

令和元年6月10日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16065

研究課題名(和文)悪性中皮腫におけるオートファジー活性化機序の解明と新規診断法、治療法への応用

研究課題名(英文)Elucidation of role for autophagy and the activated mechanism of autophagy in malignant mesothelioma.

研究代表者

篠原 義康 (SHINOHARA, YOSHIYASU)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：60723509

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、悪性中皮腫におけるオートファジーが果たす役割とオートファジー活性化の機序を明らかにすることを目的とし、以下のことを明らかにした。(1)遺伝子Aは、中皮腫細胞株において、オートファジーと細胞増殖を抑制することが分かった。さらなる検討が必要であるが、悪性中皮腫細胞株では、遺伝子Aがオートファジーを調節するメカニズムや細胞の増殖が調節されるメカニズムが複数ある可能性が示唆された。(2)p62は、悪性中皮腫細胞株において、細胞増殖やシスプラチン抵抗性に関与する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

悪性中皮腫においてオートファジーを調節する蛋白質を見出し、分子機序の一端を解明することができた。一方、悪性中皮腫細胞株において、飢餓でオートファジーを誘導すると、通常はオートファジーに分解されるp62蛋白質が悪性中皮腫細胞株の細胞内で増加するという興味深い知見を得ることができた。さらに、悪性中皮腫細胞株においてp62は細胞増殖や抗癌剤抵抗性と関わる可能性があった。このことは、悪性中皮腫が抗癌剤というストレスに対して適応することにより、悪性中皮腫が抗癌剤に対して強い抵抗性を獲得する機序の一つである可能性がある。さらなる研究で新規治療法の開発に繋がる可能性や抗癌剤抵抗性を克服できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Aim of this study is to clarify the role of autophagy and the activated mechanism of autophagy in malignant mesothelioma. (1)Gene A was found to suppress autophagy and cell proliferation in mesothelioma cell lines. We suggested that plural pathway of the mechanism that regulates autophagy and the cell proliferation signaling pathway in malignant mesothelioma cell lines, although a detailed study is required.(2)We suggested that p62 may be involved in cell proliferation and anticancer cisplatin resistance.

研究分野：分子病理

キーワード：悪性中皮腫 オートファジー

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

1. 研究開始当初の背景

悪性中皮腫は、アスベスト曝露を原因とする極めて予後不良な悪性腫瘍である。アスベスト曝露から悪性中皮腫の発症までの潜伏期間は数十年であり、高度経済成長の1970-90年頃に大量のアスベストが使用されたことから、悪性中皮腫の患者は増加の一途を辿り、2025年頃にピークを迎えると推測されている (*N Engl J Med.* 353:1591-1603, 2005)。悪性中皮腫では一般的に、外科療法、化学療法および放射線療法からなる集学的治療が行われる (*J Clin Oncol.* 27:1413-1418, 2009)。化学療法では、シスプラチン(DNA合成阻害剤)とペメトレキセド(葉酸合成阻害剤)の併用が用いられるが、十分な治療成績は得られていない。

一方、オートファジーは、細胞の自己成分を分解して再利用することで、細胞の恒常性維持を担う細胞内分解機構である。オートファジーが活性化されると、LC3-IIが増加、集積し、オートファゴソームを形成する。オートファゴソームは、オルガネラや蛋白質を取り囲み、その後、リソソームと融合してオルガネラや蛋白質を分解する (*Cell.* 147:728-741, 2011)(図1)。近年、オートファジーの腫瘍における機能や役割が注目されている。一部の腫瘍においては、オートファジーの機能低下が発がんに関与する (*Nat cell biol.* 12: 213-223, 2010)が、すでに腫瘍化してしまった腫瘍細胞では、がんの生存や増殖を促進する働きがある (*Gene Dev.* 25: 717-721, 2011)。さらに、抗がん剤抵抗性は、抗がん剤が腫瘍細胞のオートファジーを活性化することで獲得される (*Exp. Mol. Med.* 44: 109-120, 2012)。腫瘍細胞の生存戦略としてオートファジーが重要であるが、オートファジーが腫瘍抑制的か促進的かは、細胞の状況や種類に応じて異なると考えられる。

研究代表者は、悪性中皮腫の生存・増殖および治療抵抗性とオートファジーの関連性について検討し、以下の予備的結果を得ている。

(1) 悪性中皮腫細胞株では、培養中皮細胞と比較して、LC3-IIが高発現していることを見出した。また、オートファゴソームがGFP-LC3により緑色蛍光標識される悪性中皮腫細胞株を作製すると、この細胞では通常の培養条件下においても、細胞質にドット状のオートファゴソームが観察され、恒常的にオートファジーが活性化していると考えられた (図1)。

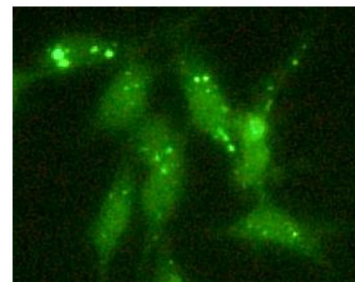


図1 悪性中皮腫細胞株(MSTO-211)におけるGFP-LC3の局在 (蛍光顕微鏡)

(2) 無血清培地(オートファジーが活性化した状態)で培養した悪性中皮腫細胞株は、血清を含む培地で培養した悪性中皮腫細胞株に比べて、シスプラチンに抵抗性を示した。このことは、無血清培地での培養ではオートファジーが活性化されていることから、細胞のシスプラチンに対する抵抗性にオートファジーが関与している可能性がある。また、悪性中皮腫細胞株をヒドロキシクロロキン(オートファジー阻害剤)で処理すると、飢餓状態で培養した悪性中皮腫細胞株では、血清を含む培地で培養した悪性中皮腫細胞に比べて、生存率は著しく低かった。

以上より、オートファジーの活性化は悪性中皮腫の生存・増殖機構、および抗がん剤治療抵抗性に深く関与すると考えられる。しかし、悪性中皮腫において、オートファジーがどのような分子機序で活性化され、生存・増殖や抗がん剤治療抵抗性に関与するのかは、解明されていない。これらを明らかにすることで、新規診断法や新規治療法の開発につながると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、悪性中皮腫細胞におけるオートファジー活性化の機序、悪性中皮腫細胞におけるオートファジーの機能や役割を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) オートファゴソームの観察：悪性中皮腫細胞株にレトロウイルスを用いて pMX-GFP-LC3 プラスミド(#38195; addgene)を遺伝子導入し、GFP-LC3を安定的に発現する悪性中皮腫細胞株を作製した。これらの悪性中皮腫細胞株の細胞内のGFP-LC3(オートファゴソーム)を蛍光顕微鏡下で観察した。
- (2) siRNA細胞内導入による遺伝子発現の抑制：Lipofectamin RNAi max(invitrogen)を用いて、標的遺伝子に対するsiRNA(invitrogen)を培養細胞内に導入した。
- (3) ウェスタンブロット法：蛋白質発現量について、ウェスタンブロット法で調べた。1次抗体は、LC3(PM036; MBL)、p62(PM045; MBL) Caspase-3(#9662; cell signaling)、phospho-ERK(#4370; cell signaling)、ERK(#4695; cell signaling)、phospho-AKT(#4060; cell signaling)、AKT(#9272; cell signaling)、GAPDH(#2118; cell signaling)を使用した。2次抗体は、Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody(#7074; cell signaling)、Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody(#7076; cell signaling)を使用した。
- (4) 細胞生存性試験：悪性中皮腫細胞の標的遺伝子のsiRNAの影響やシスプラチン処理の影響

について、生存細胞を Cell titer blue (Promega)で測定することによって、細胞の生存率やシスプラチン感受性を検討した。

4. 研究成果

(1) オートファジーにおける遺伝子 A がコードする蛋白質 A の役割

研究代表者は、悪性中皮腫細胞株において、恒常的にオートファジーが活性化し、そのことが、細胞の増殖、生存に関与していることを見出している。そこで、細胞の代謝調節、恒常性維持、ストレス応答、生存促進、増殖などに関与する分泌蛋白質 A に着目し、悪性中皮腫において、オートファジーにおける蛋白質 A の役割を検討した。オートファジーが活性化されると、オートファゴソームが形成される。オートファゴソームを構成する LC3 は、GFP-LC3 融合蛋白質として細胞に発現させると、蛍光顕微鏡下で細胞内のオートファゴソームの局在や動態を可視化することができる。作製した GFP-LC3 を安定的に発現する悪性中皮腫細胞株 (MSTO-211H, ACC-MESO-4) に遺伝子 A に対する siRNA を導入し、細胞内を蛍光顕微鏡下で観察すると、siRNA で蛋白質 A の発現を抑制した細胞では、Control の siRNA を導入した細胞と比べて、GFP-LC3 (オートファゴソーム) が減少した(図 2)。また、オートファジー活性化の指標として、オートファゴソームマーカーである LC3-II 蛋白質のウエスタンブロッティングの検出が有用とされている。LC3-II 蛋白質発現量は、siRNA で蛋白質 A の発現を抑制した細胞では、Control の siRNA を導入した細胞と比べて減少していた。これらのことから、遺伝子 A がコードする蛋白質 A は、オートファジーを調節することが分かった。また、siRNA で蛋白質 A の発現を抑制した細胞では、Control の siRNA を導入した細胞と比べて細胞増殖は抑制されたが、シスプラチン感受性には変化はなかった(図 3)。さらに、いずれの細胞株においても siRNA で蛋白質 A の発現を抑制した細胞では、Control の siRNA を導入した細胞と比べて cleaved caspase-3(活性型 caspase-3)が増加し、アポトーシスが誘導されていることが示唆された(図 4)。細胞増殖のシグナル分子である ERK や AKT について調べると、MSTO-211H では蛋白質 A の発現を抑制したときに ERK が活性化(リン酸化蛋白質の増加)し、ACC-MESO-4 では蛋白質 A の発現を抑制しても ERK の活性化に変化はなかった(図 5)。しかし、ACC-MESO-4 では、細胞内に元々リン酸化 ERK 蛋白質が多く、恒常的に ERK が活性化しているため、変化しなかった可能性があると考えられた。また、AKT については、いずれの細胞株においても変化はなかった。これらのことから、悪性中皮腫細胞株の種類ごとに、蛋白質 A がオートファジーを調節する機序や細胞の増殖や生存を調節する機序が異なる可能性があると考えられた。

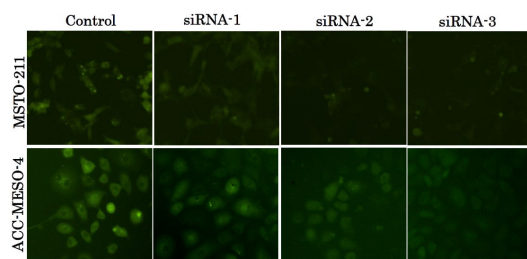


図2 遺伝子AのsiRNA導入による細胞内のGFP-LC3の変化

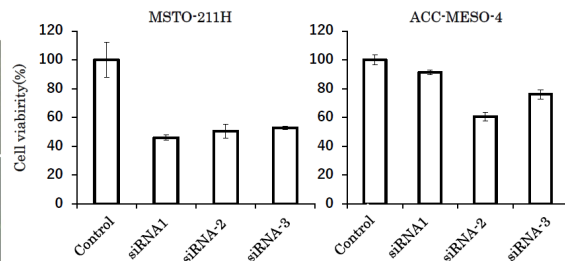


図3 遺伝子AのsiRNA導入による細胞生存性の影響

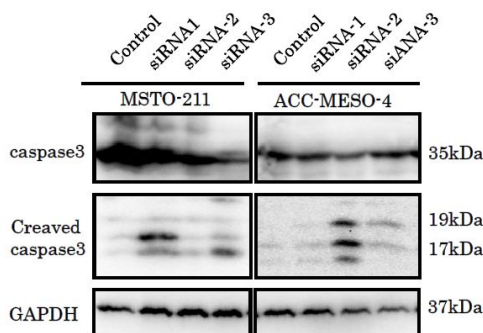


図4 遺伝子AのsiRNA導入による活性型カスパーゼ3の発現への影響

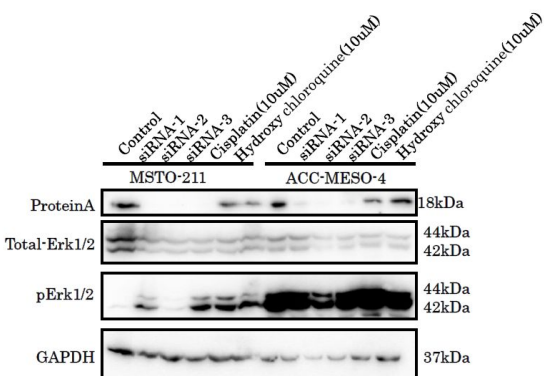


図5 遺伝子AのsiRNA導入によるERK経路への影響

(2) p62/SQSTM1 の機能解析

オートファジーが活性化すると、オートファジーの基質の一つである p62 蛋白質は、オートファジーにより細胞内で分解されて減少することが知られている。このことから、p62 はオートファジー活性化の指標として調べられている。そこで、悪性中皮腫細胞株において、飢餓(無血清培地での培養)でオートファジーを誘導した際、p62 が分解されるか調べると、興味深いことに、通常はオートファジーにより分解される p62 蛋白質は増加した(図 6)。また、p62 が細胞の生存・増殖と関わるか検討するために、p62 に対する siRNA と Control siRNA を悪性中皮腫細胞株内に導入すると、p62 の発現が抑制された細胞では、Control siRNA を導入した細胞と比べて、細胞生存・増殖が抑制された(図 7)。次に、p62 が薬剤抵抗性と関わるか検討するために、p62 に対する siRNA と Control siRNA を悪性中皮腫細胞株内に導入した後、細胞をシスプラチン処理すると、p62 の発現が抑制された細胞では、Control siRNA を導入した細胞と比べて、シスプラチン感受性が増加した(図 8)。これらのことから、悪性中皮腫細胞株において、p62 は細胞増殖やシスプラチン感受性に関与する可能性が示唆された。

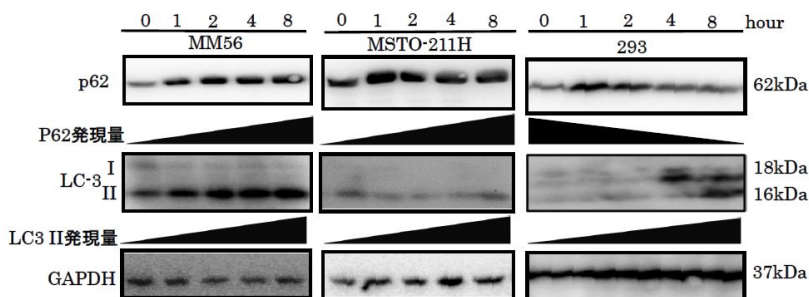


図6 飢餓による経時的なLC3とp62蛋白質発現量の変化

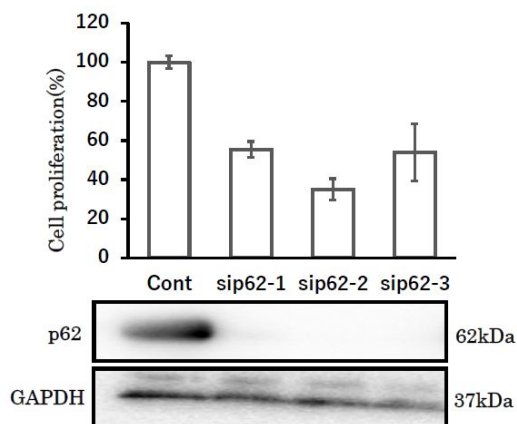


図7 sip62による細胞増殖抑制効果

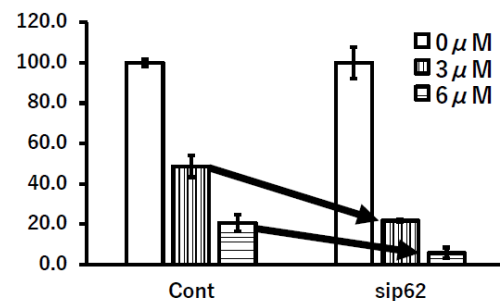


図8 sip62によるシスプラチン感受性の増加

5. 主な発表論文等

[学会発表](計1件)

- (1) 篠原義康、佐藤鮎子、結城美智子、辻村亨、悪性中皮腫細胞株における p62/SQSTM1 の機能解析、第 108 回日本病理学会、2019 年 5 月、東京国際フォーラム(東京)

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。