

【総説】

## 脂質酸化依存的新規細胞死フェロトーシスとリポキシトーシス

今井 浩孝

北里大学 薬学部 衛生化学

### 要約

近年、脂質酸化が起因となる新しい非アポトーシス経路による細胞死フェロトーシスが注目を集めている。フェロトーシス研究は現在、Ras 変異がん細胞を特異的に殺す抗がん剤のメカニズムの解析が進んでおり、シスチントランスポーター (xCT) を抑制するタイプ1 (エラスチンなど) と酸化リン脂質の一次生成物であるリン脂質ヒドロペルオキシドを直接還元する酵素 GPx4 (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) を直接阻害するか、発現量を変化させるタイプ2 (RSL3 など) に大きく分けられる。タイプ1は細胞内グルタチオンの低下により、またタイプ2は直接 GPx4を阻害することで、リン脂質ヒドロペルオキシドの代謝を抑制し、遊離二価鉄を介した脂質酸化増幅反応によりカスパーゼ非依存的な新規細胞死を誘導する。フェロトーシスは鉄のキレーター DFO (deferrioxamine)、ビタミン E、フェロスタチン-1により抑制されることが特徴であり、カスパーゼの阻害剤では抑制できない。一方、我々はこれまでに、GPx4の様々な組織特異的ノックアウトマウスにおいて、GPx4が正常組織で欠損すると、カスパーゼ非依存的で脂質酸化依存性の細胞死が起きることを見出し、その分子メカニズムや初期に酸化されるリン脂質分子種がフェロトーシスとも異なることを見出してきている (筆者らはリポキシトーシスと呼んでいる)。またミトコンドリアを経由するアポトーシスにおいても、以前我々を含めた複数のグループが、ミトコンドリア内の特異的リン脂質カルジオリピンの酸化がミトコンドリアからのチトクローム C の放出に参与することを報告している。このことは細胞死におけるリン脂質の酸化シグナルが、何処のオルガネラでどのようなリン脂質分子種に対して起きるのかによって、脂質酸化依存性の細胞死は異なる細胞死経路をたどることを示している。本総説では我々の視点からみたフェロトーシスとリポキシトーシスについて中心に紹介したい。

キーワード : GPx4, lipid peroxidation, iron, vitamin E, ferroptosis

### 1. はじめに

細胞死研究は、約 20 年前からネクローシスとは異なるプログラムされた細胞死アポトーシスの概念が生まれ、DNA ラダーの形成、ミトコンドリアからのチトクローム C の放出を伴うカスパーゼ活性化機構や Fas リガンドや TNF $\alpha$  受容体を介した細胞死シグナル経路な

どが次々に明らかにされた。その結果、アポトーシスとは異なるカスパーゼ非依存性のプログラム細胞死が存在することも明らかになってきた [1]。非アポトーシス細胞死として、オートファジー性細胞死、ネクロプトーシス、パイロトーシスなどが報告されてきたが [1]、近年、脂質の酸化を起因とする新たな細胞死としてフェロトーシスが注目を集めている [2]。図 1 に示すように脂質の酸化のメカニズムには、これまで、過酸化水素などのヒドロペルオキシドと遊離二価鉄 (Fe<sup>2+</sup>) を介したフェントン反応により起きる非酵素的な経路と 15-リポキシゲナーゼ (15-LOX) やチトクローム p450 などの酵素によるリン脂質の直接的な酸化経路が存在することが知られているが、リン脂質ヒドロペルオキシド (PL-OOH) を生成する酵素については、15-LOX やチトクローム C 以外

連絡先 : 今井浩孝 〒 108-8641

東京都港区白金 5-9-1

TEL : 03-5791-6235

FAX : 03-5791-6235

E-mail : imaih@pharm.kitasato-u.ac.jp

はまだ不明な点が多い。ビタミンEはラジカルをトラップすることにより、フェントン反応による脂質酸化の増幅を抑制する。酸化されて生成した1次生成物であるリン脂質ヒドロペルオキシドは、ホスホリパーゼA<sub>2</sub>(PLA<sub>2</sub>)による脂肪酸ヒドロペルオキシド(FFAOOH)の切り出しや、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(GPx4)によりグルタチオン依存的に還元される経路が知られているが、その他さらに酸化的分解を受け、リン脂質アルデヒド(PL-CHO)や、リン脂質カルボン酸(PL-COOH)となり、タンパク質と結合したりすることにより疾患の原因となったり、ある種の受容体を活性化することも明らかとなってきた[3,4]。PL-CHOやPL-COOHはPAFアセチルヒドロラーゼII(PAF-AHII)により切られ、リゾリン脂質(LysoPL)となる[5]。PLA<sub>2</sub>により切られたリゾリン脂質は、リゾリン脂質アシル転移酵素(LPCATなど)によって、アシルCoA合成酵素(ACSLなど)によって合成された、アシルCoAの脂肪酸を転移して元のリン脂質あるいは脂肪酸の組成が異なるリン脂質に戻す[6]。この経路はリモデリング経路(ランズ経路)と呼ばれ、酸化リン脂質の修復やリン脂質の脂肪酸組成の変化に関与する(図1)。GPx4は、フェルトーシスの制御分子であることが報告され、一気に注目を集めることとなった。本稿では、フェルトーシス及び我々が見出したリポキトーシスといった脂質酸化依存的な新規細胞死の実行経路とその制

御因子について概説する。

## 2. GPx4とは

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グルタチオンペルオキシダーゼ(phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase: PHGPx)とも呼ばれ、生体膜リン脂質の酸化1次生成物であるリン脂質ヒドロペルオキシドをグルタチオン依存的に還元する抗酸化酵素の一つである[7-9]。通常の細胞には、グルタチオンペルオキシダーゼ1(細胞質型GPx1)も存在するが、GPx1は過酸化水素を主に水に還元するのに対して、GPx4は生体膜中のリン脂質ヒドロペルオキシド(PL-OOH)を還元してヒドロキシリン脂質(PL-OH)にする。両者は活性中心に、微量元素であるセレンを持つ特殊アミノ酸であるセレノシステインを活性中心に持つ(図2)。このセレノシステインを持つタンパク質をセレンタンパク質と呼び、ヒトでは25種類が知られている。ヒトではセレン欠乏になると、心筋症や肝臓疾患を伴う中国の風土病である克山病を発症することが知られている。GPx4ゲノムは7つのエクソンからなり、第1エクソンはIaとIbの2つある。異なる3つの転写開始点から、ミトコンドリア型GPx4、細胞質や核内に存在する非ミトコンドリア型GPx4(細胞質型GPx4と呼ぶ場合もある)と核小体型GPx4(核型GPx4と呼ばれる場合もある)の3つのタイプのmRNA

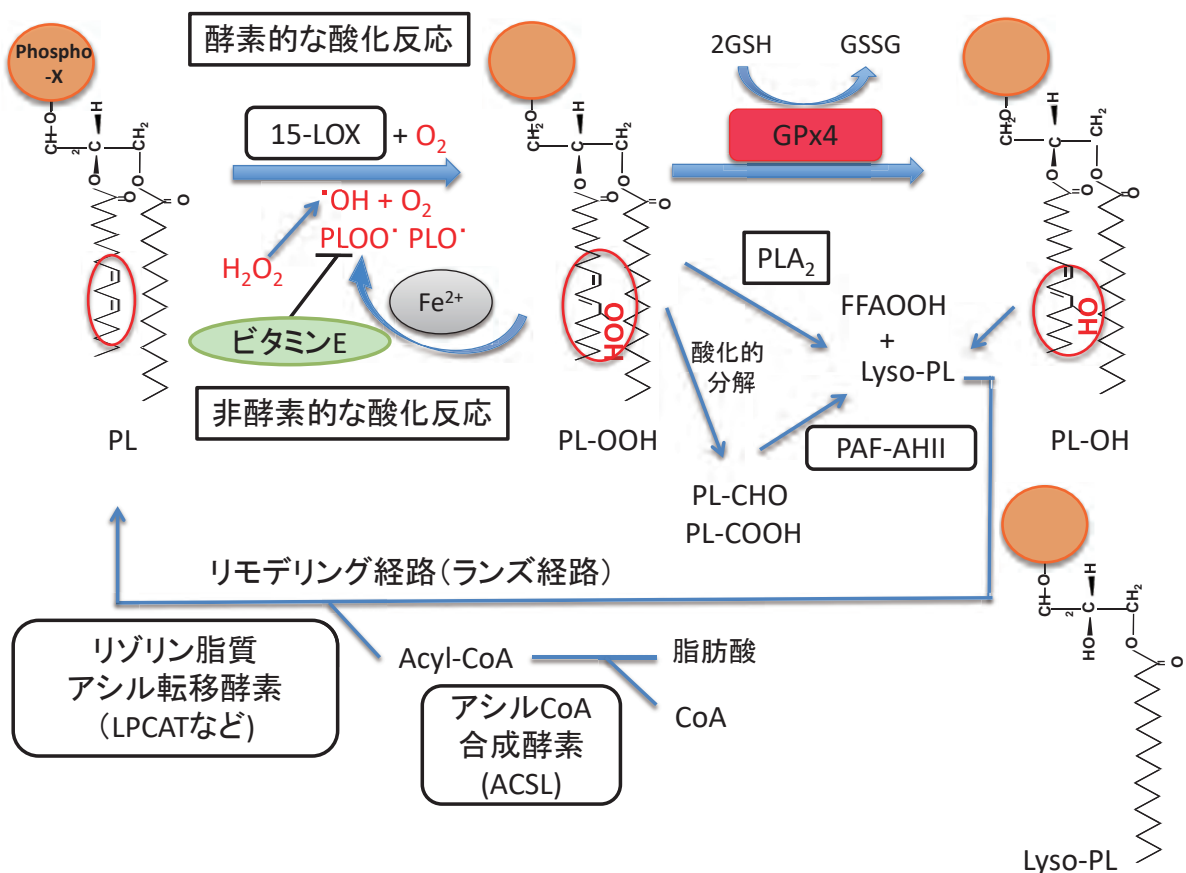


図1 生体膜リン脂質の酸化と修復経路

が転写され翻訳される。それぞれ第2エクソン以降は全く同じアミノ酸配列であり、第一エクソンIaの全てのアミノ酸配列がミトコンドリアへ移行するシグナルとなっている。一方、Ibエクソンは核小体移行シグナルとなる。Iaの最後の開始コドンのみを利用するタイプは、非ミトコンドリア型となり細胞質や核内に分布する(図2)[7]。GPx4は全ての臓器、細胞に発現するが体細胞では核小体型GPx4はほとんど発現していない。一方、精巣ではGPx4の3つのタイプの発現は非常に高く、後期精母細胞以降で著しく誘導がかかる。精子形成細胞の分化には、非ミトコンドリア型が必要であり、ミトコンドリア型は精子のミトコンドリア機能及び尻尾の正常な機能に参与する[10,11]。核小体型は先体に存在する。ヒトの重度の男性不妊症患者の精子では、GPx4の発現低下が見られる患者が多くおり[12]、精巣特異的GPx4ノックアウトマウスがオス不妊となったことから、精子でのGPx4の欠損は男性不妊症の原因となることが明らかになった[10]。またヒトにおいてGPx4欠損患者が報告されたが生後すぐ致死となり、骨の形成異常がおきていた[13]。マウスではGPx4欠損は胚発生過程の7.5日で致死となり生まれてこない[14]。

### 3. 抗がん剤による遊離鉄を介した脂質酸化依存的細胞死フェロトーシス

米国のStockwellらのグループは、変異Rasがん細胞

を特異的に殺し、正常細胞を殺さない抗がん剤をスクリーニングし、エラスチンやRSL3 (RAS-selective lethal 3) (図3) などを見出した[15]。それぞれの細胞死のメカニズムを明らかにしたところ、エラスチンは、シスチントランスポーターxCT (SLC7A11/SLC3A2)に結合し、シスチンの取り込みを抑制し、細胞内のシステイン及びグルタチオンを低下させ、グルタチオン依存的な酵素GPx4の活性低下を引き起こし、遊離2価鉄を介した脂質酸化依存的な細胞死が誘導されることを見出した[2]。この細胞死ではカパーゼは活性化されず、鉄のキレーターDFO (deferoxamine)、ビタミンEや抗酸化物質の一つであるフェロトーシスの特異的阻害剤フェロスタチン-1 (ferrostatin-1)により、細胞死が抑制されることを明らかにし、遊離2価鉄を介した脂質酸化依存的な細胞死をフェロトーシスと名付けた[2]。またRSL3はGPx4のセレノシステインに直接結合して、GPx4活性を抑制し、遊離2価鉄を介した脂質酸化依存的なフェロトーシスを起こすことを明らかにした[10]。このようにフェロトーシスを誘導する抗がん剤には、細胞内のグルタチオンを低下させる作用のあるもの(タイプ1)と、GPx4を阻害あるいは発現量を変化させるもの(タイプ2)の大きく分けて2つに分けられる(図3)。

生体膜のリン脂質の酸化は不飽和脂肪酸の量により感受性が変化する。リン脂質の脂肪酸は常に、ホスホリパーゼA1やA2により切り出され、アシル転移酵素により

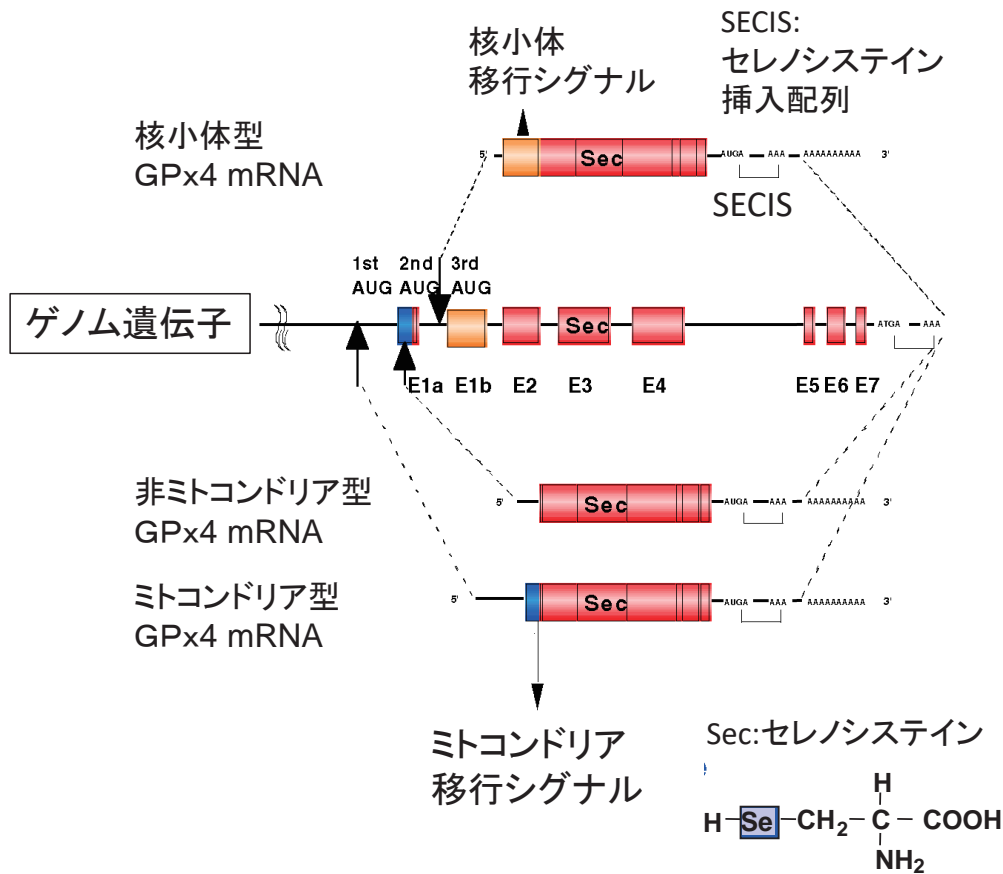


図2 3つのタイプのGPx4

別の脂肪酸がリゾリン脂質に結合することにより、組織などにおける生体膜リン脂質の不飽和脂肪酸の組成が調節されている（リモデリング経路）（図1）。Stockwellらと Conrad らのグループは別々に、フェロトーシスを抑制する分子のスクリーニングを行い、リゾホスファチジルコリンアシル転移酵素3（LPCAT3）とアシルCoA合成酵素4（ACSL4）のノックダウンやノックアウトにより、フェロトーシスを抑制できることを示した[17,10]。さらにKaganらのグループは、ACSL4欠損細胞と Wild 細胞を比較してリビドミクス解析を行い、抗がん剤によるフェロトーシスでは15-LOXによる小胞体膜のホスファチジエタノールアミン（PE）に含まれるアラキドン酸の酸化が細胞死誘導シグナルの初反応であることを報告した[19,20]。現在のところ、エラスチンやRSL3によるフェロトーシスでは、この15-LOXによるPEの酸化が初反応で、その後生成したリン脂質ヒドロペルオキシドと遊離2価鉄によるフェントン反応により、脂質酸化が増大しフェロトーシスが起きると考えられている。しかし、15-LOXノックアウトマウスにおいてもフェロトーシスが起きることから、必ずしも15-LOXは必要ではなく、脂質酸化の経路はいくつかの経路があると考えられる（図3）[21]。

その他のフェロトーシスの制御因子としては、シスチンの取り込みに関わるトランスポーターxCT（SLC7A11）の発現制御に関わる転写因子p53[22,23]

やBAP1[24]が関与していることや、遊離2価鉄の細胞内の量の制御に関わる分子、例えば、トランスフェリン受容体の減少やリソソーム機能の阻害による遊離2価鉄の生成の抑制もフェロトーシスを抑制できることが報告された[25]。また細胞内のフェリチンは鉄の貯蔵に関与するが、最近、フェリチンの特異的な分解にNCOA4（Cargo receptor for ferritinophagy）を介したオートファジー（フェリチノファジー）が関与していることが報告され、フェリチノファジーの抑制もフェロトーシスの感受性を下げることが明らかになっている[26,27]。またNrf2（NF-E2-related factor 2）などの抗酸化酵素の転写をあげる転写因子もフェロトーシスの感受性を下げる（図3）[28]。以上の結果は、脂質の不飽和度、脂質酸化に必要な遊離2価鉄、また活性酸素やラジカル消去に関与する分子がフェロトーシスの制御因子となるが、脂質酸化の下流で機能する分子の報告はなく、脂質酸化の後にどのようなメカニズムで致死となるのか、単純に生体膜の崩壊によるのかについては明らかになっていない。

#### 4. GPx4欠損による遊離鉄非依存的な新規細胞死リポキシトーシス

我々はこれまでに、全身性[14]、精巣[10]、肝臓[29]、心臓[30]、脳や網膜[31]におけるGPx4欠損マウスを作成してきた。通常のGPx4ノックアウトマウスは発

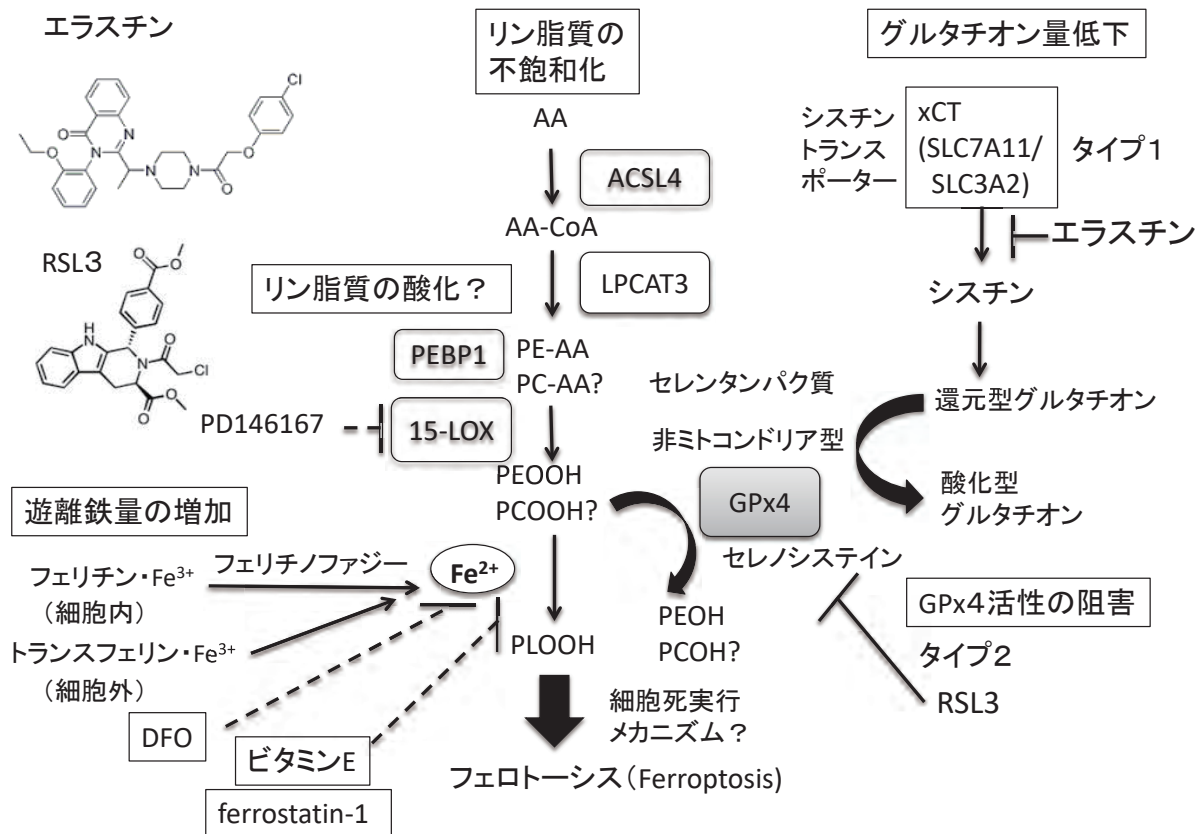


図3 フェロトーシスの分子メカニズムと調節因子と阻害剤

生過程の7.5日で致死となり、精巣特異的 GPx4欠損マウスは精子形成過程において、精母細胞以降の細胞が欠損する。また肝臓特異的 GPx4欠損マウスでは、肝実質細胞が致死となり、出生直後死となった。心臓特異的 GPx4欠損マウスは、17.5日で心臓突然死を引き起こす。網膜特異的 GPx4欠損マウスは、生後視細胞の脱落が起こり失明となる。このように、様々な正常細胞において GPx4を欠損させると細胞死が誘導される。またビタミン E 添加食を肝臓、心臓、精巣特異的 GPx4欠損マウスに摂取させるとこれらの細胞死は抑制された。このことから少なくとも、心臓、肝臓、精巣では GPx4とビタミン E により内在性に生じるリン脂質ヒドロペルオキシドを抑制することが生存に必須である。このことは正常の細胞では常に内在性にリン脂質ヒドロペルオキシドが生成していることになるがそのメカニズムはわかっていない。またこの内在性に生じるリン脂質ヒドロペルオキシドの増大が疾患の直接の原因となることを示している [30-33]。

組織特異的 GPx4欠損マウスでは、その組織において Cre タンパク質が発現誘導されてから致死が誘導されるのに3日ぐらいかかる。また我々が樹立した、タモキシフェン誘導型 GPx4欠損 MEF 細胞では、タモキシフェンを培地に添加してから、細胞死が誘導されるまでに2~3日かかる。一方、同じ MEF 細胞に、フェロトキシスを引き起こす2つのタイプの化合物、エラスチン

と RSL3を添加すると12~24時間後には致死となる。RSL3は GPx4活性を阻害してフェロトキシスを Ras 変異がん細胞に誘導し、正常細胞は殺さないとされているが、上述したように正常細胞において GPx4ゲノム遺伝子を破壊するだけで細胞死が誘導されるが、細胞死にかかる時間は全く異なっていた。このことは RSL3は GPx4阻害以外のターゲットを介して細胞死誘導機構を持っているのではないかと考えられる。また我々の MEF 細胞は、タモキシフェン添加による GPx4欠損細胞死では鉄のキレーター DFO では抑制されないが、エラスチンや RSL3 によるフェロトキシスは完全に抑制された。このことから、少なくとも我々の MEF 細胞においては、フェロトキシスと GPx4欠損細胞死が異なるメカニズムで誘導されていると考えられた。タモキシフェンを添加すると24時間後には GPx4欠損に伴ってホスファチジルコリンヒドロペルオキシド (PCOOH) が生成することが LC-ESI-MS/MS 解析により明らかとなり、遊離2価鉄非依存的な脂質酸化経路により、フェロトキシスとは異なる細胞死が誘導されていると考えられた [34]。そこで我々はこの GPx4欠損細胞死をリポキシトキシスと名付け、細胞死の詳細なメカニズムを解析している (図4)。

リポキシトキシスでは24時間後に生成するリン脂質ヒドロペルオキシドの生成はビタミン E の添加により抑制できるが、鉄のキレーター DFO では抑制できない。

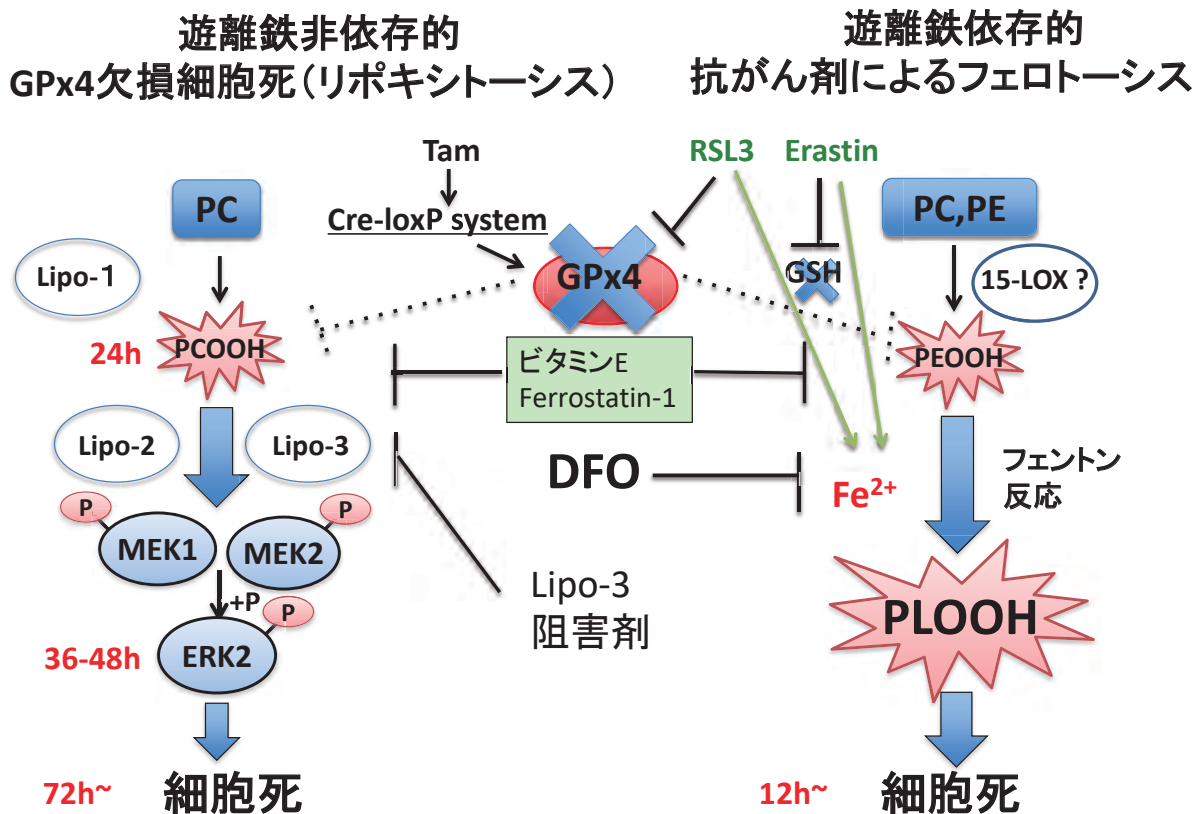


図4 リポキシトキシスとフェロトキシスの違い

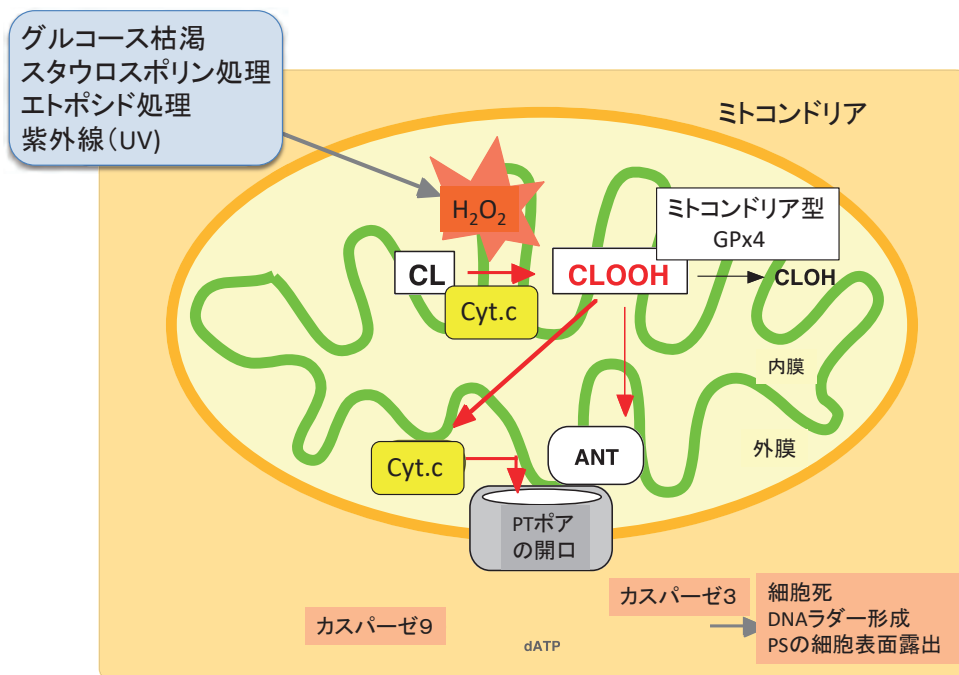
一方、エラスチンなどによるフェロトーシスによる脂質ヒドロペルオキシドの生成は鉄のキレーター DFO で抑制できる。また、リポキシトーシスでは 36 時間以降 48 時間後ぐらいまでに ERK のリン酸化が亢進する。また脂質ヒドロペルオキシド生成の下流で起きる ERK のリン酸化は、ビタミン E の添加により抑制された。また MEK の阻害剤や ERK、MEK のノックダウンはリポキシトーシスを抑制できる。このことから、リポキシトーシスでは 24 時間後に PCOOH が生成され、36 時間～48 時間後に ERK のリン酸化を介して細胞死が誘導されると考えられた (図 4)。最近我々は、この 24 時間後に生成する PCOOH を代謝できる脂質代謝酵素を見出し、この酵素を高発現するとリポキシトーシスを抑制できることを明らかにしたが、この酵素の高発現株は、エラスチンや RSL 3 によるフェロトーシスは全く抑制できなかった。フェロトーシスでは、その細胞死の誘導にホスファチジルエタノールアミンヒドロペルオキシド (PEOOH) の生成が初反応とされているが [19]、この脂質代謝酵素は PE を基質としないことから抑制できないと考えられた。この結果もリポキシトーシスとフェロトーシスが異なる細胞死メカニズムであることを示すと共に、細胞内で初期に生じるリン脂質ヒドロペルオキシドの生成する分子種や部位が異なることが考えられる。

我々はリポキシトーシスの実行因子を明らかにするために網羅的 shRNA ライブラリーを導入した MEF 細胞において、タモキシフェン添加後 96 時間後に生存した細胞を回収し、導入された shRNA 配列を同定した。さらに単独の shRNA によるノックダウン細胞がリポキシトーシスを抑制できること、及びそのノックダウン細胞

に、shRNA 耐性の cDNA を導入するとリポキシトーシスが再現できるようになる遺伝子を絞り込み、6 遺伝子を同定し、Lipo 遺伝子と名付けた。この Lipo 遺伝子のノックダウンは、リポキシトーシスを抑制できたが、RSL 3 やエラスチンによるフェロトーシスは抑制できなかったことから、フェロトーシスとリポキシトーシスは異なる細胞死であることが明らかとなった。Lipo-1 及び Lipo-2 は機能未知の新規遺伝子で、Lipo-3 遺伝子は脂質代謝酵素であった。この 3 つの lipo 遺伝子の機能部位を明らかにしたところ、Lipo-1 は PCOOH の生成に関与し、Lipo-2 及び Lipo-3 は脂質酸化の下流および ERK のリン酸化の上流で機能することが明らかとなった。Lipo-2 及び Lipo-3 は脂質酸化の下流で機能する分子であり、フェロトーシスではこれまで明らかになっていない脂質酸化の下流のシグナル分子がリポキシトーシスには存在することを意味している (図 4)。

### 5. おわりに

我々は、フェロトーシスとは異なる脂質酸化依存的細胞死メカニズムであるリポキシトーシス経路が存在することを明らかにした。リポキシトーシスはミトコンドリア型 GPx 4 や核小体型 GPx 4 の高発現では抑制できず、非ミトコンドリア型 GPx 4 の高発現で抑制できることから、ミトコンドリア内の脂質酸化は関与しない。以前我々はグルコース枯渇などにより、アポトーシスを実行するカスパーゼの活性化因子であるチトクローム C (Cyt.c) がミトコンドリアから放出するのを、ミトコンドリア型 GPx 4 の高発現により抑制し、アポトーシスを抑制できることを明らかにした [7, 35]。その抑制メカニズム



CL:カルジオリピン、PS:ホスファチジルセリン、Cyt.C:チトクロームC、ANT:アデニンヌクレオチドトランスポーター

図5 カルジオリピンの酸化とアポトーシス

は、ミトコンドリアに特異的に存在するリン脂質カルジオリピン (CL) が酸化されカルジオリピンヒドロペルオキシド (CLOOH) が生成すると、カルジオリピンに特異的に結合していたチトクローム C がカルジオリピンの酸化により内膜から遊離すること [7, 36, 37]、またチトクローム C のミトコンドリア外膜からの放出口 PT ポア (permeability transition pore) の開閉を制御するアデニンヌクレオチドトランスポーター (ANT) がカルジオリピンヒドロペルオキシドにより構造変化を起こし、PT ポアを開口することをミトコンドリア型 GPx4 が抑制できることを報告している [38] (図5)。このことはカルジオリピンヒドロペルオキシド (CLOOH) がミトコンドリアを介するアポトーシスシグナルとなることを示している [7]。今回、リポキトーシスはホスファチジルコリンヒドロペルオキシド (PCOOH) の生成が重要であり、フェロトーシスのホスファチジルエタノールアミンヒドロペルオキシド (PEOOH) の生成が重要である。このように同じ脂質酸化依存的細胞死であっても、リン脂質の酸化される分子種、生成部位が異なると細胞死経路が異なることが予想される。

リポキトーシスは、タモキシフェン添加や shRNA による GPx4 欠損や組織特異的 GPx4 欠損マウスとその組織の初代培養細胞などで観察される。フェロトーシスのようにこの細胞死を誘導できる化合物を見出せば、フェロトーシスとの違いも、より鮮明になると考えられる。

フェロトーシス研究は、特にがん細胞の新たな治療戦略として研究が進んでいる。これまで利用されてきた抗がん剤に耐性を示したがん細胞は、GPx4 依存的に生存している間葉細胞系細胞に変化しており、フェロトーシスを誘導する化合物は、抗がん剤耐性細胞に効果を示すことが報告されている [39, 40]。私見ではあるが、がん細胞はシスチントランスポーター xCT を強く発現しており、また xCT のノックアウトマウスは正常に生育できることから、エラスチンのような xCT をターゲットとしたフェロトーシス誘導剤は有用であるように思われる。一方、RSL3 のような GPx4 をターゲットとするフェロトーシス誘導剤は、正常細胞においてはリポキトーシスを誘導する可能性を秘めており、副作用が出ることが予想される。

我々はリポキトーシスの詳細な分子メカニズムを明らかにすることにより、フェロトーシスとの違いを明らかにしていきたいと考えている。

## 参考文献

1. Martinez, J. Prix Fixe: *Efferocytosis as a Four-Course Meal. Apoptotic and Non-Apoptotic Cell Death* In: Current Topics in Microbiology and Immunology 403, edited by Nagata S. and Nakano H., Japan: Springer. 2017, p1-36.
2. Dixon, S.J., et al., *Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death*. Cell 149:1060-1072, 2012.

3. Que, X., et al. *Oxidized phospholipids are prionflammatory and proatherogenic in hypercholesterolaemic mice*. Nature 558: 301-306, 2018.
4. Ambrogini, E., et al., *Oxidation-specific epitopes restrain bone formation*. Nat. Commun. 9 : 2193 doi 10.1038/s41467-018-04047-5, 2018.
5. Shimanaka, Y., et al., *Omega-3 fatty acid epoxides are autocrine mediators that control the magnitude of IgE-mediated mast cell activation*. Nat. Med. 23:1287-1297. 2017.
6. Shindou, H. and Shimizu, T. *Acyl-CoA:lysophospholipid acyltransferases*. J Biol Chem. 284:1-5. 2009.
7. Imai, H., and Nakagawa, Y. *Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells*. Free Radic Biol Med. 34:145-169. 2003.
8. Imai, H. *New Strategy of Functional Analysis of PHGPx Knockout Mice Model Using Transgenic Rescue Method and Cre-LoxP System*. J Clin Biochem Nutr. 46:1-13, 2010.
9. Imai, H., et al., *Lipid Peroxidation-Dependent Cell Death Regulated by GPx4 and Ferroptosis* In: Current Topics in Microbiology and Immunology 403, edited by Nagata S. and Nakano H., Japan: Springer. 2017, p143-70.
10. Imai, H., et al., *Depletion of selenoprotein GPx4 in spermatocytes causes male infertility in mice*. J Biol Chem. 284:32522-32532. 2009.
11. 今井浩孝, 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) と男性不妊. HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY 19:59-70, 2012.
12. Imai, H., et al. *Failure of the expression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in the spermatozoa of human infertile males*. Biol Reprod. 64:674-683, 2001.
13. Smith, A.C., et al., *Mutations in the enzyme glutathione peroxidase 4 cause Sedaghatian-type spondylometaphyseal dysplasia*. J Med Genet. 51:470-474, 2014.
14. Imai, H., et al., *Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse PHGPx gene*. Biochem Biophys Res Commun. 305:278-286, 2003.
15. Yagoda, N., et al., *RAS-RAF-MEK-dependent oxidative cell death involving voltage-dependent anion channels*. Nature 447:864-868, 2007.
16. Yang, W.S., et al., *Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4*. Cell. 156:317-331, 2014.
17. Dixon, S.J., et al., *Human Haploid Cell Genetics Reveals Roles for Lipid Metabolism Genes in Nonapoptotic Cell Death*. ACS Chem Biol. 10:1604-1609, 2015.
18. Doll, S., et al., *ACSL4 dictates ferroptosis*

- sensitivity by shaping cellular lipid composition.* Nat Cell Biol, 13 : 91-98, 2017.
19. Kagan, V.E., *et al.*, *Oxidized arachidonic and adrenic PEs navigate cells to ferroptosis.* Nat Cell Biol, 13 : 81-90, 2017.
  20. Wenzel, S.E., *et al.*, *PEBPI wardens ferroptosis by enabling lipoxygenase generation of lipid death signals.* Cell 171 : 628-641, 2017.
  21. Friedmann Angeli, J.P. *et al.*, *Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice.* Nat Cell Biol. 16:1180-1191, 2014.
  22. Jiang, L., *et al.*, *Ferroptosis as a p53-mediated activity during tumour suppression.* Nature. 520:57-62, 2015.
  23. Wang, S.J., *et al.*, *Acetylation Is Crucial for p53-Mediated Ferroptosis and Tumor Suppression.* Cell Rep. 17:366-373, 2016.
  24. Zhang, Y., *et al.*, *BAP1 links metabolic regulation of ferroptosis to tumour suppression.* Nature Cell Biol. 20:1181-1192. 2018.
  25. Gao, M., *et al.*, *An essential role for functional lysosomes in ferroptosis of cancer cells.* Biochem J. 473:769-777. 2016.
  26. Dowdle, W.E., *et al.*, *Selective VPS34 inhibitor blocks autophagy and uncovers a role for NCOA4 in ferritin degradation and iron homeostasis in vivo.* Nat Cell Biol. 16:1069-1079, 2014.
  27. Hou, W., *et al.* *Autophagy promotes ferroptosis by degradation of ferritin.* Autophagy. 12:1425-1428. 2016.
  28. Shin, D., *et al.*, *Nrf2 inhibition reverses resistance to GPx4 inhibitor-induced ferroptosis in head and neck cancer.* Free Radic Biol. Med. 129:454-462, 2018.
  29. 今井浩孝,松岡正城,中西広樹,田口良,石田規子,七里元督,吉田康一,二木鋭雄,清水孝彦,新井洋由,中川靖一 ビタミンEは肝臓特異的PHGPx欠損マウスの出生直後死をレスキューする. ビタミンE研究の進歩XV:68-72, 2012
  30. 今井浩孝 GPx4により制御される脂質酸化依存的細胞死とフェロトーシス: 実験医学, 34 : 37-46, 2016
  31. Ueta, T., *et al.* *Glutathione peroxidase 4 is required for maturation of photoreceptor cells.* J Biol Chem. 287:7675-7682, 2012.
  32. 今井浩孝 生体膜リン脂質のレドックス制御によるフェロトーシス制御: 実験医学, 36 : 726-734, 2018
  33. 今井浩孝 酸化リン脂質クオリティ制御の破綻による疾患と抗がん剤治療戦略: 実験医学, 36 : 1701-1711, 2018
  34. Imai, H. *Disruption of homeostasis of suppression of phospholipid peroxidation in biomembrane case novel cell death in disease.* Oleoscience 11:15-23, 2011.
  35. Nomura, K., *et al.*, *Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase suppresses apoptosis mediated by a mitochondrial death pathway.* J Biol Chem. 274:29294-29302, 1999
  36. Kagan, V.E., *et al.*, *Cytochrome c acts as a cardiolipin oxygenase required for release of proapoptotic factors.* Nat Chem Biol. 1:223-232, 2005.
  37. Nomura, K., *et al.*, *Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase inhibits the release of cytochrome c from mitochondria by suppressing the peroxidation of cardiolipin in hypoglycaemia-induced apoptosis.* Biochem J. 351:183-193, 2000.
  38. Imai, H., *et al.*, *Protection from inactivation of the adenine nucleotide translocator during hypoglycaemia-induced apoptosis by mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase.* Biochem J. 371:799-809, 2003.
  39. Viswanathan, V.S., *et al.*, *Dependency of a therapy-resistant state of cancer cells on a lipid peroxidase pathway.* Nature 547:453-457, 2017.
  40. Hangauer MJ, *et al.*, *Drug-tolerant persister cancer cells are vulnerable to GPx4 inhibition.* Nature 551: 247-250, 2017.



## Lipid peroxidation dependent cell death -Ferroptosis and lipoxytosis-

Hiroataka Imai

School of Pharmaceutical Sciences, Kitasato University

### Abstract

Recently an iron dependent lipid peroxidation cell death “ferroptosis” has attracted attention. Ferroptosis is a novel caspase independent cell death that can be elicited by pharmacological inhibiting the cysteine/glutamate antiporter, system Xc- (Type I) or directly binding and loss of activity of glutathione peroxidase 4 (GPx4) (Type II) in cancer cells with high level RAS-RAF-MEK pathway activity, but not in normal cells. Ferroptosis by Erastin (Type I) and RSL3 (RAS-selective lethal3, Type II) treatment was induced until 24hr and suppressed by an iron chelator DFO (deferroxamine) , vitamin E and ferrostatin-1, antioxidant compound. On the other hand, we reported that depletion of GPx4 in several tissues of mice could induce cell death in normal tissues of mice. In our established tamoxifen inducible GPx4 KO MEF cell line, cell death at 72hr and lipid peroxidation at 24hr after addition of tamoxifen were not suppressed by iron chelator DFO, but by vitamin E and ferrostatin-1, a ferroptosis specific antioxidant inhibitor. We identified six Lipo genes that could suppress non-mitochondrial GPx4 deficient cell death after addition of tamoxifen by genome-wide shRNA library screening, but not RSL3 or Erastin induced ferroptosis, indicating that GPx4 deficient cell death (lipoxytosis) by tamoxifen is different cell death from ferroptosis by erastin and RSL3. We previously reported that overexpression of mitochondrial GPx4 could suppress apoptosis by inhibition of peroxidation of cardiolipin for release of cytochrome c from inner membrane of mitochondria. These results demonstrated that lipid peroxidation at different species of phospholipid or at different organelle might induce several different cell death pathways. In this review, I would like to introduce about ferroptosis and lipoxytosis from my viewpoint.

**Keywords :** GPx4, lipid peroxidation, iron, vitamin E, ferroptosis