

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10235

研究課題名(和文)オートファジーによる胸部外科疾患の病態の理解と制御

研究課題名(英文) Understanding and control of pathophysiology of thoracic surgical disease by autophagy

研究代表者

土田 正則 (TSUCHIDA, Masanori)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：60293221

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：1. 肺癌細胞における解析：肺癌細胞株を用いてグルタミン依存性増殖、mTORC1活性、オートファジー誘導能に関してグルタミノリシス抑制後の変化を解析した。LC3-IIレベルをオートファジー誘導能の指標として測定した。グルタミノリシスを抑制することでmTORC1シグナル抑制とオートファジー誘導を介して細胞増殖が抑制されることが判明した。

2. 血管内皮障害モデル：マウスモデルでは血管内皮が虚血や加齢などのストレスに曝されるとp53の発現が増強することが判明した。オートファジーではp62が関与すると考えられているがP53とP62の直接の関連は不明で、今後検討を要する。

研究成果の概要(英文)：1. Analysis in lung cancer cells: Changes after glutaminolysis suppression regarding glutamine-dependent proliferation, mTORC1 activity, autophagy induction ability were analyzed using a lung cancer cell line. LC3-II level was measured as an index of autophagy induction ability. It was found that cell proliferation was suppressed via mTORC1 signal suppression and autophagy induction by suppressing glutaminolysis.

2. Vascular endothelial damage model: In the mouse model, expression of p53 was found to be enhanced when the vascular endothelium was exposed to stress such as ischemia and aging. It is thought that p62 is involved in autophagy, but the direct association between P53 and P62 is unknown, and further study is required.

研究分野：胸部外科学

キーワード：オートファジー 肺癌 大動脈疾患 血管内皮

### 1. 研究開始当初の背景

生体を構成する主要成分であり、生命現象を支えるタンパク質は、細胞内で絶えず合成と分解を繰り返しており、きわめて動的な再生処理システムを構成している。この新陳代謝の主役であるオートファジーは、栄養素の確保や細胞内に生じた不良品・不用品の効率的な除去のために積極的に作動されている。従来オートファジーは、栄養飢餓に応答して発動される非選択的なタンパク質分解システムとして、自己タンパク質を壊してアミノ酸を供給する究極的な生存戦略とみなされてきた。しかし、最近の研究により低いレベルで起こっている恒常的なオートファジーが神経変性疾患や癌の発症を防いでいることが明らかになりつつある。更に、“選択的オートファジー”という新概念が提唱され、オートファジー減弱に伴う異常タンパク質やオルガネラの蓄積が加齢疾患の起因となることが明らかになってきた。胸部外科が対象とする疾患は、このオートファジーが疾患の制御に関与する可能性が高いが、これまでオートファジーに着目した病態解明の研究は行われていない。

### 2. 研究の目的

オートファジーの破綻により細胞内恒常性維持が破綻し、酸化ストレス亢進やゲノム不安定化が起こると、臓器障害や腫瘍促進などの疾患を発生する可能性がある。大動脈瘤や肺癌といった加齢に伴う疾患において、オートファジーの破綻が疾患の発症や臓器障害に及ぼす影響を解明するために肺癌、血管内皮障害を材料としてその分子機構と病態生理学的意義の解明を目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 肺癌切除検体の解析：肺腺癌 4 例、肺扁平上皮癌 3 例、肺小細胞癌 1 例、腺癌の正常肺部分 1 例を用いて p62/SQSTM1 抗体、リン酸化 p62/SQSTM1 抗体、NRF2 抗体を用いたウェスタンブロットを行った。陽性コントロールとして、p-p62 が蓄積し NRF2 が活性化していることを確かめてある HCV 陽性肝細胞癌を使用した。

(2) 癌ゲノム解析：肺腺癌 100 例、肺扁平上皮癌 67 例のホルマリン固定標本から DNA を抽出し、次世代シーケンサーによるゲノムのエキゾーム解析を行った。

(3) 培養細胞の解析：肺扁平上皮癌 5 種類の cell line (Sq-1, LK-2, LC-1/sq, EBC-1 RERF-LC-AI) を用いてグルタミン依存性増殖、mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) 活性、オートファジー誘導能を解析した。グルタミンリシス抑制後の変化 LC3-II レベルをオートファジー誘導能の指標をして測定した。

(4) オートファジー測定：RERF-LC-AI および QG56 細胞を RPMI 培地中の 6 ウェルプレートで培養し 24 時間後、培地を Gln を除いた RPMI 培地に交換し 2 時間、または 10  $\mu$ M の BPTES 含有培地中で 22 時間培養した。次に、細胞をリソソームプロテアーゼ阻害剤 (10  $\mu$ g/mL E64d およびペプスタチン) を加えたあるいは加えない培地で 2 時間培養した。細胞溶解物を NuPAGE に供し抗 LC3 抗体による免疫ブロット分析を行った。

### (5) 血管内皮障害の解析

動脈瘤モデル：マウスに高脂肪食を与えアンジオテンシン II を静脈注射することで動脈瘤が形成されモデルでオートファジーに関連する LoX を測定した。

培養実験では human vascular smooth muscle cells (HVMSC) を用いて研究を行った。

### 4. 研究成果

(1) 切除検体の p62/SQSTM1 抗体、リン酸化 p62/SQSTM1 抗体、NRF2 抗体を用いたウェスタンブロットの結果

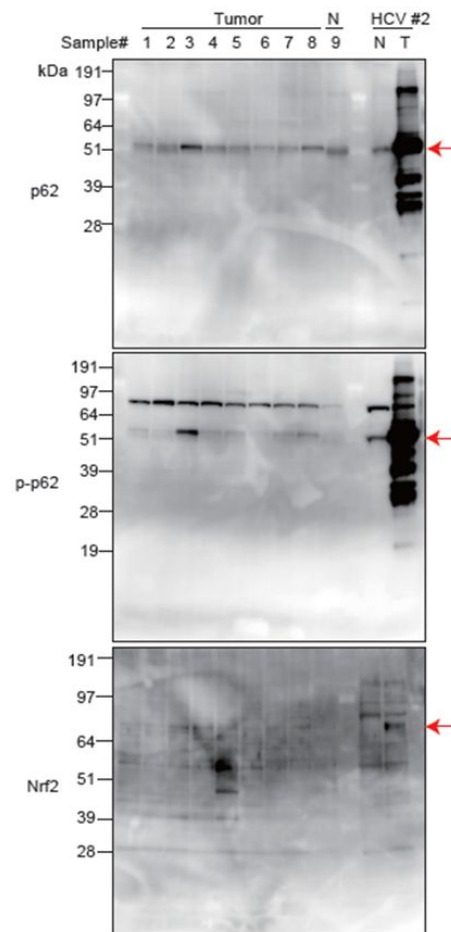


図1 肺癌における p62、p - p62 発現

図1に示すように、No. 3の扁平上皮癌の検体において p62、p-p62 ともに増加が認められた。正常肺組織の No. 9 に比べると No. 1, 4, 5, 7, 8 と腺癌 3 例、扁平上皮癌の 2 例で

p-p62の上昇を認めた。NRF2に関してはNo. 3の扁平上皮癌例でバンドがわずかに確認できたが、他の検体では検出できなかった。

(2) 切除検体を用いた網羅的遺伝子解析(NGS)でのオートファジー関連因子の検討  
扁平上皮癌切除例67例を対象にホルマリン固定標本からDNAを抽出し次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子解析を行った。図2に扁平上皮癌における変異遺伝子の頻度の高いものを示した。TP53, CDNK2B, CDKN2A, PTENの遺伝子変異頻度が高かったが、オートファジーと関連するKEAP1は67名中7名の頻度であった。(Ann Surg Oncol. 2018 25(6):1564-1571.)

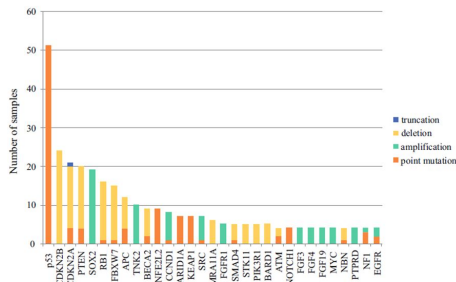


図2 肺腺癌における遺伝子解析結果

腺癌切除例100例を対象に同様の解析を行ったが、KEAP1は本研究では2.0%であった。TCGAデータでは17.1%の頻度が報告されており、日本人データと人種差を認めた。(Sci Rep. 2018 Jan 17;8(1):1005.)

(3) 肺癌培養細胞におけるオートファジー解析

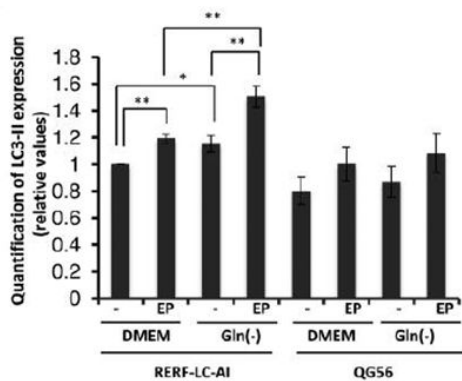


図3 グルタミン依存性細胞株におけるオートファジー

図3はRERF-LC-AIおよびQG56細胞株をグルタミン枯渇培地で24時間処理した際の、内因性LC3-IIレベルを免疫プロットング分析の結果を示した。各群5回の独立した実験の平均を示した(n=5, \* p < 0.05, \*\* p < 0.01)。

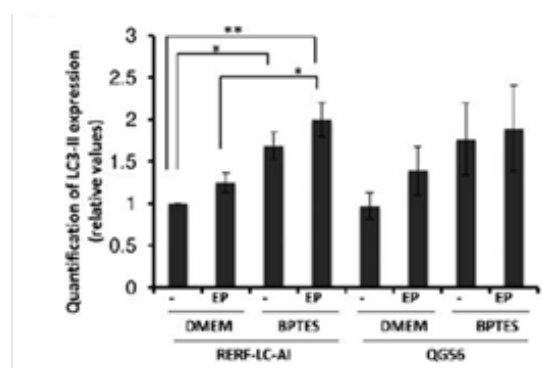


図4 グルタミン依存性細胞株におけるオートファジー

図4は、10μMBPTESで4時間処理したRERF-LC-AIおよびQG56細胞株の内因性LC3-IIレベルを免疫プロットング分析し、表示した。各群5回の独立した実験の平均を示した(n=5, \* p < 0.05, \*\* p < 0.01)。医徐湯の結果から、グルタミノリシスを抑制することでmTORC1シグナル抑制とオートファジー誘導を介して細胞増殖が抑制されることが示された。

(4) 加齢による血管疾患モデル

加齢や肥満による血管内皮障害の仮説を下図のように考え、各々の段階で寄与する分子機構をオートファジーの関与を考慮しながら検討した。

マウスに高脂肪食を与えアンジオテンシンIIを静脈注射することで大動脈壁の脆弱化が起こる。リシロキシダーゼ(LOX)は、コラーゲンおよびエラスチン前駆体中のリシン残基からアルデヒドの形成を触媒する細胞外銅依存性酵素であるが、LOXの減少は血管壁の脆弱化の指標となると考え、モデルマウスでLoXを測定した。

図5のグラフに示すように、高脂肪食+アンジオテンシンII静脈群で低下を認めた。

LoXはオートファジーに関与することが報告されており、LOX低下で血管壁の基質の露出、その後のオートファジーによる除去が誘導されることが想定される。

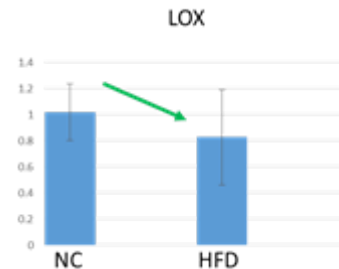


図5 正常(NC)と動脈瘤モデル(HFD)におけるLOX発現

(5) 血管内皮障害モデル:

糖尿病マウスモデル、b v c 8.ルでは血管内皮が虚血や加齢などのストレスに曝されると p53 の発現が増強することが判明した。オートファジーでは p62 が関与すると考えられているが両者の関係を検討中に HVSMC を用いた培養実験で laminine A を介した DNA ダメージの修復障害が血管障害を引き起こすことが判明した。オートファジーとの直接の関連は不明であるが、両者の関連を検討する価値はあると考えている

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5件)

Inoue Y, Shiihara J, Miyazawa H, Ohta H, Higo M, Nagai Y, Kobayashi K, Saijo Y, Tsuchida M, Nakayama M, Hagiwara K, A highly specific and sensitive massive parallel sequencer-based test for somatic mutations in non-small cell lung cancer, PLoS One, 査読有、Apr 27;12(4)、2017、e0176525  
DOI: 10.1371/journal.pone.0176525

Okamoto T, Takada K, Sato S, Toyokawa G, Tagawa T, Shoji F, Nakanishi R, Oki E, Koike T, Nagahashi M, Ichikawa H, Shimada Y, Watanabe S, Kikuchi T, Akazawa K, Lyle S, Takabe K, Okuda S, Sugio K, Wakai T, Tsuchida M, Maehara Y, Clinical and Genetic Implications of Mutation Burden in Squamous Cell Carcinoma of the Lung, Ann Surg Oncol, 査読有、Jun;25(6)、2018、1564-1571. DOI:10.1245/s10434-018-6401-1.

Sato S, Nagahashi M, Koike T, Ichikawa H, Shimada Y, Watanabe S, Kikuchi T, Takada K, Nakanishi R, Oki E, Okamoto T, Akazawa K, Lyle S, Ling Y, Takabe K, Okuda S, Wakai T, Tsuchida M, Impact of Concurrent Genomic Alterations Detected by Comprehensive Genomic Sequencing on Clinical Outcomes in East-Asian Patients with EGFR-Mutated Lung Adenocarcinoma. Sci Rep, 査読有、Jan 17;8(1)、2018、1005 DOI: 10.1038/s41598-017-18560-y

Kinoshita D, Nagasawa A, Shimizu I, Ito TK, Yoshida Y, Tsuchida M, Iwama A, Hayano T, Minamino T, Progerin impairs vascular smooth

muscle cell growth via the DNA damage response pathway, Oncotarget, 査読有、May 23;8(21)、2017、34045-34056  
DOI:10.18632/oncotarget.5973

Ye X, Zhou Q, Matsumoto Y, Moriyama M, Kageyama S, Komatsu M, Satoh S, Tsuchida M, Saijo Y, Inhibition of Glutaminolysis Inhibits Cell Growth via Down-regulating Mtorc1 Signaling in Lung Squamous Cell Carcinoma, Anticancer Res, 査読有、Nov;36(11)、2016、6021-6029  
<http://ar.iiarjournals.org/content/36/11/6021.long>

[学会発表](計4件)

岡本龍郎、高田和樹、佐藤征二郎、松原太一、上妻由佳、原武直紀、高森信吉、赤嶺貴紀、桂正和、豊川剛司、庄司文裕、土田正則、前原喜彦、喫煙量が肺扁平上皮癌の腫瘍生物学に及ぼす影響、第117回日本外科学会定期学術集会、2017年

Tsuchida M, Shimizu Y, Nakamura A, Kitahara H, Goto T, Sato S, Okamoto T, Koike T, Safety of Simultaneous TEVAR and Combined Aortic Wall Resection at the Time of Lung Resection for T4 Lung Cancer Infiltrating the Aorta, 18th World Conference on Lung Cancer 2017年

佐藤征二郎、市川寛、永橋昌幸、兒玉啓輔、若井俊文、土田正則、第54回日本癌治療学会学術集会、2016年

佐藤征二郎、後藤達哉、北原哲彦、小池輝元、高田和樹、岡本龍郎、前原喜彦、土田正則、次世代シーケンサーを用いた原発性肺腺癌切除例の網羅的遺伝子発現解析に基づく治療、第57回日本肺癌学会学術集会、2016年

[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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

土田 正則 (TSUCHIDA Masanori)  
新潟大学・大学院医歯学総合研究科・教授  
研究者番号：60293221

### (2) 研究分担者

白石 修一 (SHIRAISHI Syuichi)  
新潟大学・医歯学総合病院・助教  
研究者番号：00422600

佐藤 征二郎 (SATO Seijiro)  
新潟大学・大学院医歯学総合研究科・助教  
研究者番号：4064931

小池 輝元 (KOIKE Terumoto)  
新潟大学・大学院医歯学総合研究科・講師  
研究者番号：90635723