

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：32645

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670589

研究課題名(和文)小胞体ストレス誘導による転移・再発乳癌に対する革新的治療法の開発

研究課題名(英文)ER stress introduce an innovative therapy for metastatic breast cancer.

研究代表者

小松 誠一郎 (Komatsu, Seiichiro)

東京医科大学・医学部・兼任助教

研究者番号：40408208

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：プロテアソーム阻害によりユビキチン(Ub)化タンパク質は微小管に沿ってMTOCへ輸送されアグリソームを形成する。この輸送の「足場」となる微小管に着目し、転移性乳癌細胞株を用いて微小管重合阻害剤ビノレルビン(VNR)および脱重合阻害剤パクリタキセル(PTX)とボルテゾミブ(BZ)との併用効果を検討した。BZ+VNRはBZ+PTXに比べて効率的にアグリソーム形成を阻害し、かつ、ERストレス負荷を介したアポトーシスが增强した。さらに、ここにオートファジー阻害活性を有するアジスロマイシンを加えることでERストレス負荷と細胞死が著しく增强し、ERストレス負荷を介した新規治療法の可能性が提唱された。

研究成果の概要(英文)：As ubiquitinated (Ub) proteins are concentrated at the aggresome upon proteasome failure, we focused on the microtubule as the scaffold of this transport pathway for aggresome formation. Treatment of metastatic breast cancer cell lines with a proteasome inhibitor bortezomib (BZ) resulted in induction of aggresome in a perinuclear lesion. Vinorelbine (VNR), which inhibits microtubule polymerization, more effectively suppressed BZ-induced aggresome formation than paclitaxel (PTX), which stabilizes microtubules. Combined treatment using BZ and VNR, but not PTX, enhanced apoptosis induction along with pronounced ER stress. The addition of azithromycin to block autophagy flux in the BZ plus VNR-containing cell culture further enhanced the cytotoxicity. These data suggest that suppression of BZ-induced aggresome formation using an inhibitory drug such as VNR for microtubule polymerization is a novel strategy for metastatic breast cancer therapy.

研究分野：乳癌治療

キーワード：オートファジー 乳癌 小胞体ストレス アグリソーム プロテアソーム アポトーシス リソソーム
微小管

1. 研究開始当初の背景

現在、転移・再発乳癌の治療には、ホルモン感受性の有無、HER2 過剰発現の有無等により NCCN ガイドラインが提唱するアルゴリズムに則り治療指針が立てられている。しかし、10 年生存率は約 5%に過ぎず、20 年を超えて CR を継続している症例は全体のわずか 2 - 3%である。これより転移・再発乳癌に対する新規治療法の開発が望まれている。

ボルテゾミブ (以下 BZ) は 2003 年に多発性骨髄腫の治療薬として FDA で認可され、26S プロテアソームの阻害活性を有し、従来の抗がん剤とは作用機序の異なる特異的な薬剤である。その優れた抗腫瘍効果が造血器系腫瘍で注目されているが、転移・再発乳癌患者を対象とする BZ 単剤による第 I/II 相試験ではその明らかな有効性が検証されなかった。

近年、ユビキチン化されたタンパク質がドッキングタンパク p62 を介してオートファゴソーム内に取り込まれ、リソソームで加水分解される経路が解明され、二大タンパク分解系のクロストークが明らかとなった (Kirkin V, Mol Cell, 2009)。一方、小胞体 (ER) 内腔に過度の不良タンパク (unfolded protein) が蓄積すると、ユビキチン化されてプロテアソームで分解されるが、この処理能力を上回る不良タンパクの蓄積により、細胞のアポトーシスが誘導される。

一方、乳癌細胞や骨髄腫細胞では、行き場を失った不良タンパク質の凝集体 (aggregate) を、ダイニンモータータンパクと HDAC6 とが共同して、微小管上を核近傍の microtubule organization center へ逆行輸送し、アグリソームとして“封入”する。筆者らは、このアグリソーム形成が ER ストレスの緩和、すなわち、細胞保護的に機能していることを既に明らかにしている。(Komatsu S, Biochem Biophys Res Commun. 2013)

2. 研究の目的

転移・再発乳癌治療に実臨床使用されているタキサン系抗癌剤は微小管の脱重合阻害作用を、また、ピンカアルカロイド系抗がん剤のビノレルピンは微小管の重合阻害作用を有することから、微小管輸送のスカフォールド (足場) が構築されなくなり、これより unfolded protein の微小管輸送能も阻止されることが容易に予想される。

そこで、アグリソーム形成過程における各段階を阻害する 微小管脱重合阻害剤 (タキサン系薬剤)、重合阻害剤 (ピンカアルカロイド系薬剤) を用いて、乳癌細胞株におけるアグリソーム形成阻害効果を検討し、プロテアソーム阻害剤、オートファジー阻害剤との共存下で ER ストレス負荷を介したアポトーシスが効率的に誘導するかを検討した。

3. 研究の方法

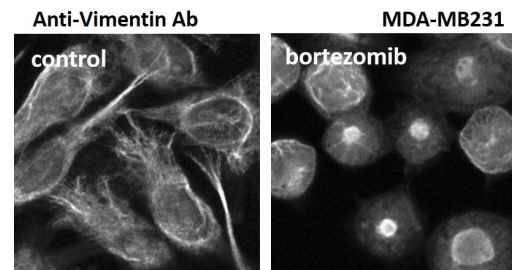
転移性乳癌細胞株 (MDA-MD-231, MDA-MB-468) を用いて、プロテアソーム阻害剤ボルテゾミブ (BZ) 添加時のアグリソーム形成について抗ビメンチン抗体を用いた免疫染色法等で評価する。

BZ に微小管脱重合阻害剤 (タキサン系薬剤) パクリタキセル (PTX)、重合阻害剤 (ピンカアルカロイド系薬剤) ビノレルピン (VNR) 等を同時添加し、BZ による誘導されるアグリソームの形成阻害活性、ER ストレス負荷、殺細胞増強効果を検討する。

さらにオートファジー阻害活性を有するマクロライド抗生剤を加えることで、アグリソーム形成阻害に加えて、オートファジーリソソーム系、ユビキチン - プロテアソーム系の細胞内二大タンパク質分解系の同時阻害による ER ストレス負荷増強と殺細胞増強効果の有無を検討した。

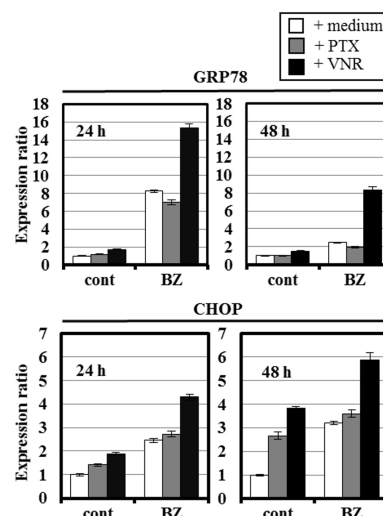
4. 研究成果

乳癌細胞株 MDA-MB231 を BZ で 24 時間処理することで、核近傍に抗ビメンチン抗体で“目玉焼き”状に強染色されるアグリソームが検出された (下図参照)

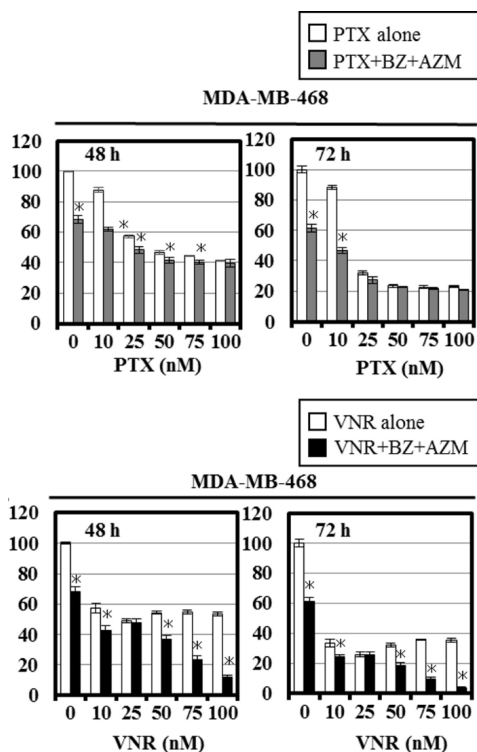


この培養系に PTX, VNR をそれぞれ同時添加すると BZ により誘導されるアグリソーム形成は抑制されるが、この抑制効果は微小管重合阻害剤 VNR の方が、脱重合阻害剤 PTX に比べて強かった。

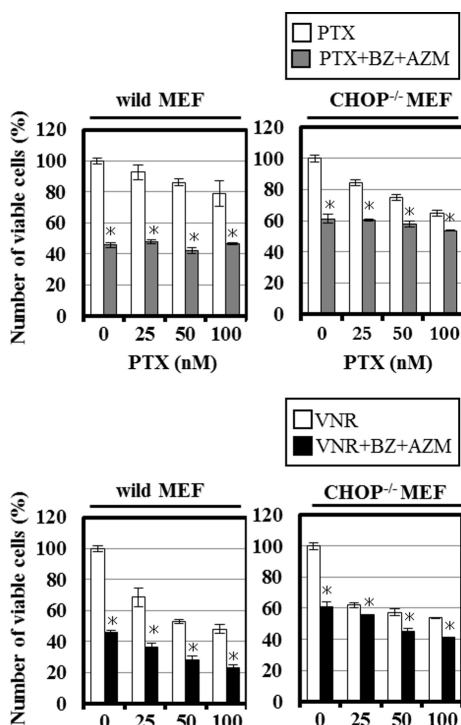
また MB231 細胞株において、両薬剤の殺細胞増強効果ならびに ER ストレス関連蛋白質 GRP78, CHOP の発現誘導は、BZ + VNR の方が BZ + PTX に比べて強力であった。



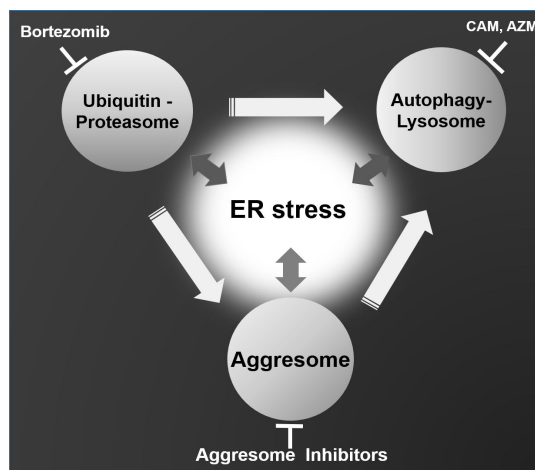
さらに、転移性乳癌細胞株における殺細胞増強効果は、オートファジー阻害活性のあるマクロライド系抗生剤であるアジスロマイシン (AZM) を添加することでさらに増強した。(下図：縦軸は生細胞数比率 (%))



CHOP ノックアウトマウス由来胎生線維芽細胞株(MEF)では、野生型 MEF と比較して、特に VNR 単独対 VNR+BZ+AZM による殺細胞増強効果が減弱することが明らかとなった。これよりにおける殺細胞増強効果には ER ストレス関連性転写因子 CHOP が関与していると考えられる。



以上より、オートファジー-リソソーム系、ユビキチン-プロテアソーム系の細胞内の二大タンパク質分解系の同時阻害に加えて、微小管重合阻害剤を用いてアグリソーム形成をブロックすることで、著しい ER ストレス負荷を介した殺細胞増強効果が誘導されることを明らかにした。これより、難治性転移性乳癌に対する新規治療概念、ER ストレス負荷療法 (ER-stress loading therapy) が提唱された。



また、共同研究者の宮澤らは、上記の現象が単に転移性乳癌細胞株に留まらず、多発性骨髄腫細胞株にアグリソーム形成阻害活性を有する HDAC6 (ヒストン脱アセチル化酵素 6) 阻害剤・ポリノスタット(SAHA)を作用させた際にも同様に観察されたことを報告している (Moriya S, Miyazawa K, et al. Int J Oncol. 2015)。これよりタンパク質産生の旺盛な種々の癌種における ER ストレス誘導療法適応の「普遍性」が強く示唆された。

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)

1: Miyahara K, Kazama H, Kokuba H, Komatsu S, Hirota A, Takemura J, Hirasawa K, Moriya S, Abe A, Hiramoto M, Ishikawa T, Miyazawa K: Targeting bortezomib-induced aggresome formation using vinorelbine enhances the cytotoxic effect along with ER stress loading in breast cancer cell lines. Int J Oncol. 49(5):1848-1858, 2016. 査読有 doi: 10.3892/ijo.2016.3673.

2: 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. 46:474-86, 2015. 査読有
doi:10.3892/ijo.2014.2773.

〔学会発表〕(計4件)

1. 宮原 か奈、森谷昇太、平澤一浩、平本正樹、**小松誠一郎**、石川孝、阿部 晃久、宮澤 啓介：Targeting bortezomib-induced aggresome formation using vinorelbine enhances the cytotoxic effect along with ER-stress loading in breast cancer cell lines. 第177回 東京医科大学医学部総会、2016年6月4日、東京医科大学病院、(東京都、新宿区)

2. 宮原 か奈、森谷昇太、平澤一浩、平本正樹、**小松誠一郎**、石川孝、阿部 晃久、宮澤 啓介：ビノレルピンは乳癌細胞株に於いてアグリソーム形成を阻害することによりボルテゾミブ誘導性の細胞毒性を増強する 第75回日本癌学会学術集会 2016年10月、パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市)

3. 森谷 昇太、**小松誠一郎**、山崎 佳穂、國場 寛子、廣田 綾子、車 暁芳、稲津 正人、後藤 明彦、平本 正樹、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30日、大阪国際会議場(大阪府、大阪市)

4. 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 cells. 第73回日本癌学会学術集会 2014年9月25日、パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.tokyo-med.ac.jp/target/>

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
小松 誠一郎 (KOMATSU, Seiichiro)
東京医科大学・医学部・兼任助教
研究者番号：40408208
- (2) 研究分担者
宮澤 啓介 (MIYAZAWA, Keisuke)
東京医科大学・医学部・主任教授
研究者番号：50209897
- (3) 連携研究者 -
- (4) 研究協力者 -