

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H04264

研究課題名(和文) 鉄介在性細胞死フェロトーシス制御による新たながん放射線治療戦略の構築

研究課題名(英文) Development of a novel radiotherapy targeting iron-dependent cell death ferroptosis

研究代表者

安井 博宣 (YASUI, HIRONOBU)

北海道大学・獣医学研究院・准教授

研究者番号：10570228

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では(1)種々の候補薬剤により効果的にフェロトーシスを誘導できる作用点を探索し、(2)得られた放射線増感作用のメカニズムに関する証左を示し、(3)生体レベルで治療効果を裏付ける事が可能なイメージング法を開発することを最終目標とした。この目標に向けて、本研究期間中に、フェロトーシス誘導剤はがん細胞内の抗酸化物質を減少させることで放射線感受性を増感させることを明らかにし、トランスフェリンプローブによるがん細胞内鉄代謝メカニズムに着目した、フェロトーシス誘導がん治療効果を事前に予測可能にする手法を開発することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

フェロトーシス誘導剤と放射線治療法を組み合わせることで、これまでのがん治療法のいずれとも異なる新規メカニズムでより効果的な治療が可能であることを示した。さらに本研究により開発したトランスフェリンプローブによるフェロトーシス感受性イメージング法が確立されれば、この新規細胞死であるフェロトーシス誘導がん治療法を必要としている患者に対して、最適な治療を提供できるようになると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, (1) we searched for a point of action that can effectively induce ferroptosis with various candidate drugs, (2) we show evidence of the obtained mechanism of radiosensitizing action, and (3) therapeutic effect at the biological level. The ultimate goal was to develop an imaging method that could support this. Toward this goal, during this study, ferroptosis inducers were shown to increase radiosensitivity by reducing antioxidants in cancer cells, and intracellular iron metabolism in cancer cells by transferrin probes. Focusing on the mechanism, we succeeded in developing a method that makes it possible to predict the therapeutic effect of ferroptosis-induced cancer in advance.

研究分野：放射線生物学

キーワード：フェロトーシス 放射線 がん治療 イメージング 移植腫瘍

1. 研究開始当初の背景

生体の恒常性維持のために、細胞内の酸化還元(レドックス)バランスを正常範囲に収めておくことは不可欠である。しかし、ある種のストレス環境下で活性酸素種(ROS)が正常レベルを超えて存在する場合、もしくはROSを消去し還元状態に保つ抗酸化作用が減弱している場合、脂質や核酸など生体分子の過酸化が引き起こされる。この状態は酸化ストレスと呼ばれ、動脈硬化、神経変性疾患といった種々の病態に関与している。一方、がん治療においては、放射線をはじめとするROSを増加させ酸化ストレス誘導性の細胞死を生じさせる手法は有望な治療アプローチである。

近年、酸化ストレスに由来するフェロトーシスと呼ばれる新しい細胞死様式が報告された(Dixon 他, Cell. 2012)。フェロトーシスは、主要な抗酸化因子であるグルタチオン量の減少や二価鉄イオンの異常蓄積を起因とし、フェントン反応(鉄を介した脂質ヒドロキシルラジカル産生機構)で増幅されるROSの増大と脂質過酸化を介して起こると考えられており、アポトーシスとは異なる鉄調節性プログラム細胞死である(図1)。がん細胞ではグルタチオン前駆体であるシスチンを取り込む膜輸送体xCTが高発現しており、これによりグルタチオンレベルを高く保つことでフェロトーシス抵抗性および放射線抵抗性を高めている

(Huang 他, Cancer Res. 2005)。従って、グルタチオン依存的な防御機構を解除する、もしくは鉄過剰の状態を作り出すことでフェロトーシスを誘導できれば、がん特異的な治療法に繋がる可能性がある。加えて、局所コントロールが可能な放射線照射と組み合わせることで、既存の治療法よりも腫瘍選択性が高く、副作用の少ないがん治療法が確立できると期待される。しかし、現在、フェロトーシスに関する知見が不足しており、がん細胞特異的にフェロトーシスを誘導する手法や、形態学的・機能的検出法について殆ど明らかにされていない。

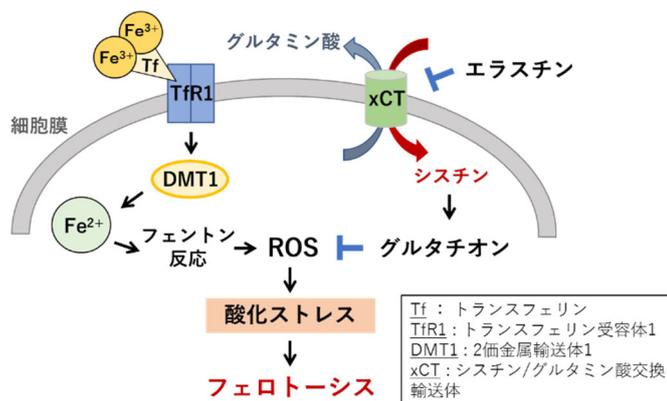


図1. 酸化ストレスとフェロトーシスについて

鉄依存性に産生されたROSにより酸化ストレスを生じて、フェロトーシスが誘導される。代表的なフェロトーシス誘導剤であるエラスチンは、グルタチオン合成を抑制する働きを持つ。

2. 研究の目的

上記、背景に基づき、(1)種々の候補薬剤により効果的にフェロトーシスを誘導できる作用点を探索し、(2)得られた放射線増感作用のメカニズムに関する証左を示し、(3)生体レベルで治療効果を裏付ける事が可能なイメージング法を開発することを最終目標とした。研究期間中に、まず代表的なフェロトーシス誘導剤であるエラスチン Erastin が放射線感受性に影響を及ぼすことで、治療効果を増加させることを予想し、Erastin と放射線治療法を併用した新規がん治療法の開発を目指した。次に、数ある分子標的薬の中から、このフェロトーシス誘導治療を選択する指標を開発するために、画像診断技術に発展可能なフェロトーシス誘導がん治療効果予測法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

[Erastin と放射線治療法を併用した新規がん治療法の開発]

ヒト子宮頸部癌由来の HeLa 細胞およびヒト肺癌由来の NCI-H1975 細胞の2種類のがん細胞株を使用した。Erastin の細胞毒性および放射線との併用による抗腫瘍効果について、コロニー形成法を行った。グルタチオンペルオキシダーゼ(GPX4)タンパク質の発現はウエスタンブロット法により解析した。細胞内グルタチオン量はチオール基を比色定量するエルマン試薬を利用したキットを使用した。動物実験では、ヌードマウスに5百万個のNCI-H1975細胞を移植することで担がんモデルマウスを作製し、Erastin の腹腔内投与は24時間間隔で3日間連続で行った。3日目のErastin投与から24時間後に3GyのX線を1回照射し、腫瘍の成長を約2週間観察した。

[トランスフェリンレセプター(TfR)発現量の非侵襲的な定量化を可能にするトランスフェリンをベースとする放射性プローブの開発]

陽電子核種としてがん診断において非常に高い精度を誇る陽電子断層撮影に使用される⁶⁸Gaを用い、⁶⁸Ge/⁶⁸Ga ジェネレーターにより回収した。鉄が結合していないアポトランスフェリン(aTf)に、イソチオシアネート基を持つ金属キレートであるp-SCN-bn-NOTAを炭酸バッファード

で 30 分間 60°C で反応させ、NOTA-aTf を合成した。そこにジェネレーターより溶出した塩化ガリウムを、合成した NOTA-aTf と HEPES buffer 下で 5 分間室温で反応させることで、⁶⁸Ga を標識した。 ⁶⁸Ga で標識した aTf プローブとトランスフェリンレセプター(TfR)との結合力を高めるために、その標識後のプローブと過剰量のクエン酸鉄を炭酸バッファー下で 30 分間 37°C で反応させ、Tf をホロ化させた。合成したプローブ ⁶⁸Ga-NOTA-hTf の取り込み実験では、2 種類のヒト腎がん細胞株である 786-O と A498 を用いた。細胞を 30mm dish に播種し、16 時間 37°C、5%CO₂ で培養した後、一定量のプローブを加え、さらに 1 時間培養した。その後、dish の培地を回収し、リン酸バッファーで洗い流したものを含めて細胞外分画とした。洗浄した dish に酸性溶液を加え 1 分間インキュベーションすることで細胞膜に結合しているプローブを別分画として回収し、最後に、塩基性溶液を加えることで dish に生着した細胞を溶かし、細胞内分画として回収した。それぞれの分画の放射能を測定することで、細胞内に取り込まれたプローブ量を算出した。

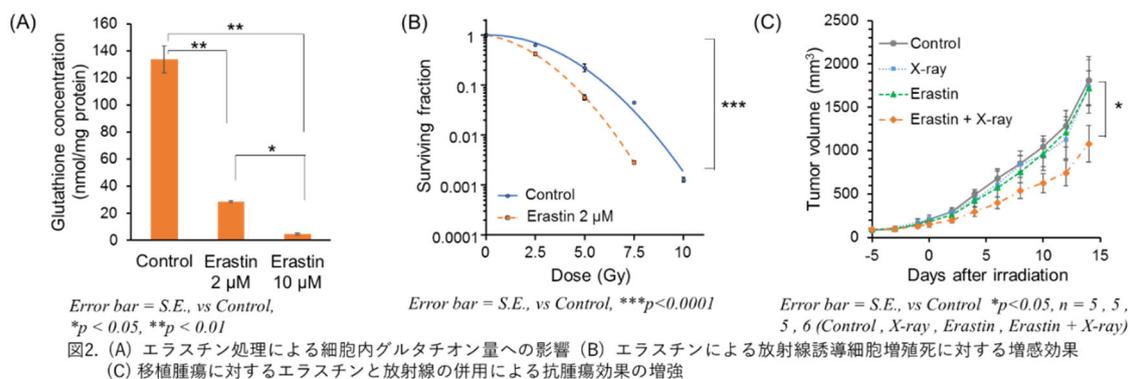
4. 研究成果

[Erastin と放射線治療法を併用した新規がん治療法の開発] (図 2)

コロニー形成試験による Erastin の毒性評価から、HeLa 細胞では IC₅₀ はおよそ 3 μM、H1975 細胞ではおよそ 6 μM 程度であった。ここに、フェロトーシス特異的阻害剤 Ferrostatin-1 を処理することで、どちらの細胞株においても有意に生存率の上昇が確認されたことから、HeLa 細胞、H1975 細胞どちらにおいても Erastin によりフェロトーシスが誘導されることが明らかとなった。次に Erastin による抗酸化能への影響について評価するために、過酸化脂質還元酵素である GPX4 タンパク質の発現量を調べたところ、どちらのがん細胞においても Erastin を処理することによって、GPX4 タンパク質の発現量が有意に低下していることが明らかとなった。さらに、Erastin の濃度依存的にグルタチオン量が減少していることも明らかにした。放射線との併用では Erastin の薬剤濃度を毒性試験において毒性の見られなかった 2 μM とし、24 時間処理した後、リニアック直線加速器により X 線を照射した。どちらの細胞株においても、放射線照射単独の細胞生存率と比較して、Erastin を併用した群では細胞生存率が大きく低下していた。また、放射線毒性の指標である 10%致死線量をそれぞれの曲線式より求め、放射線増感効果比 SER を計算したところ、HeLa 細胞では 1.27 倍、H1975 細胞では 1.38 倍の増感効果が明らかとなった。以上のことから、フェロトーシス誘導剤である Erastin によって、これらのがん細胞の放射線感受性が増加したことが示唆された。

続いて、ヌードマウスに NCI-H1975 細胞を移植することで担がんモデルマウスを作製し、がん細胞に対する Erastin と X 線の併用治療効果を評価したところ、無処置群のコントロールと比較して、X 線単独治療群と Erastin 単独治療群ではほとんど腫瘍サイズに差は認められなかったのに対し、両者を併用治療した群では、顕著に腫瘍の成長を抑えており、in vivo 試験においても Erastin の放射線増感効果が明らかとなった。またこのメカニズムとして、Erastin の 3 日間の連続投与によって腫瘍内の還元型グルタチオン GSH および、GSH と還元型グルタチオン GSSG を含めた総グルタチオン量が有意に減少していたことから、Erastin 投与により治療抵抗性に働く腫瘍内のグルタチオン量が減少し、放射線治療効果を増加したことが明らかにした。

以上の結果から、Erastin はがん細胞内の抗酸化物質を減少させることで放射線感受性を増感させることが明らかとなり、グルタチオン阻害効果のあるフェロトーシス誘導剤には、放射線感受性を増感する可能性があることを明らかにした。本研究成果は、PLoS ONE 誌に発表し、2022 年 5 月現在までに 44 回引用され、その重要性が評価されている (Shibata, Yasui *et al.* PLoS One 2019;14(12):e0225931)。



[トランスフェリンレセプター発現量の非侵襲的な定量化を可能にするトランスフェリンをベースとする放射性プローブの開発] (図 3)

上記の研究から、フェロトーシス誘導剤の放射線増感効果が明らかとなり、新たながん治療法としての可能性が示唆されたが、個々の患者に応じて、最も効果的な治療を提供するためには、このフェロトーシス誘導治療の感受性を予測する手法が必要になると考えられた。細胞の鉄取り込み経路においてトランスフェリンレセプター(TfR)経路は主要な働きを担っており、細胞内鉄量が豊富ながん細胞では、鉄代謝異常が起こり、TfR1 を過剰発現していることが報告されて

いる。そして、鉄依存性細胞死であるフェロトーシスは、細胞内 2 価鉄と過酸化水素がフェントン反応を引き起こすことで反応性の高いヒドロキシラジカルが産生し、過酸化脂質が蓄積することで誘導されることから、主要な取り込み経路である TfR1 の発現量はフェロトーシスの感受性に大きく影響することが考えられる。また、鉄輸送タンパク質であるトランスフェリン(Tf)はフェロトーシス誘導に重要な因子の一つであることがいくつかの文献より示唆されていることから、がん細胞の TfR1 量がフェロトーシス感受性と相関するという予測のもと、Tf をベースとした核医学診断法によりがん細胞のフェロトーシス感受性が予測できるのではないかとこの仮説を立てそれを立証することとした。

方法に記載したプロトコルで完成した 68Ga-NOTA-hTf の鉄含有量を測定するために、誘導結合プラズマ発光分光分析装置 (ICP-AES) を使用した。比較対象として、市販されている高純度の aTf と hTf を加えて分析したところ、68Ga-NOTA-hTf プロブの鉄含有量は、高純度 hTf の鉄含有量とほぼ一致することが判明し、本実験手順でホロ化に成功していることを確認した。また、合成した 68Ga-NOTA-aTf および hTf の放射科学的純度をサイズ排除カラムを用いた HPLC により分析したところ、どちらも 98%以上の放射科学的純度が得られ、精製後の放射能を測定することでそれぞれの放射化学的収率を計算し 6 割以上の収率を得られた。

ウェスタンブロット法により 2 種類のヒト腎がん細胞における TfR1 タンパク質発現量を解析したところ、786-O 細胞では A498 細胞と比較して、TfR1 タンパク質の発現量が 6 倍程度高いことが判明した。さらに、これらの細胞に Erastin を 24 時間処理し、コロニー形成試験を実施した結果、TfR1 高発現細胞株である 786-O 細胞では A498 細胞と比較して、Erastin への感受性が高いことが明らかとなり、ヒト腎がん細胞株において、TfR1 発現量と Erastin 感受性に相関があることが示唆された。最後に、これらの細胞へのプロブの取り込み実験を行った。結果、鉄を保持していない aTf プロブでは結合力が弱く、両細胞株間で差が認められなかったものの、鉄を加え hTf プロブでは A498 細胞と比較して、TfR1 高発現細胞株である 786-O 細胞内へ有意に高集積することが明らかとなった。

以上の結果から、本研究で開発したトランスフェリンプロブは、フェロトーシス誘導がん治療法の効果を予測できる可能性が示唆された。本研究成果は、Biochem. Biophys. Rep.誌に発表した。

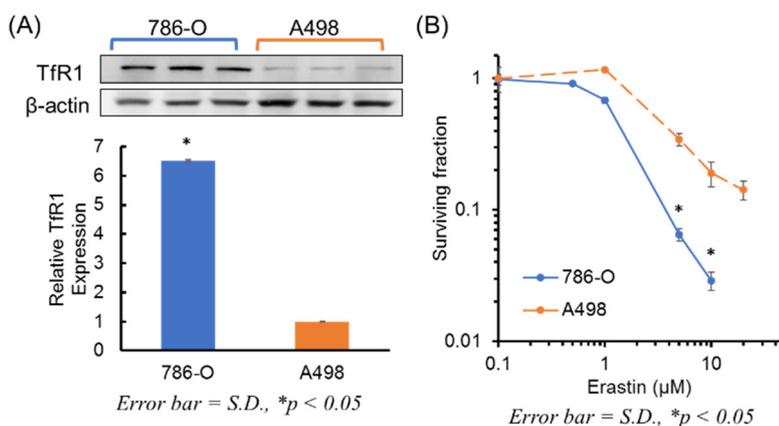


図3. (A) ヒト腎癌細胞株のTfR1タンパク質発現量比較
(B) ヒト腎癌細胞株のエラスチン感受性比較

癌細胞株のTfR1発現量とエラスチン感受性には相関性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Shibata Yuki, Yasui Hironobu, Higashikawa Kei, Miyamoto Naoki, Kuge Yuji	4. 巻 14
2. 論文標題 Erastin, a ferroptosis-inducing agent, sensitized cancer cells to X-ray irradiation via glutathione starvation in vitro and in vivo	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0225931
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0225931	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 Bo Tomoki, Yamamori Tohru, Yamamoto Kumiko, Fujimoto Masaki, Yasui Hironobu, Inanami Osamu	4. 巻 522
2. 論文標題 Mitochondrial fission promotes radiation-induced increase in intracellular Ca ²⁺ level leading to mitotic catastrophe in mouse breast cancer EMT6 cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 144 ~ 150
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.11.027	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 Fujimoto Masaki, Bo Tomoki, Yamamoto Kumiko, Yasui Hironobu, Yamamori Tohru, Inanami Osamu	4. 巻 67
2. 論文標題 Radiation-induced abnormal centrosome amplification and mitotic catastrophe in human cervical tumor HeLa cells and murine mammary tumor EMT6 cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 240 ~ 247
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3164/jcbn.19-80	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 Shibata Yuki, Yasui Hironobu, Higashikawa Kei, Kuge Yuji	4. 巻 26
2. 論文標題 Transferrin-based radiolabeled probe predicts the sensitivity of human renal cancer cell lines to ferroptosis inducer erastin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 100957 ~ 100957
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrep.2021.100957	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 Bo Tomoki, Yasui Hironobu, Shiga Tohru, Shibata Yuki, Fujimoto Masaki, Suzuki Motofumi, Higashikawa Kei, Miyamoto Naoki, Inanami Osamu, Kuge Yuji	4. 巻 49
2. 論文標題 Eribulin improves tumor oxygenation demonstrated by 18F-DiFA hypoxia imaging, leading to radio-sensitization in human cancer xenograft models	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging	6. 最初と最後の頁 821 ~ 833
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00259-021-05544-4	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 Fujimoto Masaki, Higashiyama Ritsuko, Yasui Hironobu, Yamashita Koya, Inanami Osamu	4. 巻 21
2. 論文標題 Preclinical studies for improving radiosensitivity of non-small cell lung cancer cell lines by combining glutaminase inhibition and senolysis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Translational Oncology	6. 最初と最後の頁 101431 ~ 101431
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tranon.2022.101431	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 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 柴田悠貴、東川桂、安井博宣、久下裕司
2. 発表標題 がんのフェロトーシス感受性評価のためのイメージング法開発に向けた基礎的検討
3. 学会等名 第14 回日本分子イメージング学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柴田悠貴、安井博宣、東川桂、宮本直樹、久下裕司
2. 発表標題 放射線治療を併用したフェロトーシス誘導がん治療法の検討
3. 学会等名 第72回 日本酸化ストレス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shibata Yuki、Higashikawa Kei、Yasui Hironobu、Kuge Yuji
2. 発表標題 A basic study on PET imaging technique for predicting cancer sensitivity to ferroptosis-targeting cancer therapy
3. 学会等名 The 26th Annual Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine (国際学会)
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	稲波 修 (Inanami Osamu) (10193559)	北海道大学・獣医学研究院・教授 (10101)	
研究分担者	平田 拓 (Hirata Hiroshi) (60250958)	北海道大学・情報科学研究院・教授 (10101)	
研究分担者	久下 裕司 (Kuge Yuji) (70321958)	北海道大学・アイソトープ総合センター・教授 (10101)	

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
---------	---------