

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08301

研究課題名(和文)オートファジー活性を基盤とした新たな癌治療戦略の確立

研究課題名(英文) Development of therapeutic strategy based on autophagy activity for cancer therapy

研究代表者

井上 純 (INOUE, Jun)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・講師

研究者番号：50568326

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)：癌治療において、各癌におけるオートファジー活性を把握し、その活性に基づいた新たな癌治療戦略を確立することが重要である。本研究では、1) オートファジー分解基質p62分子がオートファジー活性の分子マーカーとなる可能性があること、2) マイクロRNAの1つmir-634の導入は、オートファジーを含む複数の細胞保護システムを抑制することで抗腫瘍効果を発揮すること、3) オートファジー阻害は急性リンパ性白血病におけるL-アスパラギナーゼの治療効果を顕著に増強することを明らかにした。これらの研究成果は、オートファジー活性を指標とした新たな癌治療戦略を開発する上で有用な分子基盤となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：It is needed for development of novel therapeutic strategy based on autophagy activity in tumor from individual patients for cancer therapy. In this study, we found that 1) high expression of p62 protein, an autophagic substrate, may be a possible biomarker for autophagy-impaired cancers, 2) miR-634 has a tumor-suppressive function by concurrently targeting multiple cytoprotective processes including autophagy, 3) autophagy inhibition leads to an increased sensitivity to L-asparaginase in acute lymphoblastic leukemia (ALL). These findings provide novel insight for development of novel therapeutic strategy based on autophagy activity for cancer therapy.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：オートファジー

1. 研究開始当初の背景

オートファジーは、細胞質中の分解基質(タンパク質やオルガネラ)をリソソームで分解するための細胞内輸送経路である。このオートファジー分解は、癌微小環境での栄養ストレスや放射線・抗がん剤処理による細胞ストレスにより活性化され、分解産物からのエネルギー源供給や細胞内毒性物質(異常オルガネラ・タンパク質)の排除を行うことで、癌細胞の細胞生存や治療抵抗性に寄与している。従って、一般的には、癌治療において、オートファジーを阻害することが有用であると考えられている。

一方で、我々は、一部のヒト癌細胞株および癌臨床検体において、オートファジー関連遺伝子がゲノム・エピゲノム異常によって不活性化していることを見出してきた。これらの所見は、「ヒト癌の中には、オートファジーに依存して細胞生存する癌だけでなく、不可逆的なオートファジー障害を持つ癌も存在する」ことを示唆している。当然ながら、このようなオートファジー障害を持つ癌に対しては、オートファジーを阻害する治療戦略は有益ではないと考えられる。従って、あらかじめ各癌におけるオートファジー活性を把握し、その活性に基づいた新たな癌治療戦略を確立することが望まれる。

2. 研究の目的

そこで、本研究課題では、(1) オートファジー活性の有無を規定する分子マーカーを探索することにより、オートファジー活性の有効な測定法を確立すること、そして、(2) オートファジー活性に基づいた新たな癌治療戦略を確立するための分子基盤を構築することを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) オートファジー活性マーカーの探索

これまで、我々は、複数の癌細胞株を用いた解析により、オートファジー関連遺伝子の異常を有する癌細胞は、有さない癌細胞と比較して、オートファジー分解の基質 p62/SQSTM1 分子の発現が有意に高いことを見出してきた。そこで、様々な癌種由来の癌組織における p62 の発現状態を免疫組織染色により発現解析を行った。さらに、p62 の発現抑制実験により、p62 高発現と癌の悪性化との関連性を調べた。

(2) オートファジー活性を指標とした新たな治療戦略の開発

マイクロ RNA による核酸創薬の開発

これまでに、我々は、様々な癌病態に関与する複数の癌関連マイクロ RNA を同定してきた。その中で、*mir-634* および *miR-432-3p* に着目し、その標的遺伝子の同定および詳細な機能解析を行った。さらに、*mir-634* と既存抗がん剤との併用効果およびマイクロ RNA 抗

がん薬として可能性について、担がんマウスモデルを用いた検討を行った。

オートファジー阻害剤を用いた急性リンパ性白血病(ALL)に対する新たな治療戦略の開発

ALL 治療に使用される L-アスパラギナーゼ(L-asparaginase; L-aspar)処理によるオートファジー活性の変化およびその生物学的意義を検証した。さらに、クロロキンをを用いたオートファジー阻害による併用療法の有効性について、担がんマウスモデルおよび実際の臨床検体由来 ALL 細胞を用いた検討を行った。

4. 研究成果

(1) オートファジー活性マーカーの探索

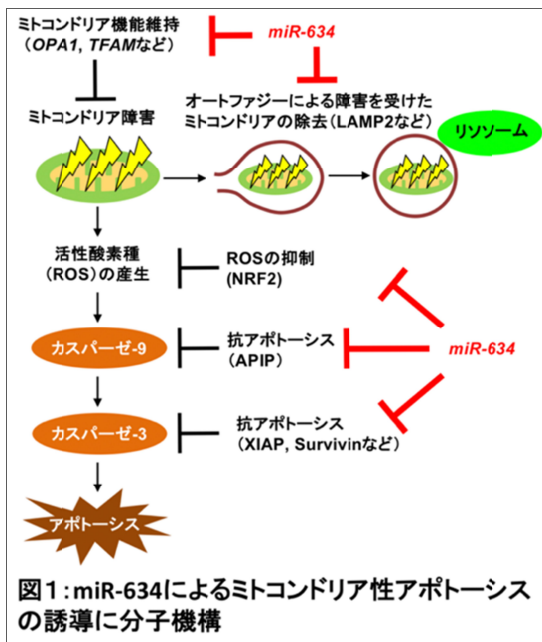
オートファジーは、癌細胞の生存・薬剤耐性に寄与する。しかし、各癌において、オートファジー活性が異なる為、その活性に基づいた癌の治療戦略の開発が重要である。そのためには、オートファジー活性を測定するための適切な分子マーカーの同定が必要である。これまで、オートファジー活性が低い癌細胞株(33株)は、活性が高い癌細胞株(150株)に比べて、オートファジー分解の基質 p62/SQSTM1 分子の発現が有意に高いことを見出してきた。このことは、p62 分子の高発現はオートファジー障害の分子マーカーの1つになる可能性を示唆している。次に、8種(子宮体癌、卵巣癌、乳癌、肺癌、肝癌、腎癌、口腔癌、食道癌)の異なる癌種由来の癌組織における p62 の発現状態を免疫組織染色により発現解析を行った。その結果、延べ1,258 症例中 358 症例(28.5%)において、p62 分子の高発現を認めた。その中でも、子宮体癌において、p62 分子の高発現は患者の予後不良に強く相関すること、癌細胞の浸潤・転移といった悪性形質の獲得に寄与することを明らかにした(Iwamoto R et al. Am J Pathol. 2015)。これらの研究成果は、オートファジー障害および p62 分子の高発現は、子宮体癌の悪性化に深く関与することを示唆している。

(2) オートファジー活性を指標とした新たな治療戦略の開発

マイクロ RNA による核酸創薬の開発

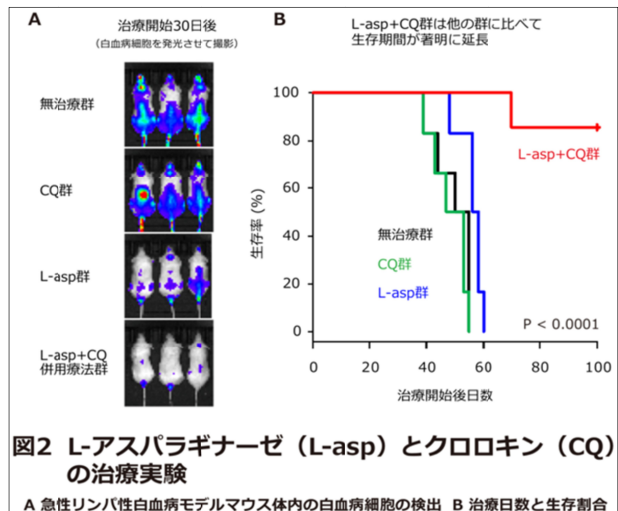
抗がん剤に対する治療抵抗性の克服は、がん治療における大きな課題である。抗アポトーシス作用、転写因子 NRF2 を介した抗酸化作用、オートファジー作用は、癌細胞の治療抵抗性の獲得に寄与することが知られている。そのような中、*mir-634* は、XIAP を含む抗アポトーシス関連遺伝子群、LAMP2 を含むオートファジー関連遺伝子群、および抗酸化作用に寄与する NRF2 分子を直接的に標的としており、これらの遺伝子発現を同時に抑制することにより、癌細胞に対して、アポトーシスによる細胞死を効率的に誘導することを見

出した(図1)。さらに、食道扁平上皮癌細胞株を用いた *in vitro* 実験および担癌マウスを用いた検討より、*mir-634* の導入はシスプラチンまたは5FUといった既存抗がん剤に対する感受性を顕著に増強させることを明らかにした(Fujiwara N et al. *Cancer Res.* 2015)。また、食道扁平上皮癌において、*miR-432-3p* は高頻度に高発現していること、抗酸化作用に寄与する NRF2 分子の異常な活性化に寄与していることを同定した(Akdemir et al. *Mol Cancer Res.* 2017)。これらの研究成果は、*mir-634* は、オートファジーを含む複数の細胞保護作用システムを同時に抑制することができるため、*mir-634* を用いた核酸創薬の開発が期待される。



オートファジー阻害剤による急性リンパ性白血病(ALL)に対する治療戦略の開発
急性リンパ性白血病(ALL)では、L-アスパラギナーゼ(L-asparaginase; L-asp)がALL治療のゴールドスタンダードとして利用されているが、L-asp に対して低感受性の患者では治療成績は不良であり、その治療抵抗性メカニズムの解明と克服がALL治療の大きな課題であった。そのような中、ALLにおいて、1) L-asp 処理により、細胞内アミノ酸濃度バランスの攪乱を伴い、急激に細胞内代謝活性の休止状態に陥ること、2) その際、オートファジーによる傷害ミトコンドリアの除去が活性化すること、3) オートファジー阻害薬クロロキン(CQ)を併用することにより、L-asp 感受性が増強されること、そして、4) その併用効果は、p53 依存的な細胞死に起因することを明らかにした。本研究成果は、p53 遺伝子解析によるコンパニオン診断および既存薬クロロキンのドラッグリポジショニングを特徴とした小児ALLの新たな治療法の開発に繋がることが期待される(Takahashi

H et al. *Oncogene* 2017)(図2)。また、卵巣癌において、非必須アミノ酸グルタミン合成酵素(Glutamine synthetase; GS)の不活性化を有する卵巣癌細胞は、その細胞生存において、細胞外グルタミン取り込みに依存していること、そして、そのようなGS不活性化卵巣癌に対しては、L-アスパラギナーゼ処理により、細胞外グルタミンを枯渇させる治療戦略が有効である可能性を示した(Furusawa et al. *Carcinogenesis* 2018)。一方で、オートファジー活性を持つ細胞と持たない細胞の Isogenic な細胞ペアを用いた低分子化合物およびマイクロRNAライブラリースクリーニングにより、それぞれの感受性の異なる化合物候補および癌抑制性マイクロRNA候補を同定する事に成功した(未発表データ)。これらの本研究課題における成果は、オートファジー活性の状態および細胞内栄養状態を指標とした新たな癌治療戦略を開発するための有意義な分子基盤になると考えられる。



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 7 件)

- Furusawa A, Miyamoto M, Takano M, Tsuda H, Song YS, Aoki D, Miyasaka N, Inazawa J, Inoue J. Ovarian cancer therapeutic potential of glutamine depletion based on GS expression. *Carcinogenesis* 39 758-766 2018 doi:10.1093/carcin/bgy033. (査読あり)
- Akdemir B, Nakajima Y, Inazawa J, Inoue J. miR-432 Induces NRF2 Stabilization by Directly Targeting KEAP1. *Mol Cancer Res* 15 1570-1578 2017. doi:10.1158/1541-7786.MCR-17-0232. (査読あり)
- Okuda M, Inoue J, Fujiwara N, Kawano T, Inazawa J. Subcloning and

characterization of highly metastatic cells derived from human esophageal squamous cell carcinoma KYSE150 cells by in vivo selection. *Oncotarget* 8 34670-34677 2017.

doi:10.18632/oncotarget.16668. (査読あり)

Takahashi H, Inoue J, Sakaguchi K, Takagi M, Mizutani S, Inazawa J. Autophagy is required for cell survival under L-asparaginase-induced metabolic stress in acute lymphoblastic leukemia cells. *Oncogene* 36 4267-4276 2017. doi:10.1038/onc.2017.59. (査読あり)

Nuylan M, Kawano T, Inazawa J, Inoue J. Down-regulation of LAPT5 in human cancer cells. *Oncotarget* 7 28320-28328 2016. doi:10.18632/oncotarget.8614. (査読あり)

Fujiwara N, Inoue J, Kawano T, Tanimoto K, Kozaki K, Inazawa J. miR-634 activates the mitochondrial apoptosis pathway and enhances chemotherapy-induced cytotoxicity. *Cancer Res.* 75 3890-3901 2015. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-0257. (査読あり)

Iwade R, Inoue J, Tsuda H, Takano M, Furuya K, Hirasawa A, Aoki D, Inazawa J. High Expression of p62 Protein Is Associated with Poor Prognosis and Aggressive Phenotypes in Endometrial Cancer. *Am J Pathol.* 185 2523-2533 2015. doi:10.1016/j.ajpath.2015.05.008. (査読あり)

[学会発表](計 20 件)

<国際学会>

Inoue J and Inazawa J: Role of autophagy under L-asparaginase-induced metabolic stress in acute lymphoblastic leukemia cells. The 1st International Conference for Precision Cancer Medicine. TMDU, Tokyo, 29-30/June/2017.

Inoue J, Takahashi H, Sakaguchi K, Takagi M, Mizutani S, Inazawa J: Autophagy is required for cell survival under L-asparaginase-induced metabolic stress in acute lymphoblastic leukemia cells. 108th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research 2017. Washington D.C., USA. 4/April/2017 (poster presentation).

Furusawa A, Inoue J, Tsuda H, Miyasaka N, Inazawa J: Differential requirement of amino acids on cell survival of ovarian cancer cells. 108th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research 2017. Washington D.C., USA. 3/April/2017 (poster presentation).

Akdemir B, Inoue J, Kawano T, Inazawa J: High expression of miR-432-3p is associated with the chemoresistance by NRF2 stabilization via directly targeting KEAP1. 108th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research 2017. Washington D.C., USA. 3/April/2017 (poster presentation).

Inoue J, Fujiwara N, Yamamoto S, Kawano T, Inazawa J: MicroRNA-based diagnosis and therapy in NRF2-stabilized tumor. Apr 18 2016, AACR New Orleans, USA (poster presentation).

Inoue J and Inazawa J: MicroRNA-based diagnosis and therapy in NRF2-stabilized tumor. The Korean Society of Oriental Pathology International Symposium, Oct 23 2015, Kyung Hee University, Seoul Korea.

Inoue J and Inazawa J: Screening of autophagy modulators for cancer therapy using high-content imaging system. The 34th Sapporo International Cancer Symposium. June 26 2015, Sapporo, Japan (poster presentation).

Michelle N, Inoue J, Kawano T, Inazawa J: Inactivation of LAPT5 gene in human cancer. The 34th Sapporo International Cancer Symposium. June 26 2015, Sapporo, Japan (poster presentation).

Inoue J, Fujiwara N, Yamamoto S, Kawano T, Inazawa J: MicroRNA-based diagnosis and therapy in NRF2-stabilized tumor. Apr 18 2016, AACR New Orleans, USA (poster presentation).

<国内学会>

井上純、稲澤譲治：オートファジーを指標とした癌治療戦略の分子基盤。第76回日本癌学会学術総会。パシフィコ横浜。神奈川県。2017年9月28日

古澤啓子、井上純、津田均、宮坂尚幸、稲澤譲治：卵巣癌細胞の生存におけるアミノ酸要求性。第76回日本癌学会学術総会。パシフィコ横浜。神奈川県。2017年9月28日

ブラク アクデミル、中島康晃、稲澤譲治、井上純：High expression of

miR-432-3p is involved in NRF2 stabilization by directly targeting KEAP1. 第76回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜. 神奈川. 2017年9月29日

井上純、稲澤譲治: ヒト癌におけるオートファジー経路の障害. 第75回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜. 神奈川. 2016年10月7日

古澤啓子、井上純、久保田俊郎、稲澤譲治: 卵巣癌細胞株の細胞生存におけるアミノ酸要求性. 第75回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜. 神奈川. 2016年10月7日

高橋寛吉、井上純、坂口公祥、高木正稔、水谷修紀、稲澤譲治: Essential role of oxaloacetate and autophagy in L-asparaginase-treated leukemia cells. 第78回日本血液学会学術集会. パシフィコ横浜. 神奈川. 2016年10月13日

井上純、稲澤譲治: ハイコンテンツイメージングによるオートファジー制御因子のスクリーニング. 第74回日本癌学会学術総会. 愛知. 2015年10月9日

井上純、稲澤譲治: ハイコンテンツスクリーニング系を利用した autophagy modulator の探索. 日本人類遺伝学会第60回大会. 東京. 2015年10月16日

Michelle Nuylan、井上純、河野辰幸、稲澤譲治: 癌におけるLAPTM5遺伝子の不活性化. 第74回日本癌学会学術総会. 愛知. 2015年10月8日

高橋寛吉、井上純、坂口公洋、高木正稔、水谷修紀、稲澤譲治: 急性リンパ性白血病細胞においてオートファジー阻害はL-asparaginaseの感受性を増強させる. 第74回日本癌学会学術総会. 愛知. 2015年10月10日

高橋寛吉、井上純、坂口公祥、高木正稔、水谷修紀、稲澤譲治: 急性リンパ性白血病細胞においてオートファジー阻害はL-asparaginaseによるアポトーシスを増強する. 日本人類遺伝学会第60回大会. 東京. 2015年10月17日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

名称: がんに対するL-アスパラギナーゼ剤とオートファジー阻害剤の併用療法の効果の予測方法、及び、癌治療剤

発明者: 稲澤譲治・井上純・高橋寛吉

権利者: 国立大学法人東京医科歯科大学・株式会社ビー・エム・エル

番号: 特願 2015-250112

出願年月日: 2015/12/22

国内外の別: 国内

名称: マイクロRNAの測定方法、並びに、がん治療剤及びこれを含むがん治療のための医薬組成物

発明者: 稲澤 譲治・井上純・山本 信祐・河野 辰幸・小崎 健一

権利者: 国立大学法人東京医科歯科大学

番号: PCT/JP2014/053594

出願年月日: 2014/2/17 (登録年月日: 2015/9/15)

国内外の別: 国内

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

<ホームページ>

<http://www.tmd.ac.jp/mri/cgen/framepage.htm>

<プレスリリース発表>

(1)「MiR-634によるミトコンドリア由来アポトーシス経路の活性化と化学療法の増強効果」平成27年8月25日 日刊工業新聞、平成27年9月4日 日経産業新聞

(2)「急性リンパ性白血病におけるL-アスパラギナーゼ投与時のオートファジー作用の解明」平成29年5月30日 産経新聞

6. 研究組織

(1)研究代表者

井上 純 (INOUE, Jun)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・分子細胞遺伝・講師 研究者番号: 50568326