

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16834

研究課題名(和文) 薬剤耐性克服を目指した新規癌治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel cancer treatment aimed at overcoming drug resistance

研究代表者

宍戸 裕二 (Shishido, Yuji)

鳥取大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00812702

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)：5-アミノレブリン酸(5-ALA)は生体内に存在する天然のアミノ酸で、その腫瘍特異的な代謝経路と光感受性を利用して既に臨床で広く使用されている。一方で、非アポトーシス性の脂質酸化ストレスによる細胞死であるフェロトーシスが薬剤耐性癌細胞に効果的な治療経路として近年注目されている。本研究では、5-ALAが食道扁平上皮癌に対してフェロトーシスを誘導し抗腫瘍効果を発揮することを証明した。今後、5-ALAによるフェロトーシス誘導を利用したさらなる臨床応用が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

フェロトーシスは薬剤耐性癌細胞にも効果を示すことから近年急速に研究が進んでおり、様々なフェロトーシスを誘導剤が同定されてきている。しかし、安全性の問題等から依然として実臨床への応用には至っていない。今回我々が着目した5-ALAは、既に実臨床でも広く使用されており、安全性は担保されている。したがって、5-ALAがフェロトーシス経路を介して抗腫瘍効果を発揮することを証明した本研究の成果は、今後フェロトーシスの臨床応用を理論的、現実的かつ安全に進めるために非常に意義のあるものである。

研究成果の概要(英文)：5-Aminolevulinic acid (5-ALA) is a natural amino acid that has already been widely used in clinical practice due to its tumor-specific metabolic pathway and photosensitivity. Ferroptosis, a non-apoptotic lipid oxidative stress-induced cell death, has recently focused on as an effective therapeutic pathway for drug-resistant cancer cells. In this study, we demonstrated that 5-ALA induced ferroptosis and exerts antitumor effects on esophageal squamous cell carcinoma. Further clinical application of 5-ALA induced ferroptosis is expected in the future.

研究分野：腫瘍学

キーワード：5-アミノレブリン酸 フェロトーシス 食道癌 薬剤耐性癌細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

5-アミノレブリン酸 (5-ALA) は生体内に存在する天然のアミノ酸で、その腫瘍特異的な代謝経路と光感受性を利用して様々な癌種における光線力学診断・光線力学療法として臨床で広く使用されている。一方で、非アポトーシス性の脂質酸化ストレスによる細胞死であるフェロトーシスが薬剤耐性癌細胞に効果的な治療経路として近年注目されている。また、フェロトーシスはグルタチオンペルオキシダーゼ 4 (GPX4) の抑制やヘムオキシゲナーゼ 1 (HMOX1) の過剰発現により誘導されることが知られている。本研究では 5-ALA が食道扁平上皮癌に対して GPX4 や HMOX1 を介してフェロトーシスを誘導し抗腫瘍効果を発揮することを証明し、食道癌の新たな治療薬となる可能性を精査した。

2. 研究の目的

5-アミノレブリン酸 (5-ALA) が食道癌に対してフェロトーシスを誘導することを明らかにし、薬剤耐性癌細胞に対する治療応用を目指すこと。

3. 研究の方法

(1)食道扁平上皮癌に対して根治的食道切除術を施行した 97 人の患者の切除検体において、食道癌組織中の GPX4 および HMOX1 の発現と予後との関連を検討した。  
 (2)食道扁平上皮癌細胞株 KYSE30 に 5-ALA を投与して RNA マイクロアレイ解析を行い、またリアルタイム PCR およびウェスタンブロット解析により GPX4、HMOX1 の RNA 発現、蛋白発現を評価した。さらに、5-ALA 投与による癌細胞株の抗腫瘍効果について検討し、フェロトーシス阻害剤や脂質酸化ストレス試薬を用いてフェロトーシスの誘導について評価した。  
 (3)ヌードマウスを用いた異種移植実験において、5-ALA 投与による腫瘍縮小効果および GPX4、HMOX1 発現について検討した。

4. 研究成果

(1)食道扁平上皮癌術後検体を用いた免疫組織化学による検討により、GPX4 発現は 40 症例 (41.2%)、HMOX1 発現は 46 症例 (47.4%) で陽性と判定され、また Kaplan-Meier 解析により GPX4 陽性および HMOX1 陰性は優位に予後不良であった (図 1)。さらに単変量解析および多変量解析により GPX4 陽性および HMOX1 陰性が食道癌患者の全生存期間における独立した予後不良因子であることが判明した (図 2)。

図 1

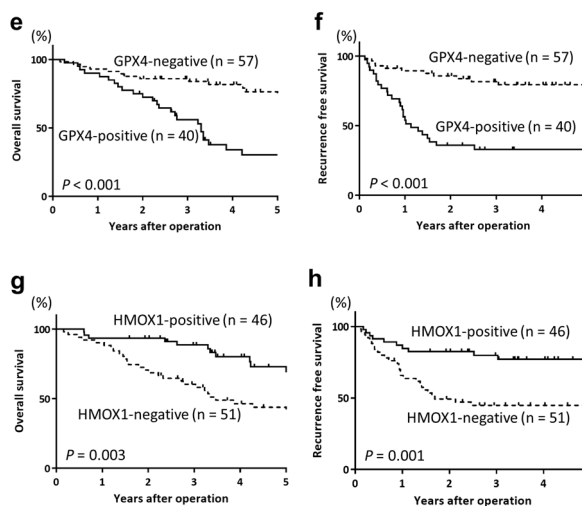
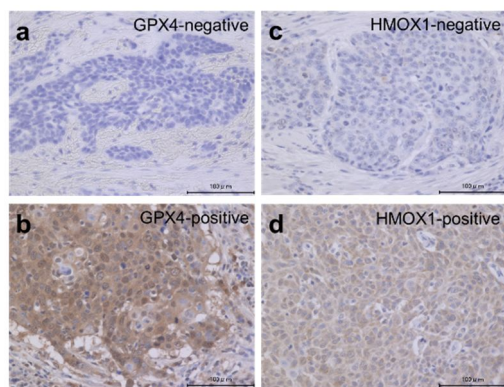


図 2

Variables	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	HR	95% CI	P Value	HR	95% CI	P Value
Age (< 70 vs. ≥ 70 years)	1.202	0.867–1.665	0.270			
Sex (male vs. female)	1.636	0.643–4.158	0.301			
BMI (< 22 vs. ≥ 22 kg/m <sup>2</sup> )	1.263	0.904–1.764	0.172			
Tumor location (lower vs. upper/middle)	1.765	0.958–3.251	0.068			
NAC (present vs. absent)	1.535	1.119–2.106	0.008	1.237	0.550–2.783	0.606
Differentiation (poor vs. well/moderate)	1.333	0.593–2.999	0.487			
Invasion depth (pT2/3/4 vs. pT1)	3.753	1.879–7.498	< 0.001	1.055	0.416–2.674	0.911
Lymph node metastasis (present vs. absent)	5.372	2.384–12.106	< 0.001	2.399	1.003–5.735	0.049
Lymphatic involvement (present vs. absent)	9.722	2.347–40.270	0.002	1.394	0.205–9.487	0.734
Vascular involvement (present vs. absent)	8.554	2.641–27.704	< 0.001	5.141	0.959–27.553	0.056
Disease stage (2/3/4a vs. 0/1)	13.075	3.156–54.162	< 0.001			
GPX4 (positive vs. negative)	3.077	1.658–5.713	< 0.001	2.393	1.228–4.666	0.010
HMOX1 (negative vs. positive)	1.612	1.164–2.234	0.004	2.480	1.245–4.938	0.010

(2) KYSE30 に 5-ALA を投与したマイクロ RNA 解析の結果、最も誘導されている経路の一つにフェロトーシスがあることが明らかとなり、GPX4 が抑制、HMOX1 が過剰発現していた (図 3)。また、リアルタイム PCR の結果、5-ALA 投与により有意に GPX4 発現が抑制、HMOX1 が過剰発現しており、ウェスタンブロットによる蛋白発現も同様の結果であった (図 4)。さらに、食道扁平上皮癌細胞株に加えて、胃癌細胞株、肝細胞癌細胞株においても 5-ALA 投与により有意な抗腫瘍効果を認め、この抗腫瘍効果はフェロトーシス阻害剤により抑制されていた (図 5 a-e)。また、5-ALA 投与により脂質酸化ストレスが生じていることも判明した (図 5 f, g)。

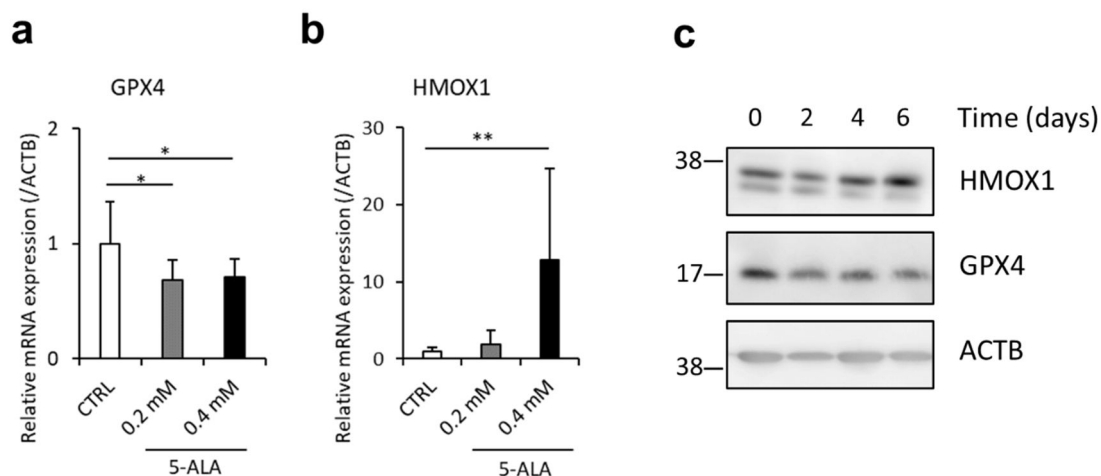
図 3

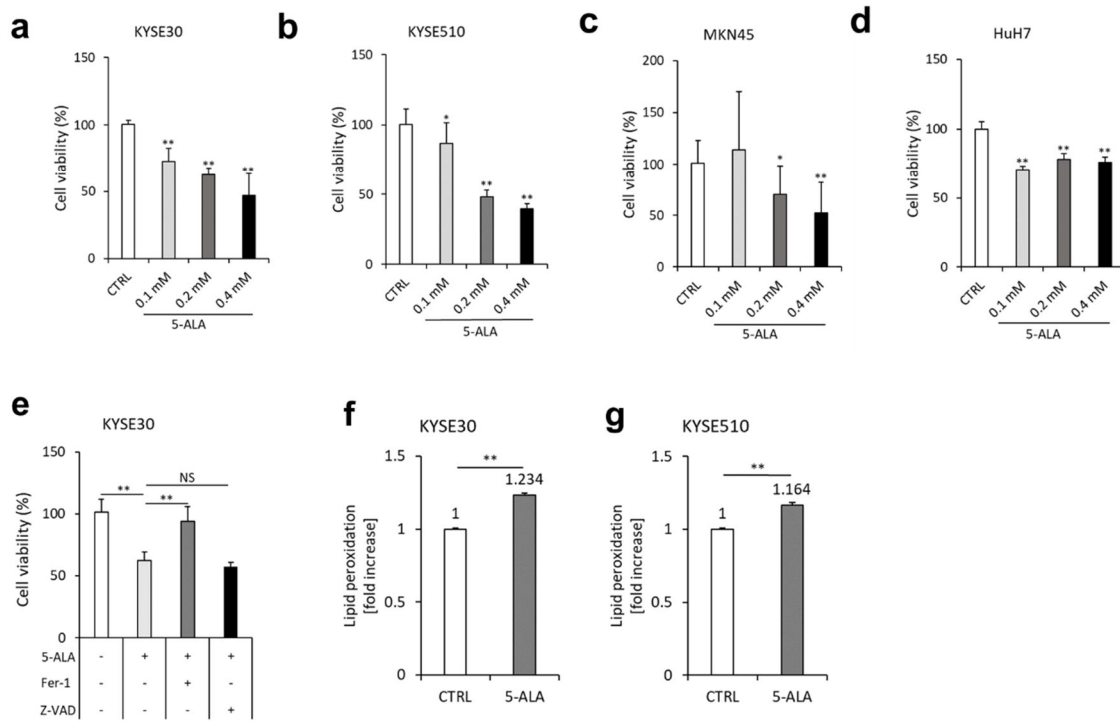
Pathway	Significance	<i>P</i> value
NRF2 pathway	4.07	0.000086
Complement and coagulation cascades	3.04	0.000909
GPCR ligand binding	2.53	0.002981
TGF-beta receptor signaling	2.43	0.003701
Deubiquitination	2.25	0.005621
Ferroptosis	2.22	0.006043
Senescence and autophagy in cancer	2.21	0.006113

	5-ALA treated	Control	Fold change
<b>Iron sequestration and stage</b>			
HMOX1	7.21	3.95	9.61
FTL	16.75	16.49	1.19
FTH1	18.45	18.13	1.24
SLC39A14	11.09	10.23	1.81
TFRC	14.21	12.25	3.91
TF	3.89	3.36	1.44
<b>Glutathione disulfide synthesis</b>			
GPX4	13.6	13.9	0.80
ALOX15	6.15	6.45	0.81

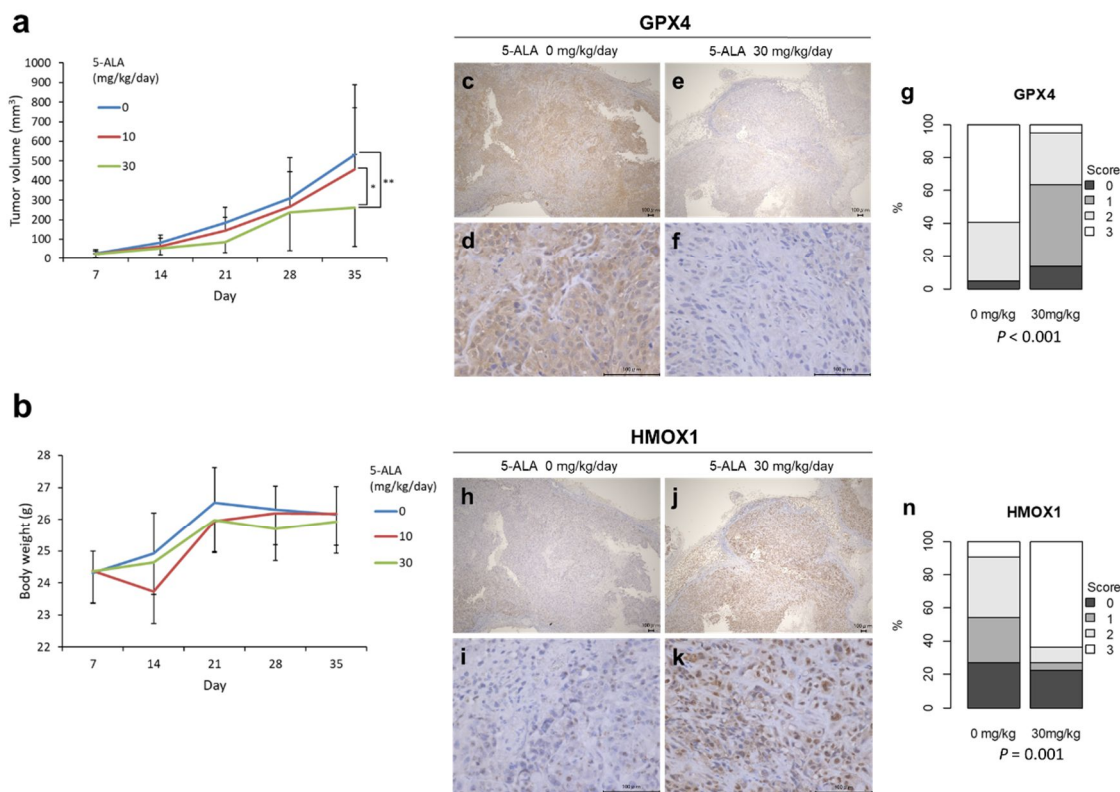
図 4





(3)ヌードマウスに KYSE30 を皮下移植し 5-ALA を連日投与したところ、コントロール群と比較し 5-ALA 投与群で有意に腫瘍縮小効果を認め、体重変化には有意差は認めなかった(図 6 a, b)。また 5-ALA 投与群の腫瘍切片の免疫組織化学染色では GPX4 が抑制され HMOX1 が過剰発現していた(図 6 c-n)。

6



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 Shishido Yuji, Amisaki Masataka, Matsumi Yoshiaki, Yakura Haruna, Nakayama Yuji, Miyauchi Wataru, Miyatani Kozo, Matsunaga Tomoyuki, Hanaki Takehiko, Kihara Kyoichi, Yamamoto Manabu, Tokuyasu Naruo, Takano Shuichi, Sakamoto Teruhisa, Honjo Soichiro, Hasegawa Toshimichi, Fujiwara Yoshiyuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Antitumor Effect of 5-Aminolevulinic Acid Through Ferroptosis in Esophageal Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1245/s10434-020-09334-4	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 穴戸 裕二
2. 発表標題 5-アミノレブリン酸はGPX4、HMOX1を介して食道癌細胞にフェロトーシスを誘導する
3. 学会等名 第75回 日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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