

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：72602

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16878

研究課題名（和文）統合的ストレス応答を介したGPX4依存のメカニズム解明と治療応用

研究課題名（英文）Mechanisms of GPX4 dependency via integrated stress response

研究代表者

白濱 仁深（SHIRAHAMA, Hitomi）

公益財団法人がん研究会・がん化学療法センター ゲノム研究部・研究員

研究者番号：20838552

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）：分子標的薬の存在下で長期にわたり生存するがん細胞（Persister細胞）は、GPX4へ強く依存し、GPX4阻害剤によりフェロトーシスが誘導されやすいことが知られている。このGPX4依存性は、これまで標的分子の阻害により出現すると考えられてきたが、本研究によって分子の阻害とは独立して細胞密度依存的に顕在化するものであることが明らかとなった。また、統合的ストレス応答に注目した生化学的実験と網羅的なトランスクリプトーム情報解析を通じて、細胞内のカルシウム変動がGPX4依存性に関与していることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、複数のがん種においてGPX4依存性を示すPersister細胞が報告されている。本研究はBRAF活性化変異を持つ細胞株に特に注目し、細胞密度やカルシウム変動がGPX4依存性に密接に関連していることを明らかにした。これは、がん細胞の薬剤耐獲得メカニズムに新たな知見をもたらすものである。また、本研究から見出されたGPX4依存性へのカルシウムシグナル伝達の関与は、カルシウムシグナル伝達を介してGPX4依存性を誘導する、フェロトーシスを利用したがん治療への応用が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Persister cells, which survive under the presence of drugs, are known to be highly dependent on GPX4 and therefore susceptible to ferroptosis induced by GPX4 inhibitor. This study revealed that the GPX4 dependency was induced not through the inhibition of the drug target but through the low density of the cells. In addition, experimental analyses focused on integrated stress response and comprehensive transcriptome analyses identified that perturbation of calcium signaling is involved in the GPX4 dependency.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：がん細胞 GPX4 フェロトーシス

1. 研究開始当初の背景

悪性黒色腫(メラノーマ)の約 **50-70%**程度は、**BRAF** キナーゼに活性化変異を有しており、**BRAF** を阻害する分子標的薬が臨床で用いられている。しかし、腫瘍の退縮誘導や生存率の改善は認められるものの、ほぼ全ての奏功は部分的に留まり、薬剤へ耐性化した後に再発する。そのため、薬剤に耐性化した腫瘍を有効に攻撃する方法が求められている。

近年、**BRAF** 活性化変異を有するメラノーマ細胞株に **BRAF** 阻害剤を 9 日間処理し続けて作成した細胞と親株との性状比較により、薬剤に耐える細胞が過酸化脂質の蓄積を抑制する酵素である **Glutathione peroxidase 4 (GPX4)** へ強く依存していることが報告された¹。**BRAF** 阻害剤を 9 日間処理した細胞は、親株と比較して **GPX4** 阻害剤に対して極めて高い感受性を示し、過酸化脂質の蓄積を伴う細胞死(フェロトーシス)が誘導された。これより、**GPX4** は薬剤耐性を解除する新たな標的として考えられた。しかし、臨床で有効な **GPX4** 阻害剤は未だ開発されておらず、また、細胞が **GPX4** 依存性となるメカニズムは不明な点が多い。

一方で、細胞には統合的ストレス応答(**Integrated Stress Response ; ISR**)と呼ばれる機構があることが知られている。細胞がストレスを受けると、その種類によって異なる **eukaryotic translation initiation factor eIF2 α (eIF2 α)** キナーゼが活性化され、**eIF2 α** のリン酸化が起きる。具体的には、ウイルス応答、小胞体ストレス、アミノ酸飢餓、ヘム鉄欠乏によって、**protein kinase RNA-activated (PKR)**、**PKR-like endoplasmic reticulum kinase (PERK)**、**general control nonderepressible 2 (GCN2)**、**heme-regulated inhibitory (HRI)** がそれぞれ応答する。**eIF2 α** のリン酸化は、転写因子 **activating transcription factor 4 (ATF4)** の翻訳誘導を招き、ストレス下での生存に重要な下流因子の発現を誘導する。近年、**ISR** は **BRAF** を含むがん活性化遺伝子によって制御されることが報告された^{2,3}。興味深いことに、**ATF4** の転写標的の中には、アミノ酸合成酵素や脂質代謝・グルタチオン代謝関連酵素が含まれている。特に、シスチントランスポーターである **Solute carrier family 7 member 11** はグルタチオンの生合成を制御し、細胞内の酸化状態を防ぐことが知られている。そこで、薬剤耐性を有する細胞における **GPX4** 依存性の上昇に、**ISR** が関与している可能性が考えられた。

2. 研究の目的

上記の背景に基づき、本研究では、薬剤耐性細胞における **GPX4** 依存性の獲得に **ISR** が関与するかを明らかにし、そのメカニズムを解明することを目的とする。**BRAF** 阻害剤による **ISR** 誘導と **GPX4** 依存性の獲得をつなぐシグナル伝達経路を明らかにし、薬剤耐性の解除への応用可能性を検証する。

3. 研究の方法

本研究を遂行する中で、当初の仮説とは異なる実験結果が得られた。その都度結果を吟味し、次の実験計画を立て、最終的に以下に記す方法で研究を行った。

(1) **BRAF** 阻害剤処理と **GPX4** 依存性の確認

まず、薬剤存在下における **GPX4** 依存性出現のモデルとして確立されているメラノーマ細胞と分子標的薬を用いた検討を行った。具体的には、**BRAF V600E** 活性化変異を持つメラノーマ細胞株 **A375** に関して、**BRAF** 阻害剤である **Vemurafenib** を処理し続けた場合に **GPX4** 依存性があらわれるかを確認した。**GPX4** 依存性の判断は、**GPX4** 阻害剤である **RSL3** の処理による細胞死誘導を基準に行った。細胞死の確認は、**ATP** 定量を元に、薬剤未処理群を基準とした生存率を算出する形で行った。またこの際、**RSL3** と同時にフェロトーシス阻害剤である **Ferrostatin-1** を処理する群も作成し、この細胞死がフェロトーシスであることを確認した。更に、**A375** に限定的な事象を見ていないことを確認するため、**A375** 同様に **BRAF V600E** 活性化変異を持つメラノーマ細胞株 **LOX-IMVI** を用いた検討を行った。

(2) 細胞密度依存的な **GPX4** 依存性の発見

次に、細胞密度が **GPX4** 依存性に影響を及ぼしている可能性が考えられたため、以下に示す実験を行うことにより確かめた。

まず、異なる数で播種した細胞に **RSL3** を処理し、細胞死誘導の違いを検証した。次に、細胞周期との関係を調べるため、細胞に **DNA** 複製阻害剤である **Aphidicolin** を前処理した実験を行

った。また、細胞数ではなく細胞密度が関与していることを確認するため、三次元スフェロイド培養を実施した。続いて、フェロトーシス以外の細胞死が関与しているのかを調べるため、ネクロトーシスおよびアポトーシスに関する阻害剤をそれぞれ **RSL3** と同時に処理する実験を行った。更に、異なる数で播種した細胞に **Vemurafenib** を処理した場合の **GPX4** 依存性を確認した。

(3) 細胞密度依存的な **GPX4** 依存性における **ISR** の関与

(2) で見出された低細胞密度で誘導される **GPX4** 依存性と、ストレス応答との関わりを調べることを目的に、**ISR** に関連する薬剤と **RSL3** の共処理を行った。具体的には、各 **eIF2 α** のキナーゼを活性化するストレスを前処理し、**GPX4** 依存性への変化を確認した。次に、**GPX4** 依存性に変化がみられた **ISR** 経路に関して、複数のストレスまたは阻害剤を用いた検討、**RSL3** 処理時の関連タンパク質発現の確認、ノックアウト細胞を用いた検討を行った。

(4) トランスクリプトーム情報を用いた網羅的な解析

密度依存的な **GPX4** 依存性の機序を調べるため、マイクロアレイを用いて網羅的な遺伝子情報解析を行った。まず、**A375** の低密度と高密度それぞれの発現情報を比較した。次に、がん細胞パネル **JFCR39** における **RSL3** 高感受性細胞株と低感受性細胞株の発現情報を比較した。続いて **A375** と **JFCR39** で共通して変動がみられた遺伝子群に関して、**metascape** を用いた **Gene Ontology (GO)** 解析を行った。

(5) カルシウムを介した **GPX4** 依存性の阻害

(3)(4) で **GPX4** 依存性にカルシウムが関与していることが示唆されたため、カルシウムが **GPX4** 依存性に及ぼす影響を検討した。カルシウムキレート試薬をはじめとする複数のカルシウムシグナル伝達阻害剤を処理し、**RSL3** を処理した場合における **GPX4** 依存性を確認した。

4. 研究成果

(1) **BRAF** 阻害剤処理と **GPX4** 依存性の確認

薬剤の存在下で生存する細胞における **GPX4** 依存性の出現機序を理解するため、先行研究にて **GPX4** 依存性出現が報告されている **A375** に **Vemurafenib** を処理した検討を行った。**A375** に **Vemurafenib** を 9 日間処理すると、**Vemurafenib** 未処理群と比べて確かに **RSL3** によって細胞死が強く誘導され、**GPX4** 依存性を示すことが確認された。また **Ferrostatin-1** の共処理により細胞致死効果が解除されたことから、この細胞死はフェロトーシスであると考えられた。

続いて、細胞株の種類を広げた検討を行った。**LOX-IMVI** に対して、**A375** 同様の処理を行ったところ、**Vemurafenib** 処理による **GPX4** 依存性の出現が確認された。

以上の実験より、**BRAF** 活性化変異を有する細胞株に **BRAF** 阻害剤を処理することによって **GPX4** 依存性が現れることを、複数の細胞株で確認した。

(2) 細胞密度依存的な **GPX4** 依存性の発見

次に、**ISR** の経路の中で **GPX4** と関連しているものを同定するため、**Vemurafenib** 処理時に活性化すると報告されている **eIF2 α** キナーゼに着目し、**siRNA** を用いてノックダウンする実験を行った。しかしその結果から、ノックダウンによる細胞密度の減少が **GPX4** 依存性に影響を及ぼしている可能性が考えられたため、細胞密度が **GPX4** 依存性に与える影響を確認するための実験を以下の通りに行った。

まず、**96-well plate** に **0.5**、**5**、**20x10³ cells/well** と異なる数で **A375** を播種し、**RSL3** の処理を行い、細胞死誘導の違いを検証した。その結果、細胞密度が低いほど **GPX4** 依存性がみられる結果となった。また、細胞密度が低いサンプルも、培養期間が長くなるにつれて細胞密度が上がると、徐々に **RSL3** への感受性が低くなり、**GPX4** 依存性が消失した。

一般的に、細胞密度がコンフルエントに近づくると、細胞の増殖は低下する。そこで、細胞密度に依存した **GPX4** 依存性に、細胞が増殖期にあることが関与しているかを確認するため、**DNA** 複製阻害剤である **Aphidicolin** を前処理した実験を行った。その結果、**Aphidicolin** の処理によって低細胞密度のサンプルは密度が低く保たれると同時に、**GPX4** 依存性が保持された。これより、細胞が増殖期にあることは密度依存性に関与しないと考えられた。

更に、細胞数ではなく細胞密度が関わっていることを確認するため、細胞数 **1**、**5**、**20x10³ cells/well** における三次元スフェロイド培養を実施した。細胞数 **1x10³ cells/well** は、二次元培養では **RSL3** 処理に対して高感受性を示すが、三次元培養下では細胞死は誘導されず、**GPX4** 依存性を示さなかった。これより、少ない細胞数でも、スフェロイドを形成し細胞同士が密着すると **GPX4** 依存性が顕在化しないことが確かめられた。

この低細胞密度で誘導される **GPX4** 依存性に、フェロトーシス以外の細胞死が関与していないことを確かめるため、各種細胞死に関する阻害剤を処理した検討も行った。フェロトーシス阻害剤 (**Ferrostatin-1**、**Liproxstatin-1**、**Deferoxamine mesylate**) だけでなく、ネクロトーシス阻害剤 (**7-Cl-O-Nec1**)、アポトーシス阻害剤 (**Z-VAD-FMK**) を用いた検討を行ったところ、フェロトーシス以外の細胞死阻害剤では、**RSL3** 処理による細胞致死効果の解除は認められなかった。

続いて、密度の異なる細胞に **Vemurafenib** を処理した場合の **GPX4** 依存性を確認した。細胞密度が低いサンプルは、**Vemurafenib** の処理によって細胞密度が低い状態で保たれ、**GPX4** 依存性が保たれた。逆に細胞密度が高いサンプルでは、**Vemurafenib** の処理によって細胞密度が下がり、**GPX4** 依存性が現れた。

これらの結果より、分子標的薬である **Vemurafenib** の処理によって出現していると考えられてきた **GPX4** 依存性は、実際には低細胞密度の状態でも本来持っている性質であることが分かった。**Vemurafenib** を処理すると低細胞密度と共に **GPX4** 依存性が維持され、通常培養下で細胞がコンフルエントに達した場合は失われるものであることが判明した (**Fig. 1**)。

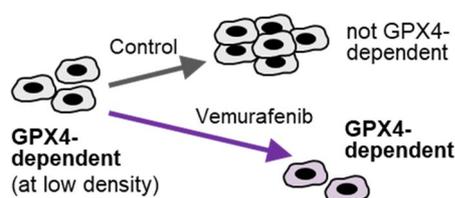


Fig. 1 薬剤耐性と **GPX4** 依存性に関する概念図

(3) 細胞密度依存的な **GPX4** 依存性における **ISR** の関与

(2) で見出された低細胞密度で誘導される **GPX4** 依存性と **ISR** との関係性を調べるため、**ISR** 関連薬剤を処理した際の **GPX4** 依存性への影響を調べた。まず、各 **eIF2 α** キナーゼに関わるストレスラー (**PKR** : **BEPP**、**PERK** : **Thapsigargin**、**GCN2** : **Halofuginone**、**HRI** : **BTdCPU**) を前処理した場合における **GPX4** 依存性の変化を確認した。その結果、**Thapsigargin** と **Halofuginone** において **GPX4** 依存性を減弱する効果がみられた。次に、前述の薬剤に関連する **PERK** および **GCN2** 経路に関して、複数のストレスラーまたは阻害剤を用いて更なる検討を行った。具体的には、**PERK** 経路に関する別のストレスラー (**2-Deoxy-D-glucose**、**Tunicamycin**) および阻害剤 (**GSK2656157**、**AMG PERK44**)、**GCN2** 経路に関する別のストレスラー (**Histidinol**) および阻害剤 (**GCN2iB**) を用いた。その結果、**PERK** のストレスラーは双方とも **GPX4** 依存性を減弱し、また **PERK** 阻害剤の一つは細胞密度が高いサンプルに **GPX4** 依存性を誘導した。

そこで、**PERK** 経路に関して更に検討するため、**RSL3** 処理時の **PERK** 関連タンパク質の発現をウエスタンブロットで確認した。その結果、**PERK** および下流の **eIF2 α** はリン酸化されておらず、**ATF4** の発現誘導もみられなかった。また、**PERK** のノックアウト細胞を用いた検討も行ったところ、ノックアウト細胞は親株と同程度の **RSL3** 感受性を示した。以上より、細胞密度依存的な **GPX4** に関して、**PERK** 経路による直接的な関与はないと考えられた。

(4) トランスクリプトーム情報を用いた網羅的な解析

密度依存的な **GPX4** 依存性の機序を調べるため、**A375** の低密度と高密度、**JFCR39** の **RSL3** 高感受性細胞株と低感受性細胞株に関する比較解析を行った。**A375**、**JFCR39** それぞれの比較において、発現変動が 2 倍以上 **p** 値が **0.05** 以下であるような遺伝子を抽出し、双方で共通して発現変動する遺伝子群に関して **GO** 解析をしたところ、カルシウムを介したシグナル伝達が上位に挙がった。実際に、(3) で **GPX4** 依存性を顕著に減弱した **Thapsigargin** はカルシウムチャネル阻害剤であるため、密度に依存した **GPX4** 依存性にカルシウムシグナル伝達が関与している可能性が情報解析と生化学的実験の両方から示唆されるかたちとなった。

(5) カルシウムを介した **GPX4** 依存性の阻害

(3)(4) で **GPX4** 依存性にカルシウムシグナル伝達が関与していることが示唆されたため、関連する阻害剤を用いた検討を行った。カルシウムキレート試薬をはじめとする複数のカルシウムシグナル伝達阻害剤と **RSL3** の共処理を行ったところ、これら阻害剤は **Thapsigargin** よりも更に **GPX4** 依存性を減弱した。そこで試薬を用いて過酸化脂質の蛍光標識を行ったところ、カルシウムチャネル阻害によって **RSL3** 処理時の過酸化脂質蓄積が抑えられ、フェルトーシスが抑制されていることが確認された。

以上より、本研究によって、分子標的薬の処理によって出現すると考えられてきた **GPX4** 依存性が、実際には低密度が保たれることによって細胞本来が持つ **GPX4** 依存性が維持されていることが明らかとなった。また、統合的ストレス応答に注目した解析を通じて、細胞内のカルシウム変動が **GPX4** 依存性に関与していることが見出された。

参考文献

1. Hangauer, M. J. *et al.* Drug-tolerant persister cancer cells are vulnerable to **GPX4** inhibition. *Nature* 551, 247–250 (2017).
2. Nagasawa, I., Kunimasa, K., Tsukahara, S. & Tomida, A. **BRAF**-mutated cells activate **GCN2**-mediated integrated stress response as a cytoprotective mechanism in response to vemurafenib. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 482, 1491–1497 (2017).
3. Kato, Y., Kunimasa, K., Sugimoto, Y. & Tomida, A. **BCR-ABL** tyrosine kinase inhibition induces metabolic vulnerability by preventing the integrated stress response in K562 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 504, 721–726 (2018).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 白濱 仁深、富田 章弘
2. 発表標題 BRAF活性化変異メラノーマ細胞におけるGPX4依存性形質の出現機序の解析
3. 学会等名 第23回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hitomi Shirahama, Shingo Dan, Akihiro Tomida
2. 発表標題 Induction of ferroptosis in melanoma cells at low cell density
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白濱仁深、旦慎吾、富田章弘
2. 発表標題 メラノーマ細胞における細胞密度依存的なフェロトーシス誘導の性状解析
3. 学会等名 第24回日本がん分子標的治療学会学術集会
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
---------	---------