

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：32645  
 研究種目：基盤研究(C) (一般)  
 研究期間：2014～2016  
 課題番号：26460478  
 研究課題名(和文) 難治性多発性骨髄腫に対する「小胞体ストレス誘導療法」の確立  
  
 研究課題名(英文) "ER-stress loading therapy" in refractory multiple myeloma  
  
 研究代表者  
 宮澤 啓介 (Miyazawa, Keisuke)  
  
 東京医科大学・医学部・主任教授  
  
 研究者番号：50209897  
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：多発性骨髄腫(MM)にボルテゾミブ(BZ)/マクロライド(CAM)を同時に作用させ、プロテアソーム/オートファジーを同時阻害することでERストレス負荷によるアポトーシスが誘導される。ミスfoldタンパク質はHDAC6とダイニンとの協働によりアグリソームへ輸送され取り込まれる。BZ/CAM処理によりアグリソームが形成される、ここにHDAC6阻害剤ボリノスタットを同時添加すると、ERストレス負荷の増大と強力なアポトーシスが誘導された。プロテアソーム、オートファジー、アグリソーム間の巧妙な細胞内ネットワークの存在が示唆され、これを標的とするMM新規治療法の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Combined treatment with bortezomib (BZ) and a macrolide for the simultaneous blocking of proteasome and autophagy pathways leads to enhanced multiple myeloma (MM) cell apoptosis induction via ER stress overloading. As misfolded protein cargo is recruited by HDAC 6 to dynein motors for aggresome transport, serving to sequester misfolded proteins, we investigated the cellular effects of targeting proteolytic pathways and aggresome concomitantly in MM cells. Pronounced apoptosis was induced by the combination of vorinostat (SAHA; potently inhibits HDAC 6) with CA M and BZ compared with each reagent or a 2-reagent combination. CAM/BZ treatment induced vimentin positive-aggresome formation, whereas it was inhibited in the presence of SAHA. The SAHA/CAM/BZ combination treatment maximally upregulated genes related to ER stress including CHOP. Targeting the integrated networks of aggresome, proteasome, and autophagy is suggested to induce efficient ER stress-mediated apoptosis in MM cells.

研究分野：腫瘍学

キーワード：多発性骨髄腫 オートファジー プロテアソーム 小胞体ストレス マクロライド抗生剤 アグリソーム

1. 研究開始当初の背景

高齢者に多い多発性骨髄腫(MM)は難治性造血器腫瘍の一つである。近年、プロテアソーム阻害剤やサリドマイド誘導体(IMiDs)が導入され生存期間の延長が認められているが、依然、根治は困難でありさらなる治療成績の向上が望まれる。

ユビキチン(Ub)-プロテアソーム系とオートファジー-リソソーム系は細胞内の二大タンパク質分解機構である。近年、p62等のドッキングタンパク質によりUb化されたタンパク質がp62と結合し、さらにp62-LC3との分子間会合を介してオートファゴソーム内に取り込まれ分解する機構が明らかとなった。(Kirikin V, Mol Cell, 2009)

一方、筆者らはマクロライド抗生剤にはオートファジー阻害活性を有すること、各種マクロライド抗生剤とプロテアソーム阻害剤であるボルテゾミブ(BZ)とを併用し両タンパク質分解系を同時に阻害することで小胞体(ER)ストレス負荷を介してMM細胞のアポトーシスを強力に誘導することを報告した。(Int J Oncol. 2013, Biochem Biophys Res Commun. 2013)

正常な立体構造として折り畳まれないミスフォールトタンパク質は、ERAD(ER-associated degradation)により小胞体外でUb化されプロテアソームで分解される。しかし、その分解許容量を上回るミスフォールドUb化タンパク質は、HDAC6とダイニンとの協同により微小管上を微小管形成中心(MTOC)に逆行輸送されアグリソームを形成する。アグリソーム内のタンパク質凝集体は、一部はオートファジーでも分解されると同時に、このアグリソーム形成はERストレスの緩和にも寄与していると考えられている。

2. 研究の目的

MM細胞に対して、Ub-プロテアソーム系をBZで、オートファジー-リソソーム系をクラリシロマイシン(CAM)等のマクロライド抗生剤に加えて、さらにHDAC6阻害剤作用を有するボリノスタット(SAHA)を添加することで、ERストレス負荷を介したアポトーシス誘導の増強の有無を検討する。さらにUb化された細胞内の挙動を検討する。

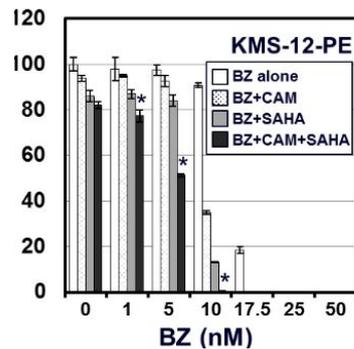
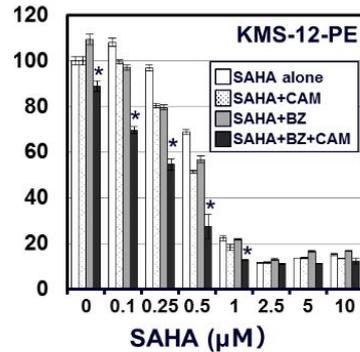
3. 研究の方法

各種骨髄腫細胞に対して、BZ、CAM、SAHAを各1剤、2剤(BZ+CAM, CAM+SAHA, BA+SAHA) 3剤(BZ+CAM+SAHA)の組合せで添加培養し、以下の項目を検討した。アポトーシス誘導、抗ビメンチン抗体、電子顕微鏡(EM)観察によるアグリソーム形成、抗Ub抗体を用いたUb化タンパク量の比較と細胞内分画による細胞内局在、real-time PCR法によるERストレス関連遺伝子発現量、CHOPノックアウトマウス由来胎生線維芽細胞株(MEF)に対する各種薬剤

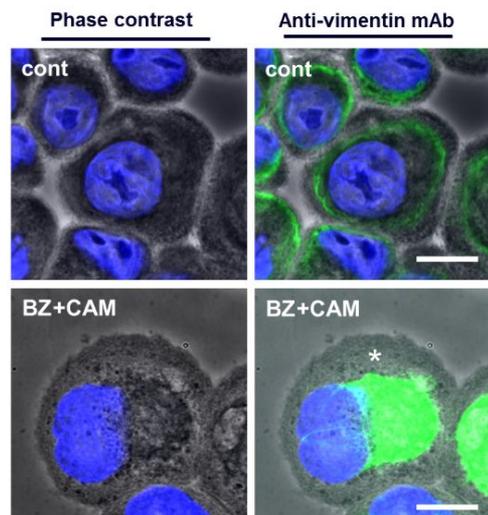
の組み合わせの比較を行う。

4. 研究成果

BZにCAM、SAHAを同時添加することで殺細胞効果の増強を認めるが、特にBZ+CAM+SAHAが最も強力な殺細胞効果を発現した。(タテ軸：生細胞比率、横軸：薬物濃度)

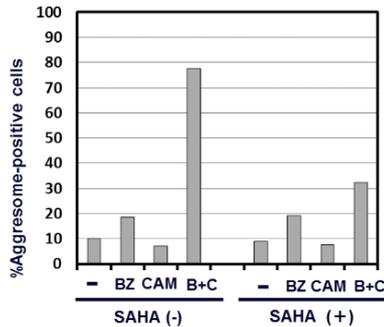


BZ+CAM同時添加培養により抗ビメンチン抗体で強陽性に染色されるアグリソームが形成された。

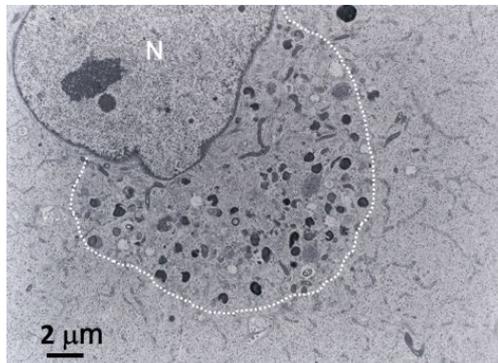


また、Ub化タンパク質もアグリソーム内に取り込まれた。

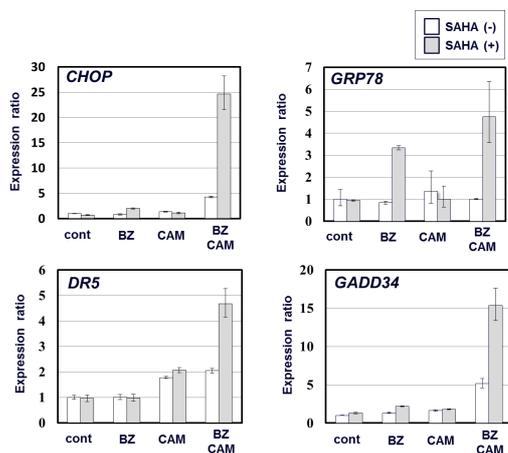
ここにHDAC6 阻害作用を有する SAHA を添加することでアグリソーム形成が阻害された。



EM 観察では BZ+CAM では、アグリソーム内にオートファゴソームやオートリソソームの核近傍への集簇像が認められた。

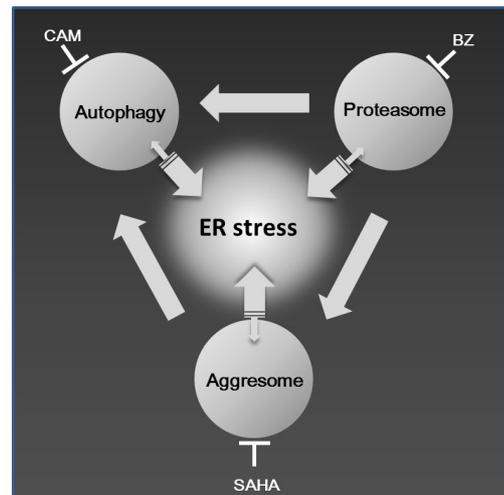


ER ストレス関連遺伝子は、BZ + CAM で発現増強を認める傾向にあったが、ここに SAHA を添加することでさらに著増した。



CHOP ノックアウト MEF では、BZ+CAM+SAHA による殺細胞効果が減弱した。

以上より、Ub-プロテアソーム系とオートファジー-リソソーム系の細胞内二大タンパク質分解機構に加えてアグリソームの三者間の細胞内ネットワークの存在が示唆された。また、これらを包括的に同時阻害することで ER-ストレスが著増し、これによる MM 細胞のアポトーシス誘導が増強することが明らかとなった。これより難治性 MM を対象とする “ ER ストレス誘導療法 ” という新規治療概念の提唱が可能となった



### 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 9 件 )

1. Hirasawa K, Moriya S, Miyahara K, Kazama H, Hirota A, Takemura J, Abe A, Inazu M, Hiramoto M, Tsukahara K, Miyazawa K: Macrolide Antibiotics Exhibit Cytotoxic Effect under Amino Acid-Depleted Culture Condition by Blocking Autophagy Flux in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cell Lines. PLoS One. 11: e0164529, 2016.

doi: 10.1371/journal.pone.0164529. 査読有

2. Miyahara K, Kazama H, Kokuba H, Komatsu S, Hirota A, Takemura J, Hirasawa K, Moriya S, Abe A, Hiramoto M, Ishikawa T, Miyazawa K: Targeting bortezomib-induced aggresome formation using vinorelbine enhances the cytotoxic effect along with ER stress loading in breast cancer cell lines. Int J Oncol. 49: 1848-1858, 2016.

doi: 10.3892/ijo.2016.3673. 査読有

3. Terayama H, Hirai S, Naito M, Qu N, Katagiri C, Nagahori K, Hayashi S, Sasaki H, Moriya S, Hiramoto M, Miyazawa K, Hatayama N, Li ZL, Sakabe K, Matsushita M, Itoh M: Specific

autoantigens identified by sera obtained from mice that are immunized with testicular germ cells alone. *Sci Rep.* 6: 35599. 2016. doi:10.1038/srep35599. 査読有

4. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A, **Miyazawa K**, (228 名中 185 ) et al: Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy.* 12: 1-222, 2016. doi: 10.1080/15548627.2015.1100356. 査読有

5. Moriya S, Komatsu S, Yamasaki K, Kawai Y, Kokuba H, Hirota A, Che XF, Inazu M, Gotoh A, **Hiramoto M**, **Miyazawa K**: Targeting the integrated networks of aggresome formation, proteasome, and autophagy potentiates ER stress-mediated cell death in multiple myeloma cells. *Int J Oncol.* 46: 474-86, 2015. doi:10.3892/ijo.2014.2773. 査読有

6. Mukai S, Moriya S, **Hiramoto M**, Kazama H, Kokuba H, Che XF, Yokoyama T, Sakamoto S, Sugawara A, Sunazuka T, Ōmura S, Handa H, Itoi T, **Miyazawa K**: Macrolides sensitize EGFR-TKI-induced non-apoptotic cell death via blocking autophagy flux in pancreatic cancer cell lines. *Int J Oncol.* 48: 45-54, 2015. doi: 10.3892/ijo.2015.3237. 査読有

7. **Hiramoto M**, Udagawa H, Watanabe A, **Miyazawa K**, Ishibashi N, Kawaguchi M, Uebanso T, Nishimura W, Nammo T, Yasuda K: Comparative analysis of type 2 diabetes-associated SNP alleles identifies allele-specific DNA-binding proteins for the KCNQ1 locus. *Int J Mol Med.* 36: 222-230, 2015. doi: 10.3892/ijmm.2015.2203. 査読有

8. Sugita S, Ito K, Yamashiro Y, Moriya S, Che XF, Yokoyama T, Hiramoto M, **Miyazawa K**: EGFR-independent autophagy induction with gefitinib and enhancement of its cytotoxic effect by targeting autophagy with clarithromycin in non-small cell lung cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 461: 28-34, 2015. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.03.162. 査読有

9. Moriya S, Komatsu S, Yamasaki K, Kawai Y, Kokuba H, Hirota A, Che XF, Inazu M, Gotoh A, **Hiramoto M**, **Miyazawa K**: Targeting the integrated networks of aggresome formation, proteasome, and autophagy potentiates ER stress-mediated cell death in multiple myeloma cells. *Int J Oncol.* 46: 474-486, 2015. doi:10.3892/ijo.2014.2773. 査読有

〔学会発表〕(計 17 件)

1. 平澤一浩、塚原 清彰、森谷昇太、**平本正樹**、風間宏美、由田 淳、阿部晃久、**宮澤啓介**、宮原か奈、稲津正人: Macrolide antibiotics exhibit cytotoxic effect under amino acid-depleted culture condition via blocking autophagy flux in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. 第 178 回 東京医科大学医学学会総会、2016 年 11 月 5 日 (東京)

2. 平澤一浩、塚原清彰、森谷昇太、**平本正樹**、**宮澤啓介**、宮原か奈: アミノ酸飢餓状態下で、マクロライド系抗菌薬はオートファジー阻害により頭頸部癌細胞株の細胞死を誘導する。第 75 回日本癌学会学術集会 2016 年 10 月 8 日 (横浜)

3. 宮原 か奈、森谷昇太、平澤一浩、**平本正樹**、小松誠一郎、石川孝、阿部 晃久、**宮澤啓介**: ビノレルピンは乳癌細胞株に於いてアグリソーム形成を阻害することによりボルテゾミブ誘導性の細胞毒性を増強する。第 75 回日本癌学会学術集会 2016 年 10 月 8 日 (横浜)

4. 森谷 昇太、風間 宏美、**平本正樹**、相澤 信、砂塚敏明、**半田 宏**、**宮澤啓介**: Macrolides enhance bortezomib-induced cytotoxicity in myeloma cells co-cultured with stroma layer. 第 78 回 日本血液学会 2016 年 10 月 6 日 (横浜)

5. **平本正樹**、森谷昇太、武村淳、風間宏美、日野浩嗣、高野直治、阿部晃久、**宮澤啓介**: 光反応性クロスリンカーと磁性ナノビーズを用いた分子標的探索の試み 第 89 回 日本生化学会大会 2016 年 9 月 26 日 (仙台)

6. **宮澤啓介**: (教育講演)「マクロライドとオートファジー」 第 23 回マクロライド新作用研究会。2016 年 7 月 30 日 (東京)

7. 宮原 か奈、森谷昇太、平澤一浩、**平本正樹**、小松誠一郎、石川孝、阿部晃久、**宮澤啓介**: Targeting bortezomib-induced aggresome formation using vinorelbine enhances the cytotoxic effect along with ER-stress loading in breast cancer cell lines. 第 177 回 東京医科大学医学学会総会、2016 年 6 月 4 日 (東京)

8. 平澤一浩、塚原清彰、森谷昇太、**平本正樹**、風間宏美、由田 淳、阿部晃久、**宮澤啓介**、宮原か奈、稲津正人: Macrolides enhance bortezomib-induced cytotoxicity and overcome stromal cell-mediated drug resistance in myeloma cells. 第 177 回 東京医科大学医学学会総会、2016 年 6 月 4 日 (東京)

9. **平本正樹**、宇田川陽秀、高橋枝里、加納圭子、鏑木康志、**宮澤啓介**、石橋奈緒子、舟橋 伸昭、南茂 隆生、安田 和

基: KCNQ1 遺伝子イントロンにおける 2 型糖尿病感受性 SNP rs163184 領域のアリル間比較解析. 第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会大会 合同大会 2015 年 12 月 2 日 (神戸)

10. 伊藤謙太郎、杉田翔平、山城優太郎、森谷昇太、車 暁芳、平本正樹、横山智央、宮澤啓介: EGFR-independent autophagy induction with gefitinib and enhancement of its cytotoxic effect by targeting autophagy with clarithromycin in non-small cell lung cancer cells. 医学会奨励賞 第 176 回 東京医科大学医学会総会、2015 年 11 月 7 日 (東京)

11. 向井俊太郎、森谷昇太、平本正樹、風間宏美、國場寛子、横山智央、半田 宏、糸井隆夫、宮澤啓介: Macrolides sensitize EGFR-TKI-induced non-apoptotic cell death via blocking autophagy flux in pancreatic cancer cell lines. 第 176 回 東京医科大学医学会総会、2015 年 11 月 7 日 (東京)

12. Moriya S, Che XF, Yokoyama T, Hiramoto M, Miyazawa K: Targeting autophagy with clarithromycin enhances gefitinib-induced cell death in non-small cell lung cancer cells. 第 74 回日本癌学会学術集会 2015 年 10 月 8 日 (名古屋)

13. 森谷昇太、小松誠一郎、山崎佳穂、河合 優佑、國場寛子、車 暁芳、稲津正人、後藤 明彦、平本正樹、半田 宏、宮澤啓介: Targeting the integrated networks of aggresome formation, proteasome, and autophagy potentiates ER stress mediated cell death in multiple myeloma cells. 医学会奨励賞 第 175 回 東京医科大学医学会総会、2015 年 6 月 6 日 (東京)

14. 伊藤謙太郎、杉田 翔平、山城優太郎、森谷 昇太、車 暁芳、平本正樹、横山智央、宮澤啓介: EGFR-independent autophagy induction with gefitinib and enhancement of its cytotoxic effect by targeting autophagy with clarithromycin in non-small cell lung cancer cells. 第 175 回 東京医科大学医学会総会、2015 年 6 月 6 日 (東京)

15. 平本正樹、宮澤啓介: KCNQ1 遺伝子イントロンの 2 型糖尿病感受性 SNP 領域におけるアリル特異的 DNA 結合因子の解析. 第 175 回 東京医科大学医学会総会、2015 年 6 月 6 日 (東京)

16. 森谷昇太、車 暁芳、平本正樹、宮澤啓介、小松誠一郎、山崎佳穂、河合優佑、國場寛子、稲津正人、後藤明彦、半田 宏: Targeting aggresome formation under simultaneous inhibition of proteasome and

autophagy potentiates ER-stress mediated cell death in myeloma cells. 第 173 回東京医科大学医学会総会、2014 年 6 月 7 日 (東京)

17. 宮澤啓介: (特別講演)「ビタミン K2 の抗腫瘍効果とその臨床応用への可能性」. 第 25 回日本産婦人科学会・新生児血液学会学術集会サテライトシンポジウム 2015 年 6 月 5 日 (東京)

〔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:  
取得年月日:  
国内外の別:

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

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者  
宮澤 啓介 (MIYAZAWA, Keisuke)  
東京医科大学・医学部・主任教授  
研究者番号: 50209897

(2) 研究分担者  
平本 正樹 (HIRAMOTO, Masaki)  
東京医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 70297828

(3) 連携研究者  
半田 宏 (HANDA, Hiroshi)  
東京医科大学・医学部・特任教授  
研究者番号: 80107432

(4) 研究協力者 -