様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

# 科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　５ 年　 ４ 月 １０ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：挑戦的研究（萌芽）
研究期間：2021～2022
課題番号：２１Ｋ１９４１７

研究課題名（和文）フェロトーシスに対するSMARCA4変異肺癌細胞の脆弱性を利用した治療法の開発

研究課題名（英文）Development of the therapy targeted to the vulnerability of SMARCA4-mutant lung cancer cells to ferroptosis

研究代表者
永野　修（Nagano, Osamu）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・准教授

研究者番号：３０４０４３４６

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　5,000,000円

研究成果の概要（和文）：フェロトーシスとアポトーシスの調節機構の解明とSMARCA4変異がん細胞のフェロトーシス脆弱性を標的とした新規治療法の開発を目的としてSMARCA4安定発現細胞株を樹立して網羅的オープンクロマチン領域解析を行い、得られた遺伝子群のうちフェロトーシス抵抗性細胞に高発現する遺伝子のみを公共データベースから抽出し、新規フェロトーシス抵抗性候補遺伝子SMYD3、LTBR、PFKPを同定した。また、CASP8遺伝子の発現ステータスが、がん細胞の抗酸化シグナルの活性化を促進するp62/SQSTM１タンパク質の安定性を制御しており、有望なフェロトーシス感受性マーカーとなりえることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義
細胞死に対する抵抗性を促進する分子メカニズムの理解は効果的ながん治療を開発するにあたり、非常に重要である。本研究によるフェロトーシス誘導治療法の開発は、SMARCA4変異がんの臓器横断的な治療法として臨床応用に発展するインパクトを持ち、治療抵抗性がんの特徴でもあるアポトーシス抵抗性に対抗する治療戦略にとしての新たな一手となることが期待される。SMARCA4変異症例の不良な予後はアポトーシス抵抗性によることが考えられるが、本研究によるフェロトーシス誘導治療法の開発は、SMARCA4変異がんの革新的治療法として臨床応用に発展するインパクトを持つことが期待される。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the regulatory mechanisms of ferroptosis and apoptosis and to develop novel therapies targeting the vulnerability of SMARCA4 mutant cancer cells to ferroptosis, we established cell lines stably expressing SMARCA4, performed ATAC-seq analysis, and extracted from public databases the genes that were highly expressed in ferroptosis -resistant cells. Among the genes obtained, only the genes highly expressed in ferroptosis -resistant cells were extracted from public databases, and new ferroptosis resistance candidate genes, SMYD3, LTBR, and PFKP, were identified. We also found that the expression status of the CASP8 gene regulates the stability of the p62/SQSTM1 protein, which promotes the activation of antioxidant signaling in cancer cells and could be a promising ferroptosis susceptibility marker.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：SMARCA4　フェロトーシス　CASP8　p62

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

申請者らは、がん組織の腫瘍内不均一性に着目した研究を進め、細胞ごとに異なる活性酸素種(Reactive oxygen species, ROS) 制御機構が存在することを見出してきた。その中で、がん幹細胞性のマーカーとして知られる CD44 バリアント(CD44v)は未分化性及び静止状態の維持を行い、シスチン輸送体タンパク質である xCT を安定化させ、xCT/GSH/GPX4 経路依存的な ROS の制御をしていることを見出した。CD44v 陽性の未分化ながん幹細胞は、従来の抗がん剤により誘導されるアポトーシスに抵抗性を得る一方で、xCT/GSH/GPX4 経路への依存性が高くフェロトーシスに対しては感受性が高いと言える。そのため CD44v 陽性がん幹細胞は、xCT 阻害剤であるスルファサラジン（SSZ）によりフェロトーシスを誘導することで特異的に治療できることを明らかにした。 この基礎研究をもとに SSZ を用いてがん幹細胞を治療する３つの臨床試験を行った。臨床検体の解析により SSZ による CD44v 陽性がん幹細胞の抑制効果がヒトでも確認でき、無増悪生存期間の延長効果も確認された。一方、CD44v は組織の中で陽性率は数%程度と少なく、組織全体の腫瘍縮小効果が乏しいことが問題点として浮き彫りになっていた。そこで私たちの研究グループは未分化性の高い腫瘍がフェロトーシス誘導療法の適切な対象疾患と考え、未分化性を決定するバイオマーカーの同定を目的に研究を進めてきた。その結果、SMARCA4 変異がん細胞はフェロトーシス感受性が高い一方、アポトーシスに対しては耐性を示すという興味深い結果を得た。更に in silico の解析から得られたセレン代謝リプログラミングが、酸化的細胞障害による細胞死のベクトルをアポトーシスからフェロトーシスへと変化させると言う仮説から、この調節機構の解明および SMARCA4 変異がん細胞のフェロトーシス脆弱性を標的とした新規治療法の開発を目的とした研究テーマを立案した。

２．研究の目的

本研究は異なる分子機構によって制御される細胞死であるフェロトーシスとアポトーシスにおいてそれぞれの調節機構とクロストークの解明、さらには SMARCA4 変異がん細胞のフェロトーシス脆弱性を標的とした新規治療法の開発を目的とする。具体的には SMARCA4 変異により発現制御される分子を網羅的に同定し絞り込みを行うとともに、フェロトーシスとアポトーシスの両方に関わる因子を同定する。さらにはフェロトーシス脆弱性を標的とした新規治療薬を探索する。

３．研究の方法

以下の項目について研究を実施した。

３－１．SMARCA4 のクロマチンリモデリング機能によって制御されるフェロトーシス抵抗性に関わる分子の同定

３－１－１. SMARCA4 変異を有する非小細胞肺癌細胞を用いた SMARCA4 安定発現細胞の作出

３－１－２. SMARCA4 安定発現細胞を用いた Transposon による網羅的オープンクロマチン領域解析（ATAC-Seq）の実施

３－１－３. SMARCA4 のクロマチンリモデリング機能によって制御される新規フェロトーシス抵抗性分子の同定

３－２．細胞死調節因子の同定

公共データベースおよび細胞株を用いた予備実験からフェロトーシス感受性が高い肺癌細胞では CASP8 遺伝子が欠失あるいは発現低下していることが明らかとなっていることから CASP8 遺伝子発現とフェロトーシス感受性の関連性を検討する。

３－３．フェロトーシス脆弱性を標的とした新規治療薬の開発

４．研究成果

３－１－１. SMARCA4 変異を有する非小細胞肺癌細胞を用いた SMARCA4 安定発現細胞の作出

SMARCA4 遺伝子を欠失し、フェロトーシス誘導に高感受性を示す非小細胞肺癌 A427 細胞を用いて SMARCA４を過剰発現する安定発現株を樹立した。さらに SMARCA4 の発現がフェロトーシス感受性に関与することを確認するためにフェロトーシス誘導剤である xCT 阻害剤スルファサラジンの効果を検討したところ、SMARCA4 の発現を戻すことでフェロトーシスに抵抗性を示すことが確認できた(図１)。

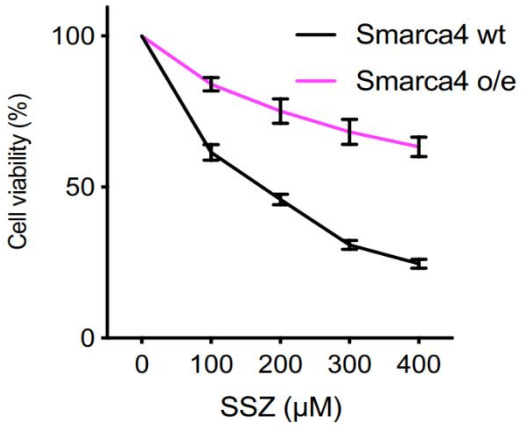


**図 1 : SMARCA４過剰発現 A427 細胞の作成およびフェロトーシス抵抗性の確認**

３－１－２. SMARCA4 安定発現細胞を用いた Transposon による網羅的オープンクロマチン領域解析（ATAC-Seq）の実施

この安定発現株を用いて ATAC-seq 解析を実施した(図 2)。

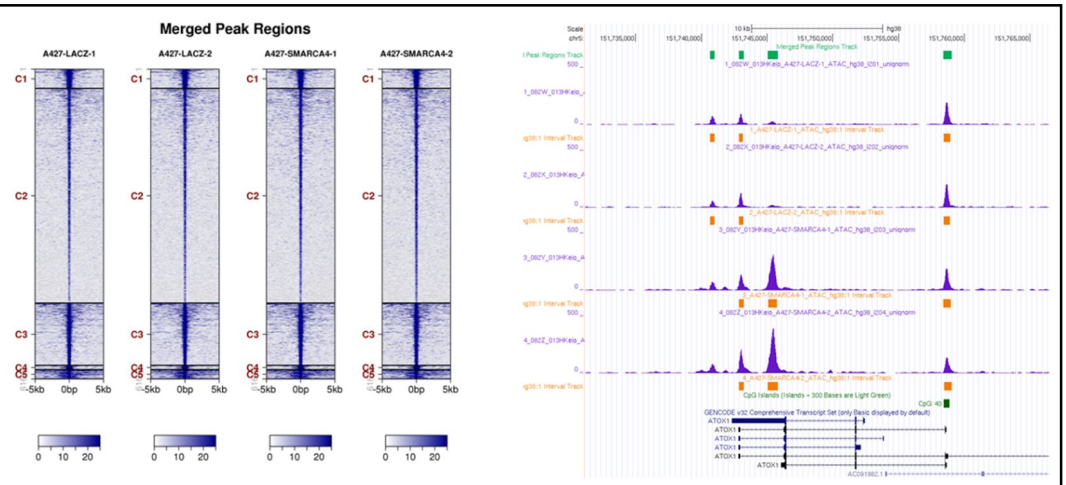


**図 2: SMARCA４安定発現 A427 細胞を用いた ATAC-seq（左）および ATOX1 の例（右）**

３－１－３. SMARCA4 のクロマチンリモデリング機能によって制御される新規フェロトーシス抵抗性分子の同定

ATAC-seq のデータを公共の細胞株データベース(DepMap)から得られたフェロトーシス誘導剤 RSL3 との抵抗性と発現パターンが相関する遺伝子群と比較し、共通の遺伝子群を抽出し、SMARCA4 によって制御されるフェロトーシス関連遺伝子リストを作成した(図３)。

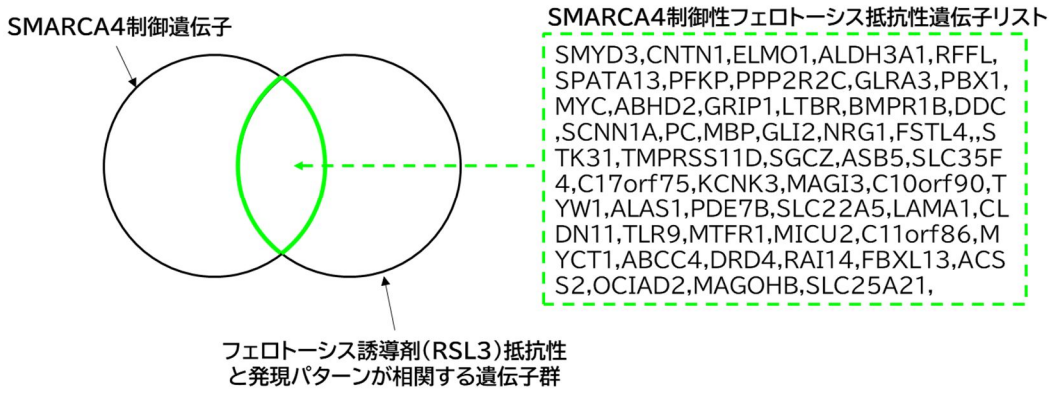


**図 3: SMARCA4 発現によるフェロトーシス抵抗性関連遺伝子のクロマチンリモデリング**

### ３－２．細胞死調節因子の同定

細胞株データベースの解析の結果、フェロトーシス感受性が高い SCLC ではアポトーシスタンパク質である caspase-8 の発現が低下していることが明らかとなった。さらに抗酸化シグナルやフェロトーシス抵抗性を促進する p62 タンパク質の安定性が CASP8 の発現によって制御されていることが明らかとなり、Caspase8 は、NRF2 依存的な抗酸化シグナルの活性化を寄与する p62/SQSTM１の発現を負に制御することでフェロトーシス感受性に関与する因子であることが分かった。また、非小細胞肺がん H441 細胞に対する阻害剤および CASP8 遺伝子ノックアウトの効果を検討したところ、CASP8 の機能阻害によって p62/SQSTM１の発現が安定化することでフェロトーシス抵抗性を上昇することが明らかとなった(図４)。

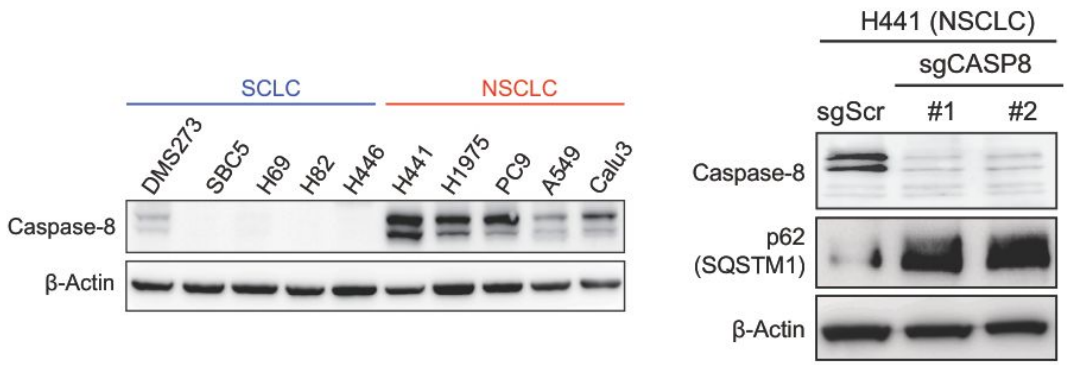


**図 4: 肺がんの CASP8 発現が NRF2 依存的抗酸化シグナルの活性化に関与する p62 タンパク質の発現に与える影響**

### ３－３．フェロトーシス脆弱性を標的とした新規治療薬の開発

これまでの検討から p62 を介した抗酸化シグナルの活性化は、抗がん剤投与によって生じることが明らかとなり、CASP8 の欠失や抗がん剤の耐性化が原因となり蓄積した p62 の発現を阻害可能な薬剤を探索した結果、新たにブルサトールという既存薬を同定した。小細胞肺がんの in vitro 培養系や in vivo 皮下腫瘍に対して抗がん剤シスプラチンを処理すると、フェロトーシス抵抗性因子である xCT や抗酸化シグナルの活性化に関わる p62 の発現が上

**昇してくるが、このシスプラチン誘導性に活性化する xCT を介した抗酸化システムはブルサトールを同時に投与することで抑制できることが分かった。このことから、ブルサトールは CASP8 欠失やシスプラチンに対する抵抗性に関わる xCT を介した抗酸化シグナルを抑**制する作用を有することから、がん細胞の治療抵抗性やフェロトーシス抵抗性に繋がる**p62-NRF2 を介した抗酸化シグナルを活性化する抗がん剤の副次的作用を抑制できる薬剤として有望であることが示唆された。**

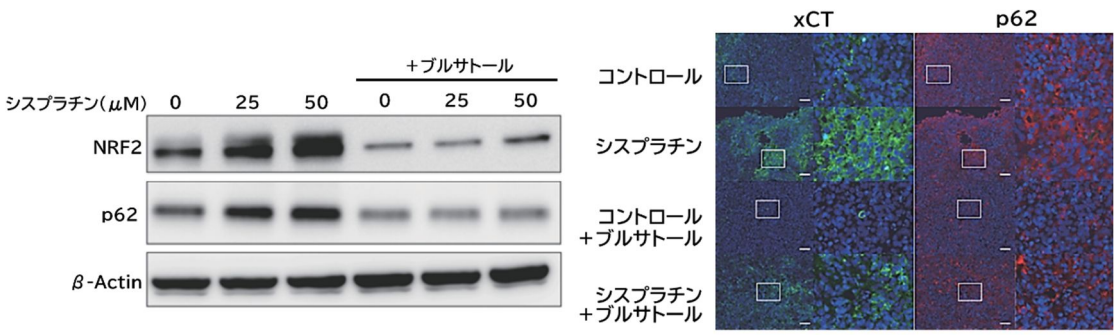


**図 5: シスプラチン処理による NRF2 抗酸化シグナルの活性化と**
**ブルサトールの併用による抑制効果**

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計2件（うち査読付論文　2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<br>Yamasaki Juntaro、Hirata Yuki、Otsuki Yuji、Suina Kentaro、Saito Yoshiyuki、Masuda Kenta、Okazaki Shogo、Ishimoto Takatsugu、Saya Hideyuki、Nagano Osamu | ４．巻<br>113 |
| ２．論文標題<br>MEK inhibition suppresses metastatic progression of KRAS‐mutated gastric cancer | ５．発行年<br>2022年 |
| ３．雑誌名<br>Cancer Science | ６．最初と最後の頁<br>916～925 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1111/cas.15244 | 査読の有無<br>有 |
| オープンアクセス<br>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<br>－ |

| | |
|---|---|
| １．著者名<br>Tsuchihashi Kenji、Hirata Yuki、Yamasaki Juntaro、Suina Kentaro、Tanoue Kenro、Yae Toshifumi、Masuda Kenta、Baba Eishi、Akashi Koichi、Kitagawa Yuko、Saya Hideyuki、Nagano Osamu | ４．巻<br>30 |
| ２．論文標題<br>Presence of spontaneous epithelial-mesenchymal plasticity in esophageal cancer | ５．発行年<br>2022年 |
| ３．雑誌名<br>Biochemistry and Biophysics Reports | ６．最初と最後の頁<br>101246～101246 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.bbrep.2022.101246 | 査読の有無<br>有 |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著<br>－ |

〔学会発表〕　計5件（うち招待講演　5件／うち国際学会　2件）

| |
|---|
| １．発表者名<br>永野修 |
| ２．発表標題<br>Therapeutic targeting of redox system in cancer stem cells |
| ３．学会等名<br>第80回日本癌学会学術総会（招待講演） |
| ４．発表年<br>2021年 |

| |
|---|
| １．発表者名<br>永野修 |
| ２．発表標題<br>がん転移におけるフェロトーシス抵抗性 |
| ３．学会等名<br>第31回日本がん転移学会学術集会・総会（招待講演） |
| ４．発表年<br>2022年 |

１．発表者名
永野修

２．発表標題
シスチントランスポーターxCTとALDHを標的とした新しいがん治療

３．学会等名
日本薬物動態学会第37回年会（招待講演）

４．発表年
2022年

１．発表者名
Osamu Nagano

２．発表標題
Development fo cancer therapy by simultaneous targeting of cystine-glutamate antiporter xCT and aldehyde dehydrogenase

３．学会等名
The Cold Spring Harbor Asia conference on Iron, Reactive Oxygen Species & Ferroptosis in Life, Death & Disease, AWAJI, JAPAN（招待講演）（国際学会）

４．発表年
2022年

１．発表者名
Osamu Nagano

２．発表標題
Novel approach for cancer therapy by cancer therapy by simultaneous targeting of xCT-dependent cystine transport and aldehyde dehydrogenase activity

３．学会等名
Redox Week in Sendai 2022（招待講演）（国際学会）

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<br>（ローマ字氏名）<br>（研究者番号） | 所属研究機関・部局・職<br>（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 |
| --- | --- |