

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07063

研究課題名（和文）難治性がんに対するセレノプロテイン遺伝子の発現制御に着目した新規細胞死の誘導

研究課題名（英文）Induction of novel cell death focusing on the regulation of selenoprotein gene expression in refractory cancer

研究代表者

山本 浩平（Yamamoto, Kouhei）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：50451927

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：GPX4のSECIS配列をノックアウトした細胞では、GPX4の発現が消失し、細胞増殖が顕著に減少し、さらに細胞死刺激に対する反応性の増加が認められた。臨床病理学的検討では、SECISBP2はDLBCLの独立した予後予測因子であることが示唆された。in vitroでは、SECISBP2-KO株でGPX4、TXNRD1の蛋白レベルが減少KO株で有意に細胞増殖の抑制が認められた。ドキシルビシン投与下では、SECISBP2-KO株では有意に死細胞率が高いことが示された。SECIS配列およびSECISBP2は新たな抗腫瘍ターゲットとして有用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

難治性の悪性リンパ腫に対して、これまでにない新しい治療戦略を提唱できた点で学術的にも社会的にも大変意義のある研究が遂行されたと考えている。

研究成果の概要（英文）：proliferation was significantly reduced, and responsiveness to cell death stimuli was increased. Clinicopathological studies suggest that SECISBP2 is an independent prognostic predictor of DLBCL. In vitro, the protein levels of GPX4 and TXNRD1 were decreased in the SECISBP2-KO strain, and cell proliferation was significantly suppressed in the KO strain. Under doxorubicin administration, the SECISBP2-KO strain was shown to have a significantly higher mortality. It was suggested that the SECIS sequence and SECISBP2 may be useful as new antitumor targets.

研究分野：病理学、血液腫瘍学

キーワード：がん 酸化ストレス セレノプロテイン SECIS配列 SECISBP2 治療戦略

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

所属研究室では、悪性リンパ腫の病態解析の一環としてびまん大細胞型 B 細胞性リンパ腫 (DLBCL) における GPX4 タンパクの発現検討を行い、GPX4 を過剰発現する群が有意に予後不良であり、さらに細胞内酸化ストレスマーカーである 8-OHdG の発現と逆相関すること、最も予後不良な群であった GPX4 陽性かつ 8-OHdG 陰性群が独立予後不良予測因子の一つであることを明らかにした (Kinowaki et. al. Laboratory Investigation, 2017; 図 1)。2014 年の Yang らの報告によると、種々のがん細胞株を用いたスクリーニング系において DLBCL 由来の細胞株が特にフェロトシス誘導効果が高いとされ、このことはフェロトシス誘導が悪性リンパ腫における有望な治療戦略であることを示唆している。一方で、GPX4 を過剰発現する DLBCL ではフェロトシス誘導に対し抵抗性を有することが予想され、GPX4 の発現調整が DLBCL 細胞における細胞死誘導の鍵を握っていると考えられる。しかし既存の GPX4 阻害剤において臨床認可されたものはなく、有害事象の評価など臨床応用には現状課題が残る。DLBCL 細胞の GPX4 発現をいかにコントロールするか、そして GPX4 遺伝子が有する特殊な遺伝子発現システムをコントロールすることによって、DLBCL の細胞死誘導を効果的に増強できるについて検討を行った。

2. 研究の目的

申請者らの先行研究において、GPX4 を過剰に発現する悪性リンパ腫患者群では既存の治療薬に抵抗性を示すものが多い。そのため、このような患者に対し新たな治療戦略の開発が急務である。本研究は予後不良な悪性リンパ腫の患者を救うため、新しい GPX4 発現制御法による抗腫瘍効果のエビデンスを分子生物学的・実験病理学的に獲得することを目的とする。

3. 研究の方法

CRISPR-Cas9 を用いたヒト細胞における SECIS 配列特異的ノックアウト細胞の作製の解析 HEK293T 細胞および悪性リンパ腫細胞株に対し、GPX4 遺伝子の 3' UTR 領域に存在する SECIS 配列を CRISPR-Cas9 システムを用いてノックアウトし、細胞の増殖や細胞死、GPX4 遺伝子発現の変化などを検討した。

悪性リンパ腫における SECISBP2 および SECISBP2 によって制御される因子の臨床病理学的検討

東京医科歯科大学附属病院病理部で診断された R-CHOP 療法およびそれに準じた治療法を施行された 2004 年～2015 年の初発 DLBCL 検体のうち、中枢神経原発例、同一患者例、薄切不可例や標本中に腫瘍細胞がない例を除く 165 例を用い、SECISBP2 およびその下流の GPX4、TXNRD1 の発現を免疫組織化学的手法を用いて検討した。臨床病理学的な項目としては、年齢、性別、Ann Arbor 分類、血清 LDH 値、Performance status、B 症状、節外病変、骨髄浸潤、Hans 分類の 9 項目を用いて検討した。

SECISBP2 の発現に関する分子生物学的検討

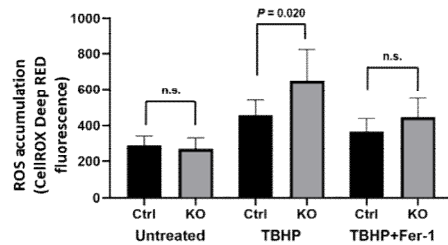
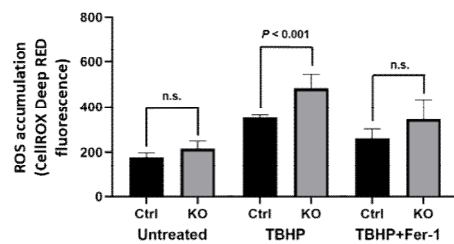
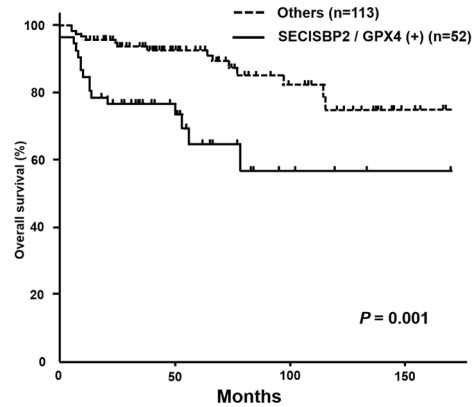
DLBCL cell line である MD901 細胞と Burkitt lymphoma cell line である Raji 細胞を使用し SECISBP2 knockout 株を作成した。これらの細胞を用い、酸化ストレスの蓄積、細胞増殖、アポトーシスに対する反応について検討を行った。

4. 研究成果

GPX4 の SECIS 配列をロックアウトした細胞では、GPX4 の発現が消失し、細胞増殖が顕著に減少し、さらに細胞死刺激に対する反応性の増加が認められた。さらに GPX4 の SECIS 配列をロックアウトした細胞では GPX4 のタンパクレベルの消失とともに mRNA レベルの減少も認められた。

臨床病理学的検討では、SECISBP2 は DLBCL の 45.5%(75/165 例)で相対的に過剰発現し、SECISBP2 陽性群は陰性群と比較して全生存率が低かった ($P = 0.006$)。SECISBP2 は DLBCL の 45.5%(75/165 例)で相対的に過剰発現し、SECISBP2 陽性群は陰性群と比較して全生存率が低かった ($P = 0.006$)。GPX4, TXNRD1 を組み合わせた分析では、SECISBP2 と GPX4, TXNRD1 は正の相関を示し(Fisher の正確検定、いずれも $P < 0.001$)、SECISBP2, GPX4, TXNRD1 の triple-positive 群 (39/165 例)でも全生存率が低く ($P = 0.001$)、多変量解析の結果でも DLBCL の独立した予後予測因子であることを示唆していた (HR 2.693, $P = 0.008$)。

MD901 (DLBCL cell line) および Raji (Burkitt lymphoma cell line) を使用した in vitro の分析では、SECISBP2-KO 株で GPX4, TXNRD1 の蛋白レベルが減少した。酸化ストレス負荷時に、SECISBP2-KO 株は、control 株と比較して有意に ROS 蓄積量が多かった (MD901; $P < 0.001$, Raji; $P = 0.020$)。細胞増殖の検討では、KO 株で有意に細胞増殖の抑制が認められた (MD901; $P = 0.001$, Raji; $P = 0.030$)。ドキソルビシン投与下では、SECISBP2-KO 株では有意に死細胞率が高いことが示され (MD901; $P < 0.001$, Raji; $P = 0.048$)、酸化ストレスを除去した際にドキソルビシンを投与すると、死細胞率の変化がキャンセルされた。これらの結果から、SECIS 配列および SECISBP2 は新たな抗腫瘍ターゲットとして有用である可能性が示唆された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Towako Taguchi, Morito Kurata, Ichihiro Onishi, Yuko Kinowaki, Yunosuke Sato, Sayuri Shiono, Sachiko Ishibashi, Masumi Ikeda, Masahide Yamamoto, Masanobu Kitagawa & Kouhei Yamamoto	4. 巻 101
2. 論文標題 SECISBP2 is a novel prognostic predictor that regulates selenoproteins in diffuse large B-cell lymphoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 218-227
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41374-020-00495-0	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 -

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------