

tert-Butyl hydroperoxide によるがん細胞株への非アポトーシス誘導

今井 茉梨乃*¹, 谷澤 和哉*¹, 井内 勝哉*², 久富 寿*³

Optimal time of *tert*-Butyl hydroperoxide to induce ferroptosis in cancerous cell lines

Marino IMAI*¹, Kazuya YAZAWA*¹, Katsuya IUCHI*², Hisashi HISATOMI*³

(Received Jan 21,2023)

1. 背景

Ferroptosisは2012年に発見された細胞膜リン脂質の過酸化反応による細胞死である^{1,2}。Necrosisの一種として定義されているが、物理的な細胞の破壊による細胞死ではなく、制御された細胞死という観点からはApoptosisに類似している。虚血性疾患、筋萎縮性側索硬化症、パーキンソン病、アルツハイマー病などでもFerroptosisが観察されている^{3,4}。2018年に*tert*-Butyl hydroperoxide (TBHP)による培養細胞へのFerroptosis誘導が発見^{5,6}された。しかし、培養細胞株ごとにFerroptosisを誘導するTBHP濃度が異なっている。

本研究では様々ながん細胞株へのTBHPの投与によるFerroptosis誘導を調査した。形態的に風船のように膨らんだ細胞死にはFerroptosisやNecroptosis⁷があるがここではFerroptosisとして観察した。がん細胞株へのFerroptosis誘導と、一般的にFerroptosis研究で使用されるアフリカミドリザル腎臓由来Cos-7細胞へのFerroptosis誘導の時間的差異を調査した。また、ヒト肝がん細胞株HepG2細胞、ヒト大腸がん細胞株DLD-1細胞、ヒト膀胱がん細胞株SUIT-2におけるFerroptosis誘導の時間的差異を調査した。

2. 材料と手順

2.1 細胞培養

ヒト膀胱がん細胞株SUIT-2細胞、ヒト肝臓がん細胞株HepG2細胞、ヒト大腸がん細胞株DLD-1細胞およびアフリカミドリザル腎臓細胞株Cos-7細胞を東北大学加齢医学研究所より入手した。10% Fetal Bovine Serumを含むD-

MEN,RPMI 1640 培地(Thermo Fisher Scientific)を用いて、37°C、5% CO₂条件下で培養した。また、組織培養用6 well plate(Thermo Fisher Scientific)に1×10⁵ cells/mLの密度で細胞を播種した。

2.2 TBHP投与

培養細胞株の播種後、24時間後にTBHP 200 μMを投与し、48 hr細胞培養を継続した。その間、Lumascopes 560 (Etalun)によって明視野のタイムラプス撮影をした。

3. 結果

HepG2細胞、DLD-1細胞、SUIT-2細胞およびCos-7細胞においてFerroptosisが確認された(Fig.1)。Ferroptosisが初めて確認された培養経過時間はHepG2細胞、DLD-1細胞、SUIT-2細胞およびCos-7細胞において4 hr、6 hr、22 hr、48 hrであった。

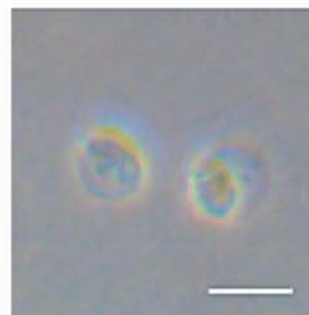


Fig.1 Cos-7細胞におけるFerroptosis誘導細胞
左の細胞に比べて右側の細胞が風船のように膨らんでいる。スケールバー：100 μm

4. 考察

ヒトがん細胞株でのTBHP投与によるFerroptosisが確認された。Ferroptosisの誘導にはアフリカミドリザル腎臓

*¹：理工学部/大学院理工学研究科

*²：埼玉がんセンター

*³：物質生命 コース (hisatomi@st.seikei.ac.jp)

細胞株Cos-7 細胞が有名だが、Cos-7 細胞より早い段階で Ferroptosisが確認され、誘導時間も圧倒的に早かった。タイムラプスによる1視野だけの観察ではあるが、HepG2細胞やDLD-1 細胞においては6時間以内でFerroptosisが誘導されている。TBHPに対する感受性の差異によると想像されるが、従来の細胞株の選定において有用な結果となった。また、ヒトがん細胞株においても簡便にFerroptosisが誘導されるのは細胞死研究において有用な結果となった。

本実験においてCos-7細胞より早期にFerroptosis誘導された細胞株が発見されたが、Ferroptosis誘導細胞の量は各細胞株で有意な差異は確認されなかった。それぞれの細胞増殖の速度やTBHPに対する感受性の問題と考えられるが、詳細な実験には至っていない。

抗がん剤において様々な遺伝子的カスケードの面からApoptosis誘導が試みられている。しかし、一部のがん細胞では抗がん剤治療によってもApoptosisに至らずに残存する。そのようなApoptosis耐性のがん細胞において、Apoptosis以外の細胞死の誘導法が探索されている。その点でもFerroptosis誘導剤は期待の持てる有用な抗がん剤候補である。近年、抗がん剤における低分子化合物から中高分子化合物への注目が集まっており、TBHPのような低分子化合物ではなく、核酸やタンパク質などの中高分子化合物の医療応用としてFerroptosis誘導剤の探索が望まれる。

なお、風船状の細胞死はFerroptosisの他にNecroptosisが有名であり、本実験で観察した細胞形態がFerroptosisとは限定できない。FerroptosisやNecroptosisの阻害剤を添加して細胞形態の変化を観察し、本研究で明らかにした風船状の形態変化についてFerroptosisあるいはNecroptosisかの選別が必要である。

参考文献

- 1) Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, *et al.* : Ferroptosis : An Iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*, 149, 1060-1072, 2012
- 2) Yang WS, Stockwell BR : Ferroptosis : Death by lipid peroxidation. *Trends Cell Biol*, 26, 165-176, 2016
- 3) Guiney SJ, Adlard PA, Bush AI, *et al.* : Ferroptosis and cell death mechanisms in Parkinson's disease. *Neurochem Int*, 104, 34-48, 2017
- 4) Weiland A, Wang Y, Wu W, *et al.* : Ferroptosis and its role in diverse brain diseases. *Mol Neurobiol*, 56, 4880-4893, 2019
- 5) Wenz C, Faust D, Linz B, *et al.* : *t*-BuOOH induces ferroptosis in human and murine cell lines. *Arch Toxicol*, 92, 759-775, 2018
- 6) Wenz C, Faust D, Linz B, *et al.* : Cell-cell contacts protect against *t*-BuOOH-induced cellular damage and ferroptosis in vitro. *Arch Toxicol*, 93, 1265-1279, 2019
- 7) Linkermann A, Green DR. : Necroptosis. *NEJM*, 370, 455-465, 2014