

令和 4 年 5 月 16 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07446

研究課題名(和文) 卵巣明細胞腺癌の発癌および特異的な電子受容体産生を標的とした治療に関する研究

研究課題名(英文) Specific mitochondrial electron transport chain processes involve oncogenesis of ovarian clear cell adenocarcinoma and can be targets of therapy

研究代表者

山崎 一人 (YAMAZAKI, KAZUTO)

帝京大学・医学部・教授

研究者番号：60302519

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣原発明細胞癌におけるフェロトーシス耐性因子の発現を免疫組織学的に検索し、グルタチオン産生に必要な(Cystathionine γ -lyase, CTH)と、グルタチオンを基質として細胞膜脂質の酸化を抑制し得る(Glutathione Peroxidase 4, GPx4)の発現亢進を認めた。CTHの発現亢進にはKEAP1の失活が関与しており、KEAP1遺伝子プロモーター領域のメチル化とコード領域のミスセンス変異によるものと推察された。卵巣明細胞癌株へのシスチントランスポーター、CTHの不可逆的阻害剤、GPx4の酵素活性阻害剤の投与は、いずれも膜脂質の酸化を亢進させ、細胞の増殖を抑制した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵巣明細胞癌においてはGST依存性のフェロトーシス耐性が亢進しており、その要因としてGSTの合成に必要なCTH、GSTを基質として細胞膜脂質の酸化を抑制し得るGPx4の発現が亢進していることが示唆された。明細胞腺癌は化学療法に対する感受性が低く進行例の予後は不良であり、標準化学療法であるTC療法との組み合わせを含めた分子標的治療の有用性の検証が求められている。本研究の内容は卵巣明細胞癌の特異的な生物学的特徴である内膜症性嚢胞由来、酸化ストレス耐性、化学療法抵抗性の裏付けとなるものであり、従来の化学療法とフェロトーシス耐性因子阻害剤の併用投与の有用性を示唆するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We analysed expression of ferroptosis-resistant factors in ovarian clear cell carcinoma by immunohistochemistry and found that 2 enzymes; cystathionine γ -lyase (CTH) which are necessary for glutathione production, and glutathione peroxidase 4 (GPx4) which could restrain the oxidation of the cell membrane lipid, are overexpressed. We also found that inactivation of KEAP1 gene, associated with probably due to methylation of its promoter region and/or missense mutation of its coding region, participated in overexpression of CTH. Administration of inhibitors for cystine transporter, an irreversible inhibitor of CTH, and inhibitor of GPx4 induced oxidation of the cell membrane lipid and reduced the tumor cell proliferation.

研究分野：病理学

キーワード：卵巣 明細胞癌 フェロトーシス cystathionine γ -lyase GPx4

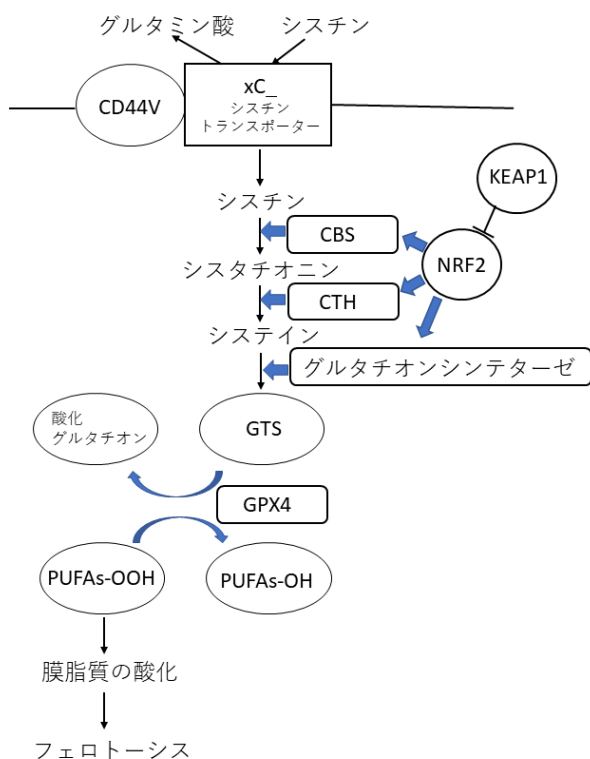
1. 研究開始当初の背景

(1) 卵巣癌子宮内膜症（内膜症性嚢胞）は明細胞癌と類内膜癌の前駆病変であると報告されているが、異なる遺伝子変異が組織型を決定するというドグマはこれまでの包括的遺伝子解析によって否定されており、なぜ内膜症性嚢胞から異なる組織型を示す 2 種類の腫瘍が発生するのか、という疑問は解明されていない。近年、非腫瘍性の子宮内膜や子宮内膜症に存在する腺毛上皮 (ciliated cell) に発現し、分泌上皮 (secretory cell) には発現していない cystathionine -lyase (CTH) が卵巣明細胞癌では高発現しており、異なる分化を示した内膜上皮 (ciliated/secretory cell) から、それぞれ明細胞癌、類内膜癌が発生するという仮説が提唱された (Hughes et al. Sci Rep. 2016;6:34949)。

(2) 子宮内膜症が癌化する頻度は約 1% と高く、内膜症上皮は低酸素条件や自由鉄による酸化ストレスが発癌を促進することが原因と考えられている。明細胞癌においては低酸素ストレスに対する細胞の適応応答を促す転写因子 (HNF-1) が特異的に高発現しており、低酸素条件下や急激な増殖に対応するべく糖の取り込みを促進し、酸化的リン酸化を使わずに短期間にエネルギーが得られる解糖系が活性化する電子伝達系における酸化的リン酸化よりも、主に嫌気性解糖を利用して ATP を得ている (Warburg 効果)。酸化的リン酸化の低下した細胞では核酸・タンパク合成に必須なアスパラギン酸が不足し、細胞増殖は抑制されるが、外因性電子受容体 (ピルビン酸、 α -ケト酪酸) を添加することによってアスパラギン酸合成が進み、増殖は回復する (Sullivan et al. Cell 2017;162: 552-563)。このことから我々は、(1) 明細胞腺癌が CTH/ α -ケト酪酸活性の亢進した低酸素耐性上皮から発生する。(2) 主に解糖系に ATP を依存している明細胞腺癌は、アスパラギン酸合成の際に必要な電子受容体として α -ケト酪酸を用い、細胞増殖を促進するのではないかと、この仮説に至った。

(3) しかしながら研究を進めるに従って、CTH の発現亢進は明細胞癌の 90% 程度に見られるものの特異的な現象ではなく、類内膜癌にも発現亢進を示すものが存在することが明らかとなった。研究者らは CTH が α -ケト酪酸の産生を促進すること以外に、シスタチオンを基質としてグルタチオン (GST) の産生に必須である細胞内システインの合成に必要であることに着目し、明細胞癌においては CTH の産生亢進によって還元型グルタチオン (GST) の細胞

内濃度が上昇し、フェルトーシスが抑制されることによって細胞の生存・増殖を促進するのではないかと、という着想に至った。明細胞癌の発生基地となる内膜症性嚢胞の内容液は血液、つまりヘモグロビン由来の鉄が豊富に含まれており、この内容液の特異的な性状が癌の発生に深く関連しているのではないかと推察された。鉄依存性の脂質酸化を介したカスパーゼ非依存性の新規細胞死 (フェルトーシス) を抑制する抗酸化酵素 GPx4 (リン脂質ヒドロペルオキシドグルタチオンペルオキシダーゼ) はフェルトーシスの制御因子として重要な役割を担うが、正常な細胞では発現が低いことが知られている。研究者は明細胞癌における GPx4 の発現に着目し、免疫組織学的に明細胞癌における発現を検証したところ、ほぼすべての主要において GPx4 の発現が亢進していることを見出した。以上の結果から、明細胞癌においては CTH/GPx4 の活性化がみられ、GST 依存性にフェルトーシス耐性を獲得しているのではないかとする仮説に至った。



2. 研究の目的

(1)：免疫組織染色の手法を用いて、卵巣明細胞癌と類内膜癌、および、明細胞癌における GST 依存性のフェロトキシ耐性経路（上図）の活性化を検証する。検討内容としては細胞膜上に発現し、細胞内のグルタミン酸を放出して細胞外のシスチンを取り込むシスチントランスポーター（xCT）、シスチンをシスタチオニンに変換する CBS、シスタチオニンをシステインに変換する CTH、GST を基質として細胞膜脂質の酸化を抑制し得る GPx4 の発現をこれらに特異的な抗体を用いて可視化し、これらの因子の発現の差異を検証する。

(2)：明細胞癌において CBS、CTH、グルタチオンシンターゼの産生の転写活性を亢進する転写因子 NRF2、および、NRF2 のネガティブレギュレーターである KEAP1 の発現様態を検討する。

(3)：細胞膜上に発現し、細胞内のグルタミン酸を放出して細胞外のシスチンを取り込むシスチントランスポーター（xCT）の活性を特異的な阻害剤（エラスチン、スルファサラジン）、グルタチオン合成に関与する重要な酵素である CTH の不可逆的阻害剤（DL-プロパルギルグリシン）、GPx4 のセレノシステイン活性部位に直接結合する酵素活性阻害剤（(1S, 3R)-RSL3）を用いて上記の経路を抑制し、明細胞癌における膜脂質の酸化状態の変化を検証する。

3. 研究の方法

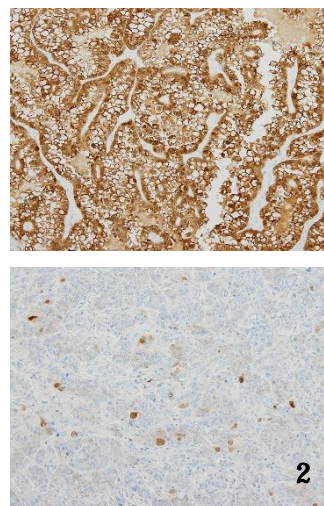
(1) 卵巣原発明細胞癌 40 例、卵巣原発類内膜癌 40 例の外科的切除検体の FFPE ブロックから組織アレイを作成し、免疫組織染色の手法を用いて xCT、CBS、CTH、GPx4 の発現を検証した。また、CBS、CTH の発現を制御する NRF2、KEAP1 の発現についても同様に検証した。

(2) 卵巣明細胞癌において CBS、CTH のレギュレーターである転写因子 *NRF2* 遺伝子の変異ホットスポットとされている exon 2 領域、および、NRF2 のネガティブレギュレーターである *KEAP1* 遺伝子の変異ホットスポットとされている exon 2-6 領域の変異の有無を Sanger 法で検証した。また、*KEAP1* 遺伝子のプロモーター領域のメチル化を PCR 法にて検証した。これらの結果と上記免疫染色の結果を照合し、CBS、CTH の発現亢進とこれらのレギュレーターの異常との関連を検証した。

(3) 卵巣原発明細胞癌株を用いて、細胞膜上に発現し細胞内のグルタミン酸を放出して細胞外シスチンを取り込むシスチントランスポーター（xCT）の活性を特異的な阻害剤（エラスチン、スルファサラジン）、グルタチオン合成に関与する重要な酵素である CTH の不可逆的阻害剤（DL-プロパルギルグリシン）、GPx4 のセレノシステイン活性部位に直接結合する酵素活性阻害剤（(1S, 3R)-RSL3）を用いて上記の経路を抑制し、明細胞癌における膜脂質の酸化状態の変化を検証する。

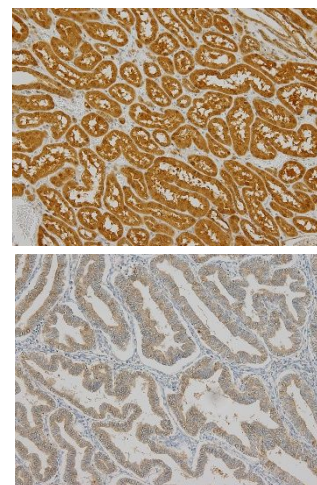
4. 研究成果

1) 卵巣原発明細胞癌 40 例、卵巣原発類内膜癌 40 例の外科的切除検体の FFPE ブロックから組織アレイを作成し、xCT、CBS、CTH、GPx4、NRF2、KEAP1 に特異的な抗体を用いて、免疫組織学的検討を行った。明細胞癌、類内膜癌のいずれにおいても xCT は膜性に軽度、CBS は細胞質に軽度の発現が見られた。一方、CTH は明細胞癌の 90%において細胞質にびまん性に強発現が見られ、その他の検体においても細胞質に軽度の発現を認めた（図 1）。類内膜癌においては CTH 陽性細胞がモザイク状に見られる症例が大部分で、発現の著しく低い症例もみられた（図 2）。GPx4 はほぼすべての明細胞癌において細胞質にびまん性に強発現が見られ、類内膜癌における発現は軽度であった（図 3,4）。明細胞癌においては NRF2 の核への移行を示すものが 17 例（42.5%）にみられ、KEAP1 の発現減弱が 20 例（50%）にみられた。NRF2 の核内移行を示す 17 例のうち 12 例（70.6%）が KEAP1 の発現減弱を示しており、KEAP1 の失活が NRF2 の核内移行に関与している可能性が示唆された。類内膜癌においてはすべての検体に NRF2、KEAP1 の発現がみられたもののいずれも微弱で、NRF2 の核内移行を示すものは認めなかった。以上の結果から、卵巣明細胞癌においては類内膜癌と比較して CTH、GPx4 の発現が亢進しており、GST 依存性に抗細胞膜脂質酸化能（フェロトキシ耐性）を獲得している可能性が考えられた。しかしながら、CTH の発現と NRF2/KEAP1 経路の異常との間に明瞭な関連は証明しえなかった。



CTH 免疫組織染色。
明細胞癌（図 1）は細胞質がびまん性に強陽性を示す。
類内膜癌（図 2）では陽性細胞が散見される。

2) 卵巣明細胞癌において CBS, CTH のレギュレーターである転写因子 *NRF2/NFE2L2* 遺伝子の変異ホットスポットとされている exon 2 領域, および, *NRF2* のネガティブレギュレーターである *KEAP1* 遺伝子の変異ホットスポットとされている exon 2-6 領域の変異の有無を Sanger 法で検証した. いずれの検体においても *NRF2/NFE2L2* 遺伝子にミスセンス・ナンセンス変異は認めなかった. *KEAP1* 遺伝子にミスセンス・ナンセンス変異は 9 例 (22.5%) に認められ, その内訳は p.T113H c.337T>C, p.V264L c.790G>A, p.V299D c.895T>A, p.H311Y c.931C>T, p.R362Q c.1084G>A, p.W403OPA c.1209G>A, p.V418A c.1253T>C, p.D422G c.1265A>G, p.R565K c.1694G>A であった. また, *KEAP1* 遺伝子のプロモーター領域のメチル化を PCR 法にて検証したところ, 23 例 (57.5%) にメチル化をみとめた. 5 例が変異とメチル化の双方, 18 例がメチル化のみ, 4 例が変異のみで, 13 例は遺伝子異常を示さなかった (図 5). *KEAP1* の発現減弱を示した 20 例のうち, 17 例 (85%) に *KEAP1* 遺伝子のプロモーター領域のメチル化が確認され, 明細胞癌における *KEAP1* の発現減弱には *KEAP1* 遺伝子のプロモーター領域のメチル化が関与している可能性が示唆された (図 6).



GPx4 免疫組織染色 .
明細胞癌 (図 3) は細胞質がびまん性に強陽性を示す .
類内膜癌 (図 4) は細胞質が軽度陽性を示す .

図5
Prevalence of *KEAP1* methylation and mutation

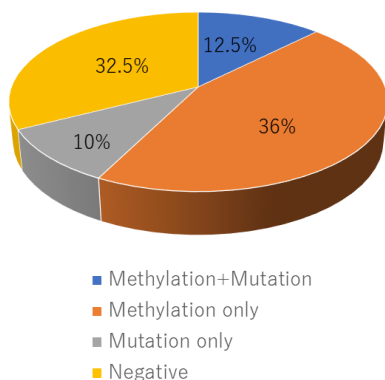
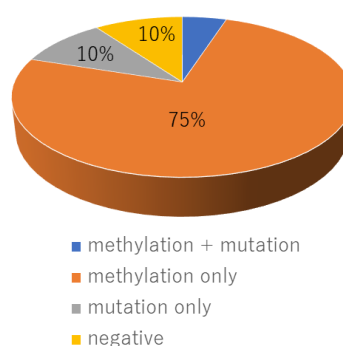


図6
KEAP1 gene silencing in weak/negative staining cases (n = 20)



3) 形態学的/遺伝子変異プロファイルの点において定型的な卵巣明細胞癌細胞株 (RMGV-2) を用いて, 阻害薬による GST 依存性フェロトキシ耐性因子の抗膜脂質酸化能 (フェロトキシ耐性) を評価した. 使用した阻害剤は, シスチントランスポーターを抑制して細胞内グルタチオンを減少させるスルファサラジンとエラスチン, グルタチオン合成に關与する重要な酵素である CTH の不可逆的阻害剤である DL-プロパルギルグリシン, GPx4 のセレノシステイン活性部位に直接結合する酵素活性阻害剤 (1S, 3R)-RSL3 である. RMGV-2 細胞株に対してこれらの阻害剤を投与したところいずれにおいても膜脂質の酸化が亢進し, 細胞増殖能は有意に低下した (スルファサラジン: IC50 = 1mM, エラスチン: IC50 = 1.5mM, DL-プロパルギルグリシン: IC50 = 8.5mM, (1S, 3R)-RSL3: IC50 = 2μM). これは腫瘍細胞の抗酸化能が低下することで自然発生する酸化ストレスへの感受性が高まり, 癌細胞がアポトーシスに至ったためと推察された. 以上の結果から, 卵巣明細胞癌においては GST 依存性のフェロトキシ耐性が亢進しており, その要因として GST の合成に必要な CTH, GST を基質として細胞膜脂質の酸化を抑制し得る GPx4 の発現が亢進していることが示唆された. 明細胞癌は化学療法に対する感受性が低く進行例の予後は不良であり, 標準化学療法である TC 療法との組み合わせを含めた分子標的治療の有用性の検証が求められている. 本研究の内容は卵巣明細胞癌の特異的な生物学的特徴である内膜症性嚢胞由来, 酸化ストレス耐性, 化学療法抵抗性の裏付けとなるものであり, 従来の化学療法とフェロトキシ耐性因子阻害剤の併用投与の有用性を示唆するものと考えられる.

< 引用文献 >

- Hughes CS et al. Quantitative profiling of single formalin fixed tumour sections: proteomics for translational research. *Sci Rep.* 2016;6:34949
Sullivan LB et al. Supporting aspartate biosynthesis is an essential function of respiration in proliferating cells. *Cell.* 2015;162:552-63.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山崎一人, 木全淳一郎
2. 発表標題 KEAP1 silencing in ovarian clear cell adenocarcinoma
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山崎一人, 石田康生
2. 発表標題 子宮体癌におけるcystationine -lyase (CTH) の発現様式の検討
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------