

2024年2月28日

報道機関 各位

国立大学法人東北大学

フェロトーシスを制御する酵素の 汎用性の高い活性評価法を開発

—細胞死を標的とした新規抗がん薬の開発を加速する—

【発表のポイント】

- フェロトーシスと呼ばれる細胞死のメカニズムは、既存の抗がん薬に抵抗性を持つがん細胞を治療するための候補として注目されています。
- このフェロトーシスの制御において重要な酵素である GPX4 の活性を評価するための、汎用性の高い新たな方法を開発しました。
- 汎用性の高い本法は、フェロトーシスを標的とした新規抗がん薬の開発や評価法に応用されることが期待されます。

【概要】

フェロトーシス (ferroptosis) は脂質酸化に依存する細胞死の一種であり、近年、既存の抗がん薬に抵抗性のがん細胞がフェロトーシスに高い感受性を示すことが知られており、フェロトーシスを標的とした新しい抗がん薬の開発が期待されています。

東北大学大学院農学研究科 伊藤隼哉助教、仲川清隆教授、大学院医学系研究科 三島英換非常勤講師らはドイツ・ヘルムホルツセンターミュンヘン 中村俊崇研究員、Marcus Conrad 博士との国際共同研究により、フェロトーシスを制御する重要な酵素であるグルタチオンペルオキシダーゼ 4 (GPX4) の酵素活性を評価するための新たな汎用性の高い方法を開発しました。従来の方法では、本来の GPX4 の酵素活性を正しく評価することが難しかったのですが、今回開発した方法では、細胞から対象の酵素を直接回収する事によって、酵素の活性を正確かつ簡便に評価することが可能となりました。さらに、本法は GPX4 だけでなく、フェロトーシスを制御する他の酵素である FSP1 の活性評価にも応用可能であるため、本法はフェロトーシスを標的とした新規抗がん薬の開発や評価法に広く応用されることが今後期待されます。

本研究成果は学術誌 Cell Reports Methods に 2 月 23 日に掲載されました。

【詳細な説明】

研究の背景

フェロトーシス (ferroptosis)^(注1) は脂質酸化依存性細胞死とも呼ばれる、アポトーシスとは異なる細胞死の一種です。各種の臓器障害やアルツハイマー病などの神経変性疾患の病態や、がんに対する抗がん薬感受性などに関わることが近年注目されています。特に、既存の抗がん薬による治療に抵抗性のがん細胞は、フェロトーシスへの感受性が高くなっていることが知られており、フェロトーシスを有効に誘導する薬剤の開発は、新規の抗がん薬となる可能性が期待されています。

フェロトーシスによる細胞死は、生体内の細胞膜に含まれる脂質が酸化する「脂質酸化」によって引き起こされます。生体内にはこの脂質酸化を抑制する機構が備わっており、特にフェロトーシスを抑制する生体内の抗酸化酵素としてグルタチオンペルオキシダーゼ 4 (GPX4)^(注2) とフェロトーシスサプレッサープロテイン 1(FSP1)^(注3) が知られています。したがって、GPX4 と FSP1 の酵素活性を正しく評価することは、フェロトーシスの制御機構の解明や、またこれらの酵素を標的とした薬剤の開発や評価に必須であり、これまで様々な方法で酵素活性が評価されてきました。

従来の GPX4 の酵素活性評価法としては、①細胞や臓器の破碎液^(注4) を用いた方法、または②遺伝子組換えした大腸菌に産生させた GPX4 酵素を使用した方法、のいずれかが使用されてきました。しかしながら、①は実際の細胞や組織のサンプルを使用できる一方で、細胞内に含まれる他の酵素や成分の影響を多分に受けてしまい、正確な GPX4 の酵素活性の評価は困難でした。②は精製された GPX4 酵素を使用するため特異性の高い活性評価が可能なものの、GPX4 はタンパク質内にセレンという微量金属を含む特殊なタンパク質であることから、大腸菌でセレンを正しく含んだ GPX4 の産生が困難なことに加え、大腸菌が産生した GPX4 は、哺乳類のものとは特性が異なるため、ヒトの生体内に含まれる GPX4 の活性を反映していないという課題がありました。実際に、GPX4 の阻害薬と知られている薬剤が、大腸菌に産生させた GPX4 を用いた評価法では阻害作用が評価できないという問題点も知られています。そのため、GPX4 を標的とした薬剤の開発や評価に、これらの従来の方法は必ずしも適していませんでした。

今回の取り組み

本研究ではこれらの課題を解決するために、東北大学大学院農学研究科 伊藤隼哉助教、仲川清隆教授、医学系研究科 三島英換非常勤講師らはドイツ・ヘルムホルツセンターミュンヘン 中村俊崇研究員、Marcus Conrad 博士との国際共同研究により、哺乳類の細胞からセレンを正しく含んだ GPX4 を直接的に取り出すことで特異性の高い GPX4 の酵素活性の評価法の構築を実現しました。

具体的には、まず哺乳類の培養細胞内に、標識した GPX4 を過剰発現させ、その標識をもとにアフィニティー精製^(注5)することで、セレンを正しく含んだ GPX4 を回収します(図1)。次に、回収した GPX4 と基質となる過酸化脂質を反応させ、酵素反応による過酸化脂質の減少または、酵素反応の結果として消費される補酵素^(注6)の減少を指標にして酵素活性を評価します。本法は、GPX4 阻害薬の効果の評価にも使用できることが確認されました。また、この研究グループのこれまでの成果により、高純度の過酸化脂質を生成する方法が確立されていました。この高純度の過酸化脂質を酵素の基質として使用することで、GPX4 の酵素活性をより正確に評価することが可能となりました。

さらに、本法は、別のフェルトーシス抑制酵素である FSP1 の酵素活性の評価にも応用できることが示されました。さらに、本法を用いることで FSP1 の新規阻害剤である WIN62577 という化合物を本研究から同定しました(図2)。

今後の展開

本法を用いて、フェルトーシスにおける重要な酵素の活性を適切に評価することで、フェルトーシスの制御機構のさらなる解明に貢献できると期待されます。さらに、GPX4 や FSP1 の阻害薬はがん細胞のフェルトーシス細胞死を促進または亢進させる作用により、新規の抗がん薬となる可能性があります。本法は、これらの阻害薬の新規探索や薬効の評価に応用されることが予測されます(図3)。

今回の取り組み

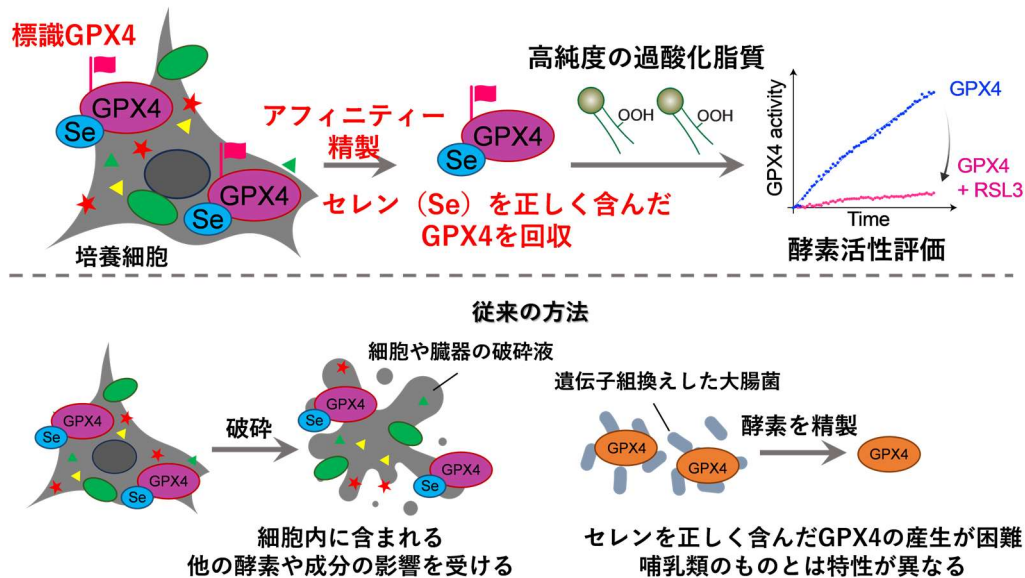


図1. 今回開発した GPX4 の酵素測定法の概要と、従来法との比較。

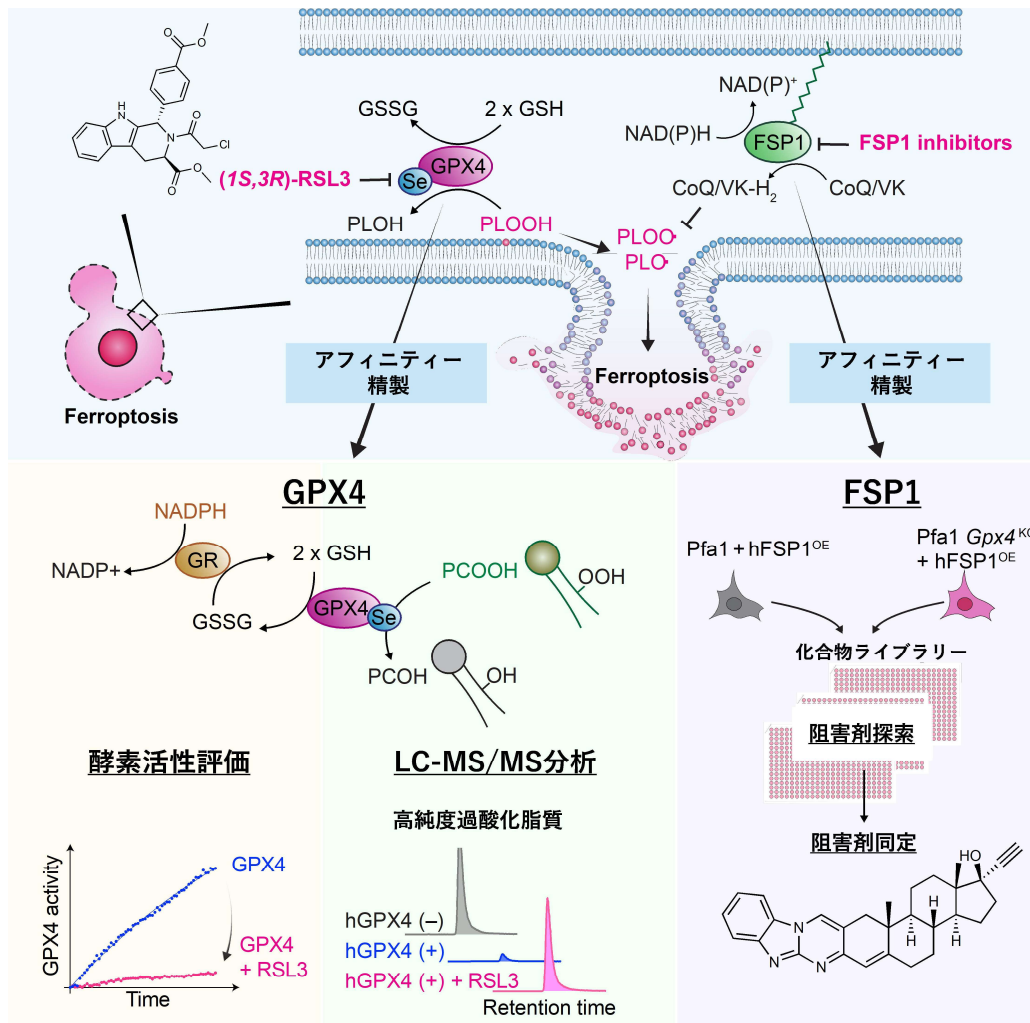


図 2. 本研究の概要

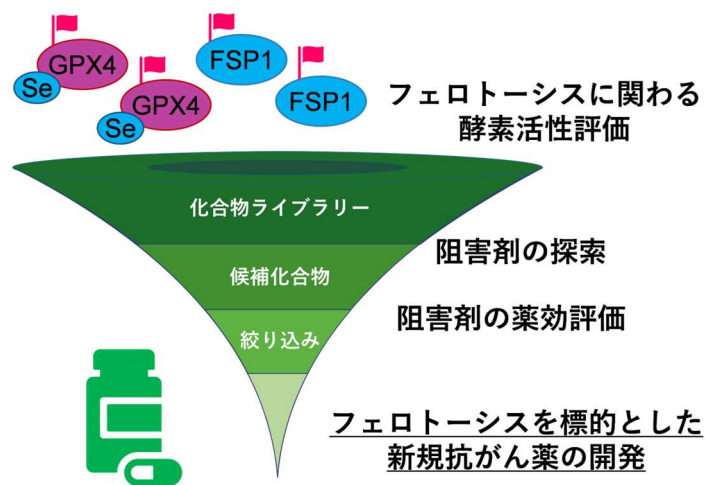


図 3. 本方法の応用と研究展望

【謝辞】

本研究は、科学研究費助成事業（JP18K08198、JP20KK0363、JP22KK0253、JP22H02278）などの支援により行われました。

【用語説明】

- 注1. フェロトーシス(Ferroptosis) : 2012 年に提唱された、アポトーシスとは異なる制御性の細胞死の形の一つ。脂質酸化依存性細胞死とも呼ばれ、細胞膜成分のリン脂質の過酸化によって引き起こされる細胞死。各種の臓器障害や神経変性疾患の病態や、がんに対する抗がん薬感受性などに関わることが近年注目されている。
- 注2. GPX4 : グルタチオンペルオキシダーゼ 4。有害な過酸化脂質を還元して解毒する役割を持つ酵素。
- 注3. FSP1 : フェロトーシスサプレッサープロテイン 1。細胞内でミトコンドリア外のコエンザイム Q10 を還元することで抗酸化作用を発揮する酵素。フェロトーシスを抑える働きがある酵素として本研究の責任著者でもある Conrad 博士らによって 2019 年に報告された。
- 注4. 破碎液 : 組織や細胞のサンプルをすりつぶした液。細胞内に含まれていた様々な酵素やタンパク質や代謝物を含んでいる。
- 注5. アフィニティー精製 : ターゲット分子と結合する分子の反応を利用して、目的のタンパク質を分離・精製する方法。
- 注6. 補酵素 : ある種の酵素の反応に必要な低分子化合物

【論文情報】

Title : A tangible method to assess native ferroptosis suppressor activity
Authors : Toshitaka Nakamura[§], Junya Ito[§], André Santos Dias Mourão, Adam Wahida, Kiyotaka Nakagawa, Eikan Mishima* and Marcus Conrad* ([§]equally contributed, *corresponding author)

タイトル : フェロトーシス抑制因子の活性を評価する具体的方法

著者 : 中村俊崇[§], 伊藤隼哉[§], André Santos Dias Mourão, Adam Wahida, 仲川清隆, 三島英換*, Marcus Conrad* ([§]筆頭著者, *責任著者)

*責任著者 : 東北大学大学院医学系研究科 非常勤講師 三島英換
ヘルムホルツミュンヘン Director Marcus Conrad

掲載誌 : Cell Reports Methods

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.crmeth.2024.100710>

URL : [https://www.cell.com/cell-reports-methods/fulltext/S2667-2375\(24\)00025-0](https://www.cell.com/cell-reports-methods/fulltext/S2667-2375(24)00025-0)

【問い合わせ先】

（研究に関すること）

東北大学大学院農学研究科 食品機能分析学分野

助教 伊藤隼哉（いとう じゅんや）

TEL: 022-757-4419

Email: junya.ito.d3@tohoku.ac.jp

東北大学大学院医学系研究科

腎・膠原病・内分泌内科学分野

非常勤講師 三島英換（みしま えいかん）

Email: eikan@med.tohoku.ac.jp

（報道に関すること）

東北大学農学部 総務係

TEL: 022-757-4003

Email: agr-syom@grp.tohoku.ac.jp