

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18661

研究課題名(和文) 新たな細胞死フェロトーシスに着目した卵巣癌における薬剤抵抗性機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of drug resistance in ovarian cancer focusing on a novel cell death ferroptosis

研究代表者

山谷 日鶴 (Yamatani, Hizuru)

山形大学・医学部・客員研究員

研究者番号：40550637

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)：卵巣明細胞癌ではシスチントランスポーター(xCT)阻害剤であるスルファサラジン(SAS)と併用効果が高い薬剤はパクリタキセル(PTX)であった。さらに、PTXとSASの併用投与によって細胞内GSHが低下し、ROSの蓄積が高度に増強する細胞ではアポトーシスが誘導され、glutathione peroxidase 4(GPx4)の発現が低い細胞ではフェロトーシスが誘導された。また、メチオニンからGSHが産生する経路の律速酵素であるcystathionine gamma-lyase (CGL)の発現が高い細胞ではPTXとSASによる細胞死が誘導されないことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵巣癌の化学療法としてプラチナとタキサン製剤の併用療法(TC療法)が標準療法として確立されている。しかしながら、TC療法無効症例やTC療法に対して耐性を獲得した再発例に対する新規治療法はなく、その開発が急務となっている。本研究ではスルファサラジンとパクリタキセルの併用投与は卵巣明細胞癌細胞株において細胞死を誘導した。スルファサラジンは既に臨床応用されている薬剤であり、薬剤抵抗性となり治療選択肢が少ない症例に対して新たな治療法となり得る可能性がある点で学術的、社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：The present study demonstrated that the most effective drug in combination with sulfasalazine (SAS), a cystine transporter (xCT) inhibitor, was paclitaxel (PTX) in ovarian clear cell carcinoma, characterized by a poor response to chemotherapy. Furthermore, the combined administration of PTX and SAS induced apoptosis in cells with decreased intracellular glutathione (GSH) depletion and highly enhanced ROS accumulation, and induced ferroptosis in cells with low expression of glutathione peroxidase 4 (GPx4). Cell death by PTX and SAS was not induced in cells with high expression of cystathionine gamma-lyase (CGL), the rate-limiting enzyme in the pathway of GSH production from methionine.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：卵巣癌 スルファサラジン グルタチオン アポトーシス フェロトーシス

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌の臨床上的の問題点は、当初、抗癌剤に感受性を示しても再発が多く、再発時は化学療法に対して耐性を示し、治療困難となることである。卵巣癌の化学療法としてプラチナとタキサン製剤の併用療法 (TC 療法) が標準療法として確立されているが、TC 療法無効症例や TC 療法に対して耐性を獲得した再発例に対する新規治療法はなく、その開発が急務となっている。

近年、がん細胞の薬剤抵抗性機構の一つに抗癌剤によって誘導される活性酸素 (ROS) を抗酸化物質であるグルタチオン (GSH) が抑制する機構 (レドックス制御) が注目されている (Trachootham D, Nat Rev Drug Discov. 2009)。GSH はシスチントランスポーター (xCT) を介してシスチンが細胞内に取り込まれシステインに変換されることで産生される。潰瘍性大腸炎や関節リウマチの治療薬として臨床的に使用されているスルファサラジン (sulfasalazine; SAS) は、シスチントランスポーター (xCT) 阻害作用を持ち、細胞内へのシスチンの取り込みを抑制することで GSH の産生を低下させる。SAS は大腸がんにおいて GSH の減少、ROS の蓄積、カスパーゼ依存性のアポトーシスを誘導して cisplatin (CDDP) 感受性を高めると報告されている (Ma Mz, Cancer Lett 2015)。一方、SAS はグリオーマ細胞や頭頸部癌細胞において xCT を阻害して、フェロトーシス (カスパーゼ非依存性で鉄 (ferrum) を介した細胞内で生じる脂質酸化が起因となる新しい細胞死の概念) を誘導することも報告されている (Sehm T, Oncotarget 2016, Roh JL, Cancer Lett 2016)。さらに我々は、SAS が paclitaxel (PTX) 耐性子宮体部漿液性癌細胞株において従来の細胞死であるアポトーシスではなく、フェロトーシスによって細胞死を誘導することを見出した (Sugiyama A, Oncol Lett 2020)。これらの報告と我々の知見から、SAS は cisplatin との併用ではアポトーシスを誘導することで cisplatin の効果を増強し、paclitaxel との併用ではフェロトーシスを誘導することで paclitaxel の効果を増強する可能性がある。さらに興味深いことに、卵巣癌の化学療法は TC 療法が標準療法であるため、SAS を併用することでアポトーシスとフェロトーシスが同時に起こり、薬剤感受性の増強または再発例における薬剤抵抗性を克服できる可能性がある。卵巣癌において SAS が抗癌剤の効果を増強するか、否かを検討した報告は未だなく、さらに増強作用のメカニズムがアポトーシスであるのかフェロトーシスであるのかを検討することで、SAS が卵巣癌における薬剤抵抗性を克服するための新規治療薬となり得る可能性がある。

2. 研究の目的

研究当初は、卵巣癌の薬剤抵抗性とレドックス制御に関連があるかを明らかにすることを第一の目的としていたが、卵巣癌細胞株では GSH 産生量と薬剤感受性に相関関係を認めなかった。そのため我々は卵巣癌の組織型の中で薬剤抵抗性が臨床上的の問題となっている卵巣明細胞癌細胞において、SAS がレドックス制御機構を抑制することで、抗癌剤の細胞増殖抑制効果が増強するかを明らかにすることを新たな目的とした。さらに卵巣明細胞癌において SAS とプラチナ製剤またはタキサン製剤併用によって誘導される細胞死がアポトーシスによるものなのか、またはフェロトーシスによるものなのかを明らかにし、SAS が TC 療法との併用投与によってアポトーシスとフェロトーシスが同時に引き起こされることで再発症例の薬剤抵抗性を解除する新規治療法となり得るか検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞内 GSH 濃度の測定

GSH-GloTM Glutathione luminescent assay kit (Promega Corporation) を用いて細胞内 GSH 濃度を測定した。細胞を 96-well プレートに 5×10^3 個となるように撒き、37 °C で 3 時間培養し細胞の接着を確認した。発光シグナルは Thermo Scientific Varioskan® Flash (Thermo Fisher Scientific K.K., Tokyo, Japan) を用いて計測した。

(2) 細胞内 ROS の測定

チューブに回収した細胞をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 2 回洗浄したのち、PBS で再懸濁した。10 μ M の 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA; Sigma-Aldrich; Merck) を室温で 10 分間反応させた。DCF-DA 処理中は光を遮断した。DCF-DA なしで処理されたサンプルをコントロールサンプルとして単一細胞の分画を前方散乱で決定した。またコントロールサンプルでフルオレセインイソチオシアネートチャネルにおける分画を設定した。コントロールサンプルで決定した分画よりも蛍光レベルの強い細胞を ROS 陽性細胞と定義した。全てのフローサイトメトリー分析は FACSCanto™ II Flow Cytometer (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) を用いて行い、データは FlowJo ソフトウェア version 7.6.5 (Treestar Inc., Ashland, OR, USA) を用いて解析した。

(3) SAS と CDDP または PTX との併用投与による細胞増殖能への影響に関する検討

細胞を 96-well プレートに 5×10^3 個となるように撒き、37 °C で 24 時間培養した。PTX と SAS をそれぞれ単剤投与または SAS と PTX を併用投与してさらに 24 時間培養した。Cell viability は Cell Titer 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS assay; Promega Corporation) を用いて評価した。

(4) SAS と PTX 併用投与による ROS の蓄積と誘導される細胞死の検討

ヒト卵巣明細胞癌細胞株において PTX と SAS をそれぞれ単剤投与または SAS と PTX を併用投与して細胞内 ROS レベルを検討した。細胞死誘導機序を評価するため、アポトーシスマーカーである cleaved PARP の発現をウェスタンブロッティングで検討した。フェロトーシス阻害剤である ferrostatin-1 を用いて PTX と SAS による細胞増殖抑制効果が解除されるかを検討することでフェロトーシスによる細胞死が誘導されているかを検討した。

(5) GSH 合成経路関連蛋白の発現

GSH 合成経路関連蛋白である xCT, システインから GSH を合成する経路の律速酵素である glutamate-cysteine ligase catalytic subunit (GCLC)、メチオニンからシステインが合成される trans-sulfuration 経路の律速酵素である cystathionine gamma-lyase (CGL)、フェロトーシスを抑制する glutathione peroxidase 4 (GPx4) の発現はウェスタンブロッティング法により検討した。

4. 研究成果

(1) ヒト卵巣明細胞癌細胞株に対する SAS の効果

SAS が xCT を阻害することで GSH 産生を抑制して ROS が蓄積する。この作用を確認するため、SAS をヒト卵巣明細胞癌細胞株である TOV21G、RMG-1、HAC-2、ES-2 に投与し、GSH 濃度の変化(図 1A)および細胞内 ROS レベル(図 1B)を検討した。SAS 400 μM で 24 時間処理すると、TOV21G、RMG-1 および ES-2 では細胞内 GSH 濃度が有意に低下し、細胞内 ROS レベルが上昇していた。HAC-2 では細胞内 GSH 濃度は有意に低下したものの、細胞内 ROS レベルに変化を認めなかった。

(2) SAS と CDDP または PTX との併用投与による細胞増殖能への影響

CDDP と SAS 併用投与によって CDDP または SAS 単剤投与と比較して有意に細胞増殖が抑制されたのは ES-2 のみであった。TOV21G、RMG-1、HAC-2 では SAS の併用投与によって CDDP の細胞毒性を増強させる効果は認めなかった(図 2A)。PTX または SAS 単剤投与と比較して PTX と SAS 併用投与によって TOV21G、RMG-1、ES-2 では有意に細胞増殖が抑制されたが、HAC-2 では SAS 併用投与による PTX の細胞毒性増強効果は認めなかった(図 2B)。これらの結果から卵巣明細胞癌細胞株では SAS との併用効果が CDDP より PTX で高いことが明らかとなったため、以下の実験は SAS と PTX を用いて行うこととした。

(3) SAS と PTX 併用投与による ROS の蓄積と誘導される細胞死に関する検討

ヒト卵巣明細胞癌細胞株において PTX と SAS をそれぞれ単剤投与または SAS と PTX を併用投与して細胞内 ROS レベルを検討した。TOV21G、RMG-1、ES-2 では、PTX と SAS 併用投与によってそれぞれの単剤投与と比較して細胞内 ROS 産生の増加を認めたが、HAC-2 では PTX と SAS 併用投与による ROS 産生の増加を認めなかった(図 3)。

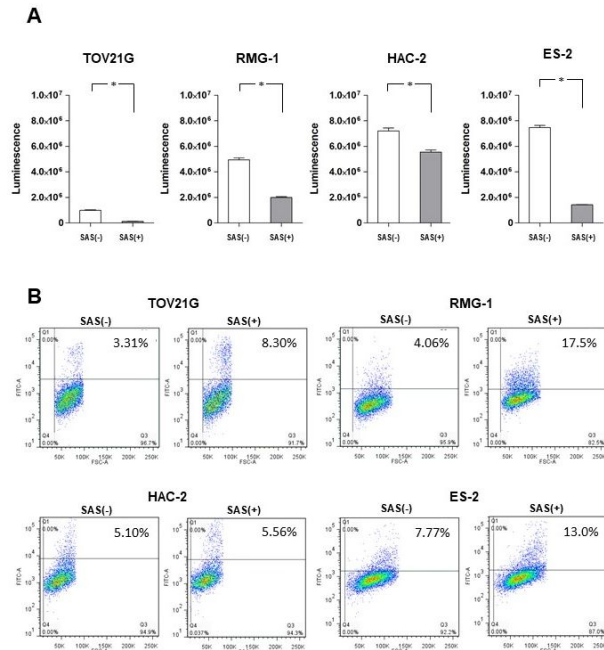


図 1

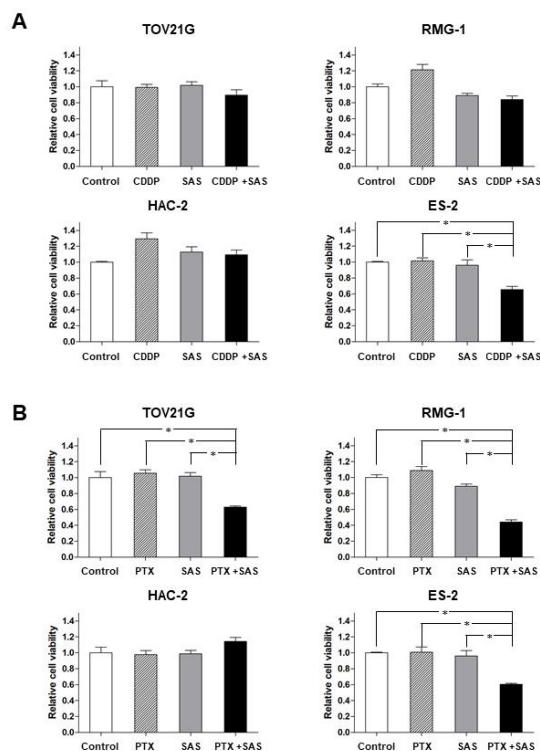


図 2

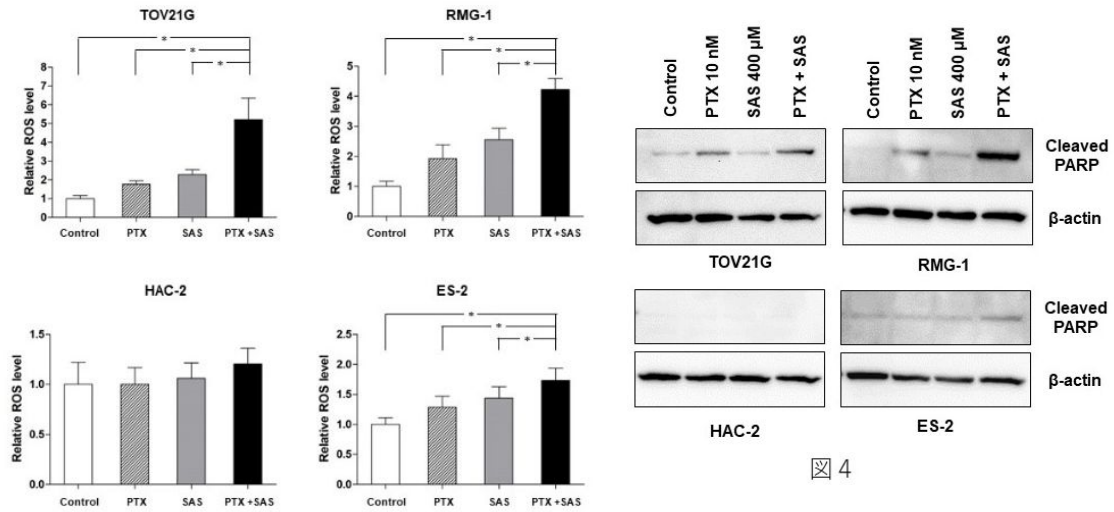


図 3

次に ROS 産生の増加による細胞死誘導機序を評価するため、アポトーシスマーカーである cleaved PARP の発現をウェスタンブロットングで検討した。TOV21G と RMG-1 では、PTX と SAS 併用投与によりそれぞれの単剤投与と比較して cleaved PARP の発現が増強したが、HAC-2 と ES-2 では PTX と SAS 併用投与による cleaved PARP の発現増強を認めなかった (図 4)。ROS 産生の増加による細胞死誘導機序にはフェロトーシスも考えられたため、PTX と SAS 併用投与による細胞増殖抑制効果がフェロトーシス阻害剤である ferrostatin-1 (Fer-1) で解除されるかを検討した。ヒト卵巣明細胞癌細胞株に対し、PTX と SAS および Fer-1 投与を行ったところ、Fer-1 によって PTX と SAS の併用投与による細胞増殖抑制効果が解除されたのは ES-2 のみであった (図 5A)。ES-2 における PTX と SAS 併用投与による細胞死誘導機序がフェロトーシスであることを確認するため、アポトーシス阻害薬である Z-VAD-FMK を用いて同様の実験を行った。PTX と SAS および Z-VAD-FMK 投与を行ったところ、Z-VAD-FMK によって PTX と SAS 併用投与による細胞増殖抑制効果が解除されなかった (図 5B)。これらの結果から、PTX と SAS 併用投与によって TOC21G と RMG-1 では細胞内 ROS の蓄積とアポトーシス誘導が増強され、ES-2 においては細胞内 ROS の蓄積によりフェロトーシスが誘導をされることが明らかになった。また、HAC-2 に関しては PTX と SAS 併用投与による細胞内 ROS の蓄積と細胞死誘導効果を認めなかった。

(4) GSH 合成経路関連蛋白の発現と SAS の効果との関連

ヒト卵巣明細胞癌細胞株において HAC-2 のみ PTX と SAS による細胞増殖抑制効果と細胞内 ROS の蓄積および細胞死誘導効果に増強を認めなかった。このメカニズムを解明するため GSH 合成経路に関連する蛋白質の発現をウ

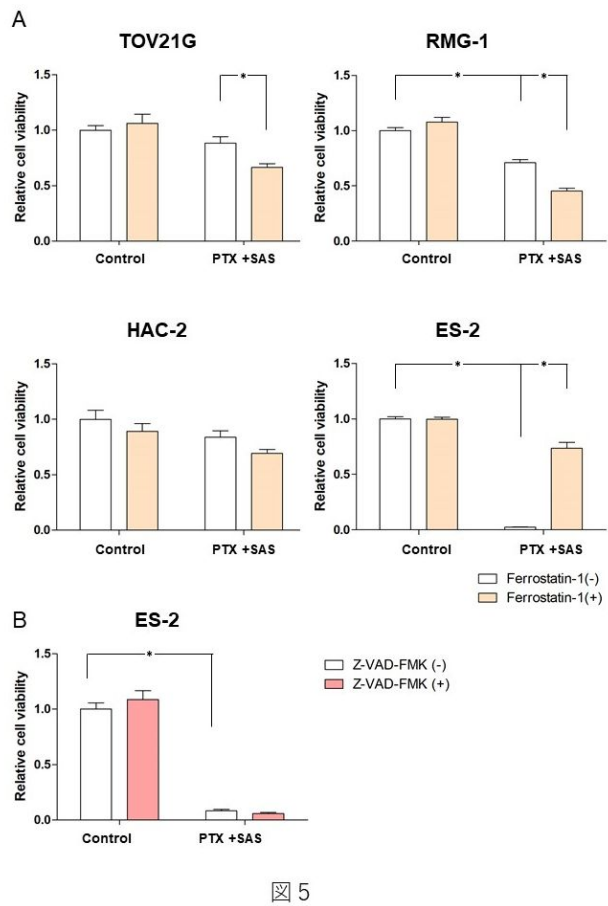


図 5

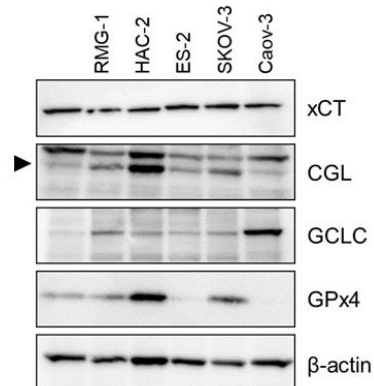


図 6

エスタンプロットティングにより検討した。さらに、漿液性癌細胞株である SKOV3 と粘液性癌細胞株である Caov-3 を用いて、明細胞癌とその他の組織型で GSH 合成経路関連蛋白の発現を比較した。SAS が阻害作用を有する xCT の発現レベルは 4 種の卵巢明細胞癌細胞株において同様であった。メチオニンからシステインが合成される trans-sulfuration 経路の律速酵素である cystathionine gamma-lyase (CGL) の発現レベルは他の細胞株に比較して HAC-2 で高かった。GSH の律速酵素である glutamate-cysteine ligase catalytic subunit (GCLC) の発現レベルは卵巢明細胞癌細胞株において同様であった。フェロトーシス誘導に関連する GPx4 の発現レベルは、フェロトーシスが誘導された ES-2 で低かった (図 6)。これらの結果から、CGL が高発現していると PTX と SAS 併用投与による細胞増殖抑制効果の増強を認めないこと、フェロトーシス誘導には GPx4 の発現の低下が関連していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

山形大学医学部産婦人科 https://yamagata-obgy.com/research/shuyou/index.html
--

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
---------	---------