

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08400

研究課題名(和文) 老化と鉄：鉄代謝調節機構の破綻による鉄依存的細胞死(フェロトーシス)の誘導

研究課題名(英文) The role of iron in aging

研究代表者

吉原 大作 (Yoshihara, Daisaku)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：00567266

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、フェロトーシスの分子機構を明らかにして、加齢による生体機能の低下(=老化)に鉄が果たす役割を解明することである。これまでに、研究代表者らは、フェロトーシスが誘導される際に、細胞内の2価鉄イオンが増加していること、この鉄動態の変化には細胞内の酸化ストレス亢進が関与している可能性を見出してきた。本研究では、フェロトーシスの誘導に関わる鉄動態の変化が起こるメカニズムを明らかにするために、酸化ストレスが鉄動態に与える影響を解析した。その結果、フェロトーシス等の酸化ストレス依存的な細胞死が誘導される際には、細胞内の鉄代謝調節機構が破綻している可能性があることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

フェロトーシスは、2012年に発見された新しい細胞死であり、その生理的意義や分子機構の詳細は解っていない。本研究によって、フェロトーシスの誘導の分子機構の一端が明らかになり、「老化における鉄の役割」を解明する基盤を確立することができた。我が国は、総人口に占める高齢者の割合が25%を超えており、世界一の高齢化社会となっている。高齢化社会においては、加齢に伴う身体機能の低下(=老化)を防ぎ、死の直前まで元気でいられるようにすることが重要である。ヒトにとって加齢は避けることができないが、老化は防ぐことができる。本研究の成果によって、老化の予防法や治療法の開発研究が加速することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Ferroptosis is a recently identified iron- and oxidative stress-dependent form of non-apoptotic regulated cell death. However, the biological roles of iron and iron metabolism in ferroptosis remain unclear. The aim of this study was to investigate the functional role of iron and iron metabolism in ferroptosis. We found that oxidative stress induced disturbance of iron metabolism during induction of oxidative stress-dependent cell death, such as ferroptosis.

研究分野：生化学

キーワード：酸化ストレス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

鉄は、生体における必須の金属であるとともに、活性酸素種 (ROS) の発生源ともなる。そのため、生体内では複数の鉄代謝調節タンパク質 IRPs (Iron regulatory proteins) が、鉄の動態や利用を厳密にコントロールしている。それにも関わらず、ヒトでは加齢とともに、組織での鉄過剰や鉄欠乏などの鉄代謝異常が起こる。これらの鉄代謝異常は、加齢に伴う生体機能の低下 (= 老化) の原因となると考えられている。

これまでに、研究代表者らは、抗酸化酵素 Cu, Zn-superoxide dismutase (Cu, Zn-SOD: SOD1) を欠損させたマウスの組織に鉄が沈着をしていることを発見し、酸化ストレスが鉄代謝異常の原因となることを報告してきた (Free Radic Biol Med., 2009, Free Radic Res., 2012 & 2016)。また、加齢とともに生体内で増加する脂質過酸化物が、鉄代謝調節タンパク質である IRP1 を強力に不活化することも見出している。これらの研究成果から、加齢に伴う酸化ストレスが、鉄代謝異常の原因となることが解ってきた。その一方で、鉄代謝異常が老化の原因となるメカニズムについては、未解明な部分が多く残っている。

近年、鉄が関与する生命現象として「フェロトーシス」という細胞死が注目されている。フェロトーシスは、鉄キレート剤によって阻害されることから、鉄依存的な「制御された細胞死 (Regulated cell death: RCD)」であると定義されている。RCD は、生体恒常性を維持する上で非常に重要な機構で、老化との関連も深い。研究代表者らは、加齢に伴う鉄代謝異常が老化を促進する背景には、フェロトーシスが関与しているのではないかと考えた。しかしながら、どのような鉄代謝異常がフェロトーシスを引き起こすのかということは解っていない。

2. 研究の目的

フェロトーシスの最大の特徴は、「鉄依存的」ということである。しかしながら、フェロトーシスの「誘導」や「実行」における鉄の役割や、フェロトーシスを誘導するような鉄動態の変化が起こる分子機構には未解明な部分が多い。本研究では、フェロトーシスの分子機構を解明することを目的として、フェロトーシス誘導時における鉄動態変化の分子機構を解析した。

3. 研究の方法

(1) 実験に用いた試薬など

培養細胞

本研究では、mProx24 (マウス近位尿細管由来)、HEK293 (ヒト胎児腎由来)、COS-1 (アフリカミドリザル腎由来)、HT1080 (ヒト繊維肉腫由来)、Hepa 1.6 (マウス肝癌由来) および LLC-PK1 (ブタ腎由来) を使用した。mProx24 細胞は、DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) /F12 培地に 10% ウシ胎児血清を添加して培養した。その他の細胞は、DMEM に 10% ウシ胎児血清を添加して培養した。

2 価鉄イオン検出プローブ

細胞内の 2 価鉄イオンの動態は、二価鉄イオン特異的な蛍光プローブ RhoNox-1 および HMRhoNox-M (岐阜薬科大学の平山祐博士より供与) を用いて検出した。

細胞生存率などの測定

Cell viability の測定は、Cell Counting Kit-8 (DOJINDO) を用いて行った。細胞障害性の測定は、Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST (DOJINDO) を用いて行った。その他、核染色 (Hoechst33342) や自動セルカウンターを用いて細胞数の測定を行った。

試薬など

酸化ストレスの負荷には、過酸化水素、2,3-dimethoxy-1,4-naphthoquinone (DMNQ、スーパーオキシド発生剤) および Erastin (フェロトーシス誘導剤) を使用した。過酸化水素は、1 M の水溶液を作製し、10 ~ 1000 μ M の濃度で使用した。DMNQ は 50 mM の DMSO (Dimethyl sulfoxide) 溶液を作製し、5 ~ 25 μ M の濃度になるように培地に添加した (培地中の DMSO 濃度は 0.05% になるように調節した)。Erastin は、10 mM の DMF (N,N-dimethylformamide) 溶液を作製し、0.5 ~ 5 μ M の濃度になるように培地に添加した (培地中の DMF 濃度は 0.1% になるように調節した)。

(2) 実験方法

フェロトーシスを起こしやすい細胞の検索

mProx24 や HEK293A 等の培養細胞を、Erastin を添加した培地で培養して、Ferroptosis を誘導しやすい細胞と Ferroptosis 誘導に耐性を持つ細胞を検索した。また、Erastin を添加した際の、鉄代謝関連分子の発現変化 (RT-PCR 法、Western blot 法) を解析した。

フェロトーシス誘導時の IRP1 の機能変化の解析

IRP1 は RNA 結合タンパク質であり、鉄代謝関連分子の mRNA 上にある IRE (Iron responsive element) に結合して、翻訳レベルでの発現量調節を行う。そのため、IRP1 の機能の変化は、IRP1

の IRE (RNA probe、RI 標識) への結合量を Gel shift assay で評価した。また、non-RI の評価方法として、RNA プローブはビオチン標識し、ストレプトアビジン結合磁気ビーズ (Dynabeads Streptavidin) で、IRE/IRP1 複合体を精製し、IRE に結合していた IRP1 を Western blot 法で検出した。

フェロトーシス誘導時の鉄イオン動態の解析

2 価鉄イオン特異的な蛍光プローブ (RhoNox-1 など) を用いて、フェロトーシス誘導時に細胞内の 2 価鉄の動態変化を解析した。

酸化ストレスにより誘導される細胞死における鉄動態の変化の解析

培養細胞に酸化ストレスを負荷 (DMNQ および過酸化水素などの培地への添加) したときの、細胞内の 2 価鉄の動態変化を解析した。また、鉄代謝関連分子の遺伝子発現量 (RT-PCR) およびタンパク質発現量および局在 (Western blot 法および免疫染色法) の変化の経時的 (0~24 h) な解析も行った。

フェロトーシス誘導機構を解析する

フェロトーシスが Erastin などの薬剤によって誘導をされることは解っているが、生体内ではどの様な時にフェロトーシスが誘導されるのかはよく解っていない。そこで、鉄代謝異常を惹起するような条件下 (酸化ストレスの負荷、高血糖、低酸素など) で mProx24 を培養して、フェロトーシスが誘導される条件を検討した。

4. 研究成果

フェロトーシスは、鉄キレート剤により阻害できることから、鉄依存的な細胞死として定義されている。しかしながら、フェロトーシスの「誘導」や「実行」における鉄の役割や、フェロトーシスを誘導するような鉄動態の変化が起こる分子機構には未解明な部分が多く残されていた。本研究では、フェロトーシスの分子機構を解明することを目的として、フェロトーシス誘導時における鉄動態変化の分子機構を解析した。

(1) mProx24 (マウス近位尿細管由来) HEK293 (ヒト胎児腎由来) COS-1 (アフリカミドリザル腎由来) HT1080 (ヒト繊維肉腫由来) Hepa 1.6 (マウス肝癌由来) および LLC-PK1 (ブタ腎由来) を細胞培養用のマイクロプレートに播種し 24 時間培養した。その後、培地に Erastin を添加し、24 時間後の Cell viability を測定した。その結果、マウス近位尿細管由来の mProx24 および HEK293A 細胞がフェロトーシスを起こしやすい細胞であることが分かった。一方で、COS-1 や LLC-PK1 細胞には、フェロトーシスが誘導され難いことが分かった。フェロトーシスが誘導され易い細胞 (mProx24 および HEK293A) と、誘導され難い細胞 (COS-1 および LLC-PK1) との間で、エラスチンによって起こる鉄代謝の変化の違いを解析し、フェロトーシス誘導に関与する分子を同定した。

(2) フェロトーシスが誘導され易い細胞である mProx24 および HEK293 を用いて、フェロトーシス誘導時における細胞内の鉄動態の解析を行った。培養細胞をガラスボトムデッシュに播種し、48 時間後に Erastin を添加した培地に交換した。その後、1~24 時間後に培地を除去し、RhoNox-1 や HMRhoNox-M で細胞中の 2 価鉄イオンの染色 (37 °C で 30 分間) を行った。細胞の洗浄や RhoNox-1 および HMRhoNox-M (10 mM, DMF:N,N-dimethylformamide 溶液) の溶解には HBSS (Hanks' balanced salt solution, Ca/Mg 含有) を使用した。染色終了後、レーザー共焦点顕微鏡で、RhoNox-1 および HMRhoNox-M の蛍光 (励起波長: 540 nm/蛍光波長: 570 nm) を検出した。その結果、Erastin 添加から 1 時間で細胞内の 2 価鉄が増加し始め、2 価鉄の増加は Erastin 添加から 6 時間まで続いていた。また、2 価鉄の増加とともに細胞内の脂質過酸化物が増加することも確認した。さらに、(1) で同定した鉄代謝関連分子の動態の変化と 2 価鉄増加との関係を解析し、(1) で同定した分子の動態の変化が細胞内 2 価鉄の増加に関与していることを確認した。

(3) フェロトーシス誘導剤である Erastin はシスチントランスポーターである xCT を阻害する。そのため、細胞内の抗酸化物質であるグルタチオンの減少が惹起され、細胞内の酸化ストレスの亢進状態が誘導されている可能性がある。研究代表者は、Erastin による酸化ストレス亢進状態の誘導が、細胞内での 2 価鉄の増加に関与しているのではないかと考えた。そこで、酸化ストレスの亢進状態によって、細胞内の鉄イオン動態にどのような影響が出るのかを培養細胞を用いて解析した。酸化ストレスの負荷には、DMNQ および過酸化水素を使用した。過酸化水素は、1 M の水溶液を作製し、10~1000 μ M の濃度で使用した。DMNQ は 50 mM の DMSO (Dimethyl sulfoxide) 溶液を作製し、5~25 μ M の濃度になるように培地に添加した (培地中の DMSO 濃度は 0.05% になるように調節した)。前項の実験と同様に、mProx24 をガラスボトムデッシュに播種し、48 時間後に DMNQ および過酸化水素を添加した培地に交換した。その後、1~24 時間後に培地を除去し、RhoNox-1 や HMRhoNox-M で細胞中の 2 価鉄イオンの染色 (37 °C で 30 分間) を行っ

た。細胞の洗浄や RhoNox-1 および HMRhoNox-M (10 mM, DMF:N,N-dimethylformamide 溶液) の溶解には HBSS(Hanks' balanced salt solution, Ca/Mg 含有)を使用した。染色終了後、レーザー共焦点顕微鏡で、RhoNox-1 および HMRhoNox-M の蛍光(励起波長: 540 nm/蛍光波長: 570 nm)を検出した。その結果、DMNQ および過酸化水素の添加による酸化ストレスの亢進によって、細胞内の 2 価鉄が増加することが分かった。DMNQ および過酸化水素は、Erastin と同様に細胞内の 2 価鉄を増加させたが、過酸化水素が Erastin と同様に過剰鉄依存的な細胞死を誘導したのに対して、DMNQ による細胞死には、過剰鉄は関与していなかった。引き続き、酸化ストレスを誘導する活性酸素種の種類による鉄動態と誘導されてくる細胞死のタイプについて詳細な検討を行っている。

(4) フェロトーシス誘導剤である Erastin や DMNQ および過酸化水素による酸化ストレスによって細胞内の鉄代謝の変化を調べた。その結果、Erastin や DMNQ などによる酸化ストレスの亢進状態は、細胞内における鉄代謝の調節機構を破綻させていることが分かった。

(5) フェロトーシスを誘導する薬剤は、Erastin の他に Sulfasalazine、Sorafenib、L-Buthionine-(S,R)-Sulfoximine、Acetaminophen および Artemisinin などが知られている。これまでの実験で、細胞内の酸化ストレス亢進による鉄代謝調節機構の破綻が、フェロトーシス誘導に重要な役割を果たしていることが示唆された。そこで、様々な条件により細胞内に酸化ストレスを誘導させて、その細胞にフェロトーシスが誘導されるのか否かを検討した。その結果、これまでに報告のない抗酸化酵素の阻害剤が、フェロトーシスに類似した細胞死を誘導することが分かった。この細胞死は、鉄キレート剤以外にも銅キレート剤によっても阻害されることも分かった。また、フェロトーシスを阻害する様な物質の検索も行い、複数の抗酸化物質や代謝阻害剤が、フェロトーシス阻害剤の候補として挙げられた。現在、詳細なメカニズムの検討を継続している。

本研究は、鉄依存的な細胞死である「フェロトーシス」に着目して、その分子機構を明らかにすることを目的とした。フェロトーシスは、2012 年に発見された新しい「制御された細胞死」であり、その生理的意義や分子機構の詳細は解っていなかった。本研究では、フェロトーシス等の酸化ストレス依存的な細胞死が誘導される際には、酸化ストレスによって細胞内鉄代謝調節機構の破綻が引き起こされている可能性があることを見出すことができた。このような鉄代謝調節機構の破綻は、加齢とともに増加する様々な疾患において見られており、老化とも密接に関係していると考えられる。今後、酸化ストレスによる鉄代謝異常の詳細な分子機構の解明が進むことで、老化(の促進)における鉄の役割が明らかになると期待される。本研究成果は、「フェロトーシスの分子機構」を解明する足掛かりとなり、また、「老化における鉄の役割」を解明する基盤を確立となり得ると考えている。我が国は、総人口に占める高齢者(65 才以上)の割合が 25%を超えており、世界一の高齢化社会となっている。高齢化社会においては、加齢に伴う身体機能の低下(=老化)を防ぎ、死の直前まで元気でいられるようにすることが重要である。ヒトにとって加齢は避けることができない。しかし、老化は防ぐことができる。本研究の成果を基に、老化の分子機構の一端が明らかになることで、老化の予防法や治療法の開発研究が加速することが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 吉原大作、藤原範子、平山祐、丹羽正人、江口裕伸、崎山晴彦、永澤秀子、鈴木敬一郎
2. 発表標題 酸化ストレスによる鉄代謝の変化と細胞死の誘導
3. 学会等名 第71回日本酸化ストレス学会 第18回日本NO学会 合同学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉原大作、藤原範子、平山祐、丹羽正人、江口裕伸、崎山晴彦、永澤秀子、鈴木敬一郎
2. 発表標題 酸化ストレスが鉄代謝異常を引き起こす機序の解析
3. 学会等名 第42回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉原大作、藤原範子、平山祐、丹羽正人、江口裕伸、崎山晴彦、永澤秀子、鈴木敬一郎
2. 発表標題 酸化ストレスによる細胞死の誘導と鉄イオン動態の変化
3. 学会等名 第41回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 吉原大作、藤原範子、平山祐、丹羽正人、江口裕伸、崎山晴彦、永澤秀子、鈴木敬一郎
2. 発表標題 酸化ストレスが細胞内の鉄イオン動態に与える影響
3. 学会等名 生命科学系学会合同年次集会（第90回日本生化学会大会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Daisaku Yoshihara, Noriko Fujiwara, Nobue Kitanaka, Junichi Kitanaka, Haruhiko Sakiyama, Hironobu Eguchi, Motohiko Takemura and Keiichiro Suzuki
2. 発表標題 Abnormal monoaminergic neurotransmission and motivational impairment-like behavior in SOD1 knockout (KO) mice
3. 学会等名 The 9th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research-Asia (SFRR-Asia) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉原大作、藤原範子、平山祐、丹羽正人、江口裕伸、崎山晴彦、永澤秀子、鈴木敬一郎
2. 発表標題 細胞内レドックス環境の変化が鉄動態に与える影響
3. 学会等名 第72回日本酸化ストレス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉原大作、藤原範子、平山祐、丹羽正人、江口裕伸、崎山晴彦、永澤秀子、鈴木敬一郎
2. 発表標題 スーパーオキシド産生剤DMNQによる細胞内の鉄動態の変化
3. 学会等名 第43回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会
4. 発表年 2019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
研究 分担者	藤原 範子 (Fujiwara Noriko) (10368532)	兵庫医科大学・医学部・教授 (34519)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	崎山 晴彦 (Sakiyama Haruhiko) (30508958)	兵庫医科大学・医学部・講師 (34519)	
研究分担者	江口 裕伸 (Eguchi Hironobu) (60351798)	兵庫医科大学・医学部・講師 (34519)	
研究分担者	鈴木 敬一郎 (Suzuki Keiichiro) (70221322)	兵庫医科大学・医学部・教授 (34519)	