

AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

分子消化器病 (2012.03) 9巻1号:33～39.

【消化器癌治療における新しい分子標的】
小胞体ストレス誘導性オートファジーの制御による治療の可能性を探る

田邊裕貴, 稲場勇平, 藤谷幹浩, 高後 裕

小胞体ストレス誘導性オートファジーの 制御による治療の可能性を探る

田邊裕貴* 稲場勇平* 藤谷幹浩* 高後 裕*

KEY WORDS

小胞体ストレス応答 (UPR), シャペロン, mTOR シグナル, オートファジー誘導

SUMMARY

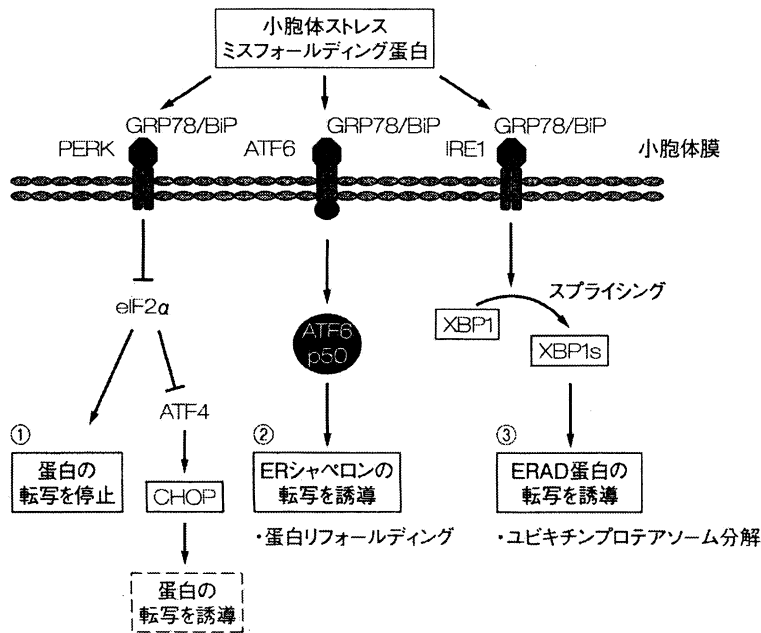
小胞体ストレスとは、さまざまな生理的条件下で小胞体の蛋白フォールディングが障害される状態であり、小胞体ストレス応答 (UPR) とよばれる複雑なシグナル伝達系が誘導される。ストレスに対する細胞の適応現象と考えられるが、UPR で十分に適応できないときには小胞体ごと除去するオートファジーの機構がはたらく。それらでも十分な効果を示さないときにはアポトーシスやオートファジー細胞死により、最終的に異常な細胞は駆除されている。最近では、腫瘍細胞が発生や増殖の段階で、UPR やそれにつづくオートファジーを利用していることが明らかにされてきた。さらに、治療のターゲットとしての研究が進められている。

はじめに

小胞体は、おもに蛋白合成や修飾をつかさどる細胞内小器官で、つねに大量の蛋白が作られるとともにその品質管理がおこなわれている。蛋白の糖鎖の付加やジスルフィド結合などの転写後修飾をおこなった後に、それらは細胞膜へ移送、または細胞外へ分泌される。そのため、通常の細胞内の小胞体は強く酸化され、 Ca^{2+} が豊富な内部環境が保たれている。一方、低酸素や小胞体の Ca^{2+} 欠乏、酸化ストレス、高脂肪食、低血糖、ウイルス感染など小胞体にストレスが生じる状態では蛋白のフォールディングの容量を超え、ミスフォールド蛋白が蓄積してくる。その状態を小胞体ストレスといい、その結果として複数のシグナル伝達系が誘導されミスフォールド蛋白の負荷を軽減する機構がはたらく。この細胞保護機構が、小胞体ストレス応答 (unfolded protein response : UPR) とよばれる¹⁾。

小胞体ストレスが強いときに、アポトーシスにより細胞全体が除去されることもあるが、小胞体自体がオートファジーにより除去される現象もみられ、近年では

* TANABE Hiroki, INABA Yuhei, FUJIYA Mikihiro, KOHGO Yutaka/旭川医科大学内科学講座消化器・血液腫瘍制御内科学分野



図① UPRのメカニズム

小胞体ストレスによりミスフォールド蛋白が蓄積し、それを除去する3段階の反応が起こる。ミスフォールド蛋白は小胞体膜上の受容体に結合し、GRP78/BiPを受容体から解離させる。その結果、PERKが転写因子eIF2αをリン酸化して蛋白の転写を抑え(反応①)、小胞体への負荷を迅速に抑える。つぎに、ATF6はゴルジ体に移動し、切断されたp50フラグメントは核内に移行しシャペロンなどの転写を促進する(反応②)。小胞体において蛋白のリフォールディングが促進され、ミスフォールド蛋白は除去される。その反応で除去できないときには、IRE1はXBP1メッセンジャーRNA(mRNA)を切断してXBP1sを作り、ERAD関連蛋白の発現を誘導する(反応③)。結果、異常蛋白は細胞質内でユビキチン-プロテアソーム系において分解される。

UPRとオートファジーの関連も明らかとなってきた²⁾。

腫瘍細胞においてさまざまなエネルギー代謝が充進し、取りまく微小環境は腫瘍に十分なアミノ酸やエネルギーを提供できないため、腫瘍が生存するには厳しい状況下におかれている。それらに対応する適応現象として、腫瘍細胞ではUPRやオートファジーが充進している。これらの経路をターゲットとした分子標的治療の可能性について概説する。

小胞体のミスフォールディング蛋白はUPRにより除去される

小胞体ではつねに大量の蛋白合成と品質管理がおこなわれているが、飢餓による低栄養や低酸素、熱ショックなどの小胞体ストレスによりミスフォールド蛋白が蓄積する。その小胞体ストレスを認識して、①ミスフォールド蛋白の合成抑制、②小胞体シャペロンの合成促進、③小胞体関連蛋白分解[*endoplasmic reticulum (ER)-associated degradation: ERAD*]の3つの機序で異常蛋白の凝集から逃れている¹³⁾。そのUPRには、小胞体膜にある3つの受容体が関与している。小胞体ストレスにより糖関連蛋白 *glucose-regulated protein78 (GRP78)/immunoglobulin binding protein (BiP)* がそれら受容体

から解離することを起点として、図①に示す3つの反応が順に起こる。

はじめにみられる反応①は、*double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase (PERK)* が翻訳開始因子 *eukaryotic translation initiation factor 2α (eIF2α)* をリン酸化して下流の蛋白の転写を停止させる反応で、小胞体へのミスフォールド蛋白の負荷を減らす役割がある。つぎに起こる反応②は、活性転写因子 (*activating transcription factor: ATF*) 6のp50フラグメントが核内に移行し小胞体分子シャペロンの転写誘導を引き起こし、その結果として小胞体に移行した分子シャペロンがミスフォールド蛋白のリフォールディングにはたらき、蛋白再生が促される。3つ目の反応③は、*inositol-requiring enzyme 1 (IRE1)* を介するERADの機序で、スプライシングされた *X-box binding protein 1 (XBP1)* が核内に移行し転写因子としてはたらき、ERAD関連蛋白の合成を促進する。それらのはたらきにより、ミスフォールド蛋白は小胞体から細胞質に輸送され、ユビキチン-プロテアソーム系によって分解される。反応②と③は、小胞体シャペロンの合成促進やERAD関連蛋白の合成促進と、蛋白のリフォールディングやプロテアソーム分解といった2段階の反応で構成される。

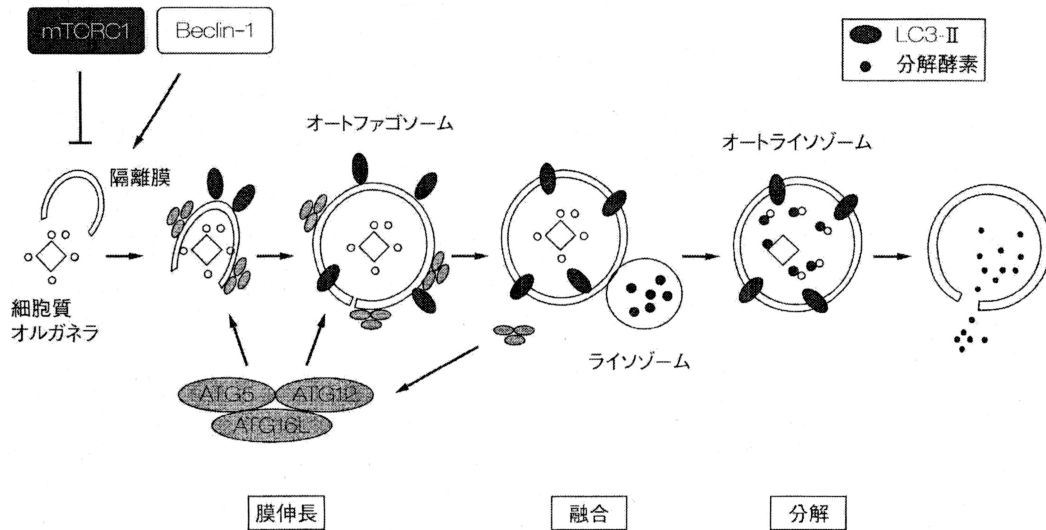


図2 オートファジーの動態

細胞の飢餓状態などを認識すると、オートファジーはmTORC1の抑制から解除される。細胞内構成成分を隔離膜が伸長して包み込みオートファゴソームを形成する。ライソソームと融合してオートライソソームとなり、ライソソーム酵素のはたらきで分解され、分解産物は細胞質内で再利用される。ATG5、12、16Lの複合体は隔離膜の伸長にはたらき、細胞質内に存在しているLC3-Iは修飾を受けてLC3-II(オートファジーのマーカー)となり、オートファゴソームの膜に結合する。

上述の3つの反応によりさまざまな小胞体ストレスに対して細胞は生存する方向に向かうが、ミスフォールド蛋白の除去が不十分なときには、細胞にはアポトーシスが誘導される⁴⁾。これには上述のPERKが関与しており、一般的な蛋白の発現は停止するが、一部の特定の遺伝子については転写が誘導される。その結果、最終的にアポトーシスが起これば細胞自体が除去されてしまう。つまり、UPRではストレスに対して通常は細胞の生存に向かうが、反対に強度のストレスに直面した場合には細胞死に至り、細胞の生死のバランスが緻密に制御されている。

UPRによりオートファジーが誘導される

細胞内の蛋白分解には、比較的短時間で分解される蛋白の分解にかかわるユビキチン-プロテアソーム系のほかに、オートファジー系がある。分解する蛋白の選択性が低く細胞蛋白やオルガネラ単位での分解が可能で、大雑把(bulk)な蛋白分解系といわれる⁵⁾。オートファジーが誘導されると、細胞質に隔離膜が伸長し細胞質成分を包み込みオートファゴソームを形成する。つづいてライソソームと融合して細胞質成分を分解し、その構成成分を

再利用することができる⁶⁾(図2)。飢餓によって誘導されるオートファジーは自己の細胞成分を分解して栄養素を確保するはたらきが想定されていたが、その調節について徐々に明らかにされてきた(図3)。最も重要な調節因子はmammalian target of rapamycin(mTOR) complex 1(mTORC1)で、飢餓状態ではmTORC1が不活化され、つづいてオートファジーが誘導される^{3)7)~9)}。また、飢餓状態のみならず抗癌剤による治療などのさまざまなストレスにより亢進することが明らかになりつつある⁵⁾。

小胞体ストレスによってオートファジーが引き起こされること、飢餓ストレスに対するUPRとオートファジーの応答が関連していることがわかってきた³⁾⁹⁾。UPR反応におけるPERKの経路を介して転写誘導される遺伝子の1つに、オートファジー遺伝子(autophagy gene: Atg)12がある。Atg12の産物ATG12は、ATG5とATG16Lとの複合体を形成して、microtubule-associated protein 1 light chain 3(LC3)の脂質化を誘導しオートファゴソームの膜形成を促進する⁶⁾。また、その他のPERKで誘導される遺伝子の1つ、CAAT/enhancer binding protein(C/EBT)homologous protein(CHOP)の調節を介して、mTORC1を抑制する系を介してオー

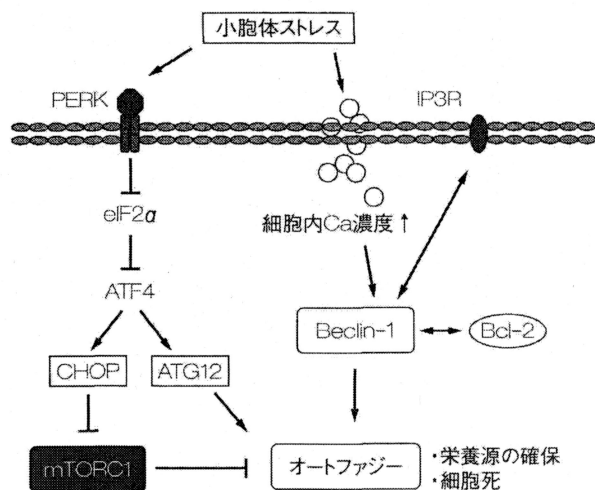


図3 小胞体ストレスとオートファジーの連携
 小胞体ストレスはUPRにおけるPERKの系の下流でATF4の転写を調節する。産生が亢進したCHOPは、mTORC1を抑制することでオートファジーを活性化している。また、オートファゴソームの形成に寄与するATG12の産生も亢進している。一方、小胞体からのCa放出やイノシトール3リン酸(IP3)受容体によるBeclin-1の競合など、UPRを介さない経路も存在している。UPRでアミノ酸などの栄養素が確保できないときには、オートファジーの大雑把(bulk)な機構で細胞は生存できる。しかし、それらの機構では不十分なときには、細胞を丸ごと除去する能力が備わっている。

トファジーを誘導する経路があることもわかってきた¹⁰⁾。

腫瘍細胞においてUPRが亢進している

ミスフォールド蛋白の蓄積によりUPRが引き起こされるが、正常の細胞は非ストレス時にUPRが静止状態にとどまっている。一方、腫瘍細胞において蛋白合成が著しく亢進しているため、細胞が生存するためにUPRの系も亢進している¹¹⁾¹²⁾。さまざまな腫瘍において、UPRの起点となるGRP78/BiPが増加していること、XBPIやATF6、ATF4が誘導され、リフォールディングにはたらくシャペロンGRP94やGRP170が増加し、オートファジーの系にかかわるCHOPも誘導されている^{13)~15)}。腫瘍細胞が飢餓状態や低酸素などのさまざまなストレスに直面していることが示されている。GRP78のヘテロノックダウンマウスでは腫瘍の増大は抑制され致死率も低下した¹³⁾¹⁶⁾。腫瘍の増殖にXBPIが必要なこと

はノックアウトマウスを用いた実験で示された¹⁴⁾¹⁷⁾。UPRにかかわる因子を*in vivo*で抑制することにより、UPRが腫瘍増殖に関与していることが示された。さらに、血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor: VEGF)の合成がシャペロンの発現に依存していることもわかり、腫瘍血管新生にも関与していることが示された¹⁸⁾。腫瘍細胞が生存するためにさまざまなストレスに対してUPRを利用していることが明らかになり、その機構をターゲットとした治療戦略が提案されている¹¹⁾¹⁵⁾。

UPRをターゲットとした分子標的治療の可能性を探る

GRP78はUPR開始のマーカースとして用いられるが、GRP78が上昇する腫瘍は進行度、再発率、致死率が高いことが食道癌や胃癌、大腸癌、肝臓癌、乳癌で示され、腫瘍の悪性度のマーカーとしても有用であることが報告されている¹⁶⁾¹⁸⁾。乳癌では、GRP78の高い群は化学療法やホルモン療法の抵抗性を示し、治療反応性のマーカーとしても利用できる¹⁹⁾。治療のターゲットとしても検討されているが、面白いことに自然界に存在する複数の化合物がGRP78を抑制することがわかっている。大豆に含まれるゲニステイン、緑茶のカテキン成分のほかに、微生物から得られるトキシシンが発見され新規抗癌剤の開発が期待される^{20)~22)}。新規薬剤の大規模スクリーニングの結果、ベルシペロスタチンというマクロサイクリック化合物が*grp78*遺伝子の転写を抑制することがわかり、シスプラチンとの相乗作用があることが動物実験で示されている²³⁾。最近では、GRP78が腫瘍の細胞膜に異所性に発現していることは腫瘍細胞の適応現象と考えられ、その生理的役割、マーカーとしての有用性、治療のターゲットとしての検討が精力的に進められている。

UPRの過程において、前述のように、分子シャペロンの合成と小胞体での蛋白のリフォールディングが促進される。それらの分子を標的とした治療も開発されている。分子シャペロンの1つ、熱ショック蛋白90(heat shock protein 90: HSP90)を阻害するゲルダナマイシン誘導体のタネスピマイシン(17-allylamine-17-demethoxy-

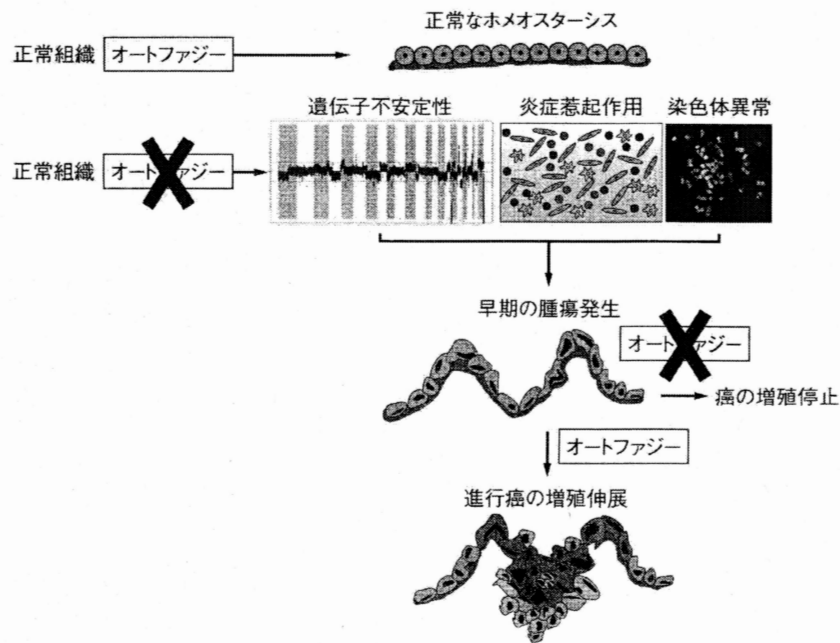


図4 癌におけるオートファジーのモデル

正常な組織ではオートファジーにより恒常性（ホメオスタシス）が維持されているが、その破綻をきたすと遺伝子不安定性や炎症、染色体異常が生じ、腫瘍の発生につながる。その段階でオートファジーが抑制されたままならば、腫瘍の増大は進行しない。一方、オートファジーが再活性化されると悪性転換する。腫瘍に対するオートファジーの役割は、諸刃の剣（a double-edged sword）のモデルとして提唱されている。

（Kimmelman AC, 2011⁵⁾より改変引用）

geldanamycin : 17-AAG) は、すでに第Ⅲ相試験で多発性骨髄腫に第Ⅱ相試験で乳癌や肺癌の臨床試験が進んでいる¹¹⁾²⁴⁾。

UPRの最後の反応において、XBPIのスプライシングとERAD関連蛋白の転写が亢進され、ユビキチン-プロテアソーム系により不要な蛋白が除去される。腫瘍の細胞質においてスプライシングされたXBPIが増加している場合は、腫瘍の増殖亢進と治療への抵抗性が示され、患者の予後不良のマーカーとなりうる¹⁴⁾。したがって、XBPIは治療のターゲットになると考えられ、XBPIの阻害薬トリエリキシン (trierixin) が発見されているため²⁵⁾、今後の癌治療に対する効果が検討されるであろう。

UPRの最終段階のプロテアソーム分解に対する阻害剤ボルテゾミブ (PS-341) は、すでに多発性骨髄腫で臨床応用が開始されている²⁶⁾。プロテアソーム阻害薬は、ユビキチン化された蛋白の分解を抑制することからその結果としてさまざまな作用を有するが、ボルテゾミブに

より小胞体にミスフォールド蛋白が蓄積することが明らかにされている¹¹⁾²⁶⁾²⁷⁾。UPRが阻害された腫瘍細胞の小胞体に異常蛋白が堆積した結果、アポトーシスが誘導されることも抗腫瘍効果の機序の1つと考えている。このボルテゾミブの細胞障害作用は乳癌や大腸癌、膀胱癌、肺癌などに対しても認められている²⁶⁾。

これらの新たな分子標的治療薬の候補物質はそれぞれ作用部位が異なるため、その他の薬剤との併用による相乗作用を期待した臨床応用が進められる。

オートファジー制御による新規治療の可能性を探る

腫瘍におけるオートファジーのはたらきは、よく「諸刃の剣 (a double-edged sword)」と表現され、腫瘍に対する増殖抑制効果と、逆の促進作用があることが指摘されている⁶⁾²⁸⁾ (図4)。前者は、非アポトーシス性のプロ

グラム細胞死の1つとして、オートファジー細胞死とよばれるもので、オートファゴソームが細胞質に集積して死に至る現象である。アポトーシスと同様に、細胞死を起こすことでオートファジーは正常組織から腫瘍の発生を抑えるはたらきをしている。後者は、腫瘍細胞を保護する機構で、細胞が飢餓ストレスに直面すると、とくに腫瘍ではエネルギー代謝が亢進しているためアミノ酸やエネルギーが枯渇し、オートファジーによりアミノ酸の分解と再利用をおこなっている。また、腫瘍が治療に対する抵抗性を獲得するときにはオートファジーが重要であると考えられている⁵⁾。

オートファジーを制御する癌治療戦略では、対象となる腫瘍のオートファジーの役割を考慮して、オートファジーを阻害または誘導させる両面からの分子標的治療を検討する必要がある。オートファジーを抑制する分子として、抗マラリア薬のクロロキンやヒドロキシクロロキンはオートファゴソームの形成を抑制するはたらきがあり、ほかの抗癌剤との併用効果が臨床試験で確認されている段階である²⁸⁾。転移性大腸癌を対象として、XE-LOX (capecitabine + oxaliplatin) ベバシズマブ療法やFOLFOX [5-fluorouracil (5-FU)/leucovorin/oxaliplatin] ベバシズマブ療法などの標準的な多剤併用化学療法に対しての上乗せ効果が検討中である²⁸⁾²⁹⁾。

オートファジーを亢進させる標的治療として、mTORシグナルを抑制する分子があげられる。小胞体ストレスによるUPRからオートファジーの誘導は、PERKの経路により調節され、さらにmTORC1により負の調節を受ける。ラパマイシン (rapamycin) とそのアナログはすでにmTORシグナルの亢進がみられる腫瘍の治療に臨床応用されており、mTOR1を抑制するとオートファジーが亢進されることが示されている²⁹⁾。しかし、mTORシグナルは増殖因子受容体の刺激を受けるphosphatidylinositol-3-phosphate kinase (PI3K) シグナルの下流に位置して、細胞増殖にかかわるほかのさまざまな蛋白の転写調節をおこなっているため⁷⁾、mTOR阻害薬の作用はオートファジーの亢進以外に影響していると考えられる。

おわりに

小胞体ストレスに対する細胞の適応現象としてのUPRとオートファジーの役割についてまとめ、それらをターゲットとした新規治療の可能性を解説した。本来は正常細胞の恒常性を維持するための機構であるが、癌細胞が発生から増殖までの過程においてそれらの機構を応用している。化学療法に対する耐性獲得にもそれらのシグナルが関与しているように、きわめて複雑であるが洗練されたシステムを構築しているため、腫瘍の細胞動態を熟知したオーダーメイドの治療戦略が求められる。



文 献

- 1) Kim R, Emi M, Tanabe K *et al* : Role of the unfolded protein response in cell death. *Apoptosis* **11** : 5-13, 2006
- 2) Ogata M, Hino S, Saito A *et al* : Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol* **26** : 9220-9231, 2006
- 3) Verfaillie T, Salazar M, Velasco G *et al* : Linking ER Stress to Autophagy : Potential Implications for Cancer Therapy. *Int J Cell Biol* **2010** : 930509, 2010
- 4) Zinszner H, Kuroda M, Wang X *et al* : CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev* **12** : 982-995, 1998
- 5) Kimmelman AC : The dynamic nature of autophagy in cancer. *Genes Dev* **25** : 1999-2010, 2011
- 6) Mizushima N, Levine B, Cuervo AM *et al* : Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* **451** : 1069-1075, 2008
- 7) Ohne Y, Takahara T, Hatakeyama R *et al* : Isolation of hyperactive mutants of mammalian target of rapamycin. *J Biol Chem* **283** : 31861-31870, 2008
- 8) Hosokawa N, Hara T, Kaizuka T *et al* : Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol Biol Cell* **20** : 1981-1991, 2009
- 9) Sakaki K, Kaufman RJ : Regulation of ER stress-induced macroautophagy by protein kinase C. *Autophagy* **4** : 841-843, 2008
- 10) Ding WX, Ni HM, Gao W *et al* : Linking of autophagy to ubiquitin-proteasome system is important for the regulation of endoplasmic reticulum stress and cell viability. *Am J Pathol* **171** : 513-524, 2007

- 11) Li X, Zhang K, Li Z : Unfolded protein response in cancer : the physician's perspective. *J Hematol Oncol* **4** : 8, 2011
- 12) Ma Y, Hendershot LM : The role of the unfolded protein response in tumour development : friend or foe? *Nat Rev Cancer* **4** : 966-977, 2004
- 13) Lee AS : GRP78 induction in cancer : therapeutic and prognostic implications. *Cancer Res* **67** : 3496-3499, 2007
- 14) Koong AC, Chauhan V, Romero-Ramirez L : Targeting XBP-1 as a novel anti-cancer strategy. *Cancer Biol Ther* **5** : 756-759, 2006
- 15) Tsai YC, Weissman AM : The Unfolded Protein Response, Degradation from Endoplasmic Reticulum and Cancer. *Genes Cancer* **1** : 764-778, 2010
- 16) Li J, Ni M, Lee B *et al* : The unfolded protein response regulator GRP78/BiP is required for endoplasmic reticulum integrity and stress-induced autophagy in mammalian cells. *Cell Death Differ* **15** : 1460-1471, 2008
- 17) Romero-Ramirez L, Cao H, Nelson D *et al* : XBP1 is essential for survival under hypoxic conditions and is required for tumor growth. *Cancer Res* **64** : 5943-5947, 2004
- 18) Ni M, Zhang Y, Lee AS : Beyond the endoplasmic reticulum : atypical GRP78 in cell viability, signalling and therapeutic targeting. *Biochem J* **434** : 181-188, 2011
- 19) Pootrakul L, Datar RH, Shi SR *et al* : Expression of stress response protein Grp78 is associated with the development of castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* **12** : 5987-5993, 2006
- 20) Ermakova SP, Kang BS, Choi BY *et al* : (-)-Epigallocatechin gallate overcomes resistance to etoposide-induced cell death by targeting the molecular chaperone glucose-regulated protein 78. *Cancer Res* **66** : 9260-9269, 2006
- 21) Zhou Y, Lee AS : Mechanism for the suppression of the mammalian stress response by genistein, an anticancer phytoestrogen from soy. *J Natl Cancer Inst* **90** : 381-388, 1998
- 22) Deng WG, Ruan KH, Du M *et al* : Aspirin and salicylate bind to immunoglobulin heavy chain binding protein (BiP) and inhibit its ATPase activity in human fibroblasts. *FASEB J* **15** : 2463-2470, 2001
- 23) Park HR, Tomida A, Sato S *et al* : Effect on tumor cells of blocking survival response to glucose deprivation. *J Natl Cancer Inst* **96** : 1300-1310, 2004
- 24) Usmani SZ, Bona RD, Chiosis G *et al* : The anti-myeloma activity of a novel purine scaffold HSP90 inhibitor PU-H71 is via inhibition of both HSP90A and HSP90B1. *J Hematol Oncol* **3** : 40, 2010
- 25) Futamura Y, Tashiro E, Hironiwa N *et al* : Trierixin, a novel Inhibitor of ER stress-induced XBP1 activation from *Streptomyces* sp. II. structure elucidation. *J Antibiot (Tokyo)* **60** : 582-585, 2007
- 26) Sterz J, von Metzler I, Hahne JC *et al* : The potential of proteasome inhibitors in cancer therapy. *Expert Opin Investig Drugs* **17** : 879-895, 2008
- 27) Mateos MV, San Miguel JF *et al* : Bortezomib in multiple myeloma. *Best Pract Res Clin Haematol* **20** : 701-715, 2007
- 28) Chen N, Karantza V : Autophagy as a therapeutic target in cancer. *Cancer Biol Ther* **11** : 157-168, 2011
- 29) Chen S, Rehman SK, Zhang W *et al* : Autophagy is a therapeutic target in anticancer drug resistance. *Biophys Acta* **1806** : 220-229, 2010

たなべひろき

田邊裕貴 旭川医科大学内科学講座消化器・血液腫瘍制御内科学分野 講師

青森県生まれ。

専門は消化器内科。

研究テーマは炎症から発癌プロセスの解明, 腸管自然免疫機構の解析。

今後の課題: 厚生労働省医政局研究開発振興課に出向した経験を生かし, 難病の治療開発に貢献すること。