

Title	悪性胸膜中皮腫に対するゾレドロン酸によるオートファジー誘導薬物療法の開発
Sub Title	The cytostatic effects of zoledronic acid on ACC-MESO-1 cells
Author	朝倉, 啓介(Asakura, Keisuke) 河野, 光智(Kono, Mitsutomo) 大塚, 崇(Otsuka, Takashi) 涌井, 昌俊(Wakui, Masatoshi)
Publisher	
Publication year	2017
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2016. )
JaLC DOI	
Abstract	<p>悪性胸膜中皮腫は治療抵抗性できわめて予後不良の悪性腫瘍であり, 従来とは全く異なる機序の治療が求められている。我々は骨粗鬆症治療薬であるゾレドロン酸の抗腫瘍効果, オートファジー誘導効果に着目し, ゾレドロン酸の悪性胸膜中皮腫細胞株に対する抗腫瘍効果を検討した。本研究において, 我々はゾレドロン酸がヒト悪性胸膜中皮腫細胞株に対してin vitroで抗腫瘍効果(殺細胞効果, 遊走抑制効果)を示すことを確認した。また, その抗腫瘍効果がオートファジー誘導を介したものであることを明らかにした。臨床応用に向けて, In vivoモデルでの抗腫瘍効果の検討, および詳細な作用機序の検討が今後の研究課題である。</p> <p>Malignant pleural mesothelioma is widely resistant to therapies, and new treatment strategies are needed. We clarified that zoledronic acid reduces cell viability and cell migration of human malignant pleural mesothelioma cells in vitro, and that induction of autophagic changes may at least in part be involved in this process.</p>
Notes	<p>研究種目：基盤研究(C)(一般) 研究期間：2014～2016 課題番号：26462148 研究分野：胸部外科学</p>
Genre	Research Paper
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_26462148seika">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_26462148seika</a>

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 28 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2014～2016

課題番号：26462148

研究課題名（和文）悪性胸膜中皮腫に対するゾレドロン酸によるオートファジー誘導薬物療法の開発

研究課題名（英文）The cytostatic effects of zoledronic acid on ACC-MESO-1 cells

研究代表者

朝倉 啓介（Asakura, Keisuke）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・共同研究員

研究者番号：90383786

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,800,000円

研究成果の概要（和文）：悪性胸膜中皮腫は治療抵抗性できわめて予後不良の悪性腫瘍であり、従来とは全く異なる機序の治療が求められている。我々は骨粗鬆症治療薬であるゾレドロン酸の抗腫瘍効果、オートファジー誘導効果に着目し、ゾレドロン酸の悪性胸膜中皮腫細胞株に対する抗腫瘍効果を検討した。本研究において、我々はゾレドロン酸がヒト悪性胸膜中皮腫細胞株に対してin vitroで抗腫瘍効果（殺細胞効果、遊走抑制効果）を示すことを確認した。また、その抗腫瘍効果がオートファジー誘導を介したものであることを明らかにした。臨床応用に向けて、In vivoモデルでの抗腫瘍効果の検討、および詳細な作用機序の検討が今後の研究課題である。

研究成果の概要（英文）： Malignant pleural mesothelioma is widely resistant to therapies, and new treatment strategies are needed. We clarified that zoledronic acid reduces cell viability and cell migration of human malignant pleural mesothelioma cells in vitro, and that induction of autophagic changes may at least in part be involved in this process.

研究分野：胸部外科学

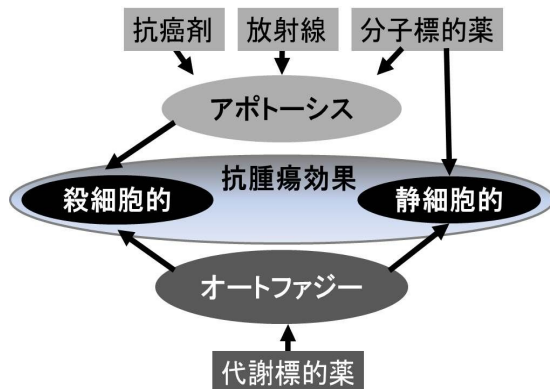
キーワード：悪性胸膜中皮腫 ゾレドロン酸

### 1. 研究開始当初の背景

アスベスト暴露を原因として発症する悪性胸膜中皮腫は、本邦では2020-30年に患者数がピークを迎えると予想されている。しかし、治療抵抗性の悪性腫瘍であり、2年生存率20~30%と予後不良である。現在までに確立された化学療法は Pemetrexed + Cisplatin のみで(生存期間中央値12か月)治療成績の向上には従来とは全く異なる機序の薬物療法が必要である。がん細胞の不均一性や変異能力を考慮すると、複数の経路を多角的に抑制することにより殺細胞効果、静細胞効果(増殖抑制効果、抗血管新生効果、抗転移効果)を複合的にもたらず戦略が重要と考えられる。主としてアポトーシスを誘導する従来のがん治療(抗がん剤・分子標的薬・放射線)にオートファジー誘導薬を併用することは、多角的な抗腫瘍効果を発揮する可能性があり、悪性胸膜中皮腫に対する新治療として期待される。

#### オートファジー誘導薬物療法のコンセプト

従来型癌治療(抗癌剤・放射線・分子標的薬)と併用することで、多角的な抗腫瘍効果を得ることができる



オートファジーは、代謝ストレスにさらされた細胞が細胞内小器官を自己消化することでエネルギーを産生する現象であり、当初は神経変性疾患の分野で研究が進められてきた。本来は代謝ストレスから細胞自身を守るための反応であるが、過剰な自己消化から細胞死に至る場合(オートファジー細胞死)があり、両義性をもつ生命現象である。腫瘍との関連においては、乳癌、子宮癌、前立腺癌の40~75%でBECLIN1遺伝子(BECN1)の異常が認められることから、オートファジーは基本的には腫瘍に対して抑制的に働く現象と考えられている。近年、腫瘍研究の分野でも代謝ストレスが癌細胞にオートファジー細胞死を誘導するとの報告が散見されるようになった(Amaravadi, Clin Cancer Res, 2007)。

申請者らの研究グループは、過去ヒト悪性胸膜中皮腫細胞株 ACC-MESO-1 細胞を用いて、以下の方法で、オートファジー誘導による抗腫瘍効果をもつ薬剤を探索してきた。まず in vitro で ACC-MESO-1 に対して抗腫瘍効果をもつ薬剤を MTT assay (cell

viability の評価)、Wound healing assay (migration の評価)で選別する。つづいて、それらの薬剤を投与した細胞におけるオートファジーマーカー LC3B の発現を Western blot で測定する。LC3B 発現が増加していた場合は、薬剤とオートファジー阻害薬(3-methyl-adenine, cloroquine、atg-siRNA)の同時投与を行う。オートファジー阻害薬の同時投与で抗腫瘍効果が減弱した場合のみ、その薬剤の抗腫瘍効果がオートファジー誘導を介したものであると判断する。この探索を通じて、高脂血症治療薬であるロバスタチン(Asakura K, J Surg Res, 2011)、抗てんかん薬であるバルプロ酸(Yamauchi Y, Asakura K et al. Biochem Biophys Res Commun, 2011)、生薬ウコンの薬効成分クルクミン(Yamauchi Y, Asakura K et al. Phytother Res, 2012)が ACC-MESO-1 細胞に対してオートファジー誘導を介した抗腫瘍効果を発揮することを申請者らは明らかにしてきた。そして、検討を行った種々のオートファジー誘導薬の中で、現在臨床応用の可能性が高いと考えているのが、骨粗鬆症・固形癌骨転移治療薬であるゾレドロン酸である。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、悪性胸膜中皮腫に対するゾレドロン酸の抗腫瘍効果とその機序を明らかにし、臨床応用することである。

### 3. 研究の方法

#### (1)ゾレドロン酸の殺細胞効果

In vitro の検討は、ヒト悪性胸膜中皮腫細胞株 ACC-MESO-1 を用いた。ゾレドロン酸の殺細胞効果は MTT アッセイで評価した。96 ウェルマイクロプレートに翌日 80%コンフルエントになるよう ACC-MESO-1 細胞を撒き、翌日からゾレドロン酸 20~100 μM を投与した。48 時間後に MTT を加え、さらに 2 時間後にホルマザリンに対応する 570nm 吸光度を測定し、cell viability を評価した。

(2)ゾレドロン酸の細胞遊走・浸潤抑制効果  
遊走能については代表的な手法である Wound healing assay にて薬剤投与 48 時間後に評価した。

(3)ゾレドロン酸のオートファジー誘導効果  
オートファジーマーカー LC3B のウェスタンプロットによりゾレドロン酸投与によりオートファジーが誘導されるかどうかを検討した。ゾレドロン酸によるオートファジーが単なるストレス反応ではなく細胞傷害的なオートファジーであることを確認するために、ゾレドロン酸とオートファジー阻害薬(3-methyl-adenine, cloroquine)の同時投与を行い、MTT アッセイで cell viability を評価した。

(4)ゾレドロン酸のオートファジー誘導機序 オートファジー誘導機序について各シグナル経路 (mTOR 経路, Akt-FoxO3 経路, IP3 経路 など) を検討した。

(5)ヒト悪性胸膜中皮腫 NOG マウス移植モデル

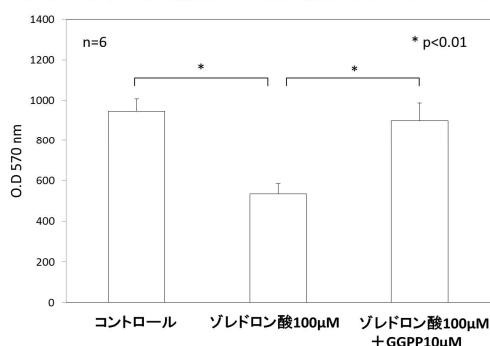
NOG マウスは T 細胞、B 細胞に加えて、樹状細胞・NK 細胞を欠く超免疫不全マウスであり、SCID マウスよりヒト悪性腫瘍の生着率・転移形成率が高い。NOG マウスに ACC-MESO-1 細胞を移植する動物モデルを作成した。

#### 4. 研究成果

##### (1)ゾレドロン酸の殺細胞効果

###### ゾレドロン酸の殺細胞効果 (MTTアッセイ, 48時間後)

ゾレドロン酸100 $\mu$ Mの48時間投与によりACC-MESO1細胞のcell viabilityは約40%低下し、その効果はGGPPの同時投与によりレスキューされた。



ゾレドロン酸 100 $\mu$ M の 48 時間投与は ACC-MESO-1 細胞の cell viability を 40% 低下させ、その効果は GGPP の同時投与で完全にレスキューされた。またゾレドロン酸投与により ACC-MESO-1 には円形への形態変化が見られたが (Rho GTPase は細胞形態維持にも関与) これも GGPP の同時投与によりレスキューされた。

(2)ゾレドロン酸の細胞遊走・浸潤抑制効果  
ゾレドロン酸 100 $\mu$ M の 48 時間投与は ACC-MESO1 細胞の遊走を有意に抑制し、その効果は GGPP の同時投与でレスキューされた。

(3)ゾレドロン酸のオートファジー誘導効果  
ゾレドロン酸 100 $\mu$ M 投与 48 時間後に、western blot にて LC3B の有意な増加と、GGPP 添加によるレスキューを認めた。オートファジー阻害薬 (3-methyl-adenine, chloroquine) の同時投与によりゾレドロン酸の殺細胞効果は有意に抑制された (ゾレドロン酸による細胞死はオートファジー細胞死である)。

(4)ゾレドロン酸のオートファジー誘導機序  
ゾレドロン酸による ACC-MESO-1 細胞の Cell viability 低下はイノシトール3リン酸 (IP3) の同時投与によりレスキューされた。IP3 欠乏がゾレドロン酸によるオートファジー誘導に関与している可能性が示唆された。

(5)ヒト悪性胸膜中皮腫 NOG マウス移植モデル

NOG マウスの左胸腔内にヒト悪性胸膜中皮腫細胞株 ACC-MESO-1 細胞  $5 \times 10^6$  個を注入し、1 ヶ月後に左胸膜腫瘍と縦隔リンパ節および対側胸膜転移を生じるモデルを開発した。

ヒト悪性胸膜中皮腫リンパ節転移モデル



##### (6)まとめ

ゾレドロン酸はヒト悪性胸膜中皮腫細胞株に対して in vitro で抗腫瘍効果 (殺細胞効果、遊走抑制効果) を示した。また、その抗腫瘍効果がオートファジー誘導を介したものであることが示された。In vivo モデルでの抗腫瘍効果の検討、および詳細な作用機序の検討が今後の課題である。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

朝倉啓介ほか「高脂血症治療薬ロバスタチンのヒト悪性胸膜中皮腫細胞株に対するオートファジー誘導を介した抗腫瘍効果」第 56 回日本肺癌学会 2015/11/26-28 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

〔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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

朝倉 啓介 (ASAKURA, Keisuke)  
慶應義塾大学・医学部・共同研究員  
研究者番号：90383786

### (2) 研究分担者

河野 光智 (KOHNO, Mitsutomo)  
東海大学・医学部・准教授  
研究者番号：10276272

大塚 崇 (Ohtsuka, Takashi)  
慶應義塾大学・医学部・准教授  
研究者番号：40306717

涌井 昌俊 (WAKUI, Masatoshi)  
慶應義塾大学・医学部・専任講師  
研究者番号：90240465

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )