

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16141

研究課題名（和文）フェロトーシスにおけるグルタチオン代謝関連産物とその代謝酵素の生理機能の解明

研究課題名（英文）Elucidation of physiological functions of glutathione-related metabolites and its metabolic enzymes in ferroptosis

研究代表者

小林 翔（Kobayashi, Sho）

山形大学・農学部・准教授

研究者番号：10779490

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）：本期間中に行った研究とその成果は次の通りである。1)新規フェロトーシス抑制遺伝子のCNDP2を欠損するマウスをゲノム編集を用いて樹立した。CNDP2欠損マウスは、アセトアミノフェン誘導性肝障害に脆弱であり、生化学的および組織学的解析によってより重篤な肝障害と腎障害が認められた。2)フェロトーシス細胞を直接判定する方法の開発のため、既存の脂質過酸化反応マーカーである4-HNE認識抗体よりも特異性の高いフェロトーシス細胞認識ラットモノクローナル抗体の作出に成功した。3)食品等からフェロトーシスを制御する食品由来成分の探索を行った所、ニンニクおよび黄柏抽出物にフェロトーシスを抑制する効果を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により樹立したCNDP2欠損マウスを用いて解析を行うことで、グルタチオンの分解を介したシステイン再利用経路の生理機能を解明することは、抗がん剤耐性を持つ癌を標的とした新たな治療薬の開発にもつながると考えている。また、本研究により作出したフェロトーシス認識ラットモノクローナル抗体は、フェロトーシスの分子機構や各種の病態におけるフェロトーシスの関与を解明するツールとして有用であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The research conducted during this period and its results are as follow. 1) To investigate the physiological function of CNDP2, a novel ferroptosis-suppressing gene found in previous study, CNDP2-deficient mice were established by genome editing. The CNDP2-deficient mice are more vulnerable to acetaminophen-induced liver injury than wild-type mice. Biochemical and histological analysis showed liver damage and renal damage are more severe in CNDP2-deficient mice. 2) We have developed a method for directly determining ferroptotic cells and succeeded in producing a rat monoclonal antibody that recognizes ferroptotic cells with higher specificity than the existing antibody that recognize lipid peroxidation marker 4-HNE. 3) We searched for food-derived ingredients that control ferroptosis and found that garlic and Phellodendron amurense extract had the effect of suppressing ferroptosis.

研究分野：生化学、食品栄養科学

キーワード：グルタチオン代謝 フェロトーシス システイン供給経路 システイン再利用経路 フェロトーシス細胞認識抗体 フェロトーシスを制御する食品由来成分

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。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞は内因性および外因性に生じる活性酸素種 (ROS) に常に曝されているが、各種抗酸化物質と抗酸化酵素が協調的に作用することで酸化還元恒常性 (レドックスホメオスタシス) が保たれ、健康な状態を維持している。過剰な ROS は酸化ストレスの亢進をもたらす、癌をはじめとした種々の疾患に関わると考えられている。グルタミン酸、システイン (Cys)、グリシンの3種類のアミノ酸から成るグルタチオン (GSH) は抗酸化や GSH 抱合による解毒をはじめとする細胞の機能維持に必須の役割を果たす。GSH は、細胞質において  $\gamma$  グルタミルシステイン合成酵素 ( $\gamma$ GCS) とグルタチオン合成酵素 (GSS) が触媒する二段階の反応により生合成される。一方で、細胞膜上に発現する  $\gamma$  グルタミルトランスフェラーゼ (GGT) は GSH 分解に関わり、GSH の  $\gamma$  グルタミル基を他のアミノ酸やペプチドに転移する反応を触媒する。さらに、GGT の作用により生じるシステニルグリシン (Cys-Gly) や多様な種類の  $\gamma$  グルタミルペプチド類 ( $\gamma$ Glu-Pep) は、構成アミノ酸まで分解される。GSH の合成における律速酵素は  $\gamma$ GCS であるが、細胞内の Cys 存在量は他の GSH の構成アミノ酸より少ないため、GSH 合成の制限要因となる。ほとんどの培養細胞は細胞外の Cys 酸化二量体のシスチンを特異的輸送体の xCT を介して取り込むことで Cys 量を維持すると考えられている。したがって、培養環境下では xCT が機能しないと細胞は生存できず、鉄イオン依存性細胞死・フェロトーシスが引き起こされる。フェロトーシスでは細胞内に過酸化脂質が蓄積するため、その還元解毒を担うグルタチオンペルオキシダーゼ 4 (GPX4) が酸化ストレス障害からの防御にとって極めて重要である。GPX4 欠損マウスは腎臓に障害が起こるが、過酸化脂質をはじめとする体内の老廃物が腎臓に集積することが一つの要因と考えられる。

申請者は最近、xCT 欠損マウスのマクロファージが培養下でほぼ正常に生存することを発見し、プロテオミクス解析により、Cys-Gly を特異的に切断する Cytosolic non-specific dipeptidase 2 (CNDP2) が高発現することを見出した。細胞外の GSH そのものは細胞に取り込まれないが、GGT によって  $\gamma$  グルタミル基が切除された Cys-Gly になると取り込まれ、CNDP2 によってアミノ酸にまで分解され、生成した Cys が GSH 合成に再利用されると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では、GSH 枯渇により引き起こされるフェロトーシスに焦点を当て、細胞内のアミノ酸再利用系として機能する CNDP2 の生理機能の解明を目指し、CNDP2 欠損マウスおよびそのマウス由来細胞を用いた解析を行った。

### 3. 研究の方法

(1) CNDP2 の生理機能を解明するため、xCT 欠損 (xCTKO) マウス由来マクロファージおよびマウス肝臓がん由来株細胞 Hepa1-6 を用いた生化学および酵素学的な検討に加え、ゲノム編集を用いて CNDP2 欠損マウスを樹立し、アセトアミノフェン誘導性肝障害モデルにおける病態の解析を行った。

(2) フェロトーシス細胞を直接的に判定する方法の確立を目指し、フェロトーシス細胞認識ラットモノクローナル抗体を作出し、各種フェロトーシス刺激での特異性の解析と共に既存の脂質過酸化反応マーカーの 4-ヒドロキシノネナル (4-HNE) 抗体との比較を行った。

(3) フェロトーシスは癌や神経変性疾患、炎症などといった種々の疾患に関与し、フェロトスタチン-1 やエダラボンとともにビタミン E のような脂溶性の抗酸化物質はフェロトーシスを抑制することが知られている。フェロトーシスを制御する食品由来の成分は、フェロトーシスに関連する疾患の予防への利用が期待されているため、食品等からフェロトーシスを制御する成分の探索を行なった。

### 4. 研究成果

(1) 先行研究において xCTKO マウス由来マクロファージのプロテオミクス解析において高発現することが明らかになった CNDP2 が Cys-Gly 分解活性を有するかどうかを CNDP2 精製酵素および培養細胞ホモジェネートを用いた検討を行なった。その結果、CNDP2 は二価金属イオンとりわけ  $Mn^{2+}$  依存的に Cys-Gly を分解することを確認した。また、xCTKO および野生型 (WT) マウス由来マクロファージのホモジェネートを用いて、ウエスタンブロット解析を行った結果、CNDP2 タンパクは WT と比較して xCTKO の方が多いことを認めた。また、Cys-Gly 分解活性は、WT と比較して xCTKO マクロファージにおいて約 2 倍程度高いことが分かった。

より詳細に細胞における生理機能を解析するため、Hepa1-6 を用いた検討を行なった。先行研究において、Hepa1-6 は xCT を介したシスチン取り込みにシステイン供給が依存していることがわかっている。ウエスタンブロット解析および Cys-Gly 分解活性測定により Hepa1-6 で CNDP2 が発現することを確認した。Hepa1-6 をシスチン欠乏培地で培養を行うと数十時間のうちに GSH が枯渇し、細胞は死滅したが、培地中に GSH や酸化型システニルグリシン二量

体 (GCssCG) を添加することにより、GSH や Cys 量が維持され、細胞死が抑制された。しかし、CNDP2 の阻害剤であるベスタチンを添加することにより、GSH や GCssCG による細胞死抑制効果が打ち消され、再び細胞は死滅したことから、フェロトーシスにおいて CNDP2 は重要な役割を担うことが示唆された。

生体における CNDP2 の生理機能の解析のため、ゲノム編集により CNDP2 欠損 (CNDP2KO) マウスを作製した。CNDP2KO マウスは通常飼育条件では正常に生育し、生殖能力も有していた。アセトアミノフェンを 350 mg/kg で腹腔内投与を行なった結果、CNDP2KO マウスは WT マウスに比べ感受性が増すことが明らかになった。アセトアミノフェン投与により、CNDP2KO マウスは WT マウスに比べ、肝機能マーカーの ALT および AST は高値を示し、組織学的な解析において肝臓障害部位も有意に増大した。さらに、アセトアミノフェンを投与した CNDP2KO においてのみ、腎機能マーカーである BUN は高値を示し、組織学的な解析においても腎障害を認めた。これらの結果より、CNDP2 は Cys-Gly 分解を介して GSH の Cys 再利用系として機能し、フェロトーシスから細胞保護に働くことと共に、アセトアミノフェン誘導性肝障害モデルにおいて肝臓および腎臓を障害から保護することに機能することが明らかになった (図 1)。

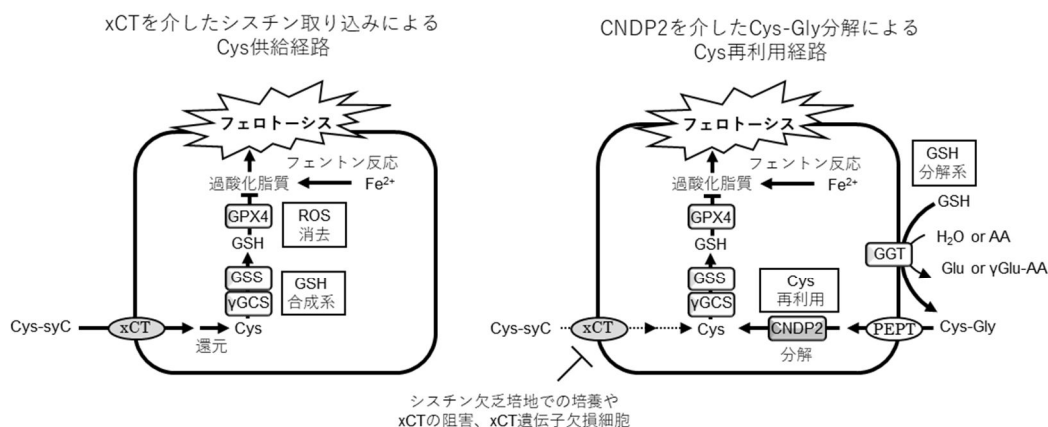


図1 xCTを介したシスチン取り込みによるCys供給経路とCNDP2を介したCys-Gly分解によるCys再利用経路の概略

Cys-syC: シスチン, AA; アミノ酸, Glu; グルタミン酸, γGlu-AA; γGCS: γグルタミルペプチド, PEPT; ペプチドトランスポーター

(2) フェロトーシス過程においてその適切なマーカーがないため、その判定が難しいことが問題点として挙げられる。そこで、フェロトーシス細胞認識抗体を作出し、細胞蛍光免疫染色法によるフェロトーシス細胞の検出系の開発を試みた。Hepa1-6 を用いて、シスチン欠乏培地で培養することでフェロトーシスを誘導した細胞を抗原としてラットに免疫した。単離したリンパ球とマウスミエローマ細胞・SP2 を細胞融合し、得られたハイブリドーマの培養上清の中からフェロトーシス細胞を特異的に認識する抗体を選抜し、ラットモノクローナル抗体・FerAb を得ることに成功した。

FerAb はシスチン欠乏培地での細胞培養だけでなく、一般的なフェロトーシス刺激である xCT 阻害剤の erastin や GPX4 阻害剤の RSL3 での処理によってフェロトーシスを誘導した細胞と強く反応したが、スタウロsporinによるアポトーシス誘導細胞には全く反応しなかった。脂質過酸化反応マーカーである 4-HNE を認識する抗体 (HNE-Ab) はフェロトーシス細胞の検出への応用が期待されている。本研究において作製した FerAb と既存の HNE-Ab を用いてフェロトーシス細胞への特異性を検討した結果、HNE-Ab はフェロトーシス細胞と反応したが、フェロトーシス刺激処理をしていない正常細胞とも強く反応したため、特異性については FerAbの方が優れていた。FerAb は 4-HNE 修飾ウシ血清アルブミンとの反応性を示したが、ウエスタンブロット解析では正常細胞とフェロトーシス細胞の間で検出されるタンパクに差が認められなかったため、FerAb はタンパク自体ではなく 4-HNE に類似する構造を認識していると考えられた。細胞内における FerAb 反応部位を共焦点レーザー顕微鏡により調べた所、FerAb はフェロトーシス刺激をしていない正常細胞との反応が観察され、細胞膜の仮足様構造に結合することに加え、フェロトーシス細胞では細胞内全体に不均一に結合し、ミトコンドリアなどの細胞内小器官にも部分的に結合することが認められた。さらに、FerAb はフェロトーシスを誘導した Hepa1-6 だけでなく、ヒト子宮頸がん由来株細胞 Hela やマウス胚性線維芽細胞 (MEF) においてもフェロトーシス刺激により反応性を示した。以上の結果から、FerAb は動物種やフェロトーシスの刺激を問わず、フェロトーシスを起こした細胞を共通して認識すると考えられ、FerAb はフェロトーシスの分子機構や各種の病態におけるフェロトーシスの関与を解明するツールとして有用であると考えられる。

(3) 食品等からフェロトーシスを制御する機能性成分の探索する一環として、ニンニクおよび黄柏から調製した抽出液を用いて、培養細胞におけるフェロトーシスへの効果を検討した。

ニンニク可食部から調製した抽出液をマウス膀胱癌由来株細胞βTC3細胞に添加した所、分量依存的に細胞内 GSH 量が増大させた。xCTKO および WT マウス由来 MEF を用いて検討した所、WT-MEF と共に、通常培養条件では GSH が枯渇しフェロトーシスを起こすため、生育できない xCTKO-MEF においても細胞内 GSH 量の増大と生存を認めた。さらに、この細胞保護効果はシスチン欠乏培地では認められなかったことから、培地中のシスチンに依存して細胞にシステインを供給する作用を持つ成分がニンニク抽出液中に存在することが示唆された。

漢方的一种である黄柏から調製した抽出液をラットグリオーマ株細胞 C6 に添加した所、シスチン欠乏によって引き起こされるフェロトーシスを抑制する効果が認められた。この条件において細胞内 GSH 量は変化しなかったことから、GSH に依存せずに細胞保護に関わる成分が黄柏抽出液中に存在することが示された。

現在、これらの抽出液からフェロトーシス制御に関わる成分の単離・精製を進めている。前述した遺伝子欠損マウスを用いた病態モデルやフェロトーシス判定方法を利用して、これらの成分の作用を解析する予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 3件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Homma Takujiro, Kobayashi Sho, Fujii Junichi	4. 巻 54
2. 論文標題 Cysteine preservation confers resistance to glutathione-depleted cells against ferroptosis via CDGSH iron sulphur domain-containing proteins (CISDs)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Free Radical Research	6. 最初と最後の頁 397 ~ 407
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/10715762.2020.1780229	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 -
1. 著者名 Moon Gyul, Kobayashi Sho, Aung Naing Ye, Yamada Ken-ichi, Yamakawa Mitsunori, Fujii Junichi	4. 巻 54
2. 論文標題 Iron loading exerts synergistic action via a different mechanistic pathway from that of acetaminophen-induced hepatic injury in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Free Radical Research	6. 最初と最後の頁 606 ~ 619
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/10715762.2020.1819996	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 -
1. 著者名 Kobayashi Sho, Harada Yumi, Homma Takujiro, Yokoyama Chikako, Fujii Junichi	4. 巻 489
2. 論文標題 Characterization of a rat monoclonal antibody raised against ferroptotic cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Immunological Methods	6. 最初と最後の頁 112912 (9 page)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jim.2020.112912	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 -
1. 著者名 Homma Takujiro, Kobayashi Sho, Sato Hideyo, Fujii Junichi	4. 巻 700
2. 論文標題 Superoxide produced by mitochondrial complex III plays a pivotal role in the execution of ferroptosis induced by cysteine starvation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Archives of Biochemistry and Biophysics	6. 最初と最後の頁 108775(9 page)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.abb.2021.108775	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 -

1. 著者名 Kobayashi Sho, Homma Takujiro, Fujii Junichi	4. 巻 26
2. 論文標題 Nitric oxide produced by NOS2 copes with the cytotoxic effects of superoxide in macrophages	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 100942(10 page)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2021.100942	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 -

1. 著者名 Fujii Junichi, Homma Takujiro, Kobayashi Sho, Warang Prashant, Madkaikar Manisha, Mukherjee Malay B.	4. 巻 Jan17
2. 論文標題 Erythrocytes as a preferential target of oxidative stress in blood	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Free Radical Research	6. 最初と最後の頁 1 ~ 19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/10715762.2021.1873318	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 該当する

1. 著者名 Homma Takujiro, Kobayashi Sho, Conrad Marcus, Konno Hiroyuki, Yokoyama Chikako, Fujii Junichi	4. 巻 115
2. 論文標題 Nitric oxide protects against ferroptosis by aborting the lipid peroxidation chain reaction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nitric Oxide	6. 最初と最後の頁 34 ~ 43
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.niox.2021.07.003	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 該当する

1. 著者名 Kobayashi Sho, Homma Takujiro, Okumura Nobuaki, Han Jia, Nagaoka Keita, Sato Hideyo, Konno Hiroyuki, Yamada Sohsuke, Takao Toshifumi, Fujii Junichi	4. 巻 174
2. 論文標題 Carnosine dipeptidase II (CNDP2) protects cells under cysteine insufficiency by hydrolyzing glutathione-related peptides	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Free Radical Biology and Medicine	6. 最初と最後の頁 12 ~ 27
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.freeradbiomed.2021.07.036	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 -

1. 著者名 Bo Tomoki, Kobayashi Sho, Inanami Osamu, Fujii Junichi, Nakajima Osamu, Ito Tsunekata, Yasui Hironobu	4. 巻 14
2. 論文標題 LAT1 inhibitor JPH203 sensitizes cancer cells to radiation by enhancing radiation-induced cellular senescence	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Translational Oncology	6. 最初と最後の頁 101212 ~ 101212
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tranon.2021.101212	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 -

1. 著者名 L Verbruggen, G Ates, O Lara, J D Munck, A Villers, L D Pauw, S Ottestad-Hansen, S Kobayashi, P Beckers, P Janssen, H Sato, Y Zhou, E Hermans, R Njemini, L Arckens, N C Danbolt, D D Bundel, J L Aertsi, K Barbet, B Guillaume, L Ris, E Bentea, A Massie	4. 巻 27
2. 論文標題 Lifespan extension with preservation of hippocampal function in aged system xc <sup>2</sup> -deficient male mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Psychiatry	6. 最初と最後の頁 2355 ~ 2368
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41380-022-01470-5	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 該当する

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 小林翔、原田裕未、本間拓二郎、横山智哉子、藤井順逸
2. 発表標題 フェロトシス細胞を認識するラットモノクローナル抗体の作製とその性質
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 本間 拓二郎、小林 翔、藤井 順逸。
2. 発表標題 マクロファージ NOS2 の生成する NO はスーパーオキシドの毒性消去に働く。
3. 学会等名 第73回日本酸化ストレス学会・第20回日本NO学会合同学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 本間拓二郎、小林翔、藤井順逸
2. 発表標題 グルタチオン合成阻害環境下における鉄硫黄クラスター形成反応のフェロトーシス感受性への関与
3. 学会等名 第73回日本酸化ストレス学会・第20回日本N0学会合同学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林翔、本間拓二郎、奥村宣明、韓佳、長岡敬太、佐藤英世、今野博行、山田壮亮、高尾敏文、藤井順逸
2. 発表標題 CNDP2はグルタチオン由来Cys-Glyを分解することでCysの再利用を促進しフェロトーシスから防御に働く
3. 学会等名 第74回日本酸化ストレス学会・第21回日本N0学会合同学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 本間拓二郎、小林翔、藤井順逸
2. 発表標題 一酸化窒素は過酸化脂質ラジカルを消去することでフェロトーシスを抑制する
3. 学会等名 第74回日本酸化ストレス学会・第21回日本N0学会合同学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 本間拓二郎、尾崎司、小林翔、藤井順逸
2. 発表標題 D-システインは細胞内グルタチオン依存的にフェロトーシスを抑制する
3. 学会等名 第16回D-アミノ酸学会学術講演会
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 本間拓二郎、小林翔、藤井順逸
2. 発表標題 一酸化窒素による新規細胞死フェロトーシス抑制機構の解明
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林翔、本間拓二郎、今野博行、佐藤英世、藤井順逸
2. 発表標題 フェロトーシスを制御するシステイン供給経路
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

山形大学 研究者情報 <a href="http://yudb.kj.yamagata-u.ac.jp/search?m=home&amp;l=ja">http://yudb.kj.yamagata-u.ac.jp/search?m=home&amp;l=ja</a>
---

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