

公益財団法人

がん研究事業団理事長 殿

研究者 (職名)	氏名	所属施設				
	宮澤 啓介 ㊞ (主任教授)	施設名	東京医科大学 生化学分野	所在地	東京都新宿区 新宿6丁目1番1号	電話
研究課題	難治性腫瘍に対するリソソーム・フラックスを標的とする “がん細胞自爆療法 (cancer cell suicide therapy)” の確立					
研究目的	1950年代にChristian De Duve (ノーベル生理学賞受賞)により同定されたリソソームは、カテプシンを含む60種類もの加水分解酵素を含み、その内部はpH 4.5~5に保たれている細胞内小器官である。リソソーム膜の透過性亢進 (lysosomal membrane permeabilization: LMP)によるこれら加水分解酵素の細胞質への逸脱は、細胞自壊を誘導することからDe Duveはこの小器官を “suicide bag (自爆を誘導する袋)”とも称した。一方、オートファジーとは、細胞内の小器官やタンパク質を二重脂質膜で包み込み、リソソームに輸送し膜癒合 (autolysosome形成)後に、その内容物をリソソーム内酵素で分解する一連のプロセスである。また、膜障害を受けたリソソーム自身がオートファジーで選択的に分解・処理されるプロセスを “lysophagy” という。 リソソームの細胞内数量は、エンドゾームからの「(新規)合成」、lysophagyによる「分解」、ならびに autolysosomal membraneからの「再生」 (lysosomal reformation) の流動的バランス (流れflux) により決定されている。申請者らは先行研究にて、このlysosomal fluxを人為的に操作することで、がん細胞内にダメージを受けたリソソームを最大限に蓄積させ、LMPを介して強力ながん細胞死を誘導する方法を発見し、国内外より注目されている (Cancer Sci 2021)。本研究では、この新規がん細胞死誘導法を難治性腫瘍の治療に応用するため、とりわけオートファジー依存度の高い膀胱癌、非小細胞肺癌、転移性乳癌を対象に、効率的にLMPを誘導する薬剤を既承認薬剤ライブラリーより抽出し、LMP誘導の分子機構の詳細な解明を行い、前臨床試験として担がんマウスを用いた抗腫瘍効果を検証することを目的とする。					
研究方法	DNA障害性薬剤であるドキソルビシン、カルボプラチン、エトポシドを非小細胞肺癌細胞株に作用させるとLMPが誘導されるが、取り分け薬剤暴露後の比較的早期に誘導されるLMPがTP53依存的に誘導されることが当教室の先行研究で判明した。よって、非小細胞肺癌細胞株を中心にTP53の野生型および変異型(欠損型)の細胞株に対するLMP誘導に至る経路の解析を行った。 Crispr-cas9法にてA549細胞のTP53ノックアウト細胞株を作成し、以下の項目に関する検討を行った。 1. AcGFP-Gal3 (ガレクチン3)安定発現株を作成し、Gal3のドット形成よりLMP誘導能の経時的変化を観察した。 2. 界面活性剤digitoninを低濃度 (15mg/mL:細胞膜溶解)および高濃度 (200mg/mL: リソソームを含む膜小器官溶解)で作用させ、各条件下で溶出されたリソソーム酵素濃度よりLMPの定量解析を行った。 3. TP53-mTOR-TFEB経路の活性化状態の検討は、各タンパク質発現量、およびAMPK, S6リン酸化状態を各特異抗体を用いたwestern blottingにより測定した。 4. オートファジー誘導能は抗LC3B抗体とBafilomycin A1を用いたautophagy flux assayにより検討した。					
研究成果	以下の一連の結果を得た。 1. DNA損傷性薬剤は、リソソーム膜透過化 (LMP) を誘発し、TP53依存的に細胞死誘導が加速された。 2. 一方、これらDNA損傷薬は、p53-mTOR-TFEB経路を介してオートファジーも同時に誘発し、このオートファジーはLMP誘導を抑制した。 3. TP53の下流、すなわち転写制御下にあるBAKとBAXは、BAK, BAXのノックダウン実験により、ドキソルビシンによって誘発されるLMPを部分的に抑制した。これより、これらpro-apoptoticタンパク質のLMP誘導における部分的関与が示唆された。 4. BIDのノックアウトおよびノックダウン実験よりTP53依存的LMP誘導における実行分子はBIDであることが明らかになった。TP53依存的にcaspase-8が活性化され、BIDを切断し(truncated BID: tBID)、これがリソソーム膜に移行してpore形成によりLMPが誘導されることが示唆された。 5. リソソーム膜の安定化を促す薬剤U18666A の処理により、LMP抑制と連動して細胞死が抑制された。この効果は野生型TP53 細胞株において認められ、TP53 KO細胞では観察されなかった。					

<p>研究 成 果</p>	<p>以上の結果を総括すると以下の通りとなる：</p> <p>リソソームは、高分子の細胞内分解を仲介する単一膜で囲まれた細胞小器官で、さまざまな形態のストレスがリソソーム膜透過化（LMP）を誘発し、カテプシンなどのリソソーム内成分の細胞質への移行を引き起こし、リソソーム依存性細胞死（LDCD）を誘発する可能性がある。本研究ではLMPがDNA損傷薬に反応してTP53によって調節されていることが明らかとなった。</p> <p>TP53ノックアウトA549（TP53-KO A549）細胞と比較して、野生型TP53 A549細胞をDNA損傷薬（ドキシルビシン、カルボプラチンおよびエトポシド）で処理すると、すべての薬剤でLMPが誘導され、細胞死誘導がより迅速に加速された。これよりDNA損傷に反応したTP53依存性LMPおよびリソソーム依存性細胞死（LDCD）の誘導が示唆された。</p> <p>このLMPは、TP53によるBIDの発現増強と活性化、およびそれに続くtruncated BIDのリソソームへの局在変化によって誘導された。同時に、DNA損傷に反応して損傷したリソソームを除去するためのオートファジー（lysophagy）がTP53-mTOR-TEFB/TFE3経路を介して活性化された。</p> <p>これらの結果は①TP53-BID軸を介した誘導と、②TP53-mTOR-TFEB/TFE3経路を介したLMPの抑制という、LMP制御におけるTP53の二面性を示している。</p> <p>ヒドロキシクロロキンまたはアジスロマイシン、ならびにATG5 KOでオートファジーをブロックすると、DNA損傷薬への曝露後のLMPおよびLDCD誘導が増強された。さらに、リソソーム膜の安定化を誘導する薬剤U18666Aで処理すると、野生型TP53 A549細胞ではLMPとLDCDが抑制されたが、TP53-KO-A549細胞では抑制されなかった。</p> <p>これらデータは、LMPがDNA損傷薬への曝露後にTP53によって精緻に調節されていることを示している。</p> <p>以上の結果は近々に学術誌に投稿予定である。</p>
<p>今 後 の 予 定</p>	<p>上記の結果を受けて、今後は以下の研究を予定している。</p> <p>既承認薬剤ライブラリーからLMP誘導薬を抽出し、この薬剤とAZMとの薬剤コンビネーションが“がん細胞自爆療法（cancer cell suicide therapy）”の最適候補となる。今後、以下の予定でプロジェクトを進める予定である。</p> <p>1. スプリットGFPによるLMPレポーターアッセイの確立と既存薬からの絞り込み：従来のLMPアッセイは蛍光抗体法によるgalectin-3とリソソーム膜タンパク質LAMP2との共局在で評価していたが（galectin-3/LAMP2 puncta assay）、マスキング法としてスプリットGFP法を応用する。各種がん細胞株にGFP1-10をLAMP2側に、GFP11を galectin-3側に融合させた安定導入株を作製し、共局在化で発するGFPシグナルの検出によりLMP誘導を評価する。</p> <p>臨床試験への順調な移行を考慮し、LTTバイオフーマ社の作成した1,054種類の既承認薬ライブラリーから絞り込みを行い、各種がん細胞株のin vitroの殺細胞効果を検証後、動物実験へと移行する。</p> <p>2. TFEBレポーターアッセイとリソソーム新生：LMPの誘導は、同時に転写因子TFEBの活性化によるリソソーム新生を伴う。TFEBが認識するCLERA配列を用いたluciferaseレポーターアッセイによる転写活性の測定と、LAMP2の蛍光抗体法によるリソソーム数の定量解析によりリソソーム新生能を評価する。</p> <p>3. 担がんマウスを用いたin vivoの治療効果を検証：膵癌、肺癌、乳癌細胞株を免疫不全マウスに皮下移植後、AZM+LMP誘導薬投与群、各単剤投与群間で抗腫瘍効果を比較する。病理組織標本を用いて galectin-3/LAMP2 puncta assayを行いリソソーム数とLMPを評価する。</p>

様式第3号

公益財団法人 東京医科大学がん研究事業団 がん研究助成金収支決算報告書

令和 4 年 6 月 28 日

公益財団法人

がん研究事業団理事長 殿

研究者所属施設名

氏 名

宮澤 啓介 ㊞

収 支 決 算 書

(単位 円)

交付を受けた助成金額		金 1,000,000 円		
	費 目	明 細	単 価 及 金 額	計 額
支 出 内 訳	設備、備品費	別添収支簿の通り	別添収支簿の通り	104,800
	消耗品費	別添収支簿の通り	別添収支簿の通り	895,378
	計			1,000,178
過 △ 不足額				△178
備 考	貴財団より交付を受けました助成金は全て本研究課題実施に必要な「生化学・分子生物学実験試薬」「実験器具」「細胞培養試薬」「細胞培養器具」など消耗品購入費、および設備・備品購入費として適正に使用致しました。			
	消耗品費には販売店への支払い時に発生しました銀行振込手数料(計880円)を計上しております。			
	不足額178円は申請者本人の自己支出としております。			

支 出 費 内 訳

区 分	金 額	根 拠
設備、備品費	104,800	(株)日本HP 請求書番号 6814379297 収支簿の通り合算して送金 振込明細控え⑤に該当
消 耗 品 費	781,330	(株)高長 請求書番号 0-744746, 0-747289, 0-748502 収支簿の通り合算して送金 振込明細控え①に該当
	17,028	(株)岩井化学 請求書番号 HM04571 収支簿の通り合算して送金 振込明細控え②に該当
	49,940	(株)バイオテック・ラボ 請求書番号 6421002641 収支簿の通り合算して送金 振込明細控え③に該当
	35,398	(株)宮川商店 請求書番号 100145255, 100146055 収支簿の通り合算して送金 振込明細控え④に該当
	10,802	(株)高長 請求書番号 0-766850, 0-767349, 0-767910, 0-768486 収支簿の通り合算して送金 振込明細控え⑥に該当
	880	振込手数料として振込明細控え①～⑥を合算

※注意：旅費（出張費、宿泊費、交通費）は研究経費に入りません。