

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09582

研究課題名(和文) 脂質ラジカル可視化技術によるミトコンドリアー核連関の解明と心不全治療への応用

研究課題名(英文) Mitochondrial-nuclear coupling by lipid radical visualization technology and its application to the treatment of cardiomyopathy

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ドキシソルビシン(DOX)は、心臓毒性を誘発し予後不良とされているがその分子機序は解明されていなかった。本研究ではDICはミトコンドリアにおいてGPx4がmRNAレベルで抑制され、過酸化脂質の蓄積が原因であることを明らかにした。これらの心臓障害は、GPx4過剰発現マウスで改善され、GPx4ヘテロ欠失マウスで悪化し、その上流にやはりフェロトーシスの制御因子であるGPX4の減少が関与していた。また、DOXがミトコンドリアのDOX-Fe2+複合体を介して過剰な脂質過酸化を誘導し、ミトコンドリア依存性のフェロトーシスを引き起こし、DOX心毒性の主な原因であ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

増え続ける癌患者に対してドキシソルビシンは以前有効な薬剤の1つとして広く用いられているが、その副作用である心毒性の機序は明らかではなかった。今回、DOX心筋症が、ミトコンドリアにおけるフェロトーシスであることを明らかにし、今後DOX誘発性心筋症の新たな治療ターゲットとなりうることを示すことができた。脂質ラジカル可視化剤によるスクリーニングに展開する予定である。

研究成果の概要(英文)：Doxorubicin (DOX) induces cardiotoxicity and has a poor prognosis, but its molecular mechanism has not been elucidated. In this study, DIC revealed that expression of GPx4 was suppressed at both the mRNA and protein level in mitochondria and was caused by lipid radical and lipid peroxide accumulation. These cardiac disorders were ameliorated in GPx4 overexpressing mice and exacerbated in GPx4 heterozygous mice, upstream of which was associated with a decrease in GPX4, which is also a regulator of ferroptosis.

We also showed that DOX induces excessive lipid peroxidation via mitochondrial DOX-Fe2+ complex and causes mitochondrial-dependent ferrocytosis, which is a major cause of DOX cardiotoxicity.

研究分野：循環器内科学

キーワード：心筋症 心不全 薬剤性心筋症 抗がん剤

1. 研究開始当初の背景

心不全はあらゆる心疾患の終末像であり、その予後は不良である。遮断薬およびレニンアンジオテンシン阻害薬の普及により、心臓リモデリングの進展抑制をターゲットとした治療が中心となっているが、既存の薬剤では治療困難な例は左室補助装置や心臓移植に頼らざるを得ない。しかし我が国では心移植ドナー数が限られているのが現状である。心不全の成因と病因について未だ不明な点が多く残されており、新たな視点からの心不全治療戦略が必要である。心臓は、生体の循環を維持するために出生後は分裂しないながらも、様々な機械的負荷に対し刻一刻と適応するべくその形態をかえる(適応する)ことができる。そのような心臓特異的な適応メカニズムの解明は、心機能が破綻する心不全機序の解明には必要不可欠である。

一方、ミトコンドリアはエネルギー産生と、その酸素消費から、常に酸化ストレス(ROS)を産生することが知られる。不全心筋においてmtDNAコピー数は、減少していることがヒトおよび動物モデルで証明されているが、その病態への関与は不明である。拡張期負荷が主体となっていると考えられる容量負荷モデル(VO)において、ミトコンドリアDNA (mtDNA)コピー数を増加させると左室の拡大を著明に抑制することを示した。これはmtDNAにコードされるmRNA、さらには電子伝達系酵素活性とは無関係の現象でありミトコンドリア内で産生されたフリーラジカルによってmtDNAそのものの酸化障害がむしろ増加することでフリーラジカルをmtDNA自身が消去し、ミトコンドリアの脂質過酸化、さらには細胞外マトリックスをはじめとする拡張期負荷に伴う核のリモデリングシグナルの抑制に至っていることを明らかにした。

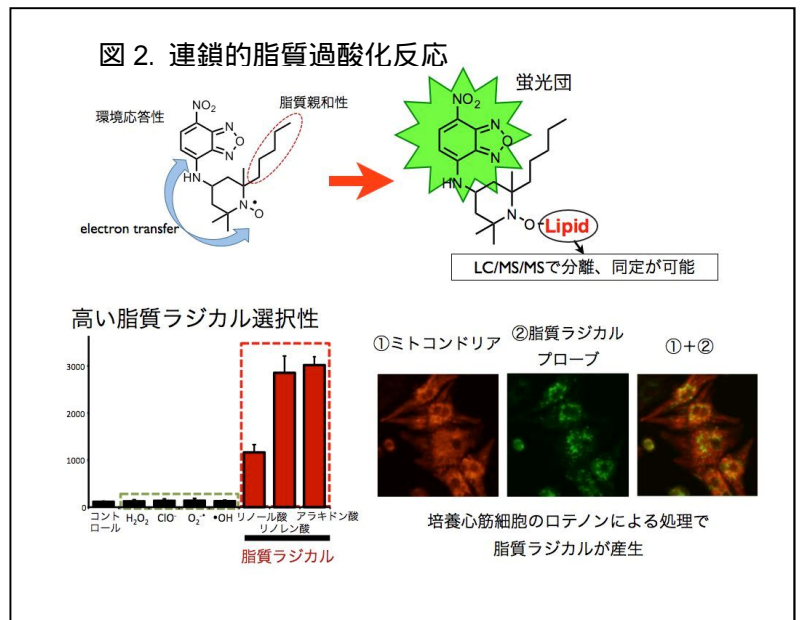
本研究では、mtDNA 増加によって減少する脂質ラジカルの同定とその制御方法を明らかにすることで、ミトコンドリア-核のストレスシグナル伝達のメカニズムの解明と新たな治療への提案を行うことを目的として行う。

申請者らは、脂質ラジカルに選択的に反応する検出プローブを用いると、呼吸鎖から産生されたスーパーオキシドが、脂質ラジカルとなって産生されることを検出した。

これらは極めて高い反応性を有し、脂質ラジカルの可視化とともに捕捉して得られた複合体から質量分析により同定が可能、かつ生体では脂質ラジカル消去剤ともなりうる。ミトコンドリア移行シグナルをつけたこの合成プローブが、単離心筋細胞でのロテノン誘発性ラジカル産生を減少させ、核DNA での MMP-2, 9 の発現を抑制したことから、この脂質ラジカル連鎖反応が、リモデリングシグナルの主役を担っていることが示唆された。

脂質ラジカルは、脂質の酸化代謝過程においての開始点として、連鎖反応を通じて爆発的に増大することが知られており、その極めて高い反応性のためにこれまで検出が極めて困難であった。申請者らは、脂質酸化代謝シグナルの開始点である脂質ラジカルが、心筋リモデリングのメディエーターであることを明らかにすることで、ミトコンドリア-核関連のシグナル伝達を明らかにすることで、これまで漠然と”レドックスシグナル

脂質ラジカルは、脂質の酸化代謝過程においての開始点として、連鎖反応を通じて爆発的に増大することが知られており、その極めて高い反応性のためにこれまで検出が極めて困難であった。申請者らは、脂質酸化代謝シグナルの開始点である脂質ラジカルが、心筋リモデリングのメディエーターであることを明らかにすることで、ミトコンドリア-核関連のシグナル伝達を明らかにすることで、これまで漠然と”レドックスシグナル



“とされてきたリモデリングに直接関わる分子を具体的に同定すること、さらには、この脂質ラジカルプローブにより mtDNA 増加と同じ治療効果が得られることを証明することを目的とする。

2. 研究の目的

具体的には、以下の2つを本研究の目的とした。

- 1) 心筋症においてミトコンドリアにおける脂質ラジカルの増加を証明する。
- 2) 脂質ラジカル捕捉による治療応用の可能性を検討することにより、心筋リモデリングにおける脂質過酸化の役割を解明する。

3. 研究の方法

1. 複数の心筋症モデルにおいて脂質ラジカルの関与があるかについて検討する。
2. 脂質ラジカル、脂質過酸化物が関与した心筋症モデル同定する。
複数の心筋症モデルを検証した結果、ドキシソルピシン心筋症における脂質過酸化物の増加、細胞死が顕著であったことから、本モデルを用いて以下の実験を行った。
3. 動物モデルの確立と脂質過酸化反応により惹起される細胞死であるフェロトーシスの関与を明らかにするために以下の実験を行った。

- 1) C57Bl マウスにドキシソルピシン 6mg/kg を、0, 2, 4 日目に投与することで、心機能の変化、生体内の唯一の脂質ラジカル消去酵素である GPX4 の発現について検討した。(mRNA および蛋白)
- 2) GPX4 の過剰発現マウスにより、ドキシソルピシンによる心筋傷害の軽減が得られるかを検討した。

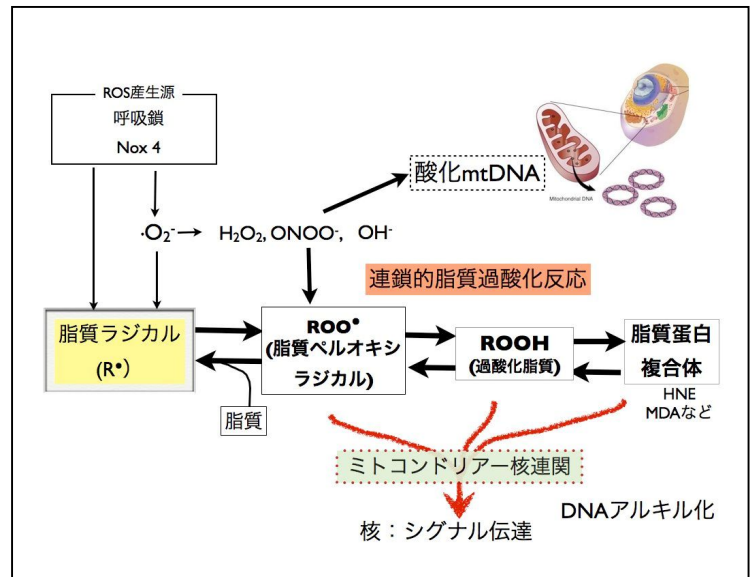
- 3) GPX4 の欠損マウスにより、ドキシソルピシンによる心筋傷害の増悪が認められるかを評価した。
培養心筋細胞を用いて、ドキシソルピシンにより GPX4 依存性の細胞死が生じているか、またどの細胞内オルガネラで生じているかを明らかにすることを目的に以下の実験を行った。

- 1) 培養心筋細胞にドキシソルピシンで処理することで、GPX4 の発現変化および脂質過酸化物、細胞死を評価した。
- 2) ミトコンドリア型 GPX4 過剰発現ウイルスならびに細胞質型 GPX4 過剰発現ウイルスを作成し、ドキシソルピシンによるアポトーシスの発現、脂質過酸化反応、細胞死について評価した。
- 3) 鉄キレート剤の添加による脂質過酸化反応、細胞死について評価した。

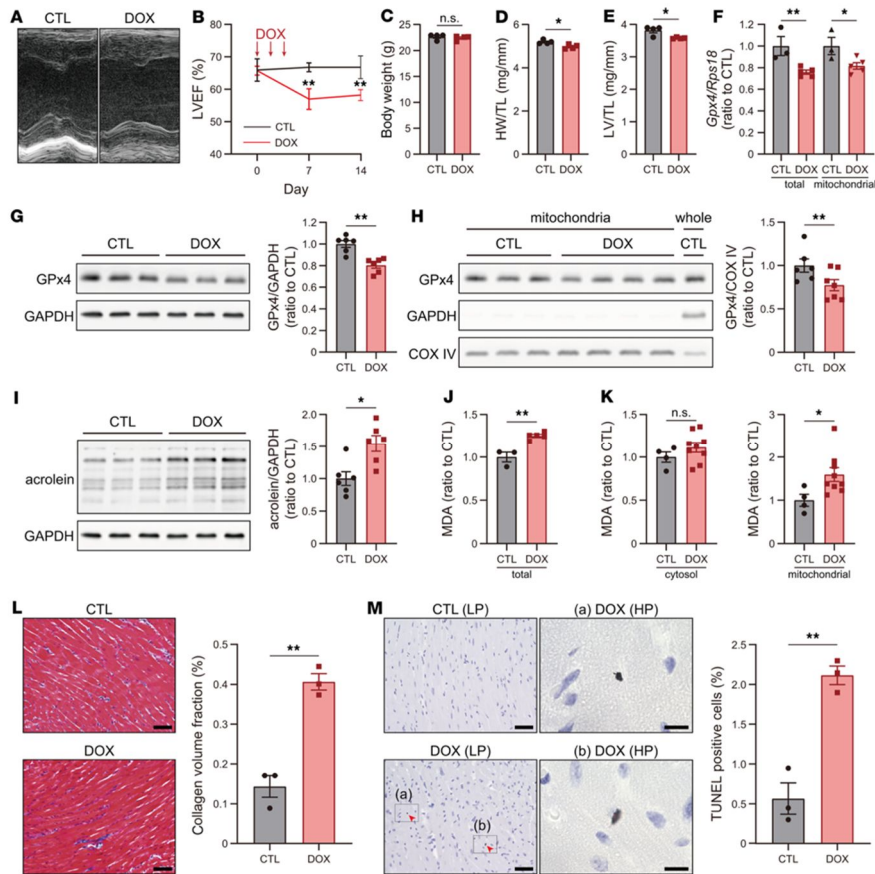
4. 研究成果

動物モデルの確立と脂質過酸化反応により惹起される細胞死であるフェロトーシスの関与を明らかにした。

ドキシソルピシン投与により、心機能が低下し、GPX4 の発現 (mRNA, protein) が抑制された。また、脂質過酸化反応 (acrolein, MDA) の亢進も認められた。さらに、14 日目には、心筋組織の



線維化ならびに TUNEL 陽性細胞の増加を認めた。



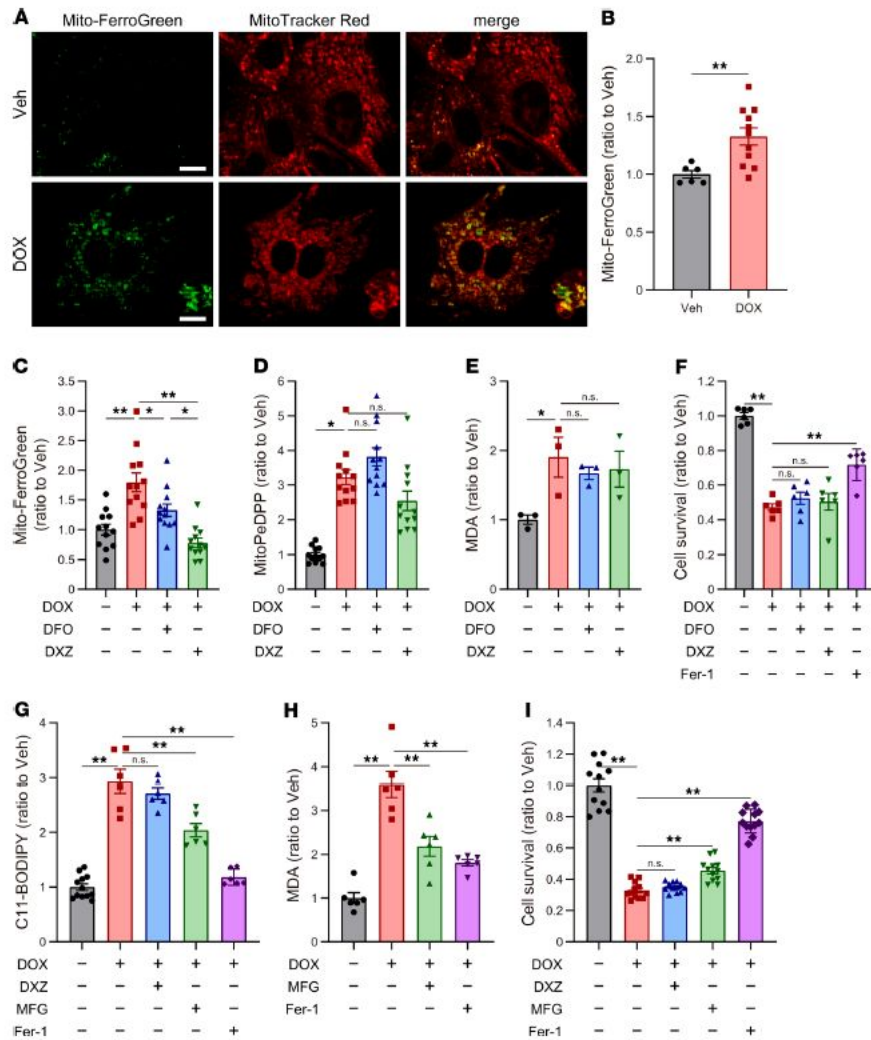
次に、GPX4 過剰発現マウス、ヘテロノックアウトマウスを使って、同様にドキシソルピシンに暴露させたとこ、過剰発現マウスでは、心機能の改善、脂質過酸化反応の減少、線維化の抑制、TUNEL 陽性細胞の減少を認めた。一方で、GPX4 ヘテロノックアウトマウスでは、ドキシソルピシンにより心機能低下がさらに増悪し、過酸化脂質の増加、線維化の増加を認めた。

これらの分子的機序、特に心筋細胞内のどのオルガネラで、一連の脂質ラジカル反応が生じているかを明らかにするために、培養心筋細胞を用いて実験を行った。

仔ラット心筋細胞にドキシソルピシンを処置すると、GPX4 の発現が約 60%減少し、MDA の増加を認めた。この MDA の増加は、細胞分画による検討で、ミトコンドリア分画で増加していることが示された。実際、蛍光免疫染色でも脂質過酸化がミトコンドリアにて増加し、脂質過酸化消去剤であるフェロスタチンにより抑制されることが示された。

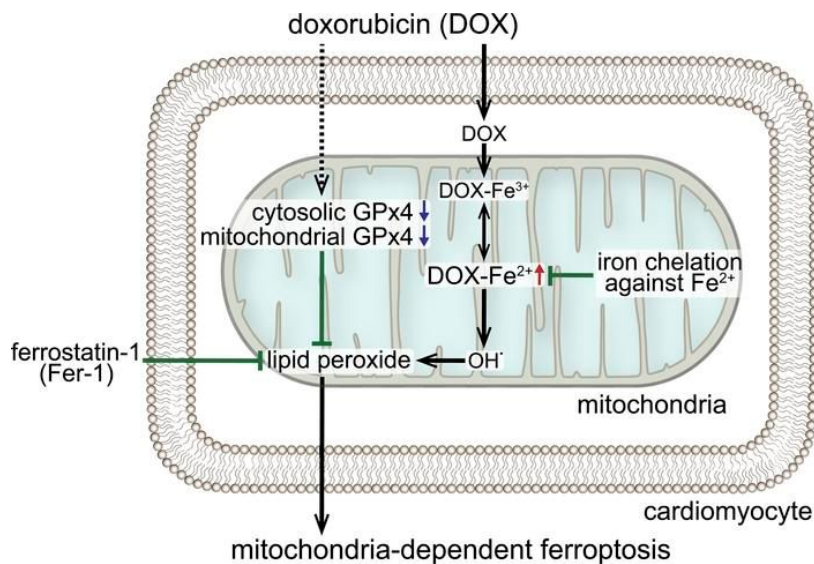
さらに、脂質ラジカルに由来する脂質過酸化反応、その後の細胞死であるフェルトーシスがミトコンドリア内で生じていることを示すために、GPX4 の細胞質型、ミトコンドリア型をそれぞれ過剰発現させることで、細胞内局在について検討した。結果として、ミトコンドリア型 GPX4 が、ドキシソルピシン心筋傷害において重要であることが明らかとなった。

また、これらのドキシソルピシンによる脂質ラジカルから脂質過酸化反応を生じる反応は、3 価鉄キレート剤 (デフェロキサミン、デキサラゾキサソ) では抑制されず、2 価鉄キレート剤で抑制されることが明らかとなった。(下図)



これまでに報告された研究とあわせて、ドキソルビシンは2価鉄と結合することで、脂質ラジカルを經由して細胞死を惹起していることが示された。

以上の内容は、JCI insight 2020: 5(9) e132747 に掲載された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Arai Shinobu, Ikeda Masataka, Ide Tomomi, Matsuo Yuka, Fujino Takeo, Hirano Katsuya, Sunagawa Kenji, Tsutsui Hiroyuki	4. 巻 312
2. 論文標題 Functional loss of DHRS7C induces intracellular Ca ²⁺ overload and myotube enlargement in C2C12 cells via calpain activation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 C29 ~ C39
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajpcell.00090.2016	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 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Tomonori Tadokoro1, Masataka Ikeda1, Tomomi Ide2, Soichiro Ikeda1, Kosuke Okabe1, Akihito Ishikita1, Shouji Matsushima1, Hiroyuki Tsutsui
2. 発表標題 Ferroptosis Plays a Key Role in the Development of Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy
3. 学会等名 日本循環器学会 学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomonori Tadokoro1, Masataka Ikeda1, Tomomi Ide2, Soichiro Ikeda1, Kosuke Okabe1, Akihito Ishikita1, Shouji Matsushima1, Hiroyuki Tsutsui
2. 発表標題 Ferroptosis plays a key role in the progression of doxorubicin-induced cardiomyopathy
3. 学会等名 International Society for Heart Research (ISHR)日本部会 学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井手友美
2. 発表標題 心不全の性差を考える～糖尿病合併と治療の選択～
3. 学会等名 第11回日本性差医学・医療学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018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
研究分担者	池田 昌隆 (Ikeda Masataka) (10567382)	九州大学・医学研究院・学術研究員 (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)	
研究分担者	筒井 裕之 (Tsutsui Hiroyuki) (70264017)	九州大学・医学研究院・教授 (17102)	