

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06965

研究課題名（和文）腫瘍細胞の細胞外脂質依存性を利用した新規がん治療モデルの確立

研究課題名（英文）Establishment of a novel anti-cancer strategy model utilizing extracellular lipid addiction of tumor cells

研究代表者

山本 浩平（Yamamoto, Kouhei）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号：50451927

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）：細胞外脂肪酸の減少によるGPX4のタンパクレベルの減少のメカニズムについて、細胞実験において、FABP5がGPX4の発現量をタンパクレベルでコントロールしていることが確認された。この現象は細胞外の脂肪酸の量によるものではなく、細胞外のセレンの濃度が細胞内のGPX4に大きく影響をおよぼすことが明らかとなった。これは同じグルタチオンペルオキシダーゼ群であるGPX1においても同様な現象が認められた。一方で同じくセレノプロテインであるTXNRD1においては細胞外のセレン量による変化はほとんど認められないという、興味深い結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

セレン元素を必須とするセレノプロテインのなかでもグルタチオンペルオキシダーゼ群での細胞外セレン元素量に対する影響が強く、TXNRD群ではその影響がほとんど認めないことから、セレノシステイン残基を用いたセレン元素の取り込みに関し、セレノプロテイン間で大きなメカニズムの違いが存在することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Regarding the mechanism of the decrease in protein levels of GPX4 due to a decrease in extracellular fatty acids, cellular experiments confirmed that FABP5 controls the expression level of GPX4 at the protein level. This phenomenon was not due to the amount of extracellular fatty acids, but rather to the concentration of extracellular selenium, which has a significant effect on intracellular GPX4. This was also the case for GPX1, a member of the same glutathione peroxidase group. On the other hand, the selenoprotein TXNRD1 was not significantly affected by extracellular selenium levels, an interesting finding.

研究分野：腫瘍病理学

キーワード：がん 細胞死 フェロトーシス 新規治療戦略

1. 研究開始当初の背景

白血病や悪性リンパ腫をはじめとしたがん細胞において、脂質代謝の亢進が細胞死の抑制や増殖能の亢進など、がんの悪性形質の増強に関わっていることが近年次々と報告され、悪性腫瘍における脂質代謝のリモデリングに注目が集まっている。脂質、とくに脂肪酸の代謝の亢進には脂肪酸を得ることが必須であり、その方法として細胞内での脂肪酸合成、細胞外の脂質の取り込みがある。予備実験としてウシ胎児血清から脂質を除去した細胞培養液(脂質除去培地)を用いて種々の悪性リンパ腫細胞株の培養を行ったところ、脂質除去培地で72時間培養後、複数の悪性リンパ腫細胞株が死滅するという結果が得られた。この細胞死はフェロトーシス(後述)阻害剤やビタミンE添加、脂質の再添加により完全にキャンセルされた。さらに、この細胞死が起こる際、フェロトーシスのkey negative regulatorである脂質抗酸化酵素GPX4がタンパクレベルで急激に減少する現象が確認された。

2. 研究の目的

この興味深い予備実験は、悪性リンパ腫細胞がフェロトーシスを免れるために細胞外の脂質に生存を依存していることを意味し、いわば“Extracellular lipid addiction(ELA)”という状態にあることを意味する。細胞外脂質が細胞内でどのように代謝され、細胞外脂質が欠乏した状態ではどのような代謝変化が起こるか、そしてELA特性に関する腫瘍細胞の分子生物学的特徴は何か、ひいてはこれら2つの知見を合わせることで細胞外に脂質が存在する生理的環境下でもターゲット分子を制御することでELAによる細胞死を引き起こすことが可能かどうか、検討を行った。

3. 研究の方法

ELA下げ減少するGPX4の代謝と細胞生存に関する検討

データベース解析によるELAに関わる遺伝子の検索と分子生物学的検討

セレノプロテインタンパクのセレン代謝による影響に関する検討

4. 研究成果

脂質除去に伴うフェロトーシスがGPX4のタンパクレベルでの減少・枯渇によるものであるかを確かめるため、GPX4の過剰発現細胞株を作製し、脂質除去培地で培養したところ、コントロールの細胞にくらべ有意に細胞生存率の改善が認められた。さらに、脂質除去培地において酸化ストレス(ROS)の蓄積が生じることをフローサイトメトリーの系を用いて確認を行った。細胞内に脂質を取り込むメカニズムとして、データベースリサーチにて悪性リンパ腫で発現の亢進が確認されるFABP5遺伝子に着目し、FABP5ノックアウト細胞を作製した。FABP5ノックアウト細胞ではコントロール細胞に比して細胞増殖がやや抑制される傾向がみられたが、ノックアウト自体がフェロトーシスなどの細胞死を誘導せず、さらに脂質除去培地での培養系では明らかなフェロトーシスの増強は確認されなかった。

さらにFABP5の機能を調べるため、FABP5が脂肪酸結合の他GPX4の生合成や代謝に関与しているかを確認するため、FABP5ノックアウト細胞のほか、FABP5ノックダウンおよびFABP5過剰発現株の樹立を試みた。具体的には、shFABP5およびFABP5過剰発現レンチウイルスベクターを作製し、びまん大細胞型B細胞性リンパ腫細胞株であるMD901にインフェクションを行い、ウエスタンブロットにて発現の減弱および発現増強を確認した。この細胞を用いてGPX4の発現をタンパクレベルで確認したところ、FABP5の減弱によりGPX4の減弱が生じ、逆にFABP5を過剰発現されるとGPX4の発現が増強されることを見出した。興味深いことに、タンパクレベルにてGPX4が変化しているにもかかわらず、mRNAレベルでは明らかな変化が見られなかった。この現象は脂肪酸除去培地においてGPX4のタンパクレベルでの量が激減するにもかかわらず、mRNAレベルでは変化がみられなかったことに類似した変化であった。さらに、GPX1やTXNRD1などのセレノプロテインの発現もコントロールしていることが分かった。FABP5がGPX4をはじめとしたセレノプロテインを翻訳ないし翻訳後修飾により制御している可能性が考えられた。

この現象が細胞外の脂肪酸を介在したものであるかなどについて確認・検討を行ったところ、細胞外の脂肪酸の影響はあってもごくわずかであることが明らかとなった。そこで、細胞外の液体構成物についてさらに検討を行ったところ、細胞外のセレンの濃度が細胞内のGPX4に大きく影響をおよぼすことが明らかとなった。これは同じグルタチオンペルオキシダーゼ群であるGPX1においても同様な現象が認められた。一方で、同じくセレノプロテインであるTXNRD1においては細胞外のセレン量による変化はほとんど認められなかった。GPX4は

FABP5 をなどの脂肪酸調節因子によりその発現量が制御されるとともに、細胞外セレンによる影響も受けることが分かったが、この変化はセレン元素を必須とするセレノプロテインのなかでもグルタチオンペルオキシダーゼ群での影響が強く、TXNRD 群ではその影響がほとんど認めないことから、セレノシステイン残基を用いたセレン元素の取り込みに関し、セレノプロテイン間で大きなメカニズムの違いが存在することが見いだされた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
---------	---------