

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：84409

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16670

研究課題名（和文）悪性骨軟部腫瘍各組織型の細胞内代謝に適応したferroptosis誘発療法の開発

研究課題名（英文）Ferroptosis to adjust intracellular metabolism in an individual malignant bone and soft tissue sarcoma subtype

研究代表者

田宮 大也（Tamiya, Hironari）

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪国際がんセンター（研究所）・その他部局等・リハビリテーション科  
部長

研究者番号：70811686

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では肉腫に対して細胞内代謝を考慮したferroptosis誘発療法を検討した。興味深いことに細胞内2価鉄イオン含有量とferroptosis感受性とは複数の細胞株で調べたところ相関が乏しく、2価鉄イオンによる細胞障害性を抑制する細胞内鉄解毒作用が肉腫各組織型で機能していることが分かった。またNF-κBおよびPRMT5を介したPGC1αの制御がBNIP3L/NIX-mediated mitophagyをコントロールしferroptosis感受性に影響を与えることが明らかとなり、NF-κBおよびPRMT5のactivityがferroptosis感受性の指標となる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

希少がんである肉腫においては薬物治療の開発が進みにくい。その中において鉄依存性細胞死であるferroptosisに着目した本研究は肉腫における新たな治療法の実現を目指そうとするものである。ミトコンドリア機能に重要なPGC1αの調整に関与することが分かったNF-κBやPRMT5は肉腫を含めたがんのactivityの亢進が報告されており、ferroptosis感受性の指標となる可能性が示されたことで、各組織型での個別化医療への発展も期待される。

研究成果の概要（英文）：In the present study, ferroptosis to adjust intracellular metabolism in sarcoma was investigated. Interestingly, ferrous iron levels were not nicely correlated with ferroptosis sensitivity in several sarcoma cell lines, suggesting that iron detoxification varies according to each sarcoma cell line. Regulation of PGC1α through NF-κB and PRMT5 controls BNIP3L/NIX-mediated mitophagy, resulting in alteration of ferroptosis sensitivity. From this result, NF-κB and PRMT5 could be an indicator of ferroptosis sensitivity in sarcoma.

研究分野：Sarcoma

キーワード：Sarcoma Ferroptosis

## 1. 研究開始当初の背景

希少がんである悪性骨軟部腫瘍(肉腫)は、上皮性の悪性腫瘍に比して有効な化学療法が少なく、新規化学療法の開発が急務となっている。肉腫はその希少性のみならず多様性も有しており、がん全体の1%程度の発生頻度にも関わらず50種類以上の組織型(骨肉腫、軟骨肉腫、ユーイング肉腫、未分化多型肉腫、脂肪肉腫、平滑筋肉腫、滑膜肉腫など)が存在する。それゆえ、新規治療法開発には多様な組織型を念頭に入れる必要がある。

近年、鉄依存性細胞死である ferroptosis が、がんの治療ターゲットとして注目されつつある。ferroptosis は鉄による細胞内脂質の過酸化によって惹起される non-apoptotic なプログラム細胞死である。鉄は細胞増殖に必須であり、悪性腫瘍細胞では鉄取り込みが亢進しているために、鉄過剰による細胞毒性のリスクにも晒される。肉腫が上皮性がんに比べて ferroptosis に高感受性であり、ferroptosis 誘発薬剤が高い抗腫瘍効果を示すことが報告された(Viswanathan et al., Nature, 2017)ことに端を発し、申請者らは肉腫における ferroptosis 感受性および関連因子の解析を行ってきた。その結果、肉腫細胞における鉄取り込みに関与する transferrin receptor 1 (TFRC) の高発現と ferroptosis 高感受性が認められ、現在論文投稿準備中である。しかしながら肉腫が一様に ferroptosis 高感受性というわけではなく、低感受性(骨肉腫など)の組織型も存在し、臨床応用に向けてはまだ前途遠慮である。

## 2. 研究の目的

本研究での目的は肉腫の各組織型における ferroptosis 感受性の違いを規定するものの同定である。よって本研究では肉腫における ferroptosis 関連細胞内代謝について解析を進め、各組織型に対応したカスタマイズ治療への発展を目指す。ferroptosis 高感受性肉腫に対しては動物実験など臨床応用に向けた展開を行いたい。

## 3. 研究の方法

多様な組織型に対応した細胞株を用いて以下の ferroptosis 関連細胞内代謝を解析した。

### (1) 脂質代謝

脂質は様々な細胞内生理機能に関わっている。複数の酵素により代謝され生成された多価不飽和脂肪酸は生理活性物質として機能する。その過程において long-chain-fatty-acid-CoA ligase (ASCL) 4 や lysophosphatidylcholine acyltransferase 3 (LPCAT3), lipooxygenase (ALOX) が触媒として働き、過酸化脂質を産生することから、ASCL4, LPCAT3, ALOX5, 12, 15 は ferroptosis の制御因子である。それらの遺伝子発現(タンパク質あるいは mRNA)の測定を各肉腫細胞株、primary culture や臨床検体において行う。また lipolysis assay kit や lipid peroxidation assay kit を利用して脂質代謝の評価を行う。特に脂肪肉腫では他の肉腫と比較して脂質代謝制御因子である PPAR $\gamma$  の発現が亢進し、ASCL1 や stearoyl-coenzyme A desaturase 1 (SCD) の発現上昇が見られており(GEO database)、他の肉腫と異なる脂質代謝を有している可能性が高い。

### (2) 鉄代謝

TFRC に結合した transferrin は結合している鉄分子とともに細胞内へエンドサイトーシスされる。2価鉄(ferrous iron)は反応性に富むため labile iron pool として細胞質にとどまるものは少なく、ミトコンドリアに運搬され、鉄硫黄クラスター(ミトコンドリアでの酸化的リン酸化)やヘム鉄(酸素運搬や細胞内酵素)として機能するか、あるいは過剰鉄として3価鉄(ferric iron)として ferritin と結合して貯蔵される。すでに先行研究で評価しているものも多いが、新規細胞

株や臨床検体を用いて TFRC, ferritin, ferroportin の発現量を評価する。

### (3) ミトコンドリア代謝

ミトコンドリアの膜電位低下が ferroptosis と関連していることが報告されている (Gao et al., Mol Cell, 2018)。申請者らの先行研究では SHAPRIN が NF- $\kappa$ B および PRMT5 を介して PGC1a を負に制御していることが確認されている。細胞株を用いてミトコンドリア活性(細胞からの単離・活性測定キットや生細胞の蛍光染色など)を測定し、臨床検体を用いた免疫染色 (TOM20 や VDAC1 抗体など)へと進める。先行研究にて淡明細胞肉腫において原因遺伝子である EWS-ATF1 の下流で PGC1a 発現が他の肉腫と比べて亢進していることがわかっており EWS-ATF1 のノックダウンなどを用いて ferroptosis 感受性との関連を解析する。

### (4) メチオニン代謝

メチオニン代謝に関連する methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) は cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A, p16) とともに様々ながんで欠失が認められる。肉腫においても約 14%程度で両遺伝子の欠失がある (TCGA dataset)。MTAP 欠失によりグルタチオン代謝が障害を受けることが報告されており (Sanderson et al., Sci Adv, 2019)、細胞株を用いて MTAP 発現の有無による ferroptosis 感受性の測定および細胞内グルタチオン定量との相関を確認する。

## 4. 研究成果

注目した細胞内代謝のうち、鉄代謝、メチオニン代謝についてまず述べる。鉄代謝については database 上ではトランスフェリンレセプター-1 (TFRC) の DNA amplification と予後との相関が認められた (TCGA データベース: 全がん種) (図 1) がそのタンパク発現量と ferroptosis 感受性については用いた細胞株内では認められず、また細胞内 2 価鉄イオン含有量と ferroptosis 感受性 (ferroptosis 誘発剤:

RSL3) との関連も明らかでなく、鉄依存性細胞死である ferroptosis であるが、単純に鉄含有

量が多いからといって ferroptosis が誘導されるといった直線的な関係性は認められなかつ

た(図 2 - 4)。メチオニン代謝についても本研究では methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) に注目して研究を行ったが、MTAP 欠損の有無と

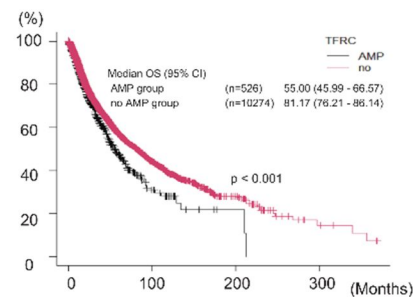


図 1 TFRC DNA amplification と全生存期間

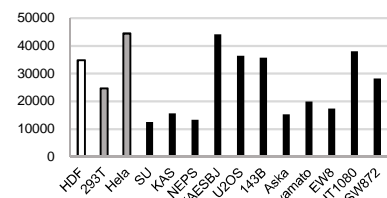


図 3 各細胞株における 2 価鉄イオン含有量

図 2 各細胞株における TFRC を含めたウエスタンブロット

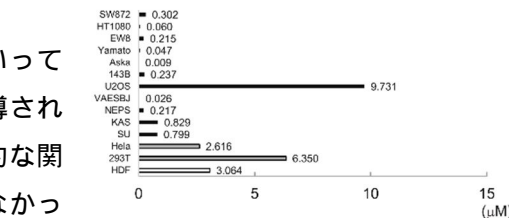


図 4 各細胞株における RSL3 の IC50

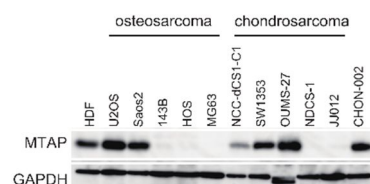


図 5 各細胞株における MTAP 発現

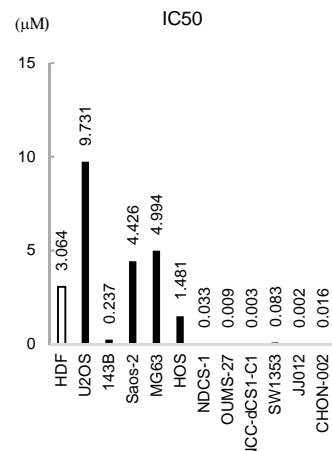


図 6 各細胞株における RSL3 の IC50

ferroptosis 感受性との間に関連性を確認できなかった(図5,6)。このことから ferroptosis は鉄依存性細胞死であるが、細胞内に鉄毒性を除去する機構が多方面で機能していることが推察される。

脂質代謝については脂肪肉腫細胞株(CRL3043)での解析を行った。ASCL 阻害剤(Triacsin C)により細胞死を誘発したが ferroptosis 誘発剤との併用では相乗効果を示さず、むしろ ASCL 阻害剤との併用では ferroptosis が抑制された(図7)。このことから脂質代謝が亢進していることが ferroptosis 誘発には有利に働くことが考えられた。

最後にミトコンドリア代謝であるが、ミトコンドリア活性を制御する PGC1 $\alpha$  が SHARPIN の下流で NF- $\kappa$ B および PRMT5 を介して負に制御されているが、PGC1 $\alpha$  が亢進してミトコンドリア活性が増加していると ferroptosis は抑制されておりこれには PGC1 $\alpha$  を介した BNIP3L/NIX-mediated mitophagy が関与していることが示唆された(図8)。

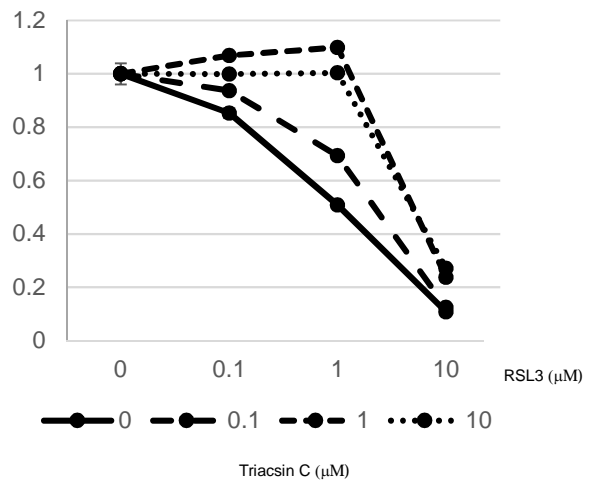


図7 CRL3043 細胞株における Triacsin C 濃度変化による RSL3 感受性

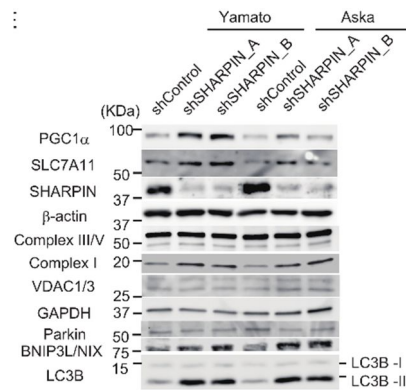


図8 SHARPIN 発現抑制による PGC1 $\alpha$  の増加

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田宮大也 若松透 竹中聡
2. 発表標題 Effectiveness of ferroptosis in bone and soft tissue sarcomas
3. 学会等名 第80回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田宮大也 若松透 竹中聡
2. 発表標題 SHARPIN-mediated regulation of ferroptosis sensitivity in bone and soft tissue sarcoma
3. 学会等名 第81回 日本癌学会学術総会
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
---------------------------	-----------------------	----

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