

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10681

研究課題名(和文)ヒ素による神経細胞死 --- ネクロトーシス、フェロトーシスの関与について

研究課題名(英文) Neuronal death induced by arsenic --- Participation of necroptosis and ferroptosis

研究代表者

上村 公一 (UEMURA, KOICHI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：30244586

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)：ヒ素によりマウス由来神経芽細胞(Neuro2A)の死細胞増加、細胞膨化、濃度依存的生存率低下、DNAマイクロアレイ、リアルタイムPCRでフェロトーシスに関連するCHAC1上昇、ウェスタンブロットでCaspase3活性化、二次ネクロトーシスを誘導するDFNA5/GSDMEの活性化、フェロトーシスマーカーGPX4の発現減少、高濃度でのストレス顆粒の発現を認めた。低濃度群ではアポトーシスが起るが、フェロトーシスも一部関与していた。濃度依存的にGSDMEによる二次ネクロトーシス(パイロトーシス)が顕著になり、高濃度群で細胞保護作用によるストレス顆粒形成もあり、濃度依存的な細胞死・生存応答も示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒ素による神経細胞死の機構の解明と治療への応用を目指した研究である。低濃度の三酸化二ヒ素曝露でアポトーシスとフェロトーシスが誘導されるが、高濃度曝露で細胞保護機構であるストレス顆粒が形成され、これらの細胞死経路が一部抑制される可能性が示された。他方、GSDMEによる二次ネクロトーシス(パイロトーシス)の誘導を介した細胞死経路へと誘導されている可能性が示唆された。なお、本実験条件下ではネクロトーシスの関与については確認できなかった。

研究成果の概要(英文)：By arsenic treatment to Neuro2A cells derived from mouse neuroblastoma, we detected the increase of cell death, cell swelling, dose dependent survival decrease, CHAC1 increase by DNA micro array, real time, Caspase3 activation by western blotting, activation of DFNA5/GSDME leading to second necrosis, ferroptosis marker GPX4 decrease, stress granule by immunostaining at high dose.

Apoptosis was the center in a low-concentrated group, but ferroptosis partly participated. It was observed dose dependent and the secondary necrosis by GSDME, and there was the stress granule in related to cytoprotection in a high dose group. It is shown the dose dependent cell death and survival response in arsenite-induced cell death.

研究分野：法医学

キーワード：ヒ素 神経細胞 アポトーシス ネクロトーシス フェロトーシス ストレス顆粒

1. 研究開始当初の背景

(1)ヒ素の中枢神経系への影響、特に神経細胞死に着目して研究を進めた。細胞死として、古くからネクロシス(necrosis)が知られており、細胞が外部から受けた障害によりダメージを受け、細胞膜が破綻し、細胞質内の物質が外部に流出し、細胞死に至る(壊死)。次に、プログラムされた細胞死として、アポトーシス(apoptosis)が見出された。外部からのストレスやデス・レセプター(death receptor; 細胞死受容体)により、細胞内のcaspase が活性化し、最終的に核の断片化が起こる。近年、オートファジー様細胞死も見出された。オートファジー自身は損傷したmitochondria, endoplasmic reticulum などの細胞内小器官を除去するシステム(atg5, Beclin1 が実行因子)であり、細胞保護的であるが、損傷の程度が大きい場合、オートファジーが破綻し、細胞死に至る。

(2)従来、necrosisは制御を受けない受動的な細胞死と考えられていたが、最近では、制御されたnecrosisとして、ネクロトーシス(necroptosis)、フェロトーシス(ferroptosis)が見出された。NecroptosisはRIPK3(Receptor-interacting kinase 3)およびMLKL(Mixed lineage kinase domain-like)の活性化により引き起こされ、death receptor の活性化に応答して始まる経路と、細胞死受容体には依存しない経路がある。Caspase-8によって阻害される特徴がある。Ferroptosisは鉄依存的な活性酸素種の発生と過酸化した脂質の蓄積によって、脂質特異的ペルオキシダーゼ4(GPx4)の活性低下が起こり、細胞死が引き起こされる。鉄キレート剤によって阻害される特徴がある。これらはまだ新しい概念であり、研究途上であるが、ヒ素による神経細胞死に、ネクロトーシス、フェロトーシスの関与している可能性が考えられる。

(3)最近、三酸化二ヒ素(As₂O₃: 亜ヒ酸)によって apoptosis が引き起こされることが明らかとなり、臓器障害に細胞死関連シグナルがヒ素の毒性に関与していることも明らかとなってきた。我々は、apoptosis 関連の研究の際、細胞が apoptosis に至る前に autophagy が働き、できるだけ apoptosis を回避しようとしていることを報告した¹⁾。この現象は普遍的な細胞の防御反応と考えられる。また、As₂O₃ は急性前骨髄性白血病の治療薬に用いられている。その作用機序はヒ素が異常タンパク質のPML(promyelocytic leukemia protein)や PML-RARα (retinoic acid receptor-α)を分解し、血球系の異常な増殖シグナルを止めることである。また、As₂O₃ は血球系だけでなく、固形腫瘍に対する抗癌剤としても注目されている。

2. 研究の目的

(1)法医学におけるヒ素中毒死の機構に関する理解が深める。毒性発現の際に細胞保護的な autophagy の発現を確認し、apoptosis、necrosis、さらに、necroptosis、ferroptosis が起こされるかを確認する。特に、プログラムされた necrosis である necroptosis、ferroptosis がヒ素の毒性に関与していることを明らかにする。

(2)臨床医学において、白血病以外の固形腫瘍の治療薬の開発に貢献するための基礎的データを提供する。

3. 研究の方法

(1) 使用細胞と試薬

ヒ素による細胞傷害の解明に神経系培養細胞を用いた。マウス神経芽腫由来 Neuro2A 細胞、Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM)培地 (Wako)、三酸化二ヒ素(As₂O₃: 亜ヒ酸、Wako)、抗 caspase3 抗体 (cell signaling)、抗 DNFA5/GSDME 抗体 (abcam)、抗 GPX4 抗体 (abcam)、抗 GAPDH 抗体 (Merck Millipore)

(2) 細胞培養法

Neuro2A 細胞を DMEM(10% FBS、100U/mL penicillin、100 μg/mL streptomycin 含有)にて、37°C、5% CO₂ の条件下で培養して用いた。

(3) 細胞生存率 細胞生存率 細胞生存率 測定

MTT assay には、細胞を 96 well plate に播種し As₂O₃ を 24 時間曝露した後、Cell Counting Kit-8 (Dojindo)試薬を 10 μL 加え 37°C で 30 分インキュベートし、450nm での吸光度を測定し細胞生存率を測定した。LDH assay は、LDH-細胞毒性テストワコー (Wako)を用いて、細胞を 96well plate に播種し As₂O₃ を 24 時間曝露した後、上清を 50 μL 新たな 96 well plate に分注し、Working solution を 100 μL 加えて呈色した後、stop solution を 50 μL 加えて 490 nm での吸光度を測定することで、細

胞障害率を測定した。

(4) リアルタイムPCR

Neuro2A 細胞に 0,5,20,100 μ M の As_2O_3 を曝露し、3 時間インキュベート後 Torizol 試薬を用いて回収を行い、フェノール/クロロホルム抽出で RNA を抽出し逆転写反応によって cDNA 化した物をサンプルとし、各プライマー(Table1)及び Go Teq® qPCR Master Mix(Promega)を用いた SYBR green 法でリアルタイム PCR を行った。

Table 1 リアルタイムPCRに用いたプライマーの塩基配列

target	Forward primer sequence (5'→3')	Reverse primer sequence (5'→3')
mouse ATF3	TCTGCGCTGGAGTCAGTTAC	TTGTTTCGACATTGGCAGC
HMOX1	CAGAAGAGGCTAAGACCGCC	ATCTTGCACCAGGCTAGCAG
CHAC1	TATAGCCGACGGTTCTGGCA	GCTCCCTCGAACTTGGTAT
GAPDH	GTGCAGTGCCAGCCTCGTCC	GCCACTGCAATGGCAGCCC

(5) 免疫染色

3 cm dish にカバーガラスを敷き細胞を播種し、各濃度の As_2O_3 を曝露した後、37°C でインキュベートした。3 時間後に 4%PFA で固定後、0.5% TritonX-100 (Wako) で細胞膜を穿孔し、抗 G3BP1 抗体下において、湿潤箱に入れ 4°C で一晩静置した。その後二次抗体反応として ant-rabbit Alexa448 (Thermo fisher scientific) に 30 分浸潤し静置・封入後、蛍光顕微鏡(DMi8-IH-Set1, ライカマイクロシステムズ社)を用いて観察した。

(6) ウェスタンブロッティング法

3cm dish に細胞を播種し各濃度の As_2O_3 を曝露した後、37°C でインキュベートした。6 時間後に細胞を回収し、超音波破砕によりタンパク質を抽出し、SDS-PAGE を用いて分離した後、PVDF 膜に転写・スキムミルクによるブロッティングを行い、各種一次抗体を反応させ 4 °C で一晩振盪した。その後各種二次抗体と反応させ、Western Lightning® Plus ECL (Perkin Elmer) で化学発光させた後、Light Capture- II ATTO) でバンドを検出した。

(7) GSDME siRNAによるノックダウン細胞の作成

3cm dish に Neuro2A 細胞を播種し、Lipofectamine® RNAiMAX reagent (Invitrogen) と siRNA(invitrogen)を 1:1 で調整し、細胞に添加し一晩インキュベートした後、0, 20, 100 μ M の As_2O_3 を曝露させ継時的な形態観察を行った。GSDME の発現抑制はウェスタンブロッティング法で確認した。

(8) 統計処理

統計処理はエクセル統計(オーエムエス出版)を用い、多重比較検定を行った(Tukey-Kramer 法、Dunnett's 法)。

4. 研究成果

(1) As_2O_3 曝露神経細胞における細胞障害の検討

Neuro2A 細胞に 1-100 μ M の As_2O_3 を曝露し、6 時間インキュベート後に観察を行った。20 μ M 以上の曝露から、細胞膜の破綻により生じる ballooning が確認された(Fig.1A)。また 1-100 μ M の As_2O_3 を 24 時間曝露した Neuro2A 細胞で細胞生存率及び細胞障害率を測定したところ、濃度依存的な細胞生存率の低下と細胞障害が確認された(Fig. 1B)。

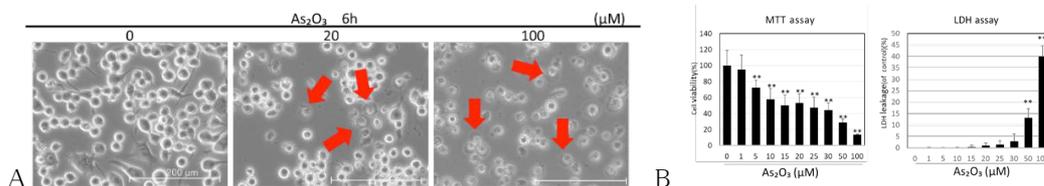


Fig.1 As_2O_3 曝露時の形態変及び細胞生存率低下及び細胞障害率の上昇

(2) As_2O_3 曝露により誘導される神経細胞死経路の検討

Neuro2A 細胞に 0,5,20,100 μ M の As_2O_3 を曝露し、6 時間インキュベート後に細胞を回収し、ウェスタンブロッティング法による各種細胞死関連タンパク質の変動を解析した(Fig.2)。アポトーシス実行因子である Caspase3 の活性化が 20 μ M 曝露時点で有意な上昇を認め、二次ネクローシス(パイロトーシス)の実行因子である GSDME の活性化(GSDME p30)が濃度依存的に上昇し、100 μ M で顕著な増加がみられた。また鉄依存性細胞死フェルトーシスに關与する GPX4 が 5,20 μ M 曝露時点で減少傾向がみられた。以上のことから、 As_2O_3 20 μ M までの低濃度ではアポトーシス、フェルトーシスの 2 種の

細胞死が並行して起こっており、100 μ M 時点では GSDME による二次ネクローシスへ(パイロトーシス)と変動していくことが示唆された。

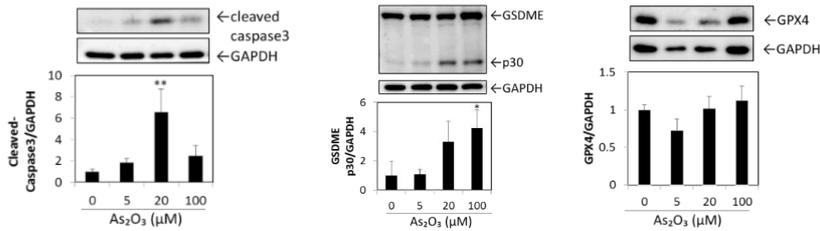


Fig.2 As₂O₃ 曝露における細胞死関連タンパク変動の検討

(3) リアルタイムPCR法によるフェロトーシス関連因子発現変化の検討

ウェスタンブロットの結果から、GPX4 の発現減少傾向が As₂O₃ 低濃度曝露群で見られたため、DNA マイクロアレイで発現変動が確認された他のフェロトーシス関連遺伝子についてリアルタイム PCR を行い、発現変動を検討した。その結果、フェロトーシス関連遺伝子である ATF3, CHAC1, HOMX1 の有意な上昇を認めた(Fig. 3)。

以上の結果より、As₂O₃ 20 μ M の低濃度曝露時点ではフェロトーシスが起きていることが示唆された。

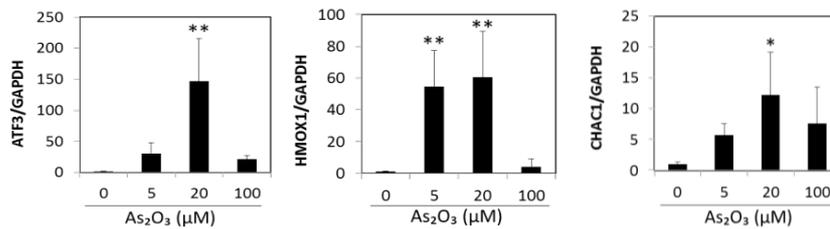


Fig.3 As₂O₃ 曝露時におけるリアルタイムPCRを用いた細胞死関連遺伝子の変動

(4) As₂O₃ 曝露神経細胞におけるストレス顆粒形成の検討

Neuro2A 細胞に 0, 5, 20, 100 μ M の As₂O₃ を曝露させ、3 時間インキュベート後にストレス顆粒マーカーである G3BP1 に対する抗体を用いた細胞免疫染色により As₂O₃ 曝露後のストレス顆粒の形成を検討した。その結果、As₂O₃ 0-20 μ M ではストレス顆粒の発現を確認出来なかったが、100 μ M 曝露群では G3BP1 の凝集が細胞内に見られ、ストレス顆粒を形成していることが確認された(Fig. 4)。

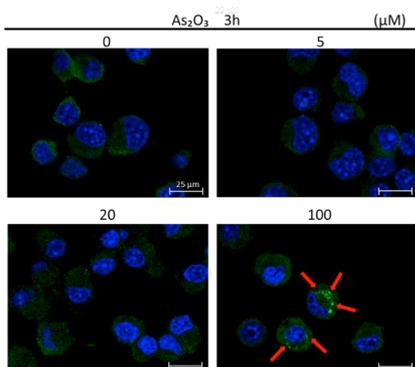


Fig.4 免疫染色を用いたストレス顆粒(赤矢印)の発現

(5) As₂O₃ 誘導神経細胞死へのGSDMEノックダウンによる影響の検討

ウェスタンブロットの結果から GSDME 活性化による二次ネクローシスの誘導が示唆されたが、GSDME による二次ネクローシスが As₂O₃による細胞障害へ関与しているかを検討した。まず、Neuro2A 細胞に GSDME に対する siRNA および control の siRNA を導入し、ウェスタンブロット法で GSDME のタンパク質発現量を確認したところ、GSDME siRNA 導入細胞では control 細胞に対して GSDME の発現の阻害が認められた(Fig. 5A)。そこでこれら細胞群に As₂O₃を 0, 5, 20, 100 μ M 曝露させ、GSDME ノックダウンによる形態の変化を検討した(Fig. 5B)。その結果、100 μ M 曝露時点で、Control 群では細胞膜 blebbing や ballooning といった細胞膜障害の特徴が顕著に確認されたが、GSDME siRNA 導入細胞群ではこれら細胞膜障害の特徴は認められず、細胞膜破綻の軽減が確認された。

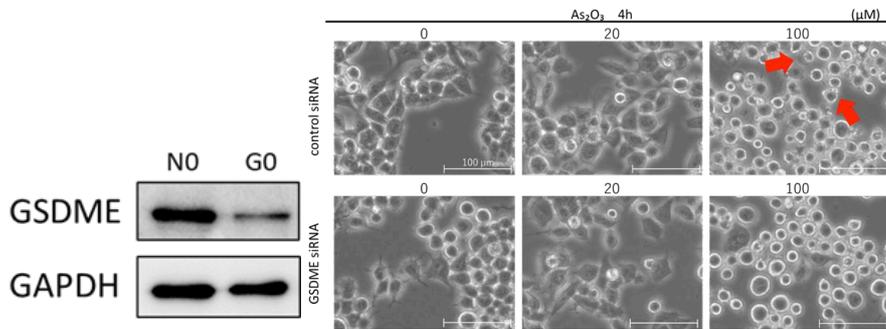


Fig5. GSDME siRNA導入による細胞障害の軽減

(6) 考察

As₂O₃ の曝露によりNeuro2A 細胞は生存率の低下・障害率の増加を示すことから、As₂O₃ は濃度依存的な神経細胞毒性を引き起こすことが示された(Fig.1)。また曝露細胞においては、細胞膜が風船状に膨らむballooningが確認されたことからパイロトーシス様細胞死が誘導されていることが考えられたが、ウェスタンブロッティング法での検討から、20 μ M曝露時にアポトーシス実行因子であるCaspase3 の活性化が増加し、また二次ネクローシスの実行因子であるGSDMEの濃度依存的な活性化が認められ、アポトーシスと共に二次ネクローシスが起きていることが示唆された。近年、ヒ素の曝露により細胞内に細胞保護機構に関わるストレス顆粒が発現し、アポトーシスを抑制することが報告されており、本研究でもAs₂O₃ 100 μ M曝露時点でストレス顆粒の形成を認めた(Fig.4)。ストレス顆粒はRNAを取り込むことで、翻訳を抑制し異常タンパク質による障害を抑制する役割を果たすことから、As₂O₃ 100 μ M曝露時の神経細胞では、Caspase3の活性化を抑制したものと考えられる。またAs₂O₃ 5-20 μ Mの低濃度曝露時では5 μ Mをピークに脂質過酸化物の代謝を行うGPX4が減少傾向を認めたことからフェロトーシスの関与が考えられた。フェロトーシスは、フェントン反応及びROSの発生により細胞内に脂質過酸化物が発生・蓄積することで誘導される細胞死であり、フェロトーシスを誘導された細胞では、SLC3A2及びSLC7A11で形成されるXc⁻系(シスチン・グルタミン酸トランスポーター)によるシスチンの細胞内への流入が抑制され、これによりGPX4の機能低下が発生し、脂質過酸化物の還元が行えなくなることで、細胞死が誘導されることが報告されている。本研究でのDNAマイクロアレイの結果から、各種細胞死関連遺伝子の発現増加に加え、フェロトーシス関連分子の発現変化が示されており、実際リアルタイムPCRの結果から、シスチン・グルタミン酸トランスポーターを形成するSLC7A11を抑制するATF3がAs₂O₃ 20 μ M曝露時点で有意に上昇し、GPX4のコファクターであるGSH(還元型グルタチオン)を抑制するCHAC1がAs₂O₃ 20 μ M曝露時点で有意な上昇を認め、またヘムを分解し二価鉄を供給することで細胞内鉄源として働きフェロトーシスを促進するHMOX1はAs₂O₃ 5, 20 μ M曝露時点で有意に上昇していることから、フェロトーシスが誘導されていることが示唆された(Fig.3)。以上の結果から、5, 20 μ M程度の低濃度のAs₂O₃ を曝露した場合では、アポトーシスとフェロトーシスが並行して起きていることが示唆された。

一方、As₂O₃ 高濃度群では、細胞保護機構であるストレス顆粒の形成が確認され(Fig.4)、アポトーシス実行因子であるCaspase3の活性化の低下(Fig.2)が確認される一方で依然として高い細胞毒性が示された(Fig.1)。本研究では細胞膜破綻を伴うGSDMEによる二次ネクローシス(パイロトーシス)が誘導されており(Fig. 1,2)、またGSDMEによる二次ネクローシスに関しては、GSDMEに対するsiRNAによるノックダウンにより、As₂O₃ 高濃度曝露時に誘導される細胞膜破綻が抑制されており、As₂O₃ 濃度依存的な細胞毒性機序に二次ネクローシスが関与することが示唆された。なお、p38 阻害剤であるSB202190添加群でのみ、細胞生存率の有意な回復及び細胞障害率の有意な減少を認めた。As₂O₃ 低濃度条件では、いずれのMAPK関連インヒビター添加群においても細胞生存率の有意な上昇は認められなかった。

以上の結果から、低濃度 As₂O₃ 曝露時にはフェロトーシス、アポトーシスが誘導されるが、高濃度曝露時には細胞保護機構であるストレス顆粒の形成によりこれら細胞死経路は抑制され、一方でGSDMEによる二次ネクローシスの誘導を介した細胞死経路へと誘導されている可能性が示唆された。

<引用文献>

- ① Aki T, Funakoshi T, Unuma K, et al, Impairment of autophagy: From hereditary disorder to drug intoxication. Toxicology 2013; 311: 205-215.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 溝部万純、秋利彦、船越丈司、平山菜穂、渡邊嶺、永井みどり、野村萌夏、上村公一
2. 発表標題 ヒ素の神経細胞特異的な毒性機序の解明
3. 学会等名 日本法医学会第89回学術関東地方集会
4. 発表年 2020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	秋 利彦 (AKI Toshihiko) (60304474)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授 (12602)	
研究分担者	船越 丈司 (FUNAKOSHI Takeshi) (40444715)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教 (12602)	

	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
研究協力者	溝部 万純 (MIZOBE Masumi)		
研究協力者	加藤 千鶴 (KATO Chizuru)		

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
---------	---------