

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07680

研究課題名(和文) 上皮間葉移行とフェロトーシス感受性により規定されるRAS変異癌の悪性化と脆弱性

研究課題名(英文) The study of malignant transformation and vulnerability of mutated-RAS carcinomas defined by epithelial-mesenchymal transition and susceptibility to ferroptosis

研究代表者

松本 光代 (MATSUMOTO, Mitsuyo)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：80400448

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究期間に申請者は、転写因子BACH1が膵臓細胞のEMTを促し、より強力な転移能の発現を促すこと、およびフェロトーシスがBACH1制御下にあることを証明し、これを報告した。一方で、フェロトーシスはRAS変異癌で特に感受性を示すことが注目されつつある。本研究ではフェロトーシス制御機構を利用した癌治療戦略を考える上で、各細胞内の鉄の代謝機構の違いについてさらに研究を深める必要性を示唆する予備的知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵臓癌は難治性がんの1つである。BACH1が膵臓癌の予後不良因子であり、上皮系遺伝子の発現を抑制し、転移を促進するという今回の発見と論文での報告、およびBACH1がフェロトーシス誘導剤感受性を促進するという発見と論文での報告は、新規治療標的もしくは新規治療診断判別法を開発する礎となる可能性がある。また、癌遺伝子RAS活性型変異を持つ癌は約30%にもおよぶことから、フェロトーシス誘導剤による癌治療を考えた時、今後更なる検討が必要ではあるものの、その波及効果は大きいと期待している。

研究成果の概要(英文)：We recently found that the transcription factor BACH1 promotes epithelial-mesenchymal transition (EMT) of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) cells leading to stronger metastatic potential. In PDAC, 90% of which have RAS mutations, we analyzed, proved and reported that a gene regulatory network of BACH1 downstream target contributes to the malignant transformation of PDAC by regulating EMT. We also elucidated that ferroptosis is under the control of BACH1 where it promotes ferroptosis in mouse embryonic fibroblasts. Cancer cells with RAS mutations are known to be highly susceptible to the ferroptosis inducer erastin. Furthermore, we reported that this ferroptosis can be spread from the ferroptotic cells to the surrounding healthy cells by the chain propagation of lipid peroxidation reactions.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：BACH1 膵臓癌 Ferroptosis EMT RAS

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

癌遺伝子RASの活性型変異を持つ癌は約30%にもおよび、RAS変異癌における治療戦略を見つけることができれば、その利益は大きい。そこで近年注目されているのが鉄依存性細胞死フェロトーシスの活用である。これはRAS変異癌細胞特異的に細胞死を誘導する薬剤の探索から見つかった細胞死であり (*Cell*, 2012 149:1060-1072)、RAS変異癌はフェロトーシスに高感受性を示すことが報告されている (*Oncoscience*, 2015 2:517-532)。しかし、この高感受性の仕組みはまだ解明されていない。一方、癌の悪性化には上皮間葉移行 (EMT) が寄与する。EMTは転移を促進するとともに、抗癌剤に対する感受性を下げることが良く知られており、EMTに対抗する治療法が望まれている。

申請者は以前、活性型RAS導入MEFsにおける形質転換やその悪性化にBACH1が寄与することを報告している (*Oncogenes*, 2013, 32:3231-45)。さらに最近、その90%がKRAS変異を有しているヒト膵癌細胞のEMTをBACH1が促進することを見出した。また、EMTと転移に関する *in silico*による解析から転移遺伝子候補としてBACH1が報告されたが (*NPJ Syst Biol Appl*, online: 23 August 2018)、実験的証拠は報告されていない。EMTは抗癌剤耐性の要因となることが報告されており、BACH1は抗癌剤耐性悪性腫瘍を見分けるマーカーとして利用できる可能性がある。しかし現在のところ、この分類が可能になったとしても悪性化を示す腫瘍に対する治療法は無い。

RAS変異癌はフェロトーシスに高感受性を示すことから、現在、その治療利用が注目されている。しかし、何故RAS変異癌がフェロトーシスに高感受性を示すのか、その理由は分かっていない。また、エラスチンやRSL3といったフェロトーシス促進剤は存在するが、より有効な誘導法やフェロトーシス感受性診断法の開発が喫緊の課題である。申請者は、最近、BACH1が鉄代謝の役割を担う転写因子であることに着目し、フェロトーシスがBACH1によって促進されることに気が付いた。

### 2. 研究の目的

RAS変異癌細胞においてBACH1はEMTといった癌の悪性化特性とフェロトーシスといった癌にとつての弱点を作り出していることが考えられた。従って、本研究ではRAS変異癌におけるBACH1のフェロトーシス促進効果とBACH1による転移促進機序をより詳細に解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

細胞はATCCから購入したAsPC-1ヒト膵臓癌細胞およびRIKENバイオリソースセンターから購入したPanc-1ヒト膵臓癌細胞を用いた。マウス胎児線維芽細胞(MEFs)は13.5日齢の胎児から作製した。培養細胞における遺伝子ノックダウンは、RNAiMAXRNA(Thermo Fisher Scientific)でのリポフェクション法を用いて、標的特異的stealth RNA (Invitrogen)を導入することで行った。BACH1の過剰発現はpCMV2-BACH1プラスミドをFugene HD (Promega)を用いて細胞に導入後、抗生物質G418添加培地でプラスミドが導入された細胞のみを選択することで達成した。RNA抽出はRNeasy plus mini kit (Qiagen)を用いた。cDNA合成は、Omniscript Reverse Transcription kit (Qiagen)を用いて行った。qPCR解析はLightCycler Fast Start DNA Master SYBR Green I (Roche)を用いて、LightCycler (Roche)で行った。内部標準遺伝子としてACTBを用いた。

RNA-sequenceはIon Protonを用いて行い、リードカウントデータはion torrent (Thermo Fisher Scientific)のtotternt RNASeqAnalysis Pluginを使用して得、遺伝子の発現差解析はRソフトのEdgeRを用いて行った。移植から5週間後の原発巣(膵臓)および転移巣の腫瘍塊のBACH1(自家製抗体9D11)とE-cadherin(ab1416, Abcam)の免疫組織化学、およびエラスチンによる細胞死がFerroptosisであることを評価するために行った電子顕微鏡像の取得は東北大学大学院医学系研究科の実験動物病理組織作製支援サービスを利用して行った。膵臓癌細胞でのBACH1によるFerroptosis誘導剤エラスチンの奏功性の違いを検討するため、Tet-onシステムとしてpTRIPZベクター(Addgene)を用いて、BACH1をドキシサイクリン(Dox)依存的に発現させる細胞の構築を行った。BACH1発現誘導には1 µg/mlのDoxを用いた。細胞死はアネキシンV染色細胞をフローサイトメトリーで解析することによって評価した。

#### 4. 研究成果

E-カドヘリンは有名な細胞間接着因子で、本因子の発現は上皮系細胞の指標の1つとなっている。我々はこれまでに膵臓癌細胞においてBACH1がいくつかの上皮系遺伝子を抑制することを見出していた。その中の因子の1つE-カドヘリンもまたBACH1のノックダウンやノックアウトによって遺伝子及びタンパク質の発現が脱抑制されることを見出していた。BACH1は転写抑制因子である。しかし、膵臓癌細胞における抗BACH1抗体によるChIP-seqの解析結果は、E-カドヘリン/*CDH1*がBACH1の直接標的因子ではないことを示した。BACH1によるE-カドヘリンの制御メカニズムを探るため、我々は過去に*CDH1*の転写活性を促すことが報告されているFOXA1に注目した。FOXA1はE-カドヘリン/*CDH1*発現の活性化因子として知られている。FOXA1の発現はBACH1のサイレンシングによって増加し、その過剰発現によって減少する。また、ChIP-seqの解析から、FOXA1はBACH1の直接標的遺伝子である可能性が示唆されていた。そこで、BACH1サイレンシングによるFOXA1の誘導が、E-カドヘリンの発現上昇を促していると考え、BACH1とFOXA1のダブルノックダウンを行った。その結果、*CDH1*の発現は低下しないことが判明し、BACH1サイレンシングによる*CDH1*の上昇にFOXA1は関与していないことが分かった。しかし、BACH1発現量がそもそも低く、E-カドヘリンの発現がAsPC-1細胞よりも高いPanc-1細胞においてBACH1をサイレンシングすると、*CDH1*の発現が上昇し、BACH1を過剰発現させるとE-カドヘリン/*CDH1*の発現が減少することを見出した。また、BACH1過剰発現Panc-1細胞でBACH1をサイレンシングさせると、*CDH1*は上昇するものの、細胞の形態は老化様に広がり、増殖できなくなった。このように、BACH1が*CDH1*の発現調節をしていることは疑いようがなく、現在、BACH1-*CDH1*軸の機序解明のためにさらに検討を進めており、その原因にたどり着きつつある。

AsPC-1細胞をマウスに移植すると、5週間後には肝臓への転移や腸間膜、腹膜への播種が認められるが、BACH1欠損AsPC-1細胞では、これらの転移・播種が抑制された。一過性にBACH1を減少させるノックダウンとノックアウトではAsPC-1細胞に与える影響が異なることが予想される。BACH1ノックアウト細胞においてもEMT関連遺伝子の変動するのか確かめるために、RNA-seqを行った。BACH1ノックダウンおよびノックアウトAsPC-1細胞の遺伝子発現に基づくクラスター解析は、その2つの群間で細胞の遺伝子発現パターンが大きく異なることを示した。しかしながら、その中であつても上皮関連遺伝子はBACH1ノックダウン時と同様にBACH1ノックアウトAsPC-1細胞において発現が上昇することが分かった。この結果は、BACH1がAsPC1細胞のEMTに一時的のみならず長期的にも影響することを示した。我々は、これまでにすでに得ていた結果と、これらの結果から、BACH1が膵臓癌の予後不良因子であり、EMTおよび転移を促進することを報告した(*Cancer Res.*, 2020, 80:1279-1292)。

エラスチンは *RAS* 変異を持つ癌細胞の細胞死を誘導する低分子化合物として同定され、その後、この細胞死が鉄に依存していることからフェロトーシスと名付けられ、新しい細胞死の存在が明らかとなった。近年、フェロトーシスはがん細胞の除去機構として働くことが判明し、新たな「がん治療」戦略の鍵として注目されている。BACH1 はヘムと鉄に関連する酸化ストレス応答と代謝経路を調節する転写因子の1つである。我々は BACH1 がそれら標的遺伝子の制御によってフェロトーシスを調節している可能性があると考えた。そこで、*Bach1* 欠損型 MEFs と野生型 MEFs をエラスチンで処理し、その細胞死誘導率を比較したところ、BACH1 がフェロトーシス誘導剤の感受性を上昇させていることを見出した。また、フェロトーシス誘導後の細胞の RNA-seq によるトランスクリプトーム解析結果、および野生型 MEFs と *Bach1* 欠損型 MEFs の間での RT-qPCR による遺伝子発現差解析を行うことで、BACH1 がフェリチン (*Fth1*, *Ft1l1*) やヘムオキシゲナーゼ 1 (*Hmox1*)、フェロポーチン (*Slc40a1*) 遺伝子、グルタミン酸-システインリガーゼの触媒サブユニット (*Gclm*, *Gclc*) およびシステイン/グルタミン酸交換輸送体 xCT (*Slc7a11*) の直接転写制御を介して、フェロトーシスを制御していることを明らかにし、これを報告した (*J Biol Chem.*, 2020, 295:69-82)。さらに我々はフェロトーシスが脂質過酸化反応の伝播により、細胞から周囲の細胞へと連鎖的に広がることを示し、これを報告した (*Cell Death & Disease*, 2021)。

我々は、BACH1 によるフェロトーシス誘導剤への感受性増加が膵臓癌細胞においても見られるか調べた。これまでの研究から、BACH1 高発現膵臓癌細胞株である AsPC-1 細胞が BACH1 低発現膵臓癌細胞株である Panc-1 細胞よりもフェロトーシス誘導剤であるエラスチンへの感受性が高いこと、さらに、AsPC-1 細胞の *BACH1* をノックダウンすると、フェロトーシス誘導剤への感受性が低下することを見出していた。そこで次に、*BACH1* の過剰発現によって Panc-1 細胞のフェロトーシス誘導剤への感受性を促進させることができるか調べることにした。Tet-on システムを用いて *BACH1* を過剰発現できる Panc-1 細胞を構築し、*BACH1* を過剰発現させた。しかし、Panc-1 細胞における *BACH1* の過剰発現はフェロトーシス誘導剤の感受性に影響を与えなかった。BACH1 は複数の鉄代謝関連遺伝子の転写を制御しており、実際に我々は BACH1 による細胞内遊離鉄の増加がフェロトーシス誘導剤への感受性を上げる要因の1つであると MEFs を用いた実験によって証明している。興味深いことに、AsPC-1 細胞ではフェロトーシス誘導剤と一緒に鉄剤 ( $\text{FeSO}_4$ ) を添加すると、鉄剤を加えていない対照と比べ生細胞数が減るのに対し、Panc-1 細胞ではフェロトーシス誘導剤を鉄剤と同時添加しても生細胞数に変化が無いことが分かった。これらの結果は、フェロトーシス制御機構を利用した癌治療戦略を考える上で、各細胞内の鉄の代謝機構の違いについてさらに研究を深める必要性を示唆した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Igarashi Kazuhiko, Nishizawa Hironari, Saiki Yuriko, Matsumoto Mitsuyo	4. 巻 297
2. 論文標題 The transcription factor BACH1 at the crossroads of cancer biology: From epithelial-mesenchymal transition to ferroptosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101032 ~ 101032
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.101032	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 Nishizawa Hironari, Matsumoto Mitsuyo, Chen Guan, Ishii Yusho, Tada Keisuke, Onodera Masafumi, Kato Hiroki, Muto Akihiko, Tanaka Kozo, Igarashi Kazuhiko	4. 巻 12
2. 論文標題 Lipid peroxidation and the subsequent cell death transmitting from ferroptotic cells to neighboring cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Death & Disease	6. 最初と最後の頁 332
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41419-021-03613-y	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 Suzuki Katsushi, Matsumoto Mitsuyo, Katoh Yasutake, Liu Liang, Ochiai Kyoko, Aizawa Yuta, Nagatomi Ryoichi, Okuno Hiroshi, Itoi Eiji, Igarashi Kazuhiko	4. 巻 15
2. 論文標題 Bach1 promotes muscle regeneration through repressing Smad-mediated inhibition of myoblast differentiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0236781
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0236781	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 Sato Masaki, Matsumoto Mitsuyo, Saiki Yuriko, Alam Mahabub, Nishizawa Hironari, Rokugo Masahiro, Brydun Andrey, Yamada Shinji, Kaneko Mika K., Funayama Ryo, Ito Mamoru, Kato Yukinari, Nakayama Keiko, Unno Michiaki, Igarashi Kazuhiko	4. 巻 80
2. 論文標題 BACH1 Promotes Pancreatic Cancer Metastasis by Repressing Epithelial Genes and Enhancing Epithelial Mesenchymal Transition	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 1279 ~ 1292
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-18-4099	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 Nishizawa Hironari, Matsumoto Mitsuyo, Shindo Tomohiko, Saigusa Daisuke, Kato Hiroki, Suzuki Katsushi, Sato Masaki, Ishii Yusho, Shimokawa Hiroaki, Igarashi Kazuhiko	4. 巻 295
2. 論文標題 Ferroptosis is controlled by the coordinated transcriptional regulation of glutathione and labile iron metabolism by the transcription factor BACH1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 69 ~ 82
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.009548	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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 佐藤正規、大塚英郎、松本光代、齋木由利子、三浦孝之、有明恭平、益田邦洋、林洋毅、森川孝則、中川圭、元井冬彦、内藤剛、石田孝宣、亀井尚、五十嵐和彦、海野倫明
2. 発表標題 膵癌におけるBACH1の機能
3. 学会等名 第119回日本外科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mitsuyo Matsumoto, Masaki Sato, Yuriiko Saiki, Hironari Nishizawa, Andrey Brydun, Shinji Yamada, Mika Kaneko, Ryo Funayama, Yukinari Kato, Keiko Nakayama, Michiaki Unno and Kazuhiko Igarashi
2. 発表標題 BACH1 promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis in pancreatic cancer through repressing epithelial genes
3. 学会等名 「Tohoku University Thematic Forum for Creativity」 Cancer - from Biology to Acceptance - (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東北大学大学院医学系研究科生物化学分野HP  <a href="http://www.biochem.med.tohoku.ac.jp">http://www.biochem.med.tohoku.ac.jp</a>          東北大学 2021年プレスリリース・研究成果「まるでドミノ!? 細胞死が連鎖して広がっていく」  <a href="https://www.tohoku.ac.jp/japanese/2021/03/press20210330-01-domino.html">https://www.tohoku.ac.jp/japanese/2021/03/press20210330-01-domino.html</a>          東北大学 2020年プレスリリース・研究成果「すい臓がん細胞の転移を促進するスイッチを発見」  <a href="https://www.tohoku.ac.jp/japanese/2020/01/press20200110-02-BACH1.html">https://www.tohoku.ac.jp/japanese/2020/01/press20200110-02-BACH1.html</a></p>
--

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
研究協力者	佐藤 正規  (Sato Masaki)		
研究協力者	西澤 弘成  (Nishizawa Hironari)		
研究協力者	鈴木 一史  (Suzuki Katsushi)		
研究協力者	五十嵐 和彦  (Igarashi Kazuhiko)		

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