

令和 6 年 4 月 28 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09143

研究課題名（和文）フェロトーシス阻害による脳虚血再灌流障害への新たな治療アプローチの検証

研究課題名（英文）The efficacy of novel treatment method to block Ferroptosis for ischemic stroke

研究代表者

栗栖 宏多 (Kota, Kurisu)

北海道大学・医学研究院・特任助教

研究者番号：30869839

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：脳虚血再灌流障害モデルにおける、Deferoxamin(DFO)のフェロトーシス抑制と細胞内鉄の蓄積の関係などを検討し、結果として、ラット虚血再灌流モデルは、フェロトーシスと細胞内鉄の増加を引き起こした。DFOの投与は、細胞内鉄の蓄積を抑制する効果があったが、ミトコンドリアの縮小などの明らかなフェロトーシスの抑制は見られなかった。神経症状については、DFOの投与は有意な改善効果を示さなかった。以上から、脳虚血再灌流障害における細胞内鉄とフェロトーシス抑制は別個のメカニズムによるものであり、今回使用したDFOの容量では鉄代謝対してのみ有効である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳虚血再灌流障害は世界的に有病率の高い脳卒中治療の合併症として発生し、高い致死率や後遺症を引き起こす重大な問題を解決する可能性があるという点が社会的に意義があることである。本研究で用いたDFOは、臨床的に安全性が確認されており、既存の治療法と併用することで、脳虚血再灌流障害の予防や改善に効果を示す可能性がある。今後は、DFO以外の鉄キレート剤や、ミトコンドリアの機能を回復させる薬剤など、他の治療薬の有効性や副作用についても検討する必要がある。以上のことを通して、脳虚血再灌流障害の根本的な治療法の開発に向けて、さらなる研究を進める予定である。

研究成果の概要（英文）：The relationship between ferroptosis inhibition and intracellular iron accumulation with deferoxamine (DFO) in a model of rat cerebral ischaemia and re-reflux injury models. The rat ischaemia-reflux model caused more ferroptosis and more iron in cells. DFO stopped iron from building up in cells, but didn't stop the cell death that causes ferroptosis. DFO did not help with neurological symptoms. These results show that the mechanisms for reducing intracellular iron and inhibiting ferroptosis in cerebral ischaemia-reflux injury are different. The dose of DFO used in this study may only affect iron metabolism.

研究分野：脳神経外科

キーワード：Ferroptosis reperfusion injury

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

急性期脳梗塞に対し、血管再開通療法が成功した場合でも脳虚血再灌流障害により障害が悪化することが知られている。近年新たな細胞死としてフェロトーシスが発見され、中枢神経系の疾患や中枢神経系以外の臓器の虚血再灌流障害でこのタイプの細胞死が密接に関与していることが明らかになってきた。この細胞死は鉄依存性であり、鉄のキレート剤で抑制されることが知られている。しかし、脳虚血再灌流障害の際のフェロトーシスの関与は明らかでなく、鉄のキレート剤による治療効果も不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は脳虚血再灌流障害とフェロトーシスの関連性を明らかにし、脳虚血再灌流障害に対して、鉄のキレート剤によるフェロトーシス抑制による治療効果の確認とその機序を解明することにある。そこで以下の課題を明らかにするための研究を計画した。

脳虚血再灌流とフェロトーシスとの関連性の確認

DF0 による、フェロトーシスを抑制効果の確認

DF0 がフェロトーシスを抑制するとしたら、その機序ならびに治療効果の確認

3. 研究の方法

RAT 脳虚血再灌流モデルを作成し、コントロール群と DF0 投与群の 2 群での比較検討を行った。それぞれの群で脳梗塞体積、脳浮腫、血液脳関門の破綻の評価を行った。

脳虚血再灌流モデルの作成は以下の要領で行なった。

SD ラットの右総頸動脈を露出し、スレッドを頸動脈に挿入し、1 時間の一時閉塞を行い、その後、再還流を行うことによって、モデルを作成した。

得られた脳組織に免疫染色 (CD34 染色, Apoptaq) 及び Western blot (Caspase-3, Bcl-x/Bcl-2, AQP4, GPX-4, HIF-) を主に行なった。

MDA アッセイおよび SOD アッセイ

脳組織を電子顕微鏡による観察

ベルリン青染色法

神経症状評価 (1 週間・3 か月)

4. 研究成果

安定したモデルの作成には成功したが、脳虚血再還流から 3 日後と 7 日後で、脳梗塞体積に 2 群間に明らかな有意差を認めることはできなかった。また脳浮腫体積、血液脳関門の破綻に関しても明らかな有意差は認めなかった。

2 群間で Caspase-3 の発現、GPX-4 の発現に有意なく、その他の染色も同様であった。

MDA アッセイおよび SOD アッセイでは DF0 群で濃度が上昇している傾向にあるものの有意差は認めなかった。

2 群において電子顕微鏡による観察を行ったところミトコンドリアの縮小が両方で認められた

ベルリン青染色法を用い、細胞内の鉄の蓄積を検出した。まずは、脳虚血再還流モデルから摘出した脳組織に上記染色を行い、コントロール脳と比べて細胞内の鉄の量がより多く検出された。その後、虚血再灌流障害モデルに対して Deferoxamin (DF0) 群とコントロール治療群に分けて DF0 が鉄の脳組織への蓄積を抑制することが確認された。

ラットの DF0 群とコントロール群での短期での神経症状の変化はなかったため、長期的な神経症状の評価 (3 か月) を行なったがやはり有意差は認められなかった。

結果のまとめ

本研究では、ラットの脳虚血再還流障害モデルを用いて、ミトコンドリアと細胞内鉄の関係について検討した。これらの結果から、ミトコンドリアと細胞内鉄の両方が脳虚血再還流障害に関与している可能性が示唆された。しかし、DF0 の投与が神経症状に影響しなかったことから、鉄キレート療法の効果には限界があると考えられた。

今後の展望について

本研究では、ミトコンドリアと細胞内鉄の両方が脳虚血再還流障害に関与している可能性を示した。この関係は、ミトコンドリアの酸化ストレスによる損傷と細胞内鉄の過剰な蓄積という二重の負のフィードバックによって引き起こされると考えられる。しかし、その詳細なメカニズム

はまだ明らかになっていない。

そこで、以下の点について今後の研究が必要であると考えられた。

- ミトコンドリアと細胞内鉄の相互作用による酸化ストレスの発生と制御の機序の解明。特に、ミトコンドリアの鉄輸送体や鉄代謝酵素の役割や調節機構について詳細に調べる必要がある。
- 酸化ストレスによる神経細胞死と神経炎症の発症と進行のメカニズムの解明。酸化ストレスは、脳虚血再還流障害において、神経細胞のアポトーシスやネクローシス、グリア細胞の活性化やサイトカインの放出などを引き起こすことが知られているが、その分子機序はまだ十分に理解されていない。この機序を確認する必要がある。
- 鉄キレート療法の有効性と安全性の評価と改善のための動物実験と臨床試験の実施。鉄キレート療法は、細胞内鉄の除去によって酸化ストレスを抑制し、脳虚血再還流障害の予防や治療に有効であると考えられるが、その効果はまだ確立されていない。今回の研究とは異なる鉄キレート剤の種類を試すことや投与量や投与期間などの最適化、副作用の低減や回避の方法などについても検討する必要がある。
- 他の鉄調節因子やミトコンドリア機能調節因子の同定とスクリーニング。鉄調節因子やミトコンドリア機能調節因子は、脳虚血再還流障害におけるミトコンドリアと細胞内鉄のバランスを調整する可能性がある。これらの因子の同定やスクリーニングによって、新たな治療標的や治療薬の開発につながる可能性がある。

これらの研究により、脳虚血再還流障害の病態理解と治療法の開発に貢献できると期待される。また、ミトコンドリアと細胞内鉄の関係は、他の神経変性疾患や代謝性疾患にも関連している可能性があるため、広範な応用が見込まれる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	鐙谷 武雄 (Abumiya Takeo) (80270726)	北海道大学・医学研究院・客員研究員 (10101)	
研究分担者	長内 俊也 (Osanai Toshiya) (90622788)	北海道大学・大学病院・講師 (10101)	
研究分担者	藤村 幹 (Fujimura Miki) (00361098)	北海道大学・医学研究院・教授 (10101)	

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