

令和 2 年 5 月 22 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03583

研究課題名（和文）xCT阻害剤による小細胞肺癌のフェロトーシス誘導機構の解明とその抗腫瘍効果の検討

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of the induction of ferroptosis by xCT inhibitor and its antitumor effect in small cell lung cancer

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） 13,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、小細胞肺癌のフェロトーシス感受性についての検討を行った。小細胞肺癌で発現低下し、フェロトーシス感受性と相関するマーカーとしてSLC7A1(xCT)、SLC3A2(CD98hc)、MALT1やBIRC3を同定した。xCTについてはヒト肺癌組織検体を用いた免疫染色を行い、xCT発現が低いことを確認した。さらに、小細胞肺癌の動物モデルであるRPMマウスより腫瘍オルガノイドを作製し、フェロトーシス誘導剤の評価をすることができるマウスモデルを作製した。また、xCT阻害剤の非臨床試験を行い、SCLCにおいてxCT阻害によるフェロトーシス誘導治療が有効であるという非臨床POCが得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

進展型SCLCの標準治療は10年以上変化がなく、その治療開発はアンメットメディカルニーズが非常に高い領域であった。しかしながら本研究により、小細胞肺癌に対してxCT阻害剤を使用したフェロトーシス誘導療法が有効であることを明らかにし、xCT阻害剤を使用するためのPOCを取得することができた。今後、xCT阻害剤を用いた臨床試験へと移行するための基盤を整備することができるようになった。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the susceptibility of small cell lung cancer (SCLC) to ferroptosis. We identified SLC7A1 (xCT), SLC3A2 (CD98hc), MALT1 and BIRC3 as the markers that were downregulated in SCLC and correlated with susceptibility to ferroptosis. Furthermore, we performed immunostaining of xCT using a human lung cancer tissue sample and confirmed that xCT expression was low in SCLC. The tumor organoids were prepared from the RPM mouse, an animal model of SCLC, to establish a model to evaluate the impact of ferroptosis-inducing cancer therapy. Finally, we conducted a non-clinical study by using the xCT inhibitor and obtained a POC in which the ferroptosis-inducing therapy is effective treatment for SCLC.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：フェロトーシス 癌 xCT 小細胞肺癌 グルタチオン 活性酸素種

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

小細胞肺癌 (SCLC) は原発性肺癌の 15% を占め、腫瘍の増殖が速く、早期に全身転移しやすい性質を持つことが知られている。臨床病期は限局型と進展型に分けられ、診断時に 70% 程度が進展型に分類される。この進展型 SCLC は標準治療を行った場合でも生存期間中央値が 8-13 ヶ月と予後不良であることが知られている。また、進展型 SCLC の初回標準治療はプラチナ製剤併用全身化学療法であるが、ほぼ全例で再発、増悪をきたすことが知られているが、非小細胞肺癌と比較して、進展型 SCLC の標準治療は 10 年以上変化がなく、その治療開発はアンメットメディカルニーズが非常に高い領域である。また、SCLC において特徴的な遺伝子変化 (欠失・変異) を反映した動物モデルを用いた薬効評価系も確立されていない。そのため申請者は、肺癌のなかでも特に進展型 SCLC における xCT 阻害剤を用いた新規治療法の確立を目標として本研究計画を立案した。

2. 研究の目的

シスチントランスポーター-xCT の阻害は、癌細胞の治療抵抗性を減弱し、癌治療への感受性を高めるとともに、一部のアポトーシス抵抗性癌細胞においてフェロトーシス (鉄依存的細胞死) と呼ばれる非アポトーシス経路の細胞死を誘導する。しかしながら、フェロト-シスが誘導されやすい癌細胞に共通する特徴やマーカーについては分かっていない。近年、申請者は癌細胞パネルを用いた探索を行い、小細胞肺癌 (SCLC) 細胞が、フェロトーシスが生じやすい性質を有していることを見出した。そこで、本研究では SCLC 特異的な遺伝子の変化や細胞内シグナルの活性化がフェロトーシス誘導に影響するかを明らかにし、感受性予測のためのバイオマーカーを取得する。さらに、SCLC 腫瘍オルガノイドとマウスモデルを作成し、生体レベルでも SCLC 特異的な遺伝子変化がフェロトーシス誘導を促進することを明らかにし、xCT 阻害剤を用いた肺癌治療のための基盤を整備する。

3. 研究の方法

本研究では、xCT 阻害剤に感受性の異なる小細胞肺癌および非小細胞肺癌細胞株を用いて、フェロトーシス誘導に関わる分子メカニズムの解明、フェロトーシス感受性決定因子の同定ならびにマウスモデルを用いた生体レベルでの解析を行う。具体的には、SCLC の遺伝的背景とフェロトーシス感受性の関連についての検討、xCT 阻害剤耐性 SCLC の作製と耐性化に関わる遺伝子発現解析を細胞レベルの解析で行うとともに、フェロトーシス感受性に関するバイオマーカーを取得する。さらに、SCLC に高頻度で見られる遺伝子変化を反映したモデルマウスを作製し、どの遺伝子がフェロトーシス感受性に関わっているのかを検証し、xCT 阻害剤による治療実験と非臨床 POC の取得を目指す。

4. 研究成果

SCLC の遺伝的背景とフェロトーシス感受性の関連についての検討

xCT 阻害剤への感受性が異なる小細胞肺癌 SBC3 細胞と非小細胞肺癌 PC9 細胞におけるマイクロアレイ解析を行った。その結果、フェロトーシス感受性の SBC3 細胞は、低感受性の PC9 細胞と比較して、上皮間葉転換 (EMT) 関連遺伝子や ALDH1 の発現が亢進していた。このことから、フェロトーシス感受性の小細胞癌細胞は、未分化ながん幹細胞様の性質を持つことが示唆された。さらに、フェロトーシス抵抗性に関わる遺伝子群の発現を調査した結果、従来知られていた SLC7A1(xCT)や SLC3A2 (CD98hc) の発現低下のほか、新たに MALT1 や BIRC3 とい

った遺伝子の発現が SCLC で低下していることが xCT 阻害剤に対する感受性と強く相関することを見出した。また、xCT についてヒト肺癌組織検体を用いて免疫染色を行い、組織マイクロアレイにて発現解析を行った。その結果、NSCLC では腫瘍組織の平均 70% で xCT 陽性であるのに対し、SCLC 組織の陽性率は 40% 程度であった (図 1 A)。このようにヒト肺癌検体においても SCLC は非小細胞肺癌 NSCLC と比較して非常に xCT が低発現であることが判明した。また、全生存期間 (OS) についても患者データを解析したところ、xCT 発現によって予後に差があることから xCT 阻害治療の有効性が示唆された (図 1 B)。

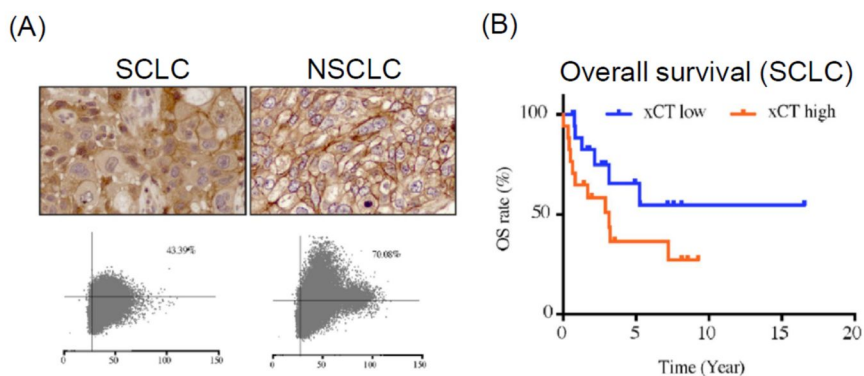


図 1 (A) SCLC と NSCLC の xCT 発現 (B) SCLC 患者の xCT 発現と全生存期間の関連

xCT 阻害剤耐性 SCLC の作製と耐性化に関わる遺伝子発現解析
 スルファサラジン高感受性株である SBC5 細胞から作成したスルファサラジン耐性株 SBC5-SSZR を用いて RNA-seq 解析を実施し、耐性化によって明らかに発現が上昇する遺伝子群として KPNB1, NEDD8, RUVBL2, CHRNA3, MCM5, ARF1, TRPM8, GADD45A, IRF4, DNAJB1 を同定した。

SCLC に高頻度で見られる遺伝子変化を反映したモデルマウスの作製
 CGRP 遺伝子の下流で Trp53 および Rb1 遺伝子がノックアウトされ、同時に癌遺伝子 Myc が発現可能な SCLC モデル RPM マウスから腫瘍オルガノイドを作製した (図 2)。さらに、同系マウスに皮下移植を行い、ゼノグラフトモデルを作製した。作成した腫瘍において SCLC マーカーである ASCL1, NEUROD, Synaptophysin について免疫染色を行い、これらが陽性であることを確認した (図 3)。

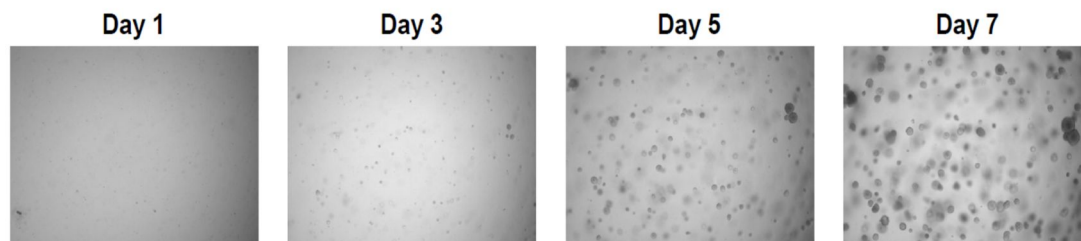


図 2 RPM マウス腫瘍から作成した腫瘍オルガノイドの培養

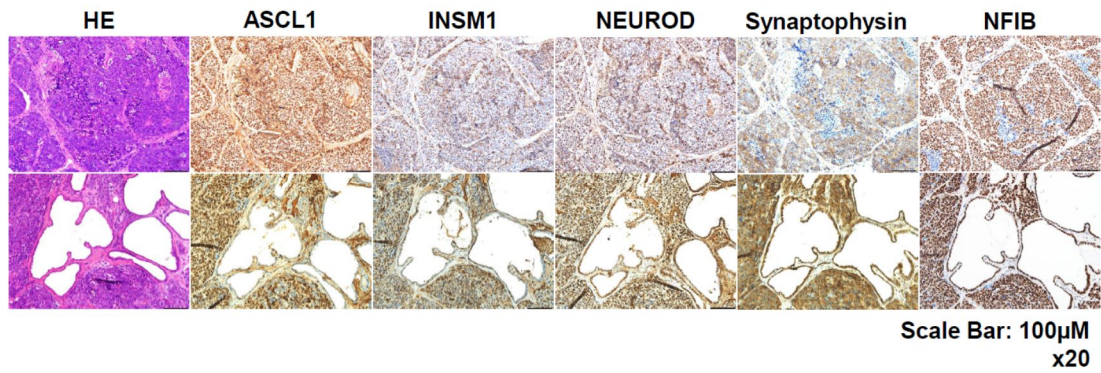


図3 作成した SCLC マウスモデルにおける SCLC マーカーの発現

xCT 阻害剤による治療実験と非臨床 POC の取得を目指す。

ゼノグラフトモデルに対して xCT 阻害剤スルファサラジン(SSZ)の効果を検討した。その結果、細胞株で見られたような高い抗腫瘍効果が確認できた(図4)。このことから、SCLC において xCT 阻害によるフェロトース誘導治療が有効であるという非臨床 POC が得られた。

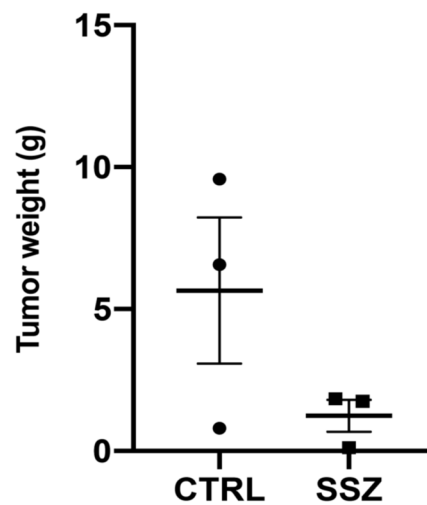


図4 SCLC マウスモデルを用いた xCT 阻害剤スルファサラジン(SSZ)の治療実験

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 4件）

1. 著者名 Suina K, Tsuchihashi K, Yamasaki J, Kamenori S, Shintani S, Hirata Y, Okazaki S, Sampetean O, Baba E, Akashi K, Mitsuishi Y, Takahashi F, Takahashi K, Saya H, Nagano O	4. 巻 109
2. 論文標題 Epidermal growth factor receptor promotes glioma progression by regulating xCT and GluN2B-containing N-methyl-d-aspartate-sensitive glutamate receptor signaling.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3874-3882
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1111/cas.13826.	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 Okazaki S, Shintani S, Hirata Y, Suina K, Semba T, Yamasaki J, Umene K, Ishikawa M, Saya H, Nagano O	4. 巻 9
2. 論文標題 Synthetic lethality of the ALDH3A1 inhibitor dyclonine and xCT inhibitors in glutathione deficiency-resistant cancer cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 33832-33843
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi.org/10.18632/oncotarget.26112	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 Saito Y, Onishi N, Takami H, Seishima R, Inoue H, Hirata Y, Kameyama K, Tsuchihashi K, Sugihara E, Uchino S, Ito K, Kawakubo H, Takeuchi H, Kitagawa Y, Saya H, Nagano O.	4. 巻 497
2. 論文標題 Development of a functional thyroid model based on an organoid culture system.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 783-789
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1016/j.bbrc.2018.02.154.	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 Otsuki Y, Yamasaki J, Suina K, Okazaki S, Koike N, Saya H, Nagano O.	4. 巻 111
2. 論文標題 Vasodilator oxyfedrine inhibits aldehyde metabolism and thereby sensitizes cancer cells to xCTtargeted therapy.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 127-136
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1111/cas.14224.	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 永野修
2. 発表標題 癌細胞に鉄依存性細胞死を誘導するxCT標的治療とその抵抗性を克服する薬剤の探索
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Osamu Nagano
2. 発表標題 Cancer treatment strategy targeting antioxidant system potentiated by CD44v-xCT in stem-like cancer cells.
3. 学会等名 10th international BioMedical Transporters Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 永野修
2. 発表標題 xCT阻害剤抵抗性を示す癌細胞に対してxCT阻害剤と合成致死を誘導する薬剤の同定
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019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
---------	---------------------------	-----------------------	----