

令和 3 年 6 月 5 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23738

研究課題名（和文）「死細胞由来抗老化シグナルモデル」とその臨床応用

研究課題名（英文）"Dead-cells-derived anti-aging-signal model" and its clinical application

研究代表者

西澤 弘成 (Nishizawa, Hironari)

東北大学・医学系研究科・学術研究員

研究者番号：30846655

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、鉄依存性の制御された細胞死であるフェロトーシスを起こした細胞の培養上清が、別の細胞で老化関連マーカーであるSA-β-ガラクトシダーゼの低下と細胞死を惹起することを示した。また、この培養上清によるSA-β-ガラクトシダーゼの低下と細胞死の伝播は抗酸化剤やフェロトーシス阻害剤によって抑制されることも分かった。さらに、フェロトーシス細胞と正常細胞を共培養すると、正常細胞にも脂質過酸化と細胞死が伝播することを示した。これらのことから、フェロトーシス細胞からの分泌物質による脂質過酸化反応とフェロトーシスの伝播現象が存在することが証明された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

フェロトーシスは新規に提唱された鉄依存性の細胞死であるが、フェロトーシス細胞からの分泌物質の生体内での機能についてはこれまでほとんど分かっていなかった。本研究によってフェロトーシス細胞から酸化関連物質が分泌されてフェロトーシスが周囲に伝播していくことが明らかになった。この伝播現象が虚血性心疾患などのフェロトーシス関連疾患の病変の拡大に関与していると考えられ、これらの疾患への新治療の開発につながる可能性がある。さらに、フェロトーシスは生体内でがん抑制メカニズムとして働くことが分かっており、フェロトーシスの伝播現象を利用して免疫療法や抗癌剤の効果を増強できる可能性が期待される。

研究成果の概要（英文）：Ferroptosis is an iron-dependent regulated cell death. However, the effects of secretory signals from ferroptotic cells to surrounding cells were not clear. In this study, we showed that the culture supernatant from ferroptotic cells induced a decrease of SA-β-galactosidase, a senescence-related marker, and cell deaths in neighboring cells. We also found that the propagation of SA-β-galactosidase reduction and cell deaths by the culture supernatant was inhibited by antioxidants and ferroptotic inhibitors. Furthermore, co-culture of ferroptotic cells with normal cells showed that lipid peroxidation and cell deaths propagated to normal cells from ferroptotic cells. These results demonstrate the existence of propagation of lipid peroxidation and ferroptosis by secreted substances from ferroptotic cells.

研究分野：細胞死、細胞老化、腫瘍生物学

キーワード：フェロトーシス 鉄依存性細胞死 脂質過酸化 細胞老化

1. 研究開始当初の背景

近年、生体内にはアポトーシス以外にも様々な制御性細胞死が複数存在することが分かり、ネクロトーシスを始め、新規の細胞死が次々と報告されていた。フェロトーシスも 2012 年に Dixon らによって、新規の細胞死として報告された¹。フェロトーシスは名前の通り、鉄依存性の細胞死であり、鉄キレート剤に阻害されるというユニークな特徴を持つ。私達は、ヘム応答性の転写因子である BACH1 に着目した。BACH1 はヘムと結合して分解される一方で、ヘムの分解酵素であるヘムオキシゲナーゼ-1 を転写抑制して、ヘムからの細胞内自由鉄の供給を調整する。このため、私達は BACH1 がフェロトーシスを制御するのではないかと考えた。

その後、数年かけて、マウス胎仔線維芽細胞 (mouse embryonic fibroblasts : MEF 細胞) を用いて、BACH1 とフェロトーシスの関連性を探求し、主に下記 5 点の知見を得ていた²。

- (1) フェロトーシス誘導時にはグルタチオン合成経路の構成因子や鉄代謝の制御因子などの酸化ストレスに対して保護作用を有する遺伝子の発現が上昇すること。
- (2) これらの遺伝子の多くが BACH1 の標的遺伝子であり、フェロトーシス誘導時には BACH1 タンパク質が分解されることでこれらの遺伝子の発現が上昇し、細胞がフェロトーシスへの抵抗を示すこと。
- (3) 逆に、BACH1 はこれらの遺伝子の転写抑制を通じて、フェロトーシスを活性化させること。
- (4) 実際に MEF 細胞で BACH1 を欠損させると、細胞内グルタチオン濃度が上昇するとともに、フェロトーシス刺激下での自由鉄の導入が減少し、細胞がフェロトーシスに抵抗性を示すこと。
- (5) この BACH1 によるフェロトーシスの促進機構は生体内でも機能しており、BACH1 はフェロトーシスを活性化させることでマウスの心筋梗塞の病態を重症化させること。

これらの知見については、本研究の開始時に論文として投稿中であったが、この BACH1 によるフェロトーシスの促進機能に着目して、それまで、がん抑制以外にははっきりしていなかったフェロトーシスの生体内での意義について、本研究で探求したいと考えていた。

私達は以前、BACH1 が老化制御因子である p53 の転写活性化能を抑制することによって、細胞老化を抑制することを見出していた^{3,4}。この点から、BACH1 のフェロトーシスの制御機能が細胞老化とも関わる可能性を考え、予備的実験を行ったところ、フェロトーシスを誘導された MEF 細胞の培養上清を正常な MEF 細胞に投与すると、細胞老化マーカーである老化関連 β -ガラクトシダーゼ (SA- β -ガラクトシダーゼ) が低下することが判明した。この点から、フェロトーシス細胞が抗老化物質を分泌している可能性を考えた。

同時期に老化と関わり深い形質である肥満についても、*Bach1* 欠損マウスは野生型マウスと比べて、高脂肪食飼育下で肥満になりやすいという予備的知見を得ていた。私達は、高脂肪食飼育下のマウスが非アルコール性肝疾患を発症してフェロトーシスが起こし、そこから抗老化物質が分泌されて肥満を代償すると考えており、*Bach1* 遺伝子欠損マウスではフェロトーシスが誘導されにくいから、この代償機構が機能せず、肥満になりやすいのではないかと考えた。

私達は、このフェロトーシス細胞が抗老化抑制物質を分泌して、細胞老化や肥満などの老化関連形質を抑制するという仮説を、死細胞由来抗老化シグナルモデル (図 1) と名付けた。

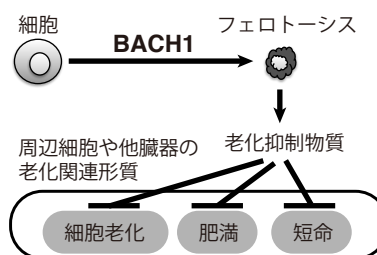
2. 研究の目的

上記の、死細胞由来抗老化シグナルモデル (図 1) が実際に存在するかどうか検証し、証明することが本研究の目的であった。

3. 研究の方法

- (1) MEF 細胞にフェロトーシス誘導剤 (Erastin) を投与してフェロトーシスを誘導し、培養上清を交換して薬剤を取り除いてからさらに培養し、その培養上清を別の MEF 細胞に投与する (図 2A) ことで、培養上清に含まれるフェロトーシス細胞由来物質が正常 MEF 細胞の細胞老化を抑制するかどうか、SA- β -ガラクトシダーゼや遺伝子発現解析によって調べた。

図1. 死細胞由来抗老化シグナルモデル



BACH1が細胞においてフェロトーシスを促進し、老化抑制物質が分泌されることで細胞老化や肥満などの老化関連形質が抑えられる。

- (2) クサビラオレンジの蛍光色素によって細胞を検出できるレポーターマウスから MEF 細胞 (クサビラオレンジ蛍光 MEF 細胞) を作製し、そのクサビラオレンジ蛍光 MEF 細胞をフェルトーシス誘導した野生型の MEF 細胞と一緒に培養する(図 3A)ことで、フェルトーシス細胞からの分泌物質がクサビラオレンジ蛍光 MEF 細胞に与える影響をタイムラプスイメージングによって調べた。
- (3) 十分に信頼がおける数の野生型マウスと *Bach1* 遺伝子欠損マウスにそれぞれ高脂肪食を与えて長期飼育し、それぞれのマウスの肥満度を比較した。また、それぞれのマウスの肝臓でのフェルトーシスの程度を遺伝子発現解析で比較した。野生型マウスに高脂肪食とともにフェルトーシス阻害剤であるフェロスタチン-1 を投与し、フェルトーシスの抑制によってマウスの肥満が加速するかどうか検討した。

4. 研究成果

- (1) フェルトーシスを誘導された MEF 細胞由来の培養上清の投与によって、正常 MEF 細胞の SA- β -ガラクトシダーゼが低下することが確認された。これはフェルトーシス細胞からの分泌物質の作用だと考えられたが、培養上清を移乗された MEF 細胞の長期培養や遺伝子発現解析からはこれらの MEF 細胞で細胞老化が抑制されているかどうかは確定できなかった。しかし、培養上清を移乗された MEF 細胞で SA- β -ガラクトシダーゼの低下とともに細胞死が惹起されることが明らかになった (図 2B)。この SA- β -ガラクトシダーゼの低下と細胞死は抗酸化物質であるビタミン E (α -トコフェロール)やフェロスタチン-1 で抑制されることも判明し(図 2B)、フェルトーシス細胞から何らかの酸化物質が分泌され、それが周囲の細胞でさらなるフェルトーシスを惹起すると考えられた⁵。

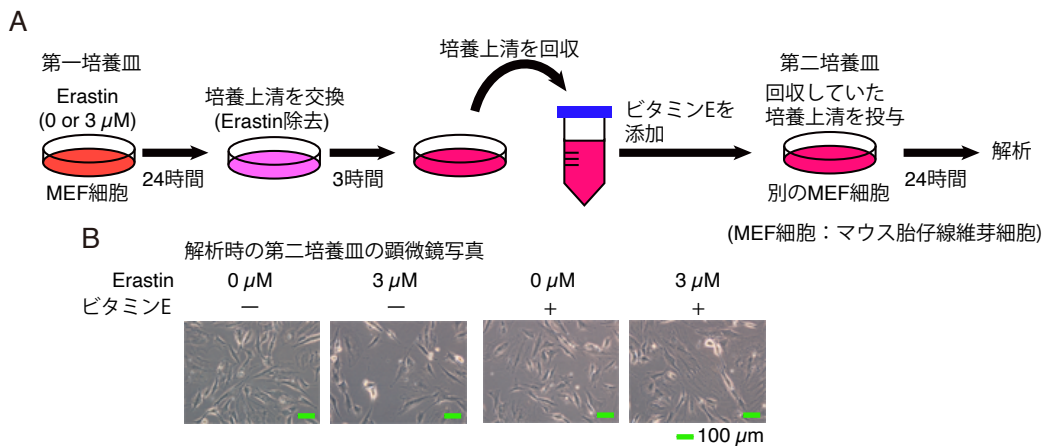


図2. (A) 実験概略図. 第一培養皿でMEF細胞でフェルトーシスを誘導し、その培養上清を第二培養皿のMEF細胞に投与することでフェルトーシス細胞からの分泌物質の効果を調べた。(B) Erastinに曝された第一培養皿の細胞(フェルトーシス細胞)由来の培養上清は第二培養皿の細胞に細胞死を惹起した。また、その効果はビタミンEで解消された。フェルトーシス細胞から酸化物質が分泌されて、別の細胞に細胞死を惹起することが示唆された。

- (2) フェルトーシス誘導された野生型の MEF 細胞と一緒に、クサビラオレンジ蛍光 MEF 細胞を培養する(図 3A)ことで、クサビラオレンジ蛍光 MEF 細胞にも細胞死が惹起される(図 3B)ことが明らかになった。上記 1)の実験と合わせて、フェルトーシス細胞からの分泌物質によって、周囲の細胞に細胞死が伝播することが示された⁵。

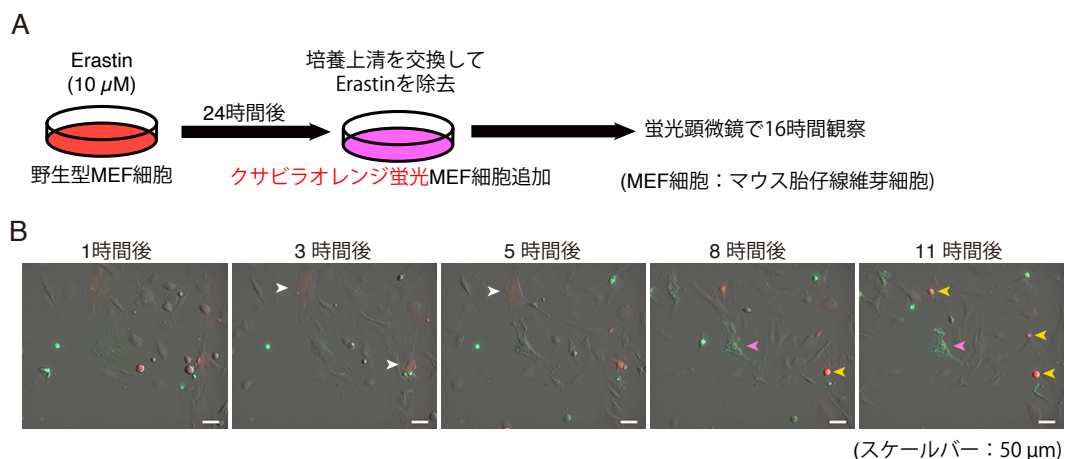


図3. (A) 実験概略図. 野生型MEF細胞にフェルトーシスを誘導し、そこにクサビラオレンジ蛍光MEF細胞を追加して、フェルトーシス細胞との共培養による他細胞への影響を調べた。(B) Erastinに曝された野生型MEF細胞がフェルトーシスを起こして緑色の細胞死マーカーに染まっている(ピンク矢頭)。その周りのクサビラオレンジ蛍光MEF細胞は最初は生きている(白矢頭)、フェルトーシス細胞からの分泌物質によって最終的に死に至る(黄矢頭)。

- (3) 十分な野生型マウスと *Bach1* 遺伝子欠損マウスの高脂肪食飼育下において、予備的知見の結果通り、*Bach1* 遺伝子欠損マウスでは野生型マウスよりも肥満になりやすくなることが判明した。また、*Bach1* 遺伝子欠損マウスの肝臓では野生型マウスと比べて、脂肪性肝障害による遺伝子発現変化が軽度であることも判明しつつある。今後、フェロトシス分泌物質の候補遺伝子を欠損させることで、脂肪性肝障害でフェロトシスした肝細胞からの分泌物質が肥満度の差に影響を与えるかどうか、引き続き検証する予定である。

引用文献

1. Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, *et al.* Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* **149**, 1060-1072 (2012).
2. Nishizawa H, Matsumoto M, Shindo T, Saigusa D, Kato H, Suzuki K, *et al.* Ferroptosis is controlled by the coordinated transcriptional regulation of glutathione and labile iron metabolism by the transcription factor BACH1. *The Journal of biological chemistry* **295**, 69-82 (2020).
3. Dohi Y, Ikura T, Hoshikawa Y, Katoh Y, Ota K, Nakanome A, *et al.* Bach1 inhibits oxidative stress-induced cellular senescence by impeding p53 function on chromatin. *Nature structural & molecular biology* **15**, 1246-1254 (2008).
4. Nishizawa H, Ota K, Dohi Y, Ikura T, Igarashi K. Bach1-mediated suppression of p53 is inhibited by p19(ARF) independently of MDM2. *Cancer science* **103**, 897-903 (2012).
5. Nishizawa H, Matsumoto M, Chen G, Ishii Y, Tada K, Onodera M, *et al.* Lipid peroxidation and the subsequent cell death transmitting from ferroptotic cells to neighboring cells. *Cell death & disease* **12**, 332 (2021).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nishizawa Hironari, Matsumoto Mitsuyo, Shindo Tomohiko, Saigusa Daisuke, Kato Hiroki, Suzuki Katsushi, Sato Masaki, Ishii Yusho, Shimokawa Hiroaki, Igarashi Kazuhiko	4. 巻 295
2. 論文標題 Ferroptosis is controlled by the coordinated transcriptional regulation of glutathione and labile iron metabolism by the transcription factor BACH1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 69 ~ 82
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.009548	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 -

1. 著者名 Nishizawa Hironari, Matsumoto Mitsuyo, Chen Guan, Ishii Yusho, Tada Keisuke, Onodera Masafumi, Kato Hiroki, Muto Akihiko, Tanaka Kozo, Igarashi Kazuhiko	4. 巻 12
2. 論文標題 Lipid peroxidation and the subsequent cell death transmitting from ferroptotic cells to neighboring cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Death & Disease	6. 最初と最後の頁 332
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41419-021-03613-y	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 -

1. 著者名 西澤 弘成、五十嵐 和彦	4. 巻 92
2. 論文標題 転写因子BACH1がつかさどるフェロトーシス制御の遺伝子ネットワーク	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 582 ~ 586
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西澤 弘成
2. 発表標題 転写因子BACH1がつかさどるフェロトーシス促進ネットワークとその生体内における意義
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

1) 研究室ホームページ (BACH1によるフェロトーシスの制御)
<http://www.biochem.med.tohoku.ac.jp/discoveries/index.html#PbannerImage7>
2) プレスリリース
まるでドミノ!? 細胞死が連鎖して広がっていく -鉄依存性細胞死(フェロトーシス)の拡散現象を発見-
<http://www.tohoku.ac.jp/japanese/2021/03/press20210330-01-domino.html>
<https://www.med.tohoku.ac.jp/news/4645.html>

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
連携研究者	五十嵐 和彦 (Igarashi Kazuhiko) (00250738)	東北大学・医学系研究科・教授 (11301)	
連携研究者	松本 光代 (Matsumoto Mitsuyo) (80400448)	東北大学・医学系研究科・助教 (11301)	

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