

令和 6 年 10 月 1 日現在

機関番号：11301
研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(A））
研究期間：2021～2023
課題番号：20KK0363
研究課題名（和文）フェロトーシスの制御機序と責任脂質酸化種の同定

研究課題名（英文）Lipid radicals in regulation of ferroptosis

研究代表者

三島 英換（Eikan, Mishima）

東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：00706939

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 10,800,000円

渡航期間： 36ヶ月

研究成果の概要（和文）：ドイツ（ミュンヘン）のヘルムホルツセンターミュンヘンに滞在し国際共同研究を行った。研究内容としてフェロトーシス細胞死の制御機構の解明に従事した。本共同研究から、1）ビタミンKのフェロトーシス抑制作用とその機序の解明、2）フェロトーシス抑制タンパク質であるGPX4の汎用性の高い新規アッセイ法の開発、3）第2のフェロトーシス抑制タンパク質であるFSP1の新規阻害薬の開発とその機序の解明を成果としてあげることが出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

フェロトーシスは鉄介在性の脂質酸化依存性の細胞死の一種である。近年、腎臓や肝臓の急性臓器障害、アルツハイマー病をはじめとする神経変性疾患、治療抵抗性がん細胞の抗がん薬感受性等の関与することが知られ、これらの病気の治療標的として世界的に注目を浴びている生命事象である。本研究においてフェロトーシスの制御機構やフェロトーシス関連タンパク質を阻害する化合物を開発した。これらの成果はフェロトーシスが関連する病気の治療薬への展開が今後期待される。

研究成果の概要（英文）：I stayed at the Helmholtz Center Munich in Germany (Munich) and conducted international collaborative research. My research was focused on elucidating the regulatory mechanism of ferrototic cell death. From this joint research, the following results were obtained: 1) elucidation of the inhibitory effect of vitamin K on ferotosis and its mechanism, 2) development of a versatile new assay for GPX4, a ferotosis inhibitory protein, and 3) development of a new inhibitor for FSP1, a second ferotosis inhibitory protein, and elucidation of its mechanism.

研究分野：生命科学

キーワード：細胞死 フェロトーシス 酸化ストレス ビタミンK 腎臓病 アポトーシス FSP1 GPX4

1. 研究開始当初の背景

フェロトーシス (Ferroptosis) は鉄介在性脂質酸化依存性の細胞死の一種として、2012 年に Dixon と Stockwell らによって提唱されたものである。以降の研究で、フェロトーシスの分子制御機構が明らかになりつつあり、また各種の病態への深い関わりが報告されてきた。例えば、虚血再灌流障害などによる腎臓、心臓、肝臓などの急性臓器障害、アルツハイマー病などの神経変性疾患、またがんの退縮などに関わることが知られている。したがってフェロトーシスはこれらの病気の治療、創薬標的となることが期待されている。

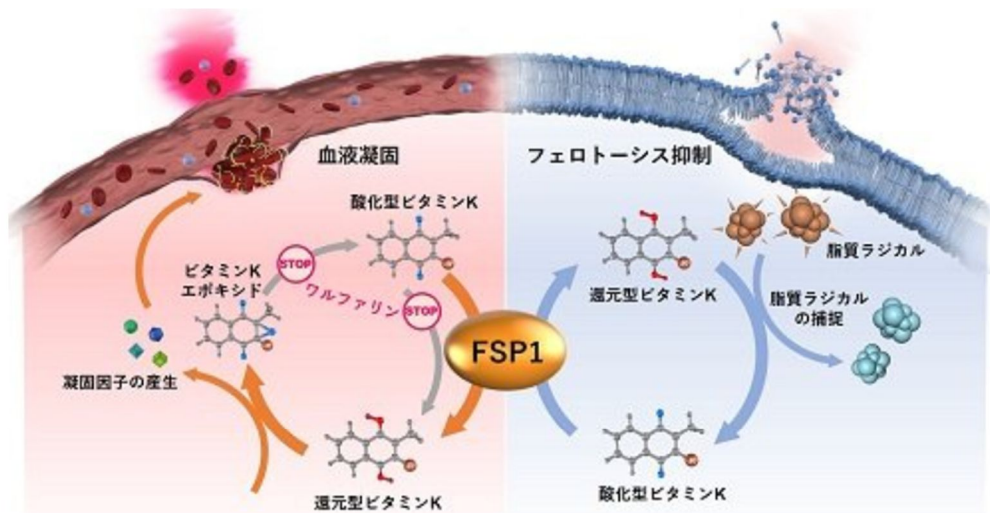
2. 研究の目的

本研究では、1) フェロトーシスの新たな制御機構と 2) フェロトーシス制御分子を標的としたフェロトーシス誘導化合物の探索、2) フェロトーシスの制御分子の評価方法の開発を目的とした。

3. 研究の方法および結果

(1) ビタミン K のフェロトーシス抑制作用の解明

フェロトーシスを誘導する培養細胞系である、タモキシフェン誘導性 Gpx4 KO 細胞の Pfa1 細胞を用いて、フェロトーシスを抑制する生体内代謝物をビタミン類を含め広く探索した。その結果、メナキノン - 4 (ビタミン K2)、フィロキノン (ビタミン K1)、メナジオン (ビタミン K3) を含むビタミン K に強いフェロトーシス抑制効果を見つけた。メナキノン 4 の高用量投与は *in vivo* におけるフェロトーシスモデルである肝細胞特異的 Gpx4 KO マウスに対してもフェロトーシス抑制効果、肝障害軽減効果を認めた。ビタミン K がフェロトーシスを抑制する機序としては、通常存在様式である酸化型ビタミン K には、フェロトーシスを抑制するために必要な脂質ラジカル捕捉作用は認めないものの、還元型ビタミン K は脂質ラジカル捕捉効果があり、この作用を介してフェロトーシスを抑制することを明らかにした。さらに、これまでコエンザイム Q10 の還元酵素として知られていた Ferroptosis suppressor protein 1 (FSP1) が、このビタミン K のフェロトーシスの抑制に必要なビタミン K の還元酵素であることを突き止めた。さらに FSP1 によるビタミン K の還元作用は、これまで 50 年来不明であった抗凝固薬であるワルファリン抵抗性のビタミン K 還元酵素であることも明らかとなった。この発見は、抗凝固薬であるワルファリン中毒の際になぜ高用量のビタミン K 投与が解毒作用を発揮するのかの分子機序を明らかにしたものである。



(左) 血液凝固に関わるビタミン K の作用。ビタミン K は、酸化型ビタミン K →還元型ビタミン K →ビタミン K エポキシドへと変換される回路をまわることで、血液の凝固に必要なタンパク質 (凝固因子) が作られ、出血した際に血を止める役割を果たす。ワルファリンはこのビタミン K サイクルをとめることで凝固因子が作られなくなるため血を固まりにくくする。ワルファリンが効いている状態でも、ビタミン K は FSP1 の働きによって還元型ビタミン K へと変換する経路があるため、ワルファリン中毒になった時でもビタミン K を投与することで凝固因子がつけられ止血可能な状態にできる。

(右) ビタミン K によるフェロトーシスの抑制。酸化型ビタミン K は FSP1 の働きによって還元型ビタミン K に変換される。還元型ビタミン K は脂質ラジカルを捕捉することでフェロトーシスを抑えるとともに、酸化型ビタミン K に戻り再び FSP1 によって還元される。

(図 : 東北大学プレスリリース 2022 年 8 月 4 日より引用)

(2) 新規抗がん薬を目指した FSP1 阻害薬の開発

FSP1 は、がん細胞をふくむ細胞のフェロトーシス抑制に働いている。したがって、FSP1 の阻害薬は新規抗がん薬となることが期待されている。これまで第一世代の FSP1 阻害薬として iFSP1 が報告されていたが、本薬剤は *in vitro* に使用できないこと、ヒト FSP1 に対してしか作用しないことから、さらなる FSP1 阻害薬の探索が期待されている。FSP1 以外にもフェロトーシス抑制分子としてミトコンドリアにおけるコエンザイム Q10 還元作用を持つジヒドロオロト酸オキシダーゼ (DHODH) も FSP1 同様にコエンザイム Q10 を還元する作用を介して、フェロトーシスを抑制すること、また DHODH 阻害薬である Brequinar が細胞のフェロトーシス感受性を高めることが報告されていた (Mao, Nature 2021, PMID: 33981038)。しかし、我々は DHODH とその阻害薬のフェロトーシスへの関与を検討する過程で、DHODH 自体にはフェロトーシス制御に関わる影響は乏しく、DHODH 阻害薬である Brequinar によるフェロトーシス感受性増強効果は、オフターゲットとして FSP1 を阻害することで発揮していることを明らかにした。つまり、Brequinar は FSP1 阻害薬でもあったことがわかった。また Brequinar はヒト FSP1、マウス FSP1 どちらも阻害することがわかった。

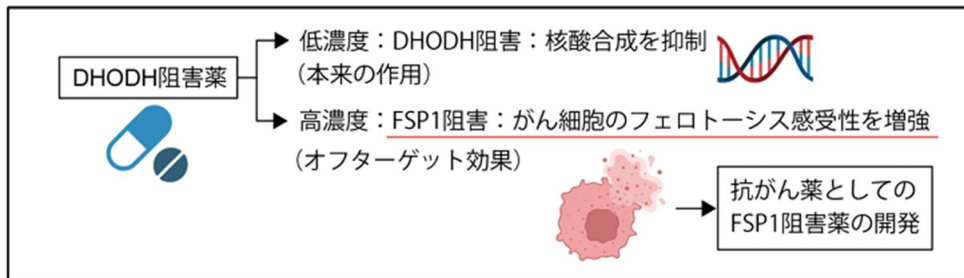


図: DHODH 阻害薬による FSP1 阻害を介したフェロトーシス感受性増強効果: 2023 年 8 月 6 日東北大学プレスリリースより引用

(3) フェロトーシス抑制タンパク質 GPX4 の汎用性の高いアッセイ法の確立

グルタチオンペルオキシダーゼ 4 (GPX4) は有害な酸化脂質を解毒することでフェロトーシスを抑制するタンパク質である。したがって、GPX4 の酵素活性を正しく評価することはフェロトーシスの制御機序や化合物の探索に重要である。しかしながら、従来の GPX4 の酵素活性評価法としては、細胞の破砕液を用いた方法、または遺伝子組換えした大腸菌に産生させた GPX4 酵素を使用した方法のいずれかが使用されてきた。しかしながら、これらの方法は、実際の細胞や組織のサンプルを使用できる一方で、細胞内に含まれる他の酵素や成分の影響を多分に受け、正しい GPX4 の酵素活性の評価は困難である点、また大腸菌で精製された GPX4 酵素を使用する場合は特異性の高い活性評価が可能なもの、GPX4 はタンパク質内にセレンという微量金属を含む特殊なタンパク質であることから、大腸菌でセレンを正しく含んだ GPX4 の産生が困難なことに加え、大腸菌が産生した GPX4 は、哺乳類のものとは特性が異なるため、ヒトの生体内に含まれる GPX4 の活性を反映していないという課題が存在した。そのため、GPX4 をより正確に汎用性の高く評価する測定系が望まれていた。

本研究では、哺乳類の培養細胞内に Strep II tag で標的した GPX4 を過剰発現させ、その標識をもとにアフィニティー精製することで、セレンを正しく含んだ GPX4 を回収した。そして、回収した GPX4 と基質となる過酸化脂質を反応させ、酵素反応による過酸化脂質の減少または、酵素反応の結果として消費される補酵素 NADPH の減少を指標にして酵素活性を評価した。本法は GPX4 の酵素活性を評価し、また GPX4 阻害薬の効果の評価にも使用できることが確認された。

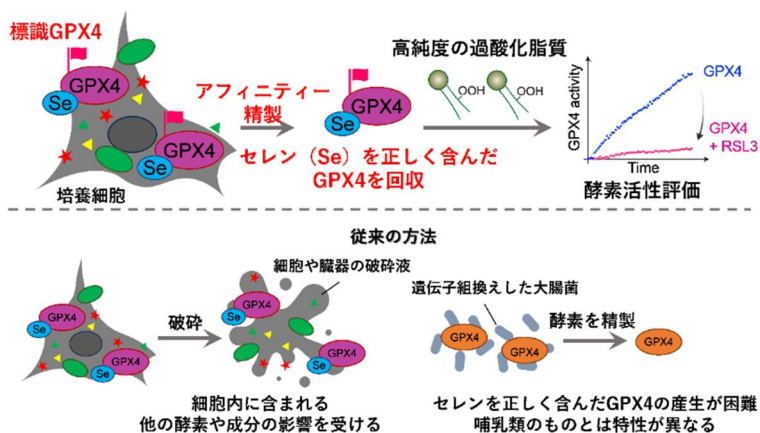


図1. 今回開発したGPX4の酵素測定法の概要と、従来法との比較。

(図: 2024 年 2 月 28 日東北大学プレスリリースより引用)

4. 研究成果

(1)の成果は、Mishima et al, Nature 2022, PMID: 35922516 に報告した。また、東北大学からプレスリリース(2022年8月4日)を行った

(2)の成果は、Mishima et al, Nature 2023 ; PMID: 37407687 に報告した。また、東北大学からプレスリリース(2023年8月6日)を行った

(3)の成果は、Nakamura et al. Cell reports methods 2024: PMID: 38401540 に報告した。また、東北大学からプレスリリース(2024年2月28日)を行った

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計16件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 5件／うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Mishima E, Ito J, Wu Z, Nakamura T, Wahida A, Doll S, Tonnus W, Nepachalovich P, Eggenhofer E, Aldrovandi M, Henkelmann B, Yamada KI, Wanninger J, Zilka O, Sato E, Feederle R, Hass D, Maida A, Linkermann A, Geissler EK, Conrad M	4. 巻 608
2. 論文標題 A non-canonical vitamin K cycle is a potent ferroptosis suppressor	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 778 ~ 783
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-022-05022-3	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 該当する
1. 著者名 Watanabe Kimio, Sato Emiko, Mishima Eikan, Miyazaki Mariko, Tanaka Tetsuhiro	4. 巻 24
2. 論文標題 What 's New in the Molecular Mechanisms of Diabetic Kidney Disease: Recent Advances	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 570 ~ 570
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms24010570	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 Mishima Eikan, Conrad Marcus	4. 巻 42
2. 論文標題 Nutritional and Metabolic Control of Ferroptosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Annual Review of Nutrition	6. 最初と最後の頁 275 ~ 309
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1146/annurev-nutr-062320-114541	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 該当する
1. 著者名 伊藤隼哉 三島英換 仲川清隆	4. 巻 81
2. 論文標題 脂質酸化細胞死を抑制するビタミンKとその還元酵素の発見	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 B&I	6. 最初と最後の頁 100-103
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 三島英換	4. 巻 65
2. 論文標題 腎障害における細胞死update	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 日腎会誌	6. 最初と最後の頁 17-24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 三島英換 菊地晃一 阿部高明	4. 巻 16
2. 論文標題 腎臓病と腸内細菌叢：最近の話題を中心に	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 腎臓内科	6. 最初と最後の頁 477-482
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Mishima Eikan, Abe Takaaki	4. 巻 14
2. 論文標題 Gut Microbiota Dynamics and Uremic Toxins	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Toxins	6. 最初と最後の頁 146 ~ 146
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/toxins14020146	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 Mishima Eikan, Abe Takaaki	4. 巻 45
2. 論文標題 Role of the microbiota in hypertension and antihypertensive drug metabolism	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hypertension Research	6. 最初と最後の頁 246 ~ 253
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41440-021-00804-0	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 Mishima Eikan	4. 巻 Online ahead of print.
2. 論文標題 The E2F1-IREB2 axis regulates neuronal ferroptosis in cerebral ischemia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hypertension Research	6. 最初と最後の頁 Online ahead
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41440-021-00837-5	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 Ho Hsin Jung, Kikuchi Koichi, Oikawa Daiki, Watanabe Shun, Kanemitsu Yoshitomi, Saigusa Daisuke, Kujirai Ryota, Ikeda Ohtsubo Wakako, Ichijo Mariko, Akiyama Yukako, Aoki Yuichi, Mishima Eikan, Abe Takaaki	4. 巻 9
2. 論文標題 SGLT 1 specific inhibition ameliorates renal failure and alters the gut microbial community in mice with adenine induced renal failure	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Physiological Reports	6. 最初と最後の頁 15092
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14814/phy2.15092	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 Zheng Jiashuo, Sato Mami, Mishima Eikan, Sato Hideyo, Proneth Bettina, Conrad Marcus	4. 巻 12
2. 論文標題 Sorafenib fails to trigger ferroptosis across a wide range of cancer cell lines	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Death & Disease	6. 最初と最後の頁 698
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41419-021-03998-w	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 Mishima Eikan, Abe Takaaki	4. 巻 14
2. 論文標題 Gut Microbiota Dynamics and Uremic Toxins	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Toxins	6. 最初と最後の頁 146 ~ 146
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/toxins14020146	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 Seibt Tobias, Wahida Adam, Hoeft Konrad, Kemmner Stephan, Linkermann Andreas, Mishima Eikan, Conrad Marcus	4. 巻 Online ahead of print.
2. 論文標題 Ferroptosis Biology	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Nephrology Dialysis Transplantation	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) 10.1093/ndt/gfae097	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 該当する

1. 著者名 Mishima Eikan	4. 巻 Online ahead of print.
2. 論文標題 Targeting ferroptosis for treating kidney disease	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Nephrology	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) 10.1007/s10157-024-02491-w	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 Nakamura Toshitaka, Ito Junya, Mour?o Andr? Santos Dias, Wahida Adam, Nakagawa Kiyotaka, Mishima Eikan, Conrad Marcus	4. 巻 4
2. 論文標題 A tangible method to assess native ferroptosis suppressor activity	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cell Reports Methods	6. 最初と最後の頁 100710 ~ 100710
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.crmeth.2024.100710	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 該当する

1. 著者名 Mishima Eikan, Nakamura Toshitaka, Zheng Jiashuo, Zhang Weijia, Mour?o Andr? Santos Dias, Sennhenn Peter, Conrad Marcus	4. 巻 619
2. 論文標題 DHODH inhibitors sensitize to ferroptosis by FSP1 inhibition	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 E9 ~ E18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-023-06269-0	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 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Eikan Mishima
2. 発表標題 Non-canonical vitamin K cycle is a potent ferroptosis suppressor
3. 学会等名 Redox week 2022（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Eikan Mishima
2. 発表標題 Non-canonical vitamin K cycle is a potent ferroptosis suppressor
3. 学会等名 Cold spring harbor meeting Asia（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Eikan Mishima
2. 発表標題 Role of Vitamin K on ferroptosis and warfarin toxicity: unexpected link
3. 学会等名 第27回心血管内分泌学会 学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三島英換
2. 発表標題 コロナ下でのドイツ留学とフェロトーシス研究
3. 学会等名 第52回日本腎臓学会西部学術大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Eikan Mishima
2. 発表標題 Ferroptosis regulation and kidney disease
3. 学会等名 第65回日本腎臓学会学術総会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三島英換
2. 発表標題 With コロナでの留学は可能か
3. 学会等名 第2回 Digital Hypertension Conference発表
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三島英換
2. 発表標題 慢性大動脈解離の偽腔閉塞化による腎動脈狭窄に対してPTRAを施行し腎虚血の改善をDW-MRIで評価しえた1例
3. 学会等名 第9回臨床高血圧フォーラム
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 フェロトシス抑制剤	発明者 三島英換	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、W02022075444A1	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

Conrad Laboratory
<https://www.conradlaboratory.com/>
東北大学プレスリリース
<https://www.tohoku.ac.jp/japanese/2022/08/press20220804-01-vitamink.html>
<https://www.tohoku.ac.jp/japanese/2023/07/press20230705-01-ferroptosis.html>
<https://www.tohoku.ac.jp/japanese/2024/02/press20240228-01-ferroptosis.html>

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
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	コンラッド マルクス (Conrad Marcus)	ヘルムホルツミュンヘン・MCD・Director	

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		
ドイツ	ヘルムホルツ研究センターミュンヘン		