

(様式4)

学位論文の内容の要旨

水野 寛之 印

(学位論文のタイトル)

2,2,6,6-Tetramethylpiperidine-1-oxyl acts as a volatile inhibitor of ferroptosis and neurological injury
(2, 2, 6, 6-テトラメチルピペリジン-1-オキシルのフェロトーシスおよび神経損傷に対する揮発性阻害剤としての作用)

(学位論文の要旨)

[研究の背景と目的]

フェロトーシスはアポトーシスなど従来の細胞死機構とは異なる酸化ストレス性細胞死で、鉄依存的に膜リン脂質の過酸化が拡がることで実行される(Cell 156:317, 2014)。脂質過酸化を防止する抗酸化剤は神経細胞を保護することが示されており、所属研究室でもまた、虚血性神経細胞死およびフェロトーシスの双方にリソソーム機能が関わることを明らかにした(JBC 285:667, 2010 他)。また欧米の研究者らは最近、フェロトーシス阻害剤として開発されたFerrostatin-1やLiprostatinが培養神経細胞や脳スライスを使った虚血実験モデルにおいて細胞死抑制効果を示すことを報告した。したがって、ヒトの脳梗塞においてもフェロトーシスが関与する可能性が考えられる。

最近著者らは癌細胞を用いたフェロトーシス誘導モデルで、2, 2, 6, 6-Tetramethylpiperidine-1-oxyl (以下TEMPOと略す)が離れた場所から細胞死抑制効果を果たすことを見つけた。本研究ではTEMPOによるフェロトーシス抑制効果の実体を解明するとともに、培養神経細胞を使った酸化ストレス性細胞死モデルにおいても細胞死を抑止することを明らかにする。またTEMPOがin vivoでも同様に作用し、マウス脳虚血モデルにおいて脳保護効果を発揮するかを検証する。

[研究材料と方法]

① TEMPOの遠隔へのフェロトーシス阻害効果の解析

1. TEMPOの遠隔へのフェロトーシス阻害効果：35 mm皿に培養したヒト線維肉腫HT1080細胞に、RSL3 (またはErastin) を添加してフェロトーシスを誘発する。TEMPO水溶液を別の35 mm皿に加え、両方を100 mm培養プレート内に並べて37°Cでインキュベートする。5時間後に細胞死カウントを行い、フェロトーシス阻害効果を確認する。また他のフェロトーシス阻害剤やTEMPO類縁体で同様の実験を行い、遠隔へのフェロトーシス抑制効果があるかを検証する。

2. TEMPOの遠隔作用メカニズムの検証：TEMPO溶液をガスバック内に入れて37°Cで3時間温めた後、ガスバック内の空気を10ml採取して、RSL3添加細胞の入った100 mm培養プレート内に注入して密閉する。またTEMPO由来のガス成分を明らかにするため、同様に採取したガスをガスクロマトグラフィー質量分析 (GC / MS) で分析する。

3. 虚血性神経細胞死に対する抑制効果：マウス海馬由来の培養細胞株HT22は、グルタミン酸を付加すると一定時間後に急速に細胞死が起こり、虚血性神経細胞死のモデル実験系として汎用されている(J Cell Biol 141: 1423, 1998)。この神経細胞死誘導モデルを用いて、TEMPOのガス成分がフェロトーシスと同様の阻害効果を発揮するかを検証する。

② マウス中大脳動脈永久閉塞モデルにおける脳保護効果の検証

C. B-17/Icr-+/+Jclマウスを使用して中大脳動脈永久閉塞モデル(MCAO)を作成する。TEMPOの気化は室温程度でも確認され、加温することで気化量が促進される。本研究では37°Cで予め加温したTEMPO溶液を3.5cm培養皿に入れ、小さな穴を開けた状態でマウスのケージ内（中央付近）に置くことで吸入投与とする。

マウスをランダムにTEMPO群、Control群、エダラボン群に分け、エダラボン(MCI-186)は既報に準じて3mg/kgを術後15分で静脈注射する。3, 5, 7時間毎にMRIで脳梗塞域のT2画像を取得し、8時間後に脳組織のTTC(2, 3, 5, -triphenyltetrazolium chloride)染色を行って脳梗塞体積を測定する。またマウス脳の組織切片を作成し、酸化ストレスマーカーとして知られる4-ヒドロキシノネナル(4-HNE)抗体による免疫染色を行う。

[研究結果・考察]

TEMPO水溶液は濃度依存的にフェロトキシ抑制作用を示し、他の阻害剤には遠隔作用はみられなかった。TEMPOの気化成分と水溶液を、それぞれGC/MSとLC/MSで解析した結果、TEMPOは分解することなく揮発し、再び水系に溶解することが確認された。これらの結果から、TEMPOは極めて稀有な性質を持つ細胞死抑制化合物であることが明らかとなった。

TEMPOはまた、フェロトキシと同様に神経細胞死モデルにおいても遠隔による阻害効果を発揮した。MCAOモデルを作成しTEMPOの効果を確認したところ、自然揮発したTEMPOを吸入したマウスではエダラボンなどに比べ、神経細胞障害が劇的に減少した。TEMPO吸入マウスはまた、4-HNEの染色レベルが有意に減弱しており、脳内の酸化ストレスの低減が確認された。

国内で臨床使用が認められている脳保護薬はエダラボンのみであり、また吸入投与で脳保護効果が認められている薬剤は存在しない。本研究成果は、脳梗塞をはじめとする虚血疾患の急性期治療に、TEMPOの吸入投与というユニークな投与方法で組織保護を図ることができる可能性を示している。