

令和 6 年 4 月 24 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16090

研究課題名（和文）ドキシソルビシン心筋症におけるフェロトーシス誘導の分子機序解明と新たな治療法の確立

研究課題名（英文）Elucidating the molecular mechanisms of ferroptosis in doxorubicin cardiomyopathy and developing novel therapeutics targeting ferroptosis

研究代表者

池田 昌隆（Ikeda, Masataka）

九州大学・大学病院・特任助教

研究者番号：10567382

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：アントラサイクリン系抗がん剤であるドキシソルビシン（DOX）による心毒性においては、ミトコンドリアに鉄が集積することで生じる鉄依存性の細胞死・フェロトーシスが主たる病態基盤であることを明らかにしてきた。本研究では、DOXがミトコンドリアDNAに入り込む一方、DOXによりヘム合成の律速酵素であるALAS1が低下することにより、DOXと鉄がそれぞれミトコンドリアに蓄積し、フェロトーシスが誘導されていることを明らかにした。さらに、解明した病態機序に基づき、ALAS1が合成する5-アミノレブリン酸がDOXによる鉄過剰、フェロトーシス、さらに心機能障害を抑制することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ドキシソルビシン（DOX）は様々ながん種に適応となる抗がん剤であるが、総投与量依存性に心毒性を生じる。その結果として発症する心筋症は予後不良であり、さらなる病態解明と治療法の開発が喫緊の課題となっている。鉄依存性の細胞死であるフェロトーシスが心毒性の主たる病態基盤であるとのこれまでの研究成果を踏まえ、本研究ではフェロトーシスの誘導に至る詳細な分子機序を解明し、アミノレブリン酸が病態機序に沿った治療法になることを明らかにした。本研究結果により、フェロトーシスに基づくドキシソルビシン心毒性の分子機序を解明し、病態機構に基づいたアミノレブリン酸を用いた新規治療の開発基盤を構築した。

研究成果の概要（英文）：We have shown that ferroptosis, an iron-dependent form of cell death, plays a pivotal role in doxorubicin (DOX) cardiotoxicity. Our present study has elucidated that DOX enters the mitochondria by intercalating into mitochondrial DNA and reduces ALAS1, the rate-limiting enzyme in heme synthesis. These phenomena in cardiomyocytes lead to the accumulation of both DOX and iron in the mitochondria, ultimately causing ferroptosis. Based on these findings, we have shown that 5-aminolevulinic acid (5-ALA), synthesized by ALAS1, can mitigate iron overload, ferroptosis, and further cardiac dysfunction induced by DOX.

研究分野：循環器内科学

キーワード：アントラサイクリン心毒性 ドキシソルビシン心筋症 フェロトーシス アミノレブリン酸

## 1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍に対する治療の飛躍的な進歩によりがん自体の寛解率および生命予後の改善が達成され、がんサバイバーとされる生存者が増えている。一方で、悪性腫瘍に伴う一連の治療および経過により心血管系の合併症を伴い、これらの合併症が QOL および長期生命予後において極めて重要な要因であることが相次いで報告されている (Patnaik et al, *Breast Cancer Res* 2011, Armstrong et al., *NEJM* 2016)。これらの背景を踏まえ、QOL および生命予後のさらなる改善に向けた集学的な治療を目指し、悪性腫瘍に伴う心血管病について新領域 Cardio-Oncology として多方面から研究が活性化している。

アントラサイクリン系抗がん剤であるドキソルビシン (Doxorubicin; DOX) は 1970 年代に臨床応用されて以来、依然として多くの悪性腫瘍に対して使用される抗がん剤であり、その有効性の高さから現在でも乳がんなどの固形腫瘍、悪性リンパ腫や白血病などの血液腫瘍に対する標準治療薬である。一方で、DOX は用量依存性に心毒性を有し、心毒性のために悪性腫瘍に対する治療が不十分となるだけでなく、結果として発症する DOX 心筋症は他の心筋症と比較して予後不良である (Felker et al., *NEJM* 2000)。これまでも DOX による心毒性の病態解明が取り組まれてきたが、依然として有効な予防法は確立していない。

申請者らは 2012 年に Dixon らにより報告された鉄依存性に生じる過剰な過酸化脂質に基づく新規制御性細胞死 (regulated cell death: RCD) であるフェロトーシスに着目し、世界に先駆けて DOX 心筋症の発症および進展にはフェロトーシスが最も重要な心筋傷害の病態基盤であることを明らかにしてきた (*JCI Insight* 2020)。特に、DOX により誘導されるフェロトーシスはミトコンドリアへの鉄の集積を契機として生じており、ミトコンドリアを端緒として誘導されていること (ミトコンドリア依存性フェロトーシス) を明らかにしてきた。しかしながら、依然として DOX によりミトコンドリア依存性フェロトーシスが誘導される分子機序については明らかではなく、フェロトーシスを標的とした治療法は確立していない。

## 2. 研究の目的

本研究では、DOX 心筋症の病態形成における主たる制御性細胞死であるフェロトーシスが心筋細胞のミトコンドリアを端緒として誘導される分子機序を解明し、本分子機序の解明を通じて新たな治療標的を同定し、DOX 心筋症に対する新たな予防法の proof of concept を確立すること、を目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、DOX と鉄が複合体を形成し、脂質二重膜に対して強い酸化能を示す報告 (Miura et al., *Pharmacol Toxicol* 1991) を踏まえた上で、DOX と鉄が心筋細胞のミトコンドリアに集積する分子機序を明らかにし、DOX がフェロトーシスを誘導する仕組みの解明を目指した。DOX のミトコンドリアへの集積については、DOX が DNA にインターカレーションする特性に着目し、ミトコンドリア DNA (mtDNA) にインターカレーションすることで DOX がミトコンドリアに集積するとの仮説を以下 (1) に示す方法にて検証した。また、ミトコンドリアに鉄が蓄積する分子機序についてはヘム合成経路に着目し、DOX によるヘム合成障害がミトコンドリア鉄の利用不全を来し、鉄過剰を生じているとの仮説を以下 (2) に示す方法にて検証した。

### (1) DOX がミトコンドリアへ集積する機序における mtDNA の役割の検証

培養心筋細胞に DOX を添加し、自家蛍光に基づき集積するオルガネラを同定した。mtDNA 生合成制御分子である mtDNA ヘリカーゼ (*Peo1*, Twinkle) を siRNA によりノックダウン、もしくはアデノウイルスにより過剰発現させ、mtDNA 量を増減させた培養心筋細胞においてミトコンドリアへの DOX 集積量、過酸化脂質、フェロトーシスを評価した。Twinkle 過剰発現マウスにドキソルビシン心筋症モデルを作成し、心エコーによる心機能、心筋組織の過酸化脂質、フェロトーシス (TUNEL 染色) を評価した。

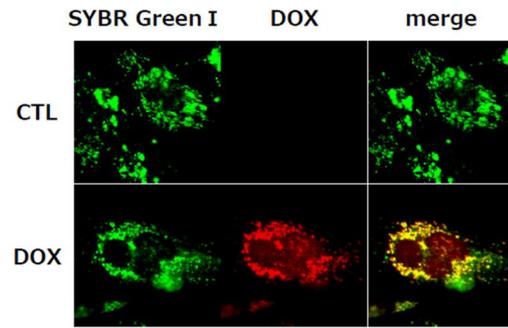
### (2) DOX によりミトコンドリアに鉄が集積する機序におけるヘム合成経路についての検証

培養心筋細胞に DOX を添加し、ヘム合成経路の代謝酵素の発現、ヘム合成を評価した。アデノウイルスによりヘム合成経路の律速酵素であるアミノレブリン酸合成酵素 1 (ALAS1) を過剰発現させ、DOX によるミトコンドリア鉄、過酸化脂質、フェロトーシスを評価した。ALAS1 が合成するアミノレブリン酸を添加し、DOX によるミトコンドリア鉄、過酸化脂質、フェロトーシスを評価した。アミノレブリン酸をドキソルビシン心筋症モデルに投与し、DOX 心筋症における心機能障害、ミトコンドリア鉄、フェロトーシスを評価した。

#### 4. 研究成果

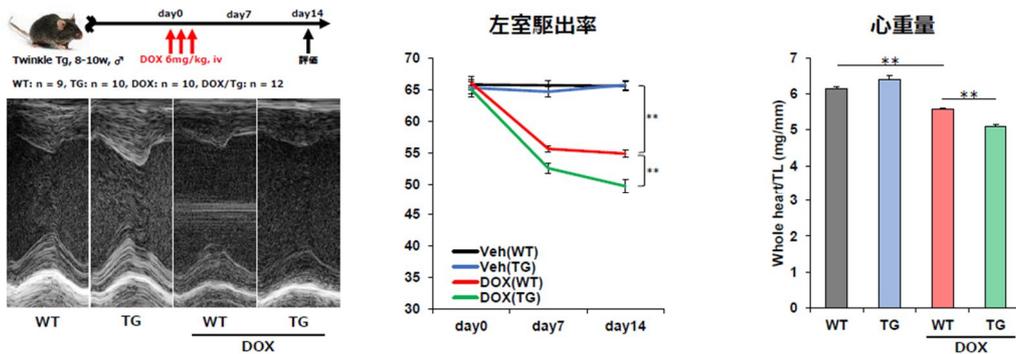
##### (1) DOX がミトコンドリアへ集積する機序における mtDNA の役割の検証

DOX は培養心筋細胞において核とミトコンドリア (ミトコンドリア DNA) に集積した培養心筋細胞に DOX を添加したところ、DOX の自家蛍光によりその局在を検討したところ、核に集積するとともに MitoBright LT により標識したミトコンドリアに集積していた。さらに、SYBR GreenI によりミトコンドリア DNA を選択的に標識したところ、DOX は特にミトコンドリア DNA に集積していることが明らかとなった。  
(右図: SYBR GreenI により特異的に標識した mtDNA と DOX は一致しており、DOX は mtDNA に集積していた)



mtDNA 量依存性に DOX はミトコンドリアに集積し、フェロトーシスを誘導した siRNA を用いて mtDNA ヘリカーゼをノックダウンしたところ、mtDNA は約 25%減少した。本条件下で DOX を添加したところ、ミトコンドリアへの DOX 集積量は約 20%減少し、DOX による過酸化脂質およびフェロトーシスは有意に抑制された。対照的に、アデノウイルスを用いて mtDNA ヘリカーゼを過剰発現したところ、mtDNA は約 1.5 倍に増加した。本条件下で DOX を添加したところ、ミトコンドリアへの DOX 集積量は約 1.5 倍に増加し、DOX による過酸化脂質およびフェロトーシスは有意に増加した。

Twinkle 過剰発現マウスでは、心筋細胞のフェロトーシスおよび心機能障害は増悪した心筋組織において mtDNA が約 2 倍に増加している Twinkle 過剰発現マウスにおいてドキシソルピシン心筋症モデルを作成した。Twinkle 過剰発現マウスにおいて DOX による心機能 (left ventricular ejection fraction; LVEF) 障害および心筋萎縮は増悪し、血清学的な心筋傷害マーカー (LDH/CK) は増加した。Twinkle 過剰発現マウスにおいて DOX により増加する過酸化脂質 (MDA および Acrolein) はさらに増加しており、組織学的評価では線維化および TUNEL 染色により標識される細胞死は増悪していた。



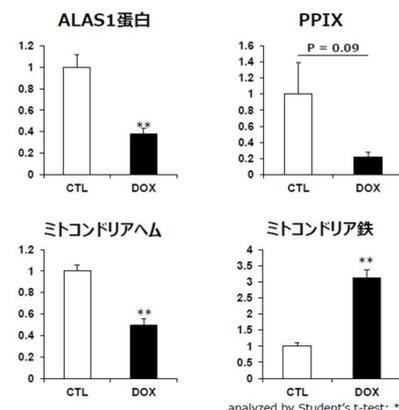
analyzed by One-way ANOVA with post-hoc Tukey's HSD Test; \*\*P<0.01.

(上図: Twinkle 過剰発現マウスでは DOX による心機能障害および心臓萎縮がより顕著に認められた)

##### (2) DOX によりミトコンドリアに鉄が集積する機序におけるヘム合成経路についての検証

培養心筋細胞への DOX の添加は ALAS1 を誘導させ、ヘム合成を障害した培養心筋細胞において DOX を添加し、ヘム合成経路の代謝酵素の発現量を評価したところ、ALAS1 の発現量、ヘム合成の中間代謝物である protoporphyrin (PpIX) が低下しており、ミトコンドリアのヘム量も低下していた。一方で、ミトコンドリア内の鉄量は有意に増加していた。

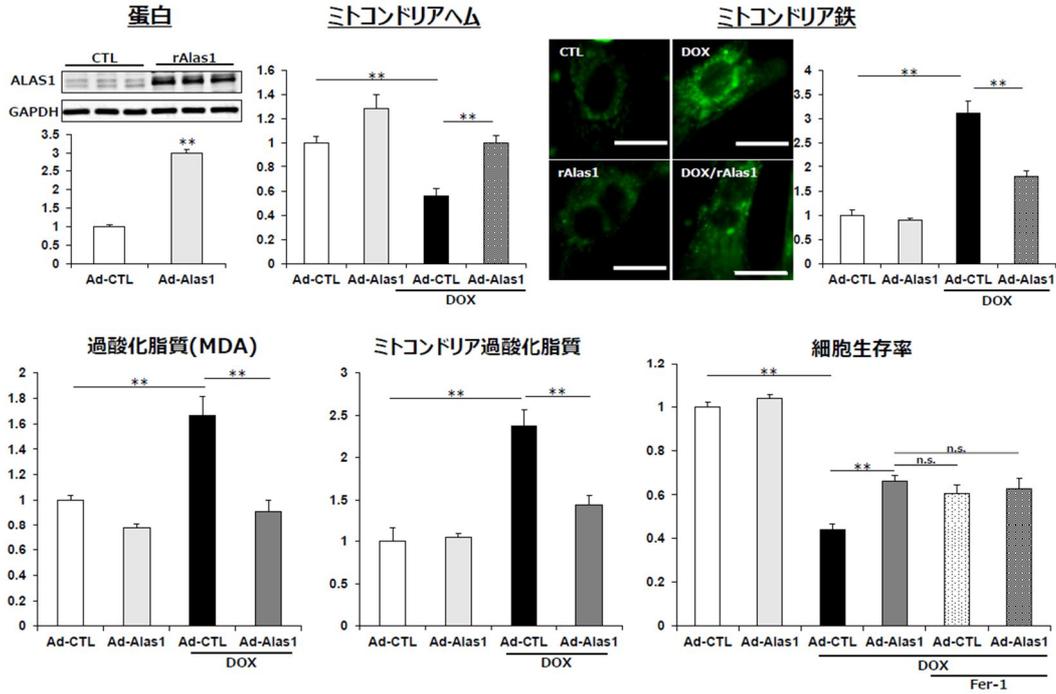
(右図: 培養心筋細胞への DOX 添加 24 時間後に細胞を解析した。ALAS1 発現量、PpIX、ミトコンドリアヘムは低下し、ミトコンドリア鉄は増加していた)



analyzed by Student's t-test; \*\*P<0.01.

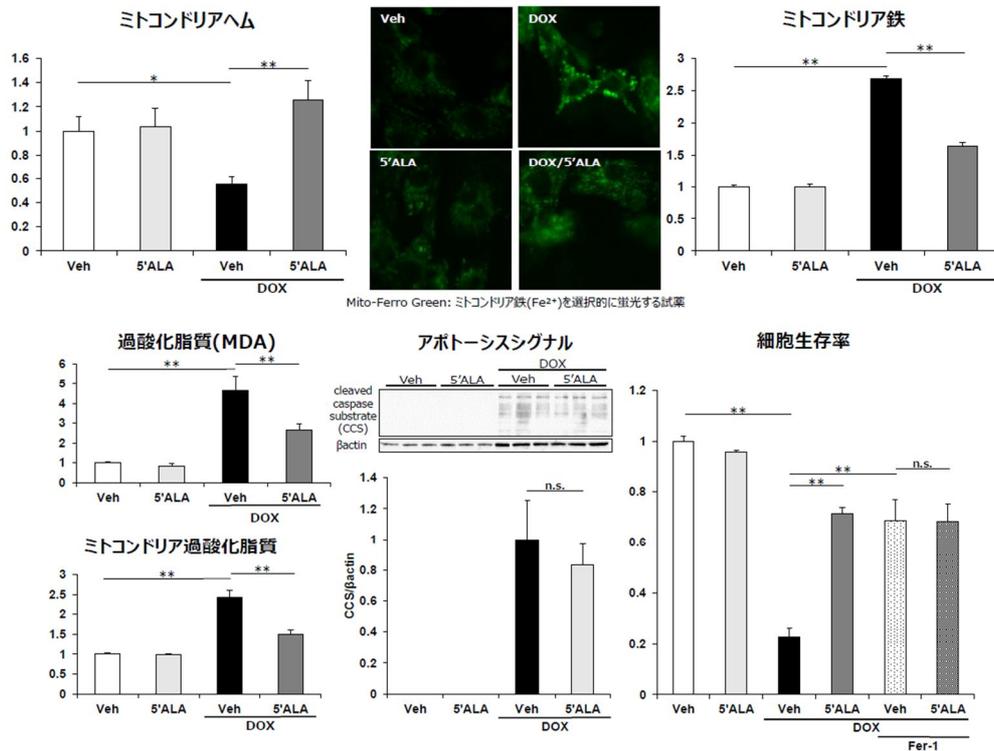
培養心筋細胞において ALAS1 過剰発現は DOX によるミトコンドリア鉄およびフェロトーシスを抑制した

アデノウイルスを用いて ALAS1 を過剰発現し、DOX によるフェロトーシスを評価した。ALAS1 の過剰発現により DOX によるヘム合成低下およびミトコンドリアへの鉄の蓄積は有意に改善した。さらに、ALAS1 過剰発現は DOX による過酸化脂質およびフェロトーシスを有意に抑制した（下図）。



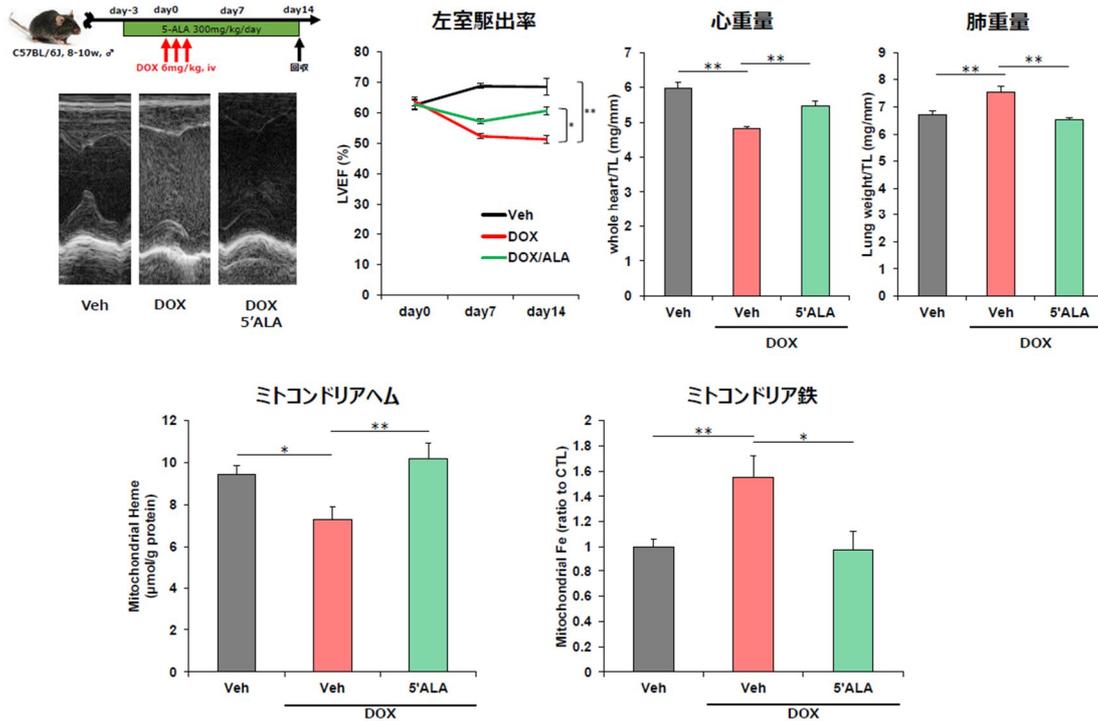
培養心筋細胞においてアミノレブリン酸添加は DOX によるミトコンドリア鉄およびフェロトーシスを抑制した

ALAS1 が合成するアミノレブリン酸を添加し、DOX によるフェロトーシスを評価した。アミノレブリン酸の添加により DOX によるヘム合成低下およびミトコンドリアへの鉄の蓄積は有意に改善した。さらに、アミノレブリン酸は DOX による過酸化脂質およびフェロトーシスを有意に抑制した。なお、DOX によりアポトーシスも誘導されるが、アミノレブリン酸の添加ではアポトーシスは抑制されなかった（下図）。



ドキシソルピシン心筋症モデルにおいてアミノレブリン酸の投与はフェロトーシス誘導を抑制し、心機能障害を改善した

ドキシソルピシン心筋症モデルにアミノレブリン酸を投与したところ、DOX による心筋組織におけるミトコンドリアへの鉄蓄積を有意に抑制した。さらに、血清学的な心筋傷害マーカー (CK/LDH) を抑制し、DOX による心機能 (LVEF) 障害および心筋萎縮を改善した。アミノレブリン酸の投与により DOX により増加する過酸化脂質 (MDA および Acrolein) は抑制され、心筋組織の線維化および TUNEL 染色により標識される細胞死は改善した (下図)。



analyzed by One-way ANOVA with post-hoc Tukey's HSD Test; \*P<0.05, \*\*P<0.01.

以上より、1) DOX は mtDNA 量依存性に心筋細胞のミトコンドリアへ集積し、DOX のミトコンドリアへの集積によりフェロトーシスを誘導していること、2) DOX はヘム合成経路の律速酵素である ALAS1 およびヘム合成を低下させ、結果としてミトコンドリア内の鉄が増加し、フェロトーシスの契機となっていること、3) ALAS1 が合成するアミノレブリン酸の添加および投与によりミトコンドリアへの鉄の蓄積およびフェロトーシスは抑制され、DOX による心筋障害が改善することを明らかにした。

抗がん剤は腫瘍細胞の高い増殖能を標的とすることで、正常細胞より優位に腫瘍細胞に作用し、抗がん作用を示すことができる。そのような抗がん剤が、増殖能が極めて低い心筋細胞優位に毒性を示す原理的な背景は明らかでなかった。本研究により、mtDNA 量依存性にミトコンドリアに集積し、フェロトーシスを誘導していることが明らかとなった。心筋細胞はミトコンドリアおよびミトコンドリア DNA が他の臓器・細胞と比較して多いことから、この豊富さが他の臓器・細胞と比較して心筋細胞にフェロトーシスが生じやすい理由であることが示唆された。

ドキシソルピシン心毒性においては、以前よりミトコンドリアへの鉄蓄積がその契機となっていることが示されてきた。本研究では、DOX による ALAS1 の発現低下に起因するヘム合成障害と鉄の利用障害がミトコンドリアへの鉄蓄積の機序の一つとなっており、ALAS1 が合成するアミノレブリン酸により DOX によるミトコンドリアへの鉄の蓄積、フェロトーシス、そして心機能障害が抑制されることを明らかにした。アミノレブリン酸は内因性のアミノ酸であることから安全性が高く、実際にアラグリオ® (光線力学診断用剤) として上市されていることから、drug repurposing による新たな治療法の開発が期待される。

なお、本報告書は以下の文献に公表されたデータに基づくものである。

Ko Abe, Masataka Ikeda, Tomomi Ide, Tomonori Tadokoro, Hiroko Deguchi Miyamoto, Shun Furusawa, Yoshitomo Tsutsui, Ryo Miyake, Kosei Ishimaru, Masatsugu Watanabe, Shouji Matsushima, Tomoko Koumura, Ken-ichi Yamada, Hirotaka Imai, Hiroyuki Tsutsui. Doxorubicin causes ferroptosis and cardiotoxicity by intercalating into mitochondrial DNA and disrupting Alas1-dependent heme synthesis. *Sci Signal* 15 (758): eabn8017, 2022.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Ikeda Masataka, Ide Tomomi, Furusawa Shun, Ishimaru Kosei, Tadokoro Tomonori, Miyamoto Hiroko Deguchi, Ikeda Soichiro, Okabe Kosuke, Ishikita Akihito, Abe Ko, Matsushima Shouji, Tsutsui Hiroyuki	4. 巻 36
2. 論文標題 Heart Rate Reduction with Ivabradine Prevents Cardiac Rupture after Myocardial Infarction in Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cardiovascular Drugs and Therapy	6. 最初と最後の頁 257 ~ 262
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10557-020-07123-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miyamoto Hiroko Deguchi, Ikeda Masataka, Ide Tomomi, Tadokoro Tomonori, Furusawa Shun, Abe Ko, Ishimaru Kosei, Enzan Nobuyuki, Sada Masashi, Yamamoto Taishi, Matsushima Shouji, Koumura Tomoko, Yamada Ken-ichi, Imai Hirotaka, Tsutsui Hiroyuki	4. 巻 7
2. 論文標題 Iron Overload via Heme Degradation in the Endoplasmic Reticulum Triggers Ferroptosis in Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 JACC: Basic to Translational Science	6. 最初と最後の頁 800 ~ 819
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jacbts.2022.03.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Oh Soo-Jin, Ikeda Masataka, Ide Tomomi, Hur Kyu Yeon, Lee Myung-Shik	4. 巻 8
2. 論文標題 Mitochondrial event as an ultimate step in ferroptosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Death Discovery	6. 最初と最後の頁 414
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41420-022-01199-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Tadokoro Tomonori, Ikeda Masataka, Abe Ko, Ide Tomomi, Miyamoto Hiroko Deguchi, Furusawa Shun, Ishimaru Kosei, Watanabe Masatsugu, Ishikita Akihito, Matsushima Shouji, Koumura Tomoko, Yamada Ken-ichi, Imai Hirotaka, Tsutsui Hiroyuki	4. 巻 80
2. 論文標題 Ethoxyquin is a Competent Radical-Trapping Antioxidant for Preventing Ferroptosis in Doxorubicin Cardiotoxicity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cardiovascular Pharmacology	6. 最初と最後の頁 690 ~ 699
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/FJC.0000000000001328	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Abe Ko, Ikeda Masataka, Ide Tomomi, Tadokoro Tomonori, Miyamoto Hiroko Deguchi, Furusawa Shun, Tsutsui Yoshitomo, Miyake Ryo, Ishimaru Kosei, Watanabe Masatsugu, Matsushima Shouji, Koumura Tomoko, Yamada Ken-ichi, Imai Hiroataka, Tsutsui Hiroyuki	4. 巻 15
2. 論文標題 Doxorubicin causes ferroptosis and cardiotoxicity by intercalating into mitochondrial DNA and disrupting Alas1-dependent heme synthesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Signaling	6. 最初と最後の頁 eabn8017
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/scisignal.abn8017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 池田 昌隆
2. 発表標題 心血管疾患におけるフェロトーシス
3. 学会等名 第44回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 池田 昌隆
2. 発表標題 心血管疾患におけるフェロトーシス
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 池田 昌隆
2. 発表標題 アントラサイクリン系抗がん剤心毒性におけるフェロトーシス
3. 学会等名 第6回医薬品毒性機序研究会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ikeda Masataka
2. 発表標題 Clinical Advancements in Therapeutics Targeting Ferroptosis for Cardiovascular Diseases
3. 学会等名 第88回日本循環器学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 池田昌隆
2. 発表標題 心血管病におけるフェロトーシス
3. 学会等名 第46回日本鉄バイオサイエンス学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Abe Ko, Ikeda Masataka, Ide Tomomi, Furusawa Shun, Ishimaru Kosei, Watanabe Masatsugu, Tsutsui Hiroyuki
2. 発表標題 Mechanistic basis underlying mitochondria-dependent ferroptosis in doxorubicin-induced cardiotoxicity
3. 学会等名 第26回日本心不全学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Abe Ko, Ikeda Masataka, Ide Tomomi, Furusawa Shun, Ishimaru Kosei, Watanabe Masatsugu, Tsutsui Hiroyuki
2. 発表標題 Mechanistic basis underlying mitochondria-dependent ferroptosis in doxorubicin-induced cardiotoxicity
3. 学会等名 第39回国際心臓研究学会日本部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Abe Ko, Ikeda Masataka, Ide Tomomi, Tadokoro Tomonori, Miyamoto Deguchi Hiroko, Furusawa Sun, Ishimaru Kosei, Tsutsui Yoshitomo, Miyake Ryo, Matsushima Shouji, Tsutsui Hiroyuki
2. 発表標題 Mechanistic basis underlying mitochondria-dependent ferroptosis in doxorubicin-induced cardiotoxicity
3. 学会等名 第87回日本循環器病学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計4件

1. 著者名 池田 昌隆、井手 友美	4. 発行年 2023年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 -
3. 書名 実験医学	

1. 著者名 池田 昌隆、井手 友美	4. 発行年 2024年
2. 出版社 日本臨牀	5. 総ページ数 -
3. 書名 日本臨牀増刊号「腫瘍循環器学」	

1. 著者名 池田 昌隆、井手 友美	4. 発行年 2024年
2. 出版社 日本臨牀	5. 総ページ数 -
3. 書名 日本臨牀「心不全の診療 2024」	

1. 著者名 池田 昌隆、井手 友美、阿部弘太郎	4. 発行年 2024年
2. 出版社 医歯薬出版	5. 総ページ数 -
3. 書名 週刊「医学のあゆみ」	

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 心筋虚血再灌流傷害治療剤	発明者 池田 昌隆、井手 友美、石丸 晃成	権利者 池田 昌隆、井 手 友美、石丸 晃成、沢井製薬
産業財産権の種類、番号 特許、特願2023-180587	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 アントラサイクリン系抗がん剤の副作用の予防剤又は治療剤	発明者 池田昌隆、井手友 美、阿部巧、筒井裕 之	権利者 九州大学
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2022/011540	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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