

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16339

研究課題名（和文）細胞転換によるがん細胞の薬剤感受性化メカニズムの解析

研究課題名（英文）Analysis of the mechanism of drug sensitization of cancer cells with cell transition

研究代表者

加藤 優 (Kato, Yu)

慶應義塾大学・薬学部（芝共立）・助教

研究者番号：80847864

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：細胞は、その生存環境に適応するために細胞転換する。本研究ではヒト大腸がん由来のHCT116細胞にEMTを誘導したEMT細胞を用いて、細胞転換時の薬剤感受性の変動機構について研究し、EMT細胞はglutathione peroxidase 4(GPX4)阻害剤に高感受性を示すことを明らかにした。このEMT細胞のRSL3高感受性には、細胞内glutathioneの低下が関与していた。次に、通常培養よりも生体内に近いスフェロイド培養時に高感受性化する薬剤を探索し、BET阻害剤のdBET6を同定した。dBET6はEMT細胞において通常培養、スフェロイド培養の両方でRSL3への感受性を増大させた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

EMTやスフェロイド培養による細胞転換は、がん細胞の薬剤抵抗性を変動させる。本研究では、EMT、スフェロイド培養による細胞転換後の細胞に強い増殖抑制効果を示す薬剤を同定した。これらの薬剤を既存の治療法を合わせることで、細胞転換による薬剤感受性の多様性を克服可能であると考えられた。また、EMT細胞では、RSL3感受性が高く、GPX4阻害時にフェロトーシスが誘導されることを明らかにした。フェロトーシスは抗がん剤や放射線治療などでも誘導されることが報告されており、EMTが誘導された細胞では、抗がん剤や放射線治療とフェロトーシス誘導剤を組み合わせることで既存の治療法が増強可能であると期待される。

研究成果の概要（英文）：Cells undergo cellular transition to adapt to their survival environment. In this study, we investigated the mechanism of variation in drug sensitivity during cell transition using EMT cells that were transduced SLUG and SNAIL in HCT116 cells derived from human colorectal cancer. We found that EMT cells showed high sensitivity to glutathione peroxidase 4 (GPX4) inhibitors. This high sensitivity of EMT cells to RSL3 was associated with a decrease in intracellular glutathione that is a substrate of GPX4. Next, we searched for drugs that are more sensitive to RSL3 in spheroid culture, which is closer to in vivo than in normal culture. Then we found that dBET6, a BET inhibitor, strongly prevented cell growth during spheroid culture. Moreover, dBET6 increased sensitivity to RSL3 in EMT cells in both normal and spheroid culture.

研究分野：腫瘍学、分子生物学

キーワード：細胞転換 上皮間葉転換 スフェロイド glutathione peroxidase 4 glutathione

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞は、その生存環境に応じて細胞転換を起こす。上皮間葉転換 (EMT) は、細胞間接着の強固な上皮系の細胞から運動能の高い間葉系の細胞への転換である。これに対して、細胞を3次元培養してスフェロイド形成を誘導すると、細胞間接着が強固になる。こうした細胞転換に伴って薬剤感受性が変化し、がん治療を困難にする。実際に、ヒト大腸がん由来の HCT116 細胞に EMT の引き金となる転写因子 SLUG や SNAIL を導入し、EMT を誘導した EMT 細胞では、cisplatin や methotrexate などの抗がん剤への耐性化、浸潤能の亢進、がん幹細胞様の形質を示す side population (SP) 細胞の出現など、がんの悪性化に関わる現象が観察されている。一方で、EMT 細胞では、BET 阻害剤の I-BET-151、bromosporine に対する感受性が親株よりも高いことを報告している (Kato Y, et al. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020)。これらの結果は、細胞転換は薬剤耐性化のみならず、薬剤感受性化にも働くことが示唆されている。そこで、本研究では、細胞転換時に有効な薬剤を探索し、それらを組み合わせることでのがんの細胞転換による薬剤感受性の多様性を克服可能な新規治療法を考案することとした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、細胞転換を起こしたがん細胞に効果の高い化合物を同定してその感受性化機構を解明する。さらに、細胞転換時に有効な薬剤を組み合わせることで、がん細胞集団の多様性を克服可能な新規治療法を考案することである。本研究では、EMT 細胞と HCT116 細胞の薬剤感受性を比較することで、EMT 細胞の生存増殖を特異的に抑制可能な薬剤を同定する。siRNA 等を用いて、EMT 細胞の生存増殖に重要な遺伝子を明らかにする。さらに、EMT 細胞に特異的に生存増殖を抑制する薬剤の感受性を規定する分子機構を明らかにする。次に、スフェロイド培養時に通常培養時よりも細胞増殖を強く抑制する薬剤を探索し、通常培養時に EMT 細胞に対して強い増殖抑制効果を示した薬剤と併用することによりがんの細胞転換により誘導される薬剤感受性の多様性を克服可能な新規治療法を考案する。

3. 研究の方法

研究に用いた細胞は、ヒト大腸がん由来の HCT116 細胞および、HCT116 細胞に EMT の引き金となる転写因子 SLUG、SNAIL を導入した EMT 細胞を用いた。薬剤処理後の細胞生存は、Cell Counting Kit-8 (Dojindo) を用いて検討した。細胞内の過酸化脂質の検出には、ImageIT Lipid Peroxidation Kit (Thermo) を用いた。また細胞内の過酸化脂質の定量には ImageJ を用いた。細胞内 glutathione 量の定量には、glutathione assay kit (Cayman Chemical) を用いた。スフェロイド培養は、超低接着表面の 96 well plate (Corning) で細胞を培養することで形成させた。スフェロイド培養時の細胞生存率は、CellTiter-Glo[®]3D Cell Viability assay (Promega) により推定した。siRNA の導入は、Silencer Select siRNA (Thermo Fisher Scientific) および、RNAiMax (Thermo Fisher Scientific) を用いて行った。

4. 研究成果

(1) HCT116 細胞に EMT 関連の転写因子である SLUG、SNAIL を強制発現させ、EMT を誘導した細胞株を作製している (Kato Y, et al. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020)。HCT116 細胞およ

び、EMT 細胞の薬剤感受性を比較することで EMT 細胞において高感受性を示す薬剤を探索した。その結果、glutathione peroxidase 4 (GPX4) 阻害に対する阻害剤 RSL3 を同定した。また、RSL3 の標的分子である GPX4 に対する siRNA の導入は、HCT116 細胞よりも強く EMT 細胞の増殖を抑制した。以上から、GPX4 は EMT 細胞に対する標的となりうることが考えられた。

(2) GPX4 の阻害による過酸化脂質の蓄積について、蛍光プローブを用いて検討した。その結果、EMT 細胞では、RSL3 の存在下で過酸化脂質が蓄積したのに対し、親株の HCT116 細胞では、RSL3 存在下でも細胞内の過酸化脂質の量に変化は見られなかった。次に、過酸化脂質の蓄積が EMT 細胞において細胞死を誘導するか ferrostatin を用いて検討した。その結果、EMT 細胞では、ferrostatin は RSL3 による細胞増殖抑制効果が減弱した。これらの結果は、RSL3 は EMT 細胞において、過酸化脂質の蓄積による細胞死であるフェロトシス(ref)を誘導したことが考えられた。また、EMT 細胞のフェロトシスが誘導されやすい性質が RSL3 高感受性に関与することが考えられた。

(3) EMT 細胞の RSL3 高感受性に関与する因子を探索したところ、EMT 細胞では、細胞内 glutathione 量が低下していた。RSL3 の感受性と細胞内 glutathione 量を比較したところ、RSL3 の感受性と逆相関していた。そこで、glutathione の合成を阻害する sulfasalazine や erastin 存在下での RSL3 感受性について検討した。Sulfasalazine、erastin は HCT116 細胞、EMT 細胞の細胞内 glutathione 量を減少させ、RSL3 存在下で細胞内の過酸化脂質の量を増加させた。しかし、sulfasalazine や erastin は、EMT 細胞においてのみ RSL3 感受性を増大させた。また、sulfasalazine、erastin による RSL3 高感受性化は ferrostatin によりレスキューされた。以上の結果は、EMT 細胞では細胞内 glutathione 量が RSL3 感受性およびフェロトシス感受性に関与することを示唆している。一方で、HCT116 細胞では、glutathione 量が減少し、RSL3 の存在下で細胞内の過酸化脂質が増加したにもかかわらず細胞死が誘導されなかったことから、過酸化脂質が蓄積した際の防御機構が EMT 細胞よりも強いことが考えられた。

以上から、EMT による細胞転換は、GPX4 阻害剤への高感受性を誘導すること、また、EMT による細胞転換後は glutathione 量を減少させる薬剤が GPX4 阻害剤の効果を高めることを明らかにした。

(4) 前述の通りスフェロイド培養は、薬剤感受性を変動させる。HCT116 細胞、EMT 細胞でスフェロイド培養時の RSL3 感受性について検討したところ、通常の 2 次元培養時に比べて RSL3 に抵抗性を示すことが考えられた。一方で、抗がん剤である SN-38 はスフェロイド培養も 2 次元培養時と感受性が変わらなかった。次に、HCT116 細胞を用いてスフェロイド培養時に感受性が増大する薬剤を探索した。その結果、エピジェネティックに遺伝子発現を変動させる BRD4 の分解に働く dBET6 が 2 次元培養時に比べて 3 次元培養時の細胞増殖を強く抑制することを見出した。一方で、通常の BRD4 阻害剤は dBET6 よりもこの効果が弱かった。

(5) dBET6 と RSL3 の併用効果について検討を行った。2 次元培養時には、dBET6 は HCT116 細胞、SLUG 導入 EMT 細胞の RSL3 感受性を増大させた。SLUG 導入 EMT 細胞における dBET6 存在下での RSL3 高感受性化は、ferrostatin により減弱した。一方で、スフェロイド培養時には、HCT116 細胞では RSL3 感受性が変動しなかったが、EMT 細胞における RSL3 感受性は増大した。以上から、

dBET6 はスフェロイド培養時の薬剤感受性の変動を克服可能な薬剤であると考えられた。

(6) スフェロイド培養時の RSL3 抵抗性に関わる因子を同定するため、2次元培養時に比べ、スフェロイド培養時に発現が上昇するフェロトーチス関連因子を検討したところ、aldehyde dehydrogenase (ALDH) がスフェロイド形成時に発現上昇することを見出した。次に、cDNA マイクロアレイのデータを用いて ALDH の内で最も発現が高いアイソフォームを探索したところ、HCT116 細胞において ALDH1/2 の内で、ALDH1A3 が最も発現が高かった。そこで、ALDH1A3 に対する siRNA を導入し、ALDH1/2 の発現低下時の β RSL3 の感受性について検討したところ、EMT 細胞では、ALDH1/2 の発現減少が RSL3 感受性を増大させた。また、dBET6 の存在下で、ALDH1/2 の発現が低下したことから、dBET6 による RSL3 感受性化に ALDH1/2 が関与していることが考えられた。

(7) これまでに、EMT 細胞には、親株には観察されなかったがん幹細胞様の性質を示す side population (SP) 細胞が含まれていることを報告した。また、SP 細胞は、BET 阻害剤 I-BET151 や bromosporine により non-SP 細胞に転換することを明らかにしている。そこで、dBET6 による SP 細胞の割合の変動について検討したところ、dBET6 は、SP 細胞から non-SP 細胞への転換を誘導することを見出した。

以上から、スフェロイド培養時の細胞転換は dBET6 への高感受性化を誘導すること、dBET6 と RSL3 を併用することで、EMT およびスフェロイド形成時の細胞転換による薬剤感受性への heterogeneity を克服可能であることが示唆された。一方で、dBET6 がスフェロイド培養時の細胞生存に及ぼす影響については明らかになっておらず、さらなる研究が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mizuki Takahashi, Yuka Okamoto, Yu Kato, Hitomi Shirahama, Satomi Tsukahara, Yoshikazu Sugimoto, Akihiro Tomida	4. 巻 9
2. 論文標題 Activating mutations in EGFR and PI3K promote ATF4 induction for NSCLC cell survival during amino acid deprivation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e14799
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.heliyon.2023.e14799	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 Kato Yu, Kunimasa Kazuhiro, Takahashi Mizuki, Harada Ayaka, Nagasawa Ikuko, Osawa Masanori, Sugimoto Yoshikazu, Tomida Akihiro	4. 巻 98
2. 論文標題 GZD824 Inhibits GCN2 and Sensitizes Cancer Cells to Amino Acid Starvation Stress	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Pharmacology	6. 最初と最後の頁 669 ~ 676
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1124/molpharm.120.000070	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 Takahashi Chihiro, Kondo Shingo, Sadaoka Kensuke, Ishizuka Shuhei, Noguchi Kohji, Kato Yu, Sugimoto Yoshikazu	4. 巻 530
2. 論文標題 Effect of TNIK upregulation on JQ1-resistant human colorectal cancer HCT116?cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 230 ~ 234
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.06.136	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 Kondo Shingo, Kato Yu, Minagawa Satoshi, Sugimoto Yoshikazu	4. 巻 523
2. 論文標題 STAT1 upregulates glutaminase and modulates amino acids and glutathione metabolism	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 672 ~ 677
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.01.006	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計19件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 加藤優、深澤ゆかり、近藤慎吾、杉本芳一
2. 発表標題 BET阻害剤dBET6はSLUG導入EMT細胞のフェロトーシス感受性を増大させる
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 奥村光遥、加藤優、近藤慎吾、杉本芳一
2. 発表標題 EMTを誘導したヒト大腸がんHCT116細胞に対するglutaminase阻害剤の効果
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 奥田賢、近藤慎吾、加藤優、杉本芳一
2. 発表標題 WEE1阻害薬耐性ヒト乳がん細胞の増殖におけるMEK-ERKの関
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 春名俊志、加藤優、有村友希、角石優花、神山遥、近藤慎吾、杉本芳一
2. 発表標題 Histone deacetylaseの抑制によるABCG2の発現低下とside population細胞の減少
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 近藤慎吾、武田卓、片山和浩、加藤優、杉本芳一
2. 発表標題 SYDE1遺伝子導入細胞におけるP-糖タンパク質の発現増大
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 加藤優、近藤慎吾、杉本芳一
2. 発表標題 FLT3-ITDによるGCN2経路を介したATF4の発現制御
3. 学会等名 第26回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加藤優、深澤ゆかり、近藤慎吾、杉本芳一
2. 発表標題 SLUG導入EMT細胞のフェロトーシス感受性
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 近藤慎吾、奥田賢、齋藤梨帆、加藤優、杉本芳一
2. 発表標題 WEE1阻害剤耐性とCHK1阻害剤耐性のメカニズムの統合的解析
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋瑞希、加藤優、国政和弘、杉本芳一、富田章弘
2. 発表標題 PI3K-mTOR経路による統合的ストレス応答制御機構の解析
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 奥田寛、近藤慎吾、加藤優、杉本芳一
2. 発表標題 WEE1阻害剤耐性細胞におけるAKTの活性化
3. 学会等名 第65回 日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 春名俊志、加藤優、近藤慎吾、杉本芳一
2. 発表標題 Side population細胞に対するepigenetic阻害剤の効果
3. 学会等名 第65回 日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤優、近藤慎吾、杉本芳一
2. 発表標題 GPX4 expression and glutathione content are determinants of ferroptosis in SLUG-transduced HCT116 cells.
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 加藤優、近藤慎吾、杉本芳一
2. 発表標題 エピジェネティック阻害剤によるSP細胞形質の抑制
3. 学会等名 第25回 日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋瑞希、加藤優、國政和弘、杉本芳一、富田章弘
2. 発表標題 GZD824のGCN2-ATF4ストレス応答経路に対する阻害効果
3. 学会等名 第24回 日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤優、近藤慎吾、杉本芳一
2. 発表標題 SLUG導入HCT116細胞におけるxCT発現上昇とフェロトーシス抵抗性
3. 学会等名 第24回 日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤優、近藤慎吾、杉本芳一
2. 発表標題 Factors affecting the ferroptosis sensitivity of SLUG-transduced HCT116 cells
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 近藤慎吾、加藤優、杉本芳一
2. 発表標題 STAT1-mediated drug resistance and its circumvention
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 深澤ゆかり、加藤優、近藤慎吾、杉本芳一
2. 発表標題 SLUG導入HCT116細胞に対するGPX4阻害剤の効果
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐々木大河、加藤優、近藤慎吾、杉本芳一
2. 発表標題 FLT3-ITDによるintegrated stress responseの誘導
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021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
---------	---------