

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K17680

研究課題名（和文）酸化コレステロールによる生体膜脂質組成の調節を介した代謝性疾患増悪のメカニズム

研究課題名（英文）Mechanisms of Metabolic Disease Exacerbation through Regulation of Biological Membrane Lipid Composition by Oxidized Cholesterol

研究代表者

有澤 琴子 (Arisawa, Kotoko)

東北大学・薬学研究科・助教

研究者番号：00813122

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：近年、世界的に動物性食品や加工食品の摂取量の増加が見られ、これらの食品に含まれる酸化コレステロールは、2型糖尿病やNASHなどの疾患との関連が示唆されている。しかし、酸化コレステロールによる細胞毒性の詳細は明らかではない。本研究では、鉄依存的な細胞死であり近年NASHなどの関連が示唆されているフェロトーシスにおける酸化コレステロールの関与を検討した。Erastinによるフェロトーシス誘導時に、7-ヒドロキシコレステロールが特異的に増加することが明らかになり、この産生酵素であるCYP7A1の遺伝子抑制によりフェロトーシス耐性を持つことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

鉄は生体の様々な生理機能に不可欠な必須微量ミネラルである一方、鉄代謝異常は多様な疾患と密接に関係する。鉄の異常な蓄積はフェントン反応によりフリーラジカルを生成し、脂質過酸化を伴う鉄依存的な細胞死である「フェロトーシス」を引き起こすことも近年明らかになってきた。細胞膜構成脂質であるコレステロールも酸化されるが、フェロトーシス誘導時の酸化コレステロール動態はあまり解明されていなかった。本研究において、フェロトーシス誘導初期にはコレステロールの酸化酵素CYP7A1が増加し、この酵素の抑制がフェロトーシス耐性につながることを示された。本知見は、フェロトーシスを標的とした創薬などへの展開が期待できる。

研究成果の概要（英文）：In recent years, there has been an increase in the consumption of animal-based and processed foods globally, and hydroxycholesterol contained in these foods has been suggested to be associated with diseases such as type 2 diabetes and non-alcoholic steatohepatitis (NASH). However, the details of the cytotoxicity caused by oxidized cholesterol remain unclear. In this study, we investigated the involvement of oxidized cholesterol in ferroptosis, an iron-dependent form of cell death that has recently been suggested to be related to NASH and other diseases. It was revealed that 7-hydroxycholesterol specifically increases during ferroptosis induced by erastin, and gene suppression of its producing enzyme, CYP7A1, confers resistance to ferroptosis.

研究分野：脂質生物学

キーワード：酸化コレステロール フェロトーシス 酸化ストレス 飽和脂肪酸

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

動物性食品に存在するコレステロールは、加工・貯蔵や調理によってラジカル的に酸化コレステロールへと変換され、我々はこのような酸化コレステロールを食事から摂取している。また、生体内におけるコレステロールの増加は、酵素反応を介して内因性の酸化コレステロールの増加を引き起こす。これらの酸化コレステロールは生体内で酸化ストレスや細胞死を引き起こすことが報告されており、健康状態との関連が示唆されている。NASH 患者は食事中的動物性脂質の摂取量が健常者と比べて多く、それに相関して肝臓中のコレステロール含量が単純性脂肪肝に比べて高いことが明らかになっている。また、2型糖尿病患者では健常者に比べて血中の 7-ketocholesterol が多く存在することや、高脂肪食誘導性の NASH モデルマウスは単純性脂肪肝と比べて酸化コレステロールが多いことなどからも、酸化コレステロールは NASH の発症あるいは亢進に影響している可能性がある。

コレステロールは、細胞膜をはじめとする生体膜の主要な構成成分である。生体膜の大部分はリン脂質で占められており、不飽和脂肪酸の多いリン脂質膜では膜の流動性は高く、脂質やタンパク質は活発に移動を行うことができる。一方、コレステロールやスフィンゴ脂質が豊富な膜マイクロドメインは流動性が低く、シグナル伝達、膜輸送、細胞骨格の形成など様々な細胞機能において重要な役割を果たしている。このマイクロドメインに異常が起こると細胞機能が障害されることが示唆されており、たとえば細胞膜のコレステロール過剰では、インスリン抵抗性の促進が起こることや、リン脂質の飽和脂肪酸が増加して膜の流動性が損なわれることにより、小胞体ストレス反応が引き起こされることが報告されている。

また、反応性の高い 2 価鉄によるラジカル発生は生体膜脂質の過酸化を引き起こし、これが細胞膜機能の破綻につながることで「フェルトーシス」とよばれる細胞死につながることで近年報告された。しかし研究開始当初、フェルトーシスにおけるコレステロールの動態はほとんど理解されていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、酸化コレステロールを介した生体膜の脂質組成の変化が、細胞障害を増悪させる可能性を明らかにすることを目的とし、次の課題について検討を行った。研究期間の途中で所属変更が生じたため一部研究計画を変更し、課題 2 としてフェルトーシスにおける酸化コレステロールの機能に着目した。

課題 1 酸化コレステロールによる膜脂質組成の変化

酸化コレステロールを介した生体膜の脂質組成の変化が、細胞障害を増悪させる可能性を明らかにすることを目的とした。酸化コレステロールがリン脂質の二重膜に取り込まれることで、酸化コレステロール自体が膜の物理性質を変化させる可能性が報告されている。また、酸化コレステロールは Liver X receptor (LXR) のリガンドとして働き、内因性の脂質合成を調節する因子として知られており、この脂質代謝の結果、生体膜の脂質組成が変化している可能性もある。しかし、酸化コレステロールが生体膜脂質を変化させるのか、またその結果として細胞機能が変化するかという点についてはほとんど検討されていないため、本点に関して検討を行った。

課題 2 フェルトーシスにより惹起される酸化コレステロールの解析

フェルトーシス誘導時はアラキドン酸やリノール酸などの多価不飽和脂肪酸 (PUFA) が酸化を受けやすいことが知られており、これらのリン脂質膜に豊富に存在する脂質の過酸化が細胞毒性を発揮する。コレステロールも過酸化を受けるが、PUFA に比べて研究は進んでおらず、フェルトーシス誘導時のコレステロールの動態はあまり解明されていない。本研究では、フェルトーシス誘導時の酸化コレステロールの解析を通して、フェルトーシスで惹起される脂質酸化メカニズムの解明と新たなフェルトーシス促進因子の同定を目指した。

3. 研究の方法

課題 1 酸化コレステロールによる膜脂質組成の変化

a. 酸化コレステロールによる飽和脂肪酸毒性の増強効果

酸化コレステロールと飽和脂肪酸は動物性食品に多く含まれる脂質であり、これらの脂質は同時に摂取されることが考えられるが、同時摂取が細胞毒性に与える影響は明確ではない。そこで、HepG2 ヒト肝がん由来細胞に飽和脂肪酸による細胞毒性を誘導した際 (パルミチン酸, 150 μ M, 18 時間) に 25-hydroxycholesterol (25-OH)、27-hydroxycholesterol、7-ketocholesterol をそれぞれ 10 μ M 共処理し、飽和脂肪酸毒性が増強される種の酸化コレステロールがあるかを検討した。

細胞死が起きた条件において、細胞死の種類および細胞毒性の要因を明らかにするために Western blotting で各種タンパク質を検出した。

b. 酸化コレステロールと飽和脂肪酸の同時添加時の脂質組成変化

上記 a で細胞死の増強が見られた条件において、リン脂質脂肪酸および酸化コレステロールを GC-MS で定量解析した。また、変化が見られた脂肪酸の合成酵素の発現変化を qPCR で評価した。

課題 2 フェロトキシスにより惹起される酸化コレステロールの解析

a. フェロトキシス誘導時における酸化コレステロールの変化

神経芽腫由来細胞株である SH-SY5Y 細胞にフェロトキシス誘導剤である Erastin を添加し、添加後の時間経過に伴う脂質過酸化の誘導状態および酸化コレステロール種の変化を解析した。

細胞内の脂質過酸化状態については、脂質ラジカル検出プローブ LipiRADICAL、過酸化脂質検出プローブ Liperfluor を用いて共焦点レーザー蛍光顕微鏡での観察およびプレートリーダーによる定量を行った。酸化コレステロールについては、コレステロール酸化生成物として主に知られる 7 α -hydroxycholesterol (7 α -OH)、7 β -hydroxycholesterol (7 β -OH)、7-ketocholesterol (7-keto) を GC-MS で定量した。

b. CYP7A1 のフェロトキシスにおける役割

2-a よりフェロトキシス誘導初期に 7 α -OH の増加が見られたことから、7 α -OH の産生酵素である CYP7A1 に着目してフェロトキシスにおける機能解析を行った。CRISPR-Cas9 システムを用いて CYP7A1 欠損 SH-SY5Y 細胞を作製し、フェロトキシス感受性を評価した。また、7 α -OH およびコレステロールを細胞に添加し細胞生存率を評価した。

4. 研究成果

課題 1 酸化コレステロールによる膜脂質組成の変化

酸化コレステロールの 25-OH を飽和脂肪酸と同時に培養細胞に添加すると、それぞれを単独で添加した際より多くの細胞死が起こることを見出した (図 1)。一方、27-hydroxycholesterol や 7-ketocholesterol は同様の作用を示さず、酸化コレステロールの構造によって脂肪毒性への増強効果は異なることが示された。25-OH と PA の同時添加では切断型 Caspase-3 および CHOP が増加しており、小胞体ストレスを背景としたアポトーシス様細胞死であることがわかった。なお、PERK の阻害剤である GSK2656157 (10 μ M) により細胞死および Caspase-3 の切断は抑制され、PERK を介した小胞体ストレスが誘導されていることが示唆された。

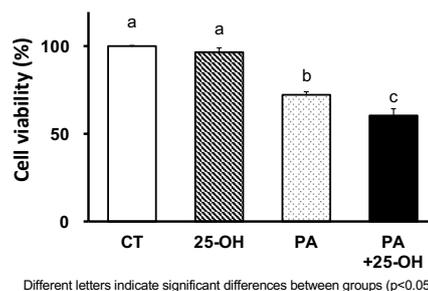


図1 酸化コレステロールによる飽和脂肪酸毒性の増強
PA, パルミチン酸; 25-OH, 25-hydroxycholesterol
PAは150 μ M, 25-OHは10 μ M添加し、18時間後にWST-8にて細胞生存率を測定した。

25-OH を飽和脂肪酸と同時に添加した際、LXR 下流の SCD-1 (Stearoyl-CoA desaturase 1) が減少し、不飽和脂肪酸/飽和脂肪酸比も減少することが明らかになった (図 2)。さらに、興味深いことに飽和脂肪酸の添加により、25-OH の細胞内蓄積自体も増加するという結果を得た。本研究期間内には生体膜の分画までは至らず、生体膜の脂質組成変化への寄与については明らかにすることができなかったが、今回見られた脂質の変化は膜脂質組成にも反映される可能性が高い。今後、生体膜脂質組成の解析と共に、その組成変化を介した細胞障害の分子メカニズムについても明らかにしていく。

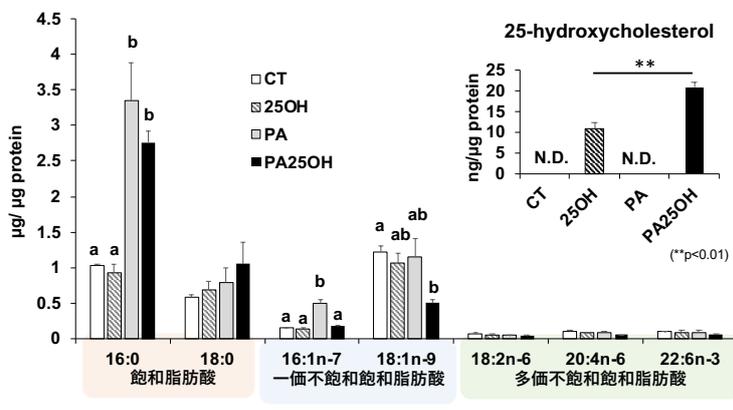


図2 酸化コレステロールと飽和脂肪酸の同時添加による脂質組成の変化
25OHの添加により、飽和脂肪酸単独処理と比べて一価不飽和脂肪酸の減少が見られた。また、25OH自体の細胞内蓄積も飽和脂肪酸との同時処理群で増加することが示された。

課題 2 フェロトーシスにより惹起される酸化コレステロールの解析

SH-SY5Y 細胞に Erastin を 10 μM で処理すると 24 時間で細胞死が見られ、これは鉄キレーターであるデフェロキサミンで抑制されたことからフェロトーシスが誘導されていることを確認した。この細胞死が生じるまでの過酸化脂質・酸化コレステロールの動きを継時的に評価した。過酸化脂質特異的のプロープである Liperfluo による蛍光は処理後 1 時間後に増加し、6~12 時間にかけて直線的に増加していくことがわかった。対して、脂質ラジカルプロープである LipiRADICAL による蛍光は処理後 3 時間以降直線的に増加していくことが確認された (図 3)。すなわち、Erastin 処理により、初期にはラジカル非依存的な過酸化反応が起こり、処理後期にラジカル依存的な過酸化反応が起こることを見出した。また、酸化コレステロールを定量分析すると、Erastin 処理後 1 時間で CYP7A1 により酵素的に生成する $7\alpha\text{-OH}$ が増加し、反応後期にはラジカル酸化によって生成する $7\beta\text{-OH}$ が増加した。

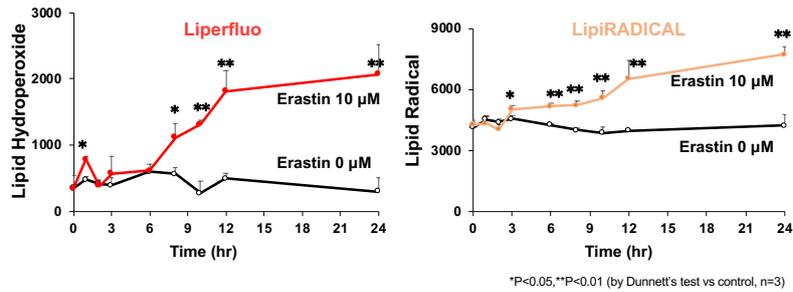


図3 フェロトーシス誘導時における脂質過酸化の経時的な測定

Erastinによりフェロトーシスを誘導した際の過酸化脂質および脂質ラジカルの産生を各々の特異的のプロープを用いて測定した。

また、CYP7A1 欠損細胞において、細胞はフェロトーシス耐性を示した。一方、細胞への $7\alpha\text{-OH}$ あるいはコレステロールの添加はフェロトーシスを誘導しなかった。遺伝子発現解析により、CYP7A1 欠損細胞では抗酸化因子である SLC7A11、GPx4 が増加していることがわかり、 $7\alpha\text{-OH}$ が直接的にフェロトーシスを引き起こすのではなく、その産生酵素である CYP7A1 がフェロトーシスに関与していることが示唆された。

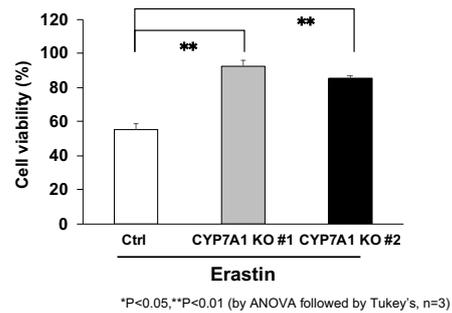


図3 CYP7A1欠損細胞におけるフェロトーシス感受性
CRISPR-Cas9でSH-SY5Y細胞のCYP7A1を欠損させ、フェロトーシス誘導剤のErastinを10 μM 処理すると、CYP7A1欠損細胞において顕著な細胞生存率の回復が見られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 0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 有澤 琴子、外山 喬士、斎藤 芳郎	4. 巻 59
2. 論文標題 必須微量元素セレン研究の最前線	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 ファルマシア	6. 最初と最後の頁 179 ~ 184
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14894/faruawpsj.59.3_179	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 有澤 琴子、斎藤 芳郎	4. 巻 60
2. 論文標題 鉄依存的な脂質酸化を伴う細胞死フェロトーシスに対するセレン・ビタミンEの作用：新たなプログラム細胞死フェロトーシスのメカニズム	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 573-580
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Zheng Xi, Toyama Takashi, Siu Stephanie, Kaneko Takayuki, Sugiura Hikari, Yamashita Shota, Shimoda Yoshiteru, Kanamori Masayuki, Arisawa Kotoko, Endo Hidenori, Saito Yoshiro	4. 巻 14
2. 論文標題 Selenoprotein P expression in glioblastoma as a regulator of ferroptosis sensitivity: preservation of GPX4 via the cycling-selenium storage	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 682
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-024-51259-5	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Arisawa Kotoko, Matsuoka Ayumi, Ozawa Natsuki, Ishikawa Tomoko, Ichi Ikuyo, Fujiwara Yoko	4. 巻 16
2. 論文標題 GPER/PKA-Dependent Enhancement of Hormone-Sensitive Lipase Phosphorylation in 3T3-L1 Adipocytes by Piceatannol	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu16010038	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Ye Xinying, Toyama Takashi, Taguchi Keiko, Arisawa Kotoko, Kaneko Takayuki, Tsutsumi Ryouhei, Yamamoto Masayuki, Saito Yoshiro	4. 巻 6
2. 論文標題 Sulforaphane decreases serum selenoprotein P levels through enhancement of lysosomal degradation independent of Nrf2	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1060
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-023-05449-y	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Mizuno Ayako, Toyama Takashi, Ichikawa Atsuya, Sakai Naoko, Yoshioka Yuya, Nishito Yukina, Toga Renya, Amesaka Hiroshi, Kaneko Takayuki, Arisawa Kotoko, Tsutsumi Ryouhei, Mita Yuichiro, Tanaka Shun-ichi, Noguchi Noriko, Saito Yoshiro	4. 巻 299
2. 論文標題 An efficient selenium transport pathway of selenoprotein P utilizing a high-affinity ApoER2 receptor variant and being independent of selenocysteine lyase	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 105009
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2023.105009	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Arisawa Kotoko, Kaneko Miyuki, Matsuoka Ayumi, Ozawa Natsuki, Kawawa Rie, Ishikawa Tomoko, Ichi Ikuyo, Fujiwara Yoko	4. 巻 15
2. 論文標題 Piceatannol Prevents Obesity and Fat Accumulation Caused by Estrogen Deficiency in Female Mice by Promoting Lipolysis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 1374
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu15061374	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Kitabayashi Nanako, Nakao Shohei, Mita Yuichiro, Arisawa Kotoko, Hoshi Takayuki, Toyama Takashi, Ishii Kiyoko, Takamura Toshinari, Noguchi Noriko, Saito Yoshiro	4. 巻 183
2. 論文標題 Role of selenoprotein P expression in the function of pancreatic cells: Prevention of ferroptosis-like cell death and stress-induced nascent granule degradation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Free Radical Biology and Medicine	6. 最初と最後の頁 89 ~ 103
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.freeradbiomed.2022.03.009	査読の有無 無
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12件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Kotoko Arisawa, Moeka Natori, Yoshiro Saito
2. 発表標題 Vitamin E increases lysosomal Fe ²⁺ concentrations despite preventing lipid peroxidation in hepatocytes
3. 学会等名 Iron, Reactive Oxygen Species & Ferroptosis in Life, Death & Disease (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kotoko Arisawa, Moeka Natori, Yoshiro Saito
2. 発表標題 Vitamin E increases lysosomal Fe (II) production in hepatocytes despite being protective against ferroptosis
3. 学会等名 The 8th International Symposium on Metallomics (ISM-8) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 秋場 湧太、金子 尚志、有澤 琴子、斎藤 芳郎
2. 発表標題 フェルトーシスで惹起される脂質酸化メカニズムの解析
3. 学会等名 第61回日本薬学会東北支部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kotoko Arisawa, Yoshiro Saito
2. 発表標題 Selenoprotein P regulates resistance to iron-dependent cell death by modulating selenium homeostasis in hepatocytes
3. 学会等名 the 22nd International Congress of Nutrition - the International Union of Nutritional Sciences (the 22nd IUNS-ICN) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 有澤琴子
2. 発表標題 セレン輸送タンパク質セレノプロテインPを介した肝臓の金属動態調節と肝疾患制御
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 有澤琴子, 斎藤芳郎
2. 発表標題 ビタミンEによるリソソームを介した鉄代謝制御とフェロトーシスの関連
3. 学会等名 第33回ビタミンE 研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 有澤琴子, 平沼哲太, 金子尚志, 外山喬士, 斎藤芳郎
2. 発表標題 肝細胞癌におけるセレノプロテインP発現変動の意義
3. 学会等名 第7回日本セレン研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 有澤琴子, 平沼哲太, 金子尚志, 外山喬士, 斎藤芳郎
2. 発表標題 セレン輸送タンパク質Selenoprotein Pを介した 肝セレン動態およびフェロトーシスの制御
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 秋場湧太, 金子尚志, 有澤琴子, 斎藤芳郎
2. 発表標題 フェロトキシスにおける脂質酸化過程と細胞内局在の解析
3. 学会等名 酸化脂質研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 秋場湧太, 金子尚志, 有澤琴子, 斎藤芳郎
2. 発表標題 フェロトキシスで誘導される脂質酸化メカニズムと細胞小器官局在性
3. 学会等名 第65回日本脂質生化学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 秋場湧太, 金子尚志, 有澤琴子, 斎藤芳郎
2. 発表標題 フェロトキシスにおける脂質酸化過程とCYP7A1の役割
3. 学会等名 第一回生体金属討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 秋場湧太, 金子尚志, 有澤琴子, 斎藤芳郎
2. 発表標題 フェロトキシスにおける脂質酸化プロセスとCYP7A1の役割
3. 学会等名 第22回次世代を担う若手のためのファーマ・バイオフィォーラム2023
4. 発表年 2023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
--	---------------------------	-----------------------	----

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