

博士論文（要約）

コハク酸デヒドロゲナーゼ **B** 及びカテプシン **D** を
患者層別バイオマーカーとしたがん創薬研究

平成 29 年度

北澤 諭

序論

1. がん創薬研究における患者層別バイオマーカーの重要性と製薬企業におけるがん標的分子の探索

近年、がん領域における医薬品の開発において求められる有効性の水準は高まり、新しい抗がん薬の研究開発はますます困難になってきている。また、抗がん薬の開発コストは上昇を続け、製薬企業にとって大きな負担となっている。抗がん薬の臨床試験は、まず少数の患者を対象とし、人への安全性や薬物動態を調べる第 1 相試験、中規模の患者層で有効性や安全性を確認する第 2 相試験、大規模に有効性と安全性を検証する第 3 相試験が行われ、良好な試験結果が得られれば、厚生労働省へ承認申請が行われる。一般的に研究開発の中でも最も費用のかかる第 2 相から第 3 相試験の成功確率を高めることが最重要課題である。大手製薬メーカーのアストラゼネカ社は、同社が 2005 年から 2010 年に行ったがん領域を含む全疾患での低分子薬の開発で、薬の用量反応性などを検証する後期第 2 相試験（フェーズ 2b）において、高い信頼性で患者の層別化ができたプロジェクトのうち 90%は進行中（残りの 10%は中止）であるのに対して、患者の層別化の信頼性が低いプロジェクトのうち 78%は臨床効果が示せず、プロジェクトが中止に至ったと報告している[1]。また、抗がん薬開発において、患者層別バイオマーカーを利用しない試験では第一相試験開始から承認までの成功確率は僅か 5%程度であるが[2]、主に患者層別バイオマーカーを利用したキナーゼ阻害剤の臨床試験の相移行確率と成功確率はより高いことも報告されている[3]。よって、患者層別バイオマーカーを利用して、あらかじめ投与対象患者を適切に層別化することで、医薬品の臨床開発の効率を引き上げ、安全性、有効性の高い抗がん薬開発が可能になると考えられる[4]。実際、治療選択肢として EGFR 阻害薬や ALK 阻害薬など様々な分子標的薬が存在する非小細胞肺癌では EGFR 変異や ALK 再構成の同定試験は必須となっている[5, 6]。

本研究では、この患者層別バイオマーカーを製薬会社における探索研究の段階から重要視し、標的とするがんに特異的に薬効を示す化合物及び既存の抗がん作用をもつ化合物に高い感受性を示す特定のがんの探索と、そのメカニズムの解明を試みた。

2. SDHB 欠損がんにおける創薬標的経路の探索

コハク酸デヒドロゲナーゼ (Succinate Dehydrogenase, SDH) は SDHA, SDHB, SDHC, SDHD の 4 つの Subunit から構成され、ミトコンドリアの TCA サイクル及び、電子伝達系酵素複合体 (Mitochondrial Complex II) の両方で働く重要な分子である。SDH それぞれのサブユニットをコードする遺伝子配列における不活性型ミスセンス変異や、Loss of Heterogeneity (LOH)、それらに伴う活性や発現の低下は家族性褐色細胞腫や家族性傍神経節腫の原因となり [7-12]、また Gastrointestinal stromal tumors (GIST)、腎がん、大腸がんや胃がん、卵巣がんなどで高頻度に検出されることから [13-22]、SDH はがん抑制遺伝子として考えられている。SDH Subunit の中でもがんにおける変異は SDHB 遺伝子に特に多く見られ [16, 23]、SDHB 変異を持つがんは悪性度が高く [11]、予後不良のケースが多い [12]。しかしながら、SDH 欠損がんにおける有効な治療薬は確立されておらず、SDH 欠損がんを標的とした新規治療薬のニーズが高いと考えられる。また、このような薬剤の開発は SDHB に欠損があるがんを層別化することにより、高い成功確率を有するスキームをとることが可能となる。SDHB 変異を持つがんに有効な薬剤を開発するためにはそのがんの特性を理解する必要がある。しかし、SDHB を欠損しているがん細胞が生存のために代謝をどのように変化して、適応しているかは完全には解明されていない。

これまでの報告で、SDHB 変異がんや SDHB を実験的に欠損させた細胞ではミトコンドリア Complex II 活性の低下や酸素消費速度の低下など、ミトコンドリア機能の低下をきたすことが報告されている [24, 25]。また、SDH 欠損がんでは基質であるコハク酸が蓄積し、それが HIF- α プロリン水酸化酵素を阻害した結果、HIF-1 α の安定化及び活性化を導くことや [24-27]、SDH 欠損の結果、蓄積したコハク酸が α -ケトグルタル酸依存的なヒストン及び DNA 脱メチル化酵素を阻害することで DNA 過剰メチル化をもたらすことが知られている [27, 28]。さらに、SDHB ノックアウト細胞では、Pyruvate Carboxylase(PC)の活性化が見られ、グルコース由来炭素源のアスパラギン酸合成への利用を活性化した PC を介して補っており、SDHB ノックアウト細胞増殖は PC に依存することが報告されている [29, 30]。

Cardaci や Lussey-Lepoutre のグループなどにより、SDHB 欠損細胞モデルの解析は盛んに行われているが、これらの研究はマウス正常細胞を用いた検討であり、実際に SDHB を欠損しているヒトのがん細胞が生存のために代謝をどのように変化させ、適応しているかは解明されていない。そこで、我々は SDHB の下方制御が臨床で報告されているヒト大腸がんの細胞株を用いて [20]、CRISPR/Cas9 ノックアウトシステムにより SDHB 欠損モデルの細胞株を樹立し、SDHB 欠損がんの代謝パターンなどの特性を評価した。SDHB 欠損

がんの特性を明らかにすることで、SDHB 欠損がんの増殖の依存性（脆弱性）の探索、即ち SDHB 欠損がんにおける新規創薬標的分子の同定を試みた。

3. V-ATPase 阻害薬の治療効果を予測する患者層別バイオマーカーの探索

Vacuolar (H⁺)-ATPase (V-ATPase) は、ATP を加水分解する細胞質内 V1 ドメインとプロトン細胞質から内腔に移行させる膜貫通型 V0 ドメインを持ち、複数のサブユニットで構成される ATP 依存性プロトンポンプである[31, 32]。ATP の加水分解エネルギーを用い、V-ATPase はプロトン細胞内腔に輸送し、内腔の pH を酸性に維持する[33]。V-ATPase は、リソソーム、エンドソーム、分泌小胞などの様々な細胞内のコンパートメントに存在し、膜輸送、タンパク質プロセッシング、およびタンパク質分解において機能する[34, 35]。

V-ATPase は、腫瘍の微小環境を酸性に維持することも重要な役割を果たし、多くの種類の転移性がんにおいて過剰発現が認められる [36]。V-ATPase は、オートファジー[37]や腫瘍の重要な栄養素である細胞外液の取り込み（エンドサイトーシス）に働くので、これは腫瘍の重要な栄養源となる[38, 39]。V-ATPase 阻害剤は、肺癌細胞においてマクロピノサイトーシスによる FITC-アルブミン取り込みを直接的に阻害したり[38]、膵臓がん細胞においてマクロピノサイトーシスによるアルブミンの分解を直接阻害する[39]。また、V-ATPase 阻害剤は、分解した血清タンパク質に由来する細胞内アミノ酸レベルを低下させ[40]、アミノ酸によって誘導される mTOR 活性化を阻害する[41, 42]。さらに、V-ATPase 発現は化学療法剤によって誘導され、化学療法抵抗性がん細胞で亢進することも報告されている[43, 44]。

これらの知見は、V-ATPase ががんの魅力的な治療標的であることを示している。いくつかの前臨床試験に関する報告では、V-ATPase 阻害剤の抗腫瘍効果を示しているが[45-48]、Koltani らの報告[49]でも議論されているように、V-ATPase 阻害薬の毒性が強いため、抗がん剤としてのヒトへの臨床的使用は未だ実現されていないと考えられる。しかしながら、V-ATPase 阻害に対する高感受性がんを選別することができれば、新しいがん治療選択肢となりうると考えられる。我々は、患者層別バイオマーカーを用いて V-ATPase 阻害剤を開発することができれば、特定のがん患者にとって大きな利点をもたらすことができ、V-ATPase 阻害剤の臨床開発における成功確率を高めることができると考えた。本研究では、V-ATPase 阻害剤に対する様々ながん細胞株の感受性を調べ、V-ATPase 阻害剤

の感受性を規定するマーカーを探索した。

4. 研究の目的

本研究では、**SDHB** 欠損モデルの細胞株を樹立し、**SDHB** 欠損がんの特性を明らかにし、**SDHB** 欠損がんにおける新規創薬標的分子の同定を試みた。また、**V-ATPase** 阻害剤に対する様々ながん細胞株の感受性を解析し、**V-ATPase** 阻害剤の感受性マーカーを探索した。これらにより、患者層別バイオマーカーを利用した医薬品の臨床開発のための分子基盤を構築することを目的とした。

材料と方法

1. SDHB 欠損がんにおける創薬標的経路の探索

1.1 細胞株

ヒト大腸がん細胞株 HCT-116 およびヒト腎がん細胞株 Caki-2 は、American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) より購入した。HCT-116 細胞は 10% ウシ胎児血清 (Fetal Bovine Serum : FBS) (HyClone, SH30071.03) 含有 McCoy's 5A (ギブコ) で、Caki-2 細胞は 10% FBS 含有 RPMI-1640 (和光純薬工業、189-02025) で、37°C、5% CO₂ 環境下で培養した。

1.2 SDHB ノックアウト細胞株の樹立

HCT116 細胞を 1.5×10^4 cells/3 ml/well で 6 ウェルプレート (コーニング) に播種し、一晚培養後に培地を交換した。SDHB CRISPR/Cas9 ノックアウトプラスミド (サンタクルーズ) 及び SDHB homology directed repair (HDR) Plasmid (サンタクルーズ, sc-401529-HDR) を 1 µg ずつ、150 µl の Opti-MEM (ギブコ) 中で混合し、Lipofectamine 2000 (サーモフィッシャーサイエンティフィック) 8 µl を含む Opti-MEM と 1:1 で混合した。室温で 20 分放置した後、HCT116 細胞に SDHB ノックアウトプラスミドを添加、導入した。コントロール CRISPR/Cas9 プラスミド (サンタクルーズ) についても同様に、HCT116 細胞に導入した。48 時間後、ピューロマイシン (シグマ) を 2 µg/ml で加え、1 週間細胞の選択を行った。SDHB ノックアウトプラスミドを導入した細胞の一部はこの時点でポリクローンとして回収した。96 ウェルプレート (コーニング) に 1 cell/100 µl/well になるように播種し、シングルクローン由来の細胞が増えたウェルについて細胞を回収し、ウェスタンブロッティング法により SDHB のタンパク質発現を確認した。ρ0 細胞のようなミトコンドリア電子伝達機能の欠損細胞は、ウリジンおよびピルビン酸の添加なしでは増殖できないとの報告より [50]、細胞の培養液には 10% FBS 含有 McCoy's 5A に 1 mM ピルビン酸ナトリウム (ギブコ) と 0.05 mg/ml ウリジン (シグマ) を加えたものを使用した。

1.3 ゲノム DNA の抽出とゲノム DNA の SDHB コピー数解析

ゲノム DNA は QIAmp DNA Mini Kit (キアゲン) で、プロトコールに従って抽出した。

抽出した DNA は、ND-1000 spectrophotometer (Nano Drop Technologies)を用いて、品質チェックと DNA 濃度測定を行った。

TaqMan® Universal PCR Master Mix (アプライドバイオシステムズ, 4304437) に 50 ng のゲノム DNA とアプライドバイオシステムズ社 Custom TaqMan® Assay Design Tool (<https://www5.appliedbiosystems.com/tools/cadt/>) で設計した SDHB プライマーとレポータープローブを混合した反応液を 1 反応分加えた。内部標準として TaqMan® RNase P コントロール Reagents Kit (サーモフィッシャーサイエンティフィック) を用い、ゲノム DNA の SDHB コピー数を測定した。定量 PCR (qPCR) は 95°C で 10 分間を 1 サイクル、その後 95°C で 15 秒間、60°C で 60 秒間を 40 サイクルの条件で ViiA7 Real-time PCR system (アプライドバイオシステムズ) を用いて行った。ゲノム DNA の定量には相対定量法を用い、サンプル間の相対ゲノム DNA コピー数を比較した。それぞれのプライマー配列とレポータープローブ配列は以下の通りである。

- ・ SDHB exon2 ノックアウトサイトのプライマー配列 (forward 5'-CCCCGTATCAAGAAATTTGCCATCT-3'; reverse 5'-GTCTGCATATGAGGTTTGTCTCCA-3')、レポータープローブ配列 (5'-ATCGATGGGACCCAGACAA-3')
- ・ SDHB exon3 のプライマー配列 (forward 5'-CCCCATGGTATTGGATGCTTTAATC-3'; reverse 5'-CTCTGCATGATCTTCGGAAGGT-3')、レポータープローブ配列 (5'-AAGTAGAGTCAACTTCATTCTT-3')
- ・ ピューロマイシン配列 (forward 5'-ACCACGCCGGAGAGC-3'; reverse 5'-CCGGGAACCGCTCAACTC-3')、レポータープローブ配列 (5'-ACACCGCCCCCGCTTC-3')

1.4 PCR、アガロースゲル電気泳動及びシーケンシング解析

SDHB exon2 ノックアウトサイトに跨るように設計した Forward プライマー (5'-ATCCAGCGTTACATCTGTTGTGCCAGCAAAATGG-3') と Reverse プライマー (5'-GTCTTGAACCTCCCAACCTCAGATGATCTGCCCCG-3')、KOD Fx Neo (東洋紡、KFX-201) を用いて、ゲノム DNA を PCR 法で増幅した。PCR は 94°C 2 分で初期変性を行い、94°C 15 秒、61°C 30 秒、68°C 30 秒を 30 サイクルで行った。増幅したゲノム DNA をアガロース XP (和光純薬工業) を用いて作成した 2% アガロースゲルで泳動し、DNA バンドを確認した。目的

のサイズのゲルを切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit（キアゲン）を用いてプロトコール通りにゲルを精製した後、シーケンス解析を依頼した（ファスマック）。

1.5 SDHB 細胞の増殖試験

SDHB ノックアウト細胞株の樹立の際と同じ培養液を用いて、HCT116 コントロール細胞、SDHB ノックアウト細胞を 3000 cell/100 μ L/well で 96 ウェルプレート（コーニング）に播種し、Day 0 から Day 4 の細胞増殖を Cell Titer-Glo® Luminescent Cell Viability Assay（プロメガ）を用い、プロトコルに従って測定した。

1.6 ウェスタンブロッティング

細胞を Phosphate-buffered saline (PBS)（和光純薬工業）で洗浄後、62.5 mM Tris-HCl（和光純薬工業）、10%グリセロール（和光純薬工業）、1% SDS（和光純薬工業）で作製した細胞溶解液で溶解し、100°Cで 5 分間加熱した。BCA™ Protein Assay Kit（サーモフィッシャーサイエンティフィック）でタンパク質定量を行い、3-Mercapto-1,2-propanediol（和光純薬工業）を用いて、サンプルを調整した。タンパク質量を揃えたサンプルを、7.5-15%の SDS-PAGE ゲル(DRC)で電気泳動した後、ゲル中のタンパク質を PVDF メンブレン（和光純薬工業）に転写した。ブロックエース(DS ファーマバイオメディカル)或いは Starting Block T20 (PBS) Blocking Buffer（サーモフィッシャーサイエンティフィック）でメンブレンをブロッキングした後、 β -actin、MDH1、OGDH 抗体は 10%ブロックエースを含む 1 \times PBST（1 \times PBS に 0.2% Tween 20（和光純薬工業）を添加）で希釈し、4°Cで一晩反応させた。それ以外の抗体は Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution（東洋紡）で希釈し 4°Cで、一晩反応させた。1 \times PBST で洗浄後、1:2000 で同様に希釈した HRP 結合抗マウスイムノグロブリン(eBioscience)或いは HRP 結合抗ウサギイムノグロブリン(eBioscience)を室温で 1 時間反応させ、ImmunoStar Zeta（和光純薬工業）或いは ImmunoStar LD（和光純薬工業）を用いて、LAS-3000 image analyzer（富士フイルム）でタンパク質強度を測定した。バンド強度は Multi Gauge Ver. 3.1(富士フイルム)を用いて、数値化した。抗体は以下のものを使用した。anti-SDHB (マウスモノクローナル、アブカム、ab14714、1:5000)、anti-SDHA (ウサギポリクローナル、アブカム、ab66484、1:5000)、anti- β -actin (HRP conjugate、ウサギモノクローナル、Cell Signaling Technology、#5125、1:5000)、anti-pyruvate dehydrogenase (ウサギポリクローナル、Cell Signaling Technology、

#2784、1:5000)、anti-pyruvate carboxylase (ウサギモノクローナル、アブカム、ab126707、1:5000)、anti-glutaminase 1 (マウスモノクローナル、アブカム、ab60709、1:5000)、anti-クエン酸 synthase (ウサギモノクローナル、Cell Signaling Technology、#14309、1:5000)、anti-iso クエン酸 dehydrogenase 1 (IDH1) (ウサギモノクローナル、Cell Signaling Technology、#8137、1:5000)、anti-oxoglutarate dehydrogenase (OGDH) (ウサギポリクローナル、Cell Signaling Technology、#13407、1:5000)、anti-dihydrolipoamide S-succinyltransferase (DLST) (ウサギモノクローナル、Cell Signaling Technology、#11954、1:5000)、anti-succinyl-CoA synthetase (ウサギポリクローナル、Cell Signaling Technology、#5557、1:5000)、anti-fumarase (ウサギモノクローナル、Cell Signaling Technology、#4567、1:5000)、anti-malate dehydrogenase 1 (MDH1) (ウサギモノクローナル、アブカム、ab181091、1:5000)、anti-MDH2 (ウサギモノクローナル、Cell Signaling Technology、#11908、1:5000)、anti-glutamic-oxaloacetic transaminase 2 (GOT2) (ウサギポリクローナル、Protein Tech、14800-1-AP、1:5000)、anti-PHGDH (マウスモノクローナル、アブカム、ab57030、1:1000)、anti-PSAT1 (マウスポリクローナル、Abnova Corporation、H00029968-A01、1:1000)、anti-phosphoserine phosphatase (PSPH) (ウサギポリクローナル、シグマ、HPA020376、1:1000)、anti-c-Myc (ウサギモノクローナル、Cell Signaling Technology、#5605、1:5000)及び anti-cleaved PARP (ウサギモノクローナル、Cell Signaling Technology、#9541、1:5000)。

1.7 酸素消費速度 (Oxygen Consumption Rate : OCR) と細胞外酸性化速度 (Extracellular Acidification Rate : ECAR) の測定

HCT116 細胞株をコラーゲンコートした XF 細胞培養マイクロプレート (Seahorse) に 5×10^3 cells/well で播種し、24 時間培養した。25 mM グルコース、1 mM ピルビン酸ナトリウム、2mM Glutamax が入った XF アッセイ培養液 (pH 7.4, Seahorse) に置換し、1 時間 CO₂ フリーインキュベーターで培養した。その後、細胞外フラックスアナライザー XF96 (Seahorse) を用いて ECAR 及び OCR の測定を行った。なお、細胞数は CyQUANT® Cell Proliferation Assay Kit (サーモフィッシャーサイエンティフィック) を用いて計測し、細胞数で補正を行った。

1.8 キャピラリー電気泳動-質量分析計 (CE-MS) を用いた代謝物解析

McCoy's 5A に 10% FBS、1 mM ピルビン酸ナトリウムと 0.05 mg/ml ウリジンを加えた培養液を用いて、HCT116 コントロール細胞、SDHB ノックアウト細胞を 8×10^5 cells/10 ml/plate で 10cm ディッシュ（コーニング）に播種し、48 時間、96 時間後に 5% D-マンニトール（和光純薬工業）で洗浄後、メタノール（和光純薬工業）で代謝物を抽出し、回収した。クロロフォルム（和光純薬工業）を用いて精製後、慶応義塾大学、先端生命科学研究所、曾我朋義研究室にて、論文に記載された通りの方法で、キャピラリー電気泳動-質量分析計（CE-MS）を用いて代謝物濃度の測定及び解析を行った[51]。

1.9 安定同位体標識グルコーストレーサー($^{13}\text{C}_6$ -グルコース)、グルタミントレーサー($^{13}\text{C}_5$, $^{15}\text{N}_2$ -グルタミン)を用いたターンオーバー解析

10% FBS 添加 RPMI-1640（和光純薬工業，189-02025）を用いて、HCT116 コントロール細胞、SDHB ノックアウト細胞を 1×10^6 cells/10 ml/plate で 10cm ディッシュ（コーニング）に播種した。一晚培養後、グルコーストレーサー解析用サンプルは、グルコースを含まない RPMI-1640（和光純薬工業，185-02865）に 10% FBS 及び 2 g/L $^{13}\text{C}_6$ -グルコース (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.)を加えた培地に置換し、所定時間培養した。グルタミントレーサー解析用サンプルはグルタミンを含まない RPMI-1640(和光純薬工業，183-02165)に 10% FBS 及び 300 mg/L $^{13}\text{C}_5$, $^{15}\text{N}_2$ -グルタミン (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.)を加えた培地に置換し、所定時間培養した。生理食塩水（大塚製薬）で洗浄後、メタノールを用いて代謝物を抽出し、Agilent 7200 Accurate-Mass Quadrupole Time-of-Flight (Q-TOF) GC/MS（アジレント）を用いて代謝物測定及び解析を行った。

1.10 SDHB 細胞のグルコース或いはグルタミン除去培地での感受性試験

SDHB ノックアウト細胞株の樹立の際と同じ培養液を用いて、HCT116 コントロール細胞を 2500 cell/100 μL /well で、SDHB ノックアウト細胞を 3500 cell/100 μL /well で 96 well プレート（コーニング，3903）に播種した。一晚培養後、グルコース除去感受性試験では、RPMI-1640（和光純薬工業，189-02025）とグルコース不含 RPMI-1640（和光純薬工業，185-02865）を用いて、通常培地でのグルコース濃度である 2 g/L グルコース添加培地（+Glc）、1 g/L グルコース添加（+1/2 Glc）、グルコース無添加（-Glc）培地中で各細胞を 4 日間培養し、Cell Titer-Glo® Luminescent Cell Viability Assay（プロメガ）で細胞生存性を測定した。グルタミン除去感受性試験では、RPMI-1640（和光純薬工業，189-02025）と

グルタミン不含 RPMI-1640（和光純薬工業，183-02165）を用いて、通常培地でのグルタミン濃度である 300 mg/L グルタミン添加培地(+Gln)、150 mg/L グルタミン添加(+1/2 Gln)、グルタミン無添加(-Gln)培地中で各細胞を 4 日間培養し、Cell Titer-Glo® Luminescent Cell Viability Assay（プロメガ）で細胞生存性を測定した。

1.11 SDHB 細胞の薬物反応性試験

SDHB ノックアウト細胞株の樹立の際と同じ培養液を用いて、HCT116 コントロール細胞を 2500 cell/100 μ L/well で、SDHB ノックアウト細胞を 3500 cell/100 μ L/well で 96 well プレート（コーニング）に播種した。一晚培養後、所定の濃度の 2-deoxy-D-glucose（シグマ）、phenformin（和光純薬工業）、dehydroepiandrosterone（東京化成）、5-pentadecylresorcinol（シグマ）、CBR-5884 (Focus Biomolecules)、NHI-2 (Focus Biomolecules)、Compound 968 (論文報告の通りに合成 [52])、CB-839 (Selleck Chemicals)、JQ1 (論文報告の通りに合成[53])、I-BET151 (論文報告の通りに合成[54])、I-BET762 (論文報告の通りに合成[55])、PFI-1 (論文報告の通りに合成[56])を添加し、4 日後に細胞の生存性を Cell Titer-Glo® Luminescent Cell Viability Assay で測定した。細胞増殖阻害カーブは対照細胞のパーセンテージとしてプロットし、50%の細胞増殖阻害率 (GI_{50}) を GraphPad Prism version 6 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA)を用い、variable slope を有するシグモイド曲線を描くことで算出した。JQ-1 処理時のタンパク質発現解析では、記載した濃度の JQ-1 を細胞播種の 24 時間後に添加し、38 時間培養し、免疫ブロッティングを行った。

1.12 RNA 干渉実験

Caki-2 細胞を 96 ウェルプレート（コーニング）に 2000 cells/100 μ L/well で播種し、10 nM の Silencer Select Predesigned SDHB siRNA (siSDHB、s12653、サーモフィッシャーサイエンティフィック) 或いは Silencer Select ネガティブコントロール siRNA #2（サーモフィッシャーサイエンティフィック）を Dharmafect 1 トランスフェクション試薬（GE Healthcare Dharmacon）を用いて導入した。48 時間後、種々濃度の JQ-1 を添加し、3 日後に細胞の生存性を Cell Titer-Glo Luminescent Cell Viability Assay で評価した。Caki-2 細胞を 6 well プレートに 6×10^4 cells / 2 mL /well で播種し、同様の方法で 10 nM の siSDHB 或いはネガティブコントロール siRNA を導入し、48 時間後に細胞を回収し、

siSDHB のノックダウン効率をウエスタンブロッティング法で確認した。

1.13 統計解析

HCT116 コントロール細胞と SDHB ノックアウト細胞 #7 との間の p 値はスチューデント t 検定によって検定した。細胞増殖試験におけるコントロール群と薬剤治療群との間の差異は、Williams 法によって検定した。スチューデント t 検定では 0.05 未満、Williams 法では 0.025 未満の p 値を統計的に有意であるとした。多重試験を考慮して、HCT116 SDHB ノックアウト細胞 #7、#23 とコントロール細胞との間の値はボンフェローニの補正を行い、算出した。

結果と考察

1. SDHB 欠損がんにおける創薬標的経路の探索

1.1 SDHB ノックアウト細胞株の樹立

2 倍体で 2 コピーの SDHB を持つ HCT116 細胞株において、CRISPR/Cas9 ノックアウトプラスミドを導入し、2 つのシングルクローンの SDHB homogenous ノックアウト細胞 (SDHB ノックアウト細胞#7 及び SDHB ノックアウト細胞#23) のゲノムにおける SDHB Exon2 ノックアウトサイトのコピー数を qPCR により調べると、コントロールベクターを導入した HCT116 細胞 (コントロール細胞) と比べて、シングルクローン化する前のポリクローンでは僅かに減少し、SDHB ノックアウト#7 及び SDHB ノックアウト#23 ではそのコピー数が半減していた (図 1A)。一方でノックアウトサイトではない SDHB Exon3 のコピー数はそれぞれの細胞間で差はなく、また相同性配向型修復 (Homology Directed Repair, HDR) プラスミドにより挿入されるピューロマイシン耐性遺伝子が、SDHB ノックアウト細胞#7 及び SDHB ノックアウト細胞#23 で検出された。SDHB Exon2 ノックアウトサイトのゲノムを PCR により増幅し、アガロースゲル泳動で増幅産物量を確認すると、SDHB ノックアウト細胞#7 及び SDHB ノックアウト細胞#23 では SDHB Exon2 ノックアウトサイトの増幅産物量が半分程度減少していた (図 1B)。そこで、シーケンシングにより SDHB ノックアウト細胞#7 及び SDHB ノックアウト細胞#23 の Exon2 のゲノム配列を調べると、SDHB Exon2 の 62 から 63 番目の塩基の間にアデニンが挿入されており、その結果として終始コドン (TAA) が形成されていた (図 1C)。以上より、SDHB ノックアウト細胞#7 及び SDHB ノックアウト細胞#23 の一つの対立遺伝子はノックアウトされた箇所に HDR プラスミドが挿入され、もう一方の対立遺伝子はノックアウトされた箇所に偶然終始コドン (TAA) が形成されていることが分かった (図 1D)。2 本の対立遺伝子がノックアウトされた SDHB ノックアウト細胞#7 と#23 は、実際にタンパク質レベルで SDHB の発現が消失していることから (図 1E)、目的の SDHB ノックアウト細胞株が樹立できた。SDH の別のサブユニットである SDHA の発現は影響を受けていないことも確認できた (図 1E)。

1.2 SDHB ノックアウト細胞株の特性評価

細胞播種 48、96 時間後のコントロール細胞と SDHB ノックアウト細胞#7 及び#23 の代

謝物をキャピラリー電気泳動-質量分析計 (CE-MS) を用いて調べると、コントロール細胞と比べて SDHB ノックアウト細胞では SDH の基質であるコハク酸の明確な蓄積と、生成物であるフマル酸の顕著な低下が認められた (図 2A)。TCA サイクルにおけるその他の生成物を見てみると、リンゴ酸、クエン酸、イソクエン酸、アコニット酸、 α -ケトグルタル酸など好気代謝に関わる代謝産物量は軒並み低下していた (図 2B)。一方で、コントロール細胞と比べて SDHB ノックアウト細胞において、顕著なピルビン酸の減少と解糖系代謝の活性化を示唆する乳酸の蓄積が認められた (図 2C)。また SDHB ノックアウト細胞における著しい酸素消費速度 (OCR) の減少と細胞外酸性化速度 (ECAR) の上昇が認められた (図 2D)。それぞれの細胞をコンフルエントまで培養すると、SDHB ノックアウト細胞 #7 及び #23 では培地の色が黄色に変化することが分かり、これは蓄積された細胞内乳酸が培地中に排出され、培地の pH が低下した結果と考えられ (図 2E)、実際に SDHB ノックアウト細胞 #7 の細胞外乳酸濃度の方が、コントロール細胞のそれと比べて有意に高かった (図 2F)。以上より、SDHB が欠損した細胞ではミトコンドリア呼吸即ち好気代謝が低下し、代償的に解糖系代謝が亢進する“代謝スイッチ”が起きていることが明らかとなった。それぞれの細胞の増殖速度を Cell-titer glo assay で比較すると、コントロール細胞は細胞播種 4 日後、約 17 倍増殖しているのに対して SDHB ノックアウト細胞は 6 倍弱と、増殖速度はコントロール細胞と比べて遅いことが分かった (図 2G)。

SDHB ノックアウト細胞で亢進している解糖系代謝の中で、どの経路が特に変化しているか、解析した代謝物を調べてみると、解糖系代謝経路の模式図 (図 2H) 中で特に変化の大きかったものは Glucose-6-Phosphate、Fructose-6-Phosphate、Fructose-1,6-bisphosphate、Glyceraldehyde-3-Phosphate などの解糖系代謝の上流や 6-Phosphogluconate、Ribulose-5-Phosphate、Ribose-5-Phosphate、Sedoheptulose 7-Phosphate などのペントースリン酸経路 (Pentose Phosphate Pathway : PPP) の代謝物が SDHB ノックアウト細胞で軒並み増加していた (図 2H)。一方、3-phosphoglycerate から下流の解糖系代謝産物レベル (3-phosphoglycerate, 2-phosphoglycerate と Phosphoenol pyruvate) はほとんど変化がなかった (図 2H)。Dihydroxyacetone phosphate、Glycerol-3-Phosphate の代謝物も増加していたため、SDHB ノックアウト細胞における解糖系由来のリン脂質合成経路の亢進も示唆された (図 2H)。また、SDHB ノックアウト細胞では、セリンレベルも 48 時間で顕著に増加し (図 2H)、セリン生合成に働く phosphoglycerate dehydrogenase (PHGDH) 及び phosphoserine aminotransferase 1

(PSAT1)のタンパク質発現レベルが、SDHB ノックアウト細胞 #7 と #23 において亢進していたため (図 2I)、SDHB ノックアウト細胞におけるセリン生合成経路の活性化が示唆された。以上より、SDHB ノックアウト細胞ではミトコンドリア好気性代謝が抑制されていることで、解糖代謝やその周辺の代謝経路が代償的に亢進することが示唆された。

1.3 SDHB ノックアウト細胞株の解糖系代謝依存

ECAR と OCR の結果や代謝物解析結果より、SDHB ノックアウト細胞では好気代謝が抑制され、解糖系代謝が亢進していることが分かったため、解糖系代謝に SDHB ノックアウト細胞増殖が実際に依存するかどうかを解析した。培地中のグルコースの除去及びグルコースのアナログで HK2 阻害剤である 2-Deoxy-Glucose (2DG) への感受性を解析すると、SDHB ノックアウト細胞はコントロール細胞と比べて培地中のグルコースの除去及び 2-DG に対して、高い感受性を示した (図 3A, B)。一方、ミトコンドリア Complex I 阻害薬である Phenformin 処理によりコントロール細胞では増殖抑制効果が見られたが、SDHB ノックアウト細胞の増殖はほとんど影響を受けなかった (図 3C)。以上より、TCA サイクルの機能が阻害されている SDHB ノックアウト細胞では解糖系代謝が亢進し、SDHB ノックアウト細胞の増殖はその解糖系代謝に強く依存していることが示唆された。

次に、SDHB ノックアウト細胞で代謝物量或いは代謝動態に変化のあった PPP、リン脂質合成経路、セリン合成経路の阻害剤である G6PD 阻害剤 (Dehydroepiandrosterone)、GPD1/2 阻害剤 (5-Pentadecylresorcinol) や PHGDH 阻害剤 (CBR-5884) に対する SDHB ノックアウト細胞の感受性を解析したが、SDHB ノックアウト細胞のこれらの薬剤に対する感受性はコントロール細胞とほぼ同等か僅かに非感受性を示した (図 3D-F)。また、ピルビン酸を基質として乳酸を生成する反応を担う LDHA の阻害剤 (NHI-2) に対しても、コントロール細胞と SDHB ノックアウト細胞の感受性は差なかった (図 3G)。SDHB ノックアウト細胞増殖は PPP や解糖系由来のリン脂質合成経路或いはセリン生合成経路ではなく、解糖系代謝そのものに依存し、その中でもピルビン酸よりも上流の反応経路に強く依存していることが示唆された。

1.4 SDHB ノックアウト細胞株における TCA サイクルへのグルコース由来炭素源の寄与

次に SDHB ノックアウト細胞でのグルコース由来の炭素源の TCA サイクルでの利用について検討した。図 4A に示すように、グルコース由来の炭素源はピルビン酸に変換され、

Pyruvate dehydrogenase (PDH) 及び Pyruvate Carboxylase (PC) を介して 2 つの異なる経路で TCA サイクルに入る。PDH を介した代謝産物であるコハク酸(m + 2)の割合は、SDHB ノックアウト細胞およびコントロール細胞の両方で時間と共に増加することから、PDH を介したグルコース由来の炭素源の TCA サイクルへの流入が確認できた (図 4B)。SDH の status から予想した通り、SDHB ノックアウト細胞ではコントロール細胞と比べて、PDH を介した SDH 生成物フマル酸(m + 2)は明確に減少しており、SDH の基質であるコハク酸(m + 2)は顕著に上昇していた (図 4B)。一方で、PC を介したフマル酸(m + 3)やコハク酸(m + 3)の割合はコントロール細胞でフマル酸(m + 2)、コハク酸(m + 2)と比べて低いことより PC を介した反時計回りのグルコース由来炭素源の流れの寄与は PDH を介したもののより少ないことが分かった (図 4B, C)。しかしながら、SDHB ノックアウト細胞ではコントロール細胞と比べて、PC を介したリンゴ酸(m + 3)とアスパラギン酸(m + 3)の割合は同等かより高いことが分かった (図 4D)。さらに、SDHB ノックアウト細胞ではコントロール細胞と比べて、PDH 発現レベルは変わらないが PC 発現レベルが増加していることが認められた (図 4E)。以上の結果をまとめると、SDHB ノックアウト細胞では SDH 欠損の影響を補うために、PC の機能を増強することで TCA サイクルにおいて反時計回りの炭素源の供給経路を活性化させ、双方向に炭素を供給することで必要最小限の代謝産物量を維持していることが示唆された。

1.5 BET Bromodomain 阻害薬に対する SDHB ノックアウト細胞株の高感受性

化合物スクリーニングにより、Bromodomain and extra-terminal (BET) 阻害剤 JQ1 が SDHB ノックアウト細胞の増殖をコントロール細胞よりも強く抑制した (図 6A)。JQ1 は c-Myc を下方制御することが知られており、c-Myc は解糖系代謝及びグルタミノリシスを制御することが報告されているため、合理的な結果であると考えられる [57, 58]。SDHB ノックアウト細胞はコントロール細胞と比較して、JQ1 に対して GI₅₀ で 13 から 23 倍高い感受性を示した (図 5A)。また、I-BET151、I-BET762 及び PFI-1 の異なるケモタイプの BET 阻害剤も同様に SDHB ノックアウト細胞の増殖をコントロール細胞よりも強く阻害することが確認された (図 5B)。JQ1 処理によりアポトーシス誘導マーカーである Cleaved poly-(adenosine diphosphate ribose) polymerase (PARP) が、コントロール細胞よりも SDHB ノックアウト細胞においてより明確に誘導された (図 5C)。また腎細胞がん細胞株 Caki-2 においても、siRNA による SDHB ノックダウンが、JQ-1 に対する感受性を増強す

ることを確認した（図 5D, E）。

次に我々は、SDHB ノックアウト細胞における BET 阻害剤による c-Myc の下方制御と増殖抑制効果との関係について、検証した。SDHB ノックアウト細胞における c-Myc のタンパク質発現は、定常状態でコントロール細胞と比べて、65～87%と減弱しており（図 5C）、JQ1 処理により SDHB ノックアウト細胞における c-Myc 発現はコントロール細胞と比べて、より低濃度から強く下方制御を受けることが分かった（図 5C）。c-Myc は、Uridine diphosphate (UDP)-N-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc)が Thr58 に修飾される O-GlcNAc 化によって安定化されることが報告されている[59, 60]。UDP-GlcNAc レベルが、SDHB ノックアウト細胞において有意に減少し（図 5F）、それが SDHB ノックアウト細胞における定常状態の c-Myc レベルの低下または BET 阻害剤による c-Myc 発現のより顕著な下方制御をもたらした可能性が考えられる。

さらに、コントロール細胞及び SDHB ノックアウト細胞において、JQ-1 処理による細胞内代謝物の変化を調べた。解糖系代謝経路における代謝物に関しては、コントロール細胞及び SDHB ノックアウト細胞の間に顕著な差はなかったが（データは示さず）、JQ-1 処理後、フマル酸、リンゴ酸、アスパラギン酸及びクエン酸など、TCA サイクルにおける代謝物レベルが SDHB ノックアウト細胞よりもコントロール細胞においてより明確に増加した（図 5G）。TCA サイクル中で、Nicotinamide adenine dinucleotide(NADH) は NADH の酸化型の NAD^+ を基質として用いた反応により生成される。 NADH/NAD^+ 比はコントロール細胞では増加したが、SDHB ノックアウト細胞では同等或いは減少した（図 5G）。

1.6 考察

本研究において、SDHB ノックアウト細胞を樹立し、SDHB 欠損がんが TCA サイクル優位から解糖系優位へと代謝シフトを起こし、生存のために適応していることを明らかにし、SDHB 欠損がんは 2DG に高感受性を示すこと即ち、解糖系代謝に依存することを示した。これらの知見に加えて、標識されたグルコースを用いたトレーサー実験では、SDHB ノックアウト細胞が TCA サイクルでの必要最低限の代謝物量を維持するために、PC 発現レベルの増加することで、PDH および PC の両方の経路によってピルビン酸を代謝してコハク酸及びフマル酸を生成し、SDHB ノックアウト細胞は SDH 機能不全の影響を補っていることを示した。これらの結果は、Cardaci らや Lussey-Lepoutre らの報告と一致している[29][30]。

しかし、我々の結果では **SDHB** 欠損がんではグルコース由来炭素源の **PC** を介したアスパラギン酸(m + 3)への寄与は少なく、**SDHB** 欠損がん増殖における **PC** 依存的なアスパラギン酸合成の重要性を主張する上記 2 報とは異なる結果を得た。

我々の **SDHB** ノックアウト細胞では、グルタミンの還元的カルボキシル化は抑制されたが、**SDHB** 欠損による **SDH** 以下への流れは遮断しているにもかかわらず、コハク酸までの酸化のグルタミノリシスは活性化していた。これと一致して、コントロール細胞と比べて **SDHB** ノックアウト細胞において **Glutaminase1** の発現レベルが増加していた。グルタミノリシスにおけるグルタミンからコハク酸への変換の中で、**Adenosine triphosphate (ATP)** を生成するためのいくつかの酵素反応が含まれる。**α-Ketoglutarate dehydrogenase** による **α-ケトグルタル酸** から **Succinyl-CoA** を生成する反応では **NADH** が作られ、それがミトコンドリア電子伝達系に入り 3 分子の **ATP** が合成される。また、**Succinyl-CoA Synthetase** による **Succinyl-CoA** からコハク酸の生成反応で **ATP** が産生される。**SDHB** ノックアウト細胞はコントロール細胞と比べて **Glutaminase1** 阻害薬 **Compound 968** および **CB-839** に対して高い感受性を示したが、これは **TCA** サイクルを回せず **ATP** 産生効率の悪い **SDHB** ノックアウト細胞においては、酸化のグルタミノリシス活性化に伴う **α-Ketoglutarate dehydrogenase** や **Succinyl-CoA Synthetase** による **ATP** 産生が重要である可能性が考えられる。

化合物スクリーニングにより、**BET** 阻害剤 **JQ1** による **SDHB** ノックアウト細胞の特異的な増殖抑制が認められた。また、いくつかのケモタイプの **BET** 阻害剤でも **SDHB** ノックアウト細胞特異的な増殖抑制効果が示せたことより、この効果はオンターゲット効果である可能性が高いことが示唆された。**BET** 阻害剤が **c-Myc** 発現を下方制御し、**c-Myc** が解糖系代謝およびグルタミノリシスに関わる遺伝子発現を転写調節することが報告されているため、**BET** 阻害剤によるこの **SDHB** ノックアウト細胞特異的な増殖抑制効果は **c-Myc** 制御に関連していると考えられる [57, 58]。

JQ-1 処理後の **TCA** サイクルの代謝物（フマル酸、リンゴ酸、アスパラギン酸、クエン酸及び **NADH/NAD⁺**）の増加は、**SDHB** ノックアウト細胞よりもコントロール細胞においてより明確に観察された。これらのデータは、**TCA** サイクルの活性化が、**JQ-1** 処理後のコントロール細胞におけるレスキュー反応として起こった可能性を示唆している。**SDHB** ノックアウト細胞では、定常状態の代謝物レベルが低いため、そのレスキュー反応が十分ではないか、**TCA** 機能不全のためレスキュー反応が起こらず、適切な代謝物レベルに達し

なかったと推察される。このことより、**BET** 阻害剤による **SDHB** ノックアウト細胞の特異的の増殖抑制が起こった可能性が考えられる。

BET 阻害剤がコントロール細胞よりも **SDHB** ノックアウト細胞において **c-Myc** 発現をより明確に減少させることを示した。また興味深いことに、**SDHB** ノックアウト細胞ではコントロール細胞よりも定常状態で低い **c-Myc** タンパク質レベルを示していた。**BET** 阻害剤による **SDHB** ノックアウト細胞特異的な増殖抑制効果は、定常状態ではコントロール細胞と比べてやや減弱している **SDHB** ノックアウト細胞の **c-Myc** 発現が、**JQ1** 処理により低濃度から下方制御の影響を受けたことに起因すると考えられる。**SDHB** ノックアウト細胞における低い **c-Myc** タンパク質レベルは、解糖系代謝の亢進に関連している可能性が考えられる。**c-Myc** の安定化は **O-linked β -N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) transferase** による **Thr58** への **O-GlcNAcylation** によるものであるとの報告があり [59, 60]、その際に基質として用いられる **UDP-GlcNAc** はグルコースから生成される [60]。また、いくつかの種類のがん細胞株では培地中グルコースの除去により **c-Myc** タンパク質の安定性が低下することも報告されている [61]。**SDHB** ノックアウト細胞では、解糖系代謝が活性化しているため、より多くのグルコースを消費していることより、**SDHB** ノックアウト細胞では **UDP-GlcNAc** の欠如により **O-GlcNAcylation** および **c-Myc** の安定性が低下している可能性が考えられ、**UDP-GlcNAc** レベルは実際に、**SDHB** ノックアウト細胞で有意に減少していた。**BET** 阻害剤による **SDHB** 欠損がんの増殖抑制作用の正確な作用機序を解明したい。

腎細胞がんで **SDHB** の変異または欠損が高頻度で検出されている [16, 17, 23]。我々は **SDHB** をノックダウンした腎臓がん細胞株でも **BET** 阻害剤 **JQ-1** に対する感受性の増強を確認した。よって、今回大腸がん細胞株 **HCT116** を用いてきたが、**SDHB** 欠損細胞に対する **JQ-1** の特異的な増殖抑制効果は、大腸がんに限定されないと考える。

我々は、**SDHB** 欠損がんの増殖は解糖系代謝及びグルタミノリシスの代謝経路に依存する代謝特性を解明し、その知見から解糖系代謝酵素やグルタミノリシスを制御する **c-Myc** の **downregulator** **BET** 阻害剤に **SDHB** 欠損がんは脆弱性を示すことを見出した。本研究より **SDHB** 欠損がんにおいて **BET** 阻害剤が有効な治療薬となる可能性が示された。

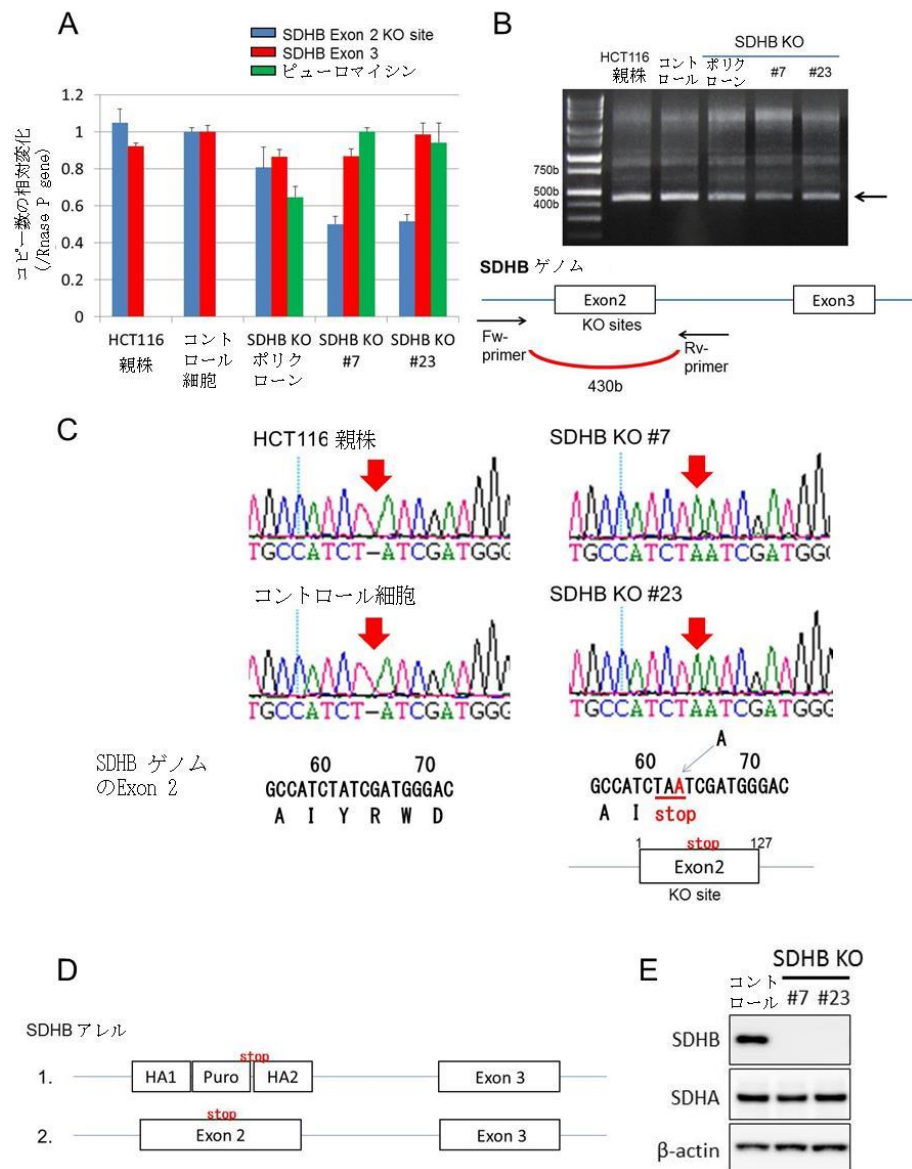
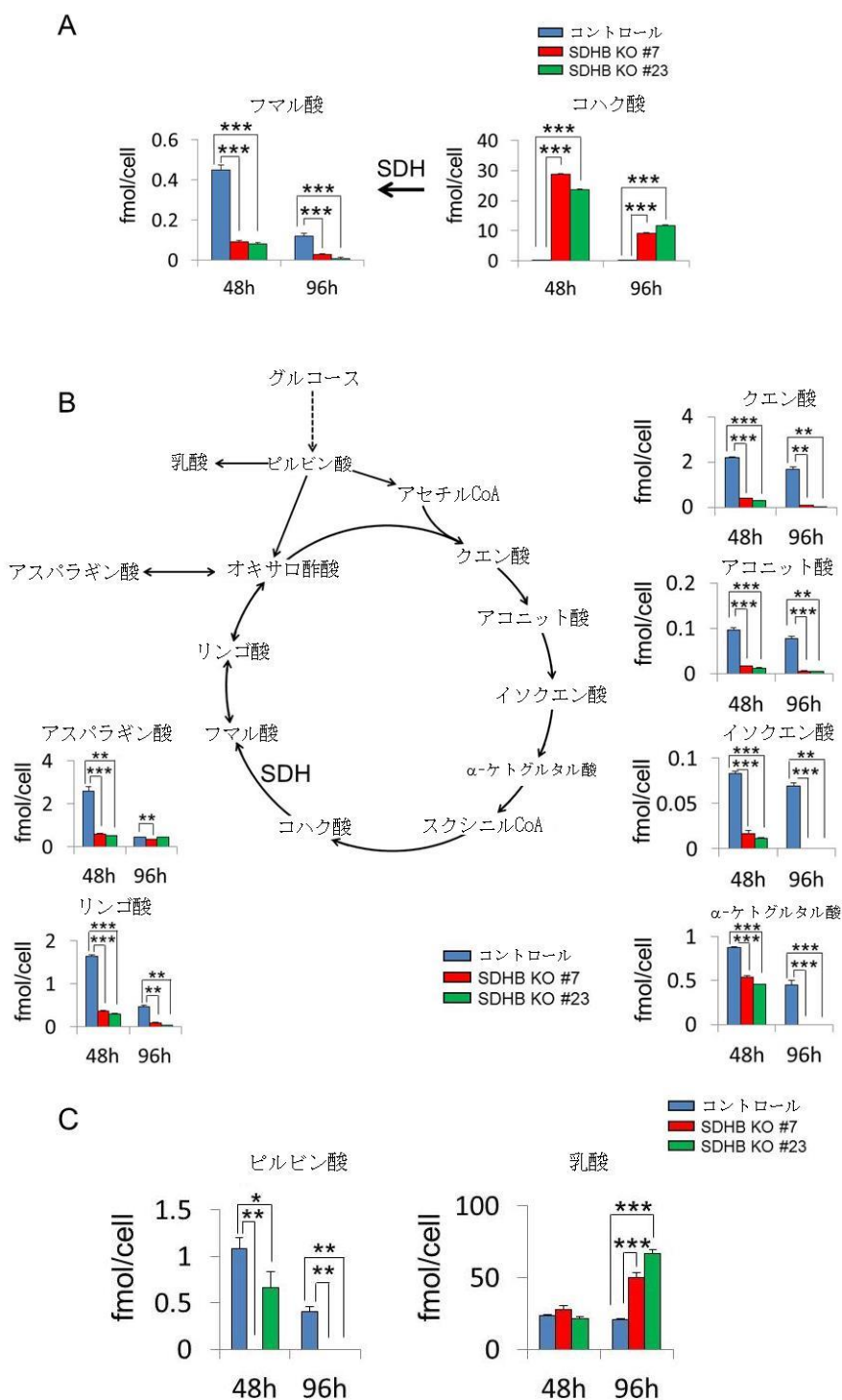


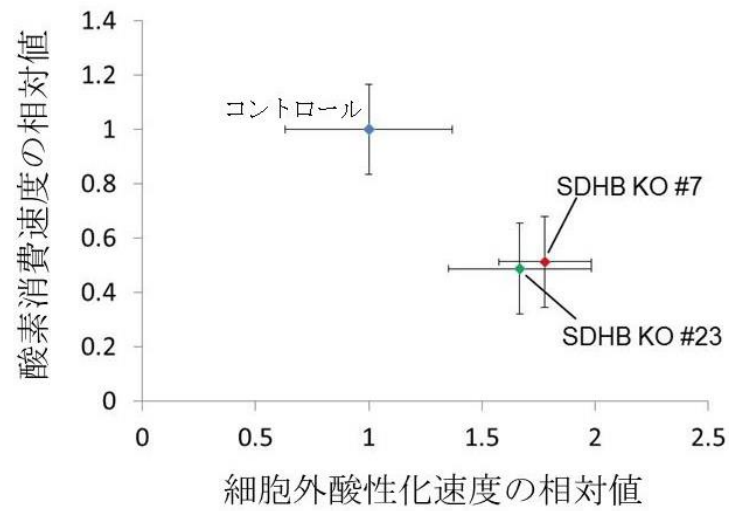
図 1 SDHB ノックアウト細胞株の樹立

A. HCT116 親株、コントロール細胞（コントロールベクターを導入した HCT116 細胞）、SDHB ノックアウトポリクローナル細胞、SDHB ノックアウト #7 および #23 細胞における SDHB ゲノム遺伝子およびピューロマイシン耐性遺伝子のコピー数を qPCR 法にて解析した。コントロール細胞の値を 1 と設定した際の各々のコピー数の相対変化を算出した。データを平均±標準偏差（Standard Deviation; SD）で示す。B. PCR 法を用いて、ゲノム DNA の SDHB Exon 2 KO サイトのゲノム増幅産物量の解析を行った。概略図は、PCR によって増幅された SDHB ゲノム部位を示す。C. シークエンシング法により SDHB ゲノム Exon2 の配列の確認を行った。SDHB ゲノムの Exon2 の配列を示す。SDHB ノックアウト

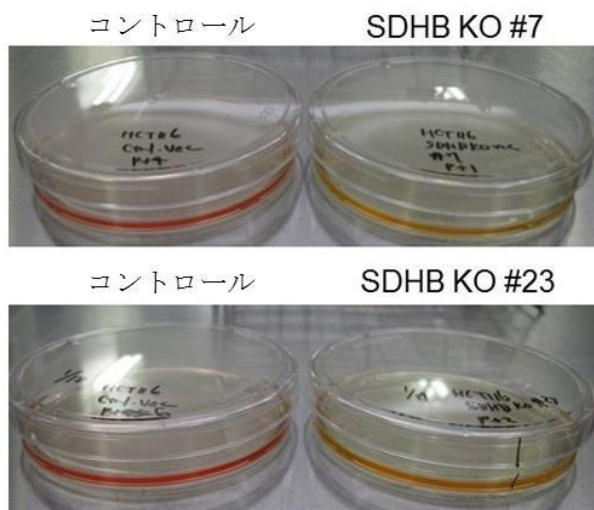
#7および#23細胞のSDHB Exon2の第62塩基と第63塩基にアデニン挿入が認められ、それに伴い終止コドンが形成された。D. SDHB ノックアウト#7及びSDHB ノックアウト#23における2本のSDHB 対立遺伝子の模式図を示す。E. SDHB、SDHA のタンパク質発現レベルを示す。各細胞を播種してから64時間後に細胞抽出液を調整し、SDHB、SDHA および β -actin の発現レベルをウェスタンブロッティング法にて解析した。



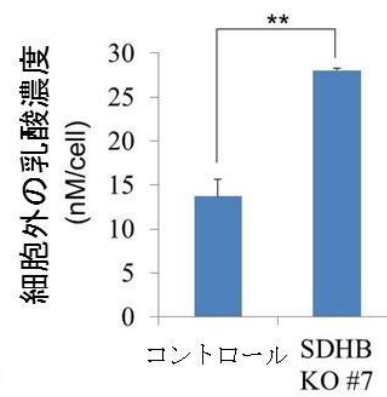
D



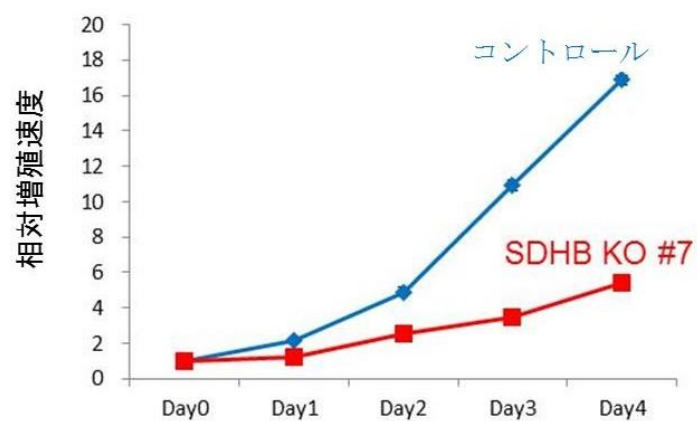
E



F



G



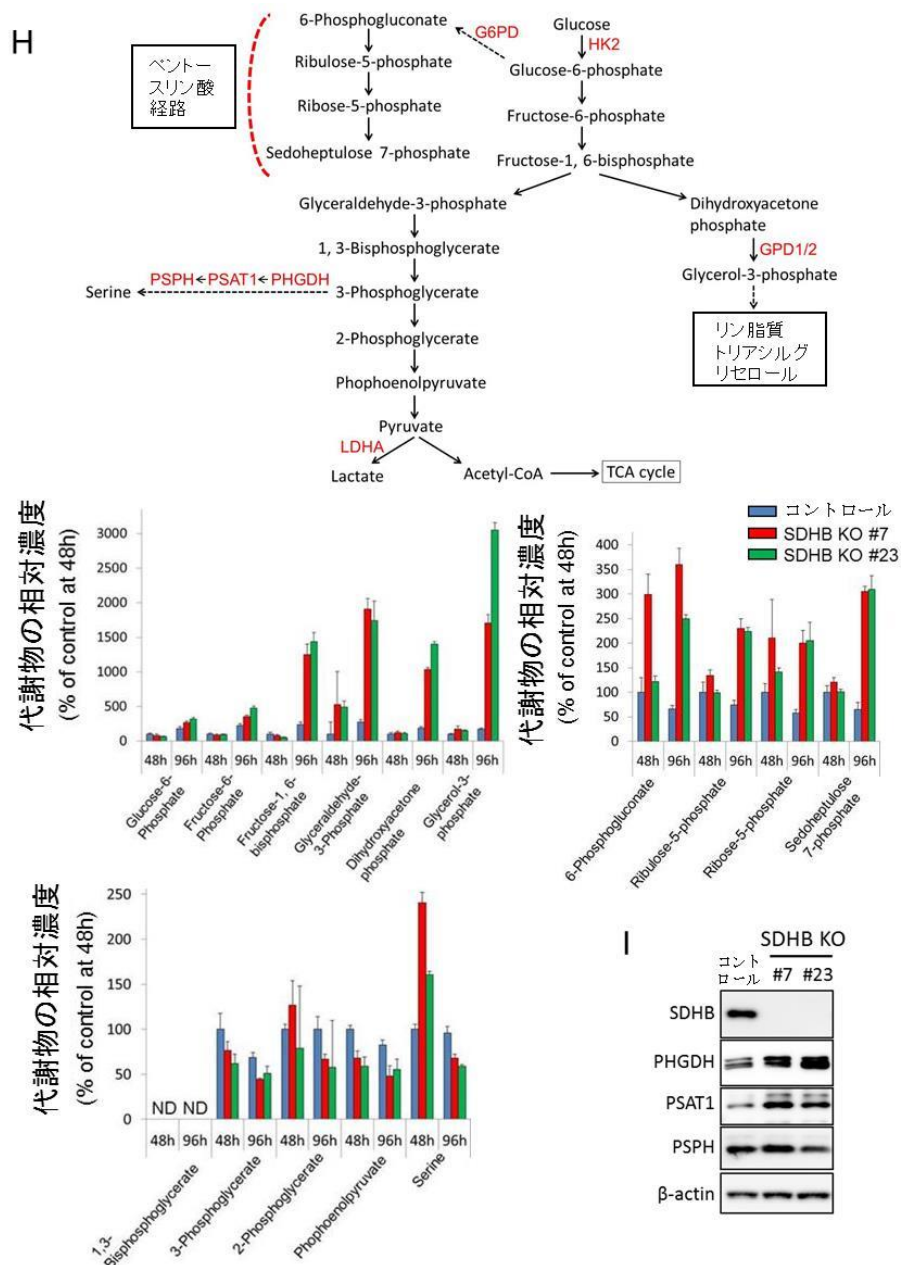


図 2 SDHB ノックアウト細胞株の特性評価

A. SDHB ノックアウト細胞における SDH 生成物のフマル酸の減少と基質のコハク酸の蓄積。B. SDHB ノックアウト細胞における TCA サイクル中代謝産物の低下。C. SDHB ノックアウト細胞におけるピルビン酸の減少と乳酸の蓄積。A, B, C. コントロール細胞、SDHB ノックアウト細胞（#7 および #23）を播種し、48 時間および 96 時間後のフマル酸、コハク酸、アスパラギン酸、リンゴ酸、クエン酸、アコニット酸、イソクエン酸、イソクエン酸、 α -ケトグルタル酸、ピルビン酸、乳酸の代謝物濃度を CE-MS を用いて測定した ($n = 3$)。データは平均 \pm SD として示す。スチューデント t 検定とボンフェローニの補正を行

い、有意差検定を行った (* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$)。D. SDHB ノックアウト細胞における Oxygen Consumption Rate (OCR) の減少と Extracellular Acidification Rate (ECAR) の上昇。OCR および ECAR を、細胞外フラックスアナライザー XF96 を用いて測定した ($n = 12$)。データは平均 \pm SD として示す。コントロール細胞の OCR 値および ECAR 値を 1 に設定し、SDHB ノックアウト細胞 (#7 および #23) の OCR および ECAR の相対値を算出した。E. SDHB ノックアウト細胞およびコントロール細胞をコンフルエントまで培養した時の培地の外観 (G のタイムポイントとは異なる)。F. SDHB ノックアウト細胞 (#7) およびコントロール細胞の播種の 24 時間後の細胞外乳酸濃度。データは平均値 \pm SD として表示した。スチューデント t 検定で、有意差検定を行った (* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$)。G. コントロール細胞と SDHB ノックアウト細胞 #7 の増殖速度の比較。SDHB ノックアウト #7 細胞およびコントロール細胞を播種し、4 日間培養した際の相対的細胞増殖を、Day0 の細胞数を 1 と設定することによって算出した。データは平均 \pm SD ($n = 3$) で示す。H. SDHB ノックアウト細胞における解糖系代謝物量の増加を示す。コントロール細胞、SDHB ノックアウト細胞 (#7 および #23) 播種し、48 時間及び 96 時間後の解糖系における代謝物を CE-MS を用いて測定した ($n = 3$)。I. SDHB ノックアウト細胞におけるセリン合成経路に働く酵素 PHGDH、PSAT1、PSPH および β -actin の発現レベルを細胞播種の 64 時間後に細胞を回収し、ウェスタンブロッティングによって調べた。

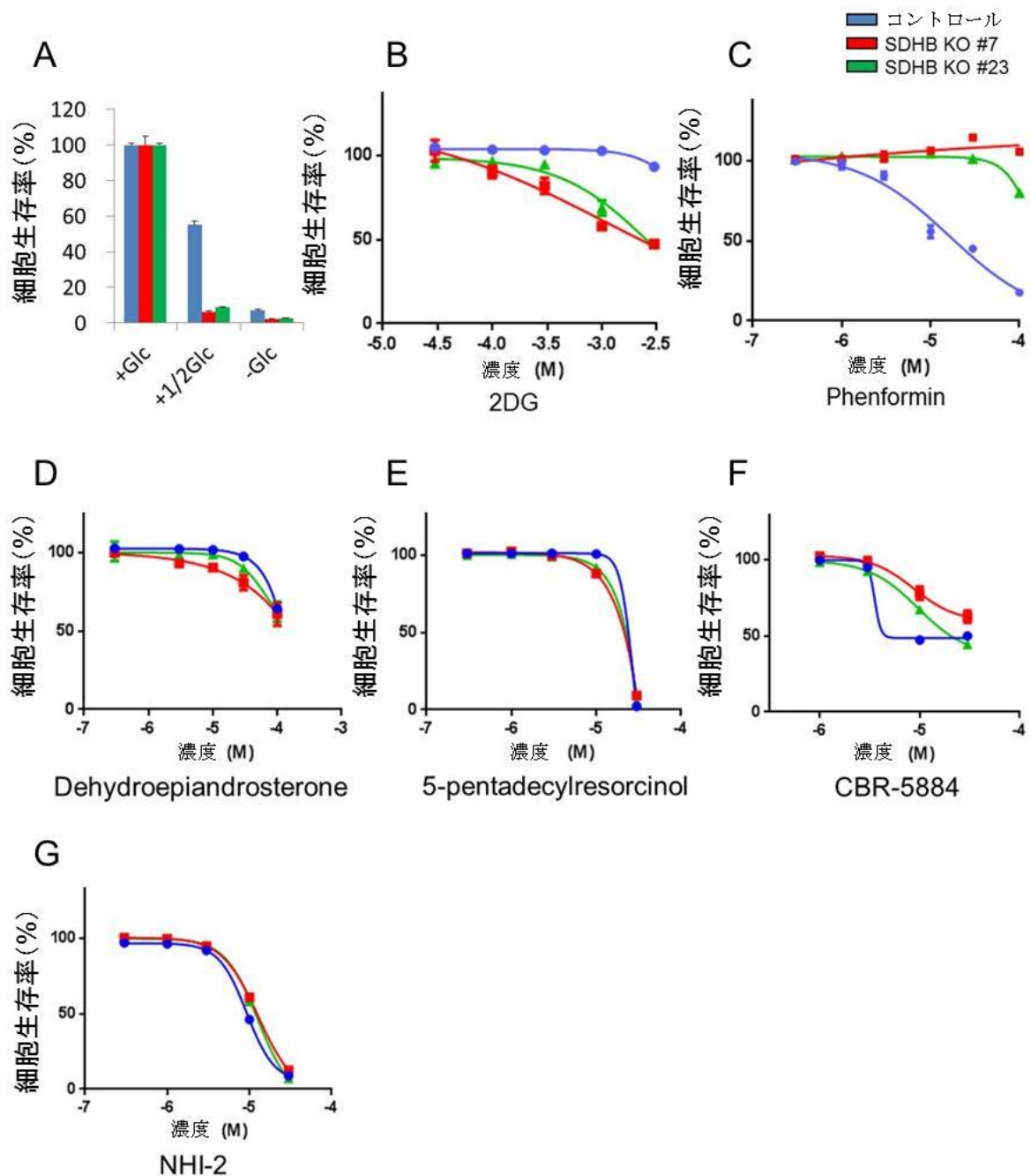
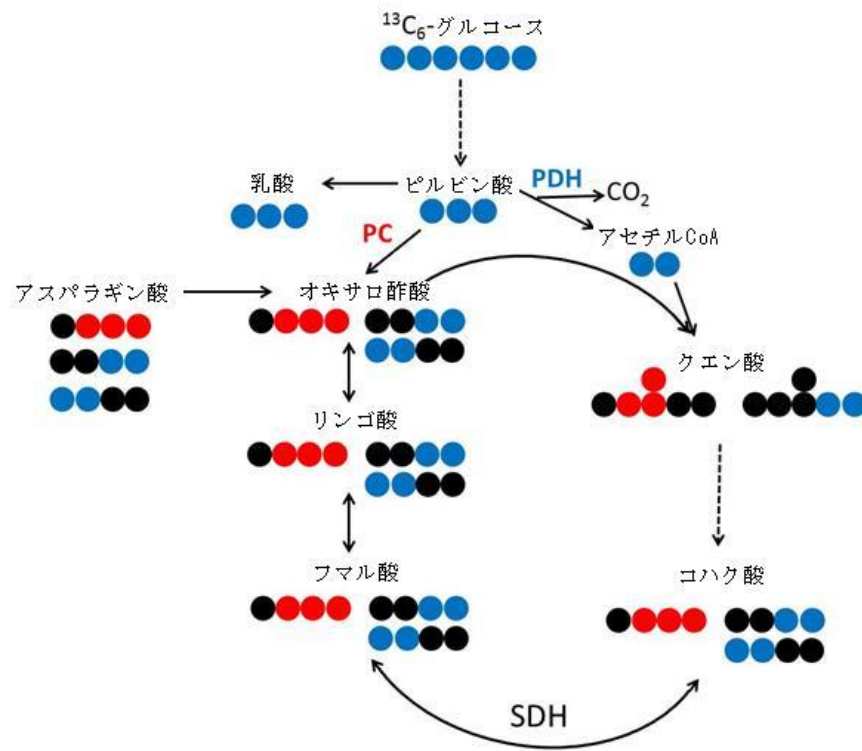


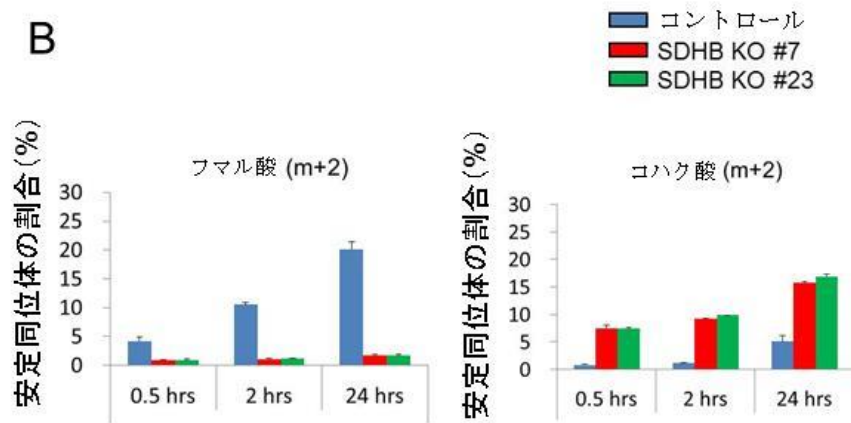
図 3 SDHB ノックアウト細胞株の解糖系代謝への依存

SDHB ノックアウト細胞およびコントロール細胞を通常のグルコース濃度 (2g / L)、1/2 のグルコース濃度 (1g / L)、およびグルコース無添加 (0g / L) の条件下で培養した際 (A)、2DG (B)、Phenformin (C)、G6PD 阻害剤 Dehydroepiandrosterone (D)、GPD1/2 阻害剤 5-Pentadecylresorcinol (E)、PHGDH 阻害剤 CBR-5884 (F) 及び LDHA 阻害剤 NHI-2 (G) を添加し、4 日後に細胞生存率を評価した。化合物無添加群を 100% に設定し、平均 \pm SD (n = 3) で示す。

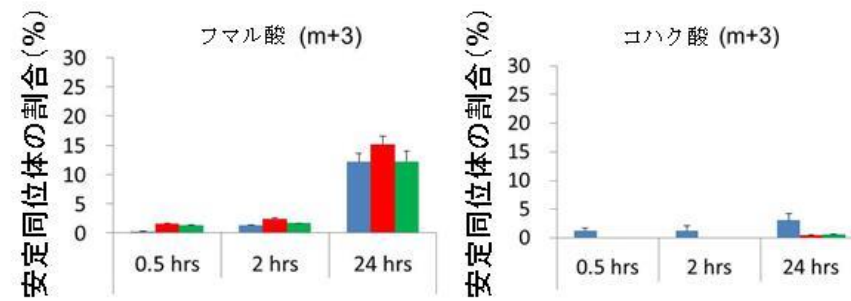
A



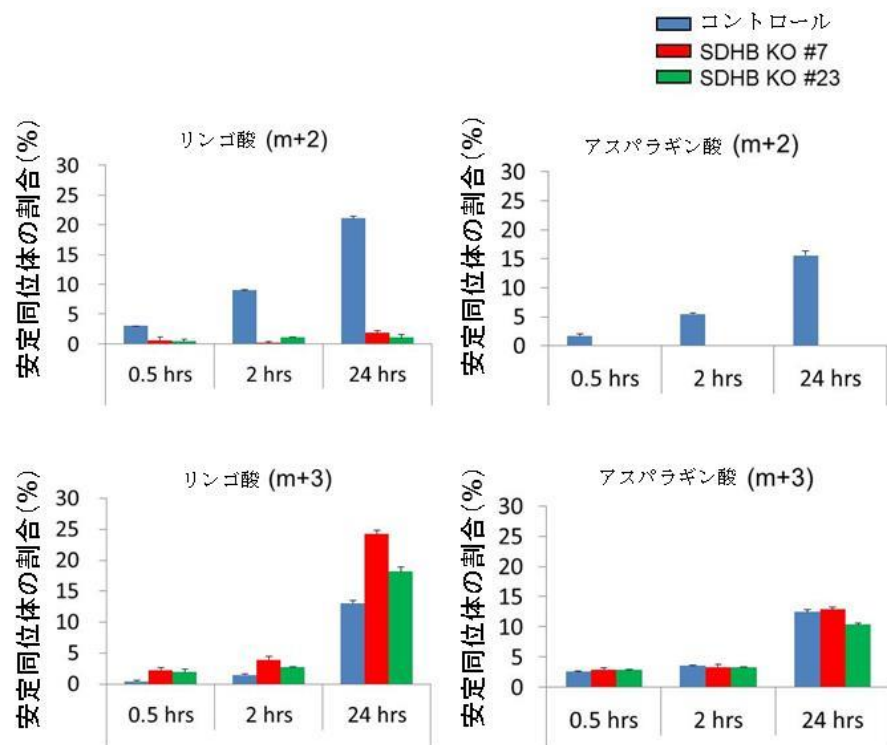
B



C



D



E

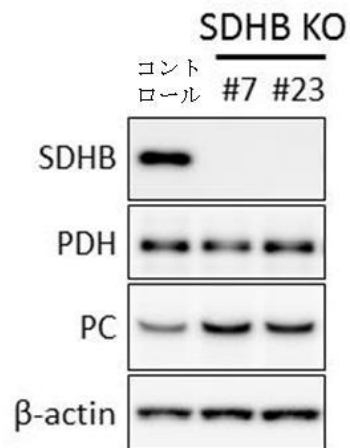
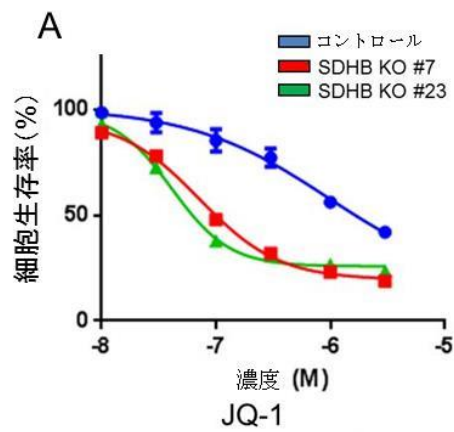
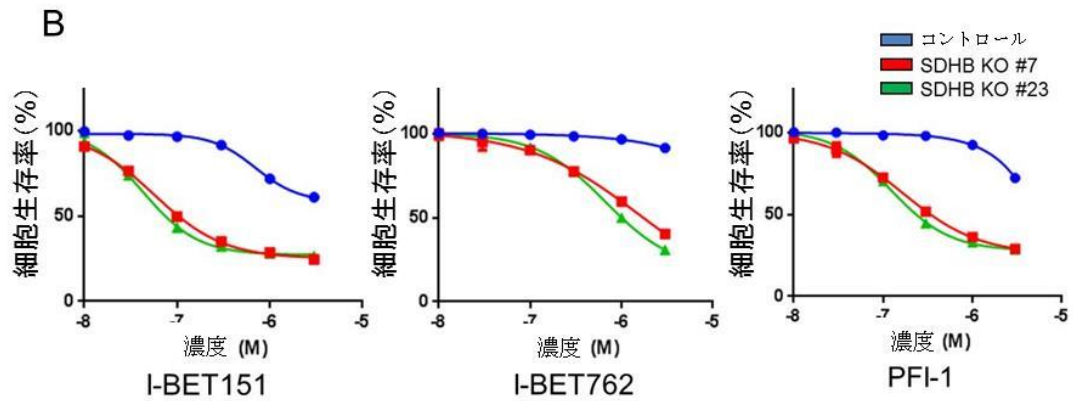


図 4 SDHB ノックアウト細胞株における TCA サイクルへのグルコース由来炭素源の寄与
 A. 模式図は、 $^{13}\text{C}_6$ -グルコース由来炭素源の PDH、PC を介した TCA サイクル及びアスパラギン酸合成への代謝動態を示す。青と赤の丸(●, ●)は ^{13}C 原子を表し、黒の丸(●)は ^{12}C 原子を表す。B. コントロール細胞と SDHB ノックアウト細胞における $^{13}\text{C}_6$ -グルコース由来炭素源の PDH を介したフマル酸(m + 2)とコハク酸(m + 2)の割合を示す。平均 \pm SD として示す。C. コントロール細胞と SDHB ノックアウト細胞における $^{13}\text{C}_6$ -グルコース由来

炭素源の PC を介したフマル酸(m + 3)とコハク酸(m + 3)の割合を示す。平均±SD として示す。D. コントロール細胞と SDHB ノックアウト細胞における $^{13}\text{C}_6$ -グルコース由来炭素源の PDH を介したリンゴ酸(m + 2)、アスパラギン酸(m + 2)及び PC を介したリンゴ酸(m + 3)、アスパラギン酸(m + 3)の割合を示す。平均±SD として示す。E. コントロール細胞と SDHB ノックアウト細胞を播種し、64 時間後に回収し、SDHB、PDH、PC および β -actin の発現レベルをウェスタンブロッティングによって調べた。



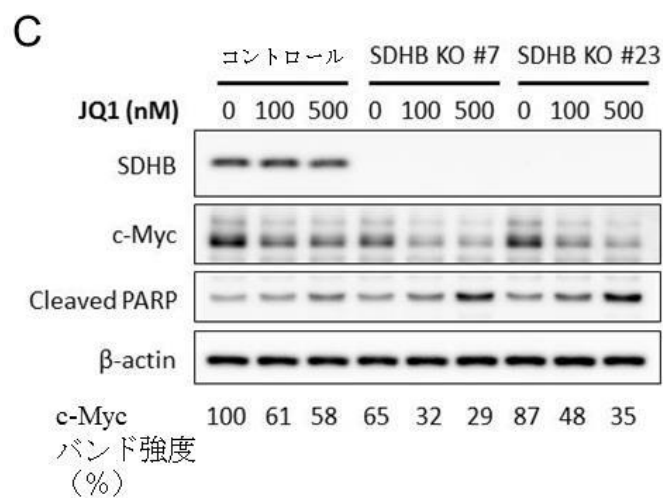
	コント ロール	SDHB KO #7	SDHB KO #23
GI ₅₀ of JQ1 (nM)	961	71.5	41.3



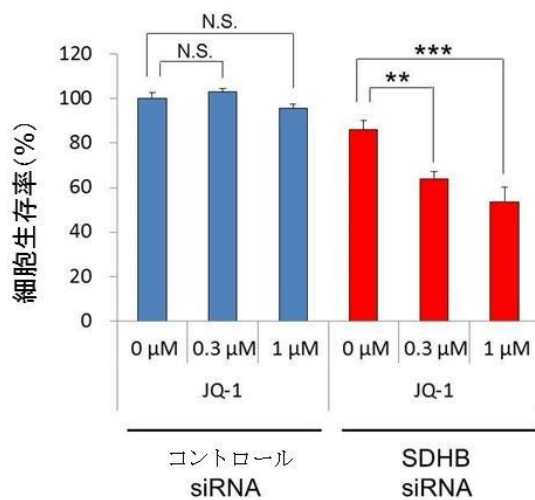
	コント ロール	SDHB KO #7	SDHB KO #23
GI ₅₀ of I- BET151 (nM)	> 3000	57.2	42.9

	コント ロール	SDHB KO #7	SDHB KO #23
GI ₅₀ of I- BET762 (nM)	> 3000	1566	670

	コント ロール	SDHB KO #7	SDHB KO #23
GI ₅₀ of PFI-1 (nM)	> 3000	166	123



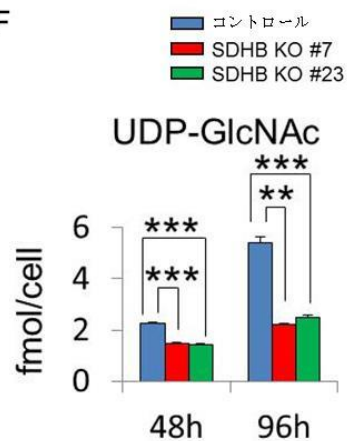
D



E



F



G

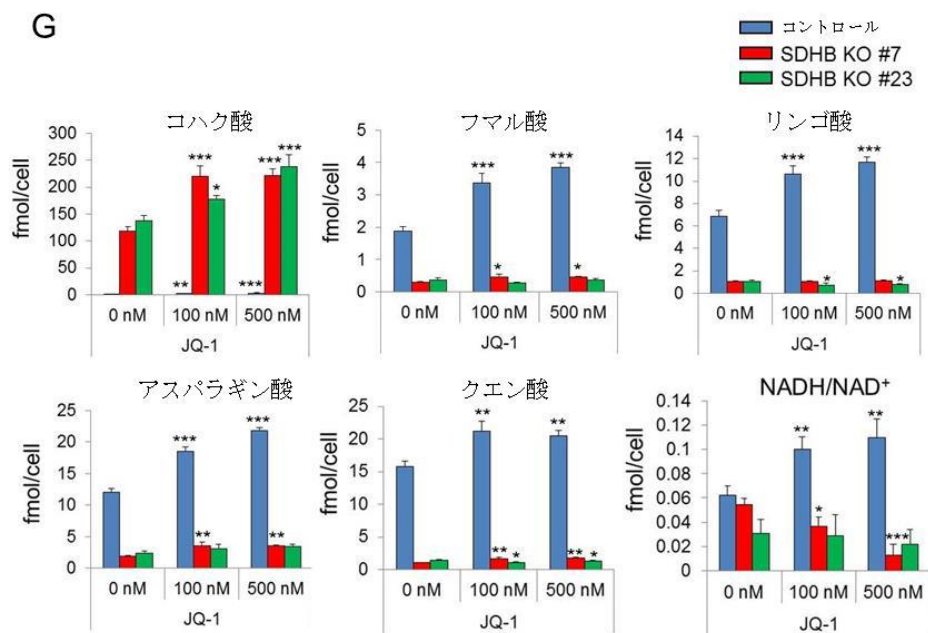


図 5 BET 阻害薬に対する SDHB ノックアウト細胞株の高感受性

A, B SDHB ノックアウト細胞およびコントロール細胞に BET 阻害剤 JQ-1、I-BET151、I-BET762 および PFI-1 で処理し、4 日後に細胞生存率を評価した。化合物無添加群を 100% に設定し、平均±SD (n = 3) で示す。GraphPad Prism バージョン 6 ソフトウェアを用いて、GI₅₀ を算出した。C. 細胞を JQ-1 で 38 時間処理し、SDHB、c-Myc、cleaved PARP 及びβ-actin の発現レベルをウエスタンブロッティングにより確認した。D. Caki-2 細胞に SDHB を標的とする siRNA 或いはコントロール siRNA を導入し、48 時間後 JQ-1 を添加し、その 3 日後に細胞生存率を評価した。コントロール群を 100% に設定した。データは平均±SD (n = 3) で表す。Williams 法を用いて有意差検定を行った (N.S. not significant, * P < 0.025, ** P < 0.005, *** P < 0.0005)。E. Caki-2 細胞に SDHB を標的とする siRNA 或いはコントロール siRNA を導入し、48 時間後に細胞を回収した。SDHB 及びβ-actin の発現レベルをウエスタンブロッティングにより確認した。F. SDHB ノックアウト細胞株における UDP-GlcNAc レベルの低下を示す。コントロール細胞、SDHB ノックアウト細胞 (#7 および #23) を播種し、48 時間および 96 時間後の UDP-GlcNAc レベルの代謝物濃度を CE-MS を用いて測定した (n = 3)。データは平均±SD として示す。スチューデント t 検定とボンフェローニの補正を行い、有意差検定を行った (*P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001)。G. コントロール細胞と SDHB ノックアウト細胞株間の BET 阻害薬処理時の TCA サイクルにおける代謝物レベル反応の相違を示す。コントロール細胞と SDHB ノックアウト細胞を JQ-1 で処理し、48 時間後 CE-MS を用いて、コハク酸、フマル酸、リンゴ酸、アスパラギン酸、クエン酸及び NADH / NAD⁺ の代謝物濃度を測定した。データは平均±SD (n = 3) で表す。Williams 法を用いて有意差検定を行った (N.S. not significant, * P < 0.025, ** P < 0.005, *** P < 0.0005)。

2. V-ATPase 阻害薬の治療効果を予測する患者層別バイオマーカーの探索

2.1 結果と考察

V-ATPase 阻害薬の感受性マーカーを探索した。V-ATPase 阻害薬は、酸性細胞内コンパートメントの pH 制御の阻害、マクロピノサイトーシスの抑制、および細胞内アミノ酸レベルの低下をもたらした。V-ATPase 阻害薬への感受性はカテプシン D の低発現と相関し、またカテプシン D 阻害剤や siRNA によるカテプシン D のノックダウンにより V-ATPase 阻害薬に対するがん細胞の感受性が増大した。さらに、カテプシン D 低発現細胞において、V-ATPase 阻害薬はアミノ酸飢餓応答の誘導、小胞体ストレスマーカーの亢進、およびにおける mTOR シグナル伝達の抑制をもたらした。大腸がん患者の多くで、正常組織と比較して腫瘍においてカテプシン D が下方制御されていることが分かった。これらの知見より、V-ATPase 阻害薬が大腸がんなどの低レベルのカテプシン D を有するがんの有望な治療選択となりうることが示唆された。

さらに、カテプシン B、H、および L 阻害剤 E-64-d、カテプシン B 阻害剤 CA-074、カテプシン K 阻害剤 II、カテプシン L 阻害剤 CAA0225 およびカテプシン L 阻害剤 III など、いくつかのカテプシン阻害剤も同様に、RCC4-vec 細胞において、V-ATPase 阻害薬 Bafilomycin A1 の増殖阻害効果を増強した。どのカテプシンが V-ATPase 阻害薬治療のための最適な感受性マーカーであるか、その生物学的メカニズムの解明が今後取り組むべき課題であると言える。

まとめと今後の展望

我々は **SDHB** ノックアウト細胞を樹立し、**SDHB** 欠損がんの代謝プロファイルを明らかにすることで、**SDHB** 欠損がんが **TCA** サイクル優位から解糖系優位へと代謝シフトすることを見出した。また我々は、**SDH** 欠損がんの増殖は解糖系代謝及びグルタミノリシスの代謝経路に依存することを明らかにし、**Myc** の **downregulator** である **BET** 阻害薬が **SDHB** 欠損がんの増殖を特異的に抑制することを発見した。本研究より、がんの診断の際に **SDHB** の不活性型変異或いは **SDHB** 低発現を患者層別バイオマーカーとして検出することができれば、それらのがんに **BET** 阻害剤が有効な治療薬として適応できる可能性が示された。

また、我々はがん細胞株におけるカテプシン **D** 発現と **V-ATPase** 阻害薬への感受性に負の相関があることを見出し、カテプシンの阻害やノックダウンによりがん細胞株の **V-ATPase** 阻害薬への感受性が増大することを示した。また、**V-ATPase** 阻害薬はカテプシン **D** 低発現がん細胞において、より強い **AAR** と **ER** ストレスの誘導及び **mTOR** シグナリングの抑制をもたらせること、さらに正常組織と比べて、大腸がん患者の腫瘍組織でカテプシン **D** 発現が低く制御されていることも見出した。カテプシン **D** 低発現を患者層別バイオマーカーとして、それらの患者のみを層別化することで、薬効が期待できる大腸がん患者への効果的な **V-ATPase** 阻害薬の投与が実現可能で、また薬効が期待できない患者を治療対象から除外することで、副作用が懸念される **V-ATPase** 阻害薬の余計な薬剤投与を減らすことが可能になると考えられる。

本研究結果は細胞レベルでの検証のみであったため、今後はこれらのコンセプトを *in vivo* 試験で検証したいと考えている。また、なぜ **BET** 阻害薬がこれらの **SDHB** 欠損がんには有効なのか、なぜ **V-ATPase** 阻害薬がカテプシン **D** 低発現がんでは有効なのか、その詳細なメカニズムを解明し、新たながん治療法の開発に貢献したいと考えている。

謝辞

本研究は、武田薬品工業株式会社 医薬研究本部 癌創薬ユニットで行われたものである。東北大学大学院生命科学研究科 生命機能科学専攻 分化制御学講座腫瘍生物学分野（東北大学加齢医学研究所 腫瘍生物学分野）教授の千葉奈津子先生には、本学位論文の作成に当たり、ご指導、ご助言を賜り、心より御礼申し上げます。東北大学大学院生命科学研究科 分子細胞生物学分野教授の大橋一正先生、東北大学大学院生命科学研究科 分化再生制御分野助教の林陽平先生にはご多忙の中、副査を務めてくださり、また多くの有益なご助言を頂き、謹んで感謝申し上げます。東北大学大学院生命科学研究科 神経機能制御分野助教の久保純先生、東北大学大学院生命科学研究科 腫瘍生物学分野助教の吉野優樹先生には、お忙しい中、学力確認委員として審査して下さい、厚く御礼申し上げます。本研究科博士前期課程に在籍時に研究を基本からご指導くださり、また本学位論文についてもご助言、ご討論を頂きました東北大学加齢医学研究所加齢研フェローの安井明先生に深く感謝申し上げます。

本学位論文を構成する内容を含んだ原著論文の作成にあたり、ご指導、ご討論を頂きました武田薬品工業株式会社の原隆人主席研究員に厚く感謝申し上げます。代謝物解析を行い、臨床サンプルデータをご提供下さいました、慶應義塾大学の曽我朋義教授と平山明由特任講師に深く感謝申し上げます。原著論文の作成に当たり、有益なご助言を頂きました西澤諭さん、ウェスタンブロッティングや **ECAR/OCR** 測定において実験のサポートを頂きました江原俊介さんと馬場悠史さんに深く感謝申し上げます。アクリジンオレンジアッセイや **TMR-BSA uptake assay** を行って下さいました中川秀行さんと船田雅昭さん、西村和帆博士、代謝物解析についてサポート下さいました安藤亜由美さんと里見佳典博士に深く感謝申し上げます。本研究を進める上で、中村鑑斗博士や中田大介さんをはじめとする武田薬品工業株式会社の癌創薬ユニットの皆様から貴重なご助言をいただきました。ここに厚く御礼申し上げます。

公表論文

1. Satoshi Kitazawa, Shunsuke Ebara, Ayumi Ando, Yuji Baba, Yoshinori Satomi, Tomoyoshi Soga, and Takahito Hara.
“Succinate dehydrogenase B-deficient cancer cells are highly sensitive to bromodomain and extra-terminal inhibitors” *Oncotarget*, 8, pp28922-28938, 2017.
2. Satoshi Kitazawa, Satoru Nishizawa, Hideyuki Nakagawa, Masaaki Funata, Kazuho Nishimura, Tomoyoshi Soga, and Takahito Hara.
“Cancer with low cathepsin D levels is susceptible to vacuolar (H⁺)-ATPase inhibition” *Cancer Sci.*, 108, pp1185-1193, 2017.

参考文献

1. Cook, D., et al., Lessons learned from the fate of AstraZeneca's drug pipeline: a five-dimensional framework. *Nat Rev Drug Discov.* 13(6): p. 419-31.
2. DiMasi, J.A., et al., Trends in risks associated with new drug development: success rates for investigational drugs. *Clin Pharmacol Ther.* 87(3): p. 272-7.
3. Walker, I. and H. Newell, Do molecularly targeted agents in oncology have reduced attrition rates? *Nat Rev Drug Discov*, 2009. 8(1): p. 15-6.
4. Kelloff, G.J. and C.C. Sigman, Cancer biomarkers: selecting the right drug for the right patient. *Nat Rev Drug Discov.* 11(3): p. 201-14.
5. Soda, M., et al., Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*, 2007. 448(7153): p. 561-6.
6. Lindeman, N.I., et al., Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology. *J Thorac Oncol.* 8(7): p. 823-59.
7. Astuti, D., et al., Gene mutations in the succinate dehydrogenase subunit SDHB cause susceptibility to familial pheochromocytoma and to familial paraganglioma.

- Am J Hum Genet, 2001. 69(1): p. 49-54.
8. van Nederveen, F.H., et al., An immunohistochemical procedure to detect patients with paraganglioma and pheochromocytoma with germline SDHB, SDHC, or SDHD gene mutations: a retrospective and prospective analysis. *Lancet Oncol*, 2009. 10(8): p. 764-71.
 9. Ghigna, M.R., et al., Bronchial Paraganglioma with SDHB Deficiency. *Endocr Pathol*, 2016.
 10. Prasad, P., et al., Loss of heterozygosity of succinate dehydrogenase B mutation by direct sequencing in synchronous paragangliomas. *Cancer Genet Cytogenet*, 2009. 192(2): p. 82-5.
 11. Gimenez-Roqueplo, A.P., et al., Mutations in the SDHB gene are associated with extra-adrenal and/or malignant pheochromocytomas. *Cancer Res*, 2003. 63(17): p. 5615-21.
 12. Amar, L., et al., Succinate dehydrogenase B gene mutations predict survival in patients with malignant pheochromocytomas or paragangliomas. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007. 92(10): p. 3822-8.
 13. Doyle, L.A., et al., Loss of succinate dehydrogenase subunit B (SDHB) expression is limited to a distinctive subset of gastric wild-type gastrointestinal stromal tumours: a comprehensive genotype-phenotype correlation study. *Histopathology*, 2012. 61(5): p. 801-9.
 14. Pantaleo, M.A., et al., Analysis of all subunits, SDHA, SDHB, SDHC, SDHD, of the succinate dehydrogenase complex in KIT/PDGFR wild-type GIST. *Eur J Hum Genet*, 2014. 22(1): p. 32-9.
 15. Vanharanta, S., et al., Early-onset renal cell carcinoma as a novel extraparaganglial component of SDHB-associated heritable paraganglioma. *Am J Hum Genet*, 2004. 74(1): p. 153-9.
 16. Williamson, S.R., et al., Succinate dehydrogenase-deficient renal cell carcinoma: detailed characterization of 11 tumors defining a unique subtype of renal cell carcinoma. *Mod Pathol*, 2015. 28(1): p. 80-94.
 17. Ricketts, C., et al., Germline SDHB mutations and familial renal cell carcinoma. *J*

- Natl Cancer Inst, 2008. 100(17): p. 1260-2.
18. Ozluk, Y., et al., Renal carcinoma associated with a novel succinate dehydrogenase A mutation: a case report and review of literature of a rare subtype of renal carcinoma. *Hum Pathol*, 2015. 46(12): p. 1951-5.
 19. Malinoc, A., et al., Biallelic inactivation of the SDHC gene in renal carcinoma associated with paraganglioma syndrome type 3. *Endocr Relat Cancer*, 2012. 19(3): p. 283-90.
 20. Zhang, D., et al., Reduced succinate dehydrogenase B expression is associated with growth and de-differentiation of colorectal cancer cells. *Tumour Biol*, 2013. 34(4): p. 2337-47.
 21. Habano, W., et al., Reduced expression and loss of heterozygosity of the SDHD gene in colorectal and gastric cancer. *Oncol Rep*, 2003. 10(5): p. 1375-80.
 22. Aspuria, P.J., et al., Succinate dehydrogenase inhibition leads to epithelial-mesenchymal transition and reprogrammed carbon metabolism. *Cancer Metab*, 2014. 2: p. 21.
 23. Gill, A.J., et al., Succinate dehydrogenase (SDH)-deficient renal carcinoma: a morphologically distinct entity: a clinicopathologic series of 36 tumors from 27 patients. *Am J Surg Pathol*, 2014. 38(12): p. 1588-602.
 24. Saxena, N., et al., SDHB-Deficient Cancers: The Role of Mutations That Impair Iron Sulfur Cluster Delivery. *J Natl Cancer Inst*, 2016. 108(1).
 25. Guzy, R.D., et al., Loss of the SdhB, but Not the SdhA, subunit of complex II triggers reactive oxygen species-dependent hypoxia-inducible factor activation and tumorigenesis. *Mol Cell Biol*, 2008. 28(2): p. 718-31.
 26. Selak, M.A., et al., Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF-alpha prolyl hydroxylase. *Cancer Cell*, 2005. 7(1): p. 77-85.
 27. Letouze, E., et al., SDH mutations establish a hypermethylator phenotype in paraganglioma. *Cancer Cell*, 2013. 23(6): p. 739-52.
 28. Xiao, M., et al., Inhibition of alpha-KG-dependent histone and DNA demethylases by fumarate and succinate that are accumulated in mutations of FH and SDH tumor suppressors. *Genes Dev*, 2012. 26(12): p. 1326-38.

29. Cardaci, S., et al., Pyruvate carboxylation enables growth of SDH-deficient cells by supporting aspartate biosynthesis. *Nat Cell Biol*, 2015. 17(10): p. 1317-26.
30. Lussey-Lepoutre, C., et al., Loss of succinate dehydrogenase activity results in dependency on pyruvate carboxylation for cellular anabolism. *Nat Commun*, 2015. 6: p. 8784.
31. Maxson, M.E. and S. Grinstein, The vacuolar-type H(+)-ATPase at a glance - more than a proton pump. *J Cell Sci*, 2014. 127(Pt 23): p. 4987-93.
32. Stransky, L., K. Cotter, and M. Forgac, The Function of V-ATPases in Cancer. *Physiol Rev*, 2016. 96(3): p. 1071-91.
33. Mindell, J.A., Lysosomal acidification mechanisms. *Annu Rev Physiol*, 2012. 74: p. 69-86.
34. Nishi, T. and M. Forgac, The vacuolar (H⁺)-ATPases--nature's most versatile proton pumps. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002. 3(2): p. 94-103.
35. Sennoune, S.R. and R. Martinez-Zaguilan, Vacuolar H(+)-ATPase signaling pathway in cancer. *Curr Protein Pept Sci*, 2012. 13(2): p. 152-63.
36. Fais, S., et al., Targeting vacuolar H⁺-ATPases as a new strategy against cancer. *Cancer Res*, 2007. 67(22): p. 10627-30.
37. Mijaljica, D., M. Prescott, and R.J. Devenish, V-ATPase engagement in autophagic processes. *Autophagy*, 2011. 7(6): p. 666-8.
38. Yumoto, R., et al., Endocytic uptake of FITC-albumin by human alveolar epithelial cell line A549. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2012. 27(3): p. 336-43.
39. Commisso, C., et al., Macropinocytosis of protein is an amino acid supply route in Ras-transformed cells. *Nature*, 2013. 497(7451): p. 633-7.
40. Kamphorst, J.J., et al., Human pancreatic cancer tumors are nutrient poor and tumor cells actively scavenge extracellular protein. *Cancer Res*, 2015. 75(3): p. 544-53.
41. Zoncu, R., et al., mTORC1 senses lysosomal amino acids through an inside-out mechanism that requires the vacuolar H(+)-ATPase. *Science*, 2011. 334(6056): p. 678-83.
42. Palm, W., et al., The Utilization of Extracellular Proteins as Nutrients Is Suppressed

- by mTORC1. *Cell*, 2015. 162(2): p. 259-70.
43. Murakami, T., et al., Elevated expression of vacuolar proton pump genes and cellular PH in cisplatin resistance. *Int J Cancer*, 2001. 93(6): p. 869-74.
 44. Torigoe, T., et al., Enhanced expression of the human vacuolar H⁺-ATPase c subunit gene (ATP6L) in response to anticancer agents. *J Biol Chem*, 2002. 277(39): p. 36534-43.
 45. Ohta, T., et al., Bafilomycin A1 induces apoptosis in the human pancreatic cancer cell line Capan-1. *J Pathol*, 1998. 185(3): p. 324-30.
 46. Lee, J.C., et al., Justicidin A decreases the level of cytosolic Ku70 leading to apoptosis in human colorectal cancer cells. *Carcinogenesis*, 2005. 26(10): p. 1716-30.
 47. Schneider, L.S., et al., Vacuolar-ATPase Inhibition Blocks Iron Metabolism to Mediate Therapeutic Effects in Breast Cancer. *Cancer Res*, 2015. 75(14): p. 2863-74.
 48. Nakashima, S., et al., Vacuolar H⁺-ATPase inhibitor induces apoptosis via lysosomal dysfunction in the human gastric cancer cell line MKN-1. *J Biochem*, 2003. 134(3): p. 359-64.
 49. Koltai, T., Cancer: fundamentals behind pH targeting and the double-edged approach. *Onco Targets Ther*, 2016. 9: p. 6343-6360.
 50. King, M.P. and G. Attardi, Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science*, 1989. 246(4929): p. 500-3.
 51. Soga, T., et al., Differential metabolomics reveals ophthalmic acid as an oxidative stress biomarker indicating hepatic glutathione consumption. *J Biol Chem*, 2006. 281(24): p. 16768-76.
 52. Wang, J.B., et al., Targeting mitochondrial glutaminase activity inhibits oncogenic transformation. *Cancer Cell*, 2010. 18(3): p. 207-19.
 53. Filippakopoulos, P., et al., Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature*, 2010. 468(7327): p. 1067-73.
 54. Dawson, M.A., et al., Inhibition of BET recruitment to chromatin as an effective treatment for MLL-fusion leukaemia. *Nature*, 2011. 478(7370): p. 529-33.

55. Nicodeme, E., et al., Suppression of inflammation by a synthetic histone mimic. *Nature*, 2010. 468(7327): p. 1119-23.
56. Fish, P.V., et al., Identification of a chemical probe for bromo and extra C-terminal bromodomain inhibition through optimization of a fragment-derived hit. *J Med Chem*, 2012. 55(22): p. 9831-7.
57. Munoz-Pinedo, C., N. El Mjiyad, and J.E. Ricci, Cancer metabolism: current perspectives and future directions. *Cell Death Dis*, 2012. 3: p. e248.
58. Miller, D.M., et al., c-Myc and cancer metabolism. *Clin Cancer Res*, 2012. 18(20): p. 5546-53.
59. Chou, T.Y., G.W. Hart, and C.V. Dang, c-Myc is glycosylated at threonine 58, a known phosphorylation site and a mutational hot spot in lymphomas. *J Biol Chem*, 1995. 270(32): p. 18961-5.
60. Itkonen, H.M., et al., O-GlcNAc transferase integrates metabolic pathways to regulate the stability of c-MYC in human prostate cancer cells. *Cancer Res*, 2013. 73(16): p. 5277-87.
61. Wu, S., et al., c-MYC responds to glucose deprivation in a cell-type-dependent manner. *Cell Death Discov*, 2015. 1: p. 15057.
62. Stankiewicz, M., et al., Supravital staining of eosinophils. *Int J Parasitol*, 1996. 26(4): p. 445-6.
63. Benes, P., V. Vetvicka, and M. Fusek, Cathepsin D--many functions of one aspartic protease. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2008. 68(1): p. 12-28.
64. Zaidi, N., et al., Cathepsin D: a cellular roadmap. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008. 376(1): p. 5-9.
65. Hah, Y.S., et al., Cathepsin D inhibits oxidative stress-induced cell death via activation of autophagy in cancer cells. *Cancer Lett*, 2012. 323(2): p. 208-14.
66. Oliveira, C.S., et al., Cathepsin D protects colorectal cancer cells from acetate-induced apoptosis through autophagy-independent degradation of damaged mitochondria. *Cell Death Dis*, 2015. 6: p. e1788.
67. Yamamoto, A., et al., Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell

- line, H-4-II-E cells. *Cell Struct Funct*, 1998. 23(1): p. 33-42.
68. Liaudet-Coopman, E., et al., Cathepsin D: newly discovered functions of a long-standing aspartic protease in cancer and apoptosis. *Cancer Lett*, 2006. 237(2): p. 167-79.
69. Tandon, A.K., et al., Cathepsin D and prognosis in breast cancer. *N Engl J Med*, 1990. 322(5): p. 297-302.
70. Theodoropoulos, G.E., et al., Evaluation of cathepsin D immunostaining in colorectal adenocarcinoma. *J Surg Oncol*, 1997. 65(4): p. 242-8.
71. Bidere, N., et al., Cathepsin D triggers Bax activation, resulting in selective apoptosis-inducing factor (AIF) relocation in T lymphocytes entering the early commitment phase to apoptosis. *J Biol Chem*, 2003. 278(33): p. 31401-11.
72. Deiss, L.P., et al., Cathepsin D protease mediates programmed cell death induced by interferon-gamma, Fas/APO-1 and TNF-alpha. *EMBO J*, 1996. 15(15): p. 3861-70.
73. Roberg, K., K. Kagedal, and K. Ollinger, Microinjection of cathepsin d induces caspase-dependent apoptosis in fibroblasts. *Am J Pathol*, 2002. 161(1): p. 89-96.
74. Schestkova, O., et al., The catalytically inactive precursor of cathepsin D induces apoptosis in human fibroblasts and HeLa cells. *J Cell Biochem*, 2007. 101(6): p. 1558-66.
75. Wu, G.S., et al., Potential role for cathepsin D in p53-dependent tumor suppression and chemosensitivity. *Oncogene*, 1998. 16(17): p. 2177-83.
76. Kirana, C., et al., Cathepsin D Expression in Colorectal Cancer: From Proteomic Discovery through Validation Using Western Blotting, Immunohistochemistry, and Tissue Microarrays. *Int J Proteomics*, 2012. 2012: p. 245819.