

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07036

研究課題名(和文)細胞内鉄代謝シグナルの解明とがん治療への応用

研究課題名(英文)The possibility of cancer therapy targeting to cellular iron metabolism

研究代表者

宮沢 正樹 (Miyazawa, Masaki)

東海大学・健康学部・准教授

研究者番号：10554818

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：鉄は細胞分裂やエネルギー産生など生体・細胞の恒常性維持に必要な不可欠なミネラルである。申請者は近年、抗がん剤であるシスプラチンによるがんの細胞死が、DNAへの結合による複製阻害とは独立して、細胞内の鉄の欠乏によっても誘導されることを明らかにした。そこで本課題では、これらの結果をもとに研究をさらに発展させ、鉄欠乏によるがん細胞死の分子メカニズムの解明を行い、細胞内鉄代謝制御系を標的とした副作用の少ないがん治療法の確立を最終的な目標にして解析を行なった。解析の結果、膵がん組織におけるIRP2タンパク質蓄積量と患者の生存率に有意な相関が見られ、IRP2ががん治療の標的となり得る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

鉄の欠乏は、貧血をはじめとする栄養障害の原因となる一方で、過剰な鉄は成長因子シグナルの活性化やDNAの酸化傷害を引き起こす活性酸素(ヒドロキシラジカル)の産生原因となり、発がんやがんの悪性化につながる。そのため申請者は、このリスクファクターとなりえる過剰な鉄を標的として、がん治療へ応用することを目標とした。本研究において、鉄の代謝とがん細胞の生存および増殖との関係を分子レベルで解明することで、鉄に関連する新しい医療技術の実用化に貢献できると考えている。

研究成果の概要(英文)：Iron is an essential mineral for maintaining cellular and organismal homeostasis, including cell division and energy production. Recently, we have elucidated that cancer cell death induced by the chemotherapeutic agent cisplatin is also triggered by intracellular iron depletion, independently of its inhibition of DNA replication through DNA binding. Therefore, based on these findings, this project aims to further advance the research by elucidating the molecular mechanisms of cancer cell death induced by iron deficiency. Additionally, the project seeks to establish a practicable and low-side-effect cancer therapy targeting intracellular iron metabolism regulation systems and to lay the groundwork for the development of novel anticancer drugs. The analysis revealed a significant correlation between IRP2 protein levels and patient survival rates in pancreatic cancer, indicating that IRP2 could be a potential target for cancer therapy.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：がん 鉄代謝

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

これまでの疫学的調査により、鉄の摂取量とがんの発症率や進行との関係が徐々に明らかにされてきた。例えば、食事による高鉄摂取は、膵がん、結腸がん、肺がんといった多くの悪性腫瘍の発症率の増加と正の相関を示すことが報告されている。さらに、鉄代謝に関わる分子レベルの解析においても、がん細胞におけるトランスフェリン受容体の高発現による鉄の取り込み強化や、鉄貯蔵を担うフェリチンの発現抑制を介した細胞内自由鉄の増加などが報告されている。これは、がん細胞が増殖に必要な鉄を迅速に利用できるようにするための戦略であるように思われる。このため、多くの研究者はがん治療における鉄キレート剤の潜在的な利用の可能性について長年にわたって解析を進めてきた。そしてこれまでの研究から、鉄キレート剤は鉄代謝の調節を通じてがん細胞の成長や増殖を抑制する可能性を示唆した。特に、デフェロキサミン (DFO) やデフェラシロクス (DFX) といった鉄キレート剤は膵がん、乳がんといった種類のがん細胞に対してアポトーシス誘導効果や抗腫瘍効果を示すことが細胞レベルの解析やマウス異種移植実験により確認された。しかしながら現在のところ、鉄キレート剤が単独で抗がん剤として正式に承認されるには至っていない。これは鉄キレート剤の効果と安全性に関するさらなる試験が必要であること意味しているが、承認に至らない一因として、鉄キレート剤によるがん細胞内の鉄欠乏状態の維持が一過性である可能性が考えられている。

### 2. 研究の目的

細胞内の鉄濃度の調節は、鉄応答エレメント (IRE) と鉄調節タンパク質 (IRP) 制御系を介して極めて厳密かつ迅速に行われる。この IRE-IRP 制御系は、細胞内の鉄バランスを維持するためのフィードバックメカニズムを提供し、鉄代謝の調整を行っている。そのため、鉄キレート剤の投与による鉄欠乏効果は、細胞が迅速に反応して鉄の取り込みを増加させるため、一時的なものとなってしまう欠点と考えられる。

申請者はこれまでの先行研究において、抗がん剤であるシスプラチンが鉄の制御を司る IRP の機能を阻害する化合物であることを証明した。この発見は、シスプラチンが DNA 複製阻害を通じて細胞死を誘導するという従来の理解に加えて、新たなメカニズムとして鉄欠乏を介した細胞死誘導効果が存在することを示し、がん治療の新たな可能性が見出された。そこで、本研究の目的は、シスプラチンによる鉄欠乏誘導効果を基盤として、細胞死シグナル伝達経路の詳細な分子メカニズムを解明し、鉄代謝を標的とした新規癌治療法の開発の端緒とすることを目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) 腫瘍組織における鉄代謝と生存時間との比較解析

膵がんは治療に対する抵抗性が高く、手術、化学療法、放射線療法の効果が限定的であり、5年生存率がわずか 10% 未満の難治性のがんとして知られている。このため、新たな治療法の開発が求められているが、近年、膵がんでは鉄の取り込みを担うトランスフェリン受容体の過剰発現が報告されている。そこで、ヒト膵がん組織を用いて、鉄代謝制御因子の免疫組織染色、ターンブル染色、およびベルリンブルー染色を行い、鉄代謝と膵がんの予後や悪転のの違いについて確認する。本解析では膵がん 250 症例について調査を行い、得られたデータをもとに、鉄代謝と鉄蓄積が患者の生存時間に与える影響について統計解析を実施する。

#### (2) 鉄欠乏によるがん細胞死の分子メカニズムの解明

シスプラチンによるがん細胞死が DNA の傷害とは独立して鉄欠乏を介して生じることは、シスプラチンと鉄キレート剤 DFO の併用実験において既に確認している。そこで、本研究では鉄代謝制御因子の阻害により鉄欠乏を誘導した場合に、がん細胞内で変化する遺伝子群を RNA-seq 法を用いて網羅的に解析し、その全容を明らかにすることを目指す。まず、IRP2 の shRNA 発現ベクターをがん細胞へ安定的に導入し、薬剤によりノックダウンを引き起こしたがん細胞の RNA サンプルを収集し、RNA-seq による遺伝子発現解析を行なう。さらに、RNA-seq によって得られた膨大な遺伝子発現データを整理し、特定の遺伝子群の発現変動や、それらが関与する細胞機能の変化や細胞死シグナルを把握することを目的とする。これにより、鉄代謝制御因子の阻害によって引き起こされる鉄欠乏状態が、がん細胞内の遺伝子発現にどのような影響を与えるのか、そ

のメカニズムやがん治療への応用の可能性を詳細に説明する。

#### 4. 研究成果

ヒト膵がん組織 250 症例を用いて、HE 染色、IRP2 免疫染色、ターンブルブル染色、ベルリンブルー染色を行なった。その結果、ターンブルブル染色、ベルリンブルー染色については、統計解析を行うための十分な染色像を得ることができなかったが、IRP2 の免疫組織染色については統計解析を行うための十分な染色像を得ることができた（図 1）。

IRP は IRE-IRP の制御系を介してトランスフェリン受容体やフェリチンの量の調節を担う鉄代謝における中心的な因子であり、細胞内の鉄量が多い場合は IRP2 のタンパク質は分解される。解析の結果、IRP2 のタンパク質量と患者の生存期間には有意な相関がみられることを明らかにした。この成果は IRP2 のタンパク質量が膵がん患者の予後の診断に有効であることを示唆するものであった。

さらに、ヒト膵がん細胞株を用いて IRP2 のノックダウン解析を行った。その結果、IRP2 の阻害により細胞増殖速度の有意な低下が確認され、IRP2 が膵がん治療の標的となり得ることが示唆された。次に、IRP2 の shRNA 発現ベクターをがん細胞へ安定的に導入し、薬剤によりノックダウンを引き起こしたがん細胞の RNA サンプルを回収し、RNA-seq による遺伝子発現解析を行なった。その結果、図 2 で示すように IRP2 の阻害により多くの遺伝子の発現変化が認められた。その後、遺伝子オントロジー解析を行なった結果、特にミトコンドリアにおけるエネルギー代謝や脂質代謝に関わる経路の変化が顕著であった。

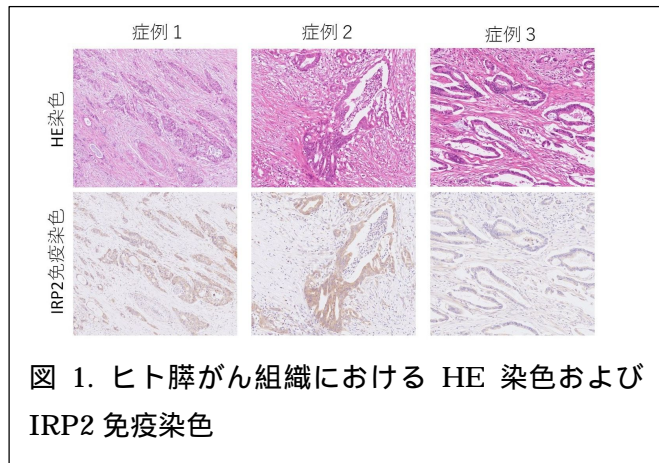


図 1. ヒト膵がん組織における HE 染色および IRP2 免疫染色

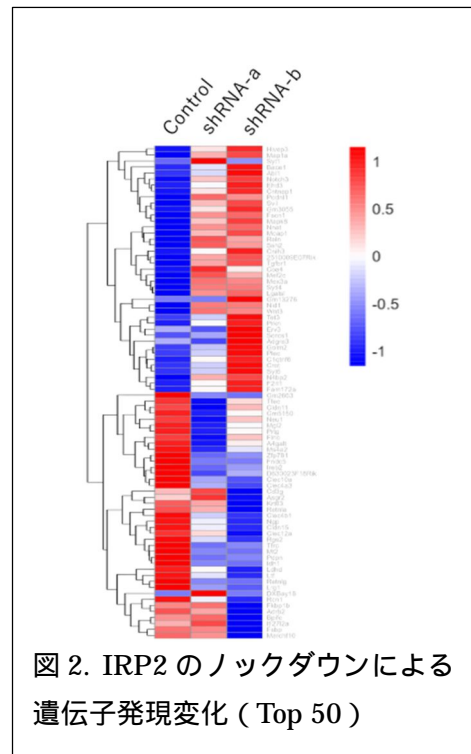


図 2. IRP2 のノックダウンによる遺伝子発現変化 (Top 50)

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 宮沢正樹	4. 巻 273
2. 論文標題 細胞内鉄代謝とがん幹細胞の制御	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 医歯薬出版(株)	6. 最初と最後の頁 424-249
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 0件）

1. 発表者名 山邊瑠奈
2. 発表標題 Identification of novel proteins interact with iron-regulatory protein IRP2
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小平みの里
2. 発表標題 The function of iron regulatory protein in pancreatic cancer
3. 学会等名 日本基礎老化学会
4. 発表年 2021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
研究分担者	平林 健一 (Hirabayashi Kenichi) (60514388)	富山大学・学術研究部医学系・教授  (13201)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	服部 鮎奈  (Hattori Ayuna)  (60820420)	京都大学・医生物学研究所・准教授     (14301)	

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