

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06691

研究課題名(和文)オートファジー細胞死を標的とする新規肺腺癌治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of a novel lung adenocarcinoma treatment targeting autophagic cell death

研究代表者

南 謙太郎 (Minami, Kentaro)

宮崎大学・医学部・薬剤師

研究者番号：20735956

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)：本研究ではBHLHE41によるオートファジー細胞死の誘導メカニズムを解明する目的で研究を行った。BHLHE41の発現時にBax、Bcl2、BNIP3の発現が減少した。このうちBcl2は発現減少とオートファジーとの関連があることからBcl2の発現減少がオートファジー細胞死に関わっていることが示唆された。また、同時期にフェロトーシス抑制因子AIFM2の発現減少し、フェロトーシスも起こっていた。BHLHE41はオートファジー細胞死に加えて、フェロトーシスも起こすことが考えられた。オートファジーはフェロトーシスとも関連しているため、今後、詳細なオートファジー機構を解析していく予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

BHLHE41は肺腺癌において悪性化進展においてオートファジー細胞死を誘導し腫瘍抑制的に働くことを明らかにしている。BHLHE41の発現時にオートファジーの抑制に関わるBcl2の発現減少することからオートファジー誘導に関わっていることが示唆された。また、同時期にフェロトーシスも起こっていることが明らかになった。このBHLHE41のオートファジー細胞死の誘導メカニズムが分かれば新規肺腺癌治療薬の開発に繋がることが考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to clarify the mechanism by which BHLHE41 induces autophagic cell death. Expressed BHLHE41 decreased the expression of Bax, Bcl2, and BNIP3. Since the decreased expression of Bcl2 is involved in autophagy, it was suggested that the decreased expression of Bcl2 is involved in autophagic cell death induced by BHLHE41. Expression of BHLHE41 also decreased the expression of the ferroptosis inhibitor AIFM2 and induced ferroptosis. In addition to autophagic cell death, BHLHE41 is also thought to induce ferroptosis. Since autophagy is also associated with ferroptosis, we plan to analyze the detailed mechanism of autophagy in the future.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：オートファジー 肺腺癌 腫瘍抑制因子

### 1. 研究開始当初の背景

我が国での肺癌の罹患率は高く、死亡数は依然として第1位である。肺癌は早期発見が困難なために予後が非常に悪く、多くの場合、数年以内に再発や転移が起こることが知られている。しかし、早期肺癌(1期)に限れば5年生存率は高く、肺癌の早期発見と悪性化進展における機序解明は肺癌による死亡を減少させる重要な課題である。

BHLHE41はBasic helix-loop-helix familyに属する抑制性の転写制御因子で、E-boxに結合することが知られている。癌研究においてBHLHE41はHIF1の分解を介して癌の悪性化に抑制的に働くこと、悪性度が高いTriple Negative乳がんではBHLHE41の低下は予後不良の指標であることなど報告されている(Nature, 2012, 487, p380, Cell, 2009, 137, p87)。オートファジーは飢餓状態に陥った細胞が自らのタンパク質を分解し、再利用するシステムで、これまで非特異的にタンパク質を分解すると考えられていたが、近年では選択的にタンパク質を分解することがわかってきた。さらには細胞死の一つにオートファジーを伴った細胞死があることが報告されている。申請者らはすでにBHLHE41に注目し、Kaplan-Meier Plotter (<http://kmplot.com/analysis/>)でBHLHE41の発現低下がみられる肺腺癌症例では著しく予後が悪いこと(図1:投稿準備中)、免疫組織化学染色の結果から肺腺癌において非浸潤癌から浸潤癌への進行に伴いBHLHE41が消失すること(図2:投稿準備中)、tet-onシステムを用いたBHLHE41の発現誘導によって軟寒天中のコロニー形成能の低下やxenograftモデルを用いた検討での腫瘍増殖の抑制を見いだしている(図3:投稿準備中)。また、この腫瘍増殖抑制はKRASに変異を持った肺腺癌細胞で強く起こることが示唆された。この腫瘍抑制機構にオートファジーが関わっていることを明らかにした。さらにフェロトーシスの関与も示唆された。

BHLHE41は脱メチル化剤5-Aza-2-deoxycytidineやプロテアソーム阻害剤MG132を処理することによって発現が増加することから、BHLHE41の発現制御にDNAメチル化やプロテアソームによる分解が関わっていることを明らかにしている。

### 2. 研究の目的

肺腺癌症例のBHLHE41発現データベースや手術検体を用いたBHLHE41の発現は肺腺癌において低く、発現が低い群は予後が悪い。また、肺腺癌細胞株でのBHLHE41の発現はオートファジー細胞死を誘導し腫瘍増殖を抑制する。そこで、BHLHE41の発現制御機構やオートファジー細胞死の誘導機構の解析を通じて肺腺癌でのBHLHE41の役割を明らかにし、肺腺癌の新規治療標的分子を同定することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### ・BHLHE41によるオートファジー誘導機構の解析

RNAseqから得られたオートファジー関連遺伝子に注目し、BHLHE41によるオートファジー誘導に関与しているかmRNAやタンパク質発現を調べる。

#### ・オートファジー細胞死以外の関与

RNAseq解析からオートファジー細胞死以外の細胞死に関与する遺伝子を探索し、その発現について解析する。

#### ・BHLHE41の発現低下機構の解析

BHLHE41の5'UTR上流2kbをルシフェラーゼ遺伝子に連結したレポータープラスミドを用いて

転写活性に影響する領域から発現制御に関わる転写因子を同定する。ユビキチン制御の可能性も示唆されたため BHLHE41 に結合する E3 ligase を同定するためにコムギ無細胞系を利用したスクリーンを用いて網羅的に探索する。

#### 4. 研究成果

##### ・ BHLHE41 によるオートファジー誘導機構の解析

BHLHE41 の発現誘導細胞において BHLHE41 の発現時にオートファジー関連遺伝子の発現が亢進していることからこれら遺伝子が関与しているかを検討した。しかしながら、ほとんどの遺伝子について関与していなかった。特に、BNIP3 は発現増加することでオートファジーに関与しているが、その発現は逆に BHLHE41 の発現によって著しく減少していた。また、アポトーシス関連因子の BAX についても BHLHE41 の発現によって低下することがわかった。これらの遺伝子は BHLHE41 の発現によってプロモーター活性も低下することが明らかになり、CHIP 解析の結果から BAX は BHLHE41 が直接プロモーターに結合し転写を抑制することがわかった。BNIP3 に関しては現在検討中である。BNIP3 の発現増加はオートファジーと関連しているが、その発現は正常組織より肺腺癌組織で高く、予後が悪いことがわかっている。BHLHE41 による BNIP3 の発現抑制によって何かしらの増殖抑制が関わっている可能性も示唆されるため、今後検討する予定である。Bcl2 は Beclin1 と結合してオートファジーを抑制しているが、この Bcl2 が BHLHE41 の発現時に mRNA とタンパク質レベルで発現が減少していることがわかった。

オートファジー細胞死については BAX の発現減少によってアポトーシス経路への抑制と Bcl2 の発現減少により Beclin1 と Bcl2 の結合がなくなり Beclin1 によるオートファジーを誘導している可能性が示唆された。今後、この機構を詳細に解析するとともに mRNA の発現変化だけでなく mTOR 等のタンパク質の発現変化の関与についても検討する予定である。

##### ・ オートファジー細胞死以外の関与

RNAseq 解析から BHLHE41 がフェロトーシスの抑制に関わる FSP1 の発現を制御している可能性を見出した。実際に mRNA レベルを比較すると BHLHE41 の発現誘導によって FSP1 の発現が低下することがわかった。この発現低下が BHLHE41 の直接の作用かを調べるために FSP1 のプロモーター領域(約-1100bp)をクローニングし、検討を行った。その結果、BHLHE41 の発現によって FSP1 のプロモーター活性は低下した。FSP1 が BHLHE41 に制御されている可能性が示唆され、今後は CHIP 解析を用いて実際に FSP1 のプロモーター領域に結合しているかを検討する。FSP1 の発現制御の可能性から BHLHE41 がフェロトーシスを誘導する可能性が示唆された。FSP1 以外の発現については今後、解析予定である。

BHLHE41 の発現によってオートファジーの一つであるフェリチノファジーの関与も示唆しているが、フェリチンタンパク質 (FTH、FTL1) の mRNA 発現には影響しておらず他の因子の発現 (特にタンパク質レベル) について検討する必要がある。

##### ・ BHLHE41 の発現低下機構の解析

プロモーター解析の結果、転写活性に必要な領域を同定することができなかった。使用した細胞が A549 でありもともと発現が低いため特定できなかった可能性は考えられる。臨床検体から正常組織では BHLHE41 の発現がみられたため、正常細胞のプロモーター活性を比較して転写活性に必要な領域を同定する予定である。E3 ligase の同定についてもコムギ無細胞系でタンパク質を精製したが可溶化してしまい解析ができなかった。現在、可溶化については克服できたため再

度、 スクリーンを行い同定する予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Takahiro Kogaki et al.	4. 巻 197
2. 論文標題 Development of a highly sensitive method for the quantitative analysis of modified nucleosides using UHPLC-UniSpray-MS/MS	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of pharmaceutical and biomedical analysis	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） 10.1016/j.jpba.2021.113943	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 Kentaro Jingushi, Masaya Aoki, Kazuhiro Ueda, Takahiro Kogaki, Masaya Tanimoto, Yuya Monoe, Masayuki Ando, Takuya Matsumoto, Kentaro Minami, Yuko Ueda, Kaori Kitae, Hiroaki Hase, Toshiyuki Nagata, Aya Harada-Takeda, Masatatsu Yamamoto, Kohichi Kawahara, Kazuhiro Tabata, Tatsuhiko Furukawa, Masami Sato, Kazutake Tsujikawa	4. 巻 11
2. 論文標題 ALKBH4 promotes tumourigenesis with a poor prognosis in non-small-cell lung cancer.	5. 発行年 2021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/s41598-021-87763-1	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 Toshiyuki Nagata, Kentaro Minami, Masatatsu Yamamoto, Tsubasa Hiraki, Masashi Idogawa, Katsumi Fujimoto, Shun Kageyama, Kazuhiro Tabata, Kohichi Kawahara, Kazuhiro Ueda, Ryuji Ikeda, Yukio Kato, Masaaki Komatsu, Akihide Tanimoto, Tatsuhiko Furukawa, Masami Sato	4. 巻 22
2. 論文標題 BHLHE41/DEC2 Expression Induces Autophagic Cell Death in Lung Cancer Cells and Is Associated with Favorable Prognosis for Patients with Lung Adenocarcinoma.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International journal of molecular sciences	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） 10.3390/ijms222111509	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 Tatsuhiko Furukawa, Sho Tabata, Kentaro Minami, Masatatsu Yamamoto, Kohichi Kawahara, Akihide Tanimoto	4. 巻 1867
2. 論文標題 Metabolic reprogramming of cancer as a therapeutic target.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochimica et biophysica acta.	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） 10.1016/j.bbagen.2022.130301	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 Yusei Yamada et al.	4. 巻 155
2. 論文標題 Fine-tuned cholesterol solubilizer, mono-6-O- $\alpha$ -D-maltosyl- $\beta$ -cyclodextrin, ameliorates experimental Niemann-Pick disease type C without hearing loss.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie	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) 10.1016/j.biopha.2022.113698	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 Tatsuhiko Furukawa, Kentaro Mimami, Toshiyuki Nagata, Masatasu Yamamoto, Masami Sato, Akihide Tanimoto	4. 巻 24
2. 論文標題 Approach to Functions of BHLHE41/DEC2 in Non-Small Lung Cancer Development	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International journal of molecular sciences	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) 10.3390/ijms241411731	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 Yusei Yamada et al.	4. 巻 13
2. 論文標題 Different solubilizing ability of cyclodextrin derivatives for cholesterol in Niemann-Pick disease type C treatment	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Clinical and Translational Medicine	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) 10.1002/ctm2.1350	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8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 南謙太郎、池田龍二
2. 発表標題 病院薬剤師が挑む新規肺腺癌治療薬の開発
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 南謙太郎、山本雅達、河原康一、古川龍彦、池田龍二
2. 発表標題 Ribonucleotide reductaseはgemcitabine耐性膵癌細胞の耐性克服の標的となる
3. 学会等名 第40回日本薬学会九州山口支部大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 古川龍彦、河原康一、南謙太郎
2. 発表標題 FMNL1の発現は悪性膠芽腫の運動性と浸潤性に関わる予後不良因子である
3. 学会等名 第26回 日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 古川龍彦、南 謙太郎、永田俊之、山本雅達、河原康一、蔭山 俊、小松勝明、佐藤雅美
2. 発表標題 オートファジ 誘導遺伝子BHLHE41の抗腫瘍活性
3. 学会等名 第8回がん代謝研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 古川龍彦、河原康一、南謙太郎
2. 発表標題 FARP1はインテグリン v 5によるCDC42の活性化に関わり、進行胃がんの予後に関わる
3. 学会等名 第25回 日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂本洸大、山本雅達、南謙太郎、古川龍彦、河原康一、武井孝行、吉田昌弘
2. 発表標題 オートファジー誘導分子DEC2 によるアポトーシス誘導因子BAXの発現抑制
3. 学会等名 第58回 化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 古川龍彦、南 謙太郎、山本雅達、河原康一
2. 発表標題 FARP1 binds with integrinavb5 and FARP1 expression is correlate to poor prognoses of advanced gastric cancer patients
3. 学会等名 第80回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 古川龍彦、南謙太郎、河原康一、山本雅達
2. 発表標題 Integrin 5 inhibitor can suppress gastric cancer cell invasiveness through Integrin 5-FARP1-CDC42 cascade
3. 学会等名 第95回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
研究 分担 者	池田 龍二  (Ikeda Ryuji)  (50398278)	宮崎大学・医学部・教授    (17601)	

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
---------	---------