

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08426

研究課題名(和文) フェロトーシスを基軸とした心筋障害メカニズムの解明と治療法の開発

研究課題名(英文) Development of therapeutics based on ferroptosis in myocardial injury

研究代表者

井手 友美 (Ide, Tomomi)

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号：90380625

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)：フェロトーシスは鉄依存性に生じる細胞死として2012年にDixonらによって提唱されたプログラム細胞死である。本基盤研究により、我々は、ドキソルビシン心毒性におけるフェロトーシスの役割、誘導分子機序、そしてフェロトーシスを標的とした治療法の可能性について明らかにした。ドキソルビシンによる心筋障害では、ミトコンドリアDNAのコピー数依存にドキソルビシンがミトコンドリア内に蓄積し、ミトコンドリアにおけるヘムの合成障害に起因する鉄の過剰状態が原因となり、過酸化脂質が増加し、フェロトーシスによる心機能障害が生じることを明らかにした。さらに、アミノレブリン酸投与により予防でき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

アントラサイクリン系抗がん剤(代表薬剤：ドキソルビシン, DOX)は多様な癌腫に古くから用いられている抗がん剤であり、現在でも卵巣癌、乳がん、悪性リンパ腫など多くの癌腫に対する標準治療薬である。しかし、DOXは総投与量依存性に心機能障害(心毒性)を生じ、その終末像であるドキソルビシン心筋症は極めて予後不良であることから、ドキソルビシン心毒性の病態の理解とその克服が目指されてきたが、今だ解決には至っていない。ドキソルビシンによる心筋傷害の分子機序の解明により治療ターゲットが明らかとなることで、多くの抗がん剤治療の患者が副作用としての心毒性を克服し、予後改善につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Ferroptosis is a programmed cell death proposed by Dixon et al. in 2012 as an iron-dependent cell death. With this foundational study, we have identified the role of ferroptosis in doxorubicin cardiotoxicity, the molecular mechanisms of induction, and the potential of targeting ferroptosis as a therapeutic strategy. In doxorubicin-induced myocardial injury, we found that doxorubicin accumulates in mitochondria in a mitochondrial DNA copy number-dependent manner, resulting in an iron overload state due to impaired heme synthesis in mitochondria, leading to increased lipid peroxide and cardiac dysfunction due to ferroptosis. In addition, the study showed that aminolevulinic acid administration caused a decrease in the amount of iron in the mitochondria. Furthermore, it was revealed that aminolevulinic acid administration can prevent the disease.

研究分野：循環器内科学

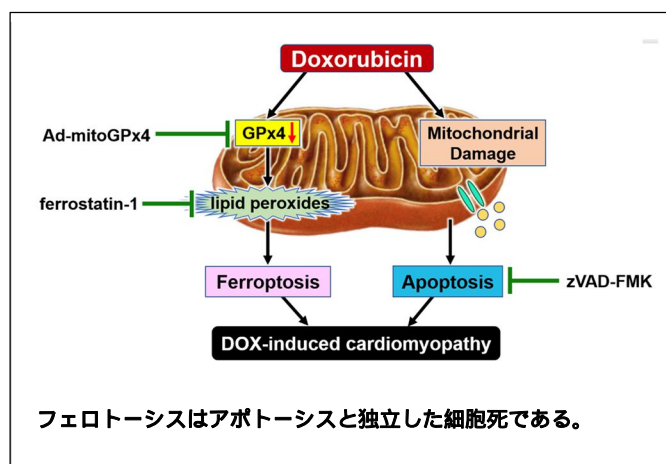
キーワード：フェロトーシス 脂質過酸化 心不全 心筋症 ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

近年、化学療法の進歩により、がんの寛解率は格段に向上してきた。一方で、薬剤による心血管系の副作用が生命予後や QOL を左右する要因となり、Cardio-Oncology (腫瘍循環器学) が注目されている。中でも、アントラサイクリン系抗がん剤のように心毒性が古くから知られた薬剤は、多くの分子標的薬が開発された現在においても、様々な悪性腫瘍で、最も使用される抗がん剤の 1 つである。アントラサイクリンによる心筋傷害は、蓄積性かつ不可逆性であり、その細胞毒性発現の機序については、酸化ストレスによるもの (Ichikawa ら JCI 2014)、鉄の蓄積によるもの (Lipshultz et al. NEJM2004)、などが報告されている。しかしながら、その心筋障害の分子機序の全容は明らかになっておらず、その有効な治療方法についてはデクスラゾキササンが唯一、一次予防のメタ解析での予防効果が認められているが、副作用の点からその臨床使用は極めて制限されている。

近年、新たなプログラム細胞死であるフェロトーシス (Dixon et al., Cell (2012)) の概念が提唱されている。フェロトーシスは、酸化リン脂質を還元する唯一の酵素である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) によって制御される、脂質酸化依存的な細胞死である。

申請者らは、本研究開始までに、ドキソルビシンによる心筋障害は、GPx4 過剰発現マウスにより改善され、またフェロトーシス阻害によりドキソルビシンによる脂質過酸化、心筋傷害、細胞死が抑制できることを明らかにした。(T. Tadokoro et al., JCI Insight 2020; 5:e132747) さらに、阻害剤を用いた細胞死評価系を用いることで、ドキソルビシンにより誘導されるフェロトーシスが、アポトーシスとは全く独立して細胞傷害に寄与することを見いだした。



しかしながら、フェロトーシスはその細胞内機序、ターゲット分子も不明であり、申請者らは、どのような分子的機序により、ドキソルビシンによるフェロトーシスが誘導されるのか、どのような機序でミトコンドリア内に蓄積するのか、どのような薬剤がフェロトーシス抑制薬となりうるのか、との“問い”に至った。

2. 研究の目的

本研究では、アントラサイクリン心筋症の分子学的機序を明らかにし、その治療法の開発をおこなうことを目的とした。特に、なぜドキソルビシンが心筋ミトコンドリアに集積するのか。

どのようなメカニズムでミトコンドリア内の鉄が増加するのか、について明らかにするとともに、分子基盤に基づいた治療法の開発を目的とした。

3. 研究の方法

1) ドキソルビシン心筋症モデルマウスの作製および mtDNA コピー数増加による心筋傷害の心筋傷害の評価

C57BL/6J マウス (8-10 週齢) に尾静脈よりドキソルビシンを 6 mg/kg を 1 日おきに 3 回投与

し、ドキシソルピシン心筋症モデルマウスを作製した。また、mtDNAヘリカーゼであるTwinkleの過剰発現マウスを用いて、mtDNA コピー数増加によるドキシソルピシンによる心筋傷害について、心臓超音波による左室駆出率、心筋組織を評価した。

仔ラット単離心筋細胞において、ドキシソルピシン投与による細胞内のドキシソルピシン蓄積について評価を行った。

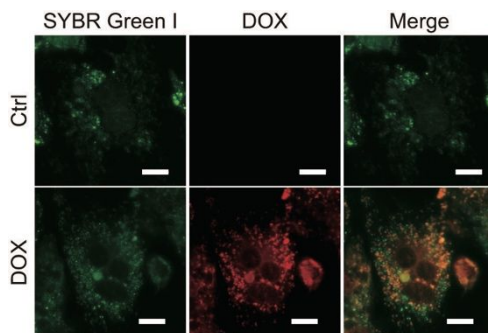
3) 5-ALA 補充による心筋傷害の抑制評価

5-ALA をドキシソルピシン投与 3 日前から投与 14 日後まで 300 mg/日/kg 腹腔内投与することで、ドキシソルピシンによるフェロトーシスならびに心筋傷害抑制効果を評価した。

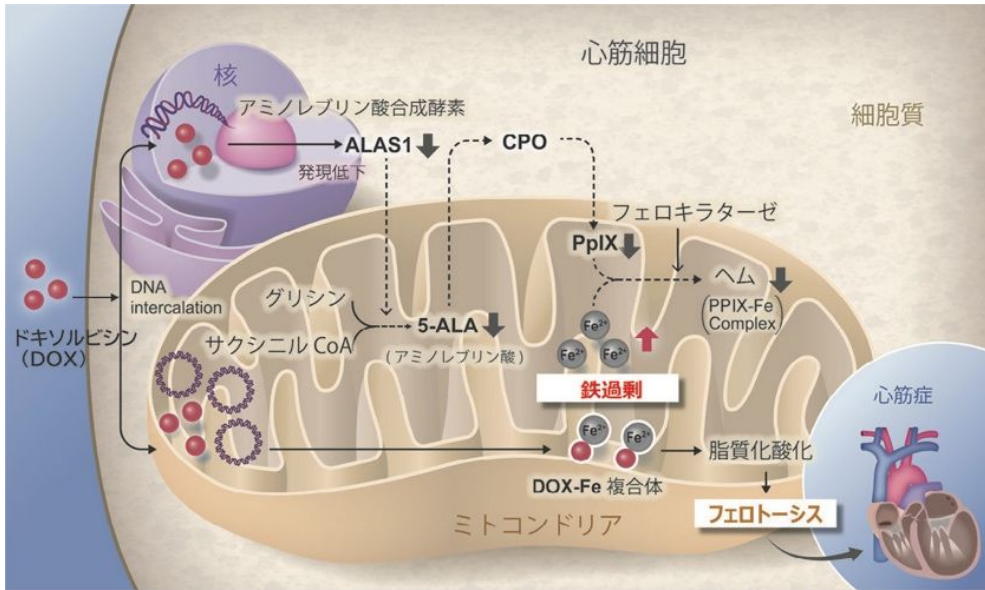
4 . 研究成果

今回の研究では、1)ドキシソルピシンは鉄と複合体を形成し、形成された複合体は脂質二重膜に対して強い酸化能を示すこと(T. Miura et al., Pharmacol Toxicol 1991;69:296-300)、2)DOX は二本鎖 DNA に intercalate する性質があること、3)鉄を活性中心とするヘムがミトコンドリアで合成されることに着目した。

ミトコンドリアは核 DNA とは異なる独自のミトコンドリア DNA (mtDNA)を有し、1つのミトコンドリアに数百コピーの mtDNA を有する。ドキシソルピシンはこの mtDNA に組み込まれ、mtDNA コピー数依存性にミトコンドリアに集積し、鉄との複合体を形成することで過剰な過酸化脂質を生成し、フェロトーシスを誘導することを明らかにした。



また、ドキシソルピシンにより多くの遺伝子発現が変化する中で、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(Alas1)が著明に低下していることが明らかとなった。ヘモグロビンの中心体としてよく知られるヘムは、ミトコンドリアにおいてプロトポルフィリン IX(PpIX)に鉄が組み込まれることによって合成される。ドキシソルピシンは Alas1 の発現を抑制することでヘム合成を障害し、その結果ヘムに使用されなくなった鉄がミトコンドリア内に蓄積し、鉄過剰状態が生じていることが明らかとなった。実際に Alas1 を過剰発現させたところ、DOX による鉄過剰、過酸化脂質、そしてフェロトーシスが抑制された。これらの結果を踏まえ、Alas1 が合成するアミノレブリン酸 (5- ALA)を添加・投与することにより、ドキシソルピシンによる鉄・過酸化脂質、そしてフェロトーシスを抑制することで、ドキシソルピシンによる心毒性 (心機能障害)を予防し得ることを明らかにした。



SCIENCE SIGNALING 1 Nov 2022: Vol 15, Issue 758 DOI: 10.1126/scisignal.abn8017

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

| | |
|--|--------------------|
| 1. 著者名 Ko Abe, Masataka Ikeda, Tomomi Ide, Tomonori Tadokoro, Hiroko Deguchi Miyamoto, Shun Furusawa, Yoshitomo Tsutsui, Ryo Miyake, Kosei Ishimaru, Masatsugu Watanabe, Shouji Matsushima, Tomoko Komura, Ken-ichi Yamada, Hirotaka Imai, Hiroyuki Tsutsui | 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 1126 |
| 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 オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 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 Ikeda Masataka, Ide Tomomi, Tadokoro Tomonori, Miyamoto Hiroko Deguchi, Ikeda Soichiro, Okabe Kosuke, Ishikita Akihito, Sato Midori, Abe Ko, Furusawa Shun, Ishimaru Kosei, Matsushima Shouji, Tsutsui Hiroyuki | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Excessive Hypoxia Inducible Factor 1 Expression Induces Cardiac Rupture via p53 Dependent Apoptosis After Myocardial Infarction | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Journal of the American Heart Association | 6. 最初と最後の頁 e020895. |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/JAHA.121.020895. | 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 Ishikita Akihito, Matsushima Shouji, Ikeda Soichiro, Okabe Kosuke, Nishimura Ryohei, Tadokoro Tomonori, Enzan Nobuyuki, Yamamoto Taishi, Sada Masashi, Tsutsui Yoshitomo, Miyake Ryo, Ikeda Masataka, Ide Tomomi, Kinugawa Shintaro, Tsutsui Hiroyuki | 4. 巻 24 |
| 2. 論文標題 GFAT2 mediates cardiac hypertrophy through HBP-0-GlcNAcylation-Akt pathway | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 iScience | 6. 最初と最後の頁 103517 ~ 103517 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2021.103517 | 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 Masataka Ikeda, Tomomi Ide, Shun Furusawa, Kosei Ishimaru, Tomonori Tadokoro, Hiroko Deguchi Miyamoto, Soichiro Ikeda, Kosuke Okabe, Akihito Ishikita, Ko Abe, Shouji Matsushima & Hiroyuki Tsutsui | 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 2021年 |
| 3. 雑誌名 Cardiovascular Drugs and Therapy | 6. 最初と最後の頁 257 |
| 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 オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 井手友美、池田昌隆、田所知命、宮本裕子、阿部巧、筒井裕之、山田健一、今井浩孝 |
| 2. 発表標題 心疾患におけるフェロトーシスの役割と病態における機序 |
| 3. 学会等名 日本薬学会第142年会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Tomomi Ide, Masataka Ikeda, Tomonori Tadokoro, Hiroko Deguchi Miyamoto, Hiroyuki Tsutsui : The role of ferroptosis in cardiovascular diseases |
| 2. 発表標題 The role of ferroptosis in cardiovascular diseases |
| 3. 学会等名 The 86th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. Chairman's Special program. 2022.3.13 (招待講演) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 井手友美 |
| 2. 発表標題 わが国における心不全の診療実態からこれからの心不全診療を考える |
| 3. 学会等名 第25回日本心不全学会学術集会（招待講演） |
| 4. 発表年 2021年 |

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

| | | |
|---|------------------------------|---------------|
| 産業財産権の名称 アミノレプリン酸を用いたアントラサイクリン系抗がん剤による心筋症の予防法（毒性/副作用低減のための併用、合剤） | 発明者 池田昌隆 井手友美 筒井裕之 阿部巧 | 権利者 同左 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-48209 | 出願年 2021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 |
|-------|--|----------------------------------|----|
| 研究分担者 | 池田 昌隆 (Ikeda Masataka) (10567382) | 九州大学・医学研究院・助教 (17102) | |
| 研究分担者 | 山田 健一 (Yamada Ken-ichi) (60346806) | 九州大学・薬学研究院・教授 (17102) | |

| | 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 |
|-------|---------------------------|-----------------------|----|
| 研究協力者 | 阿部 巧 (Abe Ko) | | |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|