

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：30108

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16084

研究課題名（和文）多重がんに対する次世代薬物治療戦略の創出：オートファジー阻害剤を応用して

研究課題名（英文）How to use of autophagy inhibitors and anti-cancer drugs for multiple cancers

研究代表者

佐藤 恵亮 (Keisuke, Sato)

北海道科学大学・薬学部・講師

研究者番号：60733946

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）：本研究では、原発性のがんが複数箇所に発生する多重がんに対する新規治療方法を見出すことを試みた。そのために、タンパク質分解機構であるオートファジーに着目し、既存の抗がん剤の効果を高めることを目的とした。培養がん細胞においてオートファジーを阻害すると細胞障害性抗がん剤であるドキソルビシンによる抗がん作用が増強されることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質分解機構であるオートファジーは、多くの疾患に関与していることが報告されているが、現在オートファジーを利用した治療は行われていない。本研究は、オートファジーを利用することで抗がん剤の効果を増強出来ることを明らかにしており、学術的意義を有する。

原発性のがんが複数箇所に発生する多重がんの患者数は、今後増大していくことが予想されている。本研究は、多重がんを想定し複数のがん細胞を標的に行った研究であり、社会的意義を有する。

研究成果の概要（英文）： The aim of this study was to establish of multiple cancers in which primary cancers occur in multiple locations. We focused on autophagy, which is a proteolytic mechanism, and attempted to enhance the effects of existing anticancer drugs. We demonstrated that autophagy inhibitor promoted anticancer effect of doxorubicin, cytotoxic chemotherapeutic agent.

研究分野：医療薬学

キーワード：オートファジー アポトーシス 多重がん

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

多重がんは、原発性のがんが複数箇所に発生する疾患であり、高齢化やがん治療の発展に伴い、その患者数は世界的に増加している。多重がん治療には、放射線治療や手術のような局所治療ではなく、性質の異なる複数のがんにも効果的で副作用が少ない抗がん剤治療を確立することが必要である。タンパク質分解機構の一つであるオートファジーは、細胞内の恒常性の維持を担っており、がんや中枢神経疾患など様々な疾患に関与することが明らかにされている。しかし、オートファジーを利用した治療は行われていない。オートファジーを利用した抗がん剤治療を構築することが出来ればがん治療の発展に繋がる。

### 2. 研究の目的

現在、臨床で使用されている抗がん剤は欠点が多く、理想的ながん治療を行うことが出来ない。本研究の目的は、多重がん治療を確立するために、性質の異なる複数のがんにも効果的で副作用が少ない抗がん剤治療を見出すことである。そのために、オートファジーを利用する。オートファジー阻害剤を細胞障害性抗がん剤、分子標的抗がん剤といった既存抗がん剤と併用することで抗がん作用を高め、最適な抗がん剤治療を見出す。

### 3. 研究の方法

#### (1) 多重がんに最適な抗がん剤および標的がん細胞の選定

培養がん細胞として、A549 (ヒト肺癌基底上皮腺がん細胞)、HT29 (ヒト結腸腺がん細胞)、SKBR3 (ヒト乳がん細胞) を使用した。細胞障害性抗がん剤としてドキソルビン、分子標的抗がん剤としてセツキシマブ、トラスツズマブ、オートファジー阻害剤としてクロロキンを使用した。細胞生存率およびアポトーシスを指標に最適な抗がん剤および標的がん細胞の選定を行った。培養がん細胞の細胞障害は MTS 還元能および LDH 漏出、アポトーシスは、cleaved caspase-3 発現量を指標に評価した。

#### (2) オートファジー阻害剤により促進されるドキソルビン誘導アポトーシスのメカニズムの解明

培養がん細胞として、A549、HT29 を使用した。細胞障害性抗がん剤としてドキソルビン、オートファジー阻害剤としてクロロキンを使用した。活性酸素産生量は、蛍光プローブ MitoSox、タンパク質発現量はウエスタンブロット法により評価した。

#### (3) 多重がんモデルマウスに対するドキソルビンおよびクロロキンの影響

多重がんモデルマウスを作成するために、ヌードマウス BALB/cSlc-nu/nu を使用した。A549、HT29 を各々マウスの背中に皮下移植した。14 日間飼育し、腫瘍の形成を目視で確認した。その後、ドキソルビンおよびクロロキンを腹腔内投与した。腫瘍の体積を評価することで抗がん作用を評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) 多重がんに最適な抗がん剤および標的がん細胞の選定

A549 細胞、HT29 細胞において、オートファジー阻害剤であるクロロキンは、ドキソルビンによる細胞障害を促進した (Fig. 1)。さらに、アポトーシスの指標である cleaved caspase3 は、ドキソルビンにより増大し、この増大は、クロロキンによりさらに促進された。これらの結果より、オートファジーを阻害することにより促進されるドキソルビン誘導細胞障害はアポトーシスであることが示唆される。一方、A549 細胞、HT29 細胞、SKBR3 細胞においてセツキシマブ、トラスツズマブはクロロキンを処理してもがん細胞の増殖抑制作用は認められなかった。

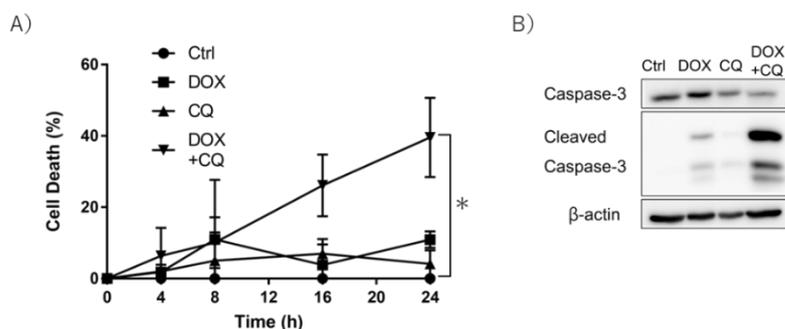


Fig. 1 CQ enhanced DOX-induced apoptosis.

A549 cells were treated with 2  $\mu$ M DOX, 20  $\mu$ M CQ, or both for 24 h. A) cell death as estimated by LDH release. B) western blot results for expression of Caspase-3. DOX: Doxorubicin; CQ: Chloroquine

オートファジー阻害剤クロロキンにより促進されるドキソルビシン誘導アポトーシスのメカニズムを解明するためにミトコンドリアおよび細胞膜経路に着目した。ドキソルビシンによりミトコンドリア経路によるアポトーシスの指標である cleaved caspase9 および細胞膜経路によるアポトーシスの指標である cleaved caspase8 の増大が認められた (Fig. 2)。クロロキン処理により cleaved caspase9 の更なる増大が認められ、この過程で活性酸素種の産生量の増大も認められた。一方、ドキソルビシンにより増大する cleaved caspase8 に対するクロロキンの影響は認められなかった。よって、オートファジーを阻害することにより促進されるドキソルビシン誘導アポトーシスは、ミトコンドリア経路によるアポトーシスということが明らかになった。

さらに、オートファジーを阻害することにより促進されるドキソルビシン誘導ミトコンドリア経路によるアポトーシスのメカニズムを詳細に検討するために mitogen-activated protein kinase (MAPK) の p38, JNK, ERK に着目した。JNK、p38 のリン酸化は、ドキソルビシンにより増大し、クロロキンによりさらに促進した。しかし、この細胞障害に対する p38 阻害剤 SB203580、JNK 阻害剤 SP600125 の影響は認められなかった。一方、ERK のリン酸化は、ドキソルビシンにより増大するが、クロロキンはこの増大を抑制した。さらに、ERK の阻害剤 SCH772984 は、ドキソルビシンおよびクロロキンによる細胞障害、活性酸素種の産生、cleaved caspase-9 および cleaved caspase-3 発現量の増大を促進した。これらの結果より、ERK はオートファジーを阻害することにより促進されるドキソルビシン誘導ミトコンドリア経路によるアポトーシスに対し防御作用を担っていること、JNK および p38 の寄与が低いことが示唆される。

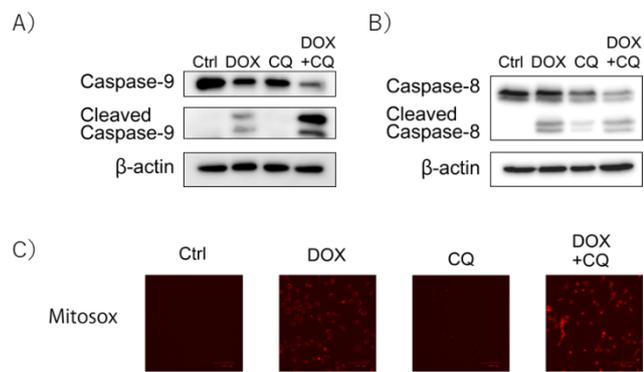


Fig. 2 Mechanism of apoptosis induced by the combination of DOX and CQ.

Western blot results for the expression of A) Caspase-9, B) Caspase-8 and C) Mitosox fluorescence depicting ROS production in A549 cells treated with 2  $\mu$ M DOX, 20  $\mu$ M CQ, or both for 24 h. DOX: Doxorubicin; CQ: Chloroquine

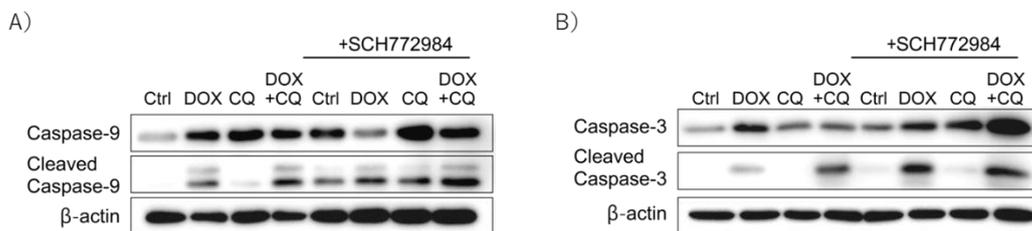


Fig. 3 Effect of ERK inhibitor on DOX and CQ-induced apoptosis.

Western blot results for the expression of A) caspase-9 and B) caspase-3 proteins in A549 cells were treated with 2  $\mu$ M DOX, 20  $\mu$ M CQ, or both with or without SCH772984 for 24 h. DOX: Doxorubicin; CQ: Chloroquine

### (3) 多重がんモデルマウスに対するドキソルビシンおよびクロロキンの影響

ヌードマウス BALB/cSlc-nu/nu に A549, HT29 を皮下移植した多重がんモデルマウスを作成した。ドキソルビシンおよびクロロキンを腹腔内投与後、抗がん作用を評価した。その結果、予想に反しドキソルビシンによる抗がん作用はクロロキンにより促進されなかった。腫瘍を取り出し、caspase-3 活性を測定したが、クロロキンによる影響は認められなかった。よって、現段階ではドキソルビシンとオートファジー阻害剤の組み合わせを多重がんに応用することは困難である。

今後は、本研究課題の成果を基に細胞障害性抗がん剤、分子標的抗がん剤以外の抗がん剤を用いた検討、対象のがん細胞を拡大することで多重がんに最適な治療方法の確立を目指す。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 SATO KEISUKE, TATSUNAMI RYOSUKE, NAKATA AKIFUMI, KOMATSU KEN-ICHI, HARAKAWA SHINJI, NEDACHI TAKAKI, HAKETA KAORU, INAGAWA HIROYUKI, WAKAME KOJI	4. 巻 41
2. 論文標題 Effects of Kumaizasa (<i>Sasa senanensis</i>) Leaf Extract on Innate Immune Regulation in HEK293 Cells and Macrophages	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 4093 ~ 4100
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.15212	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 Nakata Akifumi, Sato Keisuke, Fujishima Yohei, Ting Valerie Goh Swee, Nakayama Kanade, Ariyoshi Kentaro, Tsuruoka Chizuru, Shang Yi, Iizuka Daisuke, Kakinuma Shizuko, Yamashiro Hideaki, Miura Tomisato	4. 巻 10
2. 論文標題 Evaluation of Global DNA Methylation and Gene Expression of Izumo1 and Izumo1r in Gonads after High- and Low-Dose Radiation in Neonatal Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biology	6. 最初と最後の頁 1270 ~ 1270
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biology10121270	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 Sato Keisuke, Tatsunami Ryosuke, Wakame Koji	4. 巻 49
2. 論文標題 Epalrestat suppresses inflammatory response in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Allergologia et Immunopathologia	6. 最初と最後の頁 1 ~ 8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15586/aei.v49i5.102	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 Tatsunami Ryosuke, Sato Keisuke, Murao Yu, Yama Kaori, Yu Yang, Ohno Shun, Tampo Yoshiko	4. 巻 21
2. 論文標題 Epalrestat suppresses cadmium-induced cytotoxicity through Nrf2 in endothelial cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Experimental and Therapeutic Medicine	6. 最初と最後の頁 393
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/etm.2021.9824	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 Tatsunami Ryosuke, Murao Yu, Sato Keisuke	4. 巻 140
2. 論文標題 Protective Effect of Epalrestat against Oxidative Stress-induced Cytotoxicity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 YAKUGAKU ZASSHI	6. 最初と最後の頁 1381 ~ 1388
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/yakushi.20-00167	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6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 遠藤翔也、木藤孝真、太田夏樹、花咲夏海、佐藤恵亮、立浪良介
2. 発表標題 LPS誘導炎症反応に対するオートファジー阻害剤の影響
3. 学会等名 日本薬学会142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 太田夏樹、遠藤翔也、渡部結容乃、佐藤恵亮、立浪良介
2. 発表標題 細胞内外におけるカドミウム毒性抑制機構の開発
3. 学会等名 日本薬学会142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤恵亮
2. 発表標題 糖尿病性神経障害治療薬の新規作用の解明とその応用
3. 学会等名 日本薬学会北海道支部第148回例会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤恵亮、伊藤麻菜絵、遠藤翔也、木藤杏真、立浪良介
2. 発表標題 抗がん剤による細胞障害に対するオートファジー阻害剤の影響
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 立浪良介、菅原つばさ、佐藤恵亮
2. 発表標題 RAW264.7細胞におけるLPS誘導炎症反応に対するエパルレスタットの影響
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 熊野英里奈、佐藤恵亮、立浪良介
2. 発表標題 血管内皮細胞におけるカドミウム誘導細胞傷害に対する GGT 阻害剤の影響
3. 学会等名 フォーラム2020衛生薬学・環境トキシコロジー
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
---------	---------