

令和元年6月20日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19187

研究課題名(和文) マクロライド系抗生剤によるオートファジー阻害機構の解明と多発性骨髄腫治療への応用

研究課題名(英文) Elucidation of autophagy inhibition mechanism by macrolide antibiotics and therapeutic application to multiple myeloma.

研究代表者

森谷 昇太 (Moriya, Shota)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：30634935

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄腫難治性の原因の一つに微小環境(癌の正常細胞との相互作用)がある。骨髄腫細胞株と骨髄間質細胞株の共培養実験を行い、微小環境下でのプロテアソーム阻害剤ボルテゾミブ(BZ)の殺細胞作用を検討したところ、骨髄腫単独培養群と比較して、微小環境下ではBZの殺細胞作用が減弱した。しかし、そこにオートファジー阻害作用を持つマクロライドを併用添加し、プロテアソーム系とオートファジー系の同時阻害を試みると、微小環境下においても骨髄腫株に小胞体ストレス負荷を伴う強力な殺細胞作用が誘導された。以上より、多発性骨髄腫治療および微小環境誘導性薬剤抵抗に対する「小胞体ストレス負荷誘導療法」の可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、多発性骨髄腫の治療目標は「完治」でなく「延命」であり、一刻も早い新規治療法の開発が求められている。これまでに研究代表者は、マクロライド抗生剤のオートファジー阻害作用を明らかにし、プロテアソーム阻害剤との併用による「細胞内タンパク分解系の同時阻害」が、骨髄腫細胞株に強力な癌細胞死を誘導することを報告してきた。マクロライドは臨床でのデータが十分蓄積されているため安全性も高く、骨髄腫治療への応用が期待できる薬剤の一つであると考えられる。骨髄腫難治性の原因の一つである微小環境での有効性や、微小環境による薬剤抵抗の分子基盤解明を進めることで、in vivo試験や実臨床に向けた基盤形成とする。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that macrolide antibiotics including clarithromycin (CAM) have an inhibitory effect on autophagy flux, and combined treatment with a proteasome inhibitor bortezomib (BZ) leads to enhanced apoptosis induction via endoplasmic reticulum (ER) stress overloading in multiple myeloma (MM) cells. Since bone marrow microenvironment supports the myeloma cell growth and induces cell adhesion-mediated drug resistance (CAM-DR), we investigated the cytotoxic effect of BZ plus macrolide combination using the co-culture system of EGFP-labelled MM cell lines and stroma cell lines. EGFP-MM cells were charged onto the stroma cell monolayer and co-cultured with BZ in the presence or absence of macrolide. We have observed that the pronounced BZ-induced cytotoxicity by macrolide in MM cells co-cultured on the stroma layer. These data suggest that macrolide could be used as an autophagy inhibitor and combined treatment with BZ plus macrolide can be overcome CAM-DR.

研究分野：応用薬理学

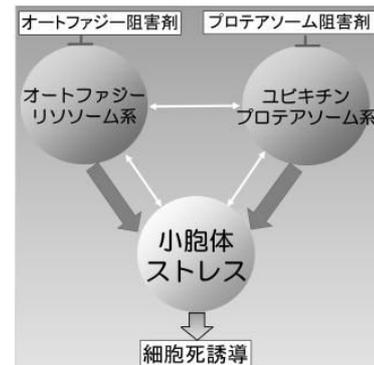
キーワード：骨髄腫 オートファジー マクロライド 小胞体ストレス プロテアソーム ボルテゾミブ クラリスロマイシン 微小環境

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

多発性骨髄腫は難治性の造血器腫瘍であり、単クローン性免疫グロブリンの異常産生を特徴とする。Bortezomib (Velcade® ,以下 BZ)は 2003 年に FDA で認可された骨髄腫の治療薬であり、26S プロテアソームの阻害効果を持つ。かつて骨髄腫は「3 年生存」を目標とするほど予後の悪い疾患だったが、プロテアソーム阻害剤の登場により長期生存を視野に入れた治療が可能となった。しかし、骨髄腫が完治不能であることは依然変わらず、革新的な新規治療法の開発が求められている。

近年、オートファジーと呼ばれる細胞の自食作用が注目を浴びている。これまでに、研究代表者はクラリスロマイシン (CAM) をはじめとするマクロライド抗生剤がオートファジーの阻害作用を持つことを明らかにした。また、プロテアソーム阻害剤との併用により、「細胞内二大タンパク質分解系」を同時阻害することで骨髄腫細胞株に対して、小胞体ストレス負荷を介した細胞死が強力に誘導することを報告してきた。(右図, [Moriya S. Int J Oncol. 2013, 2015](#))



### 2. 研究の目的

骨髄腫難治性の原因の一つに微小環境 (癌の正常細胞との相互作用) があり、骨髄腫細胞と骨髄間質細胞の相互作用により微小環境誘導性薬剤抵抗が生じることが知られている。これまでの研究から、プロテアソーム阻害剤とオートファジー阻害作用を持つマクロライドの併用投与は、骨髄腫細胞株に小胞体ストレス負荷増大を伴った強力な癌細胞死を誘導することがわかっており、骨髄腫の新規治療法としての可能性が示唆されているが、微小環境の検討をはじめ、臨床応用に向けて更なる基盤形成が必要である。

そこで本研究では、骨髄間質細胞株と骨髄腫細胞株の共培養実験系を構築し、微小環境下での BZ とマクロライドの薬剤併用による殺細胞作用の有効性を検討した。

### 3. 研究の方法

骨髄腫細胞株と骨髄間質細胞株の共培養実験を行うために、骨髄腫細胞株 (RPMI8226, IM-9, KMS-12-PE) を pEGFP-C1 ベクター (Clontech) で標識し、G418 セレクションによって EGFP 陽性の骨髄腫細胞株を樹立した。骨髄間質細胞株は日本大学 相澤信教授により樹立された LP101 および AA101 をご供与頂いた。(Aizawa S, Exp Hematol. 1994).

骨髄間質細胞株の単層上に EGFP で標識した骨髄腫細胞株を播種し、両細胞同士の接着後、薬剤 (BZ, CAM) を添加した。48 時間培養後、細胞を回収し、フローサイトメーターにて EGFP 陽性の骨髄腫細胞株の生細胞数を計測し、薬剤非添加群および骨髄腫単独培養群と比較することで微小環境下での骨髄腫細胞株への殺細胞作用を検討した。

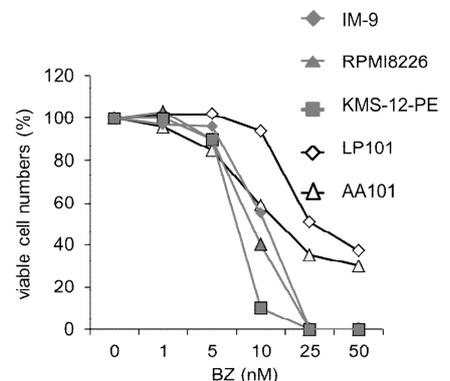
0.4um 多孔メンブレンから形成されるセルカルチャーインサート (Greiner) を隔てて、骨髄腫細胞株と骨髄間質細胞株を共培養し、と同様に薬剤を投与し、一定期間培養後、骨髄腫細胞株を回収して mRNA を抽出した。リアルタイム PCR 法を用いて、CHOP, GRP78, GADD34 などの小胞体ストレス関連遺伝子の発現量を定量し、微小環境下での骨髄腫細胞株への小胞体ストレス負荷を検討した。

質量分析法およびマイクロアレイ法により、マクロライド抗生剤のオートファジー阻害機構の解明を試みた。

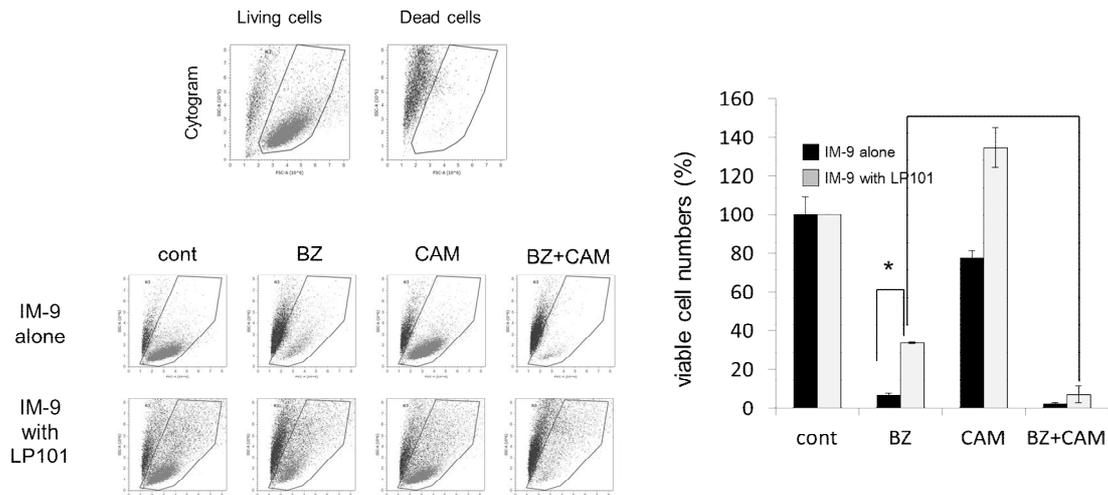
### 4. 研究成果

遺伝子導入および G418 セレクションによって EGFP 安定発現骨髄腫細胞株の樹立に成功した。また、EGFP の蛍光を指標とし、フローサイトメーターで解析することで、骨髄間質細胞株との混在化においても骨髄腫の生細胞数の計数を可能とする実験系の構築に成功した。

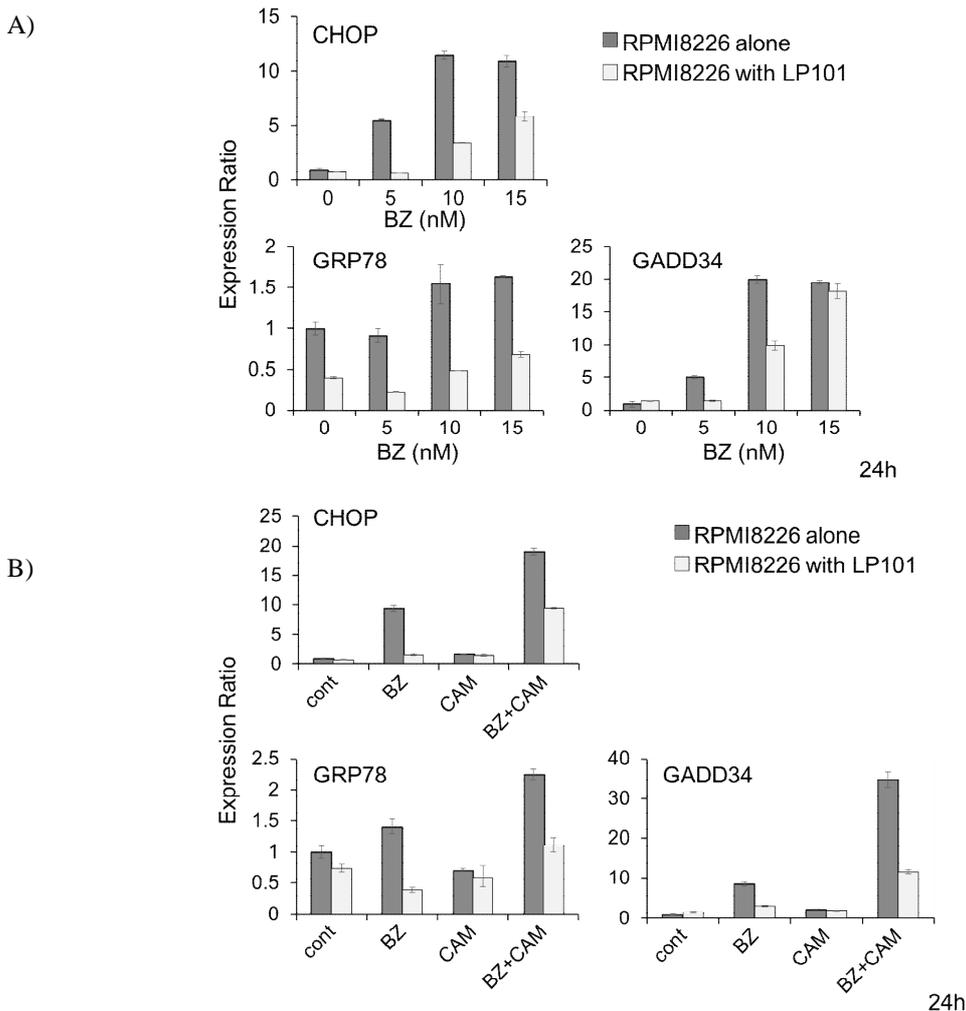
各細胞単独培養系で BZ の殺細胞作用を検討すると、BZ は骨髄腫細胞株 (RPMI8226, IM-9, KMS-12-PE) に対しては強力な殺細胞作用を示すが、正常細胞である骨髄間質細胞株 (LP101, AA101) に対しては BZ の影響を受けるものの BZ 50nM でも死滅することはなかった。



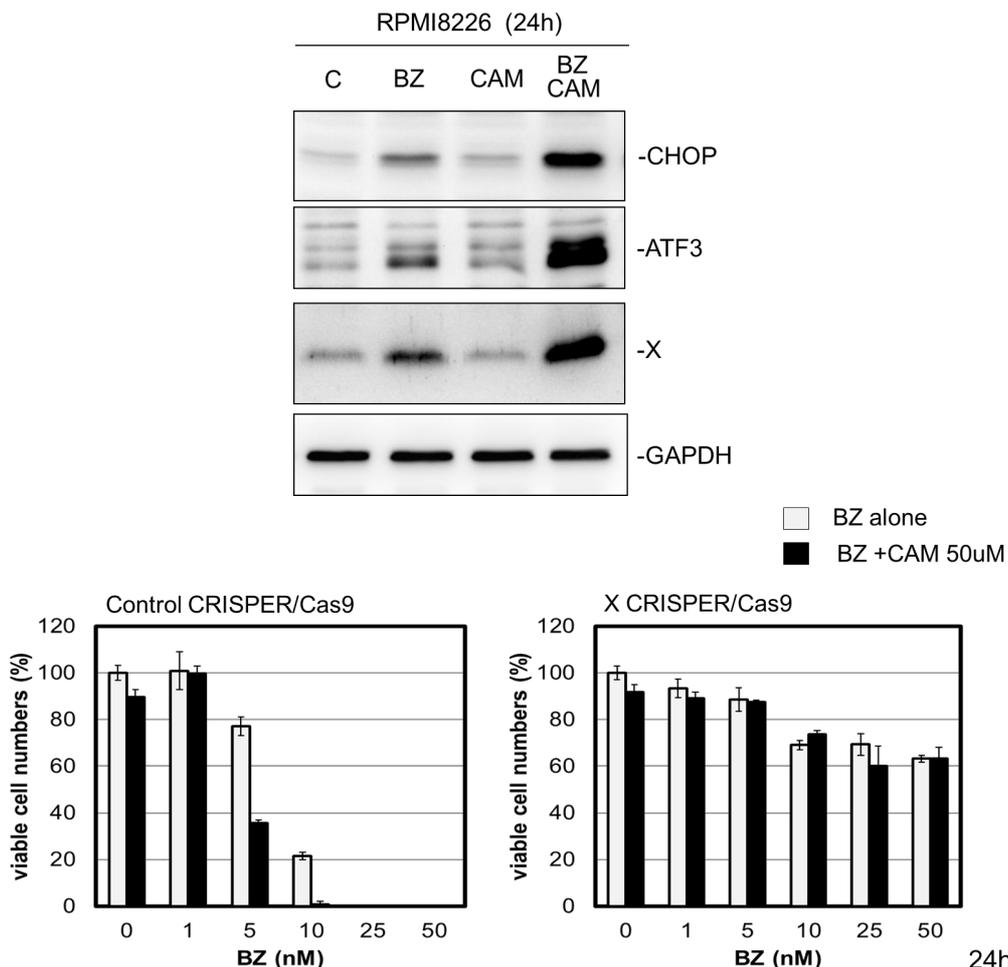
骨髄腫株単独培養群および骨髄腫・間質細胞株共培養群に薬剤(BZ,CAM)の添加を試みた。骨髄腫単独培養群と比較して、間質細胞存在下では BZ の殺細胞作用は有意に減弱した。しかし、ここにオートファジー阻害作用を持つマクロライド抗生剤 CAM を併用添加すると間質細胞存在下においても BZ の殺細胞作用を強力に増強させた。このことから、BZ とマクロライドの併用投薬法の有効性が微小環境存在下でも示唆された。



セルカルチャーインサートを用いて、微小孔を通じた骨髄腫株・骨髄間質細胞株の共培養系を構築した。薬剤添加後、骨髄腫細胞株から mRNA を抽出し、リアルタイム PCR 法で ER ストレスマーカー遺伝子の発現量を定量すると、骨髄腫単独培養群と比較して、微小環境下では BZ により誘導される小胞体ストレス関連遺伝子の発現が低下していた(下図 A)。しかし、ここにオートファジー阻害作用を持つ CAM を併用添加すると、微小環境下においても CHOP, GADD34 などの小胞体ストレス関連遺伝子の発現増強が認められ、殺細胞増強作用との関連を示唆した(下図 B)。



また、BZ と CAM の併用により、ウエスタンブロッティング解析法で、CHOP, ATF3 といった代表的な小胞体ストレスマーカータンパクの他に、小胞体ストレス経路にも関与するタンパク X (論文投稿準備中につき名称非公開) の増強が認められた。CRISPER/cas9 法により骨髄腫細胞株で X を欠損すると BZ および BZ と CAM の併用による骨髄腫細胞株の殺細胞増強作用が顕著に減弱した。



マクロライド抗生剤のオートファジー阻害機構の解明については、現在も進行中である。

以上の結果から、微小環境には、薬剤により誘導される骨髄腫の小胞体ストレス負荷を減弱させる作用があり、これが微小環境誘導性薬剤抵抗にも関与していると考えられた。一方、研究代表者が見出したプロテアソーム阻害剤とオートファジー阻害作用を持つマクロライドの併用投与法は微小環境下においても強力に骨髄腫細胞株に小胞体ストレス負荷を伴った細胞死を誘導することが明らかになった。これにより、多発性骨髄腫治療および微小環境誘導性薬剤抵抗に対する「小胞体ストレス負荷誘導療法」の可能性が示唆された。

現在論文投稿準備中である。引き続き、疾患モデルマウスを用いて *in vivo* 効果の検証を行い、実臨床に向けた更なる基盤形成を進める。また、上記の知見も踏まえて、マクロライド抗生剤のオートファジー阻害機構の解明を進める。

謝辞：LP101, AA101 骨髄間質細胞株をご供与頂きました日本大学 医学部 機能形態学系生体構造医学分野 相澤信教授に深謝いたします。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計9件)

1 ) Ota K, Okuma T, Lorenzo A, Yokota A, Hino H, Kazama H, **Moriya S**, Takano N, Hiramoto M, Miyazawa K.

Fingolimod sensitizes EGFR wild-type non-small cell lung cancer cells to lapatinib or sorafenib and induces cell cycle arrest. *Oncol Rep.* 2019 Jul;42(1):231-242. doi: 10.3892/or.2019.7140. (査読あり)

2 ) Saito Y, **Moriya S**, Kazama H, Hirasawa K, Miyahara K, Kokuba H, Hino H, Kikuchi H, Takano N, Hiramoto M, Tsukahara K, Miyazawa K.

Amino acid starvation culture condition sensitizes EGFR-expressing cancer cell lines to gefitinib-mediated cytotoxicity by inducing atypical necroptosis. *Int J Oncol*. 2018 Apr;52(4):1165-1177. doi: 10.3892/ijco.2018.4282. ( 査読あり )

3 ) Iriyama N, Hino H, **Moriya S**, Hiramoto M, Hatta Y, Takei M, Miyazawa K.

The cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor, abemaciclib, exerts dose-dependent cytostatic and cytotoxic effects and induces autophagy in multiple myeloma cells. *Leuk Lymphoma*. 2018 Jun;59(6):1439-1450. doi: 10.1080/10428194. ( 査読あり )

4 ) Yamane M, **Moriya S**, Kokuba H.

Visualization of ceramide channels in lysosomes following endogenous palmitoyl-ceramide accumulation as an initial step in the induction of necrosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017 Mar 13;511:174-181. doi: 10.1016/j.bbrep.2017.02.010. ( 査読あり )

5 ) Hirasawa K, **Moriya S**, Miyahara K, Kazama H, Hirota A, Takemura J, Abe A, Inazu M, Hiramoto M, Tsukahara K, Miyazawa K.

Macrolide Antibiotics Exhibit Cytotoxic Effect under Amino Acid-Depleted Culture Condition by Blocking Autophagy Flux in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cell Lines. *PLoS One*. 2016 Dec 15;11(12):e0164529. doi: 10.1371/journal.pone.0164529. ( 査読あり )

6 ) 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*. 2016 Nov;49(5):1848-1858. doi: 10.3892/ijco.2016.3673. ( 査読あり )

7 ) Terayama H, Hirai S, Naito M, Qu N, Katagiri C, Nagahori K, Hayashi S, Sasaki H, **Moriya S**, Hiramoto M, Miyazawa K, Hatayama N, Li ZL, Sakabe K, Matsushita M, Itoh M.

Specific autoantigens identified by sera obtained from mice that are immunized with testicular germ cells alone. *Sci Rep*. 2016 Oct 18;6:35599. doi: 10.1038/srep35599. ( 査読あり )

8 ) Mukai S, **Moriya S**, Hiramoto M, Kazama H, Kokuba H, Che XF, Yokoyama T, Sakamoto S, Sugawara A, Sunazuka T, Ōmura S, Handa H, Itoi T, Miyazawa K.

Macrolides sensitize EGFR-TKI-induced non-apoptotic cell death via blocking autophagy flux in pancreatic cancer cell lines. *Int J Oncol*. 2016 Jan;48(1):45-54. doi: 10.3892/ijco.2015.3237. ( 査読あり )

9 ) Ogawa H, Takyu R, Morimoto H, Toei S, Sakon H, Goto S, **Moriya S**, Kono T.

Cell proliferation potency is independent of FGF4 signaling in trophoblast stem cells derived from androgenetic embryos. *J Reprod Dev*. 2016;62(1):51-8. doi: 10.1262/jrd.2015-097. ( 査読あり )

[ 学会発表 ] ( 計 4 件 )

1 ) Noriyoshi Iriyama, Hirotsugu Hino, **Shota Moriya**, Masaki Hiramoto, Yoshihiro Hatta, Masami Takei, Keisuke Miyazawa

Cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor abemaciclib exerts dose-dependent cytostatic and cytotoxic effects on multiple myeloma cells via autophagy. 58th American Society of Hematology, 2017.

2 ) **森谷 昇太**, 風間 宏美, 平本 正樹, 宮澤 啓介

マクロライド抗生剤は骨髄腫細胞株のストローマ細胞接着依存性プロテアソーム阻害剤耐性を克服し、殺細胞作用を増強する. 第 76 回 日本癌学会学術総会, 2017 年

3 ) **森谷 昇太**, 風間 宏美, 平本 正樹, 相澤 信, 砂塚 敏明, 半田 宏, 宮澤 啓介

Macrolides enhance bortezomib-induced cytotoxicity in myeloma cells co-cultured with stroma layer 第 78 回 日本血液学会学術集会, 2016 年

4 ) **森谷 昇太**, 風間 宏美, 平本 正樹, 半田 宏, 宮澤 啓介

Macrolides enhance bortezomib-induced cytotoxicity and overcome stromal cell-mediated drug resistance in myeloma cells. 第 178 回 東京医科大学医学会総会, 2016 年

〔その他〕

1) 賞罰

第 179 回 東京医科大学 医学会奨励賞 受賞 (森谷昇太), 2017 年.

2) ホームページ

東京医科大学 生化学分野

<https://www.tokyo-med.ac.jp/med/course/16.html>

東京医科大学 分子標的探索センター

<http://www.tokyo-med.ac.jp/target/>

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。