

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

科学研究費助成事業

研究成果報告書



令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17744

研究課題名（和文）新規細胞死フェロトーシスを標的とした肺移植後虚血再灌流障害に対する治療法の開発

研究課題名（英文）Development of a treatment for ischemia-reperfusion injury after lung transplantation targeting novel cell death ferroptosis

研究代表者

松井 優紀（MATSUI, YUKI）

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：20860422

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000 円

研究成果の概要（和文）：細胞実験において抗フェロトーシス薬であるFer-1の投与により0.1 μ Mから細胞障害の抑制効果を認め、また、その効果を示す投与のタイミングとして、「冷虚血＋再灌流時」のみならず、「冷虚血時」のみへの薬剤投与でも効果を認める可能性が示唆された。動物実験において抗フェロトーシス薬であるFer-1の投与タイミングとしては「ドナー臓器に対する冷保存中の治療目的」＋「レシピエントに対する臓器移植後再灌流中の治療目的」の両方への投与からまず検証した。投与なし群、両方投与群で検証したが、薬剤投与で血液ガス検査によるガス交換能の改善は認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新規細胞死として、フェロトーシスを標的とした肺移植後の虚血再灌流障害を起こす新規経路の証明とその経路抑制による肺移植後のグラフト機能の改善効果の検証、及び新規薬剤の開発は申請者のみが行なっている非常に学術的独自性が高いものであり、今回は、細胞実験で得られた成果を動物実験で証明することはできなかったが、引き続きの検討で効果を証明することができれば、この結果が今後の肺移植医療に非常に有益なものになると思う。

研究成果の概要（英文）：In cell experiments, administration of Fer-1, an anti-ferroptosis drug, showed an inhibitory effect on cell damage from 0.1 μ M, and the timing of administration showing this effect was not limited to "cold ischemia + reperfusion". It was suggested that the effect may be observed even if the drug is administered only "during cold ischemia". In the animal experiment, the administration timing of Fer-1 was first verified from the administration to both "therapeutic purpose during cold storage for the donor organ" + "therapeutic purpose during reperfusion after organ transplantation for the recipient". Verification was performed in the no-administration group and both-administered groups, but no improvement in gas exchange capacity was observed by blood gas test after drug administration.

研究分野：肺移植後虚血再灌流肺障害

キーワード：新規細胞死 フェロトーシス 肺移植後虚血再灌流肺障害

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

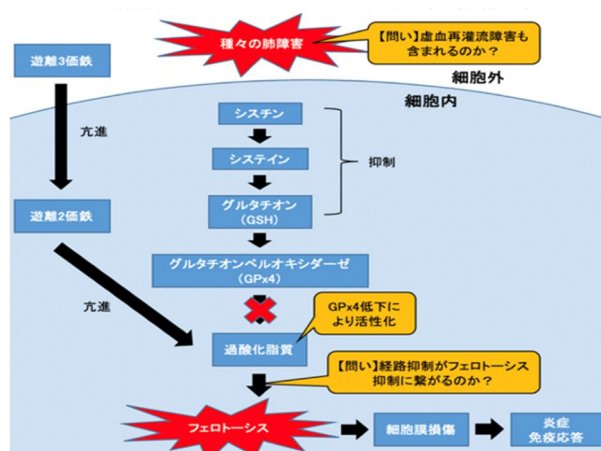
肺移植医療は特発性間質性肺炎やリンパ脈管筋腫症、肺高血圧症などの治療に反応しない慢性進行性肺疾患の終末期に行われる確立された外科治療で、2018年には本邦で計58例の肺移植が施行され、その数は近年増加傾向にある。しかし、本邦の肺移植後の5年生存率は71.7%であり、他の固形臓器移植のそれと比して未だ改善の余地があると言える。死因にはPGD、慢性拒絶反応、感染症など様々なものが挙げられるが、本邦に多い脳死肺移植の急性期の死因にPGDの関与は濃厚であり、その発症率は20-30%とされ、本邦での肺移植後死因全体の約17%を占めている。先行研究でそのPGDの発症に虚血再灌流障害の関与が示唆されており〔1〕、急性期を中心とした患者の管理にはこのPGDの制御、すなわち虚血再灌流障害の制御が必要となるが、その治療法には明確なものがないのが現状である。

さらに、この虚血再灌流障害は細胞死によって引き起こされるが、従来の細胞死の概念は制御される死(アポトーシス)と偶発的な死(ネクローシス)の2つであった。しかし、近年の研究でネクロプトーシスやフェロトーシスなど、ネクローシス様である制御された死(制御されたネクローシス)の存在が明らかになってきており、注目を集めている。肺移植領域でもその研究は広くなされ、先行研究で肺移植後の虚血再灌流障害には細胞死としてネクローシスの関与が示唆されており〔1〕、ネクローシスの中のネクロプトーシスの関与の報告もある〔2〕が、どの細胞死が肺移植後の虚血再灌流障害に関与しているのかについては未だ不明な点が多く、その関与経路の発見と、その経路抑制が肺移植後患者の治療成績に大きく寄与すると考えられる。

我々は、ネクローシスの中のフェロトーシスが慢性閉塞性肺疾患(COPD)や特発性肺線維症に大きく関わっていること〔3,4〕、心筋の虚血再灌流障害を起こしたラットへのIndolylmaleimide(IM)化合物の投与で不整脈による突然死が軽減したこと〔5〕、さらにそのIM化合物の阻害対象がフェロトーシスであること〔6〕の報告から、その他の肺障害として肺移植後の虚血再灌流障害にもフェロトーシスが関与している可能性を考えた。

フェロトーシスは近年提唱された新たな概念であり、鉄依存性の脂質酸化依存的な細胞死である(図1)。細胞は抗酸化物質であるグルタチオン(GSH)を用いて細胞毒性の高い過酸化脂質を還元し、これを無毒化することにより自身を守っているが、障害などで細胞内のシスチン-システイン-GSH経路が抑制されると、グルタチオンペルオキシダーゼ(GPx4)の活性が低下する。さらに、遊離2価鉄を介した反応(フェントン反応)で活性酸素種(ROS)による生体膜リン脂質の酸化が亢進することで過酸化脂質が細胞内に蓄積し、フェロトーシスが引き起こされる〔7〕。

図1 肺障害におけるフェロトーシス経路とその抑制効果



2. 研究の目的

現在、肺移植後の虚血再灌流障害の治療に有効である可能性が報告されている薬剤にネクロスタチン (Nec-1) [8] があるが、その阻害経路は制御されたネクローシスの中のネクロプトーシスである。本研究の標的であるフェロトーシスも制御されたネクローシスの一つであり、その阻害薬はフェロスタチン (Fer-1) IM 化合物以外にも liproxstatin-1 が報告されている [9]。先行研究として、心臓領域の虚血再灌流障害にフェロトーシスが関与しており、その阻害薬で障害抑制効果があることがわかっているが、肺移植後の虚血再灌流障害における検討や報告はない。そこで、肺移植後の虚血再灌流障害にフェロトーシスは関与するのか。フェロトーシス阻害薬がフェロトーシス抑制ならびに移植後のグラフト機能改善、つまり、肺移植後の虚血再灌流障害の新規治療法に繋がるのか。の2点の解明を本研究の目的とした。

3. 研究の方法

1) 細胞実験：気管上皮細胞株 (Beas-2B) を用いた細胞実験でフェロトーシスと虚血再灌流障害の関与の証明

【方法】(図2): 気管上皮細胞株 (Beas-2B) を 10000 cells/well (100 μ L) として、酸素濃度 21%、37 度で 24 時間培養/定着させた後に、培養液を薬剤 (Fer-1 や IM 化合物など) 含有の臓器灌流液に変更し、酸素濃度 50-60%、4 度で 18 時間保存 (冷虚血) する。その後、臓器灌流液を薬剤含有の培養液に再度変更し、酸素濃度 21%、37 度で 4 時間培養 (再灌流) 後に、WST-1 を用いて生存率を解析する。薬剤含有のタイミングは図の (I) のみ (ドナー臓器に対する冷保存中の治療目的) (II) のみ (レシピエントに対する臓器移植後再灌流中の治療目的) (I + II) の 3 通りを解析する。

2) 動物実験：ラット肺移植モデルを用いた、フェロトーシス阻害薬による虚血再灌流障害の抑制効果ならびにグラフト機能改善効果の証明

【方法】(図3): 全身麻酔下で (I) ラット A からドナー肺を摘出 (摘出時に治療薬投与 (Fer-1 や IM 化合物など)) (II) 18 時間冷虚血後にグラフト肺を作成、(III) グraft肺をラット B に移植、(IV) ラット B に治療薬を投与、(V) 2 時間再灌流した後に、肺移植後の改善効果を調査する。治療薬投与のタイミングは上記の細胞実験と同様、ドナー臓器に対する冷保存中の治療目的 (図の I のみ) レシピエントに対する臓器移植後再灌流中の治療目的 (IV のみ) その両方 (I + IV) の 3 通り (各々の n 数は 6) を解析する。治療効果判定には、血液ガス検査によるガス交換能、炎症性サイトカイン量、病理組織検体における肺傷害などを用いる。

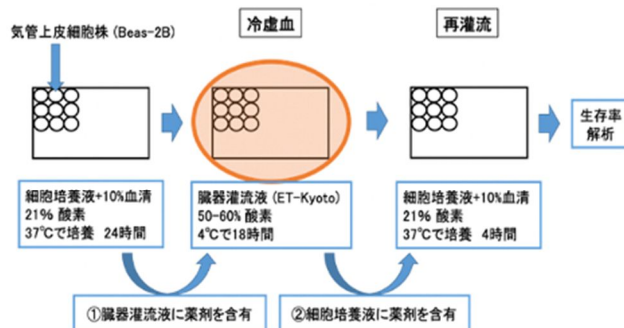


図2 細胞実験プロトコール

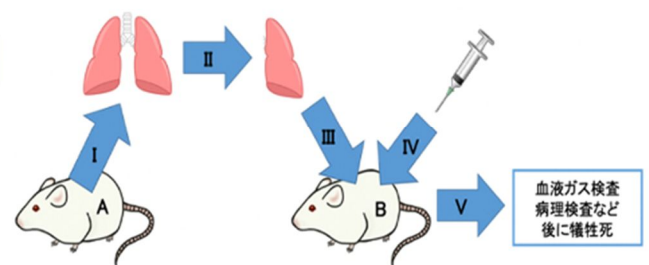


図3 動物実験プロトコール

4. 研究成果

1) 細胞実験：

抗フェロトーシス薬である Fer-1 の投与により 0.1 μM から細胞障害の抑制効果を認め、(図 4 (注：縦軸の吸光度は生細胞の吸光度を示す。)) また、その効果を示す投与のタイミングとして、「冷虚血 + 再灌流時」のみならず、「冷虚血時」のみへの薬剤投与でも効果を認める可能性が示唆された。

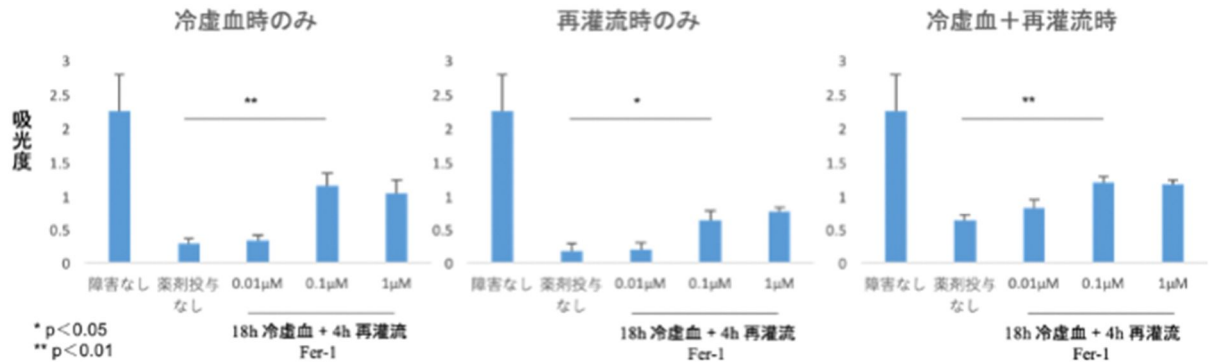


図4 フェロトーシス阻害薬による細胞障害抑制効果

2) 動物実験：

抗フェロトーシス薬である Fer-1 を使用し、投与タイミングとしては「ドナー臓器に対する冷保存中の治療目的」+「レシピエントに対する臓器移植後再灌流中の治療目的」の両方への投与 (I + IV) からまず検証した (細胞を用いた先行実験を元にして、薬剤投与のタイミングとして「両方」投与で効果を認めれば、「ドナー臓器に対する冷保存中の治療目的」のみでも効果がある可能性があると考えた)。投与なし群、両方投与群で各々の n 数は 4 で検証したが、薬剤投与で血液ガス検査によるガス交換能の改善は認めなかった (図 5)。

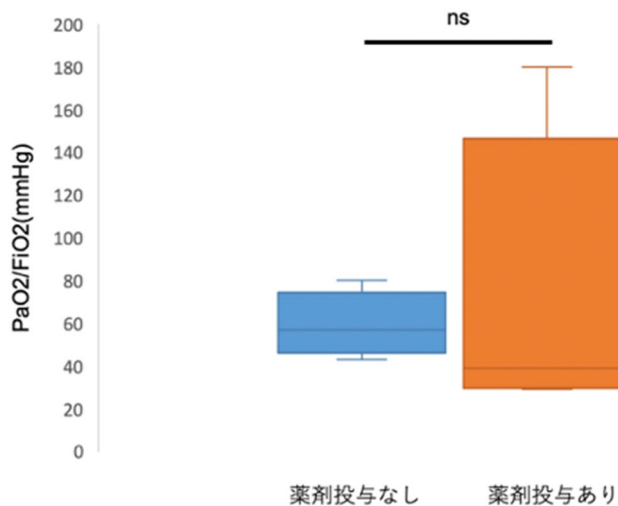


図5 フェロトーシス阻害薬によるグラフト機能改善効果

〔引用文献〕

1. Wang X et al. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2019 Aug;61(2):244-256.
2. Kim H et al. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2018 Oct 1;315(4):595-608.
3. Yoshida M et al. *Nat Commun*. 2019 Jul 17;10(1):3145.
4. Tsubouchi K et al. *J Immunol*. 2019 Oct 15;203(8):2076-2087.
5. Dodo K et al. *ACS Med Chem Lett*. 2018 Jan 29;9(3):182-187.

6. Dodo K et al. *ACS Med Chem Lett.* 2019 Jul 30;10(9):1272-1278.
7. Yu H et al. *J Cell Mol Med.* 2017 Apr;21(4):648-657.
8. Kanou T et al. *J Heart Lung Transplant.* 2018 Oct;37(10):1261-1270.
9. Li X et al. *J Inflamm.* 2019 16:11.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
---------	---------