

フェロトーシス誘導細胞死に対する

耐性機序の解析

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、胸膜や腹膜などの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多いため、効果的な化学療法の開発が望まれる。しかし、著効を示す分子標的薬は見つかっていない。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2-4割であり、適応しない患者はいまだ多く、新たな治療戦略の開発が喫緊の課題である。

申請者らはこれまでの研究過程において、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きた。フェロトーシスは制御された細胞死 (Regulated cell death; RCD) の一つとして分類されており、鉄依存性の脂質過酸化に依存する細胞死の一形態と定義されている (Ref. 4)。しかし、フェロトーシス細胞死を実行する直接の因子はいまだ同定されておらず、また、過酸化脂質の蓄積に至るまでの過程においても不明な点が多い。申請者は当研究分野で所有する約 20 の悪性中皮腫細胞株についてフェロトーシスを誘導したところ、約半数の細胞株が易誘導性を示すことを見出している。一方で、残りの半数はフェロトーシス誘導剤に対して抵抗性を示しており、フェロトーシス誘導に対する感受性がどのように決定されるのかについて新たな疑問が生じた。本研究では、フェロトーシス誘導に対して高感受性・低感受性の細胞群について遺伝子発現プロファイリングを行い、感受性に関与すると考えられる候補遺伝子の解析を進めた。また、悪性中皮腫において重要な役割を果たすシグナル伝達経路について

種々の阻害剤を検討し、フェロトーシス抵抗性について重要な働きをする因子の同定を試みた。

2. 研究の対象ならびに方法

培養細胞株

フェロトーシス誘導に対する耐性機序の検討においては、あらかじめフェロトーシス誘導剤に対して強い抵抗性を示す細胞株を選出して解析を行った。Hippo 経路の不活性化した悪性中皮腫細胞株として、NF2 遺伝子の不活性化変異を有する NCI-H2373 株、および LATS2 遺伝子の不活性化変異を有する MST0-211H 株の 2 細胞株を用いた。また、Hippo 経路に直接影響しない BAP1 遺伝子の変異を有する細胞株として、ACC-MES0-4 株を用いた。

薬剤

フェロトーシス誘導剤として GPX4 阻害剤である RSL3 を使用した。40 nM - 4 μ M、もしくは溶媒である DMSO (コントロール) の存在下で細胞を 4 日間培養した。また、mTOR 阻害剤であるエベロリムスをはじめとする複数の分子標的化合物を RSL3 と共に添加して培養し、フェロトーシス誘導に必要な RSL3 濃度の変化を観察した。悪性中皮腫細胞のフェロトーシス誘導は、フェロトーシス阻害剤 Fer-1 を RSL3 とともに投与した際の増殖抑制効果の阻害、もしくは過酸化脂質誘導の阻害によって検証した。

増殖阻害効果の解析

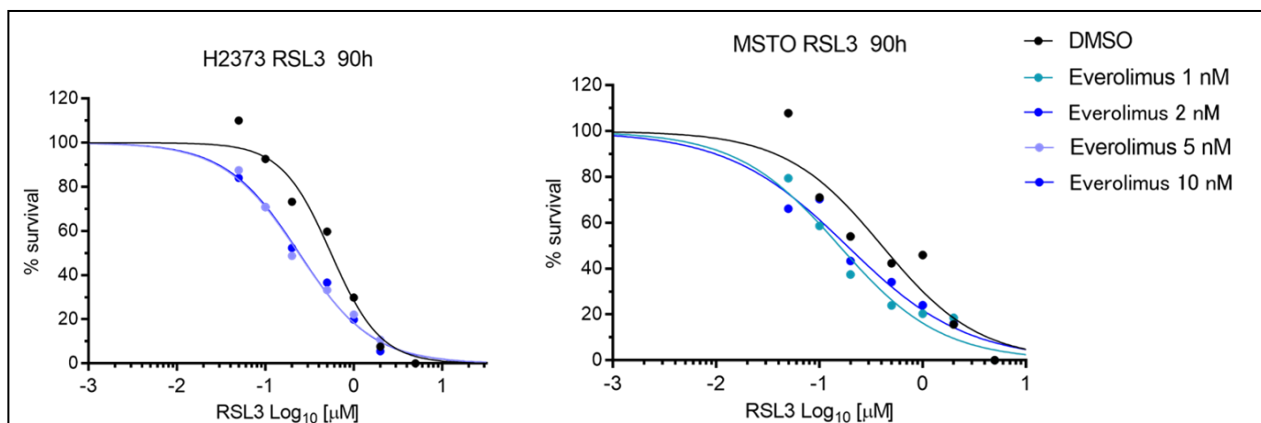
IncuCyte S3 生細胞イメージング解析システムを用いて薬剤添加後の細胞状態を 6 時間ごとに撮影し、細胞増殖および細胞形態の変化を解析した。また、薬剤添加 4 日後の細胞増殖率から 50%増殖阻害濃度を算出し、フェロトーシス感受性の変化を決定した。過酸化脂質は LiperFluo (Dojindo) を用いて添付のプロトコルに従って検出した。

3. 研究結果

遺伝子発現プロファイリングによって抽出されたフェロトーシス感受性に関与すると考えられる候補遺伝子のうち、特に強い関与が示唆される 6 遺伝子についてノックダウン shRNA 発現プラスミドを 3 種類ずつ作製した。レンチウイルスを用いて対象の細胞に感染させ、標的遺伝子のノックダウンが成立していることを qRT-PCR によって確かめた。ノックダウン細胞の増殖を検討したところ、複数の遺伝子についてノック

ダウンによる増殖抑制効果が認められた。一方で、RSL3 の IC50 が増減するノックダウン細胞は検出されなかった。

次に、RSL3 によるフェロトーシス誘導に抵抗性を示す細胞株 3 種を使用して mTOR シグナル伝達経路の阻害を行った。mTOR はがんの増殖に強く関係し、特に中皮腫での高活性化が知られている。そこで mTOR 阻害剤エベロリムスと共に RSL3 を添加し、細胞増殖の抑制に対する効果を検討した。その結果、2 剤併用は単剤と比較して低濃度で増殖を抑制した。さらに mTOR 活性を阻害可能な限界希釈濃度でエベロリムスを処理した細胞を用いて RSL3 を添加したところ、NCI-H2373 と MSTO-211H の 2 種の細胞株においてより低濃度の RSL3 での増殖抑制が見られた（下図）。RSL3 の IC50 値は、DMSO 添加時と比較して Everolimus 添加時は両細胞共に半分以下であった。BAP1 に変異を有する ACC-MESO-4 細胞ではエベロリムスを高濃度で処理した際でも、RSL3 の IC50 値に有意な差はみられなかった。



図：エベロリムスと RSL3 の併用投与による細胞増殖の抑制効果

0-10 nM エベロリムスと 40 - 4,000 nM RSL3 を添加した培地で NCI-H2373 細胞（左）もしくは MSTO-211H 細胞（右）を 90 時間培養した際の容量反応曲線を示した。DMSO 添加のみ（薬剤添加なし）の細胞増殖率を 100%とした。

4. 考察

ノックダウンによって増殖が抑制された遺伝子は、悪性中皮腫細胞の増殖に重要な役割を果たしていると考えられた。しかし、これらの遺伝子高発現が RSL3 高感受性に直接関係するかについては今回の解析からは分からなかった。今後、RSL3 高感受性・

低感受性の各細胞でこれら遺伝子のノックダウンもしくはノックアウトを行い、RSL3 感受性の変化や細胞増殖への影響、過酸化脂質量の変化を明らかに必要がある。

エベロリムスによって RSL3 感受性が増大した細胞は NF2、もしくは LATS2 遺伝子に変異を有しており、共に Hippo 経路が不活性化した悪性中皮腫細胞であった。一方、感受性が変化しなかった細胞は Hippo 経路が正常に機能している細胞であった。これらの結果から、Hippo 経路変異細胞においては mTOR の活性化がフェロトーシス誘導耐性に関与している可能性が示唆される。過去の報告では、Hippo 経路不活性化は mTOR シグナル伝達経路活性化を導くと報告されており (Ref. 5)、Hippo 経路の不活性化は悪性中皮腫細胞が有する潜在的な脆弱性から細胞を守る役割を果たしているという新たな可能性が示唆された。フェロトーシス誘導が悪性中皮腫の新たな治療として有効かどうかについては、今後のより詳細な検討や、実験動物を用いた *in vivo* 解析が必要とされる。

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. Stockwell, Ferroptosis turns 10: Emerging mechanisms, physiological functions, and therapeutic applications., *Cell*, 185:2401-2421, 2022
5. Sato T and Sekido Y, NF2/Merlin Inactivation and Potential Therapeutic Targets in Mesothelioma. *Int J Mol Sci.*, 19:988, 2018.

6. 論文発表

なし