

博士論文（要約）

酸化ストレス誘発ヒト網膜色素上皮細胞死における  
ferroptosis の関与

戸塚 清人

序章では、本研究の対象疾患である加齢黄斑変性（AMD）の特徴や背景について紹介した。AMD は中高年に発症し、重篤な視力低下を生じる疾患で、欧米や本邦における中途失明原因の上位に位置している。進行した AMD は、「滲出型」あるいは「萎縮型」の病型を呈する。現在、滲出型 AMD に対しては、抗血管新生薬の眼内注射が一定の効果を発揮するものの、萎縮型 AMD に対する有効な治療は、いまだに存在しない。そのため、新規治療法の確立のためにも、さらなる AMD の病態解明が必要である。

AMD の病態は、網膜色素上皮細胞（RPE）の細胞死に起因すると考えられており、酸化ストレスはその RPE 細胞死の主要な原因の一つと考えられている。また、AMD 患者では、非 AMD 患者に比べて、網膜や RPE 内の鉄の含有量が多いことが知られており、鉄の蓄積も AMD の病態に関わっていると考えられている。酸化ストレスによる RPE の細胞死の機序に関しては、以前から、主に apoptosis か necrosis かで議論されてきた。近年、necroptosis をはじめとした、一定の分子メカニズムによって制御された“regulated necrosis”という、新たな概念が生まれ、酸化ストレスによる RPE の細胞死にも、necroptosis の関与が示唆されるようになったが、いまだコンセンサスには至っていない。そこで、我々は *in vitro* の酸化ストレスモデルを用いて、その細胞死のメカニズムにおける apoptosis と necroptosis の関与を確認するとともに、“regulated necrosis”の一つで、“鉄依存性の酸化ストレスによる細胞死である ferroptosis”の関与について検討した。

2 章では、ヒト RPE の不死化細胞である ARPE-19 と、ヒト胎児初代培養 RPE 細胞（human fetal RPE; hf-RPE）に、安定型 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> である tert-butyl hydroperoxide（tBH）を 18 時間暴露させ、それぞれ、tBH 300 $\mu$ M と tBH 1400 $\mu$ M で、80%程度の細胞死が誘導された。細胞死に関しては、ミトコンドリアの脱水素酵素活性の低下と、細胞膜の破壊により増大する細胞外への LDH 漏出量、の 2 つの異なる指標で同時に評価した。ARPE-19 において、apoptosis 阻害薬と necroptosis 阻害薬は、tBH 400 $\mu$ M までは細胞死をよく抑制したが、それより高濃度の tBH 下では、ほとんど抑制しなかった。一方、ferroptosis 阻害薬である ferrostatin-1（Fer-1）と deferoxamine（DFO）は、両者ともに、tBH 600 $\mu$ M においても細胞死をほぼ抑制した。さらに、同様の傾向はヒト初代培養細胞である hf-RPE でも確認された。

AnnexinV/PI 染色の検討では、同時間帯において、apoptosis を生じている細胞と necrosis を生じている細胞がそれぞれ確認された。以上より、酸化ストレスによる RPE 細胞死では、何らかの理由で、細胞ごとに apoptosis と necrosis という異なった機序の細胞死を生じ、さらにその necrosis の中には“regulated necrosis”である necroptosis と ferroptosis が存在していることが示唆された。

そこで、酸化ストレス誘発 RPE 細胞死において既報のない、ferroptosis の存在をさらに確認するために、3 章では、ferroptosis の特徴である、①細胞内酸化脂質の蓄積、②glutathione（GSH）の枯渇、③細胞内の鉄（特に Fe<sup>2+</sup>）の蓄積、の 3 事象（ferroptosis の 3 事象）が、ARPE-19 に対する tBH 暴露でみられるかについて、細胞死を生じない濃度（150 $\mu$ M；非致死低濃度）、apoptosis 阻害薬や necroptosis 阻害薬が細胞死を抑制する濃度（350 $\mu$ M；低濃度）、主に ferroptosis 阻害薬

のみ細胞死を抑制する濃度(500 $\mu$ M ; 高濃度)の 3 つの濃度の tBH で検討した。Ferroptosis の 3 事象は非致死濃度の tBH ではみられなかったが、低濃度、高濃度の tBH ではみとめられ、その程度は濃度依存的であった。また ferroptosis の 3 事象は、Fer-1 と DFO によりほぼ抑制された。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、それは Fer-1 と DFO によって抑制された。以上のことから、酸化ストレスによる RPE 細胞死に ferroptosis が関与していることがさらに裏付けられ、また酸化ストレスの強度で、apoptosis、necroptosis、ferroptosis のどの細胞死の形態に至るか決まる可能性が考えられた。

4 章では、酸化ストレスモデルにおける、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 Fe<sup>2+</sup>をさらに蓄積させる方向に変化した。Fe<sup>2+</sup>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。

本研究では、in vitro において、酸化ストレスによる RPE 細胞死に、apoptosis や necroptosis に加え、ferroptosis が関与している可能性が強く示唆された。AMD 患者の RPE で実際に ferroptosis を生じているかどうかはまだ不明であり、今後の検討課題である。しかし、本研究において、脂質酸化の抑制と鉄のキレートは、RPE にかかる酸化ストレスを減少させ、その結果、ferroptosis のみならず apoptosis や necroptosis も抑制したと考えられたことから、RPE における脂質酸化と鉄代謝への介入は、AMD の発症予防や AMD の末期への進行を防ぐ治療法の有力なターゲットになると考えられた。