

氏名（本籍）	小池大我	（大阪府）
学位の種類	博士	（医学）
学位授与番号	甲第1183号	
学位授与日付	令和4年2月16日	
学位授与要件	学位規則第4条第1項該当	
学位論文題目	Intracellular ferritin heavy chain plays the key role in artesunate-induced ferroptosis in ovarian serous carcinoma cells	
審査委員	（主査）教授	長岡 仁
	（副査）教授	中島 茂 教授 古家 琢也

論文内容の要旨

【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のプログラム細胞死として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報告され、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否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否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質の評価には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シンとオートファゴソーム成熟阻害剤であるDBE6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。グループ間の差の解析では、分散の均一性をバートレット検定で確認した上で、分散分析を行った。

【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, 脂質過酸化は亢進し, 細胞死を引き起こした。フェロトシス阻害剤はこれらの変化を抑制した。しかし, ERA 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^{2+} の増加, 脂質過酸化の亢進, 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^{2+} 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^{2+} 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, 感受性を決定する要因として Fe^{2+} 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^{2+} 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。本研究の結果から, 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検討が必要である。

【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。

論文審査の結果の要旨

申請者 小池大我は, 卵巣漿液性癌細胞に対するアルテスネイトによるフェロトシス誘導において, 薬剤感受性が細胞内フェリチン重鎖の発現量と関連している事を明らかにした。本研究結果は, 卵巣癌の新規治療プロセス開発に繋がる重要な成果であり, 臨床腫瘍学・産科婦人科学の発展に少なからず寄与するものと認める。

[主論文公表誌]

Tiger Koike, Motoki Takenaka, Noriko Suzuki, Yoko Ueda, Minako Mori, Tasuku Hirayama, Hideko Nagasawa, Ken-ichirou Morishige: Intracellular ferritin heavy chain plays the key role in artesunate-induced ferroptosis in ovarian serous carcinoma cells
Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition (in press)