

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K19349

研究課題名(和文) 温熱療法併用による癌性筋萎縮促進物質の抑制

研究課題名(英文) Inhibition of cancerous sarcopenia-promoting substances by hyperthermia

研究代表者

川原 勲 (Kawahara, Isao)

奈良県立医科大学・医学部・研究員

研究者番号：80524975

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：がん性筋障害に対する補助療法を検討した。温熱療法は壊死に伴う腫瘍からのHMGB1の放出を抑制し、骨格筋変性を抑制した。抗酸化作用を有するビタミンB2とVEは抗腫瘍効果を示したが、がん性サルコペニアはむしろ増悪した。分子標的薬スニチニブによる心筋障害に対してプレロステルベンを併用することにより、スニチニブによる心筋萎縮・線維化・筋成熟度の低下を抑制した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌性筋萎縮は癌治療の妨げとなるが、化学療法に伴う筋萎縮において壊死した癌細胞から放出されるHMGB1が重要な役割を果たしている。このHMGB1の癌細胞からの放出が温熱療法により低減されることを申請者は見出した。本研究では、癌細胞死ではなくHMGB1放出抑制を生じる温熱療法や補助療法を開発し、化学療法に併用することにより、化学療法に伴う筋萎縮を低減することを目的とする。本研究から得られる結果からは、有効性が高くなおかつ低廉な骨格筋萎縮抑制法を提示することが可能であり、がん患者のQOLや治療忍容性の向上につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：Adjuvant therapy for cancer-induced muscle damage was studied. Thermotherapy inhibited the release of HMGB1 from the tumor associated with necrosis and reduced skeletal muscle degeneration. Antioxidant vitamins B2 and VE had an antitumor effect but rather exacerbated cancer sarcopenia. Pterostilbene in combination with the molecular targeting drug sunitinib for myocardial damage prevented sunitinib-induced myocardial atrophy, fibrosis, and loss of muscle maturity.

研究分野：リハビリテーション学

キーワード：がん性サルコペニア がん性心筋障害 HMGB1 温熱療法 抗酸化性ビタミン スニチニブ プレロステルベン

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

### (1) 研究の背景

癌性骨格筋萎縮は、進行癌患者の40%に認められ (Paillaud E, J Nutr Health Aging. 2006)、患者のQOLを低下させるのみならず、治療への忍容性を低下させ治療効果を減弱する (Fearon K, Eur J Cancer. 2008, Fearon K, Nat Rev Clin Oncol. 2013)。化学療法を施行するとがん患者の骨格筋萎縮が著明に進行することは日常の診療でしばしば経験される。とくに問題となるのが、癌化学療法に伴って骨格筋萎縮が増悪し化学療法の完遂を困難にすることである (Prado CM, Clin Cancer Res. 2009)。

その原因として、申請者は癌細胞から分泌される炎症性サイトカインである HMGB1 に着目した。末期大腸癌患者の検討において、骨格筋インデックスや SDS 可溶性ミオシン軽鎖1などの臨床的・生物学的筋萎縮マーカーと血中 HMGB1 は強い相関を示した (Ohmori H, Kawahara I [共同筆頭著者], Pathobiology. 2019 in press)。HMGB1 は、RAGE や TLR4 を受容体としがん細胞においては細胞増殖・運動、血管新生、転移を促進する (Ohmori H, EOTT, 2013)。また、単球などの自然免疫系細胞に対しては活性化をもたらす半面高濃度ではアポトーシスを誘導する (Kuniyasu H, Am J Pathol. 2005, Luo Y, Eur J Cancer. 2011)。さらに HMGB1 は抗がん剤により壊死に陥った癌細胞から放出され (Luo Y, Eur J Cancer, 2013, Scaffidi P, Nature. 2002)、抗がん剤の作用から残存する癌細胞の再増殖を促進する。

一方、HMGB1 は骨格筋に対して RAGE や TLR4 を介してオートファジーを誘導し骨格筋を萎縮させる (Luo Y, Cancer Res. 2014)。化学療法を受けたがん患者に骨格筋萎縮が進行することは臨床的にしばしば経験されるが (Chemama S, Ann Surg Oncol. 2016)、この原因として化学療法に伴って放出される HMGB1 が重視される。化学療法による HMGB1 放出を抑制することが出来れば、骨格筋萎縮を惹起することなく化学療法を施行することが可能になると期待される。

がんに対する温熱療法を検討する過程で、腫瘍への温熱により骨格筋においてオートファジーが抑制されることを見出した (Kawahara I, 2019, Pathobiology)。その機序として温熱による腫瘍からの HMGB1 の放出抑制が考えられた。HMGB1 は骨格筋のオートファジーを促進し筋萎縮を惹起する (Luo Y, Cancer Res, 2014) とともに、HMGB1 は DAMP (damage-associated molecular pattern) としても知られ、担当細胞においては TLR4 を介して TNF $\alpha$  の分泌を促進することが知られている (Tsong A, J Intern Med. 2014)。心筋細胞や骨格筋細胞に対しても DAMP は TNF $\alpha$  など炎症性サイトカイン発現を誘導し、細胞を傷害し、無菌性炎症を惹起し萎縮の原因となることが示唆されている (Raucci A, Cell Mol Life Sci. 2019)。これらの知見から、HMGB1 を抑制することは、癌の進展の阻害、及び、骨格筋萎縮の抑制につながることを期待される。一方、温熱療法は温度管理あるいは温熱の投与方法の難しさからその臨床応用はごく限られている。

### (2) 研究の目的

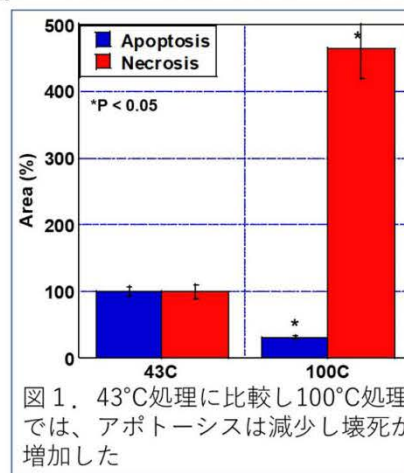
癌性骨格筋萎縮は癌治療の妨げとなるが、化学療法に伴う筋萎縮において壊死した癌細胞から放出される HMGB1 が重要な役割を果たしている。この HMGB1 の癌細胞からの放出が温熱療法により低減されることを申請者は見出した。本研究では、癌細胞死ではなく HMGB1 放出抑制を生じる温熱療法や補助療法を開発し、化学療法に併用することにより、化学療法に伴う筋萎縮を低減することを目的とする。本研究から得られる結果からは、有効性が高くなおかつ低廉な骨格筋萎縮抑制法を提示することが可能であり、がん患者の QOL や治療忍容性の向上につながると期待される。

### (3) 研究方法

Fe-Al 合金を用いた温熱療法をマウス CT26 大腸癌細胞を用いた皮下腫瘍に対して施行し、43°C と 100°C における効果を比較した。HMGB1 を抑制する方法として抗酸化作用を有する VB2 と VE を用いて、マウス皮下腫瘍・腹膜播種モデルにおける効果を検討した。分子標的薬であるスニチニブ (Sun) による心筋障害に対するプテロスチルベン (PTE) の効果を MKN74 ヒト胃癌細胞ヌードマウス皮下腫瘍モデルで検討した。

### (4) 結果

がん細胞に壊死を誘発する抗がん剤は、細胞壊死時に



HMGB1の放出を促進する。HMGB1は骨格筋にオートファジーを誘発し、筋萎縮を引き起こす。磁気温熱療法(MHT)により、CT26マウス大腸癌細胞を移植したマウス皮下腫瘍を43°Cで加熱することにより腫瘍細胞にアポトーシスを誘発した。対照的に、100°C加熱により腫瘍細胞に壊死が誘発された(図1)。

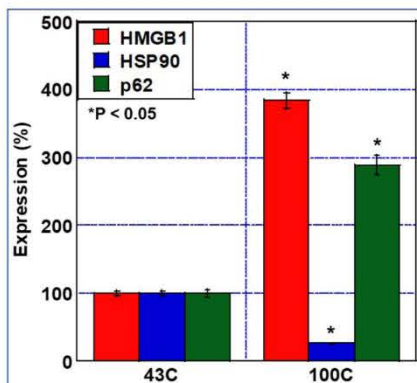


図3. 43°C処理に比較し100°C処理では、骨格筋においてHMGB1発現増加、HSP90発現低下とオートファジーの亢進が認められた

対しては抗腫瘍効果・抗幹細胞効果を示すとともに、骨格筋の萎縮を軽減することを示唆している。

このように、HMGB1の抑制ががんに対する温熱療法において標的となっており、その分泌抑制ががん性サルコペニアの抑制につながっていることが明らかになった。HMGB1分泌を抑制する目的で抗酸化作用を有するビタミンのがん性悪液質に対する効果を検討した。われわれは、抗酸化作用の知られるビタミンB2(VB2)とビタミンE(VE)のがん性サルコペニアに対する作用を、マウス悪液質モデルを用いて検討した。マウス大腸癌細胞CT26をVB2・VEで処理すると、エネルギー産生・酸化ストレスはVB2では増加しVEでは低下した。増殖は両者とも抑制したが幹細胞性は亢進した。一方、マウス筋芽細胞C2C12を処理すると、エネルギー産生・酸化ストレスはVB2では軽度増加しVEでは軽度低下した。増殖および筋分化・成熟度は両者ともに低下した。マウス悪液質モデルでは、腫瘍増殖は両者ともに抑制されたが、筋萎縮・成熟度の低下は両者ともに増悪した(図4)。

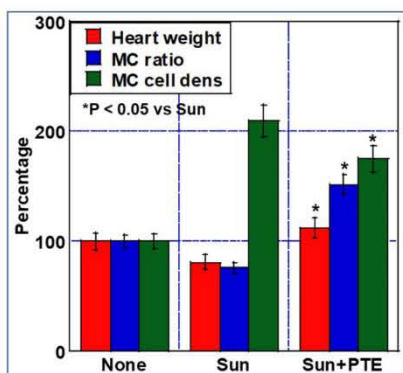


図5. 43°C処理に比較し100°C処理では、骨格筋においてHMGB1発現増加、HSP90発現低下とオートファジーの亢進が認められた

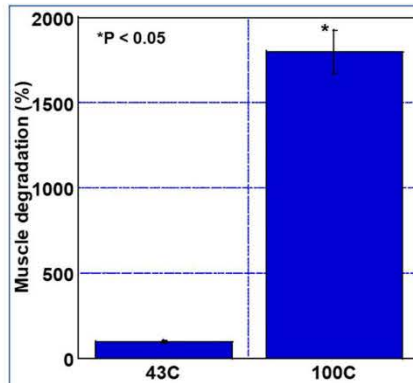


図2. 43°C処理に比較し100°C処理では、著明な腫瘍周囲の骨格筋障害が惹起された

する腫瘍細胞の幹細胞性は変化しなかったが、43°C加熱では幹細胞性は低下していた。腫瘍を取り巻く骨格筋について検討を行うと、100°C加熱では骨格筋に顕著なオートファジー、ミオシン重鎖の減少、および高血清HMGB1を誘発した(図2)。これに対し、43°C加熱ではHSP90の発現が亢進し、オートファジーの誘導は認められず、血清HMGB1濃度も低値であった(図3)。これらの所見は、43°C加熱による腫瘍の局所治療が、腫瘍に

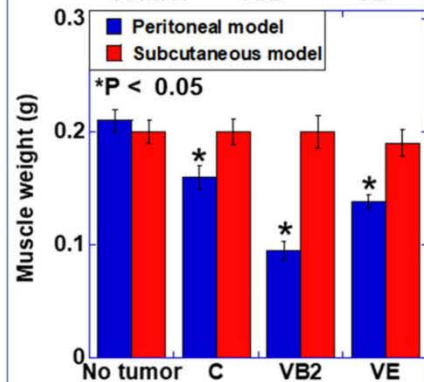
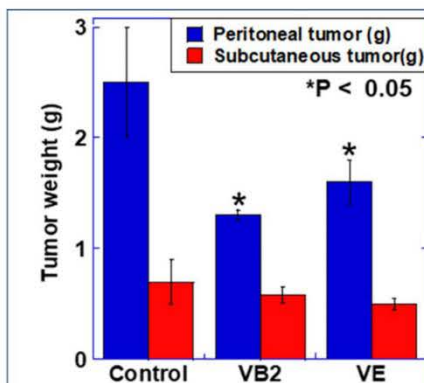


図4. VB2・VEともに、腫瘍増殖を抑制したが、骨格筋重量はむしろ増悪した

また、血中HMGB1レベルも低下しなかった。このように、VB2・VEは、抗腫瘍効果は示したものの、筋萎縮抑制効果は確認できなかった。この背景には、VB2・VEによる抗腫瘍効果による腫瘍細胞壊死によりHMGB1が死細胞から放出され、それがサルコペニアを促進することになったと考えられた。

がん患者における心機能障害はがん患者の死因では第2位とされている。その原因として化学療法剤や分子標的薬の心毒性が重視されている。今回、チロシンキナーゼ阻害剤であるスニチニブ(SUN)とフェロトーシス

促進が示唆されるプレロステルベン (PTE) の併用が心筋に及ぼす影響を検討した。ヒト胃癌細胞株 MKN74 を用いヌードマウス皮下腫瘍モデルを作製した。心筋の評価は HE 染色にて心筋細胞密度、左室断面積から心筋萎縮を検索した。結果は、心重量は両細胞株とも SUN 投与で減少がみられ PTE の併用で改善した。左室断面積、心筋細胞密度とも PTE の併用で改善しており心筋萎縮の予防効果がみられた(図 5)。さらに、PTE を併用することにより SUN により増加した心筋線維化が抑制され、低下した筋成熟マーカーの SDS 可溶性ミオシン軽鎖 1 (SDS-MYL1) の改善が認められた(図 6)。SUN に対する PTE の併用による心筋障害抑制効果は、PTE による心筋に対する直接効果とともに併用による抗腫瘍効果の促進が考えられた。一方で、PTE 投与群では大腿四頭筋重量の低下は有意に改善されなかった。これらのことから、PTE の筋障害抑制作用機序には組織特異性が存在する可能性が示唆された。

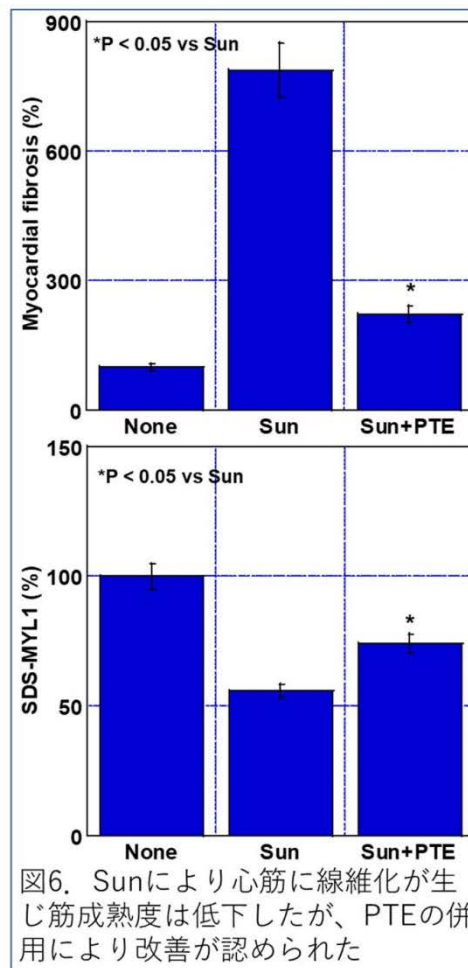


図6. Sunにより心筋に線維化が生じ筋成熟度は低下したが、PTEの併用により改善が認められた

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K11260

研究課題名(和文) がん性心筋障害の原因としてのミトコンドリアDNAの解析

研究課題名(英文) Analysis of mitochondrial DNA as a cause of cancer-derived myocardial damage

研究代表者

大森 斉 (Ohmori, Hitoshi)

奈良県立医科大学・医学部・研究員

研究者番号：80213875

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアDNAの中でもコンプレックスVの断片がラット心筋芽細胞に増殖抑制を示した。さらに、コンプレックスVの遺伝子配列の中にCovid-19と相同性を有するフラグメントが存在することを見出した。このフラグメントは2本鎖DNAの状態、HMGB1発現誘導、酸化ストレス誘導とATP産生の低下をもたらし細胞機能を障害した。さらに、このフラグメントはラットがん性悪液質モデルの血中に検出された。これらことから、このCovid-19相同性ミトコンドリアDNA断片が、がん性悪液質における心筋障害に重要な役割を果たすことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん患者における心筋障害は、患者予後を増悪する重要な因子であったが、その発生機序は不明な点が多かった。本研究では、ミトコンドリアDNAの中でもコンプレックスVに存在するCovid-19と相同性を有する配列が、心筋障害に有用な役割を果たすことを見出した。この結果は、がん性悪液質のみならず、コロナ感染症やその他のDAMPに関連する心筋障害において、診断や治療の標的となる物質の同定の可能性を示唆するもので、その意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Among the mitochondrial DNA, a fragment of Complex V showed growth inhibition in rat cardiomyoblasts. Furthermore, we found a fragment with homology to Covid-19 in the Complex V gene sequence. This fragment, in the form of double-stranded DNA, impaired cellular function by inducing HMGB1 expression, oxidative stress and decreased ATP production. Furthermore, this fragment was detected in the blood of a rat model of cancer cachexia. These findings suggest that this Covid-19 homologous mitochondrial DNA fragment plays an important role in myocardial damage in cancer cachexia.

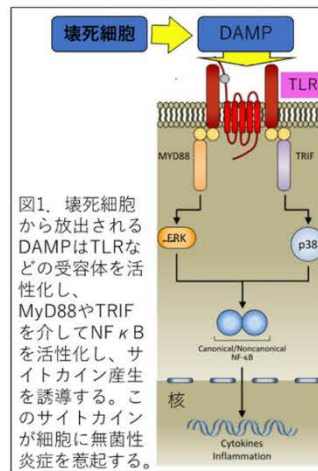
研究分野：病理学

キーワード：がん性心筋障害 DAMP ミトコンドリアDNA Covid-19 HMGB1

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

がん患者における心機能障害が高頻度に見られることが明らかとなり、心血管障害はがん死に次ぐがん患者の死因となっている (Lenneman CG, et al. Circ Res. 2016)。がん患者における心血管障害の原因として抗がん剤などの抗腫瘍治療の副作用が重視されてきた (Perez IE, Clin Med Insights Cardiol. 2019)。一方、最近、がんに伴う血中の damage-associated molecular pattern (DAMP) による無菌性心筋炎の存在が注目されている (Cui J, Hum Vaccin Immunother. 2014)。DAMP は危険関連分子パターン、危険信号やアラームとも呼ばれ、非感染性炎症反応を惹起し持続させる宿主生体分子とされる (図 1)(Seong SY, Nature Reviews. Immunology. 2004)。DAMP は心筋細胞における TNF- $\alpha$  や HMGB1 の発現を促進し、autocrine/paracrine 的に細胞を障害する (Ehrchen JM, J Leukoc Biol. 2009)。DAMP は炎症性疾患において問題とされることが多く、重症感染症や敗血症に伴う cardiomyopathy の一因と考えられている (Chan JK, J Clin Invest. 2012)。DAMP には障害を受けた壊死細胞から放出される細胞変生物が含まれ (Farkas AM, Current Opinion in Investigational Drugs. 2007)、HMGB1 がよく知られている (Raucci A, Cell Mol Life Sci. 2019)。最近、DAMP として注目されているのがミトコンドリア DNA である (Nakayama H, Biochem J. 2018)。ミトコンドリア DNA は TLR9 などの pathogen recognition receptors (PRRs) の活性化による炎症性サイトカインの誘導を心筋細胞にもたらし無菌性心筋炎を惹起することが報告されている (Nakayama H, Biochem J. 2018)。



がん患者における骨格筋萎縮と機能障害は既にごん診療における重要な治療対象となっており、これを克服することは患者の QOL を保持するのに役立つばかりでなく、がん治療に対する忍容性を高め、治療効果を促進する (Fearon K, Nat Rev Clin Oncol. 2013)。申請者は脂肪酸の癌細胞に対する効果を検討して来たが、最近ではマウス悪液質モデルを用いて脂肪酸の癌と骨格筋に対する作用を明らかにした (Mori T, Ohmori H, Cancer Sci. 2019)。このモデルにおいて、心萎縮と心不全が併発することに気付いた (Nunaga S, Ohmori H, 日本癌学会. 2019)。CT26 マウス大腸癌細胞を同系の BALB/c マウス腹腔内に接種すると悪液質が惹起されるが、この時、心重量の低下、心内腔の拡張、全身鬱血が見られ、組織学的に個々の心筋細胞面積の縮小が認められた。これらは臨床的には心不全と見なされる形質であり、癌に心筋障害が併発することをマウスモデルで見出した。がん治療に伴う心機能障害はよく知られている (Barbar T, Cardiol Clin. 2019) が、がん治療を行わないマウスにおいても心障害は発生している。実臨床でもがん治療の有無に関わらず、心障害が生じることが報告されており、例えば乳癌での死因第 1 位はがん死ではなく心不全である (Cardinale D, J Thorac Dis. 2018)。この結果、cardioncology の重要性が提起されている (Todaro MC, Int J Cardiol. 2013)。この、癌性心筋障害の病態として、心筋における代謝障害、とくに、エネルギー代謝障害が重視され (Lena A, ESC Heart Fail. 2018)、申請者もシーホース・アッセイにより心筋のエネルギー代謝が担がんマウスでは酸化的リン酸化と乳酸発酵の何れもが抑制されていることを見出した (Nunaga S, Ohmori H, 日本癌学会. 2029)。また、上記マウス悪液質モデルでは、癌性腹水中に DAMP として知られる HMGB1 が多量に含まれていた (Mori T, Ohmori H, 日本癌学会. 2019)。さらに、腹水中のミトコンドリア DNA を PCR で検索すると検出された。そこで全長ミトコンドリア DNA を抽出しラット心筋細胞株を処理したが変化は見られなかった。これに対しミトコンドリア DNA 断片を作製し処理するとコントロールの  $\beta$  アクチン DNA 断片では細胞障害は生じないが、ミトコンドリア電子伝達系 DNA では障害が認められ、コンプレックスによってその程度が異なっていた。DNA 断片を認識するシステムとして TLR9 が知られるが、申請者が検討したミトコンドリア DNA 断片には、既知の TLR9 へのコンセンサス (Peter ME, J Immunol. 2009) は含まれていなかった。これらの知見がミトコンドリア DNA のなかに DAMP 活性を惹起するコンセンサスが存在するという仮説の着想につながった。

2. 研究の目的

近年、がん患者の死因として心機能障害が重視されているが、申請者はその原因として癌に由来する変性産物である DAMP が心筋障害をもたらすことを見出した。さらに、その DAMP の中でもミトコンドリア DNA が心筋の炎症性サイトカイン産生を促進し無菌性炎症を惹起したが、ミトコンドリア DNA に炎症を惹起する特異的な配列が存在する可能性が示唆された。本研究では、この DAMP コンセンサスとも考えられる配列を解明し、がん性心筋障害の診断マーカーに、さらに、治療標的として応用可能にする基礎的知見を得ることを目的とする。本研究の結果は、がん性心筋障害の機序を解明し、予防・治療を可能にすると期待される。

### 3. 研究の方法

H9c2 ラット心筋芽細胞を用いて、ミトコンドリア DNA 断片による細胞増殖、心筋障害に関連の強い HMGB1 細胞内濃度 (Mori T, Ohmori H, 日本癌学会, 2019)、ミトコンドリア機能として酸化ストレスと ATP 産生能を ELISA で検討した。

### 4. 研究成果

末期大腸癌患者における悪液質に相関する炎症サイトカインを CT を用いた骨格筋インデックスのような臨床的な筋萎縮マーカーや SDS 可溶性ミオシン軽鎖 1 のような生物学的骨格筋成熟マーカー (Mori T, Ohmori H, Cancer Sci. 2019) と比較したところ HMGB1 や TNF- $\alpha$  が骨格筋萎縮と強い相関を示した (Ohmori H, Pathobiology, 2019 in press)。さらに、マウス悪液質モデルにおいて心筋内の HMGB1 や TNF- $\alpha$  を測定すると非担癌マウスに比較し増加していた。これらのデータは、上記の DAMP による無菌性心筋炎ががん性心筋障害に関与することを示唆している。

さらに、ミトコンドリア DNA の心筋細胞への毒性を検討するためにラット H9c2 心筋細胞をラット肝から抽出したミトコンドリア DNA を用いて処理した。興味深いことに、全長のミトコンドリア DNA では細胞死は誘導されなかった。さらに、電子伝達系のコンプレックスタンパクをコードするミトコンドリア DNA 部分を PCR で増幅したものを処理すると、コンプレックス I および V では細胞死が誘導されたが、コンプレックス III および IV では変化はなかった。また、ゲノム DNA である  $\beta$  アクチンの PCR 増幅物でも変化は認められなかった (図 2)。

この結果から、DAMP としてのミトコンドリア DNA にはいわばコンセンサス配列のような細胞毒性を生じる DAMP 活性中心が存在することが考えられた。次に、コンプレックス I および V における DAMP 関連コンセンサスを解析するにあたり、心毒性の知られる Covid-19 ウイルス遺伝子との間に相関性の有無を検討した。その結果、図 3 のようにコンプレックス V の中に 19 塩基にわたりヒト、マウス、ラットで相関性が保たれ、なおかつ、human coronavirus HKU1 strain SC2521 や Covid-19 ウイルス 2019Whuhan 株および 2019USA 株の遺伝子配列と相関性を示す箇所が見出された。われわれは、この配列が DMAP 活性を有するのではないかと考え検討を行った。

Rat の ACTB および ATP5 配列、並びに、Wuhan 株 Covid-19 の相同配列に対する 1 本鎖・2 本鎖の DNA と RNA を作製しラット心筋芽細胞 H9c2 に対する細胞増殖への影響を検討した (図 4)。その結果、ATP5 遺伝子と Covid-19 遺伝子はコントロール DNA

(19 塩基混合) や  $\beta$  アクチン (ACTB) よりも強い細胞増殖抑制を示し、単純な核酸毒性ではないことが示唆された。さらに、ラット ATP5 遺伝子は 2 本鎖 DNA・2 本鎖 RNA で同等の細胞増殖抑制を示したのに対し、Covid-19 遺伝子では 2 本鎖 DNA よりも 2 本鎖 RNA でより強い細胞増殖抑制を示した。さらに、H9c2 細胞内の HMGB1 濃度を測定すると (図 5)、ラット ATP5 遺伝子は 2 本

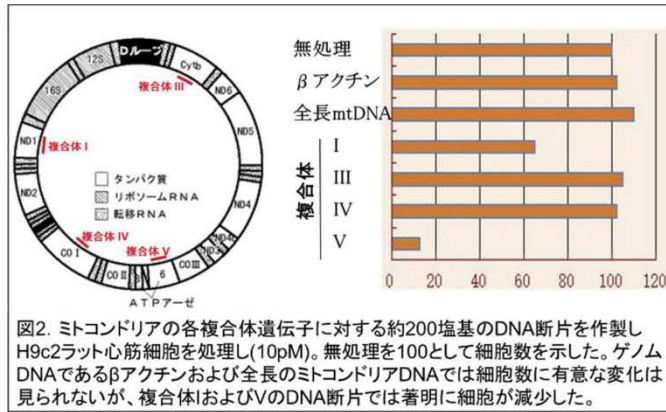


図2. ミトコンドリアの各複合体遺伝子に対する約200塩基のDNA断片を作製し H9c2ラット心筋細胞を処理し(10pM)。無処理を100として細胞数を示した。ゲノム DNAである $\beta$ アクチンおよび全長のミトコンドリアDNAでは細胞数に有意な変化は見られないが、複合体IおよびVのDNA断片では著明に細胞が減少した。

Human ATP5	AAT AAA CAT GCA TTT CAT A	1724
Mouse ATP5j	AAT AAA CAT TCA TTT CAC A	626
RAT ATP5PF	AAT AAA CAT TCA CTT CAC A	552
HKU1	AAT AAA CAT GCA TTT CAT A	19314
19Wuhan	AAT AAA CAT GCA TTC CAC A	19303
19USA	AAT AAA CAT GCA TTC CAA C	19303

図3. ミトコンドリアATP5遺伝子におけるCovid-19ウイルスとの相関性を有する配列が存在することを見出した。

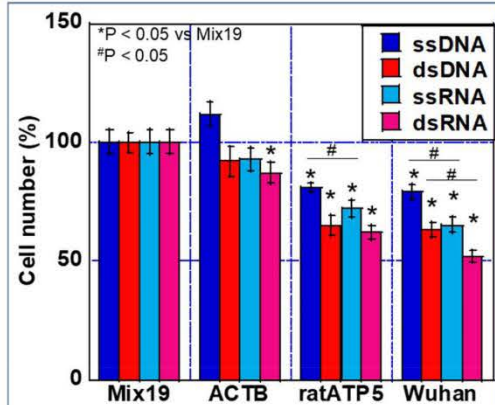


図4. RatのACTBおよびATP5配列、並びに、Wuhan株Covid-19の相同配列に対する1本鎖・2本鎖のDNAとRNAを作製し細胞増殖への影響を検討した。

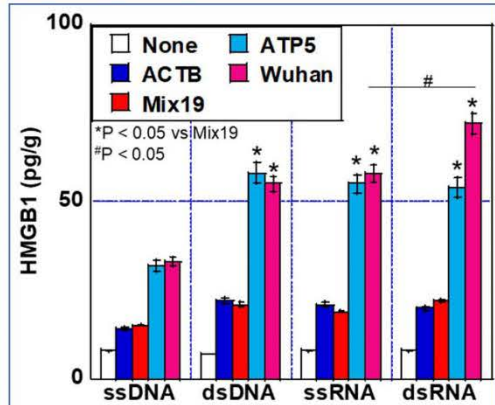


図5. 図4と同様の処理をH9c2細胞に行い、細胞内のHMGB1濃度を測定した。

鎖 DNA・2 本鎖 RNA で同等の HMGB1 発現亢進をもたらしたのに対し、Covid-19 遺伝子では 2 本鎖 DNA よりも 2 本鎖 RNA でより強い HMGB1 発現亢進が認められた。

次に、H9c2 細胞内の酸化ストレスとして過酸化脂質 4HNE 濃度 (図 6) と ATP 濃度 (図 7) を測定した。酸化ストレスは ATP5 と Covid-19 遺伝子で高く、ATP5 は 2 本鎖 DNA で Covid-19 遺伝子では 2 本鎖 RNA で高かった。これに対して、細胞内 ATP 濃度は ATP5 と Covid-19 遺伝子で低下しており、ATP5 は 2 本鎖 DNA で Covid-19 遺伝子では 2 本鎖 RNA で低かった。

最後に、ラット悪液質モデルから採取した血清中 DNA を抽出し加熱により 1 本鎖にして ATP5 1 本鎖 DNA をプローブとして血清 DNA とアニールさせた。これを mung bean nuclease により 1 本鎖 DNA を消化しアニールして 2 本鎖になったもののみを単離した。その結果、正常ラット血清中に ATP5DNA 断片は検出されなかったが、悪液質モデルでは検出された。

これらの実験結果から、ミトコンドリア・コンプレックス V の中で Covid-19 遺伝子と相同性を有するフラグメントは、心筋芽細胞に対して強い炎症を誘導し、酸化ストレスの増大と ATP 産生の低下をもたらすことが明らかになった。さらに、この DNA 断片がラット悪液質モデルで検出されたことから、この Covid-19 相同性ミトコンドリア DNA 断片が、がん性悪液質における心筋障害に重要な役割を果たすことが示唆された。

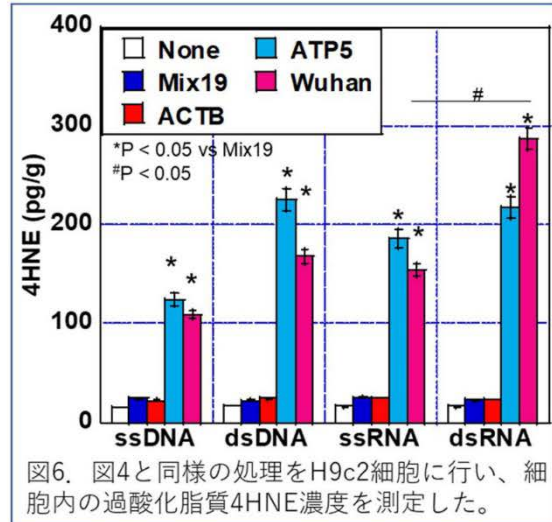


図6. 図4と同様の処理をH9c2細胞に行い、細胞内の過酸化脂質4HNE濃度を測定した。

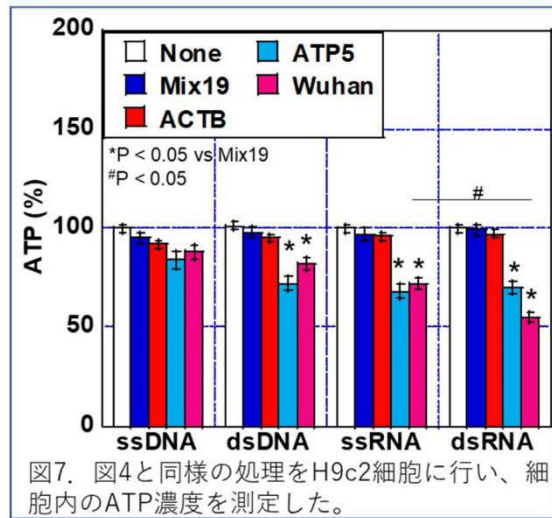


図7. 図4と同様の処理をH9c2細胞に行い、細胞内のATP濃度を測定した。



令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K19332

研究課題名(和文) 口腔衛生が免疫チェックポイント阻害薬の奏功性に及ぼす影響

研究課題名(英文) Effect of oral health on efficacy of immune checkpoint inhibitors

研究代表者

中嶋 千恵 (Nakashima, Chie)

奈良県立医科大学・医学部・研究員

研究者番号：40812657

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ウェルシュ菌はタイトジャンクションを障害するが、口腔扁平上皮癌では腫瘍内のウェルシュ菌によりclaudin-4の細胞内移行によりYAPの活性化を誘導し、その結果、EMTと幹細胞性が亢進した。同様にしてウェルシュ菌は大腸癌前癌病変SSA/P-Dの悪性化に寄与することが明らかになった。さらに、腎細胞癌でもEphA2- $\text{PKC}\epsilon$ によりウェルシュ菌に類似したclaudin-4の細胞内移行によるYAPの活性化がもたらされた。このように、非タイトジャンクションclaudin-4-YAP経路は新たながん治療の標的となる考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

体内細菌叢の細菌と癌との関係は未だ不明な点が多い。この腫瘍-細菌連関の免疫や発癌への影響をタイトジャンクションという切り口から解明することにより、新たな癌の悪性化機序を見出し、新規治療標的を抽出することを本研究の目的とする。本研究の結果は、腫瘍-細菌連関を標的とする口腔衛生、プロバイオティクスや分子標的治療の開発に有用な知見をもたらすことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Although *C. perfringens* impair tight junctions, in oral squamous cell carcinoma, intratumoral *C. perfringens* induced YAP activation through intracellular translocation of claudin-4, resulting in enhanced EMT and stemness. Similarly, *C. perfringens* was found to contribute to the malignant transformation of colon cancer precancerous lesions SSA/P-D. Furthermore, in renal cell carcinoma, EphA2- $\text{PKC}\epsilon$  resulted in the activation of YAP by intracellular translocation of claudin-4, similar to *C. perfringens*. Thus, the non-tight junction claudin-4-YAP pathway may represent a novel target for cancer therapy.

研究分野：口腔衛生学

キーワード：細菌叢 ウェルシュ菌 クローディン4 YAP 上皮間葉移行 がん幹細胞性

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

(1) 研究の背景

われわれのグループでは抗クローディン 4 (CLDN4) 細胞外ドメイン抗体を樹立し (Kuwada M, Kuniyasu H, Cancer Lett. 2015)、その腫瘍に対する効果を検討してきた。抗 CLDN4 抗体は、癌微小環境におけるバリア作用を有するタイトジャンクションが障害され、抗癌剤の腫瘍組織内浸透が促進されるとともに、腫瘍組織内に蓄積された EGF や VEGF などの腫瘍促進性の増殖因子などが腫瘍外に流出し組織内濃度が低下すること、および、同抗体が有する抗体依存性細胞傷害活性 (ADCC 活性) の 3 面から腫瘍抑制効果を示した (Kuwada M, Kuniyasu H, Cancer Lett. 2015)。タイトジャンクションと免疫細胞との関連について、タイトジャンクションの障害がリンパ球などの免疫細胞の腫瘍内への浸潤と関連することが報告されている (Chae YK, Sci Rep. 2018)。GVH 免疫反応ではタイトジャンクション障害による浸透性亢進が CD8 陽性 T リンパ球浸潤を促進する (Chae YK, Sci Rep. 2018)。自己免疫疾患ではクローディンなどのタイトジャンクションタンパクの機能障害が、標的臓器へのリンパ球などの免疫細胞の組織浸潤を促進している (Zake T, Medicine. 2018)。一方、口腔内や腸管内の細菌叢に常在菌として存在する *Clostridium perfringens* は CLDN3 および CLDN4 に結合しタイトジャンクションを障害する (Mitchell LA, Toxins. 2010)。この点から、われわれは *C. perfringens* のがんに対する影響を検討した。

(2) 研究の目的

体内細菌叢の細菌と癌との関係は未だ不明な点が多い。この腫瘍-細菌連関の免疫や発癌への影響をタイトジャンクションという切り口から解明することにより、新たな癌の悪性化機序を見出し、新規治療標的を抽出することを本研究の目的とする。本研究の結果は、腫瘍-細菌連関を標的とする口腔衛生、プロバイオティクスや分子標的治療の開発に有用な知見をもたらすことが期待される。

(3) 研究方法

*C. perfringens* の DNA の口腔扁平上皮癌および大腸前癌病変 SSA/P-D の組織内存在を PCR で検討した。口腔扁平上皮癌細胞株および腸上皮細胞株を *Clostridium perfringens* enterotoxin (CPE) で処理し、その際のタンパク発現の変化を検討した。また、腎細胞癌細胞株で CLDN4 のリン酸化とリン酸化酵素を検討した。

(4) 結果

口腔内細菌叢の常在細菌である *C. perfringens* の口腔癌における役割について検討した。クローディン (CLDN) 4 の発現を口腔扁平上皮癌で調べたところ、57 例中 22 例 (39%) が核に免疫反応性を示した (図 1 左)。核 CLDN4 陽性の症例は、陰性の症例よりも癌の進行と強い相関を示した。腫瘍内嫌気性細菌の DNA を PCR にて検討すると、*C. perfringens* 菌陽性例の 81% で核 CLDN4 発現が明らかになった (図 1 右)。ヒト口腔扁平上皮癌細胞株 HSC3 および HSC4 を CPE で処理すると、

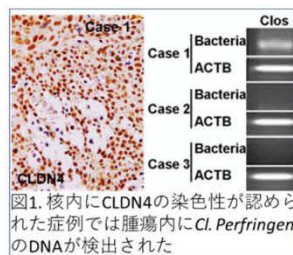


図1. 核内にCLDN4の染色性が認められた症例では腫瘍内に*Cl. Perfringens*のDNAが検出された

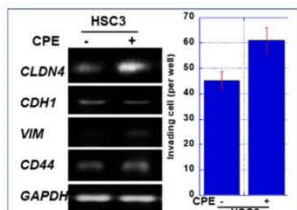


図2. CPEで処理されたHSC3ヒト口腔扁平上皮癌細胞ではEMT (CDH低下とVIM上昇)、幹細胞性亢進 (CD44増加) し浸潤能が増大した。

CLDN4 核移行が誘導され、上皮間葉転換 (EMT)、幹細胞、細胞増殖、および浸潤能が増強された (図 2)。さらに、CPE 処理により、YAP のリン酸化を抑制し、YAP 核移行を促進し、さらに、サイクリン D1 および結合組織成長因子といった YAP 標的遺伝子の発現を増加させた (図 3)。さらに、YAP1、CLDN4、ZO-2 の複合体が CPE 処理によって形成され、LATS1 による YAP1 リン酸化

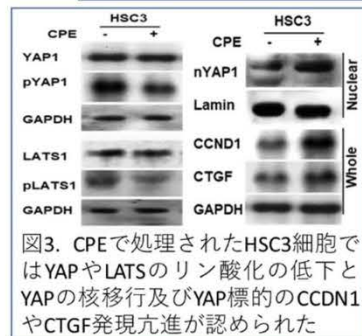


図3. CPEで処理されたHSC3細胞ではYAPやLATSのリン酸化の低下とYAPの核移行及びYAP標的のCCND1やCTGF発現亢進が認められた

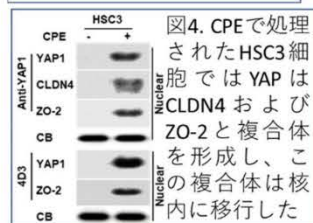


図4. CPEで処理されたHSC3細胞ではYAPはCLDN4およびZO-2と複合体を形成し、この複合体は核内に移行した

を抑制し核内に移行し、YAP を活性化することが明らかになった (図 4)。したがって、口腔扁平上皮癌における YAP の活性化は、悪性形質を促進する上で重要であると見なされた。本研究から、口腔内衛生による嫌気性細菌の制御が YAP の活性化を抑制し、腫瘍の進行を抑制する可能性が示唆された。

このように、口腔内の *C. perfringens* が CLDN4 のタイトジャンクションからの遊離を介して YAP を活性化することを見出した。次に腸内細菌叢の *C. perfringens* の大腸癌における役割を検討した。Sessile serrated adenoma/polyp with dysplasia (SSA/P-D) は、細胞異形成を伴う SSA/P で、大腸癌進展するリスクが高いとされている。SSA/PD の 12 例では、E-cadherin の発現が正常粘膜、SSA/P、管状腺腫 (TA) に比べ低く、CLDN4 の細胞質内移行と YAP の核内移行が観察された (図 5)。また、SSA/P-D 病変から抽出した DNA には CPE 遺伝子が検出されたが、SSAP や TA では検出されなかった (図 6)。ラット腸管上皮細胞株 IEC6 を低用量 CPE で処理すると、CLDN4 が細胞膜から細胞質内に移行した。細胞質内の CLDN4 は、TAZ、ZO-1、LATS、MST と複合体を形成していることが確認された (図 7)。また、CPE 処理により YAP は ZO-2 と複合体を形成し、YAP のリン酸化と核内移行が減少した (図 8)。YAP の活性化は、幹細胞化、上皮間葉転換 (EMT) を誘導した。BRAFV600E 遺伝子変異を有する HT29 細胞は、低用量 CPE 処理により、増殖、浸潤能の増強、幹細胞性と EMT 表現型の誘導を示したが、KRASG13D 遺伝子変異を有する HCT116 細胞はそのような変化を示さなかった。また、10 例の大腸癌を調べたところ、CPE (+)、BRAF 変異 (+) 例で EMT と幹細胞の増加が観察された (図 9)。これらの知見は、*C. perfringens* が YAP 活性化を介して SSA/P-D の悪性化を促進する可能性を示唆している。また、プロバイオティクスや抗生物質による腸内フローラの制御の重要性が示唆された。

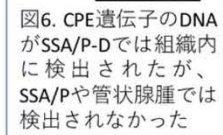


図6. CPE遺伝子のDNAがSSA/P-Dでは組織内に検出されたが、SSA/Pや管状腺腫では検出されなかった

SSA/PD の 12 例では、E-cadherin の発現が正常粘膜、SSA/P、管状腺腫 (TA) に比べ低く、CLDN4 の細胞質内移行と YAP の核内移行が観察された (図 5)。また、SSA/P-D 病変から抽出した DNA には CPE 遺伝子が検出されたが、SSAP や TA では検出されなかった (図 6)。ラット腸管上皮細胞株 IEC6 を低用量 CPE で処理すると、CLDN4 が細胞膜から細胞質内に移行した。細胞質内の CLDN4 は、TAZ、ZO-1、LATS、MST と複合体

を形成していることが確認された (図 7)。また、CPE 処理により YAP は ZO-2 と複合体を形成し、YAP のリン酸化と核内移行が減少した (図 8)。YAP の活性化は、幹細胞化、上皮間葉転換 (EMT) を誘導した。BRAFV600E 遺伝子変異を有する HT29 細胞は、低用量 CPE 処理により、増殖、浸潤能の増強、幹細胞性と EMT 表現型の誘導を示したが、KRASG13D 遺伝子変異を有する HCT116 細胞はそのような変化を示さなかった。また、10 例の大腸癌を調べたところ、CPE (+)、BRAF 変異 (+) 例で EMT と幹細胞の増加が観察された (図 9)。これらの知見は、*C. perfringens* が YAP 活性化を介して SSA/P-D の悪性化を促進する可能性を示唆している。また、プロバイオティクスや抗生物質による腸内フローラの制御の重要性が示唆された。

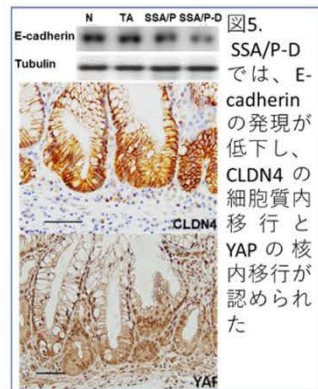


図5. SSA/P-Dでは、E-cadherinの発現が低下し、CLDN4の細胞質内移行とYAPの核内移行が認められた

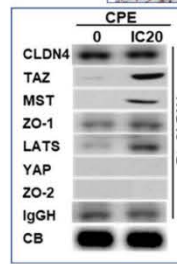


図7. CPEで腸上皮細胞IEC6を処理すると、細胞質内移行したCLDN4とHIPPO抑制系のMST, LATSとZO-1にHIPPO活性系のTAZが巻き込まれた複合体が形成された。これに対して、YAPやZO-2この複合体には結合しなかった

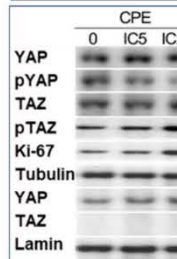


図8. CPEでEC6細胞を処理すると、YAPリン酸化が低下し核内に移行した。これに対しTAZはリン酸化が増加し核内には移行しなかった。この結果、増殖活性 (Ki-67)が増加した

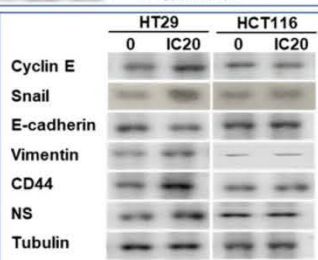


図9. CPEで処理によりBRAF変異大腸癌株HT29ではEMT(Snail増加, E-cadherin減少, vimentin増加)、幹細胞性亢進(CD44とnucleostemin:NSの増加)が見られたがBRAF野生型株HCT116では変化は見られなかった

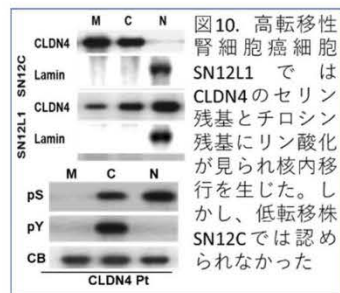


図10. 高転移性腎細胞癌細胞SN12L1では、CLDN4のセリン残基とチロシン残基にリン酸化が見られ核内移行を生じた。しかし、低転移株SN12Cでは認められなかった

SN12L1 では、EphA2/ephrinA1 による CLDN4 チロシンリン酸化が CLDN4 のタイトジャンクションからの遊離と細胞質移行をもたらした。さらに、PKCε は CLDN4 セリン残基をリン酸化し核内移行をもたらした。これに対し、SN12C では EphA2/ephrinA1 と PKCε は低発現であるが、それぞれを活性化することにより CLDN4 の細胞質内移行と核内移行が誘導された (図 11)。さらに、CLDN4 の核内移行に伴って、CLDN4 と結合した YAP の核内移行が生じ、EMT 形質が誘導された。

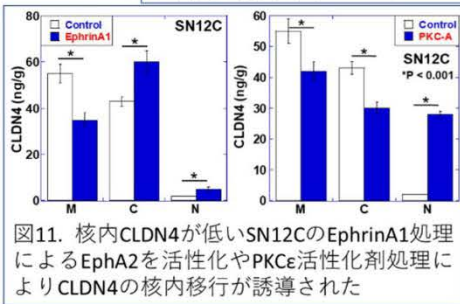


図11. 核内CLDN4が低いSN12CのEphrinA1処理によるEphA2を活性化やPKCε活性化剤処理によりCLDN4の核内移行が誘導された

これらの所見から、タイトジャンクション障害による CLDN4 の細胞内遊離は YAP の活性化を通じがんの悪性化のひとつのメカニズムとなることが示唆された。

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17661

研究課題名(和文) HMGB1標的化による胃癌におけるシスプラチン耐性阻害

研究課題名(英文) Inhibition of cisplatin resistance by HMGB1 targeting in gastric cancer

研究代表者

西口 由希子 (Nishiguchi, Yukiko)

奈良県立医科大学・医学部・研究員

研究者番号：40867727

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：HMGB1はシスプラチン耐性をもたらす重要な因子である。本研究ではHMGB1の標的化によりシスプラチン耐性を改善する試みを行った。デオキシコロール酸は核内HMGB1を低下させシスプラチン耐性を改善した。ナイーブHMGB1に比較し酸化HMGB1で活性が高く、糖化HMGB1(CML-HMGB1)はさらに強い活性を示した。これに対して、エチルピルビン酸やタンシノンによりHMGB1分泌抑制すると、CML-HMGB1によるシスプラチン耐性は抑制された。これらのことから、HMGB1とくにCML-HMGB1を標的化することはシスプラチン耐性の克服に重要であることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胃癌の化学療法においてシスプラチンは中心的な薬剤のひとつであるが、その感受性は症例により差異があり、感受性の予知および増強法を開発することは胃癌の予後改善に重要である。申請者は、シスプラチン耐性にHMGB1高発現が有意に相関することを見出したが、発現抑制やシグナル阻害では核内HMGB1のDNA修復機能を抑制できなかった。本研究では、DNA修復機能を有する核内HMGB1を選択的に阻害する方法を検討し、シスプラチン耐性を解除する補助的治療法の基礎的知見を得ることを目的とする。本研究の結果はシスプラチンの奏効性を高め、胃癌の治療成績の向上につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：HMGB1 is an important factor in cisplatin resistance. In this study, we attempted to improve cisplatin resistance by targeting HMGB1. Post-translational modification of HMGB1 showed that oxidized HMGB1 was more active than naive HMGB1, and glycosylated HMGB1 (CML-HMGB1) was more active. In contrast, inhibition of HMGB1 secretion by ethylpyruvate or tanshinone suppressed CML-HMGB1-induced cisplatin resistance. These findings indicate that targeting HMGB1, especially CML-HMGB1, is important for overcoming cisplatin resistance.

研究分野：病理学

キーワード：シスプラチン 胃癌 HMGB1 薬剤耐性 酸化HMGB1 糖化HMGB1

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究の背景

胃癌における集学的治療はその予後を改善してきたが、シスプラチンは進行胃癌に対する化学療法において 5-FU やタキサン系薬剤とともに中心的な役割を果たしている (胃癌ガイドライン第 4 版, 2014)。シスプラチン+S-1 は 1st line レジメンとして推奨されている。シスプラチン耐性を化学療法施行前に予測することは、適切な化学療法レジメンを選択する上で有用である。申請者は 30 例のネオアジュバント化学療法を施行した胃癌症例を用いてシスプラチン再生と 4 種類の耐性遺伝子の発現について免疫染色により検討を行った。クラスター解析を行うと核内 HMGB1 陽性率が最も強いシスプラチン耐性関連因子であることが示された (Nishiguchi Y, *Int J Mol Sci.* 2020)。HMGB1 がシスプラチン結合 DNA に対し結合し DNA 障害を修復すると考えられており (Stros M, *Eur J Biochem.* 2000)、このため HMGB1 を抑制することが癌細胞の DNA 修復能を低下させシスプラチン耐性を抑制すると考えられていた。ところが、HMGB1 はシスプラチン結合 DNA に強固に結合し修復分子コンプレックスの接近を阻害して修復を抑制するという予測と反対の結果が明らかになった (Calandrini V, *J Inorg Biochem.* 2015)。さらに、HMGB1 には、非修飾型(ナイーブ HMGB1)、Cys 残基の酸化・S-S 結合形成(酸化型 HMGB1)、アセチル化、リン酸化の 4 種の分子種が存在し、HMGB1 のシスプラチン結合 DNA 結合性はその修飾形態により異なることが明らかになった (He Y, *Chem Sci.* 2015)。すなわち、ナイーブ HMGB1 やリン酸化 HMGB1 はシスプラチン結合 DNA に結合し修復を阻害するのに対し、酸化 HMGB1 やアセチル化 HMGB1 はシスプラチン結合 DNA への結合能が低下しており、シスプラチン感受性亢進をもたらさない (Ugrinova I, *Int J Biochem Cell Biol.* 2009)。このことからシスプラチンの抗腫瘍活性は HMGB1 のシスプラチン結合 DNA への結合能に相関することが明らかになった (Pasheva EA, *Int J Biochem Cell Biol.* 2002)。申請者が明らかにした、核内 HMGB1 レベルとシスプラチン耐性が相関するという所見は、癌細胞においては核内 HMGB1 の多くが酸化あるいはアセチル化されてナイーブ HMGB1 が減少することによりシスプラチン感受性を低下させていると解釈できる。また、申請者は HMGB1 抗体や HMGB1 の細胞内シグナルを抑制するピルビン酸エチルによりシスプラチン感受性を促進できるか検討したが、シスプラチン感受性は変わらなかった (西口由希子, 日本胃癌学会, 2019)。このように、細胞外 HMGB1 の標的化では CDDP 感受性を促進できない。これらの所見から、HMGB1 の酸化やアセチル化を抑制しナイーブ HMGB1 を増加させることによりシスプラチン感受性を促進できる可能性がある。

## 2. 研究の目的

胃癌の化学療法においてシスプラチンは中心的な薬剤のひとつであるが、その感受性は症例により差異があり、感受性の予知および増強法を開発することは胃癌の予後改善に重要である。申請者は、シスプラチン耐性に HMGB1 高発現が有意に相関することを見出したが、発現抑制やシグナル阻害では核内 HMGB1 の DNA 修復機能を抑制できなかった。本研究では、DNA 修復機能を有する核内 HMGB1 を選択的に阻害する方法を検討し、シスプラチン耐性を解除する補助的治療法の基礎的知見を得ることを目的とする。本研究の結果はシスプラチンの奏効性を高め、胃癌の治療成績の向上につながることを期待される。

## 3. 研究方法

HMGB1 を標的化するために、デオキシコール酸による核内 HMGB1 の枯渇化、HMGB1 の修飾による CDDP 感受性への影響の検討として酸化型 HMGB1 と糖化 HMGB1 (CML-HMGB1) の比較、さらに、CML-HMGB1 標的化のためにエチルピルビン酸とタンシノンの効果を検討した。

## 4. 結果

核内 HMGB1 を枯渇させる方法としてデオキシコール酸を用い、そのシスプラチン抗腫瘍効果への影響を検討した。デオキシコール酸が核内 HMGB1 の細胞外分泌を促進し、核内 HMGB1 の枯渇を誘導することを報告している (Fujii K, *Cell Prolif.* 2009)。デオキシコール酸とシスプラチンを MKN74 および TMK1 に対して同時処理すると、シスプラチンの細胞増殖抑制効果はデオキシコール酸の濃度依存性に増加した (図 1)。一方、この時のアポトーシスは、デオキシコール酸処理により逆に低下していた。デオキシコール酸による細胞外へ分泌された HMGB1 による、RAGE を介した NFκB 活性化がアポトーシス抑制に関与していた。こ

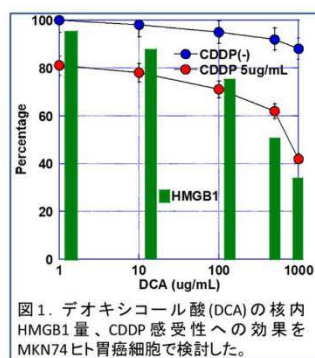
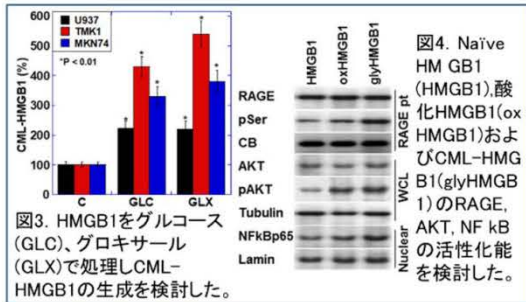


図 1. デオキシコール酸(DCA)の核内 HMGB1 量、CDDP 感受性への効果を MKN74 ヒト胃癌細胞で検討した。

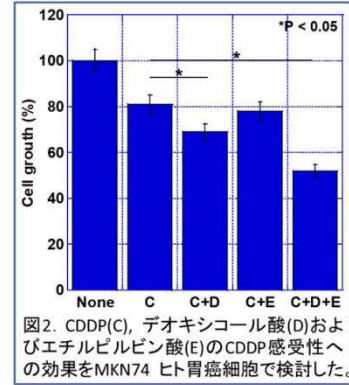
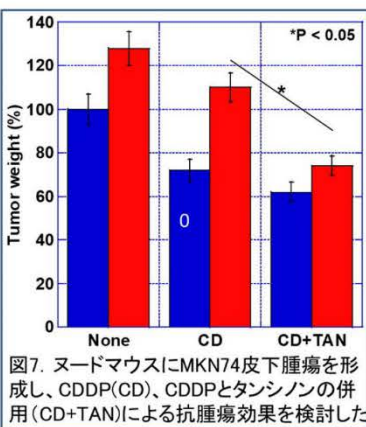
のため、デオキシコール酸とエチルピルビン酸を同時投与すると、HMGB1 分泌は抑制された。シスプラチン、デオキシコール酸とエチルピルビン酸を同時処理すると、細胞増殖抑制とアポトーシス促進が見られた (図 2)。このように、核内と細胞外の HMGB1 を同時に抑制することにより、シスプラチンの抗腫瘍効果を促進することが明らかになった。

HMGB1 標的化を検討する過程で、HMGB1 の翻訳後修飾の状況が重要であることが明らかになってきた。そこで本年度は、酸化型 HMGB1 および糖化 HMGB1 の癌細胞に対する作用を比較検討した。Nε-(Carboxymethyl)lysine (CML)は、タンパク質のリジン残基が

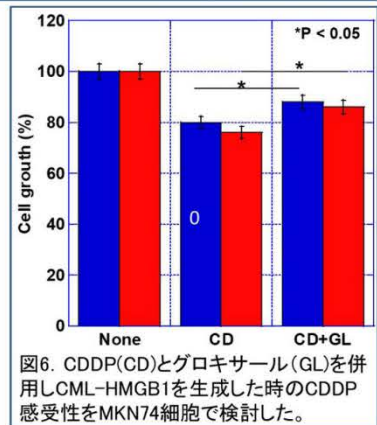
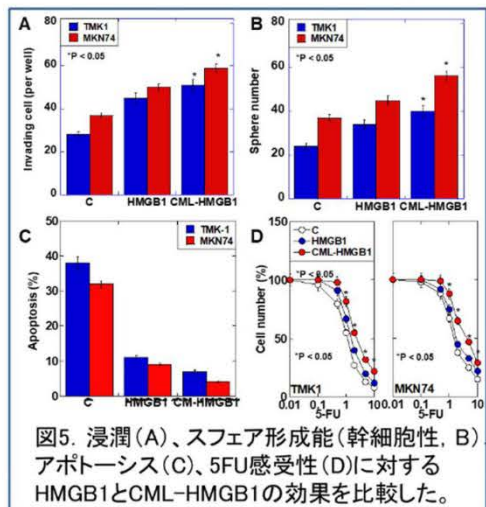


糖化することで生成する AGE の一種である。CML 修飾によるタンパク質の機能変化に関する報告はいくつかあるが、癌との関連は明らかではない。われわれは、HMGB1 における CML 修飾の意義について検討した。ヒト胃癌株 TMK1 および MKN74 をグリオキザールまたはグルコースで処理すると、CML 修飾が増加した (図 3)。CML-HMGB1 は、ナイーブ HMGB1 や酸化型 HMGB1 に比べ、RAGE、AKT、NF-κB をより顕著に活性化させた (図 4)。CML-HMGB1 は、DNA やヒストン H3 への親和性が低下しており、細胞外への分泌が促進された。CML-HMGB1 は、HMGB1 と比較して、増殖、浸潤、抗アポトーシス生存、幹細胞性、5-FU 耐性を向上させた (図 5)。さらに、CML-HMGB1 は、胃癌検体すべてにおいて様々なレベルで検出された。CML-HMGB1 レベルは、pT、pN、pM、pStage と関連していた。さらに、CML-HMGB1 レベルは、癌組織の酸化ストレスおよびネオアジュバント療法への抵抗性と関連していた。したがって、HMGB1 の CML 修飾は、HMGB1 のがん促進作用を増強していた。

さらに、CML-HMGB1 のシスプラチン感受性への影響、ならびに、CML-HMGB1 標的化の試みとしてエチルピルビン酸とタンシノンの効果を検討した。ヒト胃癌細胞株 MKN74 と TMK1 をグルコキサルで CML-HMGB1 生成を促進したうえでシスプラチン処理すると、その効果は両細胞とも約 40%低下した (図 6)。すなわち、CML-HMGB1 は HMGB1 よりも強くシスプラチン耐性を誘導することが明らかになった。タンシノンでヒト胃癌細胞株 MKN74 と TMK1 を処理したところ、HMGB1 mRNA 発現が抑制された。この系にグルコキサルを併用した時の CML-HMGB1 発現は抑制された。高糖液飲水ヌードマウス皮下腫瘍モデルを用いると CML-HMGB1 レベルは、2 週後に通常飲水マウスと比較し 1.4 倍に増加した。この系でシスプラチンの効果を検討すると、糖水投与によりシスプラチンの効果は 24%低下したのに対し、タンシノン併用により、抗腫瘍効果は 3 倍に増加した。これらのことから、タンシノンをシスプラチンと併用することにより、シスプラチン感受性を増大することが可能であると考えられた。



糖化することで生成する AGE の一種である。CML 修飾によるタンパク質の機能変化に関する報告はいくつかあるが、癌との関連は明らかではない。われわれは、HMGB1 における CML 修飾の意義について検討した。ヒト胃癌株 TMK1 および MKN74 をグリオキザールまたはグルコースで処理すると、CML 修飾が増加した (図 3)。



令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18007

研究課題名（和文）ミトコンドリア-小胞体関連タンパクPDZD8を標的とする骨肉腫治療戦略

研究課題名（英文）Targeting of the mitochondria-ER-tethering protein PDZD8 for osteosarcoma treatment

研究代表者

岸 真五 (Kishi, Shingo)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：50790341

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ミトコンドリアと小胞体を係留し両者の物質移動や代謝に影響を与える mitochondria-associated membrane (MAM) に注目が集まっている。本研究では、MAMの中でもPDZD8についてその機能を検討したところ、PDZD8タンパクは腫瘍特異的に発現している可能性があり、ミトコンドリアの鉄代謝を抑制しROS産生を抑制していることが示唆された。PDZD8の抑制は、ROS産生の増加から抗癌剤やF1F0-ATPaseを阻害するプレロステルベンの抗腫瘍効果を促進した。SunitinibはPDZD8をoff targetとして抑制する可能性が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PDZD8が腫瘍特異的に発現し、その抑制が抗がん剤などの抗腫瘍効果を促進したことは、PDZD8ががん治療における新たな分子標的となることが考えられる。とくに、SunitinibはPDZD8をoff targetとして抑制したことは、今後のPDZD8のシグナル経路の解明の手掛かりとなるとともに、PDZD8を標的とする創薬に繋がる知見と考えられる。

研究成果の概要（英文）：Mitochondria-associated membranes (MAMs) have attracted much attention which tethers mitochondria and endoplasmic reticulum (ER) to influence substance transfer and metabolism between the two. In this study, we examined the function of PDZD8 among MAMs, suggesting that PDZD8 protein is expressed in a tumor-specific manner, regulating mitochondrial iron metabolism and suppressing ROS production. Inhibition of PDZD8 promoted the antitumor effects of anticancer drugs and pterostilbene, which inhibits F1F0-ATPase, from increased ROS production. Sunitinib might suppress PDZD8 as its off target.

研究分野：がん生物学

キーワード：ミトコンドリア繫留分子 PDZD8 骨肉腫 活性酸素 鉄 スニチニブ プレロステルベン

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

### 1. 研究開始当初の背景

最近、ミトコンドリアと他のオルガネラとの協調作用が注目され、その制御系として mitochondria-associated membrane (MAM)などのミトコンドリアとオルガネラを係留・連携するタンパク群に焦点が集まっている。小胞体膜とミトコンドリアと接触する領域がミトコンドリアの分裂や飢餓にともなうオートファジーの制御に関与することが報告されている (Arasaki K, Developmental Cell. 2015)。PDZD8 は、はじめウイルス感染関連タンパクとして HSV1 や HIV1 ウイルスの感染を阻害すると報告された (Henning MS, J Virol. 2010、Henning MS, Virology. 2011)。その後、PDZD8 はイーストにおけるミトコンドリア-小胞体係留タンパクのひとつである Mmm1 と相同性を有し、哺乳類においてミトコンドリア-小胞体の係留を行うことが明らかになった (Hirabayashi Y, Science. 2017)。イーストでは Mmm1 はミトコンドリア-小胞体間の脂質輸送に関係するとされるが (Jeong H, Proc Natl Acad Sci USA. 2017)、哺乳類ではカルシウムシオンの移動を制御することが示唆されている (Hirabayashi Y, Science. 2017)。しかし、PDZD8 の機能的な解析は未だ不十分であり、細胞死との関連を示唆する申請者のデータを裏付ける機序も明らかではない。

### 2. 研究の目的

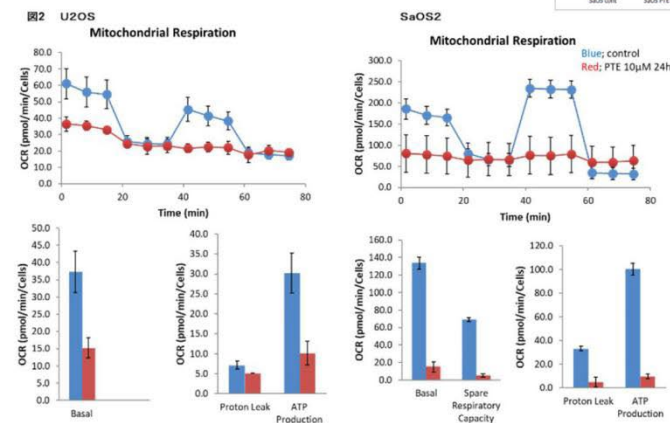
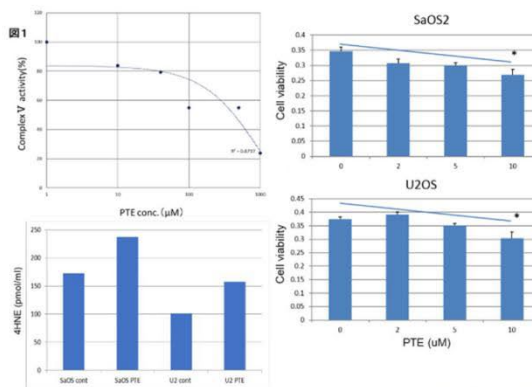
本研究では、PDZD8 の機能を明らかにし、その標的化が骨肉腫の新たな分子標的となることを証明することを目的とする。MAM 研究は近年進展が著しく、とくにパーキンソン病やアルツハイマー病などの神経変性疾患との関連から注目を集め (Gómez-Suaga P, Cell Death Dis. 2018, Area-Gomez E, FASEB J. 2017)、MAM 機能障害が疾患の本態とする仮説が提唱されている (Schon EA, Mol Cell Neurosci. 2013)。がんとの関係についてもカルシウム・イオンとアポトーシスの関連から研究がなされているが、(Doghman-Bouguerra M, Biochim Biophys Acta Mol Cell Res. 2019)、がんにおける PDZD8 の役割を報告したものは PubMed 上認められない。PDZD8 を標的化することにより骨肉腫の治療に応用することが出来れば、若年者に発生し、依然難治で、生存してもその機能的予後を制限する骨肉腫に対する治療に新規な有効なツールとなることが期待される。

### 3. 研究の方法

①PDZD8 の機能解析として、(1) PDZD8 のノックダウンによる細胞死誘導機序、(2) PDZD8 の機能制御に関連するシグナルの同定、(3) PDZD8 の骨肉腫における発現と臨床病理学的因子・薬剤耐性との関連を検討する。また、PDZD8 の治療標的化の検討として、(1) PDZD8 阻害の抗腫瘍効果、(2) PDZD8 阻害の正常組織への影響 (3) PDZD8 阻害剤のミトコンドリアへの作用を検討する。

### 4. 研究成果

ヒト骨肉腫細胞株の SaOS2 および U2OS を F1FOATPase 阻害活性を有するプテロスチルベンで処理すると、濃度依存性の増殖抑制が認



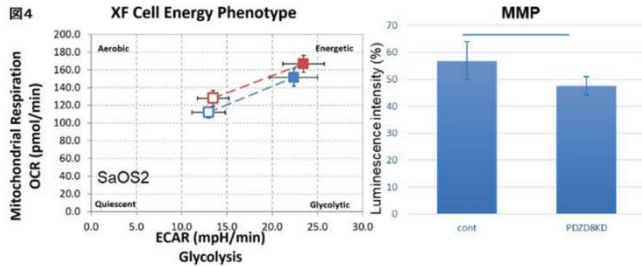
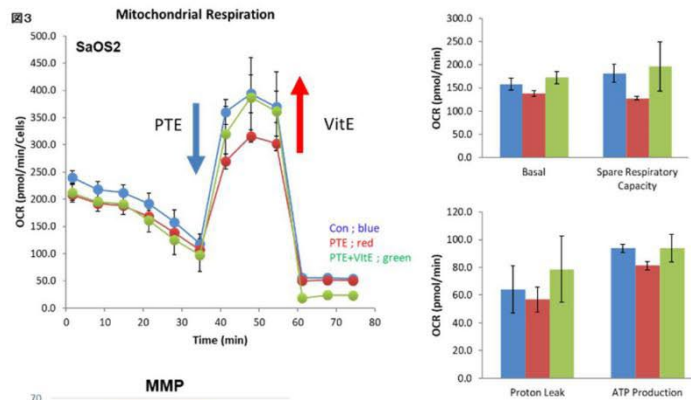
められた (図1)。このとき、プテロスチルベンにより酸化ストレスの増大が見られた。

さらに、プテロスチルベンの酸化リン酸化に対する作用をFlux解析で検討すると、図2のように、プテロスチルベンによりミトコンドリア呼吸は著明に抑制され、ATP産生も著減した。



これに対し、プテロスチルベンとともに抗酸化剤であるビタミンEを処理すると、プテロスチルベンにより抑制されたミトコンドリア呼吸は回復しATP産生も正常化した。

これらのことから、ミトコンドリア ROS 産生の増加が酸化的リン酸化を阻害し、細胞増殖を抑制したと考えられた。



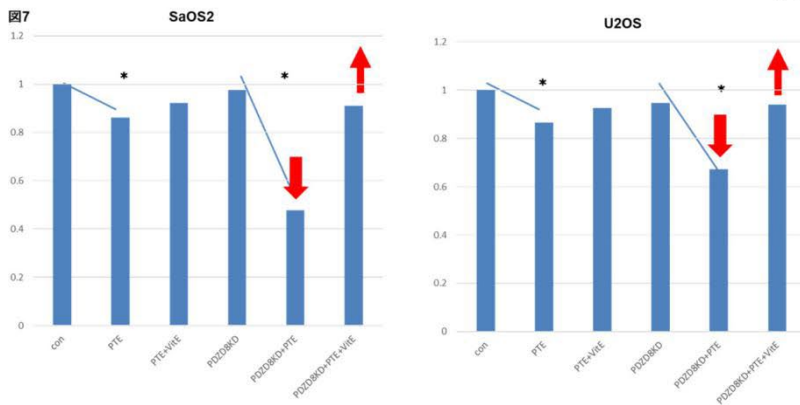
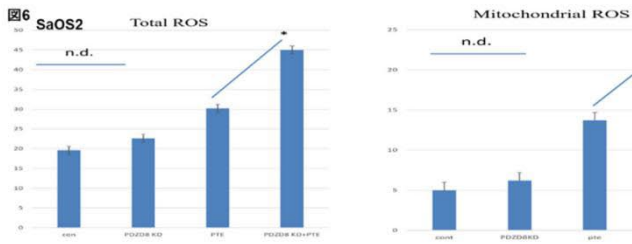
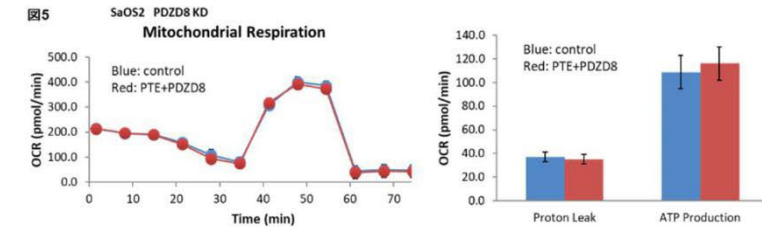
これに対して、MAM タンパクである PDZD8 をノックダウンしても、図 4 のようにミトコンドリア膜電位(MMP)は保たれており、エネルギー代謝にも変化は認められなかった。

ところが、PDZD8 ノックダウンとプテロスチルベン処理を併用すると、図 5 のようにプテロスチルベンによる酸化的リン酸化の阻害が打ち消され、ミトコンドリア呼吸や ATP 産生の抑制は認められなくなった。

さらに、興味深いことに、プテロスチルベン単独で誘導された total ROS およびミトコンドリア ROS のいずれもが、PDZD8 ノックダウンとプテロスチルベン処理を併用により著明に増加した(図 6)。

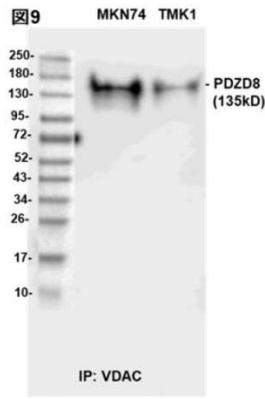
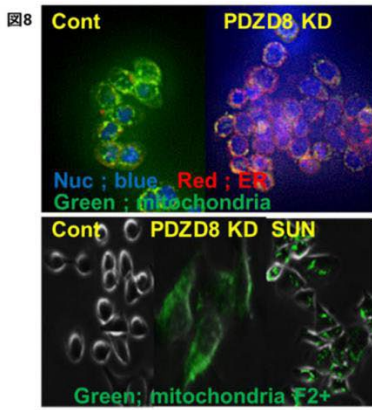
その結果、PDZD8 ノックダウンとプテロスチルベン処理を併用することにより、細胞増殖はプテロスチルベン単独よりも著明に抑制された(図 7)。この併用処理による増殖抑制はビタミン E により消失した。

これらの結果から、PDZD8 は単独ではミトコンドリアに対して有意な作用を示さないのに対して、プテロスチルベンの酸化的リン酸化抑制作用を阻害することにより、ROS 産生を亢進し、細胞障害をもたらしていると考えられる。



この原因を検討するため、PDZD8 の MAM 作用について検討を行った。図 8 上段のように、PDZD8 をノックダウンすると、ミトコンドリアと小胞体 (ER) の共局在が低下する。このとき、ミトコンドリア Fe<sup>2+</sup>の量が増加することが認められた(図 8 下段)。このことから、PDZD8 ノックダウンによりミトコンドリアと小胞体の繫留が低下し、両者の間の鉄移行に障害がもたらされたと考えられる。PDZD8 はプラットフォーム・タンパクであり、ミトコンドリアと小胞体を係留する領域に種々のタンパクをリクルートし、特定の機能を果たす複合体を形成すると考えられる。そこで、PDZD8 と共沈するタンパク質を免疫沈降で検討した。その結果、カルシウム移動に関与するVDAC が PDZD8 と共沈した(図 9)。VDAC は鉄移動に関与する mitoNEET と結合することが報告さ

れらから、PDZD8 は単独ではミトコンドリアに対して有意な作用を示さないのに対して、プテロスチルベンの酸化的リン酸化抑制作用を阻害することにより、ROS 産生を亢進し、細胞障害をもたらしていると考えられる。



れており、PDZD8 が構築する MAM 複合体内に VDAC とともに mitoNEET がインテグレートされ、鉄移動に関与することが考えられる。

ミトコンドリア鉄沈着をマーカーとして同様の変化をもたらす薬剤を検討したところ、スニチニブ (SUN) が抽出された (図 8 下段)。スニチニブ処理により PDZD8 と同様の PTE との相乗効果がミトコンドリア呼吸、ROS 産生、細胞増殖抑制に対して認められることから、スニチニブは off target と

して PDZD8 を阻害する可能性が示唆された。今後、詳細な検討を行うことで PDZD8 のシグナル経路を解明することが可能になると考えられる。

興味深いことに、胃粘膜と腫瘍性病変を用いて、PDZD8 タンパクの発現レベルを検討したところ、表 1 のように PDZD8 タンパクは胃癌組織のみ発現しており、正常粘膜組織および腺腫では発現は認められなかった。

このことから、PDZD8 は胎児組織や主要組織のような増殖性組織において MAM の役割を果たしている可能性が考えられ、今後の検討が必要である。

表1: 胃粘膜・胃腫瘍におけるPDZD8タンパク発現

Tissue	n	PDZD8 expression				P value <sup>1)</sup>
		Negative	Low	Moderate	High	
Foveolar epithelium	35	35	0	0	0	
Pyloric gland	24	24	0	0	0	
Fundic gland	11	11	0	0	0	
Intestinal metaplasia	12	12	0	0	0	
Adenoma	11	11	0	0	0	
Adenocarcinoma	85	0	8	39	38	<0.0001

表2: 胃癌におけるPDZD8タンパク発現と進行度

Parameter	n	PDZD8 expression			P value <sup>1)</sup>	
		Low	Moderate	High		
pT <sup>3)</sup>	1	10	3	5	2	0.031
	2	25	4	12	9	
	3	44	1	21	22	
	4	6	0	1	5	
pStage <sup>3)</sup>	1	34	7	16	11	0.0106
	2	44	1	22	21	
	3 - 4	7	0	1	6	