

## 学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
廣井真世	主査 教授 玉井 浩 副査 教授 大槻 勝紀 副査 教授 林 秀行 副査 教授 古谷 榮助 副査 教授 宮崎 瑞夫
主論文題名 Regulation of apoptosis by glutathione redox state in PC12 cells exposed simultaneously to iron and ascorbic acid (鉄およびアスコルビン酸同時負荷により誘導される、PC12 のアポトーシスにおけるグルタチオンの酸化還元電位の影響)	
学位論文内容の要旨	
<p>《研究目的》</p> <p>新生児仮死においてみられる低酸素性虚血性脳症(HIE)による脳の傷害は、現在でも有効な治療法がなく、その後の脳性麻痺などの原因となっている。その病態は明らかではないが、グルタミン酸の興奮毒性や、フリーラジカルの関与が考えられている。また仮死後の新生児の髄液中で遊離の鉄(non-protein-bound iron:NPBI)やアスコルビン酸(AA)が増加していることが報告されている。このAAは抗酸化剤としてとらえられていることが多いが、これらはそれぞれ単独で各種細胞でアポトーシスを引き起こすことも知られている。さらに同時に負荷することによってフリーラジカルの発生源として実験などではよく用いられてきた。そこで HIE においてこれらが同時に存在することによってフリーラジカルが発生し、神経細胞のアポトーシスが引き起こされたのではないかと考えた。さらにアポトーシスにおいて細胞内の redox environment が重要であると考えられるようになってきているため、鉄およびアスコルビン酸同時負荷による神経細胞のアポトーシスの誘導と、細胞の redox environment の関連を、グルタチオンに注目して検討した。</p> <p>《方法》</p> <p>ラット褐色細胞腫由来 PC12 細胞を用い、硫酸第一鉄、アスコルビン酸を各種濃度で同時に培地に添加し、負荷後 24 時間、48 時間で上清中の LDH 濃度を測定し、細胞死の確認を行い、さらに TUNEL 法および、アクリジンオレンジ(AO)/エチジウムブロマイド(EB)2重染色により、アポトーシスの誘導を確認した。さらに、<math>\alpha</math>-トコフェロール(TOC)など抗酸化剤によるアポトーシスの抑制効果を検討し、ラジカル傷害のマーカーとして <i>o</i>-チロシン、<i>m</i>-チロシンを GC/MS により、<math>F_2\alpha</math>-イソプロスタンを EIA により測定した。細胞内 NPBI はプレオマイシン法により測定し、細胞内の鉄の総量は原子吸光度により測定した。還元型グルタチオン(GSH)、酸化型グルタチオン(GSSG)は HPLC を用いて測定した。</p> <p>《結果》</p> <p>鉄、AA は同時に負荷することにより、それぞれ単独で負荷するよりも低濃度で細胞死を誘導した。TUNEL 法、AO/EB 法により、さらにカスパーゼ阻害剤である VAD-FMK の投与により、細胞死が抑</p>	

制されたことから、この反応がカスパーゼを介するアポトーシスであることが確認された。

次に TOC、カタラーゼ、DMSO などの抗酸化剤により細胞死の抑制効果を認め、ラジカル発生のマーカーである、*o*-チロシン、*m*-チロシン、F<sub>2</sub><sub>a</sub>-イソプロスタンの上昇を認めた。

また細胞膜を通過しない AA の D 体の使用では L 体と同様の作用が認められた。

培地に添加した鉄は上清中では、同時に添加した AA の速やかな消失に伴い、酸化され三価として存在していた。また、AA と同時添加すると、細胞内へ鉄の取り込みが増強された。

次に鉄および AA を負荷後、一定の時間で培地を交換することで、これらの反応を抑える限界点を調べた。低濃度の負荷では、10 時間までは負荷時間が短くなるに従い、細胞死は抑制されたが、高濃度負荷では 3 時間までは抑制効果が認められたものの、6 時間を越えるとまったく抑制されず、24 時間後にはほぼすべての細胞がアポトーシスに陥っていた。

Buthionine sulfoximine(BSO)の添加により細胞毒性は増強し、glutathione ethyl ester (GSHE)の添加により細胞死は抑制された。

細胞内の GSH、GSSG の濃度の比は通常の培養では 48 時間は一定であった。高濃度鉄および AA 負荷で GSH は著明に減少し GSSG の割合が増加していた。低濃度鉄および AA 負荷では 24 時間後に一過性の GSH の上昇がみられ、これは新たに合成されたものであった。さらに TOC 過剰負荷にすると低濃度負荷での GSH の上昇が 9 倍にまで増加したが、高濃度では TOC の効果はみられなかった。

次に細胞内グルタチオン半電池酸化還元電位 ( $E_{hc}$ )を求めると、通常 48 時間で-246mV から -230mV まで上昇するが、高濃度負荷では最高-165 mV、低濃度負荷で-199mV まで上昇していた。TOC 過剰負荷にすると低濃度では逆に-250mV 以下まで低下し、高濃度でも 24 時間は-190mV までの上昇にとどまった。また培地交換によって低濃度負荷で GSH の濃度が著明に上昇し、GSSG の割合が減少し、 $E_{hc}$ も-250mV 以下に低下した。高濃度負荷では 3 時間までに培地を交換すると同様の効果がみられたが、6 時間を越えると効果はみられなかった。

さらにミトコンドリアの GSH 濃度も、高濃度の鉄および AA 負荷により 24 時間後には正常の 10%まで低下していたが、TOC 過剰負荷にすると 30%を維持していた。

#### 《考 察》

鉄、AA を同時に負荷したことにより、フリーラジカル、主に OH $\cdot$ が作用し、膜脂質の過酸化が起こって、カスパーゼを介したアポトーシスが起ることが示唆された。このとき、AA は細胞外において pro-oxidant として作用しており、細胞内の鉄そのものが致命的な働きをしているのではなかった。つまり AA によって二価鉄が存在できることで、Fenton 反応が起こり、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> から OH $\cdot$ が産生され、連鎖的脂質過酸化反応が起こっていると考えられた。

さらに短時間の曝露のみでアポトーシスの経路が活性化されることがわかった。

細胞内 GSH を減少させることが知られている BSO の添加により細胞毒性が増強したこと、また細胞膜を通過する GSHE の添加により細胞死が抑制されたことより、細胞内 GSH がアポトーシス抑制に重要であることが示唆された。さらに GSH の濃度そのものではなく、GSSG/GSH の redox state が重要であることを示した。つまり、通常は一定である細胞内の GSH、GSSG の濃度の比の変化、 $E_{hc}$ が上昇することによりアポトーシスが誘導される。またこの反応においても細胞を TOC 過剰負荷にすることでアポトーシスが抑制されたことから、膜の脂質過酸化反応が重要であると考えられた。

以上から新生児仮死後の HIE 発症に、鉄および AA により発生したフリーラジカルが関与している可能性が示唆され、鉄のキレート治療が新生児の HIE を防ぐ神経保護の方法となりうると考えられた。しかしこの負荷は短時間でアポトーシスのトリガーとなり、不可逆的にその経路を活性化することから、実際に治療介入できる時間的な幅は非常に短いと考えられた。

## 審査結果の要旨および担当者

報告番号	乙 第 号	氏 名	廣 井 真 世
論文審査担当者		主 査 教 授 玉 井	浩
		副 査 教 授 大 槻	勝 紀
		副 査 教 授 林	秀 行
		副 査 教 授 古 谷	榮 助
		副 査 教 授 宮 崎	瑞 夫
<p>主論文題名</p> <p>Regulation of apoptosis by glutathione redox state in PC12 cells exposed simultaneously to iron and ascorbic acid  (鉄およびアスコルビン酸同時負荷により誘導される、PC12 のアポトーシスにおけるグルタチオンの酸化還元電位の影響)</p>			
論文審査結果の要旨			
<p>新生児仮死における低酸素性虚血性脳症 (HIE) の病態はいまだ明らかではないが、興奮性アミノ酸や、フリーラジカルの関与などが考えられている。申請者は HIE のモデルとして、ラット褐色細胞腫由来 PC12 細胞を用い、フリーラジカルの関与につき検討している。フリーラジカルの発生源として、仮死後の髄液中で増加していることが知られている、鉄とアスコルビン酸 (AA) に注目し、さらにこのときの GSSG/GSH の redox state の関与につき検討し、以下の結果を得ている。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) 鉄、AA を同時に負荷することにより、短時間の曝露でも、PC12 細胞はアポトーシスに陥る。</li> <li>2) この機序には、細胞外において AA が pro-oxidant として作用し、二価鉄が存在することにより、Fenton 反応が起こり、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> から OH・が産生され、連鎖的脂質過酸化反応が起こっていることが示唆された。</li> <li>3) 同時負荷により細胞内 GSH が減少し、GSSG が増加した結果 GSH/GSSG の比が減少し、半電池酸化還元電位 (<i>E<sub>hc</sub></i>) が上昇することで、アポトーシスが誘導されるが、軽度の負荷では GSH が新たに産生され、<i>E<sub>hc</sub></i>を保つことでアポトーシスが回避される。</li> </ol> <p>これらは新生児仮死後の HIE 発症に鉄および AA により発生したフリーラジカルが関与している可能性を示している。これらより、鉄のキレート治療が新生児の HIE を防ぐ神経保護の方法となりうる可能性を示唆しており重要な知見であると考えられる。</p> <p>以上により、本論文は本学学位規程第 3 条第 2 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。</p> <p>(主論文公表誌)</p> <p>Free Radical Biology &amp; Medicine 38(8): 1057-1072, 2005</p>			