的としたボルテゾミブとビノレルビンの併用療法の有効性, 第25回 日本乳癌学会学術総会, 2017.
5. 宮原 か奈, 風間 宏美他, 転移性乳癌に対するアグリソームを標的とする新規治療薬の可能性, 第26回 日本癌病態治療研究会, 2017.
6. 宮原 か奈, 風間 宏美他, 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.

[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 分子標的探索センター (東京医科大学 生化学分野内)
<http://www.tokyo-med.ac.jp/target/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：ローマ字氏名：

※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。