

審査の結果の要旨

氏名 戸塚 清人

本研究は、先進国の中途失明原因の上位である加齢黄斑変性（AMD）の疾患モデルである、*in vitro*における酸化ストレス誘発ヒト網膜色素上皮細胞（RPE）の細胞死において、まだ既報のない **ferroptosis** が関与しているかどうか検討したもので、以下の結果を得ている。

1. ヒト網膜色素上皮細胞の不死化細胞株（ARPE-19）と、ヒト胎児由来網膜色素上皮細胞の初代培養細胞（hf-RPE）に対して、安定型  $\text{H}_2\text{O}_2$  である **tert-butyl hydroperoxide**（tBH）を用いた酸化ストレス誘発細胞死モデルを実践し、それに対する **apoptosis** 阻害薬、**necroptosis** 阻害薬、**ferroptosis** 阻害薬の細胞死抑制効果を検討した。その結果、**apoptosis** 阻害薬と **necroptosis** 阻害薬は低濃度 tBH に対しては細胞死を抑制したが、高濃度 tBH による細胞死は抑制しなかった。一方、**ferroptosis** 阻害薬は高濃度 tBH の細胞死まで抑制した。また、AnnexinV/PI 染色では、tBH による細胞死に、**apoptosis** 細胞と **necrosis** 細胞を同時に検出した。以上より、酸化ストレスによる RPE 細胞死では、細胞ごとに異なる 3 つの細胞死形態である **apoptosis**、**necroptosis**、**ferroptosis** を生ずる可能性が示唆された。
2. ARPE-19 に対する非致死濃度の tBH 暴露では、**ferroptosis** に特徴的な 3 事象である、①細胞における酸化脂質の蓄積、②glutathione（GSH）の枯渇、③細胞内の鉄（特に  $\text{Fe}^{2+}$ ）の蓄積、はみられなかったが、致死濃度の tBH 暴露では、**ferroptosis** の 3 事象が濃度依存的に確認された。また、その 3 事象は **ferroptosis** 阻害薬でほぼ完全に抑制された。さらに、細胞への鉄負荷で細胞死が増幅される、という **ferroptosis** のもう一つの特徴も確認され、それも **ferroptosis** 阻害薬で抑制された。以上より、酸化ストレス誘発ヒト網膜色素上皮細胞死において、**ferroptosis** が関与している可能性が強く示唆された。
3. 酸化ストレスによる **ferroptosis** の 3 事象に対して、細胞内の“鉄代謝”、“GSH の合成”、および“脂質の酸化”に関わる遺伝子の発現変化について、mRNA レベルで検討した。それらの遺伝子の多くに、**ferroptosis** の 3 事象に対する代償性応答がみられたが、**transferrin receptor 1 (TfR1)**、**hephaestin (Heph)**、**ferroportin (Fpn)** の遺伝子発現に関しては、むしろ細胞内  $\text{Fe}^{2+}$  をさらに蓄積させる方向に変化した。 $\text{Fe}^{2+}$  は、Fenton 反応を介して酸化

ストレスを増加させるため、RPEにおいて、酸化ストレスと鉄の蓄積に **positive feed back** の関係が存在する可能性が示唆された。このことは、**tBH** による **ferroptosis** の誘導や、AMD 患者の RPE に見られる鉄の沈着に、関連している可能性があると考えられた。

以上、本論文は酸化ストレスによる RPE 細胞死に **apoptosis** や **necroptosis** 以外に、**ferroptosis** も生じうることを明らかにすることにより、実際に AMD 患者の RPE で **ferroptosis** が生じているかどうかという新たな問題提起をするとともに、脂質酸化の抑制や鉄代謝への介入が、AMD の発症予防や末期のステージへの進行抑止の治療ターゲットになり得ることを示しており、AMD の新規治療法の確立に貢献する内容と考えられる。よって、学位の授与に値するものと考えられる。