

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16484

研究課題名(和文) フェロトーシス感受性を制御するがん代謝の解明とそれを応用した新規化学療法の確立

研究課題名(英文) ferroptosis-targeting cancer therapy driven by metabolic regulation

研究代表者

山田 直也 (Yamada, Naoya)

自治医科大学・医学部・ポスト・ドクター

研究者番号：50611787

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)：肝癌細胞株において、ジクロロ酢酸ナトリウム(DCA)の添加によって、低用量のブチオニンスルホキシミン(BSO)でのフェロトーシス誘導が可能になった。DCAの添加により、アミノ酸欠乏様の遺伝子発現変化を生じ、多種のアミノ酸トランスポーターの発現上昇を認めるとともに、細胞内アミノ酸濃度の上昇を認めた。DCAの添加によって小胞体ストレスシグナルであるATF4経路の発現上昇を認め、ATF4遺伝子ノックアウト細胞ではDCAによるferroptosis誘導効果は消失した。以上から、DCAによるエネルギー代謝変化に伴う小胞体ストレス応答がフェロトーシス感受性亢進につながる事が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

フェロトーシスを標的とする癌化学療法は確立しておらず、生体内での十分な効果を得るとともに、副作用を軽減させる方法が求められている。本研究では、がん代謝を制御することによってフェロトーシス感受性亢進を誘導しており、これを応用することで生体内での抗腫瘍効果を高めるとともに、副作用の軽減にもつながると期待される。また、アミノ酸代謝と小胞体ストレス応答、フェロトーシス感受性の関連については未だに不明瞭な点が多くのごさされており、フェロトーシスの分子機構の更なる解明につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Ferroptosis sensitivity of human hepatocellular carcinoma-derived cells were upregulated by pyruvate dihydrogenase kinase inhibitor: sodium dichloroacetate (DCA), and ferroptosis was induced by low-dose of buthionine sulfoximine. DCA upregulated the expression of various kinds of amino acid transporter, and intracellular amino acid levels were increased. ER stress signal(PERK-ATF4-CHAC1) was upregulated by DCA, and the ferroptosis induction by DCA was disappeared in PERK-KO, ATF4-KO, and CHAC1-KO cells, indicating that the ferroptosis was driven by ER stress signal.

研究分野：消化器外科学

キーワード：フェロトーシス がん代謝 小胞体ストレス 肝癌

1. 研究開始当初の背景

Ferroptosis は、細胞内グルタチオンペルオキシダーゼ 4 (GPX4) の作用が直接的、もしくは細胞内グルタチオン (GSH) の低下によって間接的に阻害された場合に、鉄依存的な脂質過酸化物の蓄積によってもたらされる新規細胞死である。近年、癌治療の標的としての役割の他、神経変性疾患や心血管・肺・腎疾患などの病態への関与が報告され、大きな注目を浴びている。Ferroptosis は元々、RAS 遺伝子変異を有する癌細胞を選択的に殺傷する低分子化合物のスクリーニングから見出された細胞死であり、癌治療の標的としての研究が近年欧米を中心に盛んにおこなわれている。Ferroptosis を標的とする癌化学療法は、上皮間葉移行後の進行癌や間葉系細胞由来の悪性腫瘍 (肉腫) などの従来の化学療法耐性の癌種に感受性が高いことから、難治癌に対して有効であると期待されている。実際に、化学療法抵抗性を示した残存腫瘍や癌幹細胞に Ferroptosis 誘導剤を加えることでこれらの癌細胞はほぼ完全に死滅すると報告されている。しかしながら、これまで Ferroptosis を標的とする癌化学療法は臨床応用には至っていない。その最大の理由は、生体内で十分な抗腫瘍効果を発揮する薬剤、及びその投与方法が確立していないためである。さらに、フェロトシスは近年癌治療の標的としてのみならず、神経、心臓、腎臓、肺、肝臓など様々な臓器障害との関連が報告されており、高用量の Ferroptosis 誘導剤の投与に伴うこれらの全身臓器への影響も懸念されている。

癌細胞はワールブルグ効果に代表される「がん代謝」と呼ばれる、正常細胞とは異なるエネルギー代謝機構を持つことが知られており、近年、メタボローム解析やトランスクリプトーム解析の進歩に伴い詳細な解明が進み、注目を集めている。がん代謝を標的とする治療介入は正常細胞への最小限の影響で抗腫瘍効果が見込めるため、臨床的な期待が大きい。Ferroptosis を標的とする場合においても、がん代謝を標的とすることで抗腫瘍効果を高めるとともに、副作用の軽減につながると考えられる。

2. 研究の目的

我々は、肝細胞における Ferroptosis の制御機構の解析を進める過程で、肝癌由来細胞株を様々な培養条件下で Ferroptosis 誘導・阻害の実験を行っていたところ、がん代謝に影響を及ぼす 'Forced OXPHOS (強制的酸化的リン酸化)' と呼ばれる無グルコース・ガラクトース培地で、Ferroptosis 感受性が亢進し、少量の誘導剤で細胞死が誘導できることを見出した。この条件下での Ferroptosis 感受性亢進の誘導方法とそのメカニズムについては、これまで報告がなく、がん代謝を標的とするため正常細胞への影響が少なく、かつ少量の Ferroptosis 誘導剤で細胞死をもたらすため、生体内においても既存の薬剤で十分な効果が期待できることから画期的な新規治療法に発展すると考えられた。従って、本研究では、我々が同定した培養条件によるがん代謝を切り口に、がん代謝と Ferroptosis 感受性亢進の分子機構の解明と新規治療となる薬剤スクリーニングを行い、その抗腫瘍効果を生体レベルで検証する。

3. 研究の方法

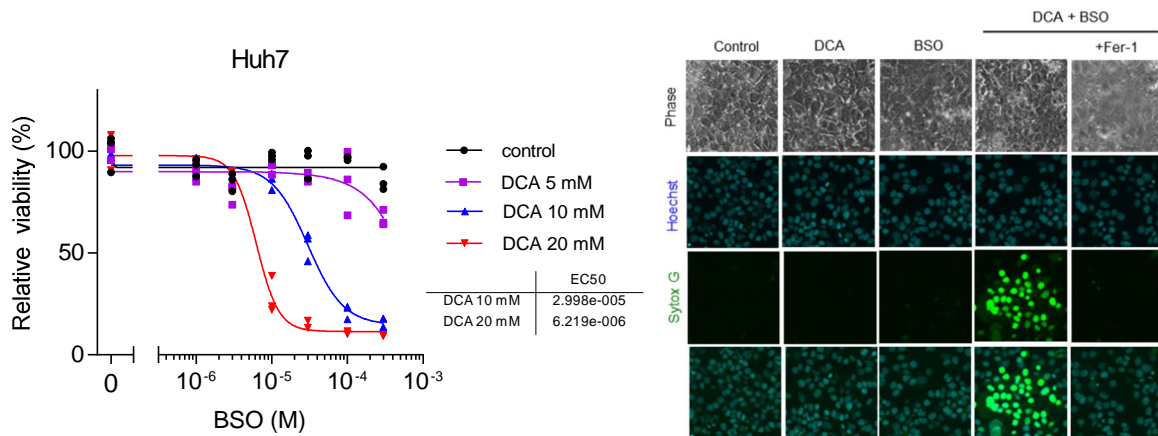
(1) 無グルコース・ガラクトース培地と同様のメカニズムで Ferroptosis 誘導効果をもたらす新規薬剤を探索する

(2) 得られた薬剤を用いて、メタボロミクス、遺伝子発現解析 (RNA-Seq)、タンパク発現を解析するとともに、遺伝子欠損細胞を作製し、Ferroptosis 感受性亢進につながるメカニズムを明らかにする。

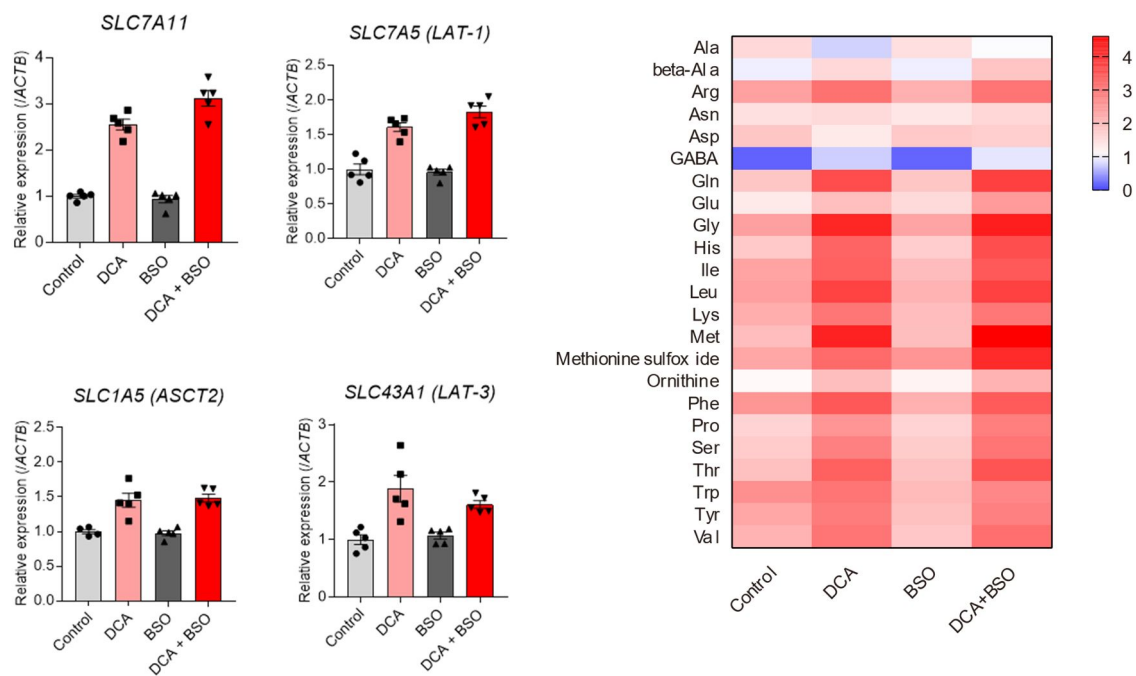
(3) 多種の癌細胞での検討と、in vivo での抗腫瘍効果と副作用について検証する

4. 研究成果

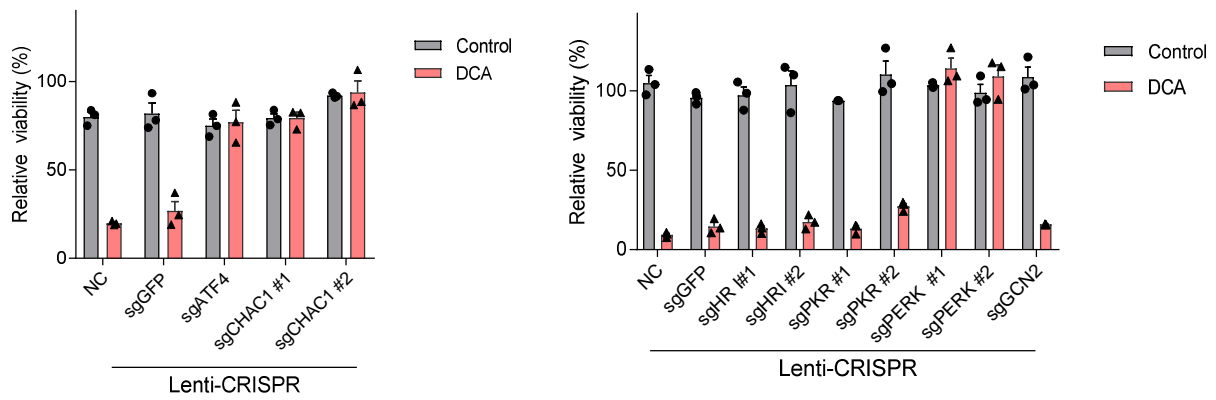
(1) 無グルコース・ガラクトース培地と同様にかん代謝へ影響を与える候補薬剤のうち、ピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼの阻害剤であるジクロロ酢酸ナトリウム (DCA) によって、肝癌由来細胞株の Ferroptosis 感受性が亢進し、低用量のブチオニンスルホキシミン (BSO) でフェロトシス誘導が可能になった。同様の効果は xCT 阻害剤である Erastin でも認められたが、GPX4 阻害剤である RSL-3 では上乘せ効果は認められなかった。



(2) DCA の添加によって、アミノ酸欠乏様の遺伝子発現変化を認め、多種のアミノ酸トランスポーターの発現上昇を認めるとともに、細胞内アミノ酸濃度の上昇を認めた。

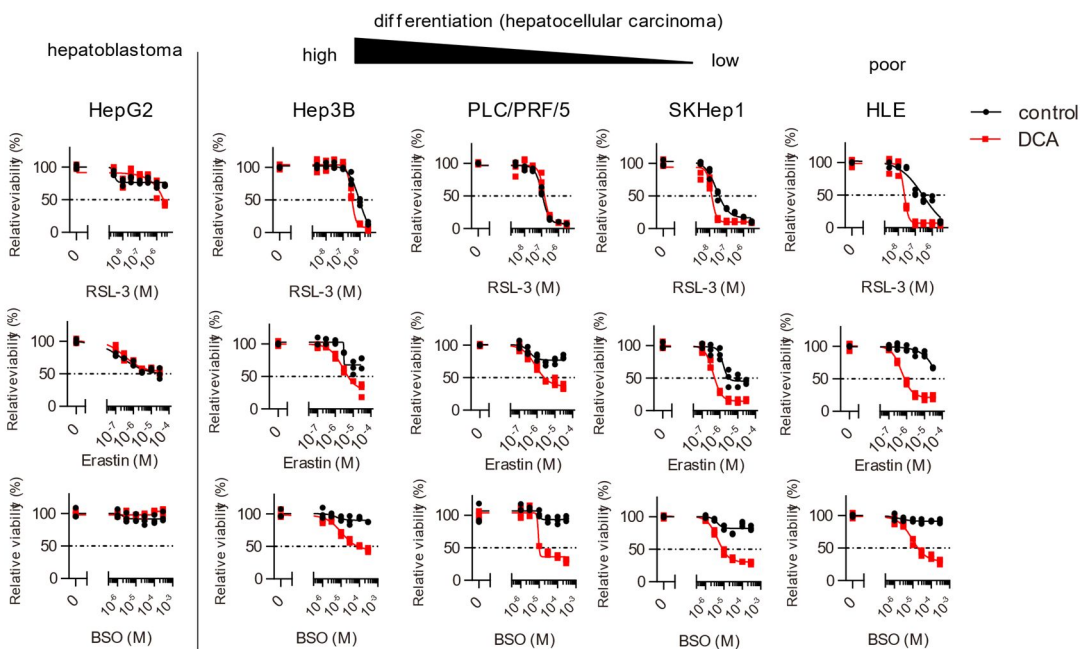


DCA の添加によって小胞体ストレスシグナルである PERK1 ATF4-CHAC1 の発現上昇を認め、これらのノックアウトによって ferroptosis 誘導効果は消失した。



(3) 肝癌細胞では低分化・未分化型である SKHep1 や HLE で同等の効果が認められた。in vivo での抗腫瘍効果と副作用については現在、ヌードマウス (BALB/c nu/nu) の皮下移植モデルを用いて検討を行っている。

A



以上から、DCAの添加による‘強制的酸化的リン酸化’による条件下では、ER ストレスを介したフェロトーシス誘導効果もたらされ、GSH 低下依存性の Ferroptosis が惹起されることが明らかになった。本研究で得られた現象を応用することで、Ferroptosis を標的とした副作用の少ない効果的な新たな癌化学療法の開発へつながることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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 |
|---------|---------|
|---------|---------|