

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18087

研究課題名(和文) 消化管間葉系肉腫におけるGPX4阻害剤の有効性とそのメカニズムの解明

研究課題名(英文) The efficacy of GPX4 inhibitor for gastrointestinal stromal tumor

研究代表者

石田 智 (Ishida, Tomo)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：60804052

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 300,000円

研究成果の概要(和文)：GIST細胞株に対しイマチニブを一定期間投与したのちの遺残細胞では抗酸化物質であるグルタチオンや関連抗酸化物質・酵素の低下が見られ、結果としてGPX4阻害剤に感受性を示した。同様の結果はゲフィチニブを投与した後のEGFR変異肺癌細胞株においても確認できた。またGIST細胞株を皮下移植したヌードマウスモデルを用いたin vivoモデルにおいても確認し得た。細胞株を用いたin vitro解析において遺残細胞では糖代謝関連の代謝の様式が親株と比較して著しく抑制されていることがわかった。このことが遺残細胞における抗酸化力の低下、ひいては遺残細胞特有のdormantな性質に寄与してい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

イマチニブ治療下の遺残細胞がイマチニブ治療の中止を困難にするとともに耐性細胞の供給源となりえると考えられている。このような背景から、遺残細胞を標的とした治療の開発に関する報告が近年少しずつなされ始めている。

今回、我々は「遺残細胞とはどういった細胞集団なのか？なぜ死滅することなく生き残ることが可能なのか？」という学術的問いに対する答えが本研究に内包されているものと考ええる。薬剤耐性腫瘍の供給源となり癌の再発・転移を誘発するこの遺残細胞の発生メカニズム、ならびに特性をさらに解明することで、GISTのみならず他癌においても治療効果を最大化することが可能であると考ええる。

研究成果の概要(英文)：After imatinib was administered to GIST cell lines for a period of time, the remnant cells showed a decrease in the antioxidant glutathione and related antioxidants and enzymes, resulting in sensitivity to GPX4 inhibitors. Similar results were observed in EGFR-mutant lung cancer cell lines after treatment with gefitinib. The same results were also observed in an in vivo model using a nude mouse model in which the GIST cell line was subcutaneously transplanted. In vitro analysis of the cell lines showed that the mode of metabolism related to glucose metabolism was significantly suppressed in the remnant cells compared to the parental line. This may contribute to the reduced antioxidant capacity of the remnant cells, and hence to the dormant nature of the remnant cells.

研究分野：消化器外科

キーワード：GIST 遺残細胞 GPX4 グルタチオン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

切除不能・再発消化管間葉系肉腫 (GIST) に対して、チロシンキナーゼ阻害剤であるイマチニブが臨床応用され、高い抗腫瘍効果を示した。しかし一方で、臨床応用後 15 年以上経過し、2 次遺伝子変異に伴う耐性化など問題点が明らかとなった。また、治療後の dormancy な遺残細胞の存在が明らかになり、この細胞がイマチニブ治療の中止を困難にし、またそれに続く二次耐性の出現の一因となると考えられている。我々は先行研究において GIST 細胞株にイマチニブを一定期間投与することで、dormancy な遺残細胞状態を経たのちに、二次耐性型遺伝子変異を有する耐性細胞が生まれるという実臨床と同様の現象を *in vitro* にて再現してきた。さらにこのような dormancy な遺残細胞は、先行研究において、代謝の面からは親株や遺伝子変異を伴う耐性株とは異質な細胞集団であることを示唆するデータを得ている。

2. 研究の目的

遺残細胞がどのように化学療法から逃避し、生き残ることができるのか網羅的に解析を行うことを目的とした。特に、そのメカニズムの一因と示唆される代謝の変化をグルタチオン代謝、糖代謝を中心に解明し、さらにはその機能に基づく新規治療の開発を目的とした。

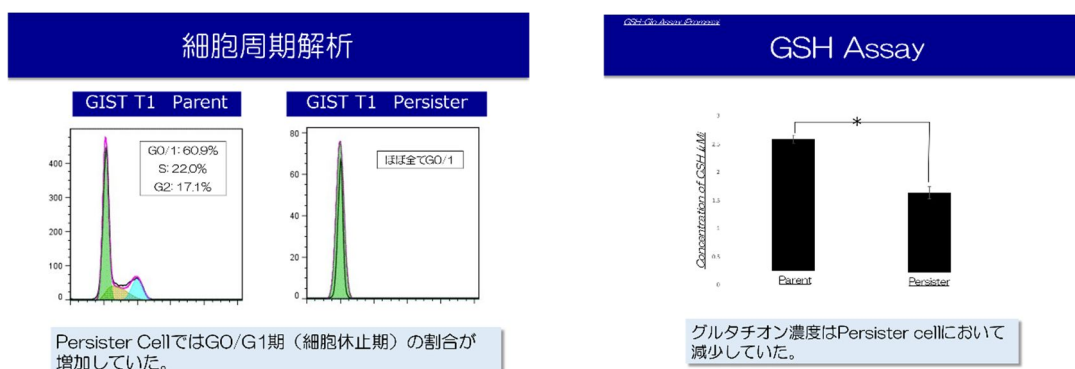
3. 研究の方法

In vitro: GIST T1 細胞株に対してイマチニブ 2 μ M を 9 日間投与後の遺残細胞に関して主に生化学的手法を用いて検討を行った。

In vivo: GIST T1 細胞株の皮下移植ヌードマウスにてイマチニブ投与後の GPX4 阻害剤の効果を検討した。

4. 研究成果

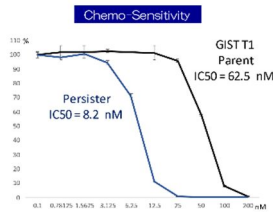
フローサイトメトリーを利用した細胞周期解析にて遺残細胞において細胞休止期である G0/G1 期の比率の増加を確認した。イマチニブ投与後遺残 GIST 細胞は自ら細胞休止期に入ることによって化学療法ストレスから回避していると考えられた。また遺残細胞においては細胞内の糖代謝の変化から NADPH が低下し、その結果抗酸化物質であるグルタチオンの低下を招き、酸化ストレスに対する脆弱性を示すと考えられた。



遺残細胞内の細胞内グルタチオン濃度は親株において 1.68nM、遺残細胞で 0.58nM であり遺残細胞で低下がみられた。また NADPH に関しても親株 2.2 μ M、遺残細胞 0.4 μ M と遺残細胞で低下

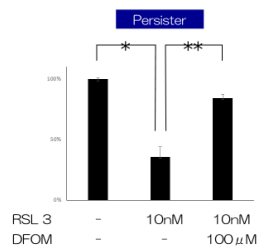
がみられた。さらに細胞内へのグルコースの取り込みが遺残細胞で低下していることを Glucose-Uptake Assay にて確認した。酸化ストレス誘導薬である GPX4 阻害薬に対する Chemo sensitivity assay では、親株 (IC50>500nM) に比較して遺残細胞 (IC50=18nM) で GPX4 阻害薬に対する感受性を示した。また GPX4 阻害剤の効果はデフェロキサミン、ならびにフェロスタチン投与にて減弱された。

GPX4阻害剤への感受性



Persister cellはParentと比較するとGPX4に感受性を示した。

鉄キレート剤の効果

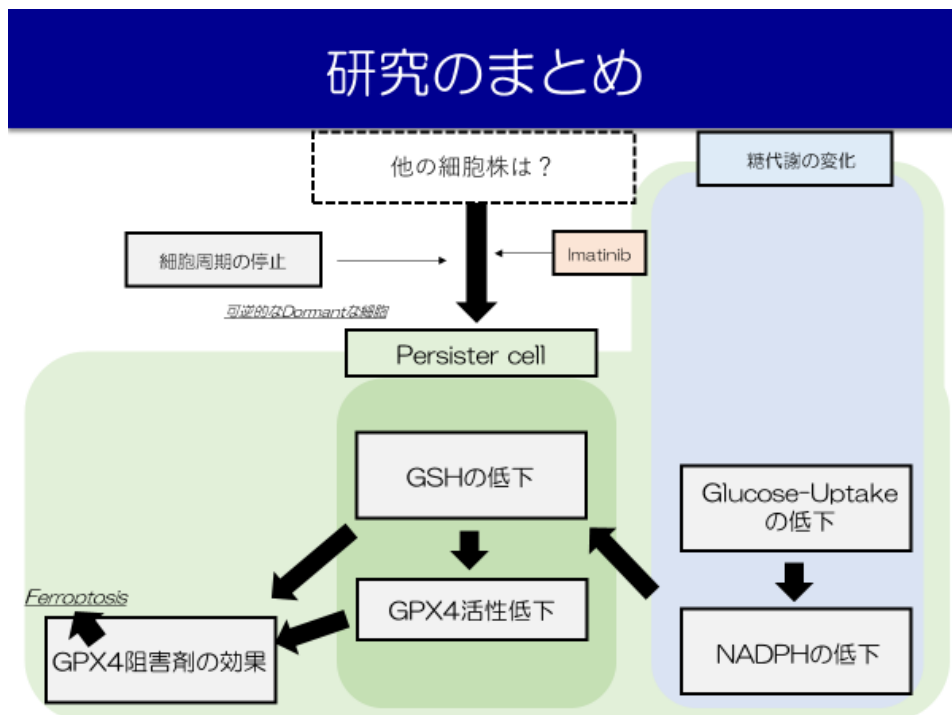


鉄のキレート剤によりRSL3の効果が減弱された。

また遺残細胞において GPX4 阻害剤投与で誘導される細胞死は鉄関連酸化ストレス細胞死であるフェロトーシスが関与している可能性が示唆された。

皮下腫瘍ヌードマウスにおいてもイマチニブ投与後の GPX4 阻害剤の腫瘍増大抑制効果を確認。同様の結果はゲフィチニブ投与後の遺残肺癌細胞においても確認し得た。

皮下腫瘍ヌードマウスにおいてもイマチニブ投与後の GPX4 阻害剤の腫瘍増大抑制効果を確認した。



(今後への発展性)

・本研究では、GIST に対するイマチニブ治療は高い抗腫瘍効果を示す一方で、遺残細胞の存在

が確認されるとともにその性質を確認した。この細胞集団に対して、GPX4 阻害剤によるフェロトーシスによる抗腫瘍効果を確認した。今後新規治療への臨床応用につながる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石田智
2. 発表標題 分子標的治療薬抵抗性消化管間葉系肉腫に対する酸化ストレス誘導を用いた新規治療の検討
3. 学会等名 第72回日本酸化ストレス学会学術集会事務局
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石田智
2. 発表標題 イマチニブ投与後遺残GIST細胞に対するGPX4阻害剤の有用性の検討
3. 学会等名 第28回日本がん転移学会学術集会・総会
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
---------------------------	-----------------------	----

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