

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08189

研究課題名（和文）腫瘍微小環境の低酸素曝露上皮間葉転換におけるアシドーシスの役割とその制御

研究課題名（英文）Role of acidosis in hypoxia-induced epithelial mesenchymal transition in lung cancer cells

研究代表者

青柴 和徹（Aoshiba, Kazutetsu）

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：60231776

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）：肺癌細胞の上皮間葉転換（EMT）に対する低酸素性アシドーシスの影響を検討した。低酸素曝露によりE-カドヘリン蛋白の減少によるEMTが生じたが、培養液のアシドーシスの中和により抑制された。その機序として低酸素性アシドーシスでは、E-カドヘリンmRNAの減少とE-カドヘリン蛋白のユビキチン化による分解促進が認められた。さらに低酸素下ではアジスロマイシンがミトファジーを抑制して肺癌細胞にアポトーシスを誘導した。またフェノフィブラートがnuclear factor erythroid 2-related factor 2の活性化を介してシスプラチンに対する抵抗性を亢進させることも明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍内部の低酸素は肺癌細胞の浸潤、転移や進行を促進する要因であるが、その対処法として低酸素に伴うアシドーシスは正による上皮間葉転換の抑制や抗菌薬であるアジスロマイシンによるミトファジー抑制によるアポトーシスの誘導が有効であると考えられた。また脂質異常症治療薬であるフェノフィブラートがシスプラチンに対する治療抵抗性を亢進させる可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：We investigated the effect of hypoxic acidosis on epithelial mesenchymal transition (EMT) in lung cancer cells. We found that exposure of lung cancer cells to hypoxia caused EMT; however, it was almost completely inhibited by neutralization of acidic pH in medium. The mechanisms by which acidosis enhanced hypoxia-induced EMT included the reduction of E-cadherin protein, which was caused by decreased production of E-cadherin mRNA and increased degradation of E-cadherin protein via its ubiquitination. We also found that the azithromycin, a macrolide antibiotic, reduced lung cancer cell survival under hypoxic conditions by interfering with the efficient removal of damaged mitochondria through mitophagy inhibition. Finally, we found that fenofibrate, an anti-hyperlipidemic drug, attenuated cisplatin cytotoxicity to lung cancer cells by enhancing the antioxidant defense system through activation of nuclear factor erythroid 2 related factor 2.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：肺癌 低酸素 アシドーシス 上皮間葉転換 ミトファジー アジスロマイシン フェノフィブラート

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

癌細胞は腫瘍内部の低酸素やアシドーシスに適応して生存している。その適応機序を明らかにして新しい癌治療法を開発することは重要な研究課題である。本研究課題では肺癌細胞を用いて、低酸素曝露による上皮間葉転換 (Epithelial mesenchymal transition: EMT)におけるアシドーシスの役割についての研究を行ったが、派生研究として低酸素曝露下における肺癌細胞に対するアジスロマイシン (AZM) の効果およびフェノフィブラート (FF) によるシスプラチン (CDDP) の抗癌作用への影響も検討した。

### 2. 研究の目的

#### (1) 研究1: 低酸素曝露 EMT におけるアシドーシスの役割

腫瘍内部の低酸素環境下では解糖系亢進による乳酸蓄積により組織が酸性化 (アシドーシス) している。低酸素は肺癌細胞の浸潤・転移を促進する EMT を誘導するが、その機序におけるアシドーシスの関与について研究した。

#### (2) 研究2: 低酸素曝露下の肺癌細胞に対する AZM の効果

低酸素環境の肺癌細胞はオートファジーを利用して自らの生存を可能にしている。抗菌薬である AZM にはオートファジー阻害効果が報告されていることから、低酸素環境下の肺癌細胞に対して殺細胞効果を発揮するかについて研究した。

#### (3) 研究3: FF による CDDP の抗肺癌作用への影響

ペルオキシゾーム増殖活性化レセプター $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor: PPAR $\alpha$ ) アゴニストである FF には脂質低下作用以外の作用も報告されていることから、CDDP の肺癌に対する抗癌作用への影響を検討した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 研究1: 低酸素曝露 EMT におけるアシドーシスの役割

肺癌細胞株 (A549) を pH6.8~7.6 に調整した培養液 (100 ng/mL bFGF 入り) で培養し、低酸素 (1% O<sub>2</sub>) に曝露した。EMT はクリスタルバイオレット液で染色後、細胞の円形度を Image Jソフトにより測定した。E-カドヘリン蛋白、mRNA 量はウエスタンブロッティング法および reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) 法を用いて評価した。また E-カドヘリン蛋白の分解速度についてはシクロヘキシミド添加後の E-カドヘリン蛋白量をウエスタンブロッティング法で評価した。

#### (2) 研究2: 低酸素曝露下の肺癌細胞に対する AZM の効果

培養した肺癌細胞 (A549、H1299、H441) に AZM (0-25  $\mu$ M) を添加後 正常酸素 (20% O<sub>2</sub>) または低酸素 (0.3% O<sub>2</sub>) に曝露した。細胞生存率は Hoechst33342 DNA 定量法により評価した。アポトーシス細胞は Diff-quick 液で染色後光学顕微鏡下で判定した。オートファジーフラックスの評価には DAL<sup>®</sup>Green と DAP<sup>®</sup>Red 試薬を用いた。マイトファジーフラックスの評価にはマ Mtphagy<sup>®</sup>Dye と Lyso<sup>®</sup>Dye 試薬を用いた。ライソゾームの酸性化の評価には pHLYS<sup>®</sup>Red 試薬を用いた。細胞の酸素消費量の測定には Seahorse XFp analyzer を用いた。ミトコンドリア膜電位 (mitochondrial membrane potential: MMP) は tetramethylrhodaminemethyl ester (TMRM) で染色後に細胞の蛍光強度を測定して評価した。生細胞におけるカスパーゼ活性は CellEvent<sup>®</sup> caspase-3/7 測定キットを用いて測定した。ミトコンドリア総量、健常ミトコンドリア量、傷害されたミトコンドリア量は MitoTracker<sup>®</sup>Green FM と TMRM で染色後に細胞の蛍光強度を測定して評価した。ミトコンドリア欠乏 A549 細胞はエチジウムプロマイド、ピルビン酸、ウリジンを含む培養液中で 20 回以上増殖されることにより作製した。

### (3) 研究3：FFによるCDDPの抗肺癌作用への影響

培養した肺癌細胞(A549、H1299、PC3、H441)にFF(0-200 μM)またはWY14643(WY)で12-48時間前処理後、0-40 μMのCDDPを添加した。細胞生存率はHoechst33342 DNA定量法、AlamarBlue® assay、ATP定量法により評価した。細胞内活性酸素(ROS)レベルはCellROX® Greenの蛍光強度(Ex 485 nm、Em 530 nm)を測定して評価した。細胞のスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)活性、カタラーゼ活性、チトクローム P4501A1活性は、SODアッセイキット-WST、EnzyChromカタラーゼアッセイキット、P450-Glo CYP1A1アッセイキットを用いて評価した。ウエスタンブロッティング、免疫蛍光染色、RT-qPCRには型通りの方法を用いた。AhRおよびPPARA遺伝子のノックダウンにはsmall interfering RNA(siRNA)transfection法を用いた。

## 4. 研究成果

### (1) 研究1：低酸素曝露 EMT におけるアシドーシスの役割

#### 低酸素誘導 EMT におけるアシドーシスの役割

A549細胞を低酸素(1% O<sub>2</sub>)に曝露したところ EMT が誘導されたが、培養液のアシドーシス(pH 6.8)を重炭酸や緩衝液(HEPES、Tris)の添加により中和したところ EMT は抑制された。正常酸素(20% O<sub>2</sub>)曝露下では重炭酸除去や高 CO<sub>2</sub> 曝露により培養液を酸性化しても EMT は生じなかった。低酸素曝露下では培養液の乳酸を増加させると EMT が生じたが、中性の乳酸ナトリウムの添加では EMT は亢進しなかった(図1)。

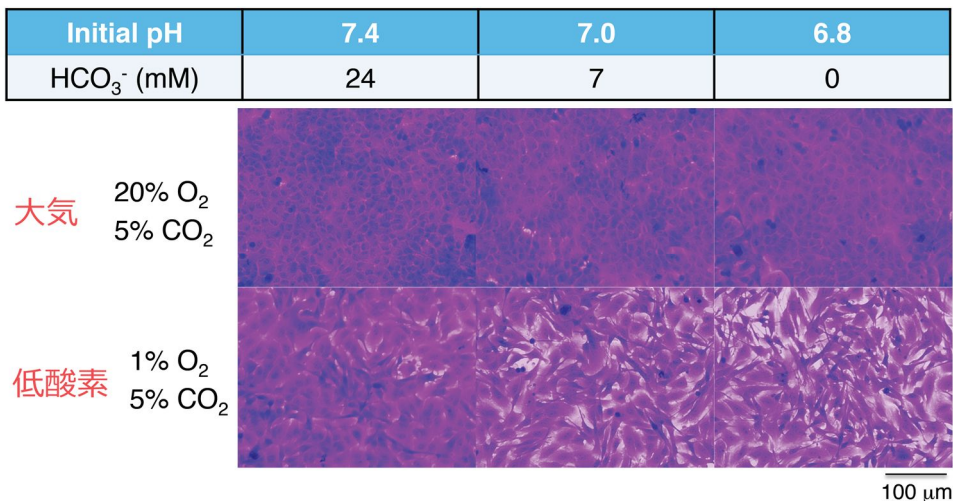


図1 低酸素誘導 EMT におけるアシドーシスの影響

#### 低酸素 EMT の可逆性

低酸素曝露後の A549 細胞に再酸素化やアシドーシスの中和処理を行ったところ EMT は消失した。

#### 低酸素 EMT における E-カドヘリン蛋白量の変化

低酸素曝露後に E-カドヘリン蛋白量が減少したが、培養液のアシドーシス中和によりその減少が抑制された。さらに E-カドヘリンの mRNA 量も低酸素曝露により減少したが、アシドーシス中和により抑制された。

#### 低酸素曝露による E-カドヘリン蛋白の分解

低酸素曝露により E-カドヘリン蛋白の分解が亢進したが、培養液のアシドーシス中和により抑制された。低酸素曝露下のアシドーシスでは E-カドヘリン蛋白のユビキチン化が認められたが、プロテアソーム阻害薬によって抑制されなかったことから、プロテアソーム系ではなく、ライソゾーム系による分解処理を介しているものと考えられた。

以上の結果から肺癌細胞の低酸素による EMT には、乳酸産生によるアシドーシスが必要であり、その機序としてアシドーシスによる E-カドヘリン mRNA の発現抑制と E-カドヘリン蛋白分解の促進が関与していると考えられた。腫瘍内部のアシドーシスの中和は肺癌細胞の浸潤・転移を促進する EMT の標的治療になると考えられた。

## (2) 研究2：低酸素曝露下の肺癌細胞に対する AZM の効果

### 低酸素曝露下の肺癌細胞の生存率に対する AZM の効果

AZM (10-25  $\mu\text{M}$ ) の添加は正常酸素下 (20%O<sub>2</sub>) では影響しなかったが、低酸素 (0.3%) 曝露した肺癌細胞 (A549、H1299、H441) の生存率を減少させた。

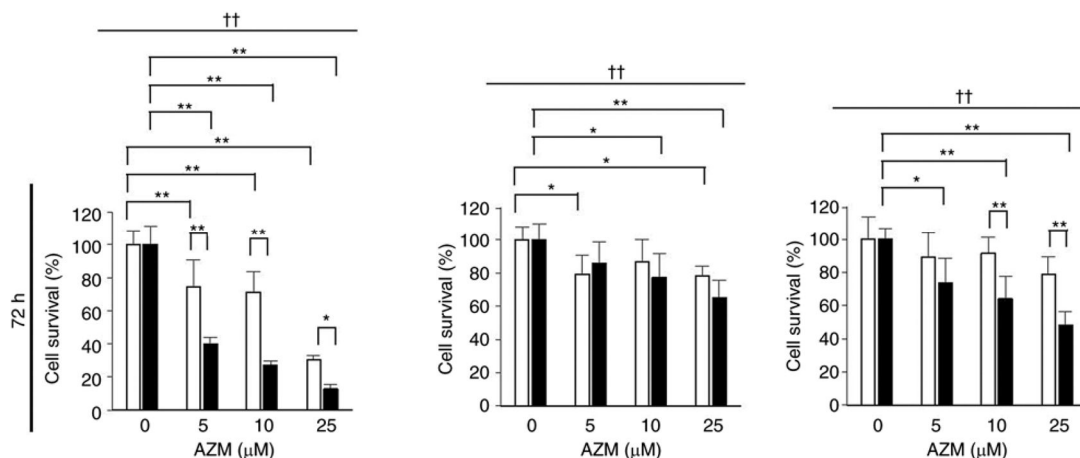


図2 低酸素曝露下の肺癌細胞の生存率に対する AZM の効果。白：20% O<sub>2</sub>。黒：0.3% O<sub>2</sub>。図の左から A549、H1299、NCI-H441 細胞。

### 低酸素曝露下の肺癌細胞のアポトーシスに対する AZM の効果

AZM は正常酸素下ではアポトーシスを誘導しなかったが、低酸素曝露した A549 細胞ではカスパーゼ-3 の活性化によるアポトーシスを誘導した。

### 低酸素曝露がミトコンドリア機能に与える影響

低酸素曝露後に正常酸素に復した A549 細胞では最大酸素消費量が減少し、AZM を添加下では MMP が減少した細胞にアポトーシスが認められた。

### 低酸素曝露のオートファジーとマイトファジーに与える AZM の影響

低酸素曝露した A549 細胞ではミトコンドリア蛋白量 (HSP60、UQCRC1) が減少し、オートファゴソームマーカーである LC3B-II が増加した。AZM の存在下では HSP60、UQCRC1 の減少が抑制され、LC3B-II が著増した。さらに DAL<sup>®</sup>Green と DAP<sup>®</sup>Red による染色でオートファゴソームとオートライソソームを識別すると、低酸素曝露後にオートファゴソームとオートライソソームが増加したが、AZM 存在下ではオートライソソームの形成が抑制された。また Mtpagy<sup>®</sup>Dye と Lyso<sup>®</sup>Dye による染色でマイトファゴソームとマイトライソソームを識別すると、低酸素曝露によりマイトライソソームが増加したが、AZM 存在下ではマイトライソソームの形成が抑制された。さらに pHlys<sup>®</sup>Red による染色では AZM によるライソソームの pH 上昇が認められた。

### 低酸素曝露した A549 細胞のミトコンドリアに対する AZM の影響

AZM 存在に低酸素曝露すると MMP が消失した傷害ミトコンドリアが細胞内に蓄積した。同時に BNIP3 と BNIP3L/Nix が増加したことから傷害されたミトコンドリアのマイトファジーが AZM により抑制されたと考えられた。ミトコンドリアを欠乏させた p<sup>0</sup> A549 細胞では AZM による低酸素曝露下の肺癌細胞の生存率は低下しなかった。以上の結果から AZM は低酸素曝露により傷害されたミトコンドリアのマイトファジーによる処理を阻害して肺癌細胞のアポト

ーシスを誘導すると考えられ、腫瘍内部の低酸素肺癌細胞を排除する治療薬候補として AZM が期待された。

### (3) 研究3 : FF による CDDP の抗肺癌作用への影響

#### FF の肺癌細胞生存率に対する効果

臨床的血中濃度 ( 25-50  $\mu\text{M}$  ) の FF は CDDP の肺癌細胞 ( A549、H1299、PC3、H441 ) に対する殺細胞作用を減弱させた。同様の効果は別の PPAR $\alpha$  アゴニストである WY においても認められ、PPAR $\alpha$  アンタゴニストである GW6471 により抑制された。

#### FF の CDDP による DNA damage response (DDR) に対する影響

CDDP は DDR ( H2AX や p53 のリン酸化 ) を誘導したが、FF および WY には影響されなかった。また FF および WY は Bax、Bad、Bcl-2、Bcl-x、HSP70 の発現にも影響しなかった。

#### 3) FF の CDDP による細胞内 ROS 増加に対する影響

CDDP は細胞内 ROS を増加させた。しかし FF および WY は CDDP による ROS 増加を抑制し、Mn-SOD、HO-1 およびカタラーゼの蛋白量と SOD およびカタラーゼ活性を増加させた。

#### FF の Nrf2 発現ならびに活性化に与える影響

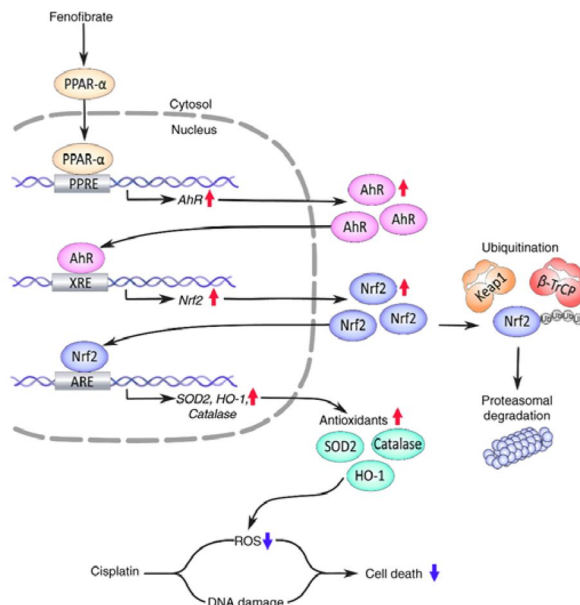
FF および WY は antioxidant response element ( ARE ) に結合する転写因子 Nrf2 の mRNA と蛋白発現、核内移行および DNA 結合活性を増強させた。しかし Nrf2 のユビキチン化や蛋白分解速度には影響せず、Nrf2 の分解を促進する Keap1 や  $\beta$ -TrCP 蛋白量にも影響しなかった。

#### FF による Nrf2 発現増加における AhR の関与

Nrf2 のプロモーター領域には xenobiotic response element ( XRE ) が存在し、XRE に結合する AhR のプロモーター領域には PPAR $\alpha$  が結合する PPRE が存在することが知られている。FF および WY は AhR の mRNA と蛋白発現、核内移行および DNA 結合活性を増強させ、AhR が XRE に結合して産生される CYP1A1 の活性を亢進させた。さらに AhR 遺伝子を siRNA によりロックダウンすると FF および WY による Nrf2 遺伝子発現が抑制され、CDDP の殺細胞減弱効果も低下した。さらに PPARA 遺伝子をロックダウンすると FF による AhR 遺伝子発現の増強効果が減少した。

以上の結果から、臨床的血中濃度の FF は CDDP の殺細胞効果を減弱させることが明らかになった。その機序としては、FF PPAR $\alpha$  活性化 AhR 活性化 Nrf2 活性化 アンチオキシダント産生増加の機序が考えられた ( 図 3 )。

図 3 FF が CDDP 殺細胞効果を減弱させる機序



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Toriyama Kazutoshi, Okuma Takashi, Abe Shinji, Nakamura Hiroyuki, Aoshiba Kazutetsu	4. 巻 27
2. 論文標題 In vitro anticancer effect of azithromycin targeting hypoxic lung cancer cells via the inhibition of mitophagy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2023.14146	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 Kogami Mariko, Abe Shinji, Nakamura Hiroyuki, Aoshiba Kazutetsu	4. 巻 26
2. 論文標題 Fenofibrate attenuates the cytotoxic effect of cisplatin on lung cancer cells by enhancing the antioxidant defense system <i>in vitro</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 313
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2023.13899	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岩井悠希、河越淳一郎、大野真梨子、小山信之、中村博幸、青柴和徹
2. 発表標題 低酸素曝露による肺癌細胞の上皮間葉転換におけるアシドーシスの役割
3. 学会等名 第61回日本呼吸器学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鳥山和俊、中村博幸、青柴和徹、阿部信二
2. 発表標題 低酸素環境下における肺癌細胞のオートファジーを標的としたアジスロマイシンによる新規治療法の開発
3. 学会等名 第63回日本呼吸器学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大野真梨子、阿部信二、中村博幸、青柴和徹
2. 発表標題 フェノフィブラートによるシスプラチンの抗癌作用の減弱効果
3. 学会等名 第62回日本呼吸器学会総会
4. 発表年 2022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
---------	---------