

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：11501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06648

研究課題名(和文) シスチン輸送体xCTの抑制による Ferroptosis の誘導と腫瘍抑制機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of induction of ferroptosis and inhibition of tumor growth caused by suppressing cystine transporter xCT

研究代表者

小林 翔 (Kobayashi, Sho)

山形大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：10779490

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：LC-MSによるチオール類と酸化ストレスマーカーのオフタルミン酸の一斉測定系を確立し、絶食時のマウスの血漿と肝臓ではグルタチオンが減少する一方で、オフタルミン酸は上昇することを明らかにした。本法を用いてxCT遺伝子欠損マウス由来マクロファージの解析を行った結果、この細胞は通常培養条件下においてシステインとグルタチオンが枯渇し、酸化ストレスが高い状態にもかかわらず、数日間生存できることがわかった。この結果はマクロファージがグルタチオンに依存しない細胞生存機構を有することを示唆する。また、一酸化窒素産生能はxCT遺伝子欠損により低下することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We established a method for simultaneous measurement of low molecular thiols and ophthalmic acid, which is an oxidative stress marker, and found an increase in ophthalmic acid level but a decrease in glutathione level in plasma and liver of fasting mice. Analyses of macrophages from xCT-deficient mice by using this method indicated that they were severe deficiency in cysteine and glutathione but could survive for several days under conditions with high oxidative stress. These results suggest that macrophages have unique glutathione-independent survival system. Meantime, nitric oxide production in xCT-deficient macrophages was significantly decreased compared to that in WT cells.

研究分野：生化学

キーワード：グルタチオン システイン xCT ferroptosis マクロファージ オフタルミン酸

1. 研究開始当初の背景

細胞内に豊富に存在するレドックス分子であるグルタチオン(GSH)は、活性酸素種の消去や有害物質の解毒反応など多様な機能を有する。GSHはシステイン(Cys)、グルタミン酸、グリシンから γ -グルタミルシステイン合成酵素(γ GCS)とグルタチオン合成酵素による2段階の反応によって合成されるが、細胞内のCys量はグルタミン酸やグリシンよりも少ないため、律速酵素の γ GCSの発現量に加えて、Cys供給量がGSH合成量を制限する。

細胞膜上に発現するシスチン・グルタミン酸トランスポーター-xCTはグルタミン酸を細胞外に放出し、代わりにシスチン(酸化型Cys)を細胞内に取り込み、Cys供給経路として機能する。xCTは、健常個体では脳・胸腺・脾臓など限られた組織において恒常的に発現している。xCT遺伝子欠損(xCTKO)マウスはシスチン/システイン比を指標とした血漿のレドックスバランスが酸化に傾いているが、正常に発育することから、xCTは生存に必須ではない。しかし、xCTKOマウス由来の胚性線維芽細胞は、培養条件下ではシスチンを取り込むことができないためGSH合成ができず、GSHが枯渇して死滅する。近年、培養系においてxCT阻害により引き起こされる細胞死は、脂質過酸化物の蓄積を特徴とし、鉄依存的な非アポトーシス性細胞死であることから、ferroptosisと名付けられた。

がんにおいてGSHは抗酸化ならびに薬剤や放射線抵抗性に関わり、がん治療の標的の一つともなるため、xCTをはじめとするCys供給系との関連で研究されている。最近、脳腫瘍・肺がん・大腸がんをはじめとする種々のがん細胞ではxCTが高発現し、悪性化に関与することが報告されており、xCTの阻害剤を用いることで、がん細胞の増殖や腫瘍成長が抑制されることが実際に観察されている。

2. 研究の目的

以上の先行研究によりxCT-GSH系を標的分子とする抗がん剤の開発が進められているが、xCT阻害による細胞死やがん細胞の成長抑制機構は十分に解明されていないため、本研究は、xCTKOマウス由来の細胞とマウスを用いて、xCT欠損に伴うグルタチオン枯渇によるferroptosis経路を明らかにし、さらに、腫瘍の形成と成長におけるxCTの果たす役割を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) GSH合成においてシステインの供給が不足した場合、Cysに代わって2-アミノ酪酸(2AB)がGSH合成系に使用され、オフタルミン酸(OPT)を生じることが知られおり、細胞のGSH枯渇のバイオマーカーとなることが報告されている。そこで、高速液体クロマトグラフィー-質量分析計(LC-MS)によるCysやGSHなどのチオール類とOPTの一斉測定系

を確立し、絶食時での血漿と肝臓中のCysやGSH、OPTの変動を調べた。

(2) xCTの阻害や欠損で引き起こされるferroptosisを解明する目的で、野生型(WT)とxCTKOマウス腹腔マクロファージの培養系における性質を比較し、xCTKOマクロファージの特徴づけを行った。

4. 研究成果

(1) 申請者らはLC-MSを用いて低分子チオール類(CysとGSH)とGSH枯渇のバイオマーカーであるOPTの一斉測定法を確立することに成功した。本法を用いた検討により、絶食時のマウスでは血漿と肝臓中のCysとGSHが減少する一方で、OPTは上昇することを明らかにした(Kobayashi et al, Biochem Biophys Res Commun, 2017)。最近になって、OPT合成に使用される2ABはメチオン代謝と連動したCys合成系(トランススルフェーション経路)の副産物として産生される2-オキソ酪酸(2OB)にアミノ基転移反応により生じることが報告された。そこで、トランススルフェーション経路の酵素の一つであるシスタチオニン- γ -リアーゼ(CSE)の阻害剤を処理した所、絶食によりさらにGSH量が減少したが、OPT量の増加は抑制された。その後の検討で γ GCSへの2ABの親和性はCysよりも約5倍程度低いことが分かり、絶食時にはトランススルフェーション経路を介して大量の2ABが合成されることが予想された。また、6時間の絶食後に栄養素として5%グルコースを飲水投与すると、絶食によるGSH量の減少が抑えられ、OPT上昇も抑制されたことから、アミノ酸代謝に伴う2OB/2ABの生成がOPT合成亢進に関与することが確認された。これらのことからトランススルフェーション経路により合成されたCysは絶食下では糖新生に利用されて不足するためGSH量は減少するが、副産物おして生じた2OBはアミノ基転移されて2ABとなりOPT合成に利用されると考えられた。

OPTに加えて、肝障害患者の血清中の γ -グルタミルペプチド類は健常者よりも高く、これらの γ -グルタミルペプチド類の合成にGSH合成系が関与することが示唆されているため、LC-MSでの測定系を改良しOPTを含めた血漿・組織中に存在する γ -グルタミルペプチド類の測定系を確立した。マウス組織中の γ -グルタミルペプチド類を測定した結果、生体内において多様な γ -グルタミルペプチドが生成されており、それらの合成には、 γ GCSだけでなく γ -グルタミルトランスフェラーゼが関与し、Cysの供給や臓器の状態に大きく依存することが分かった(未発表データ)。この結果はGSH枯渇によるferroptosis過程では細胞内ではOPTも含めた多様な γ -グルタミルペプチド類が合成される可能性を示唆する。ほとんどの γ -グルタミルペプチド類の生理機能は未知であるため、さらなる研

究が必要である。

(2) xCTKO マウス腹腔内から分離したマクロファージの培養系における性質の特徴付けを行った結果、xCTKO マクロファージは培養 24 時間目で細胞内の Cys と GSH が著しく減少するにも関わらず、WT マクロファージと同様に数日間培養環境下で生存できることが明らかになった (Kobayashi et al, Nitric Oxide, 2018)。xCTKO マクロファージは WT に比べて細菌性リポ多糖 (LPS) 刺激による細胞内活性酸素レベルが著しく高くなり、活性酸素産生試薬であるメナジオンに対して脆弱であった。中性アミノ酸トランスポーターを介して細胞内に Cys を供給することに働く 2-メルカプトエタノール (2ME) は xCTKO マクロファージ細胞内の Cys 量と GSH 量を増大させ、LPS 刺激性活性酸素レベルを減少させた。さらに、WT と xCTKO マクロファージの間に有意な差のある抗酸化/レドックス関連酵素は検出されなかった。これらの結果は、予想に反して、xCTKO マクロファージは GSH 枯渇下でも ferroptosis を回避し、生存を可能にする機構を有することを示唆した。

また、マクロファージの一酸化窒素 (NO) 産生能を培地中に蓄積した亜硝酸量として調べると、WT よりも xCTKO マクロファージの方が有意に低いことが明らかになった。しかし、誘導型 NO 合成酵素のタンパク発現量と NO 合成の前駆物質であるアルギニンの取り込み活性には WT と xCTKO マクロファージの間に差を認めなかった。2ME を添加し、細胞内の GSH 量を回復させると NO 産生能は WT と同程度まで回復したことから、細胞内のレドックス能が NO 産生を部分的に制御する可能性が考えられた。

マクロファージの GSH 枯渇下での細胞生存を可能にする機構を解明のためプロテオミクス解析を行った。その結果、xCTKO マクロファージにおいて発現が高いタンパク質因子をいくつか同定することに成功した。現在、特異的抗体を用いたイムノプロットと定量的 PCR による精密な解析を進め、これら xCTKO マクロファージで発現が高い遺伝子が細胞生存にどのように寄与するかをマウスマクロファージ様細胞株細胞を使用し、検討を行なっている。

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 7 件)

Sho Kobayashi, Shinji Hamashima, Takujiro Homma, Mami Sato, Ryusuke Kusumi, Shiro Bannai, Junichi Fujii, Hideyo Sato. Cystine/glutamate transporter, system xc⁻, is involved in nitric oxide production in mouse peritoneal macrophages. Nitric Oxide,

78:32-40. (2018) (DOI: 10.1016/j.niox.2018.05.005) (査読有)

Takujiro Homma, Takaya Shirato, Ryusuke Akihara, Sho Kobayashi, Jaeyoung Lee, Ken-ichi Yamada, Satoshi Miyata, Junichi Fujii. Mice deficient in aldo-keto reductase 1a (Akr1a) are resistant to thioacetamide-induced liver injury. Toxicol Lett, 294:37-43. (2018)(DOI: 10.1016/j.toxlet.2018.05.015) (査読有)

Mami Sato, Ryusuke Kusumi, Shinji Hamashima, Sho Kobayashi, Satoru Sasaki, Yuhei Komiyama, Takuji Izumikawa, Marcus Conrad, Shiro Bannai, Hideyo Sato. The ferroptosis inducer erastin irreversibly inhibits system xc⁻ and synergizes with cisplatin to increase cisplatin's cytotoxicity in cancer cells. Sci Rep, 8:968. (2018) (DOI: 10.1038/s41598-018-19213-4) (査読有)

Jaeyoung Lee, Eun Sil Kang, Sho Kobayashi, Takujiro Homma, Hideyo Sato, Han Geuk Seo, Junichi Fujii. The viability of primary hepatocytes is maintained under a low cysteine-glutathione redox state with a marked elevation in ophthalmic acid production. Exp Cell Res, 361:178-191 (2017) (DOI: 10.1016/j.yexcr.2017.10.017.) (査読有)

Shinji Hamashima, Takujiro Homma, Sho Kobayashi, Naoki Ishii, Toshihiro Kurahashi, Ren Watanabe, Naoko Kimura, Hideyo Sato, Junichi Fujii. Decreased reproductive performance in xCT-knockout male mice. Free Radic Res, 51:851-860 (2017) (DOI: 10.1080/10715762.2017.1388504) (査読有)

Sho Kobayashi, Jaeyoung Lee, Toshifumi Takao, Junichi Fujii. Increased ophthalmic acid production is supported by amino acid catabolism under fasting conditions in mice. Biochem Biophys Res Commun. 491:649-655 (2017) (DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.07.149) (査読有)

Eun Sil Kang, Jaeyoung Lee, Takujiro

Homma, Toshihiro Kurahashi, Sho Kobayashi, Atsunori Nabeshima, Sohsuke Yamada, Han Geuk Seo, Satoshi Miyata, Hideyo Sato, Junichi Fujii. xCT deficiency aggravates acetaminophen-induced hepatotoxicity under inhibition of the transsulfuration pathway. *Free Radic Res*, 51, 80-90 (2017) (DOI: 10.1080/10715762.2017.1282157) (査読有)

〔学会発表〕(計5件)

小林翔ら、絶食によるアミノ酸代謝の亢進はオフタルミン酸合成を促進する、2017年度生命科学系学会合同年次大会、2017

Sho Kobayashi et al, Macrophages from xCT-deficient mice survive under low cysteine/glutathione redox conditions with high oxidative stress. OCC World Congress 2017 and Annual SFRR-E Conference、2017年

小林翔ら、xCT欠損によりグルタチオン・レドックスバランスに障害のあるマクロファージの細胞培養系における性質、日本生化学会東北支部第83回例会、2017年

小林翔ら、マクロファージの酸化ストレス防御とNO産生におけるシスチン・グルタミン酸トランスポーターの役割、第17回日本NO学会、2017年

小林翔ら、肝臓へのシステイン供給におけるxCTとTranssulfuration経路の役割、第69回日本酸化ストレス学会学術集会、2016年

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.id.yamagata-u.ac.jp/BiochemI/b2.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

小林 翔 (Sho Kobayashi)
山形大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：10779490

(4)研究協力者

藤井 順逸 (Junichi Fujii)
山形大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：00222258

本間 拓二郎 (Takujiro Homma)
山形大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：70743566