

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 14 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591050

研究課題名（和文） 造血細胞におけるチロシンキナーゼを標的としたオートファジー誘導と細胞保護効果

研究課題名（英文） Targeting tyrosine kinases for autophagy induction along with cytoprotective effect in hematopoietic progenitor cells

研究代表者

宮澤 啓介 (MIYAZAWA KEISUKE)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：50209897

研究成果の概要（和文）：

慢性骨髄性白血病の分子標的薬メシル酸イマチニブ(IM)は、BCR-ABL を発現していない様々な細胞株やマウス胎生線維芽細胞 (MEF) に対して、自立的なアポトーシスを阻害する“保護効果”と強力なオートファジー誘導効果があることを明らかにした。IMは、シタラビン、ツニカマイシン、ボルテゾミブに拮抗し、血清除去による細胞死誘導に対してもオートファジー依存性に保護効果を発現した。一方、骨髄腫細胞や乳癌細胞に、オートファジー阻害作用のあるクラリスロマイシンとプロテアソーム阻害剤ボルテゾミブとを同時に作用させると、小胞体(ER)ストレス負荷を介したアポトーシスが強力に誘導されることを明らかにした。以上より、人為的にオートファジーを誘導することにより、造血前駆細胞を含めた様々の細胞でERストレス負荷の緩和を介した細胞保護効果が得られる可能性が示唆される。

研究成果の概要（英文）：

Treatment with imatinib mesylate (IM), which is used for targeting therapy for chronic myelogenous leukemia, exhibited an effect of an increased viable cell number of non-BCR-ABL-expressing cell lines by inhibiting spontaneous apoptosis along with autophagy induction. IM attenuated the cytotoxic effects of cytosine arabinoside, tunicamycin, and bortezomib as well as inhibiting cell death with serum-deprived culture in an autophagy-dependent manner. In contrast to autophagy-dependent cytoprotection in response to IM, combined treatment with autophagy inhibitor such as clarithromycin, and proteasome inhibitor, bortezomib potently enhanced endoplasmic reticulum (ER)-stress mediated apoptosis in breast cancer cells and myeloma cells. These lines of evidence suggest that manipulation of autophagy can induce cytoprotective effect via attenuation of ER-stress loading in various kinds of cells including hematopoietic progenitor cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：血液内科学（医歯薬学）

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：オートファジー，チロシンキナーゼ，メシル酸イマチニブ，小胞体ストレス，白血病

1. 研究開始当初の背景

オートファジーとは、細胞内タンパクや小器官を二重の脂質膜で包み込み（オートファゴソーム形成）、これをリソソームに輸送し分解する一連のプロセスのことである。従来、ユビキチン化（以下 Ub 化）されたタンパクは“選択的”にプロテアソームで分解されるのに対して、オートファジーは“バルク（非選択的）”に分解されると考えられていた。しかし近年、p62 (sequestosome 1) や NBR1 という docking protein との結合を介して Ub 化タンパクがオートファジーでも分解されることが明らかにされた (Kirkin V, Mol Cell, 2009)。これは細胞内の二大タンパク分解系が連動していることを物語っている。

研究代表者らは、慢性骨髄性白血病の分子標的薬であるメシル酸イマチニブ (IM) がオートファジーを強力に誘導することを独自に発見した。興味深いことに、このオートファジー誘導能は BCR-ABL を発現していない HL-60 等の白血病細胞株でも観察された。

一方、細胞内代謝は同化と異化との動的平衡により維持されている。小胞体 (ER) ストレスとは、小胞体内に正常な立体構造として折り畳まれない unfolded protein が過度に蓄積された状態のことである。ER ストレスが加わるとシャペロンタンパクの誘導や翻訳スピードの抑制、さらには unfolded protein を小胞体外に汲み出して Ub 化によりプロテアソームで分解する (ERAD) 一連の適応応答が誘導される。しかし、これを上回る負荷が加わると、転写因子 CHOP の誘導や capsase-12 の活性化を介してアポトーシスが誘導される。

以上の結果を踏まえ、研究代表者らは IM によるオートファジー誘導の生物学的意義を明らかにし、かつ、IM のオートファジー誘導に関わる標的タンパクを同定することを目的として本研究計画を立案した。これにより ER ストレス緩和等を目的とした“オートファジー誘導療法”の基盤形成を目指したものである。

2. 研究の目的

- (1) IM のオートファジー誘導能の細胞種における普遍性を検証する。
- (2) IM によるオートファジー誘導の生物学的意義を明らかにする。

- (3) オートファジー誘導における IM の標的タンパク・分子の同定を試みる。

3. 研究の方法

(1) 種々の細胞株に IM を添加培養し、オートファジー誘導能を、電子顕微鏡、LC-3 抗体を用いた immunoblotting 法、immunocytochemistry 法、および GFP-LC3 遺伝子導入細胞株を用いて検討を行った。

(2) オートファジーの生物活性の評価は、オートファジー阻害剤 3-methyladenine (3-MA) および bafilomycin A1 を使用した。また、atg family 遺伝子の siRNA によるノックダウン法、オートファジーのプロセスを完全遮断できる Tet-off atg5 (-/-) MEF 細胞株 m5-7 (水島昇博士 (現 東京大学・生化学・分子生物学) より供与) を使用した。

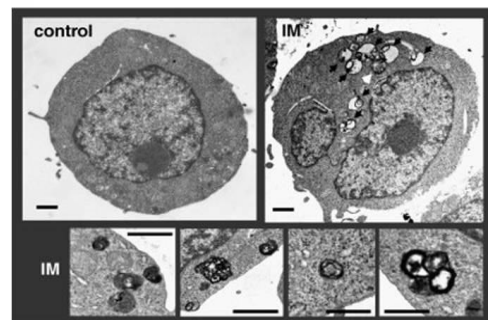
(3) ER ストレスの評価は、real-time PCR 法による ER ストレス関連遺伝子群の発現定量ならびにタンパク発原量を immunoblotting 法により定量した。また、ER ストレス性転写因子 CHOP (GADD153) のノックアウトマウス線維芽細胞株と野生型マウス線維芽細胞株との比較、CHOP 等の siRNA によるノックダウンにより ER ストレス負荷の関与の検証を行った。

(4) IM 固層化 FG ビーズを用いた IM 結合タンパクの one-step affinity 精製を試みた。

4. 研究成果

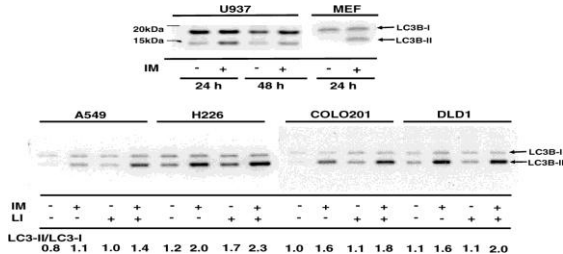
① イマチニブは BCR-ABL を発現していない種々の細胞種において、オートファジーを普遍的に、かつ、強力に誘導した。

HL-60 細胞に IM (10⁻⁶ M) 添加培養 48 時間後の電子顕微鏡像：細胞質内に多数のオートファゴソーム・オートリソソームが観察された。



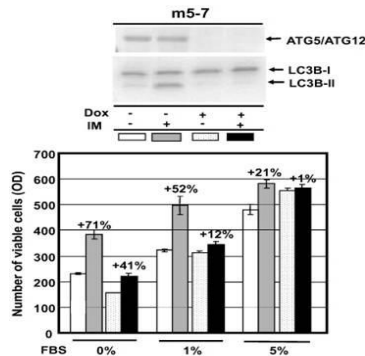
白血病細胞株 (U937), マウス胎生線維芽細胞 (MEF), 肺癌細胞株 (A549, H226), 大腸癌細胞株 (COL0201, DLD1) において IM 添加培養後、

オートファゴゾームマーカーである LC3-II の発現量の増加が immunoblotting 法により観察される。また、リソゾーム阻害剤 (LI) の存在下で LC3-II/LC3-I 比がさらに増加した。これより種々の細胞でオートファジーが誘導されていることが確認された。



②イマチニブはオートファジー誘導と連動して、細胞保護効果を発現する。

Tet-off atg5(-/-) MEF (m5-7 細胞株)で、atg5 をノックアウトし、オートファジー誘導を完全に遮断すると、IM による血清除去時の細胞保護効果は有意に減弱した。



また、オートファジー阻害剤 3-MA, bafilomycin A1 と IM との同時添加培養により、IM による細胞保護効果は減弱した。

③細胞保護効果と ER ストレス緩和効果

IM は種々の細胞ストレスに対して“保護効果”を発現した。その効果を列記すると以下の通りである。

③-1. IM は HL-60 細胞において低用量 Ara-C の殺細胞効果を抑制した。

③-2. IM は HL-60 細胞および骨髄腫細胞株 U266 細胞において ER ストレス誘導剤 tunicamycin の殺細胞効果と拮抗した。

③-3. IM は骨髄腫細胞株 U266 細胞および IM-9 細胞において 26S プロテアソーム阻害剤ボルテゾミブの殺細胞効果と拮抗した。

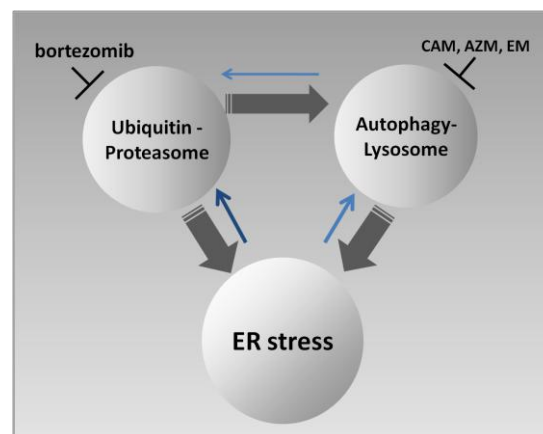
③-4. IM は種々の MEF, HL-60 細胞を含む種々の細胞において、血清除去における細胞死を

抑制した。また、血清除去により CHOP を含む ER-stress 関連遺伝子群の発現増強が誘導されるが、IM 存在下ではこれの遺伝子発現が抑制された。

③-5. HL-60 細胞における血清除去に対する IM の保護効果は Ab1 キナーゼに非依存的であった。

④細胞内ネットワークの遮断による効率的な細胞死誘導法の確立。

骨髄細胞株や乳癌細胞株において、プロテアソーム阻害剤であるボルテゾミブとオートファジー阻害効果をもつクラリスロマシン、アジスロマイシン等のマクロライド系抗生剤とを組み合わせると、マクロライド単独では細胞毒性がほとんど認めないにもかかわらず、両者を併用することにより、アポトーシスが著しく増強することが明らかとなった。また、この背景には、二つの主要なタンパク分解系の同時遮断による ER ストレス負荷の増大が関与していることが明らかとなった。



(Komatsu S, et al. Int J Oncol. 2012., Moriya S, et al. Int J Oncol. 2013.) また、これと連動して、細胞内の Ub 化タンパクの増量ならびにアグリソーム形成が著しく亢進した。(Moriya S, et al. Int J Oncol. 2013.)

これら一連の結果は、逆にオートファジーまたはプロテアソームの活性化を誘導することで ER ストレス負荷を緩和し、これにより細胞保護効果を誘導することが可能であることを強く支持するデータである。(図参照)

⑤IM のオートファジー誘導に関わる標的分子の同定は、現在も進行中である。

(謝辞: Tet-off atg5(-/-) MEF 細胞株を供与していただいた水島 昇博士(東京大学・生化学・分子生物学講座)に深謝致します。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 18 件)

(1) Komatsu S, Moriya S, Che X-F, Yokoyama T, Kohno N, Miyazawa K. Combined treatment with SAHA, bortezomib, and clarithromycin for concomitant targeting of aggresome formation and intracellular proteolytic pathways enhances ER stress-mediated cell death in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* in press. (査読有)

(2) Moriya S, Che XF, Komatsu S, Abe A, Kawaguchi T, Gotoh A, Inazu M, Tomoda A, Miyazawa K. Macrolide antibiotics block autophagy flux and sensitize to bortezomib via endoplasmic reticulum stress-mediated CHOP induction in myeloma cells. *Int J Oncol.* 42:1541-1550, 2013. (査読有)
doi: 10.3892/ijo.2013.1870.

(3) Karasawa S, Azuma M, Kasama T, Sakamoto S, Kabe Y, Imai T, Yamaguchi Y, Miyazawa K, Handa H. Vitamin K2 covalently binds to Bak and induces Bak-mediated apoptosis. *Mol Pharmacol.* 83:613-620, 2013. (査読有)
doi: 10.1124/mol.112.082602.

(4) Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, Miyazawa K, et al. Autophagy. 8:445-544, 2013. (査読有)
doi: PMID: 22966490

(5) Komatsu S, Miyazawa K(co-first author), Moriya S, Takase A, Naito M, Inazu M, Kohno N, Itoh M, Tomoda A. Clarithromycin enhances bortezomib-induced cytotoxicity via endoplasmic reticulum stress-mediated CHOP (GADD153) induction and autophagy in breast cancer cells. *Int J Oncol.* 40:1029-1039, 2012. (査読有)
doi: 10.3892/ijo.2011.

(6) Takemura A, Che XF, Tabuchi T, Moriya S, Miyazawa K, Tomoda A. Enhancement of cytotoxic and pro-apoptotic effects of 2-aminophenoxazine-3-one on the rat

hepatocellular carcinoma cell line dRLh-84, the human hepatocellular carcinoma cell line HepG2, and the rat normal hepatocellular cell line RLN-10 in combination with 2-deoxy-D-glucose. *Oncol Rep.* 27:347-355, 2012. (査読有)
doi: 10.3892/or.2011.1531.

(7) Tabuchi T, Che XF, Hiraishi K, Adachi M, Miyano K, Sumimoto H, Tabuchi T, Miyazawa K, Tomoda A. Selectively induced apoptosis in human neutrophils in the presence of oxidative phenoxazines, 2-amino-4,4 α -dihydro-4 α -7H-phenoxazine-3-one and 2-aminophenoxazine-3-one, preceded by decrease of intracellular pH, depolarization of the mitochondria, and inhibition of superoxide generation. *J Pharmacol Sci.* 117:139-48, 2011. (査読有)

(8) Abe A, Yamada H, Moriya S, Miyazawa K. The β -carboline alkaloid harmol induces cell death via autophagy but not apoptosis in human non-small cell lung cancer A549 cells. *Biol Pharm Bull.* 34:1264-1272, 2011. (査読有)

(9) Moriya S, Miyazawa K (co-first author), Kawaguchi T, Che XF, Tomoda A. Involvement of endoplasmic reticulum stress-mediated CHOP (GADD153) induction in the cytotoxicity of 2-aminophenoxazine-3-one in cancer cells. *Int J Oncol.* 39:981-988, 2011. (査読有)
doi: 10.3892/ijo.2011.1072.

(10) Tsuchida A, Itoi T, Kasuya K, Nagakawa Y, Suzuki M, Ikeda T, Suzuki Y, Aoki T, Miyazawa K. Chemoprevention of chemically-induced biliary carcinogenesis in hamsters by vitamin K2. *Hepato-gastroenterology.* 58:290-297, 2011. (査読有)

(11) Yamane M, Miyazawa K, Moriya S, Abe A, Yamane S. D,L-Threo-1-phenyl-2-decanoyl-amino-3-morpholino-1-propanol (DL-PDMP) increases endoplasmic reticulum stress, autophagy and apoptosis accompanying ceramide accumulation via ceramide synthase 5 protein expression in A549 cells. *Biochimie.* 93:1446-1459, 2011. (査読有)

(12) Kawaguchi T, Miyazawa K (co-first author), Moriya S, Ohtomo T, Che XF, Naito M, Itoh M, Tomoda A. Combined treatment

with bortezomib plus bafilomycin A1 enhances the cytotoxic effect and induces endoplasmic reticulum stress in U266 myeloma cells: crosstalk among proteasome, autophagy-lysosome and ER stress. *Int J Oncol.* 38:643-654, 2011. (査読有)
doi : 10.3892/ijo.2010.882.

(13) Nagata H, Che XF, Miyazawa K, Tomoda A, Konishi M, Ubukata H, Tabuchi T. Rapid decrease of intracellular pH associated with inhibition of Na⁺/H⁺ exchanger precedes apoptotic events in the MNK45 and MNK74 gastric cancer cell lines treated with 2-aminophenoxazine-3-one. *Oncol Rep.* 25:341-346, 2011. (査読有)

(14) Hayashi K, Hayashi T, Miyazawa K, Tomoda A. Phenoxazine derivatives suppress the infections caused by herpes simplex virus type-1 and herpes simplex virus type-2 intravaginally inoculated into mice. *J Pharmacol Sci.* 114:85-91, 2010. (査読有)

(15) Akiyama N, Miyazawa K, Kanda Y, Tohyama K, Omine M, Mitani K, Ohyashiki K. Multicenter phase II trial of vitamin K(2) monotherapy and vitamin K2 plus lalpha-hydroxyvitamin D3 combination therapy for low-risk myelodysplastic syndromes. *Leuk Res.* 34:1151-1157, 2010. (査読有)

(16) Nakachi T, Tabuchi T, Takasaki A, Arai S, Miyazawa K, Tomoda A. Anticancer activity of phenoxazines produced by bovine erythrocytes on colon cancer cells. *Oncol Rep.* 23:1517-1522, 2010. (査読有)

(17) Zheng CL, Che XF, Akiyama S, Miyazawa K, Tomoda A. 2-Aminophenoxazine-3-one induces cellular apoptosis by causing rapid intracellular acidification and generating reactive oxygen species in human lung adenocarcinoma cells. *Int J Oncol.* 36:641-650, 2010. (査読有)
18. Ohtomo T, Miyazawa K (co-first author), Naito M, Moriya S, Kuroda M, Itoh M, Tomoda A. Cytoprotective effect of imatinib mesylate in non-BCR-ABL-expressing cells along with autophagosome formation. *Biochem Biophys Res Commun.* 391:310-315, 2010. (査読有)

[学会発表] (計 11 件)

① 宮澤 啓介. オートファジーを考える

その基礎研究から臨床応用への展望. 第 169 回東京医科大学医学会総会. 2012. 6. 2, 東京.

② Komatsu S, Miyazawa K, Moriya S, Takase A, Naito M, Inazu M, Kohno N, Itoh M, Tomoda A. Combined treatment with clarithromycin and bortezomib enhances cytotoxicity via endoplasmic reticulum stress-mediated CHOP induction and autophagy in breast cancer cells. AACR Annual Meeting. 2012. 3. 31-4. 4. Chicago, USA.

③ Komatsu S, Moriya S, Kohno N, Tomoda A, Miyazawa K. Targeting autophagy with clarithromycin and proteasome with bortezomib enhances ER-stress in breast cancer cells. 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012. 9. 19. -9. 21, 札幌.

④ Moriya S, Che XF, Komatsu S, Tomoda A, Miyazawa K. Combined treatment with bortezomib plus macrolide antibiotics enhances ER-stress mediated cytotoxicity in myeloma cells. 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012. 9. 19. -9. 21, 札幌.

⑤ Che XF, Miyazawa K, Moriya S, Zheng C, Abe A, Tomoda A. 2-aminophenoxazine-3-one (Phx-3) induces apoptosis via a ROS/JNK-dependent pathway in human glioblastoma cell line LN229. 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012. 9. 19. -9. 21, 札幌.

⑥ Che XF, Komatsu S, Tomoda A, Miyazawa K. Simultaneously targeting autophagy with macrolide and proteasome with bortezomib in myeloma cells. 第 74 回日本血液学会学術集会, 2012. 10. 19-21, 京都.

⑦ 横山智央, 宮澤啓介, 野村将春, 後藤典子, 大屋敷一馬. Anti-EGFR antibody conjugated gold liposome for molecular imaging and therapy on NSCLC cells. 第 70 回日本癌学会総会, 2011. 10. 3. -5, 名古屋.

⑧ 森谷昇太, 宮澤啓介, 川口寛裕, 車暁芳, 友田燐夫. Endoplasmic reticulum stress-mediated CHOP (GADD153) induction is involved in the cytotoxicity of

2-amino-phenoxazine-3-one in cancer cells. 第 34 回日本分子生物学会総会. 2011. 12. 13-16, 横浜.

- ⑨ Miyazawa K, Moriya S, Kawaguchi T, Ohtomo T, Che XF, Maito M, Itoh M, Tomoda A. Combined treatment with bortezomib plus bafilomycin A1 enhances cytotoxic effect along with induction of ER-stress in myeloma cells. 第 52 回アメリカ血液学会総会, 2010. 12. 4-7, Orlando, USA.
- ⑩ Miyazawa K, Ohtomo T, Moriya S, Naito M, Kuroda M, Itoh M, Tomoda A. Cytoprotective autophagy induction by imatinib mesylate in non-BCR-ABL expressing cells. 第 52 回アメリカ血液学会総会, 2010. 12. 4-7, Orlando, USA.
- ⑪ 森谷昇太, 宮澤啓介, 川口寛裕, 大友理, 車暁芳, 内藤宗和, 伊藤正裕, 友田燁夫, 第 33 回日本分子生物学会・第 83 回日本生化学会合同大会, 2010. 12. 7-10, 神戸.

[その他]

ホームページ

<http://www.tokyo-med.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮澤 啓介 (MIYAZAWA KEISUKE)
東京医科大学 ・医学部 ・教授
研究者番号 : 5 0 2 0 9 8 9 7

(2) 研究分担者

横山 智央 (YOKOYAMA TOMOHISA)
東京医科大学 ・医学部 ・講師
研究者番号 : 4 0 4 0 8 2 4 0