

平成30年6月28日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18454

研究課題名(和文) 脳腫瘍の酸化ストレス抵抗性を打破する新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of therapeutic strategy breaking resistance to oxidative stress in glioma

研究代表者

土橋 賢司 (Tsuchihashi, Kenji)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：20773675

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：悪性度の高い神経膠腫は、手術、放射線、抗がん剤治療にも関わらず、未だ予後不良であり、新規治療法の開発が望まれる。本研究により、Epidermal growth factor receptor(EGFR:上皮成長因子受容体)を高く発現する神経膠腫では、細胞膜上のアミノ酸トランスポーターであるxCTを介して細胞内酸化ストレスの過度な上昇が抑制され、腫瘍細胞生存に有利に働いていることが明らかになった。xCTの阻害剤によって、酸化ストレスバランスが破綻し、腫瘍細胞の生存が抑制されることが明らかになった。このように本研究によって、EGFR高発現神経膠腫では、xCT阻害剤が有効である可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Malignant glioma such as glioblastoma is a cancer still difficult to treat. xCT functions as a plasma membrane antiporter for the uptake of extracellular cystine in exchange for intracellular glutamate. Epidermal growth factor receptor (EGFR) interacts with xCT and thereby promotes its cell surface expression and function in human glioma cells. EGFR-expressing glioma cells manifested both enhanced antioxidant capacity as a result of increased cystine uptake as well as increased extracellular glutamate which promotes glioma matrix invasion. Targeted inhibition of xCT suppressed the EGFR-dependent enhancement of antioxidant capacity in glioma cells as well as tumor growth and invasiveness. Our findings propose that xCT is a promising therapeutic target in EGFR-overexpressing malignant glioma.

研究分野：腫瘍内科

キーワード：脳腫瘍 xCT 酸化ストレス グルタチオン

1. 研究開始当初の背景

抗がん剤や放射線療法は、がん細胞内に過剰な活性酸素 (Reactive oxygen species: ROS) を発生させ、DNA や脂質などに障害を与えることで、死滅させることが知られている。治療抵抗性のがん細胞では、ROS 処理能力、つまり酸化ストレス耐性能が高く維持されていることが明らかになっている。酸化ストレス抵抗性に関与する代表の一つとして、細胞内の強力な抗酸化物質である還元型グルタチオンが知られている。

還元型グルタチオンは、システイン、グルタミン酸、グリシンからなるトリペプチドであり、複数の酵素の触媒により合成される。この内、システインの供給は還元型グルタチオン合成の律速段階であるため、細胞内の還元型グルタチオン合成はシスチン/グルタミン酸アンチポーターである xCT を介した周囲環境からのシスチンの直接取込みに依存している。よって、xCT は細胞の酸化ストレス回避機構、がん細胞の治療抵抗性に関与する重要な役割を果たしていると考えられる。

以前より脳腫瘍では xCT が酸化ストレス抵抗性や浸潤能など、様々な悪性形質の獲得に重要であることが報告されている。しかし、xCT の発現制御機構やどのような脳腫瘍細胞が実際に機能的に xCT に依存するかは不明である。

2. 研究の目的

本研究は、xCT の制御機構を明らかにすることで、脳腫瘍の酸化ストレス回避機構を解明し、治療標的となる細胞集団のマーカーを同定した上で、阻害剤を用いた新規治療法の立案を目指す。

3. 研究の方法

脳腫瘍の幹細胞マーカー候補として報告されている膜蛋白、脳腫瘍で遺伝子増幅のある膜蛋白、xCT が浸潤にも関与する過去の報告より脳腫瘍の浸潤に重要と報告される蛋白など様々な膜蛋白の発現パターンをフローサイトメトリーでスクリーニングし、xCT と同様の発現パターンを示す蛋白を明らかにする。その蛋白と xCT の発現に実際に関連があるか、分子生物学的研究手法を用いて解析する。また、ヒト脳腫瘍検体において、実際にこれらの発現に関連があるか検討する。最終的に、実際にその蛋白を高発現する脳腫瘍細胞に対して xCT を標的とした治療が有効か、in vitro、in vivo 実験で検討する。

4. 研究成果

(1) EGFR は脳腫瘍で xCT の細胞膜発現を上昇させる。

様々なヒト脳腫瘍細胞株を用いて、細胞膜上の xCT の発現解析を行った。T98G は高い xCT 発現レベルを示すことが明らかになり、U87MG や Becker 細胞は低い発現レベルを示すことがわかった。次に T98G(xCTHigh)や

U87MG, Becker(xCTlow)の xCT 発現パターンと同様の発現プロファイルを示す蛋白を探すために、悪性脳腫瘍において高発現していると報告されている様々な蛋白の解析をフローサイトメトリーで行った。これらの蛋白の中で EGFR の発現が同じ挙動を示すことが明らかになった。実際に、脳腫瘍における EGFR と xCT との関係性をさらに明らかにするために RNA 干渉法を用いて、T98G 細胞やプライマリーのヒト脳腫瘍細胞である MGG18 や GB2 細胞で EGFR をノックダウンした。EGFR のノックダウンは細胞膜上の xCT の発現を低下させた。

(2) ヒト脳腫瘍において EGFR と xCT の発現は相関する

脳腫瘍臨床検体において EGFR の発現が xCT と相関するかを調べた。140 検体の免疫染色の結果、xCT の発現レベルは、EGFR 高発現検体において、EGFR 低発現検体よりも高いことが明らかになった。

(3) EGFR は細胞内ドメインを介し xCT と結合し、細胞膜の xCT 発現を上昇させる

EGFR のノックダウンが xCT 蛋白の安定性へ与える影響を解析した。蛋白合成阻害剤であるシクロヘキシミドを添加すると、EGFR の発現をノックダウンした細胞ではコントロール細胞に比べて xCT の蛋白レベルが早く減少することが明らかとなった。これらの結果は、脳腫瘍において EGFR は xCT 蛋白の安定性を増加させ、xCT の細胞膜上の発現を上昇させることが明らかになった。次に EGFR 発現脳腫瘍細胞において EGFR が xCT と結合するか調べた。免疫沈降実験において EGFR は実際に xCT と T98G 細胞で結合していた。EGFR の xCT との結合部位を解析するために、様々な EGFR の欠損変異体を発現している HEK293T 細胞で免疫沈降実験を行った。野生型 EGFR、EGFRVIII、細胞外ドメイン欠損体は、xCT と結合していた。しかし細胞内ドメイン欠損体を持つものは結合しなかった。これらより EGFR の細胞内ドメインが xCT との結合に重要であることが示された。この結果と一致するように、細胞外ドメイン欠損体を強制発現させることによって、EGFR をノックダウンした T98G 細胞の xCT 発現を促進させたのに対し、細胞内ドメイン欠損体の強制発現では促進させなかった。これらの結果は EGFR の細胞内ドメインが xCT との結合に重要であり、xCT の細胞膜発現を上昇させることが示唆された。

(4) 細胞膜の xCT はレドックス状態を制御し脳腫瘍の生存を促進する

xCT の細胞膜発現はシスチンの取込を上昇させるので、次に私達は EGFR の発現がシスチンの取込を亢進するかを、EGFR を高発現させた U87MG 細胞(U87MG-EGFR)を用いて調べた。U87MG-EGFR 細胞の xCT の細胞膜発現は親株に比べて上昇した。L-シスチンの

取込と細胞内のシステインの量は、U87MG-EGFR 細胞で U87MG 細胞と比較して有意に上昇していた。このことは EGFR の強制発現はシステインの取込を促進し、細胞内のシステインの量が、xCT の細胞膜発現があがることによって上昇したことを意味する。システインの利用は還元型グルタチオン合成において律速段階であるために、次に私達はこれらの細胞での還元型グルタチオンやグルタチオン全体量を測定した。還元型グルタチオン、グルタチオン総量(GSH+the disulfide-linked dimer GSSG)は U87MG 細胞に比べ、U87MG-EGFR 細胞で著明に上昇していた。逆に T98G 細胞において EGFR のノックダウンは細胞内の還元型グルタチオンの量を有意に低下させた。そして質量分析イメージングは U87MG-EGFR 細胞によって形成される脳腫瘍が、U87MG 細胞のものよりも有意に高い還元型グルタチオンレベルを示した。このことは EGFR による xCT 発現の細胞膜発現上昇が in vivo において、還元型グルタチオンの増量に繋がることを示した。以上より、脳腫瘍において、EGFR は xCT の細胞膜発現を上昇させ、システインの取込を増加させることにより、還元型グルタチオン合成を促進させることを示した。次に EGFR 高発現細胞において xCT 依存的なシステイン取込の役割をさらに調べるために、これらの細胞において xCT が細胞内 ROS レベルを制御するかを調べた。xCT 阻害剤のスルファサラジンの添加は U87MG-EGFR 細胞において細胞内 ROS レベルを上昇させた。この上昇は Trolox や N-aceylcysteine(NAC)などの外因性抗酸化物質によって抑制された。対照的にスルファサラジンは、EGFR/xCT 低発現細胞の細胞内 ROS レベルを上昇させなかった。これらの結果より、xCT 依存的なシステインの取込は、EGFR/xCT 低発現細胞でなく、EGFR/xCT 高発現細胞においてレドックス状態を制御することを示した。次にスルファサラジンによるレドックス状態の破綻が EGFR/xCT 高発現細胞において、効果として細胞傷害性を付与するかを検討した。その結果、スルファサラジンの添加より、細胞の生存が抑制された。以上のように xCT 依存的なシステインの取込はレドックス状態の維持に貢献し、その結果、EGFR/xCT 高発現脳腫瘍細胞の生存を促進することが示された。

(5) system xc(-)の阻害は EGFR 高発現脳腫瘍の増殖を抑制する

EGFR 高発現脳腫瘍細胞に対する xCT の治療標的としての可能性を検討するために、RNA 干渉法による xCT の発現抑制が、U87MG-EGFR 細胞をマウスの脳に同所移植時のマウス生存に与える影響を検討した。xCT の安定的な発現抑制はコントロール U87MG-EGFR 細胞の移植と比べて、マウスの生存を延長した。これらの結果より、xCT は脳腫瘍の悪性形質に関与し、EGFR 高発現脳腫瘍に対して xCT は有望な治療標的となるこ

とが明らかになった。

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 1 件)

1. Tsuchihashi K, Okazaki S, Ohmura M, Ishikawa M, Sampetean O, Onishi N, Wakimoto H, Yoshikawa M, Seishima R, Iwasaki Y, Morikawa T, Abe S, Takao A, Shimizu M, Masuko T, Nagane M, Furnari FB, Akiyama T, Suematsu M, Baba E, Akashi K, Saya H, Nagano O.

The EGF receptor promotes the malignant potential of glioma by regulating amino acid Transport system xc(-).

Cancer Research. 76:2954-2963, 2016

〔学会発表〕(計 2 件)

1. Kenji Tsuchihashi, Shogo Okazaki, Momoko Yoshikawa, Ryo Seishima, Oltea Sampetean, Nobuyuki Onishi, Hiroaki Wakimoto, Frank Furnari, Eishi Baba, Koichi Akashi, Hideyuki Saya, Osamu Nagano

xCT promotes malignant phenotypes in EGFR-expressing glioma

AACR Annual meeting 2017

2. 土橋賢司、岡崎章吾、大村光代、サンペトラオルテア、大西伸幸、益子高、馬場英司、赤司浩一、佐谷秀行、永野修

脳腫瘍に対する酸化ストレス回避機構を標的にした治療法の開発

第 15 回日本臨床腫瘍学会学術集会

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

土橋 賢司 (TSUCHIHASHI, Kenji)

九州大学大学院医学研究院 病態修復内科学

研究者番号:20773675

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし

(4)研究協力者

岡崎 章吾 (OKAZAKI, Shogo)
大村 光代 (OHMURA, Mitsuyo)
石川 美由紀 (ISHIKAWA, Miyuki)
サンペトラ オルテア (SAMPETREAN.
Oltea)
大西 伸幸 (ONISHI, Nobuyuki)
脇本 浩明 (WAKIMOTO, Hiroaki)
吉川 桃子 (YOSHIKAWA, Momoko)
清島 亮 (SEISHIMA, Ryo)
岩崎 良美 (IWASAKI, Yoshimi)
森川 隆之 (MORIKAWA, Takayuki)
阿部 真也 (ABE, Shinya)
高尾 亜弓 (TAKAO, Ayumi)
清水 美里 (SHIMIZU, Misato)
益子 高 (MASUKO, Takashi)
永根 基雄 (NAGANE, Motoo)
Furnari Frank
秋山 徹 (AKIYAMA, Tetsu)
末松 誠 (SUEMATSU, Makoto)
馬場 英司 (BABA, Eishi)
赤司 浩一 (AKASHI, Koichi)
佐谷 秀行 (SAYA, Hideyuki)
永野 修 (NAGANO, Osamu)