

氏 名	滝 功一郎
(ふりがな)	(たき こういちろう)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第1163号
学位審査年月日	令和3年1月29日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題名	Impairment of Autophagy Causes Superoxide Formation and Caspase Activation in 661W Cells, a Cell Line for Cone Photoreceptors, under Hyperglycemic Conditions (高濃度グルコース環境下での視細胞におけるオートファジー障害と活性酸素発生およびカスパーゼの活性化)
論文審査委員	(主) 教授 高井 真司 教授 矢野 貴人 教授 小野 富三人

### 学位論文内容の要旨

#### 《目的》

糖尿病網膜症では、網膜血管に最初の病変が生じると考えられている。一方で臨床的に、広範囲に視細胞が障害される疾患である網膜色素変性症では、糖尿病網膜症が発症しにくいことが知られており、視細胞が糖尿病網膜症の発症に関与している可能性が示唆されている。また、抗酸化物質により糖尿病性網膜症の発症が抑制されることから、活性酸素種(reactive oxygen species: ROS)が病因の一つと考えられている。網膜の酸素需要は視細胞において最も高いため、網膜のROSは主に視細胞のミトコンドリアに由来すると考えられる。

オートファジーは、代謝産物をリサイクルする代謝系の一つであり、飢餓時にエネルギー

源を獲得する機構である。しかし、欠陥が生じた細胞小器官もオートファジーによって排除され、ミトコンドリアを対象としたオートファジーはマイトファジーと呼ばれる。欠陥細胞小器官は、P62 に結合することによってユビキチン化され、また、LC3 に結合してオートファゴソームを形成する。これらはやがてリソソーム膜関連タンパク質 2A (LAMP2A) を介してリソソーム膜と融合し、分解される経緯をたどる。マイトファジーの障害は、欠陥したミトコンドリアの蓄積を生み、ミトコンドリア膜電位の低下、酸化リン酸化の障害、活性酸素の発生の増加、シトクロム C の放出など、細胞傷害の原因となる。中枢神経系でオートファジーが果たす役割はまだ完全には解明されていないが、細胞分裂能力のない神経細胞にとってオートファジーはより重要な機能と考えられる。糖尿病状態ではオートファジーは障害され、ROS の増加につながる事が報告されている。

以上のような背景から、高濃度グルコース環境下では視細胞でマイトファジーが障害され、異常なミトコンドリアが蓄積することで視細胞から活性酸素種の発生が増加するという仮説をたて、以下の研究を行った。

## 《方 法》

マウス視細胞株である 661W 細胞を、生理的 (5.5 mM glucose) あるいは高濃度グルコース培地 (25 mM glucose) で 48 時間培養した。その後、オートファジー賦活剤である rapamycin (1.0 μM) あるいは阻害剤である 3-methyladenine (3MA, 10 mM) を添加し、さらに 24 時間培養した。オートファジーの障害に関しては、immunoblot でオートファジー関連蛋白である P62 と LC3B の発現を定量した。また、マイトファジーの障害に伴う、細胞内のミトコンドリアとライソゾームの変化を、それぞれ MitoTracker と LysoTracker で染色し、蛍光顕微鏡で観察した。活性酸素の発生は hydroethidine を蛍光 probe として用い、フローサイトメーターで 661W 細胞内の蛍光強度の変化を観察した。酸化ストレスによる 661 W 細胞のアポトーシスは、カスパーゼ 3/7 活性を ELISA 法で測定し評価した。

## 《結 果》

Immunoblot の結果、5.5 mM に比べ 25 mM glucose で培養した細胞では、P62 は  $1.3 \pm 0.1$  倍と有意に増加した ( $p = 0.02$ 、Scheffe)。3MA の添加により、LC3B は両条件下でともに有意に増加したが、P62 は 5.5 mM glucose 群では有意な増加は認められず、25 mM glucose 群では  $1.6 \pm 0.03$  倍 ( $p = 0.01$ 、Scheffe) と有意に増加した。rapamycin の添加により、LC3B は 5.5 mM glucose 群で  $2.7 \pm 0.05$  倍、25 mM glucose 群で  $2.4 \pm 0.1$  倍と両条件下で有意に増加し、P62 は両条件下で有意に減少したが ( $p < 0.01$ 、Scheffe)、P62 の減少は、5.5 mM glucose 群で有意に大きかった。

蛍光染色によるマイトファジーの解析では、25 mM glucose 群では 5.5 mM と比較して、MitoTracker の蛍光強度が高く、LysoTracker の蛍光強度が低く、高糖濃度環境下でミトコンドリアが蓄積している所見が認められた。5.5 mM glucose 群においては、rapamycin の添加により MitoTracker の蛍光強度が減弱し、マイトファジーの活性化が認められた。一方、3MA では MitoTracker の蛍光強度の増強と、LysoTracker の蛍光強度減弱が認められ、3MA によりマイトファジーが障害されることが観察できた。しかし、25 mM glucose 群においては、rapamycin の添加による MitoTracker の蛍光強度の減弱はみられず、高糖濃度環境下では rapamycin の効果は限定的であった。

活性酸素の発生は、5.5 mM glucose 群では、rapamycin あるいは 3MA を添加しても、平均蛍光強度に有意な変化はみられず、細胞内活性酸素は一定に保たれていた。一方、25 mM glucose 群では、5.5 mM よりも平均蛍光強度は有意に高く、また、3MA の添加により、さらに有意な増強が確認された。rapamycin の添加では平均蛍光強度の減少は有意ではなかった。

カスパーゼ 3/7 の活性は、5.5 mM glucose 群において、rapamycin の添加により有意に減少した。また、3MA を添加しても有意な変化は認めなかった。一方、25 mM glucose 群においては、rapamycin の添加によりカスパーゼ 3/7 の活性は有意に減少したが、3MA の添加により有意に増加し、オートファジーの障害が細胞死を増強する結果が得られた。

## 《考 察》

5.5 mM に比べ 25 mM glucose で培養した細胞では、活性酸素の発生および P62 の発現が有意に高く、3MA の添加により、活性酸素の発生、P62 の発現およびカスパーゼ 3/7 の活性が有意に増加した。これらの変化は 5.5 mM glucose 群では認められなかった。これらの結果から、ミトファジーは高糖濃度環境下において 661W 細胞の生存にとってより重要であると考えられた。

25 mM glucose 群では LysoTracker の蛍光強度は、5.5 mM glucose 群と比較して低く、ミトファジーが抑制されている可能性があり、また、MitoTracker の蛍光強度は高く、ミトコンドリアの分解の遅延を反映していると考えられた。3MA の添加により、両条件下とも LysoTracker の蛍光強度は低下した。また、25 mM glucose 群では MitoTracker の蛍光強度増強が顕著にみられた。一方、5.5 mM では 25 mM glucose 群に比べ MitoTracker の蛍光強度増強は軽度であった。これは高糖濃度環境下でミトファジーの障害によりミトコンドリアが一層蓄積される可能性を示唆している。また、3MA は、25 mM glucose 群で活性酸素の発生を有意に増加させたが、この変化は 5.5 mM 群ではみられなかった。したがって、ミトファジーの障害による ROS 発生は高糖濃度環境下でより顕著に現れ、おそらく損傷したミトコンドリアの蓄積によると考えられた。これらの所見から、ミトファジーが高糖濃度環境下でより視細胞の生存により重要であり、その障害による ROS の増加から細胞傷害につながると考えられる。

## 《結 論》

ミトファジーは視細胞株である 661 W 細胞において、高糖濃度環境下でより重要であり、その障害は活性酸素の発生とアポトーシスを増加させる可能性があると考えられた。臨床的には、視細胞由来の ROS が網膜血管障害に関与している可能性を示唆し、また、網膜色素変性症などで、視細胞が広範囲に死滅した状態では、逆に ROS の発生が抑制され、糖尿病網膜症が発症しない臨床所見を支持すると考えられた。

(様式 甲 6)

## 論文審査結果の要旨

本研究は、糖尿病網膜症の血管病変に視細胞が関与し、その機序の一つに「糖尿病ではマイトファジーの障害が生じている」という仮説をたて、マウス視細胞株を用いて検討したものである。研究は *in vitro* の系で行われ、高糖濃度 (25 mM) と生理的糖濃度 (5.5 mM) の環境下で、マウス視細胞株 (661W 細胞) を培養して、マイトファジーの障害、活性酸素の発生とアポトーシスの発症などの関連を検討している。

高糖度環境下でのマイトファジーの障害やアポトーシスの増加に与える影響を調べるために、免疫細胞染色や immunoblot 解析で検討している。高糖度環境下では、生理的糖濃度と比較して活性酸素の発生や P62 が増加することを示し、オートファジー阻害剤である 3-methyladenine (3MA) の添加により、高糖度環境下では活性酸素の増加、P62 およびカスパーゼ 3/7 の活性が有意に増加することから、マイトファジーが高糖度環境下において細胞生存においてより重要であることを示している。また、蛍光染色によるミトコンドリアとライソゾームの動態から、高糖度環境下でマイトファジー活動が抑制されている可能性と、ミトコンドリアの分解が遅延している可能性を示唆する所見を得ている。さらに、3MA の添加により、高糖度環境下においては、ミトコンドリアがより顕著に分解されずに蓄積する結果を示している。これらのことから、マイトファジーの障害による影響は、高糖度環境下においてより顕著に現れ、障害されたミトコンドリアの蓄積により、活性酸素の発生増加につながる可能性が示唆された。以上の結果から、高糖度環境下においてマイトファジーの機能がより重要であり、その障害は活性酸素の発生と細胞傷害をもたらすと結論している。臨床的には、視細胞由来の活性酸素が糖尿病網膜症での網膜血管障害に関与している可能性を示唆し、新たな知見と考えられる。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条第 1 項に定めるところの博士 (医学) の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

International Journal of Molecular Sciences 21(12): 4240, 2020 Jun

doi: 10.3390/ijms21124240