

令和 4 年 10 月 14 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15031

研究課題名（和文）マクロライド系抗生剤のオートファジー阻害活性を利用したがん幹細胞標的療法の確立

研究課題名（英文）Establishment of cancer stem cell targeting therapy using autophagy inhibitory activity of macrolide antibiotics

研究代表者

高野 直治（Takano, Naoharu）

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：80445410

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究にて、マクロライド系抗生物質であるアジスロマイシンのオートファジー阻害における細胞内標的の1つを明らかとし、オートファジー阻害機構の1つを明らかとした。また、他のオートファジー阻害薬と比較し、どのステップでオートファジーが阻害されるのか詳細に示した。興味深いことに、HCQと異なり、がん幹細胞能力の維持・誘導に必要と言われているHIF-1aの発現を誘導しない阻害薬であることを示した。その他、マウスを用いた実験により、in vivoの系においても経口投与でオートファジー阻害効果を発揮し、抗腫瘍効果を示すことができ、将来における臨床応用への展開を示すことができたと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、がんにおけるオートファジーの様々な役割が明らかとなり、オートファジー阻害薬ががん治療の候補の1つに挙げられているが、実際に臨床で用いることのできるオートファジー阻害薬は1つしか無く、また、副作用が存在することもあり、臨床で用いることのできる新しいオートファジー阻害薬の開発は選択肢を増やす上でも非常に有用であり、望まれていることである。AZMは抗生物質として長年臨床の場で用いられた薬剤であり、また、本研究で明らかとなったAZMのオートファジー阻害効果の詳細は、AZMをオートファジー阻害薬として臨床応用する上での重要な意義を持つと考えられる。

研究成果の概要（英文）：This study revealed the intracellular target of azithromycin (AZM) for autophagy inhibition, and clarified one of the mechanisms how AZM inhibited autophagy. Additionally, we compared the autophagy inhibitory effect with other autophagy inhibitors, HCQ and Bafilomycin, and showed in which point AZM disrupted the autophagy. Particularly, unlike HCQ, we showed that AZM did not induce HIF-1a which is an important gene to sustain and promote cancer stem cell ability. Moreover, we also showed that AZM inhibited autophagy in transplanted tumors by oral administration, and suppressed tumor growth with xenograft mice model. These data show that AZM can be a good candidate for cancer therapy.

研究分野：代謝

キーワード：マクロライド オートファジー がん

1. 研究開始当初の背景

細胞内には、ユビキチン・プロテアソーム系とオートファジー・リソソーム系の2つの主要なタンパク質分解機構が存在する。研究代表者の所属する研究室では、これらの分解系を同時に阻害することで、細胞内タンパク質産生と分解のバランスを崩し、過度の小胞体(ER)ストレスからアポトーシスが誘導されることを、様々な難治性腫瘍由来がん細胞株を用いて明らかとしてきた。また、2つの分解系を同時に阻害すると、蓄積した不良タンパク質が微小管形成中心に集簇しアグリソームが形成される。ここで HDAC6 阻害剤等でアグリソーム形成をさらに阻害することで、ER ストレス負荷による細胞死がより強力に誘導されることを明らかとした。さらに、これらの一連の実験でマクロライド系抗生剤が本来の抗菌効果とは別にオートファジー抑制能を持つことを発見し、また、単剤投与では細胞毒性を示さないが、プロテアソーム阻害剤との併用投与によって ER ストレスを介した殺がん細胞効果を増強する、という非常にユニークな薬剤であることを明らかとした。(Komatsu S, *et al.* Biochem Biophys Res Commun. 2013 など)

研究代表者の研究室のこれまでの知見より、マクロライドの「オートファジー阻害剤」としてのがん治療への応用は、今後、様々な領域で展開可能と考えられ、その使用用途は極めて広汎であることが予想された。

近年、がんの増殖・悪性化にオートファジーが関わっていることが明らかとなり、オートファジーが癌治療の有望な標的となっている。またさらに、低栄養・低酸素条件下で生存する「がん幹細胞」のオートファジー依存度が高いことも知られている(Gong C, *et al.* Oncogene. 2013; Galavotti S, *et al.* Oncogene. 2013)。現在のがん化学療法の課題は、治療後の再発とそれに続く悪性度の上昇である。その一因は、がん幹細胞が化学療法を生き残り、耐性を獲得し再増殖するためであり、この耐性獲得化にもオートファジーの亢進が関与していると考えられている。これよりオートファジー阻害剤の開発と、オートファジー阻害剤を含む多剤併用療法の確立が、がんの根治に向けた新たな課題となっている(Lin YH, *et al.* Cancer Chemother Pharmacol. 2015)。

現在、認可されているオートファジー抑制剤はクロロキン、およびその誘導体であるヒドロキシクロロキンのみである。そして、オートファジー抑制能を持つリソソーム阻害剤のクロロキン(CQ)を用いた癌の多剤併用療法が米国などで臨床試験に進んでいる。一方で、CQによるリソソーム阻害効果は、期待されたオートファジー抑制効果とは別に、がんの悪性度と大きく関わる転写因子、Hypoxia inducible factor (HIF)の発現を増強させ、がん幹細胞の増加を促すとの報告がある。さらに、酸性環境下にある腫瘍細胞に対しては抗腫瘍効果を発現しないなど、CQを用いた多剤併用療法には課題が残る。

オートファジーが有力ながん治療の標的になるとしても、現在オートファジー抑制剤の選択肢が無い状態であり、新しいオートファジー抑制剤の開発が強く望まれている状況である。

2. 研究の目的

本研究では、マクロライド系抗生物質の1つ、アジスロマイシンのがん治療における「オートファジー阻害剤」としての臨床応用を目的として、その阻害活性における「標的分子」を同定し、パスウェイ解析により分子作用機序を明らかにする。さらに、免疫不全マウスを用いた腫瘍移植モデルを用いてマクロライドの抗腫瘍効果と、がん幹細胞への増殖抑制効果を検証する。そして、現在唯一認可されているオートファジー抑制剤の HCQ と比較検討を行うことにより、既存のオートファジー阻害剤と何が同じで何が異なるのか検証を行い、臨床応用への足掛かりを目指す。

3. 研究の方法

本研究では、マクロライド系抗生剤を「オートファジー抑制剤」としてがん治療に用いることを目指し、以下の実験を行う。

- (1) マクロライド系抗生剤の1つアジスロマイシンの細胞内標的タンパク質を同定する。
- (2) アジスロマイシン標的タンパク質がオートファジーに関与しているか検証する。
- (3) アジスロマイシンのオートファジー抑制メカニズムを解明する。
- (4) 免疫不全マウスを用いたがん細胞移植モデルにて、マクロライドを用いた抗腫瘍効果を検証する。
- (5) マクロライド抗生剤の、がん幹細胞への影響を調べる。

4. 研究成果

(1) アジスロマイシン(AZM)を FG ビーズへ固定し、ビーズへ結合するタンパク質を細胞抽出液から単離し、LC-MS/MS で同定することにより、複数の細胞内標的タンパク質の候補を得ることができた。また、それらのタンパク質が AZM に結合することを、リコンビナントタンパク質を作成し検証した。特に、protein-X について詳細に検討することとした。

(2) 細胞内標的タンパク質の候補である protein-X が AZM によるオートファジー抑制に関与しているか検証するため、gene-X のノックダウンを行い、オートファジーを評価した。すると、オートファゴソームタンパク質、リソソームタンパク質の蓄積が Western blotting および、細胞免疫染色で観察され、gene-X の阻害がオートファジー抑制を引き起こすことを示した。また、AZM 処理により、細胞内 protein-X のダイナミックな動きが阻害されることから、AZM が実際に細胞

内において protein-X を阻害していることが示唆され、以上の結果から、AZM が protein-X の機能阻害を介したオートファジー抑制を行っていることが示された。

(3) AZM によるオートファジー抑制メカニズムをより詳細に検証するため、オートファジーに関与するオートファゴソーム、リソソーム、オートリソソームの細胞内動態、機能についてより詳細に HCQ, Bafilomycin と比較検証した。AZM はオートファゴソームとリソソームの融合によるオートリソソーム形成の阻害は行わないことが明らかとなった。一方で、リソソーム機能を阻害することでオートファジーを阻害する事、そして、細胞内にリソソーム、オートリソソームの蓄積を引き起こすことが明らかとなった。これらの現象は、HCQ によるオートファジー抑制の結果に近いが、リソソームの酸性化の阻害およびオートリソソーム形成を阻害する Bafilomycin とは異なる効果であることが明らかとなった。

(4) AZM による抗腫瘍効果を検証するため、がん細胞を移植した免疫不全マウスに AZM を経口投与し、腫瘍の成長を評価した。その結果、AZM 経口投与によって腫瘍の成長が優位に抑制されたこと、また、摘出した腫瘍内におけるオートファジーの抑制が観察され、*in vivo* モデルにおける AZM の抗腫瘍効果が示された。

(5) AZM 投与によるがん幹細胞への影響を検証した。がん細胞へオートファジー阻害効果を持つ HCQ と AZM を投与し、がん幹細胞マーカー遺伝子の発現を比較した。すると、HCQ では幹細胞マーカーである CD133 の発現が上昇するが、一方で AZM 処理ではこの上昇が見られなかった。HCQ 処理では過去に報告があるように HIF-1 α の発現上昇が見られたが、AZM では HIF-1 α の発現が上昇しなかった。この原因について詳細に調べたところ、両薬剤で chaperon mediated autophagy (CMA) への阻害効果が異なることが明らかとなった。これにより HIF-1 α の発現に差が生じ、CD133 の発現の差が生じたと考えられる。今後より詳細な CMA への影響、および幹細胞能力への影響について今後明らかとしたい。

以上の結果から、AZM のオートファジー抑制における細胞内標的が複数存在することが示唆され、その1つを介したオートファジー抑制機構を示すことができた。また、既存のオートファジー抑制剤と比較しながら AZM によるオートファジー阻害の詳細を調べることにより、既存のオートファジー抑制剤である HCQ との類似点および異なる点を示すこともできた。これは、将来オートファジー抑制剤を選択する上で、特にどのような薬剤と組み合わせるかを考える際の指標となると考えられる。そして *in vivo* モデルを用いて、経口投与による抗腫瘍効果を示すことができたことから、将来がん治療におけるオートファジー抑制剤の選択肢の1つとして用いることができる可能性を示すことができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Xiang Lisha, Mou Jun, Shao Bin, Wei Yuquan, Liang Houjie, Takano Naoharu, Semenza Gregg L., Xie Ganfeng	4. 巻 10
2. 論文標題 Glutaminase 1 expression in colorectal cancer cells is induced by hypoxia and required for tumor growth, invasion, and metastatic colonization	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Death & Disease	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41419-018-1291-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Kazama Hiromi, Hiramoto Masaki, Miyahara Kana, Takano Naoharu, Miyazawa Keisuke	4. 巻 501
2. 論文標題 Designing an effective drug combination for ER stress loading in cancer therapy using a real-time monitoring system	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 286 ~ 292
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.05.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Saito Yu, Moriya Shota, Kazama Hiromi, Hirasawa Kazuhiro, Miyahara Kana, Kokuba Hiroko, Hino Hirotsugu, Kikuchi Hiroyuki, Takano Naoharu, Hiramoto Masaki, Tsukahara Kiyooki, Miyazawa Keisuke	4. 巻 52
2. 論文標題 Amino acid starvation culture condition sensitizes EGFR-expressing cancer cell lines to gefitinib-mediated cytotoxicity by inducing atypical necroptosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Oncology	6. 最初と最後の頁 1165-1177
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ijo.2018.4282	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ota Kohki, Okuma Takashi, Lorenzo Alberto, Yokota Ayuka, Hino Hirotsugu, Kazama Hiromi, Moriya Shota, Takano Naoharu, Hiramoto Masaki, Miyazawa Keisuke	4. 巻 42
2. 論文標題 Fingolimod sensitizes EGFR wild?type non?small cell lung cancer cells to lapatinib or sorafenib and induces cell cycle arrest	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 231-242
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/or.2019.7140	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miyazawa Shinsuke, Moriya Shota, Kokuba Hiroko, Hino Hirotsugu, Takano Naoharu, Miyazawa Keisuke	4. 巻 27
2. 論文標題 Vitamin K2 induces non-apoptotic cell death along with autophagosome formation in breast cancer cell lines	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Breast Cancer	6. 最初と最後の頁 225 ~ 235
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12282-019-01012-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Teraoka Saeko, Muguruma Masako, Takano Naoharu, Miyahara Kana, Kawate Takahiko, Kaise Hiroshi, Yamada Kimito, Miyazawa Keisuke, Ishikawa Takashi	4. 巻 250
2. 論文標題 Association of BRCA Mutations and BRCAness Status With Anticancer Drug Sensitivities in Triple-Negative Breast Cancer Cell Lines	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Surgical Research	6. 最初と最後の頁 200 ~ 208
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jss.2019.12.040	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka Hideki, Hino Hirotsugu, Moriya Shota, Kazama Hiromi, Miyazaki Masaya, Takano Naoharu, Hiramoto Masaki, Tsukahara Kiyooki, Miyazawa Keisuke	4. 巻 22
2. 論文標題 Comparison of autophagy inducibility in various tyrosine kinase inhibitors and their enhanced cytotoxicity via inhibition of autophagy in cancer cells in combined treatment with azithromycin	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 100750 ~ 100750
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2020.100750	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hino Hirotsugu, Iriyama Noriyoshi, Kokuba Hiroko, Kazama Hiromi, Moriya Shota, Takano Naoharu, Hiramoto Masaki, Aizawa Shin, Miyazawa Keisuke	4. 巻 Apr 17
2. 論文標題 Abemaciclib induces atypical cell death in cancer cells characterized by formation of cytoplasmic vacuoles derived from lysosomes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14419	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Naoharu Takano, Masaki Hiramoto, Keisuke Miyazawa
2. 発表標題 Identification of intracellular target of azithromycin as an autophagy inhibitor.
3. 学会等名 第77回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hirotsugu Hino, Hiromi Kazama, Shota Moriya, Naoharu Takano, Masaki Hiramoto, Keisuke Miyazawa
2. 発表標題 Lysosome-targeted cytotoxic effect of CDK4/6 inhibitor abemaciclib
3. 学会等名 第77回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masaki Hiramoto, Hirotsugu Hino, Mayumi Tokuhisa, Hiromi Kazama, Naoharu Takano, Keisuke Miyazawa
2. 発表標題 Searching for molecular targets of gefitinib for autophagy regulation
3. 学会等名 日本生化学会 第91回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiromi Kazama, Masaki Hiramoto, Kana Miyahara, Naoharu Takano, Keisuke Miyazawa
2. 発表標題 Determination of effective combination of agents for ER-stress loading in breast cancer cells with ERAI-venus system
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yu Saito, Shota Moriya, Hiromi Kazama, Kazuhiro Hirasawa, Kana Miyahara, Naoharu Takano, Masaki Hiramoto, Kiyooki Tsukahara, Keisuke Miyazawa
2. 発表標題 Amino Acids Starvation Enhances Gefitinib-Induced Cytotoxicity in EGFR-Expressing Cancer Cells via Atypical Necroptosis
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山本 雄広、伊藤 真衣、高野 直治、石渡 恭子、倉堀 智一、末松 誠
2. 発表標題 翻訳後修飾を介した解糖系酵素PKM2の核移行メカニズムの解析
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 日野 浩嗣、入山 規良、國場 寛子、風間 宏美、森谷 昇太、高野 直治、平本 正樹、宮澤 啓介
2. 発表標題 CDK4/6阻害薬abemaciclibはmethuosis様の細胞死を誘導する
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Naoharu Takano, Kana Miyahara, Hiromi Kazama, Hirotsugu Hino, Masaki Hiramoto, Masahiko Kuroda, Takashi Ishikawa, Keisuke Miyazawa
2. 発表標題 Mitochondrial damage induces BRCA1 degradation in breast cancer cells
3. 学会等名 第78回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hirotsugu Hino, Hiromi Kazama, Shota Moriya, Naoharu Takano, Masaki Hiramoto, Keisuke Miyazawa
2. 発表標題 Lysosome-targeted atypical cell-death with vacuolar formation by CDK4/6 inhibitor abemaciclib
3. 学会等名 第78回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masaki Hiramoto, Naoharu Takano, Hiromi Kazama, Hirotsugu Hino, Keisuke Miyazawa
2. 発表標題 Actin cytoskeleton reorganization mediated by a cellular target of gefitinib.
3. 学会等名 第78回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高野直治、宮原か奈、山田裕美子、風間宏美、徳久真弓、日野浩嗣、藤田浩司、Edward Barroga, 平本正樹、半田宏、黒田雅彦、石川孝、宮澤啓介
2. 発表標題 乳がん細胞におけるミトコンドリアダメージによって誘導されるBRCA1の新規分解機構
3. 学会等名 第92回大会 生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 日野 浩嗣、入山 規良、國場 寛子、風間 宏美、森谷 昇太、高野 直治、平本 正樹、宮澤 啓介
2. 発表標題 CDK4/6阻害薬abemaciclibによるリソソーム由来の空胞形成を伴った新規細胞死誘導
3. 学会等名 第92回大会 生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kana Miyahara, Naoharu Takano, Yumiko Yamada, Hiromi Kazama, Mayumi Tokuhisa, Hirotsugu Hino, Koji Fujita, Edward Barroga, Masaki Hiramoto, Hiroshi Handa, Masahiko Kuroda, Takashi Ishikawa, Keisuke Miyazawa
2. 発表標題 BRCA1 degradation in response to mitochondrial damage in breast cancer cells
3. 学会等名 AACR Annual Meeting 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Naoharu Takano, Yumiko Yamada, Mayumi Tokuhisa, Hirotsugu Hino, Masaki Hiramoto, Keisuke Miyazawa.
2. 発表標題 Identification of the molecular target of azithromycin as an autophagy inhibitor and its potential application in cancer therapeutics
3. 学会等名 AACR Annual Meeting 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関