

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16296

研究課題名（和文）血液腫瘍との類似性とNotchの転写制御に着眼した小細胞肺癌の治療標的因子の探索

研究課題名（英文）Search for therapeutic target factors for small cell lung cancer, focusing on similarity to hematologic tumors and transcriptional regulation of NOTCH family

研究代表者

西澤 弘成（Nishizawa, Hironari）

東北大学・医学系研究科・学術研究員

研究者番号：30846655

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：悪性リンパ腫の予後因子と、NOTCH遺伝子の転写を制御する転写因子との重複の観点から、小細胞肺癌の新規標的因子を抽出するのが本研究の大きな目的であったが、当初期待されたほどの有力な治療標的は発掘できなかった。しかし、悪性リンパ腫の予後因子であるBACH2が、限定的ではあるものの、ヒト肺癌細胞株において、NOTCHの転写を抑制する可能性が示唆された。この点は、将来、さらに追求したい。並行して、鉄依存性細胞死フェロトーシスの制御因子も探索し、BACH2がフェロトーシスを促進することを発見するとともに、フェロトーシスが細胞間で伝播すること、BACH1の再発現でフェロトーシスが起きることも報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

フェロトーシスは生体内でがん抑制機構として働くことが分かっており、血液腫瘍や小細胞肺癌を含め、悪性腫瘍への新規治療手段として注目されている。本研究によって、悪性リンパ腫の予後因子であるBACH2がフェロトーシスを制御することが示唆されたのは、フェロトーシス研究において重要な発見だと考えられる。加えて、フェロトーシスの細胞間伝播現象とBACH2のFamily因子であるBACH1の再発現によるフェロトーシスモデル機構を発見したことで、将来的に、腫瘍内で線維芽細胞や免疫細胞でBACH1を再発現させてフェロトーシスを引き起こし腫瘍内に伝播させるという細胞療法の開発に繋がられる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The major purpose of this study was to discover novel target factors for small cell lung cancer in terms of the overlap between prognostic factors for malignant lymphoma and transcription factors that regulate the transcription of the NOTCH genes, but we were unable to unearth as many promising therapeutic targets as initially expected. However, we did obtain data suggesting that BACH2, a prognostic factor in malignant lymphoma, may repress NOTCH gene transcription in human-derived lung cancer cell lines, albeit to a limited extent. This point will be pursued further in the future.

In parallel, we also searched for regulators of iron-dependent cell death ferroptosis and found that BACH2 promotes ferroptosis and that ferroptosis is transmitted from cell to cell and ferroptosis occurs by BACH1-re-expression, which we published in papers.

研究分野：細胞死、フェロトーシス、細胞老化、腫瘍生物学

キーワード：フェロトーシス BACH2 NOTCH遺伝子 悪性リンパ腫 小細胞肺癌 BACH1 細胞死伝播 線維芽細胞

1. 研究開始当初の背景

小細胞肺癌は固形癌ではあるが、その細胞形態や増殖力、殺細胞性抗癌剤への感受性の高さなど、固形癌よりも、悪性リンパ腫を含む血液腫瘍に類似した臨床的特徴を有する。さらに、研究開始の直前に、小細胞肺癌と血液腫瘍の患者検体を使用したトランスクリプトーム解析によって、小細胞肺癌と血液腫瘍の間で遺伝子発現様式や薬剤感受性に強い類似性を認めたことが報告された¹。小細胞肺癌と血液腫瘍の間に共通の遺伝子発現制御機構があることが予想され、私達は、悪性リンパ腫の予後因子であり、また血球分化においてリンパ球分化を誘導する転写因子 **BACH2** とそのファミリー因子の **BACH1** に着目した。さらに、**BACH2**、**BACH1** の標的遺伝子の候補として、小細胞肺癌でその機能が抑制されることが知られている² *Notch* 遺伝子に着目した。私達は、**B** 細胞を用いて行ったクロマチン免疫沈降シークエンス(**ChIP** シークエンス)の結果で **BACH2** が *Notch* ファミリーの遺伝子近傍に結合する予備的知見を得ていた。*Notch* シグナル自体はほぼ全ての小細胞肺癌で抑制されていると考えられるが、米国で行われた小細胞肺癌の患者検体の大規模解析では *Notch* 遺伝子変異が入っているのは小細胞肺癌患者全体の 2 割ほどであり²、残りの 8 割では遺伝子変異以外の機序で *Notch* シグナルが抑制されていることが想定された。その中の機序の一つとして、**BACH2**、**BACH1** による *Notch* 遺伝子の転写抑制があるのではないかと考えた。同時に、**BACH** ファミリー以外にも、データベース上で小細胞肺癌のクラスター分類に寄与し、かつ悪性リンパ腫の悪性度に関与する共通の転写因子をスクリーニングし、それらが *Notch* 遺伝子の近傍に結合するかどうかをデータベース上の **ChIP-seq** のデータで確認し、**BACH** ファミリー以外の、小細胞肺癌と悪性リンパ腫の悪性度に寄与し *Notch* 遺伝子を標的とする転写因子を抽出することも計画していた。

また、肺癌臨床においては、分子標的薬治療によって、非小細胞肺癌が小細胞肺癌に形質転換することがある以前から知られており、**BACH** ファミリーや新規に抽出された遺伝子の発現摂動によって、非小細胞肺癌および小細胞肺癌の細胞株が形質転換するかどうか、*Notch* 遺伝子への転写制御が確認された場合には検討したいと考えていた。

加えて、近年、細胞のがん抑制機構として注目を集めている鉄依存性細胞死フェロトーシス³を **BACH1** が促進する⁴ことが分かっており、小細胞肺癌や悪性リンパ腫への新規治療開拓として、**BACH2** および上記スクリーニングで得られた転写因子があれば、これらがフェロトーシスを制御するかどうかを検討する計画も立てていた。さらに、フェロトーシスから周囲細胞へ老化関連 β ガラクトシダーゼ(**SA- β ガラクトシダーゼ**)を低下させる物質が分泌されていることも分かりつつあり、その現象の解明も計画していた。

2. 研究の目的

上記の通り、開始当初の主な研究目的は次の 4 点であった。

(1) **BACH** ファミリー以外で、小細胞肺癌のクラスター分類と悪性リンパ腫の悪性度に関与し、*Notch* 遺伝子を転写制御する可能性のある転写因子をスクリーニングし、有力なものがあれば抽出する。

(2) **BACH2**、**BACH1** と上記(1)のスクリーニングで抽出された転写因子に関して、それらが *NOTCH* 遺伝子を転写制御するか検証する。*Notch* 遺伝子を転写制御する場合は、さらに、小細胞肺癌細胞株、非小細胞肺癌細胞株の形質転換に関わるかどうかも検証する。

(3) **BACH2** と上記(1)のスクリーニングで抽出された転写因子があれば、それらが **BACH1** と同様に、フェロトーシスを制御するかどうか検証する。

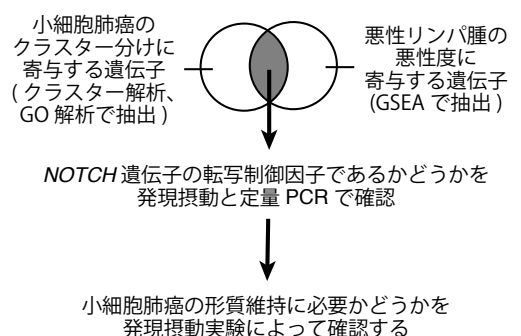
(4) フェロトーシス細胞から何らかの **SA- β ガラクトシダーゼ**を低下させる物質が分泌されている現象について詳細を調べる。

3. 研究の方法

上記(1)~(4)のそれぞれについて、記載すると、

(1) 右の図 1 の通り、データベース上から小細胞肺癌の患者検体もしくは細胞株の RNA シークエンスデータをデータベース上から取得し、クラスター解析、GO 解析を行い、クラスター分けに寄与する転写因子の抽出を試みた。同時に、悪性リンパ腫の患者検体のデータも取得し、**GSEA**(遺伝子セットエンリッチメント解析)を行い、増殖などの悪性

図 1. 小細胞肺癌の新規治療標的発掘アルゴリズム



度に寄与する転写因子の抽出を試みた。これらの抽出因子のうちで共通するものがあれば、それらが小細胞肺癌株において *NOTCH* 遺伝子の転写を制御するかどうか、データベース上での ChIP シークエンスの参照、さらには過剰発現、ノックダウンなどの発現摂動実験を行い、*NOTCH* 遺伝子の発現を定量 PCR で確認した。

(2) *BACH2*, *BACH1* の発現摂動 (過剰発現とノックダウン) を、小細胞肺癌株、非小細胞肺癌株で行い、定量 PCR やウエスタンブロッティングで *NOTCH* 遺伝子の発現変動を確認した。さらに、形態変化や増殖なども変化がありそうな場合は観察した。

(3) *BACH2* を小細胞肺癌と悪性リンパ腫の細胞株で発現摂動し、フェロトシス誘導剤 (エラストチン Erastin) への感受性 (細胞死) をフローサイトメーターで定量した。

(4) マウス胎仔線維芽細胞 (MEF 細胞) で誘導剤によってフェロトシスを誘導し、その培養上清を別の MEFs に投与して、SA- β ガラクトシダーゼへの染色具合や細胞死など、投与された細胞への影響を評価した。また、クサビラオレンジの蛍光タンパク質を発現するマウス由来の MEF 細胞を用いて、フェロトシス誘導剤に曝された野生型マウス由来の MEF 細胞と共培養して、細胞死、脂質過酸化をフローサイトメーターで定量し、共培養によるフェロトシス細胞から周囲の細胞への影響を検証した。

4. 研究成果

研究目的、方法と同様に、上記 (1)~(4) の項目ごとに記載すると、

(1) データベース上から複数回、データセットを取得し、スクリーニングを繰り返したが、小細胞肺癌のクラスター分類と悪性リンパ腫の悪性度に強く寄与し、かつ *Notch* 遺伝子の転写を制御するとはっきり確認できる転写因子は抽出されなかった。実験計画の時点でのスクリーニング条件が厳しすぎた可能性があり、次の検証時の参考にしたいと考えている。

(2) 非小細胞肺癌の細胞株で *BACH2* を過剰発現、また小細胞肺癌の細胞株で *BACH2* をノックダウンした。過剰発現、ノックダウンとも成功したが、予想に反して、それらが *NOTCH* 遺伝子の転写に与えた影響は大きくなかった (図 2)。程度は大きくないものの、やや発現が変化している部分もあり、*BACH2* が *NOTCH* 遺伝子の転写を制御する可能性は否定し切れない。ただし、細胞の種類や実験条件、共因子の存在などによって、結果が変わる可能性があり、将来の研究課題にしたいと考えている。

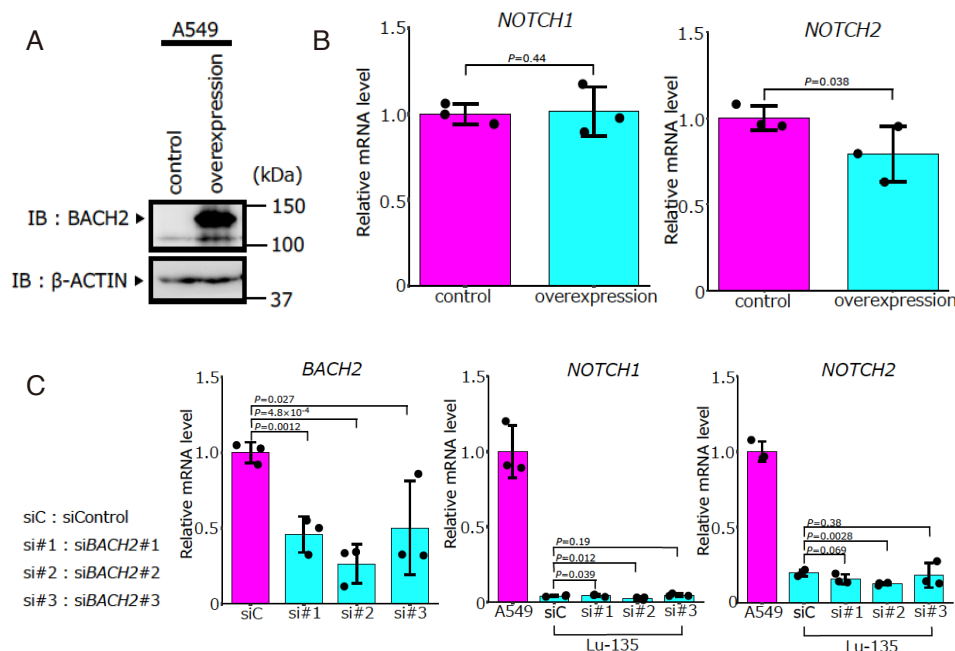


図 2. 肺癌細胞株での *BACH2* の発現摂動による *NOTCH* 遺伝子の転写変化の検証

(A) ウエスタンブロッティングで非小細胞肺癌株 A549 で *BACH2* が過剰発現されたことを確認した。(B) 同細胞株で *NOTCH* 遺伝子の発現を定量 PCR で確認したが、*BACH2* の過剰発現による *NOTCH* 遺伝子への転写の影響は小さかった。(C) 小細胞肺癌株 Lu135 で *BACH2* をノックダウンした。いずれの siRNA でも *BACH2* の発現量は 50% 以下に低下したが、*NOTCH* 遺伝子への転写の影響は大きくなかった。

(3) 小細胞肺癌および悪性リンパ腫の細胞株で、テトラサイクリン応答システム (Tet-ON) のベクターに BACH2 遺伝子を組み込んで過剰発現させると、ドキシサイクリン(テトラサイクリンの一種)を加えなくても漏れ込みで BACH2 が発現してしまう問題はあったものの、BACH2 の過剰発現によって悪性リンパ腫の細胞株のフェロトーシス誘導剤への感受性が増加することが判明した (図 3)。BACH2 は BACH1 と同様に、フェロトーシス促進作用を持つ可能性が示唆された⁵。

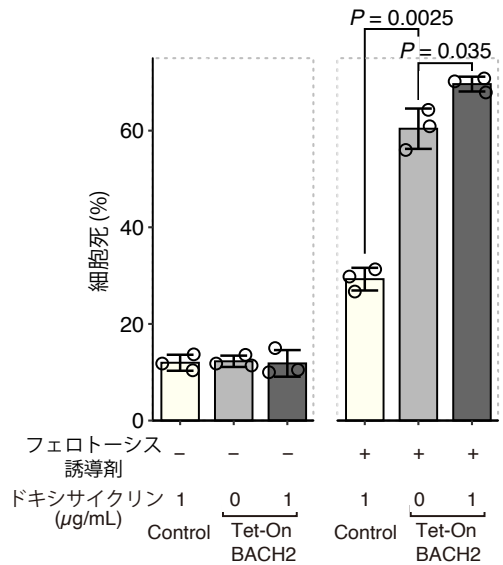


図 3. BACH2 が過剰発現された悪性リンパ腫細胞株で、フェロトーシスへの感受性が上昇した。

(4) フェロトーシスを誘導された MEF 細胞由来の培養上清の投与によって別の MEF 細胞の SA-β ガラクトシダーゼが低下することが判明した。この SA-β ガラクトシダーゼの低下が老化抑制を示しているかどうかは分からなかったが、少なくともフェロトーシス細胞から他細胞へ影響を与えるシグナル物質が分泌されていることは間違いないと考えられた。さらに、フェロトーシス細胞からの培養上清の移譲によって、別の細胞で脂質過酸化や細胞死が惹起されることも判明した (図 4)。この反応は還元剤であるビタミン E やフェロトーシスの特異的阻害剤であるフェロスタチン-1 で抑制されることから、フェロトーシス細胞から過酸化脂質関連物質が分泌されて、周囲の細胞へフェロトーシスが連鎖すると考えられた (図 4)。

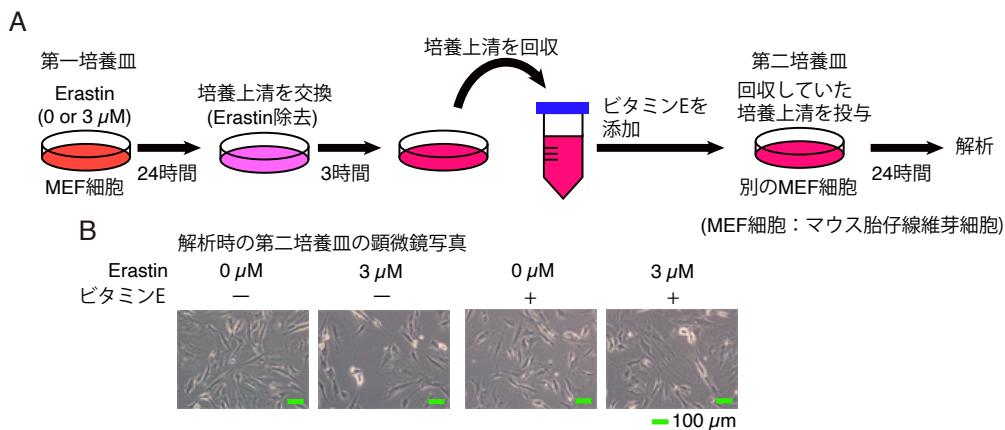


図 4. (A) 実験概略図。第一培養皿で MEF 細胞でフェロトーシスを誘導し、その培養上清を第二培養皿の MEF 細胞に投与することでフェロトーシス細胞からの分泌物の効果を実験した。(B) フェロトーシス誘導剤である Erastin に曝された第一培養皿の細胞 (フェロトーシス細胞) 由来の培養上清は第二培養皿の細胞に細胞死を惹起した。また、その効果はビタミン E で解消された。フェロトーシス細胞から脂質過酸化関連物質が分泌されて、別の細胞に細胞死を惹起することが示唆された。

さらに、フェロトーシス誘導剤である Erastin に曝した野生型の MEF 細胞をクサビオオレンジの蛍光を発する MEF 細胞と共培養させた実験でも、フェロトーシスした野生型の MEF 細胞から Erastin に直接曝されていないクサビオオレンジの MEF 細胞に細胞死が伝播することが判明し、フェロトーシス細胞から周囲にフェロトーシスが伝播することが一層明らかになった (図 5)。これらの研究成果を、Cell Death & Disease 誌で 2021 年に報告した⁶。

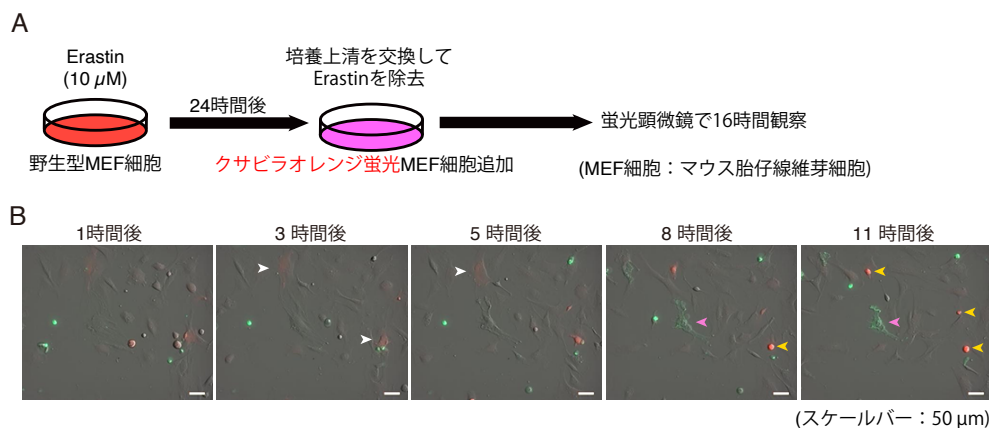


図 5. (A) 実験概略図。野生型 MEF 細胞にフェロトーシスを誘導し、そこにクサビオオレンジ蛍光 MEF 細胞を追加して、フェロトーシス細胞との共培養による他細胞への影響を調べた。(B) フェロトーシス誘導剤である Erastin に曝された野生型 MEF 細胞がフェロトーシスを起こして緑色の細胞死マーカーに染まっている (ピンク矢頭)。その周りのクサビオオレンジ蛍光 MEF 細胞は最初は生きている (白矢頭)、フェロトーシス細胞からの分泌物によって最終的に死に至る (黄矢頭)。

さらにフェロトーシス細胞からの分泌物質の影響をより正確に検証するために、MEF細胞でBACH1を再発現させることで、誘導剤を使用せずにフェロトーシスを惹起できる細胞を作製した(図6)。この細胞も周囲の細胞へフェロトーシスを伝播させることも確認することができた(図6)。この成果を、*Journal of Biochemistry* 誌で2023年4月に報告した⁷。

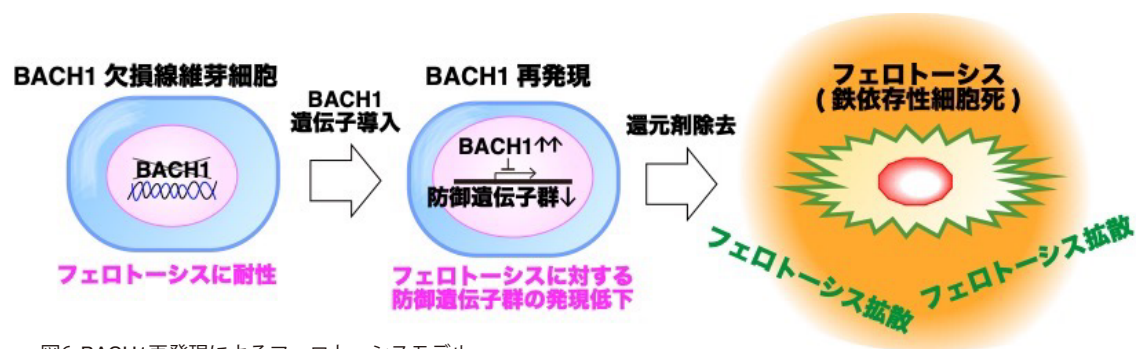


図6. BACH1再発現によるフェロトーシスモデル
BACH1欠損線維芽細胞に、BACH1遺伝子を導入してBACH1を再発現させると、還元剤除去をきっかけに細胞が自動的にフェロトーシスを起こして、死滅する。

引用文献

1. Balanis NG, Sheu KM, Esedebé FN, Patel SJ, Smith BA, Park JW, *et al.* Pan-cancer Convergence to a Small-Cell Neuroendocrine Phenotype that Shares Susceptibilities with Hematological Malignancies. *Cancer cell* 2019, **36**(1): 17-34.e17.
2. George J, Lim JS, Jang SJ, Cun Y, Ozretić L, Kong G, *et al.* Comprehensive genomic profiles of small cell lung cancer. *Nature* 2015, **524**(7563): 47-53.
3. Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, *et al.* Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* 2012, **149**(5): 1060-1072.
4. Nishizawa H, Matsumoto M, Shindo T, Saigusa D, Kato H, Suzuki K, *et al.* Ferroptosis is controlled by the coordinated transcriptional regulation of glutathione and labile iron metabolism by the transcription factor BACH1. *The Journal of biological chemistry* 2020, **295**(1): 69-82.
5. Nishizawa H, Yamanaka M, Igarashi K. Ferroptosis: regulation by competition between NRF2 and BACH1 and propagation of the death signal. *The FEBS Journal* 2023, **290**(7): 1688-1704.
6. Nishizawa H, Matsumoto M, Chen G, Ishii Y, Tada K, Onodera M, *et al.* Lipid peroxidation and the subsequent cell death transmitting from ferroptotic cells to neighboring cells. *Cell death & disease* 2021, **12**(4): 332.
7. Irikura R, Nishizawa H, Nakajima K, Yamanaka M, Chen G, Tanaka K, *et al.* Ferroptosis model system by the re-expression of BACH1. *The Journal of Biochemistry* 2023: mvad036.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Igarashi Kazuhiko, Nishizawa Hironari, Saiki Yuriko, Matsumoto Mitsuyo	4. 巻 297
2. 論文標題 The transcription factor BACH1 at the crossroads of cancer biology: From epithelial-mesenchymal transition to ferroptosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101032 ~ 101032
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.101032	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 Nishizawa Hironari, Yamanaka Mie, Igarashi Kazuhiko	4. 巻 290
2. 論文標題 Ferroptosis: regulation by competition between NRF2 and BACH1 and propagation of the death signal	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 1688-1704
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.16382	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 -
1. 著者名 西澤 弘成、山中 美慧、五十嵐 和彦	4. 巻 178
2. 論文標題 転写因子BACH1によるフェロトーシスの促進機構とフェロトーシスの伝播現象	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 同仁ニュース	6. 最初と最後の頁 1-4
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 -
1. 著者名 Nishizawa Hironari, Matsumoto Mitsuyo, Chen Guan, Ishii Yusho, Tada Keisuke, Onodera Masafumi, Kato Hiroki, Muto Akihiko, Tanaka Kozo, Igarashi Kazuhiko	4. 巻 12
2. 論文標題 Lipid peroxidation and the subsequent cell death transmitting from ferroptotic cells to neighboring cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Death & Disease	6. 最初と最後の頁 332
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41419-021-03613-y	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 Irikura Riko, Nishizawa Hironari, Nakajima Kazuma, Yamanaka Mie, Chen Guan, Tanaka Kozo, Onodera Masafumi, Matsumoto Mitsuyo, Igarashi Kazuhiko	4. 巻 -
2. 論文標題 Ferroptosis model system by the re-expression of BACH1	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvad036	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5件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 西澤 弘成、松本 光代、五十嵐 和彦
2. 発表標題 転写因子BACH1が活性化するフェロトーシス細胞由来抗老化シグナルモデル
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中島 一真、西澤 弘成、成川 礼、松本 光代、五十嵐 和彦
2. 発表標題 ビリベルジン結合型シアノバクテリアクロムを用いたフェロトーシス高感受性細胞の検出
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西澤 弘成
2. 発表標題 転写因子BACH1がつかさどるフェロトーシス制御ネットワークと フェロトーシスの伝播現象
3. 学会等名 2021がん研セミナー (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西澤 弘成
2. 発表標題 The gene regulatory network of ferroptosis controlled by the transcription factor BACH1
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hironari Nishizawa, Riko Irikura, Kazuma Nakajima, Mie Yamanaka, Mitsuyo Matsumoto, and Kazuhiko Igarashi.
2. 発表標題 BACH1 inhibits senescence, obesity, and short life span by promoting ferroptosis and subsequent FGF21 secretion
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Asia (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>まるでドミノ!? 細胞死が連鎖して広がっていく -鉄依存性細胞死(フェロトーシス)の拡散現象を発見-</p> <p>https://www.tohoku.ac.jp/japanese/2021/03/press20210330-01-domino.html</p> <p>https://www.med.tohoku.ac.jp/news/4645.html</p> <p>遺伝子一つを再発現しただけで細胞死が起きた! - 転写因子BACH1の再発現によるフェロトーシスモデル細胞が完成 -</p> <p>https://www.tohoku.ac.jp/japanese/2023/05/press20230509-01-bach1.html</p> <p>https://www.med.tohoku.ac.jp/5389/</p> <p>https://www.idac.tohoku.ac.jp/site_ja/news/17187/</p>
--

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
研究協力者	入倉 理子 (Irikura Riko)		

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
研究協力者	中嶋 一真 (Nakajima Kazuma)		
連携研究者	五十嵐 和彦 (Igarashi Kazuhiko) (00250738)	東北大学・大学院医学系研究科・教授 (11301)	
連携研究者	松本 光代 (Matsumoto Mitsuyo) (80400448)	東北大学・大学院医学系研究科・助教 (11301)	

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