

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09440

研究課題名（和文）グルタチオン合成経路に着目した薬剤耐性卵巣癌に対する新規治療戦略の確立

研究課題名（英文）Establishment of a novel therapeutic strategy for drug-resistant ovarian cancer focusing on the glutathione synthesis pathway

研究代表者

清野 学（Seino, Manabu）

山形大学・医学部・講師

研究者番号：40594320

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）：本研究では、パクリタキセル（PTX）とxCT阻害剤スルファサラジン（SAS）の併用療法が卵巣明細胞癌に対して有効か検討した。PTXとSASによる治療は、ROSが著しく生成された細胞で、個々の薬剤治療よりも効果的にアポトーシスを誘導した。さらに、PTXとSASの併用治療は、グルタチオンペルオキシダーゼ（GPx4）の発現が低く、細胞内鉄レベルが高く、過酸化脂質が著しく蓄積している細胞でフェロトーシスを誘発した。これらのことから結xCT阻害剤が卵巣明細胞癌の有力な治療ターゲットになる可能性があることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵巣癌は進行期で見つかることが多く予後不良な疾患である。卵巣癌で最も多い組織型は漿液性癌であり、比較的化学療法の効果が見られることが多い。一方卵巣明細胞癌は化学療法抵抗性であり、欧米人と比較すると日本人で多くみられる組織型である。本研究では卵巣明細胞癌に対してパクリタキセルとグルタチオン阻害薬であるスルファサラジンの併用が有効であることを証明した。このことにより予後不良である卵巣明細胞癌の化学療法抵抗性を克服し、予後改善に寄与できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：This study demonstrated that combined treatment of paclitaxel (PTX) and the xCT inhibitor sulfasalazine (SAS) significantly enhanced cytotoxicity more than that by the individual drugs in OCCC cells. Treatment with PTX and SAS induced apoptosis more effectively than did individual drug treatments in the cells with significant generation of ROS. Moreover, Combined treatment of PTX and SAS induced ferroptosis in the cells with low expression of glutathione peroxidase (GPx4), high levels of intracellular iron and significant lipid ROS accumulation. Therefore, our findings provide valuable information that xCT inhibitor might be a promising therapeutic target for drug-resistant OCCC. The strategy of combined administration of PTX and SAS can potentially be used to treat OCCC and help to develop novel therapeutic methods.

研究分野：婦人科悪性腫瘍

キーワード：卵巣癌 明細胞癌 グルタチオン 化学療法抵抗性 パクリタキセル

## 1. 研究開始当初の背景

卵巣癌は、本邦で罹患数および死亡者数が増加傾向にあり、婦人癌で最も予後不良な疾患である。卵巣癌の代表的な組織型は、漿液性癌であるが<sup>1)</sup>、明細胞癌は本邦では欧米に比べ頻度が高いという特徴がある<sup>2,3)</sup>。明細胞癌は約半数が卵巣に局限した期で診断されるが、進行・再発症例では化学療法に対して抵抗性を示すことが臨床上の大きな問題である。卵巣癌の化学療法としてはタキサン製剤と白金製剤の併用療法(TC療法)が確立されているが<sup>4)</sup>、明細胞癌におけるTC療法の奏効率は11~25%と低く<sup>5,6,7)</sup>、TC療法に替わる有効な新規薬物療法の開発が強く望まれている。そのため本邦で明細胞癌を対象としたTC療法とイリノテカン+シスプラチン(CPT-P)療法を比較する臨床試験(GCIG/JGOG3017試験)が実施されたが、治療成績に二つのレジメンで有意差は認められなかった<sup>8)</sup>。

これまで多くの研究により卵巣癌の薬剤抵抗性機序に関する遺伝子や蛋白が同定され、それらを標的とした分子標的治療が行われたが、臨床で十分な効果を示した例は少ない。特定の遺伝子や蛋白を標的とした従来の分子標的治療薬では、癌細胞内で新たな薬剤耐性経路が活性化され、期待された効果を発揮できない可能性がある。そこで我々は遺伝子や蛋白の発現変化の下流に存在する代謝産物は一定であることから、薬剤抵抗性獲得の機序として癌細胞内の代謝経路に着目し、細胞内代謝経路・産物の網羅的解析(メタボローム解析)を行った。その解析の中で薬剤抵抗性に関連する代謝経路の一つとしてグルタチオン(Glutathione; GSH)代謝経路を見出した<sup>9)</sup>。GSHは活性酸素種(Reactive Oxygen Species; ROS)を消去する強力な抗酸化作用を持ち、様々な癌腫で細胞内GSHが高濃度であり、癌細胞の生存や薬剤抵抗性と関連することが報告されている<sup>10,11)</sup>。GSHは主としてグルタミン酸-シスチントランスポーター(xCT)を介してシステイ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が、メチオニンからシステインが合成されGSHが産生されるtrans-sulfuration経路も存在する。xCTは多くの癌細胞で発現しているが、trans-sulfuration経路関連酵素の発現は癌腫によって異なる<sup>12,13,14)</sup>。このようにxCTは癌細胞の生存や薬性抵抗性と関連したGSH合成経路において重要な役割を果たしており、癌治療における新たな治療標的となり得る。

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、xCT阻害作用を持つ。SASは大腸癌において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シスプラチン感受性を高めると報告されている<sup>15)</sup>。一方、SASは神経膠腫細胞や頭頸部癌細胞においてxCTを阻害して、フェロトーシスを誘導することも報告されている<sup>16,17)</sup>。フェロトーシスは細胞内GSHの低下によってグルタチオンペルオキシダーゼ(glutathione peroxidase 4; GPx4)活性が低下すると、細胞内脂質ペルオキシドが蓄積し、2価鉄とのフェントン反応を介して連鎖的な脂質酸化反応が起こることで誘導される<sup>18)</sup>。我々は、パクリタキセル耐性の子宮体部漿液性癌細胞株においてSASをパクリタキセルと併用投与することでフェロトーシスが誘導され、パクリタキセル抵抗性が解除されることを見出した<sup>19)</sup>。これらの報告と我々の知見から、SASはシスプラチンとの併用ではアポトーシスを誘導することでシスプラチンの効果を増強し、パクリタキセルとの併用ではフェロトーシスを誘導することでパクリタキセルの効果を増強する可能性がある。さらに、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。しかしながら、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した報告もない。

本研究では、既存の抗癌剤に対する薬剤抵抗性が課題となっている卵巣明細胞癌において、SASがGSH代謝経路を阻害することで抗癌剤の効果を増強するか否か、さらにその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した。

1. 日本産科婦人科学会・日本病理学会 編. 卵巣腫瘍・卵管癌・腹膜癌取り扱い規約 病理編(第1版). 金原出版, 東京, 2016

2. Song T, Seong SJ, Bae DS, Kim JH, Suh DH, Lee KH, et al: Prognostic factors in women with synchronous endometrial and ovarian cancers. *Int J Gynecol Cancer* 2014; 24(3): 520-527

3. Nagase S, Ohta T, Takahashi F, Yaegashi N: Annual report of the Committee on Gynecologic Oncology, the Japan Society of Obstetrics and Gynecology: Annual patient report for 2017 and annual treatment report for 2012. *J Obstet Gynaecol Res.* 2021; 47(5): 1631-1642

4. Bookman MA, Brady MF, McGuire WP, Harper PG, Alberts DS, Friedlander M, et al: Evaluation of new platinum-based treatment regimens in advanced-stage ovarian cancer: a Phase III Trial of the Gynecologic Cancer Intergroup. *J Clin Oncol* 2009; 27(9): 1419-

- 5.日本婦人科腫瘍学会 編 .卵巣がん・卵管癌・腹膜癌 治療ガイドライン 2020 年版 .金原出版 , 東京 , 2020
- 6.Sugiyama T, Kamura T, Kigawa J, Kikuchi Y, Kita T, Suzuki M, et al: Clinical characteristics of clear cell carcinoma of the ovary: a distinct histologic type with poor prognosis and resistance to platinum-based chemotherapy. *Cancer* 2020; 88(11): 2484-2589
- 7.Itamochi H, Kigawa J, Terakawa N: Mechanism of chemoresistance and poor prognosis in ovarian clear cell carcinoma. *Cancer Sci* 2008; 99(4): 653-658
- 8.Sugiyama T, Okamoto A, Enomoto T, Hamano T, Aotani E, Terao Y, et al: Randomized phase trial of irinotecan plus cisplatin compared with paclitaxel plus carboplatin as first-line chemotherapy for ovarian clear cell carcinoma: JGOG3017/GCIG Trial. *J Clin Oncol* 2016; 34(24): 2881-2887
- 9.Seino M, Ohta T, Sugiyama A, Sakaki H, Sudo T, Tsutsumi S, et al: Metabolomic analysis of uterine serous carcinoma with acquired resistance to paclitaxel. *Oncotarget* 2018; 9(62):31985-31998
- 10.Estrela JM, Ortega A, Obrador E: Glutathione in cancer biology and therapy. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2006; 43(2): 143-181
- 11.Trachootham D, Alexandre J, Huang P: Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov* 2009; 8(7): 579-591
- 12.The Human Protein Atlas. <http://www.proteinatlas.org> (2021年10月27日)
- 13.Zhao H, Li Q, Wang J, Su X, Ng KM, Qiu T, et al: Frequent epigenetic silencing of the folate-metabolising gene cystathionine-beta-synthase in gastrointestinal cancer. *PLoS One* 2012; 7(11):e49683
- 14.Kim J, Hong SJ, Park JH, Park SY, Kim SW, Cho EY, et al: Expression of cystathionine beta-synthase is downregulated in hepatocellular carcinoma and associated with poor prognosis. *Oncol Rep* 2009; 21(6):1449-1454
- 15.Ma MZ, Chen G, Wang P, Lu WH, Zhu CF, Song M, et al: Xc- inhibitor sulfasalazine sensitizes colorectal cancer to cisplatin by a GSH-dependent mechanism. *Cancer Lett* 2015; 368(1): 88-96
- 16.Sehm T, Rauh M, Wiendieck K, Buchfelder M, Eyupoglu IY, Savaskan NE: Temozolomide toxicity operates in a xCT/SLC7a11 dependent manner and is fostered by ferroptosis. *Oncotarget* 2016; 7(46): 74630-74647
- 17.Roh JL, Kim EH, Jang HJ, Park JY, Shin D: Induction of ferroptotic cell death for overcoming cisplatin resistance of head and neck cancer. *Cancer Lett* 2016; 381(1):96-103.
- 18.Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev RM, Gleason CE, et al: Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Non-Apoptotic Cell Death. *Cell* 2012; 149(5): 1060-1072
- 19.Sugiyama A, Ohta T, Obata M, Takahashi K, Seino M, Nagase S: xCT inhibitor sulfasalazine depletes paclitaxel-resistant tumor cells through ferroptosis in uterine serous carcinoma. *Oncol Lett* 2020; 20(3): 2689-2700

## 2 . 研究の目的

卵巣明細胞癌の化学療法抵抗性克服を目指し、パクリタキセルとスルファサラジンの併用効果を検討した。

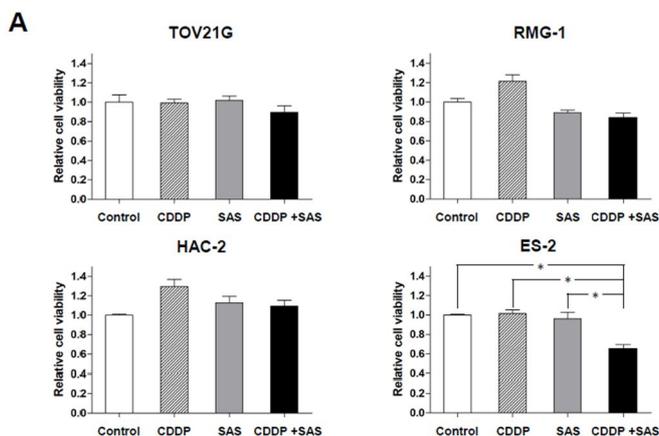
## 3 . 研究の方法

ヒト卵巣明細胞癌細胞株である RMG-1、ES-2、TOV21G、HAC-2、ヒト卵巣粘液性癌細胞株である Caov-3、ヒト卵巣漿液性癌細胞株である SKOV-3 を用いた。それぞれの細胞株におけるスルファサラジンの抗腫瘍効果を確認し、スルファサラジンとパクリタキセルまたはシスプラチンの併用効果を検討した。各細胞株における trans-sulfuration 経路を検討し、スルファサラジン併用化学療法の効果と比較検討した。ヒト明細胞癌細胞株の異種移植モデルで SAS が PTX の抗腫瘍効果を増強するかを確認するため、RMG-1 細胞 (2 × 10<sup>6</sup> 個生細胞) をヌードマウスの皮下に接種し、腫瘍径が 10mm

に到達したのを確認後、DMSO (コントロール) と PTX または SAS のそれぞれ単剤投与、PTX と SAS 併用投与の 4 群で薬剤を 4 週間投与した。

## 4. 研究成果

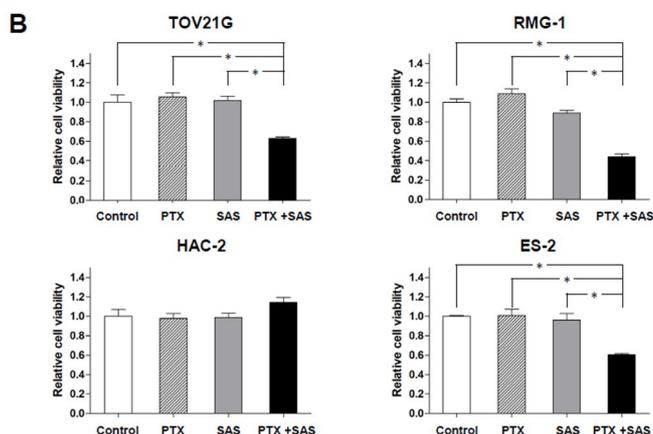
### (1) 卵巣明細胞癌細胞株におけるスルファサラジンと抗腫瘍薬の併用効果



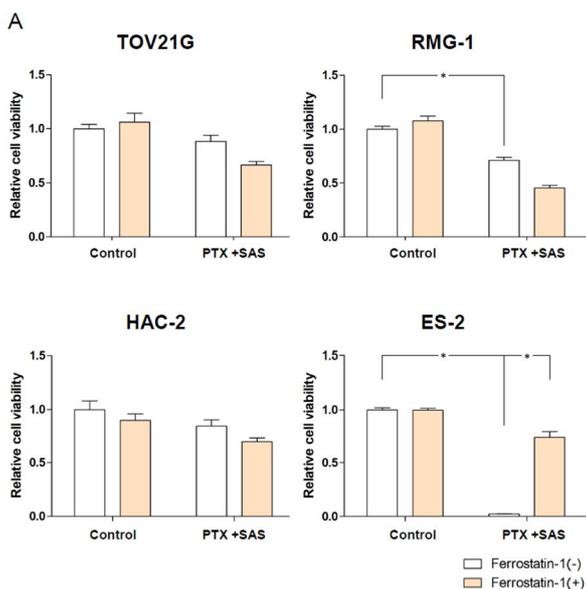
卵巣明細胞癌細胞株においてスルファサラジンとシスプラチンまたはパクリタキセルの併用効果について検討した。

右図に示すように、シスプラチン併用ではES-2のみで抗腫瘍効果の増強が確認されたが、他の細胞株では併用効果を認めなかった(A)。

一方、パクリタキセル併用ではTOV-21、RMG-1、ES-2において抗腫瘍効果が有意に増強した。

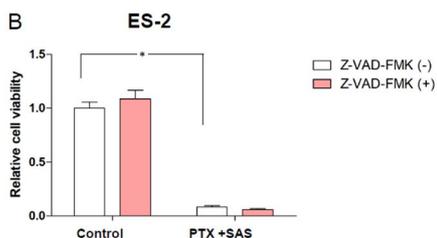


### (2) スルファサラジンおよびパクリタキセル併用により得られた細胞死の検討

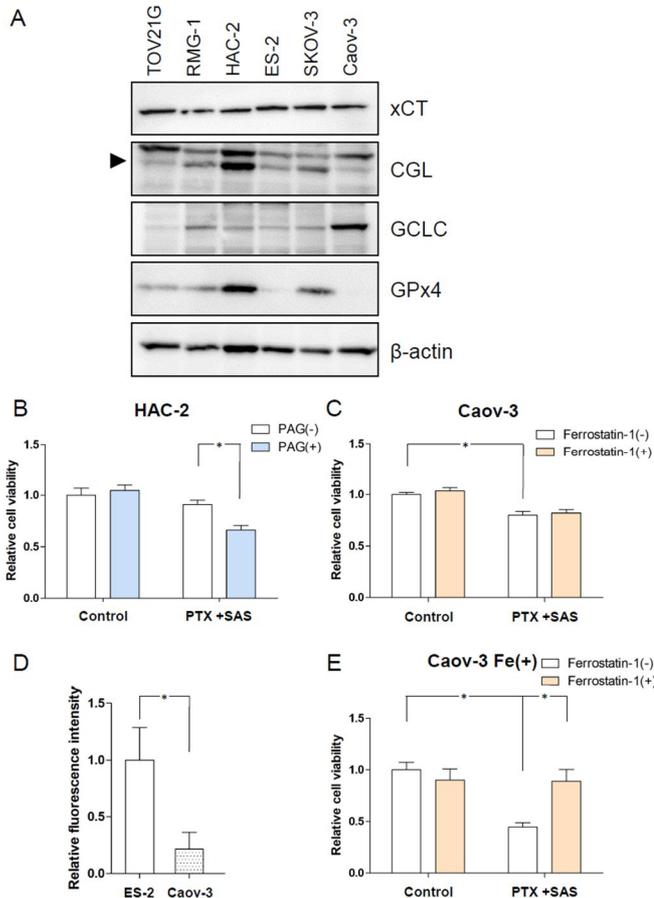


活性酸素産生の増加による細胞死誘導機序にはフェロトーシスが考えられたため、パクリタキセル (PTX) とスルファサラジン (SAS) 併用投与による細胞増殖抑制効果がフェロトーシス阻害剤であるフェロスタ

チン 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。



( 3 ) Trans-sulfuration 経路とパクリタキセルおよびスルファサラジンの効果検討



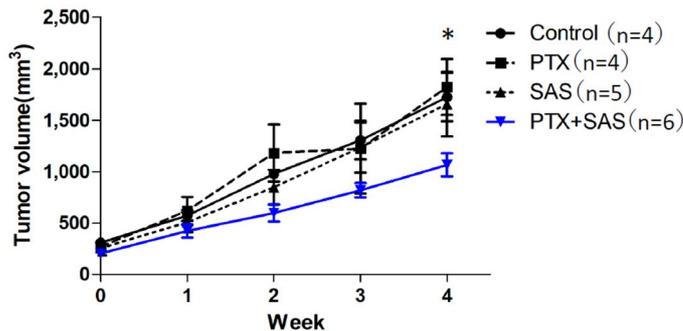
グルタチオン合成経路に関連する蛋白質の発現をウェスタンブロッティングにより検討した。

用を有する xCT の発現レベルは4種の卵巣明細胞癌細胞株において同様であった。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。

フェロトーシス誘導に関連する GPx4 の発現レベルは、HAC-2 で高く、ES-2 で低かった。HAC-2 では CGL 発現レベルが高く transsulfuration 経路由来のシステインの産生が亢進している可能性があったため、CGL 阻害薬であるプロパルギルグリシン (PAG) を用いて細胞増殖抑制効果を検討した。HAC-2 において PTX と SAS および PAG の投与は PTX と SAS 併用投与に比較して細胞増殖抑制効果を

8 増強させた

( 4 ) ヒト明細胞癌細胞株の異種移植モデルでのスルファサラジンおよびパクリタキセルの抗腫瘍効果



ヒト明細胞癌細胞株の異種移植モデルで SAS が PTX の抗腫瘍効果を増強するかを確認

するため、RMG-1 細胞 (2×10<sup>6</sup> 個生細胞) をヌードマウスの皮下に接種し、腫瘍径が 10mm

に到達したのを確認後、DMSO (コントロール) と PTX または SAS のそれぞれ単剤投与、

PTX と SAS 併用投与の 4 群で薬剤を 4 週間投与した。薬剤投与開始後

5 週間で PTX と

SAS 併用投与群は他の 3 群と比較して有意に腫瘍増殖が抑制された (図 8)。薬剤投与による体重減少、発疹や下痢といった副作用は認めなかった。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Idei Urara, Ohta Tsuyoshi, Yamatani Hizuru, Seino Manabu, Nagase Satoru	4. 巻 24
2. 論文標題 Mechanism of Cell Death by Combined Treatment with an xCT Inhibitor and Paclitaxel: An Alternative Therapeutic Strategy for Patients with Ovarian Clear Cell Carcinoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 11781 ~ 11781
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms241411781	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 出井麗、太田剛、伊藤泰史、堀川翔太 榊宏諭、清野学、永瀬智
2. 発表標題 グルタチオン代謝経路阻害剤とpaclitaxelの併用による 細胞死誘導機構に関する検討
3. 学会等名 第74回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2022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	永瀬 智 (Nagase Satoru) (00292326)	山形大学・医学部・教授  (11501)	研究の統括
研究分担者	太田 剛 (Tsuyoshi Ohta) (50375341)	山形大学・医学部・准教授  (11501)	研究協力、論文作成の指導

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