

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19905

研究課題名(和文)食道癌におけるオートファジーの役割の解明と新たな治療体系の開発

研究課題名(英文) Interpretation of roles of autophagy and development of novel therapeutic systems in esophageal carcinoma

研究代表者

小西 博貴 (Konishi, Hirotaka)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00448739

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：食道癌細胞株を用いて、オートファジーの状態に合わせた新たな治療体系の確立を目標に実験を進めた。オートファジーの中心遺伝子であるATG7発現の食道癌組織における低下は、オートファジー抑制や予後悪化と関連する事を確認し、ATG7発現とオートファジーの回復が、細胞内のp62選択的分解により低下する事を確認した。これにより、細胞保護因子であるNrf2の分解促進や不安定化が、抗がん剤などの刺激への抵抗性やがん細胞の弱体化・予後などに与える影響を検討中である。またAQP5分子の分解へのオートファジーの関連の可能性が高まり、肝細胞癌におけるオートファジーによる選択的分解と抗腫瘍効果を確認し報告を行った。

研究成果の概要(英文)：The aim of this research is an establishment of a novel therapeutic strategy according to the state of autophagy in esophageal carcinoma. It was confirmed that decrease of ATG7 expression, which is the main gene of autophagy flux, associated with the suppression of autophagy or worse prognosis. Moreover, the restoration of ATG7 expression and autophagy flux lead the suppression of p62 protein expression due to the autophagy specific degradation. This suppression of p62 protein lead the degradation or destabilization of Nrf2, which is the main factor of cellular protection, and now the effects for cancer cells or prognosis due to the decrease of Nrf2 protein are being investigated. On the other hands, the degradation of AQP5 protein is likely to be caused by autophagy specific degradation. It was reported that autophagy is associated with the specific degradation of AQP5 and anticancer effect in hepatocellular carcinoma.

研究分野：消化器外科学

キーワード：食道癌 オートファジー Nrf2 化学療法

1. 研究開始当初の背景

オートファジーは、不要となった細胞内小器官や蓄積タンパクをリソソームの融解酵素により分解し、そのエネルギーを自身で用いる事により細胞の生存に寄与する。細胞におけるオートファジーの低下や異常は、様々なストレスや外因物質の影響で細胞内不良タンパクや活性酸素の蓄積を招き、細胞の腫瘍化や癌細胞の悪性化につながる事が確認されている。一方で、一過性にオートファジーを亢進することで、状態維持や薬剤に対する抵抗性を獲得し、癌細胞の生存に寄与している事も報告されている。

このように癌細胞は、オートファジーを制御することで悪性度の維持や生存を保証していると考えられるが、これらの制御機構については不明な点も多い。癌におけるオートファジーの制御機構を十分に解明・理解することは、様々な経路に対する治療の効果を総合的に解釈できる可能性を持ち、オートファジー関連遺伝子を指標とした有効な治療体系の確立につながる可能性を持つ。

2. 研究の目的

オートファジーの増減が、抗がん剤に対する抵抗性の獲得や悪性度に関連するとの報告も認められものの、オートファジーの調節機構や癌細胞に対する影響には、いまだ一定の見解が得られていない。今回、食道癌細胞株におけるオートファジー関連遺伝子や調節因子の発現を様々な状態で網羅的に解析し、癌細胞の生存にも寄与すると考えられるオートファジーやその関連遺伝子を指標とした、癌調節機構の解明と各種抗癌剤(分子標的薬)の新たな使用法の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 食道癌切除検体における免疫染色でオートファジーの中心的分子である ATG7 発現と予後・臨床病理因子との関連を検討した。また、ATG7 の発現調節による食道癌細胞株における他の関連分子の発現変化を確認した。

(2) オートファジーに関連した Nrf2 発現と食道癌の予後・臨床病理因子との関連を検討した。また、食道癌細胞株を用いて Nrf2 に関わる分子機構や抗がん剤耐性との関連についても検討中である。

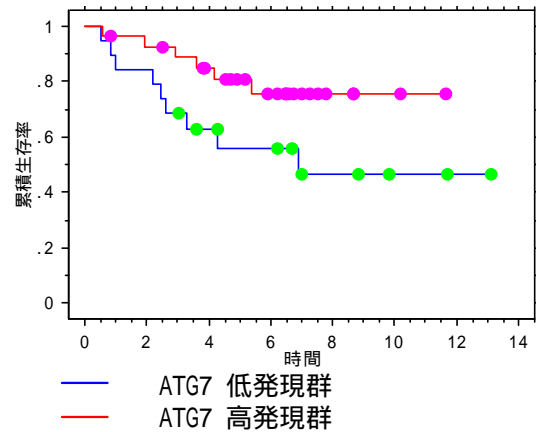
(3) オートファジーによる選択的な分解が確認された AQP5 分子に関して、肝細胞癌細胞株を用いて、選択的分解の確認と抗腫瘍効果に関して検討した。

4. 研究成果

(1) オートファジーの中心分子である ATG7 の食道癌組織における発現と予後との関連について免疫組織染色を用いて検討した。この結果、新たな食道癌組織(47例)における ATG7 タンパク発現の低下は、不良な予後との

相関を認め(図1)、予備実験における結果と同様であり、ATG7 タンパクの発現低下すなわちオートファジーの抑制が、予後の悪化と関連する可能性が示唆された。

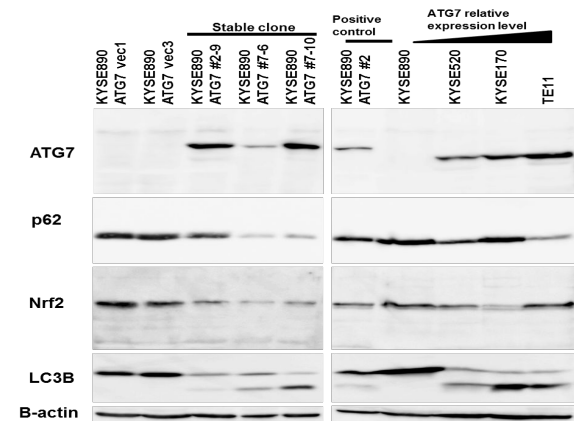
図1



臨床病理因子との比較では、ATG7 タンパク発現と明らかな相関を認める因子は同定できなかった。

また ATG7 欠失の食道癌細胞株に ATG7 発現コンストラクトを導入し、オートファジー・LC3B-formII の発現を確認した安定発現株においては、p62/ Nrf2 タンパクの発現低下が確認された(図2)。これらのことから、ATG7 低発現群での不良な予後は、p62/ Nrf2 タンパクの蓄積が一因となっている可能性が示唆された。

図2



(2) 食道癌組織における Nrf2 発現と予後との関連を検討したが、(1)の結果などからの予想に反して、組織における Nrf2 の低発現群ほど予後不良な結果となった(図1)。また臨床病理学因子と Nrf2 発現の間にも、明らかな相関関係は認めなかった。

また、食道癌細胞株において siRNA により Nrf2 発現を抑制することで増殖能の低下が確認された(図2)。抗がん剤に対する感受性に関して、5FU 処理に対しては Nrf2 発現によって感受性に差を認めないものの、CDDP 処理に対して siRNA による Nrf2 抑制により、感受性の低下が確認された(図3)。

図 1

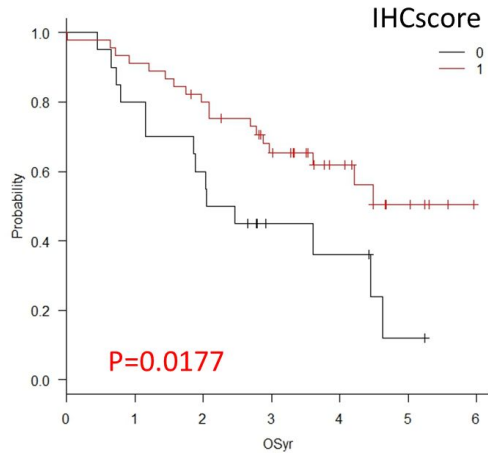


図 2

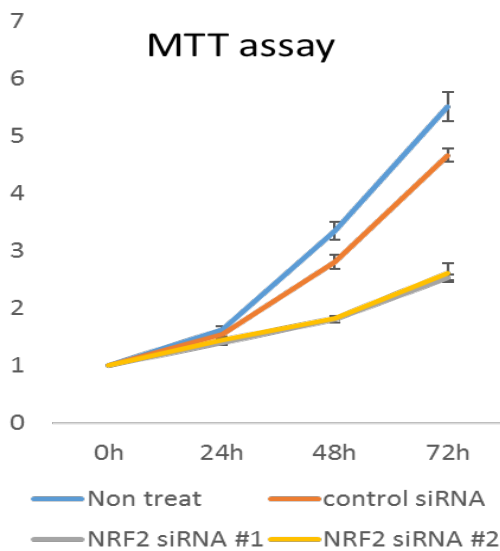
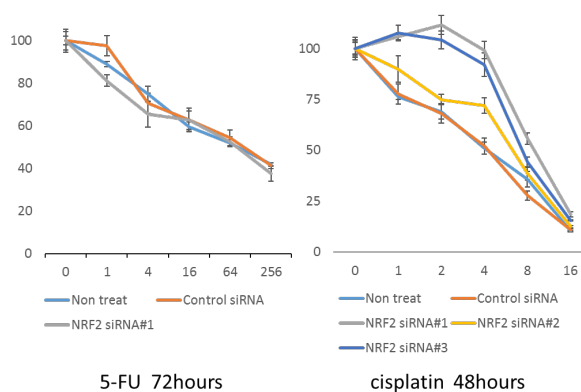


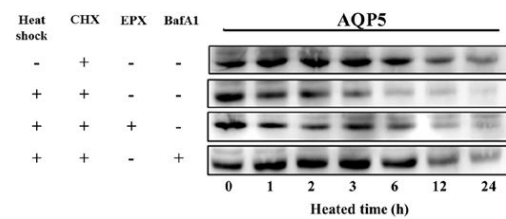
図 3



しかしながらこれらの結果は、ATG7 や Nrf2 タンパクの発現による予後の差などの結果とは一部矛盾する結果を含んでおり、さらなる検証実験を継続中である。

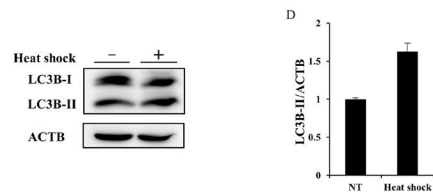
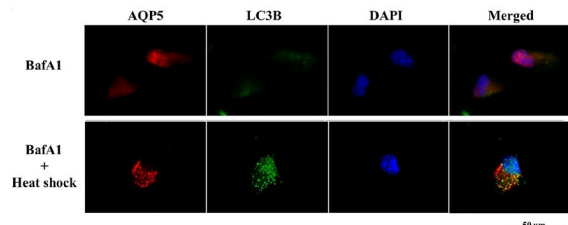
(3) オートファジーによる分解が示唆された AQP5 に関して、肝細胞癌細胞株 (Alexander cell) での発現とオートファジーの活性化について検討した。条件の検討において、温熱刺激 (42 °C) によって AQP5 の分解がより促進される事を確認し、同条件下での AQP5 タンパク発現を検討した (図 1)。CHX 投与により新たなタンパク合成を阻害し、温熱刺激を加える事により、AQP5 の分解が促進され、このような変化はプロテオソーム阻害剤である EPX 投与によって変化がないものの、リソソーム阻害剤である BafA1 投与により AQP5 の蓄積を認めた。これらのことから、温熱刺激による AQP5 の分解が、リソソームによる分解系であるオートファジー と関連することが示唆された。

図 1



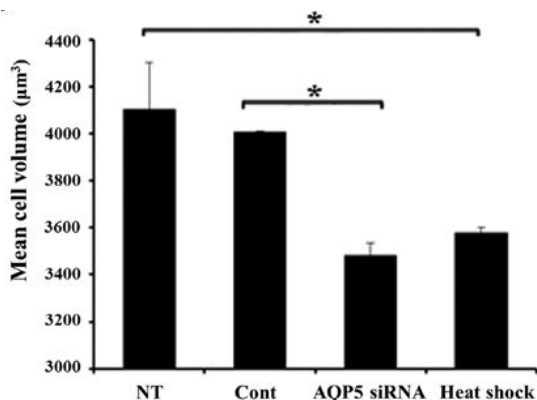
また、免疫蛍光染色や LC3B formII の発現亢進から、温熱刺激によるオートファゴソーム形成の促進と AQP5 の共局在が示唆され、温熱刺激による AQP5 分解がオートファジーにより行われる可能性が高くなった。

図 2



温熱刺激により肝細胞癌細胞株は増殖抑制を受けており (図 3) この変化は siRNA を用いて AQP5 発現を抑制した際の変化と同様であった。これらの結果から、温熱刺激による肝細胞癌細胞株の増殖抑制は、オートファジーの活性化に伴う AQP5 の分解促進によるタンパク発現の低下に起因するものであると考えられた。

図 3



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 1 件)

Michihiro Kudou, Atsushi Shiozaki, Hiroataka Konishi, Eigo Otsuji et al., Heat shock exerts anticancer effects on liver cancer via autophagic degradation of aquaporin 5, International Journal of Oncology, 査読あり, 50, 2017, 1857-1867 DOI:10.3892/ijo.2017.3940

[学会発表](計 2 件)

福永智彦、小西博貴、大辻英吾他、Clinical significance of expression of Nrf2 in esophageal squamous cell carcinoma、日本外科学会、2017-4、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
Kosuga T, Shiozaki A, Konishi H, Otsuji E et al., Heat shock induces anticancer effects via regulation of aquaporin5, 40th World Congress of the International College of Surgeons, 62nd Annual Congress of the International College of Surgeons Japan Section, 2016, Oct, Kyoto (Japan).

[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：

6. 研究組織

(1)研究代表者

小西 博貴(KONISHI, Hiroataka)
京都府立医科大学 医学(系)研究科(研究院) 助教

研究者番号：00448739

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()