

Sulforaphane による小細胞肺癌株に対する
鉄代謝を介した新規細胞死フェロトーシスの検討
(要約)

日本大学大学院医学研究科博士課程
内科系呼吸器内科学専攻

飯田 由子

修了年 2018 年

指導教員 橋本 修

肺癌は世界の癌死の主要な原因の一つであり¹、日本でも癌死の最も多い原因である。肺癌は、組織型によって大きく非小細胞肺癌と小細胞肺癌に分かれ、小細胞肺癌は肺癌の中の約 15%を占め²、肺癌の中でも特に予後不良である。その一因として非小細胞肺癌と比較し、進行してから発見されることが多く、手術症例の割合が約 5%以下と低いこと³、また、小細胞肺癌の治療は化学療法が中心となるが、現在有効な抗癌剤が少ないことに加え、抗癌剤に対して早期に耐性を示すことから長期的な治療効果を望みにくいことが挙げられる。

非小細胞肺癌では手術検体での診断例、薬剤耐性時の再生検例が小細胞肺癌に比べて多く、癌細胞の詳細な遺伝子変異検索が可能であり、**driver** 遺伝子である **EGFR** 遺伝子変異や **ALK** 融合遺伝子などが同定され⁴、特異的な阻害剤が開発され臨床応用が普及し予後の改善が見られてきた。しかし、小細胞肺癌は特に進行が速いため、手術症例の割合が低く、手術によって切除された病理検体が得られにくく³、気管支鏡検査での微小検体による診断例が多いため、非小細胞肺癌と比較して詳細な遺伝子変異検索が困難であり、**driver** 遺伝子の検索や治療対象となる標的分子の研究が進んでいない。このように、小細胞肺癌では薬剤耐性の問題や治療対象となる標的分子の同定が困難であるために、非小細胞肺癌に比べて有効な抗癌剤の

治療選択肢が非常に少なく，小細胞肺癌の予後不良の一因となっている．

そのため新規の抗腫瘍薬やその抗腫瘍機序の解明が必要とされている．

Sulforaphane (SFN) は，ブロッコリーやブロッコリースプラウトなどの植物に含まれる成分の一種であり，有害な化合物を活性化し DNA と相互作用する発癌物質を上昇させる phase- I 酵素の阻害と， Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) - nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) を介した phase- II 解毒酵素の誘導による発癌予防効果の他に，近年，様々な癌においてアポトーシス誘導作用⁵を始めとした抗腫瘍効果が報告され，新規の抗腫瘍薬として期待されている．

細胞死には，従来からプログラム細胞死として知られているアポトーシスの他に，新規細胞死として receptor-interacting protein kinase1 (RIPK1) ， receptor-interacting protein kinase3 (RIPK3) ， mixed lineage kinase domain-like (MLKL) を介し細胞膜上に孔を形成しネクロトーシス様の細胞死が誘導するネクロプトーシス⁶，シスチントランスポーターSLC7A11 を阻害するなどして細胞内のシスチン，グルタチオンが枯渇すると遊離二価鉄依存的なフェントン反応が起こり，リン脂質酸化が亢進することによって鉄依存的に細胞死を誘導するフェロトーシスが報告されている⁷．これらの新しく解明されたプログラム細胞死は，その制御により新しい癌治療のターゲットとな

りうると考えられる。

SFN は様々な癌細胞のアポトーシスを誘導することは報告されているが、小細胞肺癌株に対する効果とその機序について検討されていない。このような背景から、本研究は、ヒト小細胞肺癌株 NCI-H69 (H69) を用いて SFN による細胞死誘導とその詳細な機序について解析することを目的とした。

我々はヒト小細胞肺癌株 H69 を用いて、SFN による刺激下で LDH assay, MTT assay を用いて細胞死誘導作用、細胞増殖抑制作用について検討を行った。次に SFN による細胞死誘導作用が癌細胞に特異的であるか否かを検討するために正常気道上皮細胞株 16HBE 細胞を用いて細胞障害度を検討した。続いて、細胞死に関してその機序を明らかにするために、アポトーシス、ネクロプトーシス、およびフェロトーシス特異的抑制薬（それぞれ z-vad, necrostatin-1, ferrostatin-1）の SFN による細胞死に対する抑制効果を比較検討した。フェロトーシスは鉄依存的な脂質過酸化による細胞死であり、鉄のキレート剤による DFO でフェロトーシスが抑制され、lipid peroxidation の亢進により細胞死が起こることが知られている。鉄キレート剤 (deferroxamine ; DFO) が SFN による細胞死を抑制するか否かを LDH assay を用いて検討を行い、lipid peroxidation について flow cytometry を用いて検討を行った。フェロトーシスの誘導においてシスチントランスポ

ーターである *SLC7A11* を阻害することが引き金となる報告があることから、SFN によるフェロトーシスの作用機序を検討するために、SFN 刺激による H69 細胞の *SLC7A11* mRNA 発現の変化を RT-PCR で検討とした。

H69 細胞において、SFN は濃度依存性に細胞死を誘導した。さらに、SFN 刺激は H69 細胞において濃度依存性に細胞増殖も抑制した。非癌気道上皮細胞である 16HBE 細胞に対する SFN による細胞障害度は、小細胞肺癌株 H69 と比較して細胞死誘導作用が低値であり、SFN による細胞死誘導作用は、正常気道細胞と比べて癌細胞に有意に認められた。フェロトーシスの特異的抑制薬である ferrostatin-1 で SFN による H69 細胞死は有意に抑制された。さらに SFN による H69 細胞死は、鉄キレート剤である DFO で抑制され、脂質過酸化反応が認められたことより、SFN による小細胞肺癌の細胞死はフェロトーシスによるものであることが示唆された。また、SFN 刺激によりコントロール（無刺激）と比較し、*SLC7A11* mRNA 発現は統計学的有意に低下している結果が得られた。以上より SFN による H69 細胞のフェロトーシスにはシスチントランスポーター *SLC7A11* の発現阻害が関与することが示唆された。

本研究は、SFN が従来の抗癌剤では標的とされていなかった新規プログラム細胞死フェロトーシスにより、シスチントランスポーター *SLC7A11* の

発現阻害を介して小細胞癌の細胞死を誘導することを明らかにした。現在までに小細胞肺癌株において SFN による癌細胞に対する抗腫瘍効果を示した報告はなく、その機序にフェロトーシスの関与を示した報告はないため、本研究の成果は小細胞肺癌における新たな治療戦略の一つとしてなりうると考えられた。現在臨床上小細胞肺癌で用いられている細胞障害性抗癌剤は主にアポトーシスを介した抗腫瘍作用であるが、早期に耐性をきたす点などで問題がある。その点においてもアポトーシスとは異なるフェロトーシスによる細胞死誘導作用は、小細胞肺癌治療において新しい展望となりうる可能性が考えられた。

参考文献

- 1 Azar, F. E. *et al.* Cost-effectiveness of lung cancer screening and treatment methods: a systematic review of systematic reviews. *BMC health services research* **17**, 413, doi:10.1186/s12913-017-2374-1 (2017).
- 2 Knez, L., Sodja, E., Kern, I., Kosnik, M. & Cufer, T. Predictive value of multidrug resistance proteins, topoisomerases II and ERCC1 in small cell lung cancer: a systematic review. *Lung cancer* **72**, 271-279, doi:10.1016/j.lungcan.2011.02.014 (2011).
- 3 Takenaka, T. *et al.* Role of surgical resection for patients with limited disease-small cell lung cancer. *Lung cancer* **88**, 52-56, doi:10.1016/j.lungcan.2015.01.010 (2015).
- 4 Stinchcombe, T. E. Targeted Therapies for Lung Cancer. *Cancer treatment and research* **170**, 165-182, doi:10.1007/978-3-319-40389-2_8 (2016).
- 5 Kallifatidis, G. *et al.* Sulforaphane targets pancreatic tumour-initiating cells by NF-kappaB-induced antiapoptotic signalling. *Gut* **58**, 949-963, doi:10.1136/gut.2008.149039 (2009).
- 6 Sun, L. *et al.* Mixed lineage kinase domain-like protein mediates

necrosis signaling downstream of RIP3 kinase. *Cell* **148**, 213-227, doi:10.1016/j.cell.2011.11.031 (2012).

- 7 Dixon, S. J. *et al.* Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* **149**, 1060-1072, doi:10.1016/j.cell.2012.03.042 (2012).