

論文の内容の要旨

Title: Analysis of mechanism of lipid peroxidation dependent novel cell death
induced by PHGPx depletion
(生体膜脂質酸化が起因となる新規細胞死経路に関与する分子の同定)

氏名 松岡 正城

〈序〉

リン脂質ヒドロペルオキシドグルタチオンペルオキシダーゼ (PHGPx) は、活性中心にセレノシステインを持つ GPx ファミリーのアイソザイムの1つであり、グルタチオンを補酵素として生体膜に生じたリン脂質ヒドロペルオキシドを直接還元除去できる細胞内唯一の抗酸化酵素である。GPx ファミリーには、cGPx、GPx-GI、pGPx、PHGPx の4つのアイソザイムが存在しており、PHGPx はリン脂質ヒドロペルオキシドに対して基質特異性が非常に高いということや、他のアイソザイムがテトラマーであるのに対し 20kDa のモノマーで存在しているということなどを特徴としている。また、PHGPx は全ての臓器に存在しているが、特に精巣で発現が高いことが知られている。PHGPx ノックアウトマウスが発生のどの段階で致死となっているかを検討した所、受精後 7.5 日 (7.5 dpc) までは PHGPx ノックアウトマウス胚 (KO 胚) は存在するが、8.5 dpc 以降では存在せず、逆に吸収胚が見られるようになった。この結果 PHGPx ノックアウトマウスは 7.5dpc から 8.5dpc で胚致死になることが明らかとなった。さらに、心臓、肝臓、脳、精巣の各臓器特異的 PHGPx 欠損マウ

スを作成したところ、心臓、肝臓、脳の各臓器特異的 PHGPx 欠損マウスは各臓器に障害が起こり、出生直前又は直後に致死になること、精巣特異的 PHGPx 欠損マウスは精巣障害を引き起こし不妊になることを明らかにしている。これらの結果は、PHGPx 欠損による組織や細胞における脂質過酸化物の蓄積が直接原因となって組織障害を引き起こすことを示している。しかし、なぜ PHGPx が欠損すると致死になるのか、どのようなメカニズムで致死になるのかは明らかになっていない。

そこで、本研究では、PHGPx loxP MEF 細胞(TG KO MEF 細胞)にレトロウィルスにより Cre ERT2 タンパク質を発現させ、タモキシフェン誘導型 PHGPx 欠失細胞(CreERT2MEF 細胞)を樹立し、PHGPx 欠失による内在性の脂質ヒドロペルオキシド依存的な細胞死がどのようなメカニズムで起こるかを明らかにすることを目的に解析を行った。

〈結果〉

Cre ERT2 MEF 細胞は、loxP 配列に挟まれた PHGPx 遺伝子により PHGPx が発現されている。この細胞は、エストロゲン受容体が結合した Cre(Cre ERT2)タンパクが通常状態では細胞質に存在し、タモキシフェンを添加するとエストロゲン受容体に結合し、核移行シグナルの出現を伴い核内へ移行し、loxP 配列に挟まれた PHGPx ゲノム遺伝子の組み換えを行い、PHGPx を欠失させることができる。この細胞を用い、タモキシフェン添加による PHGPx を欠損した際の細胞死について検証した。その結果、24 時間後までに PHGPx 遺伝子が欠失し、細胞内にリン脂質ヒドロペルオキシドが 24 時間後をピークに増加し、その後、48~72 時間後以降に細胞死が起こることが明らかとなった。また、この細胞死は非ミトコンドリア型 PHGPx の再構成やビタミン E 誘導体である Trolox やビタミン E の添加では完全に抑制したが、ビタミン C や N-アセチルシステインなど水溶性の抗酸化物質では細胞死を抑制できなかった。このことから、この細胞死は、脂質ヒドロペルオキシドの生成に依存的に起きていることが明らかとなった。

PHGPx 欠失による細胞死がアポトーシスであるかを明らかにするために、アポトーシス阻害剤による細胞死抑制効果について検証した。その結果、Caspase の阻害剤である Z-VAD-FMK と PARP の阻害剤である DHIQ では、抑制できなかった。したがって、PHGPx 欠失による細胞死は、典型的なアポトーシスではないことが示唆された。アポトーシス時の DNA の切断は、二重鎖低分子 DNA 断片を生じる。TUNEL 染色は、DNA 分解物のフリーの 3'-OH 末端に、修飾核酸を標識する事により DNA 断片分解物を検出できる。TUNEL 染色の結果、アポトーシス陽性コントロールであるスタウロスポリン処理をした細胞では核内全体が染色されたのに対し、タモキシフェン添加後タモキシフェン添加 48 時間後の細胞では、核内の一部が染色された。したがって、PHGPx 欠失による細胞死において、DNA の断片化は起きていないが、DNA の一部が傷害を受けている事が示唆された。レトロウィルス shRNA システムを用いて AIF のノックダウン細胞を樹立して本細胞死における AIF の関与を検討した。AIF ノックダウン細胞を、mRNA レベル・タンパク質で確認した結果、AIF の発現が著しく低下していることが確認できた。この細胞を用いて PHGPx 欠失による細胞死抑制効果を検討したところ、AIF shRNA1,2 とともにレスキュー効率が 1%未満であり、レス

キューできなかった。したがって、PHGPx 欠失による細胞死は、AIF の放出を介した細胞死ではないことが明らかとなった。

次に、ネクローシスについて検討した。HMGB1 はクロマチン構造の安定化や遺伝子の転写調節に関わる非ヒストンクロマチン関連性タンパク質ファミリーの一員であり、通常核内に存在している。HMGB1 は、外からの大きなストレスにより引き起こされるネクローシスの際に核外へ放出される事が知られている。そこで、この HMGB1 の核外放出を免疫染色を用いて検出する事により、本細胞死がネクローシスかどうかを検討した。その結果、ネクローシス陽性コントロールである t-BuOOH 処理をした細胞では HMGB1 の核外放出が見られたのに対し、タモキシフェン添加 48 時間後の細胞では HMGB1 の放出は見られなかった。したがって本細胞死はネクローシスではないことが示唆された。

さらに、電子顕微鏡およびタイムラプスによる PHGPx 欠失による細胞死の形態観察を行った。電子顕微鏡による細胞死の形態観察は、細胞内においてどのような現象が起こっているか推測する上で重要である。タモキシフェン非添加細胞とタモキシフェン添加後 48 時間の細胞を観察した。その結果、PHGPx 欠失時には、細胞内にオートファゴソーム様の小胞や空胞が多数見られた。また、PHGPx 欠失による細胞死が起きている細胞の核は、変化に乏しく、電子顕微鏡像からもアポトーシスではない事が示唆された。また、ネクローシスの様な、細胞全体あるいはオルガネラが膨張している細胞像はみられないことから、ネクローシスではないことが明らかとなった。また、タイムラプスの解析から、細胞死の瞬間においても細胞の膨張は見られずネクローシスではないことが確かめられた。

オートファジー性細胞死は、カスパーゼ非依存的な制御機構を有する新しい細胞死である。電子顕微鏡像から、PHGPx 欠失時にオートファゴソーム様の小胞が見られたため、本細胞死がオートファジー性細胞死であるのかについて検討した。ATG5 は、ATG12、ATG16 と複合体を形成して、オートファゴソームの伸長に関与するオートファジー必須タンパク質である。そこで、オートファジー関連タンパク質である ATG5 のノックダウンによりオートファジーを阻害したときの、細胞死抑制効果を検討した。その結果、ATG5 ノックダウン細胞でも PHGPx 欠損による細胞死が誘導され、コントロール細胞と比較して細胞死の時期や割合も変化が無かった。よって、本細胞死はオートファジー性細胞死ではない事が明らかとなった。

ネクローシスは、最近見出されたネクローシス様のプログラム細胞死で、Caspase が阻害された状況下で、TNF レセプターの下流にある RIP1 キナーゼや RIP3 キナーゼを介して細胞死が誘導されることまで明らかとなっている。そこで、ネクローシスで重要な役割を果たす RIP1 キナーゼをノックダウンしたときの PHGPx 欠損による細胞死抑制効果を検討した。RIP1shRNA によるノックダウン細胞を作成した結果、RIP1sh1 と RIP1sh4 が mRNA レベルで発現が著しく抑制されていた。この RIP1 が欠失した細胞を用いてタモキシフェン添加による PHGPx 欠失による細胞死を抑制するか検討した結果、細胞死は全く抑制されなかった。RIP1 のノックダウンによって本細胞死が全くレスキューされなかった事から、ネクローシスではないことが強く示唆された。

また、本研究では、化合物ライブラリーでのスクリーニングにより PHGPx 欠損による細胞死を抑

制できる化合物を新たに見出している。

〈考察〉

以上の結果から、我々は PHGPx 欠失による細胞死は典型的な既知の細胞死ではなく、新規のプログラム細胞死であることを見出した。しかし、今のところ PHGPx の欠失による細胞死の詳細なメカニズムは、全くわかっていない。抗酸化剤のビタミン E、Trolox をタモキシフェンと同時処理することによりリン脂質ヒドロペルオキシドの生成が抑制され細胞死が抑制されたことから、脂質の酸化がその原因であることは間違いない。では、なぜ PHGPx を欠失しただけで細胞内の脂質の酸化が起こるのか、どのようなメカニズムで脂質の酸化が亢進するのかを明らかにすることが今後の課題である。

これまでに報告のあるリン脂質を直接酸化し、リン脂質ヒドロペルオキシドの生成ができる酵素は、15-LOX(15-リポキシゲナーゼ)のみである。しかし、我々の樹立した細胞では、15-LOX は発現しておらず、15-LOX の shRNA 処理や 15-LoxKOMEF 細胞でも PHGPx 欠失による細胞死を抑制できなかったことからこの細胞死では 15-LOX は必須ではない。PHGPx 欠失による細胞死は、NADPH オキシダーゼ、キサンチンオキシダーゼの阻害剤でも致死は抑制されず、スーパーオキシドを消去する Mn-TBAP、EUK-8 の添加でも全く PHGPx 欠失による細胞死を抑制することができないことから、PHGPx 欠失による細胞死はこれらのスーパーオキシド産生系も介していないと考えられる。H₂O₂ の消去に関わる cGPx 高発現や N-アセチルシステイン、ビタミン C などでも致死抑制効果はみられない。また、鉄のキレート剤であるデフェロキサミン添加でも PHGPx 欠失による細胞死を抑制できなかった。これらの結果は、新規の脂質酸化酵素の存在を示唆しているのではないかと考えている。通常の状態では、ビタミン E と PHGPx が、この酵素による脂質のヒドロペルオキシドの生成を抑えることにより細胞死を抑制していることが示唆される。現在、PHGPx 欠失による細胞死のメカニズムの一端を明らかにするために、見出してきた PHGPx 欠失による細胞死を抑制する化合物のターゲットの同定を試みている。もし、この細胞死に関与する因子が同定できれば、臓器特異的 PHGPx 欠失マウスで見られている不妊や心臓障害、肝障害など、過酸化脂質の蓄積により引き起こされる様々な疾病の治療に大きく貢献することができると考えている。この細胞死に関与する因子の解明により、新たな細胞死の制御機構の解明や過酸化脂質の蓄積を原因とする疾病に対しての新規治療薬の開発が期待される。