

令和 6 年 4 月 9 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06065

研究課題名(和文) がん細胞におけるシスチン代謝とグルコース代謝の相互作用とその機能制御

研究課題名(英文) The relationship between cystine and glucose metabolism in cancer cells

研究代表者

加藤 裕教 (Kato, Hironori)

大阪公立大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：50303847

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)：がん細胞において、シスチン代謝とグルコース代謝は密接に関係し、互いに影響を及ぼしていることが明らかにされつつあるが、その生理的意義や分子メカニズムについては理解が進んでいないのが現状である。本研究では、1) 細胞外グルタチオンの代謝に関わるGGT1の発現が、神経膠芽腫細胞のフェロトーシスに対する耐性に大きく関わること、2) グルコース欠乏による細胞死が、NF2/Merlinによる転写レベルでのSLC7A11の発現制御によって抑制されていること、3) AMPKの活性化剤の1つが、SLC7A11によるシスチンの取り込みを阻害することで、フェロトーシスを促進すること、を新たに見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で主に用いた神経膠芽腫細胞は、グリア細胞から発生するがん(神経膠腫)の中でも最も悪性度が高いがん細胞であるため、正常なグリア細胞あるいは比較的悪性度の低い神経膠腫細胞との違いを比較検討することで、本研究結果が悪性度の高いがん細胞特異的に見られる代謝機能やその制御機構を分子レベルで理解していくことにつながる可能性が考えられる。また、本研究で得られた成果が、腫瘍悪性化に関わる新たな分子ターゲットとなり得る候補分子の同定、さらにはその分子に対する新たな診断法や治療法の開発に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：It is becoming clear that cystine metabolism and glucose metabolism are closely related and influence each other in cancer cells, but the physiological significance and molecular mechanisms are currently poorly understood. In this study, we demonstrated that 1) expression of GGT1, an enzyme that metabolites extracellular glutathione, is involved in the resistance of glioblastoma cells to ferroptosis, 2) cell death due to glucose starvation is suppressed by the NF2/Merlin-mediated transcriptional regulation of SLC7A11 expression, and 3) one of the AMPK activators promotes ferroptosis by inhibiting the SLC7A11-mediated cystine uptake.

研究分野：細胞生物学

キーワード：がん アミノ酸代謝 グルコース代謝 細胞死

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多くのがん細胞が増殖と生存のためにグルコースに依存していることはよく知られている。がん細胞においては、グルコースの輸送体や代謝酵素の発現量の増加が見られ、取り込まれたグルコースは十分なエネルギーと生合成中間体を供給するために利用される。また、グルコースの代謝によって NADPH が産生され、グルタチオンなどのがん細胞の主要な抗酸化システムに利用される。がん細胞は、正常な細胞に比べて細胞内の活性酸素種のレベルが高いことから、がん細胞が酸化ストレスから回避するためには NADPH の産生が不可欠となっている。そのため、神経膠芽腫を含めた多くのがん細胞は、グルコースが欠乏した環境下では速やかに細胞死を引き起こす。一方、アミノ酸交換輸送系として知られている system xc⁻ は、SLC7A11 (xCT) と SLC3A2 (4F2hc または CD98) の 2 種のタンパク質により構成され、細胞膜において細胞内のグルタミン酸との交換によって細胞外のシスチンを細胞内へ取り込む。取り込まれたシスチンは、システインに還元されグルタチオンの合成に利用される。従って、シスチンの取り込みを担う SLC7A11 は、神経膠芽腫を含む様々ながん細胞で高発現していることが報告されている。一方、一部のがん細胞ではシスチンが欠乏することでフェロトーシスと呼ばれる細胞死を引き起こす。フェロトーシスは、細胞膜に存在する不飽和脂肪酸が二価の鉄イオン依存的に過度の酸化を受けることで過酸化脂質が生じ、細胞膜の損傷を引き起こす細胞死である。これまでの多くの研究者による報告から、グルタチオン依存的に過酸化脂質を直接還元する酵素である glutathione peroxidase 4 (GPX4) の阻害や、グルタチオンの産生に必要なシステインの主要な供給源となっている SLC7A11 による細胞外からのシスチンの取り込みを阻害することで、フェロトーシスが誘導されることが確認されている。このように、シスチン及びグルコースの代謝は、がん細胞が生存していく上で重要な要素となっている。ところが、これまでの研究はそれぞれの代謝に焦点を当てたものが多く、シスチン代謝とグルコース代謝が密接に関係し、互いに影響を及ぼしている点についてはあまり理解が進んでおらず、特にがん細胞の細胞死との関連については未だ不明な点が数多く残されているのが現状である。

2. 研究の目的

これまでの研究では、がん細胞がまわりの環境からグルコースが欠乏した条件下におかれると、グルコースの代謝が起こらないために細胞死を引き起こすと考えられていた。ところが、申請者は最近、グルコースが欠乏した条件下において、SLC7A11 によるシスチンの取り込みが、細胞死の引き金になっていることを明らかにした。これまでの研究では、グルコースの欠乏そのものががん細胞における細胞死の引き金になっていると考えられていたが、申請者の研究成果から、グルコースが欠乏した状態でがん細胞が大量にシスチンを取り込むと、細胞内における NADPH の枯渇から酸化ストレスによる細胞死を引き起こすという、全く新しい細胞死の概念を提唱することができた。本研究では、がん細胞において特に引き起こされるシスチン代謝とグルコース代謝との関係に焦点を絞り、これまで申請者が明らかにしてきた SLC7A11 に関わる一連の分子群の成果をさらに発展させ、未だ不明な点が多い SLC7A11 の活性及び機能制御と、それに対するグルコース代謝との関係を分子レベルで明らかにすることで、がん細胞の機能を担う新たな分子機構の一端を解明することを目的とする。特に本研究で主に用いる神経膠芽腫細胞は、グリア細胞から発生するがん(神経膠腫)の中でも最も悪性度が高いがん細胞であるため、正常なグリア細胞あるいは比較的悪性度の低い神経膠腫細胞との違いを比較検討することで、悪性度の高いがん細胞特異的に見られる代謝機能やその制御機構を分子レベルで明らかにしていくことが可能であると考えられる。本研究で得られた成果は、腫瘍悪性化に関わる新たな分子ターゲットとなり得る候補分子の同定、さらにはその分子に対する新たな診断法や治療法の開発に貢献することが期待される。

3. 研究の方法

1) 低グルコース培養による細胞の生存性の解析

グルコースを含まない培地を作成し、細胞を 24 時間培養した後の細胞死の割合を、培地中に放出された乳酸デヒドロゲナーゼの酵素活性を測定することによって算出した。GGT1 の検出は、抗 GGT1 抗体を用いてウェスタンブロット法により検出した。また、GGT1 欠損神経膠芽腫細胞は、CRISPR-Cas9 システムにより樹立した。

2) 細胞内還元型グルタチオンレベルの測定

96 well black plate に低密度 (3.0×10^3 cells/well) または高密度 (3.0×10^4 cells/well) で細胞を播種し、24 時間培養した。その後、培地を交換、各種阻害剤を用いて処理し、15 時間培養した。PBS で 2 回洗浄した後、GSH-Glo Glutathione Assay kit (promega) を用い、細胞内の GSH 量を測定した。

3) シスチン取り込みの検出

細胞を 96 well plate に 1.0×10^4 cells/well で播種した。播種 24 時間後、培養細胞を PBS で 1 回洗淨し、培養培地を 2 mM Glutamine を含むシスチン欠乏培地に交換し、5 分間静置した。その後 2 mM Glutamine を含むシスチン欠乏培地に Cystine analog を添加し 30 分間 37 °C で静置した。Cystine Uptake Assay キット(同人化学研究所)を用いて規定のプロトコルに従い、細胞内に取り込まれたシスチン量を測定した。

4. 研究成果

1) 神経膠芽腫細胞における GGT1 によるフェロトーシスの抑制作用

我々はこれまでに、細胞外でグルタチオンの分解を担う酵素である gamma- glutamyltransferase 1 (GGT1) の発現が、シスチン欠乏によるフェロトーシスに対する感受性を決定していることを、複数の神経膠芽腫細胞株を用いた解析により明らかにした。GGT1 を高発現している細胞が高密度で存在すると、シスチン欠乏によっても細胞内グルタチオンレベルの枯渇は起こらず、フェロトーシスは抑制された。一方、GGT1 を高発現している細胞に対して GGT 阻害剤の処理、あるいは GGT1 の遺伝子欠損により、シスチン欠乏条件下で細胞内グルタチオンレベルが枯渇し、フェロトーシスが引き起こされた。以上の結果から、細胞外でグルタチオン代謝に関わるタンパク質 GGT1 が、シスチン欠乏条件下における神経膠芽腫細胞の生存に重要な働きをしていることが明らかにされた。

2) 神経線維腫症 2 型遺伝子 NF2/Merlin による神経膠芽腫細胞のグルコース依存性の制御

我々は以前に、神経膠芽腫におけるグルコース依存性に、細胞外のシスチンを細胞内のグルタミン酸との交換により細胞内へ輸送するアミノ酸交換輸送体、SLC7A11 を介したシスチン取り込み及びシスチン代謝が関与することを明らかにした。さらに、神経膠芽腫の一種である U251 細胞が、培養密度に依存して、mTOR-リソソーム系を介したタンパク質分解による SLC7A11 の発現を制御することで、グルコース欠乏下での細胞生存性を調節することを報告した。本研究では、高密度状態での SLC7A11/xCT 発現量減少において、細胞間接触が要因であると推測し、神経線維腫症 2 型遺伝子 NF2 でコードされるタンパク質 Merlin に着目した。そこで、CRISPR-Cas9 により NF2 遺伝子を欠損した U251 細胞を樹立し検討を行った結果、SLC7A11 が分解される高密度状態においても、NF2 の欠損により SLC7A11 の発現維持および mRNA 量及びタンパク質の発現増加を確認した。一方で、U251 細胞の低密度状態では Hippo シグナル経路において各種転写活性を担う TAZ が核内で局在することに対し、高密度状態では細胞質への局在の変化、さらに NF2 遺伝子欠損細胞では高密度状態にも関わらず TAZ は核内で局在することが明らかになった。以上より、神経膠芽腫細胞においては、mTOR/リソソームによるタンパク質分解機構のみならず NF2 (Merlin) を介した mRNA 転写レベルおよび TAZ を含めた細胞間伝達機序での遺伝子発現の変化が、SLC7A11 の発現制御に寄与していることが可能性が示唆される。

3) 神経膠芽腫細胞におけるフェロトーシスに対する AMPK の機能解析

我々はこれまでに、グルコースとシスチンの同時枯渇条件下においてはシスチン欠乏によるフェロトーシスが抑制されることを見出している。そこで、グルコース欠乏がどのようにシスチン欠乏によるフェロトーシスを抑制しているかを解明するため、グルコース欠乏によって活性化される AMP-activated kinase (AMPK) に着目し研究を行なった。シスチン欠乏条件下に AMPK 活性化剤を処理し、細胞死の割合を測定した。ところが、使用した AMPK 活性化剤で異なる結果を示した。一方ではフェロトーシスが促進され、逆に別の活性化剤ではフェロトーシスが抑制されることがわかった。そこで、フェロトーシスを促進する AMPK 活性化剤がどのようにフェロトーシスを促進するのかを検討するため、細胞内 GSH 量の測定や細胞外からのシスチンの取り込みを測定した。その結果、AMPK 活性化剤存在下では有意な GSH の枯渇とシスチンの取り込みの抑制が起こっていることがわかった。また、AMPK の 1 サブユニットを欠損させた T98G 細胞を作成し、シスチン欠乏による細胞死の割合を測定した。その結果、コントロール細胞と同様に、AMPK 1 欠損細胞においてもフェロトーシスが誘導されていた。一方、AMPK の活性化の指標となる acetyl-CoA carboxylase のリン酸化については、AMPK 1 欠損細胞では検出できなかった。従って本研究により、神経膠芽腫細胞におけるシスチン欠乏によるフェロトーシスについて、グルコース代謝が大きく関わっていること、さらには AMPK 活性化剤が、細胞外からのシスチンの取り込みを直接あるいは間接的に阻害することで、AMPK 活性化とは異なるメカニズムでフェロトーシスを促進していることを見出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hayashima Kazuki, Kimura Ikuo, Katoh Hironori	4. 巻 539
2. 論文標題 Role of ferritinophagy in cystine deprivation-induced cell death in glioblastoma cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 56 ~ 63
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.12.075	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 Hayashima Kazuki, Katoh Hironori	4. 巻 298
2. 論文標題 Expression of gamma-glutamyltransferase 1 in glioblastoma cells confers resistance to cystine deprivation-induced ferroptosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101703 ~ 101703
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2022.101703	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 Tamura Yuho, Nakamizo Yuta, Watanabe Yuzo, Kimura Ikuo, Katoh Hironori	4. 巻 597
2. 論文標題 Filamin A forms a complex with EphA2 and regulates EphA2 serine 897 phosphorylation and glioblastoma cell proliferation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 64 ~ 70
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.01.050	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 Yamaguchi Itsuki, Katoh Hironori	4. 巻 175
2. 論文標題 Merlin/NF2 regulates SLC7A11/xCT expression and cell viability under glucose deprivation at high cell density in glioblastoma cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 313 ~ 322
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvad105	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 Fukatsu Shoya, Miyamoto Yuki, Oka Yu, Ishibashi Maki, Shirai Remina, Ishida Yuki, Endo Shin, Katoh Hironori, Yamauchi Junji	4. 巻 16
2. 論文標題 Investigating the Protective Effects of a Citrus Flavonoid on the Retardation Morphogenesis of the Oligodendroglia-like Cell Line by Rnd2 Knockdown	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neurology International	6. 最初と最後の頁 33 ~ 61
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/neurolint16010003	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 Ohue-Kitano Ryuji, Nonaka Hazuki, Nishida Akari, Masujima Yuki, Takahashi Daisuke, Ikeda Takako, Uwamizu Akiharu, Tanaka Miyako, Kohjima Motoyuki, Igarashi Miki, Katoh Hironori, Tanaka Tomohiro, Inoue Asuka, Suganami Takayoshi, Hase Koji, Ogawa Yoshihiro, Aoki Junken, Kimura Ikuo	4. 巻 8
2. 論文標題 Medium-chain fatty acids suppress lipotoxicity-induced hepatic fibrosis via the immunomodulating receptor GPR84	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 e165469
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.165469	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 山口 一樹、加藤 裕教	4. 巻 95
2. 論文標題 がん細胞のシスチン代謝に対する細胞外環境の影響	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 792 ~ 796
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2023.950792	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11件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 石丸由姫、木村郁夫、加藤裕教
2. 発表標題 神経膠芽腫細胞における鉄依存性細胞死フェロトーシスの制御
3. 学会等名 第94回 日本生化学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松尾省吾、木村郁夫、加藤裕教
2. 発表標題 神経膠芽腫細胞におけるアミノ酸欠乏時に発現が変動する遺伝子の解析
3. 学会等名 第94回 日本生化学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山口一樹、木村郁夫、加藤裕教
2. 発表標題 神経膠芽腫細胞のグルコース依存性とアミノ酸トランスポーターxCTの機能制御
3. 学会等名 第67回 日本生化学近畿支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 早嶋一貴、加藤裕教
2. 発表標題 フェロトーシス制御における細胞外グルタチオン代謝の役割
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中尾莉奈、文室彩音、加藤裕教
2. 発表標題 フェロトーシス制御におけるグルコース代謝の役割
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木村優希、山口一樹、加藤裕教
2. 発表標題 フェロトローシスにおける細胞外脂肪酸の影響
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山口一樹、加藤裕教
2. 発表標題 神経線維腫症2型遺伝子NF2 (Merlin) によるxCT/SLC7A11発現調節が神経膠芽腫細胞のグルコース依存性を制御する
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本竜右、寺本昂司、加藤裕教
2. 発表標題 神経膠芽腫細胞におけるEphA受容体シグナルとその機能
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山口一樹、加藤裕教
2. 発表標題 神経膠芽腫のグルコース依存性を制御するxCT/SLC7A11発現調節機構の解明
3. 学会等名 日本薬学会 第143回年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山口一樹、加藤裕教
2. 発表標題 神経線維腫症2型遺伝子NF2 (Merlin) によりmRNAレベルで制御されるSLC7A11/xCT 発現機構
3. 学会等名 第96回 日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 加藤裕教
2. 発表標題 エフリン受容体によるRhoファミリーGタンパク質の活性制御
3. 学会等名 第96回 日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2023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