

研究課題別評価書

1. 研究課題名

脂質ヒドロペルオキシドによる細胞機能制御と疾患との関連の解析

2. 氏名

今井 浩孝

3. 研究のねらい

生体膜を構成するリン脂質は、主に2位の位置に多価不飽和脂肪酸を有しているため、紫外線や炎症性細胞などの活性酸素などにより、リン脂質の酸化を引き起こし、1次生成物としてリン脂質ヒドロペルオキシドが生じ、更にアルデヒドやカルボン含有酸化リン脂質に代謝され、細胞膜の崩壊などを伴う細胞死を引き起こすと考えられている。一方、生体内にはリン脂質を特異的に直接酸化し、リン脂質ヒドロペルオキシドを生成する酵素 15-リポキシゲナーゼが存在するが、その生理的意義はよくわかっていない。我々はこれまでに、リン脂質ヒドロペルオキシドを直接還元できる細胞内の主要な酵素、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)の機能の解析をととして、細胞内のオルガネラ局所で生じる脂質ヒドロペルオキシドの生理的な役割について、エイコサノイド産生制御機能、カルジオリピンヒドロペルオキシドを介したアポトーシス制御などをPHGPx高発現株を用いて明らかにしてきた。PHGPxは一つの遺伝子から、ミトコンドリア、核小体、細胞質や核などオルガネラに局在する3つのタイプが存在する。我々はPHGPxの全欠損マウスは発生初期過程の 7.5 日から 8.5 日の間で致死となることを報告したが、なぜPHGPxが欠損すると発生初期過程で致死となるのかは明らかではなかった。

本研究では、なぜ PHGPx が欠損すると発生初期過程で致死となるのか、またどのオルガネラで生成するどのような酸化脂質の生成がこの発生過程の細胞死に重要であるのか。またこの細胞死は発生過程に特異的なことであるのかをオルガネラ選択的PHGPx欠損マウスや細胞を用いて酸化脂質メタボローム解析を行い明らかにすることを目的とした。さらに、各臓器でのPHGPxを欠損させ、酸化脂質の代謝経路を破綻させたとき、脂質ヒドロペルオキシドが起因となってどのような疾病が引き起こされるのかについて解析することを目的とした。これらの解析から新たな脂質ヒドロペルオキシドの機能としての新規細胞死制御機構や病態発生のメカニズムを明らかにすることを目指した。

4. 研究成果

1)発生過程における3つのタイプのPHGPxの機能解析

PHGPxは一つの遺伝子から、ミトコンドリア、核小体、細胞質や核などオルガネラに局在する3つのタイプが存在する(図1)。

PHGPxの全欠損マウスは発生初期過程の 7.5 日から 8.5 日の間で致死となる。なぜ PHGPx が欠損すると発生初期過程で致死となるのか、どのタイプのPHGPxが発生過程で重要なのかについて明らかにするために、まず 3.5日受精卵の初代培養系を構築し検討した。Wildの 3.5日受精卵は、培養 2 日目にハッチングが起こり、4 日目以降 ES 細胞の元になる Inner Cell Mass (ICM)を形成するが、3.5 日 KO 受精卵はハッチング後、4 日目以降

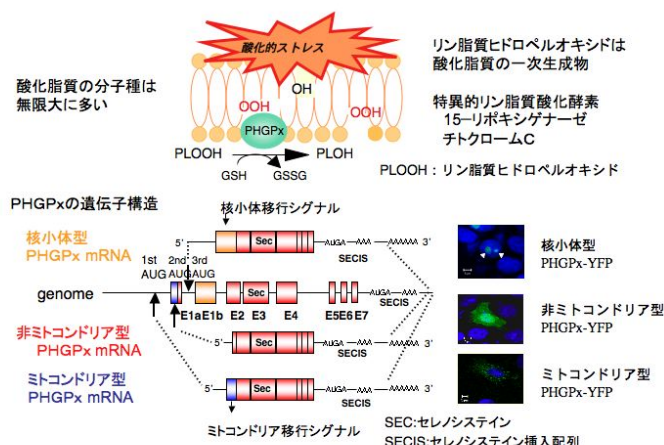


図1 リン脂質ヒドロペルオキシドグルタチオンペルオキシダーゼの (PHGPx)の構造と機能

ICM 形成ができず致死となった(図2)。この致死がどのタイプの PHGPx が重要であるのかをレトロウイルス感染系にて、ミトコンドリア型、非ミトコンドリア型、核小体型のそれぞれの cDNA を導入したところ、非ミトコンドリア型のみで ICM 形成不全をレスキューできた。一方、非ミトコンドリア型 PHGPx の活性中心のセレノシステインをセリンに変換したものではレスキューできなかった。興味深いことに、低分子化合物の抗酸化剤を培地中に添加したところ、脂質の過酸化を抑制できる、ビタミンE、ビタミンEの誘導体のトロロックス、PHGPx 活性をもつエブセレンにより ICM 形成不全がレスキューできた。しかし、スーパーオキシドを消去できる MnTBAP や過酸化水素生成をおさえるN-アセチルシステインやグルタチオンでは ICM 形成不全を抑制することができなかった。これらの結果から、ICM 形成の際にはなんらかの脂質過酸化反応が常に起こっており、正常な ICM 形成には PHGPx によるこの脂質酸化物の生成を抑制することが必須であることが明らかとなった(図2)。

次に個体レベルでどのタイプの PHGPx が発生過程に必須であるのかを明らかにするために、トランスジェニックレスキュー法を用いて、胚致死のレスキュー実験を試みた。3つのタイプの PHGPx は 1a エクソン中の2つの開始コドン、1b エクソン中にひとつの開始コドンをもつ(図1)。それぞれの開始コドン ATG を TTG に変異させた、トランスジェニックゲノム遺伝子(Tg 遺伝子)を導入したトランスジェニックマウスを作成し、PHGPx ヘテロマウスと交配し、更に内在性の PHGPx ゲノムが KO になると胚致死になるところを、導入した Tg 遺伝子によりレスキューできるのかについて検討した。loxP 配列ではさまれた3つとも正常な PHGPx を発現できる正常 PHGPx ゲノム Tg 遺伝子(図4A)、ミトコンドリア型単独変異 Tg 遺伝子、核小体型単独変異 Tg および、ミトコンドリア型、核小体型ダブル変異(非ミトコンドリア型のみ発現)Tg 遺伝子ではレスキューできたが、非ミトコンドリア型単独変異 Tg 遺伝子及び全タイプの変異 Tg 遺伝子ではレスキューできなかった。またミトコンドリア型、核小体型ダブル変異(非ミトコンドリア型のみ発現)マウスは正常に生育した。以上の結果から、胚発生過程及び、受精卵の ICM 形成には非ミトコンドリア型のみが必須であることが明らかとなった。

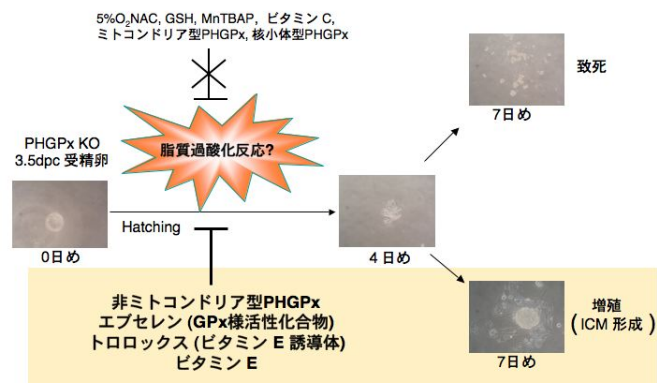


図2 3. 5日 PHGPxKO 受精卵の ICM 形成不全とその抑制効果

2)PHGPx欠損によるMEF細胞の新規細胞死の解析

3.5 日のPHGPx欠損受精卵の致死が胚発生特有な現象であるのか、一般の細胞でも見られるのかを明らかにするために、loxP配列ではさまれた正常なマウスPHGPxゲノムTg遺伝子によりレスキューされたfloxマウス(図4A)胎児より、不活化したMEF細胞を樹立し、更にタモキシフェン誘導型CreERT²遺伝子を導入したCRE ERT²細胞を樹立した。本細胞はタモキシフェンを培地中に添加すると、Creタンパク質が核内に移行し、導入したPHGPxゲノムTg遺伝子を破壊することにより、PHGPx欠損細胞となる。本細胞にタモキシフェン添加を行うと24時間でPHGPxタンパク質がほぼ消失し、更にG1-S期で細胞周期が停止し、48時間後から72時間の間で致死となることが明らかとなった(図3)。このPHGPx欠損による細胞死も脂質酸化を抑制するビタミンEやビタミンEの誘導体トロロックスやプロブコールで致死が抑制されたが、MnTBAP、EUK-8、N-アセチルシステインでは抑制できなかった。また各オルガネラ局在型のPHGPx cDNAを導入したところ、ミトコンドリア型、核小体型ではレスキュー効果は弱く、核内局在型PHGPxでは抑制できず、核外放出型PHGPxで効率よくレスキューできることが示され、本細胞死の脂質過酸化は、ミトコンドリアや核内の脂質の酸化が起因となるのではなく、細胞質側の脂質過酸化が起因となっていると考えられた。

そこで本細胞死のメカニズムを詳細に検討した結果、アポトーシスの阻害剤や、抗アポトーシスタンパク質 Bcl-xL の高発現によっても致死が抑制できないこと、カスパーゼの活性化、チトクロームCの放出も見られないこと Apoptosis inducing factor (AIF)のノックダウンによってもレスキューできないことから、典型的なアポトーシスとは異なることが明らかになった。また、ネクローシスの指標である HMGB1 の核からの放出、細胞膜の膨潤、崩壊も見られず、ネクローシスでもないことが明らかとなった、また第3の細胞死経路としてオートファジー性細胞死が報告されているが、本細胞死過程においてはオートファジーの指標である LC3 の脂質付加体が誘導され、オートファジーの誘導がおきていた。しかし、オートファジー関連タンパク質の ATG5 のノックダウン細胞でも致死の抑制効果が見られないことから、オートファジー性細胞死とも異なる全く新しい細胞死が誘導されていることが明らかとなった。

そこで本細胞死におけるリン脂質の変化についてメタボローム解析を行った。タモキシフェン添加後の経時的なホスファチジルコリン(PC)の酸化分子種の変動を LC-ESI-MS/MS を用いて検出したところ、タモキシフェン添加24時間後に PCOOH(PC ヒドロペルオキシド)の分子種の上昇が最大となり、36、48時間で減少した。PHGPxが欠損しているにも関わらず、36時間以降 PCOH(PC ヒドロキシ体)の生成が上昇した。PCOOH の代謝産物である PC アルデヒド、PC カルボン酸の量的変動はわずかであった。また PCOOH の24時間での増加は、ビタミンE誘導体であるトロロックスの添加により完全に抑制された。トロロックスの添加時期の違いによる致死のレスキュー効果を検討したところ、24時間以降にトロロックスを添加するとレスキュー効率が著しく減少したことから、この24時間までに生成する微量の PCOOH がこの新規細胞死の誘導を起こしていると考えられた。15-リポキシゲナーゼは PCOOH の産生をする、しかし、樹立した細胞では、15-リポキシゲナーゼの発現は見られなかった。また様々な既知の活性酸素産生酵素の阻害剤においても致死は抑制できなかったこと、さらには、2%酸素状態でも致死が誘導されることから、未同定の新規膜酸化システムの存在が示唆された。以上の結果から、PHGPx は細胞増殖必須因子であり、PHGPx やビタミンEはこの未同定の新規膜酸化システムによる膜リン脂質酸化を抑制あるいは還元することにより、細胞膜状態のホメオスタシスを維持することにより、細胞増殖を正常に維持していること、このホメオスタシスの破綻により新規の細胞死が誘導されることが明らかとなった(図3)。

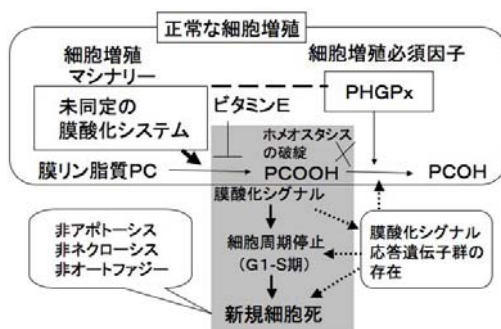


図3 新たな膜酸化シグナル経路と細胞増殖制御機構

3) 組織特異的PHGPx欠損マウスのフェノタイプの解析

A) 精巣特異的 PHGPx 欠損マウスのフェノタイプの解析

我々はこれまでに男性不妊症患者のうち重度乏精子症の約3割の患者において、精子中の PHGPx が著しく低下した症例を見出している。PHGPx の精巣、精子での欠損が本当に不妊症を引き起こすのかについて、精母細胞特異的 Cre 発現マウス (pgk2-Cre) とトランスジェニックレスキュー法にて作成したコントロール flox マウスと交配して作成した(図4A, B)。精巣特異的 PHGPx 欠損マウスはオス、メスとも正常に生育したが、雄において精巣中の精母細胞の約80%が細胞死を引き起こし脱落し、著しい精子数の減少を引き起こした。また生成された精子はミトコンドリア膜電位が消失し、精子の尻尾が折れ曲がるフェノタイプを示し、卵子との受精能を消失し、雄が不妊となることが明らかとなった(図4B)。本マウスはヒトの不妊症と同様のフェノタイプを示した。またオルガネラ選択的 PHGPx 欠損マウスの解析から、ミトコンドリア単独欠損マウスや、核小体型、ミトコンドリア型ダブル欠損マウスでは、精子数の減少は観察されなかったが、精子の形態異常及びミトコンドリア膜電位の低下が観察され、精子の異常のフェノタイプはミトコンドリア型 PHGPx の欠損によるものであることが明らかとなった。

B) 心筋特異的 PHGPx 欠損マウスのフェノタイプの解析

土壌中のセレン欠乏地域に住むヒトでは心筋症を引き起こすことが知られている。PHGPx の心筋での機能を明らかにする目的で心筋特異的 Cre 発現マウス (MCK-Cre) とコントロール flox マウスと交配して心筋特異的 PHGPx 欠損マウスの作成を試みたが、発生過程の 17.5 日から 18.5 日の間で致死となることが明らかになった。このマウスでは心臓は正常に形成されていたが、17.5 日に心筋が TUNEL 陽性となり致死となることが明らかとなった (図 4C)。

PHGPx は心筋における機能、生存に重要な役割をしていることが明らかとなった。

C) 肝臓特異的 PHGPx 欠損マウスのフェノタイプの解析

PHGPx の肝臓における機能を明らかにする目的で肝臓特異的 Cre 発現マウス (Alb-Cre) とコントロール flox マウスと交配して、肝臓特異的 PHGPx 欠損マウスの作成を行った。肝臓特異的 PHGPx 欠損マウスは出生直後に速やかに死亡することが明らかとなった。肝臓の形態、機能について観察したところ、17.5 日以降、肝臓の萎縮及び TUNEL 陽性細胞が出現し、肝細胞の脱落が観察された。18.5 日では PCOOH の蓄積及び血液中の GOT の著しい上昇が見られ、肝障害により致死となることが示された (図 4D)。

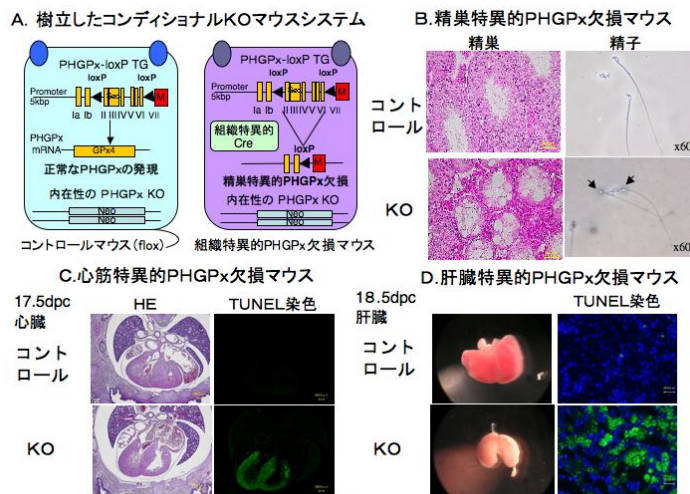


図4 組織特異的PHGPx欠損マウスのフェノタイプのまとめ

5. 自己評価

本研究では、3つのタイプのPHGPxのうち細胞質に存在するタイプが、受精卵、MEF細胞、肝細胞、心筋細胞、精母細胞において、正常な増殖に必須なタンパク質であり、正常な個体発生、器官形成にも重要な役割を担っていることを明らかにした。MEF細胞におけるPHGPx欠損による細胞死の解析から、細胞増殖の際には常に未同定の膜酸化システムにより、微量のリン脂質ヒドロペルオキシド(PCOOH)が産生されており、ビタミンEはその産生自身を抑制することにより、またPHGPxはその還元により膜の酸化状態のホメオスタシスを維持することにより、正常な細胞増殖を維持していることを見いだした。この生体膜の酸化状態のバランスの破綻は、これを感知するシステムにより非アポトーシス、非ネクローシスの新規な細胞死を引き起こすことが明らかとなった。本さきがけ研究では、当初目的とした、3つのタイプのオルガネラ選択的PHGPx欠損マウス、精巣、肝臓、心筋特異的PHGPx欠損マウスの作成に成功し、特に精巣特異的PHGPx欠損マウスは、男性不妊症の原因であること、心筋特異的PHGPx欠損マウスは脂質過酸化が起因となる心不全モデルマウスであることを明らかにできた。酸化脂質メタボローム解析からは、新規細胞死のマーカーとなりうる候補分子種の同定まで行うことができ、当初の目的はほぼ達成できたという点では評価できると考えている。これらの研究の論文発表はもとより、今後、本研究で得られた成果をさらに大きく飛躍させることで、本研究成果の評価をさらに高めたいと考えている。

6. 研究総括の見解

酸化脂質の還元酵素PHGPxの欠損細胞や欠損マウスを用い、本酵素が正常な増殖や個体発生、器官形成に必須であること、PHGPx欠損による細胞死が非アポトーシス、非ネクローシスの新規な細胞死であることなど、研究は計画通り順調に進捗した。研究が多岐に亘っているため、今後は、新規細胞死メカニズムやさらに詳細なメタボローム解析など、焦点を絞った解析が望まれる。優れた研究成果が数多く得られており、早く論文発表へと完成させて欲しい。

7. 主な論文等

A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの

①論文

1. Hattori, H. Imai, H. Kirai, N., Furuhashi, K., Sato, O., Konishi, K., Nakagawa, Y. Identification of a responsible promoter region and a key transcription factor, CCAAT/enhancer-binding protein epsilon, for up-regulation of PHGPx in HL60 cells stimulated with TNF- α . **Biochem.J.** 408, 277-286 (2007)
2. Imai, H., Hakkaku, N., Iwamoto, R., Suzuki, J., Suzuki, T., Tajima, Y., Konishi, K., Minami, S., Ichinose, S., Ishizaka, K., Shioda, S., Arata, S., Nishimura, M., Naito, S., Nakagawa, Y. Depletion of selenoprotein GPx4 in spermatocytes causes male infertility in mice. **J. Biol. Chem.** 284, 32522-32532 (2009)
3. Imai, H. New strategy of functional analysis of PHGPx knockout mice model using transgenic rescue method and Cre-loxP system. **J. Clin. Biochem. Nutri.** 46, 1-13 (2010)

②特許

研究期間累積件数: 0 件

③受賞

1. 日本酸化ストレス学会学術賞 (2008 年 6 月 19 日)

④著書

1. 今井浩孝、中川靖一 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の生体内機能 ー新たな細胞機能制御因子としての脂質ヒドロペルオキシド 細胞工学 26, 1269-1275 (2007)
2. 今井浩孝、グルタチンペルオキシダーゼ4 (GPx4、PHGPx) による胚発生・精子形成の制御機構、実験医学増刊号 酸化ストレスと病態 1, 細胞分化増殖・シグナル異常と再生医療 27, 112-117 (2009)
3. 今井浩孝、セレン酵素PHGPx欠損と男性不妊症との関連 総説 Biomed. Res. Trace Elements 20, 3, 232-239 (2009)

⑤招待講演

1. Hirotsugu Imai, Depletion of GPx4 in testis and sperm caused male infertility in mice and human. BOSH 2008 “ Biomarkers of oxidative Stress in Health and Diseases”, Osaka, Japan, January 2008
2. Hirotsugu Imai, Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is essential for spermatogenesis and development of functional spermatozoa, Lipid Peroxidation 2008 Session 6 Antioxidant enzymes, Karuizawa, Japan, October 2008
3. Hirotsugu Imai, The physiological role of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase during embryogenesis and spermatogenesis, The 4th International Conference of Phospholipase A2 and Lipid Mediators, Tokyo, Japan, May 2009
4. 今井浩孝 3つのタイプの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) の個体レベルでの機能解析 (日本酸化ストレス学会学術賞講演) 第62回日本酸化ストレス学会 (福岡) 2009, 6, 11
5. Hirotsugu Imai, Phenotype analysis of tissue specific phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase knockout mice, The 1st International Conference of Lipid Hydroperoxide Biology and Medicine, Sendai, Japan, November 2009

⑥シンポジウム

1. 今井浩孝、抗酸化酵素PHGPxと男性不妊症との関連 第8回日本抗加齢医学総会シンポジウム6 フリーラジカルの医学・生物学 (東京) 2008, 6, 6
2. 今井浩孝、抗酸化酵素PHGPxと男性不妊症との関連 第61回日本酸化ストレス学会シンポジウム5 遺伝子改変マウスが解き明かす抗酸化遺伝子の真の役割 (京都) 2008, 6, 20
3. 今井浩孝、セレン酵素PHGPxと男性不妊症との関連 第19回日本微量元素学会 シ

ンポジウム セレン研究の最前線（東京）2008,7,4

4. 今井浩孝、オルガネラ選択的、臓器特異的PHGPx欠損マウスを用いた個体レベルでの PHGPxの機能解析 第82回日本生化学会 シンポジウム 翻訳されうる21番目のアミノ酸 セレノシステインを含有するタンパク質研究のブレーク・スルー（神戸）2009,10,22
5. 今井浩孝、新規膜酸化ストレス細胞死におけるリポドミクス解析 第4回メタボロームシンポジウム リポドミクス（横浜）2009,11,19

B. 本研究課題に関連した成果で主なもの

①論文

1. Imai, H., Saito, M., Kirai, N., Hasegawa, J., Konishi, K., Hattori, H., Nishimura, M., Naito, S., Nakagawa, Y. Identification of the positive regulatory and distinct core regions of promoters, and transcriptional regulation in three types of mouse phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. **J. Biochem (Tokyo)**, 140, 573–590 (2006)
2. Kadota Y., Suzuki, S., Ideta, S., Fukinbara, Y., Kawakami, T., Imai, H., Nakagawa, Y., Sato, M. Enhanced metallothionein gene expression induced by mitochondrial oxidative stress is reduced in phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase overexpressed cells. **Eur. J Pharmacol.** 626, 166–170 (2010)