

博士論文要旨

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

ハンチントン病 (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変異ハンチンチン (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 は、発症年齢と CAG リピート数との間に負の相関が認められている。しかし、同じリピート数でも患者によって発症年齢が大きく異なることから、他の遺伝子や環境因子などの背景因子が発症に大きく関与していると考えられている。本研究では、HD 様症状を引き起こす 3-ニトロプロピオン酸 (3-NP: ミトコンドリア複合体 II 阻害剤) 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活性酸素種 (ROS) の関与について検討した。第 2 章では、3-NP 誘発細胞死に対するフェロトシスおよび NOX の関与について検討した。

1. 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 ROS の関与

3-NP 処置により、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 STHdhQ7 細胞よりも STHdhQ111 細胞で高く、mHTT を有する STHdhQ111 細胞の脆弱性が観察された。また、3-NP は STHdh 細胞における ROS の産生と Drp1 のオリゴマー化を増加させ、抗酸化剤 (エダラボン, NAC) はその増加を抑制した。さらに、mHTT を有する STHdhQ111 細胞ではミトコンドリア膜電位の低下および caspase 3/7 活性の上昇が認められ、抗酸化剤はそれらを抑制した。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

し、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。

2. 3-NP 誘発細胞死の機序解明

3-NP による STHdh 細胞死において、pan-caspase 阻害剤である Z-VAD-FMK は明らかな細胞保護作用を示さなかったことから、caspase 非依存的な経路を介していることが示唆された。鉄蓄積マーカーであるフェリチンの発現レベルは、STHdhQ7 細胞と比較して STHdhQ111 細胞において増加していた。さらに、3-NP による STHdh 細胞死は鉄キレーターであるデフェロキサミンおよびフェロトシス阻害剤であるフェロスタチン-1 により抑制されたことから、3-NP による STHdh 細胞死はフェロトシスを介しており、STHdhQ111 細胞においてそれがさらに亢進していることが示唆された。また、NOX2 選択的阻害剤である GSK2795039 は、3-NP 誘発 STHdh 細胞死を抑制したことから、NOX2 活性化を介した細胞内 ROS がフェロトシスを誘導していることが示唆された。

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。

【略語】

Drp1: Dynamin-related protein

HD: Huntington's disease

mHTT: mutant Huntingtin

NAC: N-Acetyl-L-cysteine

ROS: reactive oxygen species

3-NP: 3-nitropropionic acid

NOX: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase

論文審査結果の要旨

氏名（本籍）	岡田 のりあ (岡山県)
学位の種類	博士（薬科学）
学位記番号	甲 第 4 7 号
学位授与年月日	令和 5 年 3 月 1 0 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当者
学位論文の題名	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
論文審査委員	(主査) 位田 雅俊
	(副査) 松永 俊之
	(副査) 高橋 圭太

本論文は、ハンチントン病様症状を引き起こす 3-ニトロプロピオン酸 (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 (STHdhQ111) とコントロール細胞 (STHdhQ7) を用いて比較検討を行ったものである。

3-NP 処置により、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 STHdhQ7 細胞よりも STHdhQ111 細胞で高く、変異ハンチンチン (mHTT) を有する細胞の脆弱性が観察された。STHdhQ111 細胞が 3-NP に対して脆弱性を有する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が示唆された。さらに、3-NP による細胞死に細胞内活性酸素種 (ROS) の産生とミトコンドリアの断片化が関与し、抗酸化剤がその細胞死を抑制することを明らかにした。また、3-NP による細胞死に NADPH オキシダーゼ 2 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。

以上より、本研究は 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たもので、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り、博士（薬科学）論文として価値あるものと認める。