

令和 2 年 6 月 6 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15215

研究課題名（和文）xCT発現がん幹細胞におけるグルタミン酸関連特性の包括的解明

研究課題名（英文）Elucidating the role of glutamate in xCT-expressing cancer cells

研究代表者

土橋 賢司 (Tsuchihashi, Kenji)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：20773675

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：高悪性度脳腫瘍の一部は上皮成長因子受容体(EGFR)とアミノ酸トランスポーターであるxCTを高発現している。xCTはグルタミン酸を細胞外に放出するが、グルタミン酸が腫瘍細胞の悪性化に寄与する機序は不明な点も多い。本研究では、EGFR-xCT高発現脳腫瘍はグルタミン酸が豊富な微小環境形成し、グルタミン酸が腫瘍のNMDA型グルタミン酸受容体に結合することで、グルタミン酸受容体が活性化され遊走能の亢進が生じることを明らかにした。さらに、EGFRの活性化はグルタミン酸受容体を活性化させることも明らかにした。xCT阻害に加え、グルタミン酸受容体阻害を行うことで、抗腫瘍効果が高くなることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

xCTはアミノ酸トランスポーターの一つであり、様々ながん種や、さらにその中で治療抵抗性が高いとされるがん幹細胞という一部の集団で発現が高いことが報告されている。xCT発現がん細胞に対する治療開発が期待されている。本研究では、xCTを介し放出されたグルタミン酸ががん細胞上のグルタミン酸受容体に結合し、がんの悪性化を促進するを明らかにした。その中でEGFRという別の分子がグルタミン酸受容体を活性化することを初めて明らかにした。xCT阻害に加え、グルタミン酸受容体阻害を行うことで、抗腫瘍効果が高まることを明らかにした。本研究は、xCTとグルタミン酸受容体阻害の併用という新しい治療戦略を打ち出した。

研究成果の概要（英文）：We previously showed that EGFR-expressing glioma cells highly express xCT which is cystine-glutamate antiporter. In the present project, we showed released glutamate promotes the migration of glioma cells through the activation of NMDA type glutamate receptor. In response to EGF stimulation, EGFR phosphorylated the COOH-terminal domain of GluN2B, the subunit of NMDA type glutamate receptor, and thereby enhanced glutamate-NMDAR signaling and consequent cell migration in EGFR-overexpressing glioma cells. The administration of sulfasalazine and NMDA type glutamate inhibitor, MK-801, also synergistically suppressed the growth of subcutaneous tumors formed by EGFR-overexpressing glioma cells. Furthermore, shRNA-mediated knockdown of xCT and GluN2B cooperatively prolonged the survival of mice injected intracerebrally with such glioma cells. Our findings thus show the efficacy of combinatory treatment by xCT and glutamate receptor inhibition for EGFR-xCT expressing glioma cells.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：xCT EGFR Glutamate Glioma

1. 研究開始当初の背景

がん幹細胞は、特徴的な表面抗原により同定され、乳癌、頭頸部癌、胃癌などの上皮系のがん腫は、CD44v-xCT を発現している。xCT は、シスチン・グルタミン酸交換輸送体という機能を有する。これまでの報告で、細胞内に取り込まれたシスチンは還元型グルタチオンへ変換され、細胞内の活性酸素レベルを低く抑えることで、未分化性の維持や治療抵抗性に寄与していることが知られている。他方、グルタミン酸については未解明である。グルタミン酸を放出するアミノ酸輸送体は xCT のみであり、グルタミン酸は xCT 発現がん幹細胞の代謝と密接に関与している。また、グルタミン酸は細胞膜上の受容体に結合することで細胞内にシグナルを伝達する特徴を有し、また取り込み輸送体により細胞内に取り込まれ、様々な代謝経路へ流れることが知られている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、がん幹細胞の生物学的特性とグルタミン酸の関係をシグナル、代謝の両面より包括的に解明することである。

3. 研究の方法

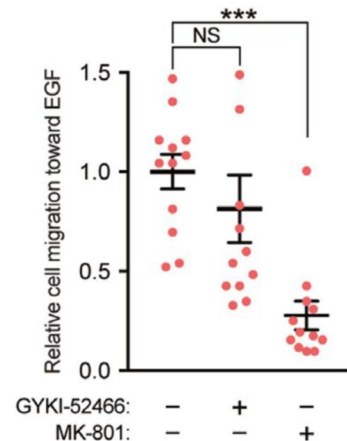
研究開始当初は、様々ながん種のがん幹細胞モデルを用いて実験を行う予定であったが、最終的には、脳腫瘍細胞を用いて研究を行った。脳腫瘍細胞株である U87MG に EGFR を過剰発現した U87MG-EGFR 細胞や T98G 細胞株は、xCT を高く発現する。これらの細胞を用いて以下のような実験を行った。

- (1) グルタミン酸の放出能の測定することで、xCT 発現脳腫瘍細胞が実際にグルタミン酸を多く放出するかの検討
- (2) グルタミン酸受容体阻害剤やグルタミン酸受容体の short-hairpin RNA を用いた、責任グルタミン酸受容体の同定
- (3) 細胞内カルシウム流入測定によるグルタミン酸受容体活性化の評価
- (4) ウェスタンブロッティングによるグルタミン酸受容体や EGFR の活性化状態の検討
- (5) 免疫沈降によるグルタミン酸受容体と EGFR の結合の評価
- (6) In vitro kinase アッセイによる EGFR によるグルタミン酸受容体のリン酸化の評価
- (7) 免疫不全マウスへ腫瘍細胞を移植し、xCT 阻害剤やグルタミン酸受容体阻害剤の有効性の評価
- (8) 免疫不全マウスへ xCT やグルタミン酸受容体の shRNA を導入した腫瘍細胞を移植しマウスの生存を比較することで xCT やグルタミン酸受容体が腫瘍細胞増殖へ与える影響の評価

4. 研究成果

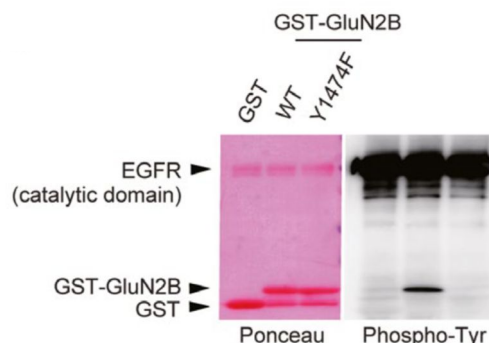
(1) NMDA 型グルタミン酸受容体阻害により腫瘍細胞の遊走が抑制される

EGFR 高発現脳腫瘍細胞は、非高発現脳腫瘍細胞に比べ、シスチン・グルタミン酸交換輸送体である xCT を高発現している。実際にグルタミン酸が、脳腫瘍細胞の悪性度に関与しているか検討するために、グルタミン酸受容体阻害剤を用いて検討した。その結果、NMDA 受容体阻害剤 (MK-801) により EGFR 高発現脳腫瘍細胞の遊走能が抑制された (右図)。またグルタミン酸による NMDA 受容体の活性化により細胞内に Ca^{2+} の流入が生じるが、NMDA 受容体の阻害剤により Ca^{2+} 流入が抑制されることを確認した。



(2) EGFR は NMDA 型グルタミン酸受容体を活性化する

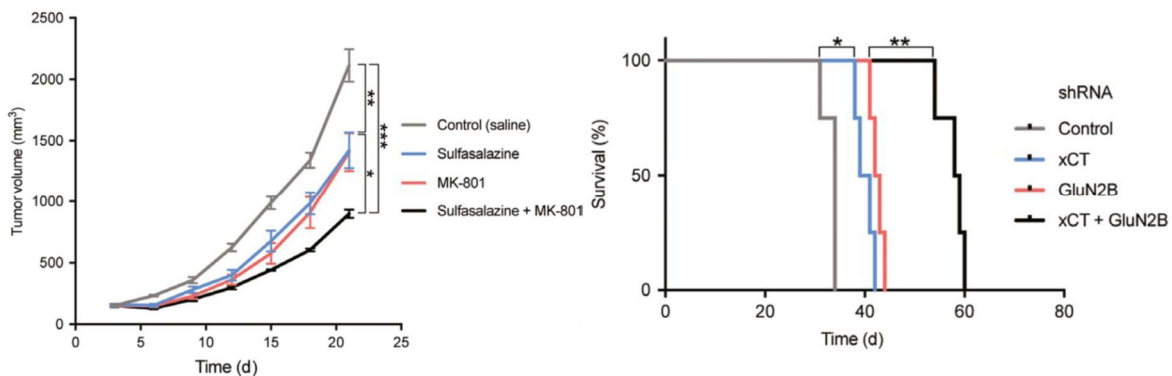
EGFR 高発現脳腫瘍細胞におけるグルタミン酸受容体を介した悪性形質獲得機構を明らかにするために、グルタミン酸受容体のリン酸化に着目した。その結果、EGFR のリガンドである EGF の添加により、NMDA 受容体のリン酸化による活性化が生じることを明らかにした。この結果より、EGFR の EGF の結合を介した活性化が、NMDA 受容体をリン酸化する仮説を立てた。実際に in vitro キナーゼアッセイで、EGFR が直接 NMDA 受容体 (GluN2B の Y1474) をリン酸化することを確認した (右図)。また免疫沈降実験により、EGFR と NMDA 受容体 (GluN2B) は結合していることを確認した。この結果より、EGFR-xCT 高発現脳腫瘍細胞の悪性形質獲得には、EGFR を介したグルタ



ミン酸受容体である NMDA 受容体の活性化が重要であることが明らかになった。

(3) xCT と NMDA 型グルタミン酸受容体の併用阻害は抗腫瘍効果を有する

最後にマウスを用いたモデル実験において、EGFR 高発現脳腫瘍細胞の増殖は、xCT 阻害剤 (Sulfasalazine) に NMDA 受容体阻害剤を併用することで著明に抑制されることが確認された (下図左)。また、shRNA を導入した腫瘍細胞の同所移植実験でも同様の結果が確認された (下図右)。これらの結果より、今回は脳腫瘍を用いた主にグルタミン酸受容体のシグナルに着目した結果であるが、xCT 発現腫瘍において、グルタミン酸は腫瘍の悪性形質に寄与しており、グルタミン酸受容体の阻害が治療戦略になることが明らかになった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 K Suina*, K Tsuchihashi*, J Yamasaki, S Kamenori, S Shintani, Y Hirata, S Okazaki, O Sampetrean, E Baba, K Akashi, Y Mitsuishi, F Takahashi, K Takahashi, H Saya, O Nagano (*These authors contributed equally)	4. 巻 109
2. 論文標題 Epidermal growth factor receptor promotes glioma progression by regulating xCT and GluN2B-containing N-methyl-d-aspartate-sensitive glutamate receptor signaling	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3874-3882
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.13826	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Isobe S, Kataoka M, Endo J, Moriyama H, Okazaki S, Tsuchihashi K, Katsumata Y, Yamamoto T, Shirakawa K, Yoshida N, Shimoda M, Chiba T, Masuko T, Hakamata Y, Kobayashi E, Saya H, Fukuda K, Sano M.	4. 巻 61
2. 論文標題 Endothelial-Mesenchymal Transition Drives Expression of CD44 Variant and xCT in Pulmonary Hypertension	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Am J Respir Cell Mol Biol .	6. 最初と最後の頁 367-379
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1165/rcmb.2018-02310C	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 推名 健太郎, 山崎 淳太郎, 大槻 雄士, 平田 雄紀, 岡崎 章悟, 土橋 賢司, サンベトラ・オルテア, 光石 陽一郎, 高橋 史行, 高橋 和久, 佐谷 秀行, 永野 修
2. 発表標題 小細胞肺癌において、xCTはがん幹細胞性に寄与する
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shohei Kamenori, Kentaro Suina, Juntaro Yamasaki, Subaru Shintani, Yuji Otsuki, Yuki Hirata, Shogo Okazaki, Kenji Tsuchihashi, Oltea Sampetrean, Yoichiro Mitsuishi, Fumiyuki Takahashi, Kazuhisa Takahashi, Hideyuki Saya, Osamu Nagano
2. 発表標題 SLC7A11 expression confers cancer stem-like properties in small cell lung cancer cells
3. 学会等名 Annual Meeting of the American-Association-for-Cancer-Research (AACR) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----