様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　７ 年　 ６ 月 ２４ 日現在

機関番号：１４３０１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2022～2024
課題番号：２２Ｋ０６２２２

研究課題名（和文）鉄誘導性フェロトーシス惹起機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanisms underlying iron-induced ferroptosis

研究代表者
藤田　宏明（Hiroaki, Fujita）

京都大学・医学研究科・特定講師

研究者番号：９０７３８００６

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,200,000円

研究成果の概要（和文）：鉄依存性細胞死であるフェロトーシスはがんや神経変性疾患、虚血性疾患との関連から精力的に解析されている。本研究では細胞への鉄添加によってフェロトーシスを誘導できる新たな系を構築し、その系を用いてスクリーニングにより、制御因子を網羅的に探索した。さらに本スクリーニングより、新規のセレンタンパク質合成としてPRDX6を同定した。PRDX6欠損細胞ではフェロトーシスのマスター抑制因子であるセレンタンパク質GPX4の発現が減少し、鉄添加によって細胞死が誘導された。さらにPRDX6はセレンタンパク質の原材料となるセレン元素と結合することを見出し、未同定の細胞内セレン輸送体であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義
細胞内のセレン輸送体は20年以上前より存在が示唆されていたが、未同定であった。本研究によりPRDX6がセレン輸送体としてフェロトーシスの制御に関与することを明らかにし、生命にとって必須の制御系であるセレンタンパク質合成系の一旦を明らかにした。さらにPRDX6とがんとの関連にも探索し、PRDX6はがん細胞で高発現であり、PRDX6高発現のがん患者では予後が悪いことを見出した。

研究成果の概要（英文）：Ferroptosis, an iron-dependent form of cell death, has been vigorously studied due to its relevance to cancer, neurodegenerative diseases, and ischemic conditions. In this study, we established a novel system that induces ferroptosis through iron supplementation in cells and used this system to screen for regulatory factors. Through this screening, we identified PRDX6 as a novel selenoprotein synthesis factor. In PRDX6-deficient cells, the expression of selenoprotein GPX4 -a master suppressor of ferroptosis- was reduced, leading to cell death upon iron treatment. Furthermore, we discovered that PRDX6 binds to selenium, the essential element for selenoprotein, revealing that PRDX6 functions as a previously unidentified intracellular selenium carrier.

研究分野：フェロトーシス

キーワード：フェロトーシス　セレン　セレンタンパク質

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

１．研究開始当初の背景

鉄は容易に電子を授受する性質から生命にとって必須の金属だが、過剰に存在するとラジカルを発生し、毒性を発揮する。特に近年、鉄毒性によって惹起される細胞死・フェロトーシスが発見され、がんや神経変性疾患、虚血性疾患との関連から精力的に解析されている。
フェロトーシスは鉄によって細胞膜を構成するリン脂質中の多価不飽和脂肪酸が過酸化・傷害されることで惹起される細胞死である(図 1)。その重要な制御因子としてセレンタンパク質 GPX4 が知られており、GPX4 は過酸化脂質を無毒化することでフェロトーシスを抑制する。これまでのフェロトーシス研究は主に GPX4 阻害剤などによって細胞死が誘導されており、「フェロ」=「鉄」の名称に相反して、鉄の側面からの解析は行われていなかった。

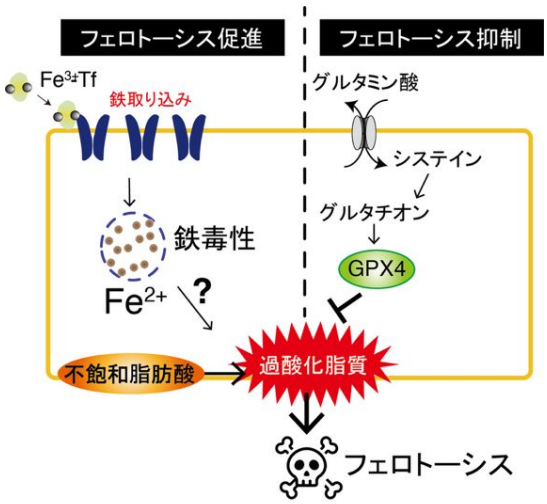


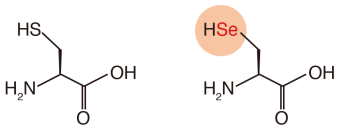
図 1：フェロトーシスの制御因子

２．研究の目的

本研究では鉄の側面からフェロトーシスを再解析し、新たな制御因子を探索するため、細胞に鉄を添加するだけでフェロトーシス様の細胞死を誘導できる細胞を CRISPR/Cas9 システムを用いて作成した。さらに、その細胞を用いた CRISPR スクリーニングにより新たな制御因子の探索を行った。

３．研究の方法

細胞内鉄は生命にとって必須であるが、過剰に存在すると毒性を発揮するため、一定量となるように厳密に制御されている。細胞内鉄量の重要な制御因子として FBXL5 が知られている。そこで、まず鉄が過剰となる細胞を作成するために FBXL5 欠損細胞を作成した。FBXL5 欠損細胞は細胞内の鉄が過剰となり、鉄添加によってフェロトーシス様の細胞死が誘導された。次に鉄過剰によって惹起される細胞死の制御因子を探索するため、全遺伝子を対象とした CRISPR スクリーニングを行い、制御因子の探索を行った。



シスチン (Cys)　　セレノシステイン (Sec)

図 2：セレノシステインの構造

４．研究成果

CRISPR スクリーニングの結果、鉄や脂質の代謝制御因子、既知のフェロトーシス制御因子を含む多種多様な制御因子の同定に成功した。中でも既知のセレンタンパク質合成因子が細胞死抑制因子として Hit したことに着目した。セレンタンパク質は 21 番目のアミノ酸であるセレノシステインを含有するタンパク質群である。セレノシステインはシステインの硫黄元素がセレン元素に置き換わった構造をしている(図 2)。ヒトではセレンタンパク質は 25 種類、知られておりその反応性の高さから、主に抗酸化作用を発揮する。フェロトーシスのマスター抑制因子である GPX4 もセレンタンパク質であり、活性中心のセレノシステイン残基でフェロトーシスの抑制に関与する。

セレンタンパク質合成系は生命にとって必須の制御系であるが、完全には解明されていないのが現状である。今回、行ったスクリーニングでは既知のセレンタンパク質合成因子が全て Hit していたので、新規のセレンタンパク質合成因子が含まれる可能性を考慮し、セレンタンパク質 GPX4 の発現量を指標に 2nd スクリーニングを行ったところ、新たなセレンタンパク質合成因子として PRDX6 を同定した。PRDX6 欠損細胞では GPX4 を含むセレンタンパク質の発現が著減し(図 3)、鉄添加によって

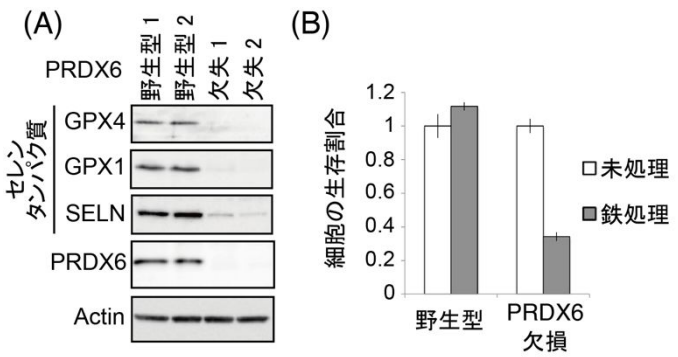


図 3：PRDX6 欠損細胞の表現型
(A) PRDX6 欠損細胞ではセレンタンパク質の発現が減少
(B) PRDX6 欠損細胞では鉄添加で細胞死が誘導

フェロトーシスが誘導されることを見出した。

PRDX6 は活性中心のシステイン残基で過酸化物を除去し、グルタチオンで還元される GPX 活性を有している抗酸化タンパク質であると、20 年以上前より考えられてきた。まず、PRDX6 が GPX 活性を有しているか、精製タンパク質を用いて解析を行ったところ、驚いたことに PRDX6 は全く GPX 活性がないことを見出した。次に、PRDX6 によるセレンタンパク質合成メカニズムを探索するために、PRDX6 欠損細胞に活性中心システイン残基の変異体を入れ戻す実験を行ったところ、セレンタンパク質の発現には PRDX6 活性中心のシステイン残基が必須であることを見出した。以上の結果より PRDX6 の活性中心システイン残基は従来考えられてきた GPX 活性ではなく、セレンタンパク質の発現を制御する機能を有していることを明らかにした。

次に PRDX6 によるセレンタンパク質合成メカニズムを詳細に探索した。野生型細胞ではセレンタンパク質の原材料であるセレン元素の添加によってセレンタンパク質の発現が効率よく増加したのに対し、PRDX6 欠損細胞ではその増加が顕著に減弱していることを見出した。よって PRDX6 はセレンタンパク質の原材料であるセレン元素の細胞内利用効率を上昇させていることを明らかにした。

細胞内のセレンは極めて反応性が高く、量も少ないため、細胞内にはセレン輸送タンパク質が存在し、セレンは輸送タンパク質のシステイン残基に補足され、セレンタンパク質合成因子へと安全に、かつ効率よく運ばれることが考えられてきた。今回見出した PRDX6 は活性中心のシステイン残基でセレンの利用効率を制御することを見出したので、未同定のセレン輸送体ではないかと考え解析を行った。質量分析で PRDX6 とセレンの結合を見たところ、活性中心システイン残基にセレンが付加されること、さらに PRDX6 はセレンタンパク質合成因子とも結合することを見出した。以上の結果より、PRDX6 は未同定のセレン輸送体として、セレンタンパク質合成に関与することを明らかにした(図 4)。

最後に PRDX6 とがんとの関係について解析を行った。がん細胞はセレンタンパク質を高発現することで、酸化ストレスを回避することが知られていた。そこで、PRDX6 とがんとの関連を探索したところ、PRDX6 はがん細胞で発現が高い傾向があり、PRDX6 高発現のがん患者では予後が悪いことが明らかとなった。さらに、膵臓がん細胞で PRDX6 を欠損したところ、フェロトーシスが誘導され、セレンの添加によって細胞死が回避されることを明らかにした。従来考えられてきた GPX4 阻害剤は、GPX4 欠損マウスが胎生致死であることから副作用の高さが懸念されてきた。一方、PRDX6 欠損マウスは生存可能であることから、PRDX6 阻害剤は副作用の少ない新たな抗がんターゲットとなる可能性を考え、解析を進行中である。

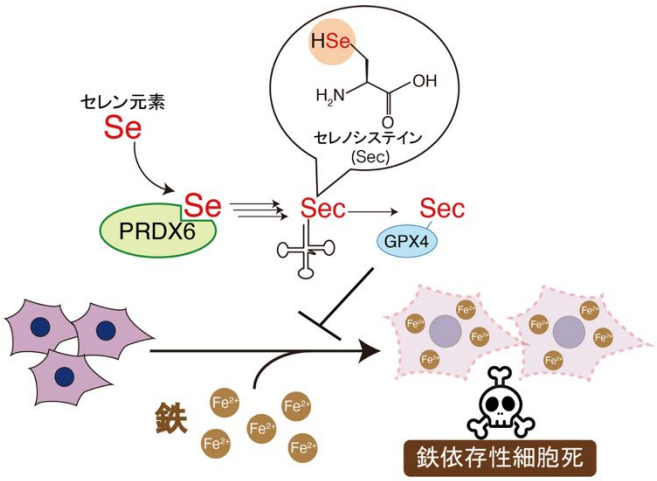


図 4 : PRDX6 によるセレン代謝制御を介したフェロトーシス制御

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計2件（うち査読付論文　2件／うち国際共著　1件／うちオープンアクセス　1件）

１．著者名 2.Fujita H., Tanaka Y., Ogata S., Suzuki N., Kuno S., Barayeu U., Akaike T., Ogra Y. and Iwai K.,	４．巻 31
２．論文標題 PRDX6 augments selenium utilization to limit iron toxicity and ferroptosis	５．発行年 2024年
３．雑誌名 Nature structural & molecular biology	６．最初と最後の頁 1277-1285
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41594-024-01329-z	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 該当する

１．著者名 Sota Kuno, Hiroaki Fujita, Yu-ki Tanaka, Yasumitsu Ogra, Kazuhiro Iwai	４．巻 23
２．論文標題 Iron-induced NCOA4 condensation regulates ferritin fate and iron homeostasis	５．発行年 2022年
３．雑誌名 Embo reports	６．最初と最後の頁 e54278
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embr.202154278	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9件（うち招待講演　6件／うち国際学会　1件）

１．発表者名 藤田宏明
２．発表標題 フェロトーシスを制御する新たなセレン代謝経路の解明
３．学会等名 日本薬学会（招待講演）
４．発表年 2025年

１．発表者名 藤田宏明
２．発表標題 鉄誘導性フェロトーシスのメカニズム解明
３．学会等名 レドックス R&D 戦略委員会　春のシンポジウム（招待講演）
４．発表年 2025年

１．発表者名
藤田宏明

２．発表標題
フェロトーシスを制御する新たなセレン動態の解明

３．学会等名
日本生化学会　シンポジウム（招待講演）

４．発表年
2024年

１．発表者名
藤田宏明

２．発表標題
Mechanisms underlying iron-induced ferroptosis

３．学会等名
シグナルネットワーク研究会

４．発表年
2024年

１．発表者名
藤田宏明

２．発表標題
鉄誘導性フェロトーシスのメカニズム解明

３．学会等名
フォーラム2024 衛生薬学・環境トキシコロジー（招待講演）

４．発表年
2024年

１．発表者名
藤田宏明

２．発表標題
鉄誘導性フェロトーシスのメカニズム解明

３．学会等名
鉄バイオサイエンス学会

４．発表年
2024年

１．発表者名
藤田宏明

２．発表標題
Mechanisms underlying iron-induced ferroptosis: possibile involvement of selenium metabolism

３．学会等名
The 1st international G-RE-XS Conference（招待講演）（国際学会）

４．発表年
2024年

１．発表者名
藤田宏明

２．発表標題
鉄依存性フェロトーシスの制御メカニズム解明

３．学会等名
日本生化学会　シンポジウム

４．発表年
2023年

１．発表者名
藤田宏明

２．発表標題
鉄誘導性フェロトーシス の制御メカニズム解明

３．学会等名
メタルバイオサイエンス学会（招待講演）

４．発表年
2022年

〔図書〕　計1件

１．著者名	４．発行年
藤田宏明，岩井一宏	2024年
２．出版社	５．総ページ数
医学のあゆみ	4
３．書名	
フェロトーシスとセレン代謝	

〔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