

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09673

研究課題名(和文) 鉄代謝依存性新規プログラム細胞死(フェロトーシス)のCOPD病態での役割

研究課題名(英文) Involvement of cigarette smoke-induced epithelial cell ferroptosis in COPD pathogenesis

研究代表者

皆川 俊介 (Minagawa, Shunsuke)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：70468685

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)：喫煙刺激によって気道上皮細胞において細胞内の遊離鉄濃度が上昇し、フェロトーシスを介してCOPD病態形成に関与することを証明した。また細胞内の有害な遊離鉄(Fe^{2+})の産生機序として、オートファジーによるフェリチンの分解機構(フェリチノファジー)が関与していることも、証明した。我々の研究結果から、喫煙刺激はNCOA4により制御されるフェリチン特異的オートファジーを亢進させ、気道上皮細胞内の遊離鉄を増加させることが明らかとなった。そしてこの細胞内遊離鉄の増加およびGPx4活性の低下がフェロトーシスを誘導し、COPD病態形成に関与すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

COPDの発生機序は、未だ解明されておらず有効な治療法も確立されていないのが現状である。我々の考えるCOPDの発生機序は、遊離鉄、鉄依存性細胞死、フェリチン依存性オートファジーであるフェリチノファジーといったこれまで検討されていなかった全く新しい機序であり、新規薬剤の開発に大いなる前進をもたらす可能性を秘めている。またCOPDは、世界的に見ても死亡率の高い疾患であり、新規治療法が開発されれば、その社会的意義は十分大きいものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Ferroptosis is a necrotic form of regulated cell death (RCD) mediated by phospholipid peroxidation in association with free iron-mediated Fenton reactions. Disrupted iron homeostasis resulting in excessive oxidative stress has been implicated in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). We demonstrated the involvement of ferroptosis in COPD pathogenesis. Our in vivo and in vitro models show labile iron accumulation and enhanced lipid peroxidation with concomitant non-apoptotic cell death during cigarette smoke (CS) exposure, which are negatively regulated by GPx4 activity. NCOA4-mediated ferritin selective autophagy (ferritinophagy) is initiated during ferritin degradation in response to CS treatment. CS exposure models, using both GPx4-deficient and overexpressing mice, clarify the pivotal role of GPx4-regulated cell death during COPD. These findings support a role for cigarette smoke-induced ferroptosis in the pathogenesis of COPD.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：慢性閉塞性肺疾患 COPD 細胞死 オートファジー 脂質酸化 活性酸素

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

慢性閉塞性肺疾患 (COPD) は主に喫煙が原因の、慢性進行性の気流閉塞を呈する治療抵抗性疾患である。現時点において COPD の予後を著明に改善させる有効な薬物療法はなく、分子病態の解明は急務である。近年、鉄依存性の新規細胞死であるフェロトーシスの存在が注目されている。また COPD 肺における細胞内鉄濃度の上昇は、以前から指摘されているが、細胞内鉄上昇と COPD 病態への関与のメカニズムについては検討されていない。また有害な細胞内遊離鉄増加の機序は明らかになっていない。

2. 研究の目的

肺上皮細胞におけるプログラム細胞死(PCD)の亢進は、慢性閉塞性肺疾患(COPD)病態の進展上重要な病態である。近年、リン脂質酸化を伴う鉄依存性、カスパーゼ非依存性の PCD であるフェロトーシスの存在が報告された。またフェリチン特異的オートファジー (ferritinophagy) の亢進は、フェリチンから遊離鉄(Fe^{2+})への分解を介してフェロトーシスを誘導する。COPD 患者では肺組織への鉄の過剰な蓄積が報告されるが、COPD を含めた呼吸器病態への ferritinophagy 及びフェロトーシスの関与はこれまで検討されていない。本検討では、培養細胞および動物モデルを用いて、COPD 病態へのフェロトーシスの関与と病態形成に与える影響を明らかにし、病態理解と新たな治療戦略の構築を目的とする。

3. 研究の方法

COPD 肺における鉄および過酸化脂質の蓄積の検討

肺手術検体より得られた肺組織を用いて、鉄のおよび過酸化脂質の蓄積につき検討した。COPD 肺組織の Fe^{3+} 染色(Perl's DAB)および 4-HNE(4-hydroxy-2-nonenal)の免疫染色により、気道上皮での評価を行った。また肺組織をホモジネートしたサンプルから脂質成分を抽出し、質量分析法(LC-MS)により不飽和多価脂肪酸に対する過酸化体の割合を定量し、過酸化脂質の蓄積について検討した。

培養細胞でのフェロトーシスの検討

肺手術検体より分離培養したヒト気道上皮細胞(HBEC)および Beas2B 細胞を用いて、タバコ煙抽出液(Cigarette smoke extract; CSE)による刺激を行い、細胞内遊離鉄の定量、細胞死および脂質酸化を定量した。細胞内遊離鉄の定量には、培養細胞を超音波破碎したのち、上清中の Fe 濃度を ICP-MS を用いて定量した。細胞死の評価のため、培養細胞の LDH assay により細胞傷害を、MTT assay により細胞生存率を定量した。さらに気道上皮細胞における CSE 誘導性脂質酸化の評価のため、C-11 BODIPY 蛍光プローブを用いて、その蛍光強度を定量した。鉄キレート剤(Deferoxamin; DFO)、フェロトーシス阻害薬(Ferrostatin-1)およびフェロトーシス主要制御因子である GPx4 のノックダウンによる細胞死および脂質酸化の制御を確認することで、フェロトーシスを評価した。

肺気腫モデルマウスによるフェロトーシスの検討

GPx4 遺伝子改変マウスを用いて喫煙曝露実験を行い、肺気腫病態について検討した。8~10 週齢の Wild type(WT)および GPx4 ヘテロノックアウトマウス(GPx4^{+/-})、GPx4 高発現マウス(GPx4-TG)を使用し、小動物吸入曝露システム in Expose を用いて 1 ヶ月間、6 ヶ月間の全喫煙曝露により COPD モデルを作成する。1 ヶ月喫煙マウスでは、肺からの気管支肺胞洗浄液(BAL)を採取し、細胞数の計測を行った。肺組織中の細胞死の評価のため TUNEL 染色を、過酸化脂質の定量のため質量分析法(LC-MS)を行った。さらに ELISA 法により肺組織中のサイ

トカインの定量を行った。6ヶ月喫煙マウスでは、肺組織のHE染色で平均肺胞径を測定し、肺気腫病変の評価を行った。また肺組織をホモジネートしたサンプルから脂質成分を抽出し、質量分析法(LC-MS)により不飽和多価脂肪酸に対する過酸化体の割合を定量し、過酸化脂質の蓄積について検討した。

4. 研究成果

COPD 患者肺組織において鉄および脂質酸化の亢進。

COPD 肺組織では気道上皮細胞における鉄沈着が亢進し、同部位に 4-HNE の蓄積を認めた。肺組織中のホスファチジルコリンやホスファチジルエタノールアミンの過酸化体 (PCOOH,PEOOH) は、COPD 肺において正常の肺に比較して有意に蓄積が高度であった (図 1)。COPD 肺において GPx4 の発現は減弱しており、患者の一秒量と負の相関を呈した (図 2)。

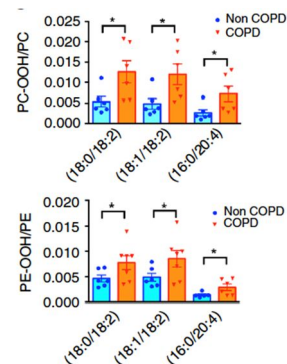


図 1

気道上皮細胞における CSE 刺激

気道上皮細胞に CSE を含んだ培養液中で培養したところ、control と比較し、細胞内遊離鉄の濃度、脂質酸化、細胞死がそれぞれ有意に増加した。またこれらの増加は、鉄キレート剤であるデフェロキサミン (DFO) や、フェロトシスの抑制剤である Ferrostatin-1、および GPx4 のノックダウンによって有意に抑制された。

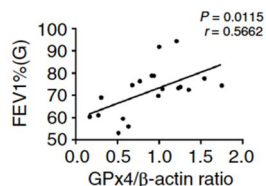


図 2

喫煙による細胞内遊離鉄上昇の機序の検討

喫煙刺激により一過性にフェリチンが上昇するが、時間経過とともに次第に減少に転じた。またこの減少はフェリチン特異的オートファジーであるフェリチノファジーのアダプター蛋白である NCOA4 の増加をともなっていた。気道上皮細胞に喫煙刺激 (CSE) を行うとフェリチンと LC3 は共局在を伴って上昇することが共焦点顕微鏡で確認された。このことからフェリチンは喫煙刺激によりフェリチノファジー機構によって有害な遊離鉄に分解されることが考えられた。気道上皮細胞において NCOA4 を siRNA で欠損させると、喫煙刺激による細胞内遊離鉄の濃度、脂質酸化、細胞死の増加をそれぞれ有意に抑制することがわかった。

GPx4 遺伝子改変マウスにおける肺気腫病態の評価

GPx4 ヘテロノックアウトマウスでは、WT マウスに比較して平均肺胞径が増大しており、肺気腫病態が増悪していた。一方、GPx4 高発現マウスでは平均肺胞径が改善し、肺気腫病態形成は抑制されていた。TUNEL 法による細胞死の評価では、GPx4 ヘテロノックアウトマウスでは喫煙により TUNEL 陽性細胞が増加し、GPx4 高発現マウスでは減少していた。さらに BAL 液中の HMGB-1 は、WT マウスと比較して、GPx4 ヘテロノックアウトマウスでは喫煙誘導性に増加し、GPx4 高発現マウスでは減少していた (図 3)。質量分析法による過酸化脂質の定量を行うと、GPx4 ヘテロノックアウトマウスでは喫煙誘導性に脂質酸化が亢進し、GPx4 高発現マウスでは抑制されていることが確認された (図 3)。

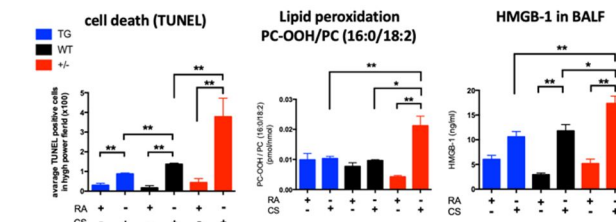


図 3

総括：喫煙刺激は NCOA4 により制御されるフェリチン特異的オートファジーを亢進させ、気道上皮細胞内の遊離鉄を増加させた。また、気道上皮細胞内の遊離鉄の亢進および GPx4 活性の低下はフェロトーシスを誘導し、COPD 病態形成に関与することが考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Masahiro Yoshida, Shunsuke Minagawa, et al	4. 巻 10
2. 論文標題 Involvement of cigarette smoke-induced epithelial cell ferroptosis in COPD pathogenesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature communications	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-019-10991-7.	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 Shunsuke Minagawa, Masahiro Yoshida, Jun Araya, Hiromichi Hara, Hirotaka Imai, Kazuyoshi Kuwano,	4. 巻 62
2. 論文標題 Regulated necrosis in pulmonary disease: A focus on necroptosis and ferroptosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 554-562
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1165/rcmb.2019-0337TR.	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 吉田昌弘
2. 発表標題 NCOA4依存性フェリチノファジーのCOPD病態への関与
3. 学会等名 日本呼吸器学会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 吉田昌弘
2. 発表標題 Involvement of cigarette smoke induced ferroptosis via NCOA4-mediated ferritinophagy in COPD pathogenesis
3. 学会等名 ヨーロッパ呼吸器学会（国際学会）
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 吉田昌弘
2. 発表標題 The role of ferroptosis in COPD pathogenesis
3. 学会等名 欧州呼吸器学会 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 皆川俊介, 吉田昌弘, 坂本太郎, 荒屋 潤, 今井浩孝, 桑野和善
2. 発表標題 喫煙誘導性フェロトーシスのCOPD病態への関与
3. 学会等名 日本生化学学会
4. 発表年 2019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	荒屋 潤 (ARAYA JUN) (90468679)	東京慈恵会医科大学・医学部・教授 (32651)	