

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19405

研究課題名（和文）新たな細胞死フェロトーシスにおける脂質ラジカルの関与

研究課題名（英文）Involvement of lipid radicals in new cell death ferroptosis

研究代表者

山田 健一（Yamada, Ken-ichi）

九州大学・薬学研究院・教授

研究者番号：60346806

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：近年、新しい細胞死としてフェロトーシスが注目されているが、その発現部位などは未だ明らかにされていない。そこで、本研究では、フェロトーシスの誘導に脂質ラジカルが関与していることを明らかにすることと目的とした。その結果、脂質ラジカルがフェロトーシス誘導時に細胞膜や小胞体などに局在していることがわかった。さらに、細胞間フェロトーシスの感受性差を説明できる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

フェロトーシスは、全く新しい細胞死形態であるため、その原因やメカニズムはほとんど分かっていない。本研究結果から、フェロトーシスの生成部位を明確にし、細胞間での感受性差も説明できる可能性を示した。このことは、新しい細胞死フェロトーシスの本質に迫っているのは間違いなく、「酸化脂質（脂質ラジカル）が単なる酸化副生成物ではなく、生体機能維持に極めて重要である」との新たな学理の発見とともに、創薬研究等への発展も期待できると考えている。

研究成果の概要（英文）：In recent years, as a new cell death type, ferroptosis has been attracting attention, but the site of induction has been unclear. Therefore, in this study, we aimed to clarify whether lipid radicals were involved in the induction of ferroptosis. As a result, we found that lipid radicals were localized in the cell membrane and endoplasmic reticulum during induction of ferroptosis. Furthermore, we succeeded to explain the difference in sensitivity of cells to ferroptosis.

研究分野：薬学

キーワード：脂質 フェロトーシス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

最近、アポトーシスでもネクローシスでもない全く新しい細胞死形態、「フェロトーシス」(Dixon SJ, et al., Cell, 2012) が提唱された。このフェロトーシスは、活性型 RAS 変異陽性がん細胞株を用いた synthetic lethal screening によって発見され、脂質過酸化反応依存的な新規細胞死機構である。本細胞死は、脂質過酸化物を無害な脂質アルコールへと還元する glutathione peroxidase 4 (GPX4) の阻害剤である RSL-3 や、これを間接的に阻害するエラスチン処理によって誘導される。また、フェロトーシスは、アポトーシスやネクロ(プ)トーシスなどの既報の細胞死機構とは全く異なるメカニズムにおいて進行し、新たながん治療の標的などとして期待されている。事実、フェロトーシス誘導剤は、腫瘍形成を抑制することや、抗腫瘍薬の耐性を獲得したがん細胞に対してより効果的に細胞死を誘導することが報告されている。一方で、フェロトーシス阻害剤、ferrostatin-1 や liproxstatin-1 が、脳障害や肝障害を保護する可能性も示されている。

このフェロトーシスは、様々な細胞内小器官にて脂質過酸化反応が進行する。例えば、Kaganらは、phosphatidylethanolamine-binding protein 1 が、15-lipoxygenase と複合体を形成することで細胞膜における脂質過酸化反応を誘導すること、また一方で、脂質過酸化反応検出試薬である C11-BODIPY や Iperfluo を用いた局在評価から、ミトコンドリアや小胞体にて脂質過酸化反応が生じていることも報告されている。このように同じ刺激剤、同じ細胞でもフェロトーシス誘導時に脂質過酸化反応が生じている部位が異なることが報告され、実際にどこで生じているかについては未だ確定しているとは言えない。さらに、フェロトーシスは、培養細胞によりその誘導剤に対する感受性差が大きく異なるとされているが、そのメカニズムが不明であることから、感受性差を説明可能な因子の探索にも至っていない。そこで、フェロトーシス誘導において重要な役割を担う脂質過酸化反応を明らかにすれば、その細胞死進行機構の解明、さらには創薬研究へと発展できるのではと考えた。

ここで、脂質過酸化物の生成機構を考えて見ると、連鎖的脂質過酸化反応であり、その中心は、「脂質ラジカル」である。すなわち、この脂質ラジカルが脂質過酸化反応の起点であると言える。最近我々は、この脂質ラジカルに対して選択的に反応する蛍光検出プローブの開発に成功した。さらに、本蛍光プローブを化学発がんモデル動物に適用すると、化学発がん物質投与後に肝組織で蛍光強度が上昇し、さらに脂質ラジカルを抑制する化合物を合成し投与すると、脂質ラジカルの生成が抑えられるとともに、細胞死と代償性増殖が軽減され、その後の発がんも有意に抑制されることもわかった。すなわち、脂質ラジカルが本肝障害の発症に密接に関与していることは間違いない。加えて、加齢黄斑変性疾患モデル動物である光照射網膜障害モデル動物においても同様に、脂質ラジカル抑制により失明原因である細胞脱落を顕著に軽減した。以上の背景から、脂質ラジカルが疾患に密接に関与しており、この脂質ラジカルの生成部位を明確にすることは、フェロトーシスの生成部位を明らかにすることができるとともに、新たな創薬研究につながると期待できる。

2. 研究の目的

そこで本研究では、「新しい細胞死形態フェロトーシスにおける脂質ラジカルの関与と疾患発症との関連性」について明確にすることを目的とした。そのために、1) フェロトーシス誘発時に脂質ラジカルは産生しているか、2) フェロトーシスが疾患発症に関与しているか、の2点を研究項目とした。

3. 研究の方法

1) フェロトーシス誘発時に脂質ラジカルは産生しているか

非小細胞肺がんの細胞株 Calu-1、A549、またヒト繊維肉腫である HT-1080 にフェロトーシス誘導剤 RSL-3、エラスチンなどを添加し、脂質ラジカル検出蛍光プローブおよび脂質過酸化物検出プローブのフェロトーシス抑制効果について、MTT assay を用いて評価した。また、フェロトーシス誘導剤にて刺激した細胞に、脂質ラジカル検出蛍光プローブ、および各種オルガネラマーカーを添加し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて各種プローブの局在を評価した。

2) フェロトーシスが疾患発症に関与しているか

mRNA 回収、リアルタイム PCR などは、定法に従って行った。また、147 株の肺癌細胞株の Cancer Cell Line Encyclopedia の遺伝子発現量データと Genomics of Drug Sensitivity in Cancer の薬剤感受性データの相関を解析した。

4. 研究成果

上記目的のために、1) フェロトーシス誘発時に脂質ラジカルは産生しているか、2) フェロトーシスが疾患発症に関与しているか、について検討した。

1) フェロトーシス誘発時に脂質ラジカルは産生しているか

本研究ではまず、非小細胞肺癌細胞株の Calu-1 にフェロトーシス誘導剤の RSL-3 と脂質ラジカル検出蛍光プローブを併用処理し、24 時間後に MTT assay により細胞毒性を評価した。すると、脂質ラジカル検出蛍光プローブは 1 μ M から完全に細胞保護効果を示したのに対し、既報の脂質過酸化反応検出試薬である C11-BODIPY や Liperfluo は、1 μ M ではほとんど細胞保護効果は示さなかった。これは、他のフェロトーシス誘導剤であるエラスチン処理や、ヒト線維肉腫細胞株の HT-1080 を用いた検討においても同様の結果が得られた。次に、脂質ラジカル検出蛍光プローブが上記のフェロトーシス誘導細胞において生じた脂質過酸化反応を検出可能か精査するために、共焦点レーザー顕微鏡を用いた蛍光イメージングを行った。本実験では、RSL-3 と脂質ラジカル検出蛍光プローブを併用処理後、3 時間後に共焦点蛍光画像を撮像した。すると、RSL-3 処理時に蛍光が上昇し、フェロトーシス阻害剤 liproxstatin-1 の併用処理によりその蛍光は抑制された。以上より、脂質ラジカル検出蛍光プローブは従来の脂質過酸化反応検出試薬に比べ高い細胞保護効果を示すとともに、フェロトーシス誘導時における脂質過酸化反応を検出可能であった。すなわち、検出された脂質ラジカルは、本細胞死進行過程において重要な役割を担っていることが示唆された。

次に RSL-3 処理した Calu-1 細胞における脂質ラジカル検出蛍光プローブの局在を評価した。すると、脂質ラジカル検出蛍光プローブの蛍光は小胞体マーカーの ER-Tracker 及び形質膜マーカーの Cell Mask と共局在し、その蛍光は liproxstatin-1 処理により減弱した。また、ミトコンドリアマーカーの Mito-Tracker とは共局在しなかった。さらに興味深いことに、細胞内小胞への局在とみられる輝点が複数観測された。一方、これらの輝点は C11-BODIPY を用いた際には観測されず、癌細胞間で輝点数が大きく異なった。また、それらはフェロトーシス感受性と相関した。さらに、この輝点は、あるオルガネラに相当することがわかった。

以上の結果より、フェロトーシスに脂質ラジカルの生成が密接に関与しており、細胞間のフェロトーシス感受性差にも脂質ラジカルが関係する可能性が示唆された。

2) フェロトーシスが疾患発症に関与しているか

我々は、これまでに脂質ラジカル抑制剤の化合物スクリーニング系を構築し、実際に複数の候補化合物を見出している。そこで、本脂質ラジカル抑制剤が、フェロトーシスを抑制するかどうか検討した。上記培養細胞に RSL3 あるいはエラスチンなどでフェロトーシスを誘導したところ、化合物濃度依存的にフェロトーシスを抑制することがわかった。また、本化合物は、疾患モデルでも同様に、顕著な抑制効果を示すことがわかった。

一方で、上記フェロトーシスは、細胞種毎にその感受性が大きく異なるようである。例えば、同じ非小細胞肺癌の細胞株である Calu-1 と A549 では、約 600 倍感受性差がある。また、上記脂質ラジカル検出蛍光プローブを用いた検討より、その蛍光強度にも大きく差があることもわかった。そこで、この感受性差の原因を探索した。その結果、フェロトーシス誘導剤の感受性と各種因子の mRNA の発現量との相関解析から、リゾリン脂質アシルトランスフェラーゼの中でも因子 A が、また、酸化脂質消去酵素の中でも因子 B がフェロトーシスの感受性差を制御している可能性が示唆された。これら因子の発現抑制および阻害剤添加実験では、フェロトーシス誘導剤添加による感受性が亢進し、因子 A と因子 B は複合的にフェロトーシス耐性を誘導することが示唆された。

以上の結果より、脂質ラジカルが確かにフェロトーシス誘導に重要であり、その局在部位がフェロトーシス誘導に密接に関与している可能性を示唆された。さらに、細胞間で存在するフェロトーシスの感受性差に因子 A、因子 B が関与している可能性を示した。本研究成果をさらに発展させ、フェロトーシスの抑制剤の探索などを進めることは、疾患のメカニズム解明や治療などに大いに貢献できると期待している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shinto S, Matsuoka Y, Yamato M, Yamada KI.	4. 巻 62(2)
2. 論文標題 Antioxidant nitroxides protect hepatic cells from oxidative stress-induced cell death.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Clin Biochem Nutr.	6. 最初と最後の頁 132-138
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b18-00558.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 日下部 大樹, 松岡 悠太, 山田 健一
2. 発表標題 脂肪酸添加はがん細胞のフェロトーシス感受性を亢進させる
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 進藤 早紀, 松岡 悠太, 山田 健一
2. 発表標題 脂質ラジカル抑制剤探索に向けたスクリーニング系の構築とその応用
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋藤 耕太, 松岡 悠太, 山田 健一
2. 発表標題 脂質過酸化反応における抗酸化物質の作用点および反応抑制機序の解明
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北島綾子, 日下部 大樹, 進藤 早紀, 松岡 悠太, 山田 健一
2. 発表標題 非アルコール性脂肪肝炎モデルへの脂質過酸化抑制剤の応用
3. 学会等名 第35回日本薬学会九州支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宗 茉里恵, 進藤 早紀, 松岡 悠太, 山田 健一
2. 発表標題 脂質過酸化反応を抑制する化合物の探索と両側総頸動脈狭窄モデルマウスへの応用
3. 学会等名 第35回日本薬学会九州支部大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考