

令和 6 年 4 月 25 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08289

研究課題名（和文）鉄除去により強制的に変化させた代謝を標的とした新規抗癌併用療法の開発

研究課題名（英文）Development of a novel anti-cancer combination therapy targeting metabolism forcibly altered by iron removal

研究代表者

藤澤 浩一（Fujisawa, Koichi）

産業医科大学・産業生態科学研究所・教授

研究者番号：00448284

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）：鉄は生体に必要な微量元素であり、鉄キレート剤は癌に対する新たな治療戦略として注目されている。鉄キレート剤投与によっておこる代謝変化を解析するとともに耐性株における耐性メカニズムを解析することで新たに鉄キレート剤との併用効果のある薬剤の同定を行った。HeLa細胞では乳酸の排出を阻害する乳酸排泄抑制剤が併用効果を持つことが認められた。肝癌細胞株ではグルタミン酸のTCA回路への流入を防ぐグルタミナーゼ阻害薬を投与すると併用効果を認められた。さらにDF0投与により亢進するオートファジーをクロロキンで阻害することでより効率よく癌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

これまでに鉄キレート剤を用いた併用療法について報告されている。しかし既存の抗がん剤との併用が主なものであり、鉄キレート剤の代謝変化を利用した併用療法についての報告はない。本研究では鉄キレート剤耐性株の代謝変化をメタボローム解析で詳細に解析することでターゲットを絞り新規併用療法を開発するものであり、新しいアプローチである。本研究で得られた成果は、今後の新たな癌化学療法に有益なものになると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Iron is a trace element necessary for living organisms, and iron chelators are attracting attention as a new therapeutic strategy for cancer. In HeLa cells, lactate excretion inhibitors, which block lactate efflux, were found to be effective in combination with iron chelators. In hepatocellular carcinoma cell lines, a glutaminase inhibitor that prevents glutamate from entering the TCA cycle was found to have a concomitant effect. Furthermore, inhibition of autophagy, which is enhanced by chelator administration, with chloroquine more efficiently inhibited cancer cell growth.

研究分野：肝臓

キーワード：がん 鉄代謝

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在癌は最も大きな問題となっている疾患であり、膵癌や肝癌は、本邦での頻度が高く予後不良な難治性消化器癌である。膵癌は早期発見が困難なことであり、早期に浸潤、転移を起こしやすい。また進行膵癌に対して、化学療法があるがすべての症例に導入することは困難であり、難治性消化器癌に対して新規治療薬の開発と治療法の確立が望まれている。

2. 研究の目的

鉄は生体に必要な微量元素で、細胞の増殖、生存などに必須であり、適切な濃度の鉄を保つことが重要である。鉄を含むタンパクは数多くあり、特に 2-oxoglutarate dioxygenase family に属する酵素の中には低酸素に關与する HIF-hydroxylase、コラーゲン成熟に關わる collagen hydroxylase、カルニチン合成に關わる酵素などが含まれている。また DNA 合成に關わる Ribonucleotide reductase、TCA 回路の mitochondrial aconitase、電子伝達系の NADH-coenzyme Q reductase、Rieske protein などは Iron-sulfur enzymes として知られる重要な酵素である。このように細胞内の鉄をキレートすることで代謝が大きく変化することから、DFO 投与により強制的に代謝変化を誘導し、その変化を新たなターゲットとした新規 DFO 併用治療法の開発を目的とした。

3. 研究の方法

3-1 ウェスタンブロット解析

ウェスタンブロットは標準的な方法を使用して実施した。細胞溶解バッファーは、62.5 mM トリス-HCl (pH 6.8)、4%の SDS、および 200 mM ジチオスレオン酸で調製した。電気泳動には、12%のアクリルアミドゲルを使用した。電気泳動には、20 μ g の試料タンパク質を使用し、タンパク質をポリビニルジフルオライド (PVDF) 膜に転送し、5%の脱脂乳で非特異的なエピトープをブロッキングした。

3-2 代謝物解析

代謝物および統計解析は、Metabolon 社で実施された。細胞ペレットはメタノール抽出にさらされ、次いで超高速液体クロマトグラフィー/質量分析 (UHPLC / MS) (陽性、陰性、または極性イオンモード)、ガスクロマトグラフィー/質量分析 (GC / MS) による分析のために分割した。代謝物は、化学標準の参照ライブラリとの自動比較によって識別され、品質管理のための視覚的検査を行った。

3-3 総 RNA 抽出

細胞から総 RNA を TRIzol 試薬 (Life Technology) を使用して抽出した。RNA サンプルは、ND-1000 分光光度計で定量し、品質は Experion System で確認した。

3-4 SAGE

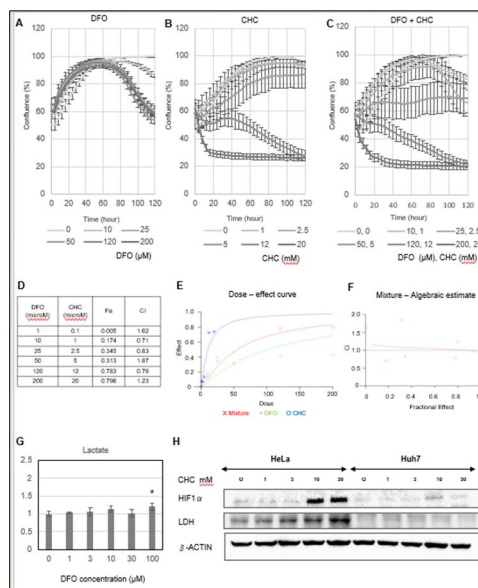
イオンアンプリセックストランスクリプトームヒューマンジーン発現キット (Life Technologies) をライブラリ作製に使用した。イオンプロトン次世代シーケンサーライブラリ解析ビーズを作製し、Ion PI IC 200 キット (Life Technologies) および Ion PI Chip Kit v2 BC を用いて、シーケンスした。代謝物解析および SAGE の結果は、Ingenuity Pathways Analysis (IPA) によって統合した。

4. 研究成果

4-1 肝癌細胞株 (Huh7) において DFO と乳酸排泄抑制剤の併用効果は認められない

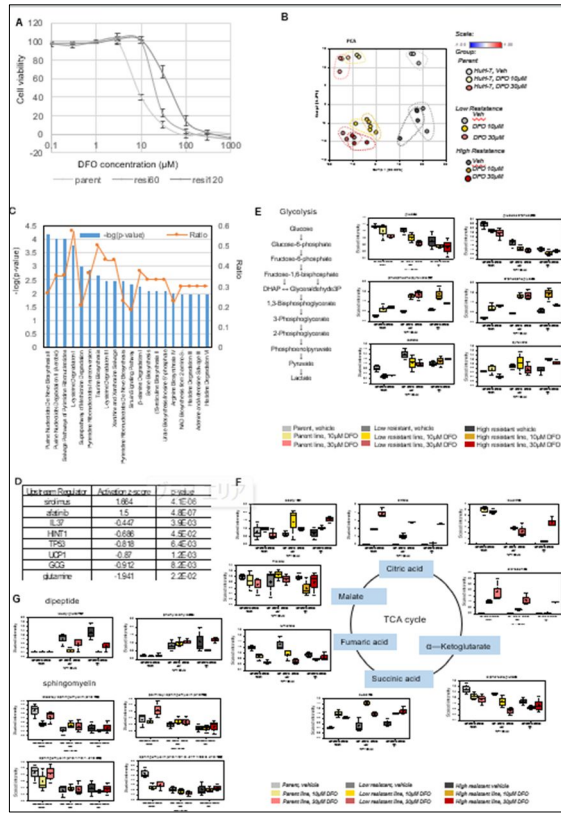
HeLa 細胞を用いて得られた結果が肝癌細胞株でも同様の効果があるか検討するため、Huh7 を用いて併用効果を詳しく調べるために DFO, CHC, DFO+CHC の各種濃度で細胞増殖を評価した (Fig. 1A-C)。Combination index (CI) は 1.0 未満の値を示さず、DFO と CHC の併用効果は認められなかった (Fig. 1D-F)。効果がなかった原因として、HeLa 細胞では DFO の濃度依存性に Lactate が増加したが、Huh7 では Lactate の蓄積は HeLa に比べて少なかった (Fig. 1G)。また WB で HeLa 細胞と Huh7 細胞を比較すると、HeLa では HIF1 の著明な蓄積と DFO の濃度依存性に LDH タンパクの蓄積がみとめられたが、Huh7 では DFO の濃度依存的 HIF1 蓄積の程度が低く LDH の発現が増加しなかったことが CHC の効かなかった原因と考えられた (Fig. 1H)。

4-5 DFO 耐性 Huh7 細胞株では dipeptide の蓄積が



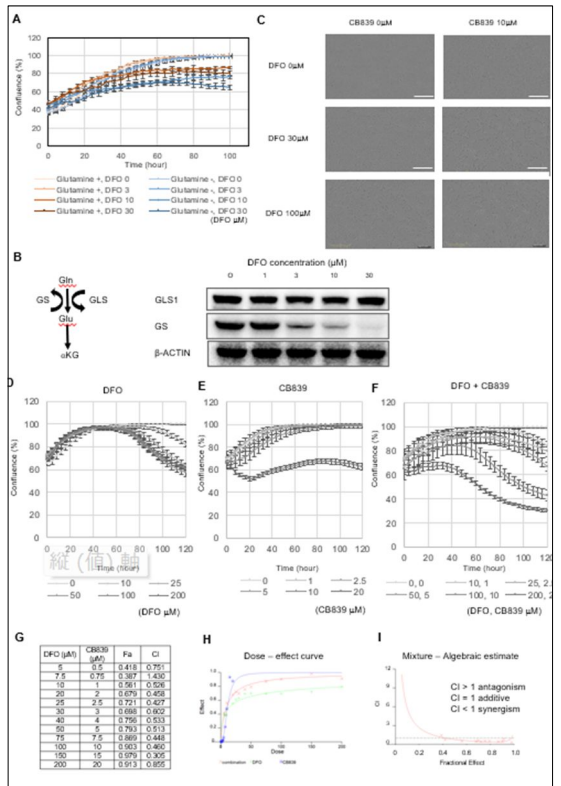
起こり、解糖系亢進とグルタミン代謝の変化が起こる

HeLa 細胞と Huh7 では由来臓器も異なりその代謝が大きく異なっていることが考えられたため、DFO 耐性株の作製を行い、代謝変化を検討した。親株の IC50 が 7.6 μM であるのに対して軽度 DFO 耐性がある low resistant は 19.1 μM 、さらにより DFO 耐性が高い high resistant では 45.8 μM であった (Fig.2A)。メタボローム解析を行ったところ、PCA 解析で明らかな分離が認められた (Fig.2B)。親株と high resistant との比較を行った IPA 解析では、HeLa でも認められたようにプリン、ピリミジン代謝に関わる purine and pyrimidine nucleotides De Novo biosynthesis, salvage pathways of pyrimidine ribonucleotides, pyrimidine ribonucleotides interconversion などが Canonical pathway として挙がってきた (Fig.2C)。また upstream regulator として mTOR (mechanistic Target of Rapamycin) 経路を阻害する sirolimus の他、EGFR 阻害薬である afatinib、glutamine などが挙がってきた (Fig.2D)。さらに各代謝産物を比較すると DFO を投与していない状態で Resistant cell line は解糖系の亢進を示唆する pep や lactate の上昇が認められた (parent VEH vs low, High VEH, Fig.2E)。TCA 回路では、DFO 投与後の citrate, cis-aconitate, isocitrate の増加が耐性株では低下していた (Fig.2F)。また興味深い変化として耐性株で多くの dipeptide の蓄積が認められ、スフィンゴミエリンの減少が認められた (Fig.2GH)。



4-6 Huh7 において DFO と GLS 阻害薬との併用により相乗効果をもたらす

Upstream regulator としてグルタミン (Gln) が挙がってきたことに着目して DFO 感受性に対する Gln の影響を評価した。Gln 投与群に比べ Gln 非投与群では DFO の感受性が増加したことから (Fig.3A)、グルタミンオリシスが DFO 感受性に影響を及ぼすことが示唆された。また Gln から Glu へ変換する GLS 1 の発現は DFO の濃度依存性に変化はなかったが、Glu から Gln へ変換する GS は発現の濃度依存的減少が起こり、相対的に Glu を蓄積させる方向の変化であると考えられた (Fig.3B)。そこでグルタミンナーゼ (glutaminase) の低分子阻害剤 CB-839 と DFO を併用したところ併用効果が認められた (Fig.3C)。併用効果を詳しく調べるために DFO, CB839, DFO+CB839 の各種濃度で細胞増殖を評価した (Fig.3D-F)。Combination index (CI) は 1.0 未満の値を示し DFO と CB839 の併用効果は相乗的と考えられた (Fig.3G-I)。



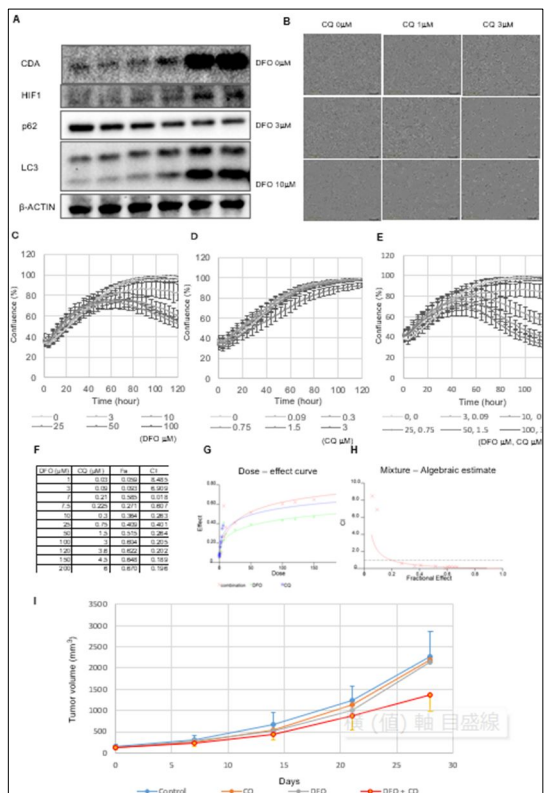
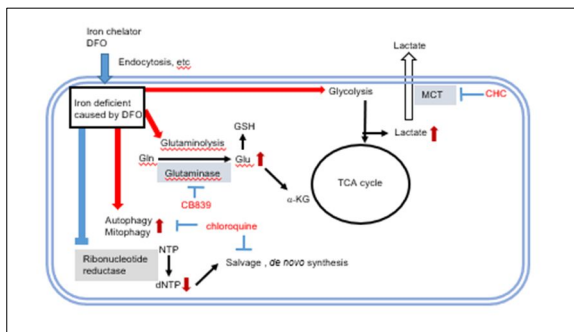
4-7 Huh7 において DFO はオートファジー阻害薬との併用により相乗効果をもたらす

CB839 との併用効果は相乗的ではあるが、更に効率の良い相乗効果を持つ併用薬剤を検討した。DFO によって mitophagy 誘導されることが知られており、さらにプリンおよびピリミジンサルベージ回路の亢進が認められ、これらのサルベージ回路にはオートファジーの関与が示唆されていることから、Huh7 において DFO 投与によりオートファジーが誘導されるかどうか評価した。DFO 投与で濃度依存的にピリミジンサルベージ経路の構成要素である Cytidine deaminase (CDA) が増加し、LC3- の増加の増加が認められ、オートファジーの亢進が認められた (Fig.4A)。そこでオートファジー阻害薬であるクロロキン (CQ) との併用療法を検討した。CQ と DFO の併用により CQ1 μM で軽度、3 μM でより高い DFO の効果が認められた (Fig.4B)。併用効果を詳しく調べるために DFO, CQ, DFO+CQ の各種濃度で細胞増殖を評価した

Figure 4: Effect of CQ on DFO-induced autophagy. Panel A shows CDA and LC3 levels. Panel B shows cell viability vs DFO and CQ concentrations. Panel C shows microscopy images of autophagy induction.

(Fig.4C,D,E)。Combination index (CI)は1.0未満の値を示し、DFOとCQの併用効果は相乗的と考えられた(Fig.4F-H)。さらにIn vivoでのDFOとCQの併用効果があるか評価するため、nudeマウスの皮下にHuh7細胞を移植したXenograftモデルにおいて、1ヶ月薬剤投与を行った。薬剤非投与群と比較しCQ単独群、DFO単独群は癌細胞の増殖を十分に抑制しなかったがDFOとCQの併用では有意な増殖抑制が認められた(Fig.4I)。

最後に下図にDFOによる代謝の変化とターゲット分子のサマライズを示した。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Fujisawa Koichi, Nishimura Yuto, Sakuragi Akino, Duponselle Jolien, Matsumoto Toshihiko, Yamamoto Naoki, Murata Tomoaki, Sakaida Isao, Takami Taro	4. 巻 23
2. 論文標題 Evaluation of the Effects of Microgravity on Activated Primary Human Hepatic Stellate Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7429 ~ 7429
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23137429	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 Fujisawa Koichi, Wakazaki Maina, Matsuzaki Aya, Matsumoto Toshihiko, Yamamoto Naoki, Noma Takafumi, Takami Taro	4. 巻 23
2. 論文標題 Adenylate Kinase Isozyme 3 Regulates Mitochondrial Energy Metabolism and Knockout Alters HeLa Cell Metabolism	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4316 ~ 4319
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23084316	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 Fujisawa Koichi, Takami Taro, Okubo Shoki, Nishimura Yuto, Yamada Yusaku, Kondo Keisuke, Matsumoto Toshihiko, Yamamoto Naoki, Sakaida Isao	4. 巻 22
2. 論文標題 Establishment of an Adult Medaka Fatty Liver Model by Administration of a Gubra-Amylin-Nonalcoholic Steatohepatitis Diet Containing High Levels of Palmitic Acid and Fructose	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 9931 ~ 9931
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22189931	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 Fujisawa Koichi, Takami Taro, Matsumoto Toshihiko, Yamamoto Naoki, Yamasaki Takahiro, Sakaida Isao	4. 巻 10
2. 論文標題 An iron chelation-based combinatorial anticancer therapy comprising deferoxamine and a lactate excretion inhibitor inhibits the proliferation of cancer cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Metabolism	6. 最初と最後の頁 8 ~ 16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40170-022-00284-x	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 Fujisawa Koichi, Takami Taro, Shintani Haruko, Sasai Nanami, Matsumoto Toshihiko, Yamamoto Naoki, Sakaida Isao	4. 巻 11
2. 論文標題 Seasonal variations in photoperiod affect hepatic metabolism of medaka (<i>Oryzias latipes</i>)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 1029 ~ 1040
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.13095	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 Fujisawa Koichi, Takami Taro, Sasai Nanami, Matsumoto Toshihiko, Yamamoto Naoki, Sakaida Isao	4. 巻 21
2. 論文標題 Metabolic Alterations in Spheroid-Cultured Hepatic Stellate Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3451 ~ 3451
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21103451	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 Fujisawa Koichi, Matsumoto Toshihiko, Yamamoto Naoki, Yamasaki Takahiro, Takami Taro	4. 巻 13
2. 論文標題 Metabolic Analysis of DFO-Resistant Huh7 Cells and Identification of Targets for Combination Therapy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Metabolites	6. 最初と最後の頁 1073 ~ 1073
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/metabo13101073	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 Fujisawa Koichi	4. 巻 24
2. 論文標題 Regulation of Adenine Nucleotide Metabolism by Adenylate Kinase Isozymes: Physiological Roles and Diseases	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5561 ~ 5561
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms24065561	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 Nagai Hiroyuki, Miwa Akihiro, Yoneda Kenji, Fujisawa Koichi, Takami Taro	4. 巻 10
2. 論文標題 Optimizing the Seeding Density of Human Mononuclear Cells to Improve the Purity of Highly Proliferative Mesenchymal Stem Cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Bioengineering	6. 最初と最後の頁 102 ~ 102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/bioengineering10010102	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 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 藤澤浩一, 松本俊彦, 山本直樹, 高見太郎
2. 発表標題 鉄キレート剤 (DF0) 投与により変化した代謝をターゲットとした併用療法の検討
3. 学会等名 第58回 日本肝臓学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤澤 浩一, 松本 俊彦, 山本 直樹, 高見 太郎
2. 発表標題 鉄キレート剤 (DF0) 投与により起こる代謝変化を標的にした抗癌剤併用療法の検討
3. 学会等名 第28回肝細胞研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Koichi Fujisawa, Toshihiko Matsumoto, Naoki Yamamoto, Takahiro Yamasaki, Taro, Takami
2. 発表標題 A novel anticancer therapy with deferoxamine and drugs targeting iron-chelation-modulated metabolism
3. 学会等名 The Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL) OSAKA (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 笹井 奈々実、藤澤 浩一、松本 俊彦、高見 太郎、山本 直樹、西川 潤、坂井田 功
2. 発表標題 オートファジーに関わる NUPR1に着目した骨髄由来間葉系幹細胞のストレス耐性機構の評価
3. 学会等名 第27回肝細胞研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 笹井 奈々実、藤澤 浩一、松本 俊彦、高見 太郎、山本 直樹、西川 潤、坂井田 功
2. 発表標題 骨髄由来間葉系幹細胞におけるストレス応答機構の解明
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
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
研究分担者	高見 太郎 (Taro Takami) (60511251)	山口大学・大学院医学系研究科・教授 (15501)	
研究分担者	松本 俊彦 (Matsumoto Toshihiko) (70634723)	山口大学・大学院医学系研究科・講師 (15501)	
研究分担者	山本 直樹 (Yamamoto Naoki) (90448283)	山口大学・教育・学生支援機構・教授 (15501)	

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