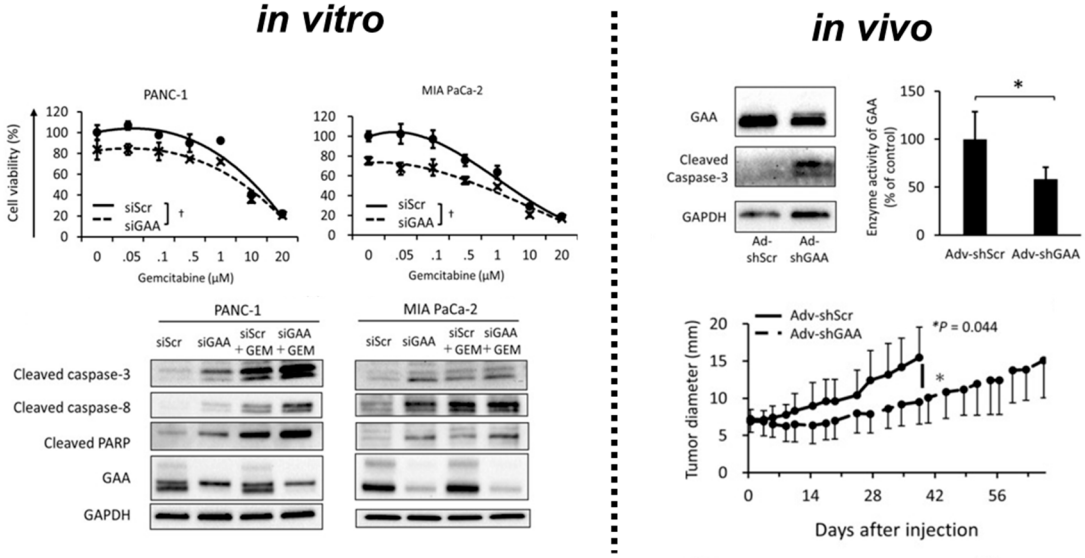
58　膵癌ライソゾーム機構の分子機序と革新的治療の開発	池上　徹

【目的】膵癌は腹部臓器に発生する固形悪性腫瘍のうち最も悪性度の高い癌腫であり、根治術不能あるいは根治術可能であっても局所および全身に再発する症例が極めて多い。本研究ではオートファジーの実態がライソゾームにおける基質分解にあることに着目し、膵臓癌におけるライソゾームの働き及びオートファジーの調整機構を解明することである。
【方法】ヒト膵癌細胞株に対し塩酸ゲムシタビン（GEM）を投与し、抗がん剤抵抗性とオートファジーの関係の評価およびターゲット酵素の選定を行ったのち、siRNA 法を用いて酸性α グルコシダーゼ（GAA）の発現を抑制し、抗腫瘍効果、ミトコンドリア機能、オートファジー誘導効果の解析に加え、抗癌剤抵抗性におけるライソゾーム酵素の役割を明らかにした。また、shGAA を搭載したアデノウイルスベクター（AdV-shGAA）を作製し、マウス皮下腫瘍モデルに局注し抗腫瘍効果の検討を行った。
【結果】EM 投与により膵癌細胞のライソゾーム酵素遺伝子およびオートファジー関連遺伝子の発現増強を認め、ライソゾーム活性が上昇した。中でも GAA の発現は著明に亢進していた。GAA の酵素活性値は GEM 濃度依存的に上昇し、細胞内での要求が上昇した。また、*GAA* 遺伝子の抑制により GEM による抗腫瘍効果が増強することから、ライソゾーム機能が抗癌剤治療抵抗性の原因となっていることが明らかとなった。さらに GAA の発現抑制によりライソゾーム活性が低下し、オートファジー関連タンパクの発現が抑制された。細胞内では膜電位の低下した異常ミトコンドリアが蓄積し、アポトーシス誘導タンパクの発現増加を確認し、細胞増殖能の低下を認めた。*In vivo* においても AdV-shGAA よるマウス皮下腫瘍モデルにおいて抗腫瘍効果が確認された。ライソゾーム酵素発現抑制によりオートファジー機構が制御され、膵臓癌細胞がアポトーシスに誘導された。抗癌剤耐性にライソゾーム酵素が関与していることが示され、新たな治療標的となりうることが示唆された。

in vitro および *in vivo* における GAA 阻害によるオートファジー抑制と腫瘍増殖抑制



58. 膵癌ライソゾーム機構の分子機序と革新的治療の開発

池上　徹

東京慈恵会医科大学 医学部 外科学講座 消化器外科

Key words : 膵癌，オートファジー，ライソゾーム，酸性αグルコシダーゼ，アデノウイルス

緒　言

膵癌は腹部臓器に発生する固形悪性腫瘍のうち最も悪性度の高い癌腫であり、根治術不能あるいは根治術可能であっても局所および全身に再発する症例が極めて多い。悪性度の高い浸潤性膵管癌に於いては、最終的に 90%以上の症例で全身化学療法を必要とする状態に至るのが現状である。さらに化学療法施行中に病勢コントロール不可能となる状況に直面することが非常に多く、その成績は非常に燦々たる状況である［1］。膵癌が抗癌剤耐性を示す要因として、膵癌組織における繊維化や低酸素化、癌幹細胞の役割や耐性遺伝子の活性化などがその要因として挙げられるが、いまだ決定的な解決打開策は得られておらず、抗癌耐性の機序解明と治療戦略の立案が緊急の課題である。

ライソゾームは全ての真核細胞に存在する脂質二重膜で構成されたオルガネラの一つであり、エンドサイトーシスにて細胞外物質の取り込みや、細胞内環境の維持を目的としてオートファジー機構にてミトコンドリアを含む細胞内オルガネラの取り込みを介して基質をその構成単位まで処理を行う役割を担っている［2］。癌細胞においてはライソゾームにおいてオートファジーを活性化させることで低酸素状態に於けるエネルギー基質の安定的供給を行う報告もある［3］。また癌細胞とオートファジー機構の関係性に関する多くの研究においてはオートファゴソーム形成の観点からの研究が大勢を占めており、分解の実態であるライソゾームの変化に着目した研究は今までにない。

方　法

抗癌剤投与膵臓癌細胞株を対象に、マイクロアレイ解析を行い、抗癌剤投与下で活性化されるライソゾーム関連遺伝子を同定し、siRNA にて網羅的ノックダウンすることで抗癌剤耐性に関与する遺伝子を同定した。ゲムシタビンによる酵素活性、オートファジーの変化および酵素ノックダウンによる評価として、マイクロアレイおよび siRNAs 解析にて共通していた遺伝子に由来するライソゾーム酵素に関して *in vitro* にて以下の項目に関する検討を行った。上記で同定されたライソゾーム酵素をノックダウンすることで膵癌細胞内部におけるミトコンドリア機能と形態の評価を行った。さらに上記実験にて同定した遺伝子のうち、ライソゾーム酵素としての役割が抗癌剤耐性に関して大きいと統計学的に考えられる遺伝子（*GAA*）に対する shRNA ウイルスベクターを作製し、マウス皮下腫瘍モデルに投与を行った。EF1A プロモーターを改変した低炎症型 AdV にライソゾーム酵素に対する siRNA を発現する RNA 干渉ユニットを搭載した AdV を使用した。遺伝子導入群およびコントロール群間における生存率、腫瘍サイズの変化を評価した。

結　果

1.　酸性αグルコシダーゼ（GAA）抑制による塩酸ゲムシタビン（GEM）抗腫瘍効果への影響

塩酸ゲムシタビンを投与した膵管細胞株 PANC-1 に対してマイクロアレイ解析を行い、オートファジー関連遺伝子や複数のライソゾーム酵素関連遺伝子の発現が上昇していることを確認した。中でも、遺伝子欠損時の酵素補充療法が確立されている酸性アルファグルコシダーゼ（GAA）の発現が優位に増加していることを確認し、その後の実験を行った。GEM の投与により、未治療群と GAA KD 細胞の両方の細胞生存率が用量依存的に抑制され、GAA KD 細胞では

低用量の GEM に高い感受性を示した。さらに、GAA KD と GEM 処理により膵癌細胞の増殖能は GEM 単剤と比較して有意に抑制された（Mann-Whitney test、$p<0.01$）。続いて、GAA KD が膵癌細胞のアポトーシスシグナルへの影響を明らかにするため、Cleaved Caspase-3、-8、Cleaved PARP のウェスタンブロット解析を行った。GAA の発現を抑制すると、GEM 処理 72 時間後に、膵癌細胞におけるこれらのアポトーシスシグナルの発現量の上昇を認め、GAA 抑制が GEM に対する膵癌細胞の感受性を向上させることが示唆された（図 1）。

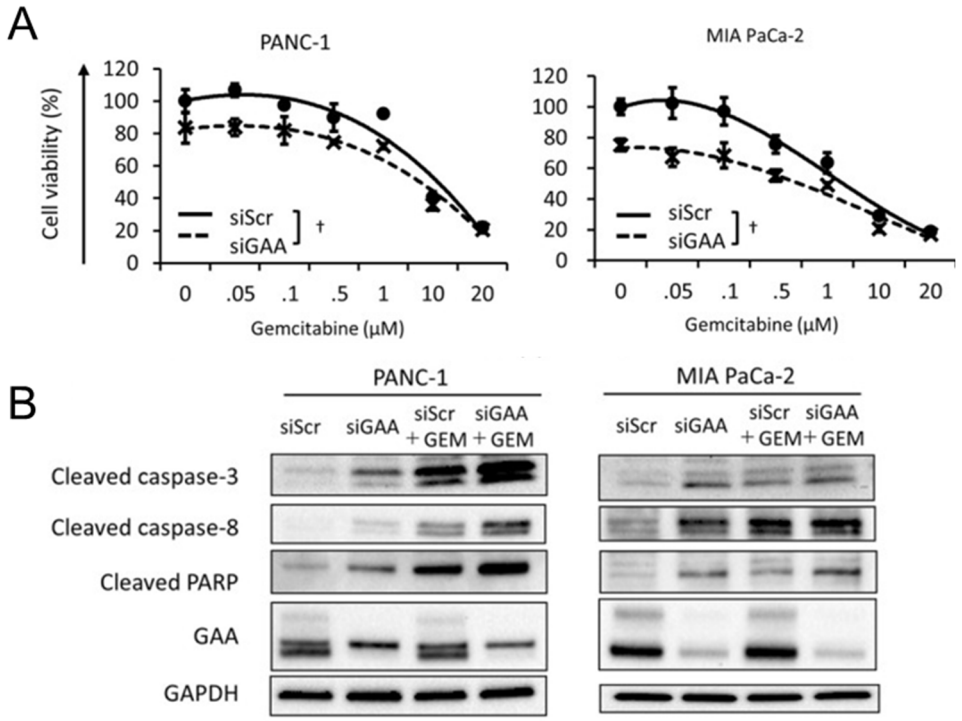


図 1. GAA ノックダウンは GEM の抗腫瘍効果を増強する

A） 膵臓癌細胞株に siGAA を導入することにより GEM による増殖抑制効果が増強した。

B） アポトーシス関連タンパク質の発現レベルが増加した。

2. GAA 抑制による膵癌細胞ミトコンドリアに対する影響

ミトコンドリア染色では、GAA KD 細胞の平均蛍光強度がコントロール細胞に比べて有意に増加したことから、GAA KD によって膵癌細胞内にミトコンドリアが蓄積していることが示唆された。さらにミトコンドリアの機能評価において、蛍光顕微鏡と FCM にて、GAA KD 膵癌細胞では、緑色の発色が有意に上昇しており、GAA KD 膵癌細胞に蓄積したミトコンドリアが脱分極していることが明らかとなった。FCM では、膵癌細胞でミトコンドリアの増加が見られた。FCM では、赤と緑の蛍光比が低下していることが示された（Mann-Whitney test、$p<0.01$）GAA KD により膵癌細胞に機能不全のミトコンドリアが蓄積することが示唆された（図 2）。

3. アデノウイルスベクターを用いた GAA 抑制遺伝子導入の効果

AdV-shGAA ベクターを作製した。続いて、ヌードマウスに PANC-1 細胞を皮下移植し、腫瘍に AdV を直接注入した。注入後 4 週間で、AdV-shGAA 群の腫瘍径は AdV-shScr 群よりも有意に小さかった（Mann-Whitney test、$p<0.01$）。AdV-shGAA 群では生存率の延長が認められた（Log-rank test、$p<0.01$）。AdV-shGAA は、膵癌細胞腫瘍において GAA の酵素活性（Mann-Whitney test、$p<0.01$）とタンパク質を減少させ、Cleaved caspase-3 の発現が増加した。AdV-shGAA を注入した腫瘍では、Ki67 陽性細胞の数が減少し、TUNEL 陽性細胞の数が増加した。さらに、AdV-shGAA 投与群の腫瘍では、PANC-1 細胞で *in vitro* で観察されたのと同様に、ミトコンドリアの蓄積が見られた（図 3）。

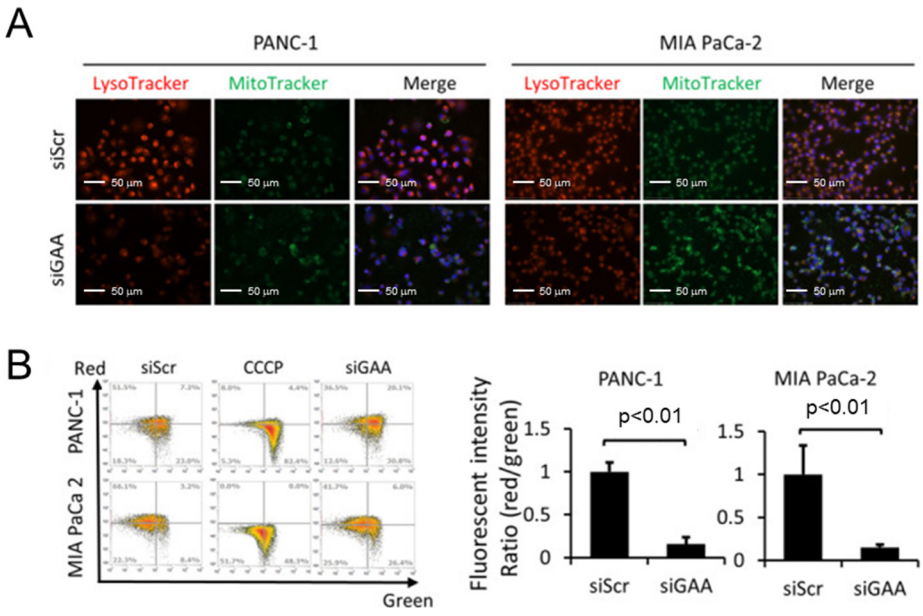


図 2. GAA 抑制による脱分極ミトコンドリアの蓄積

A）LysoTracker の観察では、GAA を KD した PANC-1 および MIA PaCa-2 細胞で発光強度が減少した。

B）FCM では、その蛍光比の現象を定量化した。

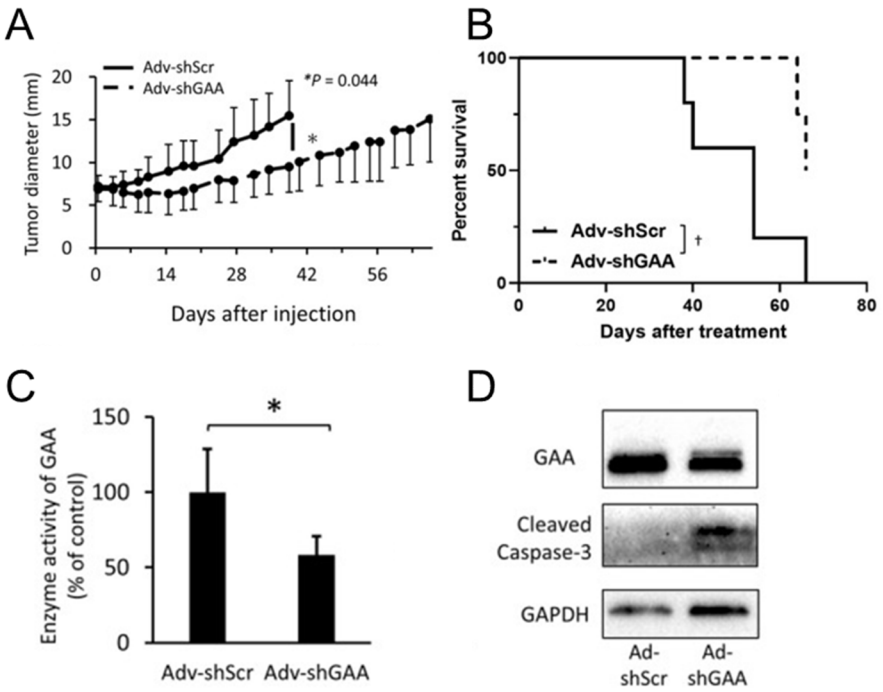


図 3. shGAA 搭載アデノウイルスベクターによる抗腫瘍効果

A） Adv-shGAA による腫瘍の成長抑制。

B） Adv-shGAA による生存期間が延長。

C） Adv-shGAA による GAA 酵素活性。

D） Adv-shGAA による cleaved caspase-3 の過剰発現。

考　察

ライソゾームは癌細胞や正常細胞における生体高分子の代謝、細胞増殖、細胞分裂、細胞分化に重要な役割を果たしている。癌細胞では、ライソゾームによる分解が亢進し、血管新生やその転移能力に関与していることが報告されてきた［4］。しかし、化学療法に対するライソゾームの役割は、いまだ十分には解明されていない。本研究では、膵癌細胞における GAA の制御が治療に有効であることを示した。GAA が遺伝的に欠損すると、Pompe 病を発症し、オートファゴソームへのグリコーゲンの大量蓄積が生じ、ミトコンドリアの膜電位の低下や活性酸素の増加が観察されている。GAA を KD した膵癌細胞では，GAA 活性の残存が観察され、これらの細胞が *GAA* 遺伝子欠損病である Pompe 病の軽度の表現型を模倣していることが示唆された［5］。

本研究において、GEM を投与した膵癌細胞では、LC3-Ⅱが増加し、p62 が減少していることがウェスタンブロット解析により確認された。GAA はグルコースの結合を分解するため、解糖に最も効率的なライソゾーム酵素であり、ワールブルグ効果に代表されるように、糖代謝が必要とされる癌細胞においては重要な役割を担っていると考えられる。GEM 投与後の膵癌細胞の細胞毒性に対する耐性メカニズムには、グリコシダーゼやプロテアーゼに由来するライソゾーム酵素の分解能力が関与していると考えられた。これらの考えは、ライソゾーム内の pH を上昇させるライソゾーム酵素阻害剤であるクロロキンが、膵癌細胞における活性酸素の産生を介して GEM によるアポトーシスを促進するという過去の報告によって裏付けられている［6］。

in vivo における AdV-shGAA による治療が腫瘍に対して有望な効果をもたらすことを示した。近年、癌に対する遺伝子治療は新たな治療法として臨床現場で注目されている。アデノウイルスベクター（AdV）は、その遺伝子を宿主のゲノムに組み込むことはなく、肝障害などの副作用も少ないことから癌治療ベクターとしては、頻繁に使用されている［7］。本研究では、ヒト U6 プロモーター由来の shGAA からなる AdV-shGAA を単回投与したところ、明らかな副作用を引き起こすことなく抗腫瘍効果を示した。したがって、AdV による GAA の抑制は有望な遺伝子治療となりうると考えられた。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京慈恵会医科大外科学講座消化器外科分野の白井祥睦、春木孝一郎、古川賢英である。また研究を全面的に支援してくださった上原記念生命科学財団の方々に心から感謝いたします。

文　献

1） Manrai M, Tilak TVSVGK, Dawra S, Srivastava S, Singh A. Current and emerging therapeutic strategies in pancreatic cancer. Challenges and opportunities. World J Gastroenterol. 2021;27(39):6572-89. doi: 10.3748/wjg.v27.i39.6572.

2） Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. Cell. 2008;132(1):27-42. doi: 10.1016/j.cell.2007.12.018.

3） Perera RM, Stoykova S, Nicolay BN, Ross KN, Fitamant J, Boukhali M, et al. Transcriptional control of autophagy-lysosome function drives pancreatic cancer metabolism. Nature. 2015;524(7565):361-5. DOI: 10.1038/nature14587

4） Kallunki T, Olsen OD, Jaattela M. Cancer-associated lysosomal changes: friends or foes? Oncogene. 2013;32(16):1995-2004. DOI: 10.1038/onc.2012.292

5） Raben N, Wong A, Ralston E, Myerowitz R. Autophagy and mitochondria in Pompe disease. nothing is so new as what has long been forgotten. American journal of medical genetics Part C, Seminars in medical genetics. 2012;160c(1):13-21. doi: 10.1002/ajmg.c.31317.

6) Fu Z, Cheng X, Kuang J, Feng H, Chen L, Liang J, et al. CQ sensitizes human pancreatic cancer cells to gemcitabine through the lysosomal apoptotic pathway via reactive oxygen species. Molecular oncology. 2018;12(4):529-44. doi: 10.1002/1878-0261.12179.
7) Miura Y, Yamasaki S, Davydova J, Brown E, Aoki K, Vickers S, et al. Infectivity-selective oncolytic adenovirus developed by high-throughput screening of adenovirus-formatted library. Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy. 2013;21(1):139-48. doi: 10.1002/1878-0261.12179.