

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 13 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24501331

研究課題名(和文)オートファジー制御に基づく効果的な癌免疫療法の確立

研究課題名(英文)Effective anti-cancer immunotherapy by controlling autophagy

研究代表者

原田 守 (Harada, Mamoru)

島根大学・医学部・教授

研究者番号：50260716

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：細胞は、飢餓・ストレス状態では生存するためにオートファジーを利用する。そして、癌細胞は、このオートファジーを治療抵抗性の獲得や癌局所での低酸素環境への適応に利用している。申請者は、ヒト膵癌細胞にTRAILでアポトーシスを誘導する場合にオートファジーが誘導されること、また、オートファジーをRNA干渉や分子標的薬で阻害することによりヒト癌細胞のTRAIL感受性が増加することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Autophagy is a cell survival system under starvation or stress. Cancer cells utilize this system to acquire therapy-resistance and adjust hypoxic tumor microenvironment. I found that autophagy is induced when human pancreatic cancer cells are treated with apoptosis-inducing TRAIL. Additionally, their susceptibility to TRAIL is significantly augmented by the treatment with RNA interference or molecular-targeted drugs to inhibit autophagy.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：癌免疫療法 アポトーシス TRAIL オートファジー

1. 研究開始当初の背景

癌免疫療法は、患者に負担の少ない新たな治療法として注目されている。申請者は、最近の研究成果として、本来、免疫細胞に発現している toll 様受容体(TLR)が、多種類の癌細胞にも発現していること、さらに、癌細胞を TLR リガンドで刺激した場合、特定の癌細胞では細胞死を生じることを報告した。さらに、前立腺癌や乳癌細胞の細胞質内に poly(I:C) を導入すると、細胞質内のアジュバント受容体である MDA5 を介して、カスパーシム依存性のアポトーシスと増殖抑制を生じることを観察した。そして、アジュバント受容体を介するシグナルで誘導されるアポトーシスに伴い、癌細胞でオートファジーが誘導・増強していることを観察し、さらに、オートファジーを抑制すると癌細胞のアポトーシスが促進することを報告した。オートファジーの基本的役割は、飢餓やストレス状態において自己蛋白を分解し、アミノ酸を再利用して自己細胞を生存・維持させることである。そして、癌の微小環境で生じていると考えられる低酸素状態でもオートファジーが誘導されることが報告されている。このようなオートファジーの細胞防御的役割を考えると、癌治療に随伴して生じるオートファジーは、癌治療抵抗性の獲得に深く関与していることが示唆される。癌治療の過程で、癌細胞がオートファジーを利用しながら治療抵抗性を獲得し、癌幹細胞の選択的残存や癌の潜伏状が生じているとすれば、「オートファジー制御に基づく効果的な癌治療法の確立」は、癌の根治に結びつく有効な戦略になると考えられる。しかしながら、癌免疫療法により誘導される癌細胞死とオートファジーの関係、さらに、癌治療抵抗性の原因と考えられる癌幹細胞の選択的残存におけるオートファジーの役割、オートファジーを制御することによる癌免疫療法の治療

効果の増強に関する研究はほとんど行われていない。

2. 研究の目的

オートファジーの本来の役割が、飢餓やストレス状態で自己を生存・温存させることであることを考えると、癌治療抵抗性の獲得にオートファジーが関与している可能性が示唆される。本研究の目的は、癌免疫療法により誘導される癌細胞死抵抗性におけるオートファジーの役割を明らかにする、オートファジー制御に基づく効果的な癌免疫療法を確立することである。

3. 研究の方法

申請者は、ヒト膀胱癌細胞株を用いて、免疫効果細胞や分子 (TRAIL) により誘導される癌細胞死とオートファジーの関係を *in vitro* の系で検討した。また、オートファジーが、癌免疫療法に対して防御的に作用していることを確認後、癌免疫療法とオートファジー阻害剤との併用効果とその機序を *in vivo* モデルを用いて検証した。

4. 研究成果

研究期間の前半は、がん細胞選択的にアポトーシスを誘導できる TRAIL 分子のヒト膀胱がん細胞に対する細胞死誘導において、抵抗性機序として誘導されるオートファジーを抑制することにより、TRAIL 誘導性アポトーシスが誘導・増強できるか検討した。オートファジーを抑制する分子として、heat shock protein (HSP) 70 の機能を抑制すると同時に癌治療抵抗性に関与すると考えられるオートファジーを阻害することが報告されている pifithrin- μ (PFT- μ) を利用した。4種類のヒト膀胱癌細胞株 (MiaPaca-2、Panc-1、AsPC-1、BxPC-3) のいずれの細胞株にも TRAIL の受容体である death

receptor (DR4、DR5) を発現していたが、AsPC-1 のみ TRAIL 抵抗性であった。他の 3 種類の細胞株は、TRAIL または PFT- μ の単独処理により濃度依存的な cell viability の低下とアポトーシスの増加が認められたが、両者を併用することにより有意な相加・相乗効果が観察された。また、MiaPaca-2 と Panc-1 において、オートファジー関連分子である beclin-1 の発現を siRNA で選択的に低下させると、TRAIL に対する感受性が有意に増強されたことから、ヒト膵癌細胞に発現する DR を標的とした TRAIL によるがん治療に PFT- μ を併用することの有効性が示された。また、TRAIL によるヒト膵がん細胞のアポトイイスにおけるオートファジーの役割を確認するために、オートファジーに必須の分子である Beclin-1 を RNA 干渉で knockdown して検討したところ、Beclin-1 の発現が低下し、オートファジーが抑制された癌細胞では、TRAIL 感受性が亢進していた。さらに、免疫不全マウスにヒト膵がん細胞 Panc-1 を皮下接種したモデルを用いて、TRAIL と PFT- μ の in vivo での抗がん効果も検討し、併用効果があることを確認した。

研究期間の後半は、オートファジー阻害剤としてマラリア治療薬として臨床で使用され安全性が確認されている chloroquine を用いて行った。ヒト膵癌細胞株 (MiaPaca-2、Panc-1) のいずれの細胞株にも TRAIL の受容体である DR4、DR5 を発現していたが、MiaPaCa-2 は TRAIL に高感受性だったが Panc-1 は TRAIL 低感受性だった。両細胞株は chloroquine に濃度依存的な感受性を示したが、それぞれの suboptimal 濃度で MiaPaCa-2 は TRAIL に対

して相加的な抗癌効果を示した。その機序として、アポトーシスの誘導とともにコリネー形成能を低下させることが確認された。また、chloroquine 単独では、癌細胞に G2/M arrest を誘導することを確認した。さらに、MiaPaca-2 と Panc-1 において、オートファジー関連分子である beclin-1 の発現を siRNA で選択的に低下させると、TRAIL に対する感受性が有意に増強されることを細胞分子レベルでも確認できた。さらに、免疫不全マウスにヒト膵がん細胞 MiaPaCa-2 を皮下接種したモデルを用いて、TRAIL と chloroquine の併用により in vivo でも抗がん効果が増強されることを in vivo でも確認した。

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 13 件)

- 1) Harada M., et al., (16 人中 12 番) Prognostic impact of programmed cell death 1 ligand 1 expression in human leukocyte antigen class I-positive hepatocellular carcinoma after curative hepatectomy. **Journal of Gastroenterology**. 査読有 50: 65-75, 2015. doi: 10.1007/s00535-014-0933-3.
- 2) Harada M. et al., (5 人中 5 番目) Intermittent chemotherapy can retain the Therapeutic potential of anti-CD137 antibody during the late tumor-bearing state. **Cancer Science**, 査読有 106: 9-17, 2015. doi: 10.1111/cas.12568.
- 3) Harada M. et al. (10 人中 8 番目) Sorafenib enhances the anti-tumor effects of anti-CTLA4 antibody in by inhibiting myeloid-derived suppressor cells. **Oncology Reports**, 査読有 33: 2947-2953, 2015. doi: 10.3892/or.2015.3893.

- 4) Harada M. et al., (10 人中 9 番目) New polycomb group protein enhancer of zeste homolog (EZH) 2-derived peptide with the potential to induce cancer-reactive cytotoxic T lymphocytes in prostate cancer patients with HLA-A3 supertype alleles. **International Immunopharmacology**, 査読有 26: 133-138, 2015. doi: 10.1016/j.intimp.2015.03.023.
- 5) Harada M. et al., (5 人中 5 番目) The roles of ROS and caspases in TRAIL-induced apoptosis and necroptosis in human pancreatic cancer cells. **PLOS One**, 査読有 10:e012738, 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0127386.
- 6) Harada M. (10 人中 9 番目) Identification of erythropoietin receptor-derived peptides having the potential to induce cancer-reactive cytotoxic T lymphocytes from HLA-A24⁺ patients with renal cell carcinoma. **International Immunopharmacology**, 査読有 20: 59-65, 2014. doi: 10.1016/j.intimp.2014.02.018
- 7) Harada M. et al., (4 人中 4 番目) Transfection of poly(I:C) can induce ROS-triggered apoptosis and IFN- β -mediated growth arrest in human renal cell carcinoma cells via innate adjuvant receptors and the 2-5A system. **Molecular Cancer**, 査読有 13: 217, 2014. Doi:10.1186/1476-4598-13-217
- 8) Harada M. et al., (8 人中 8 番目) Bcl-2 family inhibition sensitizes human prostate cancer cells to docetaxel and promotes unexpected apoptosis under caspase-9 inhibition. **Oncotarget**, 査読有 5: 11399-412, 2014. (doi: 無)
- 9) Harada M. et al., (7 人中 7 番目) Metronomic chemotherapy with low-dose cyclophosphamide plus gemcitabine can induce anti-tumor T cell immunity in vivo. **Cancer Immunology Immunotherapy**, 査読有 62: 383-91, 2013. doi:10.1007/s00262-012-1343-0.
- 10) Harada M. et al. (6 人中 6 番目) The HSP70 and autophagy inhibitor pifithrin- μ enhances the antitumor effects of TRAIL on human pancreatic cancer. **Molecular Cancer Therapeutics**, 査読有 12: 341-51, 2013. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-12-0954.
- 11) Harada M. et al., (7 人中 7 番目) Metronomic chemotherapy with low-dose cyclophosphamide plus gemcitabine can induce anti-tumor T cell immunity in vivo. **Cancer Immunology Immunotherapy**, 査読有 62: 383-91, 2013. doi: 10.1007/s00262-012-1343-0.
- 12) Harada M. et al., (6 人中 6 番目) The HSP70 and autophagy inhibitor pifithrin- μ enhances the antitumor effects of TRAIL on human pancreatic cancer. **Molecular Cancer Therapeutics**, 査読有 12: 341-51, 2013. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-12-0954.
- 13) Harada M. et al., (7 人中 7 番目) Pifithrin- μ , an inhibitor of heat-shock protein 70, can increase the antitumor effects of hyperthermia against human prostate cancer cells. **PLOS One** 査読有 8(11): e78772. 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0078772.
- 〔学会発表〕(計 26 件)
- 1) Harada M. Combination of low-dose and intermittent chemotherapy with cyclophosphamide and gemcitabine restores efficacy of anti-CD137 antibody therapy at the late tumor-bearing state. 2014年12月10日-12日、京都国際会館(京都) 第43回日本免疫学会総会.
- 2) 原田守 : HIF-2 α の阻害はヒト膵がん細胞の TRAIL 感受性を増強する。2014年

- 9月25日-27日、パシフィコ横浜（横浜）第73回日本癌学会総会。
- 3) 原田守：ABT-263はヒト前立腺癌PC3細胞のドセタキセル感受性を増強する。2014年9月25日-27日、パシフィコ横浜（横浜）第73回日本癌学会総会。
- 4) 原田守：可溶性ST2は炎症性のがん微小環境を修飾し膵臓がんの腫瘍血管新生と増殖を抑制する。2014年9月25日-27日、パシフィコ横浜（横浜）第73回日本癌学会総会。
- 5) 原田守：ABT-263はヒト膵がん細胞のTRAILによるアポトーシスを増強する。2014年9月25日-27日、パシフィコ横浜（横浜）第73回日本癌学会総会。
- 6) 原田守：シイタケ菌糸体抽出物とgemcitabineの併用はTregとMDSCを抑制することで相乗的な抗腫瘍効果を発揮する。2014年9月25日-27日、パシフィコ横浜（横浜）第73回日本癌学会総会。
- 7) Harada M., Pifithrin- μ , an inhibitor of HSP70, can increase the antitumor effects of hyperthermia against human prostate cancer cells. 2014年9月4日-6日、AOSSA 福井県民ホール（福井）The 6th ACHO & the 31st JCTM.
- 8) 原田守：抗がん剤やBRMによる免疫抑制の軽減と抗がんT細胞応答の誘導。2014年8月28日-30日、パシフィコ横浜（横浜）第52回日本癌治療学会。
- 9) 原田守：低酸素誘導因子HIF阻害によるヒト膵癌細胞のTRAIL感受性の増強。2014年7月30日-8月1日、ひめぎんホール（松山）第18回日本がん免疫学会。
- 10) 原田守：Bcl-2 family 阻害剤によるヒト膵癌細胞のTRAIL抵抗性の克服。2014年7月30日-8月1日、ひめぎんホール（松山）第18回日本がん免疫学会。
- 11) 原田守：ヒト膵癌細胞に対するTRAILとchloroquineの併用効果の検討。2014年7月30日-8月1日、ひめぎんホール（松山）第18回日本がん免疫学会。
- 12) Harada M.: Long-lasting suppression of CT26 growth after low-dose chemotherapy with cyclophosphamide plus gemcitabine, followed by anti-CD137 antibody. 2013年12月11日-13日、幕張メッセ（千葉）第42回日本免疫学会学術総会。
- 13) Harada M.: Persistent antitumor immune response after the combination therapy with low-dose chemotherapy and anti-CD137 (4-1BB) antibody. 2013年10月3日-5日、パシフィコ横浜（横浜）第72回日本癌学会学術総会。
- 14) Harada M.: Restoration of the TRAIL susceptibility of human pancreatic cancer cells by inhibition of Bcl-xL. 2013年10月3日-5日、パシフィコ横浜（横浜）第72回日本癌学会学術総会。
- 15) Harada M.: Mechanisms of an HSP70 inhibitor pifithrin- μ to enhance TRAIL-induced apoptosis of pancreatic cancer cells. 2013年10月3日-5日、パシフィコ横浜（横浜）第72回日本癌学会学術総会。
- 16) Harada M.: CD4 T cell-mediated masking effects of the immunogenicity of tumor-associated antigens are qualitatively and quantitatively different depending on the individual antigens. 2013年10月3日-5日、パシフィコ横浜（横浜）第72回日本癌学会学術総会。
- 17) Harada M.: A novel HSP70 inhibitor pifithrin- μ enhances the antitumor effect of radiation on human prostate cancer. 2013年10月3日-5日、パシフィコ横浜（横浜）第72回日本癌学会学術総会。
- 18) 原田守：Poly(I:C)トランスフェクションによるROS産生を伴った癌細胞死誘

導とインターフェロン制御分子の関与。
2013年7月3日-5日、ANAクラウン
プラザホテル宇部（宇部）、第17回日本が
ん免疫学会。

19) 原田守：HSP70 阻害剤 pifithrin- μ が
Panc-1 膵癌細胞に対する TRAIL 誘導性
アポトーシスを増強する機序。2013年7
月3日-5日、ANAクラウンプラザホテ
ル宇部（宇部）、第17回日本がん免疫学
会。

20) 原田守：低用量 chemotherapy と抗
CD137 抗体の併用により誘導される持
続的な抗腫瘍免疫応答。2013年7月3日
-5日、ANAクラウンプラザホテル宇部
（宇部）、第17回日本がん免疫学会。

21) 原田守：オートファジーの阻害はアジ
ュバント受容体リガンドである
poly(I:C)による癌細胞死を増強する。
2012年9月19日-21日、ロイトン札幌
（札幌）、第71回日本癌学会学術総会。

22) 原田守：HSP70 およびオートファジー
阻害剤 pifithrin-m の膵癌細胞に対する
TRAIL 誘導性アポトーシス増強効果。
2012年9月19日-21日、ロイトン札幌
（札幌）、第71回日本癌学会学術総会。

23) 原田守：新規 HSP70 阻害剤である
pifithrin- μ は、ヒト前立腺癌において温
熱療法の抗腫瘍効果を増強する可能性が
ある。2012年9月19日-21日、ロイト
ン札幌（札幌）、第71回日本癌学会学術
総会。

24) 原田守：Poly(I:C) トランスフェクショ
ンによるヒト腎癌細胞での ROS 産生と
アポトーシスの誘導 2012年7月26日-
28日、ロイトン札幌（札幌）、第16回日
本がん免疫学会。

25) 原田守：HSP70 および autophagy 阻
害剤 pifithrin- μ は TRAIL によるヒト膵

癌細胞の apoptosis を増強する 2012年7
月26日-28日、ロイトン札幌（札幌）、
第16回日本がん免疫学会。

26) 原田守：シイタケ菌糸体抽出物の経口
摂取は担癌に伴う Treg の増加を抑制す
ることでペプチドワクチンによる CTL
活性を維持できる 2012年7月26日-28
日、ロイトン札幌（札幌）、第16回日本
がん免疫学会。

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.med.shimane-u.ac.jp/immunology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原田 守 (HARADA, Mamoru)

島根大学・医学部・教授

研究者番号：50260716

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：