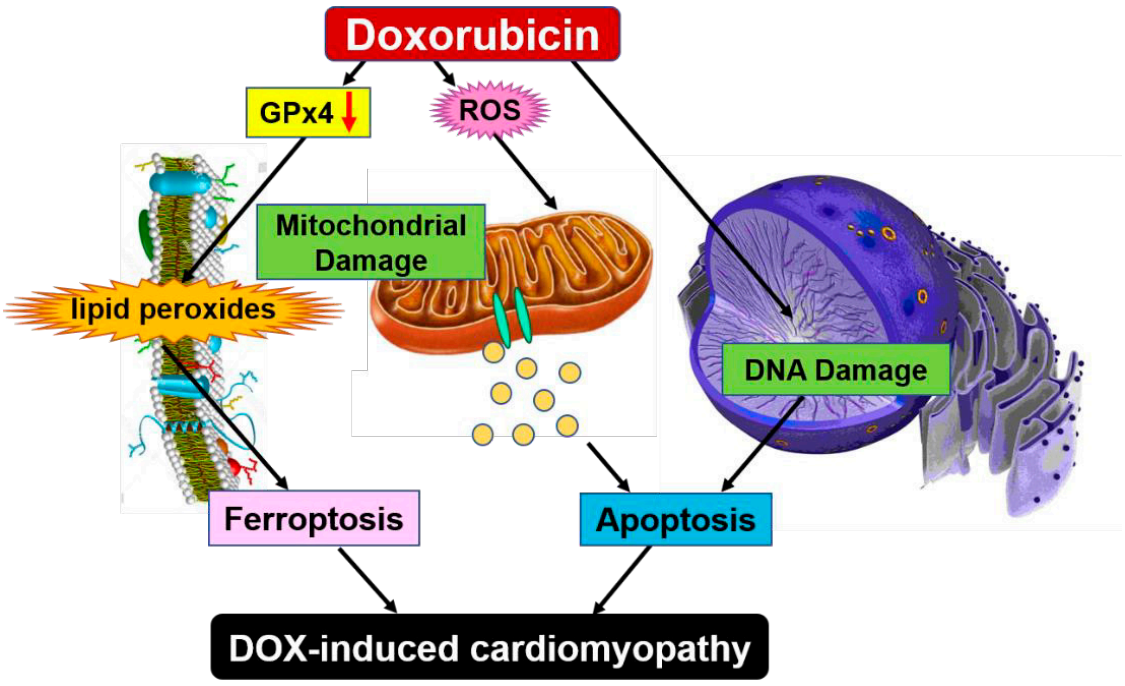
212　心血管病における脂質ラジカルを標的とした治療の確立	池田　昌隆

【目的】心血管病は本邦における死因の約 3 割を占める疾患群であり、さらなる病態解明とその治療法の確立が望まれる。以前より脂質化酸化物は心血管病の進展において重要な役割を果たしていることが報告されてきたが、依然として過酸化脂質が病態進展に寄与する分子機序は明らかではない。本研究では、近年新規に提唱された過剰な過酸化脂質に基づく制御性細胞死であるフェロトーシス（ferroptosis）とその主たる制御分子である glutathione peroxidase 4（GPx4）に着目し、心血管病の中でも特に過酸化脂質が病態に深く関与していることが示唆されているドキソルビシン心筋症でのこれらの役割についての解析を行った。

【方法】C57BL/6J マウスおよび GPx4 過剰発現マウスにドキソルビシン心筋症モデルを作製し、心機能および生化学的な解析を行った。また新生仔ラットから得た単離培養心筋細胞にドキソルビシン刺激を加え、フェロトーシス阻害剤である ferrostatin-1（Fer-1）およびアポトーシスの阻害剤である zVAD-FMK を用いて、ドキソルビシンによって誘導される細胞死の詳細な解析を行った。

【結果】ドキソルビシン心筋症モデルの心筋組織においては、心収縮能の低下や心筋細胞死といった心筋傷害とともに GPx4 が有意に減少しており、過酸化脂質が増加していることが確認された。一方で、GPx4 の過剰発現マウスではこれらの心筋傷害が改善された。単離心筋細胞を用いた検討では、ドキソルビシンによる刺激により GPx4 の減少とともに 6 割程度の細胞死が誘導された。脂質親和性抗酸化剤の一種であり、フェロトーシス阻害剤とされる Fer-1 の添加により、3 割程度の細胞死が抑制され、またアポトーシスの阻害剤である zVAD-FMK の添加により、3 割程度の細胞死が抑制された。さらに Fer-1 と zVAD-FMK 両者の添加によりドキソルビシンによる細胞死がほぼ完全に抑制されることが示された。以上の結果より、ドキソルビシン心筋症における細胞死においてはアポトーシスとともに GPx4 の減少に伴うフェロトーシスが病態進展に重要な役割を果たしていることが示唆された。

ドキソルビシンに伴う GPx4 の減少とそれに伴うフェロトーシスは
アポトーシスとともにドキソルビシン心筋症の病態進展に寄与する



212. 心血管病における脂質ラジカルを標的とした治療の確立

池田　昌隆

九州大学 大学院医学研究院 循環器内科学分野

Key words：ドキソルビシン心筋症，GPx4，フェロトーシス

緒　言

心血管病は本邦における死因の約 3 割を占める疾患群であり、さらなる病態解明とその治療法の確立が望まれる。これまでにも脂質化酸化物は心血管病の進展に寄与することが示されてきたが、依然として過剰な過酸化脂質が蓄積する機序および病態進展に寄与する分子機序は明らかではない。本研究では、近年新規に提唱された鉄分子を介したフェントン反応により生じる過剰な過酸化脂質に基づく制御性細胞死であるフェロトーシス（ferroptosis）とその主たる制御分子である glutathione peroxidase 4（GPx4）に着目した［1〜2］。アントラサイクリン系抗癌剤の一種であるドキソルビシンは、現在でも血液の悪性腫瘍および乳がんを中心に多用される抗がん剤である一方、用量依存性に心毒性を示し、他の心筋症と比較しても予後不良であることが知られている［3］。加えてドキソルビシン心筋症においては過酸化脂質の蓄積が病態進展に寄与していることが示唆されていることから、マウスでのドキソルビシン心筋症モデルおよび単離培養心筋細胞を用いたドキソルビシンによる心筋細胞傷害におけるフェロトーシスと GPx4 の役割についての解明を行った［4］。

方　法

1.　ドキソルビシン心筋症動物モデルの解析

本研究では、8〜9 週齢の C57BL/6J マウス（日本クレア）および GPx4 過剰発現マウス（C57BL/6J 背景）を用いて解析を行った。ドキソルビシン心筋症モデルとして、尾静脈よりドキソルビシン（6 mg/kg）をモデル作製 0、2、4 日の時点で投与し、7、14 日の時点で心エコーによる心機能解析を行った。さらに 14 日の時点で安楽死とし、生化学的な解析（蛋白および遺伝子解析）のための臓器回収を行った。また回収時に体重および心重量を測定した。回収したサンプルを用いて Western blot による蛋白発現評価（GPx4）、定量リアルタイム PCR （qRT-PCR）による遺伝子発現解析、またホルマリン固定による心筋組織の線維化および細胞死の評価を行った。過酸化脂質の評価としては、TBARS （Thiobarbituric Acid Reactive Substances）による MDA（malonic dialdehyde）の測定を行い、さらにアクロレイン抗体を用いた western blot にて評価を行った。

2.　単離心筋細胞でのドキソルビシン刺激による心筋細胞死の解析

新生仔ラットより吸入麻酔下に心臓を摘出し、心室のみを分離し、overnight での 4℃トリプシン処理を行った。次にコラゲナーゼによる処理を行った後に非心筋細胞を 2 度の一時的な播種により除去し、単離心筋細胞を 2.5×10^5/ml で播種し、培養を開始した。10%FBS 含有 DMEM にて培養を行い、プロトコール開始 24 時間前から無血清培地に変更し、ドキソルビシン添加の実験を行った。ドキソルビシン刺激は（2 μM）30 時間の刺激で行い、阻害剤として ferrostatin-1（Fer-1：50 μM）および zVAD-FMK（50 μM）を使用し、これらの阻害剤についてはドキソルビシン添加の 30 分前に添加した。回収した細胞の蛋白発現（GPx4）および遺伝子発現（GPx4）を検討し、過酸化脂質については TBARS、また細胞死については Calcein-AM（Dojindo）を用いて評価を行った。

結　果

1. ドキソルビシン心筋症では左室収縮機能低下とともに過酸化脂質が増加し、GPx4 過剰発現マウスではこれらの心筋傷害が改善した

方法 1 に示すプロトコールにてドキソルビシン心筋症を作製した。過去の報告にある通り、本研究にて作製したドキソルビシン心筋症は著明な体重減少（全身衰弱）を来すことなく、左室収縮能の低下を誘導するドキソルビシン心筋症モデルであることを確認した（図 1、左図）。これらのモデルから回収した心筋組織を解析したところ、GPx4 は細胞質およびミトコンドリア型ともに減少し（data not shown）、過酸化脂質が有意に増加していた（図 1、中央図）。一方で GPx4 過剰発現マウスでは過酸化脂質の蓄積とともに心機能の低下が有意に改善した（図 1、左図および右図）。

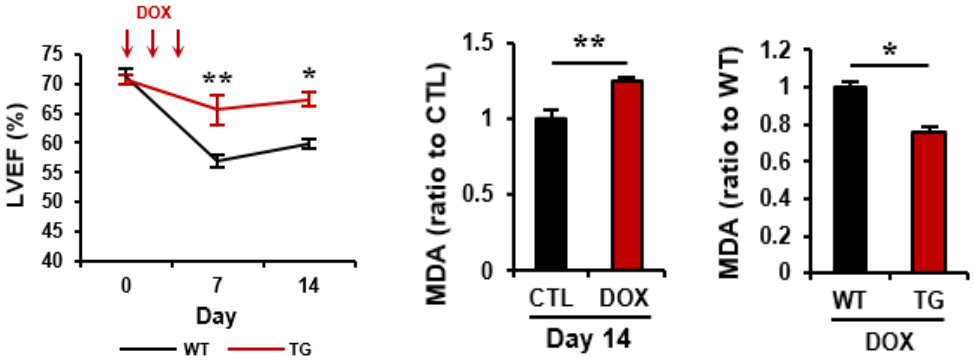


図 1.　ドキソルビシン心筋症における GPx4 過剰発現の心機能と過酸化脂質への効果
ドキソルビシンにより左室の収縮障害を来し（左図）、過酸化脂質の一つである MDA が増加する（中央図）。GPx4 の過剰発現マウスでは、左室収縮障害が予防され、MDA が抑制された（左図および右図）。
有意差検定は Student's t-test により行った。*P＜0.05、**P＜0.01。（文献［4］より改変して引用）。

2. Ferrostatin-1 は培養心筋細胞におけるドキソルビシンによる細胞死を有意に抑制した

方法 2 に示すプロトコールにて実験を行ったところ、ドキソルビシン刺激により著明な過酸化脂質と細胞死が誘導された（左図および中央図）。一方で、フェロトーシス阻害剤の一つである Fer-1 により細胞死が有意に改善し、ドキソルビシンにおいてフェロトーシスが重要な細胞死であることが示唆された。

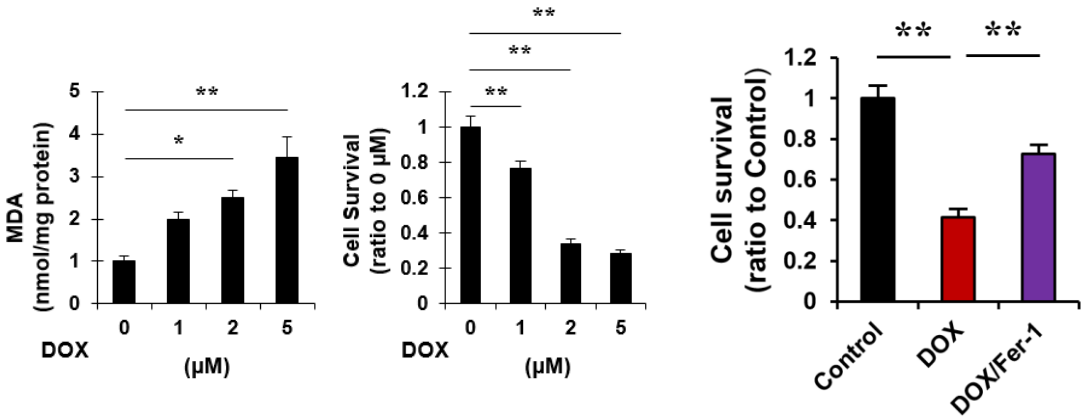


図 2.　単離心筋細胞におけるドキソルビシン（DOX）刺激により誘導される細胞死に対するフェロスタチンの効果
ドキソルビシン（DOX）刺激では濃度依存性に過酸化脂質の一つである MDA が増加し、細胞死が誘導される（左図・中央図）。一方で、脂質親和性抗酸化物質でありフェロトーシス阻害剤である Fer-1 によりドキソルビシン（2 μM、30 h）の細胞死は部分的に改善する（右図）。有意差検定は One-way ANOVA により行った。*P＜0.05、**P＜0.01。（文献［4］より改変して引用）。

3. ドキソルビシンで誘導される心筋細胞死はアポトーシスとともにフェロトーシスが主要な制御性細胞死である

ferrostatin-1単独では完全には細胞死が防止できなかったこと、またDOX刺激ではアポトーシスを引き起こすカスパーゼシグナルの活性化が認められたことから、アポトーシスとフェロトーシスの関連についても検討を行った。これらの結果から、アポトーシスとフェロトーシスはほぼ同等にドキソルビシンによる細胞死を抑制し、一方で両者の阻害剤を同時に使用することで完全に相加的な改善効果が得られることから、フェロトーシスとアポトーシスによる細胞死は互いに独立していることが明らかとなった。

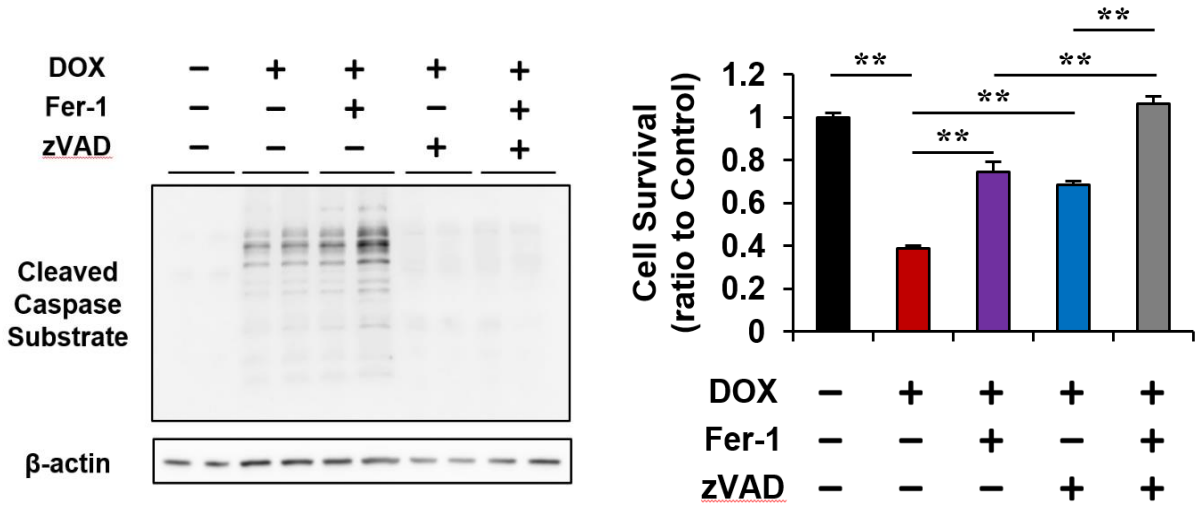


図 3. 単離心筋細胞におけるドキソルビシン（DOX）刺激により誘導される細胞死に占めるアポトーシスとフェロトーシスの割合

ドキソルビシンではカスパーゼシグナルが活性化し、アポトーシス阻害剤である zVAD-FMK ではカスパーゼシグナルを抑制する一方、Fer-1 ではカスパーゼシグナルを抑制しなかった（左図）。zVAD-FMK と Fer-1 はほぼ同等にドキソルビシンによる細胞死を抑制し、同時に阻害した場合には相加効果が得られたことから、それぞれ独立した細胞死であることが示唆された。有意差検定は One-way ANOVA により行った。*P＜0.05、**P＜0.01。（文献［4］より改変して引用）。

考　察

ドキソルビシン心筋症は他の心筋症と比較し予後不良であり、またその発症が原疾患である悪性腫瘍の治療の限界となる。ドキソルビシンによる心筋細胞死としては、これまでにもアポトーシス、オートファジー、ネクロプトーシスなどの様々なプログラム細胞死の関与が報告されてきた。本研究において我々は新たにフェロトーシスの関与とその分子機序、そして zVAD-FMK で抑制されるアポトーシスと Fer-1 で抑制されるフェロトーシスにより、ドキソルビシン関連細胞死の多くが説明される得ることを示した。今後はこれらの細胞死を標的としたドキソルビシン心筋症の予防戦略および治療戦略の確立が望まれる。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、九州大学大学院医学研究院循環器内科の筒井裕之教授、北里大学衛生学教室の今井浩孝教授、九州大学大学院薬学研究院薬科学部門生体分子情報学講座の山田健一教授、九州大学大学院医学研究院循環器病病態治療講座の井手友美准教授である。また共に実際の実験を行った大学院生の田所知命先生に感謝致します。

文　献

1) Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, Patel DN, Bauer AJ, Cantley AM, Yang WS, Morrison III B, Stockwell BR. Ferroptosis: An iron-dependent form of nonapoptotic cell death. Cell. 2012 May 25;149(5):1060-72. PMID: 22632970 DOI: 10.1016/j.cell.2012.03.042.

2) Angeli JPF, Schneider M, Proneth B, Tyurina YY, Tyurin VA, Hammond VJ, Herbach N, Aichler M, Walch A, Eggenhofer E, Basavarajappa D, Radmark O, Kobayashi S, Seibt T, Beck H, Neff F, Esposito I, Wanke R, Forster H, Yefremova O, Heinrichmeyer M, Bornkamm GW, Geissler EK, Thomas SB, Stockwell BR, Donnell VB, Kagan VE, Schick JA, Conrad M. Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice. Nat Cell Biol. 2014 Dec;16(12):1180-91. Epub 2014 Nov 17. PMID: 25402683 DOI: 10.1038/ncb3064.

3) Felker GM, Thompson RE, Hare JM, Hruban RH, Clemetson DE, Howard DL, Baughman KL, Kasper EK. Underlying causes and long-term survival in patients with initially unexplained cardiomyopathy. N Engl J Med. 2000 Apr 13;342(15):1077-84.PMID 10760308 DOI: 10.1056/NEJM200004133421502.

4) Tadokoro T, Ikeda M, Ide T, Deguchi H, Ikeda S, Okabe K, Ishikita A, Matsushima S, Koumura T, Yamada K, Imai H, Tsutsui H. Mitochondria-dependent ferroptosis plays a pivotal role in doxorubicin cardiotoxicity. JCI Insight. 2020 May 7;5(9):e132747. PMID: 32376803. DOI: 10. 1172/jci.insight.132747.