

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590089

研究課題名(和文) 生体膜脂質酸化ホメオスタシスの破綻による新規細胞死の実行経路の解明

研究課題名(英文) Analysis of signaling pathway of novel lipid hydroperoxide dependent cell death

研究代表者

今井 浩孝 (IMAI, HIROTAKA)

北里大学・薬学部・教授

研究者番号：50255361

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々はこれまでに様々な細胞において酸化リン脂質を還元するリン脂質ヒドロペルオキシドグルタチオンペルオキシダーゼ(PHGPx)を欠損すると脂質酸化依存的な新規細胞死が誘導されることを見出している。本研究では、タモキシフェン誘導型PHGPx欠損MEF細胞を用いて化合物ライブラリーやshRNAライブラリーをスクリーニングすることにより新規細胞死に関与するシグナル分子の同定を目的に研究を行った。その結果、致死を抑制する化合物6種類、致死を抑制する20以上の遺伝子の同定に成功した。これらの分子はこれまで報告のある既知の細胞死誘導因子とは異なるものであり、この細胞死が新規細胞死であることが裏付けられた。

研究成果の概要(英文)：Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) is an intracellular anti oxidant enzyme that directly reduces peroxidized phospholipids. From analysis of our tissue-specific PHGPx knockout mice, we clarified that depletion of PHGPx can induce novel cell death via generation of phospholipid hydroperoxide in several tissues. This novel lipid hydroperoxide dependent cell death can be completely suppressed by addition of vitamin E. To clarify the mechanism of novel cell death pathway, we screened chemical library and shRNA library using tamoxifen inducible PHGPx knockout MEF cells. We found six inhibitors and about 20 genes to suppress the novel lipid hydroperoxide dependent cell death. Knockdown of target genes against inhibitors can be suppressed novel cell death. These identified genes were not different from that regulating apoptosis, necroptosis and autophagic cell death. These results mean that lipid hydroperoxide dependent cell death is novel programmed cell death.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：細胞死 脂質酸化 shRNAライブラリー 化合物ライブラリー GPx4 心不全 ビタミンE

### 1. 研究開始当初の背景

リン脂質ヒドロペルオキシドグルタチオンペルオキシダーゼ (PHGPx) は、生体膜脂質の酸化で生じたリン脂質ヒドロペルオキシドをグルタチオン依存的に直接還元する酵素である。我々はこれまでに様々な組織特異的 PHGPx 欠損マウスを作成し個体レベルでの機能解析を行っている。精巣特異的 PHGPx 欠損マウスでは精母細胞が致死となり、精子数が著しく減少し男性不妊となること、肝臓特異的 PHGPx 欠損マウスでは、16.5 日以降肝細胞死が誘導され、出生直後死となること、心臓特異的 PHGPx 欠損マウスでは、17.5 日に心筋細胞が致死となり、18.5 日では浮腫を起こし産まれてこないことなどを見いだしている。興味深いことにこれらの各組織での PHGPx 欠損による細胞死では母親にビタミン E 添加食を与えることで完全に個体レベルでの致死が抑制され、正常に成育できるようになる。一方、ビタミン E 添加食で正常に成育できた心臓特異的 PHGPx 欠損マウスは、通常食に換えると約 10 日で致死となることを見出している。このことは PHGPx とビタミン E により脂質酸化を抑制することが、細胞および個体の生存にとって極めて重要であることを示している。

このように PHGPx の欠損による脂質酸化が起因となる細胞死のメカニズムを明らかにするために、我々はタモキシフェン誘導型 PHGPx 欠損細胞を用いて、細胞死の形態について詳細に検討したところ、これまで報告のあるアポトーシス、ネクローシス、オートファジー性細胞死やネクロトーシスとも異なる新規の細胞死であることを見出していた。

### 2. 研究の目的

本研究では、この脂質酸化が起因となる新規細胞死の致死のメカニズムを明らかにする目的で、既知のターゲットが明らかになっている約 300 種類の化合物ライブラリーをスクリーニングし、細胞内のどのシグナル系が致死に関与しているのかについて検討を行った。また shRNA ライブラリーもスクリーニングを行い、細胞死を抑制できる shRNA を同定し、新規細胞死の実行因子を明らかにすることを試みた。

### 3. 研究の方法

(1) タモキシフェン誘導型 PHGPx 欠損 MEF 細胞

スクリーニングに用いた細胞は、我々が樹立したタモキシフェン誘導型 PHGPx 欠損 MEF 細胞である。この細胞では、培地にタモキシフェンを添加すると、添加後 24 時間で PHGPx が欠損し、細胞内でリン脂質ヒドロペルオキシドが生成し、細胞死は 48 時間後から 72 時間後の間で致死となる。この細胞死は、タモキシフェン添加と同時に 200  $\mu$ M のビ

タミン E やビタミン E の誘導体であるトコロックスの添加で、完全に細胞死が抑制され、正常に増殖できる。

(2) 化合物ライブラリーのスクリーニング  
この細胞を用いて、化合物ライブラリーを、タモキシフェン添加と同時に添加し、72 時間後においても細胞死が起きていない阻害剤について検討を行った。

約 300 種類の既知の酵素に対する阻害剤ライブラリー (文科省科研費・新学術領域・がん支援・化学療法基盤支援活動班・標準阻害剤キット) を用い、96 穴プレートにまいたタモキシフェン誘導型 PHGPx 欠損 MEF 細胞株に、タモキシフェンを終濃度 1  $\mu$ M および 10  $\mu$ M で添加した場合の、72 時間後の細胞死を抑制できる化合物を 1 次スクリーニングした。

1 次スクリーニングで陽性を示した化合物については、スケール UP と濃度依存性について解析を行った。2 次スクリーニングによって、濃度依存的に再現よく細胞死を抑制できる化合物を 8 種類みいだした。

(3) In vitro リン脂質自動酸化抑制能の解析

ビタミン E のように、脂質の酸化を抑制する化合物は、脂質酸化そのものを抑えるため、新規細胞死を抑制することができる。そのため、キナーゼ等のシグナル伝達系とは異なる。そこで、2 次スクリーニングでも陽性だった化合物が、In vitro における自動酸化によるリン脂質ヒドロペルオキシドの生成を抑制できるのか (リン脂質自動酸化抑制能を有しているか否か) について検討した。

イムロン 1 プレートにリノール酸含有ホスファチジルコリン (PC) のエタノール溶液を加え、37 度で 12 時間放置する。エタノールは乾固した後、PC の自動酸化が起きる。12 時間後、脂質ヒドロペルオキシドと反応し蛍光を発するジヒドロローダミンを反応させ、PC ヒドロペルオキシドの生成量を蛍光量で測定した。被験化合物の濃度をふり、コントロールとしてビタミン E と比較検討した。被験化合物の濃度は、実際の細胞死を抑制することができた濃度あたりから濃度依存性について検討した。

(4) レトロウイルス感染系を用いた標的蛋白質のノックダウンによる細胞死抑制効果の確認

標的遺伝子のノックダウンを行うために、レトロウイルス感染系を用いた shRNA の発現ベクターの作成をまず行った。shRNA ベクターは、pMIG dr-U6 を用い、Packing 細胞株である PlatE 細胞にリポフェクトアミン法を用いて遺伝子導入を行い、2 日間培養し、培養上清中にレトロウイルスの産生を行った。培養上清を回収し、ポリブレンを加えた後に、タモキシフェン誘導型 PHGPx 欠損細胞に加え、レトロウイルスを感染させることによりノックダウン細胞を作成した。標的遺伝子がノックダウンされているのかについては定量的 real time PCR 法にて確認を行った。

#### (5) ノックダウン細胞への遺伝子の再導入実験

遺伝子の再導入実験もレトロウイルス感染系を用いて行った。標的遺伝子の cDNA を MEF 細胞から PCR 法によりクローニングし、塩基配列を確認した後、発現ベクター (pMXs-IR) に導入し、上述した方法にてレトロウイルスを作成して、ノックダウン細胞に感染させた。この導入した cDNA はノックダウンに使用している shRNA が結合しない耐性の cDNA を導入した。具体的には、マウスではなくヒト遺伝子を導入する場合と、shRNA 結合塩基についてアミノ酸配列に変化がないような形で、変異をいれた cDNA を導入した。

#### (6) 心臓特異的 PHGPx 欠損マウスのビタミン E 低下により起きる心不全による突然死に対する阻害剤の効果

我々はこれまでに心臓特異的 PHGPx 欠損マウスが発生過程の 17.5 日に心筋細胞の突然死により、個体が致死となること、母親にビタミン E 添加食を与えることにより、致死が抑制され、正常に育つことを報告している。ビタミン E 添加食で正常に成育した心臓特異的 PHGPx 欠損マウスを通常食に換えると、心臓のビタミン E の減少に伴い、約 10 日でほとんどのマウスが不整脈性の心不全により突然死を引き起こすことを明らかにしている。本実験では、新規細胞死を抑制することを見いだした阻害剤で、ビタミン E 添加食から通常食に変えた後 10 日で起きる突然死に対して、治療効果がみられるのかについて検討した。投与は通常食に換えてから、腹腔に阻害剤を毎日投与し、致死時期の変化について解析した。

#### (7) shRNA ライブラリーのスクリーニング

レンチウイルスマウス shRNA ライブラリー (SBI 社製) を用いて、タモキシフェン誘導型 PHGPx 欠損 MEF 細胞に感染させた。それから、タモキシフェン添加、未添加後 96 時間後でも生存している MEF 細胞から RNA の抽出を行い、細胞内に導入された shRNA 配列を PCR による増幅を行い、プローブとしてマイクロアレイ解析を行った。タモキシフェン未添加細胞に比べ、添加後 96 時間においてシグナル強度が増加した遺伝子のうち上位 151 遺伝子を細胞死誘導に参与する候補遺伝子とした。

次に 151 遺伝子個々にレトロウイルス shRNA の感染系を構築し、ノックダウン細胞を作成し、タモキシフェン添加による細胞死の抑制効果について実際に検討した。その結果、阻害剤 A で見出した標的蛋白質 A のノックダウンによる細胞死の抑制効果よりも、高い細胞死抑制効果を示した遺伝子を 17 遺伝子見出した。

### 4. 研究成果

#### (1) PHGPx 欠損 MEF 細胞株を用いた新規細

#### 胞死のメカニズムの解析

我々はこれまでに、タモキシフェン誘導型 PHGPx 欠損 MEF 細胞において、カスパーゼ非依存性かつ典型的なアポトーシスではなく、HMGB1 の核からの放出もみられず、タイムラプスの解析から、ネクローシスでもない細胞死であることを報告してきた。またオートファジー性細胞死の可能性についてもオートファジーの責任分子である ATG5 のノックダウン細胞でも細胞死の抑制効果は全くみられなかったことからオートファジー性細胞死とも異なると結論づけた。

本研究では、新たな細胞死経路として、ネクローシスやフェロトーシス (鉄依存性細胞死) の可能性について検討した。ネクローシスは、カスパーゼが機能しない細胞死において、RIP1 キナーゼおよび RIP3 キナーゼ複合体の活性化によって起きる新しい細胞死である。阻害剤として、RIP1 キナーゼの阻害剤 Nec-1 が知られている。我々の細胞死では、Nec-1 でも抑制効果がみられたが、Nec-1 は一方で強力なリン脂質の自動酸化に対しても抑制効果を示した。さらに細胞内のヒドロペルオキシドも Nec-1 によって下がることからビタミン E のように脂質酸化を抑制して細胞死を抑制していると考えられた。実際、RIP1 のノックダウン細胞では細胞死は抑制できなかった。このことから本細胞死はネクローシスとも異なると考えられた。一方、最近、変異 RAS ががん細胞を殺す抗がん剤による細胞死で、鉄依存性の脂質酸化を介した細胞死フェロトーシスが報告された。本細胞死もビタミン E で抑制効果がみられた。

そこで、我々の細胞死における鉄のキレーター並びにフェントン反応による脂質酸化の可能性について検討した。その結果、鉄のキレーターやスーパーオキシドの消去剤 Mn-TBAP や N アセチルシステインでは、細胞死の抑制効果はみられなかった。またスーパーオキシドジスムターゼ (SOD1、2) や過酸化水素の消去酵素、細胞質型グルタチオンペルオキシダーゼの高発現細胞株を作成しても細胞死は抑制できなかったことから、PHGPx 欠損による脂質ヒドロペルオキシドの生成には、フェントン反応以外の経路が関与していると考えられた。実際、蛍光色素 DCFH-DA を用いた細胞内ヒドロペルオキシド生成について、フローサイトメトリーを用いて解析したところ、タモキシフェン添加後 24 時間後のヒドロペルオキシドの上昇は、ビタミン E 同時添加では抑制されたが、鉄のキレーター存在下では抑制されなかった。フェロトーシスを引き起こすことが知られている xCT トランスポーターの阻害剤処理では、ヒドロペルオキシドの生成がみられ、鉄のキレーターによって抑制された。このことから、PHGPx 欠損によっておこるヒドロペルオキシド生成はフェントン反応以外のシステムでおこると考えられた。以上の結果は、PHGPx 欠損による細胞死はフェロトーシス様では

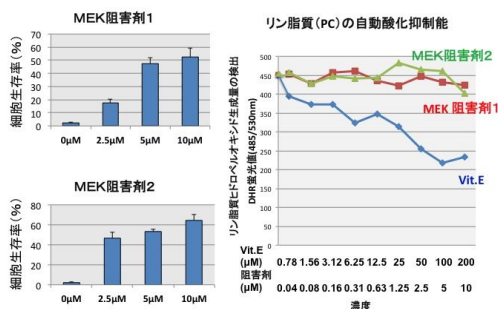
あるが、異なるメカニズムが存在することが考えられた。

### (2) 化合物ライブラリーによる新規細胞死に 関与するシグナル伝達経路の解析

これまでのところ、我々が見出した PHGPx 欠損による脂質酸化依存的新規細胞死経路に関わるシグナル伝達経路は全く明らかになっていない。またフェロトーシスにおいても脂質酸化の下流で働く遺伝子については明らかではない。そこで我々は既知のシグナル伝達系の約 300 種類の阻害剤を用いて、既知の酵素のうちどのようなシグナル経路がこの細胞死に関与しているのかについて解析を行った。その結果、300 種類のうち、8 阻害剤が、新規細胞死を抑制できることを明らかにした。このうち、ひとつは Nec-1 であるが、先に述べたようにこの化合物は強い、リン脂質酸化抑制能（抗酸化活性）をもつことから、他の 7 つの阻害剤についても同様に検討した。その結果、もうひとつの阻害剤も本来のターゲット分子以外に強い抗酸化活性をもつことが明らかとなった。

よって抗酸化活性をもたない阻害剤として、6 個の阻害剤を見出した。興味深いことにそのうち 2 個は MEK の阻害剤であり(図 1) 別の 2 個は MAPK とは異なるキナーゼ A の阻害剤 A であった。その他はそれぞれ異なるキナーゼの阻害剤で有り、合計 4 種類のターゲットタンパク質を見出した。

図1 MEK阻害剤はPHGPx欠損による細胞死を抑制できる



### (3) ターゲットキナーゼタンパク質のノック ダウンおよび、再導入実験による新規細胞 死への関与の検討

4 つのキナーゼのノックダウン細胞をレトロウイルス感染系を用いて作成したところ、MEK およびキナーゼ A のノックダウン細胞では、タモキシフェン誘導型 PHGPx 欠損細胞死を強く抑制できることが明らかとなった。また、ノックダウン細胞に shRNA 耐性の cDNA (MEK およびキナーゼ A) を戻すと致死が回復した。このことから MEK およびキナーゼ A は新規細胞死の実行経路として機能していることが明らかとなった。キナーゼ活性をつぶした cDNA を再導入しても細胞死は抑制できなかったことから、PHGPx 欠損による新規細胞死は MEK およびキナーゼ A の活性が必要

であることが明らかとなった。実際、MEK の下流で働くと考えられる ERK のノックダウンでも細胞死は抑制された。一方、他の MAPK 経路でありアポトーシスの際に関与する p38 および JNK の阻害剤は全く抑制効果は示さなかった。

残りの 2 つのキナーゼのノックダウン細胞では弱い細胞死の抑制効果は観察されたが、その抑制効果は阻害剤に比べてかなり弱かったことから、阻害剤のターゲット分子が他にも存在する可能性が考えられた。

次に MEK の活性化が PHGPx 欠損細胞死において観察されるのかについて、リン酸化 ERK およびリン酸化 MEK の抗体を用いて検討したところ、致死の後期において活性化が検出された。このリン酸化の亢進はビタミン E の添加により抑制されたことから、脂質酸化の下流で活性化されていることも明らかとなった。またこれらの阻害剤は心臓特異的 PHGPx 欠損マウスのビタミン E 低下による個体レベルの突然死に対しても抑制効果がみられた。すなわち、このことは In vivo においても、この新規細胞死経路が寄与していることが考えられた。

### (4) レンチウイルス感染系を用いた shRNA ライブラリーのスクリーニング

プール型のレンチウイルスマウス shRNA ライブラリー (SBI 社製) を用いて、タモキシフェン添加 9 6 時間後でも生存している shRNA 配列の同定を、Genechip 解析によって行った。この shRNA 配列は Genechip の結合配列を利用して作られており、マイクロアレイ解析から、PHGPx を欠損しても生き残った細胞のゲノムに取りこまれた shRNA を含む RNA からプローブを作ることにより、導入 shRNA 配列の同定と shRNA の濃縮が観察されると考えられた。実際、2 回の実験から共通して配列がみられ、未刺激時よりも濃縮された shRNA 配列の候補遺伝子を約 150 遺伝子見出した。この 150 遺伝子配列について、マウスレトロウイルス感染系に置き換えて、一つ一つの遺伝子をノックダウンすることにより、細胞死が抑制されるのかについて検討したところ、強く細胞死を抑制できたキナーゼ A のノックダウンによる細胞死抑制効果よりも強く細胞死を抑制できる shRNA 配列を 17 遺伝子同定することに成功した。これらの遺伝子は、いずれもこれまでに、アポトーシス、ネクローシス、オートファジー性細胞死、ネクロトーシスに関与することが知られている遺伝子を含んでいなかった。

以上の結果からも PHGPx 欠損による脂質酸化依存的な細胞死は、これまで報告のある既知の細胞死とは異なることが予想された。これらのノックダウン細胞では、脂質酸化を抑えていそうな細胞や ERK の活性化を抑えているものなども見出しており、実際に新規の細胞死経路に関与する分子であることが予想された。今後は、それぞれの遺伝子がどのよ

うに脂質酸化依存的な細胞死の実行に關与しているのかについて明らかにする必要がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

今井浩孝、リン脂質酸化シグナルが關与する新規細胞死経路-GPx4 とビタミン E により制御される新規細胞死フェロトーシスー、医学のあゆみ 生命を支える脂質 最新の研究と臨床、査読有、248 巻、13 号、2014、1075-1083

Hiroataka Imai、Abnormal metabolism of oxidized phospholipids as cause of male infertility and retina degradation and screening of potential therapeutic drug、Proceedings of Annual meeting of the Korean Society of applied pharmacology , 査読有、2012、44-47

今井浩孝、松岡正城、中西広樹、田口良、石田規子、七里元督、吉田康一、二木鋭雄、清水孝彦、新井洋由、中川靖一、ビタミン E は肝臓特異的 PHGPx 欠損マウスの出生直後死をレスキューする、ビタミン E 研究の進歩、査読有、15 巻、2012、68-72

今井浩孝、リン脂質ヒドロペルオキシドグルタチオンペルオキシダーゼ(PHGPx) と男性不妊、HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY、査読有、Vol 19、2012、59-70  
Ueta T., Inoue T., Furukawa T., Tamaki Y., Nakagawa Y., Imai H., Yanagi Y.、Glutathione peroxidase 4 is required for maturation of photoreceptor cells、J.Biol. Chem.、査読有、287 巻、2012、7675-7682

今井浩孝、生体膜脂質酸化ホメオスタシスの破綻による新規細胞死と疾患、オレオサイエンス、査読有、Vol 11、2011、431-439

〔学会発表〕(計 18 件)

2013 年度は全発表、2012 年度および 2011 年度は招待講演のみを記載

今井浩孝、酸化リポドミクスを利用した新たな酸化脂質、細胞応答機構の解析と食品、毒性学への応用、日本薬学会 134 年会、平成 26 年 3 月 30 日、熊本

吉田梨沙、澤崎花奈、松川ふみ、松岡正城、今井浩孝、PHGPx 欠損による脂質酸化依存的な新規細胞死経路の解析、日本薬学会 134 年会、平成 26 年 3 月 28 日、熊本

Hiroataka Imai、Novel lipid peroxidation dependent cell death by deficiency of PHGPx、17th Biennial Meeting of Society for free Radical Research International (SFRR2014)、平成 26 年 3 月 26 日、京都  
Hiroataka Imai、Novel lipid peroxidation dependent cell death by deficiency of selenoprotein GPx4、10<sup>th</sup> International Society for Trace Element Research in Human (ISTERH 2013)、平成 25 年 11 月 19 日、東京

今井浩孝、Mechanism of lipid peroxidation dependent novel cell death and related disease、第 86 回日本生化学会、平成 25 年 9 月 13 日、横浜

澤崎花奈、松岡正城、山本伊純、船津真悠子、松川ふみ、新井洋由、今井浩孝、第 66 回日本酸化ストレス学会学術集会、平成 25 年 6 月 13 日、松島

今井浩孝、生命維持に必須な生体膜脂質の酸化ホメオスタシスの破綻による疾患、第 55 回日本脂質生化学会、平成 25 年 6 月 6 日、松島

今井浩孝、化学物質感受性に影響を与える細胞膜脂質酸化ホメオスタシスの変化—化学物質の脂質酸化を介した新しい細胞死経路による毒性評価系—、日本薬学会 133 年会、平成 25 年 3 月 29 日、横浜

Hiroataka Imai、Physiological and pathological role of three types of phospholipid hydroperoxide glutathione

peroxidase (PHGPx) in mice、International Free Radical Winter School in Muikamachi 2013、平成 25 年 3 月 12 日、六日町

今井浩孝、生体膜リン脂質酸化ホメオスタシスの破綻による新規細胞死を介した疾患、第 11 回ホスファチジルセリン研究会、平成 24 年 11 月 16 日、東京

Hiroataka Imai、Phenotype analysis of spermatocyte and photoreceptor specific Glutathione Peroxidase 4 (GPx4) knockout mice、The Second Korea-China Joint Seminar on Selenium in Nutrition, Biochemistry and Cancer、平成 24 年 11 月 1 日、Seoul Korea

Hiroataka Imai、abnormal metabolism of oxidized phospholipids as cause of male infertility and retina degradation and screening of potential therapeutic drug、Advanced Concepts in Drug Development Strategy for Human Disease Control、平成 24 年 10 月 5 日、Kangwon, Korea

Hiroataka Imai、Lipidomics analysis of lipid hydroperoxide dependent non-apoptotic cell death in MEF cells、New Frontiers of Metabolism Research in Biomedical Sciences、平成 24 年 9 月 28 日、東京

今井浩孝、PHGPx 欠損マウスを用いたビタミン E の生理機能の解析、第 15 回 Vitamin E Update Forum、平成 24 年 8 月 26 日、東京

今井浩孝、セレン蛋白質 GPx4 の個体レベルでの生理機能と疾患、第 23 回 日本微量元素学会学術集会、平成 24 年 7 月 6 日、東京

今井浩孝、生命維持に必須な PHGPx とビタミン E による生体膜酸化ホメオスタシスの制御、第 334 回脂溶性ビタミン総合研究委員会、平成 24 年 3 月 16 日、東京

今井浩孝、心機能における PHGPx 及び

ビタミン E の役割の解析、第 14 回 Vitamin E Update Forum、平成 23 年 8 月 30 日、東京

今井浩孝、生体膜脂質酸化ホメオスタシス破綻による疾患・細胞応答機構、第 3 回コレステロールダイナミクス研究会、平成 23 年 5 月 14 日、東京

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

今井 浩孝 (IMAI, Hiroataka)  
北里大学薬学部・衛生化学・教授  
研究者番号：50255361