

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18599

研究課題名(和文) 難治性尿路上皮癌に対するフェロトーシス誘導による新規治療戦略

研究課題名(英文) Establishment of a novel therapy for urothelial carcinoma by ferroptosis

研究代表者

長谷川 政徳 (HASEGAWA, Masanori)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：50383823

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：尿路上皮癌細胞株に対して一価不飽和脂肪酸(MUFA)であるオレイン酸を前投与するとフェロトーシス感受性は著明に低下し、感受性に生体膜の脂質組成が大きく影響することが明らかとなった。一般に癌細胞はde novoのMUFA合成の責任酵素であるSCD1発現が上昇しており、尿路上皮癌細胞株においてSCD1抑制はフェロトーシス感受性を上昇させたことから、尿路上皮癌はMUFA合成促進によりフェロトーシスから逃避していると推測された。さらに、ゲムシタピンはSCD1を低下させたことから、生体膜のMUFA比率を低下させる可能性があり、ゲムシタピンとフェロトーシス誘導薬との併用療法の可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脂質は様々なメディエーターとして機能することが明らかとなっているが、水に溶けない物性、ゲノムにコードされない理由から、解析し難く、多くの脂質機能が未解明であり、癌におけるその重要性の認識は不十分である現状にある。脂質を標的とした治療法は現在臨床で応用されておらず、脂質をターゲットとしたフェロトーシス誘導による癌の制圧は全く新しい治療戦略であると考えている。前治療抵抗性となった後にも有効である可能性があり、転移の予防医療や、癌幹細胞を標的とした治療といったこれまでに実現されていない治療概念への発展も期待される。

研究成果の概要(英文)：Pre-administration of oleic acid, a monounsaturated fatty acid (MUFA), to urothelial cancer cell lines significantly reduced ferroptosis susceptibility, and the lipid composition of biological membranes have a significant impact on ferroptosis susceptibility. In general, cancer cells have increased expression of SCD1, which is the responsible enzyme for de novo MUFA synthesis, and inhibition of SCD1 increased ferroptosis sensitivity in urothelial cancer cell lines. Furthermore, gemcitabine decreased SCD1 expression, and it may reduce the MUFA ratio of membrane, and we have found the possibility of combination therapy with gemcitabine and ferroptosis inducers.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：尿路上皮癌 フェロトーシス

## 1. 研究開始当初の背景

腎盂癌、尿管癌、膀胱癌等の尿路上皮癌の場合、早期であれば手術により根治が期待できる。一方で進行癌に対しては、シスプラチンとゲムシタピンを併用した化学療法が施行されているが、一定期間の奏功の後再発してしまう。尿路上皮癌では、分子標的薬の有効性が乏しく、抗癌剤に抵抗性となった際には病勢のコントロールは困難であり、全く新しい視点からのアプローチの構築が喫緊の課題である。

一般に、細胞死のメカニズムとして、アポトーシス、ネクローシス、オートファジーなどが知られているが、2012年にフェロトーシスという細胞死の概念が新しく提唱された (Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. Dixon SJ et al. Cell. 149(5):1060-72. 2012)。フェロトーシスは既知の細胞死メカニズムとは全く異なり、鉄依存的な活性酸素種の発生と過酸化した脂質の蓄積によって細胞死をきたす機序である。Hangauerらは、乳癌細胞においてHer2で増殖中の細胞には影響がなく、ラパチニブによりHer2を抑えたときに残存する細胞集団が鉄依存性のフェロトーシスを起こしやすいことを発見し、2017年11月のNature誌に報告した (Drug-tolerant persister cancer cells are vulnerable to GPX4 inhibition. Hangauer MJ et al. Nature. 551(7679):247-50. 2017)。その細胞集団において、脂質の過酸化を抑制し、フェロトーシスから細胞を守るグルタチオンペルオキシダーゼ4 (GPX4) への依存性が高まっていることを明らかとし、GPX4阻害剤であるRSL3とML210は治療後の残存細胞に著効した。これらの結果は、分子標的治療後に残存する細胞を根治可能なGPX4を中心としたフェロトーシス誘導という新しい標的を発見し、再発の問題を新しい方向から解決できる可能性が提示された点で非常に高く評価される。

## 2. 研究の目的

本研究では、シスプラチンおよびゲムシタピン抗癌剤に抵抗性を有する尿路上皮癌細胞株を用いて、フェロトーシスを中心とした治療抵抗性の獲得機序を解明する。フェロトーシスから細胞を保護するGPX4の阻害 (フェロトーシス誘導剤) によるフェロトーシス誘導は抗癌剤抵抗性の改善につながるか検討する。本研究は、抗癌剤抵抗性の尿路上皮癌に対するフェロトーシス誘導による新規治療戦略の構築を目的とし、将来的な臨床応用を見据えた基礎研究を主軸とする。

## 3. 研究の方法

当初の研究計画では、尿路上皮癌は抗癌剤耐性獲得後にフェロトーシス感受性が上昇することを期待していたが、下記のごとく予想に反して感受性は変化しなかった。次に、生体膜のリモデリングによるフェロトーシス誘導について検討するため、以下の実験を計画、遂行した。

### 【概要】

細胞膜を構成するリン脂質は極性基に2つの脂肪酸が接続し疎水基をなし、疎水基には様々な脂肪酸が接続するが、4個の二重結合を有するアラキドン酸に代表されるような“多価不飽和脂肪酸 (PUFA)”の二重結合が過酸化されることで、脂質の過酸化が起こりフェロトーシスを起こす。一方で、de novoの脂肪酸合成では、グルコースの代謝過程で供給されるアセチルCoAが原料となり、飽和脂肪酸から9-脂肪酸デサチュラーゼ (SCD1) により

“一価不飽和脂肪酸(MUFA)”であるオレイン酸、パルミトレイン酸が生成される。MUFAは、リン脂質におけるPUFA占拠率を低下させることでフェロトーシスを抑制することが報告されている(Cell Chem Biol. 2019)。

#### 【研究方法】

(1) 外的脂質添加によるリポクオリティの変化とフェロトーシス感受性：培養液中にPUFAを添加し、リポドミクス解析によりPUFAが実際にリン脂質においてその比率が増加していることを確認する。また、PUFA存在下にてGPX4阻害剤へ暴露し、感受性が増強していることを確認する。一方、MUFAを添加し、同様にリン脂質における組成変化を確認後、GPX4阻害剤への感受性が低下していることを確認する。リン脂質の組成は、リポドミクス解析を施行する。

(2) SCD1によるde novo脂肪酸合成とフェロトーシス感受性：SCD1は細胞におけるde novo脂肪酸合成の重要酵素であり、MUFAを合成する責任酵素である。SCD1阻害剤であるCAY10566を暴露し、GPX4阻害剤に対する感受性が増強されるか確認する。

(3) 抗癌剤との併用：シスプラチンもしくはゲムシタピンとフェロトーシス誘導剤との併用による相乗的な細胞死誘導機序について検討する。また作用機序について、de novo経路のMUFA合成責任酵素であるSCD1の発現調節に着目し検討する。

#### 4. 研究成果

これまでに、尿路上皮癌細胞株であるT24株およびUMUC3株を用いて、シスプラチンとゲムシタピン抗癌剤に対する抵抗株を作製した。これらの細胞株は、各抗癌剤に抵抗性を示す一方、フェロトーシスから細胞を保護するグルタチオンペルオキシダーゼ4(GPX4)の阻害剤であるRSL3に感受性を示した。RSL3による細胞死はフェロトーシスを抑制するferrostatin-1により抑制され、アポトーシスを抑制するカスパーゼ阻害薬Z-VAD-FMKで抑制されなかったことから、生じた細胞死はフェロトーシスであることが明らかとなった。抵抗株においてフェロトーシス感受性が高いことを予測していたが、これらの抵抗株においては親株と感受性は変わらなかった。反対に、フェロトーシス誘導による殺細胞効果は、抗癌剤に抵抗性を獲得後も有効であることが確認され、抗癌剤抵抗性を含む難治性尿路上皮癌に対する新規治療法となりうる可能性が示唆された。

尿路上皮癌細胞株(T24およびUMUC3)に対して実際にMUFAであるオレイン酸200microMもしくはパルミトレイン酸200microMを24時間前投与することでフェロトーシス感受性は著明に低下した。逆に、アラキドン酸100microMを24時間前投与することでフェロトーシス感受性は著明に亢進した。リポドミクス解析により各脂肪酸を加えると、生体膜における比率が上昇することを確認した。以上より、フェロトーシス感受性に生体膜の脂質組成が大きく影響することが明らかとなった。一般に癌細胞はSCD1発現が上昇していることから、オレイン酸合成が促進することでフェロトーシスから逃避していると考えられ、CAY10566によるSCD1の抑制はフェロトーシス感受性を上昇させた。また、尿路上皮癌の治療にゲムシタピンが投与されるが、このゲムシタピンはSCD1を低下させたことから、生体膜のMUFA比率を低下させる可能性があり、これまでにゲムシタピンとフェロトーシス誘導薬との併用療法の可能性を見出しており、現在新規治療法の構築を目指している。これらの知見は尿路上皮癌において報告はなく、抗癌剤抵抗性を含む難治性尿路上皮癌に対する新規治療法となりうる可能性が示唆された。

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 Shigeta Keisuke, Hasegawa Masanori, Kikuchi Eiji, Yasumizu Yota, Kosaka Takeo, Mizuno Ryuichi, Mikami Shuji, Miyajima Akira, Kufe Donald, Oya Mototsugu	4. 巻 111
2. 論文標題 Role of the MUC1 C oncoprotein in the acquisition of cisplatin resistance by urothelial carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3639 ~ 3652
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14574	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0件

〔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
---------	---------