

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06954

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・准教授

研究者番号：50568326

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーの活性状態は各患者癌で異なるため、癌病態におけるオートファジー活性の生物学的意義を理解すると共に、オートファジー活性の有無に基づいた治療戦略の確立が求められている。本研究では、一部の癌細胞において、オートファジーの不活性化が腫瘍形成および転移能の獲得に寄与することを示した。また、オートファジー活性の指標となるバイオマーカー候補を特定した。さらに、オートファジー不活性化癌における治療標的となる候補分子および有効な低分子化合物を同定した。以上の成果は、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となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌治療において、各患者癌の特性に基づいて治療方針を選択する個別化医療の実現が求められている。オートファジーの活性状態は各患者癌で異なるため、予め各患者癌におけるオートファジー活性を把握した上で、オートファジー活性化癌あるいは不活性化癌の各々に対して有効な治療方針を選択することが重要となる。本研究による成果は、各癌におけるオートファジー活性の測定方法の開発およびオートファジー活性に基づいた個別化治療戦略を確立するための分子基盤となる。また、オートファジーの不活性化が関与する他の難治疾患(神経変性疾患など)の病態解明にも役立つ可能性がある。

研究成果の概要(英文)：It is believed that the state of autophagy activity differs in each patient's cancer. Therefore, it is necessary to understand the biological significance of autophagy activity in cancer and to establish therapeutic strategies based on autophagy activity. In this study, we showed that inactivation of autophagy contributes to tumorigenesis and acquisition of metastatic potential in some cancer cells. We identified candidate biomarkers to determine the active state of autophagy in each patient cancer. Furthermore, we identified candidate molecules and effective small-molecule compounds as therapeutic targets for autophagy-inactivated cancers. These results provide a molecular basis for the establishment of new therapeutic strategies based on autophagy activity.

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

<ヒト癌におけるオートファジーの活性化>

オートファジーは、細胞内物質(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分解経路である。このオートファジー分解経路は、癌微小環境での栄養ストレスや放射線または抗癌剤処理などの細胞ストレス下で活性化される。そして、分解産物からのエネルギー源供給や細胞内毒性物質(異常オルガネラなど)の排除を介して、癌細胞の生存や治療抵抗性に寄与すると考えられている。この考えに基づき、放射線または抗癌剤治療を行う際に、オートファジー経路を阻害するクロロキンを併用投与する臨床治験が盛んに行われている。実際に、我々は、急性リンパ性白血病(Acute lymphoblastic leukemia: ALL)の担癌マウスモデルにおいて、ALLの標準治療薬であるL-asparaginase(L-asp)とクロロキンの併用投与により、L-aspの治療効果が顕著に増強されることを見出してきた。また、我々は、リソソーム膜上に局在するLAPTM5遺伝子産物の蓄積がオートファジー障害を伴った細胞死を惹起すること、そして、そのようなLAPTM5誘導性細胞死は、小児の固形癌である神経芽腫の腫瘍自然退縮時のプログラム細胞死に深く関与する可能性を示してきた。このように、オートファジーの活性化は、癌細胞の生存を介して、癌の悪性化に寄与すると考えられている。

<ヒト癌におけるオートファジーの不活性化>

一方、マウスでのオートファジー関連遺伝子の欠損は、肝腫瘍の発生を誘発することが知られており、オートファジーの不活性化もまた癌化に寄与すると考えられている。しかし、実際のヒト癌におけるオートファジー障害の頻度は不明であった。そのような中、これまで我々は、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(ATG5、ATG7、LC3Av1など)のゲノム・エピゲノム異常を同定してきた。また、癌ゲノムデータベース上で、16種の癌種由来4,379症例のうち649症例(14.8%)において、オートファジー関連遺伝子の異常(変異または欠失)を検出した(特に肺扁平上皮癌や前立腺癌)。これらの所見は、オートファジーの活性化状態は各患者癌で異なっており、オートファジーの活性化と不活性化の両方が癌の悪性化に寄与する可能性を示唆している。当然、オートファジー障害を有するオートファジー不活性化癌に対して、上述のような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。また、オートファジー不活性化癌細胞では、オートファジー以外の別の細胞生存システムが活性化していると推測され、そのような細胞生存システムの特定は、オートファジー不活性化癌に対する治療戦略の確立に繋がると考えた。

2. 研究の目的

このような背景の中、本研究では、癌におけるオートファジー活性の生物学的意義を理解すると共に、オートファジー活性化癌と不活性化癌の各々に対して有効な治療標的を特定し、オートファジー活性を基盤とした新たな癌治療戦略を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) オートファジーの活性化状態が明らかな癌細胞亜株の樹立

オートファジー関連遺伝子(ATG5、ATG7、LC3Av1など)が不活性化しているヒト癌細胞株において、各々の当該遺伝子の安定発現細胞株を樹立した。また、マウス乳癌細胞株(4T1)およびマウスメラノーマ細胞株(B16-F10)において、CRISPR/Cas9システムを用いて、Atg5遺伝子を欠損した細胞株を樹立した。各細胞株におけるオートファジーの活性化状態は、電子顕微鏡観察お

および western blotting 解析での LC3B form-II やオートファジー分解基質である p62 タンパク質レベルなどで確認した。

(2) オートファジー活性化癌または不活性化癌の分子特性の比較検討

上記で作成したオートファジーの活性状態が明らかな癌細胞ペアを用いて、種々の *in vitro* アッセイ系および担癌マウスでの造腫瘍能と肺への転移能(自然転移、尾静脈投与経路)の比較検討を行った。さらに、培養細胞や担癌マウスからの抽出腫瘍または血液サンプルを用いて、網羅的な遺伝子発現等の比較検討を行った(プロテオーム解析、発現アレイ解析、メタボローム解析など)。

(3) オートファジー活性化癌と不活性化癌の各々に対する有効な治療戦略の確立

オートファジーの活性状態が明らかな癌細胞ペアを用いて、細胞生存を指標とした承認薬ライブラリーのスクリーニングを行った。特に、オートファジー不活性化癌細胞で高い感受性を示す低分子化合物の同定とその抗腫瘍効果に関する作用機序の解明に取り組んだ。また、オートファジー経路を標的とするマイクロ RNA 核酸抗癌薬の投与による抗腫瘍効果と共に、培養細胞および担癌マウス腫瘍組織におけるオートファジーの活性状態を検討した。

4. 研究成果

(1) 癌病態におけるオートファジー活性の生物学的意義の解明

オートファジー関連遺伝子(*ATG5*、*ATG7*、*LC3Av1* など)が不活性化しているヒト癌細胞株(例: Du145 前立腺癌細胞株、*ATG5* 遺伝子の機能消失型変異を有する)において、当該遺伝子の導入により、オートファジー活性の回復と担癌マウスでの腫瘍増殖の抑制が認められた。また逆に、オートファジー機能が正常に備わった 4T1 細胞または B16-F10 細胞において、マウス *Atg5* 遺伝子の欠損により、オートファジーの不活性化と担癌マウスでの造腫瘍能と肺への転移能の部分的な亢進が見られた。これらの結果は、一部の癌細胞において、オートファジーの不活性化は、腫瘍形成および転移能の獲得に寄与することを示唆している。一方で、上記のオートファジーの活性状態が明らかな癌細胞ペアを用いて、種々の *in vitro* アッセイを行った結果、オートファジー活性の有無は、*in vitro* での細胞増殖、細胞移動能、浸潤能、様々な既存抗癌剤(シスプラチンや 5FU など)に対する感受性、栄養飢餓での細胞生存に影響しなかった。

また、培養細胞または担癌マウスからの抽出腫瘍サンプルを用いた網羅的な遺伝子発現解析(プロテオーム解析および発現アレイ解析)により、オートファジー不活性化癌で特異的に発現亢進する遺伝子群および上流の転写因子ネットワークを同定した。これらの遺伝子群は、オートファジー不活性化癌細胞における細胞生存システムに深く関与する可能性があり、治療標的になると考えられる。さらに、培養細胞または担癌マウス由来血液サンプルを用いた発現解析とメタボローム解析により、オートファジーの活性状態と相関する血中サイトカイン、マイクロ RNA、または代謝産物(アミノ酸を含む)を特定した。これらの分子は、各患者癌におけるオートファジーの活性状態を把握する上で、有用なバイオマーカーの候補分子となる可能性がある。現在、オートファジー不活性化癌細胞に関連する遺伝子群およびバイオマーカー候補に関して、それらの遺伝子機能および生物学的な意義を解明するためにさらなる検討を進めている。

(2) オートファジー活性に基づいた癌治療戦略の開発

上記の Du145 細胞および *ATG5* 遺伝子を導入した Du145 細胞のペアを用いて、細胞生存を指標とした承認薬ライブラリーのスクリーニングを実施し、オートファジー不活性化癌細胞(Du145 細胞)で高い感受性を示す 12 種の低分子化合物を同定した。他のオートファジー不活性化癌細胞

胞においても同様に、当該候補化合物の処理に対して高い感受性を示した。また、Du145 細胞の担癌マウスへの当該候補化合物の投与により、腫瘍増殖が抑制された。さらに、候補化合物による抗腫瘍効果において、脂質代謝経路の遮断とそれに伴うミトコンドリア傷害の誘発が深く関与する可能性を見出した。これらの結果は、オートファジー不活性化癌に対する新たな治療戦略の開発につながると考えられ、候補化合物による抗腫瘍効果の詳細な分子メカニズムの解明を行なっている。

一方、オートファジー活性化癌に対する治療戦略として、*miR-634* 製剤の有用性を検証した。マイクロ RNA (*microRNA*; *miR*) は、約 22 塩基からなる機能性 RNA であり、複数の標的遺伝子の転写産物に直接結合し、その遺伝子発現を負に制御する。近年、新たな医療モダリティとして、癌抑制型 *miR* を創薬シーズとして用いた核酸抗癌薬の開発が注目されている。我々は、以前の研究により、オートファジーを含む細胞生存システムに関連する複数の遺伝子群を標的とする *miR-634* を用いた全身投与用または局所投与用の核酸抗癌製剤を開発してきた。本研究では、オートファジー活性を有する癌細胞株 (A431 皮膚扁平上皮癌細胞株など) の培養細胞および担癌マウスにおいて、*miR-634* の導入により、顕著な抗腫瘍効果と共に、オートファジー活性の部分的な抑制を確認した (リソソーム関連分子の発現低下、p62 の蓄積など)。これらの結果は、オートファジー活性化癌に対する治療戦略として、*miR-634* 製剤が有用である可能性を示している。以上のように、本研究成果は、各癌におけるオートファジーの活性状態の測定方法の開発およびオートファジー活性に基づいた個別化治療戦略を確立するための分子基盤となる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Kishikawa M, Inoue J, Hamamoto H, Kobayashi K, Asakage T, Inazawa J	4. 巻 26
2. 論文標題 Augmentation of lenvatinib efficacy by topical treatment of miR-634 ointment in anaplastic thyroid cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 101009 ~ 101009
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2021.101009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Inoue J, Kishikawa M, Tsuda H, Nakajima Y, Asakage T, Inazawa J	4. 巻 -
2. 論文標題 Identification of PDHX as a metabolic target for esophageal squamous cell carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14938	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Inoue J, Fujiwara K, Hamamoto H, Kobayashi K, Inazawa J	4. 巻 19
2. 論文標題 Improving the Efficacy of EGFR Inhibitors by Topical Treatment of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma with miR-634 Ointment	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Therapy - Oncolytics	6. 最初と最後の頁 294 ~ 307
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omto.2020.10.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Takagawa Y, Gen Y, Muramatsu T, Tanimoto K, Inoue J, Harada H, Inazawa J	4. 巻 28
2. 論文標題 miR-1293, a Candidate for miRNA-Based Cancer Therapeutics, Simultaneously Targets BRD4 and the DNA Repair Pathway	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Therapy	6. 最初と最後の頁 1494 ~ 1505
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ymthe.2020.04.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Gokita K, Inoue J, Ishihara H, Kojima K, Inazawa J	4. 巻 19
2. 論文標題 Therapeutic Potential of LNP-Mediated Delivery of miR-634 for Cancer Therapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Therapy - Nucleic Acids	6. 最初と最後の頁 330 ~ 338
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omtn.2019.10.045	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tonouchi E, Gen Y, Muramatsu T, Hiramoto H, Tanimoto K, Inoue J, Inazawa J	4. 巻 8
2. 論文標題 miR-3140 suppresses tumor cell growth by targeting BRD4 via its coding sequence and downregulates the BRD4-NUT fusion oncoprotein	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-22767-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 井上純、岸川正大、朝蔭孝宏、稲澤譲治
2. 発表標題 食道癌における治療標的としての代謝関連分子の探索
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井上純、稲澤譲治
2. 発表標題 LNPを介したmiR-634の腫瘍への送達による抗腫瘍効果
3. 学会等名 第24回日本がん分子標的治療学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井上純、岸川正大、濱本英利、小林勝則、藤原恭子、稲澤謙治
2. 発表標題 皮膚扁平上皮癌におけるmiR-634軟膏による抗腫瘍効果
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岸川正大、井上純、濱本英利、小林勝則、朝蔭孝宏、稲澤謙治
2. 発表標題 甲状腺未分化癌に対するmiR-634を用いた核酸抗癌剤の開発
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 玄泰行、村松智輝、井上純、稲澤謙治
2. 発表標題 新規癌抑制型miRNAによるMYC標的核酸抗癌治療の可能性
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Inoue J, Gokita K, Kishikawa M, Hamamoto H, Kobayashi K, Fujiwara K, Asakage T, Kojima K, Inazawa J
2. 発表標題 Therapeutic potential of the topical treatment of miR-634 ointment for cutaneous squamous cell carcinoma
3. 学会等名 AACR Annual Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Inoue J, Gokita K, Kojima K, Inazawa J
2. 発表標題 Therapeutic potential of LNP-mediated delivery of miR-634 for cancer therapy.
3. 学会等名 The 3rd International Society of Precision Cancer Medicine (ISPCM) 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Furusawa A, Inoue J, Miyamoto M, Takano M, Tsuda H, Song YS, Aoki D, Miyasaka N, Inazawa J
2. 発表標題 Ovarian cancer therapeutic potential of glutamine depletion based on GS expression.
3. 学会等名 The 3rd International Society of Precision Cancer Medicine (ISPCM) 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kishikawa M, Inoue J, Asakage T, Inazawa J
2. 発表標題 Therapeutic potential of the topical treatment of miR-634 ointment for skin cancer.
3. 学会等名 The 3rd International Society of Precision Cancer Medicine (ISPCM) 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Gen Y, Inoue J, Inazawa J
2. 発表標題 The exploration of novel tumor suppressive miRNAs using function-based miRNA screening.
3. 学会等名 The 3rd International Society of Precision Cancer Medicine (ISPCM) 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上純、古澤啓子、宮本守員、高野政志、津田均、Song Yong Sang、青木大輔、宮坂尚幸、稲澤譲治
2. 発表標題 グルタミン合成酵素の発現に基づいた細胞外グルタミン枯渇による卵巣がん治療戦略の開発
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 五木田憲太郎、井上純、石原比呂之、小嶋一幸、稲澤譲治
2. 発表標題 LNPを介したmiR-634の送達による抗腫瘍効果
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 玄泰行、井上純、稲澤譲治
2. 発表標題 機能的miRNAスクリーニングを用いたp53不活性型癌に細胞死を誘導するmiRNAの探索
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岸川正大、井上純、濱本英利、小林勝則、藤原恭子、朝蔭孝宏、稲澤譲治
2. 発表標題 皮膚癌に対するmiR-634軟膏の塗布による抗腫瘍効果
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Muramatsu T, Tonouchi E, Gen Y, Hiramoto H, Tanimoto K, Inoue J, Inazawa J
2. 発表標題 miR-3140 suppresses tumor cell growth by targeting BRD4 via its coding sequence and downregulates the BRD4-NUT fusion oncoprotein.
3. 学会等名 AACR Annual Meeting 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 井上純、稲澤讓治	4. 発行年 2019年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 5
3. 書名 医学の歩み：マイクロRNAを用いた核酸抗癌薬の開発	

〔出願〕 計5件

産業財産権の名称 腫瘍細胞の評価方法	発明者 稲澤讓治、井上純、 岸川正大	権利者 国立大学法人東京医科歯科大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-052697	出願年 2021年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 医薬組成物	発明者 稲澤讓治、玄泰行、 井上 純、村松智輝、 高川祐希	権利者 国立大学法人東京医科歯科大学
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/048114	出願年 2020年	国内・外国の別 外国
産業財産権の名称 医薬組成物	発明者 稲澤讓治、玄泰行、 井上 純、村松智輝、 高川祐希	権利者 国立大学法人東京医科歯科大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-233250	出願年 2019年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 マイクロRNAの測定方法、並びに、がん治療剤及びこれを含有するがん治療のための医薬組成物	発明者 稲澤讓治、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
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-094747	出願年 2018年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 マイクロRNAの測定方法、並びに、がん治療剤及びこれを含有するがん治療のための医薬組成物	発明者 稲澤讓治、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
産業財産権の種類、番号 特許、15/976.460	出願年 2018年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			