

ハンチントン病モデル細胞における  
3-ニトロプロピオン酸誘発細胞死の  
機序解明に関する研究

岡田 のりあ

2022

## 目次

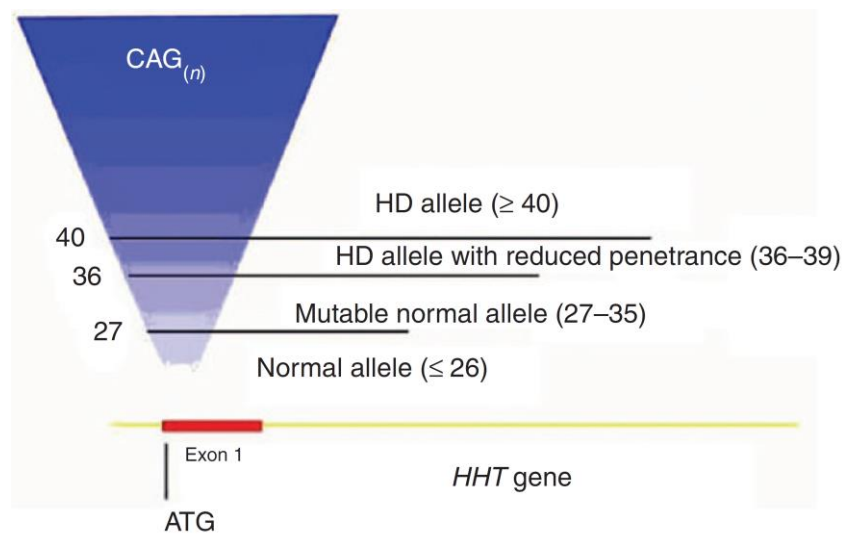
序論	1 頁
第 1 章 3-NP によるミトコンドリア機能障害および細胞死における活性酸素種の関与	8 頁
第 1 節 緒言	
第 2 節 実験材料および方法	
第 3 節 実験成績	
第 4 節 考察	
第 2 章 3-NP 誘発細胞死の機序解明	35 頁
第 1 節 緒言	
第 2 節 実験材料および方法	
第 3 節 実験成績	
第 4 節 考察	
総括および結論	62 頁
謝辞	65 頁
引用文献	66 頁
略語一覧表	78 頁

## 序論

近年、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、ポリグルタミン病などの神経変性疾患について、原因遺伝子異常やリスク因子が明らかにされ、遺伝子異常による異常タンパク質のミスフォールディング・凝集が神経変性を引き起こすという共通の発症分子メカニズムが想定されるようになった[1]。これら神経変性疾患のうち、ポリグルタミン病は、遺伝子内でグルタミンをコードする塩基配列 CAG (C : シトシン、A : アデニン、G : グアニン) リピートが増加しているために起こる神経変性疾患であり、ハンチントン病 (Huntington's disease; HD)、脊髄小脳失調症 1、2、3、6、7、17 型、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症、球脊髄性筋萎縮症などの総称である[2][3]。ポリグルタミン病に共通の発症メカニズムとしては、ポリグルタミン鎖の異常伸長により原因タンパク質のミスフォールディングを生じ、その結果可溶性のオリゴマー、難溶性の凝集体を形成して神経変性を引き起こすと考えられている[4]。

HD は、1872 年にジョージ・ハンチントンがアメリカ合衆国のニューヨーク州で診察した遺伝性舞踏病の症例について記載したことに由来している[5]。以前はハンチントン舞踏病と呼ばれていたが、舞踏運動のみが HD の主症状でないことから、現在はハンチントン病と名称が変更されている。HD は染色体 4q16.3 に位置するハンチンチン (*HTT*) 遺伝子のエクソン 1 における CAG リピート伸長によって引き起こされる常染色体優性遺伝性の進行性神経変性疾患である[6] (Fig. 1)。健常人における 16-20 CAG リピートと比較して、HD 患者は 36 以上の CAG リピートを有する。その結果、HD 患者では長鎖ポリグルタミンを有する異常な huntingtin タンパク質 (Mutant Huntingtin; mHTT) が産生する。HD の病態モデルとして、ヒト *mHTT* 遺伝子を導入したトランスジェニック (R6/2HD) マウスが開発された。R6/2HD マウスは、ヒト変異型 *HTT* 遺伝子のエ

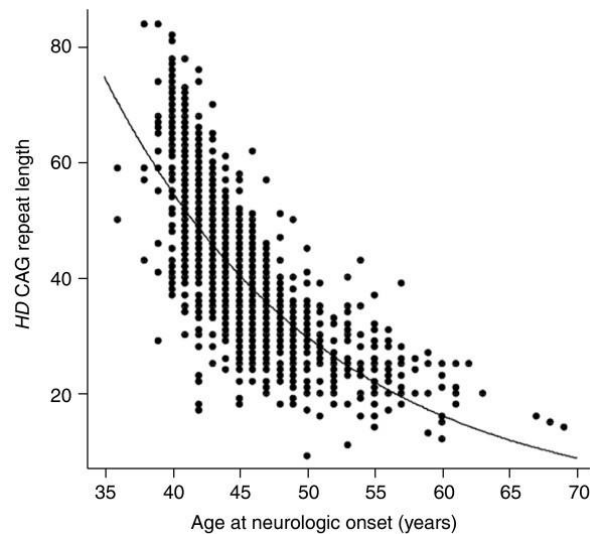
クソン 1 を発現しており、約 150 リピートを有する。ハンチントン病様の症状を早期から呈するマウスであり、臨床症状を反映したモデルとして広く研究に用いられている[7]。その他、全長ヒト mHTT を発現するマウスモデルとして YAC トランスジェニックマウス等が開発されているが、これらのモデルマウスで有効であった化合物が、必ずしも臨床試験で成功するわけではない[8]。



**Figure 1. Diagram of *HTT* gene and the location of the polymorphic CAG repeat within exon 1.**

Bean et al., 2014 より引用。

主な HD の臨床症状は、不随意運動障害、認知障害、および精神障害である。これらの症状は主として成人に発症し、好発年齢は 30 歳台であるが、小児期から老齢期まで様々な年齢での発症がみられる。発症年齢と CAG リピート数との間には相関が認められる (Fig. 2) [9]。しかし、ベネズエラの HD 家系の分析などにより、同じリピート数でも発症年齢には大きな差が認められることから、*HTT* 遺伝子以外の遺伝子や食事や運動などの環境要因が発症年齢を調節している可能性が示唆されている[10][11]。



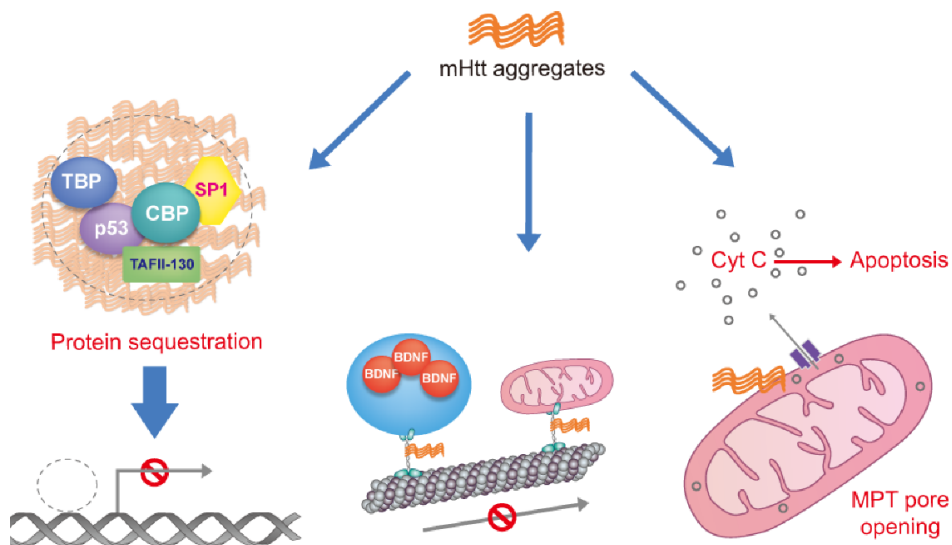
**Figure 2. Inverse correlation of age at neurologic onset and HD CAG repeat length.**

Gusella et al., 2009 より引用。

HD の治療として、ドパミン受容体遮断作用を示す抗精神病薬、舞踏運動治療薬として小胞モノアミン輸送体阻害薬テトラベナジンが対症療法として使用されている。さらに、mHTT を低下させることを目的とした *HTT* を標的とする miRNA を発現するアデノ随伴ウイルスベクター (NCT04120493) [12]や、*huntingtin pre-mRNA* を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチド (NCT02519036) [13][14]に Phase I/II の臨床試験が行われている。また、*HTT* 転写対立遺伝子を非特異的に標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチド (NCT03761849) [15][16]を用いた Phase III 試験が行われている。しかしながら、ハンチントン病に対する有効な治療法はまだ確立されておらず、対症療法を行う以外に有効な治療法はない。そのため、ハンチントン病の発症メカニズムを明らかにし、有効性が期待できる治療法を開発することが望まれている。

mHTT は、多くのメカニズムを通じて神経細胞の機能障害と細胞死をもたらすことが報告されている。即ち、mHTT はミスフォールディングにより凝集体

を形成し、線条体ニューロンおよび大脳皮質ニューロンに細胞死を引き起こす [17][18][19]。その他、軸索輸送、転写、翻訳、ミトコンドリアおよびシナプスの機能に対して影響を及ぼすとされている[20]。mHTT は、p53、SP1 などの転写因子を mHTT 凝集体に隔離することによって転写を抑制し、多くの遺伝子の転写調節障害を引き起こすと考えられている[21][22] (Fig. 3)。また、mHTT は分子モーターと微小管と相互作用することで、線条体の神経活動に関わる brain-derived neurotrophic factor (BDNF) の逆行性輸送の阻害や、ミトコンドリアなどの細胞小器官の輸送に障害をもたらすと考えられている[23][24] (Fig. 3)。さらに、ミトコンドリア外膜との相互作用によりミトコンドリア膜透過性遷移孔開口時の  $Ca^{2+}$  閾値を低下させ、Cytochrome C 放出とアポトーシスをもたらす[25] (Fig. 3)。

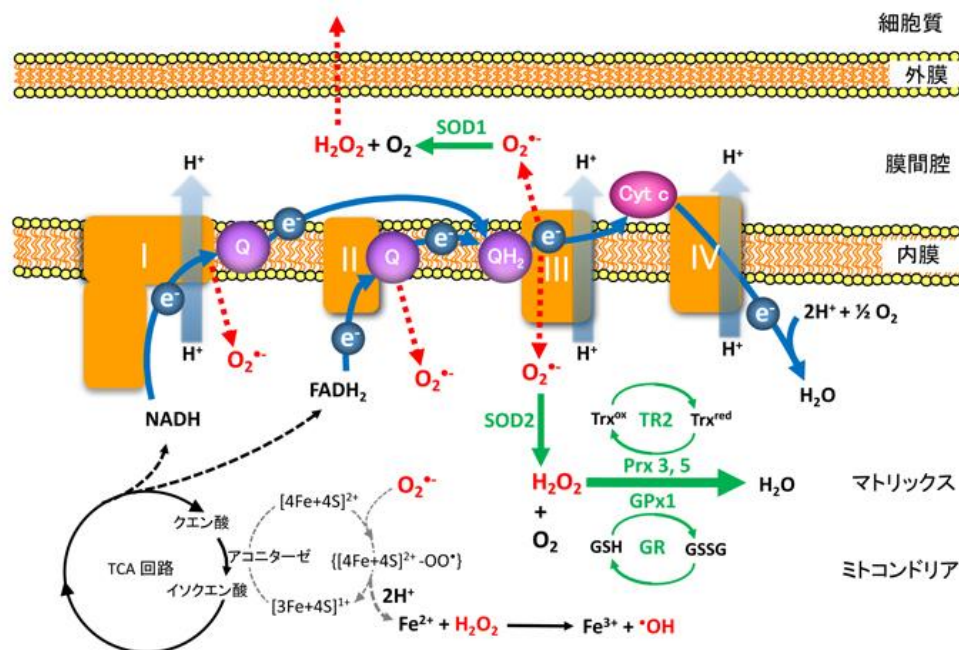


**Figure 3. Potential molecular pathogenesis of toxicity of mHTT aggregates.**

Kim et al., 2014 より引用。

CBP : cAMP response element binding protein (CREB) binding protein, Cyt C : Cytochrome c, MPT : Mitochondrial permeability transition, SP1 : Specificity protein 1, TAFII-130 : TBP-associated factor, 135 kDa, TBP : TATA-binding protein.

CAG リPEATの伸長によって引き起こされる線条体神経細胞死のメカニズムの1つとして、ミトコンドリア機能不全が関与していると考えられている。ミトコンドリアは好気呼吸におけるエネルギー産生の場合として、重要な細胞小器官である。ミトコンドリア内膜上にある呼吸鎖 (電子伝達系) において、酸化還元反応を利用したエネルギー代謝により、ATP を産生している (Fig. 4)。



**Figure 4. Mitochondrial electron transfer system.**

<https://www.toho-u.ac.jp/sci/bio/column/0790.html> より引用。

I: Complex I, II: Complex II, III: Complex III, IV: Complex IV, GPx:Glutathione peroxidase, GR:Glutathione reductase, FADH<sub>2</sub>: Flavin adenine dinucleotide (reduced form), GSH : Glutathione (reduced form), GSSG:Glutathione disulfide, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:Hydrogen peroxide , NADH: Nicotinamide adenine dinucleotide (reduced form), •O<sub>2</sub><sup>-</sup>:Superoxide, •OH:hydroxyl radical, Prx:peroxiredoxin, SOD:Superoxide dismutase, TR:Thioredoxin reductase, Trxox: Thioredoxin (oxidized form) , Trxred: Thioredoxin (reduced form), Q: Ubiquinone

mHTT はミトコンドリア外膜に局在し、ミトコンドリアの構造変化を引き起こし、ミトコンドリア機能障害を起こす[26]。また、HD 患者の尾状核では、ミトコンドリア複合体 I 活性は変化しておらず、複合体 II、III 活性は著しく低下していること [27][28]、げっ歯類に

ミトコンドリア複合体 II 阻害剤である 3-ニトロプロピオン酸 (3-nitropropionic acid; 3-NP) (Fig. 5) を投与すると線条体の神経細胞死が誘

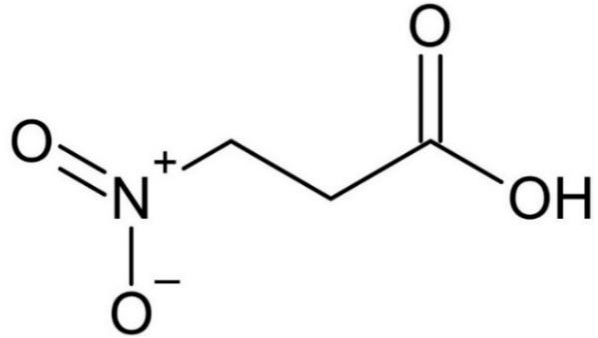


Figure 5. Structural formula of 3-nitropropionic acid.

導され、HD 様の運動機能障害が生じることが報告されている[29]。さらに、R6/2HD マウスモデルに 3-NP を投与すると線条体神経細胞死および運動機能の低下を促進する[30][31]。3-NP は 3-ニトロアクリル酸に酸化され、活性部位の残基と反応し、複合体 II を不可逆的に阻害する [32]。このように、複合体 II の機能障害が HD 病因における重要な事象であることが強く示唆されるが、HD における複合体 II の機能不全の原因と、それが神経細胞死をどのように引き起こすかは十分に明らかにされていない。したがって、3-NP 毒性に重要な役割を持つ因子について明らかにすることは、線条体細胞の細胞死に関与するメカニズムの理解につながる。

HD 研究において、HD モデル細胞であるマウス線条体由来前駆細胞株 (STHdh 細胞) が広く用いられている。STHdh 細胞は、Hdh 遺伝子 (マウスハンチントン病遺伝子ホモログ) にヒト化エクソン 1 を導入した HD ノックインマウス [33] の線条体から樹立され、これらの細胞株は野生型および変異型ハンチントンを内在性レベルで発現する [34]。STHdhQ111 細胞は疾患レベルの 111 回の CAG リピートがノックインされたマウス線条体前駆細胞株であり、長鎖ポリグルタミン (Q111) を持つ mHTT が発現する。コントロール細胞として、通常鎖の



ポリグルタミン (Q7) を持つ STHdhQ7 細胞が用いられている。通常の培養条件下では STHdhQ111 細胞と STHdhQ7 細胞に細胞生存率や細胞死に明らかな違いは認められないが、STHdhQ111 細胞は STHdhQ7 細胞と比較して、無血清培地や興奮性アミノ酸アナログである *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) などの細胞ストレスに対する脆弱性を有しており、細胞死が誘導されやすい特徴を持つ[35][36]。

本研究では、線条体細胞死に関与するメカニズムを明らかにすることを目的として 3-NP 誘発細胞死について、ハンチントン病モデル細胞である STHdhQ111 細胞とコントロール細胞である STHdhQ7 細胞を用いて比較検討を行った。第 1 章では、STHdh 細胞に対する 3-NP 誘発ミトコンドリア機能障害と細胞死に対する活性酸素種 (Reactive Oxygen Species : ROS) の関与について検討し、第 2 章では、3-NP 誘発細胞死に対する細胞死の機序を明らかにするためにフェロトキシスおよび nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase (NOX) の関与についてさらに詳細に検討した。

## 第1章 3-NPによるミトコンドリア機能障害および細胞死における活性酸素種の関与

### 第1節 緒言

活性酸素種 (Reactive Oxygen Species : ROS) は生体内において DNA、脂質、タンパク質などの生体高分子と反応し、その結果として脂質過酸化、DNA 変異、タンパク質の変性などをもたらす。酸化ストレスの上昇はこうした分子レベルの生体酸化損傷を増加させ、様々な疾病につながると考えられている[37]。生理的条件下では、酸化物質と抗酸化物質の間にバランスが保たれているが、老化や疾患などにより過剰な ROS 産生または細胞の抗酸化システムが弱まることにより不均衡な状態となり、ROS による細胞損傷をもたらす (Fig. 6)。HD 患者の線条体および皮質においてヘムオキシゲナーゼ、マロンジアルデヒドなどの酸化ストレスのマーカーの上昇が報告されていることから HD の病態に酸化ストレスの関与が示唆される[38]。HD 患者の血漿、死後脳組織、リンパ芽球および脳脊髄液においても酸化ストレスの関与が報告されている[38][39][40]。また、HD 患者で観察される酸化変化の多くは、HD マウスモデルにおいても再現されており、酸化ストレスは、HD の病態進行に重要な役割を果たすと考えられている[41][42]。

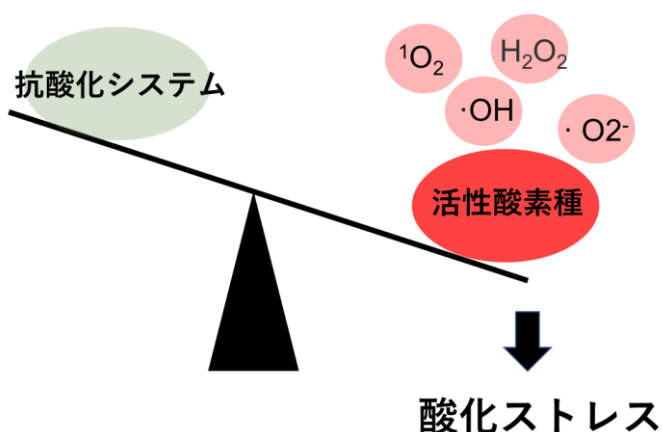
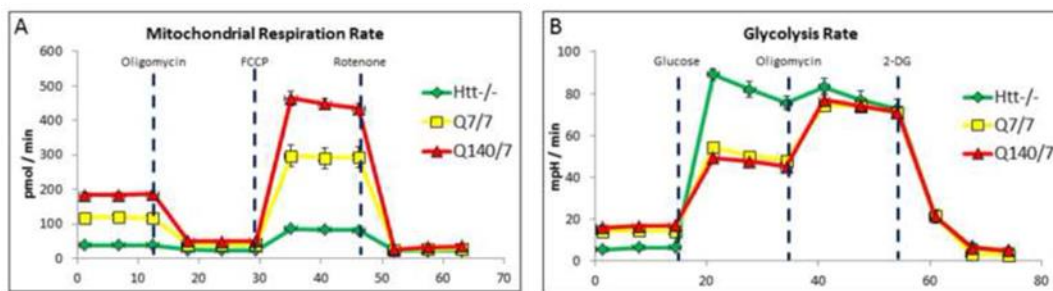


Figure 6. Balance of Antioxidant system and reactive oxygen

ミトコンドリア機能障害は酸化ストレスを引き起こす原因の 1 つと考えられている。HTT を発現するマウス胚性幹細胞を用いて細胞外フラックスアナライザーによりミトコンドリアおよび解糖系の評価を行った先行研究において、*Htt* をノックアウトした *Htt*<sup>-/-</sup> 群では ATP 産生が減少しているのに対し、伸長したポリグルタミンを有する *Htt*<sup>-/-</sup>Q140/7 群は ATP 産生が増加していることが報告されている (Fig. 7A)。また、*Htt*<sup>-/-</sup> 群はミトコンドリアによる ATP 合成ができない代わりに、解糖による ATP 産生が亢進している (Fig. 7B)。このことから、HTT がミトコンドリアの ATP 合成と呼吸鎖機能に重要であり、mHTT がエネルギー代謝に影響を与えることが示唆される[43]。

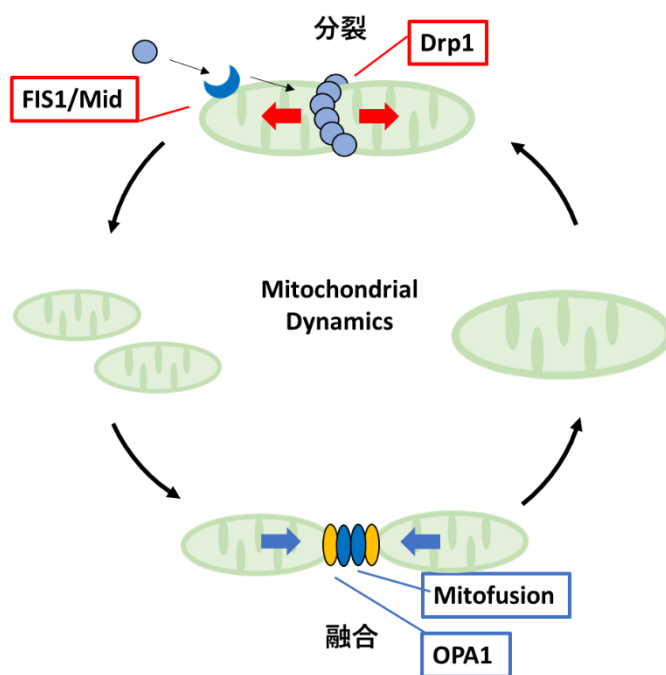


**Figure 7. Influence of mHTT on mitochondrial and glycolytic fluxes.**

Ismailoglu et al., 2014 より引用。

ミトコンドリアは形態的に動的な小器官で、分裂と融合によってネットワークを形成して細胞全体に分布している。正常な細胞では、融合と分裂というこの2つの状態の間に均衡が保たれている (Fig. 8)。ミトコンドリアの分裂を制御する主要なタンパク質には、分裂タンパク質 Dynamin-related protein 1 (Drp1) があり、その他多くの制御タンパク質も含まれている。ミトコンドリアの分裂は、Drp1 が外膜の Mitochondrial fission factor (Mff) および Mitochondrial dynamics proteins (Mid) タンパク質と複合体を形成し、分裂点に動員後、Drp1 が多量体からなる複合体を形成し、ミトコンドリアを断片化していると考えられる。ミトコンドリア外膜の融合は Mitofusin 1、ミトコンドリア内膜の融合は Optic

Atrophy 1 (OPA1) を介して起きる[44]。一過性に HTT を導入された細胞において、CAG リピートの増加は、ミトコンドリアの断片化と ATP 産生の減少をもたらすが、分裂の抑制と融合の促進は ATP レベルを増加させ、伸長したポリグルタミンタンパク質を発現する細胞での細胞死を抑制する[45]。HD 患者の死後検体の尾状核では、ミトコンドリア機能障害を示す分裂タンパク質 Drp1 の増加や融合タンパク質 Mitofusin 1 の発現低下が確認されている[46]。



**Figure 8. Diagram of mitochondrial dynamics.**

しかしながら、HTT タンパク質による線条体細胞死への酸化ストレスやミトコンドリア機能障害の関与について詳細は明らかにされていない。本章では 3-NP によるミトコンドリア機能障害および細胞死に対する抗酸化剤である *N*-Acetyl-L-cysteine (NAC) とエダラボンの作用をハンチントン病モデル細胞である STHdhQ111 細胞とコントロール細胞である STHdhQ7 細胞を用いて比較検討した。

## 第2節 実験材料および方法

### 2-1 実験材料

本試験に用いた薬物および試薬は以下の通りである。トリプシン (Trypsin)、Mouse anti- $\beta$ -actin (AC-74) 抗体、Protease inhibitor cocktail、Phosphatase inhibitor cocktail II、IIIは Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)、Fetal bovine serum (FBS) は Valeant (Costa Mesa, CA, USA)、ペニシリン (Penicillin)、ストレプトマイシン (Streptomycin) は Meiji Seika (Tokyo, Japan)、Hoechst 33342、Propidium iodide (PI) は Molecular Probes (Eugene, OR, USA)、Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)、Dimethylsulfoxide (DMSO)、Blocking One-P は NacalaiTesque (Kyoto, Japan)、BCA protein assay kit、Peroxidase conjugated goat anti-rabbit IgG antibody、Peroxidase conjugated goat anti-mouse antibody、CM-H<sub>2</sub>DCFDA、MitoSOX<sup>TM</sup> Mitochondrial Superoxide Indicators, for live-cell imaging は Thermo Fisher Scientific Inc. (Franklin, MA, USA)、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、2-メルカプトエタノール含有 4×sample buffer solution、ImmunoStar<sup>®</sup>LD、N-acetyl cysteine (NAC) は Wako (Osaka, Japan)、スーパーセップ<sup>TM</sup> エース (5-20%) は Fujifilm Corporation, Tokyo, Japan)、Immobilon<sup>®</sup>-P PVDF Membrane、Rabbit anti BAX 抗体 は Millipore (Bedford, MA, USA)、Can Get Signal 1、2 は TOYOBO Co., Ltd. (Osaka, Japan)、Rabbit anti-Akt 抗体、Rabbit anti p-Akt (193H12) 抗体、Rabbit anti p-Drp1 抗体は Cell signaling technology (Danvers, MA, USA)、Rabbit anti Bcl-2 (C-2) 抗体、Mouse anti Drp1 (C-5) 抗体は Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)、Cell Counting Kit-8、MT-1 MitoMP Detection Kit は (Dojin Kagaku, Kumamoto, Japan)、Caspase-Glo<sup>®</sup> 3/7 Assay System は Promega Corporation (Madison, WI, USA)、3-Methyl-1-phenyl-5-pyrazolone (エダラボン) は Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., (Tokyo, Japan)、3-nitropropionic acid (3-NP) は Cayman Chemical (Ann Arbor, MI,

USA)、Flux pak-XFp 用、XF Mito stress test kit、XF Glycolysis stress test kit は Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA) で購入した。

## 2-2 実験方法

### 2-2-1 細胞培養

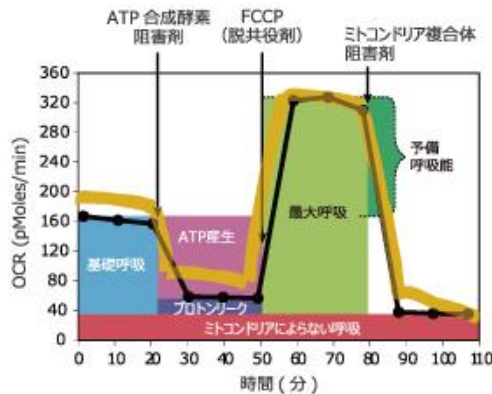
STHdhQ7 および STHdhQ111 細胞は、Coriell institute for Medical Research (Camden, NJ, USA) より購入した[34]。

STHdhQ7 および STHdhQ111 細胞は、10% FBS、100 U/ml ペニシリンおよび 100  $\mu\text{g/ml}$  ストレプトマイシンを添加した DMEM を用いて、33°C、5% CO<sub>2</sub> 中にて培養した。3 日ごとに Trypsin を用いて継代操作を行った。

### 2-2-2 ミトコンドリア呼吸評価

STHdhQ7 および STHdhQ111 細胞を 15,000 cells/well で XF HS Mini 用ミニプレートに播種し、5% CO<sub>2</sub>、33°C で 24 時間培養した。その後、培地を XF DMEM Medium (10 mM glucose、1 mM Pyruvate、2 mM L-glutamine 含有) に交換した。超純水で一晩水和したセンサーカートリッジに充填した XF Mito stress test kit [oligomycin (終濃度 1.5  $\mu\text{M}$ )、FCCP (終濃度 1  $\mu\text{M}$ )、rotenone/antimycin (終濃度 0.5  $\mu\text{M}$ )] を順に添加し、XF HS Mini (Agilent Technologies) を用いて酸素消費速度

(OCR) の測定を行い、タンパク量で補正した値を使用した (Fig. 9)。

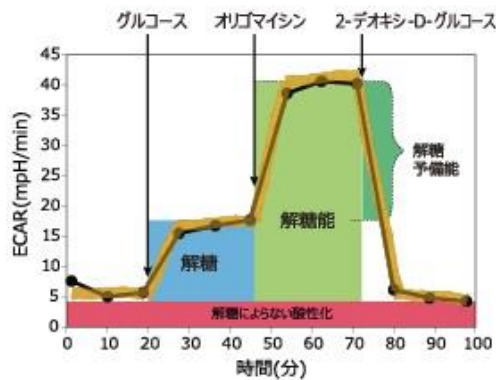


**Figure 9. The fundamental parameters of mitochondrial function.**

<https://www.primetech.co.jp/products/tabid/90/pdtd/119/language/ja-JP/Default.aspx> より引用。

### 2-2-3 解糖能評価

STHdhQ7 および STHdhQ111 細胞を 15,000 cells/well で XF HS Mini 用ミニプレートに播種し、5% CO<sub>2</sub>、33°C で 24 時間培養した。その後、培地を XF DMEM Medium (2 mM L-glutamine 含有) に交換した。超純水で一晩水和したセンサーカートリッジに充填した XF Glycolysis stress test kit [glucose (終濃度 10 mM)、oligomycin (終濃度 1 μM)、2-Deoxy-D-glucose (2-DG) (終濃度 50 mM)] (Agilent Technologies) を順に添加し、XF HS Mini を用いて細胞外産生加速度 (ECAR) の測定を行い、タンパク量で補正した値を使用した (Fig. 10)。



**Figure 10. The fundamental parameters of glycolysis.**

<https://www.primetech.co.jp/products/tabid/90/pdid/119/language/ja-JP/Default.aspx> より引用。

### 2-2-4 細胞生存活性評価

STHdhQ7 および STHdhQ111 細胞を 3,000 cells/well で 96 well プレート (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) に播種し、5% CO<sub>2</sub>、33°C で 24 時間培養した。その後、培地を 3% FBS 含有の DMEM に交換した。この時、エダラボンおよび NAC を DMSO に溶解し、1% DMSO を含むリン酸緩衝食塩水 (PBS) で希釈し、それぞれ終濃度 30 μM および 2 mM でウェルに添加した。また、3-NP を PBS に溶解し、終濃度 5 mM となるよう調製し、エダラボンや NAC と同時に培地に添加した。

その後、試薬添加 24 時間後に Cell Counting Kit-8 を用いて細胞生存活性評価

を行った。測定は、CCK-8 試薬添加後 0 時間および 2 時間後に、Varioskan Flash 2.4 microplate reader (Thermo Fisher Scientific) を用いて、450/650 nm で行い、添加直後の吸光度の値をバックグラウンドとして引いた値を用いて 定量を行った。

#### 2-2-5 細胞死の評価

STHdhQ7 および STHdhQ111 細胞を 96 well plate に播種し、2-2-4 と同様の条件で 薬物処置及および細胞障害を惹起し、試薬添加 24 時間後、培養細胞に対し Hoechst33342 (終濃度 8.1  $\mu\text{M}$ ) と PI (終濃度 1.5  $\mu\text{M}$ ) を添加することにより核染色を行った。15 分間のインキュベーションの後、Lionheart FX automated microscope (BioTek, Winooski, VT, USA) を用いて画像を撮影した。Gen5 software (BioTek) を用いて PI 陽性細胞数 (死細胞) および Hoechst 33342 陽性細胞数 (生細胞+死細胞) を計測し、Hoechst33342 陽性細胞に対する PI 陽性細胞の比として値を算出した。

注釈：細胞生存活性および細胞死の評価について

細胞生存率に用いた CCK-8 assay は、細胞内の脱水素酵素の補酵素である NADH 量を測定している(<https://www.dojindo.eu.com/store/p/456-Cell-Counting-Kit-8.aspx>)。細胞内 NADH 量は細胞内のエネルギー代謝活性を反映している。一方、死細胞率は、PI (死細胞)、Hoechst33342 (全細胞) による蛍光核染色により評価した。PI は、生細胞の細胞膜は透過せず、死細胞 (後期アポトーシスおよびネクローシス) においてのみ細胞膜を透過して核内の DNA に intercalate し赤色蛍光を発する。このように、細胞生存率の評価は、PI で染色されていない生細胞内も含めたエネルギー代謝活性の低下 (NADH 量の減少) も反映している。そのエネルギー代謝の低下を含めて細胞恒常性の維持の閾値を超えて破綻した



一部の細胞が細胞死に至ることから、死細胞率が低い場合や、細胞死に対する抑制率が高くない場合には細胞生存率の評価では差は検出できない。

#### 2-2-6 細胞内活性酸素種評価

細胞内活性酸素種 (過酸化水素、ヒドロキシラジカル、ペルオキシナイトロイト) は CM-H<sub>2</sub>DCFDA を用いて評価した。細胞内活性酸素種は、STHdhQ7 および STHdhQ111 細胞を 96 well plate に播種し、2-2-4 と同様の条件で薬物処置および細胞障害を惹起し、12 時間後に終濃度が 1  $\mu$ M となるように CM-H<sub>2</sub>DCFDA を添加し、33°C、5% CO<sub>2</sub> 中で 60 分間インキュベーションした。定量評価は Varioskan Flash 2.4 microplate reader を用いて 495/527 nm で測定した蛍光輝度を BIOREVO BZ-X710 (Keyence, Osaka, Japan) で撮影した Hoechst 33342 陽性細胞数で補正した値を使用した。

#### 2-2-7 ミトコンドリア活性酸素種評価

ミトコンドリア活性酸素種 (スーパーオキシド) は MitoSOX™ Red Mitochondrial Superoxide Indicator を用いて評価した。STHdhQ7 および STHdhQ111 細胞を 96 well plate に播種し、2-2-4 と同様の条件で薬物処置および細胞障害を惹起し、12 時間後に終濃度が 5  $\mu$ M となるように MitoSOX を添加し、33°C、5% CO<sub>2</sub> 中で 60 分間インキュベーションを行った。定量評価は BIOREVO BZ-X710 で撮影した画像の蛍光輝度を Image J で測定し、Hoechst 33342 陽性細胞数で補正した値を使用した。

#### 2-2-8 ミトコンドリア膜電位評価

ミトコンドリア膜電位は MT-1 MitoMP Detection Kit を用いて測定した。

STHdhQ7 および STHdhQ111 細胞を 96 well plate に播種し、24 時間後培地で希釈した MT-1working solution を添加し 30 分間インキュベーションした後、2-2-4 と同様の条件で薬物処置および細胞障害を惹起した。さらに 24 時間後に BIOREVO BZ-X710 で撮影を行い、BZ-X analyzer system を用いて蛍光を測定し、Hoechst 33342 陽性細胞数で補正した値を使用した。

#### 2-2-9 Caspase3/7 評価

Caspase-3/7 は Caspase-Glo 3/7 Assay System を用いて測定した。STHdhQ7 および STHdhQ111 細胞を 96 well plate に播種し、2-2-4 と同様の条件で薬物処置および細胞障害を惹起し、24 時間後に Caspase-Glo 3/7 試薬をサンプル量に対して 1 : 1 の割合で添加し、細胞を室温で 30 分間インキュベートした。各サンプルの発光を Varioskan LUX microplate reader (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定し、Lionheart FX automated microscope を用いてカウントした Hoechst 33342 陽性細胞数で補正した。

#### 2-2-10 ウェスタンブロット解析

##### 2-2-10-1 試料採取

STHdhQ7 および STHdhQ111 細胞を 6 well プレートに  $6 \times 10^4$  cells/well で播種した。培養 24 時間後、培地を 3% FBS 含有の DMEM と交換し、2-2-4 と同様の条件で薬物処置および細胞障害を惹起し 12 時間インキュベートした。その後、PBS で洗浄を行った後 RIPA buffer (50 mM Tris 溶液 pH 8.0、150 mM NaCl、1.0% Igepal CA-630、0.5% デオキシコール酸ナトリウム、0.1% SDS 含有) 1 ml に対し Protease inhibitor cocktail、Phosphatase inhibitor cocktail II および III をそれぞれ 10  $\mu$ L ずつ混合した試薬を加えて溶解し、マイクロチューブに回収した。その後

30 分間氷上に静置し、4°C、12,000 ×g で 20 分間遠心してから -80°C で保存した。

#### 2-2-10-2 タンパク質定量

タンパク質定量は、BCA protein assay kit を用いて行った。検量線作成のために 0、12.5、25、50、125、250、500、750、1,000、1,500 および 2,000 µg/ml の濃度に調製した Bovine serum albumin を用いた。それぞれのタンパク質抽出液は、RIPA buffer で 2 倍に希釈して用いた。BCA protein assay kit の A 液と B 液を製品プロトコールに従って混合した Working reagent をサンプルに添加し、37°C のインキュベーター中で 30 分間反応させ、その後 532 nm の吸光度を Varioskan Flash 2.4 microplate reader を用いて測定した。タンパク質濃度は Sample Buffer Solution (2-メルカプトエタノール含有) (×4) 又は非還元性 SDS Sample Buffer [250 mM Tris-hydroxymethyl ammonium (Tris)-HCl, pH 8.0, 8% SDS, 40% glycerol] および RIPA buffer を用いて調製し、100°C で 5 分間煮沸処理し、-80°C に保存した。

#### 2-2-10-3 電気泳動および転写

スーパーセップ TM エース (5-20%) を泳動装置にセットし、Running buffer で容器内を満たした。サンプルは、1 well あたりの添加量は分子量マーカー 4 µl、各サンプル 10 µl とした。サンプル添加後、ゲル 1 枚あたり 20 mA で 90 分間電気泳動した。泳動後、ゲルを Cathode buffer (25 mM Tris、40 mM 6-Amino hexanoic acid) に 15 分間浸漬した。転写膜はメタノールに 30 秒間浸漬し、超純水に 15 分間浸漬した。その後、Anode buffer 2 (25 mM Tris) に 15 分間浸漬した。陽極側から、Anode buffer 1 (0.3 M Tris) に浸したろ紙、Anode buffer 2 に浸したろ紙、転写膜、ゲル、2 枚の Cathode buffer に浸したろ紙の順に重ね、膜 1 枚当たり 100 mA で 45 分間転写した。

#### 2-2-10-4 ウェスタンブロッティング

転写後、0.05% Tween 20 含有 50 mM TBS (T-TBS: 10 mM tris、40 mM Tris hydrochloride、15 mM NaCl) で洗浄し、Block One-P に浸して、30 分間ブロッキングした。その後 T-TBS で 5 分間、3 回洗浄し、Can get signal solution 1 で 1000 倍希釈した一次抗体に浸し、低温で一晩振とうした。その後再び T-TBS で 5 分間、3 回洗浄し Can get signal solution 2 で 1000 倍希釈した二次抗体に浸し、室温で 1 時間振とうした。T-TBS で 5 分間、3 回洗浄した後、ImmunoStar®LD に 5 分浸した。その後、Amersham Imager 680 (Cytiva, Marlborough, MA, USA) および Amersham Imager 680 Analysis Software (Cytiva) を用いて検出、解析を行った。一次抗体には、Rabbit anti BAX (1/2,000)、Rabbit anti Bcl-2 (C-2) (1/ 1,000)、Rabbit anti-Akt (1/ 1,000)、Rabbit anti p-Akt (193H12) (1/ 1,000)、Mouse anti Drp1 (C-5) (1/1,000)、Rabbit anti p-Drp1 (1/ 1,000)、Mouse anti  $\beta$ -actin (AC-74) (1/2,000) を、二次抗体には、Peroxidase conected goat anti-rabbit IgG (1:1,000)、Peroxidase conected goat anti-mouse (1/1,000) を用いた。

#### 2-2-11 統計学的解析

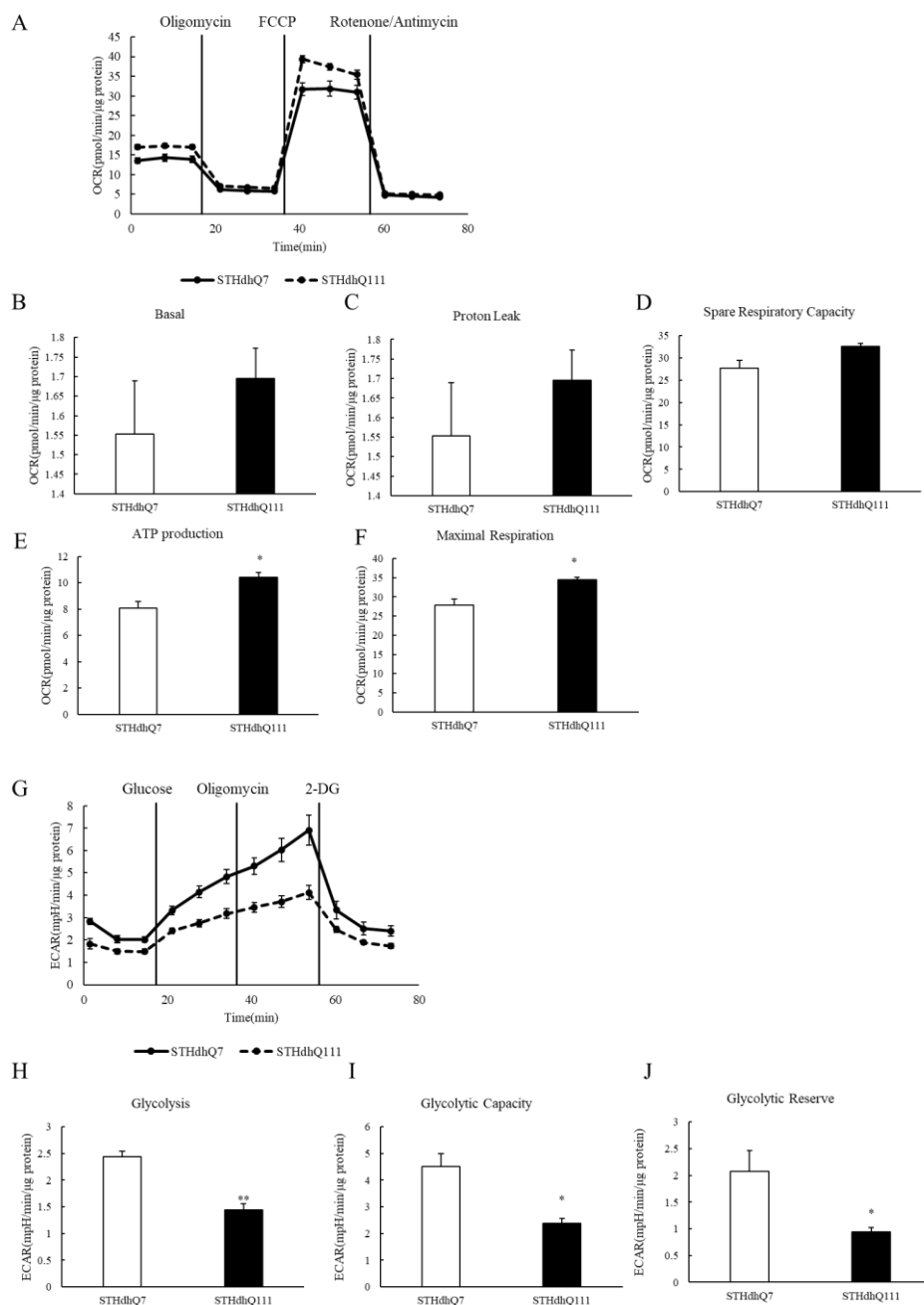
統計学的な比較は、Statistical Package for the Social Science 15.0 J for Windows software (エス・ピー・エス・エス株式会社、Tokyo、Japan) を用いて行った。2 群間の比較は、Levene 検定後、two-tailed Student's t-test を行った。多群間の比較は、One-way analysis of variance (ANOVA) 後に Tukey's test を行った。実験結果は平均値  $\pm$  標準誤差で表し、危険率 5 %未満を有意とした。

### 第3節 実験成績

#### 3-1 STHdh 細胞のエネルギー代謝

はじめに、HD モデル細胞である STHdhQ111 細胞およびそのコントロール細胞である野生型 HTT を持つ STHdhQ7 細胞を用いて、STHdh 細胞のエネルギー代謝について検討した。STHdhQ111 細胞は疾患レベルの CAG リピート配列がノックインされたマウス線条体前駆細胞株であり、長鎖ポリグルタミン (Q111) を持つ mHTT が発現している。コントロールとして通常鎖のポリグルタミン (Q7) を持つ STHdhQ7 細胞を用いた。

ミトコンドリア呼吸評価を Fig. 11A-F に、解糖能の評価を Fig. 11G-J に示す。ミトコンドリア呼吸評価において、STHdhQ111 細胞は STHdhQ7 細胞と比較して ATP 産生 (Fig. 11E) および最大呼吸 (Fig. 11F) が増加していた。一方、基礎呼吸 (Fig. 11B)、プロトンリーク (Fig. 11C) および予備呼吸能 (Fig. 11D) には違いは認められなかった。解糖能の評価では STHdhQ111 細胞は STHdhQ7 細胞と比較して解糖 (Fig. 11H)、解糖能 (Fig. 11I) および解糖予備能 (Fig. 11J) が低下していた。



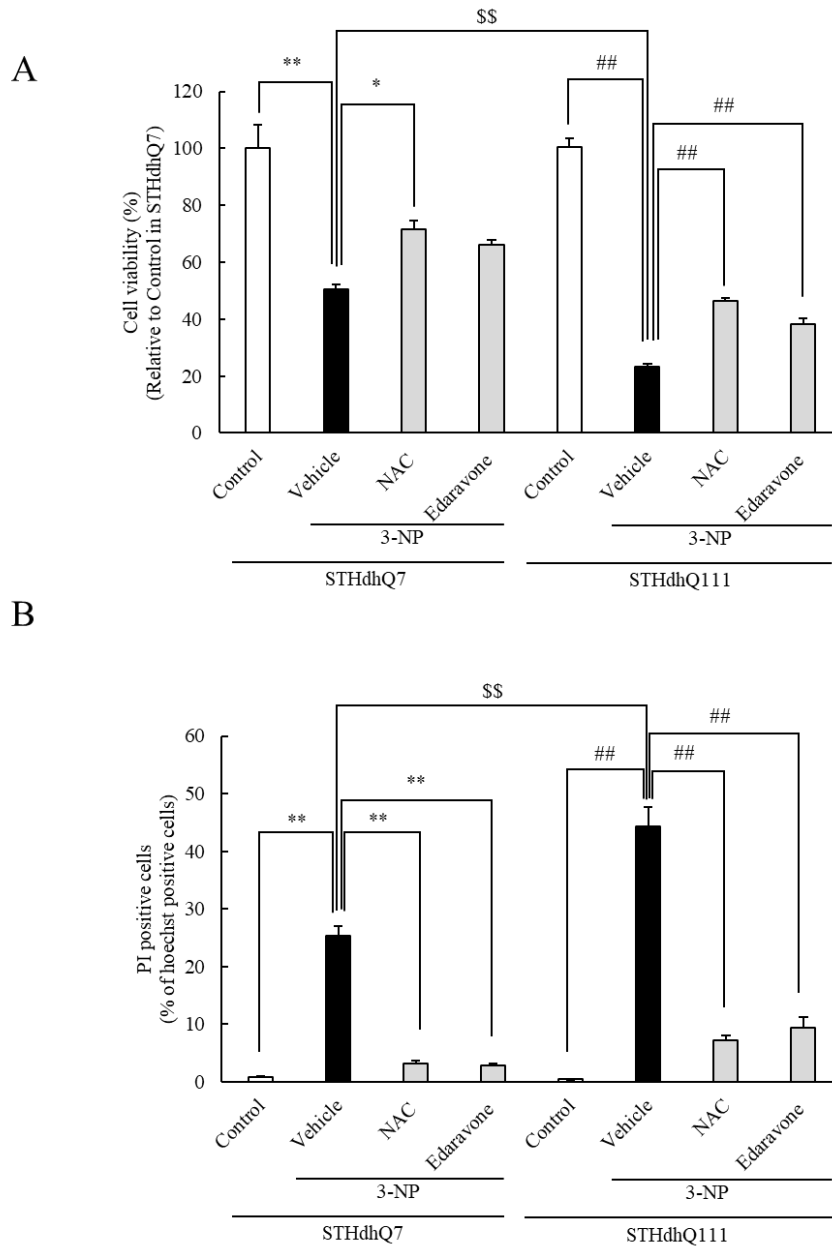
**Figure 11. Mutant HTT enhanced mitochondrial respiration and decreased glycolysis in striatal cells**

(A-F) The mitochondrial respiration in both STHdh cells with or without mutant HTT. (B) Basal mitochondrial respiration levels. (C) Proton leak levels. (D) Spare respiratory capacity levels. (E) ATP production levels. (F) Maximal respiration levels. (G-J) The glycolysis in both STHdh cells with or without mutant HTT. (H) Glycolysis levels. (I) glycolytic capacity levels. (J) glycolytic reserve levels. Data are shown as mean  $\pm$  SEM (n = 3). \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 vs. STHdhQ7 (Student's *t*-test).

### 3-2 STHdh 細胞に対する 3-NP 誘発細胞死

3-NP により誘発される細胞死に対する 抗酸化剤 NAC およびエダラボンの保護作用について検討した。STHdhQ111 細胞は、3-NP によるミトコンドリア複合体 II の阻害に対して脆弱であることが報告されている[47]。

細胞生存活性を Fig. 12A に、全細胞数に対する PI 陽性細胞数(死細胞率)を Fig. 12B に示す。通常の培養条件 (3% FBS) 下の溶媒投与対照群 (Control) において、STHdhQ7 細胞と STHdhQ111 細胞の細胞生存率 (Fig. 12A) および死細胞率 (Fig. 12B) に明らかな違いは認められなかった。それに対して、3-NP (5 mM) 処置により、STHdhQ7 細胞と STHdhQ111 細胞の両群において、細胞生存率の減少 (Fig. 12A) および死細胞率の増加が認められた (Fig. 12B)。これらの障害は、STHdhQ111 細胞が STHdhQ7 細胞より脆弱であった (Fig. 12A)。NAC (2 mM) およびエダラボン (30  $\mu$ M) は、3-NP による細胞生存率の減少および死細胞率の増加を両細胞において有意に抑制した (Fig. 12A, B)。



**Figure 12. 3-NP enhanced cell damage in striatal cells with mutant HTT, and NAC and edaravone inhibited the cell damage in both striatal cells with or without mutant HTT.**

(A) The cell viability rate after co-treatment with 3-NP (5 mM) and NAC (2 mM) or edaravone (30  $\mu$ M) for 24 h. (B) The cell death rate after co-treatment with 3-NP (5 mM) and NAC (2 mM) or edaravone (30  $\mu$ M) for 24 h. Data are shown as mean  $\pm$  SEM (n = 6). \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 vs. vehicle in STHdhQ7 (Tukey's test), ##P < 0.01 vs. vehicle in STHdhQ111 (Tukey's test), and \$\$P < 0.01 between vehicles (Student's *t*-test).

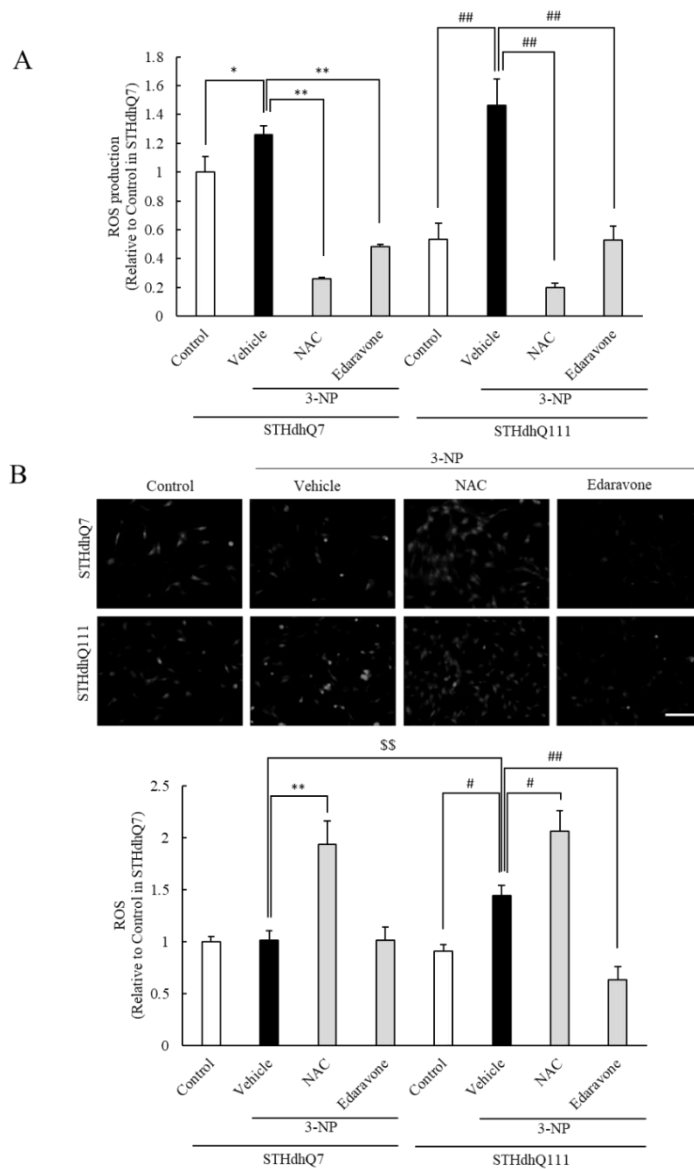


### 3-3 3-NP による細胞内およびミトコンドリア ROS の変化

先行研究において、STHdhQ7 細胞に対する 3-NP 処置により細胞内 ROS 産生を増加することが知られている[48]。そこで、3-NP 処置による STHdhQ7 および STHdhQ111 における細胞内 ROS およびミトコンドリア ROS 産生を比較検討した。細胞内 ROS を調べるために、過酸化水素、ヒドロキシラジカル、ペルオキシナイトライトなどの ROS を検出する CM-H<sub>2</sub>DCFDA プローブを用いて細胞内 ROS を評価した (Fig. 13A)。また、ミトコンドリア活性酸素種 (スーパーオキシド:  $\cdot O_2$ ) を検出する MitoSOX™ Red Mitochondrial Superoxide Indicator を用いてミトコンドリア ROS を評価した (Fig. 13B)。

通常の培養条件 (3% FBS) 下の溶媒投与対照群 (Control) において、STHdhQ111 細胞の細胞内 ROS は STHdhQ7 細胞と比較して低下していたが、3-NP (12h) 処置により同レベル以上に増加した (Fig. 13A)。この増加は NAC およびエダラボンによって有意に抑制された (Fig. 13A)。

ミトコンドリア ROS は、通常の培養条件 (3% FBS) 下の溶媒投与対照群 (Control) において、両細胞で明らかな差は認められなかった (Fig. 13B)。3-NP 処置により、STHdhQ111 でのみミトコンドリア ROS は有意に増加した。このミトコンドリア ROS の増加は、エダラボン処理によって有意に抑制された (Fig. 13B)。一方、STHdhQ7 においては、3-NP 処置によるミトコンドリア ROS の増加は認められなかった (Fig. 13B)。また、チオール系抗酸化物質である NAC は、3-NP 処置後に STHdhQ111 および STHdhQ7 の両細胞でミトコンドリア ROS を増加させた (Fig. 13B)。

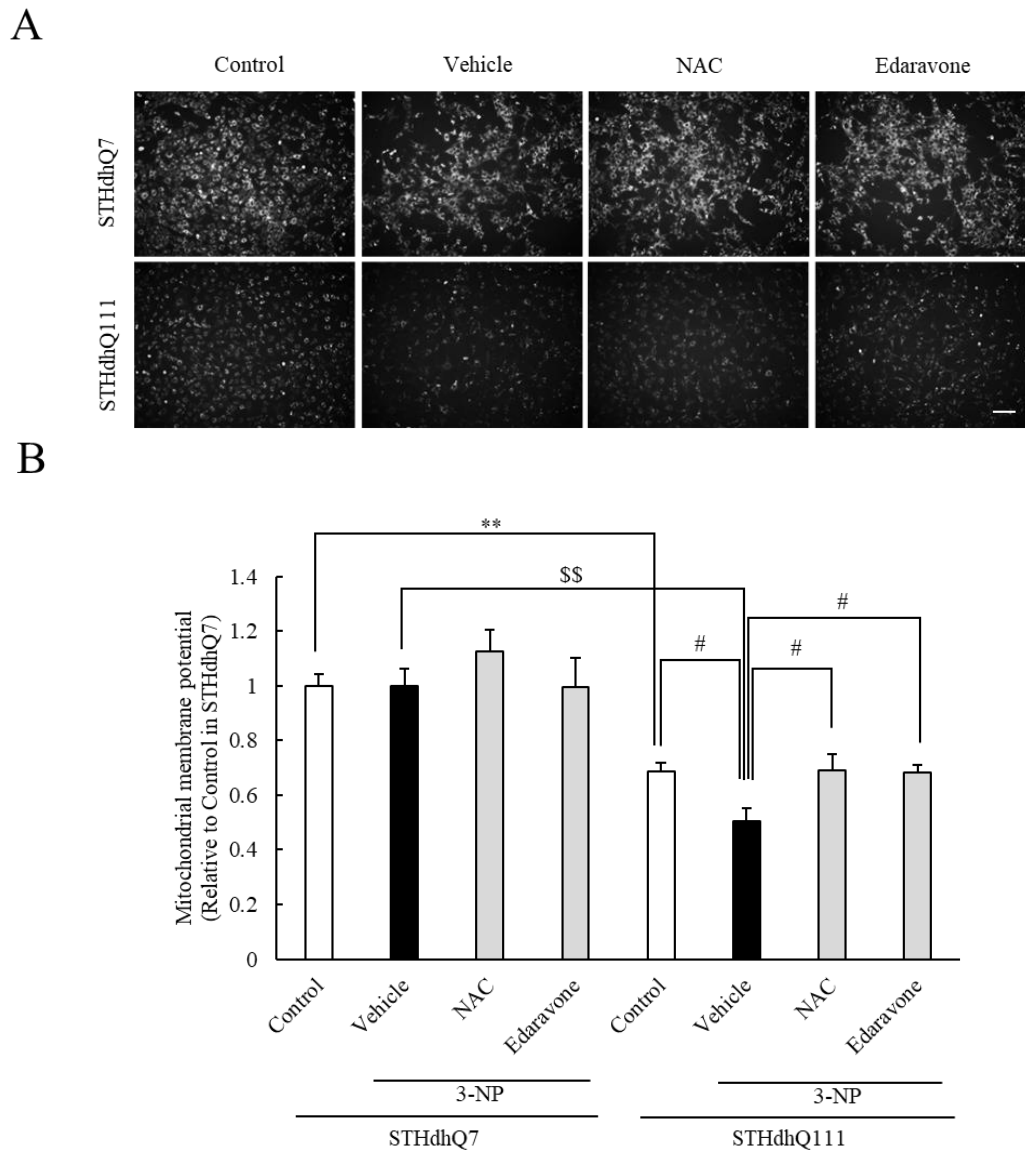


**Figure 13. 3-NP enhanced intracellular and mitochondrial ROS production rates in striatal cells with mutant HTT, and edaravone inhibited them in both striatal cells with or without mutant HTT.**

(A) The ROS production rate after co-treatment with 3-NP (5 mM) and NAC (2 mM) or edaravone (30  $\mu$ M) for 12 h. (B) The mitochondrial ROS production rate after co-treatment with 3-NP (5 mM) and NAC (2 mM) or edaravone (30  $\mu$ M) for 12 h. Top: representative images; scale bar = 200  $\mu$ m. Bottom: quantitative data. Data are shown as mean  $\pm$  SEM (n = 6). \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 vs. vehicle in STHdhQ7 (Tukey's test), #P < 0.05, ##P < 0.01 vs. vehicle in STHdhQ111 (Tukey's test), and <sup>SS</sup>P < 0.01 between vehicles (Student's t-test).

### 3-4 3-NP によるミトコンドリア膜電位の変化

ミトコンドリア機能に対する抗酸化剤の影響を調べるために、MMPプローブである MT-1 色素を用いてミトコンドリア膜電位 (Mitochondrial Membrane Potential:MMP) を評価した (Fig. 14A, B)。通常の培養条件化 (Control) において、STHdhQ111 細胞の MMP は、STHdhQ7 に比較して約 30% 低下していた (Fig. 14B)。3-NP を 24 時間処置すると、STHdhQ111 細胞でのみ MMP がさらに低下し、その低下は NAC およびエダラボンにより抑制された (Fig. 14B)。一方、STHdhQ7 細胞の MMP は、薬剤処置による影響は認められなかった (Fig. 14B)。



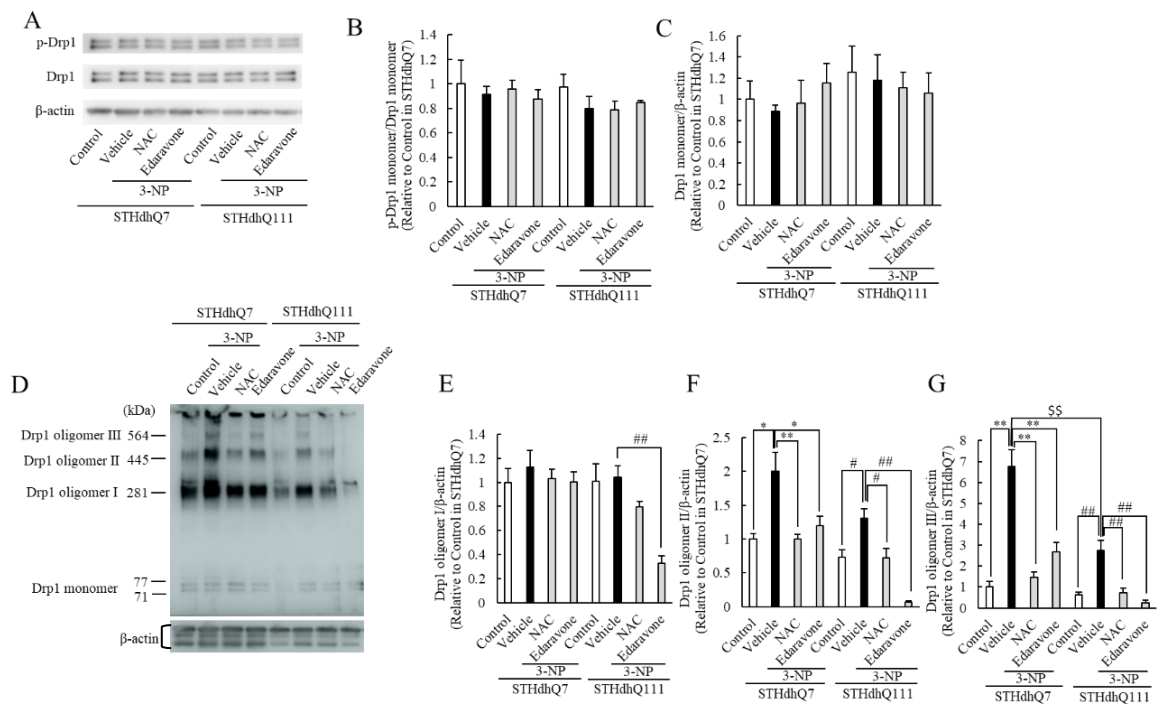
**Figure 14. NAC and edaravone suppressed the impaired mitochondrial membrane potential by 3-NP in STHdhQ111, whereas they did not affected in STHdhQ7.**

(A) STHdh cells were treated with 3-NP (5 mM), NAC (2 mM), or edaravone (30  $\mu$ M) for 24 h. Mitochondrial membrane potential (MMP) was evaluated using the MT-1 MitoMP assay kit. (A) Representative images. Scale bar = 200  $\mu$ m. (B) Quantitative data. Mean  $\pm$  SEM (n = 6). #P < 0.05 vs. vehicle in STHdhQ111 (Tukey's test), \*\*P < 0.01 between controls (Student's t-test), and \$\$P < 0.01 between vehicles (Student's t-test).

### 3-5 3-NP による Drp1 のオリゴマー化

Drp1 活性は、サイクリン依存性キナーゼ 5 (cyclin dependent kinase5; CDK5) による 616 番目の Serine 残基 (S616) のリン酸化によって一部制御され、ミトコンドリア分裂をもたらす[49]。mHTT を発現する細胞での細胞毒性の増加には、ミトコンドリアの断片化の増加が関与していることが報告されている[50]。還元剤である 3-メルカプト-1,2-プロパンジオールを用いた SDS-PAGE によって、ミトコンドリア分裂に関与する Drp1 のリン酸化を評価した (Fig. 15A-C)。p-Drp1/Drp1 比および Drp1 モノマー発現は、細胞種間や薬剤処置による明らかな違いは認められなかった (Fig. 15A-C)。

Drp1 のオリゴマー化は、Drp1 の活性化およびミトコンドリア分裂に関与している。細胞質に存在する Drp1 は Mff と MiD49/51 と呼ばれる受容体を介してミトコンドリア外膜に結合し、オリゴマー化してミトコンドリアを取り囲み GTP 加水分解に依存して、ミトコンドリア膜を切断する[51][52]。そこで、3-メルカプト-1,2-プロパンジオールを含まない非還元 SDS-PAGE で Drp1 オリゴマーについて検討した (Fig. 15D-G)。Drp1 オリゴマーはオリゴマー I (四量体 : 281 kDa)、II (八量体 : 445 kDa)、III (高分子量体 : 564 kDa) として検出された。四量体であるオリゴマー I は STHdhQ7 細胞と STHdhQ111 細胞の両方で高発現した。エダラボンは STHdhQ111 細胞でのみ、オリゴマー I を有意に抑制した (Fig. 15E)。オリゴマー II、III は 3-NP 処置により STHdhQ7 細胞と STHdhQ111 細胞の両方で発現が増加し、STHdhQ111 細胞よりも STHdhQ7 細胞でより上昇していた。また、NAC とエダラボンはこれらの増加を有意に抑制した (Fig. 15F-G)。



**Figure 15. 3-NP increased Drp1 oligomer, and NAC and edaravone suppressed it in striatal cells with or without mutant HTT.**

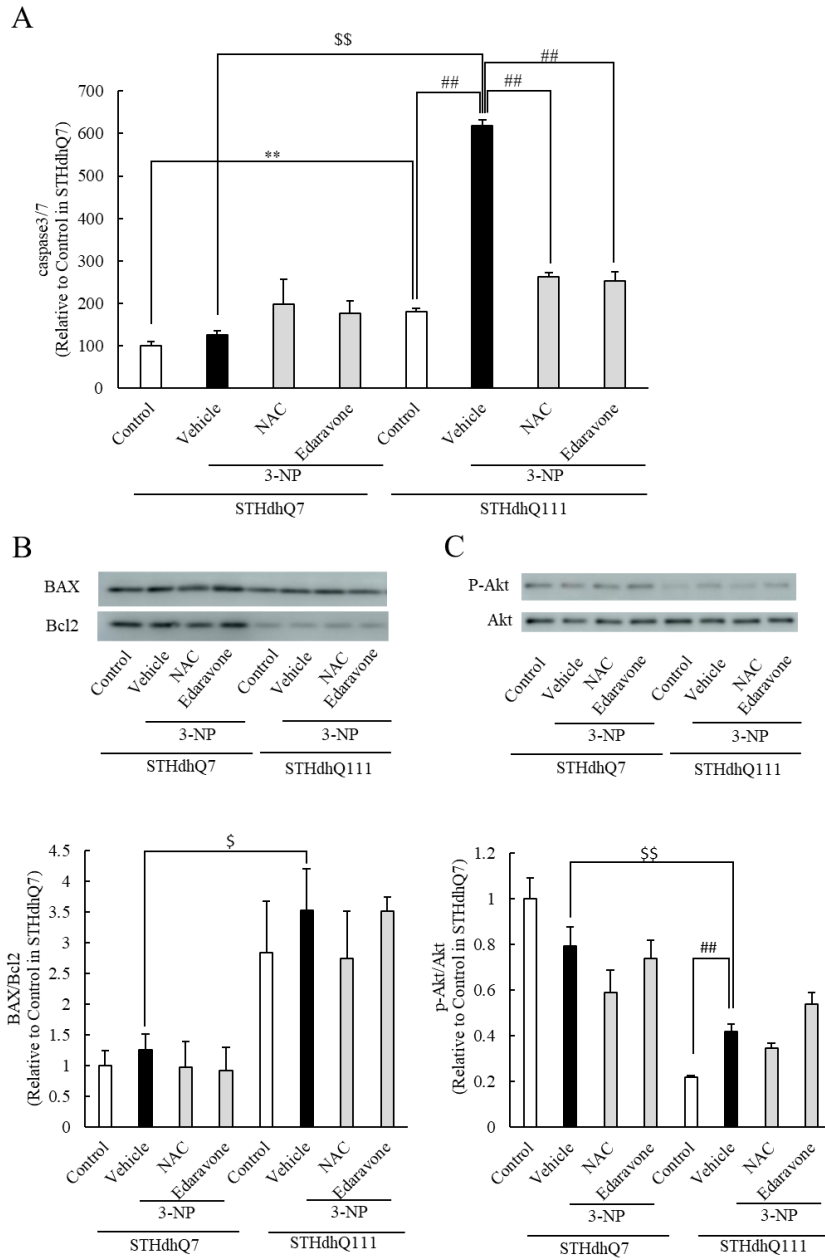
Western blot analysis and quantification of protein expression (A–C). Reducing SDS-PAGE was performed, followed by immunoblotting. (A) Typical band images of immunoblotting on reduced SDS-PAGE. (B) p-Drp1 monomer expression levels normalized to the Drp1 monomer (n = 4). (C) Drp1 monomer expression levels normalized to β-actin (n = 4). (D–G) Non-reducing SDS-PAGE was performed, followed by immunoblotting. (D) Typical band images of immunoblotting using non-reducing SDS-PAGE. (E–G) Drp1 oligomer expression levels normalized to β-actin (n = 3–4). Mean ± SEM, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 vs. vehicle in STHdhQ7 (Tukey's test), #P < 0.05, ##P < 0.01 vs. vehicle in STHdhQ111 (Tukey's test), and \$\$P < 0.01 between vehicles (Student's *t*-test).

### 3-6 3-NP によるアポトーシス、細胞生存シグナル伝達経路への影響

アポトーシス経路の活性化について検討するため、caspase 3/7 活性を測定した。通常の培養条件 (Control) 下において、STHdhQ111 は、STHdhQ7 に比べて caspase 3/7 活性が亢進していた。さらに、3-NP 処置により、STHdhQ111 細胞でのみ caspase 3/7 活性がさらに上昇した。その caspase 3/7 活性の上昇は、NAC およびエダラボンによって有意に抑制された (Fig. 16A)。

さらにアポトーシスに対する抗酸化剤の効果を明らかにするために、アポトーシス促進因子である Bax およびアポトーシス抑制因子である Bcl-2 タンパク質の発現をウェスタンブロッティングにより測定し、Bax/Bcl-2 比を評価した (Fig. 16B)。通常の培養条件 (Control) 下において、STHdhQ111 は、STHdhQ7 に比べて Bax/Bcl-2 比が上昇していたが、3-NP および抗酸化剤処置の明らかな影響は認められなかった (Fig. 16B)。

また、活性化された Akt は、アポトーシス促進因子をリン酸化してアポトーシスを抑制する[53]。通常の培養条件 (Control) 下では、STHdh111 細胞は STHdh7 細胞に比べて p-Akt/Akt 比が減少していた (Fig. 16C)。一方、3-NP 処置は STHdhQ111 細胞においてのみ Akt のリン酸化を増加させたが、抗酸化剤による明らかな作用は認められなかった (Fig. 16C)。



**Figure 16. Apoptosis and reduced cell survival signaling pathways were promoted in striatal cells with mutant HTT.**

(A) The caspase-3/7 production rate after co-treatment with 3-NP (5 mM) and NAC (2 mM) or edaravone (30  $\mu$ M) for 24 h. Data are shown as mean  $\pm$  SEM (n = 6). \*\*P < 0.01 vs. vehicle in STHdhQ7 (Tukey's test), ##P < 0.01 vs. vehicle in STHdhQ111 (Tukey's test), and \$\$P < 0.01 between vehicles (Student's t-test). (B,C) Western blotting analysis (top) and quantification (bottom) of protein expression. (B) BAX expression levels normalized to Bcl2 (n = 3). (C) p-Akt expression levels normalized to Akt levels (n = 4). Mean  $\pm$  SEM, \$P < 0.05, \$\$P < 0.01 between vehicles (Student's t-test).



#### 第4節 考察

本研究において、通常の培養条件下では、mHTTを有するSTHdhQ111細胞と野生型STHdhQ7細胞の間で細胞生存率と死細胞率に明らかな違いは認められなかった。これらの結果は十分な栄養下での培養条件ではmHTTを発現した細胞(STHdhQ111)においても恒常性が維持されることを示唆する。一方、先行研究において血清除去やNMDAなどのストレス条件下では脆弱性を示すことが報告されている[35][36]。本研究においても、3-NPの24時間処置により、いずれの細胞においても細胞生存率の低下、細胞死率の増加が観察され、その程度は先行研究の報告の通り、STHdhQ7細胞よりもSTHdhQ111細胞で有意に高かった[54]。これらの細胞障害は、抗酸化剤であるNACおよびエダラボンによって明らかに抑制された。したがって、STHdhQ111細胞は酸化ストレスに対して、脆弱であることが示唆される。一方、細胞内のROS産生はSTHdhQ7細胞よりもSTHdhQ111細胞において低かったが、3-NPを12時間処置した後のROS産生の増加率はSTHdhQ111細胞で高かった。ROSの増加は抗酸化剤により無処置のControl以下のレベルまで抑制された。これらの結果は、STHdhQ111細胞における代謝活性および抗酸化能の低下を示唆している。一方、ミトコンドリアROSには両細胞間で明らかな違いは認められなかったが、3-NP処置によりSTHdhQ111細胞においてのみミトコンドリアROSが増加し、エダラボンはこの増加を有意に抑制した。エダラボンは、筋萎縮性側索硬化症の治療薬として臨床で使用されている強力なラジカルスカベンジャーであり、HDにも有効であると期待される[55]。一方、予想に反してNACは細胞保護作用と細胞内ROS産生の抑制作用を示したにもかかわらず、ミトコンドリアROS産生を促進した。興味深いことに、NAC(5 mM)とチオール基(-SH)を持つグルタチオンエチルエステル(1~4 mM)はミトコンドリア複合体IIIを活性化し、細胞質内のROSを増

加させずにミトコンドリア ROS を増加させ、その増加はタイロン (ラジカルスカベンジャー) により抑制されることが報告されている[56]。彼らの研究では、NAC によりミトコンドリア ROS は増加したが MMP には影響が認められなかった。これらの結果は、STHdh 細胞死においては、ミトコンドリア ROS の増加よりも複合体 II 活性低下に伴う細胞内 ROS の増加がより重要であり、STHdhQ111 細胞がより感受性が高いことを示唆する。本研究では、STHdhQ111 細胞の MMP は STHdhQ7 細胞よりも約 30% 低く、3-NP を 24 時間処置すると、STHdhQ111 細胞でのみ MMP がさらに低下した。さらに、抗酸化剤は STHdhQ111 細胞の 3-NP による MMP 低下を抑制した。しかし、STHdhQ7 細胞では、抗酸化剤の有無にかかわらず、3-NP 処置後の MMP に明らかな変化は認められなかった。この結果は、STHdhQ111 細胞の MMP が 3-NP (20 mM、48 時間) 処置により有意に減少したが、STHdhQ7 では影響がなかったという先行報告と一致する[57]。これらの結果より、STHdhQ111 細胞の 3-NP に対する脆弱性に MMP の低下が一部関わっていることが示唆された。

Drp1 はミトコンドリア分裂の重要な制御因子であり、その活性はリン酸化、S-ニトロシル化、small ubiquitin-related modifie (SUMO) 化などの翻訳後修飾によって制御されている[58]。HD の原因であるグルタミン鎖が異常に伸長した HTT タンパク質は Drp1 と結合して Drp1 GTPase 活性と自己会合 (self-oligomerization) を促進し、ミトコンドリアの過剰な断片化を引き起こすことにより細胞死を促進することが報告されている[59]。STHdhQ111 細胞においても Drp1 の GTPase 活性が増加し、ミトコンドリアの断片化を促進し[60]、Drp1 阻害剤である Mdivi1 は STHdhQ111 細胞に対して保護作用を有することが報告されている[61]。本研究では、STHdh 細胞間や 3-NP 処置、抗酸化剤の有無に関わらず Drp1 および p-Drp1 タンパク質の発現に明らかな影響は観察されなかった。一方、3-NP

処置により Drp1 の高次オリゴマー (オリゴマー II および III)が増加し、NAC およびエダラボンはこれらの増加を有意に抑制した。以上のことから、ミトコンドリア断片化時の Drp1 オリゴマー化には細胞内 ROS の生成が関与しており、抗酸化剤により抑制されることが示唆された。

本研究において STHdhQ7 細胞と比較して、STHdhQ111 細胞における BAX/Bcl2 比の増加、p-Akt/Akt 比の減少が認められた。しかし、3-NP を処置しない Control 群では、いずれの細胞も死細胞率は低く、両細胞間における明らかな差は認められなかった。さらに、3-NP 処置後の BAX/Bcl2 比にも明らかな変化はなく、抗酸化剤処置によっても明らかな作用は観察されなかった。そこで、caspase-3/7 活性を測定した結果、STHdhQ111 細胞では、STHdhQ7 細胞に比べて caspase-3/7 活性が亢進しており、この結果は、STHdhQ111 細胞では STHdhQ7 細胞に比べて cleaved caspase-3 の増加が認められたという過去の報告と一致していた[62]。さらに、3-NP 処置により STHdhQ111 細胞の caspase-3/7 活性は上昇し、その上昇は両抗酸化剤により有意に抑制された。一方、STHdhQ7 細胞では 3-NP 処置および抗酸化剤により明らかな作用は認められなかった。これらの結果は、mHTT を有する STHdhQ111 細胞における 3-NP 誘発細胞死の一部に、酸化ストレスを介したアポトーシス経路が関与していることを強く示唆する。一方、STHdhQ7 細胞では、3-NP による細胞死は caspase-3 の活性化を伴うアポトーシス細胞死であり、STHdhQ111 細胞では caspase-3 の活性化を伴わない非アポトーシス経路が関与しているという相反する結果も報告されている[47]。これらのことから、アポトーシス/非アポトーシスの両経路が 3-NP による細胞死に関与していることが示唆され、本メカニズムを解明するためには、さらなる検討が必要である。このように、3-NP によって誘導される STHdhQ111 細胞の脆弱性の増加は、BAX/Bcl2 比の増加および p-Akt/Akt 比の減少に起因すると

考えられるが、抗酸化剤による変化が認められないことから、これらの変化には ROS は関与していないことが示唆される。さらに、3-NP 処置により STHdhQ111 細胞では p-Akt/Akt 比が有意に増加し、STHdhQ7 細胞では p-Akt/Akt 比が減少する傾向にあったことから、3-NP 処置は STHdhQ111 細胞では細胞死抑制的に、STHdhQ7 細胞では細胞死促進的に作用していると推察される。一方、これらの変化は抗酸化剤処置の影響を受けなかったことから、mHTT が関与している可能性が示唆される。しかし、mHTT は様々な細胞内因子と結合し、それらの機能異常を誘導することが報告されているが[63][64]、詳細なメカニズムは現在のところ明らかではなく、さらなる研究が必要とされる。

以上のことから、3-NP による STHdh 細胞死に細胞内 ROS の産生と Drp1 のオリゴマー化が関与する可能性が示唆され、抗酸化剤がその細胞死を抑制することを明らかにした。さらに、3-NP による STHdhQ111 細胞死にミトコンドリア機能の低下および caspase 3/7 活性の上昇が関与している可能性が示唆された。しかし、3-NP による ROS 産生の起源や細胞死の機序については十分に明らかにできなかった。そこで第 2 章では、それらの課題についてさらに詳細に検討した。

## 第2章 3-NP 誘発細胞死の機序解明

### 第1節 緒言

細胞死は、プログラム細胞死と非プログラム細胞死に分類される (Table. 1)。プログラムされた細胞死は、制御された細胞内シグナル伝達経路によって引き起こされる。形態的特徴や分子メカニズムから、さらにアポトーシス性細胞死と非アポトーシス性細胞死に分類される。アポトーシスは、アポトーシス小体形成、DNA 断片化、クロマチン凝縮を特徴とし、カスパーゼ依存的に起こる [65][66]。非アポトーシスは、細胞膜の破裂とカスパーゼ非依存的であることを特徴としており、ネクロプトーシスやパイロトーシス、フェロトーシスが含まれる [67]。一方、予期せぬ細胞傷害の結果として起こる偶発的な細胞死は、非プログラム細胞死と呼ばれる。非プログラム細胞死であるネクローシスは、外的要因によって刺激され、細胞の膨張、細胞膜破裂、それに続いて細胞内容物が細胞外へ漏出し、炎症反応が引き起こされる [68]。

**Table 1. Table of cell death classifications.**

細胞死の形式		特徴	
プログラム細胞死	アポトーシス性細胞死	アポトーシス	アポトーシス小体形成、DNA断片化、クロマチン凝縮を特徴とし、カスパーゼ依存的に起こる。
	非アポトーシス性細胞死	ネクロプトーシス	ネクローシス様の細胞死を誘導する。ネクロプトーシスはアポトーシスが抑制された場合に細胞死を実行する。
		パイロトーシス	細胞の膨潤、クロマチンの凝縮、細胞膜のバリア機能の喪失などの特徴を有する炎症誘導性の細胞死。
		フェロトーシス	鉄に依存した細胞死であり、過酸化脂質の蓄積が起きる。
非プログラム細胞死	ネクローシス	外的要因によって刺激され、細胞の膨張、細胞膜破裂、それに続いて細胞内容物が細胞外へ漏出し、炎症反応が引き起こされる。	

フェロトーシスは、2012年に Stockwell らにより報告された新しいタイプの細胞死であり、大量の鉄の蓄積と脂質過酸化を伴う[69]。フェロトーシス誘導因子は、さまざまな経路を介してグルタチオンペルオキシダーゼに直接的または間接的に影響を及ぼし、抗酸化能力の低下と細胞内の脂質活性酸素種 (ROS) の蓄積をもたらし、最終的には酸化細胞死につながる。フェロトーシスによって起こる細胞死は、鉄キレート剤や脂質過酸化の阻害剤によって抑制することができる。最近の研究では、フェロトーシスは、腫瘍、神経系疾患、腎障害、血液疾患など、多くの疾患の病態生理学的プロセスと密接に関連していることが明らかにされている。

第1章において、3-NP 処置により STHdhQ111 細胞が STHdhQ7 細胞と比較して細胞死を促進すること、細胞内 ROS が細胞死誘導に関与することを明らかにした。しかし、その細胞死がアポトーシスあるいは非アポトーシスによるのかを明らかにすることはできなかった。また、主要な細胞内 ROS 産生経路を特定することもできなかった。近年、HD 患者における血漿の脂質過酸化レベルの上昇や R6/2 HD モデルマウス脳における鉄蓄積によってフェロトーシスの関与が示唆されている[70][71][72]。フェロトーシスは、脂質過酸化の増加、鉄イオンの蓄積、鉄関連タンパク質の変化などを含む鉄依存性の細胞死である。さらに、鉄キレート剤である deferoxamine が R6/2HD マウスの運動機能障害や神

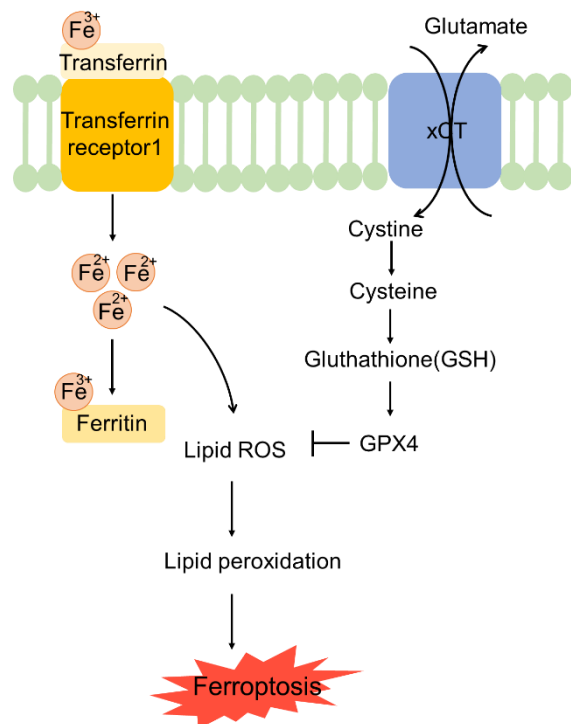


Figure 17. Signaling pathways of ferroptosis.

経学的異常を改善することが報告されている[72]。フェロトーシスは過剰な脂質過酸化を伴うが、そのシグナル伝達やエフェクター分子についての詳細は明らかにされていない。フェロトーシスを制御することによって、病因研究と疾患の発症に介入することが期待されるが、フェロトーシスの分子メカニズムについてさらに明らかにする必要がある。

細胞内 ROS 産生経路として、NOX やミトコンドリアの電子伝達系が考えられる。NOX は、膜貫通型のスーパーオキシド ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) 産生酵素であり、NOX 1-5、および Dual Oxidase 1/2 (Duox1/2) の 7 つが存在する。NOX は、活性化されると、NADPH から膜の反対側にある酸素分子に電子を伝達し、 $\cdot\text{O}_2^-$  を発生させる[73] (Fig. 18)。 $\cdot\text{O}_2^-$  は、他の ROS と結合して、様々な神経疾患を誘発する

可能性がある[74]。HD 関連では、共免疫沈降法によりポリグルタミンタンパク質が NOX2 と結合することが報告されている[75]。

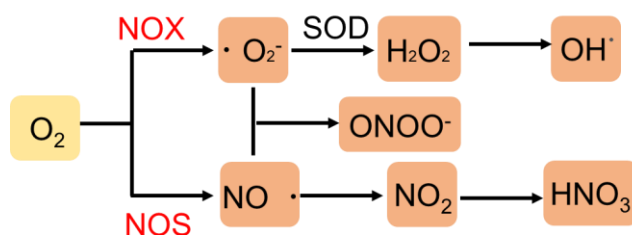


Figure 18. Diagram of ROS production.

本章では、3-NP 誘発 STHdh 細胞死の機序解明を目的としてフェロトーシスおよび NOX の関与について検討した。

## 第2節 実験材料および方法

### 2-1 実験材料

本試験に用いた薬物および試薬は以下の通りである。トリプシン (Trypsin)、Mouse anti- $\beta$ -actin (AC-74) 抗体、Protease inhibitor cocktail、Phosphatase inhibitor cocktailII、III、deferoxamine mesylate、ferrostatin-1、GSK2795039 は Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)、Rabbit anti-Ferritin (EPR3004Y) 抗体は Abcam (Cambridge, UK)、Fetal bovine serum (FBS) は Valeant (Costa Mesa, CA, USA)、ペニシリン (Penicillin)、ストレプトマイシン (Streptomycin) は Meiji Seika (Tokyo, Japan)、Hoechst 33342、Propidium iodide (PI) は Molecular Probes (Eugene, OR, USA)、Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)、Dimethylsulfoxide (DMSO)、Blocking One-P は NacalaiTesque (Kyoto, Japan)、BCA protein assay kit、Peroxidase conected goat anti-rabbit IgG antibody、Peroxidase conected goat anti-mouse antibody、CM-H<sub>2</sub>DCFDA、は Thermo Fisher Scientific Inc. (Franklin, MA, USA)、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、2-メルカプトエタノール含有 4×sample buffer solution、スーパーセップ TM エース (5-20%) は Fujifilm Corporation (Tokyo, Japan)、ImmunoStar<sup>®</sup>LD、N<sup>G</sup>-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME) は Wako (Osaka, Japan)、Immobilon<sup>®</sup>-P PVDF Membrane は Millipore (Bedford, MA, USA)、Can Get Signal 1、2 は TOYOBO Co., Ltd. (Osaka, Japan)、Cell Counting Kit-8、2-(4-Carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide, sodium salt (Carboxy-PTIO) は Dojin Kagaku (Kumamoto, Japan)、Z-VAD-FMK は Toronto Research Chemicals (Toronto, ON, Canada)、Mito-TEMPO、3-NP は Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA) で購入した。



## 2-2 実験方法

### 2-2-1 細胞培養

STHdhQ7 および STHdhQ111 細胞は、Coriell institute for Medical Research (Camden, NJ, USA) より購入した[34]。本細胞はマウス線条体前駆細胞を起源とする細胞で、STHdhQ7 および STHdhQ111 はそれぞれ 7 または 111 個のグルタミンリピートを有するヒト Huntingtin タンパク質を発現している。STHdhQ7 および STHdhQ111 細胞は、10% FBS、100 U/ml ペニシリンおよび 100  $\mu$ g/ml ストレプトマイシンを添加した DMEM を用いて、33°C、5% CO<sub>2</sub> 中にて培養した。3 日ごとに Trypsin を用いて継代操作を行った。

### 2-2-2 細胞生存活性評価

STHdhQ7 および STHdhQ111 細胞を 3,000 cells/well で 96 well プレート (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) に播種し、5% CO<sub>2</sub>、33°C で 24 時間培養した。その後、培地を 3% FBS 含有の DMEM に交換した。この時、ferrostatin-1、GSK2795039、Mito-TEMPO、L-NAME、および Z-VAD-FMK を DMSO に溶解し、1%DMSO を含む PBS で希釈し、それぞれ濃度調製を行いウェルに添加した。Carboxy-PTIO は PBS に溶解し、濃度調製を行いウェルに添加した。また、3-NP を PBS に溶解し、終濃度 5 mM となるよう調製し、上記の試薬と同時に培地に添加した。

その後、試薬添加 24 時間後に Cell Counting Kit-8 を用いて細胞生存活性評価を行った。測定は、CCK-8 試薬添加後 0 時間および 2 時間後に、Varioskan LUX microplate reader を用いて、450/650 nm で行い、添加直後の吸光度の値をバックグラウンドとして引いた値を用いて 定量を行った。

### 2-2-3 細胞死の評価

STHdhQ7 および STHdhQ111 細胞を 96 well plate に播種し、2-2-2 と同様の条件で薬物処置および細胞障害を惹起し、試薬添加 24 時間後、培養細胞に対し Hoechst33342 (終濃度 8.1  $\mu\text{M}$ ) と PI (終濃度 1.5  $\mu\text{M}$ ) を添加することにより核染色を行った。15 分間のインキュベーションの後、Lionheart FX automated microscope (BioTek, Winooski, VT, USA) を用いて画像を撮影した。Gen5 software (BioTek) を用いて PI 陽性細胞数 (死細胞) および Hoechst 33342 陽性細胞数 (生細胞+死細胞) を計測し、Hoechst33342 陽性細胞に対する PI 陽性細胞の比として値を算出した。

### 2-2-4 細胞内活性酸素種評価

細胞内活性酸素種 (過酸化水素、ヒドロキシラジカル、ペルオキシナイトライド) は CM-H<sub>2</sub>DCFDA を用いて評価した。細胞内活性酸素種は、STHdhQ7 および STHdhQ111 細胞を 96 well plate に播種し、2-2-2 と同様の条件で薬物処置および細胞障害を惹起し、24 時間後に終濃度が 1  $\mu\text{M}$  となるように CM-H<sub>2</sub>DCFDA を添加し、33°C、5% CO<sub>2</sub> 中で 60 分間インキュベーションした。定量評価は Varioskan Flash 2.4 microplate reader を用いて 495/527 nm で測定した蛍光輝度を BIOREVO BZ-X710 (Keyence, Osaka, Japan) で撮影した Hoechst 33342 陽性細胞数で補正した値を使用した。

### 2-2-5 ウェスタンブロット解析

#### 2-2-5-1 試料採取

STHdhQ7 および STHdhQ111 細胞を 6 well プレートに  $6 \times 10^4$  cells/well で播種した。培養 24 時間後、培地を 3% FBS 含有の DMEM と交換し、2-2-2 と同様の

条件で薬物処置および細胞障害を惹起し 12 時間インキュベートした。その後、PBS で洗浄を行った後 RIPA buffer (50 mM Tris 溶液 pH 8.0、150 mM NaCl、1.0% Igepal CA-630、0.5% デオキシコール酸ナトリウム、0.1% SDS 含有) 1 ml に対し Protease inhibitor cocktail、Phosphatase inhibitor cocktail II および III をそれぞれ 10  $\mu$ L ずつ混合した試薬を加えて溶解し、マイクロチューブに回収した。その後 30 分間氷上に静置し、4°C、12,000  $\times$ g で 20 分間遠心してから -80°C で保存した。

#### 2-2-5-2 タンパク質定量

タンパク質定量は、BCA protein assay kit を用いて行った。検量線作成のために 0、12.5、25、50、125、250、500、750、1,000、1,500 および 2,000  $\mu$ g/ml の濃度に調製した Bovine serum albumin を用いた。それぞれのタンパク質抽出液は、RIPA buffer で 2 倍に希釈して用いた。BCA protein assay kit の A 液と B 液を製品プロトコールに従って混合した Working reagent をサンプルに添加し、37°C のインキュベーター中で 30 分間反応させ、その後 532 nm の吸光度を Varioskan LUX microplate reader を用いて測定した。タンパク質濃度は Sample Buffer Solution (2-メルカプトエタノール含有) ( $\times$ 4) および RIPA buffer を用いて調製し、100°C で 5 分間煮沸処理し、-80°C に保存した。

#### 2-2-5-3 電気泳動および転写

スーパーセップ TM エース (5-20%) を泳動装置にセットし、Running buffer で容器内を満たした。1 well あたりの添加量は分子量マーカー 4  $\mu$ l、各サンプル 10  $\mu$ l とした。サンプル添加後、ゲル 1 枚あたり 20 mA で 90 分間電気泳動した。泳動後、ゲルを Cathode buffer (25 mM Tris、40 mM 6-Amino hexanoic acid) に 15 分間浸漬した。転写膜はメタノールに 30 秒間浸漬し、超純水に 15 分間浸漬し

た。その後、Anode buffer 2 (25 mM Tris) に 15 分間浸漬した。陽極側から、Anode buffer 1 (0.3 M Tris) に浸したろ紙、Anode buffer 2 に浸したろ紙、転写膜、ゲル、2 枚の Cathode buffer に浸したろ紙の順に重ね、膜 1 枚当たり 100 mA で 45 分間転写した。

#### 2-2-5-4 ウェスタンプロットティング

転写後、0.05% Tween 20 含有 50 mM TBS (T-TBS: 10 mM tris、40 mM Tris hydrochloride、15 mM NaCl) で洗浄し、Block One-P に浸して、30 分間ブロッキングした。その後 T-TBS で 5 分間、3 回洗浄し、Can get signal solution 1 で 1000 倍希釈した一次抗体に浸し、低温で一晩振とうした。その後再び T-TBS で 5 分間、3 回洗浄し Can get signal solution 2 で 1000 倍希釈した二次抗体に浸し、室温で 1 時間振とうした。T-TBS で 5 分間、3 回洗浄した後、ImmunoStar®LD に 5 分浸した。その後、Amersham Imager 680 (Cytiva, Marlborough, MA, USA) および Amersham Imager 680 Analysis Software (Cytiva) を用いて検出、解析を行った。一次抗体には、Rabbit anti ferritin (EPR3004Y) (1/1,000)、Mouse anti  $\beta$ -actin (AC-74) (1/2,000) を、二次抗体には、Peroxidase conected goat anti-rabbit IgG (1:1,000)、Peroxidase conected goat anti-mouse (1/1,000) を用いた。

#### 2-2-6 統計学的解析

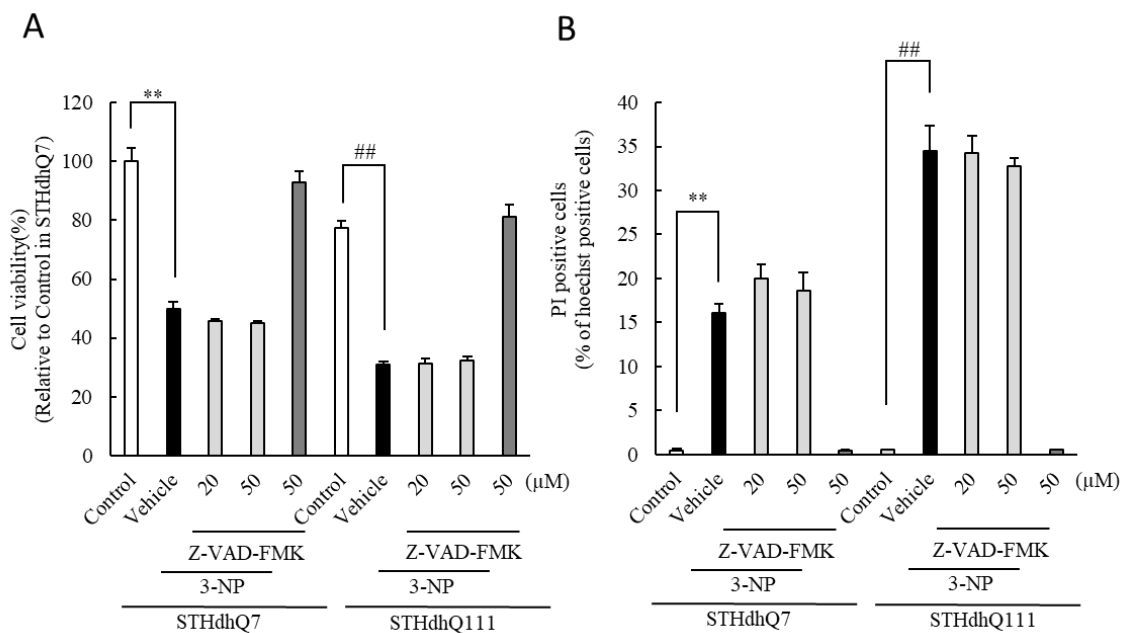
統計学的な比較は、Statistical Package for the Social Science 15.0 J for Windows software (エス・ピー・エス・エス株式会社、Tokyo, Japan) を用いて行った。多群間の比較は、One-way analysis of variance (ANOVA) 後に Tukey's test を行った。実験結果は平均値  $\pm$  標準誤差で表し、危険率 5%未満を有意とした。

### 第3節 実験成績

#### 3-1 3-NP 誘発細胞死に対する caspase 阻害剤の効果

第1章において、3-NP 処置により STHdhQ111 細胞では caspase-3/7 活性が増加したが、STHdhQ7 細胞では変化が認められなかった。まず 3-NP 処置による細胞死に caspase 依存性の経路が関わっているかを明らかにするために、pan-caspase 阻害剤である Z-VAD-FMK の作用を検討した。

3-NP 処置により細胞生存率の低下および死細胞率の増加が認められたが、Z-VAD-FMK (20 $\mu$ M および 50 $\mu$ M) は、これらを抑制しなかった (Fig. 19A, B)。したがって、3-NP 誘発細胞死は caspase 非依存的な経路を介することが示唆された。

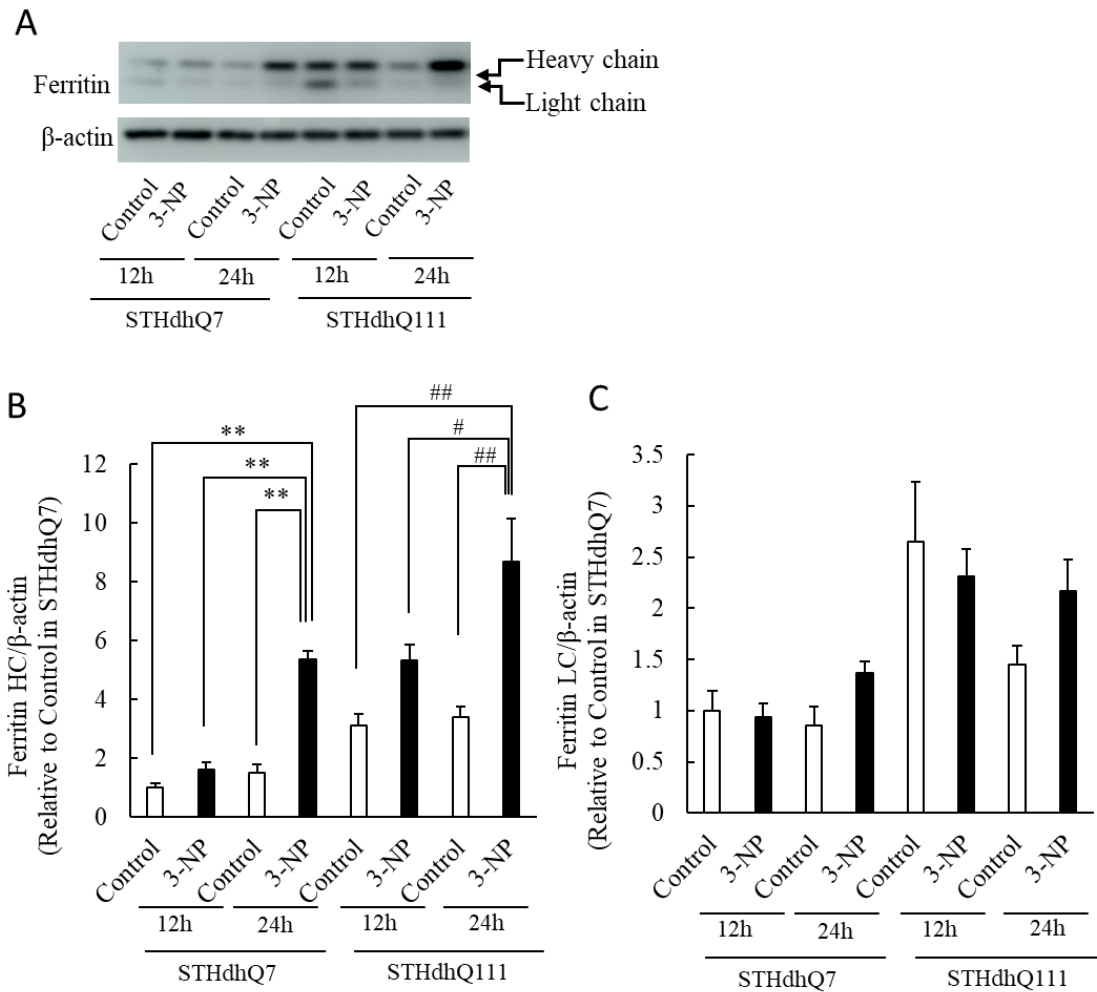


**Figure 19. Z-VAD-FMK failed to suppress 3-NP-induced cell damage in both STHdh cells with or without mutant HTT**

(A, B) The percentages of cell viability (A) and cell death (B) after co-treatment with 3-NP and Z-VAD-FMK (an irreversible pan-caspase inhibitor) in STHdhQ7 and STHdhQ111 for 24 h. The values are expressed as the mean  $\pm$  SEM (n = 6). \*\*p < 0.01 vs. vehicle plus 3-NP in STHdhQ7, and ##p < 0.01 vs. vehicle plus 3-NP in STHdhQ111.

### 3-2 3-NP によるフェリチン発現レベルの変化

次に、caspase 非依存経路を介する ROS 誘発による STHdh 細胞死がフェロトキシス経路が関与しているかどうかについて検討した。まず、鉄蓄積のマーカであるフェリチンの発現をウェスタンブロッティングにより検討した (Fig. 20)。通常の培養条件 (Control) 下において、フェリチンの発現は STHdhQ7 細胞と比較して STHdhQ111 細胞において高い傾向を示し、3-NP 処置により両細胞においてフェリチン重鎖の発現が増加した (Fig. 20A-C)。一方、フェリチン軽鎖の発現量には 3-NP 処置による明らかな違いは認められなかった (Fig. 20C)。



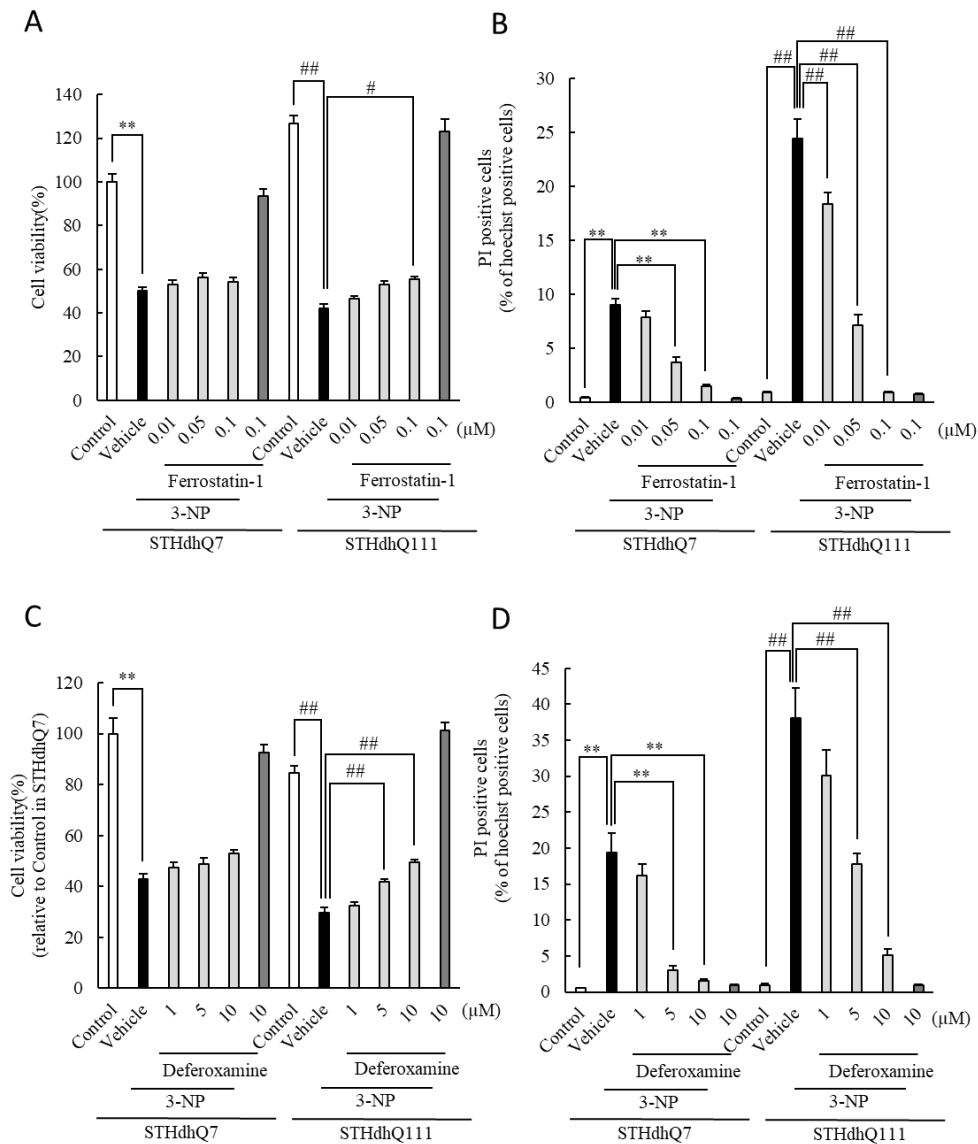
**Figure 20. Ferritin levels were increased in STHdh cells with mutant HTT, and 3-NP treatment induced ferritin heavy chain in both STHdh cells with or without mutant HTT**

(A–C) Immunoblot analysis and quantification of ferritin expression. SDS-PAGE was conducted, followed by immunoblotting. (A) Representative band images by immunoblotting on SDS-PAGE. (B) Ferritin heavy chain (HC) levels normalized to β-actin. (C) Ferritin light chain (LC) levels normalized to β-actin. The values are expressed as the mean ± SEM (n = 12), \*\*p < 0.01 vs. control or 3-NP in STHdhQ7, and #p < 0.05, ##p < 0.01 vs. vehicle plus 3-NP in STHdhQ111.

### 3-3 3-NP 誘発細胞死に対するフェロトーシス阻害剤および鉄キレート剤の効果

フェロトーシス阻害剤である *ferrostatin-1* は、3-NP による両細胞における細胞生存率の低下および死細胞率の増加を濃度依存的に抑制した (Fig. 21A, B)。さらに、鉄キレート剤である *deferoxamine* も、3-NP による細胞生存率の低下および死細胞率の増加を抑制した (Fig. 21C, D)。これらの結果は、3-NP による細胞死には、遊離鉄を介した脂質過酸化によるフェロトーシスが関与していることを示唆している。



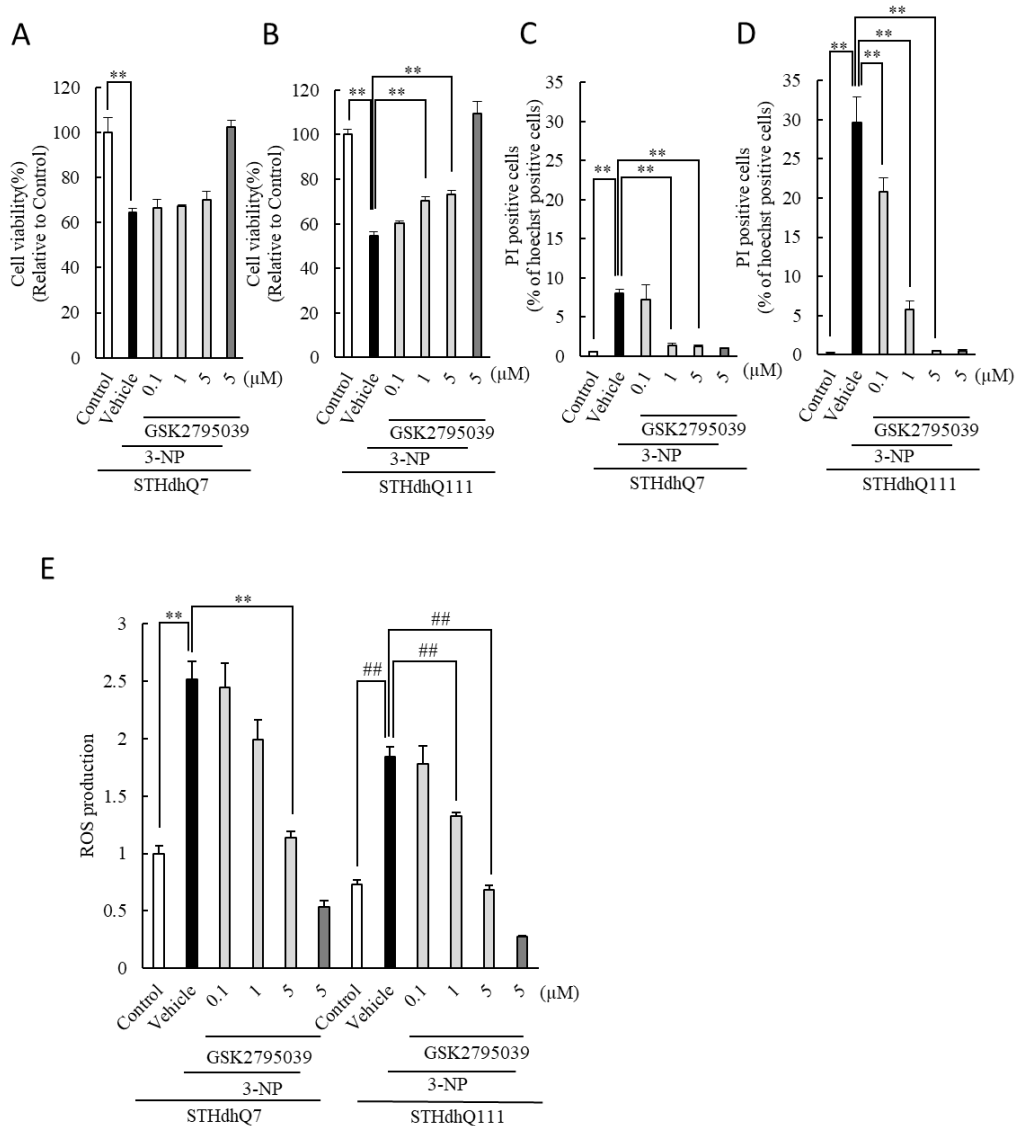


**Figure 21. Protective effects of ferrostatin-1 and deferoxamine on 3-NP-induced cell damage in both STHdh cells with or without mutant HTT**

(A, B) The percentages of cell viability (A) and cell death (B) after co-treatment with 3-NP and ferrostatin-1 in STHdhQ7 and STHdhQ111 for 24 h. (C, D) The percentages of cell viability (C) and cell death (D) after co-treatment with 3-NP and deferoxamine in STHdhQ7 and STHdhQ111 for 24 h. The values are expressed as the mean  $\pm$  SEM (n = 6). \*\*p < 0.01 vs. vehicle plus 3-NP in STHdhQ7, and ##p < 0.01 vs. vehicle plus 3-NP in STHdhQ111.

### 3-4 3-NP 誘発細胞死に対する NOX2 阻害剤の効果

1 章において、3-NP による線条体細胞死にはミトコンドリア ROS よりも細胞内 ROS 産生が寄与していることを示した。そこで、ROS 産生酵素である NOX が細胞死に関与しているか明らかにするために、NOX2 阻害剤である GSK2795039 の作用を検討した。GSK2795039 は、STHdhQ111 細胞における 3-NP による細胞生存率の低下を有意に抑制し、STHdhQ7 細胞も抑制傾向を示した (Fig. 22A, B)。死細胞率の増加は両細胞で有意に抑制された (Fig. 22C, D)。次に、3-NP による細胞内 ROS 産生増加に対する NOX2 阻害剤の作用について検討した (Fig. 22E)。3-NP を 24 時間処置すると、両細胞で細胞内 ROS の産生が有意に増加し、GSK2795039 は、その増加を濃度依存的に抑制した (Fig. 22E)。これらの結果から、3-NP による細胞死には NOX2 を介した細胞内のスーパーオキシド ( $\cdot\text{O}_2$ ) の産生が関与していることが示唆された。

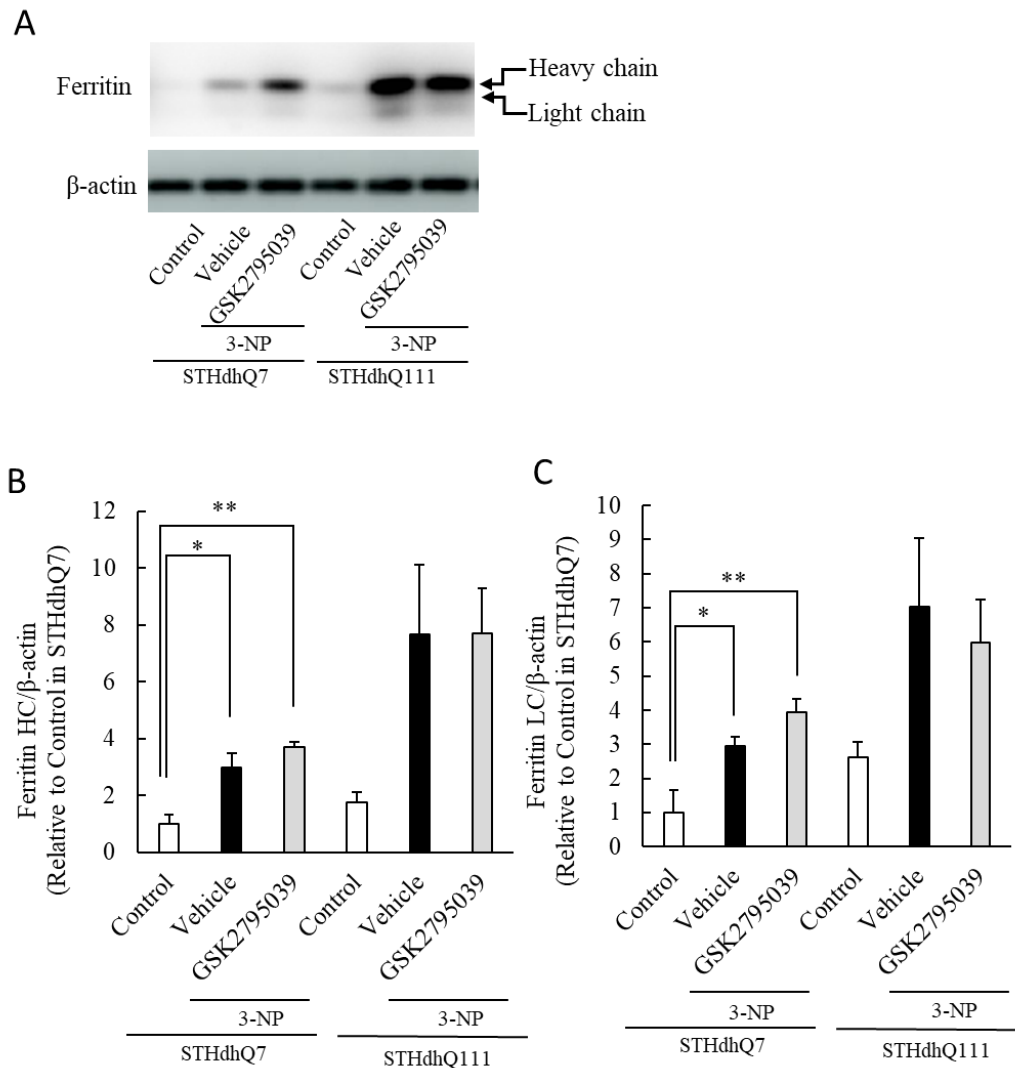


**Figure 22. Effective effects of GSK2795039, a NOX2 inhibitor, on 3-NP-induced cell damage and intracellular ROS production in both STHdh cells with or without mutant HTT**

(A, C) The percentages of cell viability (A) and cell death (C) after co-treatment with 3-NP and GSK2795039 (an inhibitor of NOX2) in STHdhQ7 for 24 h. (B, D) The percentages of cell viability (B) and cell death (D) after co-treatment with 3-NP and GSK2795039 in STHdhQ111 for 24 h. (E) The ROS production (E) rate after co-treatment with 3-NP (5 mM) and GSK2795039 in STHdhQ7 and STHdhQ111 for 24 h. \*\* $p < 0.01$  vs. vehicle plus 3-NP in STHdhQ7, and ## $p < 0.01$  vs. vehicle plus 3-NP in STHdhQ111.

### 3-5 3-NPによるフェリチン増加に対する NOX2 阻害剤の効果

鉄蓄積のマーカーであるフェリチンに対する NOX2 阻害剤の影響を検討した (Fig. 23)。3-NP は、両細胞においてフェリチン重鎖および軽鎖の発現を増加させた (Fig. 23A-C)。しかしながら、GSK 2795039 (5  $\mu$ M) は、いずれの細胞でも 3-NP によるフェリチン重鎖および軽鎖の発現増加に影響を与えなかった (Fig. 23B, C)。これらの結果は、3-NP による NOX2 を介した ROS の産生は、鉄の蓄積に直接関与していないことを示唆している。

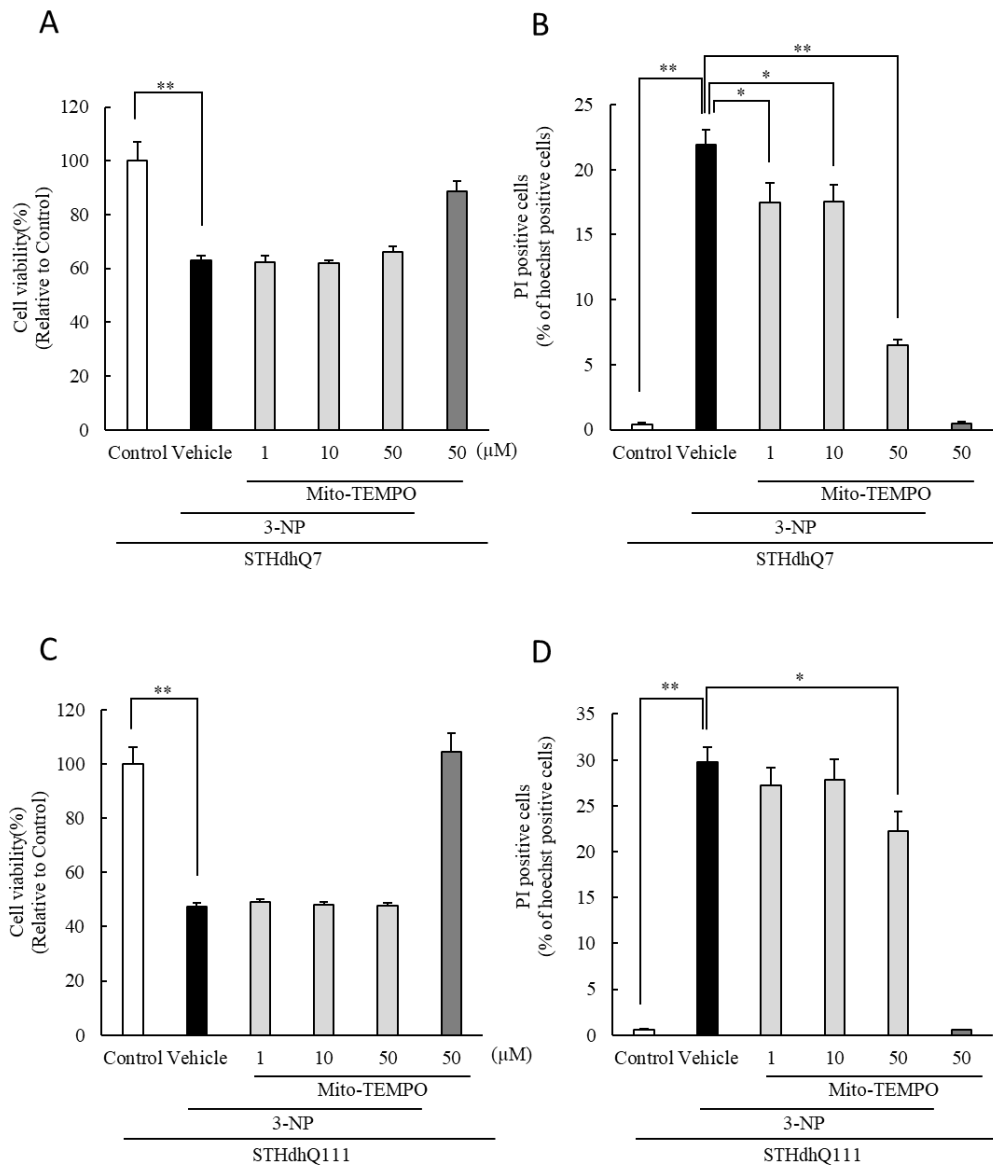


**Figure 23. Effects of GSK2795039, a NOX2 inhibitor, on 3-NP-induced ferritin expression in both STHdh cells with or without mutant HTT**

(A–C) Immunoblot analysis and quantification of ferritin expression. SDS-PAGE was conducted, followed by immunoblotting. (A) Representative band images by immunoblotting on SDS-PAGE. (B) Ferritin heavy chain (HC) levels normalized to β-actin. (C) Ferritin light chain (LC) levels normalized to β-actin. The values are expressed as the mean ± SEM (n = 4), \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 vs. Control in STHdhQ7.

### 3-6 3-NP 誘発細胞死に対する Mito-TEMPO の効果

NOX の活性化とミトコンドリア ROS 産生には様々なクロストークが存在することが知られている[76]。そこで、3-NP 誘発細胞死におけるミトコンドリア ROS の関与を調べるために、ミトコンドリア標的 superoxide dismutase (SOD) 模倣剤である Mito-TEMPO の作用について検討した。Mito-TEMPO は、3-NP による死細胞率の増加に対して STHdhQ7 細胞においては濃度依存的な抑制効果を示したが、STHdhQ111 細胞では抑制効果を示したのは 50  $\mu\text{M}$  のみであった (Fig. 24B,D)。一方、3-NP による両細胞の細胞生存率の低下に対する明らかな作用は認められなかった (Fig. 24A,C)。



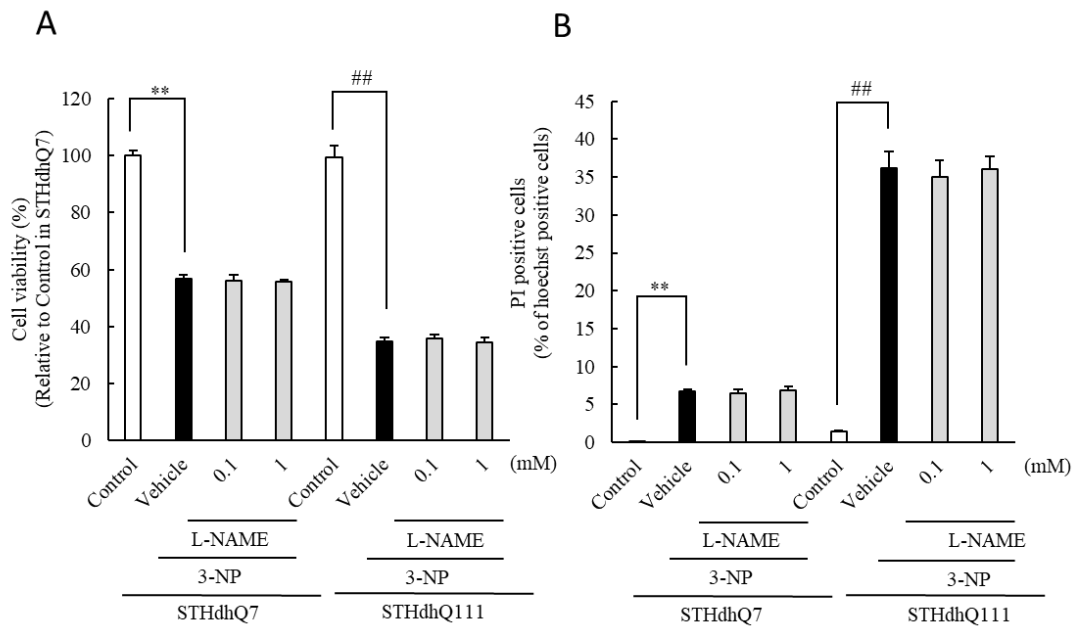
**Figure 24. A mitochondria-targeted superoxide dismutase mimetic, Mito-TEMPO, partially ameliorated 3-NP-induced cell damage in both STHdh cells with or without mutant HTT**

(A, B) The percentages of cell viability (A) and cell death (B) after co-treatment with 3-NP and Mito-TEMPO in STHdhQ7 for 24 h. (C, D) The percentages of cell viability (C) and cell death (D) after co-treatment with 3-NP and Mito-TEMPO in STHdhQ111 for 24 h. The values are expressed as the mean  $\pm$  SEM (n = 6). \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 vs. vehicle plus 3-NP.

### 3-7 3-NP 誘発細胞死に対する NOS 阻害剤の効果

ラットへ 3-NP を投与すると HD 様の症状を示し、NOS を介した NO 産生が HD に関与していることが報告されている[77][78]。そこで、NOS 阻害剤である L-NAME の作用を検討した。3-NP による細胞生存率の低下および死細胞率の増加に対する L-NAME (0.1 mM、1 mM) の明らかな抑制作用は認められなかった (Fig. 25A, B)。したがって、NOS による内因性の NO 合成は 3-NP による STHdh 細胞死に関与していないことが示唆された。



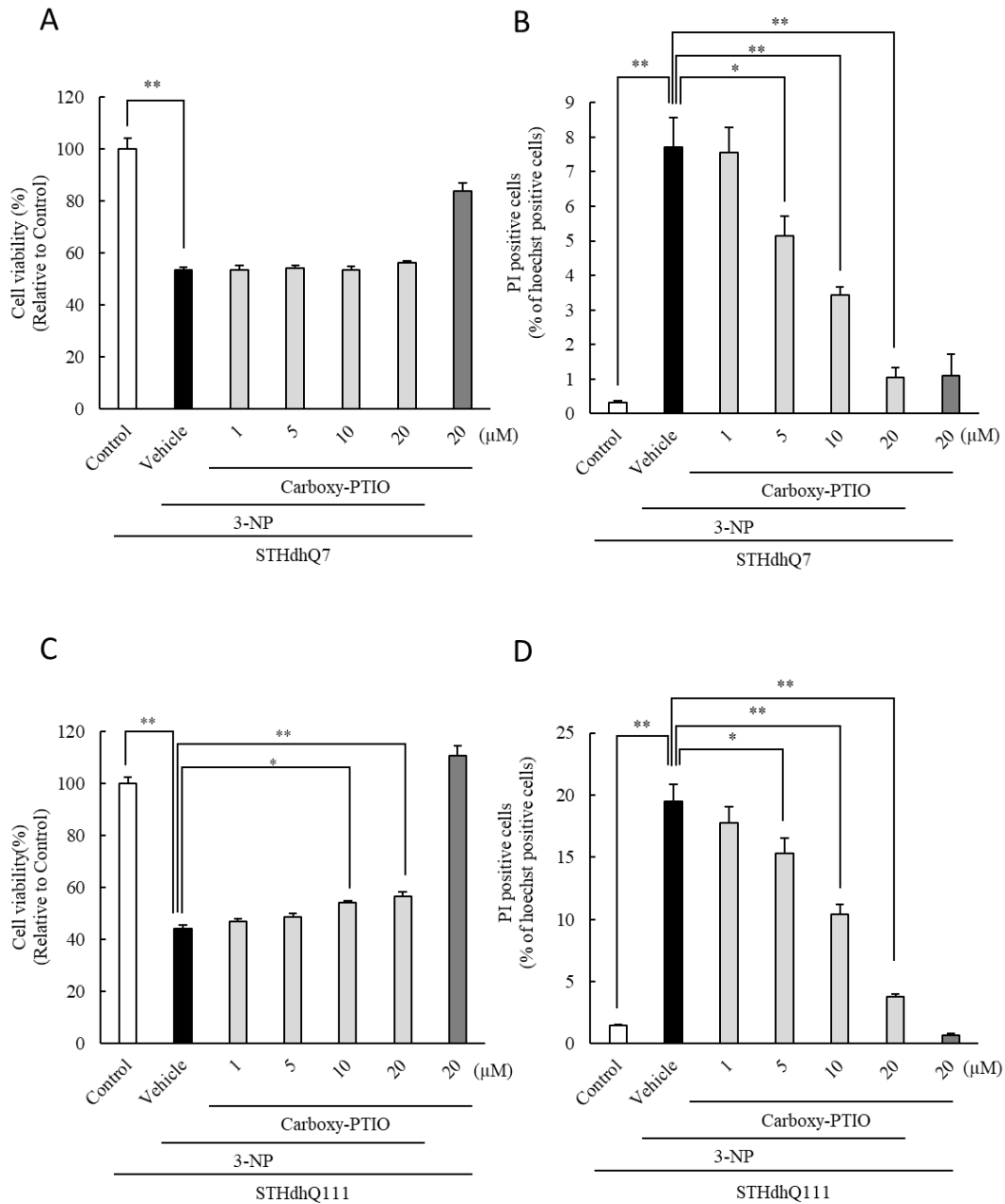


**Figure 25. A NOS inhibitor, L-NAME, failed to inhibit 3-NP-induced cell damage in both STHdh cells with or without mutant HTT**

(A, B) The percentages of cell viability (A) and cell death (B) after co-treatment with 3-NP and L-NAME (a non-selective NOS inhibitor) in STHdhQ7 and STHdhQ111 for 24 h. The values are expressed as the mean  $\pm$  SEM (n = 6). \*\*p < 0.01 vs. vehicle plus 3-NP in STHdhQ7, and ##p < 0.01 vs. vehicle plus 3-NP in STHdhQ111.

### 3-8 3-NP 誘発細胞死に対する NO 消去剤の効果

3-NP は直接 NO を生成し、神経細胞毒性を誘発することが報告されている [77]。そこで、NO 消去剤である Carboxy-PTIO を用いて検討を行った。Carboxy-PTIO は、STHdhQ111 細胞において細胞生存率の低下を有意に抑制したが、STHdhQ7 細胞では明らかな作用は認められなかった (Fig. 26A,C)。また、Carboxy-PTIO は STHdh の両細胞において 3-NP による死細胞率の増加を濃度依存的に抑制した (Fig. 26B,D)。NO 消去剤である Carboxy-PTIO が細胞生存率の低下および死細胞率の増加を抑制したことから、NO が細胞特性に関わっており、3-NP が直接的な NO ドナーとして寄与していることを示唆している。



**Figure 26. A nitric oxide scavenger, Carboxy-PTIO, ameliorated 3-NP-induced cell damage in both STHdh cells with or without mutant HTT**

(A, B) The percentages of cell viability (A) and cell death (B) after co-treatment with 3-NP and Carboxy-PTIO in STHdhQ7 for 24 h. (C, D) The percentages of cell viability (C) and cell death (D) after co-treatment with 3-NP and Carboxy-PTIO in STHdhQ111 for 24 h. The values are expressed as the mean  $\pm$  SEM (n = 6). \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 vs. vehicle plus 3-NP.

#### 第4節 考察

第1章では、mHTTを持つSTHdhQ111細胞は野生型STHdhQ7細胞よりも3-NPに対して脆弱であり、その細胞死に細胞内ROS産生が関与していることを明らかにした。STHdhQ111細胞では、通常の培養条件下でSTHdhQ7細胞と比較して細胞生存活性や死細胞率に明らかな差は認められなかったが、BAX/Bcl2比の上昇とp-Akt/t-Akt比の減少が認められた。さらに、3-NP処置によりSTHdhQ111細胞ではアポトーシスの実行caspaseであるcaspase-3/7活性を増加させ、抗酸化剤はその活性増加を有意に抑制した。これらの結果は、3-NP処置により、STHdhQ111細胞でのみcaspase-3/7が活性化されたが、両細胞でcaspase非依存的経路の関与も示唆された。そこで、第2章では、まずpan-caspase阻害剤(Z-VAD-FMK)の3-NPによる細胞障害に対する作用について検討した。Z-VAD-FMKは、両細胞において3-NPによる細胞生存活性の減少、死細胞率の増加に明らかな作用を示さなかった。これらの結果から、3-NP誘発細胞死はcaspase非依存的経路を介して細胞死を誘導していることが示唆された。

HD患者では、ROS産生、脂質過酸化、鉄イオンの増加が報告されている[70][71]。R6/2 HDモデルマウスでも同様のROS産生、脂質過酸化、鉄関連タンパク質の変化が報告されている[72]。さらに、鉄キレート剤であるdeferoxamineはR6/2 HDマウスの運動機能障害、神経障害を改善する[72]。これらの知見は、HD発症における細胞死にフェロトーシスが関与していることを示唆している。本研究において、通常の培養条件下では鉄蓄積のマーカであるフェリチンは、STHdhQ7に比べてSTHdhQ111で発現量が高い傾向が認められた。さらに、3-NPにより両細胞においてフェリチン重鎖の発現量の増加が誘導された。加えて、フェロトーシス阻害剤であるferrostatin-1および鉄キレート剤であるdeferoxamineが、3-NPによる死細胞率の増加を有意に抑制したことか

ら、3-NP による細胞死はフェロトーシスと関連していることが強く示唆された。さらに、別のミトコンドリア複合体 II 選択的阻害剤である atpenin a5 処置においても STHdhQ111 細胞に対して細胞死が誘導され、ferrostatin-1 はそれを有意に抑制した (未発表データ)。R6/2 HD マウスモデルでは、線条体への鉄の蓄積、鉄調節タンパク質 (IRP-1/2) の減少および鉄排出機能を有するフェロポーチンの増加が報告されている[72]。細胞内鉄量が少ない場合、IRP はフェリチン軽鎖、フェリチン重鎖、フェロポーチンなどの鉄関連因子の mRNA 非翻訳領域の 5'UTR にある IRE (iron responsive element) に結合してその翻訳を抑制する。一方、フェロポーチンおよびフェリチンは、細胞内鉄の増加による IRP の不活性化・分解によって増加する。したがって、STHdhQ111 細胞では鉄蓄積を介してフェリチンが増加したと考えられる。また、エラスチンやソラフェニブなどのフェロトーシス誘導剤は、抗酸化関連因子およびフェリチン重鎖の発現を抑制している p62-Keap1-NRF2 経路を活性化することが報告されている[79]。また、STHdhQ111 細胞は NRF2 によって制御される抗酸化剤応答配列 (ARE) 活性が低下していることも報告されている[80]。これらのことから、STHdhQ111 細胞では恒常的に鉄蓄積が亢進しており、3-NP 処置による酸化ストレスに対して脆弱であることが示唆された。

ROS は、フェロトーシスの上流イニシエーターであるが、その主な発生源としてはミトコンドリア ROS や NOX ファミリーの関与が考えられる。そこで、3-NP 細胞死における NOX の関与を検討したところ、NOX2 選択的阻害剤である GSK2795039 は 3-NP 誘発細胞死を有意に抑制した。NOX1/4 阻害剤である GKT137831 (IC<sub>50</sub> : 140 nM(NOX1)、110 nM(NOX4)、1,750 nM(NOX2)) では、1 μM の濃度において明らかな抑制作用は認められなかった (未発表データ)。一方、3-NP によるフェリチン発現量の増加は、GSK2795039 では明らかな抑制作用は

示さなかった。これらの結果は、NOX2 活性化による ROS 産生は、フェリチンを誘導する鉄蓄積そのものには関与せず、その下流の脂質過酸化に寄与していることを示唆している。さらに、3-NP による細胞内 ROS 産生の増加を GSK2795039 は濃度依存的に抑制した。一方、ミトコンドリア ROS の阻害剤である Mito-TEMPO は、高濃度 (50 $\mu$ M) で細胞死を部分的に抑制した。これらの結果から、3-NP による細胞死は NOX2 を介した  $\cdot O_2^-$  産生が主要なメディエーターであり、ミトコンドリア由来の  $\cdot O_2^-$  が一部関与していることが示唆された。

3-NP はラットに HD 様症状を誘発し、その発症に NOS を介した NO 産生の関与が示唆されている[77][78]。本研究では、NOS 阻害剤である L-NAME は 3-NP 誘発細胞死に対して明らかな作用を示さず、STHdh 細胞には内因性 NO の関与はないことが示唆された。一方、NO 消去剤である carboxy-PTIO は、いずれの細胞株においても濃度依存的に 3-NP 誘発細胞死を抑制した。3-NP は、神経細胞毒性の供与体として直接 NO を生成することが報告されている[77]。これらの結果から、3-NP は一部直接的な NO ドナーとして寄与し、 $\cdot O_2^-$  との反応生成物であるペルオキシナイトライト (ONOO $^-$ )、チロシン残基へのニトロ化またはチオール基へのニトロシル化が細胞死に関与していることが示唆される。しかし、これらのメカニズムを解明するためには、さらなる研究が今後必要である。

以上のことから、本章では STHdhQ7 細胞に対する STHdhQ111 細胞の 3-NP 誘発細胞死の脆弱性のメカニズムを十分に解明することはできなかったが、STHdh 細胞における 3-NP 誘発細胞死はカスパーゼ非依存的であり、主に NOX2 活性化並びに鉄を介してフェロトーシスが誘導されることを明らかにした (Fig. 25)。また、ミトコンドリア由来の  $\cdot O_2^-$  が細胞死に一部関与していることが明らかになった。さらに、STHdhQ7 細胞と比較して STHdhQ111 細胞において鉄

蓄積マーカーであるフェリチンの発現量が亢進していたことから、STHdhQ111細胞は酸化ストレスに対してフェロトーシスが誘導されやすい可能性が示唆される。

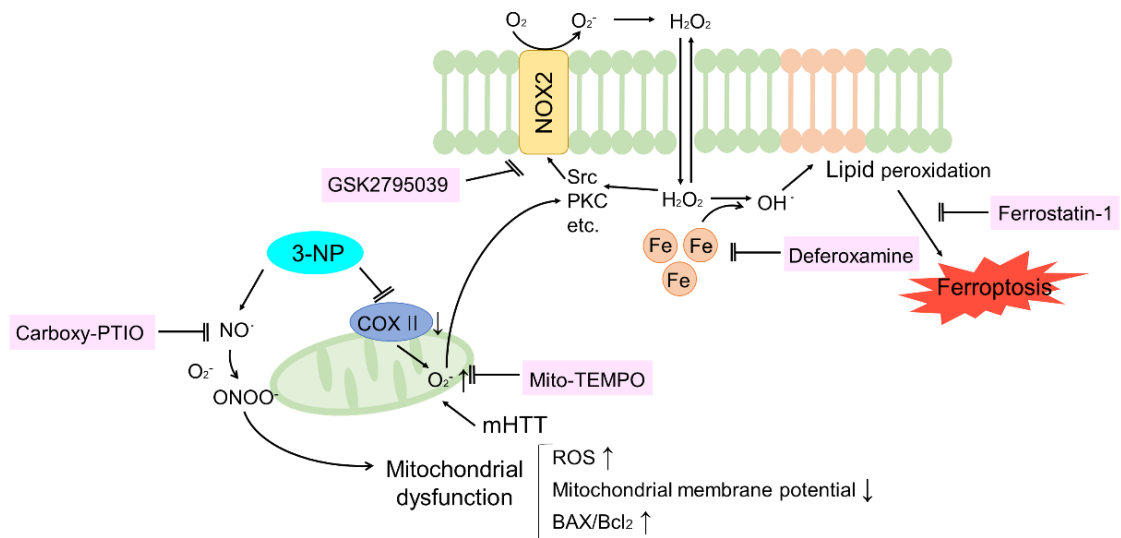


Figure 27. Schematic diagram of 3-NP-induced cell death in the STHdhQ111 cells

## 総括および結論

HD は、HTT 遺伝子の CAG リピート伸長によって引き起こされる常染色体優性遺伝性の進行性神経変性疾患である。健常人における 16-20 CAG リピートと比較して、HD 患者は 36 以上の CAG リピートを有する。その結果、HD 患者では長鎖ポリグルタミンを有する mHTT が産生する。mHTT は、ミスフォールディングにより凝集体を形成し、線条体ニューロンおよび大脳皮質ニューロンの細胞死を引き起こす。

HD 様症状を引き起こす 3-NP による神経細胞死について、ハンチントン病モデル細胞である STHdhQ111 細胞とコントロール細胞である STHdhQ7 細胞を用いて比較検討を行った。

第 1 章では、マウス線条体由来前駆細胞株 (STHdh 細胞) に対する 3-NP 誘発ミトコンドリア機能障害と細胞死に対する ROS の関与について検討した。

1. STHdhQ111 細胞は、STHdhQ7 細胞と比較して 3-NP による細胞死に対して脆弱性を示した。
2. 3-NP 誘発細胞死に対して、抗酸化剤である NAC およびエダラボンは細胞保護作用を示した。
3. STHdhQ111 細胞の細胞内 ROS は STHdhQ7 細胞と比較して低下していたが、3-NP により同レベル以上に増加した。
4. ミトコンドリア ROS には両細胞間で明らかな違いは認められなかったが、3-NP 処置により STHdhQ111 細胞においてのみミトコンドリア ROS が増加した。
5. STHdhQ111 細胞の MMP は STHdhQ7 細胞よりも低く、3-NP 処置により STHdhQ111 細胞でのみ MMP がさらに低下した。



6. 3-NP 処置により両細胞で Drp1 のオリゴマー発現が増加し、その増加は NAC およびエダラボンにより抑制された。
7. STHdhQ111 細胞の caspase-3/7 活性は STHdhQ7 細胞に比べて亢進していた。  
3-NP 処置により STHdhQ111 細胞のみ caspase-3/7 活性はさらに増加し、その増加は NAC およびエダラボンにより抑制された。
8. 通常の培養条件下において、STHdhQ111 細胞は STHdhQ7 細胞と比べて Bax/Bcl 2 比が上昇、p Akt/Akt 比が減少していた。3-NP および抗酸化剤は Bax/Bcl 2 比に対して明らかな作用を示さなかった。3-NP は STHdhQ111 細胞においてのみ Akt のリン酸化を増加させたが、抗酸化剤による明らかな作用は認められなかった

第 2 章では、3-NP 誘発線条体細胞死に対するフェルトーシスおよび NOX の関与について検討した。

1. Pan-caspase 阻害剤 (Z-VAD-FMK) は、両細胞において 3-NP 誘発細胞死を抑制しなかった。
2. 通常の培養条件下において、鉄蓄積マーカーであるフェリチン軽鎖および重鎖の発現レベルは、STHdhQ7 細胞と比較して STHdhQ111 細胞において増加していた。
3. 3-NP 処置により両細胞においてフェリチン重鎖が増加した。また、フェルトーシス阻害剤は 3-NP 誘発線条体細胞死を抑制した。
4. NOX2 阻害剤は、両細胞において 3-NP 誘発細胞死および細胞内 ROS 産生を抑制した。一方、NOX2 阻害剤はフェリチン軽鎖および重鎖の発現レベルに明らかな作用を示さなかった。
5. NOS 阻害剤は、両細胞において 3-NP 誘発細胞死を抑制しなかったが、NO 消

去剤である Carboxy-PTIO は 3-NP 誘発細胞死を抑制した。

本研究では、3-NP による STHdh 細胞死に NOX2 活性化による細胞内 ROS 産生および鉄依存性の細胞死であるフェロトーシスが関与していることを明らかにした。さらに、mHTT を有する STHdhQ111 細胞は 3-NP に対する脆弱性を有し、その機序としてミトコンドリア膜電位の低下および細胞内鉄蓄積が関与している可能性を明らかにした。これらの研究成果は、HD 様の症状を誘発する 3-NP による神経細胞死および mHTT を有する神経細胞における病態発症メカニズムの一部を明らかにし、ハンチントン病の発症メカニズムを理解することに寄与するものである。

## 謝辞

本稿を終えるに臨み、本研究の遂行にあたり終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました恩師 岐阜薬科大学 生体機能解析学大講座 薬効解析学研究室教授 嶋澤雅光博士に深甚なる謝意を表します。

本研究に際して終始御懇切なる御指導並びに御助言を賜りました岐阜薬科大学 生体機能解析学大講座 薬効解析学研究室前教授 原英彰博士、准教授 中村信介博士、岐阜薬科大学 バイオメディカルリサーチ寄附講座特任講師 大津航博士に深謝致します。また、諸種の御協力と御助言を頂きました 岐阜薬科大学 生体機能解析学大講座 薬効解析学研究室諸氏に心より感謝の意を表します。

本論文の審査にあたり、有益なご助言を賜りました岐阜薬科大学医療薬剤学大講座薬物治療学研究室教授 位田雅俊博士、岐阜薬科大学グリーンファーマシー教育推進センター教授 松永俊之博士並びに岐阜薬科大学生命薬学大講座感染制御学研究室講師 高橋圭太博士に深謝致します。

## 引用文献

- [1] C. Soto and S. Pritzkow, “Protein misfolding, aggregation, and conformational strains in neurodegenerative diseases,” *Nat. Neurosci.*, vol. 21, no. 10, p. 1332, Oct. 2018, doi: 10.1038/S41593-018-0235-9.
- [2] H. C. Fan *et al.*, “Polyglutamine (PolyQ) Diseases: Genetics to Treatments,” <http://dx.doi.org/10.3727/096368914X678454>, vol. 23, no. 4–5, pp. 441–458, May 2014, doi: 10.3727/096368914X678454.
- [3] A. R. La Spada and J. P. Taylor, “Polyglutamines Placed into Context,” *Neuron*, vol. 38, no. 5, pp. 681–684, Jun. 2003, doi: 10.1016/S0896-6273(03)00328-3.
- [4] J. R. Gatchel and H. Y. Zoghbi, “Diseases of Unstable Repeat Expansion: Mechanisms and Common Principles,” *Nat. Rev. Genet. 2005 610*, vol. 6, no. 10, pp. 743–755, Oct. 2005, doi: 10.1038/nrg1691.
- [5] A. Wexler, E. J. Wild, and S. J. Tabrizi, “George Huntington: a legacy of inquiry, empathy and hope,” *Brain*, vol. 139, no. 8, pp. 2326–2333, Aug. 2016, doi: 10.1093/BRAIN/AWW165.
- [6] M. E. MacDonald *et al.*, “A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington’s disease chromosomes,” *Cell*, vol. 72, no. 6, pp. 971–983, Mar. 1993, doi: 10.1016/0092-8674(93)90585-E.
- [7] L. Mangiarini *et al.*, “Exon 1 of the HD Gene with an Expanded CAG Repeat Is Sufficient to Cause a Progressive Neurological Phenotype in Transgenic Mice,” *Cell*, vol. 87, no. 3, pp. 493–506, Nov. 1996, doi: 10.1016/S0092-8674(00)81369-0.
- [8] D. E. Ehrnhoefer, S. L. Butland, M. A. Pouladi, and M. R. Hayden, “Mouse models of Huntington disease: variations on a theme,” *Dis. Model. Mech.*, vol. 2, no. 3–4,

- p. 123, Mar. 2009, doi: 10.1242/DMM.002451.
- [9] J. F. Gusella and M. E. MacDonald, “Huntington’s disease: The case for genetic modifiers,” *Genome Med.*, vol. 1, no. 8, pp. 1–6, Aug. 2009, doi: 10.1186/GM80/FIGURES/2.
- [10] N. S. Wexler *et al.*, “Venezuelan kindreds reveal that genetic and environmental factors modulate Huntington’s disease age of onset.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 101, no. 10, pp. 3498–3503, Mar. 2004, doi: 10.1073/pnas.0308679101.
- [11] A. Novati, H. P. Nguyen, and J. Schulze-Hentrich, “Environmental stimulation in Huntington disease patients and animal models,” *Neurobiol. Dis.*, vol. 171, p. 105725, Sep. 2022, doi: 10.1016/J.NBD.2022.105725.
- [12] “Safety and Proof-of-Concept (POC) Study With AMT-130 in Adults With Early Manifest Huntington’s Disease - Full Text View - ClinicalTrials.gov.” <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04120493> (accessed Dec. 01, 2022).
- [13] S. J. Tabrizi *et al.*, “Targeting Huntingtin Expression in Patients with Huntington’s Disease,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 380, no. 24, pp. 2307–2316, Jun. 2019, doi: 10.1056/NEJMOA1900907.
- [14] “Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of ISIS 443139 in Participants With Early Manifest Huntington’s Disease - Full Text View - ClinicalTrials.gov.” <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02519036> (accessed Dec. 01, 2022).
- [15] F. B. Rodrigues, L. Quinn, and E. J. Wild, “Huntington’s Disease Clinical Trials Corner: January 2019,” *J. Huntingtons. Dis.*, vol. 8, no. 1, pp. 115–125, Jan. 2019, doi: 10.3233/JHD-190001.
- [16] “A Study to Evaluate the Efficacy and Safety of Intrathecally Administered

- RO7234292 (RG6042) in Participants With Manifest Huntington's Disease - Full Text View - ClinicalTrials.gov." <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03761849> (accessed Dec. 01, 2022).
- [17] G. Hoffner, S. Souès, and P. Djian, "Aggregation of expanded huntingtin in the brains of patients with Huntington disease.," *Prion*, vol. 1, no. 1, pp. 26–31, 2007, doi: 10.4161/PRI.1.1.4056.
- [18] R. Vidal, B. Caballero, A. Couve, and C. Hetz, "Converging Pathways in the Occurrence of Endoplasmic Reticulum (ER) Stress in Huntingtons Disease," *Curr. Mol. Med.*, vol. 11, no. 1, pp. 1–12, Jan. 2011, doi: 10.2174/156652411794474419.
- [19] H. Lee *et al.*, "IRE1 plays an essential role in ER stress-mediated aggregation of mutant huntingtin via the inhibition of autophagy flux," *Hum. Mol. Genet.*, vol. 21, no. 1, pp. 101–114, Jan. 2012, doi: 10.1093/HMG/DDR445.
- [20] S. Kim and K.-T. Kim, "Therapeutic Approaches for Inhibition of Protein Aggregation in Huntington's Disease," *Exp. Neurobiol.*, vol. 23, no. 1, p. 36, Mar. 2014, doi: 10.5607/EN.2014.23.1.36.
- [21] J. S. Steffan *et al.*, "The Huntington's disease protein interacts with p53 and CREB-binding protein and represses transcription," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 97, no. 12, p. 6763, Jun. 2000, doi: 10.1073/PNAS.100110097.
- [22] A. W. Dunah *et al.*, "Sp1 and TAFII130 transcriptional activity disrupted in early Huntington's disease," *Science (80-. )*, vol. 296, no. 5576, pp. 2238–2243, Jun. 2002, doi: 10.1126/SCIENCE.1072613/SUPPL\_FILE/1072613S3\_THUMB.GIF.
- [23] L. R. Gauthier *et al.*, "Huntingtin Controls Neurotrophic Support and Survival of Neurons by Enhancing BDNF Vesicular Transport along Microtubules," *Cell*, vol. 118, no. 1, pp. 127–138, Jul. 2004, doi: 10.1016/J.CELL.2004.06.018.

- [24] J. P. Dompierre *et al.*, “Histone Deacetylase 6 Inhibition Compensates for the Transport Deficit in Huntington’s Disease by Increasing Tubulin Acetylation,” *J. Neurosci.*, vol. 27, no. 13, p. 3571, Mar. 2007, doi: 10.1523/JNEUROSCI.0037-07.2007.
- [25] Y. S. Choo, G. V. W. Johnson, M. MacDonald, P. J. Detloff, and M. Lesort, “Mutant huntingtin directly increases susceptibility of mitochondria to the calcium-induced permeability transition and cytochrome c release,” *Hum. Mol. Genet.*, vol. 13, no. 14, pp. 1407–1420, Jul. 2004, doi: 10.1093/HMG/DDH162.
- [26] Y. S. Choo, G. V. W. Johnson, M. MacDonald, P. J. Detloff, and M. Lesort, “Mutant huntingtin directly increases susceptibility of mitochondria to the calcium-induced permeability transition and cytochrome c release,” *Hum. Mol. Genet.*, vol. 13, no. 14, pp. 1407–1420, Jul. 2004, doi: 10.1093/HMG/DDH162.
- [27] S. E. Browne *et al.*, “Oxidative damage and metabolic dysfunction in huntington’s disease: Selective vulnerability of the basal ganglia,” *Ann. Neurol.*, vol. 41, no. 5, pp. 646–653, May 1997, doi: 10.1002/ANA.410410514.
- [28] M. Gu, M. T. Gash, V. M. Mann, F. Javoy-Agid, J. M. Cooper, and A. H. V. Schapira, “Mitochondrial defect in Huntington’s disease caudate nucleus,” *Ann. Neurol.*, vol. 39, no. 3, pp. 385–389, Mar. 1996, doi: 10.1002/ANA.410390317.
- [29] E. Brouillet, C. Jacquard, N. Bizat, and D. Blum, “3-Nitropropionic acid: a mitochondrial toxin to uncover physiopathological mechanisms underlying striatal degeneration in Huntington’s disease,” *J. Neurochem.*, vol. 95, no. 6, pp. 1521–1540, Dec. 2005, doi: 10.1111/J.1471-4159.2005.03515.X.
- [30] M. A. Hickey and A. J. Morton, “Mice Transgenic for the Huntington’s Disease Mutation Are Resistant to Chronic 3-Nitropropionic Acid-Induced Striatal

- Toxicity,” *J. Neurochem.*, vol. 75, no. 5, pp. 2163–2171, Nov. 2000, doi: 10.1046/J.1471-4159.2000.0752163.X.
- [31] M. B. Bogdanov, R. J. Ferrante, S. Kuemmerle, P. Klivenyi, and M. F. Beal, “Increased Vulnerability to 3-Nitropropionic Acid in an Animal Model of Huntington’s Disease,” *J. Neurochem.*, vol. 71, no. 6, pp. 2642–2644, Dec. 1998, doi: 10.1046/J.1471-4159.1998.71062642.X.
- [32] C. J. Coles, D. E. Edmondson, and T. P. Singer, “Inactivation of succinate dehydrogenase by 3-nitropropionate.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 254, no. 12, pp. 5161–5167, Jun. 1979, doi: 10.1016/S0021-9258(18)50574-3.
- [33] L. B. Menalled, “Knock-In Mouse Models of Huntington’s Disease,” *NeuroRx*, vol. 2, no. 3, p. 465, 2005, doi: 10.1602/NEURORX.2.3.465.
- [34] F. Trettel *et al.*, “Dominant phenotypes produced by the HD mutation in STHdhQ111 striatal cells,” *Hum. Mol. Genet.*, vol. 9, no. 19, pp. 2799–2809, Nov. 2000, doi: 10.1093/HMG/9.19.2799.
- [35] Y. Noda *et al.*, “VGF and striatal cell damage in in vitro and in vivo models of Huntington’s disease,” *Pharmacol. Res. Perspect.*, vol. 3, no. 3, pp. 1–12, 2015, doi: 10.1002/prp2.140.
- [36] X. Xifró, J. M. García-Martínez, D. Del Toro, J. Alberch, and E. Pérez-Navarro, “Calcineurin is involved in the early activation of NMDA-mediated cell death in mutant huntingtin knock-in striatal cells,” *J. Neurochem.*, vol. 105, no. 5, pp. 1596–1612, Jun. 2008, doi: 10.1111/J.1471-4159.2008.05252.X.
- [37] T. Finkel and N. J. Holbrook, “Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing,” *Nat. 2000 4086809*, vol. 408, no. 6809, pp. 239–247, Nov. 2000, doi: 10.1038/35041687.



- [38] S. E. Browne, R. J. Ferrante, and M. F. Beal, "Oxidative Stress in Huntington's Disease," *Brain Pathol.*, vol. 9, no. 1, p. 147, 1999, doi: 10.1111/J.1750-3639.1999.TB00216.X.
- [39] A. Johri and M. F. Beal, "Antioxidants in Huntington's disease," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.*, vol. 1822, no. 5, pp. 664–674, May 2012, doi: 10.1016/J.BBADIS.2011.11.014.
- [40] M. A. Sorolla, G. Reverter-Branchat, J. Tamarit, I. Ferrer, J. Ros, and E. Cabiscol, "Proteomic and oxidative stress analysis in human brain samples of Huntington disease," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 45, no. 5, pp. 667–678, Sep. 2008, doi: 10.1016/J.FREERADBIOMED.2008.05.014.
- [41] M. Perluigi *et al.*, "Proteomic Analysis of Protein Expression and Oxidative Modification in R6/2 Transgenic Mice," *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 4, no. 12, pp. 1849–1861, Dec. 2005, doi: 10.1074/MCP.M500090-MCP200.
- [42] S. E. Browne, R. J. Ferrante, and M. F. Beal, "Oxidative stress in Huntington's disease," *Brain Pathol.*, vol. 9, no. 1, pp. 147–163, Jan. 1999, doi: 10.1111/j.1750-3639.1999.tb00216.x.
- [43] I. Ismailoglu, Q. Chen, M. Popowski, L. Yang, S. S. Gross, and A. H. Brivanlou, "Huntingtin Protein is Essential for Mitochondrial Metabolism, Bioenergetics and Structure in Murine Embryonic Stem Cells," *Dev. Biol.*, vol. 391, no. 2, p. 230, Jul. 2014, doi: 10.1016/J.YDBIO.2014.04.005.
- [44] J. M. Emery and R. M. Ortiz, "Mitofusin 2: A link between mitochondrial function and substrate metabolism?," *Mitochondrion*, vol. 61, pp. 125–137, Nov. 2021, doi: 10.1016/J.MITO.2021.09.003.
- [45] H. Wang, P. J. Lim, M. Karbowski, and M. J. Monteiro, "Effects of overexpression

- of Huntingtin proteins on mitochondrial integrity,” *Hum. Mol. Genet.*, vol. 18, no. 4, pp. 737–752, Feb. 2009, doi: 10.1093/HMG/DDN404.
- [46] J. Kim *et al.*, “Mitochondrial loss, dysfunction and altered dynamics in Huntington’s disease,” *Hum. Mol. Genet.*, vol. 19, no. 20, pp. 3919–3935, Jul. 2010, doi: 10.1093/HMG/DDQ306.
- [47] Q. Ruan, M. Lesort, M. E. MacDonald, and G. V. W. Johnson, “Striatal cells from mutant huntingtin knock-in mice are selectively vulnerable to mitochondrial complex II inhibitor-induced cell death through a non-apoptotic pathway,” *Human Molecular Genetics*, vol. 13, no. 7, pp. 669–681, Apr. 01, 2004, doi: 10.1093/hmg/ddh082.
- [48] Y. J. Choi, N. H. Kim, M. S. Lim, H. J. Lee, S. S. Kim, and W. Chun, “Geldanamycin attenuates 3-nitropropionic acid-induced apoptosis and JNK activation through the expression of HSP 70 in striatal cells,” *Int. J. Mol. Med.*, vol. 34, no. 1, pp. 24–34, 2014, doi: 10.3892/IJMM.2014.1747.
- [49] B. Cho *et al.*, “CDK5-dependent inhibitory phosphorylation of Drp1 during neuronal maturation,” *Exp. Mol. Med.*, vol. 46, no. 7, 2014, doi: 10.1038/EMM.2014.36.
- [50] H. Wang, P. J. Lim, M. Karbowski, and M. J. Monteiro, “Effects of overexpression of Huntingtin proteins on mitochondrial integrity,” *Hum. Mol. Genet.*, vol. 18, no. 4, p. 737, Feb. 2009, doi: 10.1093/HMG/DDN404.
- [51] C. S. Palmer, L. D. Osellame, D. Laine, O. S. Koutsopoulos, A. E. Frazier, and M. T. Ryan, “MiD49 and MiD51, new components of the mitochondrial fission machinery,” *EMBO Rep.*, vol. 12, no. 6, p. 565, Jun. 2011, doi: 10.1038/EMBOR.2011.54.

- [52] H. Otera *et al.*, “Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells,” *J. Cell Biol.*, vol. 191, no. 6, p. 1141, Dec. 2010, doi: 10.1083/JCB.201007152.
- [53] A. Brunet *et al.*, “Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a forkhead transcription factor,” *Cell*, vol. 96, no. 6, pp. 857–868, Mar. 1999, doi: 10.1016/S0092-8674(00)80595-4.
- [54] Q. Ruan, M. Lesort, M. E. MacDonald, and G. V. W. Johnson, “Striatal cells from mutant huntingtin knock-in mice are selectively vulnerable to mitochondrial complex II inhibitor-induced cell death through a non-apoptotic pathway.,” *Hum. Mol. Genet.*, vol. 13, no. 7, pp. 669–681, Apr. 2004, doi: 10.1093/hmg/ddh082.
- [55] R. Bhandari, A. Kuhad, and A. Kuhad, “Edaravone: a new hope for deadly amyotrophic lateral sclerosis.,” *Drugs Today (Barc.)*, vol. 54, no. 6, pp. 349–360, Jun. 2018, doi: 10.1358/dot.2018.54.6.2828189.
- [56] V. L. Kolosov *et al.*, “Thiol-based antioxidants elicit mitochondrial oxidation via respiratory complex III,” *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.*, vol. 309, no. 2, pp. C81–C91, Jul. 2015, doi: 10.1152/AJPCELL.00006.2015.
- [57] Z. Mao, Y. S. Choo, and M. Lesort, “Cystamine and cysteamine prevent 3-NP-induced mitochondrial depolarization of Huntington’s disease knock-in striatal cells,” *Eur. J. Neurosci.*, vol. 23, no. 7, pp. 1701–1710, Apr. 2006, doi: 10.1111/J.1460-9568.2006.04686.X.
- [58] K. Elgass, J. Pakay, M. T. Ryan, and C. S. Palmer, “Recent advances into the understanding of mitochondrial fission.,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1833, no. 1, pp. 150–161, Jan. 2013, doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.05.002.
- [59] W. Song *et al.*, “Mutant huntingtin binds the mitochondrial fission GTPase

- dynamamin-related protein-1 and increases its enzymatic activity,” *Nat. Med.*, vol. 17, no. 3, pp. 377–383, Mar. 2011, doi: 10.1038/NM.2313.
- [60] M. Cherubini, M. Puigdemívol, J. Alberch, and S. Ginés, “Cdk5-mediated mitochondrial fission: A key player in dopaminergic toxicity in Huntington’s disease,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.*, vol. 1852, no. 10, pp. 2145–2160, 2015, doi: 10.1016/j.bbadis.2015.06.025.
- [61] M. Manczak and P. Hemachandra Reddy, “Mitochondrial division inhibitor 1 protects against mutant huntingtin-induced abnormal mitochondrial dynamics and neuronal damage in Huntington’s disease,” *Hum. Mol. Genet.*, vol. 24, no. 25, pp. 7308–7325, Dec. 2015, doi: 10.1093/HMG/DDV429.
- [62] Y. N. Jin, W. Y. Hwang, C. Jo, and G. V. W. Johnson, “Metabolic State Determines Sensitivity to Cellular Stress in Huntington Disease: Normalization by Activation of PPAR $\gamma$ ,” *PLoS One*, vol. 7, no. 1, p. e30406, Jan. 2012, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0030406.
- [63] B. P. Culver *et al.*, “Proteomic analysis of wild-type and mutant huntingtin-associated proteins in mouse brains identifies unique interactions and involvement in protein synthesis,” *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 26, pp. 21599–21614, Jun. 2012, doi: 10.1074/jbc.M112.359307.
- [64] S. N. Illarioshkin, S. A. Klyushnikov, V. A. Vigont, Y. A. Seliverstov, and E. V. Kaznacheeva, “Molecular Pathogenesis in Huntington’s Disease,” *Biochem.*, vol. 83, no. 9, pp. 1030–1039, Sep. 2018, doi: 10.1134/S0006297918090043.
- [65] J. F. R. Kerr, A. H. Wyllie, and A. R. Currie, “Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics,” *Br. J. Cancer*, vol. 26, no. 4, p. 239, 1972, doi: 10.1038/BJC.1972.33.

- [66] S. Elmore, "Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death," *Toxicol. Pathol.*, vol. 35, no. 4, p. 495, 2007, doi: 10.1080/01926230701320337.
- [67] D. Tang, R. Kang, T. Vanden Berghe, P. Vandenabeele, and G. Kroemer, "The molecular machinery of regulated cell death," *Cell Res.*, vol. 29, no. 5, p. 347, May 2019, doi: 10.1038/S41422-019-0164-5.
- [68] G. Yan, M. Elbadawi, and T. Efferth, "Multiple cell death modalities and their key features (Review)," *World Academy of Sciences Journal*, vol. 2, no. 2. Spandidos Publications, pp. 39–48, Mar. 01, 2020, doi: 10.3892/wasj.2020.40.
- [69] B. R. Stockwell *et al.*, "Ferroptosis: A Regulated Cell Death Nexus Linking Metabolism, Redox Biology, and Disease," *Cell*, vol. 171, no. 2, pp. 273–285, Oct. 2017, doi: 10.1016/J.CELL.2017.09.021.
- [70] N. Klepac, M. Relja, R. Klepac, S. Hećimović, T. Babić, and V. Trkulja, "Oxidative stress parameters in plasma of Huntington's disease patients, asymptomatic Huntington's disease gene carriers and healthy subjects : a cross-sectional study.," *J. Neurol.*, vol. 254, no. 12, pp. 1676–1683, Dec. 2007, doi: 10.1007/s00415-007-0611-y.
- [71] J. Lee *et al.*, "Modulation of lipid peroxidation and mitochondrial function by nordihydroguaiaretic acid (NDGA) improves neuropathology in Huntington's disease mice," *Acta Neuropathol.*, vol. 121, no. 4, p. 487, Apr. 2011, doi: 10.1007/S00401-010-0788-5.
- [72] J. Chen *et al.*, "Iron Accumulates in Huntington's Disease Neurons: Protection by Deferoxamine," *PLoS One*, vol. 8, no. 10, Oct. 2013, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0077023.
- [73] L. Villegas, A. Nørremølle, K. Freude, and F. Vilhardt, "Nicotinamide Adenine

- Dinucleotide Phosphate Oxidases Are Everywhere in Brain Disease, but Not in Huntington's Disease?," *Front. Aging Neurosci.*, vol. 13, Nov. 2021, doi: 10.3389/FNAGI.2021.736734.
- [74] S. Barua, J. Y. Kim, M. A. Yenari, and J. E. Lee, "The role of NOX inhibitors in neurodegenerative diseases," *IBRO Reports*, vol. 7, p. 59, Dec. 2019, doi: 10.1016/J.IBROR.2019.07.1721.
- [75] A. Bertoni *et al.*, "Early and late events induced by polyQ-expanded proteins: identification of a common pathogenic property of polyQ-expanded proteins.," *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 6, pp. 4727–4741, Feb. 2011, doi: 10.1074/jbc.M110.156521.
- [76] S. Dikalov, "Crosstalk between mitochondria and NADPH oxidases," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 51, no. 7, p. 1289, Oct. 2011, doi: 10.1016/J.FREERADBIOMED.2011.06.033.
- [77] S. B. Deshpande, H. Hida, N. Takei-Io, T. Masuda, H. Baba, and H. Nishino, "Involvement of nitric oxide in 3-nitropropionic acid-induced striatal toxicity in rats," *Brain Res.*, vol. 1108, no. 1, pp. 205–215, Sep. 2006, doi: 10.1016/J.BRAINRES.2006.06.032.
- [78] P. Kumar and A. Kumar, "Protective effect of hesperidin and naringin against 3-nitropropionic acid induced Huntington's like symptoms in rats: Possible role of nitric oxide," *Behav. Brain Res.*, vol. 206, no. 1, pp. 38–46, Jan. 2010, doi: 10.1016/J.BBR.2009.08.028.
- [79] X. Sun *et al.*, "Activation of the p62-Keap1-NRF2 Pathway Protects against Ferroptosis in Hepatocellular Carcinoma Cells," *Hepatology*, vol. 63, no. 1, p. 173, Jan. 2016, doi: 10.1002/HEP.28251.

- [80] Y. N. Jin *et al.*, “Impaired Mitochondrial Dynamics and Nrf2 Signaling Contribute to Compromised Responses to Oxidative Stress in Striatal Cells Expressing Full-Length Mutant Huntingtin,” *PLoS One*, vol. 8, no. 3, Mar. 2013, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0057932.

## 略語一覧表

3-NP	3-Nitropropionic acid
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxide
Drp1	Dynamin-related protein 1
FBS	Fetal bovine serum
HD	Huntington's disease
L-NAME	<i>N</i> <sup>G</sup> -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride
Mff	Mitochondrial fission factor
mHTT	Mutant Huntingtin
Mid	Mitochondrial dynamics proteins
MSNs	Medium spiny neurons
MMP	Mitochondrial membrane potential
NAC	<i>N</i> -Acetyl-L-cysteine
NMDA	<i>N</i> -methyl-D-aspartate
NOX	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase
OPA1	Optic Atrophy 1
PBS	Phosphate buffered saline
PI	Propidium iodide
RIPA	Radio immunoprecipitation assay
ROS	Reactive Oxygen Species



SDS	Sodium dodecyl sulfate
SUMO	Small ubiquitin-related modifie
SOD	Superoxide dismutase