

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860398

研究課題名(和文)細胞内タンパク分解系を標的とした多発性骨髄腫の新規治療法の開発

研究課題名(英文)Development of intracellular proteolytic pathways targeted therapies for the treatment of multiple myeloma

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄腫治療薬であるプロテアソーム阻害剤ボルテゾミブ(BZ)は、骨髄腫細胞株に対してオートファジーを誘導する。本研究では日常臨床で使用されているマクロライド系抗生剤がオートファジーの流れ(Flux)を止める作用を持つことおよび、BZによって骨髄腫細胞株に誘導されるオートファジーをマクロライドにより遮断することで殺細胞効果が増強することを明らかにした。また両タンパク分解系の同時阻害によりアグリソームが核膜周囲に形成され、更にこれをHDAC阻害剤SAHAにより阻害することで、殺細胞作用が著しく増強することを明らかにした。以上より細胞内タンパク分解系を標的とした新規骨髄腫治療法の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The specific 26S proteasome inhibitor bortezomib (BZ) induces autophagy in myeloma (MM) cells. The macrolide antibiotics clarithromycin (CAM) blocked autophagy flux, and BZ+CAM enhanced cytotoxicity in MM cell lines. Its combination, for the simultaneous blocking of the proteasome and autophagy leads to enhanced MM cell apoptosis. As misfolded protein is recruited by histone HDAC6 to dynein motors for aggresome transport, serving to sequester misfolded proteins, we further investigated the cellular effects of targeting proteolytic pathways and aggresome formation concomitantly in MM cells. Pronounced apoptosis was induced by the combination of HDAC6 inhibitor SAHA with BZ+CAM compared with each reagent or a 2-reagent combination. BZ+CAM treatment induced aggresome formation in the perinuclear region, whereas they were inhibited in the presence of SAHA. Targeting the integrated networks of aggresome, proteasome, and autophagy is suggested to induce efficient apoptosis in MM cells.

研究分野：応用薬理学，細胞死，オートファジー

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

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産生を特徴とする。Bortezomib (Velcade®、以下 BZ)は2003年にFDAで認可された骨髄腫の治療薬であり、26S プロテアソームの阻害効果を持つ。かつて骨髄腫は「3年生存」を目標とするほど予後の悪い病気であったが BZ 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、これを用いても骨髄腫が完治不能であることは依然変わらず、革新的な新規治療法の開発が求められている。

研究代表者らは、骨髄腫細胞において BZ がオートファジーを誘導することおよび、BZ とオートファジー阻害剤 Bafilomycin A₁ を骨髄腫細胞株に併用添加すると、殺細胞効果が相乗的に増強することを発見した。また、殺細胞効果の増強に関し、小胞体内に異常なタンパクが蓄積されてアポトーシスが引き起こされる「小胞体(ER)ストレス性細胞死」の関与を報告した。(Kawaguchi T, Moriya S, et al. Int J Oncol.2011)

しかし、現在のところ臨床認可されているオートファジー阻害剤は存在しない。一方近年臨床で日常使用されているマクロライド抗生剤である Clarithromycin(CAM) や Azithromycin(AZM)にオートファジー阻害作用があることが報告された。(Nakamura M et al. Int J Oncol. 2010, Renna M, et al. J Clin Invest. 2011)

以上を踏まえ、研究代表者は骨髄腫治療に対し、BZ と併用可能なオートファジー阻害剤としてのマクロライドの有用性を検討すると同時に、細胞タンパク分解系を標的とした多発性骨髄腫の新規治療法の開発を目指した。

2. 研究の目的

本研究では「細胞内二大タンパク分解系」の同時阻害を標的とした小胞体ストレス増強による多発性骨髄腫の新規治療法を開発し、臨床応用へ向けた基盤形成を行うために下記を明らかにすることを目的とした。

臨床使用されている各種マクロライド抗生剤を骨髄腫細胞株に投与し、オートファジー阻害能を評価する。

プロテアソーム阻害剤(BZ)とマクロライド抗生剤を骨髄腫細胞株に併用投与し、殺細胞効果増強の有無を検証する。

上記実験系において、タンパク分解系の同時阻害により、ER ストレスが増強し、殺細胞効果が増強すると予想されるが、ER ストレス経路のマーカータンパク・遺伝子発現を

調べ、殺細胞作用増強における ER ストレス性細胞死の関与を明らかにする。

タンパク分解系が過度に阻害されると、不良タンパク凝集体アグリソームが細胞保護的に形成されることが知られている。上記薬剤投与において、細胞内へのアグリソーム形成の有無を検証する。また、アグリソーム形成を HDAC6 阻害剤等で阻害することで、更に殺細胞作用を増強できるか検討する。

3. 研究の方法

マクロライド抗生剤のオートファジー阻害能の評価は骨髄腫細胞株(IM-9, RPMI8226, KMS-12-PE)にマクロライド抗生剤を添加培養し、オートファジー阻害能を、LC3B 抗体および p62 抗体を用いた immunoblotting 法にて検討を行った。

殺細胞作用の評価は骨髄腫細胞株に各種薬剤を添加培養し、CellTiter-Blue® Cell Viability Assay Kit (Promega)により生細胞数を算出した。また caspase-3 抗体、PARP 抗体を用いた immunoblotting 法にてアポトーシス関連タンパクの検討を行った。

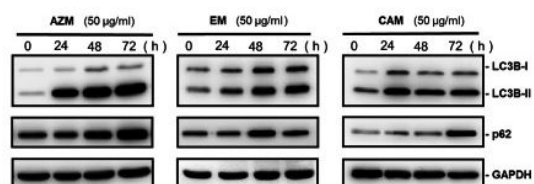
ER ストレスの評価は、Real-time PCR 法による ER ストレス関連遺伝子群の発現定量ならびにタンパク発現量を immunoblotting 法により定量した。

また、ER ストレス性細胞死を誘導する転写因子 CHOP の欠損細胞株ならびに、CHOP siRNA 処理を行った細胞株を使用し、薬理作用における ER ストレス負荷の関与を検証した。

アグリソームの評価は Vimentin 抗体を用いた蛍光免疫染色法および電子顕微鏡による形態学的観察を行った。

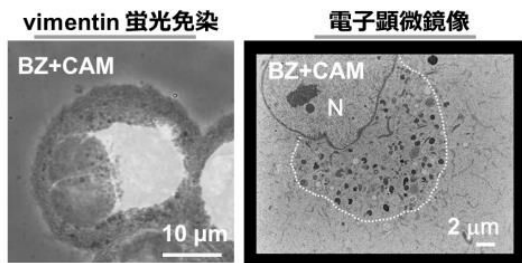
4. 研究成果

骨髄腫細胞株へのマクロライド抗生剤 Clarithromycin (CAM)、Azithromycin (AZM)、Erythromycin (EM)の 50ug/ml 投与により、オートファゴソームマーカーの LC3B-II ならびに p62 の継時的な蓄積が認められた。これにより骨髄腫細胞株に対し、オートファジーの流れ (Flux) を止める作用を持つことが示唆された。

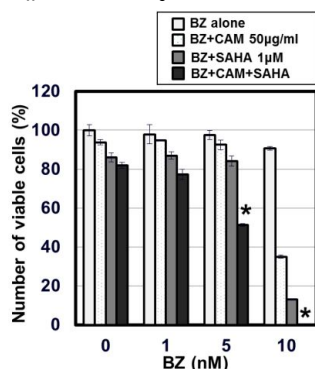


骨髄腫細胞株に BZ とマクロライドを併用投与し、48 時間後に生細胞数を測定したところ、殺細胞作用の増強が認められた。マクロライド単剤での毒性はほとんど認められなかった。同様の殺細胞作用の増強は肺がん細胞株 H226 でも普遍的であった。

細胞内の不良タンパクはプロテアソームおよびオートファジーによって分解除去されるが、タンパク分解系の許容量を超えた不良タンパクが細胞内に蓄積すると、不良タンパクの一部は HDAC6 と Dynein によって核膜周囲に輸送されて、細胞保護的にアグリソームが形成されると考えられている。そこで、BZ と CAM の併用投与による、アグリソーム形成の有無を検証するために、抗 Vimentin 抗体を用いた蛍光免疫染色を行ったところ、BZ と CAM の併用投与により核膜付近に Vimentin 強陽性に染色されるアグリソームと思われる構造物が認められた。電子顕微鏡観察では核膜周囲へのオルガネラの凝集が認められた。



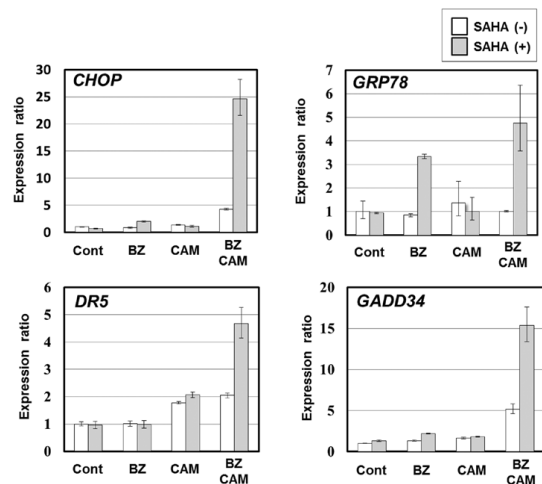
プロテアソーム系とオートファジー系の同時阻害 (BZ と CAM の併用投与) に加え、このアグリソーム形成を阻害するために、HDAC 阻害剤 SAHA (皮膚 T 細胞性リンパ腫治療薬: Volinostat, Zolinza®) の三剤併用投与を行った。これを蛍光顕微鏡で観察すると Vimentin 陽性のアグリソームの形成は阻害され、薬剤投与後 48 時間で著しい殺細胞作用の増強が認められた。



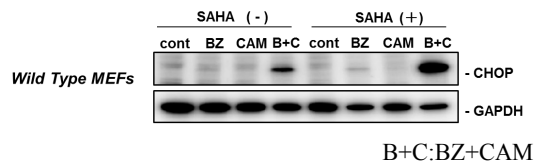
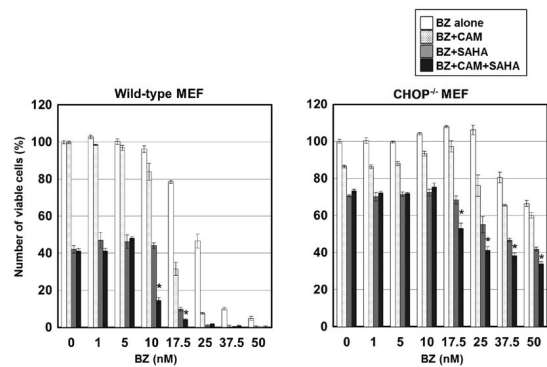
また、SAHA の代わりに特異的 HDAC6 阻害剤 Tubacin や、HDAC6 siRNA 処理を行っても同様の結果が得られた。

薬剤三剤併用条件における小胞体ストレス負荷をリアルタイム PCR 法で検討したところ、薬剤三剤併用により、ER ストレス性

細胞死を誘導する転写因子 CHOP ならびに ER ストレス関連遺伝子の発現増強が認められた。



薬剤三剤併用における殺細胞作用の増強が CHOP の発現増強に関与していると考え、CHOP を欠損した MEF を用いて検討を行った。野生型 MEF では骨髄腫細胞株と同様に薬剤三剤併用での殺細胞作用の著しい増強、並びに CHOP の発現増強が再現されたが、CHOP を欠損した MEF では、薬剤三剤併用による殺細胞作用の増強は減弱する傾向にあった。



B+C: BZ+CAM

以上より、BZ によってプロテアソーム系を阻害し、マクロライドによってオートファジー系を阻害し、またアグリソームをHDAC阻害剤により阻害することでERストレス負荷増大を伴った殺細胞作用の増強が認められた。



これらの結果はタンパク分解系を標的とした多発性骨髄腫の新規治療法の可能性を示唆するものと考えられる。

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6件)

Mukai S, Moriya S, Hiramoto M, Kazama H, Kokuba H, Che XF, Yokoyama T, Sakamoto S, Sugawara A, Sunazuka T, Ōmura S, Handa H, Itoi T, Miyazawa K.

Macrolides sensitize EGFR-TKI-induced non-apoptotic cell death via blocking autophagy flux in pancreatic cancer cell lines. *Int J Oncol.* 2016 Jan;48(1):45-54. (査読あり)

Ogawa H, Takyu R, Morimoto H, Toei S, Sakon H, Goto S, Moriya S, Kono T. Cell proliferation potency is independent of FGF4 signaling in trophoblast stem cells derived from androgenetic embryos. *J Reprod Dev.* 2016 Feb 20;62(1):51-8. (査読あり)

Sugita S, Ito K, Yamashiro Y, Moriya S, Che XF, Yokoyama T, Hiramoto M, Miyazawa K. EGFR-independent autophagy induction with gefitinib and enhancement of its cytotoxic effect by targeting autophagy with clarithromycin in non-small cell lung cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015 May 22;461(1):28-34. (査読あり)

Moriya S, Komatsu S, Yamasaki K, Kawai Y, Kokuba H, Hirota A, Che XF, Inazu M, Gotoh A, Hiramoto M, Miyazawa K.

Targeting the integrated networks of aggresome formation, proteasome, and autophagy potentiates ER stress-mediated cell death in multiple myeloma cells. *Int J Oncol.* 2015 Feb;46(2):474-86. (査読あり)

Che XF, Moriya S, Zheng CL, Abe A, Tomoda A, Miyazawa K.

2-Aminophenoxazine-3-one-induced apoptosis via generation of reactive oxygen species followed by c-jun N-terminal kinase activation in the human glioblastoma cell line LN229. *Int J Oncol.* 2013 Nov;43(5):1456-66. (査読あり)

Komatsu S, Moriya S, Che XF, 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.* 2013 Jul 19;437(1):41-7. (査読あり)

[学会発表](計11件)

向井俊太郎, 森谷昇太, 平本正樹, 風間美, 國場寛子, 横山智央, 半田宏, 糸井隆夫, 宮澤啓介: Macrolides sensitize EGFR-TKI-induced non-apoptotic cell death via blocking autophagy flux in pancreatic cancer cell lines. 第176回 東京医科大学医学会総会, 2015年11月07日, 東京医科大学病院, 東京.

森谷昇太, 車暁芳, 横山智央, 平本正樹, 宮澤啓介: クラリスロマイシン併用によるゲフィチニブ誘導性オートファジーを標的とした肺癌細胞株の殺細胞効果の増強, 第74回 日本癌学会学術総会, 2015年10月08日-2015年10月10日, 名古屋国際会議場, 名古屋.

伊藤謙太郎, 杉田翔平, 山城優太郎, 森谷昇太, 車暁芳, 平本正樹, 横山智央, 宮澤啓介: EGFR-independent autophagy induction with gefitinib and enhancement of its cytotoxic effect by targeting autophagy with clarithromycin in non-small cell lung cancer cells. 第175回 東京医科大学医学会総会, 2015年6月07日, 東京医科大学病院, 東京.

森谷昇太, 小松誠一郎, 山崎佳穂, 河合優佑, 國場寛子, 車暁芳, 稲津正人, 後藤明彦, 平本正樹, 半田宏, 宮澤啓介: Targeting the integrated networks of aggresome formation,

proteasome, and autophagy potentiates ER stress mediated cell death in multiple myeloma cells. 第 175 回 東京医科大学医学会総会 (医学会奨励賞受賞講演), 2015 年 6 月 07 日, 東京医科大学病院, 東京.

森谷昇太, 小松誠一郎, 車暁芳, 山崎佳穂, 國場寛子, 廣田綾子, 稲津正人, 後藤明彦, 宮澤啓介: Targeting aggresome formation enhances ER-stress mediated cell death in myeloma cells. 第 76 回 日本血液学会学術集会, 2014 年 10 月 31 日-2014 年 11 月 02 日, 大阪国際会議場, 大阪.

森谷昇太, 小松誠一郎, 車暁芳, 後藤明彦, 宮澤啓介: Simultaneous targeting aggresome, proteasome, and autophagy potentiates ER-stress mediated cell death in myeloma cell. 第 73 回 日本癌学会学術総会, 2014 年 09 月 25 日-2014 年 09 月 27 日, パシフィコ横浜, 横浜.

森谷昇太, 小松誠一郎, 山崎佳穂, 車暁芳, 宮澤啓介: Targeting intracellular proteolytic pathways with bortezomib, clarithromycin, and HDAC6 inhibitor enhances ER-stress mediated cell death in myeloma cells. 第 86 回 日本生化学会大会, 13 年 09 月 13 日, パシフィコ横浜, 横浜.

森谷昇太, 小松誠一郎, 山崎佳穂, 車暁芳, 宮澤啓介: Targeting intracellular proteolytic systems enhances ER-stress mediated myeloma cell death. 第 75 回 日本血液学会学術集会, 2013 年 10 月 11 日-2013 年 10 月 13 日, ロイトン札幌, 札幌.

小松誠一郎, 森谷昇太, 車暁芳, 河野範男, 宮澤啓介: Concomitant Targeting Intracellular Proteolytic Pathways Enhances ER-stress Mediated Cell Death in Breast Cancer Cells. 第 72 回 日本癌学会学術総会, 2013 年 10 月 03 日-2013 年 10 月 05 日, パシフィコ横浜, 横浜.

車暁芳, 森谷昇太, 宮澤啓介: Survivin を標的とする合成ペプチドによる成人 T 細胞白血病細胞(ATL)に対する新規治療法の開発, 2013 年 6 月 1 日, 東京医科大学病院, 東京.

宮下竜伊, 石川和浩, 森谷昇太, 宮澤啓介: DNA メチル化阻害剤による白血病細胞のオートファジーと小胞体ストレス誘導に関する検討, 第 171 回東京医科大学医学会総会, 2013 年 6 月 1 日, 東京医科大学病院, 東京.

〔その他〕

賞罰

第 174 回 東京医科大学 医学会 奨励賞受賞 (2015 年 6 月 6 日, 東京医科大学病院, 東京)

第 172 回 東京医科大学 医学会 奨励賞受賞 (2013 年 6 月 1 日, 東京医科大学病院, 東京)

ホームページ

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

6. 研究組織

(1) 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