

令和 5 年 4 月 29 日現在

機関番号：23701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05751

研究課題名（和文）泌尿器がんにおけるオートファジーの意義の再考に向けた基盤構築と創薬展開

研究課題名（英文）Reconsidering the significance of autophagy in urological cancer and drug discovery

研究代表者

遠藤 智史（Endo, Satoshi）

岐阜薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：60433207

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）：オートファジーに特徴的なイベントであるオートファゴソーム形成に重要なシステインプロテアーゼAtg4Bの阻害剤を見出した。この化合物をリードとし、構造最適化を行い、活性と物性を向上させた誘導体の創製に成功した。前立腺がん細胞を用いた検討で、単独での細胞毒性が低い一方で、抗がん剤との併用で作用増強効果を示したため、HCQとは異なりリソソーム機能阻害に依存しないがんアジュバント薬になることが期待された。また、見出したAtg4B阻害剤の構造情報を基に、長鎖脂肪酸がAtg4B阻害を介したオートファジー阻害剤であることを見出し、そのがんアジュバント薬としての有効性を実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年オートファジー阻害剤ヒドロキシクロロキンと既存抗がん剤との併用に関する臨床試験が実施され、オートファジーを標的とした治療の有効性が多数報告されてきた。しかし、ヒドロキシクロロキンには副作用の問題に加えて、その抗がん活性にオートファジー阻害が寄与しないことも報告され、がん治療標的としてのオートファジーに疑問を唱える声も出ている。本課題では、新規オートファジー阻害剤としてオートファゴソーム膜形成を阻害するAtg4B阻害剤を創製し、そのがんアジュバント薬としての有効性を実証し、オートファジーの分子基盤の解明やオートファジー特異的阻害剤の臨床応用に向けた重要な知見が得られたと考える。

研究成果の概要（英文）：We found an inhibitor of Atg4B, a cysteine protease essential for autophagosome formation, a characteristic event in autophagy. Using this compound as a lead, we succeeded in developing a derivative with improved activity and physical properties through structural optimization. The Atg4B inhibitor showed low cytotoxicity when treated as a single agent and potentiation of action when combined with anticancer drugs in prostate cancer cells, suggesting that it could be an adjuvant cancer drug that, unlike hydroxychloroquine, does not depend on inhibition of lysosomal function. Based on the structural information of the inhibitor, we also found that long-chain fatty acids are autophagy inhibitors via Atg4B inhibition, and demonstrated its efficacy as an adjuvant cancer drug.

研究分野：創薬科学

キーワード：オートファジー 前立腺がん オートファジー阻害剤

## 1. 研究開始当初の背景

### ○現在の泌尿器がん治療における問題点

泌尿器科領域の3大がんである前立腺がん、膀胱がん、腎がんにおいて各がん種に有効な抗がん剤が開発されてきたが、いずれにおいても短期間で耐性を獲得し、予後が不良で治療が困難な進行がんに移行する。以下にそれぞれのがんについて問題点を列挙する。前立腺がん治療の第一選択にはホルモン療法が用いられるが、5年以内に半数以上でホルモン療法が効かない去勢抵抗性前立腺がん (CRPC) へと移行する。最近、CRPC 治療薬として abiraterone と enzalutamide、cabazitaxel が上市され、新たに apalutamide や darolutamide の開発が進められている。しかし、これらの既存 CRPC 治療薬が有効な症例が 40%程度にすぎないことや、継続投与による薬剤間での交叉耐性や重篤な副作用も報告されており、治療満足度は未だ高いとは言えない。また、膀胱がんにおいて gemcitabine/cisplatin 併用療法が、腎がんにおいてチロシンキナーゼ阻害剤と mTOR 阻害剤がそれぞれ開発されてきたが、両治療に不応性、もしくは耐性獲得した進行がんの予後は極めて不良であり、有効な代替治療策は存在しない。

### ○泌尿器がんの標的としてのオートファジーの位置づけ

腫瘍におけるオートファジー誘導は、腫瘍悪性化、抗がん剤感受性の低下や耐性獲得に関与する。近年、hydroxychloroquine (HCQ) と既存抗がん剤との併用に関する臨床試験が実施され [Levy et al., Nat. Rev. Cancer, 2017]、泌尿器領域においてもオートファジーを標的とした治療の有効性が多数報告されている [Li et al., Oncol. Rep., 2019]。しかし、HCQ には副作用の課題に加えて、その抗がん活性にオートファジー阻害が寄与しないことも報告され、がん治療標的としてのオートファジーに疑問を唱える声も出ている。また、前立腺がんにおいてオートファジー前半のオートファゴソーム膜形成の阻害と後半のリソソーム融合の阻害で生存率への影響が異なることも報告された [Goodall et al., Dev. Cell, 2016]。このようにオートファジー阻害剤の臨床応用を目指す上で、がんにおけるオートファジーの意義については未だ不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、泌尿器がんにおけるオートファジーの意義の再考に向けた基盤構築と創薬展開である。近年、がん細胞の生存や抗がん剤耐性獲得へのオートファジーの関与が報告され、オートファジー阻害剤は新規抗がん剤として開発が期待されている。しかし、臨床試験においてリソソーム阻害剤 HCQ のがん化学療法や放射線治療との併用の有効性が示されてきた一方、HCQ の抗癌活性にオートファジー阻害が寄与しないことが報告されるなど、“非特異的”オートファジー阻害剤に対する信頼性は揺らいでいる。申請者はがんの生存戦略の破綻を目指した酵素阻害剤の創製や抗がん剤感受性とオートファジーとの関連性について研究を進めてきた。これらの研究を発展させ、本研究では、オートファジー“特異的”阻害剤を開発し、泌尿器がん細胞の抗がん剤感受性に及ぼす影響を解析することで、がんにおけるオートファジーの意義の再考とオートファジー特異的阻害剤のがんアジュバント薬としての有効性の実証を行い、有効な治療薬に限られる泌尿器がんの新規治療薬の創製を目指す。

## 3. 研究の方法

### 3-1. *In vitro* cleavage assay

Atg4B と LC3 の C 末端に GST を融合させた LC3-GST を大腸菌の計で発現させ、Ni Sepharose 6FF カラムを用いて単一に精製した。精製した Atg4B、LC3-GST と阻害剤を混合し、37 °C でインキュベート後に SDS-PAGE と Coomassie 染色を行い、LC3-GST のから LC3 と GST への変換量を調べた。対照群として dimethylsulfoxide (DMSO) を添加したサンプルを用いて、変換量、変換率 (%) は以下の式により算出した。変換量 = (GST + LC3) / (LC3-GST + GST + LC3)、変換率 (%) = (阻害剤添加時の変換量) / (DMSO 添加時の変換量) × 100

### 3-2. ウェスタンブロット法

処理した細胞を DPBS で 2 回洗浄後、セルスクレイパーを用いて細胞を剥離した。回収した細胞は、DPBS で洗浄後、8 M urea、10 mM tris (hydroxymethyl) aminomethane を含む 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) で懸濁してソニケーションにより細胞膜を破壊した。細胞破砕液を遠心分離 (12,000 ×g、10 分間、4 °C) し、その上清を細胞抽出液とした。SDS-PAGE により分離後、PVDF 膜に転写し、1% BSA を用いてブロッキング後、各一次抗体と horseradish peroxidase 標識二次抗体と順次反応させた。抗体反応性タンパク質は ECL enhanced chemiluminescence detection kit を用いた化学発光法により検出した。得られた各バンドの発光強度は画像解析処理ソフトウェア Image J (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA) を用いて定量化した。

### 3-3. DAPGreen 染色

増殖培地に懸濁した細胞を 24-well multiplate 中に  $1.5 \times 10^5$  cells/500  $\mu$ L ずつ播種し、37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で一晩培養した。培地を除去後、抗生物質と 2% FBS を含む培地に交換、0.1  $\mu$ M

DAPGreen 添加後 30 分インキュベートし、培地中に試料を添加してさらに 24 時間培養した。対照群として DMSO を添加した細胞を調製した。培地を除去後、DPBS で細胞を 2 回洗浄した。PBS で 2 回洗浄後、余分な水分を除去し、スライドガラス上にマウント剤 (fluoromount-G) を用いてカバーガラスを固定した。DAPGreen 染色した細胞を、共焦点レーザー顕微鏡 LSM700 にセットし、蛍光観察を行った。倒立型蛍光顕微鏡の 40 倍油浸対物レンズを用いて、画像を取り込んだ。

### 3-4. 蛍光免疫染色

増殖培地に懸濁した細胞を 24-well multiplate 中に  $1.5 \times 10^5$  cells/500  $\mu$ L ずつ播種し、37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で一晩培養した。抗生物質と 2% FBS を含む培地に交換し、培地中に試料を添加してさらに 24 時間培養した。対照群として DMSO を添加した細胞を調製した。培地を除去後、DPBS で細胞を 2 回洗浄した。4% paraformaldehyde phosphate buffer solution 300  $\mu$ L を加え、10 分間固定し、0.1% Triton X-100、100 mM glycine を含む DPBS 300  $\mu$ L を加え、10 分間静置した。0.1% Tween 20、1% BSA を含む DPBS 300  $\mu$ L を加え、1 時間ブロッキングし、DPBS で 2 回洗浄後、DPBS に 300 : 1 に希釈した一次抗体 (抗 caspase-3 抗体) 液に置換し、4  $^{\circ}$ C で一晩インキュベートした。PBS で 2 回洗浄後、DPBS に 500 : 1 で希釈した Alexa Fluoro-488 標識したウサギ二次抗体液に置換し、室温で 1 時間遮光してインキュベートした。DPBS で 2 回洗浄後、余分な水分を除去し、スライドガラス上にマウント剤 (DAPI fluoromount-G) を用いてカバーガラスを固定した。蛍光免疫染色した細胞を、共焦点レーザー顕微鏡 LSM700 (Carl Zeiss 社, Jana, Germany) にセットし、蛍光観察を行った。

## 4. 研究成果

### 4-1. OBAA の構造最適化

Atg4B に対する阻害剤の探索は世界中で行われており、mammalian target of rapamycin (mTOR) や PI3K 活性に影響を及ぼさず Atg4B を阻害する NSC185058 やベンゾトトロポロン誘導体である UAMC-2526、他にも LC3 ペプチド基質様化合物 (Z-FG-FMK や S130)、in silico screening により得られた LV-320、AlphaScreen HTS アッセイにより同定された aminobenzo[cd]indol-2-[1H]-one 誘導体である compound 33、IC<sub>50</sub> = 260 nM と強力に Atg4B を阻害する FMK-9a46 が報告されている。しかし、これら Atg4B 阻害剤には以下のような問題点が指摘されている。FMK-9a は Atg4B 阻害活性を示す一方で、オートファジー誘導活性も有し、LC3 ペプチド基質様化合物 LV-320 は Atg4B に共有結合性の不可逆的結合をするため、他のセリンプロテアーゼも阻害する。本研究に先立ち見出した OBAA は Atg4B 阻害活性に加えて PLA<sub>2</sub> 阻害活性を有する。OBAA の Atg4B 選択性を上昇させるために、構造の最適化を行った。OBAA における Atg4B 阻害活性はカルボキシ基とカルボニル基における立体配置が Atg4B 阻害活性に重要であり、長いアルキル鎖も Atg4B 阻害活性に重要であることが確認された。そこで、OBAA のアルキル鎖長を変えた誘導体を設計、合成し、*in vitro* cleavage assay によって Atg4B 阻害活性を OBAA と比較した (Fig.1A-B)。その結果、アルキル鎖の伸長に伴い、Atg4B 阻害活性は二相性のカーブを示した (Fig.1C)。具体的には、炭素鎖が 0 個から 11 個と長くなるにつれて Atg4B 阻害活性は低下し、炭素鎖が 11 個から 17 個まで長くなるにつれて活性は低下し、炭素鎖 18、19 個で再度活性の上昇が認められた。この原因にはアルキル鎖が伸長するにつれ Atg4B との疎水性相互作用が強くなる一方で、親水性が低下し溶解度が低下することが考えられる。炭素数が 18、19 個の誘導体では新たな疎水性相互

作用を獲得したことが活性の上昇の要因かもしれない。OBAA は高い PLA<sub>2</sub> 阻害活性を持つことが知られ、Köhler らは、アルキル鎖の伸長に伴い、PLA<sub>2</sub> 阻害活性が上昇することを報告している。そこで、合成した誘導体による PLA<sub>2</sub> 阻害活性を評価したところ、OBAA と同程度の Atg4B 阻害活性を示した Aup01 の PLA<sub>2</sub> 阻害活性は、OBAA よりも約 70 倍低下し、Atg4B に対する選択性は 80 倍向上した。

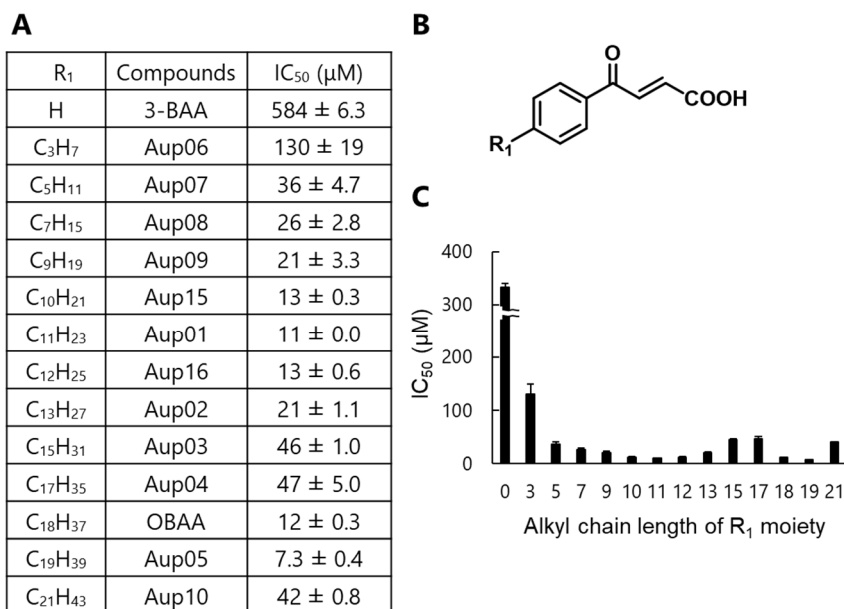


Fig.1. OBAA誘導体によるAtg4B阻害活性評価

#### 4-2. Aup01 によるオートファジー阻害作用

p62 は LC3 との相互作用を介してオートファジー依存的に分解されることが知られている。OBAA はオートファジー阻害活性を介して、アミノ酸不含培地処理時に低下した p62 発現量を有意に回復させる。そこで、LNCaP 細胞における Aup01 のオートファジー阻害効果を OBAA と比較した。Aup01 の前処理により、AF 処理時に低下した p62 の発現量は用量依存的に増加し、OBAA と比較してより低濃度で強い効果が見られた (Fig. 2A)。また、オートファジー誘導への影響を調べた。去勢抵抗性前立腺がん (CRPC) 治療薬 abiraterone (Abi) 処理によるオートファジー誘導はオートファゴソームを検出する蛍光プローブ DAPGreen の蛍光顕微鏡観察によっても確認された (Fig. 1B)。AF 処理によって増大した DAPGreen のドット状の蛍光は Aup01 の前処理により完全に消失した。以上の結果から Aup01 は OBAA よりも強力なオートファジー阻害剤であることが示唆された。

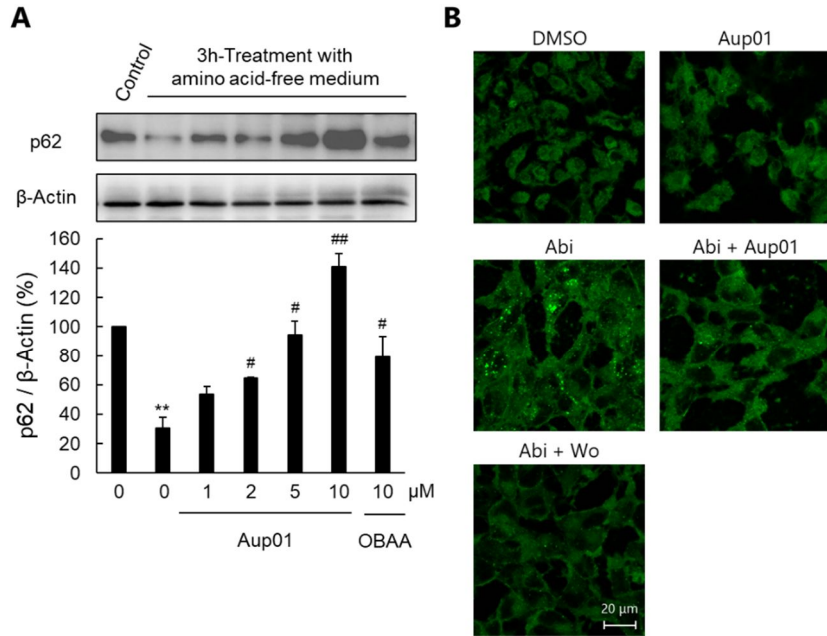


Fig.2. Aup01によるオートファジー阻害活性。  
(A) p62 expression. (B) DAPGreen staining. Abi, abiraterone; Wo, wortmannin

#### 4-3. CRPC 治療薬 Abi によるオートファジーおよびアポトーシスの誘導

前立腺がん細胞で誘導されたオートファジーは、CRPC 治療薬の抵抗性を高め、オートファジー阻害活性が知られる clomipramine や metformin がヒト前立腺がん C4-2B 細胞の Enz 感受性を高めることで、Enz 耐性 C4-2 細胞に対して耐性克服作用を示すことも知られる。そこで、OBAA の誘導体である Aup01 と CRPC 治療薬との併用効果について検討した。ウェスタンブロットにおいても Abi 処理で見られた Bax/Bcl-2 比の上昇や切断型 PARP 発現が Aup01 や PI3K 阻害剤 Wo の前処理によって有意に増大した (Fig. 3A-B)。アポトーシスマーカーである切断型 caspase 3 の特異抗体を用いて蛍光免疫染色を行ったところ、Abi 処理によって増大した切断型 caspase 3 の蛍光強度は、Aup01 の前処理によってさらに増大した (Fig. 3C)。Aup01 の前処理によって LNCaP 細胞の Abi 感受性は有意に増大したことから、Aup01 はオートファジー阻害を介して Abi によるアポトーシス性細胞死を増強させることが示唆された。また、Abi 以外の CRPC 治療薬である、AR アンタゴニスト enzalutamide、apalutamide、タキサン系の微小管重合阻害剤 Cab についても Aup01 はアポトーシス性細胞死を増強し、有意な相乗効果を示した。今回、機序の異なる上記の CRPC 治療薬に対して新規オートファジー阻害剤 Aup01 は相乗効果を示した。作用点が異

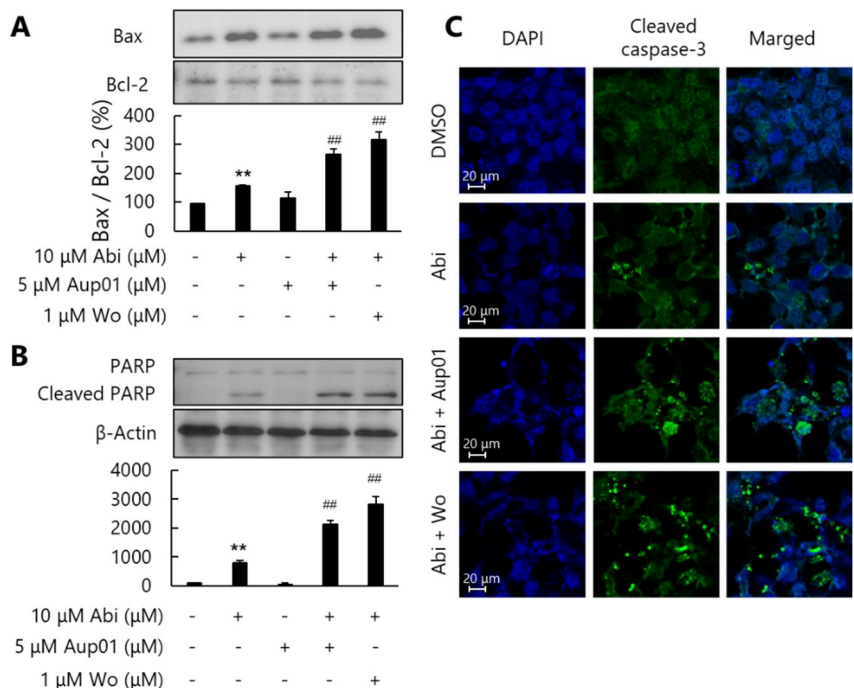


Fig.3. アピラテロン誘導性アポトーシスに及ぼすAup01の増強効果  
(A, B) Western blotting. (C) Immunofluorescent staining.

なるこれらすべての CRPC 治療薬はいずれもアポトーシス性細胞死を誘起することが知られるが、その詳細な作用機序は不明である。アポトーシス誘導機構として、細胞内、特にミトコンドリアでの活性酸素種の産生が挙げられ、最近、所属研究室では Enz、Abi、Cab が活性酸素種産生を介してアポトーシスを誘導することを明らかにした。オートファジーはがん種を問わず、酸化および損傷したタンパク質を貪食することでがん細胞におけるアポトーシスの抑制に寄与すると考えられている。また、Atg4B サイレンシング時においても Aup01 処理時と同様に、アポトーシス誘導の増強とオートファジーの抑制が見られた (Fig. 4)。そのため、Aup01 は Atg4B 阻害活性を介してオートファジーを阻害することで CRPC 治療薬によるアポトーシス性細胞死を増強したと考えられる。

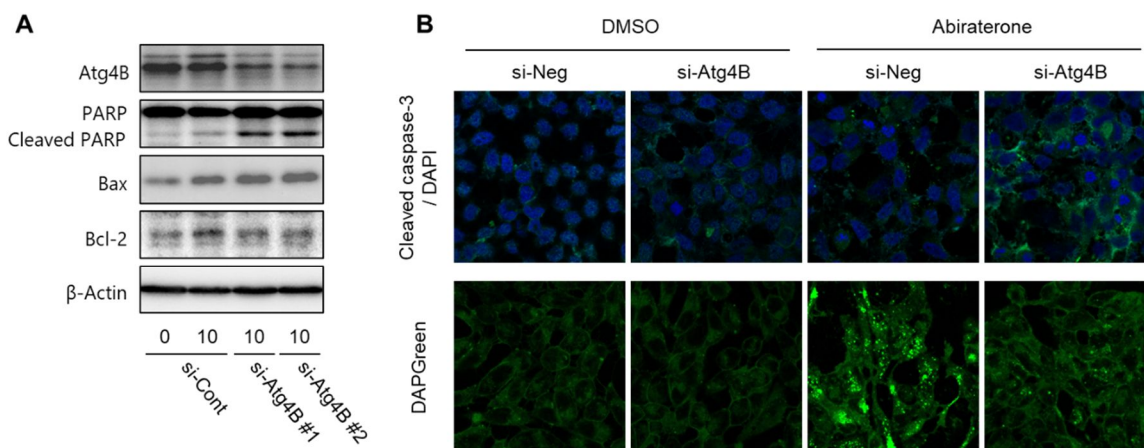


Fig. 4. アビラテロン誘導性アポトーシスとオートファジー誘導に及ぼす Atg4B サイレンシングの効果 (A) Western blotting. (B) Immunofluorescent staining.

#### 4-4. Atg4B 阻害活性を有する天然化合物の同定とそのオートファジー阻害活性

Atg4B 阻害活性を有する OBAA や Aup01 をはじめとするその誘導体は分子内に親水性領域と疎水性の高いアルキル鎖からなる。そこで、ファーマコフォアが類似した長鎖脂肪酸による Atg4B 阻害活性を評価した (Fig. 5)。パルミチン酸 (C16:0)、ステアリン酸 (C18:0)、オレイン酸 (C18:1)、リノレン酸 (C18:2)、 $\alpha$  リノレン酸、エイコサペンタエン酸 (EPA, C20:5)、ドコサヘキサエン酸 (DHA, C22:6)、アラキドン酸 (C20:4) は 20  $\mu$ M の濃度でいずれも Atg4B 阻害活性を示した (Fig. 5A-B)。この中で DHA が最も強力な活性を示した。DHA は AF 処理で減少した p62 発現量を回復させ、AF 誘導性のオートファジー誘導を顕著に抑制した (Fig. 5C-D)。

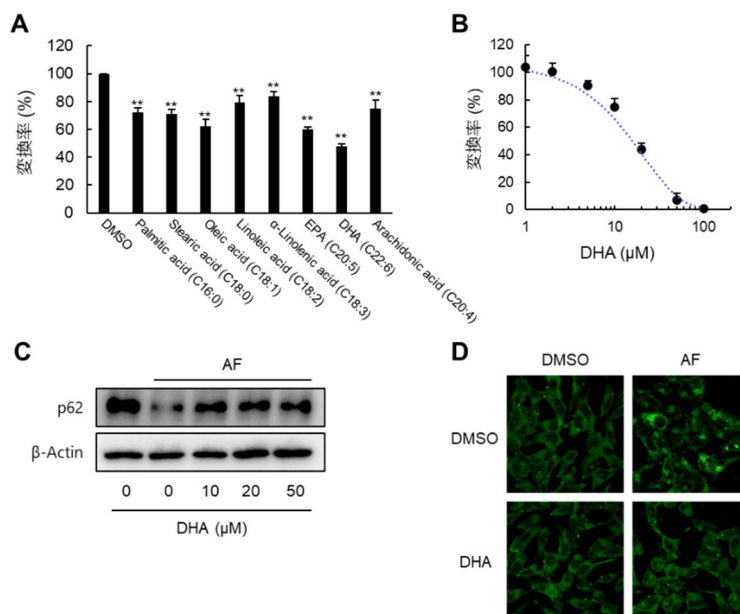


Fig. 5. DHAによるAtg4B阻害活性とオートファジー阻害活性 (A, B) In vitro cleavage assay. (C) Western blotting. (D) Immunofluorescent staining.

以上、泌尿器系がんの治療標的としてのオートファジーの有用性の解明を目的とし、オートファジーに特徴的なオートファゴソーム膜形成に関わる Atg4B の阻害剤を開発し、そのオートファジー阻害剤としての有効性、CRPC 治療薬との併用の有効性について実証することができた。今後、in vitro 及び in vivo 評価をさらに進めることで、未だないオートファジー阻害剤の創薬応用を目指したい。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kudo Yudai, Endo Satoshi, Fujita Mei, Ota Atsumi, Kamatari Yuji O., Tanaka Yoshimasa, Ishikawa Takeshi, Ikeda Hayato, Okada Takuya, Toyooka Naoki, Fujimoto Naohiro, Matsunaga Toshiyuki, Ikari Akira	4. 巻 65
2. 論文標題 Discovery and Structure-Based Optimization of Novel Atg4B Inhibitors for the Treatment of Castration-Resistant Prostate Cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 4878 ~ 4892
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jmedchem.1c02113	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 Satoshi Endo, Mina Kawai, Manami Hoshi, Jin Segawa, Mei Fujita, Takuo Matsukawa, Naohiro Fujimoto, Toshiyuki Matsunaga, Akira Ikari	4. 巻 -
2. 論文標題 Targeting Nrf2-antioxidant signaling reverses acquired cabazitaxel resistance in prostate cancer cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biochemistry	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) 10.1093/jb/mvab025	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 Atsumi, Kawai Mina, Kudo Yudai, Segawa Jin, Hoshi Manami, Kawano Shinya, Yoshino Yuta, Ichihara Kenji, Shiota Masaki, Fujimoto Naohiro, Matsunaga Toshiyuki, Endo Satoshi, Ikari Akira	4. 巻 735
2. 論文標題 Artepillin C overcomes apalutamide resistance through blocking androgen signaling in prostate cancer cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Archives of Biochemistry and Biophysics	6. 最初と最後の頁 109519 ~ 109519
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.abb.2023.109519	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4件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 工藤 優大、藤田 芽衣、鎌足 雄司、田中 義正、藤本 直浩、岡田 卓哉、豊岡 尚樹、五十里 彰、遠藤 智史
2. 発表標題 前立腺癌治療薬としての新規オートファジー阻害剤の有効性の検証
3. 学会等名 第85回日本生化学会中部支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 工藤 優大、藤田 芽衣、鎌足 雄司、田中 義正、藤本 直浩、岡田 卓哉、豊岡 尚樹、五十里 彰、遠藤 智史
2. 発表標題 オートファジー阻害剤としての新規Atg4B阻害剤の創製
3. 学会等名 第67回日本薬学会東海支部 総会・大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 遠藤 智史
2. 発表標題 オートファゴソーム膜形成を標的とした新規オートファジー阻害剤の開発
3. 学会等名 岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科 2021公開講座（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤田 芽衣、工藤 優大、鎌足 雄司、田中 義正、藤本 直浩、岡田 卓哉、豊岡 尚樹、五十里 彰、遠藤 智史
2. 発表標題 新規オートファジー特異的阻害剤の創製と前立腺癌治療への応用
3. 学会等名 第84回日本生化学会中部支部例会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 オートファジー阻害剤	発明者 遠藤智史、五十里 彰、豊岡尚樹、岡田 卓哉、藤本直浩	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2020-157505	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

【研究成果】オートファジーを狙って、がん細胞にとどめを刺す！！  
<https://www.gifu-pu.ac.jp/news/2022/03/research-20220314-01.html>

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