

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15481

研究課題名（和文）シスチン/グルタミン酸輸送系のインテグリンを介した転移能制御機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the potential role of the cystine/glutamate transporter in the regulation of tumor metastasis through interaction with integrin

研究代表者

佐藤 菜美（Sato, Mami）

新潟大学・日本酒学センター・特任助教

研究者番号：40893235

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）：ヒト線維肉腫由来細胞HT1080において、シスチン/グルタミン酸輸送体xCTの遺伝子欠損および過剰発現により、親株に比し血管内皮細胞への接着能と三次元培養系における増殖能が低下した。このメカニズムには、細胞間接着を担うN-カドヘリンの発現低下が関与する可能性が示唆された。また、フェロトーシスの制御因子でもあるxCTの機能阻害によるがんの転移制御について検討する目的で、xCTの阻害効果が知られる分子標的薬ソラフェニブのxCT阻害特性を検討した。その結果、ソラフェニブのもつ細胞死誘導効果はxCTの発現に依存せず、また誘導される細胞死はフェロトーシスによるものではないことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究者らはこれまでにマウスメラノーマ細胞におけるxCT遺伝子欠損（xCT-KO）が転移能の低下と関連することを示したが、本研究でヒト由来がん細胞においても同様の結果を得た。そのメカニズムとして、細胞間接着の低下によることを示唆した。この成果は、xCTの役割として注目されてきた酸化ストレスからの細胞の保護に加え、新たにxCTと接着因子との関連性を示した点で意義がある。

研究成果の概要（英文）：Deletion or overexpression of the xCT gene attenuated adhesion capacity to endothelial cells and tumor cell growth (3D culture model) in HT1080, a human fibrosarcoma-derived cell line. Downregulation of N-Cadherin might be one of the mechanisms behind these phenomena. xCT is also one of the ferroptosis regulators, and sorafenib, a molecular target drug, has been used as an inhibitor of xCT for ferroptosis-cancer-relevant research. Thus, the xCT inhibition manner of sorafenib was characterized to investigate if xCT inhibition can regulate cancer metastasis through ferroptosis induction. As a result, the induction of cell death by sorafenib was independent of xCT expression. Additionally, it has been confirmed that sorafenib does not induce ferroptosis in many cancer cell lines.

研究分野：生化学

キーワード：xCT シスチン フェロトーシス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

シスチン/グルタミン酸輸送系 (x_c 系) は、アミノ酸輸送を担う xCT とこのタンパク質の細胞膜上での発現を介助する 4F2 heavy chain (CD98) とで構成される生体抗酸化系タンパク質である。本研究代表者らは x_c 系ががんの転移に果たす役割を解明するため、これまでに xCT の遺伝子を欠損させた高転移性マウスメラノーマ細胞を作製し、宿主マウスを用いた種々の転移モデル実験および in vitro において転移能に関与する機能の評価を実施した。その結果、xCT 遺伝子欠損により、腫瘍細胞移植マウスの転移病巣数の減少と寿命の延伸が認められ、in vitro では遊走能や浸潤能の低下を確認した。そのメカニズムとして、xCT ががん細胞の酸化ストレス保護を通じて転移能を維持していることが示唆されたが、それ以外のメカニズムは不明であった。また、ヒト由来がん細胞でも同様の傾向はみられるのかという点についても未検証であった。近年、 x_c 系が細胞死様式の一つであるフェロトーシスの制御因子であることがわかり、xCT を標的としたフェロトーシス誘導が、がん細胞を効果的に死滅させる可能性が注目されている。xCT ががんの病態にどのように関与するのかを明らかにするとともに、xCT によるアミノ酸輸送活性の制御を通じて転移能を制御できるかを検討することができれば、当該研究領域の更なる発展が見込まれる。

2. 研究の目的

がんの病態への関与として、主に酸化ストレス保護作用の面から研究されてきた x_c 系について、本研究では x_c 系を構成する xCT と CD98 の複合体、さらに CD98 との相互作用が報告されている接着分子インテグリンに着目し、がんの転移制御における x_c 系の役割を明らかにする。さらに、xCT によるアミノ酸輸送活性の制御を通じて転移能を制御できるかを検討する。

3. 研究の方法

- (1) ヒトサルコーマ由来細胞株 (HT1080) を用い xCT 遺伝子欠損細胞 (xCT-KO) を、また xCT-KO にヒト xCT 遺伝子を再導入して、xCT 遺伝子過剰発現細胞 (xCT-OE) を作製した。野生型細胞 (WT) とこれらの細胞を用い、がん細胞の転移能に関与する機能の評価した。
- (2) xCT の輸送活性阻害とフェロトーシス誘導作用が報告されている多標的キナーゼ阻害剤 ソラフェニブ (sorafenib) について、その阻害特性の解析を (1) の細胞を使用し行った。

4. 研究成果

- (1) WT と比較し、xCT-KO では細胞増殖、スクラッチアッセイによる遊走能、人工基底膜マトリックスであるマトリゲル (Corning 社) とセルカルチャーインサートを用いた評価系による浸潤能、血管内皮細胞 (HUEhT-1) への接着性が有意に低下した。xCT-OE では、増殖、遊走は WT と同程度に回復する傾向にあったが、浸潤能と血管内皮細胞への接着性は WT よりも有意に低かった。

また、ウェスタンブロッティング法によるタンパク質発現解析では、xCT-KO と OE の両方において、インテグリン (beta 1 integrin) の発現が WT に比し低下していた。 x_c 系のサブユニットである CD98 がインテグリンと結合し、インテグリンが担うシグナル伝達を活性化するという報告 (文献 1) から、当初は CD98 の発現に応じインテグリンの発現が変動することを考えたが、xCT-KO において CD98 の発現は低下する一方で、xCT-OE では CD98 の著しい上昇がみられた。xCT の発現変動によって変動する CD98 とインテグリンとの関連は明確にすることができなかったが、xCT の発現レベルに応じてインテグリンを含む細胞の接着分子の変動が、xCT-KO および OE における浸潤能や内皮細胞との接着性の低下につながっている可能性が示唆された。

そこで、ウェルを Poly-2-Hydroxyethyl Methacrylate (poly-HEMA) でコートすることでがん細胞の非足場依存的増殖を再現し、スフェロイドを形成させると、WT に比し xCT-KO と OE でスフェロイド内の生細胞数が有意に低下した。細胞傷害性の指標として乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) の活性を測定したところ、WT と比較した際に xCT-KO では上昇傾向が、また xCT-OE では有意な上昇が認められたため、細胞が細胞外基質との接着性を失った際に生じる細胞死 (アノキス) が起こっていることが示唆される。加えてそれぞれの細胞が形成したスフェロイドを回収し、タンパク質発現解析を行ったところ、細胞間接着を担う N-Cadherin の発現が xCT-KO と OE において低下していることが

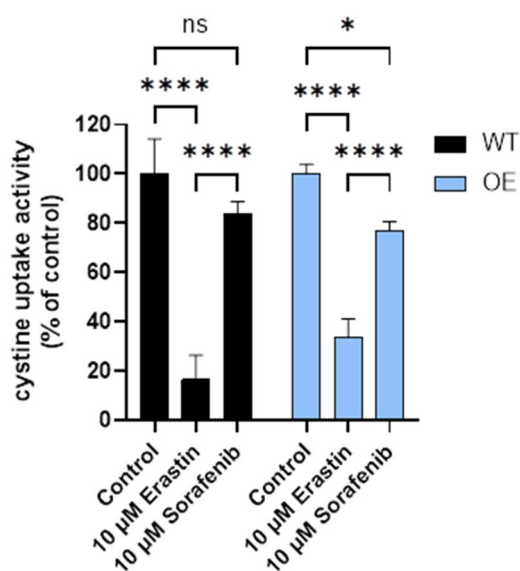
確かめられた。本研究で実施した浸潤能や血管内皮細胞への接着性評価は腫瘍細胞が浮遊細胞の状態で行うものであり、N-Cadherin の発現低下による細胞間接着性の低下が、これら機能の低下と結びついていることが示唆される。

以上より、本研究代表者らがマウス由来がん細胞で報告した際（文献 2）と同様に、xCT 遺伝子の欠損はがん細胞の転移能維持に関与する種々の機能を低下させることがわかり、xCT の阻害剤による転移能制御の有用性が示唆された。本研究で xCT 遺伝子過剰発現によっても転移能が低下することが示され、今後はそのメカニズムについても解明する必要がある。本研究では xCT ががん細胞の転移能維持に果たす役割として、xCT の発現がインテグリンやカドヘリンなどの接着分子の発現に影響を与えることを明らかにできたが、それがどのようなメカニズムで制御されているのかについてはまだ解明に至らなかった。xCT 遺伝子の欠損、過剰発現は共に細胞内のアミノ酸代謝に影響を及ぼす。今後は xCT が関与するアミノ酸代謝の変動とがんの接着分子制御機構に着目することで、本研究で未解明の事項にアプローチしていく。

- (2) xCT を標的としたフェロトーシス誘導によるがんの転移制御について検討する目的で、xCT の阻害活性によるフェロトーシス誘導能をもつことが知られる分子標的薬ソラフェニブ (sorafenib) について、xCT 阻害剤かつフェロトーシス誘導剤としての特性解析を行った。Sorafenib は xCT のシスチン取り込みとともに放出される細胞外グルタミン酸量を低下させることから、xCT によるシスチン輸送の阻害活性を有するとされる（文献 3）。

そこで (1) の HT1080-WT、xCT-OE を用い、C-14 標識シスチンを用いて sorafenib のシスチン輸送阻害活性を測定した。このとき、xCT のシスチン輸送を強力に阻害することが知られるエラスチン (erastin、文献 4、5) を阻害活性の比較対象として同時に測定に用いると、同じ濃度において、sorafenib のシスチン輸送活性は極めて弱いことが明らかとなった（図 1）。また、HT1080-WT、xCT-KO、xCT-OE において sorafenib 処理による細胞生存性を調べたところ、sorafenib は xCT の発現とは非依存的に細胞の生存性を低下させ、更に sorafenib とフェロトーシス特異的阻害剤 liproxstatin-1 を同時に加えた場合でも生存性が低下したことから、sorafenib が誘導する細胞死はフェロトーシスによるものではないことが示唆された。Helmholtz Munich (ドイツ) の Marcus Conrad 博士との共同研究により、同様の傾向が種々のがん細胞株で確かめられた。

xCT のシスチン輸送活性阻害効果が確かめられている化合物の中で、強力な阻害効果もつ erastin は溶解性の低さなどから in vivo における実験に用いることが難しく、また抗リウマチ薬として用いられるスルファサラジン (Sulfasalazine) のシスチン輸送阻害活性は erastin の阻害活性 ($IC_{50}=1.4 \mu\text{M}$) に対し低い ($IC_{50}=26.1 \mu\text{M}$) (文献 5)。このことから、in vivo においても有用な xCT 阻害作用のある化合物を探索する必要があるが、今後は本研究代表者が行っている清酒醸造産物の機能性解析を応用し、清酒とその副産物、また清酒醸造に関わる原料から候補となる化合物を見出すことを計画中である。



(図 1) エラスチンとソラフェニブによるシスチン輸送活性の阻害効果 HT1080-WT、xCT-OE それぞれの Control におけるシスチン輸送活性を 100%としたときの、各処理群のシスチン輸送活性を示す。

< 引用文献 >

1. Feral, C. C., Nishiya, N., Fenczik, C. A., Stuhlmann, H., Slepak, M., & Ginsberg, M. H. (2005). CD98hc (SLC3A2) mediates integrin signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(2), 355-360. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404852102>
2. Sato, M., Onuma, K., Domon, M., Hasegawa, S., Suzuki, A., Kusumi, R., Hino, R., Kakiyama, N., Kanda, Y., Osaki, M., Hamada, J., Bannai, S., Feederle, R., Buday,

- K., Friedmann Angeli, J. P., Proneth, B., Conrad, M., Okada, F., & Sato, H. (2020). Loss of the cystine/glutamate antiporter in melanoma abrogates tumor metastasis and markedly increases survival rates of mice. *International Journal of Cancer*, 147(11), 3224-3235. <https://doi.org/10.1002/ijc.33262>
3. Dixon, S. J., Patel, D. N., Welsch, M., Skouta, R., Lee, E. D., Hayano, M., Thomas, A. G., Gleason, C. E., Tatonetti, N. P., Slusher, B. S., & Stockwell, B. R. (2014). Pharmacological inhibition of cystine-glutamate exchange induces endoplasmic reticulum stress and ferroptosis. *ELife*, 3. <https://doi.org/10.7554/eLife.02523>
 4. Dixon, S. J., Lemberg, K. M., Lamprecht, M. R., Skouta, R., Zaitsev, E. M., Gleason, C. E., Patel, D. N., Bauer, A. J., Cantley, A. M., Yang, W. S., Barclay Morrison, I., & Stockwell, B. R. (2012). Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Non-Apoptotic Cell Death. *Cell*, 149(5), 1060. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.042>
 5. Sato, M., Kusumi, R., Hamashima, S., Kobayashi, S., Sasaki, S., Komiyama, Y., Izumikawa, T., Conrad, M., Bannai, S., & Sato, H. (2018). The ferroptosis inducer erastin irreversibly inhibits system xc⁻ and synergizes with cisplatin to increase cisplatin's cytotoxicity in cancer cells. *Scientific Reports*, 8(1), 1-9. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19213-4>

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Zheng Jiashuo, Sato Mami, Mishima Eikan, Sato Hideyo, Proneth Bettina, Conrad Marcus	4. 巻 12
2. 論文標題 Sorafenib fails to trigger ferroptosis across a wide range of cancer cell lines	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Death & Disease	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） 10.1038/s41419-021-03998-w	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 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 佐藤茉美 小沼 邦重、土門 美緒、長谷川 駿、柿原 奈保子、神田 裕介、尾崎 充彦、浜田 淳一、坂内 四郎、Marcus Conrad、岡田 太、佐藤 英世
2. 発表標題 シスチン/グルタミン酸輸送系（xc-系）の欠損が腫瘍細胞の転移に及ぼす影響
3. 学会等名 第30回日本がん転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mami Sato, Mio Domon, Shun Hasegawa, Marcus Conrad, Hideyo Sato
2. 発表標題 The cystine/glutamate transporter regulates the metastatic capability of human fibrosarcoma cells
3. 学会等名 EMBO Workshop Ferroptosis: When metabolism meets cell death（国際学会）
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			
ドイツ	Helmholtz Munich			