

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：83802

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15806

研究課題名（和文）放射線照射により生じる血管内酸化ストレス及びがん転移形質の誘導機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the Impact of Radiation-induced Intravascular Oxidative Stress on Cancer Metastasis

研究代表者

井上 実（Inoue, Minoru）

静岡県立静岡がんセンター（研究所）・その他部局等・研究員

研究者番号：20826010

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、血管内酸化ストレスの指標として血清アルブミン（HSA）のシステイン34（Cys34）の酸化還元状態に着目し、分化型甲状腺がん（DTC）の予後に与える影響およびその作用機序を明らかにした。具体的には、DTC患者を対象としたコホート研究を通じて、還元型のHSA-Cys34（HMA）高濃度群は低濃度群と比較し、無増悪生存期間が長いことを明らかにした。また、In vitroの実験を通じて、HMAはDTC細胞にフェロトーシスを誘導することを明らかにした。以上より、HSA-Cys34の酸化還元状態は、DTCにおける予後因子および治療標的として有望であり、個別化治療戦略の発展に寄与し得る。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血清アルブミン（HSA）システイン34（Cys34）の酸化還元状態が、分化型甲状腺がん（DTC）細胞に脂質過酸化を介したフェロトーシス誘導に関与することを明らかにした本研究は、今後、フェロトーシスの新規誘導メカニズム解明およびその応用に関する基礎研究の進展という学術的意義を有すると考えられる。また、本研究ではDTC症例においても、還元型のHSA-Cys34（HMA）が無再発生存期間延長と関連することを明らかにしたため、HSA-Cys34の還元を促進する治療法の開発等を通じて、DTC患者の予後改善に寄与し得るといった社会的意義を有している。

研究成果の概要（英文）：This study focused on the redox state of cysteine-34 (Cys34) in serum albumin (HSA) as an indicator of vascular oxidative stress and its impact on the prognosis of differentiated thyroid carcinoma (DTC). Through a cohort study involving DTC patients, it was revealed that patients with higher concentrations of the reduced form of HSA-Cys34 (HMA) had longer progression-free survival compared to those with lower concentrations. Additionally, in vitro experiments demonstrated that HMA induces ferroptosis in DTC cells. The redox state of HSA-Cys34 is thus a promising prognostic factor and therapeutic target in DTC, potentially contributing to the development of personalized treatment strategies.

研究分野：放射線治療

キーワード：がん 放射線治療 血清アルブミン フェロトーシス 脂質過酸化

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヒト血清アルブミン (Human serum albumin: HSA) はヒト血中に最も豊富に存在するタンパクで、34 番目のアミノ酸 システイン (Cys-34) が遊離チオールを有することから抗酸化物質として機能する (Halliwell B., *BiochemPharmacol.* 1998)。その血中濃度は、同様に抗酸化物質として知られる還元型グルタチオンの 100 倍にも及ぶため、血清アルブミンは血中の主たる抗酸化物質と言える。Cys-34 の遊離チオールは、生体内の活性酸素種 (Reactive oxygen species: ROS) の分解と引き換えに、スルホン酸などへ酸化され、抗酸化能を失う (血清アルブミンの酸化)。がん細胞は、その活発な代謝と増殖の過程において、また放射線照射などの治療の過程において、細胞内に ROS を産生・蓄積するため、細胞内の抗酸化物質だけでなく、血管内の抗酸化物質も活用し、生存・増殖を維持している可能性がある。

### 2. 研究の目的

本研究では、放射性ヨード内用療法を施行した分化型甲状腺癌 (Differentiated thyroid cancer: DTC) の症例に着目し、同症例の血清中の HSA-Cys34 の酸化還元状態と予後との関連を検証することとした。また、HSA-Cys34 が DTC 細胞の生存・増殖に与える影響を In vitro の実験系において検証した。

### 3. 研究の方法

DTC コホートにおける HSA-Cys34 の酸化還元状態と予後との関連の検証

放射性ヨード内用療法 (Radioactive Iodine Therapy: RIT) を受けた DTC 症例 99 名を対象とした後ろ向きコホート研究を行った。具体的には、99 名のうち 50 名は Adjuvant Therapy として、49 名は転移病変に対する Cancer Treatment としての RIT であったため、各治療群で分けて解析を行った。当院バイオバンクに保管されている各治療群の血清サンプルから HSA-Cys34 の酸化還元状態を液体クロマトグラフィーで測定し、還元型 HSA-Cys34 (HMA) と酸化型 HSA-Cys34 (HNA1 および HNA2) の濃度を分析した。臨床データは電子カルテや診断画像から収集し、無再発生存期間 (Progression-free survival: PFS) は Kaplan-Meier 法および Cox 回帰分析を用いて評価した。

DTC 細胞における HSA-Cys34 の酸化還元状態と意義の検証

ヒト DTC 細胞株 (8505C) を用いて、還元型 HSA-Cys34 (HMA) および酸化型 HSA-Cys34 (HNA1) を添加した培養条件下での細胞生存率、脂質過酸化、フェルトーシスの誘導を評価した。細胞内の ROS 蓄積の評価には DCFDA を、脂質過酸化の評価には BODIPY C-11 染色を、細胞生存率の評価には SF アッセイを用いた。また、フェルトーシス誘導に関わるメカニズムの検証として、細胞内グルタチオン (GSH) 濃度の測定、および脂質過酸化の制御に関連する遺伝子 GPX4 の発現量解析 (定量 PCR) を行った。

### 4. 研究成果

DTC 症例における HMA 濃度と無再発生存期間との関連性

放射性ヨード内用療法を受けた DTC 患者 99 例 (Adjuvant Therapy 群 50 例、Cancer Treatment 群 49 例) における HMA 濃度と PFS の関連を図 1 に示す。Adjuvant Therapy 群では、HMA 高濃度、低濃度の両群間において PFS の有意な差は認められなかった (図 1a)。一方で Cancer Treatment 群においては、HMA 高濃度群は低濃度群に比べ、有意な PFS の延長を示した (図 1b)。既知の予後因子である年齢、組織型、転移部位、治療前の血清サイログロブリン濃度を考慮した多変量解析を用いても HMA 濃度は、独立した予後因子であった (図 1c)。

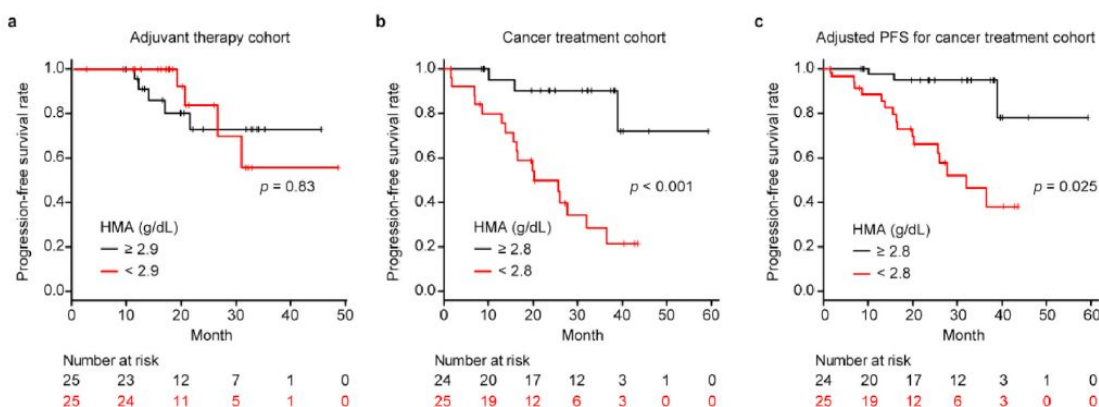


図 1. HMA 濃度と無再発生存期間との関連

DTC 細胞において HMA は脂質過酸化を介したフェロトーシスを誘導する HMA 添加による細胞生存率の低下:

Cancer Treatment 群各症例の血清を培地（ウシ胎児血清は添加していない）に添加してヒト DTC 細胞株 8505C を培養したところ、HMA 濃度と細胞生存割合に有意な相関を認めた ( $R = -0.24$ ,  $p = 0.048$ , 図 2a)。次に、ウシアルブミンを除去したウシ胎児血清を含む培地（注 1）に HMA および HNA1 を添加し培養した結果、HMA を添加した群で DTC 細胞の生存率の著明な低下を認めた（図 2b, 2c）。一方で HNA1 を添加した群（注 2）では細胞増殖・生存に影響は見られなかった（図 2b, 2c）。

注 1: のちに HMA 添加による細胞死はフェロトーシスと判明するが、フェロトーシスは培地中のシスチン濃度に影響を受けることが既知である。よって、培地中のシスチン濃度は、平均的なヒト血清中のシスチン濃度（1.3 mg/dL）と同等に調整したものを用了。

注 2: 酸化型 HSA-Cys34 は HNA1 と HNA2 の 2 種類であるが、HNA2 は血清中でわずかしが存在せず、本コホートでも同様であったため、HNA1 のみを検証に用了。

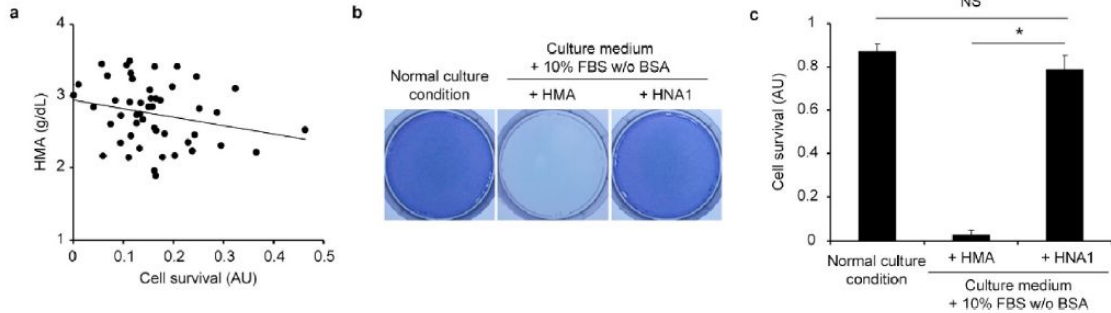


図 2. HMA 存在下での DTC 細胞の生存率低下

HMA 添加による細胞内 ROS と過酸化脂質の増加:

続いて、HMA 存在下での細胞内 ROS レベルを測定したところ、HMA 添加群では HNA1 添加群と比較し、有意に DTC 細胞内の ROS レベルの上昇を認めた（図 3a）。この ROS 上昇の原因を検証するため、NADPH oxidase 阻害剤 diphenyleneiodonium (DPI)、Nitric oxide synthase 阻害剤 N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)、Lipid peroxidation 阻害剤 Trolox を先述の実験条件に添加したところ、Trolox でのみ ROS の低下を認めた（図 3b）。これらの結果より、HMA 添加により脂質過酸化が起こっていることが予想されたため、BODIPY C-11 を用いて過酸化脂質を可視化した結果、HMA 添加群においてのみ過酸化脂質を同定できた（図 3c 中の緑色蛍光を示す部分）。

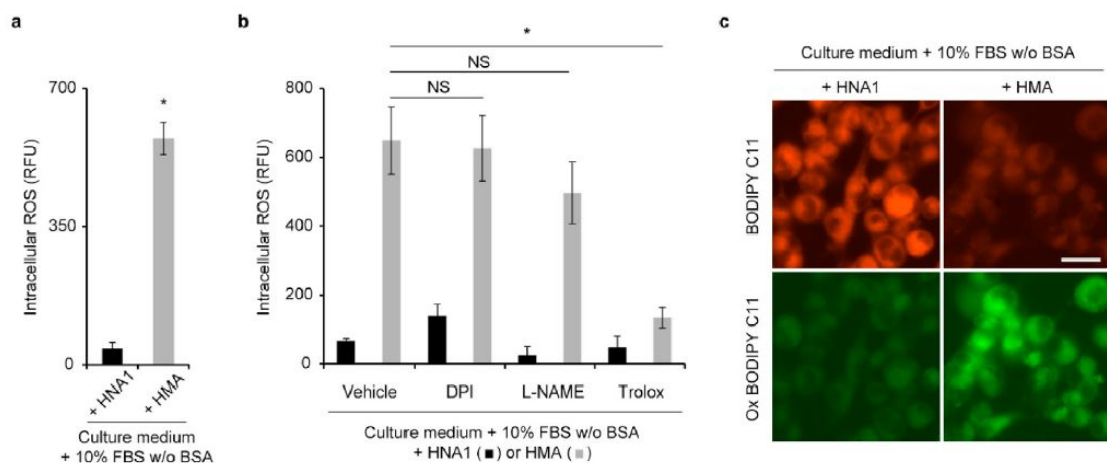


図 3. HMA 存在下での ROS レベルと過酸化脂質の増加

HMA 添加によるフェロトーシスの誘導:

脂質過酸化に関連する細胞死としてフェロトーシスが既知であるため、フェロトーシス阻害剤（Trolox、Ferrostatin-1、Desferrioxamine）を用いて HMA 存在下の細胞死が阻害されるかを検証した。図 4a および 4b に示すように、いずれのフェロトーシス阻害剤によっても HMA に

よる細胞死は阻害できた。さらに、HMA 添加による細胞死がフェロトーシスであることの確証を得るために、フェロトーシス誘導過程で既知の現象である細胞内のグルタチオン (GSH) 合成の低下ならびに GPX4 遺伝子の発現低下の確認を行った。図 4c および 4d に示すように、HMA 存在下では細胞内 GSH 濃度の低下、および GPX4 遺伝子の発現低下が認められた。

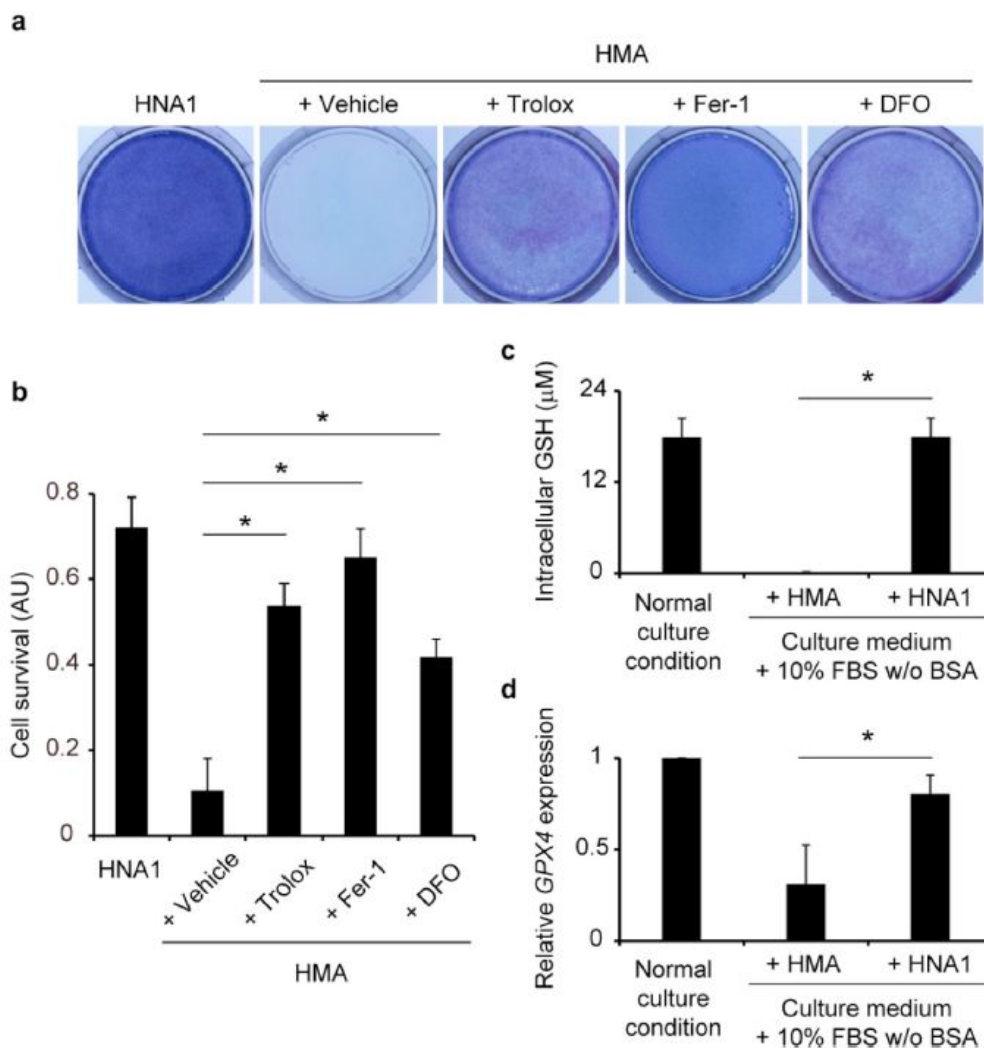


図 4. HMA 存在下におけるフェロトーシス阻害剤の細胞死への影響、GSH 濃度、GPX4 発現

以上の通り、本研究は、還元型 HSA-Cys34 (HMA) 濃度が DTC の予後良好因子であること、および HMA が DTC 細胞におけるフェロトーシス誘導作用を有すること示しており、今後、HSA-Cys34 を治療標的とした個別化治療戦略の発展に寄与すると期待される。

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 Inoue Minoru, Iizuka Yusuke, Nakamura Kiyonao, Sato Genki E., Mizowaki Takashi	4. 巻 209
2. 論文標題 Role of albumin Cys34 redox state in the progression of differentiated thyroid carcinoma and induction of ferroptosis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Free Radical Biology and Medicine	6. 最初と最後の頁 108 ~ 115
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.freeradbiomed.2023.10.015	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 井上 実、飯塚裕介、中村清直、佐藤玄基、溝脇尚志
2. 発表標題 分化型甲状腺癌における血清アルブミンCys34の基礎・臨床的意義
3. 学会等名 日本放射線腫瘍学会第36回学術大会
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
---------	---------