

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17285

研究課題名（和文）新規細胞死経路に着目した抗がん剤誘発性腎障害に対する治療戦略の開発

研究課題名（英文）Development of Therapeutic Strategies for Anticancer Drug-Induced Acute Nephrotoxicity on Novel Cell Death Pathways

研究代表者

濱野 裕章（HAMANO, Hirofumi）

徳島大学・病院・特任助教

研究者番号：10847289

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：シスプラチン誘発腎毒性（CIN）の機序については、これまで多くの研究がされてきた。フェロトーシスは、鉄を介して誘導される非アポトーシス性の細胞死である。本研究では、CINにおけるフェロトーシスの役割について検討した。シスプラチンは、マウスの腎臓における鉄とヒドロキシラジカルが共局在化した。また、シスプラチンによって生じる腎機能障害、フェロトーシスマーカーの増加はフェロトーシス阻害剤であるFer-1によって改善した。さらに、鉄キレート剤であるデフェロキサミンもCOX-2と4-HNEの発現を低下させ、CINを抑制した。フェロトーシスはCINの病態に関与することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

フェロトーシスがシスプラチン誘発腎毒性（CIN）の病態生理に関与していることを明らかにした。シスプラチン投与により、腎臓の鉄量とトランスフェリンレセプターの発現、第一鉄量が増加し、フェロトーシス阻害剤でCINが抑制された。このように、フェロトーシスは、総鉄および第一鉄の含有量を増加させることにより、CINの病態生理に関与している可能性があり、その阻害は、CINの予防のための治療ターゲットとなりうることが示唆された。フェロトーシスがCINの予防標的であることを確認するためには、さらなる調査が必要である。

研究成果の概要（英文）：The mechanism of cisplatin-induced nephrotoxicity (CIN) has long been investigated in order to develop preventive/therapeutic drugs. Ferroptosis is a newly identified form of non-apoptotic regulated cell death induced by iron-mediated lipid peroxidation and is involved in the pathophysiology of various diseases. In this study, we examined the role of ferroptosis in CIN. We evaluated the role of ferroptosis in CIN by in vivo experiments in a mouse model. Treatment with cisplatin augmented renal ferrous iron and hydroxyl radical levels with co-localization. Mice administered cisplatin demonstrated kidney injury, with renal dysfunction and the ferroptosis markers, COX2 and 4-hydroxynonenal (4-HNE); these changes were ameliorated by Ferrostatin-1 (Fer-1), an inhibitor of ferroptosis. Ferroptosis is involved in the pathogenesis of CIN and might be used as a new preventive target for CIN.

研究分野：薬理

キーワード：フェロトーシス シスプラチン 鉄

1. 研究開始当初の背景

がんサバイバーにおける抗がん剤による晩期臓器合併症を発症することが問題となっており、がん治療関連合併症の予防法や治療法の開発は喫緊の課題である。がんやその治療に伴う腎障害は、腫瘍学-腎臓病学を融合した「Onco-nephrology」という新領域として注目されている。腎機能が低下した患者では、腎排泄型の抗がん剤の投与制限が必要となることに加えて、腎機能低下自体が抗がん剤による急性腎障害(acute kidney injury; AKI)発症のリスク因子であり、同時に AKI 発症は予後悪化因子となることが知られている。また、がん治療が奏功しても治療中の AKI 発症の既往は将来的な慢性腎臓病(chronic kidney disease; CKD)発症のリスク因子となることも明らかとなった(AKI to CKD transition : J Am Soc Nephrol 2016)。よって古典的抗がん剤シスプラチン(CDDP)を始めとした AKI 発症リスクが高い抗がん剤治療において AKI を予防することは、短期的・長期的にもがん患者の予後改善につながると考えられるため、その克服は重要であるが、予防薬・治療薬がないのが現状である。

鉄はイオン価数が変化する遷移金属であり、電子移動を伴う生体反応に多く活用されることで生命機能維持に必須である。一方で、二価鉄(Fe²⁺)は Fenton 反応を介してラジカルを発生させ、細胞障害を引き起こす。研究代表者のグループは腎臓病における鉄の役割を研究しており、腎臓病では鉄の異所性臓器蓄積を引き起こすこと(Hamano H, et al. Nephrol Dial Transplant. 2018)、線維化腎での鉄蓄積がみられることを報告した(Ikeda Y, et al. PLoS One. 2014)。加えて、鉄キレート剤や鉄制限食による除鉄が、間質性腎炎や糖尿病性腎症の病態進展を抑制することを明らかにした(Ikeda Y... Hamano H, et al. Sci Rep. 2017, Ikeda Y, et al. PLoS One. 2014, Ikeda Y, et al. Am J Physiol Renal Physiol. 2013)。このように、鉄は腎障害の病態と密接に関与しており、「鉄」が腎障害の治療標的因子であることが示唆されている。

フェロトーシスとは、鉄依存性の脂質酸化を介した「制御性細胞死」という新しい概念である(Cell 2012)。抗がん剤誘発性腎障害は CDDP によるものがよく知られているが、CDDP 投与によって、腎臓への鉄蓄積や酸化ストレスが増加することが報告されており、鉄キレート剤デフェロキサミンによって CDDP 腎障害を抑制することも明らかにされている(Int Urol Nephrol. 2002)。よって、CDDP 誘発性腎障害には鉄依存性のフェロトーシスが関与することが示唆されるが、詳細は不明である。

2. 研究の目的

本研究では、CDDP 誘発性腎障害の発症における対して新規の細胞死経路フェロトーシスの関与を明らかにして、フェロトーシスに着目した新規予防・治療法への応用につながる基礎的知見の集積を目的とする。また、CDDP を用いたがん治療の安全性向上ならびに腎機能低下患者への用量制限を緩和できることが期待される。

3. 研究の方法

本研究では、CDDP 誘発性腎障害におけるフェロトーシスの役割について、in vitro, in vivo の両面から解析を行う。In vitro では腎近位尿細管細胞を用いて、CDDP による腎細胞障害にフェロトーシスが関与することと、そのメカニズム解明を行い、創薬ターゲットとなる分子を探索することに加えて、腎障害を起こす他の抗がん剤についてもフェロトーシスの関与を確認する。In vivo では CDDP 誘発性腎障害モデル動物を用いた、フェロトーシスの確認、ならびに薬理学的なフェロトーシス阻害や鉄除去によって、フェロトーシス抑制による腎障害改善効果について、遺伝子・タンパク発現、病理学的観点から検討する。加えて、フェロトーシス抑制が、CDDP の抗腫瘍効果に対して影響しないかを調べる。これらの検討から、CDDP 誘発性腎障害に対する予防薬・治療薬の確立のための基礎知見を集積することで、将来的な臨床応用につながることを目指す。

(1) In vitro 実験：CDDP によるフェロトーシス発症メカニズムの解明

腎近位尿細管細胞(MDCK もしくは LCC-PK1)を用いる。この 2 系統は薬剤輸送体発現が保持されており、CDDP 含めた薬剤性細胞障害検討への使用が適している。

CDDP による細胞死におけるフェロトーシスの役割

CDDP による細胞死がフェロトーシス阻害薬(Ferrostatin-1, Liproxstatin-1)によって抑制されるかどうかを細胞増殖アッセイによる毒性解析にて評価する。

CDDP 細胞死におけるフェロトーシスの機序

CDDP を処理した細胞におけるフェロトーシスの制御因子(SLC7A11, GPX4, ACSL4 など)の変化を確認する。また、フェロトーシスは鉄依存性の過酸化脂質の蓄積を介するため、過酸化脂質を検出する Malondialdehyde や 4-Hydroxynonenal を測定する。また、フェロトーシスマーカーである COX-2 発現も確認する。

CDDP による細胞内鉄の変化

CDDP によって細胞内鉄が変化するか、ニトロソ PSAP 法・原子吸光度法により鉄濃度を

測定する。また、フェントン反応を触媒する二価鉄イオンを、特異的検出蛍光プローブである RhoNox-1 を用いて検出し、鉄の局在とフェロトーシスの関係を調べる。

(2) In vivo 実験：CDDP 腎障害マウスモデルを用いたフェロトーシスの役割の検討
本研究では下記の AKI, CKD モデルを用いる。予備検討にて腎障害の再現性を確認している。
AKI モデル：マウスに CDDP 腹腔内投与(20mg/kg)して AKI マウスモデルを作成し、48 時間後にサンプリングを行う。このモデルは CDDP 腎障害を検討するのに汎用されている。
CKD モデル：少量 CDDP の慢性投与(7mg/kg を週 1 回×4 週間)によって CKD モデルを作成して解析に用いる。

CDDP 腎障害マウスモデルにおけるフェロトーシス

培養細胞でみられた CDDP によるフェロトーシスが、モデル動物の腎臓でもみられるかを確認する。フェロトーシスマーカー 4-Hydroxynonenal による過酸化脂質蓄積や COX-2 発現を調べる。同様にフェロトーシスの制御因子についても調べる。加えて、腎臓鉄蓄積について、ニトロソ PSAP 法・原子吸光度法による鉄濃度や、RhoNox-1 による二価鉄イオンの測定を行う。上記のフェロトーシス阻害薬投与によって、腎障害が抑制されるかも検討する。また、CDDP の腎蓄積量についても原子吸光度法を用いて評価する。加えて、鉄キレート剤デフェロキサミンを投与して鉄除去によっても、腎障害が抑制されると同時に、過酸化脂質や COX-2 発現増加が抑制され、フェロトーシスが阻害されることを調べる。フェロトーシス制御因子の影響についても解析する。

フェロトーシス抑制による CDDP 抗腫瘍効果への影響の検討

培養がん細胞やがん移植マウスを用いて、フェロトーシス抑制による CDDP の抗腫瘍効果への影響を調べる。フェロトーシス抑制は CDDP 腎障害を抑制するが、抗腫瘍効果には影響しないことを明らかにする。

4. 研究成果

シスプラチンは、トランスフェリン受容体 1 とフェリチンのタンパク質発現を増加させ、マウスの腎臓の鉄含有量を増加させた。また、シスプラチン投与により、腎臓の第一鉄とヒドロキシルラジカルレベルが共局在化し、増加した。シスプラチン投与マウスは、腎機能障害と炎症性サイトカインの発現増加を伴う腎障害を示し、これらの変化はフェロトーシスの阻害剤である Ferrostatin-1 (Fer-1) によって改善された。フェロトーシスマーカーである COX2 や 4-hydroxynonenal (4-HNE) の発現はシスプラチン投与により増加し、Fer-1 投与により減少した。一方、シスプラチンによるアポトーシスとネクロトーシスは、Fer-1 投与により抑制された。さらに、鉄キレート剤であるデフェロキサミンも COX-2 および 4-HNE の発現を低下させ、CIN を抑制した。フェロトーシスは CIN の病態に関与しており、CIN の新たな予防標的として利用できる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 0件）

1. 著者名 Hamano H, Ikeda Y, Goda M, Fukushima K, Kishi S, Chuma M, Yamashita M, Niimura T, Takechi K, Imanishi M, Zamami Y, Horinouchi Y, Izawa-Ishizawa Y, Miyamoto L, Ishizawa K, Fujino H, Tamaki T, Aihara KI, Tsuchiya K.	4. 巻 99
2. 論文標題 Diphenhydramine may be a preventive medicine against cisplatin-induced kidney toxicity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Kidney International	6. 最初と最後の頁 885 ~ 899
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.kint.2020.10.041	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 -

1. 著者名 Hamano H, Chuma M, Takechi K, Ikeda Y.	4. 巻 99
2. 論文標題 The authors reply	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Kidney International	6. 最初と最後の頁 1026 ~ 1026
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.kint.2021.01.009	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Ikeda Y, Hamano H, Horinouchi Y, Miyamoto L, Hirayama T, Nagasawa H, Tamaki T, Tsuchiya K.	4. 巻 67
2. 論文標題 Role of ferroptosis in cisplatin-induced acute nephrotoxicity in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Trace Elem Med Biol .	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jtemb.2021.126798.	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
---------------------------	-----------------------	----

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