

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K09686

研究課題名(和文)骨形成におけるフェロトーシス抑制機構の解明と生体材料への応用

研究課題名(英文)Analysis of ferroptosis depression system on bone formation

研究代表者

渡邊 郁哉 (Watanabe, Ikuya)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・教授

研究者番号：00274671

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：細胞死の予防は、いくつかの病気の阻害剤として知られている。フェロトーシスは、鉄依存性細胞死として知られる新たに調節された壊死であり、ディクソンら(2013)によると、このタイプの細胞死では、アポトーシスと壊死の代わりに脂質過酸化が細胞膜の損傷に重要な役割を果たす。フェロスタチン-1は、癌細胞のフェロトーシス経路における細胞死のよく知られた阻害剤である。また、この試薬はMC3T3E1骨芽細胞でも使用され、細胞分化試験でエラスチンが誘導する細胞死に影響を与えた。また、以前に我々は、フェロスタチン-1が骨芽細胞の生存率にドーピング効果があることを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

フェロトーシスは近年その存在が認められた新たな細胞死の概念であり、現在ではがん抑制メカニズムとして注目されている。これはがん細胞の酸化ストレスに対する抵抗性を減弱させ、フェロトーシスという鉄依存的なlipid ROSの蓄積による細胞死を起こしやすくしている一方で、骨再生におけるフェロトーシスおよびlipid ROSの影響について報告した研究はなく、本研究は骨芽細胞への影響およびメカニズムを新たに解明し、それを阻害する基質を検索し、骨芽細胞死を減少させ、骨形成を促進する基質を見いだせたので、学術的・社会的意義が大きい。

研究成果の概要(英文)：Ferroptosis is a newly found regulated necrosis and known as iron-dependent cell death. According to Dixon et al. (2013), lipid peroxidation plays an important role in cell membrane damage induced by ferroptosis instead of apoptosis. Ferrostatin-1 is a well-known inhibitor of cell death in the ferroptosis pathway of cancer cells. The erastin was also used in MC3T3E1 osteoblasts to influence erastin-induced cell death in cell differentiation tests. In addition, previously we found that ferrostatin-1 has a doping effect on osteoblast viability.

研究分野：生体材料学

キーワード：フェロトーシス 細胞死 エラスチン フェロスタチン

1. 研究開始当初の背景

活性酸素種 (ROS: Reactive Oxygen Species) は、ミトコンドリアが酸素 ($3O_2$) を用いたエネルギー産生を行う際に発生する反応性の高い副産物であり、代表的なものとしてスーパーオキシド/スーパーオキシドアニオン ($O_2^{\cdot-}$)、ヒドロキシラジカル (HO^{\cdot})、過酸化水素 (H_2O_2)、一重項酸素 ($1O_2$) の 4 種類が知られている。

生体防御に作用する (マクロファージ・好中球) 一方で、過激な酸化活性による遺伝子・膜脂質・蛋白質等への酸化障害により、骨アポトーシス、癌や動脈硬化、老化等の危険因子の一つとされている。細胞内では superoxide dismutase (SOD)、catalase (CAT)、glutathione peroxidase (GPx) により、図 1 に示すような経路により H_2O と O_2 に還元される。近年、鉄依存的な過酸化脂質 (Lipid ROS) の蓄積による細胞死を引き起こす非アポトーシス性のフェルトーシスの存在が認められた。フェルトーシスおよび lipid ROS の骨再生への応用の研究はなく、骨芽細胞におけるフェルトーシスの作用を解明し、フェルトーシス阻害する基質を検索し、それらが骨芽細胞死を減少させ、骨形成を促進させることができるか、が研究開始当初の背景である。

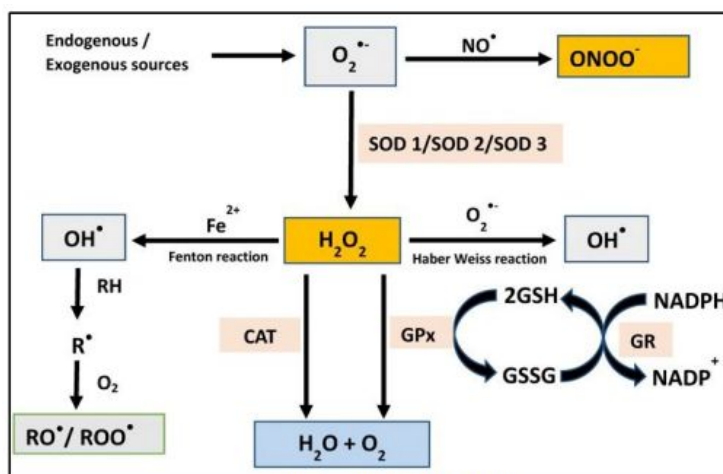


図 1. ROSの代謝経路

ミトコンドリアに存在するSODにより $O_2^{\cdot-}$ は H_2O_2 へ返還され、細胞質のCATとGPxにより H_2O と O_2 に還元される。またGPxは脂質酸化物 (lipid ROS) を還元する作用も持つ。

2. 研究の目的

フェルトーシスは近年その存在が認められた新たな細胞死の概念であり、現在ではがん抑制メカニズムとして注目されている。これはがん細胞の酸化ストレスに対する抵抗性を減弱させ、フェルトーシスという鉄依存的な lipid ROS の蓄積による細胞死を起こしやすくしている一方で、骨再生におけるフェルトーシスおよび lipid ROS の影響について報告した研究はなく、本研究は骨芽細胞への影響およびメカニズムを新たに解明しようとするものである。よって本研究においては、骨芽細胞に対するフェルトーシスの作用を解明し、それを阻害する基質を検索し生体材料へ応用することで、骨芽細胞死を減少させ、骨形成を促進する生体材料を創生することを目的としている。

3. 研究の方法

本研究においては、以下のような研究を行った。まず、骨芽細胞にフェルトーシスを起こさせ、遺伝子発現の変化を観察することで、骨形成における lipid ROS およびフェルトーシス影響を明らかにした。また、フェルトーシスを阻害する、または回復させ骨形成能を促進させる基質を検索した。その基質の実際の骨形成促進能を評価し、分子生物学的・免疫組織化学的実験を行った。

フェルトーシスの誘導と骨形成関連遺伝子の発現量測定 (細胞実験条件の決定): 細胞はマウ

ス頭蓋由来骨芽細胞様細胞 (MC3T3 cell) を使用した。10%FBS、1%ペニシリン- ストレプトマイシンを添加した α -MEM を基本培地とし、それに様々な濃度の Erastin を添加して、4 時間培養してフェロトーシスを誘導した。MTS アッセイによる細胞増殖率の定量 基本培地に交換後、0、2、4、6 時間後の細胞生存率を MTS アッセイ (CellTiter 96, Promega) にて定量した。

フェロトーシスを阻害する基質の検索でフェロトーシス阻害剤として代表的な Ferrostatin-1 を用い、フェロトーシス誘導時 (Erastin 感作時) もしくは骨形成誘導培地に各種濃度の Ferrostatin-1 を添加し、細胞増殖率を定量した。細胞増殖に効果を示したグループは、前述のマイクロアレイおよび qRT-PCR を行い遺伝子発現の変化を観察し、骨形成における阻害薬の添加効果を検証した。マイクロアレイによる遺伝子発現の網羅的解析と qRT-PCR による定量骨形成誘導培地 (基本培地+50mg/ml L-アスコルビン酸、10mM β -グリセロリン酸塩) に交換後、24、48 時間、3 日、7 日後に細胞を回収し、total RNA を抽出する。そこから、cDNA を精製しマイクロアレイにて発現遺伝子の網羅的解析を行い、フェロトーシスを誘導した実験群としていないコントロール群で比較した。

フェロトーシスではミトコンドリアの萎縮が特徴的に観察されることが知られており、本研究でもフェロトーシスが再現されたことを確認するためである。以降、2 時間後および 4 時間後の細胞生存率が 60~80%にある条件を使用した。蛍光染色によるミトコンドリア・ミトコンドリア ROS・脂質過酸化・グルタチオンレベルの観察はミトコンドリア用の CellLight 試薬 (ThermoFisher SCIENCE) を用いて、Erastin 作用前~作用後のミトコンドリアの形態変化を蛍光顕微鏡 (BZ-9000、KEYENCE) にて観察した。また、MitoSOX RED (ThermoFisher SCIENCE) を使用してミトコンドリアをターゲットとした SOD 濃度の変化を観察した。脂質過酸化・グルタチオンレベルの観察:Lipid Peroxidation kit ならびに Thiol 染色 (ともに ThermoFisher SCIENCE) を行い、細胞内脂質過酸化物質とグルタチオン酸の局在を確認した。

4. 研究成果

細胞死の予防は、いくつかの病気の阻害剤として知られている。フェロトーシスは、鉄依存性細胞死として知られる新たに調節された壊死であり、ディクソンら (2013) によると、このタイプの細胞死では、アポトーシスと壊死の代わりに脂質過酸化が細胞膜の損傷に重要な役割を果たす。フェロスタチン-1 は、癌細胞のフェロトーシス経路における細胞死のよく知られた阻害剤である。また、この試薬は MC3T3E1 骨芽細胞でも使用され、細胞分化試験でエラスチンが誘導する細胞死に影響を与えた。また、以前に我々は、フェロスタチン-1 が骨芽細胞の生存率にドーピング効果があることを発見した。

今回我々が行った研究では、骨細胞株の遺伝子発現について検討した。25 μ mol のエラスチンを含む分化培地 (Era-25) を添加することにより部分的な細胞死 (フェロトーシス) を誘導し、次に培地にフェロスタチン-1 を含む分化培地 (Fer-0、Fer-01、Fer-05、Fer-10 および Fer-20) 癌細胞死阻害剤に変換した。

qRT-PCR の結果は、Fer-05 および Fer-20 サンプルの RUNX2 の遺伝子発現が、コントロールおよび Era-25 サンプルの遺伝子発現よりも高いことを示した。遺伝子発現 は、1 日目と 7 日目に Fer-05 によって有意に増加した。コントロールおよび Era-25 サンプルと比較して、1、3、および 7 日目の Fer-20 の RUNX2 の発現レベルは、他のすべてのグループと比較して有意に高い遺伝子発現を示した。16 日後の ALP 活性の結果は、フェロスタチンの量が多いほど、細胞がより分化することを示し、また、25 μ M エラスチンおよび 5 μ M フェロスタチン-1 と混合した 25 μ M エラスチンで培養した細胞について ALP 活性を測定したところ、16 日後の ALP 結果はそれらの間に有意差を示さなかった。したがって、5 μ M フェロスタチン-1 と 25 μ M エラスチンの混合物は分化を促進していないということが判明した。

蛍光染色によるミトコンドリア・ミトコンドリア ROS・脂質過酸化・グルタチオンレベルの観察は現在結果待ちである。

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 0件）

1. 著者名 Valanezhad Alireza, Odatsu Tetsuro, Abe Shigeaki, Watanabe Ikuya	4. 巻 22
2. 論文標題 Bone Formation Ability and Cell Viability Enhancement of MC3T3-E1 Cells by Ferrostatin-1 a Ferroptosis Inhibitor of Cancer Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 12259 ~ 12259
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms222212259	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	バラネザド 有礼左 (Valanezhad Alireza) (00608870)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教 (17301)	
研究分担者	尾立 哲郎 (Odatsu Tetsuro) (70513167)	長崎大学・病院(歯学系)・講師 (17301)	

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
---------	---------