

令和 4 年 6 月 4 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07107

研究課題名(和文) 骨髄腫に治療抵抗をもたらす微小環境オートファジーの解明と、その阻害に基づく新治療

研究課題名(英文) Autophagy targeted therapies for myeloma treatment in the bone marrow microenvironment.

研究代表者

森谷 昇太 (Moriya, Shota)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：30634935

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)：微小環境誘導性薬剤耐性の解明を目指し、間質細胞株と骨髄腫株の共培養実験を実施した。ボルテゾミブ(BZ)の骨髄腫株に対する殺細胞作用は間質細胞株の存在下で大きく減弱した。しかし、オートファジー阻害作用を持つクラリスロマイシン(CAM)を併用投与すると、骨髄腫株への殺細胞作用が増強した。BZ+CAM併用はERストレス、ROSおよびアポトーシス促進タンパク質NOXAを増強した。NOXAはERストレスによる転写制御のみならず、オートファジー系の分解制御を受けており、CAMはNOXAの細胞内分解も阻害することが示唆された。微小環境のオートファジー阻害は骨髄腫の治療成績の改善につながる可能性が示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多発性骨髄腫の治療目標は「完治」でなく「延命」となる。特に、BZと免疫調節薬(IMiDs)に耐性を獲得した症例の予後は極めて不良である。この原因の一つが微小環境であり、一刻も早い解明が求められている。本研究で見出されたBZとCAMの併用投薬は間質細胞株の存在下においても強力な殺細胞作用を誘導した。また、微小環境による薬剤耐性の原因として骨髄腫へのROS負荷、ERストレス負荷、NOXA誘導の減弱作用の存在が示唆され、オートファジー阻害作用を持つCAMはこれらを著しく増大させた。本研究成果を発展させ、オートファジーを標的とした治療法を開発することは骨髄腫の治療成績の改善に繋がる可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：To investigate bone marrow microenvironment-induced drug resistance, we examined co-culture of myeloma cells with bone marrow stromal cells. The cytotoxic effect of bortezomib (BZ) on myeloma cells was significantly attenuated in the presence of stromal cells. However, combined treatment with clarithromycin (CAM), an autophagy inhibitor, enhanced cytotoxic effects on myeloma cells even in the presence of stromal cells. Combined treatment with BZ and CAM enhanced ER stress, ROS and the pro-apoptotic protein NOXA, which is downstream of ER stress. We showed that NOXA is not only transcriptionally regulated by ER stress but also regulated by autophagic degradation. This result suggests that CAM also inhibits autophagic degradation of NOXA. Targeting autophagy in the bone marrow microenvironment may lead to improved outcomes in myeloma therapy.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：多発性骨髄腫 オートファジー ボルテゾミブ プロテアソーム 微小環境 マクロライド クラリスロマイシン 小胞体ストレス

1. 研究開始当初の背景

多発性骨髄腫は難治性の造血器腫瘍であり、単クローン性免疫グロブリンの異常産生を特徴とする。この治療に Bortezomib (Velcade®、以下 BZ) をはじめとするプロテアソーム阻害剤が使用されている。かつて骨髄腫は「3年生存」を目標とするほど予後不良の疾患だったが、プロテアソーム阻害剤の登場により長期生存を視野に入れた治療が可能となった。しかし、完治不能であることに依然変わりはなく、革新的な治療方法の開発が求められている。

骨髄腫が難治性である原因の一つに骨髄腫細胞と間質細胞の相互作用により生じる微小環境がある。骨髄腫細胞が間質細胞に接着することにより微小環境誘導性薬剤抵抗 (CAM-DR: cell adhesion-mediated drug resistance) が生じるが、その詳細な分子機構は明らかではない。

これまでに、研究代表者はクラリスロマイシン (CAM) をはじめとするマクロライド抗生剤がオートファジーの阻害作用を持つことを明らかにした。また、BZ がオートファジーを誘導することおよび、BZ に CAM を併用投与することにより、「細胞内二大タンパク質分解系」を同時阻害することで、骨髄腫細胞株に対して、小胞体 (ER) ストレス負荷を介した細胞死が強力に誘導することを報告してきた (Moriya S, et al. Int J Oncol. 2013.2015)。

研究代表者が見出した BZ と CAM の併用による本投与法は骨髄腫間質細胞の存在下においても、骨髄腫細胞株に強力な殺細胞作用を生じることが予備実験において認められていた。また、骨髄腫細胞株と間質細胞株を共培養後、両細胞を分画すると、骨髄腫のみならず、間質細胞においてもオートファジーが誘導されており、CAM-DR におけるオートファジーの関与が示唆されていた。

2. 研究の目的

本研究では、骨髄腫細胞株と間質細胞株の共培養実験をモデルに、骨髄腫微小環境の分子病態の解明を目指し、これまで研究代表者が見出してきた BZ と CAM の併用投薬法の有効性を検証することで、CAM-DR 克服に向けた基盤形成を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

1) 骨髄腫細胞株と間質細胞株の共培養実験による殺細胞作用の解析

骨髄腫細胞株 (RPMI8226, IM-9, KMS-12-PE) を pEGFP-C1 vector で標識後、G418 セレクションを行い、EGFP 安定発現株を樹立した。本細胞株を間質細胞株 (LP101, AA101, 日本大学 相澤信教授より供与) の単層レイヤー上に播種し、薬剤 (BZ, CAM) を投与後、フローサイトメーターにて EGFP 陽性の細胞数を定量することにより殺細胞作用を評価した。

2) タンパク質発現解析および遺伝子発現解析

間質細胞株を裏返したセルカルチャーインサート (Greiner, ポア径 0.4µm) 上に播種し、間質細胞株のレイヤーを形成させた後、インサートをマルチウェルプレートに正しい向きで装着し、インサートの内側に骨髄腫細胞株を播種した。これにより、0.4µm のインサートの微細孔を通して、間質細胞株と骨髄腫細胞株が直接接着できる環境を構築した。培養系に薬剤 (BZ, CAM) を投与後、骨髄腫細胞を回収し、タンパク質および mRNA を精製した。本サンプルを Western Blotting 法および Real time PCR 法において ER ストレス関連遺伝子群 (GRP78, CHOP, ATF3, ATF4, GADD34, NOXA) を中心に解析した。

3) 遺伝子欠損細胞株の樹立

pSpCas9 (BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 vector (Addgene) を使用し、骨髄腫細胞株の NOXA 欠損株および 293T 細胞株 (ヒト胎児由来腎臓上皮細胞) の ATG5 欠損細胞株を樹立した。

4) NOXA の半減期解析

骨髄腫細胞株に薬剤 (BZ, CAM) を投与後、タンパク質の翻訳阻害剤である cycloheximide (CHX) を併用添加し、経時的にタンパク質を回収し、Western Blotting 法にて NOXA の半減期を解析した。また、内在性 promoter による転写制御の影響を排除した解析を行うために、CMV-promoter で制御される Flag-NOXA vector を構築した。293T 細胞およびオートファジー欠損 293T 細胞に Flag-NOXA を導入することで、Flag-NOXA のターンオーバーにおけるオートファジーの関与を解析した。

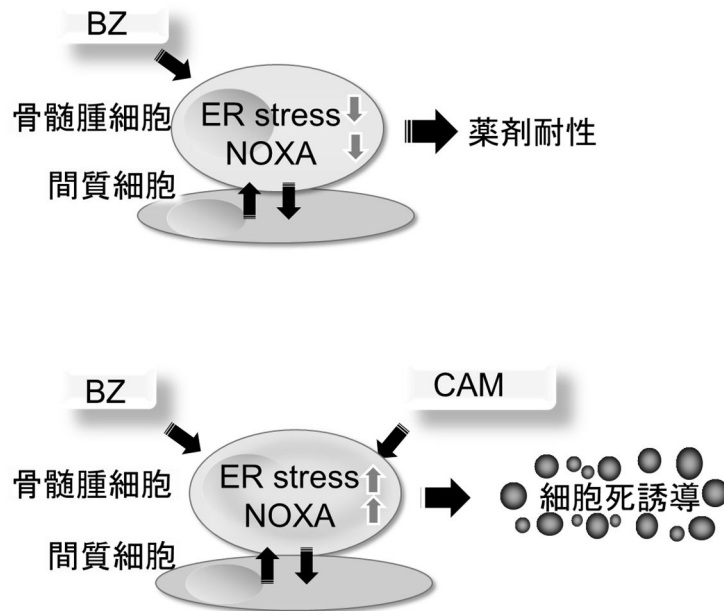
5) 細胞内活性酸素種 (ROS) の定量評価

EGFP 安定発現骨髄腫細胞株を間質細胞株のレイヤー上に播種し、薬剤 (BZ, CAM) を投与した。培養後、ROS の赤色蛍光染色試薬である Dihydroethidium を用いて細胞を染色した。フローサイトメーターにて EGFP 陽性の骨髄腫細胞株をゲーティングし、赤色蛍光の蛍光強度を測定することで、骨髄腫細胞株の ROS 負荷を定量評価した。

4. 研究成果

- 1) **BZとCAMの併用は間質細胞株の存在下においても骨髄腫細胞株の殺細胞作用を増強する**
間質細胞のレイヤー上に骨髄腫細胞株を播種し、BZを投与し、フローサイトメーターでEGFP陽性の骨髄腫細胞株の数を定量した。骨髄腫単独培養時はBZにより強力な細胞死誘導が認められたが、骨髄腫細胞株を間質細胞株と共培養すると、BZの骨髄腫細胞株に対する殺細胞作用が減弱しておりCAM-DRによる薬剤抵抗が生じたものと考えられた。しかしながら、BZにオートファジー阻害作用を持つマクロライド抗生剤であるCAMを併用添加すると、間質細胞株の存在下においても骨髄腫細胞株に強力な殺細胞作用が認められた。間質細胞への影響は軽微であった。これにより、CAM-DR克服へのBZとCAM併用療法の有効性が示唆された。
- 2) **BZとCAMの併用はERストレスを増強し、細胞死促進タンパク質NOXAを誘導する**
研究代表者らはBZとCAMの併用における殺細胞増強作用の分子基盤として、細胞内二大タンパク分解系の同時阻害によるERストレス負荷の増大を報告してきた。骨髄腫細胞株にBZとCAMを併用添加し、Western Blotting法およびReal time PCR法においてタンパク質や遺伝子発現量を検討すると、従来報告してきたCHOPやGRP78といった遺伝子群の発現増強を認め、新規にERストレス性転写因子であるATF3の増強ならびに、ERストレスによって転写制御されることが報告されている細胞死促進タンパク質NOXAの増大を認めた。
- 3) **NOXAの欠損はBZおよびBZとCAMの併用による殺細胞増強作用を大きく阻害する**
(2)において、殺細胞作用に関与する因子として新規にNOXAの関与が示唆されたため、CRISPER/Cas9を用いて骨髄腫細胞株のNOXA欠損株を樹立した。NOXA欠損株ではBZおよびBZとCAMの併用による殺細胞作用が大きく阻害された。このため、本併用投薬法においてNOXAの増大の関与が示唆された。
- 4) **間質細胞は骨髄腫細胞のROS負荷を減弱し、ERストレス負荷およびNOXAを減弱する。**
骨髄腫細胞株と間質細胞株を、セルカルチャーインサートを用いて共培養し、薬剤(BZ,CAM)を投与後、両細胞を分画し、骨髄腫細胞株からタンパク質およびmRNAを回収した。発現量を行うと、骨髄腫単独培養時には(2)の通り、BZによりERストレス関連タンパク質/遺伝子群の発現増強を認めた。しかし、間質細胞株と共培養するとこれらの発現量は著しく減弱した。しかしながら、ここにオートファジー阻害作用を持つCAMを併用添加すると、間質細胞株存在下においても骨髄腫細胞株にERストレスやNOXAの増大が認められた。

次に骨髄腫細胞株にBZを投与後、細胞内のROS負荷をROS測定プローブであるDihydroethidiumにおいて検討すると、BZによる骨髄腫細胞株への強力なROS負荷増大が認められた。しかしながら、間質細胞の存在下では、ROS負荷が有意に減弱していた。また、ROSの緩和剤であるNACの添加はBZによるERストレス関連遺伝子/タンパク質の発現を減弱させ、NOXAの誘導を阻害した。以上の結果より、微小環境による薬剤抵抗の原因の一つに、ROSおよびERストレス負荷減弱が関与するものと考えられ、ERストレスにより転写制御されるNOXAもこれら一連の経路に相関して減弱したものと考えられた。
- 5) **NOXAはプロテアソームおよびオートファジーによる分解制御を受ける**
NOXAは従来、プロテアソーム系による分解制御を受けることが報告されていた。そこでNOXAの細胞内半減期を解析するために、タンパク質翻訳阻害剤であるcycloheximideによるchase解析を行った。薬剤非添加および、BZ,CAM単剤ではNOXAの細胞内半減期は3時間ほどであったが、BZとCAMを併用するとNOXAの細胞内半減期の延長が認められた。また、内在性プロモーターの転写制御を受けないFlag-NOXA vectorを構築し、293T細胞およびオートファジー関連遺伝子であるATG5を欠損させた293T細胞への導入を試みたところ、control 293T細胞においてはFlag-NOXAの発現量は低く保たれており、薬剤(BZ,CAM)処理により、内在性NOXAと相関した変動を示した。しかし、ATG5欠損細胞株においてはFlag-NOXAの発現量はcontrol細胞株よりも高く保たれており、BZ単独により著しく増大した。そのため、NOXAはプロテアソーム系のみならず、オートファジーによる分解制御を受けるものと思われた。
- 6) **間質細胞側のオートファジー**
骨髄腫細胞株と間質細胞株を共培養後、両細胞を分画して解析すると、間質細胞側にもオートファジーが誘導されるという予備的知見を得ていた。CAMは間質細胞側のオートファジーも抑制している可能性が考えられる。しかしながら、本研究期間中には十分な解析を行うことができなかった。本項目は引き続き解析を続ける予定である。



研究成果の概略図：

間質細胞と骨髓腫細胞株の相互作用は骨髓腫細胞株のERストレス負荷や、ERストレスの下流に存在する細胞死促進タンパク質NOXAの発現を低下させており、CAM-DRの原因の一つであると考えられた。BZによるプロテアソーム系の阻害と、CAMによるオートファジー系の阻害は、間質細胞の存在下においても骨髓腫のERストレス負荷を増大させた。またNOXAはプロテアソーム系のみならず、オートファジー系による分解制御を受けており、BZとCAMの併用はNOXAの増大および分解抑制を介して骨髓腫細胞株に強力な細胞死を誘導した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Hino Hirotsugu, Iriyama Noriyoshi, Kokuba Hiroko, Kazama Hiromi, Moriya Shota, Takano Naoharu, Hiramoto Masaki, Aizawa Shin, Miyazawa Keisuke	4. 巻 111
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 2132 ~ 2145
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takeda Atsuo, Takano Naoharu, Kokuba Hiroko, Hino Hirotsugu, Moriya Shota, Abe Akihisa, Hiramoto Masaki, Tsukahara Kiyooki, Miyazawa Keisuke	4. 巻 57
2. 論文標題 Macrolide antibiotics enhance the antitumor effect of lansoprazole resulting in lysosomal membrane permeabilization-associated cell death	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Oncology	6. 最初と最後の頁 1280 ~ 1292
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ijo.2020.5138	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 Mierxiati Saimi, Shota Moriya, Zhong-Lian Li, Hidenobu Miyaso, Kenta Nagahori, Shinichi Kawata, Takuya Omotehara, Yuki Ogawa, Hirotsugu Hino, Keisuke Miyazawa, Kou Sakabe, Masahiro Itoh	4. 巻 Apr 20;46(1)
2. 論文標題 Cytonuclear Estrogen Receptor Alpha Regulates Proliferation and Migration of Endometrial Carcinoma Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Tokai J Exp Clin Med.	6. 最初と最後の頁 7 ~ 16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 該当する

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 Jul;42(1)
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 該当する

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 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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 鳥山 和俊, 阿部 信二, 高野 直治, 風間 宏美, 森谷 昇太, 宮澤 啓介
2. 発表標題 DNA-damaging drugs in combination with a macrolide antibiotic enhance cytotoxicity for nonsmall cell lung cancer cells
3. 学会等名 第185回東京医科大学医学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 服部 和裕, 塚原 清彰, 高野 直治, 風間 宏美, 森谷 昇太, 宮澤 啓介
2. 発表標題 頭頸部扁平上皮癌細胞株に対するHDAC6阻害剤とプロテアソーム阻害剤との相乗的殺細胞効果と非アポトーシス誘導の分子メカニズムの検討
3. 学会等名 第185回東京医科大学医学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名	Mierxiati Saimi, Shota Moriya, Zhong-Lian Li, Hidenobu Miyaso, Kenta Nagahori, Shinichi Kawata, Takuya Omotehara1, Yuki Ogawa1, Hirotsugu Hino, Keisuke Miyazawa, Kou Sakabe, Masahiro Itoh
2. 発表標題	細胞質・核内に局在のエストロゲンリセプタ による子宮内膜癌細胞の増殖と遊走の制御機構
3. 学会等名	第126回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	森谷昇太、風間宏美、日野浩嗣、高野直治、平本正樹、相澤信、宮澤啓介
2. 発表標題	ClarithromycinのNOXAのオートファジー分解阻害による骨髄腫のストローマ接着によるbortezomib耐性化の克服
3. 学会等名	第82回日本血液学会学術集会
4. 発表年	2020年

1. 発表者名	Mitsuru Moriyama, Daigo Akahan, Shota Moriya, Arisa Yamada, Misa Imai, Marito Araki, Norio Komatsu, Keisuke Miyazawa, Akihiko Gotoh
2. 発表標題	ERストレスはruxolitinibの変異CALR導入細胞増殖抑制効果を増強する
3. 学会等名	第82回日本血液学会学術集会
4. 発表年	2020年

1. 発表者名	日野浩嗣、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阻害剤abemaciclibはリソソーム機能障害を介した空胞形成を伴う新規細胞死を誘導する
3. 学会等名	第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年	2020年

1. 発表者名 田中英基、日野浩嗣、森谷昇太、風間宏美、高野直治、平本正樹、塚原清彰、宮澤啓介
2. 発表標題 Comparison of autophagy inducibility in various tyrosine kinase inhibitors and their enhanced cytotoxicity via inhibition of autophagy in cancer cells by quantitative autophagy flux monitoring system.
3. 学会等名 第183回 東京医科大学医学会総会
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回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 阿部晃久、森谷昇太、山田博之
2. 発表標題 イソリキリチゲニンはプロテアソーム系を阻害することによりERストレスを誘導し、ヒトメラノーマ細胞に非アポトーシス性細胞死を誘導する
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
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 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、相澤信、宮澤啓介
2. 発表標題 CDK4/6阻害薬abemaciclibはリソソームの酸性化、膨化による空胞形成を伴った新規細胞死を誘導する
3. 学会等名 第125回 日本解剖学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森谷昇太、風間宏美、高野直治、平本正樹、宮澤啓介
2. 発表標題 Combid treatment with bortezomib plus clarithromycin overcomes stromal cell-mediated drug resistance in myeloma cells via ER-stress and NOXA induction.
3. 学会等名 第184回 東京医科大学医学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京医科大学 生化学 https://www.tokyo-med.ac.jp/med/course/16.html 東京医科大学 分子標的探索センター http://www.tokyo-med.ac.jp/target/

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
---------	---------