

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07050

研究課題名(和文)酸化リン脂質依存的細胞死抑制因子SMS2の生理的機能の解明

研究課題名(英文) Analysis of physiological functions of oxidized phospholipid-dependent cell death by SMS2

研究代表者

熊谷 剛 (Kumagai, Takeshi)

北里大学・薬学部・講師

研究者番号：30365184

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、GPx4欠損による誘導される酸化脂質依存的な細胞死に対する、SMS2の酸化脂質代謝を介した抑制機構の解明および生体における実証を目的とした。研究期間内で、SMS2の細胞膜における局在がGPx4欠損による細胞死の抑制には重要であること、抑制にはSMS2の他DAGATおよびDAGL経路が関与することが明らかにした。さらに肝臓特異的GPx4/SMS2二重欠損マウスを用いた解析より、コンカナバリンA投与による肝障害に起因する致死性がGPx4/SMS2二重欠損マウスで有意に増強された。以上の結果より、SMS2が生体内でも酸化脂質を代謝する活性があることが初めて実証された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これらの成果は、SMS2の新たな“抗酸化酵素”としての機能を初めて明らかにしたものであり、脂質代謝酵素が酸化脂質を代謝する抗酸化機能を有することを実証した点で意義は大きい。また、近年注目されている酸化脂質依存的な細胞死の機構の解明や新たな治療法の開発につながるものであり、今後SMS2が酸化脂質が関与する疾患の治療のためにターゲットとなることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to elucidate the suppression mechanism of oxidized lipid-dependent cell death induced by GPx4 deficiency by SMS2 and to demonstrate whether SMS2 has antioxidant function in vivo. As a result, we clarified that localization of SMS2 at the plasma membrane is important for suppression of cell death by GPx4 deficiency. In addition, we showed that the DAG acyltransferase and DAG lipase pathways were involved. Furthermore, in order to demonstrate that SMS2 suppresses cell death by oxidative phospholipid metabolism in vivo, we used liver-specific GPx4/SMS2 double-deficient mice and examined the effects of SMS2 on the oxidative stress load on the liver. As a result, it was suggested that lethality due to liver damage induced by administration of concanavalin A was significantly enhanced in GPx4/SMS2 double-deficient mice. These results demonstrate for the first time that SMS2 has the activity to metabolize oxidized lipids in vivo.

研究分野：生化学

キーワード：酸化脂質 スフィンゴミエリン合成酵素2(SMS2) 細胞死 フェロトーシス 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

我々は、タモキシフェン添加により誘導的に GPx4 を欠損させることが可能な細胞株を用いた細胞死メカニズムの解析から、GPx4 欠損により誘導される細胞死が、アポトーシスやネクローシスなどの既知の細胞死経路ではなく、酸化リン脂質に依存した新規経路により誘導されることを明らかにした。さらにこの細胞死は鉄イオンを必須としない点から、近年様々な疾患との繋がりが注目されている遊離鉄および酸化脂質に依存した新規の細胞死形態であるフェルトーシスとも異なる細胞死であると考えられた。しかしながら、GPx4 欠損により引き起こされる新規細胞死の実行経路および制御する分子についてはほとんど分かっていなかった。我々は解析を進める過程で、スフィンゴミエリン合成酵素 2(SMS2)が酸化脂質依存的に発現亢進すること、SMS2 の過剰発現が、細胞内で生成されるホスファチジルコリンヒドロペルオキシド(PC-OOH)をジアシルグリセロールヒドロペルオキシド(DAG-OOH)に代謝することで新規細胞死を抑制することを見出したが、詳細な抑制機構や生体内での意義については不明であった。

2. 研究の目的

本研究は、SMS2 の酸化リン脂質代謝活性に焦点をあて、SMS2 の抗酸化酵素としての新たな機能を細胞レベルおよび個体レベルで実証することを目的とした。実証するにあたって、*in vitro* における機能について、GPx4 欠損による新規細胞死における SMS2 の抑制機構の解析を行ない、細胞死誘導に重要な酸化リン脂質の生成場および分子種を明らかにすることを目指した。また *in vivo* における生理的意義について、肝臓特異的 GPx4/SMS2 二重欠損マウスを用いて、酸化リン脂質を起因とする酸化ストレス負荷モデル系における感受性の解析を行ない、生体での SMS2 の抗酸化機能を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

In vitro 解析には、タモキシフェン誘導型 GPx4 欠損 MEF 細胞を用いた。この細胞は、内因性 GPx4 遺伝子を欠損しており、外部より IoxP 配列に挟まれた GPx4 遺伝子および Cre-ERT 融合遺伝子を導入した細胞である。この細胞をタモキシフェンで処理することにより IoxP 配列に挟まれた GPx4 遺伝子を除去することができ、結果として GPx4 を欠損させることができる。この細胞に SMS2 遺伝子を、レトロウイルス発現系を用いて発現させることで過剰発現細胞を構築して解析した。各遺伝子欠損細胞は、CRISPR/Cas9 システムを用いて構築した。酸化脂質の生成は、酸化脂質特異的な蛍光プローブである NBD-Pen およびヒドロペルオキシド特異的なプローブである H₂DCFDA を用いたフローサイトメトリーで検出した。また酸化脂質分子種については、LC-MS/MS により測定した。*In vitro* SMS 活性の測定は、重水素標識したホスファチジルコリンヒドロペルオキシド(PC-OOH)を基質として用い、細胞ライセートと反応させることで生成される重水素標識スフィンゴミエリン(SM)を LC-MS/MS で測定することにより評価した。

In vivo 解析には、我々が作成した肝臓特異的 GPx4 欠損マウスと全身性 SMS2 欠損マウスを交配することにより、肝臓特異的 GPx4/SMS2 二重欠損マウスを作成して用いた。肝臓特異的に酸化ストレスを負荷するために、コンカナバリン A(ConA)尾静脈投与によるモデルを用いて解析した。

4. 研究成果

1) 新規細胞死抑制における SMS2 の細胞内膜局在の重要性の検討

ゴルジ体及び細胞膜に局在する SMS2 のうち、どちらの膜への局在が新規細胞死の抑制に重要かを明らかにするために、変異体を用いて解析した。SMS2 の細胞膜への局在には C 末端領域に存在する 4 つのシステイン残基のパルミトイル化が関わることから、この 4 つのシステイン残基をアラニン残基に置換した細胞膜に移行しない SMS2 変異体を作製して細胞に導入し解析を行った。GPx4 欠損による細胞死に対する影響を検討したところ、野生型 SMS2 過剰発現細胞(wt)では抑制されたのに対し、細胞膜に局在しない SMS2 変異体(4m)の過剰発現では抑制されなかった。このことより、SMS2 の細胞膜における局在が GPx4 欠損による細胞死の抑制には重要であることが明らかとなった(図1)。

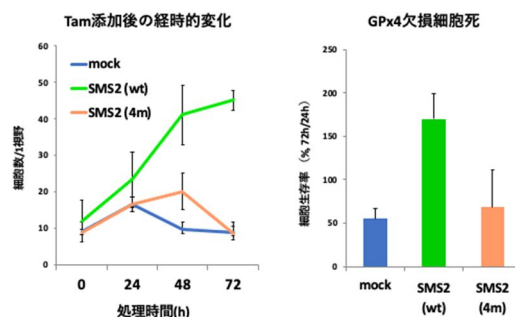


図1 GPx4欠損細胞死に対する細胞膜局在変異体 SMS2(4m)過剰発現の影響

2) DAG-OOHの代謝経路の解明

SMS2 の過剰発現は、GPx4 欠損により生じる PC-OOH をセラミドと DAG-OOH に代謝することで細胞死を抑制していると予想されたが、その後 DAG-OOH がどのような経路で代謝されるのかは不明であった。そこで、DAG 代謝経路に関わる酵素の阻害剤を用いて、どの経路が DAG-OOH の代謝に重要であるのかを検討した。既知の DAG 代謝経路に関わる酵素の阻害剤を用いて GPx4 欠損による細胞

死に対する影響を検討したところ、DAGアシルトランスフェラーゼ (DAGAT) 阻害剤およびDAGリパーゼ (DAGL) 阻害剤処理によりSMS2過剰発現による細胞死の抑制効果は部分的にキャンセルされ、2つの阻害剤の併用によりキャンセル効果は増強した(図2)。このことから、どれか一つの経路が重要ではなく、各経路が代謝に関わっていることが示唆された。さらにどの分子が関与するのかを明らかとするために、CRISPR/Cas9システムを用いて各分子の欠損細胞の構築を目指した。その結果、いくつかの分子について欠損細胞の構築に成功し解析を行ったが、関与する分子の同定には至らなかった。今後さらに解析を進め明らかにする必要がある。

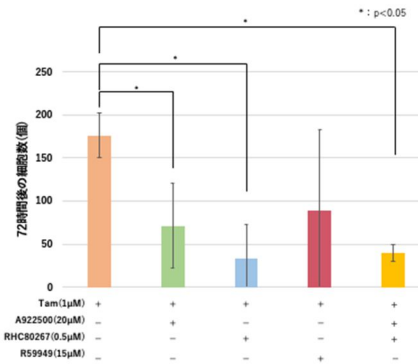


図2 DAG阻害剤を添加した際の72時間後の細胞数

3) GPx4欠損による細胞膜での酸化脂質生成のイメージング

1)の結果より、GPx4欠損による細胞死誘導には細胞膜で生成される酸化脂質が重要であることが推察された。酸化脂質生成場所およびその分子種の同定は、GPx4欠損による新規細胞死誘導のメカニズムを解明するうえで重要な要因であった。そのため、実際に細胞膜において酸化脂質の生成が確認できるのかについて蛍光プローブおよび共焦点レーザー顕微鏡を用いたタイムラプス観察を目指した。蛍光プローブ量やレーザーの強度など様々な条件を検討して細胞膜上での酸化脂質生成のリアルタイムでの検出を試みたが、期間内に明確に検出することはできなかった。今後より感度良く検出できる系を用いて明らかにすることが課題である。

4) 肝臓特異的GPx4/SMS2二重欠損マウスを用いたSMS2の *in vivo*における酸化脂質代謝能の実証

*In vivo*でもSMS2が酸化脂質活性を有しているのかを明らかとするために、肝臓特異的GPx4/SMS2二重欠損マウスを作成して解析を行った。我々はこれまでに肝臓特異的GPx4欠損マウスを作成して解析を行い、肝臓特異的GPx4欠損マウスは通常職下では出生直後に致死となること、この致死はビタミンE高添加食でレスキューできること、さらにレスキュー後に餌をビタミンE欠乏食に変更することで再び酸化脂質依存的に致死となることを明らかとしている。そこで肝臓特異的GPx4欠損マウスおよび肝臓特異的GPx4/SMS2二重欠損マウスをコンカナバリンA(ConA)投与して肝臓特異的に酸化ストレス負荷して致死に至る期間を比較した。ConAはマウスに尾静脈投与することで、ナチュラルキラーT細胞の活性化を引き起こし、サイトカインの産生を介し、肝常在クッパー細胞におけるROSの産生を促進することで、肝臓に酸化ストレス誘発して自己免疫性急性肝炎により48時間以内に致死を引き起こすことが知られている薬剤である。その結果、肝臓特異的GPx4/SMS2二重欠損マウスでの最長生存日数は11日であった(n=15)。一方、肝臓特異的GPx4欠損マウスでの最長生存日数は32日であった(n=6)。肝臓特異的GPx4ヘテロマウス(n=5)及び肝臓特異的GPx4ヘテロ/SMS2欠損マウス(n=10)は35日後まで80%以上が生存していた(図3)。

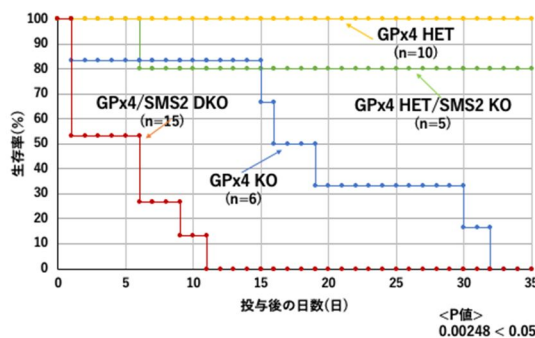


図3 GPx4 KOマウス及びGPx4/SMS2 DKOマウスの生存曲線の比較

次に、ConAを投与した肝臓特異的GPx4欠損マウスと肝臓特異的GPx4/SMS2二重欠損マウスの肝臓における組織学的な解析としてHE染色を行った。その結果、肝臓特異的GPx4/SMS2二重欠損マウスと肝臓特異的GPx4欠損マウスを比較すると、肝臓特異的GPx4/SMS2二重欠損マウスの方がより広範囲に壊死の病変が見られた(図4)。さらに、過酸化脂質の蓄積の有無を免疫組織学的に解析するために、抗ACR(acrolein)抗体で免疫組織染色を行った。その結果、対照群である肝臓特異的GPx4欠損マウスにおけるACR陽性範囲が全体の4.4%であったのに対し、肝臓特異的GPx4/SMS2二重欠損マウスでは、11.9%であり、有意に増加していた(図5)。

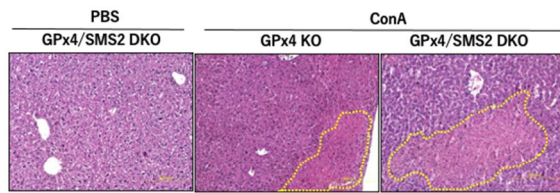


図4 GPx4/SMS2 DKOマウスにおけるConA投与時の肝障害

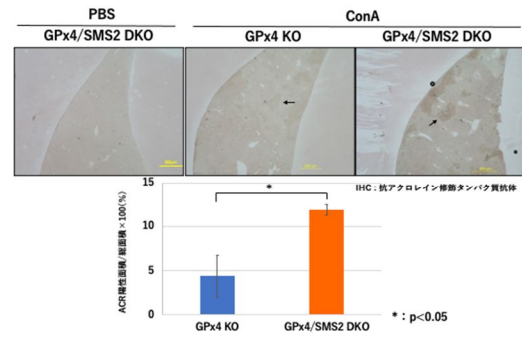


図5 GPx4/SMS2 DKOマウスの肝臓におけるConA投与時の脂質酸化

以上の結果から、SMS2 が PC-OOH を代謝する“抗酸化酵素”としての機能を発揮することで、GPx4 欠損により誘導される細胞死を抑制すること、抑制機構には SMS2 による PC-OOH から DAG-OOH への変換およびその後の DAG-OOH の代謝が関与すること、細胞膜に局在する SMS2 が細胞死の抑制には寄与することが *in vitro* の解析より明らかとなった。さらに、肝臓特異的 GPx4/SMS2 二重欠損マウスを用いた *in vivo* 解析より、SMS2 の酸化脂質代謝活性は、生体内でも機能していることが実証された。本研究結果より、SMS2 の“抗酸化酵素”としての新たな機能を見出すことができた。様々な疾患において酸化脂質の蓄積が発症の要因となっていることが示唆されている。したがって、酸化脂質を除去できる SMS2 は、様々な疾患に対する創薬のターゲットとして今後期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 熊谷剛、安里成美、山下美砂、米山昌吾、今井浩孝
2. 発表標題 肝臓特異的GPx4/SMS2二重欠損マウスを用いたin vivoにおけるSMS2の抗酸化活性の検討
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 安里成美、山下美砂、米山昌吾、熊谷剛、今井浩孝
2. 発表標題 肝臓特異的GPx4/SMS2二重欠損マウスを用いたin vivoにおけるSMS2の抗酸化活性の検討
3. 学会等名 日本ビタミン学会 第74回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安里成美、米山昌吾、熊谷剛、今井浩孝
2. 発表標題 SMS2によるリポキシトース抑制機構の解析
3. 学会等名 フォーラム2021 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 熊谷剛
2. 発表標題 SMS2によるリポキシトースの抑制機構の解析
3. 学会等名 第2回 細胞死コロキウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 熊谷剛、今井浩孝
2. 発表標題 SMS2によるリポキシトースの抑制機構の解析
3. 学会等名 フォーラム2020 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 熊谷剛、今井浩孝
2. 発表標題 重水素型酸化リン脂質を用いた新たな酸化脂質代謝系と意義
3. 学会等名 第73回 日本酸化ストレス学会・第20回 日本NO学会 合同学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 熊谷剛、平澤星蘭、大矢梨里香、河合美侑、今井浩孝
2. 発表標題 SMS2過剰発現によるGPx4欠損新規細胞死の抑制には細胞膜に局在するSMS2が重要である
3. 学会等名 第72回日本酸化ストレス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 角井伶早、熊谷剛、平澤星蘭、大矢梨里香、河合美侑、今井浩孝
2. 発表標題 SMS2過剰発現細胞におけるリポキシトース抑制機構の解析
3. 学会等名 第63回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

北里大学薬学部臨床薬学研究部門ホームページ
<http://www.pharm.kitasato-u.ac.jp/rinyakuken/index.html>
北里大学薬学部衛生化学教室ホームページ
<http://www.pharm.kitasato-u.ac.jp/eisei/eisei/Home.html>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------