

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02766

研究課題名（和文）xCTを介した治療抵抗性獲得に伴う代謝リプログラミングと癌幹細胞性獲得機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of mechanisms of xCT-mediated cancer therapy resistance accompanied with metabolic reprogramming and cancer stem cell property

研究代表者

永野 修（Nagano, Osamu）

藤田医科大学・腫瘍医学研究センター・教授

研究者番号：30404346

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：小細胞肺癌（SCLC）の初回標準治療はプラチナ製剤併用全身化学療法であるが、その多くが再発・増悪をきたす。しかしながら、再発・増悪したSCLC細胞の治療抵抗性を促進するメカニズムについてはほとんど分かっていない。本研究はSCLC細胞の増悪のメカニズムとして、p62/SQSTM1を介したxCTの発現制御が関与することを明らかにした。さらに、SCLC細胞のシスプラチン抵抗性にはオートファジー不全が関与することを見出した。そこで、p62/SQSTM1を標的とする治療法を開発するために阻害剤を探索し、p62/SQSTM1のタンパク質安定性を低下させることが出来る有望な候補薬を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小細胞肺癌（SCLC）の初回標準治療はプラチナ製剤併用全身化学療法であるが、その多くが再発・増悪をきたす。しかしながら、再発・増悪したSCLC細胞の治療抵抗性を促進するメカニズムについてはほとんど分かっていない。このようにアンメットメディカルニーズが高いがん腫においてp62/SQSTM1を介した治療抵抗性メカニズムを明らかにし、新たな候補薬を同定した。この薬剤が臨床応用されれば、SCLCやp62/SQSTM1を高発現する高悪性度のがんに対して新たな治療法の開発に繋がるのが期待でき、広く社会に貢献することが可能になる。

研究成果の概要（英文）：The initial standard treatment for small cell lung cancer (SCLC) is systemic chemotherapy with platinum drugs, but many patients experience relapse or disease progression. However, the mechanisms promoting resistance in relapsed/aggravated SCLC cells remain largely unknown. In this study, we demonstrated that the regulation of xCT expression via p62/SQSTM1 is involved in the progression of SCLC cells. Furthermore, we found that autophagy deficiency contributes to the cisplatin resistance of SCLC cells. Therefore, we searched for inhibitors to develop therapies targeting p62/SQSTM1 and identified promising candidates that can reduce the protein stability of p62/SQSTM1.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：p62/SQSTM1 xCT 抗がん剤耐性 オートファジー

### 1. 研究開始当初の背景

近年、xCT 阻害剤に感受性の高い癌腫の選定を行った際、小細胞肺癌 (SCLC) 細胞が細胞増殖に伴う内因性の活性酸素種の産生が高いものの、xCT の発現レベルが低いために、xCT 阻害剤やフェロトーシス誘導剤に対して高い感受性を示すことを見出している。SCLC は原発性肺癌の 15% を占め、腫瘍の増殖が速く、早期に全身転移しやすい性質を持つ。臨床病期は限局型と進展型に分けられ、診断時に 70% 程度が進展型に分類される。この進展型 SCLC は標準治療を行った場合でも生存期間中央値が 8-13 ヶ月と予後不良であり、初回標準治療のプラチナ製剤併用全身化学療法に対して、ほぼ全例で再発、増悪をきたすことが知られている。最近の検討から申請者は、治療抵抗性を獲得した SCLC 細胞では、xCT の発現が強く誘導され、癌幹細胞の特性であるスフェア形成能やマウスにおける腫瘍形成能が亢進することを見出した。このような SCLC 細胞の造腫瘍能の獲得は xCT の過剰発現によっても再現され、xCT の発現上昇は SCLC 細胞の腫瘍形成能の亢進に繋がることが分かった。一方、xCT に依存性が高い CD44v 陽性扁平上皮癌である OSC19 細胞を用いて xCT 阻害剤耐性株 (OSC19-SSZR) を作成したところ、システイン合成系の活性化などの xCT 非依存的グルタチオン代謝へのシフトが観察されるとともに、さらに腫瘍形成能の低下と腫瘍関連遺伝子群の発現低下が誘導された。このように、xCT を介した代謝リプログラミングは、細胞の遺伝子発現に影響を与え、癌細胞の造腫瘍能に関与していることが示唆されたため、治療後に残存した SCLC 細胞では、癌治療のストレスからオートファジー不全が生じ、その結果、p62/SQSTM1 の発現が誘導され、xCT を介した代謝リプログラミングと癌幹細胞様性質の獲得が生じるのではないかという仮説を立てた。この仮説を検証するため、本研究計画を立案した。

### 2. 研究の目的

進展型小細胞肺癌 (SCLC) の初回標準治療はプラチナ製剤併用全身化学療法であるが、ほぼ全例で再発、増悪をきたす。しかしながら、再発・増悪した SCLC 細胞の治療抵抗性を促進するメカニズムについてはほとんど分かっていない。申請者はこれまで、固形癌の主要な癌幹細胞マーカーである CD44 バリエーションフォーム (CD44v) が、細胞膜上でシステイン-グルタミン酸交換輸送体 xCT を安定化することで癌細胞の酸化ストレス抵抗性を高め、腫瘍の増大や治療抵抗性に寄与していることを見出している。一方、固形癌のなかでも xCT 発現が低い SCLC 細胞では xCT の機能的役割については、ほとんど分かっていない。近年、申請者らは治療抵抗性を獲得した SCLC 細胞は、xCT が高発現となり、スフェア形成能や造腫瘍能といった癌幹細胞様の性質を獲得するようになることや、オートファジー制御因子 p62/SQSTM1 が xCT 発現に関与していることを新たに見出した。当該研究では SCLC の悪性化に関わる p62/SQSTM1 および xCT の機能的役割を明らかにするため、xCT 発現が癌幹細胞性に与える影響の解析 p62/SQSTM1 を介した xCT の発現制御機構 新規 SCLC マウスモデルと xCT 標的治療の開発に関する研究を行う。さらに、我々が最近開発した新規 xCT 阻害剤と併用剤による合成致死誘導療法の抗腫瘍効果について新規 SCLC マウスモデルを用いて解析することで臨床応用に向けた非臨床 POC の取得を目指す。

### 3. 研究の方法

SCLC 細胞のがん幹細胞性や治療抵抗性における xCT の役割とその制御機構として p62/SQSTM1 に着目して以下のような研究を実施した。

#### xCT 発現ががん幹細胞性質に与える影響 (令和 3~4 年度)

がん幹細胞の性質である腫瘍開始能と抗がん剤抵抗性における xCT の役割を明らかにするために xCT 低発現 SCLC 細胞株に xCT を過剰発現した SCLC-xCT を樹立し、腫瘍開始能と抗がん剤抵抗性について調べた。

#### p62/SQSTM1 を介した xCT の発現制御機構の解明 (令和 3~4 年度)

SCLC ではシスプラチン耐性化に伴って xCT の発現が亢進していることを見出したため、シスプラチン耐性株 SCLC-CP<sub>r</sub> を用いて xCT の結合タンパク質を網羅的に解析し、xCT と p62/SQSTM1 結合することを見出したため、さらに変異体を作成して、両者のタンパク結合が xCT の活性に関与するかについて調べた。

#### 小細胞肺がんの腫瘍形成における p62/SQSTM1 の役割の解明 (令和 5 年度)

p62/SQSTM1 がどのように SCLC 細胞で発現が亢進するかについて調べたところ、オートファジー不全状態が関与していることを発見したため、オートファジー関連遺伝子である ATG7 をノックアウトした SCLC 細胞を作成して、p62/SQSTM1 高発現 SCLC 細胞を作成して p62/SQSTM1

の役割に関する解析を行った。

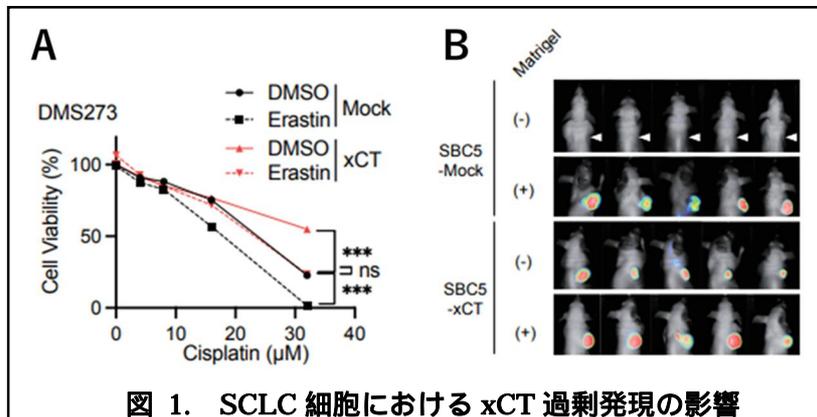
### p62/SQSTM1 阻害剤の探索と治療実験(令和 5 年度)

p62/SQSTM1 タンパク質の安定性を速やかに低下させることが可能な薬剤 Compound X を同定した。そこで、この薬剤を使用して p62/SQSTM1 を介した xCT の発現制御システムへの影響や SCLC 細胞のシスプラチン感受性およびフェロトーシス感受性の変化を検討した。

## 4. 研究成果

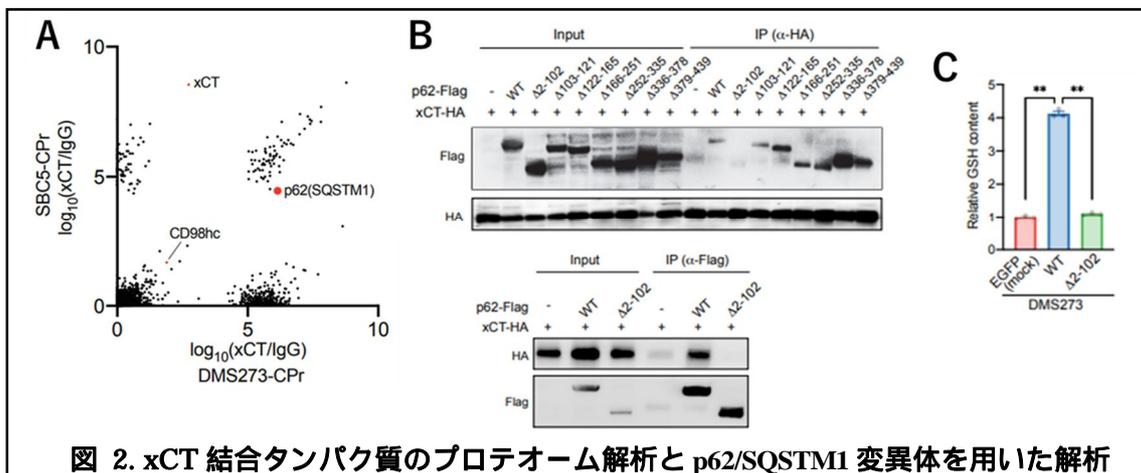
### xCT 発現ががん幹細胞性質に与える影響 (令和 3~4 年度)

がん幹細胞の性質である腫瘍開始能と抗がん剤抵抗性における xCT の役割を明らかにするために xCT 低発現 SCLC 細胞株に xCT を過剰発現した SCLC-xCT を樹立し、腫瘍開始能と抗がん剤抵抗性について調べた。その結果、SCLC に xCT を過剰発現することでシスプラチン感受性の低下が誘導され、xCT 阻害剤で戻ることから、xCT の活性亢進が SCLC のシスプラチン抵抗性に関与することが分かった(図 1A)。また、マウス皮下腫瘍の形成に関して検討したところ xCT の高発現は腫瘍促進する細胞外マトリクス非存在下での intrinsic な腫瘍形成能を促進することが分かった(図 1B)。このことから xCT 低発現細胞の一つである SCLC 細胞における xCT の発現亢進は抗がん剤抵抗性と腫瘍形成能を促進させる機能的役割があることを確認した。



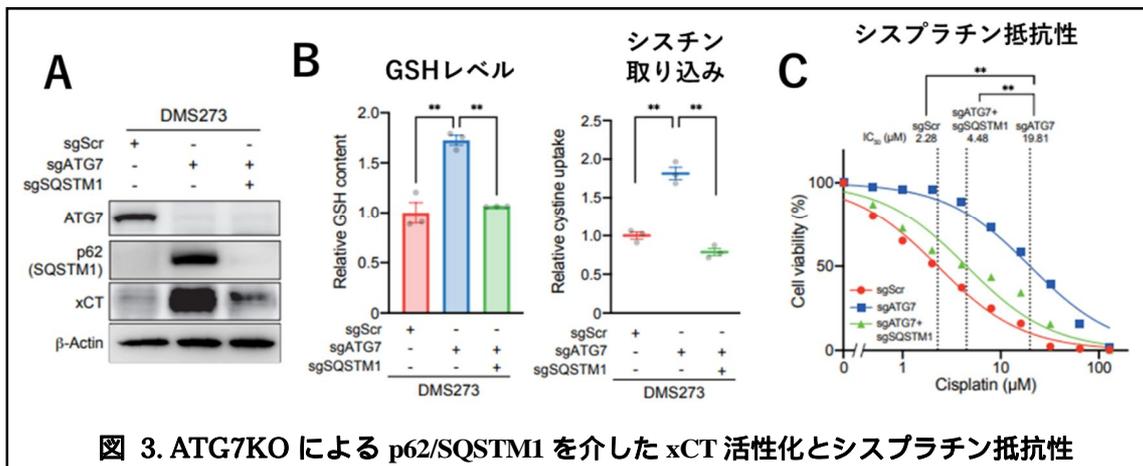
### p62/SQSTM1 を介した xCT の発現制御機構の解明

SCLC ではシスプラチン耐性化に伴って xCT の発現が亢進していることを見出したため、シスプラチン耐性株 SCLC-CPr を用いて xCT の結合タンパク質を網羅的に解析し、xCT と p62/SQSTM1 結合することを見出した(図 2A)。さらに変異体を作成して p62/SQSTM1 の N 端 2-102 で xCT と結合することを見出した(図 2B)。そこで、この部位の欠失変異体を導入した安定発現細胞株を作成し細胞内の GSH レベルを比較した。その結果、xCT と結合しない 2-102 では SCLC 細胞の抗酸化能に関わる GSH 合成が低下していることが分かった。



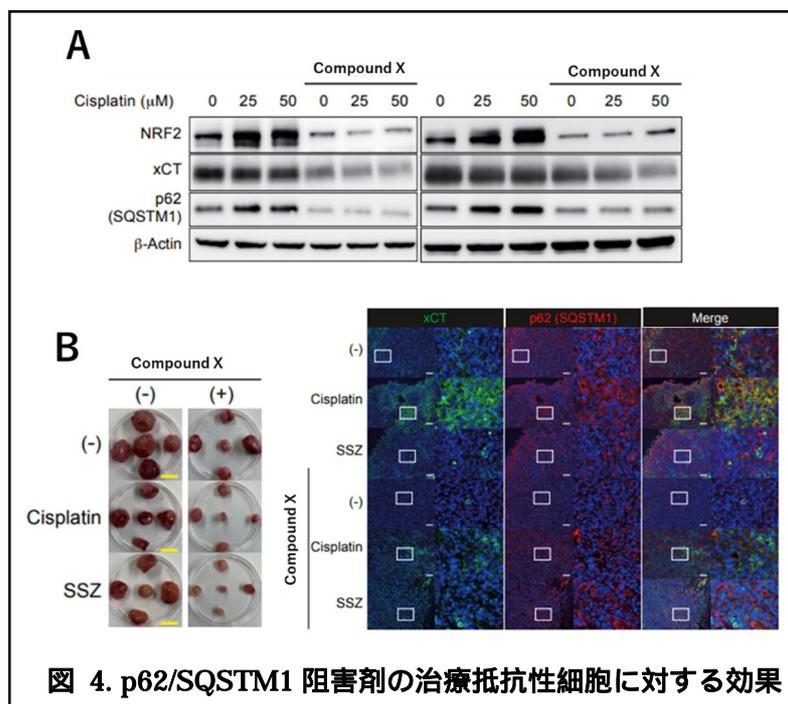
### 小細胞肺がんの腫瘍形成における p62/SQSTM1 の役割の解明

p62/SQSTM1 がどのように SCLC 細胞で発現が亢進するかについて調べたところ、オートファジー不全状態が関与していることを発見したため、オートファジー関連遺伝子である ATG7 を CRISPR/CAS9 システムでノックアウトすることにより、p62/SQSTM1 高発現 SCLC 細胞を作成して p62/SQSTM1 の役割に関する解析を行った。その結果、ATG7 をノックアウトすることで、p62/SQSTM1 タンパク質の安定化と xCT の発現上昇が生じることが分かった(図 3A)。さらに、細胞内 GSH レベルの上昇やシスチン取り込みの亢進といった xCT の活性亢進を示唆するデータが得られた(図 3B)。そこで次にシスプラチン抵抗性にオートファジー不全や p62/SQSTM1 が関与するかについて調べたところ、ATG7 遺伝子のノックアウトによって生じるシスプラチン抵抗性は p62/SQSTM1 のダブルノックアウトによって元に戻ることが分かった。このように SCLC 細胞ではオートファジーが抑制されることで、p62/SQSTM を介した xCT の活性化やシスプラチン抵抗性が生じると考えられた。



### p62/SQSTM1 阻害剤の探索と治療実験

p62/SQSTM1 が NRF2 シグナルの標的タンパク質でもあることから、関連する阻害剤をスクリーニングし、p62/SQSTM1 と xCT タンパク質の安定性を速やかに低下させることが可能な薬剤 Compound X を同定した(図 4A)。そこで、この薬剤を使用して p62/SQSTM1 を介した SCLC のシスプラチン感受性およびフェロトーシス感受性の変化を SCLC-CP<sub>r</sub> 細胞を用いたマウス皮下腫瘍モデルを用いて生体レベルで検討した。その結果、シスプラチンの投与は、SCLC の xCT や SQSTM1 の発現を亢進させるものの、CompoundX の併用によって抑制できることが分かった。これにより p62/SQSTM1 を標的とする治療は治療抵抗性細胞を取り除き、治療感受性を高めるのに有効であることを明らかにすることが出来た。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tsuchihashi Kenji, Hirata Yuki, Yamasaki Juntaro, Suina Kentaro, Tanoue Kenro, Yae Toshifumi, Masuda Kenta, Baba Eishi, Akashi Koichi, Kitagawa Yuko, Saya Hideyuki, Nagano Osamu	4. 巻 30
2. 論文標題 Presence of spontaneous epithelial-mesenchymal plasticity in esophageal cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 101246 ~ 101246
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2022.101246	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yamasaki Juntaro, Hirata Yuki, Otsuki Yuji, Suina Kentaro, Saito Yoshiyuki, Masuda Kenta, Okazaki Shogo, Ishimoto Takatsugu, Saya Hideyuki, Nagano Osamu	4. 巻 113
2. 論文標題 MEK inhibition suppresses metastatic progression of KRAS-mutated gastric cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 916 ~ 925
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15244	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 5件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 永野修
2. 発表標題 がん転移におけるフェロトーシス抵抗性
3. 学会等名 第31回日本がん転移学会学術集会・総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 永野修
2. 発表標題 シスチントランスポーターxCTとALDHを標的とした新しいがん治療
3. 学会等名 日本薬物動態学会第37回年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Osamu Nagano
2. 発表標題 Development of cancer therapy by simultaneous targeting of cystine-glutamate antiporter xCT and aldehyde dehydrogenase
3. 学会等名 The Cold Spring Harbor Asia conference on Iron, Reactive Oxygen Species & Ferroptosis in Life, Death & Disease, AWAJI, JAPAN (招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Osamu Nagano
2. 発表標題 Novel approach for cancer therapy by simultaneous targeting of xCT-dependent cystine transport and aldehyde dehydrogenase activity
3. 学会等名 Redox Week in Sendai 2022 (招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 永野修
2. 発表標題 Therapeutic targeting of redox system in cancer stem cells
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会(招待講演)
4. 発表年 2021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
---------	---------