

## 学位論文要約

### Extended Summary in Lieu of the Full Text of a Doctoral Thesis

氏名： 小池 大我  
Full Name

学位論文題目： Intracellular ferritin heavy chain plays the key role in artesunate-induced  
Thesis Title ferroptosis in ovarian serous carcinoma cells

学位論文要約：  
Summary of Thesis

#### 【目的・緒言】

2012年に鉄依存性と脂質過酸化を特徴とする新規プログラム細胞死が発見され、フェロトーシスという概念が提唱された。フェロトーシスは細胞内で $Fe^{2+}$ と過酸化水素が反応（フェントン反応）して生成される活性酸素種（ROS）による脂質過酸化によって誘導される。エラスチン（ERA）に代表されるフェロトーシス誘導剤は、昨今、様々な薬剤が同定されており、マラリア治療の第一選択薬であるアルテスネート（ART）もその一つである。しかし、ARTのフェロトーシス誘導における詳細な作用機序は不明であり、卵巣癌においては未知である。

一方、2014年にはフェリチン特異的オートファジーであるフェリチノファジーが発見され、その関連タンパクであるNCOA4も同時に同定された。フェリチノファジーの亢進はリソソーム内、更には細胞内で $Fe^{2+}$ を蓄積させ、フェロトーシス誘導を促進する可能性が示唆されている。

本研究では、新規に開発されたリソソームに局在する $Fe^{2+}$ に特異的な蛍光プローブを用いて、卵巣癌においてフェリチノファジーがARTによるフェロトーシス誘導に関与しているかを明らかにしようとした。また、フェリチンを構成するサブユニットの一つであるフェリチン重鎖（FTH）は、細胞内において $Fe^{2+}$ に対するキレート作用を有することが知られており、細胞内のFTHの発現量がARTによるフェロトーシスの感受性に関与しているかについても検討した。

#### 【対象と方法】

卵巣漿液性癌の細胞株としてCaOV3とSKOV3ip1を用いた。細胞生存率の評価にはWST-1アッセイを用いた。細胞内のグルタチオン-SH（GSH）レベルはGSSG/GSH定量キットを用いて測定した。フェリチノファジー関連タンパクの評価にはWestern blottingを用いた。脂質過酸化はBODIPY 581/591 C11 Lipid Peroxidation Sensorを用いて、リソソームに局在する $Fe^{2+}$ は、特異的な新規蛍光プローブであるLyso-RhoNoxを用いて、共に共焦点顕微鏡での観察下で評価した。フェロトーシス阻害には特異的フェロトーシス阻害剤であるフェロスタチン1及び鉄キレート剤であるデフェロキサミン（DFO）を用いた。オートファジー阻害にはリソソーム阻害剤であるクロロキンとオートファゴソーム成熟阻害剤であるDBE-Qを用いた。遺伝子のノックダウンにはNCOA4 siRNA, FTH siRNAを、過剰発現にはFTH1 cDNA plasmidを用いた。画像データ解析にはImageJを用いた。統計データ解析に

はEZR version 1.52を用いた。すべてのデータは分散分析にかけられ、グループ間の差はパートレット検定を用いて評価された。 $p < 0.05$ は統計的に有意であるとした。

#### 【結果】

ARTの添加により卵巣漿液性癌細胞のリソソームに局在する $Fe^{2+}$ は増加、脂質酸化は亢進し、細胞死を引き起こした。フェロトーシス阻害剤はこれらの変化を抑制した。しかし、BRAとは異なりART

は細胞内 GSH レベルに影響を与えなかった。また、ART に対する感受性は CaOV3 で高く SKOV3ip1 で低かった。これも ERA とは逆の結果であった。

2 種類のオートファジー阻害剤は共に ART による細胞死を抑制した。また、NCOA4 をノックダウンすると ART によるリソソームに局在する Fe<sup>2+</sup>の増加、脂質酸化の亢進、細胞死は抑制された。

タンパク発現量は、ART 添加によりオートファジーマーカーである P62、LC3B- I の減少及び LC3B- II の増加、並びにフェリチン及び NCOA4 の減少を認め、フェリチノファジーの亢進が示唆された。CaOV3、SKOV3ip1 の両方で ART 添加時のリソソームに局在する Fe<sup>2+</sup>の増加は同様に認めた。

細胞内 FTH 発現量は CaOV3 では低く、SKOV3ip1 では高かった。SKOV3ip1 において siRNA を用いて FTH をノックダウンすると ART に対する感受性は大きく増加し、CaOV3 において遺伝子導入により FTH を過剰発現させると ART に対する感受性は大きく低下した。

### 【考察】

本研究では、ART によりリソソームに局在する Fe<sup>2+</sup>が増加することを直接可視化することに初めて成功した。その機序としてフェリチノファジーの亢進が考えられ、卵巣漿液性癌細胞においてフェリチノファジーは ART によるフェロトーシス誘導の主要なメカニズムであることが示唆された。しかし、ART によるフェリチノファジーの亢進とその感受性には細胞株間で差があり、感受性を決定する律速段階として Fe<sup>2+</sup>のキレート作用を持つ FTH の発現量が考えられた。FTH 低発現の細胞は細胞内 Fe<sup>2+</sup>が蓄積しやすく、ART に対する感受性は高いと考えられる。卵巣漿液性癌と FTH については、臨床検体を用いた研究で癌細胞の FTH 発現量の低さと予後の悪さが相関するという報告がある。本研究の結果を踏まえると、ART は将来的に既存の治療に抵抗性の卵巣漿液性癌に対する有効な治療薬となることが期待できる。ART は既に臨床の場で広く用いられており、臨床応用は新規薬剤に比して容易であると考えられる一方で、動物実験を含めた今後の更なる研究が必要である。

### 【結論】

卵巣漿液性癌細胞株に対する ART によるフェロトーシス誘導において、主要なメカニズムはフェリチノファジーの亢進であることが明らかになった。また、本研究により細胞の ART に対する感受性には、細胞内 FTH の発現量が大きく影響していることが初めて示唆された。