

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462434

研究課題名(和文)小胞体ストレス誘導による膀胱癌新規治療法の開発

研究課題名(英文)Development of novel bladder cancer therapies by inducing endoplasmic reticulum stress

研究代表者

佐藤 全伯 (Sato, Akinori)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究・泌尿器科学・講師)

研究者番号：00296675

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では既存のプロテアソーム阻害薬、HIVプロテアーゼ阻害薬、ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬を用いて膀胱癌に対する小胞体ストレス誘導を介した新規治療法を開発することを目的とし、7種類の併用について検討を行った。いずれの併用でも小胞体ストレスを誘導することでアポトーシスを惹起し、膀胱癌増殖を抑制することができた。小胞体ストレスは異常蛋白(unfolded protein)の蓄積によって誘導され、過度に蓄積した異常蛋白は凝集することが示された。更に、小胞体ストレスの誘導は、ヒストンアセチル化およびmammalian target of rapamycin経路の抑制と関連していた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the present study is to develop novel therapies against bladder cancer by inducing endoplasmic reticulum (ER) stress using combinations of the clinically feasible proteasome inhibitor, HIV protease inhibitor, and histone deacetylase inhibitor. The efficacy of 7 combinations were evaluated. The combinations caused apoptosis and inhibited bladder cancer growth by inducing ER stress. The ER stress was induced by the accumulation of unfolded proteins and excessively accumulated unfolded proteins were shown to aggregate. Furthermore, the induction of ER stress was demonstrated to be associated with histone acetylation and inhibition of the mammalian target of rapamycin pathway.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：小胞体ストレス プロテアソーム阻害薬 HIVプロテアーゼ阻害薬 ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬

## 1. 研究開始当初の背景

私は、これまで一貫して泌尿器科癌に対する小胞体ストレス誘導、ユビキチン化蛋白蓄積を介した新規治療の開発を行ってきた。本研究の開始前までの研究で、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害薬である vorinostat あるいは HIV プロテアーゼ阻害薬である ritonavir とプロテアソーム阻害薬である bortezomib を用いた併用療法が、in vitro と in vivo において、腎癌 (Sato A et al. BJU Int 2011; Sato A et al. Urology 2012) および前立腺癌 (Sato A et al. J Urol 2013) の増殖抑制に有効であることを示し、また、そのメカニズムについても解明することができた。

細胞内に生じた異常蛋白 (unfolded protein) は、まず分子シャペロンによってその修復が試みられるが、修復が不成功であった場合は、ユビキチンを付加され (ユビキチン化)、プロテアソームで分解される。通常は蛋白の恒常性が、この「ユビキチン-プロテアソーム経路」によって保たれ、細胞は生存することができる。HDAC 阻害薬は、分子シャペロンをアセチル化し、その機能を抑制することで異常蛋白の修復を妨げ、細胞内に異常蛋白を増加する。また HIV プロテアーゼ阻害薬も、分子シャペロンの抑制により、異常蛋白を増加することが知られている。ただ、このままでは増加した異常蛋白はプロテアソームで分解されてしまうため、これらの薬剤だけでは異常蛋白を蓄積することはできない。そこで私は、これらの薬剤と、プロテアソーム阻害薬を併用することで、効率的にユビキチン化された異常蛋白を蓄積できると仮定した。過度に蓄積された異常蛋白により、小胞体ストレスが誘導され、アポトーシスに至るのみならず、ユビキチン化蛋白自体が cytotoxic であるため、両者による効率的な殺細胞効果が期待できると考えた訳である。

転移を有する進行した膀胱癌に対する治療的な治療法はなく、これまでにない新たな発想、アプローチによる治療法開発が重要である。私は、膀胱癌においても、小胞体ストレス誘導が効果的に殺細胞効果を発揮するものと考え、本研究を着想した。

## 2. 研究の目的

小胞体ストレス誘導は、細胞に普遍的に備わっている蛋白の恒常性維持機構をターゲットとするため、特定のシグナル伝達経路にとらわれる可能性が低く、革新的ながん治療法になると考えられる。本研究では、既存のプロテアソーム阻害薬、HIV プロテアーゼ阻害薬、HDAC 阻害薬を用いて、膀胱癌に対する小胞体ストレス誘導を介した新規治療法を開発することを目的とした。

## 3. 研究の方法

膀胱癌細胞培養株 (T24, UMUC3, 5637, J82,

HT-1376, VmCub1, EJ) を用いて、プロテアソーム阻害薬、HIV プロテアーゼ阻害薬、HDAC 阻害薬の併用が及ぼす効果について以下の方法で検討を行った。

### (1) 細胞増殖抑制効果の検討

細胞の viability を MTS assay にて検討した。結果から Chou と Talalay らの方法で combination index を算出し、併用効果の相乗性について検討した。次いで colony formation assay を行い、コロニー形成阻害能について検討した。

### (2) 小胞体ストレス誘導、蛋白ユビキチン化、ヒストンアセチル化の検討

小胞体ストレスの誘導 (glucose-regulated protein (GRP) 78, heat shock protein (HSP) 70, endoplasmic reticulum resident protein (ERp) 44, endoplasmic oxidoreductin-1-like protein (Ero1L) の発現増加) とユビキチン化蛋白の蓄積を western blot 法により検討した。また、RIPA buffer を用いた蛋白回収で生じた非可溶性蛋白分画を再溶解し、western blot 法によりユビキチン化蛋白の非可溶性蛋白分画への移行について検討した。更に、小胞体ストレス誘導とヒストンアセチル化の相互関係についても検討した。

### (3) アポトーシス誘導の検討

アネキシン V 陽性細胞をフローサイトメトリーを用いて検出した。また、western blot 法で active caspase 3, cleaved poly(ADP-ribose) polymerase, NOXA の発現を検討した。

### (4) Autophagy 誘導の検討

Western blot 法で LC3-I, LC3-II の発現の変化を確認し、autophagy の誘導を検討した。

### (5) 細胞周期および細胞周期関連蛋白発現の変化に関する解析

細胞周期の変化をフローサイトメトリーにて解析した。また、western blot 法にて cyclin D1, cyclin-dependent kinase (CDK) 4, p21 の発現を検討した。

## 4. 研究成果

### (1) プロテアソーム阻害薬 bortezomib と HDAC 阻害薬 vorinostat の併用

Bortezomib と vorinostat の併用により、著明にアポトーシスが誘導され、膀胱癌増殖は相乗的に抑制された。細胞周期関連蛋白では cyclin D1, CDK4 の発現が減少し、p21 の発現増加が認められた。予想通り、両者の併用はユビキチン化蛋白を蓄積し、小胞体ストレスを誘導した。この結果は、理論的には興味深い、HDAC 阻害薬の必要濃度が比較的高く、臨床的な応用という点では困難と考えられた。

(2) プロテアソーム阻害薬 carfilzomib と HIV プロテアーゼ阻害薬 ritonavir の併用  
 Carfilzomib と ritonavir の併用もアポトーシスを誘導し、膀胱癌増殖を相乗的に抑制した。併用は、小胞体ストレスを誘導するとともに、ヒストンアセチル化も促進した。更に、mammalian target of rapamycin (mTOR) 経路を抑制する sestrin-2 や AMP-activated protein kinase (AMPK) の発現を誘導し、オートファジーを惹起することが示された。

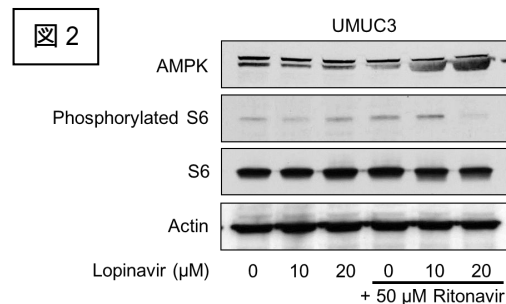
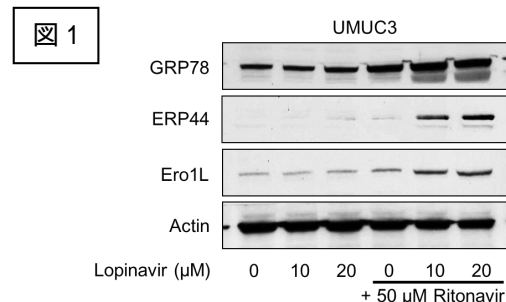
(3) プロテアソーム阻害薬 ixazomib と HIV プロテアーゼ阻害薬 ritonavir の併用  
 Ixazomib と ritonavir の併用は、相乗的にアポトーシスを誘導し、膀胱癌増殖を抑制した。本併用でも予測通り小胞体ストレスが誘導され、更にヒストンのアセチル化が促進されることが示された。また、ユビキチン化蛋白の蓄積が時間依存性であること、また、それらの過剰の蓄積は凝集を来すことが、非可溶性蛋白分画の解析で示された。本併用は、オートファジーを誘導することも見出され、これは蛋白凝集と理論的に矛盾しない結果であった。更に、蛋白合成を抑制することにより併用療法の効果が減弱したことから、異常蛋白の蓄積および小胞体ストレスの誘導が、併用療法の機序として重要であることが示唆された。

(4) HIV プロテアーゼ阻害薬 ritonavir と HIV プロテアーゼ阻害薬 nelfinavir の併用  
 Ritonavir と nelfinavir は、ともに抗 HIV 薬であり、本併用は、抗腫瘍薬を用いない大変ユニークな試みである。この併用においても、相乗的なアポトーシスの誘導および殺細胞効果が認められた。細胞周期関連蛋白では、cyclin D1, CDK4 の発現が低下した。メカニズムとしては、小胞体ストレスの誘導とヒストンアセチル化が示された。このヒストンアセチル化の機序の一つとして、併用による HDAC の発現抑制が考えられた。また、本併用は mTOR 経路を抑制することが示され、重要なメカニズムの一つと考えられた。

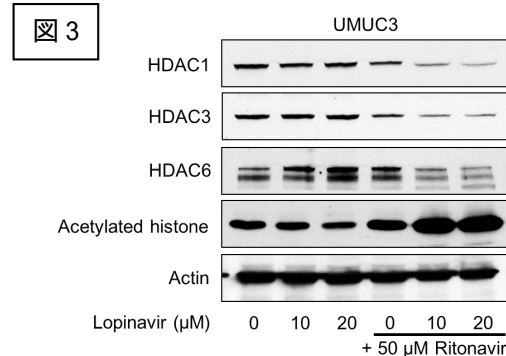
(5) プロテアソーム阻害薬 ixazomib と HDAC 阻害薬 panobinostat の併用  
 Ixazomib と panobinostat の併用も、相乗的にアポトーシスを誘導し、膀胱癌細胞増殖を抑制した。また、cyclin D1, CDK4 の発現を低下させるとともに、p21 の発現を増加させ、cyclin D1/CDK4 複合体の発現と機能を同時に抑制することが示された。仮定通り、併用により小胞体ストレスが相乗的に誘導され、更にヒストンのアセチル化も促進された。また、tubulin のアセチル化も促進され、HDAC6 の抑制を通じた分子シャペロンのアセチル化および機能抑制が示唆された。一方で、蛋白合成阻害薬が併用による小胞体ストレス誘導を抑制し、殺細胞効果を減弱したことから、小胞体ストレス誘導が本併用の重要な作用

メカニズムであることが示された。

(6) HIV プロテアーゼ阻害薬 ritonavir と HIV プロテアーゼ阻害薬 lopinavir の併用  
 Ritonavir と lopinavir も、ともに抗 HIV 薬である。(4) の併用の成功から本併用を着想して研究を行った。抗がん薬を用いない併用療法ではあるが、強力な殺細胞効果が認められた。また、仮定通り、小胞体ストレスの誘導が確認され(図1)、AMPK 発現増加による mTOR 経路の抑制も示された(図2)。



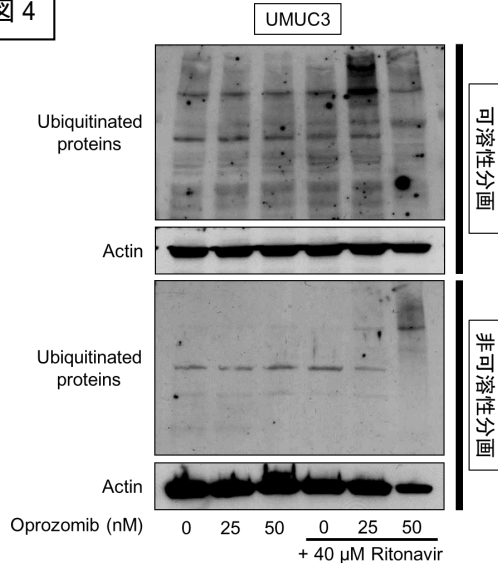
更に、併用が HDAC の発現を抑制すること、およびヒストンアセチル化を惹起することも見出された(図3)。



Ritonavir と lopinavir の併用は、AIDS の治療薬として、その合剤が臨床的に使用されており、投与方法および安全性がすでに確立されている。本併用は、膀胱癌治療への臨床応用が十分に期待できるものとする。

(7) プロテアソーム阻害薬 oprozomib と HIV プロテアーゼ阻害薬 ritonavir の併用  
 Oprozomib と ritonavir の併用においても、相乗的にアポトーシスが誘導され、細胞増殖が抑制された。併用は、cyclin D1 および CDK4 の発現を抑制し、sub-G1 fraction を増加した。予想通り、併用により相乗的に小胞体ストレスが誘導されたが、本併用においても、ユビキチン化された unfolded protein は、

図 4



その細胞内蓄積に伴って可溶性分画から非可溶性分画に移行することが(図4)使用した全細胞株で示された。更に、蛋白合成阻害薬 cycloheximide が unfolded protein の蓄積と小胞体ストレス誘導を抑制し、併用の効果を減弱したことから、仮定通り、小胞体ストレスの誘導が併用の重要なメカニズムであることが示された。また、併用が AMPK の発現を増加して、mTOR 経路を抑制するとともに、autophagy を誘導すること、更に、HDAC の発現を抑制してヒストンアセチル化を促進することも見出された。

#### <まとめ>

本研究により、以下のことが明らかとなった。

- 膀胱癌において、既存のプロテアソーム阻害薬、HIV プロテアーゼ阻害薬、HDAC 阻害薬の併用により、小胞体ストレスを誘導することが可能である。
- 小胞体ストレスの誘導は、アポトーシスを惹起し、膀胱癌増殖抑制に有効である。
- 小胞体ストレスは、unfolded protein の蓄積によって誘導される。
- 過度に蓄積した unfolded protein は非可溶性蛋白分画に移行する。
- 小胞体ストレスを誘導すると、ヒストンアセチル化も惹起される。
- 小胞体ストレスの誘導は、mTOR 経路の抑制と関連する。

進行膀胱癌に対する根治的な治療法は存在しない。小胞体ストレス誘導は、従来の治療法とは全く異なった作用機序で抗腫瘍効果を発揮するため、従来の治療法では効果がなかったケースでも奏功する可能性があると思われる。本研究は、膀胱癌における小胞体ストレス誘導が既存薬のみの併用で可能であることを示したものであり、本研究成果に基づいた、小胞体ストレス誘導による膀胱癌新規治療法の臨床応用が期待される。

## 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2件)

Sato A, Asano T, Okubo K, Isono M, Asano T: Nelfinavir and ritonavir kill bladder cancer cells synergistically by inducing endoplasmic reticulum stress. *Oncol Res.* 26, 323-332, 2018. doi:10.3727/096504017X1495792984297 2. 査読有.

Sato A, Asano T, Okubo K, Isono M, Asano T: Ritonavir and ixazomib kill bladder cancer cells by causing ubiquitinated protein accumulation. *Cancer Sci.* 108, 1194-1202, 2017. doi: 10.1111/cas.13242. 査読有.

[学会発表](計16件)

佐藤全伯, 浅野貴子, 大久保和樹, 磯野誠, 浅野友彦: Panobinostat と ixazomib の併用は小胞体ストレスとヒストンアセチル化を誘導し膀胱癌細胞増殖を抑制する. 第106回日本泌尿器科学会総会, 京都, 2018.

Sato A, Asano T, Okubo K, Isono M, Asano T: Ritonavir and oprozomib cause bladder cancer apoptosis synergistically by inducing endoplasmic reticulum stress. The 33rd European Association of Urology Congress, Copenhagen, 2018.

(招待講演) 佐藤全伯: 泌尿器科癌の分子標的治療~その歴史と展望~. 上越スペシャリティミーティング, 上越, 2017.

佐藤全伯, 浅野貴子, 大久保和樹, 磯野誠, 浅野友彦: HIV プロテアーゼ阻害薬の併用は小胞体ストレスとヒストンアセチル化を誘導し膀胱癌細胞増殖を抑制する. 第105回日本泌尿器科学会総会, 鹿児島, 2018.

Sato A, Isono M, Asano T, Okubo K, Asano T: Panobinostat and ixazomib inhibit bladder cancer growth synergistically by increasing histone acetylation and inducing endoplasmic reticulum stress. The 32nd European Association of Urology Congress, London, 2017. (Best Poster 賞受賞)

Sato A, Okubo K, Asano T, Isono M, Asano T: Lopinavir synergizes with ritonavir to induce bladder cancer apoptosis by causing histone acetylation and endoplasmic reticulum stress. The 32nd European Association of Urology Congress, London, 2017.

佐藤全伯, 大久保和樹, 磯野誠, 浅野貴子, 浅野友彦: HIV プロテアーゼ阻害薬の併用は膀胱癌細胞で強力な殺細胞効果を発揮する. 第 75 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2016.

Sato A, Asano T, Isono M, Okubo K, Asano T: Ritonavir interacts with ixazomib synergistically to cause ubiquitinated protein accumulation and endoplasmic reticulum stress in bladder cancer cells. 24th Biennial Congress of the European Association for Cancer Research, Manchester, 2016.

**(招待講演)** Sato A: ER stress: A novel approach to treating urological malignancies. 11th Triennial Meeting German-Japanese Confederation of Urology, Hamburg, 2016.

佐藤全伯, 浅野貴子, 磯野誠, 大久保和樹, 浅野友彦: Ritonavir と ixazomib の併用は小胞体ストレスを相乗的に誘導し膀胱癌細胞増殖を抑制する. 第 104 回日本泌尿器科学会総会, 仙台, 2016.

Sato A, Asano T, Isono M, Okubo K, Asano T: Combination of human immunodeficiency virus protease inhibitors causes bladder cancer apoptosis synergistically by inducing endoplasmic reticulum stress and histone acetylation. The 31st European Association of Urology Congress, Munich, 2016.

佐藤全伯, 磯野誠, 大久保和樹, 浅野友彦: 膀胱癌細胞において ritonavir は carfilzomib と相互作用し小胞体ストレスとオートファジーを誘導する. 第 74 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2015.

Sato A, Isono M, Asano T, Okubo K, Ito K, Asano T: Ritonavir synergizes with carfilzomib to cause endoplasmic reticulum stress and autophagy in bladder cancer cells. The 30th European Association of Urology

Congress, Madrid, 2015.

佐藤全伯, 磯野誠, 浅野貴子, 大久保和樹, 浅野友彦: Ritonavir と carfilzomib の併用は小胞体ストレスを相乗的に誘導し膀胱癌細胞増殖を抑制する. 第 103 回日本泌尿器科学会総会, 金沢, 2015.

**(招待講演)** 佐藤全伯: 何かを細胞内に蓄積することで癌細胞を死滅できるのか? 第 9 回 Basic Urology Research Seminar, 大阪, 2014.

Sato A, Asano T, Isono M, Ito K, Asano T: Ubiquitinated protein accumulation: A novel approach to treating bladder cancer. The 23rd Biennial Congress of the European Association for Cancer Research, Munich, 2014.

[その他]  
ホームページ等

<https://researchmap.jp/zenpaku/>

## 6. 研究組織

研究代表者

佐藤 全伯 (SATO, Akinori)

防衛医科大学校・医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究, その他部局等・講師

研究者番号: 00296675