

フェロトーシス誘導に対する悪性中皮腫細胞の

脆弱性の解明

愛知県がんセンター研究所

分子腫瘍学分野 主任研究員 佐藤龍洋

1. 研究の背景・目的

悪性中皮腫は、肺などの臓器を保護する漿膜に存在する中皮細胞がアスベスト曝露等によりがん化した難治性の希少がんである (Ref. 1)。早期発見が難しく、発見時には外科的切除が不可能なケースがほとんどであることから、化学療法による治療が主体となることが多い。しかし、著効を示す分子標的薬は見つかっておらず、いまだシスプラチンとペメトレキセドの併用療法が標準治療となっている。悪性中皮腫の網羅的なゲノム解析では、がん細胞増殖や悪性化を促進するようなドライバー遺伝子の変異がほとんど見られず (Ref. 2, 3)、既存の分子標的薬は効果を示さないことが示唆されている。近年、免疫チェックポイント阻害剤の臨床試験の結果が報告されているが、奏効率は2-3割にとどまっており、新たな治療戦略の開発が喫緊の課題となっている。

申請者らは悪性中皮腫の脆弱性を新規に検討するため、極めて多様で複雑な化合物を含む微生物上清ライブラリーを用いて、増殖抑制効果を示す化合物の探索を行い、悪性中皮腫細胞株がフェロトーシスに高い感受性を示すことを明らかにしている。フェロトーシスは制御された細胞死 (Regulated cell death; RCD) の一つとして知られ、過剰な過酸化脂質によって引き起こされる鉄依存性の細胞死である (Ref. 4, 5)。フェロトーシスを含むRCDは非悪性細胞に害を与えずにがん細胞を選択的に除去する新たながん治療戦略として期待されている。しかし、フェロトーシスの腫瘍の生物学に及ぼす影響については依然として未解明の点が多い。そこで本研究では、フェロトーシス誘導剤として作用機序の異なる2種の薬剤 RSL3, エラスチンを使用し、悪性中皮腫細胞株もしくは非がん化コントロール中皮細胞株に対する増殖抑制効果を検討した。

2. 研究の対象ならびに方法

培養細胞株

悪性中皮腫細胞株として当分野で樹立した細胞株もしくは細胞バンクに登録された細胞株を十数株、非がん化コントロール中皮細胞 4 株合わせて約二十株を用いた。

薬剤

RSL3, エラスチンを使用し、それぞれ 0-10 μM , 0-50 μM の濃度で 4 日間細胞に投与した。フェロトーシスの誘導を検証するため、フェロトーシス阻害剤 10 μM Fer-1 を RSL3 もしくはエラスチンとともに投与し、増殖阻害の抑制効果を測定した。

増殖阻害効果の解析

薬剤添加後の細胞増殖を IncuCyte S3 生細胞イメージング解析システムを用いて解析した。また、薬剤添加 96 時間後の細胞増殖率から 50%増殖阻害濃度を算出し、各細胞株樹立元の腫瘍組織型との相関について解析した。

発現差異解析

RSL3 50%増殖阻害濃度の結果をもとに、各細胞株の遺伝子発現量データを使用して発現差異解析を実施し、その結果をボルケーノプロットに示した。発現量 2 倍以上、p 値 0.01 以下を閾値として発現量に差のある遺伝子を選出した。

3. 研究結果

(1) フェロトーシス誘導剤による悪性中皮腫増殖抑制効果の検討

フェロトーシス誘導剤として RSL3, エラスチンの 2 種類を使用し、悪性中皮腫細胞 15 株および正常不死化中皮細胞 4 株に対して細胞死が誘導される濃度を測定した。また、Fer-1 を併用した際に細胞死の誘導が抑制されたことから、RSL3, エラスチンは悪性中皮腫細胞に対してフェロトーシス細胞死を誘導していると示唆された。次にこれら薬剤の 50% 増殖阻害濃度 (IC_{50}) を算出した。悪性中皮腫細胞株、正常中皮細胞株に対する両薬剤の IC_{50} には有意差が認められなかった (図 1)。しかし興味深いことに、一部の悪性中皮腫細胞株は RSL3 に対して高い感受性を示すことがわかった (図 1、高感受性群)。

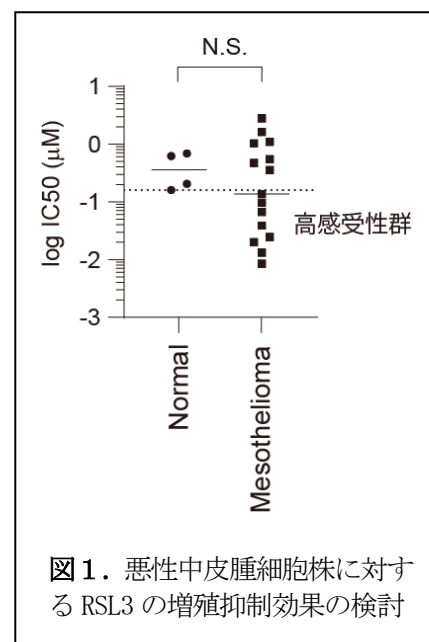
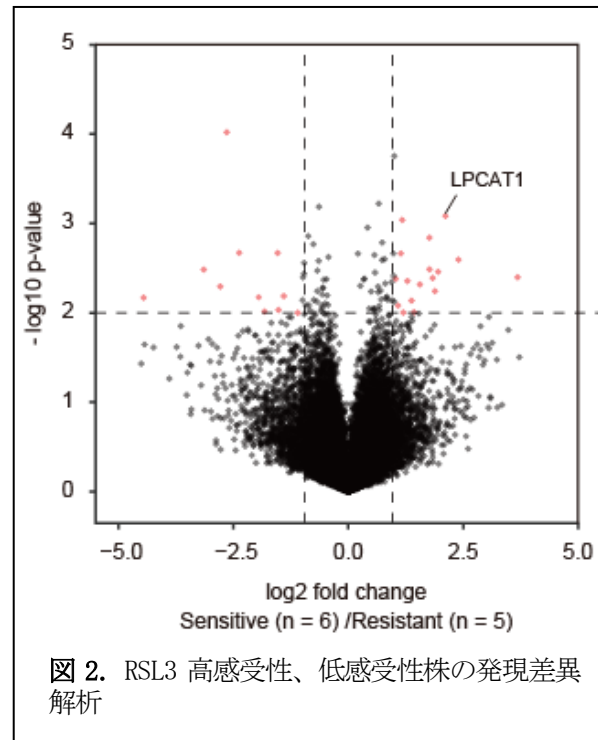


図 1. 悪性中皮腫細胞株に対する RSL3 の増殖抑制効果の検討

RSL3 感受性を規定する要因について検討したところ、上皮型の形態を示す腫瘍を由来とする細胞株が RSL3 高感受性群に有意に濃縮していることがわかった。

(2) RSL3 感受性に関与する遺伝子の探索

RSL3 高感受性細胞株 6 株と低感受性株 5 株について、マイクロアレイ解析による発現量データを用いて発現差異解析を行ったところ、感受性群で有意に発現量の高い遺伝子を 17 個、反対に発現量の低い遺伝子を 11 個同定した。これらの遺伝子のうち、フェロトシス誘導との関連性が高い脂質合成経路に関与する遺伝子 LPCAT1 について 2 細胞株を用いてノックダウン実験を行ったが、RSL3 により細胞死が誘導される濃度に差異は認められなかった。



4. 考察

本研究により、一部の悪性中皮腫細胞株が RSL3 によるフェロトシス細胞死の誘導に対して脆弱性を示すことが明らかとなった。また、これらの細胞株のほとんどが上皮型の腫瘍から樹立された細胞株であることから、病理組織型とフェロトシス間の強い関連が示唆された。近年、悪性中皮腫の遺伝子発現プロファイルに基づいたクラスタリングが病理組織型分類と類似した結果をもたらすことが報告されており (Ref. 3)、遺伝子発現変動と病理組織型の密接な関係が示唆されている。本研究では、発現差異解析によりフェロトシスへの関連が示唆される 28 の遺伝子を同定している。このうちの一つである LPCAT1 はフェロトシス感受性との関連が認められなかったが、その他の遺伝子については解析の余地がある。これらの遺伝子と病理組織型、フェロトシス易誘導性の関係についてさらに解析を進めることで、悪性中皮腫細胞の特性理解と新たな治療戦略の開発が加速すると期待できる。

5. 文献

1. Sekido Y, Molecular pathogenesis of malignant mesothelioma., *Carcinogenesis*, 34:1413-1419, 2013.

2. Hmeljak et al, Integrative Molecular Characterization of Malignant Pleural Mesothelioma. *Cancer Discov.*, 8:1548–1565, 2018.
3. Bueno et al, Comprehensive genomic analysis of malignant pleural mesothelioma identifies recurrent mutations, gene fusions and splicing alterations. *Nat Genet.*, 48:407–416, 2016.
4. Han et al, Ferroptosis and Its Potential Role in Human Diseases., *Front. Pharmacol.*, 11:239, 2020
5. Chen et al, Broadening horizons: the role of ferroptosis in cancer., *Nature Reviews Clinical Oncology*, 18:280–296, 2021

6. 論文発表

なし