

ふりがな氏名	たかすぎ のりふみ 高杉 典史
学位の種類	博士（歯学）
学位記番号	甲 第 964 号
学位授与の日付	令和 5 年 3 月 3 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項に該当
学位論文題目	Inhibition of xCT effectively induces ferroptosis in oral squamous cell carcinoma cells in epithelial-mesenchymal transition (xCT 阻害によるフェロトーシスは上皮間葉転換状態の口腔扁平上皮癌細胞に効果的に誘導される)
学位論文掲載誌	Journal of Osaka Dental University 第 57 巻 第 1 号 令和 5 年 4 月
論文調査委員	主査 井関 富雄 教授 副査 橋本 典也 教授 副査 竹信 俊彦 教授

論文内容要旨

フェロトーシスは鉄依存性の脂質過酸化蓄積が引き起こす新たな細胞死であり、フェロトーシスの誘導はさまざまな種類の癌細胞の増殖抑制に有効であることが報告されている。xCT はシスチン-グルタミン酸トランスポーター System x_c⁻ のサブユニットであり、細胞内へシスチンを取り込んで還元型グルタチオン (GSH) を合成する。GSH は更に Glutathione Peroxidase 4 (GPX4) によって酸化型グルタチオン (GSSG) へと変換され、その過程で GPX4 が脂質過酸化の原因となる活性酸素を無毒化して細胞の恒常性を維持している。xCT を阻害すると、これらの酸化ストレスへの耐性機構の異常により細胞内の脂質過酸化の蓄積が起これ、フェロトーシスが引き起こされる。さらに、フェロトーシスは上皮間葉転換 (EMT) を起こした癌細胞において誘導されやすいことが近年発見された。EMT は癌の浸潤・転移や薬剤耐性に関わることで癌の悪性度を向上させる。EMT を起こして浸潤・転移能の向上や薬剤耐性を獲得している癌は既存の抗腫瘍薬などを使用した局所制御において問題となることが多い。そのため、このような EMT を生じた悪性度の高い癌に対しての有効な治療法の開発が求められている。そこで、口腔扁平上皮癌細胞に Transforming Growth Factor-β1 (TGF-β1) を投与して EMT を誘導し、EMT 誘導口腔扁平上皮癌細胞の xCT を阻害することでフェロトーシスを誘導した場合の効果を検討した。

xCT 阻害剤エラスチンが口腔扁平上皮癌細胞株 SAS および HSC-2 の xCT の機能を阻害することで酸化ストレスを発生させ、フェロトーシスが誘導されることを明らかとした。次に、TGF-β1 の投与を行った SAS および HSC-2 が EMT を引き起こすことを EMT 関連タンパク質、遺伝子の発現解析によ

って明らかにした。さらに、EMTを誘導したSASおよびHSC-2のフェロトーシス誘導による細胞生存率がEMTを誘導していない対照群と比較して有意に低下することを明らかにした。

今回行った実験結果から、xCT阻害によるフェロトーシスの誘導はEMTを伴う薬剤耐性の獲得や浸潤・転移能の向上している悪性度の高い口腔癌の制御に有用である可能性を示した。

論文審査結果要旨

転移した口腔扁平上皮癌（OSCC）は薬剤耐性を獲得しており、化学療法が奏功しにくいとされている。しかし、これまでの研究から薬剤耐性を示す癌細胞にはフェロトーシスが誘導されやすいことも報告されている。フェロトーシスとは、鉄依存性の脂質過酸化が引き起こす新たな細胞死形態の一つである。細胞膜のシスチントランスポーターであるxCTが阻害されることで細胞内のシスチンが減少し、GPX4の働きが低下し細胞内活性酸素が増加することで細胞膜脂質の過酸化が促進され細胞死に至る。以上から、転移したOSCC細胞に対するフェロトーシス誘導剤の使用がその制御において有効であると考えられる。本研究では、エラスチンの使用でOSCC細胞にフェロトーシスが誘導されるのかを実験している。その後、OSCC細胞にTGF- β 1を使用して上皮間葉転換（EMT）を誘導し、転移したOSCC細胞をin vitroで再現し、フェロトーシス誘導に対する感受性を検証している。

まず、SASおよびHSC-2をエラスチンで処理し、細胞生存率の測定を行った。また、エラスチン処理と同時にフェロトーシス阻害剤フェロスタチン1での処理群および非処理群も同様の手順で細胞生存率の測定を行った。その結果、SASおよびHSC-2両細胞ともエラスチン処理後に有意に、濃度依存的に細胞生存率が低下しており、またフェロスタチン1での処理により生存率低下が防止された。さらに、エラスチン処理した両細胞のBODIPY 581/591C11染色による蛍光強度をフローサイトメトリーで計測した。その結果、エラスチンは両細胞の過酸化脂質レベルを上昇させていた。また、SAS、HSC-2両細胞をエラスチンで処理し、ウェスタンブロッティングにてxCTおよびGPX4のタンパク発現レベルを、リアルタイムPCRでmRNA発現レベルを測定した。その結果、両細胞ともxCTのタンパク発現、mRNA発現レベルが上昇していた。また、GPX4のタンパク発現レベルは両細胞とも低下していた。xCTの増加についてはエラスチンが機能阻害し、その発現が代償的に増加するとの過去の報告とも一致している。以上から、エラスチンによりOSCC細胞内に過酸化脂質が蓄積されフェロトーシスが誘導されることが明らかとなった。

さらに、SAS・HSC-2をTGF- β 1で処理し、EMTマーカーの変動をウェスタンブロッティングおよびリアルタイムPCRで測定した。その結果、両細胞ともTGF- β 1の投与によりNカドヘリン、ビメンチン、スラッグの発現レベルが増加しており、ビメンチン、スラッグのmRNA発現レベルはコントロール群と比較して有意に増加していた。さらに、EMT状態のOSCC細胞に対してエラスチンを投与し、細胞生存率測定を行った。その結果、両細胞とも全てのエラスチン濃度においてTGF- β 1投与群の方が非投与群より低かった。以上から、EMT状態にあるOSCC細胞は通常のOSCC細胞と比較して、エラスチンによるフェロトーシスの感受性が高いことが明らかとなった。

以上より、エラスチンはOSCC細胞にフェロトーシスを誘導するという点、EMT状態のOSCC細胞は通常のOSCC細胞よりもエラスチンに対する感受性が高いということについて明らかにした点において本論文は博士（歯学）の学位を授与するに値すると判定した。