

令和 2 年 5 月 8 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16827

研究課題名(和文) 子宮体部漿液性癌におけるレドックス制御機構と薬剤抵抗性の関連

研究課題名(英文) The relationship between redox balance and drug resistance in uterine serous carcinoma

研究代表者

小幡 美由紀 (Obata, Miyuki)

山形大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：70613066

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：シスチントランスポーター(xCT)阻害剤であるスルファサラジン(SAS)がパクリタキセル感受性および耐性子宮体部漿液性癌(USC)細胞株における殺細胞効果に及ぼす影響とそのメカニズムを検討した。SASはパクリタキセル感受性細胞株よりも耐性細胞株でより細胞増殖抑制効果が高かったが、両細胞株でパクリタキセル感受性の増強効果は認めなかった。パクリタキセル耐性細胞株においてSASによって誘導される細胞死は、アポトーシスではなくフェロトーシスであることが明らかになった。ROSの蓄積とJNKの活性化による合成致死が、xCT阻害剤SASによるフェロトーシス誘導機構に重要である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

子宮体部漿液性癌は再発率が高く、再発時は化学療法抵抗性となるため予後不良であるが、パクリタキセル耐性細胞株ではxCTを阻害することでフェロトーシスが誘導され強い殺細胞効果を示したことからxCT阻害剤が再発子宮体部漿液性癌患者に対する新たな治療法の一つとなる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effect of the xCT inhibitor sulfasalazine (SAS) on cytotoxicity in paclitaxel-sensitive and -resistant USC cell lines. We also examined the mechanism by which SAS induces ferroptotic cell death in paclitaxel-resistant cells. The results of proliferation assay showed that SAS promoted growth inhibition more effectively in paclitaxel-resistant than -sensitive cells, but did not enhance paclitaxel cytotoxicity in both USC cell lines. Immunoblotting analysis and the experiments conducted using ferroptosis inhibitors revealed SAS-mediated cell death was induced through ferroptosis and not apoptosis; in paclitaxel-resistant cells. The synthetic lethal interaction between ROS accumulation and Ras effector JNK activation might be critical for enhancing the sensitivity to ferroptotic cell death mediated by xCT inhibitor SAS.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：子宮体部漿液性癌 スルファサラジン レドックス機構 フェロトーシス JNK 合成致死

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

子宮体部漿液性腺癌(uterine serous carcinoma: USC)は、中期症例でも再発率が高く、遠隔転移をきたしやすく予後不良である(Machdavi A, Int J Gynecol Cancer 2011)。USC は化学療法としてプラチナ製剤とタキサン製剤の組み合わせ(TC療法)が第一選択となっている。しかしながら、TC療法無効症例やTC療法に対して耐性を獲得した再発例に対する新規治療法はなく、その開発が急務となっている。

近年、癌幹細胞の薬剤抵抗性にレドックス制御(GSHによるROSの還元作用)が関与していることが報告されている(Ishimoto T, Cancer Cell 2011)。レドックス制御機構は癌幹細胞だけではなく、大腸がんにおけるプラチナ抵抗性にも関与していることが報告されている(Ma Mz, Cancer Letters 2015)。潰瘍性大腸炎や関節リウマチの治療薬として臨床的に使用されているスルファサラジン(sulfasalazine; SAS)は、シスチントランスポーター(xCT)阻害作用を持ち、細胞内へのシスチンの取り込みを抑制することでGSHの産生を低下させる。SASはグリオーマ細胞では抗がん薬を併用することで抗がん薬の効果を増強させ(Yerokun T, Anticancer Res 2015)、悪性リンパ腫細胞では増殖を抑制した(Dai L, J Hematol Oncol 2014)。しかしながら、USCにおいてSASが増殖抑制作用と抗がん薬の効果を増強するか、否かを検討した報告はない。SASがUSCにおいて抗がん薬の効果を増強すれば、SASはUSCにおける新規治療薬となり得る可能性がある。

2. 研究の目的

- (1) スルファサラジン(SAS)が子宮体部漿液性細胞株の増殖を抑制するか、また抗がん薬と併用することで薬剤感受性がどのように変化するかを明らかにする。
- (2) シスチントランスポーター(xCT)またはCD44vの発現とSASの効果の関連を明らかにする。
- (3) SASの殺細胞効果のメカニズムを明らかにする。SASの抗腫瘍効果はレドックス制御機構を抑制することであるので、SAS投与することで細胞内のグルタチオン(GSH)が減少し、活性酸素(ROS)の産生量が増加するか、また細胞死はapoptosisによって誘導されるのかを明らかにする。
- (4) 婦人科癌患者とレドックス機構の関連を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) SASが細胞増殖と薬剤感受性に与える影響についての検討: USPC1(paclitaxel感受性株)とPTX1(paclitaxel耐性株)を用いた。両細胞株にSAS単剤またはSASとpaclitaxelを併用投与し、細胞増殖能に対する影響をMTS assay法で検討した。
- (2) シスチントランスポーター(xCT)またはCD44vの発現とSASの効果の関連についての検討: USPC1とPTX1におけるxCTとCD44vの発現をwestern blotting法とRT-PCR法で検討した。
- (3) SASの殺細胞効果に関する検討: USPC1とPTX1にSASを投与し、PI染色法による死細胞カウントで殺細胞効果を検討した。
- (4) SASによるレドックス機構の変化に関する検討: USPC1とPTX1にSASを投与し、GSHとROSの変化を検討した。
- (5) SASの殺細胞効果メカニズムに関する検討: SASの殺細胞効果のメカニズムがapoptosisによるものか、抗PARP抗体によるwestern blotting法で検討した。また、レドックス制御機構によって誘導される細胞死に鉄依存性のフェロトーシス(Dixon SJ, Cell 2012)があることに着目し、PTX1にSAS+apoptosis阻害剤(Z-VAD-FMK)またはフェロトーシス阻害剤(ferrostatin-1)を投与し、細胞増殖に対する影響をMTS assay法で、細胞死に対する影響をPI染色法で検討した。さらに、フェロトーシスはRas活性とROS上昇によるSynthetic lethality(合成致死)による細胞死であると報告されている(Garama DJ et al, Mol Cell Biol 2015)。そのためRas下流のシグナル伝達分子の発現(ERK, AKT, JNK)をwestern blotting法で検討した。
- (6) 婦人科癌患者とレドックス機構の関連についての検討: 倫理委員会の承認後(承認番号H29-359)、2018年1月~2019年12月までに当科で手術を施行した良性疾患(卵巣腫瘍6例、子宮筋腫3例)9例、子宮体癌73例、卵巣癌37例について文書によって患者の同意を得たのちに、採血を行いFREE Carrio Duo®(株式会社ウイスマー)を用いて酸化ストレスをd-ROMsテストで、抗酸化力をBAPテストで検討した。

4. 研究成果

- (1) SASが細胞増殖と薬剤感受性に与える影響について
USPC1(paclitaxel感受性株)とPTX1(paclitaxel耐性株)にSASを投与したところ、USPC1ではSAS 600 μ Mでコントロールと比較して有意に細胞増殖が抑制され、PTX1ではSAS 200 μ Mでコントロールと比較して有意に細胞増殖が抑制された(図1)。USCにおけるSASの細胞増殖抑制作用はUSPC1に比較してPTX1で高かった。さらにSASとpaclitaxelを併用投与したところ、USPC1ではSAS併用によるpaclitaxelの薬剤感受性の増強は認めず、PTX1ではpaclitaxel単剤投与と比較して細胞増殖は抑制されたが、これはSASの

細胞増殖抑制効果が PTX1 では高いため paclitaxel 感受性を増強したとは言えなかった (図 2)。

- (2) シスチントランスポーター(xCT)または CD44v の発現と SAS の効果の関連について
SAS の細胞増殖抑制作用が USPC1 に比較して PTX1 で高かったことから USPC1 と PTX1 において SAS が作用する xCT の発現と xCT を安定化させる CD44v の発現に違いがあるのではないかと考え、それぞれの発現を検討した。xCT の発現は両細胞株で同程度であり、CD44v の発現は USPC1 で発現が増強しており (図 3)、PTX1 で SAS の効果が高いという結果を裏付けるものではなかった。

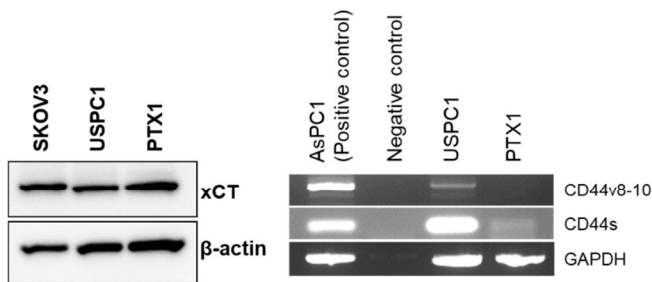


図3. xCTとCD44vの発現

- (3) SAS の殺細胞効果について
SAS の殺細胞効果について USPC1 と PTX1 に SAS 200 μM を投与し PI 染色を行って死細胞数のカウントを行った。USPC1 ではコントロールと比較して死細胞の増加を認めなかったが、PTX1 ではコントロールと比較して有意に死細胞の増加を認めた (図 4)。

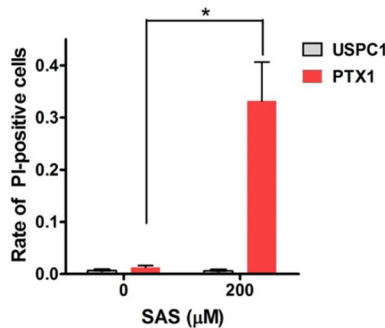


図4. SASによる殺細胞効果

- (4) SAS によるレドックス機構の変化について
USPC1 と PTX1 に SAS 400 μM を投与し細胞内 GSH 濃度を検討したところ、両細胞株で GSH の減少を認めた (図 5)。

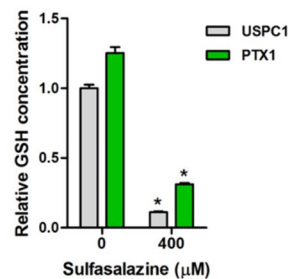


図5. SASによるGSH産生への影響

- しかしながら ROS は PTX1 ではコントロールに比較して産生量が増加したが、USPC1 では ROS の増加を認めなかった (図 6)。

- (5) SAS の殺細胞効果メカニズムについて

これまでの結果から USC 細胞株では paclitaxel 抵抗性である PTX1 で SAS の細胞増殖抑制と殺細胞効果が高く、さらに PTX1 では SAS 投与によって GSH の低下と ROS 産生の増加を認めたことからレドックス機構に関連した殺細胞効果メカニズムがあると推察された。そこで PTX1 における SAS による細胞死誘導メカニズムが apoptosis によるものであるのかを検討するため抗 PARP 抗体を用いて western blotting 法を行ったが、コントロールに比較して SAS 投与による PARP 発現の増強を認めなかった。そのためレドックス制御機構によって誘導され、apoptosis とは異なる細胞死であるフェロトーシスに着目し、PTX1 に SAS+apoptosis 阻害剤(Z-VAD-FMK)またはフェロトーシス阻害剤(ferrostatin-1)を投与し、細胞増殖に対する影響を MTS assay 法で検討した。PTX1 に SAS+ Z-VAD-FMK を投与しても SAS による細胞増殖抑制作用が解除さ

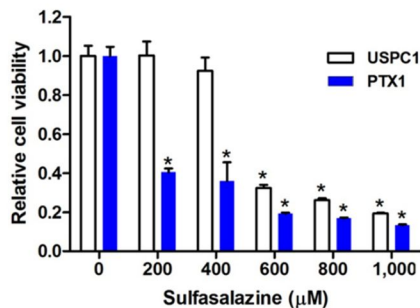


図1. SASによる細胞増殖抑制効果

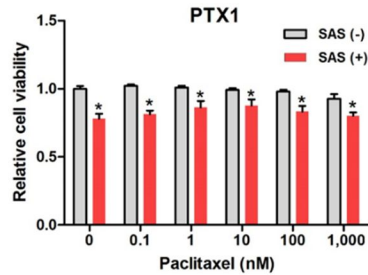
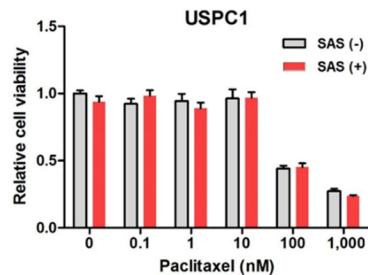


図2. SASによるpaclitaxel感受性への影響

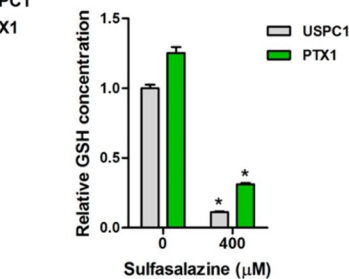


図5. SASによるGSH産生への影響

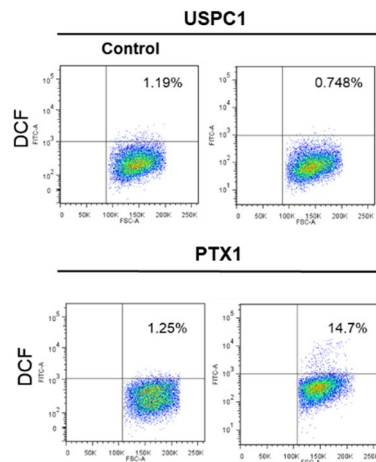


図6. SASによるROS産生への影響

れなかったが、SAS+ferrostatin-1 を投与したところ SAS による細胞増殖抑制作用が解除された(図7)。さらに ferrostatin-1 投与によって SAS による細胞死誘導が解除された(図8)。これらのことから PTX1 における SAS による細胞死誘導メカニズムがフェロトーシスによるものであることが明らかになった。

(6) フェロトーシスと Ras 下流シグナル分子との関連について

これまでの結果から PTX1 では SAS 投与によりフェロトーシスが起これることで細胞増殖抑制と死細胞誘導効果があることが明らかになった。USPC1 で SAS による細胞増殖抑制や細胞死誘導効果が PTX1 と比較して低いのはフェロトーシスが起きていないためと考えられた。フェロトーシスは Ras 活性と ROS 上昇による Synthetic lethality (合成致死)による細胞死であると報告されている。そのため PTX1 と USPC1 では SAS によるフェロトーシス誘導作用に違いがあるのは Ras 下流のシグナル伝達分子の発現(ERK, AKT, JNK)が異なるのではないかと考え、両細胞におけるそれらの分子の発現を western blotting 法で検討した。PTX1 と USPC1 では ERK と AKT の発現に違いはなかったが、phospho-JNK の発現が PTX1 で高かった(図9)。そこで PTX1 に JNK の siRNA を導入し、JNK を knockdown することで SAS の細胞増殖抑制と細胞死誘導作用がどのように変化するか検討した。コントロールとしては PTX1 に control-siRNA を導入した細胞を用いた。コントロールと比較して JNK-siRNA を導入した細胞では SAS による細胞増殖抑制効果と細胞死誘導作用が解除された(図10、11)。これらのことから SAS によるフェロトーシス誘導のためには JNK 経路の活性化と ROS の上昇が必要であることが明らかになった。

(7) 婦人科癌患者とレドックス機構の関連について

これまで実験結果から USC におけるレドックス機構とフェロトーシス誘導機構との関連が明らかになったが、婦人科癌患者とレドックス機構の関連については未だ明らかになっていない。近年、癌の発生に関して「酸化ストレス」が関与していることが知られている^{1,2)}。酸化ストレスとは酸化反応によって引き起こされる生体にとって有害な反応であり、不健康な生活習慣、ストレス、紫外線、加齢などによって引き起こされる^{3,4)}。酸化ストレスにより生活習慣病や老化、発がんの原因になると言われている。実際に肺小細胞癌患者は健康者に比較し血中酸化ストレスが高値であることが報告されているが⁵⁾、婦人科癌患者がどの程度の酸化ストレスにさらされているかはこれまで研究されていない。そこで我々は良性疾患9例、子宮体癌73例、卵巣癌37例について採血を行い FREE Carriro Duo® (株式会社ウイスマー)を用いて酸化ストレスを d-ROMs テストで、抗酸化力を BAP テストで検討した。d-ROMs の平均値は良性疾患 394 U、子宮体癌 357U、卵巣癌 408 U であり、良性疾患と子宮体癌、卵巣癌でそれぞれ有意差は認めなかった。術前 BAP 値は、良性疾患 2633 μmol/l、子宮体癌 2269 μmol/l、卵巣癌 2251 μmol/l U であり、良性疾患と比較して子宮体癌および卵巣癌で有意差に低値であった。これらの結果から婦人科癌患者では健康者と比較して抗酸化力(還元作用)の低下を認めることが明らかになった。この還元作用の低下が抗がん剤による治療効果とどのように関連しているかについては今後さらに検討予定である。

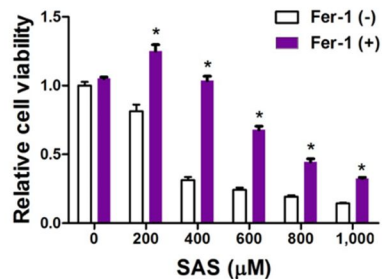


図7. Ferrostatin-1のSASの細胞増殖抑制効果へ影響

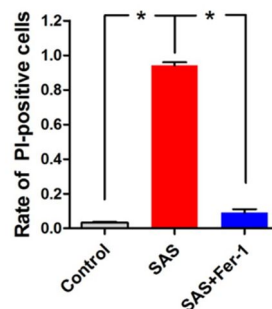


図8. Ferrostatin-1のSASの細胞死誘導効果へ影響

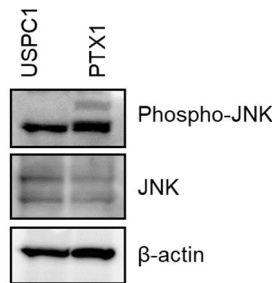


図9. JNK経路の発現

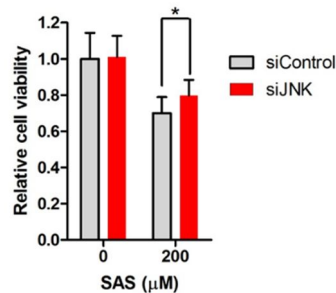


図10. JNK knockdownによるSASの細胞増殖抑制効果への影響

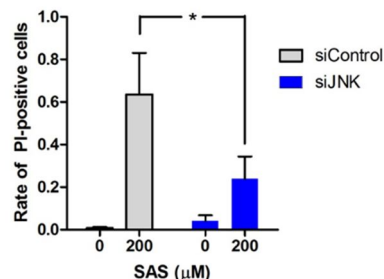


図11. JNK knockdownによるSASの細胞死誘導効果への影響

<引用文献>

- 1) Friedverg EC, et al. Database of mouse strains carrying targeted mutations in genes affecting biological responses to DNA damage version 7. *DNA Repair*, 5, 189-209, 2006.
- 2) Gupta RK, et al. Interactions between oxidative stress, lipid profile and antioxidants in breast cancer: a case control study, *Asian Pac J Cancer Prev*, 13, 6295-8, 2012
- 3) Gloire G, et al. NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochem Pharmacol*, 10, 1493-505, 2006
- 4) Mittler R, et al. ROS signaling: the new wave? *Trends Plant Sci*, 10, 300-9, 2011
- 5) Wakabayashi T, et al. Evaluation of reactive oxygen metabolites in patients with non-small cell lung cancer after chemotherapy. *Multidiscip Respir Med*, 9, doi: 10. 1186/2049-6958-9-44, 2014

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----