

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07158

研究課題名(和文) がん細胞の浸潤・転移におけるシスチン・グルタミン酸トランスポーターの機能の解明

研究課題名(英文) Role of cystine/glutamate transporter in cancer metastasis.

研究代表者

佐藤 英世 (Sato, Hideyo)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：60235380

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：がん細胞の浸潤や転移におけるシスチン・グルタミン酸トランスポーター(xCT)の機能を明らかにする目的で、高転移能を持つマウスメラノーマのxCTをCRISPR/Cas9システムを用いてノックアウトした細胞を作製し、複数のマウス転移モデルを用いて転移に及ぼす影響を調べた。その結果、xCTノックアウト細胞は、野生型細胞に比べて、転移能が有意に低下することが示された。それに伴って、xCTノックアウト細胞を移植したマウスの生存率は、野生型細胞を移植したマウスに比べて明らかに高まることが示された。これらことから、xCTは、がんの転移に重要な役割を持つことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、シスチン・グルタミン酸トランスポーターは、がん細胞の浸潤や転移に重要な役割を担うことが示された。このことは、シスチン・グルタミン酸トランスポーターが、がんの治療において、新しいターゲット分子なることを示している。このトランスポーターの阻害剤の開発が進めば、がんの転移を抑制する新規のがん治療法となることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：In order to clarify the function of cystine/glutamate transporter (xCT) in cancer cell invasion and metastasis, xCT of mouse melanoma with high metastatic potential was knocked out using CRISPR/Cas9 system. The effect of xCT deficiency on the metastasis was investigated using several metastasis models. As a result, xCT knockout cells were shown to have a significantly reduced metastatic potential as compared to wild type cells. Accordingly, it was shown that the survival rate of the mice transplanted with xCT knockout cells was significantly higher than that of the mice transplanted with wild-type cells. These findings indicate that xCT has an important role in cancer metastasis.

研究分野：生化学

キーワード：シスチン・グルタミン酸トランスポーター グルタチオン シスチン メラノーマ 転移 グルタミン酸 xCT

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アミノ酸輸送系の一つであるシスチン・グルタミン酸トランスポーター(xCT)は、多くのがん細胞において強く発現しており、がんの増殖や浸潤、転移能、抗がん剤耐性、また、がん幹細胞の特性維持などに深く関与することが報告されるようになってきた。このことは、xCT の機能を抑制することが、がんの増殖・浸潤・転移などを抑えるうえで重要であることを強く示唆している。しかし、xCT が有する多様な機能の何かががんの特性発現に関わるか、その分子メカニズムについては不明な点を多い。

2. 研究の目的

本研究では、xCT の機能のうち、特に細胞外環境形成に関わる機能に注目して、がんの浸潤や転移等の病態成立における xCT の役割を解明することを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

まず、高頻度で特定臓器に転移することが知られているマウス B16F10 メラノーマの xCT 遺伝子を特異的にノックアウトした xCT 欠損細胞、さらにこの xCT 欠損細胞に xCT を強制発現するベクターを導入した細胞を樹立した。これらの細胞と親株である B16F10 細胞をマウス(C57BL/6J)の尾静脈から移植し、一定期間(4-8 週)後、肺への転移の程度を親株のがん細胞を投与した場合と比較検討した。次に自然転移モデルとしてこれらの細胞を皮下移植で xCT 欠損の影響を検討した。移植部位での腫瘍の体積変化を経時的に観察するとともに、他の組織への転移の有無も調べた。さらに、足蹠にこれらの細胞を移植し、25 日目に原発巣を摘出して一定期間後、膝下リンパ節や腹腔内の各リンパ節ならびに肺、肝などの遠隔転移の程度を比較検討した。

4. 研究成果

いずれの転移モデル系でも、xCT 欠損細胞を移植したマウスでは、野生型細胞を移植したマウスと比べて、明らかに転移が減少しており、それを反映して生存率が有意に高まっていた。in vitro の実験系として、スクラッチアッセイにより、これらの細胞の遊走能を検討した。また、マトリゲルを用いて、浸潤能についても検討した。一連の実験系にグルタチオン合成阻害剤や xCT の誘導剤で処理した細胞について、遊走能や浸潤能がどのように変化するか検討した。その結果、いずれの場合も CT 欠損細胞において有意に低下することが示された。また、メラノーマの浸潤能、遊走能、スフェロイド形成能、血管内皮細胞との接着能は、xCT を介して維持される細胞内グルタチオンが重要であることが示された。しかし、細胞内グルタチオンの動態だけではこれらの細胞の浸潤能や遊走能は、十分説明することができず、xCT が新たに誘導されることが重要である可能性が示唆された。さらに、xCT の特異的阻害剤であるエラスチンの阻害特性を他の xCT 阻害剤と比較検討し、エラスチンが他の xCT 阻害剤とは異なり、不可逆的阻害をすることを示した。これらの研究に加え、新たに入手したヒト肉腫由来がん細胞株 HT1080 細胞を用いて、CRISPR/Cas9 システムにより、xCT 遺伝子欠損細胞を作製した。この xCT 遺伝子欠損細胞と親株細胞のシスチン取り込み活性、細胞内グルタチオンの動態、xCT タンパク質の発現を調べた。また、これらの細胞の浸潤能、遊走能、スフェロイド形成能を調べ、いずれも xCT 遺伝子欠損 HT1080 細胞で低下していることを明らかにした。この xCT 欠損株に xCT 遺伝子を再導入した addback 細胞を用いて、in vitro の実験系でさらに解析を行った。xCT の特異的阻害剤であるエラスチンやスルファサラジン、グルタチオン合成阻害剤である BSO、そして、xCT を

介さずに細胞内にシステインを供給できる 2-メルカプトエタノールを共存させた時、Boyden Chamber Assay、スクラッチアッセイ、スフェロイド形成解析のため ATP 測定を行った。その結果、浸潤能、遊走能、スフェロイド形成能は、xCT を介して維持されるグルタチオンが重要であることが示された。これらの結果は、マウスメラノーマ細胞の *in vitro* の実験系で得られた結果と概ね一致することから、ヒトのがん細胞も、個体レベルでの転移に xCT が重要な役割を担うことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 9件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Sato Mami, Kusumi Ryosuke, Hamashima Shinji, Kobayashi Sho, Sasaki Satoru, Komiyama Yuhei, Izumikawa Takuji, Conrad Marcus, Bannai Shiro, Sato Hideyo	4. 巻 8
2. 論文標題 The ferroptosis inducer erastin irreversibly inhibits system xc- and synergizes with cisplatin to increase cisplatin's cytotoxicity in cancer cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-19213-4	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 該当する
1. 著者名 Ottestad-Hansen Sigrid, Hu Qiu Xiang, Follin-Arbelet Virgine Veronique, Bentea Eduard, Sato Hideyo, Massie Ann, Zhou Yun, Danbolt Niels Christian	4. 巻 66
2. 論文標題 The cystine-glutamate exchanger (xCT, Slc7a11) is expressed in significant concentrations in a subpopulation of astrocytes in the mouse brain	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Glia	6. 最初と最後の頁 951 ~ 970
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/glia.23294	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 該当する
1. 著者名 Kobayashi Sho, Hamashima Shinji, Homma Takujiro, Sato Mami, Kusumi Ryosuke, Bannai Shiro, Fujii Junichi, Sato Hideyo	4. 巻 78
2. 論文標題 Cystine/glutamate transporter, system xc -, is involved in nitric oxide production in mouse peritoneal macrophages	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nitric Oxide	6. 最初と最後の頁 32 ~ 40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.niox.2018.05.005	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 Kikuchi Kenta, Iida Mayumi, Ikeda Naoki, Moriyama Shigetaka, Hamada Michito, Takahashi Satoru, Kitamura Hiroshi, Watanabe Takashi, Hasegawa Yoshinori, Hase Koji, Fukuhara Takeshi, Sato Hideyo, Kobayashi Eri H., Suzuki Takafumi, Yamamoto Masayuki, Tanaka Masato, Asano Kenichi	4. 巻 201
2. 論文標題 Macrophages Switch Their Phenotype by Regulating Maf Expression during Different Phases of Inflammation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 635 ~ 651
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.1800040	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 Albertini Giulia, Deneyer Lauren, Ottestad-Hansen Sigrid, Zhou Yun, Ates Gamze, Walrave Laura, Demuyser Thomas, Bentea Eduard, Sato Hideyo, De Bundel Dimitri, Danbolt Niels C., Massie Ann, Smolders Ilse	4. 巻 66
2. 論文標題 Genetic deletion of xCT attenuates peripheral and central inflammation and mitigates LPS-induced sickness and depressive-like behavior in mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Glia	6. 最初と最後の頁 1845 ~ 1861
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/glia.23343	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 該当する

1. 著者名 Sato Mami, Kusumi Ryosuke, Hamashima Shinji, Kobayashi Sho, Sasaki Satoru, Komiyama Yuhei, Izumikawa Takuji, Conrad Marcus, Bannai Shiro, Sato Hideyo	4. 巻 8
2. 論文標題 The ferroptosis inducer erastin irreversibly inhibits system xc- and synergizes with cisplatin to increase cisplatin's cytotoxicity in cancer cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 968
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-19213-4	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 該当する

1. 著者名 Lee Jaeyong, Kang Eun Sil, Kobayashi Sho, Homma Takujiro, Sato Hideyo, Seo Han Geuk, Fujii Junichi	4. 巻 361
2. 論文標題 The viability of primary hepatocytes is maintained under a low cysteine-glutathione redox state with a marked elevation in ophthalmic acid production	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 178 ~ 191
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yexcr.2017.10.017	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 該当する

1. 著者名 Hamashima Shinji, Homma Takujiro, Kobayashi Sho, Ishii Naoki, Kurahashi Toshihiro, Watanabe Ren, Kimura Naoko, Sato Hideyo, Fujii Junichi	4. 巻 51
2. 論文標題 Decreased reproductive performance in xCT-knockout male mice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Free Radical Research	6. 最初と最後の頁 851 ~ 860
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/10715762.2017.1388504	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 Dang Duy-Khanh, Shin Eun-Joo, Tran Hai-Quyen, Kim Dae-Joong, Jeong Ji Hoon, Jang Choon-Gon, Nah Seung-Yeol, Sato Hideyo, Nabeshima Toshitaka, Yoneda Yukio, Kim Hyoung-Chun	4. 巻 108
2. 論文標題 The role of system Xc- in methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity in mice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Neurochemistry International	6. 最初と最後の頁 254 ~ 265
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuint.2017.04.013	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 該当する

1. 著者名 Bentea Eduard, Van Liefveringe Joeri, Verbruggen Lise, Martens Katleen, Kobayashi Sho, Deneyer Lauren, Demuyser Thomas, Albertini Giulia, Maes Katrien, Sato Hideyo, Smolders Ilse, Lewerenz Jan, Massie Ann	4. 巻 290
2. 論文標題 Zonisamide attenuates lactacystin-induced parkinsonism in mice without affecting system x c ?	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Experimental Neurology	6. 最初と最後の頁 15 ~ 28
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.expneurol.2016.12.009	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 該当する

1. 著者名 Kang Eun Sil, Lee Jaeyong, Homma Takujiro, Kurahashi Toshihiro, Kobayashi Sho, Nabeshima Atsunori, Yamada Sohsuke, Seo Han Geuk, Miyata Satoshi, Sato Hideyo, Fujii Junichi	4. 巻 51
2. 論文標題 xCT deficiency aggravates acetaminophen-induced hepatotoxicity under inhibition of the transsulfuration pathway	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Free Radical Research	6. 最初と最後の頁 80 ~ 90
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/10715762.2017.1282157	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 該当する

1. 著者名 Merckx Ellen, Albertini Giulia, Paterka Magdalena, Jensen Cathy, Albrecht Philipp, Dietrich Michael, Van Liefveringe Joeri, Bentea Eduard, Verbruggen Lise, Demuyser Thomas, Deneyer Lauren, Lewerenz Jan, van Loo Geert, De Keyser Jacques, Sato Hideyo, Maher Pamela, Methner Axel, Massie Ann	4. 巻 14
2. 論文標題 Absence of system xc- on immune cells invading the central nervous system alleviates experimental autoimmune encephalitis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Neuroinflammation	6. 最初と最後の頁 9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12974-016-0787-0	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 該当する

1. 著者名 Loewen Jaycie L., Albertini Giulia, Dahle E. Jill, Sato Hideyo, Smolders Ilse J., Massie Ann, Wilcox Karen S.	4. 巻 318
2. 論文標題 Genetic and pharmacological manipulation of glial glutamate transporters does not alter infection-induced seizure activity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Experimental Neurology	6. 最初と最後の頁 50 ~ 60
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.expneurol.2019.04.010	査読の有無 無
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 Kitagawa Yoshinori, Nakaso Kazuhiro, Horikoshi Yosuke, Morimoto Masaki, Omotani Takuma, Otsuki Akihiro, Inagaki Yoshimi, Sato Hideyo, Matsura Tatsuya	4. 巻 9
2. 論文標題 System xc ⁻ in microglia is a novel therapeutic target for post-septic neurological and psychiatric illness	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1 ~ 13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-44006-8	査読の有無 無
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 Leclercq Karine, Liefferinge Joeri Van, Albertini Giulia, Neveux Michel, Dardenne Sylvia, Mairat Coello Georges, Vandenplas Catherine, Deprez Tania, Chong Seon Ah, Foerch Patrik, Bentea Eduard, Sato Hideyo, Maher Pamela, Massie Ann, Smolders Ilse, Kaminski Rafal M.	4. 巻 60
2. 論文標題 Anticonvulsant and antiepileptogenic effects of system xc ⁻ inactivation in chronic epilepsy models	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Epilepsia	6. 最初と最後の頁 1412 ~ 1423
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/epi.16055	査読の有無 無
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8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 佐藤茉美、鈴木亜美、久住亮介、小沼邦重、尾崎充彦、坂内四郎、岡田 太、Marcus Conrad、佐藤英世
2. 発表標題 xCT遺伝子欠損マウスメラノーマ細胞の細胞死解析と腫瘍増殖能の評価
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林翔、本間拓二郎、奥村宜明、佐藤英世、高尾敏文、藤井順逸
2. 発表標題 xCT遺伝子欠損マクロファージの生存を可能にする分子機構の解明
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 風間絢香、大谷真志、茂呂和世、佐藤英世、渡辺直子
2. 発表標題 マウス敗血症モデルにおけるシスチントランスポーターの影響
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sato, M., Onuma, K., Silva, M.S.C.D., Kusumi, R., Osaki, M., Feederle, R., Bannai, S., Conrad, M., Okada, F., and Sato, H.
2. 発表標題 The cystine/glutamate antiporter is essential for maintaining the highly metastatic potential of B16F10 skin melanoma cells.
3. 学会等名 The 2018 Cold Spring Harbor Asia Conference: IRON, REACTIVE OXYGEN SPECIES & FERROPTOSIS IN LIFE, DEATH & DISEASE. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤茉美、鈴木亜美、小沼邦重、尾崎充彦、坂内四郎、岡田太、佐藤英世
2. 発表標題 シスチン/グルタミン酸輸送体は細胞内グルタチオンの維持を通じてがん細胞の遊走・浸潤・転移に寄与する
3. 学会等名 ConBio2017生命科学系合同年次大会 (第90回日本生化学会、第40回日本分子生物学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 久住亮介、鈴木悠、小沼邦重、尾崎充彦、坂内四郎、岡田太、佐藤英世
2. 発表標題 ヒト由来骨肉腫細胞の浸潤能とグルタチオン合成系との関連性
3. 学会等名 ConBio2017生命科学系合同年次大会（第90回日本生化学会、第40回日本分子生物学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 本間拓二郎、浜島真司、小林翔、倉橋敏裕、渡辺連、木村直子、佐藤英世、藤井順逸
2. 発表標題 シスチントランスポーター・xCT欠損マウスは雄性生殖能が低下する
3. 学会等名 ConBio2017生命科学系合同年次大会（第90回日本生化学会、第40回日本分子生物学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 57.土門美緒、長谷川駿、佐藤茉美、坂内四郎、Regena Feederle、Marcus Conrad、佐藤英世
2. 発表標題 ヒト繊維肉腫由来細胞の浸潤能におけるシスチン・グルタミン酸輸送体の役割
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
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
研究分担者	岡田 太 (Okada Futoshi) (00250423)	鳥取大学・医学部・教授 (15101)	