

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：32305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07814

研究課題名(和文) 虚血による神経細胞死をフェロトーシスとして捉える

研究課題名(英文) Analysis of cerebral ischemic neural cell death and ferroptosis

研究代表者

久保田 知里 (Kubota, Chisato)

高崎健康福祉大学・健康福祉学部・助教

研究者番号：90750638

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)：脳梗塞などに見られる虚血性神経細胞死は、活性酸素種の関与や酸化脂質の蓄積といった特徴が鉄依存性細胞死フェロトーシスに似ている。本研究では虚血性神経細胞死の培養細胞モデルを解析し、フェロトーシスと同様に、細胞内遊離鉄や脂質膜過酸化、そして多価不飽和脂肪酸に酸素を添加する酵素などが関与することを明らかにした。また、ラジカル捕捉化合物の2,2,6,6-テトラメチルピペリジンN-オキシルが発見し、虚血性神経細胞死およびフェロトーシスを遠隔から阻害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

脳梗塞は時に致命的となる疾患で、脳組織障害の機序を明らかにし脳保護を果たす方法を示すことは社会的に重要である。本研究から、虚血による神経細胞死の機構の一端が明らかとなり、また神経保護剤として応用される化合物を示した。

研究成果の概要(英文)：Oxidative stress-associated cell death is implicated in cerebral ischemia-associated neural damage. Recently, a cell death pathway that involved reactive oxygen species production has been shown in tumor cells and named ferroptosis due to an iron-dependence. We revealed that lipoxygenase, intracellular free iron, and the accumulation of lipid reactive oxygen species are involved in glutamate induced cell death. We found that volatilized 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (TEMPO) effectively prevented both ferroptosis and glutamate-induced oxidative toxicity in mouse neuronal cell line. Furthermore, TEMPO clearly reduced neural cell death in a middle cerebral artery occlusion (MCAO) model in mouse. We suggest potential physiological relevance of ferroptosis and neural cell injury during periods of ischemia.

研究分野：神経科学

キーワード：脳虚血 フェロトーシス 脂質過酸化

1. 研究開始当初の背景

脳虚血による神経細胞死は活性酸素種 (ROS) の関与や酸化脂質の蓄積が知られ、2012 年に提唱された新規細胞死「フェロトーシス」に特徴が似ている。フェロトーシスは鉄依存性の細胞死で、アポトーシスをはじめとする従来の細胞死とは異なる形態を示す。

フェロトーシスの分子機序は、リン脂質ヒドロペルオキシド(PL-OOH)の唯一の還元酵素である Glutathione Peroxidase 4 (GPX4)が直接あるいは間接的に障害を受けると、鉄イオンを触媒としたフェントン反応により PL-OOH を起点とする脂質過酸化連鎖 (Lipid-ROS) が拡大し、細胞膜の破綻に至ると推察される。GPX4 の機能不全は腎上皮の細胞死を引き起こすこと、フェロトーシスの特異的阻害剤であるフェロスタチンが虚血による腎臓や心臓の細胞死を抑制されることなどが報告されている。脳虚血による神経細胞死もフェロトーシスである可能性が高く、この細胞死の理解が進めば、脳梗塞をはじめとする脳神経疾患の予防や治療法の開発につながると期待される。

2. 研究の目的

本研究では、虚血性神経細胞死の培養細胞モデルを用いて、フェロトーシス実行に必須の Lipid-ROS の拡がりや脂質過酸化物の蓄積を明らかにする。また新規マーカーを用いてマウスの脳虚血モデルを解析し、脳神経組織でのフェロトーシス細胞死を確認する。

3. 研究の方法

(1) 虚血性神経細胞死モデルでのフェロトーシスの検証

マウス海馬由来の培養細胞株 HT22 細胞にグルタミン酸(5mM<)を負荷するとネクロトーシス様の細胞死が起こり、虚血性神経細胞死モデルとして認知・利用されている。本研究ではまず、HT22 細胞株にフェロトーシス誘導試薬(Erastin)を作用させ、グルタミン酸負荷で起る HT22 細胞株の細胞死とフェロトーシスを比較する。脂質膜過酸化を検出する蛍光分子プローブを使用して、Lipid-ROS の発生部位や広がりを経時的に解析する。また HT22 細胞に様々なフェロトーシス阻害剤を作用させ、細胞死抑制効果を示すかを検討する。

(2) フェロトーシス阻害剤のマウス中大脳動脈閉塞モデルでの脳保護効果の検証

マウス中大脳動脈閉塞モデルを作成し、脳組織において脂質過酸化物の蓄積を検出する。また細胞解析で見出した神経細胞死阻害剤が、*in vivo* において虚血による神経細胞死を阻害するかを検証する。このとき臨床実績のある脳保護薬 MCI-186 (エダラボン) を用いて比較する。

4. 研究成果

HT22 細胞に Erastin を作用させたところ、グルタミン酸負荷と同じ時間経過をたどり細胞死が起ることを確認した。またグルタミン酸および Erastin による細胞死を解析した結果、多価不飽和脂肪酸に酸素を添加する酵素であるリポキシゲナーゼや細胞内遊離鉄、Lipid-ROS が同様に関わるのが判明した。したがって少なくとも細胞レベルにおいて、グルタミン酸負荷で誘導される虚血性神経細胞死はフェロトーシスと同様の機序を示すことが分かった。

次にフェロトーシス経路の解析から新たな神経細胞保護薬の探索を行った。多くのラジカル捕捉化合物がフェロトーシスを阻害することを確認し、そのうち 2,2,6,6-テトラメチルピペリジン N-オキシル(TEMPO)が気体として離れたところにある細胞に作用し、フェロトーシスを阻害することを見出した。TEMPO は HT22

細胞のグルタミン酸誘導神経細胞死においても、同様の効果を示した(図1)。

続いて、マウス中大脳動脈閉塞モデルを作成し、揮発 TEMPO の脳保護効果を解析した(図2)。TEMPO 吸入投与群では脳保護薬 MCI-186 の静脈投与群と比較して優位に脳梗塞進行の抑制効果を認めた。これらの結果から TEMPO は強力に神経細胞死を抑制することが明らかになり、TEMPO の吸入投与が新たな脳保護療法として応用される可能性が示唆された。

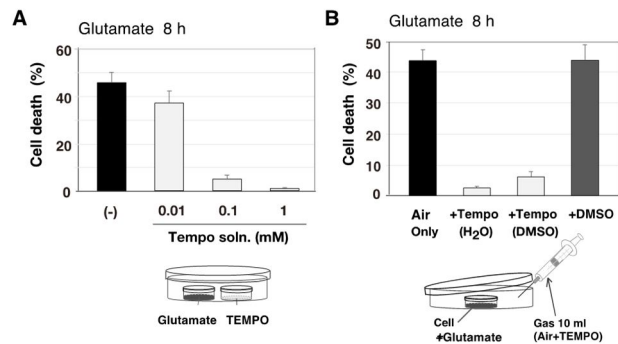


図1. 揮発TEMPOは虚血性神経細胞死を阻害する

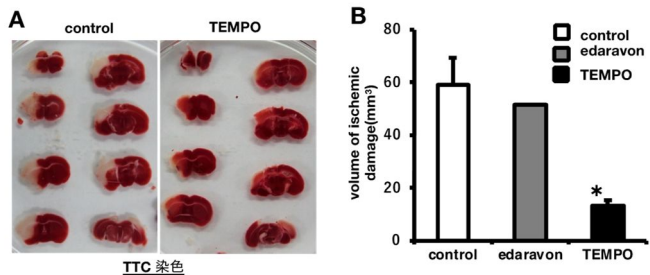


図2. マウスMCAOにおいてTEMPO吸入投与により脳梗塞巣の広がりが遅延する

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 1件）

1. 著者名 Mizuno Hiroyuki, Kubota Chisato, Takigawa Yuta, Shintoku Ryosuke, Kannari Naokatsu, Muraoka Takako, Obinata Hideru, Yoshimoto Yuhei, Kanazawa Masato, Koshiishi Ichiro, Torii Seiji	4. 巻 172
2. 論文標題 2,2,6,6-Tetramethylpiperidine-1-oxyl acts as a volatile inhibitor of ferroptosis and neurological injury	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 71 ~ 78
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvac044	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8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hiroyuki Mizuno, Chisato Kubota, Yuta Takigawa, Ryosuke Shintoku, Masato Kanazawa, Yuhei Yoshimoto, Ichiro Koshiishi, Seiji Torii
2. 発表標題 2,2,6,6-Tetramethylpiperidine-1-oxyl acts as a volatile inhibitor of ferroptosis and neurological injury
3. 学会等名 16th Congress of World Federation of Interventional and Therapeutic Neuroradiology(WFITN)（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 久保田 知里, 水野 寛之, 瀧川 裕太, 神徳 亮介, 輿石 一郎, 好本 裕平, 鳥居 征司
2. 発表標題 2,2,6,6-テトラメチルピペリジンN-オキシルの揮発投与により虚血性神経細胞死は抑制される
3. 学会等名 2022年度日本生化学会関東支部例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 水野 寛之, 久保田 知里, 瀧川 裕太, 神徳 亮介, 金澤 雅人, 輿石 一郎, 好本 裕平, 鳥居 征司
2. 発表標題 2,2,6,6-テトラメチルピペリジン-1-オキシル(TEMPO)の揮発投与によるフェロトース阻害及び脳保護効果
3. 学会等名 日本脳神経外科学会第81回学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 建部 貴輝、久保田 知里、矢山 萌、神徳 亮介、水野 寛之、大日方 英、鳥居征司
2. 発表標題 癌細胞のフェロトーシス感受性を薬剤で調節する
3. 学会等名 2021年度日本生化学会関東支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鳥居 征司、建部 貴輝、矢山 萌、神徳 亮介、水野 寛之、大日方 英、久保田 知里
2. 発表標題 低分子化合物によるフェロトーシス感受性の調節
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鳥居征司、侯 二、久保田知里、竹内利行
2. 発表標題 膵 細胞におけるインスリン分解機序の追跡
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 久保田知里、鳥居征司
2. 発表標題 鉄依存性細胞死フェロトーシスに対する感受性を解析する
3. 学会等名 第18回生体機能研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 久保田知里、竹内利行、小林雅樹、北村忠弘、鳥居征司
2. 発表標題 分泌顆粒蛋白質フォグリンによる膵 細胞増殖の抑制
3. 学会等名 第66回北関東医学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 2,2,6,6-テトラメチル-1-ピペリジニルオキシルの揮発使用による細胞死抑制と組織保護	発明者 鳥居征司、久保田知里、輿石一郎、滝川雄太、水野寛之、神	権利者 国立大学法人群馬大学
産業財産権の種類、番号 実用新案、PCT/JP2021/036440	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

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