

令和 6 年 5 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K12253

研究課題名（和文）不飽和カルボニル化合物によるPKCを介した新しいフェロトーシス誘導機序の解明

研究課題名（英文）Elucidation of molecular mechanisms for PKC-dependent ferroptosis induced by unsaturated carbonyl compounds

研究代表者

東 恒仁（Higashi, Tsunehito）

北海道大学・医学研究院・助教

研究者番号：90453018

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）：我々の生活する環境中には、様々な化学物質が存在する。その中には生体に対して悪影響を及ぼすものも含まれている。不飽和カルボニル化合物は、有機化合物の不完全燃焼によって発生する化学物質であり、生体毒性があることが知られているが、毒性メカニズムは不明であった。本研究では、不飽和カルボニル化合物が免疫系細胞や肺の細胞に対してフェロトーシスという種類の細胞死を引き起こすことや、フェロトーシスを引き起こす際にプロテインキナーゼCというタンパク質が重要な役割を果たすことなどを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫系細胞や呼吸器系細胞の細胞死は、感染症や慢性閉塞性肺疾患など様々な疾病の原因であると考えられる。本研究の遂行によって有機化合物の燃焼で生じる不飽和カルボニル化合物が免疫系・呼吸器系細胞に対して引き起こす細胞死のメカニズムの一端が明らかになった。本研究結果は、これらの疾病の予防法や治療法の開発の一助となるものと期待される。またフェロトーシスの誘導に關与する因子の特定に成功したことで、フェロトーシス誘導の分子メカニズムの解明につながるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：There are a lot of types of chemical compounds in our environments. Among these, cytotoxic compounds exist. Unsaturated carbonyl compounds are one of the cytotoxic chemical compounds, and are produced by combustion of organic compounds such as lipids. Although the unsaturated carbonyl compounds are highly toxic, the molecular mechanism for cytotoxicity has been unclear. In this study, we have revealed that the unsaturated carbonyl compounds induce ferroptosis in immune cells and lung cells. We have also found that protein kinase C plays an important role in ferroptosis induction in these cells.

研究分野：化学物質の毒性学

キーワード：不飽和カルボニル化合物 フェロトーシス プロテインキナーゼC

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 不飽和カルボニル化合物とその細胞毒性

不飽和カルボニル化合物は、分子内に二重結合を持つアルデヒドおよびケトンの総称である。これらの化合物は高い化学反応性とそれに基づく細胞毒性を有することが知られているが、その毒性メカニズムの全貌は不明である。代表的な不飽和カルボニル化合物としては、アクロレイン (acrolein, ACR) やメチルビニルケトン (methyl vinyl ketone, MVK) が挙げられる。ACR はタバコの主流煙や有機化合物を不完全燃焼させたときの煙、加熱された油脂類に含まれる。MVK はタバコの主流煙に含まれるほか、ステロイドの合成材料などとして工業的に使われている。このように不飽和カルボニル化合物は環境中に広く含まれ、我々が曝露される化学物質の一つである。これらの化合物の影響を受けやすいと考えられるのは、直接曝露される皮膚や呼吸器系、また肺でのガス交換を介して曝露される循環器系や血液系などである。喫煙者は、疫学的に慢性閉塞性肺疾患や呼吸器系のがん、動脈硬化症や高血圧症、易感染性などの呼吸器系・循環器系疾患および感染症罹患に対するリスクを負っていると報告されている。タバコの主流煙には、ACR や MVK が比較的高濃度に含まれることから、不飽和カルボニル化合物がこれらの疾患の発症及び進展に寄与している可能性が考えられるものの、その実態に関しては不明な点が多い。

以前、タバコ煙ガス相や ACR・MVK がグリオーマ細胞や血管平滑筋細胞に対して引き起こす細胞死にはプロテインキナーゼ C (PKC) 依存性があること、ACR や MVK は PKC を活性化することなどを明らかにしたが、不飽和カルボニル化合物による細胞死誘導のメカニズムに関しても不明な点が多いのが現状である。

(2) フェロトーシス

細胞死にはアポトーシスやネクローシスなど様々な種類があることが知られているが、フェロトーシスは 2012 年に報告された比較的新しい細胞死の形態である。フェロトーシスの特徴は、誘導が鉄イオン依存的事であること、また最終的には脂質の過酸化による細胞の膜の機能不全が細胞死の原因となることなどである。フェロトーシスの誘導経路としては、グルタチオン依存的なフェロトーシス抑制因子である GPX4 を介する経路やユビキノンを経る経路などが報告されているが、その全貌については明らかになっていない。

2. 研究の目的

環境中の毒性化合物である不飽和カルボニル化合物 (ACR や MVK など) が細胞にどのようにして生体に影響を与えているのかは明らかではない。本研究では、ACR や MVK が細胞死 (フェロトーシス) を引き起こすメカニズムを明らかにすることで不飽和カルボニル化合物の生体毒性の機序を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

マウスマクロファージ J774 細胞は、ウシ胎児血清を 10% 添加した RPMI1640 を用いて 37°C、炭酸ガス濃度 5% 条件下で培養を行った。マウスマクロファージ RAW264.7 細胞、ヒト肺腺がん由来 A549 細胞およびヒト小細胞肺がん由来 SBC-3 細胞は、ウシ胎児血清を 10% 添加した DMEM を用いて 37°C、炭酸ガス濃度 5% 条件下で培養を行った。

(2) 細胞の生死判別試験

細胞の生死判別は、細胞の MTS 還元活性を測定することで行った。細胞を 1.0×10^4 cells/well で 96 well plate に播種し、約 24 時間培養を行った後に化学物質等で処理した。4 時間後に MTS 基質 (Promega) を添加し、更に 1 時間から 4 時間インキュベートした。産生された MTS 反応物の量は 492 nm の吸光度を測定することで定量化した。処理を行っていない細胞の MTS 反応物の量を 100% として MTS 還元活性を評価した。実験は独立して 3 回以上実施し、各界の平均値及び標準誤差を用いて表した。

(3) タバコ煙ガス相抽出物の作製方法

タバコ煙ガス相抽出物は、紙巻きタバコ Hi-Lite (JT) の主流煙をケンブリッジフィルターに通じてタール相 (粒子相) を除き、残ったガス相を PBS 中に通じることで作製した。ガス相抽出物の濃度は、作製に用いたタバコ全煙中のタール相が PBS 中に溶解したと仮定した「仮想タール濃度」にて表した。

(4) 免疫染色

細胞をガラスボトムディッシュ (マツナミ) に 1.0×10^5 cell/ml の濃度で播種し、約 24 時間培養したのちにタバコ煙ガス相等で 4 時間処理した。4% PFA で固定した後、0.1% TritonX-100/PBS で透過処理を実施した。1% BSA によるブロッキング後、一次抗体処理および蛍光標識二次抗体処理を実施した。蛍光観察および撮像は、100 倍対物レンズ (PlanApo VC, NA=1.4, ニコン) を用いて行った。

(5) ウエスタンブロッティング

細胞を回収後、氷上において NP-40 buffer で 30 分処理して溶解した。遠心分離で夾雑物を除

去した後、細胞溶解液をサンプルバッファーと混合し、還元条件下で SDS-PAGE に供した。分離されたタンパク質を PVDF メンブレンに転写した後、スキムミルクもしくは BSA 溶液でブロッキングした。メンブレンを一次抗体及び HRP 標識二次抗体で処理した後、ECL 試薬によるシグナルを X 線フィルムにて検出した。

4. 研究成果

(1) マウスマクロファージの不飽和カルボニル化合物感受性の検討

不飽和カルボニル化合物である ACR・MVK は様々な細胞に対して細胞死を誘導する性質を持つが、その感受性は細胞に依存する。そこでマクロファージ系培養細胞ならびに肺がん由来細胞の ACR・MVK を検討した。その結果、マウスマクロファージ系細胞である J774 細胞は ACR・MVK に対して高い感受性を有するものの、マウスマクロファージ系細胞 RAW264.7 細胞は高い耐性を持つことが判明した。またヒト小細胞肺がん由来 SBC-3 細胞の ACR・MVK 感受性は高かったが、ヒト肺腺がん由来 A549 細胞は耐性を持っていた (図 1)。

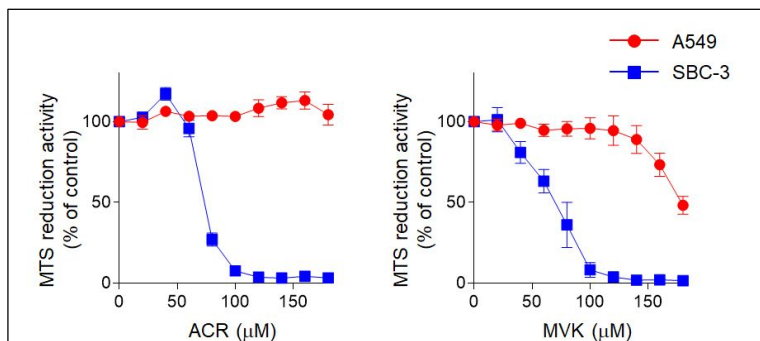


図 1 呼吸器系由来細胞の不飽和カルボニル化合物感受性の検討。ヒト肺腺がん (A549) とヒト小細胞がん (SBC-3) 由来細胞に対して ACR (左) および MVK (右) を負荷して細胞の生存率を評価した。

(2) 不飽和カルボニル化合物による細胞死の種類

細胞死にはアポトーシスやネクローシスなど様々な種類が存在することから、薬理学的手法を用いてタバコ煙ガス相や不飽和カルボニル化合物による細胞の種類を検討を行った。その結果、鉄イオンを介する細胞死であるフェロトーシスの阻害薬である Ferrostatin-1 (Fer-1) および Liproxstatin-1 (Lip-1) が ACR および MVK による細胞死を抑制することが分かった (図 2)。これらの結果から、不飽和カルボニル化合物による細胞死はフェロトーシスであることが示唆された。一方、ネクローシスおよびアポトーシス阻害薬は、不飽和カルボニル化合物による細胞死を抑制しなかった。

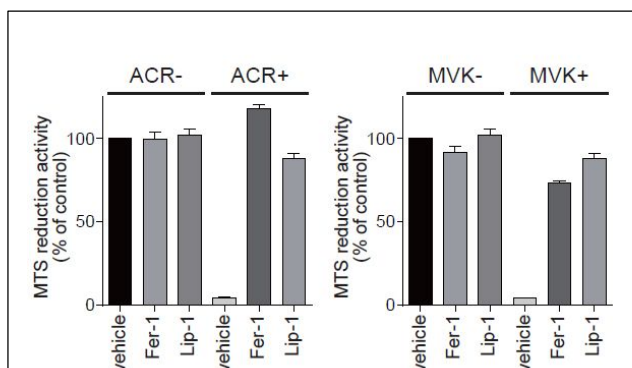


図 2 不飽和カルボニル化合物による細胞死メカニズム。フェロトーシス阻害薬 (Fer-1・Lip-1) 存在下で J774 マクロファージに対して ACR (左) および MVK (右) を負荷して細胞の生存率を評価した。JPS 153: 22-25 (2023)より改変して掲載。

(3) 不飽和カルボニル化合物による細胞死メカニズムの検討

これまでの研究成果により、グリオーマ細胞や血管平滑筋細胞に対して不飽和カルボニル化合物は PKC 依存的に細胞死を引き起こすことが分かっている。そこで本研究では、J774 細胞および SBC-3 細胞の不飽和カルボニル化合物感受性に対する PKC 阻害薬の効果を検討した。その結果、PKC 阻害薬 Gö6983 はこれらの細胞死を優位に抑制することが明らかになった。PKC には 10 種類のアイスフォームが存在するが、Gö6983 は比較的アイソフォーム特異性が低い PKC 阻害薬であることが知られている。不飽和カルボニル化合物によるフェロトーシス誘導に寄与する PKC アイソフォームを特定するためにアイソフォーム特異性がある PKC 阻害薬を検討したところ、PKCβ に対して特異性が高い阻害薬である Enzastaurin が不飽和カルボニル化合物による J774 細胞の細胞死を有

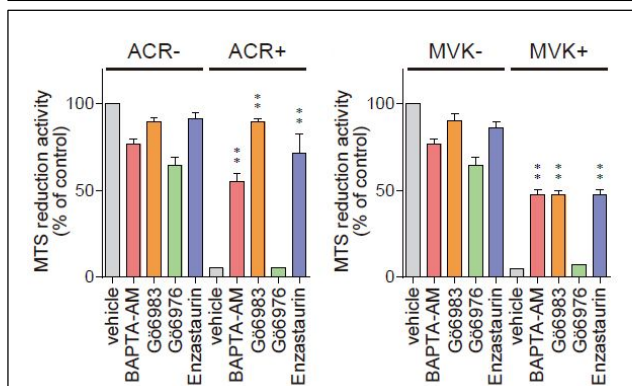


図 3 不飽和カルボニル化合物による細胞死に関連する PKC アイソフォームの特定。PKC 阻害薬 (Gö6983・Gö6976・Enzastaurin) 存在下で J774 マクロファージに対して ACR (左) および MVK (右) を負荷して細胞の生存率を評価した。JPS 153: 22-25 (2023)より改変して掲載。

意に抑制した(図3)。同様に PKCβに特異性が高い PKC 阻害薬 LY333531 はヒト小細胞肺癌由来 SBC-3 細胞において不飽和カルボニル化合物による細胞死を抑制した。以上の結果から、不飽和カルボニル化合物による細胞死には PKCβが関与している可能性が高いことが示唆された。フェロトーシス一般に対する PKCβの関与を検討するため、代表的なフェロトーシス誘導薬である RSL3 に対する PKC 阻害薬の効果を検討した結果、Gö6983・Enzastaurin は RSL3 によるフェロトーシスを抑制した(図4)。タバコ煙ガス相は PKCβの局在には影響を及ぼさなかったが(図5)、不飽和カルボニル化合物が細胞内の PKC 活性を上昇させるという報告を考え合わせると、メカニズムは不明なもの不飽和カルボニル化合物は PKC に作用してその活性を制御していることが示唆される。

(4) 細胞の不飽和カルボニル化合物の感受性に差異に関する検討

細胞によってタバコ煙ガス相や不飽和カルボニル化合物に対する感受性は大きく異なるが、そのメカニズムは不明であった。細胞内のフェロトーシス抑制因子の一つである GPX4 は、還元型グルタチオン(GSH)を基質として脂質の過酸化を抑制しフェロトーシスを抑えることが分かっている。そこで GSH 生合成系が不飽和カルボニル化合物感受性に対して与える影響を検討した。GSH 合成阻害薬である buthionine sulfoximine で細胞を処理したところ、RAW264.7 細胞の不飽和カルボニル化合物感受性が有意に上昇した。この結果は、細胞内グルタチオン濃度もしくはグルタチオン生合成系が不飽和カルボニル化合物感受性を決定している要因であることを示唆するものである。

不飽和カルボニル化合物は環境中の毒性化合物であり、我々が容易に曝露されうる化合物群である。そのため、これらの化合物の生体毒性のメカニズムの解明は、環境中の毒性化合物を原因とする疾病や健康被害の治療法や軽減方法の開発にもつながるものと考えられる。本研究では不飽和カルボニル化合物による呼吸器系細胞およびマクロファージのフェロトーシス誘導には PKCβが関与することを明らかにした。呼吸器系細胞の細胞死は、慢性閉塞性肺疾患をはじめとする呼吸器系疾患の原因となると考えられており、本研究を更に発展させることでこれらの疾患の発症に関与する化合物の特定につながる可能性がある。更にマクロファージの細胞死は、免疫力の低下による易感染性に加え、動脈硬化症の発症及び進展にも寄与していることが指摘されている。高齢化社会を迎えている昨今、虚血性心疾患を含む循環器疾患は世界の死因の第1位を占めている。本研究の発展は、環境に起因する循環器疾患の予防法や治療法の開発にもつながるものと期待される。

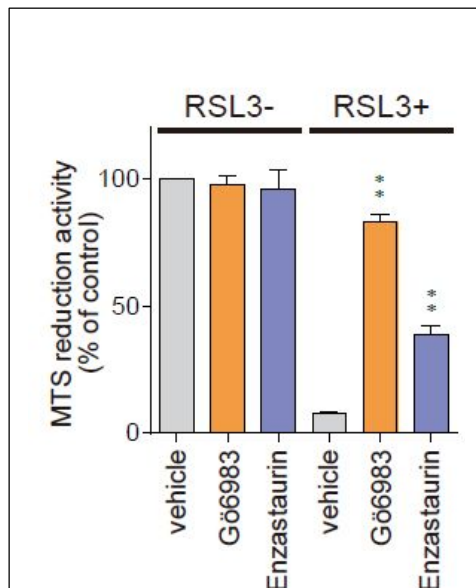


図4 フェロトーシスの PKC 依存性。PKC 阻害薬(Gö6983・Enzastaurin)存在下で J774 マクロファージに対して RSL3 を負荷して細胞の生存率を評価した。JPS 153: 22-25 (2023)より改変して掲載。

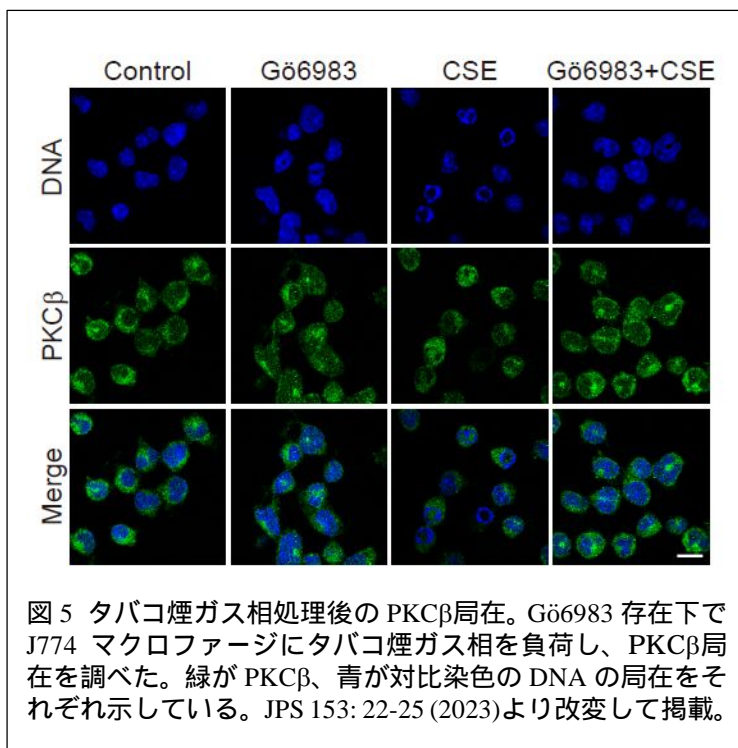


図5 タバコ煙ガス相処理後の PKCβ局在。Gö6983 存在下で J774 マクロファージにタバコ煙ガス相を負荷し、PKCβ局在を調べた。緑が PKCβ、青が対比染色の DNA の局在をそれぞれ示している。JPS 153: 22-25 (2023)より改変して掲載。

高年齢化社会を迎えている昨今、虚血性心疾患を含む循環器疾患は世界の死因の第1位を占めている。本研究の発展は、環境に起因する循環器疾患の予防法や治療法の開発にもつながるものと期待される。

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 1件）

1. 著者名 Higashi Tsunehito, Handa Haruka, Mai Yosuke, Maenaka Katsumi, Tadokoro Takashi	4. 巻 153
2. 論文標題 Protein kinase C is involved in cigarette smoke gas phase-induced ferroptosis in J774 macrophages	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 22 ~ 25
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jphs.2023.06.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 東恒仁、眞井洋輔、眞崎雄一
2. 発表標題 In vitroアッセイによる環境毒性因子の呼吸器系への影響の解明
3. 学会等名 日本動物細胞工学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 東恒仁、眞井洋輔、眞崎雄一
2. 発表標題 タバコ煙ガス相は気管上皮細胞に対してPKC依存的にフェロトーシスを誘導する
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 東恒仁、眞崎雄一
2. 発表標題 不飽和カルボニル化合物の毒性メカニズムと生理作用の解明
3. 学会等名 環境ホルモン学会第23回研究発表会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 東恒仁、眞井洋輔、眞崎雄一
2. 発表標題 気管上皮細胞に対するタバコ煙の作用の分子的解明
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 東恒仁、半田悠、眞井洋輔、前仲勝実、田所高志
2. 発表標題 不飽和カルボニル化合物は肺小細胞がんSBC-3細胞に対してPKC依存的にフェロトーシスを誘導する
3. 学会等名 第74回薬理学会北部会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 東恒仁、半田悠、眞井洋輔、前仲勝実、田所高志
2. 発表標題 タバコ煙ガス相はJ774マクロファージにおいてPKCbetaを介してフェロトーシスを誘導する
3. 学会等名 第97回日本薬理学会年会
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
---------	---------