

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

論 文 提 出 者 氏 名	論 文 審 査 担 当 者
長 谷 川 昌 史	主 査 教 授 林 秀 行
	副 査 教 授 大 槻 勝 紀
	副 査 教 授 朝 日 通 雄
	副 査 教 授 黒 岩 敏 彦
主論文題名 Hypothermic inhibition of apoptotic pathways for combined neurotoxicity of iron and ascorbic acid in differentiated PC12 cells: Reduction of oxidative stress and maintenance of the glutathione redox state (分化 PC12 細胞における鉄アスコルビン酸神経毒性に対する低温によるアポトーシス経路抑制効果：酸化ストレス減少とグルタチオン酸化還元状態の調整)	
学 位 論 文 内 容 の 要 旨	
《目 的》 新生児の低酸素性虚血性脳症(HIE)は重症仮死に伴い、新生児死亡率や神経発達予後に関わる。長らく補助的な治療以外の選択はなかったが、HIEに対する臨床での低温療法の効果と安全性が近年示されてきた。だが未だに低温治療の最適な温度、開始時期、期間等は検討中であり、作用機序は不明な点が多く模索中である。我々の以前の報告でHIEの患児の髄液中では遊離の鉄とアスコルビン酸(AA)が増加しており、遊離鉄はアスコルビン酸により Fe^{2+} に還元されると Fenton 反応等によりヒドロキシラジカル等の活性酸素を生じさせるため、Fe, AA は HIE における酸化ストレスで大きな役割を果たすことが示唆された(Ogihara T. et al. Pediatr Res. 53: 594-599, 2003)。また PC12 細胞は Fe-AA 負荷による酸化ストレスよりアポトーシスを引き起こし、細胞の生存、アポトーシスなどの状態は glutathione の酸化還元状態から導かれる酸化還元電位 half-cell reduction potential (Ehc) と密接な関係が有ることが判明した(Hiroi M. et al. Free Radic Bio Med 38:1057-1072, 2005)。	

今回神経細胞モデルである分化 PC12 細胞を用いて Fe-AA による細胞毒性への低温の効果と作用機序を調べ、低温治療の最適条件とアポトーシス経路に対する影響、Fe-AA による酸化ストレスへの低温の影響や glutathione の酸化還元状態との相関等を検討した。

《方 法》

分化 PC12 細胞に 1mM Fe-AA 負荷を種々の低温条件下で行い細胞生存率を評価した(MTT assay 変法)。最適温度、最適低温開始時期、必要低温期間などを検討した。次に低温のアポトーシス経路への影響を調べるため caspase 活性の変化(total caspase activation 及び caspase-3,8,9)、ミトコンドリア膜電位変化(蛍光色素 Mitocapture 使用)や cytochrome c 放出(ELISA)、アポトーシス誘導因子(AIF)や細胞生存に関わる Akt リン酸化、apoptosis signal-regulating kinase (ASK)等 (Western blotting)を測定した。低温の活性酸素産生に対する影響は純粋な化学反応としての細胞非存在下(phenylalanine, para-tyrosine への Fe-AA 負荷)と細胞存在下で検討し、酸化ストレスマーカーとしては ortho-tyrosine, meta-tyrosine, di-tyrosine, 4-hydroxynonenal (HNE)をみた(GC-MS)。また細胞内の GSH,GSSG を測定することで導かれ細胞の酸化還元状態を示す half-cell reduction potential (Ehc)の時間的变化を追った。 $Ehc\text{ (mV)} = -287 - (59.1/2) \log ([GSH]^2/[GSSG])$ 。

《結 果》

【有効な低温条件】 低温による最適な細胞保護効果が見られたのは 30-32℃であり、6 時間以内の開始と 24 時間以上の期間が必要であった。

【アポトーシス経路に対する影響】 caspase 全体の活性化が低温で抑制され、caspase-3 活性化のピークが常温の 12 時間に対し低温では 24 時間まで遅延されていた。また低温は Fe-AA 負荷後 6 時間以降のミトコンドリアの膜電位の崩壊を防いで、6 時間での cytochrome c と AIF の放出を抑制した。

Akt リン酸化、ASK リン酸化では常温と低温の差は見られなかった。

〔酸化ストレスへの影響〕 細胞非存在下では酸化ストレスマーカーの産生は常温と低温で差は見られなかったが、細胞存在条件では ortho-tyrosine, meta-tyrosine, di-tyrosine, HNE 産生は低温群で有意に抑制されていた。

〔細胞内酸化還元電位 Ehc と低温の関係〕 分化 PC12 細胞の Ehc は通常状態で -220mV から-180mV であった。Fe-AA 負荷により Ehc が-180mV を超えたとき、アポトーシスは引き起こされた。低温は Fe-AA 負荷後 24 時間で Ehc が-180mV より上昇するのを防いだ。

《考 察》

今回の分化 PC12 細胞を用いた実験での低温の最適条件である 32℃や 6 時間以内の低温の開始、24 時間以上の低温期間は動物実験や臨床試験で有効と考えられる条件と矛盾せず、細胞レベルでの低温療法モデルとして適していると考えられる。低温の機序としてアポトーシス経路の複数の要素(total caspase activation, ミトコンドリア膜電位変化、cytchrome c, AIF 放出)の抑制が考えられた。細胞存在下では低温により酸化ストレスマーカーの減少を伴い、細胞内での活性酸素産生の抑制効果が示唆された。また低温は GSH,GSSG により規定される細胞内酸化還元電位を変化させ細胞内環境を還元状態に調整することによって、Fe-AA の毒性による細胞障害を防いでいることが考えられる。今回の実験モデルにより、新生児の HIE に対する治療として、低温治療に加えて鉄キレート剤、GSH ドナー(N-acetylcysteine 等)などを併用することが考えられる。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	乙 第 号	氏 名	長 谷 川 昌 史
論文審査担当者		主 査 教 授 林	秀 行
		副 査 教 授 大 槻	勝 紀
		副 査 教 授 朝 日	通 雄
		副 査 教 授 黒 岩	敏 彦
主論文題名			
Hypothermic inhibition of apoptotic pathways for combined neurotoxicity of iron and ascorbic acid in differentiated PC12 cells: Reduction of oxidative stress and maintenance of the glutathione redox state (分化 PC12 細胞における鉄アスコルビン酸神経毒性に対する低温によるアポトーシス経路抑制効果：酸化ストレス減少とグルタチオン酸化還元状態の調整)			
論文審査結果の要旨			
新生児の低酸素性虚血性脳症(HIE)は新生児死亡や神経発達に関わる。近年HIEに対する臨床での低温療法の効果が示されてきたが、未だに最適な温度、開始時期、期間等は検討中であり、その作用機序も不明な点が多い。そこで申請者はHIEの患児の髄液中に鉄(Fe)とアスコルビン酸(AA)が増加しており酸化ストレスの一因となることに注目し、神経細胞モデルである分化PC12細胞を用いて Fe-AA 負荷に対する低温の効果、最適条件、作用機序などを検討した。その結果、低温治療の最適温度は 30-32℃であり、6 時間以内の開始と 24 時間以上の期間が必要であり、低温はアポトーシス経路の複数の要素(total caspase activation, ミトコンドリア膜電位変化、cytchrome c, AIF 放出)を抑制することを明らかにした。これは動物実験、臨床データとも大きく矛盾せず、細胞レベルでの低温効果検討モデルとして有用であった。また低温では細胞存在下で酸化ストレスの低下を認め、GSH,GSSG により導かれる細胞内酸化還元電位(Ehc)が低温 Fe-AA 負荷群ではより低く保たれることを示し、低温の作用機序として重要な関連性を新たに示唆した。			

これらの実験結果から申請者は HIE に対する治療として、低温治療に加えて鉄キレート剤、GSH ドナー(N-acetylcysteine 等)などの併用を提案している。本研究は細胞での実験であり、実際の臨床応用については更なる検討が必要であるものの、細胞レベルでの直接的な低温療法の効果、機序の解明に有用であるといえる。

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。

(主論文公表誌)

Brain Research 1283 : 1-13, 2009