

審査の結果の要旨

氏名 松岡 正城

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グルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) ファミリーのアイソザイムの1つであり、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く、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特徴としている。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。PHGPx ノックアウトマウスでは、受精後 7.5 日まで胚は存在するが、8.5 日以降では存在せず、逆に吸収胚が見られる。すなわち PHGPx ノックアウトマウスは受精後 7.5 日から 8.5 に地で胚致死になる。さらに、心臓、肝臓、脳、精巣の各臓器特異的 PHGPx 欠損マウスでは、それぞれの臓器に障害が起こり、出生直前又は直後に致死になる。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、松岡は、PHGPx loxP MEF 細胞 (TG KO MEF 細胞) にレトロウイルスにより 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。

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。松岡はこの細胞を用い、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を明らかにした。また松岡は、この細胞死が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いことを示した。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を明らかとした。

さらに松岡は、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。この結果から松岡は、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を示唆した。また、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ることが分かった。これらの結果から松岡は、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を示。さらに、レトロウイルス 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を確認した。また、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 ともにレスキュー効率が 1%未満でありレスキューできないことが分かった。以上の結果から松岡は、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を示した。

次に松岡は、ネクローシスについても検討した。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により検出し、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 の放出は見られないことがわかり、本細胞死はネクローシスではないことを示した。さらに、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、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を示唆した。

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。松岡は、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。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いことが分かり、本細胞死はオートファジー性細胞死ではない事を明らかにした。

ネクロトーシスは、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が明らかとなっている。そこで松岡は、ネクロト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ることを見出した。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ず、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、ネクロトーシスではないことを強く示唆した。

本研究で松岡は、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も新たに見出している。

以上の結果から、松岡は 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。今後、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られる。また、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。以上の結果から、松岡の研究は博士（薬学）に充分値すると判断した。