

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：32612

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K23009

研究課題名(和文)治療抵抗性がんに対するxCT-ALDH併用阻害治療におけるCOX-2の意義

研究課題名(英文)The function of cox-2 in the inhibition of xCT and ALDH

研究代表者

大槻 雄士(OTSUKI, Yuji)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任助教

研究者番号：10875412

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：フェロトーシスの誘導時に細胞内でのCOX-2の発現が上昇し、アラキドン酸からの Prostaglandin-2 (PGE2) の産生も亢進することが確認された。これらの実験結果を元に、酸化ストレスがアラキドン酸カスケードに与える影響を解析した結果、細胞内の酸化ストレスを亢進させた場合、アラキドン酸カスケードの調整によって酸化ストレス抵抗性分子である Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) の発現を亢進させ、細胞がフェロトーシスからの生存を図っていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

フェロトーシスを利用した抗がん剤の開発は昨今注目されており、新しい治療法が生まれつつある状態である。申請者らはがん幹細胞に関する研究から、その治療抵抗性のメカニズムとして活性酸素に起因する鉄依存性細胞死(フェロトーシス)を回避する機構が重要であることをつきとめている。その中で、フェロトーシス誘導性抗がん剤における抵抗性のメカニズムなどの解明が進むことで、より本開発が進むことが見込まれる。その上において、今回のようなフェロトーシスに関わる分子の発現解析は対処患者の絞り込みや、治療法の改善方針なども含めて大きく貢献できるため、社会的意義は非常に高いものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：It was confirmed that intracellular expression of COX-2 was increased during the induction of ferroptosis, and that the production of Prostaglandin-2 (PGE2) from arachidonic acid was also enhanced. Based on these experimental results, we analyzed the effect of oxidative stress on the arachidonic acid cascade. It was suggested that the expression of 2-related factor 2 (Nrf2) was enhanced and that the cells survived ferroptosis.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：フェロトーシス COX-2 xCT

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

申請者らは長年のがん幹細胞に関する研究から、その治療抵抗性のメカニズムとして活性酸素に起因する鉄依存性細胞死(フェロトーシス)を回避する機構が重要であることをつきとめた(Cancer Cell 2011; Nat Commun 2012; Cancer Res 2013; Cancer Res 2016)。特に活性酸素による脂質をはじめとする細胞内分子の酸化を抑制するために、シスチン輸送体 xCT を介した細胞外からのシスチンの取り込みと、それに続くグルタチオン合成が重要であり、xCT は次世代のがん治療の標的として有望であると考えた。この概念を証明するため、xCT 阻害効果を持つ既存薬スルファサラジン(SSZ)を用いた医師主導の臨床試験を実施し、CD44v 陽性がん幹細胞の減少という POC の取得(Gastric Cancer 2016)、そして従来の抗がん剤との併用で手術不能進行性肺がんの患者において有意な無増悪生存期間延長を得た(Cancer Sci 2017)。これら治験の経験に基づき、SSZ の効果を増強・拡大するために、SSZ の合成致死誘導剤スクリーニングを実施し(Oncotarget 2019)、過去に狭心症治療薬として使用されていたオキシフェドリン(OXY)を SSZ の合成致死誘導剤として同定した(Cancer Sci 2020)。OXY はアルデヒド脱水素酵素(ALDH)の共有結合性阻害剤として働き、SSZ 等のグルタチオンを枯渇させる治療との併用で、過酸化脂質由来の細胞傷害性アルデヒド 4-HNE の細胞内蓄積を誘導し、殺細胞効果を強力に増大させ、多くのがん細胞、特に治療抵抗性となったがん細胞に高い効果を示すことを発見した。

### 2. 研究の目的

グルタチオンは細胞内の活性酸素種と過酸化脂質の異常な蓄積を防ぎ、フェロトーシスからがん細胞を保護する。そのため、GSH 合成を促進するシスチン-グルタミン酸アンチポーターサブユニット xCT の阻害剤が抗がん剤として臨床で有用であることを申請者らは示してきた。しかし、xCT 阻害剤では抵抗性を示すがん細胞あるいは抵抗性を獲得するがん細胞が存在し、問題となっている。申請者は、血管拡張薬オキシフェドリンが細胞内のアルデヒドデヒドロゲナーゼを阻害すること、オキシフェドリンと xCT 阻害剤を併用することで、種々のがん細胞において協調的に細胞死を誘導し腫瘍抑制をきたすことを発見した。さらに併用療法時に Cyclooxygenase-2 (COX-2)等の遺伝子群の発現が上昇することも確認した。本研究では、この併用療法の治療効果を高めるために、COX-2 等の遺伝子の発現が上昇する分子機構を解明し、がん治療応用への基盤を固める。

### 3. 研究の方法

#### (1) フェロトーシス誘導時の COX-2 発現の確認

複数の細胞を用い、COX-2 のレポーター遺伝子(COX-2 プロモーターの下流で蛍光色素の発現が誘導されるベクター)を導入したレポーター細胞を作成しフローサイトメトリーで確認する。その他ウエスタンブロッティング等の方法でも同様に確認を行う。

#### (2) アラキドン酸カスケードとの関連解析

アラキドン酸は COX-2 を介して Prostaglandin-E2 (PGE2) に変換される。この PGE2 が細胞に及ぼす影響を検討することで、COX-2 の発現によるがん細胞への影響を検討した。具体的には、細胞を PGE2 で処理することでフェロトーシスにおける細胞への影響を検討する。また、COX-2 の発現変化によるがん細胞への影響も検討する。

#### (3) その他のアラキドン酸カスケードの解析

また、アラキドン酸は 12, 15-Lipoxygenase (12, 15-LOX) を介して細胞毒性アルデヒドに変換される。そのため、これらの分子発現の変化によるがん細胞への影響も検討した。

### 4. 研究成果

作成したレポーター細胞にてフェロトーシスを誘導したとこと、著明に蛍光色素の発色をフローサイトメトリーにて確認することができた。さらに、同様の実験をウエスタンブロッティングにて行ったところ、同様に発現の上昇を確認した。また、フェロトーシス誘導により PGE2 の細胞内での蓄積が亢進することも確認することができた。これらは大腸がん細胞株、および肺がん細胞株の両方にて確認することができ、がん細胞における普遍性があることも示唆される。

上記で用いた細胞に対し、PGE2 での処理を行うと、フェロトーシス誘導を阻害することが確認できた。これは、過去の報告なども参考に考察すると、抗酸化ストレス遺伝子である NF-E2-related factor 2 (Nrf2) が関連していると考えられ、今後この解明も行っていく方針である。また、COX-2 をノックダウンすることでフェロトーシスをより強力に誘導することにも成功しており、COX-2 および PGE2 のフェロトーシス関連性が示された。

さらに、12, 15-LOX のノックダウンにより同様にフェロトーシスを抑制することを発見した。

つまり、これらのノックダウンにより細胞毒性アルデヒドの蓄積が低下していることが予測された。COX-2およびLOX-12, 15のノックダウンの結果から考えると、COX-12の発現低下はアラキドン酸から細胞毒性アルデヒドをより多く産生させることでフェロトーシスを誘導しているのではないかと考えられた。

本研究により、フェロトーシスとアラキドン酸カスケードの深い関連性が示唆され、今後はこのより詳細な解明を行っていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 Fumihiko Kojimahara, Yuji Otsuki, Hideyuki Saya, Osamu Nagano
2. 発表標題 COX-2-mediated eicosanoid production protects cancer cells from ferroptotic cell death
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

deleteC HOPE賞 受賞式 <a href="https://www.youtube.com/watch?v=30BExEm3DBs&amp;t=3741s">https://www.youtube.com/watch?v=30BExEm3DBs&amp;t=3741s</a> deleteC HOPE賞 受賞者インタビュー <a href="https://www.youtube.com/watch?v=qaELIq1RdH8&amp;t=116s">https://www.youtube.com/watch?v=qaELIq1RdH8&amp;t=116s</a>
--

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