

ロドデンドロールによる細胞死へのフェロトーシスの関与の可能性

山形大学大学院医学系研究科

小林 翔

Rhododendrol is metabolized to rhododendrol quinone by tyrosinase in melanocytes. Reactive oxygen species, such as hydroxyl radical and singlet oxygen, are produced and cause oxidative damage in melanocytes. Recent study has revealed that ferroptosis, a non-apoptotic, iron-dependent cell death, appears to be involved in pathogenesis of a variety of diseases. It is likely that rhododendrol-induced leukomelanoderma is also caused by ferroptosis by means of lipid peroxidation products produced during rhododendrol oxidation in melanocytes. Singlet oxygen also induces ferroptosis, and, on the contrary, radical scavenger edaravone effectively suppresses ferroptosis caused by cysteine deprivation. Singlet oxygen is commonly produced via photon-mediated energy transfer reaction and also tyrosinase-catalyzed rhododendrol metabolism, so that it is likely that ferroptosis is induced by resulted singlet oxygen in melanocytes upon UVB irradiation.

Here we first established a rat monoclonal antibody (FerAb) against Hepa 1-6 cells that had been cultivated in cysteine-depleted media. Binding of the resulting antibody increased during advancing ferroptosis which was caused, not only by cysteine deprivation but also treatment with xCT inhibitor erastin or GPX4 inhibitor RSL3, although apoptotic cell death induced by a staurosporine treatment had no effect on the binding. Thus, FerAb appears to be the useful tool to detect ferroptosis. When we examined effects of rhododendrol on human melanocyte MNT1 cells, it damaged the cells only at high dose. However, precise analyses of the cells by means of FACS indicated that only less-differentiated cells containing low levels of melanin appeared to die by the rhododendrol treatment. This is similar to the *in vivo* situation, and hence this cell culture system using the MNT1 cells may be ideal model system for rhododendrol-induced melanocyte death.

1. 緒言

白樺などの植物由来のフェノール化合物であるロドデンドロールはメラノサイトに作用し、メラニン合成における律速酵素・チロシナーゼにより代謝されてロドキノンとなる。ロドキノンはチロシナーゼ酵素を阻害することで美白効果を発揮するが、過剰に作用するとグルタチオン含有量を低下させ、細胞死を誘導して白斑の原因となる。この時の細胞死はアポトーシスによると報告されているが、本病態では炎症細胞の関与が示されている¹⁾ことから、アポトーシス以外の細胞死の関与も考えられる。

ロドデンドロールによる細胞障害過程では活性酸素が生成し、グルタチオンが低下する²⁾ため、抗酸化能の減弱が細胞死に関わる可能性がある。一方、その過程でオートファジーが活性化される³⁾など、2012年にはじめて報告された鉄依存性細胞死・フェロトーシスに酷似している。フェロトーシス誘導には次の2つの経路が知られている⁴⁾。1) システイン供給不足もしくはグルタチオン低下により、グルタチオンペルオキシダーゼ4 (GPX4) が正常に機能せず、増加した脂質過酸化物が細胞死をもたらす⁵⁾。2) 癌抑

制遺伝子のp53が活性化して酸化型システイン(シスチン)の取込みに働くxCTの遺伝子発現を抑制して細胞死をもたらす。またロドデンドロールによる白斑は日光を浴びている皮膚に顕著なことから、紫外線による増強効果が指摘されている^{6,7)}が、紫外線の照射によりロドデンドロール代謝物から実際に一重項酸素が生成することが確認されている⁸⁾。これまで我々は、フェロトーシス抑制に果たすxCTの役割について、培養細胞ならびに遺伝子欠損マウスを用いて研究してきた⁹⁻¹¹⁾。またドナー化合物を用いて、一重項酸素が肝癌由来のHepa 1-6細胞にフェロトーシスを誘導することを確認しており¹²⁾、本化合物を用いることで、ロドデンドロールによる白斑形成に一重項酸素が関与することを検証することができると考える。

これまでのところロドデンドロールによるメラノサイトの障害作用とフェロトーシスとの関連についての報告はないが、ロドデンドロールがオートファジーを活性化し、活性酸素・ラジカルが細胞死に関わることから、図1に示すようにフェロトーシスが関与する可能性が高いと考えている。本研究では、*in vivo*におけるフェロトーシス細胞の検出を可能にするモノクローナル抗体を作製し、さらにヒト由来のMNT1メラノサイトを用いて、ロドデンドロールによる細胞死へのフェロトーシスの関与と、その抑制剤による細胞保護作用を調べた。

2. 方法

2.1. フェロトーシス認識抗体の作製

マウス肝癌由来のHepa 1-6細胞をシスチン(酸化型シ



Potential involvement of ferroptosis in cell death by rhododendrol

Sho Kobayashi

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Graduate School of Medical Science, Yamagata University

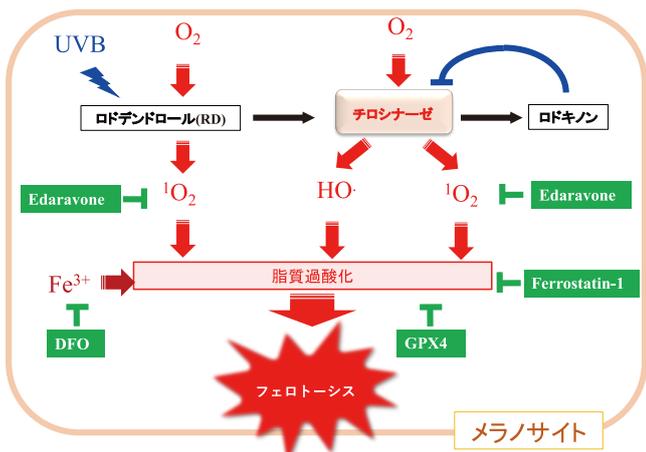


図1 ロドデンドロール(RD)によるメラノサイト細胞死がフェロトーシスによる可能性を示す模式図。一重項酸素, $^1\text{O}_2$; ヒドロキシルラジカル, $\text{HO}\cdot$

ステイン二量体) 欠乏培地で培養してフェロトーシスを誘導し、それを抗原としてラットに免疫した。単離したリンパ球とマウスミエロマ細胞・SP2を細胞融合し、得られたハイブリドーマの培養上清の中からフェロトーシス細胞を特異的に認識する抗体を免疫細胞染色により選抜し、ラットモノクローナル抗体・FerAbを得た。

2. 2. ロドデンドロールの細胞生存への影響

ヒト由来のMNT1メラノサイトを培養し、ロドデンドロール添加後の生細胞数をCellTiter-Blue® Cell Viability Assay kit (Promega) による測定やトリパンブルー色素排除試験法による細胞数計測を行い、ロドデンドロールが細胞生存に与える影響を調べた。

2. 3. 細胞内活性酸素と脂質過酸化物の定量

活性酸素種 ($\text{H}_2\text{DCF-DA}$ と DHR123) と脂質過酸化物 ($\text{C11-BODIPY}^{581/591}$) を認識する蛍光プローブを使用し、フローサイトメーターを用いて解析した。

3. 結果

3. 1. フェロトーシス認識抗体の作製

フェロトーシス研究のほとんどは培養細胞を用いて行われてきたが適切なマーカーがないため、その判定が難しいことが問題点として挙げられる。そこで生体内でフェロトーシスを検出することを目的として、フェロトーシス細胞を認識するラットモノクローナル抗体を作製した¹³⁾。768クローンから最終的に1つのクローンを選別し、FerAbと命名した。本抗体は、シスチン欠乏培地での細胞培養、ならびにシスチン細胞内取込みの阻害剤・erastinや脂質過酸化を抑制するGPX4の阻害剤・RSL3で処理してフェロトーシスを誘導した細胞と強く反応したが、スタウロス

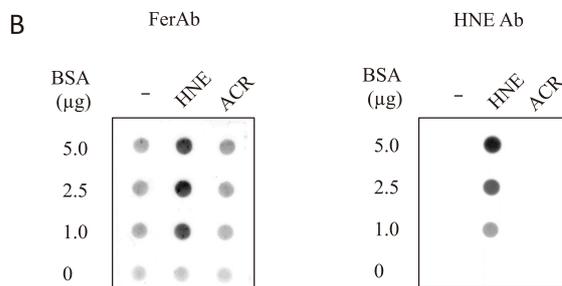
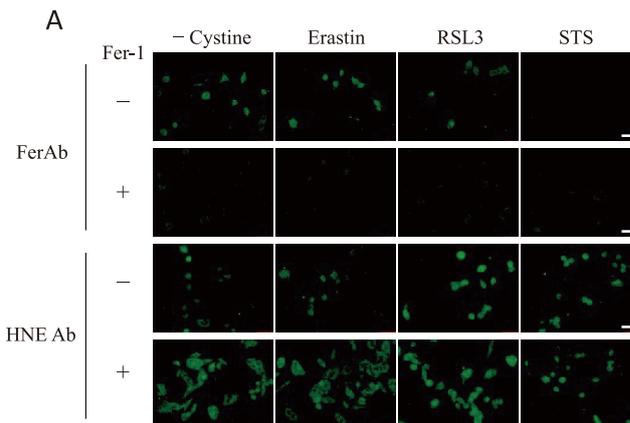


図2 抗フェロトーシス抗体の特異性の検討。免疫細胞染色による抗フェロトーシス抗体(FerAb)と抗HNE抗体(HNE Ab)との比較。(A) Fer-1はフェロトーシス抑制剤ferrostatin-1を示す。HNEおよびアクロレイン(ACR) 修飾ウシ血清アルブミン(BSA)を用いたドットプロット解析の検討結果(B)。

ポリリン処理によりアポトーシスを誘導した細胞には全く反応しなかった。代表的な脂質過酸化物である4-ヒドロキシ-2-ノネナール(HNE)を認識する抗体(HNE Ab)もフェロトーシス細胞に結合したが、生細胞とも強く結合するため、特異性についてはFerAbの方が優れていた(図2A)。FerAbはHNE修飾BSAとの反応性を示した(図2B)が、ウエスタンブロット解析では正常細胞とフェロトーシス細胞の間で反応性に違いを認めず、タンパク質自体ではなくHNE類似の構造を認識していると考えられた。細胞内におけるFerAb結合部位を共焦点レーザー顕微鏡により調べたところ、生細胞では細胞膜の仮足様構造に結合し、フェロトーシス細胞では細胞内全体に不均一に結合し、またミトコンドリアなどの細胞小器官にも部分的な結合を認めた。

3. 2. ロドデンドロールのMNT1メラノサイトに対する作用

ヒト由来のMNT1メラノサイトをロドデンドロール処理し、生細胞数を測定することで、ロドデンドロールが細胞生存に与える影響を調べた。その結果、ロドデンドロールの濃度依存性に細胞死を認めたが、予想に反して高濃度

を必要とした(図3A)。そこで、約半数が細胞死を起こす7mMの濃度を用いて、シスチンを含む通常培地と、含まないシスチン欠乏培地で細胞死について検討した。まず、通常培地で培養した細胞に、広くフェロトキシスを誘導するerastinを投与したところ部分的に細胞死が認められ、その程度はロドデンドロールの存在によって増強された(図3B)。次にシスチン欠乏培地で培養したところ、同様に部分的な細胞死を認めた。ロドデンドロールが存在すると7割程度まで細胞死が増強された。フェロトキシス抑制剤の効果について調べたところ、脂質過酸化を抑えるferrostatin-1、鉄のキレート剤であるDFO、およびラジカル消去剤のEdaravoneはいずれも細胞死を抑制する傾向を示したが、その効果はわずかであった。

次に細胞内に活性酸素種が生じ、脂質過酸化が起こっているかどうかについて調べた。活性酸素の検出プローブとしてH₂DCF-DAを用いて、FACS解析を行ったところ、ロドデンドロール処理しない細胞では、蛍光強度の低い小さなピークと、強い大きなピークに分かれ、ロドデンドロール処理により蛍光強度の小さなピークが選択的に消失した(図4)。同様の傾向がDHR123を用いた場合にも認められた。しかし、過酸化脂質を検出するC11-BODIPY^{581/591}によってはこのような違いを認めなかった。

4. 考 察

ロドデンドロールによる白斑は日本国内で問題となったことから、関連する研究のほとんどは国内で行われている。フェロトキシスについては、その引き金となるのは鉄イオン依存性に生じる活性酸素・ラジカルと考えられており、シスチン欠乏によるフェロトキシスは、ラジカル消去剤であるエダラボン(商標名:ラジカット)により抑制される¹⁴⁾。今回作製したFerAbは、ヒト子宮頸癌由来のHela細胞や、種々の刺激でフェロトキシスを誘導したHepa1-6にも結合したことから、動物種や刺激を問わずフェロトキシスを起こした細胞を共通に認識すると考えられる。FerAbはフェロトキシス細胞を特異的に検出できるため、フェロトキシスの機構や各種の病態への関与を解明する研究に有用と考えられる。

MNT1メラノサイトに対するロドデンドロールの作用については、細胞死の誘導に高濃度を必要とすることから、一見したところでは細胞毒性は低いように思われる。しかしながら、蛍光強度の低い細胞と高い細胞は、これまでの知見から、次のような違いに基づくと考えられる。すなわち、MNT1メラノサイトには分裂を終えて大きくなりメラニンを合成している分化の進んだ細胞と、分裂したばかりで小さく蛍光強度の低いメラニンの少ない細胞が存在する。分化度の低い細胞は内在性の蛍光物質、すなわちメラニンが少ないと考えられる。メラニンには抗酸化活性があ

り活性酸素種に対して耐性であるため、ロドデンドロール処理に対しても耐性となっており、分化度の低い細胞が選択的に死滅したと考えられる。この小さな細胞に限定すると、ロドデンドロールによる致死効果が大きいことが分かる。ロドデンドロールを塗布した皮膚では、メラニンを有するメラノサイトはすぐに減少することはなく、時間を経た後に白斑が生じることから、未分化な細胞が選択的に死滅していると考えられ、本知見とも一致する。したがって、ロドデンドロールによるMNT1メラノサイトの傷害は、生体内のメラノサイトの傷害機構を調べるモデル細胞系として有用と考えられる。今後、この未分化な細胞に焦点を当てて解析することで、フェロトキシスの関与を明確にし、その予防や治療に応用できる可能性がある。

xCTの阻害やシステインの欠乏によって誘導されるフェロトキシスには、ミトコンドリアの関与が報告されている。我々は電子伝達複合体IIIから生成するスーパーオキシドを特異的に抑制する阻害剤を用いて、この複合体由来のスーパーオキシドが関与することを明らかにしている¹⁵⁾。ロドデンドロールによるメラノサイトの細胞死についても、同様に電子伝達複合体IIIが関与するかどうか検討を予定している。紫外線による白斑形成については一重項酸素の関与が考えられている⁸⁾ため、ドナー化合物を用いて紫外線曝露時の一重項酸素の関与についても検討を行う予定である。

5. 総 括

本研究により、フェロトキシス細胞を特異的に検出するラットモノクローナル抗体・FerAbの作製に成功した。MNT1メラノサイトはロドデンドロールによる白斑形成のモデル系として有用であり、本細胞を用いることで、ロドデンドロールによる皮膚の白斑へのフェロトキシスの関与とその機構を解明することができると思われる。

(引用文献)

- 1) Tanemura A, Yang L, Yang F, Nagata Y, Wataya-Kaneda M, Fukai K, Tsuruta D, Ohe R, Yamakawa M, Suzuki T, Katayama I. An immune pathological and ultrastructural skin analysis for rhododendrol-induced leukoderma patients. *J. Dermatol. Sci.*, **77**, 185-188 (2015)
- 2) Ito S, Wakamatsu K. Biochemical Mechanism of Rhododendrol-Induced Leukoderma. *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, 552 (16 page) (2018)
- 3) Yang L, Yang F, Wataya-Kaneda M, Tanemura A, Tsuruta D, Katayama I. 4-(4-hydroxyphenyl)-2-butanol (rhododendrol) activates the autophagy-lysosome pathway in melanocytes: insights into the mechanisms of rhododendrol-induced leukoderma. *J.*

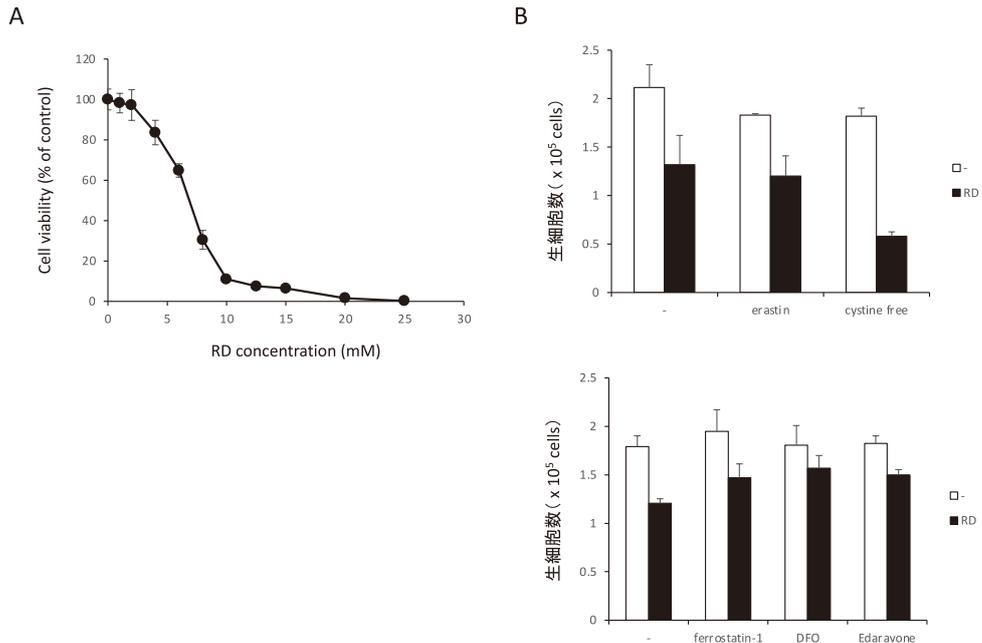


図3 ロドデンドロール(RD)によるメラノサイト(MNT1)細胞死の誘導。ロドデンドロール濃度依存性(A)と7 mM RDとフェロトシスの誘導剤ならびに抑制剤の併用効果(B)。平均±標準偏差(n=3)を示す。

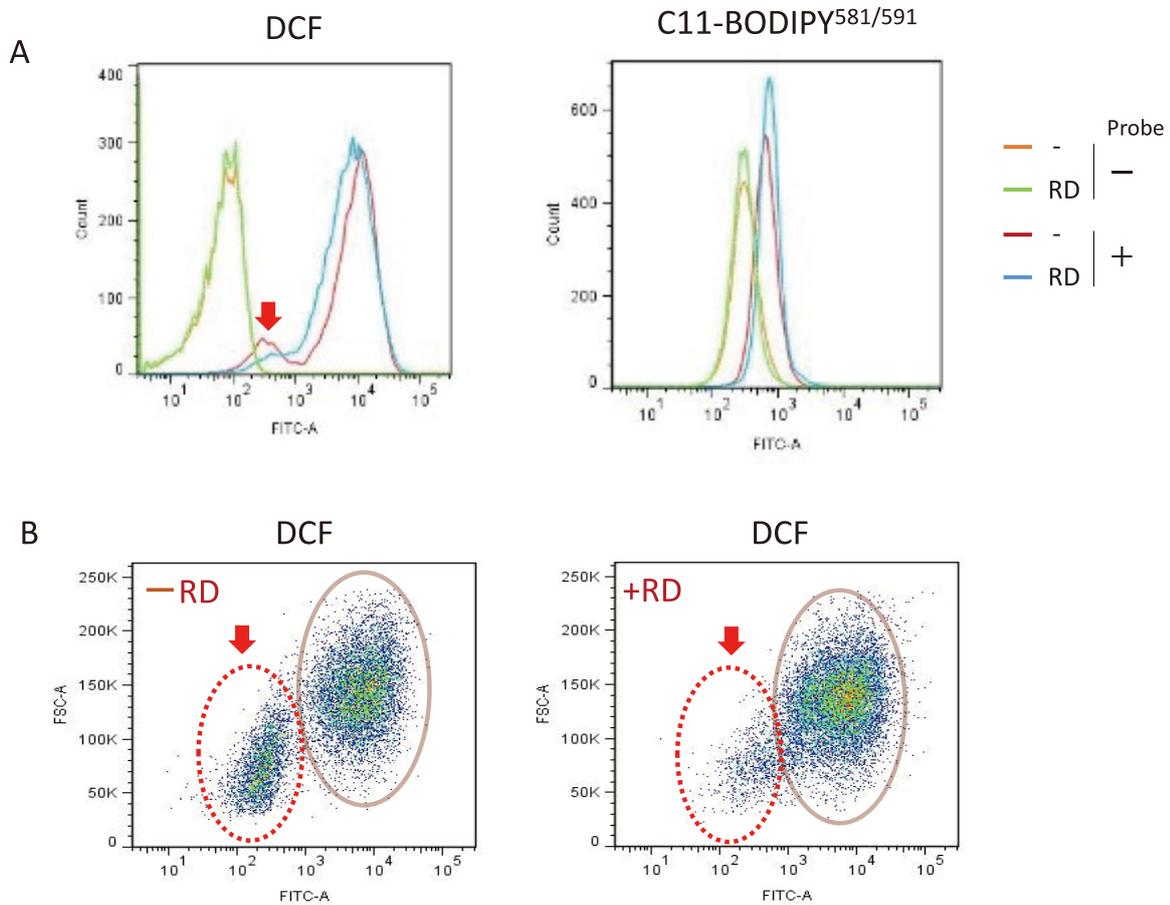


図4 ロドデンドロール(RD)の作用のFACS解析。DCFおよびC11-BODIPY^{581/591}を用いたヒストグラム(A)と7mM RD処理前後の細胞の分布の比較(B)。A図の赤矢印で示すピークと、B図の矢印内の細胞集団は一致する。

- Dermatol. Sci.*, **77**, 182-185 (2015)
- 4) Fujii J, Homma T, Kobayashi S. Ferroptosis caused by cysteine insufficiency and oxidative insult. *Free Radic. Res.*, **23**, 1-12 (2019)
 - 5) Friedmann Angeli JP, Schneider M, Proneth B, Tyurina YY, Tyurin VA, Hammond VJ, Herbach N, Aichler M, Walch A, Eggenhofer E, Basavarajappa D, Rådmark O, Kobayashi S, Bornkamm GW, Wanke R, Forster H, Yefremova O, Heinrichmeyer M, Hanschmann EM, Geissler EK, Stockwell BR, O'Donnell VB, Schick JA, Conrad M. Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice. *Nat. Cell. Biol.*, **16**, 1180-1191 (2014)
 - 6) Ito S, Wakamatsu K. A convenient screening method to differentiate phenolic skin whitening tyrosinase inhibitors from leukoderma-inducing phenols. *J. Dermatol. Sci.*, **80**, 18-24 (2015)
 - 7) Goto N, Tsujimoto M, Nagai H, Masaki T, Ito S, Wakamatsu K, Nishigori C. 4-(4-Hydroxyphenyl)-2-butanol (rhododendrol)-induced melanocyte cytotoxicity is enhanced by UVB exposure through generation of oxidative stress. *Exp. Dermatol.*, **27**, 754-762 (2018)
 - 8) Miyaji A, Gabe Y, Kohno M, Baba T. Generation of hydroxyl radicals and singlet oxygen during oxidation of rhododendrol and rhododendrol-catechol. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **60**, 86-92 (2017)
 - 9) Kobayashi S, Sato M, Kasakoshi T, Tsutsui T, Sugimoto M, Osaki M, Okada F, Igarashi K, Hiratake J, Homma T, Conrad M, Fujii J, Soga T, Bannai S, Sato H. Cystathionine is a novel substrate of cystine/glutamate transporter: implications for immune function. *J. Biol. Chem.*, **290**, 8778-8788 (2015)
 - 10) Kang ES, Lee J, Homma T, Kurahashi T, Kobayashi S, Nabeshima A, Yamada S, Seo HG, Miyata S, Sato H, Fujii J. xCT deficiency aggravates acetaminophen-induced hepatotoxicity under inhibition of the transsulfuration pathway. *Free Radic. Res.*, **51**, 80-90 (2017)
 - 11) Kobayashi S, Hamashima S, Homma T, Sato M, Kusumi R, Bannai S, Fujii J, Sato H. Cystine/glutamate transporter, system x_c⁻, is involved in nitric oxide production in mouse peritoneal macrophages. *Nitric Oxide*. **78**, 32-40 (2018)
 - 12) Homma T, Kobayashi S, Fujii J. Induction of ferroptosis by singlet oxygen generated from naphthalene endoperoxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **518** 519-525 (2019)
 - 13) Kobayashi S, Harada Y, Homma T, Yokoyama C, Fujii J. Characterization of a rat monoclonal antibody raised against ferroptotic cells. *J. Immunol. Methods.*, **489**, 112912 (9 page) (2021)
 - 14) Homma T, Kobayashi S, Sato H, Fujii J. Earavone, a free radical scavenger, protects against ferroptotic cell death in vitro. *Exp. Cell Res.*, **384**, 111592 (9 page) (2019)
 - 15) Homma T, Kobayashi S, Sato H, Fujii J. Superoxide produced by mitochondrial complex III plays a pivotal role in the execution of ferroptosis induced by cysteine starvation. *Arch. Biochem. Biophys.*, **700**, 108775 (9 page) (2021)