

報道関係各位

2023年3月6日
東京医科大学

マクロライド系抗生物質アジスロマイシンの オートファジー阻害活性における分子機構の解明に成功

～ 今後のアジスロマイシンのがん治療応用に期待 ～

【概要】

東京医科大学（学長：林 由起子／東京都新宿区）生化学分野 宮澤啓介主任教授、高野直治准教授を中心とする研究グループは、これまでマクロライド系抗生物質が本来の抗菌活性とは独立してオートファジー阻害効果を有することに着目し、がん細胞の生存・増殖に不可欠なオートファジーをマクロライド系抗生剤のアジスロマイシン（AZM）で阻害することで、種々のがんの分子標的薬やDNA障害性抗がん剤の抗腫瘍効果を増強することを報告してきました。しかし、AZMが何故オートファジー阻害活性を発揮するのか、その分子機構は長らく不明でした。今回、同グループはAZMを固相化した機能性磁性ナノビーズを用いることで、AZMが結合する細胞内タンパク質の分離・同定を試み、AZMが細胞骨格タンパク質であるケラチンおよびチューブリンと分子間結合することによりオートファジー阻害活性が誘導されることを明らかにしました。現在、臨床の現場で用いることのできるオートファジー阻害薬は抗マラリア薬であるハイドロキシクロロキンしかありませんが、AZMがハイドロキシクロロキンに匹敵するオートファジー阻害活性を持ち、かつ、細胞毒性が低く抑えられていることも明らかとなりました。さらに、がん細胞を皮下に移植したマウスにAZMを経口投与したところ、移植された腫瘍の成長が対象群に比べ抑えられることも明らかとなりました。本研究は、AZMのオートファジー阻害活性を利用した新しいがん治療開発を行う際の、重要な基盤研究となると考えられます。

本研究成果は2023年3月4日に国際科学雑誌「British Journal of Cancer」に掲載されました。

【本研究のポイント】

- アジスロマイシンが細胞骨格タンパク質であるケラチンおよびチューブリンとの相互作用を介してオートファジー阻害効果を発現します。

- これら細胞骨格タンパク質との相互作用を介してアジスロマイシンはリソソーム内の加水分解酵素の成熟を阻害し、リソソームの分解機能を抑制することでオートファジー活性を阻害することが明らかとなりました。
- アジスロマイシンはヒドロキシクロロキンと同等のオートファジー阻害活性を同濃度で発揮しますが、細胞毒性は低く抑えられていることも明らかとなりました。
- 皮下に腫瘍を移植された免疫不全マウスにアジスロマイシンを経口投与すると、腫瘍の成長が対照群に比べ抑制されました。

【研究の背景】

オートファジーは細胞内のタンパク質や小器官を二重脂質膜で包み込み（オートファゴソーム形成）、これをリソソームに輸送して膜融合し、オートファゴソームの内容物をリソソーム内の加水分解酵素で分解処理する一連のプロセスです。細胞内のタンパク質はオートファジーによりアミノ酸レベルまで分解され、新規のタンパク質合成の材料としてこれらアミノ酸はリサイクルされることから、生体が生存する上で欠かせない分子機構の1つです。がんもまたオートファジーを利用して成長し、薬剤耐性を獲得することも明らかとなってきています。これにより、オートファジーの抑制が、がんの治療標的となりうる可能性が以前より示されています。しかし、これまで臨床の現場で使用可能なオートファジー阻害薬は抗マラリア薬の1つであるヒドロキシクロロキンしか存在せず、副作用の観点からより安全性の高い他の薬剤が望まれていました。本研究では、長らく臨床で用いられてきた抗生物質の1つアジスロマイシンに強力なオートファジー阻害活性があることに着目し、どのようにオートファジー阻害活性が誘導されるのか、その分子機序を明らかにすることを目指しました。

【本研究で得られた結果・知見】

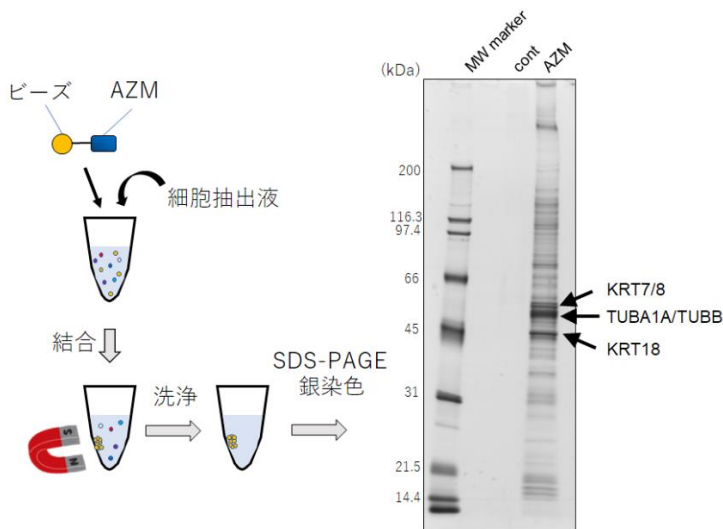


図1. AZM結合タンパク質の単離
がん細胞抽出液と、磁性体ナノビーズに固相化したアジスロマイシンを混ぜ、ビーズに結合したタンパク質を回収し、銀染色にて可視化した図。質量分析装置を用いて、矢印で示したバンドに含まれるタンパク質が、ケラチン(KRT18, KRT7/8), とチューブリン(TUBA1A, TUBB)であることを明らかにした。

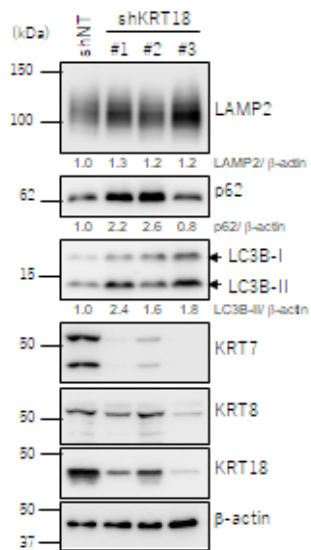


図2. KRT18 ノックダウンによるオートファジーの阻害

細胞内成分を包み込んだオートファゴソームはリソソームへと輸送され、リソソーム内の加水分解酵素群で分解処理される。オートファジーの分解基質 p62 ならびにオートファゴソーム膜成分の LC3B-II もオートファジーの一連のフラックス（流れ）の中で同様に分解を受ける。AZM 結合タンパク質の一つとして同定されたケラチン 18 について、shRNA を用いて KRT18 遺伝子をノックダウンしたところ（#1～#3）、p62 および LC3B-II が蓄積していることから、オートファジーが阻害されている様子がウェスタンブロットティングで明らかとなった。また、リソソーム自体もオートファジーで分解・再生されることから、オートファジーが止まることでリソソーム膜成分である LAMP2 も蓄積していることが示されている。

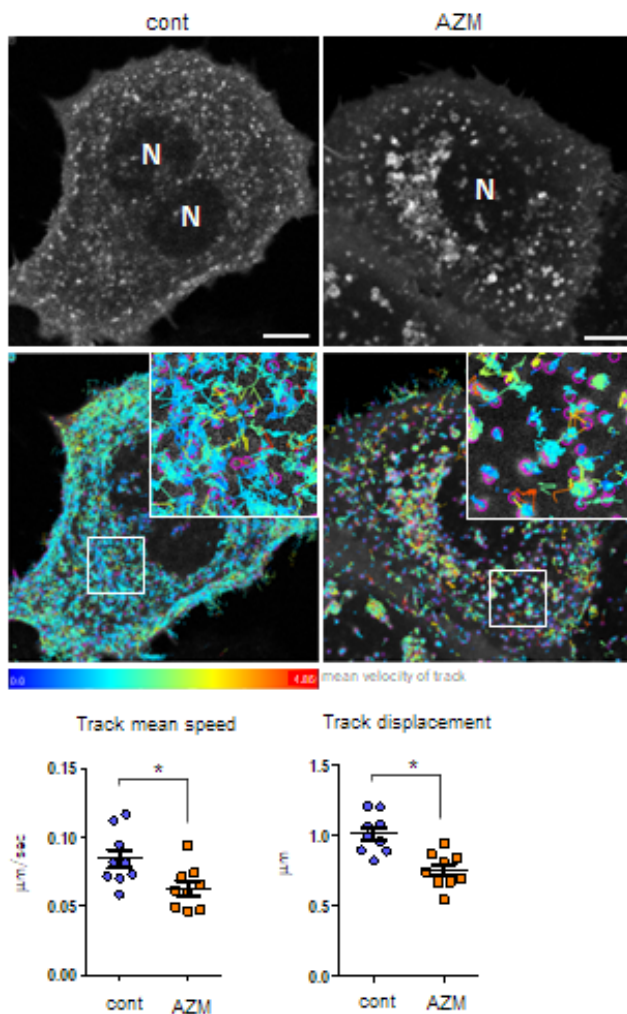


図3. コントロール(cont)および AZM 処理によるリソソームの細胞内動態の変化の解析

遺伝子導入により LAMP1-EGFP を発現させ、リソソームが蛍光タンパク質で標識された細胞に AZM 処理を行い、チューブリン上を移動するリソソームの細胞内動態を解析した。個々のリソソームの軌跡が青～赤に色分けされた線で示されている。下の図では、リソソームの動く速さ(track mean speed)と移動距離(track displacement)をまとめた。AZM 非添加のコントロールと比較して AZM 添加によりリソソームの移動速度・移動距離が抑制されていることが明らかとなった。これによりオートファジーのフラックス（流れ）が抑えられていることが示されている。

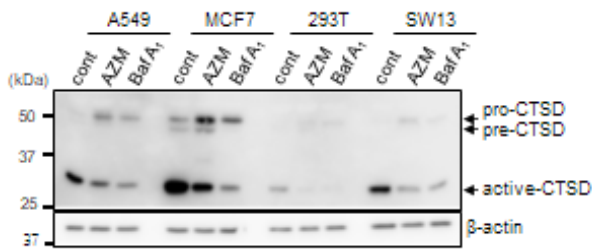


図4. アジスロマイシンによるリソソーム酵素の阻害
 各種がん細胞株（肺癌細胞 A549, 乳癌細胞 MCF7, 腎癌細胞 293T, 副腎皮質腺癌細胞 SW13) に AZM 処理を行うことで、がん細胞内のリソソーム酵素のカテプシン D は、活性型 (active-CTSD) が減少し、不活型の前駆体 (pro-CTSD, pre-CTSD) が増加した (試験管内実験のみに使用可能なオートファジー阻害剤 bafilomycin A1 (BafA1) を「陽性コントロール」として使用している)。これにより AZM はリソソームの酵素活性を抑制していることが示された。

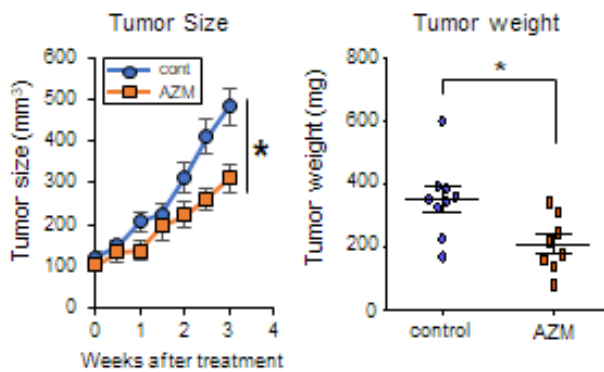


図5. アジスロマイシンの経口投与による抗腫瘍効果

免疫不全マウスの皮下に癌細胞株を移植し、対照群 (cont) と AZM 経口投与群間で、腫瘍の成長を比較した。AZM の経口投与によりマウスに移植された癌細胞の増殖が抑制されていることが示された。

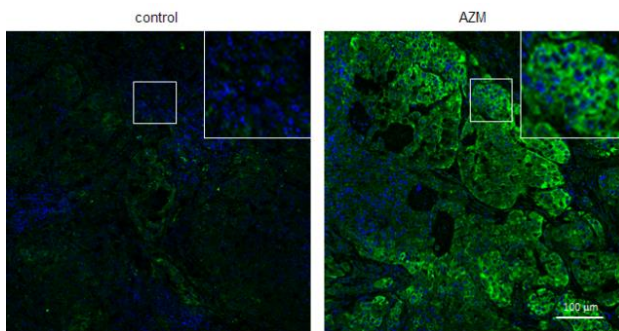


図6. アジスロマイシン投与による腫瘍内の p62 の蓄積

対照群と AZM 経口投与群のマウスから取り出した腫瘍の組織切片を用いて免疫染色法によりオートファジーの分解基質である p62 の蓄積量を比較した。(緑色に光っているシグナルが p62 由来のシグナル。青色は核由来のシグナル。) AZM によりオートファジーが阻害されることで腫瘍組織内で p62 が蓄積されていることが示された。

【今後の研究展開および波及効果】

本研究では、アジスロマイシンがどのようにオートファジー阻害活性を示すのか、その作用機序を明らかにしました。また、他のオートファジー阻害薬であるヒドロキシクロロキンと同等のオートファジー阻害活性を持つことや、がん細胞の皮下移植により腫瘍を形成しているマウスにアジスロマイシンを経口投与することで、抗腫瘍効果を発揮することを示しました。本来、抗菌薬として臨床使用されているアジスロマイシンには強力な抗腫瘍効果は当然ありません。しかし、オートファジー阻害活性に着目すると、様々ながんの分子標的薬や抗がん剤との併用により抗腫瘍効果を強力に増強することが先行研究で

示されています。それゆえ、阻害活性が高くより安全なオートファジー阻害剤が臨床の現場では求められています。本研究は、今後のオートファジーと細胞骨格タンパク質との関連性に関する基礎研究やアジスロマイシンのオートファジー阻害剤としての臨床応用展開に重要な足掛かりとなる研究成果と考えられます。

【掲載誌名・DOI】

掲載誌名：British Journal of Cancer

DOI：10.1038/s41416-023-02210-4

【論文タイトル】

Azithromycin, a potent autophagy inhibitor for cancer therapy, perturbs cytoskeletal protein dynamics

【著者】

Naoharu Takano*, Masaki Hiramoto, Yumiko Yamada, Hiroko Kokuba, Mayumi Tokuhisa, Hirotosugu Hino, and Keisuke Miyazawa* (*責任著者)

【主な競争的研究資金】

- ・ 文部科学省 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 (S1411011)
- ・ 科研費 (17K15031, 20K07298)
- ・ AMED 橋渡し研究戦略的推進プログラム (JP18lm0203004)
- ・ 公益財団法人 東京医科大学がん研究事業団

【関連 HP】

東京医科大学 (生化学分野内) 分子標的探索センター

<https://www.tokyo-med.ac.jp/target/>

○研究内容に関するお問い合わせ先

東京医科大学 生化学分野 主任教授 宮澤啓介

TEL：03-3351-6141 (代表)

E-mail：miyazawa@tokyo-med.ac.jp

東京医科大学 生化学分野 准教授 高野直治

TEL：03-3351-6141 (代表)

E-mail：ntakano@tokyo-med.ac.jp

○取材に関するお問い合わせ先

学校法人東京医科大学 企画部 広報・社会連携推進室

TEL：03-3351-6141 (代表)

E-mail：d-koho@tokyo-med.ac.jp