

別紙1

厚生労働科学研究費補助金

平成24年度 疾病・障害対策研究分野

第3次対がん総合戦略研究

オートファジー活性を指標とした癌個別化医療  
の分子基盤に関する研究

平成24年度 総括研究報告書

研究代表者 井上 純

平成25（2013）年 5月

## 目次

### I. 総括研究報告書（別紙3）-----1~5

オートファジー活性を指標とした癌個別化医療の分子基盤に関する研究

研究代表者：井上 純

研究分担者：稲澤 譲治

分担研究報告書（別紙4）：該当なし

刊行に関する一覧表（別紙5）：該当なし

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業）

総括研究報告書

オートファジー活性を指標とした癌個別化医療の分子基盤に関する研究

研究代表者：井上 純 東京医科歯科大学難治疾患研究所分子細胞遺伝学 助教

研究分担者：稲澤譲治 東京医科歯科大学難治疾患研究所分子細胞遺伝学 教授

研究要旨

オートファジーは、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輸送経路である。この経路は、癌微小環境での栄養ストレスや放射線・抗がん剤処理による細胞ストレスにより活性化され、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・タンパク質）の排除を行うことで、癌細胞の細胞生存システムとして機能すると考えられている。この考えに基づき、様々な癌種を対象として、抗がん剤投与の際に、オートファジーを阻害することのできるクロロキン（抗マラリア薬）を併用投与する臨床治験が盛んに行われている。その一方で、非ストレス下でもオートファジーは常に低いレベルで機能しており、オートファジー関連遺伝子（Atg5またはAtg7）を人為的に破壊したマウスでは、肝臓腫瘍が発生する事が報告されている。また、最近我々は、実際のヒト癌細胞株および食道癌臨床検体において、オートファジー関連遺伝子（LC3Av1およびATG7）が不活性化していることを同定した。これらの所見は、ヒト癌の中には、オートファジーに依存して細胞生存する癌（Autophagy-Addicted cancer; AA癌）だけでなく、不可逆的なオートファジー障害を受けた癌（Autophagy-Impaired cancer; AI癌）も存在する可能性を示唆している。当然ながらAI癌に対しては、オートファジー阻害剤の効果は期待できない。

そこで、本研究（24-25年度）では、AA癌およびAI癌細胞株を同定および作製し、それらの細胞間における細胞特性の差異を見出す事により、オートファジー活性測定法の確立およびAI癌における細胞生存システムの解明・標的分子の同定を目的とした。このようにして、オートファジー活性を指標とした癌個別化医療の分子基盤を構築することを目指している。

24年度では、オートファジー関連遺伝子が不活性化している細胞株（AI癌細胞株）とオートファジーが正常に機能する細胞株（AA癌細胞株）を樹立・同定してきた。さらに、分泌物質、遺伝子発現、細胞内代謝産物に着目して、AA癌とAI癌細胞株間で生物学的特性の相違を見出すことで、オートファジー活性を測定するための有用なマーカーの同定を試みた（エキソソーム中のmiRNA）。また、AI癌で活性化している第2の細胞生存システム・標的分子を特定することを目的として、低分子化合物スクリーニングを行い、いくつかの候補化合物を特定した。

次年度（25年度）では、引き続き、オートファジー活性を測定するための有用なマーカーを同定するために、特に分泌物質（エキソソーム中のmiRNA）に重点を置いて、研究を行っていく。そして、得られた候補マーカーに関して、様々な癌細胞株（特に今後増加が予想され、効果的な診断治療法の確立が急がれる中皮腫、および難治性の高い肺がん、膵癌、食道癌）および癌臨床検体（血清または組織標本）を用いて、AA癌とAI癌を識別するマーカーの検証を行うことで、現実的かつ簡便なオートファジー活性の測定法を確立する。また、他の化合物ライブラリーを対象として、引き続き、AI癌に特異効果を示す化合物のスクリーニングを行っていくと共に、24年度で特定した候補化合物に関しては、AI癌細胞株を用いた *in vitro*・*in vivo* での検証実験を行っていく。

研究分担者	氏名	所属機関	職名
	稲澤譲治	東京医科歯科大学 所分子細胞遺伝学	難治疾患研究 教授

## A. 研究目的

### <研究背景>

オートファジーは、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輸送経路である。この経路は、癌微小環境での栄養ストレスや放射線・抗がん剤処理による細胞ストレスにより活性化され、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・タンパク質）の排除を行うことで、癌細胞の細胞生存システムとして機能すると考えられている。この考えに基づき、様々な癌種を対象として、抗がん剤投与の際に、オートファジーを阻害することのできるクロロキン（抗マラリア薬）を併用投与する臨床治験が盛んに行われている。

その一方で、非ストレス下でもオートファジーは常に低いレベルで機能しており、オートファジー関連遺伝子（*Atg5* または *Atg7*）を人為的に破壊したマウスでは、肝臓腫瘍が発生する事が報告されている。また、最近我々は、実際のヒト癌細胞株および食道癌臨床検体において、オートファジー関連遺伝子（*LC3Av1* および *ATG7*）が不活性化していることを同定した。これらの所見は、ヒト癌の中には、オートファジーに依存して細胞生存する癌（Autophagy-Addicted cancer; AA 癌）だけでなく、不可逆的なオートファジー障害を受けた癌（Autophagy-Impaired cancer; AI

癌）も存在する可能性を示唆している。当然ながら AI 癌に対しては、オートファジー阻害剤の効果は期待できない。

そこで、我々は、癌治療または上記のオートファジー阻害剤を用いる際、予め各癌のオートファジー活性を把握することが重要であり、そのための分子マーカーを特定することが必要であると考えた。また、AI 癌の悪性化においては、オートファジー以外の第2の細胞生存システムが活性化している可能性があるため、そのシステム関連分子を治療標的とする、いわゆる“細胞生存の **Synthetic lethality**”を利用した治療戦略が有用であると考えた。

24年度では、AA 癌および AI 癌細胞株を同定および作製し、それらの細胞間における細胞特性の差異を見出す事により、オートファジー活性測定法の確立および AI 癌における細胞生存システムの解明・標的分子の同定を目的とした。このようにして、オートファジー活性を指標とした癌個別化医療の分子基盤を構築することを目指している（図1）。

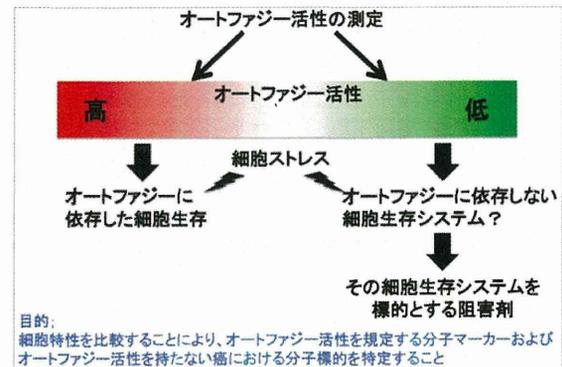


図1 本研究の目的

## B. 研究方法

固定された臨床検体において、オートファジー活性を測定する方法は確立されてい

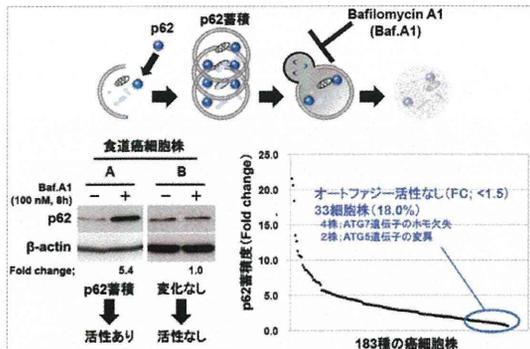


図2 p62 レベルを指標とした癌細胞株におけるオートファジー活性の測定

ない。一方、培養細胞において、オートファジー経路を阻害する事ができる **Bafilomycin A1 (Baf.A1)** で処理した際、オートファジー分解の基質である **p62** タンパク質量の増加率をウェスタンブロットで調べる事により、オートファジー活性を把握する事が出来る (図2)。すなわち、オートファジー活性を有する細胞株では、**Baf.A1** 処理後、**p62** タンパク質量が増加するが、**AI** 癌細胞株では、その増加は見られない。

### C. 研究結果

そこで、様々な組織由来の癌細胞株におけるオートファジー活性を調べた結果、**183** 細胞株中 **33** 株 (**18.0%**) は、オートファジー障害を持つ **AI** 癌細胞である可能性が示唆された (**Baf.A1** 処理時の **p62** タンパク質量の増加率が **1.5** 倍未満) (図2)。これらの細胞株のうち、**4** 細胞株では、**ATG7** 遺伝子がホモ欠失により不活性化している事を同定した。また **2** 細胞株では、オートファジー関連遺伝子である **ATG5** 遺伝子がエキソン-イントロン境界部位の変異により不活性化している事を同定した (エキソンスキップ)。さらに、これらの細胞株における、**ATG7** または **ATG5** の各々の安定発現細胞では、オートファジー分解の基質である **p62** タンパク質量の減少および電子顕微鏡観察におけるオートファジー小胞の出現を認めた。このことは、これらの遺伝子導入

により、オートファジー機能が回復した事を示している。以上の結果は、ヒト癌細胞株の中には **AI** 癌が存在すること、さらに、その一部は、オートファジー関連遺伝子のゲノム一次構造異常に起因する事が分かった。

このように、**AA** 癌細胞と **AI** 癌細胞を同定および作製した。現在、これらの細胞間で差のある遺伝子発現パターン、分泌物質 (エキソソーム内物質、サイトカイン) の同定、および **AI** 癌細胞に対して特異的な効果を示す低分子化合物を探索している。

### D. 考察

< 24年度研究成果の意義 >

癌の臨床サンプルを用いて、オートファジー活性を測定する方法は確立されていないため、実際のヒト癌において、本当にオートファジーが活性化しているのか、あるいはオートファジー障害を持つ癌があるのかは、よく分かっていない。今回、我々の細胞株レベルでの解析により、ヒト癌細胞株 **183** 株中 **33** 株 (**18.0%**) では、オートファジーが障害されている事が分かった。そのうち、**ATG5** または **ATG7** 遺伝子の異常が同定された **6** 株以外の株では、他のオートファジー関連遺伝子のどこかに異常がある可能性が考えられる (オートファジー関連遺伝子は **30** 種類以上存在すると言われている)。

< 25年度研究への発展性 >

これまで、**AA** 癌細胞株と **AI** 癌細胞株を同定・作製してきた。これらの細胞は、オートファジー活性を測定するための分子マーカー群の特定に有用であると考えられる。また、**AI** 癌では、微小環境・細胞ストレス下での癌細胞の生存において、オートファジー以外の細胞生存システムに依存していると考えられる。従って、**AI** 癌細胞の特性を理解する事は、そのような第2の細胞生存システムを治療標的とする、**Synthetic lethality** を利用した治療戦略の確立に繋が

と思われる。

これらの研究は、オートファジー活性を指標とした癌個別化医療の分子基盤を構築することのみならず、癌の発生・進展におけるオートファジー障害の意義およびオートファジー活性から見る癌の heterogeneity の理解にも繋がると考えている。

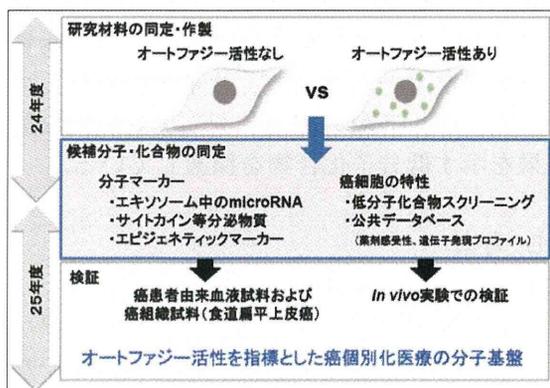


図3 25年度研究への発展性

## E. 結論

我々の細胞株レベルでの解析により、ヒト癌細胞株 183 株中 33 株 (18.0%) では、オートファジーが障害されている事が明らかになった。これらの同定・作製した AA 癌細胞株と AI 癌細胞株は、オートファジー活性を測定するための分子マーカー群の特定およびオートファジー活性を指標とした癌個別化医療の分子基盤の構築のための有用な資材となる可能性が考えられた。

## F. 健康危機情報

特記事項なし

## G. 研究発表

### 1. 発表論文

本研究に関連する発表論文なし

### 2. 学会発表

(1) 井上純、稲澤讓治：ヒト癌におけるオートファジー関連遺伝子の異常. 第71回日本癌学会学術総会. さっぽろ芸文館. 北海道. 2012年9月19日

(2) 山本信祐、井上純、小村健、小崎健一、稲澤讓治：NRF2 pathway を負に制御する microRNA の同定. 第71回日本癌学会学術総会. さっぽろ芸文館. 北海道. 2012年9月20日

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特許申請；1件

発明の名称：マイクロRNAの測定方法、並びに、がん治療剤及びこれを含むがん治療のための医薬組成物

出願番号：特願2013-027399

出願日：2013/02/15

公開番号：未公開

発明者：稲澤讓治、井上純、山本信祐、河野辰幸、小崎健一 (敬称略)

出願人：国立大学法人東京医科歯科大学

## I. 倫理面への配慮

採取された癌組織を用いた研究を行うにあたり、東京医科歯科大学倫理委員会において既に承認を得ている (承認番号：#2010-5-2)。

