



## Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（医学）
報告番号	甲第2009号
学位記番号	第1414号
氏名	小島 悠揮
授与年月日	令和6年3月22日
学位論文の題名	Induction of Ferroptosis by Photodynamic Therapy and Enhancement of Antitumor Effect with Ferroptosis inducers (PDTによるフェロトーシス誘導とフェロトーシス誘導剤併用における抗腫瘍効果の増強)  Journal of Gastroenterology, 2023 Nov 10
論文審査担当者	主査： 瀧口 修司 副査： 森田 明理, 日比 陽子

## 論文内容の要旨

光線力学療法 (Photodynamic therapy: PDT) は、光感受性物質とレーザー光により生じる光化学反応により腫瘍に対する殺細胞効果を引き起こす局所治療法である。腫瘍集積性を有する光感受性物質を投与後、腫瘍に特定波長のレーザー光を照射することにより一重項酸素 [活性酸素種 (Reactive oxygen species: ROS) の一種] が発生する。一重項酸素の強い酸化作用により腫瘍細胞障害を引き起こす。現在、主に臨床で使用されている光感受性物質は第二世代の talaporfin sodium (TS) である。照射部位にのみ効果があり、低侵襲で安全性の高い治療法である。フェロトーシスは、制御された細胞死の一つである。細胞膜の不飽和多価脂肪酸が過酸化し蓄積され、Glutathione peroxidase 4 (GPX4) 抗酸化メカニズムが破綻した際に引き起こされる。過酸化脂質蓄積には、ROS が関連しており、PDT により発生した ROS が過酸化脂質蓄積を誘導し、フェロトーシスを引き起こすと考えられる。本研究では、TS-PDT によるフェロトーシス誘導と、フェロトーシス誘導剤併用 PDT の抗腫瘍効果を検討した。

以下の *in vitro* の実験には MKN45 (ヒト胃腺癌細胞) と KYSE30 (ヒト食道扁平上皮癌細胞) を使用した。(1) フェロトーシス誘導剤 (imidazole ketone erastin: IKE または Ras-selective lethal 3: RSL3) とフェロトーシス阻害剤 (Ferrostatin-1: Fer-1) が TS-PDT の殺細胞効果に与える影響について細胞増殖アッセイを用いて評価した。IKE または RSL3 併用 TS-PDT は、TS-PDT 単独と比較してより高い殺細胞効果を誘導した。Fer-1 は、細胞死を抑制した。TS-PDT で誘導される細胞死の一部はフェロトーシスであると考えられた。(2) TS-PDT で誘導されるアポトーシスに対する Fer-1 の影響を調べるために、Active-caspase3 抗体で染色した細胞をフローサイトメトリーで分析した。Fer-1 は、Active-caspase3 レベルを抑制しなかった。アポトーシスとフェロトーシスが独立した細胞死であることが分かった。(3) 過酸化脂質の代謝産物である Malondialdehyde (MDA) は過酸化脂質蓄積のマーカーである。チオバルビツール酸反応性物質 (TBARS) アッセイを用いて TS-PDT 処理した細胞の MDA を定量した。TS-PDT 処理した細胞において MDA が高値であった。Fer-1 は、MDA を抑制した。さらに TS-PDT で誘導される過酸化脂質を調べるために Liperfluo の蛍光強度をフローサイトメトリーを用いて測定した。TS-PDT 処理した細胞は、Liperfluo の蛍光強度が未処理細胞と比較して増強した。Fer-1 は Liperfluo の蛍光強度を抑制した。以上より PDT が過酸化脂質を誘導していることを確認した。(4) ROS の発生を調べるために DCFH-DA を用いたフローサイトメトリーを施行した。TS-PDT 処理した細胞で DCFH-DA 蛍光強度が増強した。Fer-1 により DCFH-DA 蛍光強度は抑制されなかった。PDT にて ROS が発生し、Fer-1 は、ROS の発生に影響を与えなかった。(5) TS-PDT による GPX4 抗酸化メカニズムへの影響を調べた。TS-PDT 処理した細胞において GPX4 の mRNA が増加した。TS-PDT 処理した細胞では、還元グルタチオン (Reduced glutathione: GSH) に対する酸化グルタチオン (Oxidized glutathione: GSSG) の比 (GSH/GSSG) が低下した。これらの結果は、TS-PDT により GPX4 抗酸化メカニズムが増強され GSH が枯渇した事を示唆している。(6) GSH 合成に必要なシスチンは、シスチン/グルタミン酸トランスポーターである System xc-を介して細胞外から取り込まれる。シスチン取り込み能力を評価するために、シスチンと同様に System xc-を介して細胞に取り込まれるセレノシステインを用いた蛍光酵素アッセイを施行した。セレノシステインの蛍光強度は、TS-PDT 単独、IKE 単独、または IKE 併用 TS-PDT で処理した細胞で低下した。TS-PDT 単独処理によってもシスチン取り込み能力が低下していた。未処理細胞および TS-PDT 処理 2、4、8 時間後の細胞におけ

る System xc-の構成タンパク質である SLC7A11 のタンパク質発現をウェスタンブロッティングで評価した。TS-PDT 処理した細胞における SLC7A11 のタンパク質発現は、TS-PDT 後より経時的に低下した。以上より TS-PDT の System xc-阻害作用が考えられた。(7) 異種移植腫瘍マウスモデルにおけるフェロトーシス誘導剤併用 PDT の抗腫瘍効果を評価した。未処理のマウス (コントロール群)、IKE を隔日投与したマウス (IKE 群)、PDT 単独処理したマウス (PDT 群)、および IKE 併用 PDT 処理したマウス (PDT + IKE 群) の腫瘍体積比を PDT 施行した 2 週間後に評価した。MKN45 および KYSE30 では、コントロール群と IKE 群の腫瘍体積比に有意差は認められなかった (MKN45、 $P=0.9$  ; KYSE30、 $P=0.9$ )。MKN45 では、PDT 群とコントロール群の腫瘍比に有意差はなかった ( $P = 0.08$ )。KYSE30 では、PDT 群の腫瘍体積比はコントロール群より有意に低下した ( $P = 0.04$ )。MKN45 と KYSE30 では、PDT + IKE 群の腫瘍体積比はコントロール群より有意に低下した (MKN45 :  $P=0.01$ 、KYSE30 :  $P<0.0001$ )。PDT + IKE 群の腫瘍体積比は PDT 群と比較し低下傾向であった。また、フェロトーシス誘導剤としてソラフェニブを使用し同様の実験を施行した。PDT + ソラフェニブ群の腫瘍体積比は PDT 群と比較し低下傾向であった。

本研究より TS-PDT によるフェロトーシス誘導は、ROS による直接的な脂質過酸化だけではなく、System xc-の阻害が関与しており、フェロトーシス誘導剤の併用は TS-PDT の抗腫瘍効果を増強する事が明らかになった。この知見は、フェロトーシス誘導剤と PDT の併用が癌患者に大きな利益をもたらす可能性を示唆している。

.....

2000 文字

(注) 和文で 2, 000 字以内でまとめる

## 論文審査の結果の要旨

**【背景・目的】** 光線力学療法 (PDT) は、光感受性物質とレーザー光により生じる光化学反応により腫瘍に対する殺細胞効果を引き起こす治療法である。腫瘍集積性を有する光感受性物質を投与後、腫瘍に特定波長のレーザー光を照射する事により一重項酸素 [活性酸素種 (ROS) の一種] が発生し、その強い酸化作用により腫瘍細胞障害を引き起こす。フェロトーシスは、制御された細胞死の一つである。細胞膜の不飽和多価脂肪酸が過酸化蓄積され、GPX4 抗酸化メカニズムが破綻した際に引き起こされる。ROS が関連しており、PDT により発生した ROS が過酸化脂質蓄積を誘導し、フェロトーシスを引き起こすと考えられる。本研究では、TS-PDT によるフェロトーシス誘導と、フェロトーシス誘導剤併用 PDT の抗腫瘍効果を検討した。

**【方法】** ①フェロトーシス誘導剤 (IKE または RSL3) とフェロトーシス阻害剤 (Fer-1) が TS-PDT の殺細胞効果に与える影響について細胞増殖アッセイを用いて評価した。②TS-PDT 処理した細胞の MDA を TBARS アッセイを用いて定量した。TS-PDT で誘導される過酸化脂質を調べるために Liperfluo の蛍光強度をフローサイトメトリーにて測定した。③TS-PDT 処理した細胞の GPX4 mRNA と GSH/GSSG 比を測定し、TS-PDT による GPX4 抗酸化メカニズムへの影響を評価した。④TS-PDT 単独、IKE 単独と IKE 併用 TS-PDT で処理した細胞のシスチン取り込み能力をセレノシステイン蛍光酵素アッセイを用いて評価した。TS-PDT 処理した細胞における SLC7A11 タンパク質発現をウェスタンブロッティングで評価した⑤異種移植腫瘍マウスモデルにおけるフェロトーシス誘導剤 (IKE または ソラフェニブ) 併用 PDT の抗腫瘍効果を評価した。

**【結果】** ①IKE または RSL3 の併用は、高い殺細胞効果を誘導した。Fer-1 は、細胞死を抑制した。TS-PDT で誘導される細胞死の一部はフェロトーシスであると考えられた。②TS-PDT 処理した細胞において MDA 高値であり、Fer-1 により抑制された。Liperfluo の蛍光強度が TS-PDT 処理した細胞において増強しており、Fer-1 により抑制された。PDT が過酸化脂質を誘導していることを確認した。③TS-PDT 処理した細胞において、GPX4 mRNA が上昇しており、GSH/GSSG 比が低下していた。GPX4 抗酸化メカニズムの破綻が示唆された。④IKE で処理した細胞だけでなく、TS-PDT 単独処理した細胞においてもシスチン取り込み能力が低下しており、SLC7A11 の発現が低下していた。⑤フェロトーシス誘導剤 (IKE または ソラフェニブ) 併用 PDT 処置したマウスの腫瘍体積比は、PDT 単独処置と比較し低下傾向であった。

**【結語】** TS-PDT によるフェロトーシス誘導は、ROS による直接的な脂質過酸化作用だけではなく、System xc-の阻害が関与しており、フェロトーシス誘導剤の併用は TS-PDT の抗腫瘍効果を増強する事が明らかになった。

**【審査内容】** 主査の瀧口教授からは、①今後の研究の展望、②腫瘍縮小効果判定方法、③PDT の治療効果の増強意義などについて計 5 項目の質問があった。第一副査の森田教授からは、①アポトーシスの誘導機序、②フェロトーシスに注目した理由、③SLC7A11 の発現が低下する機序などについて計 5 項目にわたり質問がなされた。第二副査の日比教授からは、①フェロトーシスの形態的特徴、②フェロトーシスのマーカーなどについて計 4 項目にわたり質問がなされた。これらの質問に対し、一部返答に窮することもあったが、おおむね適切な回答が得られ、学位論文の主旨を十分理解していると判断した。本研究は、TS-PDT によりフェロトーシスが誘導され、フェロトーシス誘導剤併用 TS-PDT は抗腫瘍効果を増強することを示した。よって、これらの新しい知見を報告している本論文の筆頭著者は博士 (医学) の学位を授与するに相応しいと判断した。

論文審査担当者 主査 瀧口 修司 教授 副査 森田 明理 教授 日比 陽子 教授