

群馬大学生体調節研究所内分泌・代謝学共同研究拠点共同研究報告書

平成30年4月18日

群馬大学生体調節研究所長 殿

所属機関名 群馬大学大学院保健学研究科
職 名 教授
研究代表者 奥石一郎

下記のとおり平成29年度の共同研究成果を報告します。

記

(課題番号:16034)

1. 共同研究課題名	フェロトーシス誘導細胞内脂質ラジカル反応の解析		
2. 共同研究目的	近年、酸化ストレス疾患における新たな細胞死の概念としてフェロトーシスがクローズアップされている。本研究では、フェロトーシスの鍵となる分子種の発現に係わる遺伝子を改変した細胞を用い、フェロトーシス誘導・進展・細胞死とラジカル反応との関連を明らかにする。		
3. 共同研究期間	平成29年4月1日 ~ 平成30年3月31日		
4. 共同研究組織			
氏 名	所属部局等	職名等	役割分担
(研究代表者) 奥石一郎	保健学研究科	教授	研究の総括
(分担研究者) 時田佳治 瀧川雄太	保健学研究科 保健学研究科	助教 博士1年生	培養細胞を用いたラジカル解析 培養細胞を用いたラジカル解析
5. 群馬大学生体調節研究所 の共同研究担当教員	分野名	内分泌制御分野	氏 名
			鳥居征司

※ 次の6, 7, 8の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6, 7, 8の項目全体では1頁に収めて下さい。

6. 共同研究計画

本研究では、フェロトーシス誘導細胞において以下の研究を実施する。

- ①細胞質におけるリポキシゲナーゼによるフリーラジカル産生機構の解明
- ②オルガネラ膜リン脂質を構成する不飽和脂肪酸の化学的ラジカル連鎖反応の解明
- ③脂質過酸化蓄積による細胞障害機構の解明

申請者はすでに、スピンプローブ剤であるニトロキシルラジカルが、フェロトーシスによる細胞死を抑制することを明らかにした。その機序として、TEMPO 系ニトロキシルラジカルおよび PROXYL 系ニトロキシルラジカルがそれぞれ、細胞内レドックスポテンシャルや脂質ラジカル産生に影響を及ぼすことが推察される。そこで PROXYL 系ニトロキシルラジカルと炭素中心ラジカルとのラジカル-ラジカル反応により生成する付加体を、HPLC および LC-MS/MS により解析することで、多価不飽和脂肪酸由来炭素中心ラジカルの同定を行う。また、多価不飽和脂肪酸の酸化を触媒する各種リポキシゲナーゼの発現や局在、活性変動を解析し、フェロトーシスにおける役割を明らかにする。

7. 共同研究の成果

細胞内で産生されるラジカル種を解析する手法としてスピンプローブ法とスピントラップ法がある。スピントラップ法としては、脂質ラジカルを標的としたスピントラップ剤が確立されているが、欠点として、トラップ効率の低さが挙げられ、そのため、細胞に対して高濃度のスピントラップ剤を付加しなくてはならない。一方、スピンプローブ法は安定ラジカルを用いたラジカル種の解析法であり、ラジカル-ラジカル付加反応は活性化エネルギーの無い反応であり、反応効率が高い。フェロトーシスを誘導した細胞に対してスピンプローブ法ならびにスピントラップ法を応用するにあたり、フェロトーシス誘導細胞において産生される脂質ラジカルとスピントラップ剤ならびにスピンプローブ剤が反応することでフェロトーシスによる細胞死が抑制されるか否について検討を行ったところ、細胞膜透過性の六員環状ニトロキシルラジカル(TEMPO 系)および五員環状ニトロキシルラジカル(PROXYL 系)がフェロトーシスを抑制した。レドックスポテンシャル感受性蛍光プローブおよび脂質ラジカル感受性蛍光プローブを用いた画像解析を行って、活性酸素種産生および脂質ラジカル産生への影響を解析したところ、TEMPO 系ニトロキシルラジカルは細胞内レドックスを酸化側にシフトさせ、PROXYL 系ニトロキシルラジカルは脂質ラジカルの産生を抑制することが明らかとなった。

リポキシゲナーゼが生成するリン脂質ヒドロペルオキシドが脂質ラジカルに変換され、化学的なラジカル連鎖反応につながる可能性が考えられる。特異的阻害剤および siRNA を用いた解析によって、15-LOX がフェロトーシスによる細胞死に関与することが判明した。特異的な活性化化合物を用いて細胞内の 15-LOX 活性を増加させると、それだけで細胞死に至ることはないが、フェロトーシス感受性を有意に高めることが分かった。これらの結果は、リポキシゲナーゼが生成する膜中の多価不飽和脂肪酸の酸化が脂質ラジカル産生能を高め、フェロトーシスによる細胞死に影響を及ぼしていることを示している。

8. 共同研究成果の学会発表・研究論文発表状況

(本研究所の担当教員の氏名の記載のある論文、又はこの共同研究に基づくとの記載のある論文等を記載して下さい。なお、論文の場合は、別刷りを1部提出してください。)

①本研究所の担当教員の氏名の記載のある論文

1. Shintoku R, Takigawa Y, Yamada K, Kubota C, Yoshimoto Y, Takeuchi T, Koshiishi I, Torii S.
Lipoxygenase-mediated generation of lipid peroxides enhances ferroptosis induced by erastin and RSL3.
Cancer Science 108, 2187-2194, 2017

②この共同研究に基づくとの記載のある論文

同上