

【要約】

**Ferroptosis induction and its regulatory mechanism
in pheochromocytomas compared with
adrenocortical adenomas**

(褐色細胞腫における副腎皮質腺腫と比較した
フェロトーシス誘導能とその制御機構)

千葉大学大学院医学薬学府

先端医学薬学専攻

(主任：横手幸太郎教授)

類家 裕太郎

【目的】Ferroptosis は、鉄依存性の脂質過酸化により引き起こされる調節された細胞死であり、glutathione peroxidase 4 (GPX4) やペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 α (PPAR α) により抑制される。Ferroptosis は悪性腫瘍、組織虚血再灌流障害や神経変性疾患などで病態との関連が次々と報告されているが、副腎における ferroptosis の報告は非常に少ない。2020 年に初めて、ヒト正常副腎は脂質合成酵素発現が高く、副腎皮質癌 (ACC) で ferroptosis が誘導されやすいことが報告されているのみである。これらの解析はデータベースや継代細胞株を使用しており、初代培養細胞を用いた報告はない。本研究では、ヒト副腎腫瘍組織とその初代培養細胞を用いて、褐色細胞腫 (PCC) および副腎皮質腺腫 (非機能性腺腫 (NF)・コルチゾール産生性腺腫 (CP)) における ferroptosis 制御遺伝子・実行因子・誘導能を比較検討した。そして、ferroptosis 感受性が高い疾患における ferroptosis の制御機構と臨床的意義を明らかにすることを目的とした。

【方法】ヒト副腎腫瘍組織における ferroptosis 制御遺伝子の変動を RNA sequence および iDEP (integrated Differential Expression and Pathway analysis) で解析した。また各種副腎組織摘出後の初代培養細胞を用いて実際の ferroptosis 誘導やその制御因子を検討するため、ferroptosis 実行因子として知られる lipid ROS、細胞内 Fe²⁺、ferroptosis 誘導剤 erastin 投与後の cell viability を検討した。次に、上記で絞り込まれた重要経路・遺伝子に対する阻害剤を用いて ferroptosis 誘導能への影響を検討した。更に ferroptosis 感受性が認められた PCC における ferroptosis の臨床的意義を検討する目的で、当院で手術を行った 52 例の PCC 組織における ferroptosis marker *PTGS2* 遺伝子発現を RT-qPCR で調べ、中央値 1 をカットオフ値として低値群と高値群に分類し、患者背景 (年齢、性別)、ホルモン産生性、画像所見 (腫瘍体積、PET の SUVmax、MIBG 集積)、転移の有無、病理学的所見 (GAPP

スコア、PASS)、遺伝子異常を比較検討した。最後に、xenograft model mice を用いて ferroptosis 誘導剤(erastin 40 μ M または RSL3 4 μ M)の生体内における腫瘍形成能に及ぼす影響を検討した。

【結果】主成分分析では、皮質腺腫は主成分が類似していたが、PCC では大きく異なっていた。皮質腺腫 (NF or CP) と比較して PCC では PPAR α が有意に低下し、その下流シグナルの脂肪酸 β 酸化関連遺伝子発現が有意に減少していた。また、PCC では鉄代謝が有意に変動しており細胞外の鉄を運搬するトランスフェリン (TF) や細胞内 Fe³⁺を Fe²⁺に変換する STEAP3 遺伝子発現の有意な増加を認めた。

実際に PCC では細胞内 Fe²⁺が高値であり、ferroptosis marker PTGS2 遺伝子発現高値群が存在した。ferroptosis が誘導されるほど (PTGS2 遺伝子発現が高い程)、ferritin や heme から Fe²⁺を動員する遺伝子 (FTL、HO1) が増加することが示された。初代培養細胞に ferroptosis 誘導剤 erastin で 24 時間処理すると、皮質腺腫と比較検討し ferroptosis 感受性が高く、PCC 細胞株における ferroptosis 誘導は鉄キレート剤 deferoxamine (DFO) で明らかに減弱した。一方で、PPAR α antagonist GW6471 で 72 時間処理しても ferroptosis 誘導に影響はなかった。以上より PCC における ferroptosis 誘導には鉄代謝が重要であることが示された。臨床的に、PCC 副腎組織において PTGS2 高値群は低値群に比較して若年発症、PASS 高値、遺伝子異常、特に cluster 1 遺伝子異常が有意に多く含まれていた。

cluster 1 は HIF シグナルを介しているため、低酸素培養キットを使用して偽低酸素状態を模倣し ferroptosis を誘発の機序を検討した。PCC 細胞株である PC12 細胞を正常酸素症 (21%O₂) および低酸素症 (1%O₂) で 48 時間培養したところ、低酸素下では定常状態では低下していたトランスフェリン受容体 Tfrc の遺伝子発現を増加させ、ferroptosis が誘導されることが明らかとなった。更に ferroptosis 誘導剤を投与した褐色細胞腫を免疫不全マウスの皮下に移植すると、対照 (DMSO) と比較して、経

時的な最大皮下腫瘍径は有意に小さく、投与 41 日後に sacrifice して測定した腫瘍体積も有意に減少した。これらから、PCC において ferroptosis 誘導は腫瘍形成抑制的に作用することが示された。

【考察と結論】 PCC は皮質腺腫と比較して ferroptosis が誘導されやすく、その機序として細胞内 Fe^{2+} の利用が重要な役割を果たしていた。PCC の中でも ferroptosis が誘導される症例は、若年、PASS 高値、遺伝子異常、特に cluster 1 遺伝子変異を有しており、低酸素シグナルを介したトランスフェリン受容体の増加が更なる細胞外 Fe^{2+} の利用の増加に寄与し ferroptosis を促進すると考えられた。*PTGS2* 高値が PCC の遺伝子変異・分化度の判断の一助となる可能性がある。また PCC は病理組織所見だけでは悪性度の判断が難しく、数年してから再発を示す症例が存在し、また、外科治療以外に有効な治療法が確立されておらず、化学療法の効果も部分的であるのが現状である。PCC における ferroptosis 誘導は、腫瘍形成抑制的に作用しており、ferroptosis 誘導剤や鉄代謝 modulator が PCC の新しい治療標的として期待される。