

フェロトーシス誘導感受性を規定する

新規遺伝子の同定

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、アスベスト曝露等により胸膜や腹膜などの漿膜に存在する中皮細胞ががん化することにより発症する、難治性の希少がんである (Ref. 1)。悪性中皮腫の早期発見は患者予後を左右する重要課題であるが、特徴的な所見が乏しく、発見時にはすでに外科的切除が不可能なケースが多い。このような背景から効果的な化学療法の開発が望まれているが、いまだ著効を示す分子標的薬は見つかっていない。次世代シーケンス解析では、腫瘍の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はほとんど見られないことがわかり、既存の分子標的薬は効果を示さないと示唆されている。また、効果が期待された分子標的薬も臨床試験ではよい成績を収めるに至っておらず、悪性中皮腫は細胞死の誘導に対して強い薬剤耐性を示す (Ref. 2)。近年、免疫チェックポイント阻害剤の臨床試験が実施されており 2-4 割の患者への奏効が認められているが、いまだ多くの患者が治療薬を必要としている。

申請者らはこれまでに微生物が産生する化合物を用いてスクリーニングを実施し、正常中皮細胞と比較して悪性中皮腫細胞株で強い抗腫瘍効果を示す化合物を探索してきた。その結果、ブレフェルジン A が悪性中皮腫細胞株に対して特異的に細胞死を誘導することを見出し、さらにその分子機構としてフェロトーシスが誘導されている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である (Ref. 3)。脂質の過酸化は細胞内活性酸素種が関わっているが、他にも脂肪酸や脂質の合成経路、複数の還元反応経路や未知の経路などフェロトーシス誘導に関わる経路は多岐に渡る。申請者は悪性中皮腫のフェロトーシス誘導感受性がどのようにして規定され

ているのかを調べるため、当研究分野で所有する約 20 の悪性中皮腫細胞株を用いてフェロトーシスを誘導する実験を行った。その結果、約半数の細胞株が易誘導性を示すのに対し、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すことが明らかとなった。また、フェロトーシス誘導に対して高感受性・低感受性の細胞株を選出して解析を進めてフェロトーシス感受性に関わるシグナル伝達経路を見出したが、一部の細胞にのみ作用したものの中皮腫全体としての効果は薄く、より詳細な検討が必要とされた。そこで本研究では、ブレフェルジン A 処理の前後でフェロトーシス誘導に関わる遺伝子群がどのような発現変動を示すか検討することとした。また同時に CRISPR-Cas9 システムを用いたノックアウトライブラリーを用いてスクリーニングを実施し、フェロトーシス誘導に重要な役割を果たす遺伝子の探索を行った。

2. 研究の対象ならびに方法

培養細胞株

ブレフェルジン A によりフェロトーシスが誘導される悪性中皮腫細胞として Y-MESO-27, NCI-H2052, NCI-H2452 細胞株を使用した。また、コントロールとして正常不死化中皮細胞株 MeT-5A 株を用いた。スクリーニングには NCI-H2373 株を使用した。

遺伝子発現解析、細胞内二価鉄の観察

細胞株に 10 ng/mL ブレフェルジン A もしくは溶媒 DMSO を等量添加して 48 時間培養した。遺伝子発現解析においてはこれらの細胞を回収し、RNA を精製して遺伝子発現量を測定した。細胞内二価鉄の観察においてはこれらの細胞を 1 μ M FerroOrange (Dojindo) をキット添付プロトコルに従って添加し、細胞内蛍光を IncuCyte S3 生細胞解析装置を用いて観察した。

ノックアウトスクリーニング

NCI-H2373 細胞に lentiCas9-Blast を 24 時間感染させ、8 μ g/mL ブラストサイジン含有培地で培養して Cas9 発現細胞株を樹立した。この細胞に human GeCK0 knockout lentiviral pooled library を感染させ、8 μ g/mL ピューロマイシン含有培地で培養した後、フェロトーシス誘導剤 RSL3 を 0, 20, 100 nM となるように添加して培養した。実験は 2 連で行い、必要に応じて細胞を継代培養して 15 日後に 4.5×10^7 個の細胞を回収した。回収した細胞からゲノム DNA を精製し、ゲノム編集のターゲット配列を含む領域を PCR 増幅して次世代シーケンスで配列を解析した。

3. 研究結果

フェロトーシス誘導に関わる主要な細胞内小器官としてミトコンドリアがよく知られている (Ref. 4)。私たちはフェロトーシス細胞死に関与するミトコンドリア関連遺伝子について調べるため、ブレフェルジン A を添加する前後の細胞を回収して関連遺伝子群の発現量変化を測定した。その結果、フェロトーシスを起こす中皮腫細胞ではミトコンドリア融合に関連する遺伝子において、その発現量が増大する傾向が見られた。一方で、フェロトーシスが誘導されない正常中皮細胞では発現量が増大しないことが分かった。

次に、ミトコンドリア以外への影響についても検討するため、細胞内における二価鉄の量を蛍光プローブを用いて観察した。二価鉄の増加はフェントン反応の触媒として機能し、ROS 産生を介してフェロトーシスを誘導する。しかし、ブレフェルジン A 添加前後において蛍光強度に差はなく、また、中皮腫と正常中皮細胞間においても蛍光に大きな差は見られなかった。

さらにフェロトーシス易誘導性の原因遺伝子の同定に向けて、GeCKO ライブラリーを用いたノックアウトスクリーニングを実施した。フェロトーシスを誘導した細胞もしくはコントロール細胞からゲノムを回収し、次世代シーケンスにより濃縮されたガイド RNA 配列を同定した。現在これらの解析を行っており、フェロトーシスに強く関連すると予想される遺伝子群の抽出とその機能解析を行う予定である。

4. 考察

本研究において、ブレフェルジン A により活性酸素種の生成に関わる遺伝子の発現上昇を新たに見出した。この遺伝子はミトコンドリア融合に関わる遺伝子として知られ、その増加は *in vitro*, *in vivo* においてフェロトーシスを誘導することが報告されている (Ref. 5)。ミトコンドリアは小胞体膜と接触して相互に影響しあいながら機能することが知られていることから、ブレフェルジン A が標的とする小胞体膜への影響がミトコンドリアを介して ROS 産生異常につながっている可能性が考えられた。ミトコンドリアの形態変化をタイムラプス顕微鏡で観察することでより詳細な分子機構が解明されると期待される。ノックアウトスクリーニングの結果と併せ、中皮腫におけるフェロトーシス感受性の分子機構の解明を目指す。

5. 文献

1. Sekido Y, Molecular pathogenesis of malignant mesothelioma., *Carcinogenesis*,

34:1413-1419, 2013.

2. Sekido Y and Sato T, NF2 alteration in mesothelioma., *Front Toxicol*, 5:1161995, 2023.
3. Stockwell, Ferroptosis turns 10: Emerging mechanisms, physiological functions, and therapeutic applications., *Cell*, 185:2401-2421, 2022.
4. Dai Y, et al., A guideline on the molecular ecosystem regulating ferroptosis., *Nat Cell Biol*, 1038/s41556-024-01360-8. Online ahead of print.
5. Li C et al., STING1 Promotes Ferroptosis Through MFN1/2-Dependent Mitochondrial Fusion., *Front Cell Dev Biol*, 9:698679, 2021.

6. 論文発表

なし