

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：72602

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15539

研究課題名（和文）カルシウムシグナル伝達を介したフェロトーシス抵抗性の分子機序解明と治療への応用

研究課題名（英文）Molecular mechanisms of ferroptosis resistance mediated by calcium signaling and their therapeutic application

研究代表者

白濱 仁深（SHIRAHAMA, Hitomi）

公益財団法人がん研究会・がん化学療法センター ゲノム研究部・研究員

研究者番号：20838552

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：近年、細胞密度の上昇に伴ってがん細胞がフェロトーシスに抵抗性を示す例が複数報告されているが、その機序は未知の部分が多い。本研究では、予備的検討の結果を踏まえて、まずカルシウムを介したシグナル伝達に着目した検討を行った。一方で、低/高細胞密度を比較したオミクス解析からは、高細胞密度における脂肪酸代謝、特にSCDの亢進が示唆された。実際に複数のメラノーマ細胞株で、細胞密度上昇に伴うSCDの亢進を認めた。さらに、SCD阻害によるフェロトーシス誘導剤への感受性化は、細胞密度の高さに応じて認められた。以上より、高細胞密度におけるフェロトーシス抵抗性に寄与する分子の一つとしてSCDを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

フェロトーシスは比較的最近報告された細胞死の一形態であり、転移性メラノーマをはじめ、複数のがん種がフェロトーシスに脆弱性を示すことから、治療への応用が期待されている。他方で、高細胞密度でフェロトーシス抵抗性があらわれるという報告は、メラノーマのような細胞がひとたび凝集するとフェロトーシス誘導戦略が有効でなくなることを示唆している。本研究ではこの密度依存的なフェロトーシス抵抗性のメカニズム解析に焦点を当て、オミクス解析と生化学実験を通じてSCDがフェロトーシス抵抗性における中心的な役割を果たしていることを明らかにした。この成果は、メラノーマにおける新たながん治療戦略へと繋がることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：In recent years, several studies have reported that cancer cells show resistance to ferroptosis as cell density increases, but the underlying mechanisms are still largely unknown. In this study, based on the results of preliminary investigations, calcium-mediated signal transduction was primarily investigated. On the other hand, omics analyses comparing low and high cell densities suggested that fatty acid metabolism, especially SCD, is upregulated in high cell density. Indeed, several melanoma cell lines showed an increase in SCD with increasing cell density. Furthermore, sensitization to ferroptosis induction by SCD inhibition was observed at higher cell densities. Thus, SCD was identified as one of the molecules that contribute to ferroptosis resistance at high cell densities.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：フェロトーシス 細胞密度 SCD 脂肪酸代謝 脂質代謝 メラノーマ

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

フェロトーシスは過酸化脂質の蓄積によって引き起こされる細胞死である。このフェロトーシスを防ぐため、Glutathione peroxidase 4 (GPX4) を中心とする還元機構を細胞は有する。これまでに転移性メラノーマ (Nature 585:113-118, 2020) をはじめとする複数のがん種が、フェロトーシスに脆弱であることが報告されてきた。一方で最近、細胞の密度が上がることでフェロトーシス抵抗性に向かう例が複数報告され、注目を集めている。実際に我々は、一部のメラノーマ細胞株が、細胞密度の上昇に伴って GPX4 阻害 (フェロトーシス誘導) に抵抗性を示すことを見出してきた。この現象は、体内で転移するメラノーマ細胞がひとたび凝集するとフェロトーシス抵抗性となることを示唆している。そこでこのフェロトーシス抵抗性を解除し、細胞死の回避を防ぐため、密度依存的なフェロトーシス抵抗性のメカニズム解明が求められる。予備的検討からは、小胞体におけるカルシウムイオン (Ca^{2+}) 放出が関与していることが示唆された。

2. 研究の目的

本研究は、密度依存的なフェロトーシス抵抗性のメカニズム解明を目的とする。予備的検討の結果を踏まえて、カルシウムを介したシグナル伝達と密度依存的なフェロトーシス抵抗性との関係に着目した検討から進めた。

3. 研究の方法

本研究を遂行するなかで、研究開始当初の仮説とは異なる結果が得られた。結果の一つひとつを吟味し、次の実験を計画し、最終的に以下に記す方法で研究を遂行した。

(1) カルシウムシグナル伝達と密度依存的なフェロトーシス抵抗性との関連性の検討

密度依存的なフェロトーシス抵抗性を示すメラノーマ細胞株 (A375、LOX-IMVI) をそれぞれ異なる細胞密度で播種し、カルシウムシグナル伝達に関連する試薬とフェロトーシス誘導剤との共処理を行った。カルシウムシグナル伝達に関連する試薬には、 Ca^{2+} キレーター、 Ca^{2+} イオンファ、複数のイオンポンプタンパク質の阻害剤などが含まれる。フェロトーシス誘導剤には、GPX4 阻害剤である RSL3 を用いた。この際、RSL3 と同時にフェロトーシス阻害剤 (Ferrostatin-1; Fer1) を処理する群も作成し、Fer1 処理によって細胞死を免れるかどうかを、細胞死の種類がフェロトーシスであることの指標とした。生存率は、細胞内 ATP 量を基に、薬剤未処理群を基準として算出した。

(2) 異なる細胞密度におけるオミクス情報の比較解析

低/高細胞密度における A375 のトランスクリプトームおよびメタボロームデータの比較解析を実施した。トランスクリプトーム解析はマイクロアレイデータを元に行い、発現量が 50 以上あるプローブのなかで変動 ($p < 0.05$, Fold change ≥ 2) がみられた遺伝子群に関して Metascape を用いた Gene Ontology (GO) 解析を行った。メタボロームデータに関しては、単位体積当たりの量に 1.5 倍以上の変動がみられた代謝物に関して MetaboAnalyst 5.0 を用いた Enrichment 解析を行った。

(3) Stearoyl-CoA desaturase (SCD) と密度依存的なフェロトーシス抵抗性との関連性の検討

まず、密度依存的なフェロトーシス抵抗性を示すメラノーマ細胞株 (A375、G361、LOX-IMVI) を用いて、異なる細胞密度における SCD の遺伝発現およびタンパク質発現を検討した。続いて、異なる細胞密度で播種した A375 と G361 に、SCD 阻害剤 (A939572 または MK8245) と RSL3 を共処理し、RSL3 の感受性変化を検討した。また、A375 の SCD ノックアウト細胞を作成し、異なる細胞密度で播種して、RSL3 感受性に変化が現れるかどうかを検討した。これら感受性に関する検討においては、RSL3 と共に Fer1 を処理する群を作成し、細胞死がフェロトーシスであることを確認した。

(4) 外部の公共データベースを用いたフェロトキシ脆弱性 (GPX4 依存性) の比較解析
 公共データベース (DepMap; 22Q1) の遺伝子依存性データを用いた比較解析を実施した。まず、白血球を除く細胞株の遺伝子依存性データを、フェロトキシが誘導されやすい細胞 (GPX4 に高依存である細胞; GPX4 dep) のものとそれ以外の細胞 (GPX4 non-dep) のものに分けた。続いて、遺伝子依存性データの値は-0.5 よりも低いほど増殖や生存に影響すると考えられることから、-0.5 よりも低い値は-0.5 からの差分、-0.5 以上の値は 0 とし、Wilcoxon の順位検定とオッズ比を計算した。

4. 研究成果

(1) カルシウムシグナル伝達と密度依存的なフェロトキシ抵抗性との関連性の検討

はじめに、カルシウムを介したシグナル伝達と密度依存的なフェロトキシ抵抗性に関する検討を行った。複数のメラノーマ細胞株を異なる細胞密度で播種し、カルシウムシグナル伝達阻害剤と RSL3 との共処理を行った。その結果、小胞体への Ca^{2+} 流入を阻害する試薬を処理した際に、フェロトキシが誘導されやすい低細胞密度においても (高細胞密度と同様に) フェロトキシ抵抗性となることを認めた。Transient receptor potential cation channel subfamily M member 8 (TRPM8) アンタゴニストもその一つである。TRPM8 は細胞膜および小胞体に局在する陽イオンチャネルであり、高細胞密度のメラノーマ細胞株 A375 において TRPM8 遺伝子が高発現することを見出していた。TRPM8 アンタゴニストが低細胞密度でフェロトキシ抵抗性を招いたことから、TRPM8 アゴニストと RSL3 との共処理を行ったが、高細胞密度におけるフェロトキシ抵抗性は解除されなかった。

(2) 異なる細胞密度におけるオミクス情報の比較解析

続いて、密度依存的なフェロトキシ抵抗性の機序を調べるため、低または高細胞密度における A375 のオミクスデータの比較解析を実施した。

まず、高細胞密度で亢進している遺伝子を網羅的に探索して GO 解析を行ったところ、「Extracellular matrix organization」や「SREBF and miR33 in cholesterol and lipid homeostasis」などに関連する遺伝子が含まれていることが分かった (図 1A)。カルシウムに関連する GO タームは上位 10 位には入らなかった。そこで上位 2 つの GO タームそれぞれに関連する遺伝子を確認したところ、細胞外マトリックスに関する遺伝子発現は上昇しているものと下降しているものが混在している一方で、SREBF 関連の遺伝子には有意に下降しているものはみられなかった。SREBF 関連遺伝子のなかでも脂肪酸代謝関連、特に SCD の遺伝子が発現上昇していた (図 1B)。

また、メタボロームデータについて、高細胞密度で量が増加していた代謝物に関して Enrichment 解析を行ったところ、クエン酸回路に関する代謝物が亢進していることが分かった (図 1C)。クエン酸回路の亢進は、脂質新生に関連することが知られている (Nat Rev Drug Discov 21:283-305, 2022)。実際に、脂質新生関連の遺伝子も、高細胞密度で発現上昇していることが認められた。以上のトランスクリプトームおよびメタボローム解析の結果から、高細胞密度においては脂質 (脂肪酸) 代謝、特に SCD が亢進していることが示唆された。

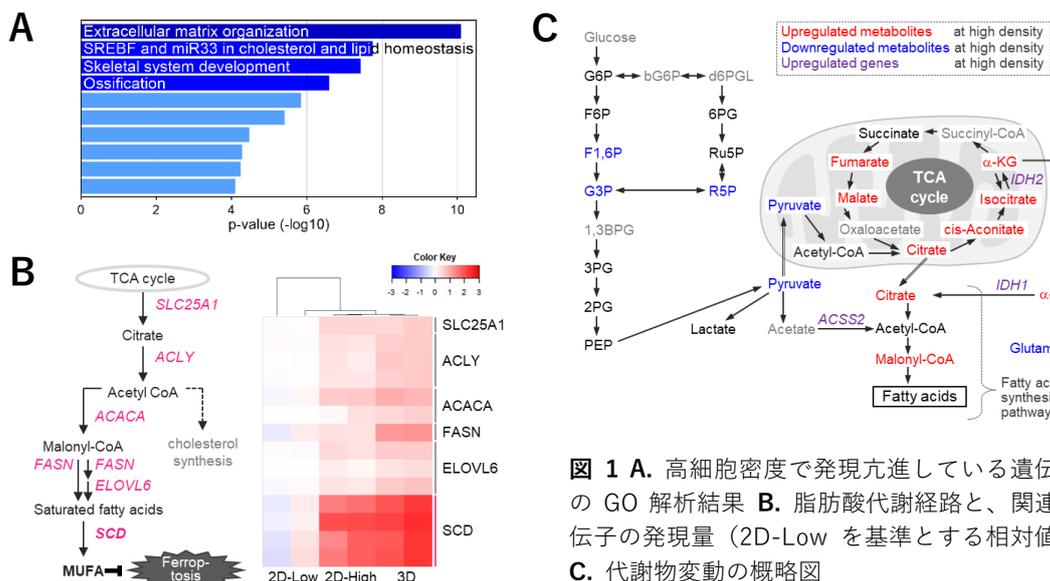


図 1 A. 高細胞密度で発現亢進している遺伝子の GO 解析結果 B. 脂肪酸代謝経路と、関連遺伝子の発現量 (2D-Low を基準とする相対値) C. 代謝物変動の概略図

(3) SCD と密度依存的なフェロトーシス抵抗性との関連性の検討

上記のオミクス比較解析の結果を受けて、SCD と密度依存的なフェロトーシス抵抗性の関連について検討を行った。まず、密度依存的なフェロトーシス抵抗性を示す複数のメラノーマ細胞株を異なる細胞密度で播種し、SCD の遺伝子およびタンパク質発現を検討したところ、細胞密度の上昇に伴って SCD が誘導されることを認めた (図 2A,B)。続いて、異なる細胞密度で播種した A375 と G361 に、SCD 阻害剤と RSL3 を共処理し、SCD 阻害剤処理によってフェロトーシスが誘導されるかどうかを検討した。その結果、細胞密度の高さに応じて、SCD 阻害剤処理による RSL3 感受性を認めた。また、A375 の SCD ノックアウト細胞を作成し、異なる細胞密度で播種して、RSL3 によるフェロトーシス誘導に変化が現れるかどうかを検討したところ、SCD 阻害剤処理時と同様に、細胞密度が高いほど SCD ノックアウトによるフェロトーシス誘導効果がみられた (図 2C)。以上の検討から、高細胞密度におけるフェロトーシス抵抗性に寄与する分子の一つとして SCD を同定した。

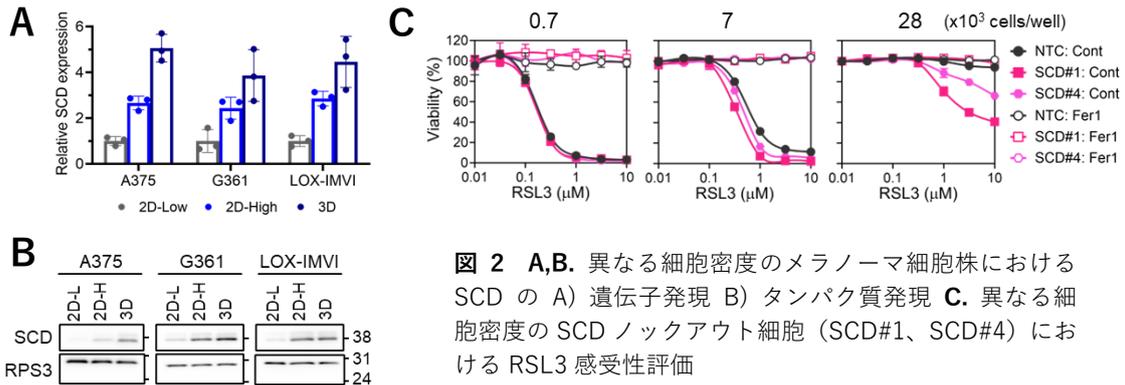


図 2 A,B. 異なる細胞密度のメラノーマ細胞株における SCD の A) 遺伝子発現 B) タンパク質発現 C. 異なる細胞密度の SCD ノックアウト細胞 (SCD#1、SCD#4) における RSL3 感受性評価

(4) 外部の公共データベースを用いたフェロトーシス脆弱性 (GPX4 依存性) の比較解析

フェロトーシスと脂肪酸代謝の関連を潜在的な関係を探索するため、DepMap の遺伝子依存性データを用いた比較解析を実施した。フェロトーシスが誘導されやすい細胞群 (GPX4 dep) とそれ以外の細胞群 (GPX4 non-dep) の遺伝子依存性の比較を行った結果、GPX4 dep 群は EEFSEC をはじめとする GPX4 の生合成に関連する遺伝子に依存していることが示唆された (図 3A)。一方で GPX4 non-dep 群が最も依存する遺伝子は SCD であり、SCAP など脂肪酸代謝に関連する遺伝子が上位に続いた (図 3A,B)。この結果より、GPX4 依存性と SCD (脂肪酸代謝) 依存性は相対する状態であることが示唆された。メラノーマ細胞株における低細胞密度から高細胞密度の遷移は、フェロトーシスが誘導されやすい GPX4 高依存な状態から脂肪酸代謝に依存した状態への遷移であると考えられる (図 3C)。

本研究ではメラノーマにおける細胞密度依存的なフェロトーシス抵抗性のメカニズム解析に焦点を当て、オミクス解析と生化学実験を通じて SCD が中心的な役割を果たしていることを明らかにした。また、公共データベースを利用した解析からは、GPX4 依存と SCD 依存は対照的な状態であることが示唆され、細胞密度が上昇することは SCD に依存した状態への遷移であると考えられた。本研究による、異なる密度におけるフェロトーシス制御機構の解明は、メラノーマにおける新たながん治療戦略へと繋がることが期待できる。

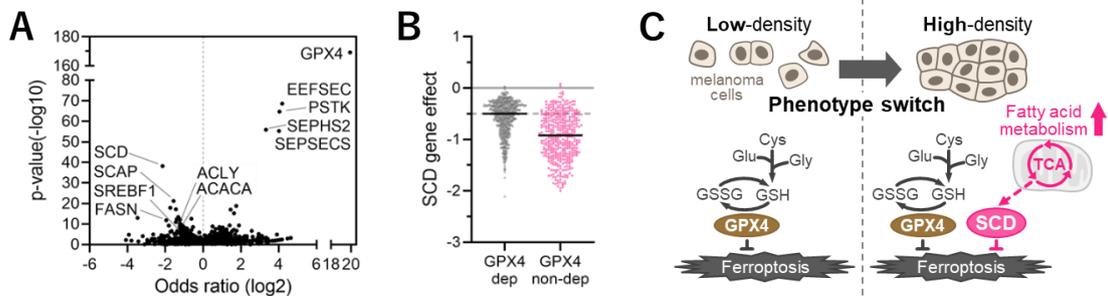


図 3 A. フェロトーシスが誘導されやすい細胞群 (GPX4 dep) とそれ以外の細胞群 (GPX4 non-dep) における遺伝子依存性の比較解析結果 B. GPX4 dep と GPX4 non-dep における SCD 依存性 C. 異なる細胞密度のメラノーマにおけるフェロトーシス制御機構の概念図

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 Hitomi Shirahama, Yuri Tani, Satomi Tsukahara, Yuka Okamoto, Akiko Hasebe, Tomomiki Noda, Shuji Ando, Masaru Ushijima, Masaaki Matsuura, Akihiro Tomida	4. 巻 125
2. 論文標題 Induction of stearyl CoA desaturase confers cell density dependent ferroptosis resistance in melanoma	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Biochemistry	6. 最初と最後の頁 e30542
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jcb.30542	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 白濱 仁深、旦 慎吾、富田 章弘
2. 発表標題 密度依存的なフェロトーシス抵抗性へのカルシウム恒常性の関与
3. 学会等名 第80回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 白濱 仁深、富田 章弘
2. 発表標題 オミクスデータに基づく細胞密度依存的なフェロトーシス抵抗性の解析
3. 学会等名 第26回 日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 白濱 仁深、富田 章弘
2. 発表標題 メラノーマ細胞における密度依存的なフェロトーシス抵抗性に関するオミクス解析
3. 学会等名 第81回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hitomi Shirahama, Yuri Tani, Satomi Tsukahara, Yuka Okamoto, Akiko Hasebe, Shingo Dan, Akihiro Tomida
2. 発表標題 Stearoyl-CoA desaturase confers cell density-dependent resistance to ferroptosis induced by inhibition of glutathione peroxidase 4 in melanoma cells
3. 学会等名 AACR Annual Meeting 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023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
---------	---------