

要約

グルタチオンペルオキシダーゼ 4 (GPx4) は、リン脂質ヒドロペルオキシドを還元する抗酸化酵素である。当研究室では GPx4 欠損マウスを作製し、7.5 dpc で細胞死を引き起こし致死となることを明らかにしている。さらに GPx4 欠損による胎生期致死をレスキューするために GPx4-loxP TG を導入し、臓器特異的に Cre を発現させることで任意の臓器において GPx4 を欠損させる系を確立した。そして GPx4 が欠損することで様々な臓器で細胞死が引き起こされることをこれまでに明らかにしている。さらに、GPx4-loxP TG を導入した GPx4 欠損マウスからマウス胎児線維芽細胞 (MEF) を単離し、細胞死を細胞レベルで解析した。その結果、ウイルス感染により Cre を発現させると細胞死が誘導された。このことから GPx4 は細胞の生存に必須であることが明らかになった。

一方で Stockwell らの研究グループは RAS 変異がん細胞特異的に細胞死を誘導する抗がん剤 RAS Selective Lethal (RSL) のスクリーニングを行った。彼らは RSL の一つである erastin は変異 RAS シグナルが活性化した細胞のみで細胞死を誘導すること、erastin による細胞死はビタミン E で抑制されるため脂質酸化依存的な細胞死であることを示した。さらに 2012 年に erastin がシスチントランスポーターを阻害して GPx4 活性を低下させること、2014 年に RSL3 が GPx4 活性を直接阻害することを報告した。GPx4 の活性低下に伴って鉄による

フェントン反応を介した脂質酸化の劇的な増加を引き起こし 24 時間で致死を誘導することを併せて報告し、この鉄依存的脂質酸化依存的細胞死をフェロトーシスと名付け、以降世界中から注目を集めている。フェロトーシスの制御因子が GPx4 であったため、現在まで GPx4 欠損細胞死とフェロトーシスは同一の細胞死と考えられていた。

しかし、我々が Cre を発現させて GPx4 を欠損した時に誘導される細胞死は Cre が発現してから 48 時間かけてゆっくりと致死となること、フェロトーシスは一般に 24 時間で引き起こされる細胞死であることから、本研究ではこの二つの GPx4 の活性低下を介した脂質酸化依存的細胞死が同一のメカニズムで進行する細胞死か明らかにすることを目的に実験を行った。

さらに詳細な細胞死メカニズムを明らかにするために MEF 細胞に *CreERT2* を発現させたタモキシフェン (TAM) 誘導型 GPx4 欠損 MEF 細胞株 (ETK1 細胞) を樹立した。この細胞は TAM を培地に添加すると *CreERT2* タンパク質が核内に移行することで GPx4 が欠損する。TAM を添加してから細胞を観察したところ、72 時間で細胞死が誘導された。Trolox や Ferrostatin-1 (Fer-1) といった抗酸化剤の添加で脂質酸化を抑制すると、細胞死も抑制された。このことから、GPx4 欠損による細胞死は非常にゆっくりと進行する脂質酸化依存的な細胞死であることが明らかになった。そこでこの細胞死の脂質酸化が鉄を介して引き

起こされるか検討した。鉄キレーターDeferoxamin (DFO) を添加するとフェロトーシスの脂質酸化は確かに抑制された。一方で GPx4 欠損による脂質酸化は DFO を添加しても抑制されなかった。このことから GPx4 欠損による細胞死の脂質酸化は鉄を介さない細胞死であることが明らかになり、フェロトーシスと区別してリポキシトーシスと名付けた。

リポキシトーシスの実行因子を明らかにするために既知酵素阻害剤で構成される化合物ライブラリーのスクリーニングを行った。約 300 で構成されるライブラリーのうち、8 化合物がリポキシトーシスを抑制した。そのうち本研究では MEK 阻害剤に着目した。

MEK1/2 阻害剤である MEK inhibitor I と U0126 は濃度依存的にリポキシトーシスと RSL 3 や erastin によるフェロトーシスを抑制した。そこで、MEK1 Knock Down (KD) 細胞を作製し、リポキシトーシスとフェロトーシスに対する細胞死抑制効果を検討した。MEK1 KD によってリポキシトーシスは抑制され、さらにこの MEK1 KD 細胞にヒト MEK1 を再導入することで再び細胞死が誘導された。一方でフェロトーシスは、MEK1 KD 細胞では全く抑制されなかった。このことから、リポキシトーシスにおいては MEK 1 が、フェロトーシスにおいては MEK2 が細胞死誘導に関与していることが示唆された。さらにリポキシトーシスにおいて脂質酸化が 24 時間で亢進した後の 36 時間以降に MEK1 がリン

酸化され、MEK1 がリン酸化する ERK1/2 のうち、ERK2 のみがリン酸化されていた。さらに脂質酸化を抑制する Trolox の添加により MEK1 及び ERK2 のリン酸化が抑制されたことから、リポキシトーシスでは脂質酸化の下流で MEK1/ERK2 経路が活性化されていることが明らかになった。さらに脂質酸化を抑制する Trolox の添加により MEK1 及び ERK2 のリン酸化が抑制されたことからリポキシトーシスでは脂質酸化の下流で MEK1/ERK2 経路が活性化されていることが明らかになった。一方でフェロトーシスにおいては MEK の活性化は脂質酸化の上流で起こっており、この点でも両者は異なっていた。また、ERK の選択的阻害剤を用いて解析したところ、確かにリポキシトーシスにおいて ERK2 のみが細胞死誘導に機能していること、フェロトーシスにおいては ERK の阻害剤で抑制されず MEK の活性化の下流で ERK が関与していないことが明らかになった。

以上の結果から、GPx4 欠損によるリポキシトーシスと GPx4 阻害剤 RSL3 やシスチントランスポーター阻害剤 erastin によるフェロトーシスは異なる細胞死経路によることを明らかにした。