

博士論文（要約）

論文題目 酸化ストレス強度依存的なATP濃度変化に伴う
細胞死形態シフトの解析

氏名 西田 卓人

【序論】

細胞がストレスを受けた際に誘導される細胞死には大きく分けてアポトーシスとネクローシスがある。アポトーシスは一般的に細胞膜の破綻を伴わない細胞死の形態であるのに対し、ネクローシスは細胞膜の破綻を伴った細胞死である。従って両者は細胞の死という点では同じだが、ネクローシスはアポトーシスと比較して **Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs)**を含んだ細胞内容物の漏出により強い炎症反応が誘導されるといった点で生体内での意義が異なっている。ネクローシスはカスパーゼといった特定の分子やシグナル伝達により制御されて誘導されるアポトーシスと比べて、強烈なストレスにより誘導される非特異的な細胞死と考えられてきた。ところが近年、ネクローシスの中にもネクロプトーシスをはじめとする特定の分子やシグナル伝達により制御を受ける種類のもものが報告され注目を集めている。

当研究室では以前、 H_2O_2 を用いて HeLa 細胞に酸化ストレスを負荷すると、その刺激強度によって異なる形態の細胞死が誘導されることを報告した¹。比較的低濃度(1 mM)の刺激ではアポトーシスが誘導されるが、より高濃度(3 mM)ではネクローシスが誘導される。また、高濃度の H_2O_2 により誘導されるネクローシスは **ASK1-p38-NR4A2** というリン酸化を介したシグナル伝達により制御されていることも明らかにしていた。一方で、同じ酸化ストレスでも刺激の強度によって細胞死の形態が変化するメカニズムや **NR4A2** がどのようにネクローシスの誘導に関与するのかといった点は不明であった。酸化ストレスにより誘導される細胞死は神経変性疾患をはじめとする様々な疾患との関わりが指摘されており、この細胞死を制御する分子メカニズムの詳細な解明は関連する疾患の治療戦略の提示にも繋がると考え解析を行った。

【方法・結果】

1. 酸化ストレス下における細胞内の NAD^+ 量、ATP 量と細胞死の形態には相関がある

序論でも述べた通り、近年様々な種類の制御されたネクローシスが報告されているが、その中でも酸化ストレスにより誘導されることが知られているものとしてパータナトスと呼ばれるものがある。パータナトスは DNA 損傷刺激に依存して誘導されるネクローシス様の細胞死であり、DNA 損傷時に活性化し、 NAD^+ を基質として **Poly(ADP-ribose) (PAR)**を合成する **PAR Polymerase 1 (PARP1)**の活性に依存して誘導される。高濃度の H_2O_2 刺激により誘導されるネクローシスと **PARP1** との関係性を調べたところ、**PARP1** の活性化により NAD^+ が消費され枯渇することがネクローシスの誘導に重要であることが明らかとなった。また、更なる解析の結果アポトーシス誘導性の低濃度 H_2O_2 刺激とネクローシス誘導性の高濃度 H_2O_2 刺激とでは細胞内の NAD^+ 濃度変化が異なることが分かった。具体的には低濃度刺激、高濃度刺激どちらにおいても刺激直後に急激な NAD^+ レベル低下が生じるが、低濃度刺激の場合でのみ NAD^+ レベルの回復が見られる様になった。さらに細胞内の NAD^+ レベルを NAD^+ の生合成前駆体である **Nicotinamide riboside (NR)**を処置することによって上昇させると、本来ならネクローシスが起ころうな高濃度 H_2O_2 刺激でもアポトーシスが生じるようになり、 NAD^+ 生合成経路における律速酵素 **NAMPT** の阻害剤 **FK866** を処置することにより細胞内 NAD^+ レベルを低下させるような操作を施すと、逆に本来ならばアポトーシスを起こすような低濃度 H_2O_2 刺激でもネクローシスが誘導されるようになった。以上のことから酸化ストレスを受けた HeLa 細胞では刺激の強度に依存して細胞内 NAD^+ レベル変化に違いが生じ、それによって細胞死の形態が制御されていることが示唆された。

一方で、なぜ NAD^+ の枯渇がカスパーゼ 3 活性化を抑制するのかは不明であった。 NAD^+ は **PARP**

ファミリーなどの基質となるだけでなく、解糖系などを介した ATP 合成においても重要な働きをしている。加えて細胞内の ATP 量の多寡によって細胞死の形態がアポトーシスからネクローシスへと変化する例が過去に報告されていた²。以上の知見から酸化ストレス下においても、ストレス強度の違いによって細胞内 ATP 量に違いが生じて細胞死の形態が変化するのではないかと考えた。実際にアポトーシス誘導性の低濃度、及びネクローシス誘導性の高濃度の H₂O₂ 刺激を加えた上で細胞内 ATP 量の変化を測定したところ、NAD⁺レベルの時間変化と同じように低濃度の H₂O₂ 刺激においては刺激直後に一度 ATP 量の減少が生じその後回復する変化が見られた一方、高濃度の H₂O₂ 刺激では ATP 量の回復が見られなかった。

続いて H₂O₂ 刺激時の細胞内 ATP 量の減少が PARP1 の活性化による NAD⁺の枯渇に依存しているのかを調べる目的で、PARP1 阻害剤である DPQ を処置したところ高濃度の H₂O₂ 刺激時に見られる細胞内 ATP 量の減少が抑制された。さらに、NAD⁺生合成前駆体である NR を処置した場合、高濃度の H₂O₂ 刺激でも細胞内 ATP 量の回復が見られるようになった。DPQ や NR の処置によって高濃度 H₂O₂ 刺激においても NAD⁺レベルが上昇し、カスパーゼ 3 が活性化しアポトーシスが誘導されるようになることから、酸化ストレスによりアポトーシスが起きるような条件ではネクローシスが起きる条件の時と比べて細胞内 ATP 量が高くなっていることが分かった。

序論で述べた通り高濃度 H₂O₂ 刺激により誘導されるネクローシスは NR4A2 に依存している。さらに解析を進めると、NR4A2 の発現抑制によって高濃度 H₂O₂ 刺激によるネクローシスの誘導が阻害されるだけでなく、本来失われるカスパーゼ 3 の活性が観察されるようになることを見出した。一方で NR4A2 が細胞死の形態変化に対して果たす具体的な役割については不明であった。NR4A2 を発現抑制した時の細胞内 NAD⁺, ATP 量変化を測定したところ、NR4A2 の発現抑制によって若干ではあるが高濃度 H₂O₂ 刺激時の細胞内 NAD⁺, ATP 量の上昇が確認された。このことから NR4A2 は高濃度 H₂O₂ 刺激時に細胞内の NAD⁺, ATP 濃度を下げることで細胞死の形態をネクローシス寄りに変化させていることが示唆された。

2. 高濃度の H₂O₂ 刺激では内因性のアポトーシス誘導経路が阻害される

高濃度の H₂O₂ 刺激時にアポトーシスが抑制されるメカニズムとして、細胞内 ATP 量の低下が示唆されたが、ATP 量の低下がなぜアポトーシスの誘導を抑制しているのかは不明であった。そこで高濃度 H₂O₂ 刺激時にはアポトーシス誘導のシグナル伝達におけるどのポイントが抑制されているのか解析した。アポトーシスが誘導される経路には大きく分けて Death Receptor シグナルにより誘導される外因性経路と、ミトコンドリアからのシトクロム c の放出などに依存する内因性経路が存在する。それぞれカスパーゼ 8 とカスパーゼ 9 がイニシエーターカスパーゼとして重要であることが知られているため、それぞれのノックアウト HeLa 細胞を CRISPR-Cas9 システムにより作製した。作製した HeLa 細胞に H₂O₂ 刺激を加えたところ、アポトーシス誘導性の低濃度 H₂O₂ 刺激ではカスパーゼ 8 ではなくカスパーゼ 9 のノックアウト細胞でカスパーゼ 3 の活性化及び切断が減弱した。このことから HeLa 細胞において低濃度の H₂O₂ 刺激依存的に誘導されるアポトーシスは内因性経路に依存することが分かった。更に刺激強度を変えた時の各カスパーゼの切断に注目すると、高濃度の H₂O₂ 刺激ではカスパーゼ 9 の切断が抑制されていることが分かった。以上のことから、高濃度の H₂O₂ 刺激によるアポトーシスの抑制は、内因性経路におけるカスパーゼ 9 の切断よりも上流のイベントで生じていることが示唆された。

【総括・展望】

本研究において私は、酸化ストレス刺激下ではその強度によって異なる細胞内 ATP 量変化が起こることを見出し、その違いによって細胞死の形態が変化する可能性を示した。また、酸化ストレス刺激下での細胞内 ATP 量変化は、PARP1 の活性化による NAD⁺ の消費が重要な役割を担っていることが示唆された。これまでに酸化ストレス強度依存的な細胞死形態変化の制御を担うが、その具体的な役割が不明であった NR4A2 に関しても細胞内 NAD⁺、ATP 量の制御を介して細胞死の形態を変化させることが示唆された。

更に高濃度 H₂O₂ 刺激時にアポトーシスが抑制されるメカニズムとして、アポトーシスの内因性誘導経路のうちカスパーゼ 9 の切断よりも上流のイベントが抑制されていることが分かった。このイベントとしてはミトコンドリアからのシトクロム c の放出や、それに引き続いて起こるアポプトソームの形成が考えられる。興味深いことにアポプトソームの形成には ATP が必要であることが報告されており³、このステップが高濃度 H₂O₂ 刺激では抑制されている可能性がある。

序論でも記した通り、酸化ストレスにより誘導される細胞死は神経変性疾患などの疾患との関わりが指摘されている。また PARP1 の活性に依存したネクローシス様の細胞死は特にパータナトスと呼ばれており⁴、PARP1 ノックアウトマウスの表現型解析からパーキンソン病の発症などとの関連が指摘されている。一方で NR4A2 と PARP1 依存的な細胞死との関わりを示した報告は存在せず、本研究は PARP1 依存的細胞死の分子メカニズムに新たな知見を与え、関連する疾患の治療標的の提示にも繋がると期待される。興味深いことに、過去には神経細胞内の ATP 量を保つことによってパーキンソン病の発症を抑制できるという報告がなされている⁵。アポトーシスとネクローシスは炎症誘導性という観点から性質の異なる細胞死であり、神経における炎症が神経変性疾患の病態発現に寄与するという報告もあるため、細胞内 ATP 量の制御による細胞死形態の制御はこのような疾患の治療標的にもなり得ると考えられる。

【参考文献】

[1] Watanabe T et al., J Biol Chem. 2015. [2] Eguchi Y et al., Cancer Res. 1997. [3] Kim HE et al., Proc Natl Sci USA. 2005. [4] Fatokun AA et al., Br J Pharmacol. 2014. [5] Nakano M et al., EBioMedicine. 2017