

令和 4 年 6 月 26 日現在

機関番号：32202

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22940

研究課題名(和文)肝特異的なFerroptosisの新たな制御機構の解明

研究課題名(英文)Liver specific regulation mechanism of ferroptosis

研究代表者

山田 直也 (Yamada, Naoya)

自治医科大学・医学部・ポスト・ドクター

研究者番号：50611787

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：肝細胞特異的なferroptosis制御因子として、コレステロール合成酵素である7-デヒドロコレステロール還元酵素(DHCR7)を同定した。DHCR7遺伝子を欠損、もしくは薬剤で阻害した場合に、肝細胞はferroptosisに耐性を示した。DHCR7の欠損・阻害下ではDHCR7の基質である7-デヒドロコレステロール(7-DHC)の蓄積が認められ、これが多価不飽和脂肪酸より優先的に酸化されることがferroptosis抑制につながることが示された。さらに、DHCR7阻害剤は肝虚血再灌流障害の抑制にも有効であり、ferroptosis関連肝疾患の制御に有効な治療標的と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、新たな細胞死であるフェロトーシスと様々な疾患への関与が相次いで報告され、注目を集めている。肝臓では、近年患者数の増加が問題視されている非アルコール性脂肪性肝炎やアルコール性肝炎、急性肝不全の原因であるアセトアミノフェン肝障害、肝虚血再灌流障害などへの関与が報告されている。本研究では、肝臓に特異的なフェロトーシスの制御因子として、コレステロール合成酵素の1つであるDHCR7を同定した。DHCR7の阻害剤は肝細胞のフェロトーシスを抑制し、肝虚血再灌流障害を軽減した。これらから、DHCR7を標的とした治療はフェロトーシス関連肝疾患に有効であると期待される。

研究成果の概要(英文)：We identified 7-dehydrocholesterol reductase (DHCR7), the terminal enzyme of cholesterol biosynthesis, as a novel regulator of ferroptosis in hepatocytes. Genetic and pharmacological inhibition (with AY9944) of DHCR7 suppressed lipid peroxidation and ferroptosis in human hepatocellular carcinoma Huh-7 cells. DHCR7 inhibition increased its substrate, 7-dehydrocholesterol (7-DHC), and extrinsic 7-DHC supplementation in turn suppressed ferroptosis. 7-DHC-derived oxysterol metabolite, 3,5-dihydroxycholest-7-en-6-one (DHCEO), was increased by a ferroptosis inducer RSL-3 in DHCR7-deficient cells, suggesting that the ferroptosis-suppressive effect of DHCR7 inhibition was driven by intracellular 7-DHC as a radical scavenger. AY9944 suppressed ferroptosis in murine primary hepatocytes in vitro and systemic administration of AY9944 inhibited hepatic ischemia-reperfusion injury in vivo. In conclusion, DHCR7 inhibition is a potential therapeutic option for ferroptosis-related liver diseases.

研究分野：消化器外科学

キーワード：フェロトーシス 細胞死 鉄 脂質酸化 肝虚血再灌流障害 オキシステロール

1. 研究開始当初の背景

鉄依存的な脂質過酸化物の蓄積により惹起される新規細胞死である Ferroptosis が 2012 年に報告され、癌や様々な疾患に対する治療標的として大きな注目を集めている。Ferroptosis は、細胞内グルタチオンペルオキシダーゼ 4 (GPX4) の作用が直接的、もしくは細胞内グルタチオン (GSH) の低下によって間接的に阻害された場合に、鉄依存的な脂質過酸化物の蓄積によってもたらされる新規細胞死である。Ferroptosis は元々、RAS 遺伝子変異を有する癌細胞を選択的に殺生する低分子化合物のスクリーニングから見出された細胞死であり、様々ながん細胞が Ferroptosis 感受性を有しており、これを誘導することが新たながん治療につながると期待されている。一方で近年、癌治療の標的としての役割の他に、神経変性疾患や心血管・肺・腎疾患などの病態への関与が報告されており、Ferroptosis から対象となる臓器・細胞を保護することが病態の治療・予防につながると考えられている。我々は自治医科大学・移植外科での生体肝移植症例 202 例を解析し、ドナー鉄過剰状態が肝移植時の肝虚血再灌流障害における独立した危険因子であることを見出し、この病態に Ferroptosis が重要な役割を果たすことを明らかにした (Yamada, et al. *Am J Transplant*, 2020)。また、解熱鎮痛薬のアセトアミノフェンによる急性肝不全発症における Ferroptosis の役割を見出し、そこで生じる脂質過酸化が長鎖脂肪酸アシル CoA 合成酵素 (ACSL4) 依存的なアラキドン酸を代表とする n-6 系多価不飽和脂肪酸のラジカル酸化 (自動酸化) 反応によってもたらされることを生体レベルで解明した (Yamada, et al. *Cell Death Dis*, 2020)。その他にも、鉄代謝異常であるヘモクロマトーシス、近年患者数の増加数が問題視されている非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) やアルコール性肝疾患における Ferroptosis の関与が、近年報告されている。

我々は、肝臓 (特に肝細胞) は、鉄や GSH、脂質の代謝において中心的な役割を果たすことから、様々な肝疾患における Ferroptosis の関与に加え、臓器・細胞特異的な Ferroptosis 制御機構が存在すると考えるに至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は肝臓、特に肝細胞に特異的な Ferroptosis の制御因子を探索し、それによる Ferroptosis 制御の分子機構を解明するとともに、これを応用した Ferroptosis 関連肝疾患に対する新たな治療法を開発することである。

3. 研究の方法

(1) 肝細胞特異的フェロトーシス制御因子の探索と分子機構解明、及び候補薬剤の選出

肝癌由来細胞株 Huh-7 に、CRISPR/Cas9 ライブラリーを導入し、GPX4 阻害剤である RSL-3 による ferroptosis 誘導を 4 回反復して行う。ferroptosis 耐性細胞を回収し、遺伝子発現を次世代シーケンサーで解析する。得られた結果を元に、候補遺伝子を選出後述する 7-dehydrocholesterol reductase (DHCR7) し、欠損細胞を作製し、ferroptosis 抑制効果を検証する。さらに、DHCR7 の基質となる 7-dehydrocholesterol (7-DHC)、及び下流のコレステロールを低下させる Methyl-β-cyclodextrin (Mβ-CD) をの添加を行い、ferroptosis 抑制効果を検討する。DHCR7 欠損・阻害下における細胞内 7-DHC 量と、その酸化生成物の 1 つである DHCEO について LC-MS/MS で解析する。

(2) マウス初代肝細胞、肝虚血再灌流障害モデルでの検討

マウス初代肝細胞を分離・培養し、フェロトーシス誘導を行い、AY9944 の抑制効果を検討する。マウス部分肝虚血再灌流障害 (70% 虚血 1 時間、再灌流 3 時間) を行い、開腹の 1 時間前に AY9944 を腹腔内投与し、その効果を検討する。

4. 研究成果

(1) 肝細胞特異的フェロトーシス制御因子の探索と分子機構解明、及び候補薬剤の選出
肝癌由来細胞株である Huh7 に約 20,000 種類の sgRNA からなる CRISPR/Cas9 ライブラリーを導入し、RSL-3 刺激を 4 回反復して行った。得られたフェロトーシス耐性細胞とコントロール細胞の遺伝子発現を次世代シーケンサーで解析したところ、DHCR7 欠損細胞が多数を占めた。(図 1) DHCR7 欠損細胞を作製して検討したところ、RSL-3 刺激に対して抵抗性を示し

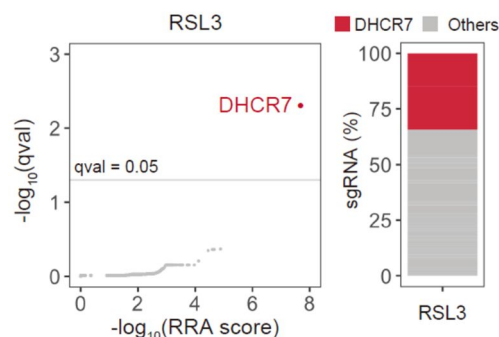


図 1 CRISPR/Cas9 スクリーニング結果

図 1) DHCR7 欠損細胞を作製して検討したところ、RSL-3 刺激に対して抵抗性を示し

た(図 2)。DHCR7 の阻害剤である AY9944 を添加した場合にも、Huh-7 は RSL-3 刺激や、GPX4 欠損細胞における ferroptosis に対して耐性を示した。さらに、DHCR7 の欠損下では ferroptosis に特徴的な脂質酸化マーカーの抑制が確認された。

DHCR7 はコレステロール合成経路の最終段階に寄与する酵素であり、7-DHC をコレステロールへ返還する。DHCR7 欠損・阻害下では細胞内で 7-DHC が蓄積する一方で、コレステロールの低下が生じる。細胞外から 7-DHC を添加したところ、RSL-3 や GPX4 欠損細胞における ferroptosis に耐性を示した。一方で、M⁻CD による細胞内コレステロールの引き抜きを誘導した場合には、フェロトシス抑制効果は認められなかった。すなわち、DHCR7 欠損・阻害下での ferroptosis 抑制効果は細胞内に蓄積した 7-DHC が寄与することが示唆された。

DHCR7 欠損細胞、及び AY9944 で処理した細胞を用いて 7-DHC を LC-MS/MS で測定したところ、7-DHC の顕著な増加が確認できた。(図 3)細胞内において 7-DHC は DHCR7 によってコレステロールへ返還されるほか、紫外光によってプロビタミン D3 に、また異性化酵素によって 8-DHC にも変化する。一方で 7-DHC は構造的にフリーラジカルに対して高い反応性を示すことが知られている。Porter らは、コレステロールや不飽和脂肪酸の脂質酸化反応の速度を規定するペルオキシラジカルと脂質の反応速度定数(k_p)が、リノール酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸に比較して、7-DHC では非常に高く、フェロトシスに重要とされるアラキドン酸の約 11 倍であると報告している。そこで、代表的な 7-DHC 由来オキシステロールである DHCEO を LC-MS/MS で測定したところ、DHCR7 欠損細胞でのみ DHCEO は検出され、さらに RSL-3 刺激によって有意な増加が認められた。(図 4)これらから、DHCR7 欠損・阻害下での ferroptosis 抑制効果は、細胞内に蓄積した DHCEO が優先的に酸化されることで細胞膜多価不飽和脂肪酸酸化が抑えられることによると考えられた。

(2) マウス初代肝細胞、肝虚血再灌流障害モデルでの検討

DHCR7 の正常細胞・組織での発現は、元々コレステロール合成酵素であることを反映して肝臓や副腎で高い。正常肝細胞における DHCR7 欠損による ferroptosis 抑制効果を検討するため、マウス初代肝細胞を分離・培養し検討したところ、AY9944 を添加した場合に RSL-3 刺激に対して抵抗性を示した。さらに、生体内での役割を検討するため、ferroptosis 関連肝疾患モデルとして確立している肝虚血再灌流障害モデルマウスを用いて検討した。AY9944 を腹腔内投与した場合に肝虚血再灌流障害における組織障害、血清 AST、ALT 値の上昇は有意に抑制された。これらの結果から、DHCR7 阻害によるフェロトシス制御は、生体内においても有効であり、ferroptosis 関連肝疾患に対する有効な治療標的になり得ることが示された。

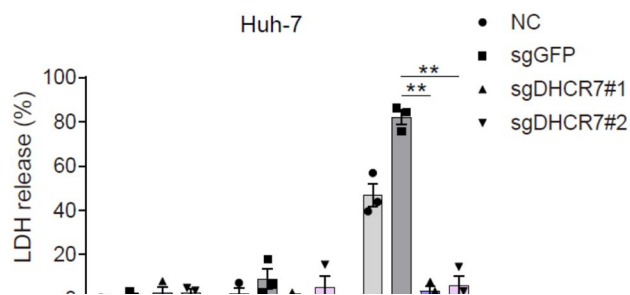


図 2 DHCR7 欠損細胞における ferroptosis 抑制効果

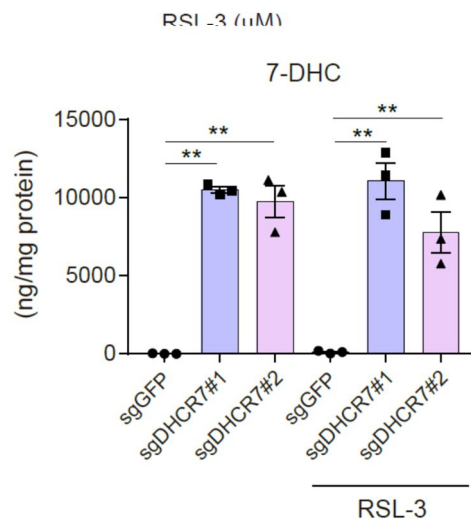


図 3 DHCR7 欠損細胞における 7-DHC 蓄積

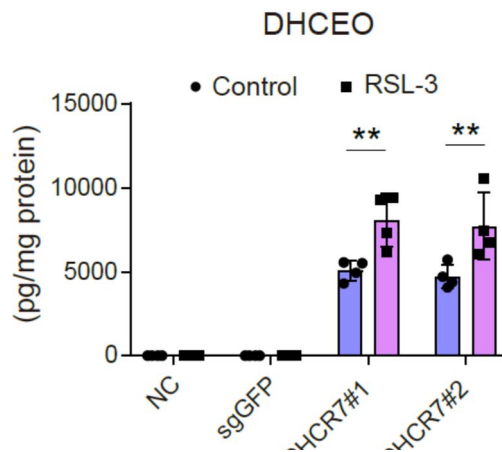


図 4 DHCR7 欠損細胞における DHCEO 産生

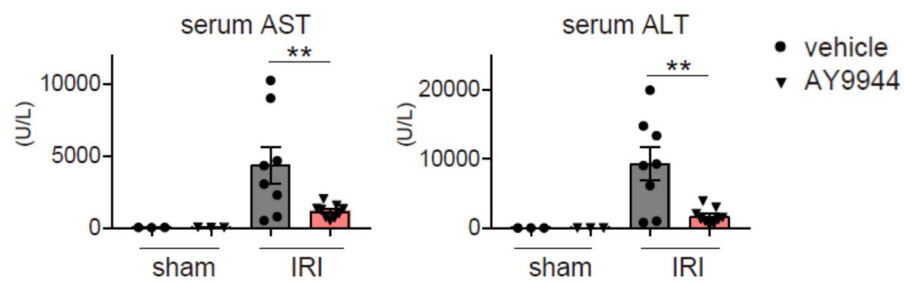


図 4 AY9944 による肝虚血再灌流障害 (IRI) 抑制効果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山田直也
2. 発表標題 肝特異的フェロトーシス制御機構の解明とこれを利用した新規治療法の開発
3. 学会等名 第47回日本臓器保存生物医学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------