

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430150

研究課題名(和文) 癌細胞のオートファジーと低酸素応答制御による免疫的細胞傷害抵抗性の克服

研究課題名(英文) Restoration of immune susceptibility to cancer cells regulated by autophagy and hypoxic responses

研究代表者

原嶋 奈々江 (HARASHIMA, Nanae)

島根大学・医学部・助教

研究者番号：60345311

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)：抗癌治療薬として注目されるTRAILに抵抗性を示したヒト膵癌細胞において、感受性の回復とその機序を検討した。オートファジーを阻害するpifithrin- μ と、あるいは抗アポトーシス分子Bcl-xL阻害剤ABT-263とTRAILの併用で、膵癌細胞に対するTRAIL感受性が増強した。また低酸素誘導因子のうちHIF-1ではなくHIF-2をRNA干渉で抑制した膵癌細胞は、抗アポトーシス蛋白survivin発現を減少させ抗腫瘍効果を誘導した。よって、HIF-2、オートファジー、抗アポトーシス分子それぞれの阻害が、免疫療法の治療効果を高める可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the human pancreatic cancer cells which showed resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), as an anticancer drug, I investigated to restore the sensitivity to TRAIL and elucidate its cellular mechanisms. Pifithrin- μ , an inhibitor of autophagy or ABT-263, a Bcl-2 family inhibitor which targets Bcl-2, Bcl-xL, and Bcl-w significantly enhanced the sensitivity to TRAIL in human pancreatic cancer cells. Knockdown of HIF-2 α , but not HIF-1 α , using siRNA increased the susceptibility of pancreatic cancer cells to TRAIL via decreased the expression of anti-apoptotic protein survivin, and induced antitumor effects. These results suggest that inhibition of HIF-2 α , autophagy, or anti-apoptotic molecules can enhance the efficacy of immune therapies to cancers.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：低酸素 癌 免疫 治療抵抗性 オートファジー

1. 研究開始当初の背景

(1) TRAIL 治療抵抗性とオートファジー

Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) は、death receptor を介して癌細胞選択的にアポトーシスを誘導する。既に欧米の臨床試験において良好な成績が得られているが、治療抵抗性を示す癌腫も報告されており、治療効果を高める方法の開発が課題となっている。そこで島根県に多い膵臓癌に着目し、ヒト膵癌細胞を用いて、heat shock protein (HSP) 70 の機能阻害効果や治療抵抗性に関与すると考えられ、且つ、オートファジー阻害効果を有する pifithrin- μ と TRAIL の併用による抗腫瘍効果を検討する。

(2) 癌の治療抵抗性における低酸素環境とオートファジー

オートファジーは、アポトーシスを逃れるためだけでなく、低酸素や酸化ストレス応答を含む様々な代謝ストレス下で癌細胞が生き延びるための、cytoprotective な働きを担っていると考えられている。脳腫瘍に関して低酸素下により誘導されるオートファジーが、癌細胞生存や腫瘍浸潤血管の新生に働くことが報告されたが、その他の癌種での詳細な機序や、TRAIL 及び癌に対する抗体医薬による治療抵抗性と低酸素・オートファジーの関連やメカニズム、加えて治療抵抗性の克服法は確立されていない。癌微小環境における低酸素は、アポトーシスの回避や治療抵抗性に関わっていると考えられており、これらを標的とした治療が検討されている。アポトーシスに関連する ROS の産生、ミトコンドリアや小胞体でのストレス応答、低酸素応答の相互作用メカニズムの解明は様々な癌種において、治療抵抗性の克服に応用可能であると期待される。

2. 研究の目的

癌の治療において、癌細胞に対する薬剤の効果を規定する要因である感受性あるいは抵抗性は極めて重要である。特に臨床において、投与当初は有効性を示しても、次第に抵抗性が生じ、十分な抗腫瘍効果が得られなくなる獲得耐性は克服すべき大きな課題である。治療抵抗性獲得の機序として、低酸素という微小環境、癌幹細胞の存在、免疫抑制性細胞の増殖等が挙げられる。また、近年オートファジーが抗腫瘍効果との関連において注目されている。オートファジーは本来、栄養飢餓やストレス応答で細胞内環境を維持し、細胞生存に重要な役割を果たしている。これまでに、癌細胞死と拮抗的に作用するオートファジーの抑制により、抗癌効果が増強されることを明らかにした(Harashima, et al. Cancer Immunol Immunother, 2012; Inao, et al. Breast Cancer Res Treat, 2012)。一連の研究成果は、癌治療抵抗性の獲得にオートファジーが重要な役割を担っている可能性を示唆している。本研究はこれらの研究

をさらに発展させる目的で、上皮性癌に対する免疫的細胞傷害を制御する分子機構、特にオートファジー、低酸素応答、酸化ストレス応答との関連性に重点をおき、癌治療抵抗性を克服する新しい治療法の確立を目標とする。

3. 研究の方法

(1) 膵癌細胞でオートファジーを抑制すると、TRAIL による癌細胞死の誘導が増強されることを阻害剤 pifithrin- μ を用いて解析し、細胞死の機序を明らかにする。また、抗アポトーシス分子 Bcl-2 ファミリー阻害剤 (ABT-199, ABT-263) を用いて、TRAIL 感受性に及ぼす影響について解析する。抗腫瘍効果は in vivo 実験でも検証する。

(2) 低酸素環境での膵癌細胞の TRAIL 感受性への影響を、TRAIL 受容体である death receptor (DR)-4, DR5 の発現、アポトーシスおよびその細胞内経路についてフローサイトメトリーや蛋白分子発現によって検討する。

(3) 膵癌細胞での TRAIL 感受性増強と低酸素環境あるいはオートファジーの作用について、低酸素誘導因子 HIF-1 α と HIF-2 α 分子ノックダウン細胞株の作成、オートファジーマーカー LC3-II と GFP の融合蛋白の作成を行う。これらを細胞内に遺伝子導入したのち、低酸素環境での培養や、オートファジー阻害剤、抗アポトーシス分子阻害剤と TRAIL の併用により、癌細胞死にそれぞれが与える影響とその機序について解析する。

(4) ヒト腫瘍抗原特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) が膵癌細胞における TRAIL 感受性に及ぼす影響を、健康人末梢血から誘導した癌反応性 CTL や $\gamma\delta$ T 細胞を用いて検討する。

(5) ヒト膵癌細胞を SCID マウスに皮下接種後 (xenograft モデル)、低酸素誘導因子の阻害、オートファジーの阻害、あるいは抗アポトーシス分子の阻害が TRAIL との併用によって、有意な抗腫瘍効果を示すか検証する。

4. 研究成果

低酸素癌の代表である膵癌に関して、低酸素環境ならびに低酸素誘導因子 hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α と HIF-2 α が TRAIL 感受性に及ぼす影響とその機序についてさらに検討した。HIF-2 α を RNA 干渉で抑制すると、Panc-1 細胞の TRAIL 感受性が高まった。HIF-2 α が TRAIL 抵抗性に重要な役割を果たしており、癌の低酸素反応を阻害することにより、TRAIL による治療効果を高め得る可能性が示唆された。Apoptosis Protein Array assay により HIF-1 α の siRNA による RNA 干渉細胞よりも HIF-2 α を抑制した Panc-1 細胞において、survivin 発現が減少することが新たに明らかとなった。さらに HIF-2 α を抑制した Panc-1 細胞に survivin を過剰発現させると、TRAIL 抵抗性が回復することが確認できた。

また survivin 阻害剤と TRAIL の併用による抗腫瘍効果を *in vitro* と *in vivo* の両方で認めた。よって、ヒト膵癌細胞では HIF-2 α が survivin の発現を転写レベルで制御することにより TRAIL 抵抗性をコントロールしていることが明らかとなった。また、オートファジーは飢餓や低酸素など様々なストレスで誘導される蛋白分解システムで、細胞の恒常性を保つ役割を担っているが、癌細胞において一般的には、治療抵抗性に関与している場合が多い。HSP70 の機能とともにオートファジーも阻害する pifithrin- μ は、TRAIL によるデスシグナルに伴う NF- κ B 経路の活性化を阻害し、癌細胞表面での DR5 発現を選択的に増強することにより、ヒト膵癌細胞に対する TRAIL の抗癌効果を増強することが明らかとなった(発表論文 8)。TRAIL 抵抗性ヒト膵癌細胞株を TRAIL と 2 種類の Bcl-2 ファミリー阻害剤 (ABT-199, ABT-263) とともに培養すると、Bcl-xL を選択的に阻害する ABT-263 併用時にのみ顕著な抗腫瘍効果を認め、それは ER stress 経路ではなく NF- κ B 経路を介して癌細胞表面の DR5 発現を上昇させ、caspase 依存的なアポトーシスを誘導した。*in vivo* においても、ABT-263 と TRAIL の併用による顕著な抗腫瘍効果が認められ、膵癌の有効な治療法になる可能性が示唆された(発表論文 1)。以上より、治療抵抗性の獲得が問題となっている TRAIL を用いた膵癌治療において、HIF-2 α の抑制、オートファジーの阻害、抗アポトーシス分子の阻害それぞれと TRAIL との併用療法は、治療効果を高める有効な複合免疫療法となりうる可能性が示唆された。

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 8 件)

Hari Y., Harashima N., Tajima Y., and Harada M. Bcl-xL inhibition by molecular-targeting drugs sensitizes human pancreatic cancer cells to TRAIL. *Oncotarget*; 6 (39): 41902-41915, 2015. 査読あり。DOI: 10.18632/oncotarget.5881

Zhang M., Harashima N., Moritani T., Huang W., and Harada M. The roles of ROS and caspases in TRAIL-induced apoptosis and necroptosis in human pancreatic cancer cells. *PLoS One*. May 22; 10(5): e0127386, 2015. 査読あり。DOI:10.1371/journal.pone.0127386. eCollection 2015

Tongu M., Harashima N., Tamada K., Chen L., and Harada M. Intermittent

chemotherapy can retain the therapeutic potential of anti-CD137 antibody during the late tumor-bearing state. *Cancer Sci*. 106(1):9-17, 2015. 査読あり。DOI: 10.1111/cas.12568

Tamaki H., Harashima N., Hiraki M., Aichi N., Nishimura N., Shiina H., Naora K., and Harada M. Bcl-2 family inhibition sensitizes human prostate cancer cells to docetaxel and promotes unexpected apoptosis under caspase-9 inhibition. *Oncotarget*. Nov 30;5(22):11399-412, 2014. 査読あり。DOI: 10.18632/oncotarget.2550

Harashima N., Minami T., Uemura H., and Harada M. Transfection of poly(I:C) can induce reactive oxygen species-triggered apoptosis and interferon- β -mediated growth arrest in human renal cell carcinoma cells via innate adjuvant receptors and the 2-5A system. *Mol Cancer*. Sep 17; 13:217, 2014. 査読あり。DOI: 10.1186/1476-4598-13-217

Minami T., Minami T., Shimizu N., Yamamoto Y., De Velasco M., Nozawa M., Yoshimura K., Harashima N., Harada M., and Uemura H. Identification of erythropoietin receptor-derived peptides having the potential to induce cancer-reactive cytotoxic T lymphocytes from HLA-A24(+) patients with renal cell carcinoma. *Int Immunopharmacol*. 20(1):59-65, 2014. 査読あり。DOI: 10.1016/j.intimp.2014.02.018

Sekihara K., Harashima N., Tongu M., Tamaki Y., Uchida N., Inomata T., and Harada M. Pifithrin- μ , an inhibitor of heat-shock protein 70, can increase the antitumor effects of hyperthermia against human prostate cancer cells. *PLoS One*, 14;8(11): e78772, 2013. 査読あり。DOI: 10.1371/journal.pone.0078772

Monma H., Harashima N., Inao T., Okano S., Tajima Y., and Harada M. 12. The HSP70 and autophagy inhibitor pifithrin- μ enhances the antitumor effects of TRAIL on human pancreatic cancer. *Mol Cancer Ther*. 12(4), 341-51, 2013. 査読あり。DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-12-0954

[学会発表](計 29 件)

1. 原嶋奈々江、原田守. HIF-2 α がヒト膵癌細胞の TRAIL や T 細胞に対する細胞傷害に対する免疫抵抗性を survivin を介して制御する、平成 27 年度 文部科学省

新学術領域研究 がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動 公開シンポジウム, 2016年2月9日, 一橋講堂 学術総合センター(東京都).

2. Mamoru Harada, Nanae Harashima. HIF-2 α , but not HIF-1 α , determines immune resistance of pancreatic cancer cells to TRAIL and T cells via survivin, 第44回日本免疫学会, 2015年11月18日, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市).
3. 波里瑠子、原嶋奈々江 他. Bcl-xL inhibition sensitizes human pancreatic cancer cells to TRAIL, 第74回日本癌学会総会, 2015年10月9日, 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市).
4. 原嶋奈々江 他. HIF-2 α regulates susceptibility of human pancreatic cancer cells to TRAIL- and T cell-mediated cytotoxicity via survivin, 第74回日本癌学会総会, 2015年10月9日, 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市).
5. Nanae Harashima, et al. Regulatory roles of HIF-2 α and survivin in TRAIL- and $\gamma\delta$ T cell-mediated cytotoxicity of human pancreatic cancer cells, 19th JACI & 23rd MNCB, 2015年7月9日~11日, 東京大学 伊藤国際学術センター内伊藤謝恩ホール(東京都文京区).
6. Mamoru Harada, Nanae Harashima. The role of ROS and caspases in TRAIL-induced apoptosis and necroptosis in human pancreatic cancer cells, 19th JACI & 23rd MNCB, ICCIM 2015, 2015年7月9日~11日, 東京大学 伊藤国際学術センター内伊藤謝恩ホール(東京都文京区).
7. Mamoru Harada, Nanae Harashima, et al. Combination of low-dose and intermittent chemotherapy with cyclophosphamide and gemcitabine restores efficacy of anti-CD137 antibody therapy at the late tumor-bearing state. 第43回日本免疫学会, 2014年12月11日, 京都国際会館(京都府京都市).
8. 原嶋奈々江 他. HIF-2 α の阻害はヒト膵がん細胞の TRAIL 感受性を増強する. 第12回がんハイポキシア研究会, 2014年11月21日, ホテルマリタレー創世佐賀(佐賀県佐賀市).
9. Yoko Hari, Nanae Harashima, et al. Bcl-2 family inhibitors effectively sensitize human pancreatic cancer cells to TRAIL. 45th Anniversary Meeting of APA (American pancreatic association) /JPS(日本膵臓学会), November 5-8, 2014, Hapuna Beach Prince Hotel, Big Island, Hawaii (U. S. A.).
10. Hiroyuki Monma, Nanae Harashima, et al. Autophagy inhibitors enhance TRAIL-induced antitumor effects on human pancreatic cancer cells, 45th Anniversary Meeting of APA (American pancreatic association) /JPS(日本膵臓学会), November 5-8 (Nov. 6th), 2014, Hapuna Beach Prince Hotel, Big Island, Hawaii (U. S. A.).
11. 原嶋奈々江 他. Inhibition of HIF-2 sensitizes human pancreatic cancer cells to TRAIL, 第73回日本癌学会総会, 2014年9月27日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市).
12. 波里瑠子、原嶋奈々江 他. Bcl-2 family inhibitor ABT-263 unveils the resistance to TRAIL-induced apoptosis in human pancreatic cancer cells, 第73回日本癌学会総会, 2014年9月26日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市).
13. 玉木宏樹、原嶋奈々江 他. ABT-263 sensitizes PC3 prostate cancer cells to docetaxel, 第73回日本癌学会総会, 2014年9月25日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市).
14. 波里瑠子、原嶋奈々江 他. Bcl-2 family 阻害剤併用によるヒト膵癌細胞の TRAIL 抵抗性の克服, 第18回日本がん免疫学会総会, 2014年7月31日, ひめぎんホール(愛媛県松山市).
15. 原嶋奈々江 他. 低酸素誘導因子 hypoxia-inducible factor 阻害によるヒト膵癌細胞の TRAIL 抵抗性の増強, 第18回日本がん免疫学会総会, 2014年7月31日, 松山, ひめぎんホール(愛媛県松山市).
16. 門馬浩行、原嶋奈々江 他. ヒト膵癌細胞に対する TRAIL と chloroquine の併用効果の検討, 第18回日本がん免疫学会総会, 2014年7月31日, ひめぎんホール(愛媛県松山市).
17. 門馬浩行、原嶋奈々江 他. Autophagy 阻害剤を用いたヒト膵癌に対する TRAIL の抗腫瘍効果増強の検討, 第69回日本消化器外科学会総会, 2014年7月16日, ホテルハイツ/郡山市民文化センター(福島県郡山市).

18. 玉木宏樹、原嶋奈々江 他. Bcl-2 ファミリー阻害剤併用によるヒト前立腺癌細胞の Docetaxel 感受性の増強, 日本薬学会第 134 年会, 2014 年 3 月 30 日, ホテル日航熊本 (熊本県熊本市).
19. 原田守、原嶋奈々江 他. Long-lasting suppression of CT26 growth after low-dose chemotherapy with cyclophosphamide plus gemcitabine, followed by anti-CD137 antibody, 第 42 回日本免疫学会, 2013 年 12 月 12 日, 幕張メッセ(千葉県幕張市).
20. Touko Inao, Nanae Harashima, et al. Poly(I:C), an innate adjuvant receptor ligand, can induce the antitumor effects on human breast cancer cells, 36th Annual SABCS, 2013 年 12 月 12 日, San Antonio (U. S. A.).
21. 頓宮美樹、原嶋奈々江 他. Persistent antitumor immunity after the combination therapy with low-dose chemotherapy and anti-CD137 (4-1BB) antibody, 第 72 回日本癌学会, 2013 年 10 月 3 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市).
22. 関原和正、原嶋奈々江 他. A novel HSP-70 inhibitor pifithrin- μ enhances the antitumor effect of radiation on human prostate cancer, 第 72 回日本癌学会, 2013 年 10 月 4 日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市).
23. 原嶋奈々江 他. Restoration of the TRAIL susceptibility of human pancreatic cancer cells by inhibition of Bcl-xL, 第 72 回日本癌学会, 2013 年 10 月 3 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市).
24. 門馬浩行、原嶋奈々江 他. Mechanisms of an HSP-70 inhibitor pifithrin- μ to enhance TRAIL-induced apoptosis of pancreatic cancer cells, 第 72 回日本癌学会, 2013 年 10 月 3 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市).
25. 門馬浩行、原嶋奈々江 他. 膵癌細胞に対する TRAIL と新規 HSP70 阻害剤 pifithrin- μ の併用効果と作用機序, 第 44 回日本膵臓学会, 2013 年 7 月 26 日, 仙台国際センター (宮城県仙台市).
26. 頓宮美樹、原嶋奈々江 他. 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, 第 17 回日本がん免疫学会, 2013 年 7 月 5 日, ANA クラウンプラザホテル宇部 (山口県山口市).
27. 門馬浩行、原嶋奈々江 他. 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, 第 17 回日本がん免疫学会, 2013 年 7 月 5 日, ANA クラウンプラザホテル宇部 (山口県山口市).
28. 原嶋奈々江 他. 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その活性化経路, 第 17 回日本がん免疫学会, 2013 年 7 月 5 日, ANA クラウンプラザホテル宇部 (山口県山口市).
29. 岡野慎士、原嶋奈々江 他. 切除肝細胞癌における Programmed Death of Ligand 1(PDL1)発現の生物学的意義, 第 17 回日本がん免疫学会, 2013 年 7 月 5 日, ANA クラウンプラザホテル宇部 (山口県山口市).

〔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 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
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
原嶋 奈々江 (HARASHIMA, Nanae)
島根大学・医学部・助教
研究者番号: 60345311

(2)研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：