

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460075

研究課題名(和文) shRNAライブラリーにより同定した新規細胞死実行因子の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of lipo genes, PHGPx depleted novel cell death execution factors, identified by genome-wide shRNA library

研究代表者

今井 浩孝 (IMAI, Hirotaka)

北里大学・薬学部・教授

研究者番号：50255361

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：PHGPx欠損細胞死の実行遺伝子を明らかにするために、網羅的shRNAライブラリー感染により、生き残ることのできるshRNA配列を同定し、その遺伝子のcDNAのクローニングを行い、ノックダウン細胞に再導入した際にPHGPx欠損細胞死が回復する遺伝子を6遺伝子、PHGPx欠損細胞死実行因子(Lipo遺伝子)を見出した。Lipo遺伝子のノックダウン細胞は、抗がん剤エラスチン、RSL3によるフェロトーシスを全く抑制できなかった。以上の結果は、PHGPx欠損細胞死とフェロトーシスは異なる細胞死であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：To clarify the mechanism of PHGPx depleted novel cell death, we identified six PHGPx depleted lipid peroxidation dependent cell death (lipoxytosis) inducing genes (Lipo gene) by genome-wide shRNA library screening and cell death recovery screening by retransfection of cDNA for lipo gene into lipo gene knockdown cells. Knockdown cells of the Lipo gene failed to suppress ferroptosis by the anti-cancer agent erastin and RSL3. These results reveal that PHGPx-depleted cell death is different cell death pathway from ferroptosis by erastin and RSL3.

研究分野：医歯薬学 薬学 生物系薬学

キーワード：細胞死 シス 脂質酸化 遊離二価鉄 shRNAライブラリー フェロトーシス GPx4欠損細胞死 リポキソ
ーシス ビタミンE

1. 研究開始当初の背景

リン脂質ヒドロペロキシドグルタチオンペルオキシダーゼ (PHGPx、GPx4) は、酸化ストレス等で生体膜のリン脂質が酸化され生成したリン脂質ヒドロペルオキシドをグルタチオン依存的に直接還元できる抗酸化酵素である。我々はこれまでに PHGPx を様々な組織、細胞で欠損させると、脂質酸化依存的でカスパーゼ非依存的な新規細胞死が誘導されることを見出してきた。一方、米国の Stockwell らは変異 Ras 依存的ながん細胞のみを殺す抗がん剤エラスチンが、シスチントランスポーターを阻害し、細胞内のグルタチオンを枯渇させることにより、PHGPx 活性を消失させ、遊離 2 価鉄依存的な脂質酸化依存的な新規細胞死フェロトシスを引き起こすこと、また RSL3 は PHGPx に直接結合して酵素活性を阻害することにより同様な鉄依存性の脂質酸化依存的なフェロトシスを引き起こすことから、PHGPx がフェロトシスの制御因子であることを報告した。その結果、現在では GPx4 欠損による細胞死と抗がん剤によるフェロトシスは同じ細胞死経路であると考えられている。しかし、我々は、PHGPx 欠損による細胞死は、1 2 時間で致死となる抗がん剤によるフェロトシスに比べ、細胞死に 2~3 日かかることや、鉄のキレーターで抑制できないことから、PHGPx 欠損細胞死とフェロトシスは異なる細胞死経路であると考えている。

2. 研究の目的

本研究では PHGPx 欠損新規細胞死の実行因子を明らかにし、抗がん剤によるフェロトシスと致死のメカニズムが異なることを明らかにすることを目的とした。これまでに我々は、プール型の shRNA ライブラリーのスクリーニングを行い、PHGPx 欠損細胞死を抑制できる候補遺伝子を 151 遺伝子見出し、さらに一つ一つの単独 shRNA を感染させ、PHGPx 欠損細胞死を抑制できる遺伝子を 42 遺伝子明らかにした。そこで、本研究ではこの 42 遺伝子の cDNA をクローニングして、ノックダウン細胞に、再導入することにより、細胞死を回復させられるのか、また PHGPx 欠損細胞死の際にどのように機能するのか、フェロトシスにも関与するのかについての解析を行った。

3. 研究の方法

PHGPx 欠損細胞死は、我々が樹立したタモキシフェン誘導型 PHGPx 欠損 MEF 細胞を用いた。本細胞は、培地にタモキシフェンを添加すると、細胞質に発現したエストロゲン受容体に結合した Cre リコンビナーゼが、核に移行して、LoxP 配列に挟まれた PHGPx ゲノム遺伝子を破壊することができる。タモキシフェン添加後、24 時間後に PHGPx タンパク質はほぼ消失し、リン脂質ヒドロペルオキシドの生成

が起きる。その後、36 時間後に MEK 及び ERK のリン酸化が起きて 48 時間から 72 時間後に細胞死が誘導される。この細胞死は、カスパーゼ阻害剤で抑制がかからないが、ビタミン E で完全に抑制できる。この細胞に対してプール型網羅的 shRNA ライブラリーを含むレンチウイルスを感染させ、96 時間後に生き残った細胞から導入された shRNA 配列を Gene Chip で同定し、候補遺伝子として 151 遺伝子を同定した。さらに、個々の shRNA を発現するレトロウイルスベクターを構築して、感染し、実際に PHGPx 欠損細胞死を抑制できる shRNA を評価した。MEK のノックダウンより細胞死抑制効果が高かった遺伝子 42 遺伝子を脂質酸化依存的な新規細胞死実行因子 (Lipo 遺伝子) として同定した。

本研究ではまず、この 42 遺伝子の cDNA のクローニングを、タモキシフェン誘導型 PHGPx 欠損 MEF 細胞から回収した mRNA から行った。クローニングできた cDNA を shRNA 耐性に変異を入れた後に、それぞれの shRNA を導入したノックダウン細胞に、レトロウイルスを用いて再発現させた。再導入した細胞をタモキシフェン添加することにより細胞死が誘導されるようになる Lipo 遺伝子を同定した順に番号をつけた。

また得られた Lipo 遺伝子 cDNA と GFP 遺伝子との融合タンパク質を作成し、細胞に発現することで、細胞内での分布を明らかにするとともに、タモキシフェン添加刺激における細胞内局在の変化について、12 時間後、24 時間後、36 時間後、48 時間後、60 時間後に観察した。

Lipo 遺伝子の機能部位を明らかにするために、26 時間後に見られるリン脂質ヒドロペルオキシドを蛍光色素 DCF による上昇によりフローサイトメトリーに解析した。さらに 40 時間後に見られる ERK のリン酸化はリン酸化抗体による免疫染色により解析した。Lipo 遺伝子のノックダウン細胞を用いて、脂質ヒドロペルオキシド生成の上流か下流で機能しているのか、また ERK のリン酸化の上流か下流で機能しているのかについて解析した。

この細胞はフェロトシスを起こすことができた。エラスチン、RSL3、サルファサラジンで細胞死が誘導できるが、いずれも 12 時間で致死が起きる。Lipo 遺伝子のノックダウン細胞がフェロトシスを抑制できるのかについて解析を行った。

4. 研究成果

(1) Lipo 遺伝子の cDNA クローニングとノックダウン細胞への再導入細胞の作成と細胞死の回復効果

候補 42 遺伝子の shRNA の配列から、cDNA を探索し、cDNA のクローニングを行った。cDNA のアノテーションがないノンコーディング遺伝子や増幅ができない遺伝子もあった。得られた 42 遺伝子は、これまで細胞死に関与

していると考えられている遺伝子はほとんどなかったことから、PHGPx 欠損細胞死が新規の細胞死であることが予想できた。得られた cDNA のうち、それぞれのノックダウン細胞にレトロウイルス感染系を用いて、再導入したところ、再導入しただけで細胞死が誘導されてしまうものも見られた。これらの遺伝子は細胞死誘導活性が考えられたが、今回は対象から外した。再導入したノックダウン細胞を、タモキシフェン添加し 72 時間後に細胞死が誘導できたものを、PHGPx 欠損細胞死実行因子 (Lipo 遺伝子) と名付け 6 遺伝子同定した。Lipo-1 は新規遺伝子、Lipo-2 は機能未知遺伝子、Lipo-3 はそのホモログが脂質代謝活性を有する遺伝子ファミリー分子、Lipo-4, 5 はタンパク質分解に関与する遺伝子、Lipo-6 はシャペロン様の活性が予想される機能未知遺伝子であった。Lipo-4 及び Lipo-5 以外はほとんど機能が明らかになっていない遺伝子であった。

(2) Lipo 遺伝子の GFP 融合タンパク質を用いた解析

得られた 19 種類の cDNA と GFP の融合タンパク質を細胞に発現させ、Lipo 遺伝子の細胞内局在とタモキシフェン添加後に局在が変化する遺伝子が存在するかについて、12 時間おきに観察した。19 遺伝子のうち、細胞膜あるいは細胞膜と小胞体に発現している Lipo 遺伝子が 2 つ、1 つは核及び、核小体に存在した。それ以外は細胞質に分布した。Lipo1-6 遺伝子のうち、Lipo-3 遺伝子は細胞膜、小胞体に分布が観察された。それ以外は細胞質に存在した。タモキシフェン添加後、局在が変化した遺伝子は残念ながら存在しなかった。

(3) Lipo-1 ~ 6 遺伝子の機能部位の同定

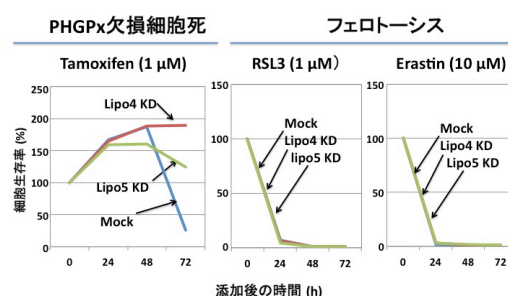
Lipo-1~6 のノックダウン細胞を用いて。タモキシフェン添加後、26 時間後の細胞内のヒドロペルオキシド生成が抑制されているか、また 40 時間後の ERK のリン酸化の上流か下流で機能しているのかについて解析した。その結果、Lipo-1 はヒドロペルオキシド生成を抑制した。Lipo-6 は ERK のリン酸化の下流で機能していることが予想された。Lipo-3 はヒドロペルオキシド生成の下流で機能していたが、ERK リン酸化に関してはノックダウン細胞においてベースのリン酸化が高かったため、今後の解析が必要である。Lipo-2, 4, 及び 5 はヒドロペルオキシド生成の下流、ERK リン酸化の上流で機能していると考えられた。

(4) Lipo 遺伝子のフェロトーシスへの関与

Lipo 遺伝子は、ノックダウンにより GPx4 欠損細胞死を抑制できる遺伝子として見出された遺伝子群である。シスチントランスポーター (xCT) を阻害してフェロトーシスを起こすエラスチンやサルファサラジン、PHGPx に直接結合する RSL3 によるフェロトーシス

に対して、Lipo 遺伝子のノックダウン細胞が抑制できるのかについて検討した。RSL3 及びエラスチンは鉄のキレーター DF0 で抑制されるが、GPx4 欠損細胞死では DF0 で全く抑制効果が見られない。Lipo 遺伝子ノックダウン細胞は全く、エラスチン、サルファサラジン及び RSL3 によるフェロトーシスを抑制できなかった。図 1 は Lipo-4 及び Lipo-5 ノックダウン細胞のデータを示す。タモキシフェン添加による GPx4 欠損細胞死は Lipo-4 及び Lipo-5 は抑制できるが、RSL3 やエラスチンでは全く抑制できなかった。

図1 PHGPx欠損細胞死はフェロトーシスと細胞死経路が異なる



以上の結果から、本研究では、GPx4 欠損細胞死の実行因子を 6 遺伝子見出した。この遺伝子のノックダウン細胞は全くフェロトーシスを誘導する試薬エラスチン、サルファサラジン、RSL3 に対して抑制効果を示さなかった。このことから、GPx4 欠損細胞死と抗がん剤によるフェロトーシスは全く異なる細胞死経路を介する新規細胞死であることが明らかとなった。我々は現在リポキナーゼと名付け解析を進めている。

今後は同定した Lipo 遺伝子がどのように新規細胞死の実行に関与しているのかについて詳細な解析が必要である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

- ① Imai, H., Matsuoka, M., Kumagai, T., Sakamoto, T., and Koumura, T.: Lipid peroxidation-dependent cell death regulated by GPx4 and Ferroptosis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 403, 143-170 (2017) 査読有 DOI:10.1007/82_2016_508.
- ② Sakai, O., Yasuzawa, T., Sumikawa, Y., Ueta, T., Imai, H., Sawabe, A., and Ueshima, S.: Role of GPx4 in human vascular

- endothelial cells, and the compensatory activity of brown rice on GPx4 ablation condition. **Pathophysiology** 24(1), 9-15 (2017) 査読有
DOI:10.1016/j.pathophys.2016.11.002.
- ③ Uchida, T., Sakai, O., Imai, H., and Ueta, T.: Role of glutathione peroxidase 4 in corneal endothelial cells. **Curr. Eye Res.** 42(3), 380-385 (2017) 査読有
DOI:10.1080/02713683.2016.1196707
- ④ Sakai, O., Uchida, T., Imai, H., and Ueta, T.: Glutathione peroxidase 4 plays an important role in oxidative homeostasis and wound repair in corneal epithelial cells. **FEBS Open Bio.** 6(12), 1238-1247 (2016) 査読有
DOI:10.1002/2211-5463.12141.
- ⑤ 今井浩孝 : GPx4 により制御される脂質酸化依存的細胞死とフェロトーシス. **実験医学** 34 (7) 37-46 (2016) 査読なし
- ⑥ Sakai, O., Uchida, T., Roggia, M.F., Imai, H., Ueta, T., and Amano, S.: Role of glutathione peroxidase 4 in glutamate-induced oxytosis in the retina. **PLoS One** 10, e0130467 (2015) 査読有 DOI:10.1371/journal.pone.0130467 eCollection
- ⑦ Kumagai, T., Kozakai, Y., Ishino, T., Yajima, Y., Nakagawa, Y., and Imai, H.: Nrf2 up-regulates the induction of acidic sphingomyelinase by electrophiles. **J. Biochem.** 158(2), 127-137 (2015) 査読有
DOI:10.1093/jb/mvv030.
- ⑧ 今井浩孝 : フェロトーシスー脂質酸化依存的新規細胞死ー. **臨床免疫・アレルギー科** 63(5) 406-414 (2015) 査読なし
- ⑨ Sakai, O., Uchida, T., Imai, H., Ueta, T., and Amano, S.: Role of glutathione peroxidase 4 in conjunctival epithelial cells. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.** 56, 538-543 (2015) 査読有 DOI:10.1167/iops.14-15463
- ⑩ Fujii, J., and Imai, H.: Redox reactions in mammalian spermatogenesis and the potential targets of reactive oxygen species under oxidative stress. **Spermatogenesis** 4, e979108 (2014) 査読有
DOI:10.4161/21565562.2014.979108
- ⑪ Sakamoto, T., Maebayashi, K., Nakagawa, Y., and Imai, H.: Deletion of the four phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase genes accelerates aging in *Caenorhabditis elegans*. **Genes Cells** 19, 778-792 (2014) 査読有 DOI:10.1111/gtc.12175
- ⑫ Roggia, M.F., Imai, H., Shiraya, T., Noda, Y., and Ueta, T.: Protective role of glutathione peroxidase 4 in laser-induced choroidal neovascularization in mice. **PLoS One** 9, e98864 (2014) 査読有
DOI:10.1371/journal.pone.0098864
- [学会発表] (計 35 件)
- 35 件のうち、招待講演及びシンポジウム講演のみ 18 件を記載する。
- ① 今井浩孝、脂質酸化依存的新規細胞死ーフェロトーシスと GPx4 欠損細胞死ーにおける鉄の役割、日本薬学会第 137 年会 2017 年 3 月 27 日、仙台 仙台国際センター (宮城県 仙台市)
- ② 今井浩孝、GPx4 に制御される脂質酸化依存的新規細胞死 (フェロトーシス様細胞死) と疾患、第 4 回 J F A S (Japan/Joy of Fatty Acids Secrets/Society) 2017 年 3 月 5 日、富士ソフトアキバプラザ (東京 千代田区)
- ③ Hirofumi Imai, GPx4 Depletion Induced Novel Lipid Peroxidation Dependent Cell death and Disease. The 6th International Selenium Conference (Se 2016) (Guangzhou-Shenzhen, China) 2016.10.21 Jinan University (Guangzhou, China)

- ④ 今井浩孝、脂質酸化依存的新規細胞死フェロトーシスと GPx4 欠損細胞死、第 8 9 回日本生化学会大会 2016 年 9 月 25 日、仙台国際センター (宮城県 仙台市)
- ⑤ 今井浩孝、松岡正城、新井洋由、網羅的 shRNA ライブラリースクリーニングによる脂質酸化依存的新規細胞死の実行因子の探索、第 19 回 Vitamin E Update Forum 2016 年 8 月 16 日、如水会館 (東京都 千代田区)
- ⑥ 今井浩孝、GPx4 により制御される脂質酸化依存的新規細胞死-フェロトーシスとの関連-、第 4 回 ATAGO Respiratory Expert Seminar 2016 年 6 月 25 日、東京慈恵医科大学 (東京都 港区)
- ⑦ Hiroataka Imai, GPx4 Depletion Induced Novel Lipid Peroxidation Dependent Cell death and Disease、The 13th International Conference on the Chemistry of Selenium and Tellurium (ICCST-13) 2016, 5, 26、Gifu Nagaragawa Convention Center (岐阜県 岐阜市)
- ⑧ 今井浩孝、GPx4 欠損によるフェロトーシス様新規細胞死の分子メカニズム、日本薬学会第 136 年会 2016 年 3 月 28 日、パシフィコ横浜 (神奈川県 横浜市)
- ⑨ 今井浩孝、PHGPx により制御される脂質ヒドロペルオキシド依存的新規細胞死、第 30 回日本酸化ストレス学会関東支部会 教育講演 2015 年 12 月 19 日、東海大学代々木キャンパス (東京都 渋谷区)
- ⑩ 今井浩孝、脂質酸化依存的新規細胞死(フェロトーシス)と疾患、第 31 回 Wak ework ショップ 細胞死の New Horizon 細胞死研究の先に見えてきたもの 2015 年 11 月 4 日 東京コンフ
- ァレンスセンター・品川 (東京都 品川区)
- ⑪ Hiroataka Imai, Koumura, T. and Matsuoka, M. Ferroptosis regulator GPx4 or Vitamin E in heart prevents cardio sudden death in mice, Japan Australia Meeting on Cell Death, 2015, 10,22, WEHI (Melbourne, Australia)
- ⑫ Hiroataka Imai, Suppression of generation of phospholipid hydroperoxide in heart by vitamin or GPx4 prevents cardio sudden death in mice, 56th International Conference on the Bioscience of Lipids (ICBL) 2015, 9, 25 Convention Center of the Amerian Portal del Iguazu Hotel (Puerto Iguazu, Misiones Republica Argentina)
- ⑬ 今井浩孝、ビタミン E により制御される新規フェロトーシス様細胞死と疾患、フォーラム 2015 衛生薬学・環境トキシコロジー 教育講演 2015 年 9 月 17 日、神戸学院大学薬学部 (兵庫県 神戸市)
- ⑭ 今井浩孝、ビタミン E により制御されるフェロトーシス様新規細胞死の抑制因子 SMS 2 の解析、第 18 回 Vitamin E Update Forum 2015 年 8 月 28 日、如水会館 (東京都 千代田区)
- ⑮ Hiroataka Imai, Novel lipid peroxidation dependent cell death (Ferroptosis like cell death) by deficiency of GPx4, 2015 Spring Annual Convention of Pharmaceutical Society of Korea, 2015, 4, 24, C&V Center (OSONG, (Korea))
- ⑯ 今井浩孝、生体膜リン脂質酸化ホメオスタシスの破綻による新規細胞死機構とその疾患、第 9 回レドックスライフイノベーションシンポジウム 2015 年 3 月 12 日、理化学研究所 横浜キャンパス・交流棟ホール (神奈川県 鶴見市)
- ⑰ 今井浩孝、セレン蛋白質 GPx4 とビタミン E により制御される脂質酸化依存的

新規細胞死、第25回日本微量元素学会
学術集会 2014年7月3日、岡山大
学津島キャンパス (岡山県 岡山市)

- ⑱ 今井浩孝、ビタミンEは体によいのか？
酸化脂質と疾患の関連 第14回日本抗
加齢医学会総会 2014年6月8日、
大阪国際会議場 (大阪府 大阪市)

〔図書〕(計1件)

- ① 今井浩孝、(株)エル・アイ・シー、疾患
モデルの作成と利用-脂質代謝異常と
関連疾患<下巻> 第6節 過酸化リ
ン脂質消去酵素、2015年4月10日発
刊、(413) 331-339

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今井 浩孝 (IMAI, Hirotaka)
北里大学薬学部・衛生化学・教授
研究者番号：50255361