

201318062B

別紙1

厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略研究事業

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24～25年度 総合研究報告書

研究代表者 井上 純

平成26（2014）年 5月

別紙2

目次

I. 総合研究報告書（別紙3） -----1~ 8

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

II. 刊行に関する一覧表（別紙5） ----- 9

別紙 3

厚生労働科学研究費補助金（第 3 次対がん総合戦略研究事業） 総合研究報告書

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。がんにおけるオートファジーの役割には、2面性があることが知られている。すなわち、オートファジーは、癌微小環境での栄養ストレスや治療による細胞毒性ストレスに対する細胞生存システムとして、癌の悪性進展に寄与する。その一方で、細胞内の異常オルガネラや基質タンパク質 **p62/SQSTM1** を除去することで腫瘍の発生を抑制する。そのような背景の中、本研究（24－25年度）では、オートファジー活性を持つ癌および持たない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オートファジー障害を持つ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て研究を行った。

本研究課題の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オートファジー障害を持つ癌細胞株とオートファジーが正常に機能する細胞株を樹立・同定してきた。そして、25年度では、オートファジー障害を持つ癌における細胞生存システムの解明・治療標的分子の同定およびオートファジー活性測定法の確立のための分子基盤を構築する事を目的として、オートファジー障害を持つ癌細胞で活性化している転写因子 **NRF2** を標的とするマイクロRNA、およびオートファジー障害を持つ癌細胞で高感受性を示す低分子化合物を同定した。さらに、オートファジー活性測定法の確立の分子基盤を構築する事を目的として、ヒト癌臨床検体において、オートファジー関連遺伝子の遺伝子異常、分解基質 **p62/SQSTM1** タンパク質の高発現の頻度を調べた。

このように、本研究成果により、ヒト癌の中には、遺伝子異常によってオートファジー活性がない癌があること、そして、オートファジー活性がないことによる“弱点”を標的とする新たな治療法の分子基盤、および **p62/SQSTM1** の発現様式は、ヒト癌におけるオートファジー活性の評価方法の1つの候補となることを明らかにした。これらの成果は、オートファジー活性を指標とした癌の個別化医療のための分子基盤になることが期待される。

A. 研究目的

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

<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。

そのような背景の中、本研究（24-25年度）では、オートファジー活性を持つ癌および持たない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オートファジー障害を持つ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て研究を行った。

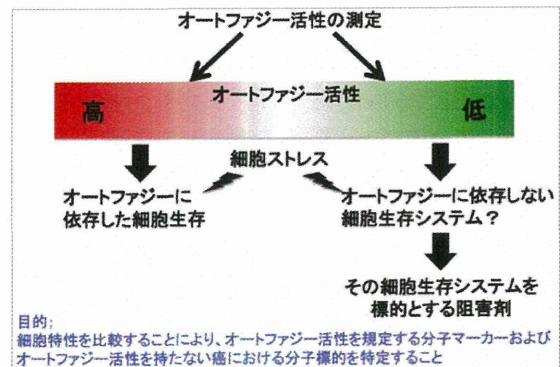


図1 本研究の目的

B. 研究方法

(1) ヒト癌細胞株におけるオートファジー活性の測定

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。

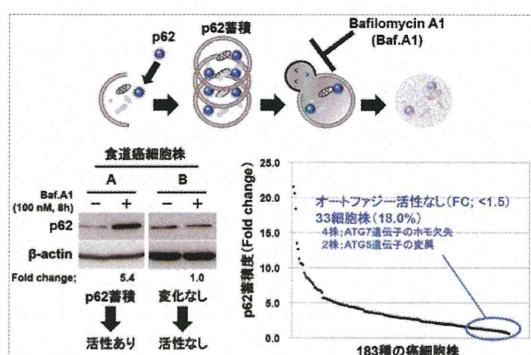


図2 p62 レベルを指標とした癌細胞株におけるオートファジー活性の測定

(2) オートファジー障害を持つ癌細胞に対する治療標的の分子基盤

① NRF2 を標的とするマイクロ RNA の同定

NRF2 の標的配列の下流にルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだレポーターシステムを構築した。このシステムを用いたレポーターアッセイにより、470種のマイクロRNAライブラリーから、NRF2の発現を負に制御するマイクロRNAを同定した。候補マイクロRNAに関して、複数種類の癌細胞株を用いて、それらのマイクロRNAの導入は、NRF2の発現を減弱することをレポーターアッセイおよびウェスタンブロットで確認した。さらに、マウス担がんモデルを用いた治療実験により、アテロコラーゲンを用いたマイクロRNAの腫瘍へ

の注入による腫瘍増殖の抑制効果およびシスプラチンの抗腫瘍併用効果を評価した。

② オートファジー障害を持つ癌細胞で高感受性を示す低分子化合物の同定
オートファジー関連遺伝子である **ATG7** を消失した細胞とその細胞に **ATG7** を遺伝子導入し、オートファジーを回復させた細胞のペアを用いた。化合物ライブラリーのスクリーニングにおいて、クリスタルバイオレット染色による細胞生存アッセイにより評価を行った。

(3) ヒト癌におけるオートファジー活性の評価方法の確立のための分子基盤

① オートファジー関連遺伝子の遺伝子異常の検出

The Cancer Genome Atlas (TCGA) に登録されている 178 例の肺扁平上皮癌臨床検体におけるオートファジー関連遺伝子 (17 種) の遺伝子変異の有無を検討した。ATG7 遺伝子に関して、ATG7 の変異体の発現プラスミドを作成し、ATG7 欠失細胞に導入し、オートファジー活性回復の有無を LC3B-II の発現量をウェスタンブロットで評価することにより行った。

② オートファジー分解基質

p62/SQSTM1 タンパク質の発現解析
様々な癌種由来の臨床検体 (1258 例) を用いた免疫組織染色法により、p62 のタンパク質の発現レベルを調べた。癌組織中の 10% 以上の癌細胞において、発現が認められた場合、陽性と判定した。

(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、「ヒトゲノム・遺伝子研究に関する倫理指針」に従い、倫

理面に十分配慮して研究を進めた。
(東京医科歯科大学倫理委員会・承認番号：#2010-5-2)。

実験動物を使用するにあたり、動物愛護の原則(3R)を厳守して研究を行った。(東京医科歯科大学実験動物委員会・承認番号：0130186A)。

遺伝子組み換え実験を行うにあたり、「遺伝子組み換え生物等の使用等の規則による生物の多様性の確保に関する法律施行規則」に従い、研究を行った(東京医科歯科大学の組み換えDNA実験委員会・承認番号：2011-024C2)。

C. 研究結果

(1) ヒト癌細胞株におけるオートファジー活性の測定

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。

(2) オートファジー障害を持つ癌細胞に対する治療標的の分子基盤

① NRF2 を標的とするマイクロRNAの同定

オートファジー障害は、オートファジー分解の基質であるp62/SQSTM1タンパク質の蓄積を介して、酸化ストレスおよび抗がん剤に対する細胞生存に寄与する転写因子NRF2の活性化に繋がることが知られている。一方、マイクロRNAは、機能性小分子RNAの1つであり、標的分子の発現を負に制御することが知られている。近年、マイクロRNAを用いた核酸創薬が盛んに試みられている。

そこで、470種のマイクロRNAライブラリーから、NRF2の発現を負に制御するマイクロRNAの同定を試みた。その結果、4種のマイクロRNA(miR-507, -634, -450a, 129-5p)がNRF2の発現を直接的に負に制御していることを同定した。NRF2は、それ自身の機能亢進型の遺伝子変異によっても活性化することが知られている。オートファジー障害を持つ癌細胞株を含め、そのようなNRF2が恒常的に活性化している癌細胞では、これらのマイクロRNA導入により、酸化ストレス、抗がん剤に対する感受性が増加した。さらに、マウス皮下に形成させた腫瘍へのmiR-507の導入は、*in vivo*での細胞増殖を抑制した。

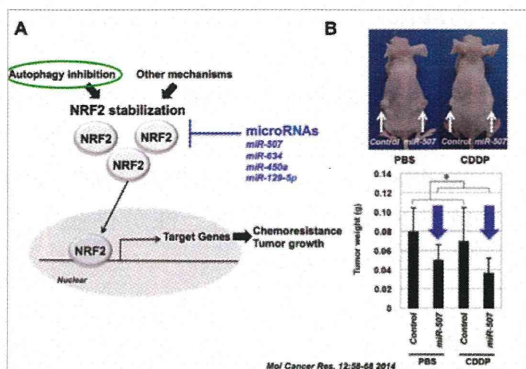


図3 NRF2を標的とするマイクロRNAの同定

A: 癌における NRF2 の活性化には、オートファジー障害が寄与することが知られている。NRF2 を直接的に負に発現制御する 4 種のマイクロRNA を同定した。

B: NRF2 が活性化した A549 細胞を用いたマウス担がんモデルにおいて、マイクロRNA-507 の導入による腫瘍抑制効果

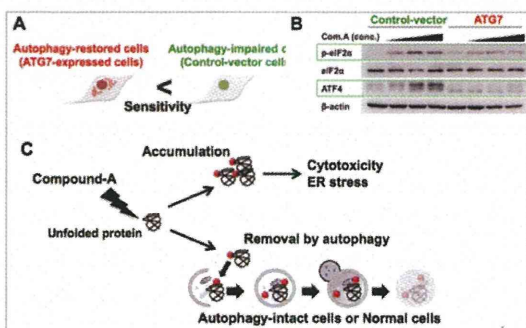


図4 オートファジー障害を持つ癌細胞で高感受性を示す低分子化合物の同定

A: ATG7 遺伝子を欠失したオートファジー活性を持たない細胞 (赤) と ATG7 遺伝子導入によりオートファジー活性を回復させた細胞 A: ATG7 遺伝子を欠失したオートファジー活性を持たない細胞 (赤) と ATG7 遺伝子導入によりオートファジー活性を回復させた細胞 (緑) の細胞ペアを用いて、スクリーニングを行った。

B: 候補化合物 A の処理後のウェスタンブロー

ット解析 (ER ストレスマーカー)

C: 推測されたモデル図

オートファジー活性を持つ癌細胞および正常細胞では、ER ストレスを惹起する化合物処理に対して耐性であるが、オートファジー障害を持つ癌細胞では、unfolded タンパク質を処理できないため、高い感受性を示すことが推測された。

② オートファジー障害を持つ癌細胞で高感受性を示す低分子化合物の同定
オートファジー活性を持つ細胞と持たない細胞の Isogenic 細胞ペアを用いて、低分子化合物ライブラリーのスクリーニングを行った結果、オートファジー障害を持つ癌細胞において、顕著に高い感受性を示す 3 種の化合物を同定した。これら化合物は、オートファジー活性を持つ細胞では、オートファジー機能が顕著に亢進する一方で、オートファジー障害を持つ癌細胞では、ER ストレスが惹起されていた

(2) ヒト癌におけるオートファジー活性の評価方法の確立のための分子基盤

① オートファジー関連遺伝子の遺伝子異常の検出

The Cancer Genome Atlas (TCGA) に登録されている 178 例の肺扁平上皮癌臨床検体におけるオートファジー関連遺伝子 (17 種) の遺伝子変異を検討した結果、178 例中 54 例 (30.2%) の検体において、オートファジー関連遺伝子のいずれかに遺伝子変異が起きていた。また、遺伝子変異の機能解析により、ATG7 遺伝子に関して、178 例中 4 例 (2.2%) の検体において、機能消失型の遺伝子変異であることが分かった。

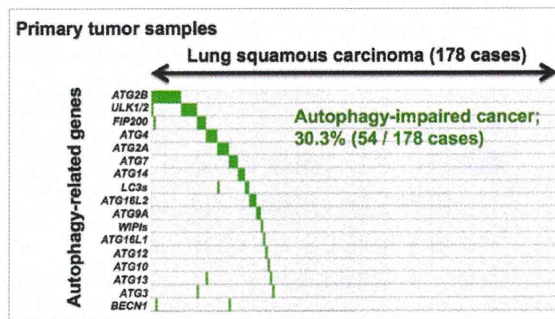


図5 オートファジー関連遺伝子の遺伝子変異の頻度

17種類のオートファジー関連遺伝子について、TCGAデータベースに登録されている肺扁平上皮癌178例における変異の存在を緑色で示す。

② オートファジー分解基質

p62/SQSTM1タンパク質の発現解析
 オートファジー障害を持つ癌細胞は、必ずその分解基質であるp62/SQSTM1タンパク質が蓄積して

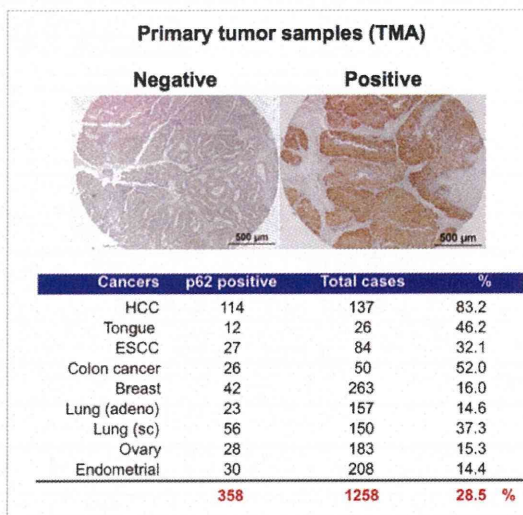


図6 癌組織における免疫組織染色によるp62の発現解析

写真は、子宮体がんの染色例を示す。表は、各組織におけるp62の陽性頻度を示す。

いる。従って、様々な癌種由来の臨床検体を用いた免疫組織染色を行っ

た結果、1258例中358例(28.4%)の検体において、p62/SQSTM1タンパク質の高発現が認められた。そして、その頻度は、癌種により異なる事(肝臓癌:83.2%~子宮体癌:14.4%)、およびp62/SQSTM1の染色パターンには不均一性が存在することが分かった。

D. 考察

<研究成果の意義>

(1) ヒト癌細胞株におけるオートファジー活性の測定

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)。

(2) オートファジー障害を持つ癌細胞に対する治療標的の分子基盤

① NRF2を標的とするマイクロRNAの同定

オートファジー障害は、細胞生存に寄与する転写因子NRF2の恒常的活性化に繋がる。そんな中、本研究において、NRF2を直接的に標的とする4種のマイクロRNAを同定した。有用なデリバリーシステムの構築が必須ではあるが、本研究成果は、将来的にオートファジー障害を持つ癌を含め、NRF2が活性化した癌に対

する治療戦略を考える上で重要な分子基盤になると考えられた。現在、様々なマウス担癌モデルを用いて、マイクロ RNA 導入による治療実験評価を行っている。

- ② オートファジー障害を持つ癌細胞で高感受性を示す低分子化合物の同定

Unfolded protein の一部は、p62/SQSTM1 を介して、オートファジー分解される。もし、このシステムが破綻した場合、Unfolded protein が蓄積し、ER ストレスが惹起される。従って、オートファジー活性がない癌細胞に対して、人為的に Unfolded protein の蓄積・ER ストレスを促すことは、理にかなった治療戦略になると考えられる。さらに、オートファジー活性を持つ正常細胞では、Unfolded protein は速やかにオートファジー分解されるため、副作用が少ないことも推測される。現在、様々なマウス担癌モデルを用いて、これらの化合物投与による治療実験評価を行っている。

- (3) ヒト癌におけるオートファジー活性の評価方法の確立のための分子基盤

最初に、TCGA データベースおよび遺伝子変異の機能解析の結果、低頻度ではあるが、実際のヒト癌組織において、オートファジー関連遺伝子の異常を伴ったオートファジー障害が起きている事が示唆された。また、p62/SQSTM1 タンパク質の蓄積は、オートファジー障害の1つの分子マーカーとして考えられている。本研究での免疫組織染色による発現解析の結果から、多く見積もって約 28% の検体において、オートファジー障害が起きていることが推測された。

しかしながら、p62/SQSTM1 遺伝

子は、ヒト癌組織において、転写レベルでも活性化することが知られているため、p62/SQSTM1 タンパク質の蓄積が本当にオートファジー障害の有用な分子マーカーになるかどうか、さらなる検討が必要である。具体的には、現在、食道癌を対象とし、同一検体において、オートファジー関連遺伝子のゲノム構造異常、p62/SQSTM1 の RNA およびタンパク質レベルの対応した情報をそれぞれ取得し、多数検体において統合的に評価検討することを試みている。

<今後の発展性>

オートファジー障害を持つ癌細胞は、p62/SQSTM1 の蓄積を介して、NRF2 を含めた様々な“Oncogenic signal”を活性化すると考えられている。しかしながら、このようなオートファジー活性がない癌細胞に対しては、ER ストレスの誘導あるいは活性化した NRF2 を標的とすることが有用な治療戦略になる可能性が示唆された。このように、本研究成果は、オートファジー活性がないことによる“弱点”を標的とする新たな治療法の確立のための分子基盤になることが期待される。

p62/SQSTM1 の発現様式は、ヒト癌におけるオートファジー活性の評価方法の1つの候補である。本研究により、今後さらなる統合的な評価検討が必要であることが明確となった。また、オートファジー障害を持つ癌細胞において、特異的な遺伝子発現プロファイルおよび特異的に分泌されるエクソソーム内物質を見出してきた。それらの因子における有用性を評価していくことにより、新たなオートファジー活性の評価方法の確立に繋がることも期待される。

E. 結論

本研究成果により、ヒト癌の中には、

遺伝子異常によってオートファジー活性がない癌があること、そして、オートファジー活性がないことによる“弱点”を標的とする新たな治療法の分子基盤、および p62/SQSTM1 の発現様式は、ヒト癌におけるオートファジー活性の評価方法の1つの候補となることを明らかにした。これらの成果は、オートファジー活性を指標とした癌の個別化医療のための分子基盤になることが期待される。

F. 研究発表

1. 発表論文

Yamamoto S, Inoue J, Kawano T, Kozaki KI, Omura K, Inazawa J. The Impact of miRNA-based Molecular Diagnostics and Treatment of NRF2-stabilized Tumors. Mol Cancer Res 12:58-68 2014.

2. 学会発表

(1) 井上純、稲澤譲治：癌治療におけるオートファジー活性の評価. 第72回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜. 2013年10月3日

(2) 岩館怜子、井上純、青木大輔、稲澤譲治：オートファジー障害を持つ癌細胞における化合物スクリーニング 第72回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜. 2013年10月3日

(3) 山本信祐、井上純、河野辰幸、小村健、小崎健一、稲澤譲治：NRF2 活性化癌に対する MicroRNA を基盤とした診断・治療 第72回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜. 2013年10月4日

(4) ヌイラン ミシェル、井上純、河野辰幸、稲澤譲治：食道癌における LPTM5 遺

伝子の発現低下 第72回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜. 2013年10月4日

(5) 藤原直人、井上純、河野辰幸、小崎健一、稲澤譲治：複数癌種における MicroRNA-634 による細胞死誘導機構 第72回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜. 2013年10月5日

G. 知的財産権の出願・登録状況

特許申請；1件

<特許出願>

発明名称：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

願番：特願2013-027399(P12-029)

出願日：2013/02/15

発明者：稲澤譲治、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

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Yamamoto S, Inoue J, Kawano T, Kozaki KI, Omura K, Inazawa J.	The Impact of miRNA-based Molecular Diagnostics and Treatment of NRF2-stabilized	Karen E. Knudsen	Molecular Cancer Research	American Associatio n for Cancer Research	USA Philade lphia, PA 19106- 4404	2014	58-68

