

トランス脂肪酸による細胞死制御機構の分子種間の差異と その病態生理学的意義の解明

医療薬学専攻

山田 侑杜

【研究背景・目的】

トランス脂肪酸 (*trans*-fatty acid: TFA) は、炭素-炭素原子間にトランス型二重結合を有する脂肪酸の総称である。生体内では酵素的に合成されず、主に食品製造過程で副産物として産生される「人工型」(エライジン酸など：加工食品に高含有)、反芻動物の胃の中の微生物や一部植物が産生する「天然型」(ルーメン酸など：乳製品、植物油などに高含有) の 2 種類に分類され、含有食品の摂取を通して体内に蓄積する。過去の疫学調査等から、人工型 TFA が循環器系疾患・神経変性疾患などの危険因子とされてきた一方、天然型 TFA には抗がん作用が存在することが報告されてきたが、どのようにして分子種間で異なる生体作用を発揮しているのか、その詳細な分子機序は未だ不明である。さらに最近、酸化ストレスに起因するラジカル反応(不飽和脂肪酸のシス・トランス異性化反応)により、生体内で非酵素的に少量産生される「内在性」TFA(トランスアラキドン酸など)の存在も明らかになっているが、詳細な生体内での産生条件、機能的役割や病態生理学的意義については全くわかっていない。これらの大きな要因として、TFA に関するこれまでの報告のほとんどは、疫学調査やマウス個体レベルのものであり、分子・細胞レベルでの解析例が乏しいという背景がある。そこで本研究では、これまで当研究室で確立した TFA に関する独自の解析技術や研究基盤を基に、多様な TFA の分子種間で異なる細胞死への影響とその分子機構の解明を目的とした。

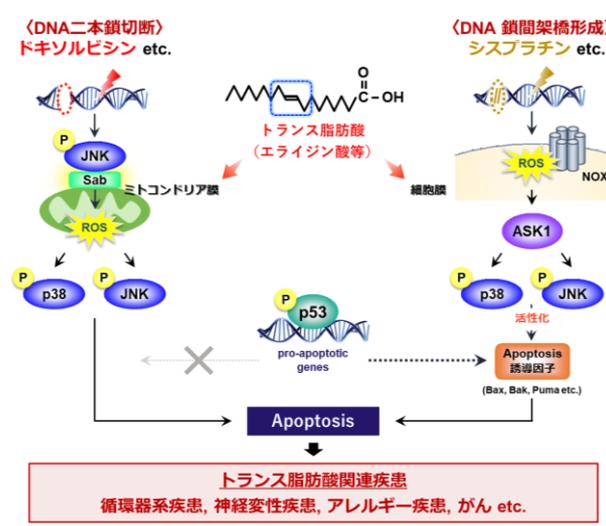
【結果・考察】

第 1 章：DNA 損傷様式によって異なる人工型 TFA の細胞死シグナル促進機構

DNA 損傷は、紫外線や抗がん剤等の化学物質、活性酸素 (ROS) など、細胞内外の様々なストレスによって引き起こされ、その蓄積は細胞の機能異常やがん化を引き起こす。したがって細胞には、DNA 損傷の様式や程度などの違いに応じた多様な感知・応答システムが備わっており、それらが適切に誘導されることで生体の恒常性が維持されているが、この制御機構の破綻による細胞老化や細胞死の異常亢進が起こると、炎症や臓器障害を惹起し、様々な病態の発症に寄与する。これまでに当研究室では、人工型 TFA のエライジン酸が、DNA 二本鎖切断誘導剤ドキシソルビシン処置時に、DNA 損傷応答の代表的な制御因子である転写因子 p53 非依存的に、ミトコンドリアにおける ROS の産生促進によるストレス応答性 MAP キナーゼ p38/JNK の活性化増強を引き起こすことで、細胞死を促進することを明らかにしている (*Sci. Rep.* 2020)。一方で私は、この細胞死

促進作用の分子機構について、DNA 損傷の多様な様式間での共通性・差異を調べたところ、DNA 鎖間架橋形成剤であるシスプラチン処置時には、p53 依存的な全く異なる分子機構で細胞死の促進が起きることを新たに見出したため、以下解析を行った。

ヒト骨肉腫細胞株 U2OS に、エライジン酸存在下でシスプラチンを処置したところ、p38/JNK MAP キナーゼの活性化増強に伴って細胞死が亢進し、いずれの MAP キナーゼ阻害剤の共処置でも、細胞死の促進が有意に抑制された。そこで、転写因子 p53 および MAP キナーゼの最上流に位置するストレス応答キナーゼ ASK1 の欠損細胞を作製して解析を行ったところ、いずれの欠損細胞でも、ドキシソルビシン処置時の細胞死の促進は全く抑制されなかった一方、シスプラチン処置時の細胞死の促進は顕著に抑制された。これらの結果より、エライジン酸は DNA 鎖間架橋形成時には、DNA 二本鎖切断時とは異なり、ASK1-p38/JNK MAP キナーゼ経路活性化を増強することで、p53 依存的なアポトーシスを亢進することが示唆された。さらに、上流の作用点を明らかにするため、エライジン酸存在下では、シスプラチン処置時の ROS (ASK1 の直接的な活性化因子) の産生が顕著に亢進していた。ROS 産生亢進は、NADPH オキシダーゼ (NOX) 阻害剤 Apocynin の処置で抑制された一方、ミトコンドリア ROS 消去剤 mito-TEMPO の処置では抑制されなかった。さらに、NOX 活性を正に制御するキナーゼ分子 RIP1 の阻害剤処置または欠損によっても、この ROS 産生の亢進が抑制された。以上の結果から、シスプラチン処置などの DNA 鎖間架橋形成による DNA 損傷時、エライジン酸は RIP1 依存的な NOX を介した ROS 産生を亢進することで、ASK1-p38/JNK MAP キナーゼ経路の活性化を増強し、p53 依存的な細胞死を促進することが明らかとなった。したがって、人工型 TFA は、DNA 損傷様式の違いに応じて、全く異なる細胞死誘導シグナルを惹起・増強することで、アポトーシスを促進し、関連疾患発症に寄与するものと考えられる。

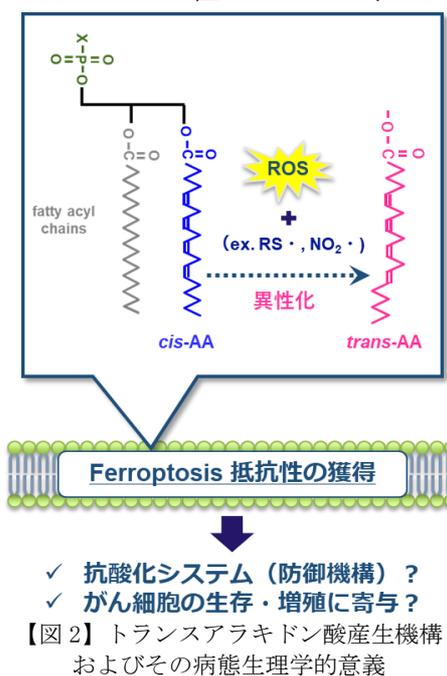


【図1】 DNA 損傷様式によって異なる人工型 TFA の細胞死シグナル促進機構

第2章：トランスアラキドン酸の生体内産生機構とその病態生理学的意義の解明

TFA は生体内の脂質合成系で酵素的に合成されないため、その由来は外来性のみとされてきた。しかし近年、酸化ストレスに起因するラジカル反応（不飽和脂肪酸のシス-トランス異性化反応）により、生体内で非酵素的に少量産生される「内在性」TFA（トランスアラキドン酸など）の存在が明らかになっている。我々はまず、この内在性 TFA の

具体的な生理的産生条件や分子種などを同定するために、独自の TFA 検出・測定系を利用し、刺激条件等の網羅的検討を行った結果、非典型的プログラム細胞死「フェロトーシス」の誘導時に、細胞内でモノトランスアラキドン酸（1 箇所の二重結合がトランス型に変換されたアラキドン酸）と呼ばれる TFA が産生されることを新たに発見した。フェロトーシスとは、生体膜リン脂質中のシスアラキドン酸（全ての二重結合がシス型）の鉄依存的な過酸化を起点として誘導される非典型的プログラム細胞死の一種であり、神経変性疾患をはじめとした様々な病態の発症・増悪に関連することが知られている。そこで、トランスアラキドン酸をヒト線維肉腫細胞株 HT1080 に処置したところ、シスアラキドン酸のようなフェロトーシス促進作用は認められなかった。以上より、シスアラキドン酸が過酸化を受けるような酸化ストレス時に、自身が一部トランス異性化することでフェロトーシスを抑制するネガティブフィードバック機構が存在することが示唆された。本機構は、神経変性疾患などの本細胞死が寄与する関連疾患の防御機構として働いている可能性や、鉄や活性酸素を高含有し、本細胞死に脆弱であることが知られるがん細胞においては、本機構を悪用してトランスアラキドン酸を過剰に産生することで、フェロトーシス耐性を獲得し、がんの悪性化や増殖に繋がっている可能性が想定される。



第3章：共役脂肪酸によるフェロトーシス誘導機構の解明

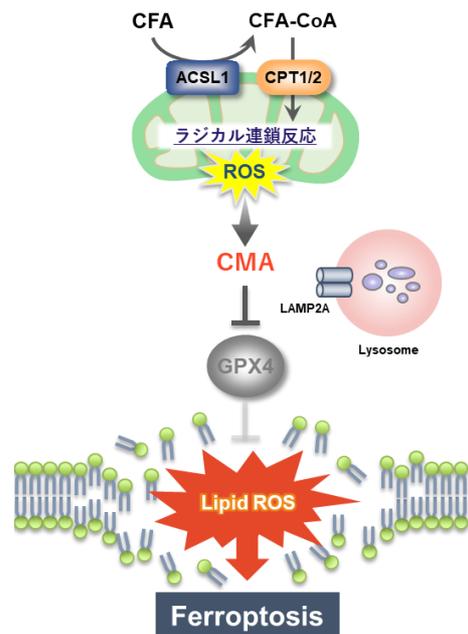
共役脂肪酸（Conjugated fatty acid : CFA）とは、その炭素骨格中の複数の二重結合が共役（隣接）した構造を持つ脂肪酸で、通常 1 つ以上のトランス型二重結合を有し、乳製品（ルーメン酸など）、植物油（ α -エレオステアリン酸 : ESA）に高含有されることから、天然型 TFA に分類される。本研究では、詳細が不明な CFA による抗がん作用機構の解明を目的として、特に CFA によるがん細胞死誘導作用に着目し、その詳細な分子機構の解析を行った。

まず、ヒト線維肉腫細胞株 HT1080 に対して様々な TFA を単独処置したところ、ルーメン酸や ESA などの CFA 特異的に、顕著な細胞死を誘導した。また、CFA のトランス型二重結合を全てシス型に置換したところ、細胞死が一部抑制されたことから、細胞死誘導におけるトランス型二重結合の重要性が示唆された。本細胞死は、フェロトーシスの阻害剤 Ferrostatin-1（過酸化脂質の消去剤）によって顕著に抑制された一方、他のプログラム細胞死の阻害剤では抑制されなかったことから、フェロトーシスであることが

示唆された。実際に、過酸化脂質検出プローブ Liperfluo によって、CFA の処置時間依存的に、細胞内の過酸化脂質 (Lipid ROS) 量が増大することが確認できた。そこで、細胞内の最も重要な過酸化脂質消去酵素である GPX4 (フェロトーシス抑制因子) に着目し、その発現量を解析したところ、CFA 処置時には GPX4 のタンパク質分解が認められた。GPX4 は、過去の報告から、シャペロン介在性オートファジー (CMA) という選択的オートファジーの1つにより分解を受けることが知られている。実際に、本分解系の阻害剤として汎用される CDDO (HSP90 阻害剤) または Chloroquine (リソソーム阻害剤) を共処置したところ、CFA 処置時の GPX4 分解および細胞死が顕著に抑制された。興味深いことに、ミトコンドリア選択的な ROS 消去剤 mito-TEMPO でも、上記阻害剤と同様の抑制作用が認められた。そこで、CFA がミトコンドリアに取り込まれて集積する可能性を想定し、脂肪酸のミトコンドリア取り込みに重要な脂肪酸アシル化酵素 ACSL1、およびアシル CoA からアシルカルニチンへの変換を担う酵素 CPT1/2 について、各々の阻害剤を共処置したところ、CFA によるフェロトーシスが顕著に抑制された。また、ミトコンドリア選択的な ROS 検出プローブ mitoSOX、過酸化脂質検出プローブ mitoPeDPP の利用により、CFA 処置時にミトコンドリアにおける ROS および lipid ROS の産生量増大が認められた。以上の結果から、CFA の中でも特にトランス型二重結合を有するものが、ミトコンドリアに集積してミトコンドリア ROS/lipid ROS の産生増大を引き起こし、その下流で CMA 依存的な GPX4 の分解を誘導することで、フェロトーシスを強力に誘導することが示唆された。フェロトーシスはがん細胞の感受性が特に高い細胞死であり、実際に、CFA が複数のがん細胞で特に高い殺傷作用を発揮することを見出していることから、副作用の少ないがん予防・治療薬としての応用が期待される。

【総括】

本研究により、由来や構造の異なる様々な TFA について、分子種ごとに異なる細胞死制御機構の詳細が細胞・分子レベルで解明された。本研究成果は、これまで異なる分子種が全て一括りにされ、一様に疾患増悪因子として捉えられてきた TFA が、分子種ごとに異なる作用点、分子機能を有することを明らかにしたという点で、画期的で重要な基礎的知見として位置付けられる。今後の本研究の更なる進展により、関連疾患の予防・治療戦略の提案等に繋げていきたい。



【図3】 共役脂肪酸 (CFA) によるフェロトーシス誘導機構

論文審査結果の要旨

論文提出者：山田 侑杜

論文審査委員（主査）：斎藤 芳郎

論文題目：

トランス脂肪酸による細胞死制御機構の分子種間の差異とその病態生理学的意義の解明

トランス脂肪酸 (*trans*-fatty acid: TFA) とは、炭素-炭素原子間にトランス型二重結合を有する脂肪酸の総称である。過去の疫学調査等から、食品製造過程で産生される人工型 TFA (エライジン酸など) の摂取は、循環器系疾患などの危険因子とされてきた一方、天然型 TFA (共役脂肪酸) には、抗がん作用をはじめとする様々な有益な生理作用が知られている。また、酸化ストレス時などに生体内で非酵素的に産生される内在性 TFA (トランスアラキドン酸など) については、加齢やアルツハイマー病等の疾患に伴う血中濃度の増加が報告され、着目されている。しかし、TFA の分子標的や作用機構は解明が進んでおらず、分子種ごとの機能的差異や役割の違いは全く不明であることから、本研究では、これらを明らかにすることを目指し、詳細な解析を行った。

第1章では、DNA 鎖間架橋形成時の細胞死に対する、人工型 TFA 特有の促進作用を見出し、本作用が、キナーゼ分子 RIP1 依存的な NADPH オキシダーゼ (NOX) 由来の ROS 産生増大、およびその下流で活性化する ASK1-p38/JNK MAP キナーゼ経路に依存したものであることを明らかにした。以上の結果は、先行研究で既に明らかになっていた DNA 二本鎖切断時の細胞死促進作用とは、標的分子や分子機構が全く異なることを明確に示したという点で、人工型 TFA の毒性発現機構の全容解明に繋がる重要な基礎的知見となった。

第2章では、代表的な内在性 TFA であるトランスアラキドン酸が、制御性細胞死の1つであるフェロトーシスが誘導されるような脂質過酸化時に、シスアラキドン酸が一部トランス異性化することで産生され、NOX の抑制を介してフェロトーシスに対して抑制的に作用するというネガティブフィードバック機構の存在が明らかとなった。本研究成果は、神経変性疾患などの本細胞死が寄与する関連疾患に対する防御機構としての役割や、本機構を悪用したがん細胞のフェロトーシス耐性獲得への寄与など、様々な病態と内在性 TFA の密接な関連を想起させる、重要な足掛かりとなる発見である。

第3章では、天然型 TFA である共役脂肪酸 (CFA) のがん細胞における強力なフェロトーシス誘導能を見出した。詳細な解析から、CFA はミトコンドリアに取り込まれて蓄積し、ROS/lipid ROS を過剰に産生することで、シャペロン介在性オートファジー依存的な GPX4 (過酸化脂質の主要な消去酵素) の分解を促進し、フェロトーシスを強力に誘導することが明らかとなった。本作用はがん細胞特異性が高いことから、CFA を利用したフェロトーシスによる新規がん治療薬の開発・応用が期待される。

本研究は、由来や構造の異なる様々な TFA 分子種の生体作用が画一的に捉えられてきた中で、分子種ごとに異なる作用点および機能を細胞・分子レベルで詳細に解明したという点で、独自性・革新性が高く、関連疾患の分子病態の理解や予防・治療戦略の開発に繋がることが期待されることから、基礎・応用の両面において重要な研究成果であると考えられる。

よって、本論文は博士 (薬学) の学位論文として合格と認める。