

平成30年5月25日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10699

研究課題名(和文) 子宮体部漿液性腺癌の抗癌剤耐性克服にむけたメタボローム解析に基づく新治療戦略

研究課題名(英文) Development of novel therapeutic strategies based on metabolomics analysis of uterine serous carcinoma

研究代表者

永瀬 智 (Nagase, Satoru)

山形大学・医学部・教授

研究者番号：00292326

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト子宮体部漿液性腺癌細胞株USPC-1とUSPC-1からパクリタキセル耐性を獲得した細胞株PTX1のメタボロームプロファイルと比較したところ、PTX1において、グルタチオン(GSH)、グルコース-6-リン酸、リボース-5-リン酸の濃度が高いことが明らかとなった。シスチントランスポーターの阻害作用を有するスルファサラジン(SSZ)投与により、PTX1のGSH濃度は低下し、パクリタキセルとの併用によりパクリタキセル感受性が増強した。さらに、SSZ投与により、PTX1の細胞増殖能は抑制され、死細胞が増加したが、この細胞死は非アポトーシス性細胞死であるフェロトーシスにより生じることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：First, we examined metabolomic profile in USC cells by analysis using a capillary electrophoresis CE-MS/MS system. The concentration of GSH, Glucose-6-phosphate and ribose-5-phosphate in the PTX-1 cells was higher than that of USPC-1 cells. Next, we investigated the effect of the xCT inhibitor sulfasalazine (SAS) on cytotoxicity in paclitaxel-sensitive and -resistant USC cell lines. The results of proliferation and cell-death assays showed that SAS enhanced the efficacy of paclitaxel in both paclitaxel-sensitive and -resistant cell lines. Immunoblotting analysis and experiments conducted using ferroptosis inhibitors revealed that SAS-mediated cell death was induced through ferroptosis, and not apoptosis, in paclitaxel-resistant cells. Collectively, our findings indicate that xCT inhibition can overcome resistance to paclitaxel, and could thus represent a candidate novel treatment for patients with recurrent chemotherapy-resistant USC.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：子宮体部漿液性癌 メタボローム解析 パクリタキセル耐性 スルファサラジン フェロトーシス

1. 研究開始当初の背景

子宮体部漿液性癌 (uterine serous carcinoma: USC)は、子宮体癌の組織型別に見ると 10%程度の頻度であるにも関わらず、子宮体癌関連死の約 40%を占め、主要な死亡原因となる悪性度の高い疾患である。USC は約 50%の患者が 3・4 期の進行した状態で発見され、5 年生存率は 33%程度と報告されている。進行した USC に対する治療は、腫瘍減量手術とそれに引き続く化学療法となっており、化学療法はプラチナ製剤とタキサン製剤が用いられている。化学療法は再発リスクを減らし生存率改善に寄与しているが、
・ 期 USC 患者の多くが再発し、再発時は化学療法に対して抵抗性となり、原病死に至る。そのため、再発 USC の化学療法抵抗性機序を解明し、新規治療法を開発することが重要であった。

これまで多くの研究により薬剤耐性機序に関する遺伝子や蛋白質が同定されているが、臨床へ応用された例は少ない。これは、遺伝子や蛋白質の発現変動が認められても、何らかの代償的機構が働くことが理由の一つと考えられている。癌遺伝子の変異やその代償的機構は多数あっても代謝の変化は一定であることから、遺伝子や蛋白質発現のさらに下流にある、酵素などによって作り出された細胞内の低分子化合物群 (メタボローム) が注目されるようになった。研究開始当時、癌に特異的な代謝経路や抗癌剤耐性機序に関する代謝経路の研究結果も報告されてきていたことから、本研究では、薬剤耐性獲得の機序として癌細胞内の代謝経路に着目し、抗がん剤耐性獲得に関連する細胞内代謝経路・産物を明らかにすることが新規治療法確立の基盤となると考え、研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究では、抗癌剤耐性化によって変化する代謝産物全体を解明するため、抗癌剤耐性株と親株の細胞内メタボロームプロファイルの比較により抗癌剤耐性に関連する代謝経路を明らかにすること、網羅的解析で明らかとなった代謝産物・代謝経路をもとに、抗癌剤耐性獲得に強く関連する因子を明らかにし、抗腫瘍効果を検証すること、を目的とした。

3. 研究の方法

1) 網羅的メタボローム解析

ヒト子宮体部漿液性癌細胞株 USPC1 と、USPC1 を徐々に高濃度のパクリタキセルに暴露させパクリタキセル耐性を獲得させた PTX1 を用いた。USPC1 と PTX1 をそれぞれ 15 nM パクリタキセル存在下で 24 時間培養した。USPC1 のコントロール細胞とパクリタキセル処理細胞、PTX1 のコントロール細胞とパクリタキセル処理細胞のメタボローム解析を行った。メタボローム解析はヒューマン・メタボローム・テクノロジー株式会社

社に委託し、解糖系、ペントースリン酸回路、クエン酸回路、グルタチオン代謝経路等および 116 種の代謝物質を選出し解析を行った。

2) 代謝産物グルタチオン (GSH) 濃度測定

細胞内 GSH 濃度の測定は GSH-GloTM Glutathione Assay (Promega) を用いて行った。細胞を 96well プレートに 1.0×10^3 個となるように撒き、翌日から SAS またはその他の薬剤を投与し培養した。培養液を除去し、GSH-GloTM Reagent を加えて 30 分培養した。さらに reconstituted Luciferin Detection Reagent を加え、15 分培養したのちに Varioskan Flash (Thermo Fisher Scientific) を用いて発光度を測定した。

3) スルファサラジン (SSZ) の効果の検証 ROS の測定

6cm dish に細胞を撒き、80%コンフルエントになるまで培養した。SSZ またはその他の薬剤を投与後 24 時間培養し、細胞を回収した。440 xg で 5 分間遠心し、上清を除去して $10 \mu\text{M}$ の 2' 7' -ジクロロフルオレセンジアセテート (DCFH-DA) (SIGMA-ALDRICH, MO, USA) を 37 度で 30 分間反応させた。この際、遮光に留意した。フローサイトメトリー法で発光する細胞の定量を行った。なお、コントロールサンプルは薬剤処理なしの同細胞を用いた。

Cell viability assay

細胞を 96 well プレートに 1.0×10^3 個となるように撒き、翌日から SAS またはその他の薬剤を投与し 72 時間培養した。MTS assay には CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, USA) を使用した。培養液を吸引し CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Reagent と培養液を培養ウェルに加え、さらに 90 分培養したのちに Model 80 Microplate ReaderR (Biorad, Hercules, CA) を用いて 490 nm の吸光度を測定した。

死細胞の計測

細胞を 12 well プレートに 1.0×10^4 個となるように撒き、翌日から SAS またはその他の薬剤を投与し 24 時間培養した。PI (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)、及び hoechst (Thermo Fisher Scientific) で染色しさらに 15 分培養したのちに蛍光顕微鏡を用いて PI 陽性細胞と hoechst 陽性細胞の数を計数した。死細胞の割合は PI 陽性細胞 / hoechst 陽性細胞で算出した。

フローサイトメトリー

培養細胞をセルスクレーパーで回収して氷冷した PBS で洗浄し、4%(w/v) パラホルムアルデヒド/PBS を用いて室温で 10 分間固定した。FACS buffer [0.5%(w/v) ウシ血清アルブミン、PBS] で洗浄した後、FACS buffer で 1 次抗体と 1 時間反応させた。その後、Alexa

Fluor[®]488 Conjugate (Cell Signaling, #4412)に室温で30分反応させた。同細胞の二次抗体のみを染色したサンプルをコントロールサンプルとして単一細胞の分画を前方散乱 (FSC)で決定した。またコントロールサンプルでフルオレセインイソチアシアネートチャンネルにおける分画を設定した。コントロールサンプルで決定した分画よりも蛍光レベルの強い細胞を陽性細胞と定義した。すべてのフローサイトメトリー実験はFACSCantoTM Flow Cytometer (BD Biosciences, Franklin Lakes)を用いて行い、データはFlowJoソフトウェア version 7.6.5 (TreeStar Inc., Ashland)を用いて解析した。

4) 統計解析

結果は平均 ± 標準偏差 (SD) で表し、Mann-Whitney U test を用いて解析した。P値が0.05未満を有意差ありとし、図内にアスタリスクで表した。統計解析にはGraphPad Prism (Graphpad Software Inc. Version 5.0)を使用した。

4. 研究成果

1) パクリタキセル耐性株における代謝産物の変化

脂質代謝においては、Malonyl-coenzyme-Aの濃度がUSPC1細胞においてパクリタキセル処理により上昇したが、PTX1では上昇は認めなかった。Creatinine、phosphocreatine、creatineにおいても、同様の变化を認めた。

解糖系の中間代謝物であるグルコース6-リン酸がUSPC1と比較してPTX1で高値であった。パクリタキセル処理を行った場合も同様に、PTX1よりもUSPC1で高値であった。また、解糖系の活性度を示すグルコース6-リン酸/リボース5-リン酸比は、USPC1のコントロール細胞と比較してパクリタキセル処理細胞で著明に上昇しており、PTX1ではコントロール/パクリタキセル処理細胞で差がなかった。さらに、USPC1においてコントロールと比較しパクリタキセル未処理細胞と処理細胞でグルタチオン(GSH)濃度が高い傾向にあった。

2) パクリタキセル耐性とGSH

放射線療法や化学療法は、過剰な活性酸素 (reactive oxygen species: ROS) を誘導して癌細胞の抗酸化機構を崩壊させることで癌細胞を細胞死に導く。GSHは抗酸化物質であり、これまでの報告から、ROSに対して強力な還元作用を持ち、様々な癌種で癌細胞内のGSHが高濃度であることがわかっている。さらに、GSHはROSによる細胞死誘導を抑制し、癌細胞の生存や化学療法抵抗性に関与していることから、パクリタキセル耐性とGSHの関連に関して研究をすすめた。

USPC1及びPTX1の細胞増殖に対するスルファサラジン (SAS) の効果

細胞内GSH合成に不可欠で細胞内の酸化還元バランスを決定する因子として、システイン-グルタミン酸トランスポーターの軽鎖サブユニットであるxCTが重要である。USC細胞株におけるxCTの発現を、SKOV3細胞をpositive controlとしてWestern blotting法にて検討したところ、

パクリタキセル感受性株USPC1、パクリタキセル耐性株PTX1ともにxCTを強発現していた(図1)。

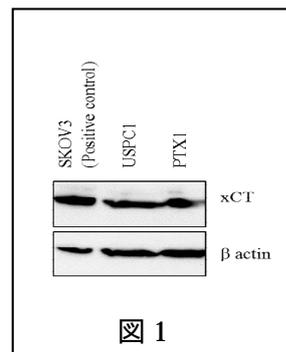


図1

スルファサラジン (SAS) が細胞増殖に与える影響をMTS assayで検討したところ、SASはPTX1では濃度依存性に細胞増殖を抑制し、USPC1では600 μM以上の濃度で細胞増殖を抑制することが明らかとなった(図2)。

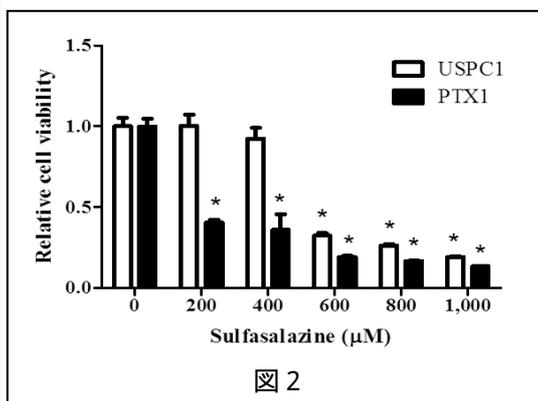


図2

次にSASとパクリタキセルの併用効果について検討した。細胞にパクリタキセル単剤またはパクリタキセルとSAS 200 μMの併用投与を行い72時間培養したところ、PTX1において、パクリタキセルとSASの併用投与はパクリタキセル単剤投与と比較し、それぞれのパクリタキセル濃度で細胞増殖を有意に減少させた(図3)。

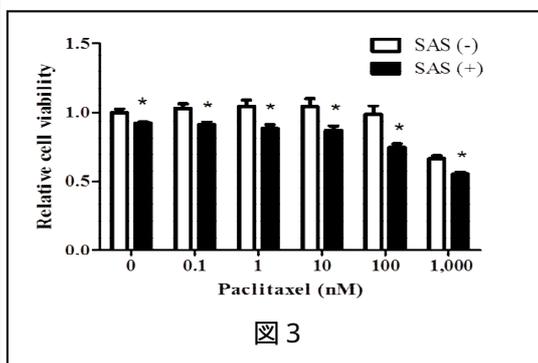


図3

これらの結果から、SASの細胞増殖抑制効果はパクリタキセル感受性株と比較してパクリタキセル抵抗性細胞株でより強く、またSASはパクリタキセル感受性を高める可能性があることが示唆された。

SAS とパクリタキセルの投与による GSH 濃度と活性酸素(ROS)蓄積に与える影響

xCT によるシスチン輸送を SAS が阻害することを確認するため、USC 細胞における SAS またはパクリタキセル投与前後の細胞内 GSH 濃度と細胞内 ROS レベルを測定した。メタボローム解析の結果と同様に、細胞内 GSH 濃度は USPC1 と比較して PTX1 で高く(図 4A)、SAS 400 μ M 投与によって GSH 濃度は両細胞株で明らかに低下した(図 4B)。

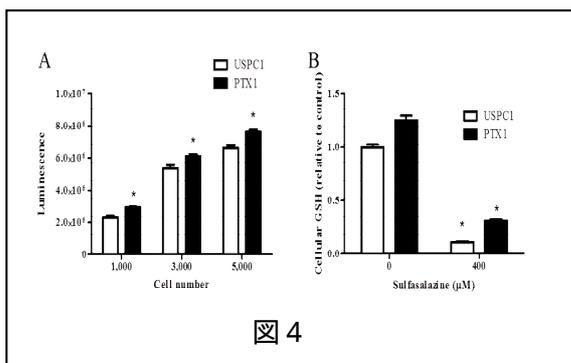


図 4

次に USC 細胞に SAS 単剤または SAS とパクリタキセルを併用投与し、それぞれの細胞内 ROS レベルを DCFH-DA を用いてフローサイトメトリーを行い検討した。パクリタキセル感受性株 USPC1 では、SAS 200 μ M を 24 時間投与しても細胞内 ROS レベルが、コントロールと比較して上昇しなかったが、パクリタキセル 10nM 投与またはパクリタキセルと SAS の併用投与では ROS の蓄積を認めた。一方、PTX1 では SAS 200 μ M を投与した 24 時間後には ROS レベルがコントロールと比較して 12 倍に、SAS 200 μ M とパクリタキセル 10 nM を投与した 24 時間後では 14 倍に上昇した。以上より、SAS 投与による GSH 減少作用が ROS 蓄積に与える影響は、パクリタキセル感受性株と耐性株では異なることが示唆された。

3) パクリタキセル耐性株における、SAS によるフェロトーシスの誘導

パクリタキセル耐性細胞株において SAS により誘導される細胞死誘導のメカニズムについて検討を行った。SAS の細胞死誘導機序がアポトーシスではないかと考え、アポトーシスマーカーである cleaved PARP の発現を western blotting 法で検討したが、アポトーシス以外の機序で細胞死や細胞増殖抑制が引き起こされている可能性があることが示されたため、フェロトーシス性の細胞死が誘導されるかどうか検討を行った。フェロトーシス阻害薬であるフェロスタチン 1 (Fer-1) を用いて SAS 単剤または SAS と Fer-1 の併用投与を 72 時間行い、MTS assay 法で cell viability を測定した。SAS と Fer-1 の併用投与により、SAS 単剤投与と比較して cell viability が有意に上昇した(図 5A)。さらに、SSZ と Fer-1 の併用投与によって SSZ による細胞死誘導は有意に減少した(図 5B)。

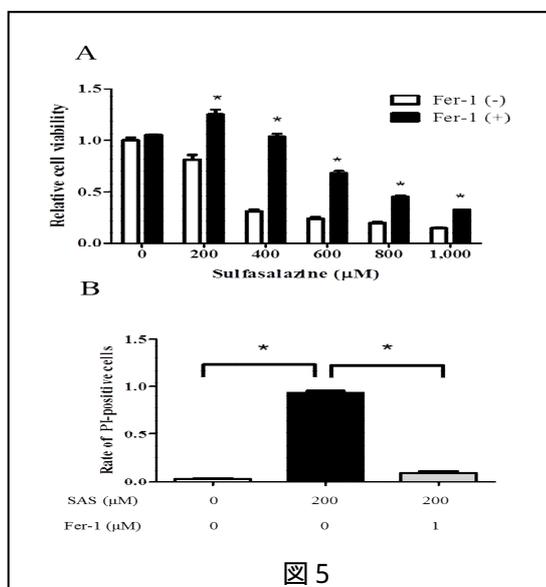


図 5

また、鉄キレーターであるデフェロキサミン (DFO) と SAS との併用投与により、SAS 単剤投与と比較して cell viability が上昇した(図 6)。

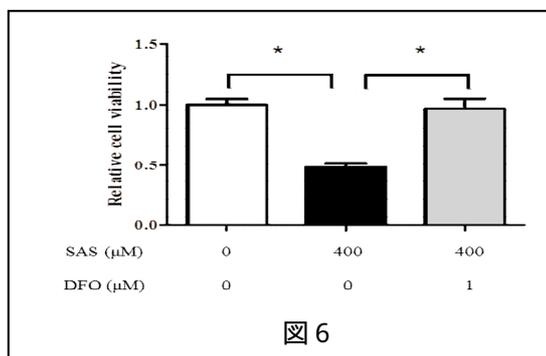


図 6

SAS により誘導される細胞増殖抑制がアポトーシスではなくフェロトーシスであることを確かめるために、アポトーシス阻害薬である Z-VAD-FMK の効果を検証したが、アポトーシス阻害薬 Z-VAD-FMK は SAS により誘導される細胞増殖抑制に影響を及ぼさないことが明らかとなった。以上の結果から、パクリタキセル耐性細胞株において SAS により誘導される細胞増殖抑制と細胞死の機序がフェロトーシスによるものである可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Shigeta S, Nagase S, Mikami M, Ikeda M, Shida M, Sakaguchi I, Ushioda N, Takahashi F, Yamagami W, Yaegashi N, Udagawa Y, Katabuchi H. Assessing the effect of guideline introduction on clinical practice and outcome in patients with endometrial cancer in Japan: a project of the Japan Society of Gynecologic Oncology (JSGO) guideline evaluation

committee. J Gynecol Oncol. 2017;28(6):e76
Matsumura S, Ohta T, Yamanouchi K, Liu Z, Sudo T, Kojimahara T, Seino M, Narumi M, Tsutsumi S, Takahashi T, Takahashi K, Kurachi H, Nagase S. Activation of estrogen receptor alpha by estradiol and cisplatin induces platinum-resistance in ovarian cancer cells. Cancer Biol Ther. 2017;18:730-739
Nishimoto M, Toyoshima M, Shiga N, Utsunomiya H, Suzuki F, Nagase S, Nishigori H, Suzuki T, Sasano H, Ito K, Yaegashi N. Steroid Sulfatase Inhibitor Reduces Proliferation of Ishikawa Endometrial Cancer Cells in Co-Culture Systems. OJEMD. 2016;6:193-204
Kitatani K, Usui T, Sriraman SK, Toyoshima M, Ishibashi M, Shigeta S, Nagase S, Sakamoto M, Ogiso H, Okazaki T, Hannun YA, Torchilin VP, Yaegashi N. Ceramide limits phosphatidylinositol-3-kinase C2β-controlled cell motility in ovarian cancer: potential of ceramide as a metastasis-suppressor lipid. Oncogene. 2016;35(21):2801-12
Ebina Y, Katabuchi H, Mikami M, Nagase S, Yaegashi N, Udagawa Y, Kato H, Kubushiro K, Takamatsu K, Ino K, Yoshikawa H. Japan Society of Gynecologic Oncology guidelines 2013 for the treatment of uterine body neoplasms. Int J Clin Oncol. 2016;21(3):419-34
Seino M, Okada M, Sakaki H, Takeda H, Watarai H, Suzuki S, Seino S, Kuramoto K, Ohta T, Nagase S, Kurachi H, Kitanaka C. Time-staggered inhibition of JNK effectively sensitizes chemoresistant ovarian cancer cells to cisplatin and paclitaxel. Oncol Rep. 2016;35(1):593-601

〔学会発表〕(計 12 件)

杉山晶子, 太田 剛, 榊 宏, 清野 学, 須藤 毅, 永瀬 智. 子宮体部漿液性腺癌細胞株におけるスルファサラジンによるパクリタキセル抵抗性解除機構に関する検討. 第 69 回日本産科婦人科学会 広島 2017.4.13-16
清野 学, 太田 剛, 杉山晶子, 榊 宏, 須藤 毅, 永瀬 智. 子宮体部漿液性癌のタキサン耐性獲得に関するメタボローム解析. 第 69 回日本産科婦人科学会 広島 2017.4.13-16
Sakaki H, Seino M, Ohta T, Nagase S. GSKJ4, a selective jumonji H3K27 demethylase inhibitor, targets ovarian cancer stem cells. 第 69 回日本産科婦人科学会 広島 2017.4.13-16
Seino M, Ohta T, Sugiyama A, Sakaki H, Sudo T, Nagase S. Metabolomic analysis of uterine serous carcinoma with acquired resistance to paclitaxel. ASGO2017 Nov 30-Dec 2, 2017, Tokyo, Japan
清野 学, 太田 剛, 須藤 毅, 成味 恵, 榊 宏, 永瀬 智. JNK 阻害薬を用いた卵巣癌

薬剤抵抗性克服の試み. 第 58 回日本婦人科腫瘍学会 鳥取 2016.7.8-10
永瀬 智. 2 型子宮内膜癌の細胞像・組織像と遺伝子異常. 第 57 回日本臨床細胞学会 横浜 2016.5.28
清野 学, 太田 剛, 榊 宏, 成味 恵, 須藤 毅, 高橋一広, 倉智博久, 永瀬 智. レスベラトロールは卵巣癌幹細胞のアポトーシスを誘導し幹細胞性を喪失させる. 第 68 回日本産科婦人科学会 東京 2016.4.21-24
清野 学, 太田 剛, 成味 恵, 須藤 毅, 小島原敬信, 高橋俊文, 高橋一広, 永瀬 智. 子宮体癌の筋層浸潤判定における術前 MRI と迅速病理診断の精度比較. 第 57 回日本婦人科腫瘍学会 岩手 2015.8.7-9
清野 学, 太田 剛, 松村創平, 須藤 毅, 高橋俊文, 高橋一広. 卵巣がん幹細胞の幹細胞性維持における JNK の役割についての検討. 第 67 回日本産科婦人科学会 神奈川 2015.4.9-12
永瀬 智. 子宮体癌の疫学・診断・治療. 第 67 回日本産科婦人科学会 神奈川 2015.4.9-12
Matsumura S, Ohta T, Takahashi T, Yamanouchi K, Takahashi K, Kurachi H. Non-sex cord-stromal ovarian tumors frequently produce and secrete estrogen in postmenopausal women: impact on bone metabolism and abnormal endometrial histology. IFFS/JSRM International Meeting 2015, Yokohama, April 26-29, 2015.
Seino M, Okada M, Shibuya K, Seino S, Suzuki S, Takeda H, Ohta T, Kurachi H, Ito K, Nagase S, Kitanaka C. Requirement of JNK Signaling for Self-renewal and Tumor-initiating capacity of ovarian cancer stem cells. American Association for Cancer Research Annual meeting, Philadelphia, April 18-22, 2015

〔図書〕(計 1 件)

Nagase S, Ohta T, Seino M. Primary chemotherapy and targeted molecular therapy of epithelial ovarian cancer. Frontiers in Ovarian Cancer Science. (Katabuchi H.ed.) Singapore, Springer 2017:207-224

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永瀬 智 (NAGASE, Satoru)
山形大学・医学部・教授
研究者番号：00292326

(2) 研究分担者

太田 剛 (OHTA, Tsuyoshi)
山形大学・医学部・講師
研究者番号：50375341

清野 学 (SEINO, Manabu)
山形大学・医学部・助教
研究者番号：40594320

鈴木 史彦 (SUZUKI, Fumihiko)
東北大学医学部医学系研究科・助教
研究者番号：20400343

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()