





学位論文審査結果報告書

報告番号	北里大 乙 第1698号	氏 名	鶴田 佳保里
論文審査担当者	<div><div>(主査) 北里大学教授</div><div>奥脇 暢</div><div>(副査) 北里大学教授</div><div>岡田 信彦</div><div>(副査) 北里大学教授</div><div>清野 正子</div><div>(副査) 北里大学教授</div><div>今井 浩孝</div></div> <div></div>		
<p>〔論文題目〕</p> <p>鉄非依存的な脂質酸化を介した GPx4 欠損による新規細胞死 (リポキントーシス) の分子機構の解析と阻害剤の発見</p> <p>〔論文審査結果の要旨〕</p> <p>プログラム細胞死は、生体の発生過程や恒常性の維持において必要不可欠な生命現象である。プログラム細胞死には、アポトーシスやフェロトーシスなどが知られ、それぞれの細胞死プログラムの実行因子は異なる。北里大学薬学部衛生化学研究室では、抗酸化酵素グルタチオンペルオキシダーゼ 4 (GPx4) のノックアウトマウスの解析から、酸化脂質に関わる新しいプログラム細胞死を発見した。GPx4は酸化ストレスなどによって生じたリン脂質ヒドロペルオキシドをグルタチオン依存的に還元する抗酸化酵素である。マウスにおける GPx4 の欠損は胎生 7.5 日で致死となることが示されており、この胎生致死は緩やかに進む細胞死が原因であることが明らかにされている。GPx4 に直接結合してその活性を阻害する抗がん剤 RSL3 で細胞を処理すると、鉄依存的な脂質酸化によるフェロトーシスが誘導されることから、フェロトーシスと GPx4 のノックアウトによる細胞死が同一の経路をたどるプログラム細胞死であると考えられてきた。GPx4 のノックアウト依存的な細胞死は、RSL3 やエラスチンなどの阻害剤依存的なフェロトーシスとは細胞死にいたる時間が異なることから、鶴田氏は GPx4 のノックアウト依存的な細胞死はフェロトーシスとは異なる経路をたどる細胞死であると着想した。本研究では、フェロトーシスと GPx4 のノックアウト依存的な細胞死が異なるメカニズムにより生じることを証明し、その細胞死の分子機構を明らかにすることを目的として研究を行った。</p> <p>GPx4 のノックアウトマウスは胎生致死であることから、GPx4 ノックアウトマウスを LoxP-GPx4 を導入することによってレスキューし、このマウスから採取した MEF 細胞から CRE-ERT2 を発現する細胞 (ETK1) を樹立した。ETK1 細胞は、タモキシフェン添加によって CRE リコンビナーゼが核に蓄積し、GPx4 遺伝子領域を破壊することで GPx4 欠損細胞となる。ETK1 細胞にタモキシフェンを添加後、細胞の生存率を計測すると、24 時間以降に GPx4 の発現減少が起こり 72 時間までの時間をかけて緩やかな細胞生存率の低下が観察された。一方、ETK1 細胞にフェロトーシスの誘導剤である RSL3 やシスチントランスポーター阻害剤エラスチンを添加すると、24 時間以内に細胞死が誘導された。いずれの細胞</p>			

死も、Torolox や Ferrostatin-1 といった抗酸化剤によって抑制された。また、いずれの細胞死にも酸化脂質の蓄積が関わることを、酸化脂質特異的な蛍光試薬を用いることによって証明した。しかし、RSL3 やエラスチンで誘導される細胞死は、鉄キレーターDFOによって抑制されるのに対して、GPx4 のノックアウト依存的な細胞死はDFO 処理では抑制されなかった。これらのことから、鶴田氏は、フェロトーシスとGPx4 のノックアウト依存的な細胞死はいずれも脂質酸化依存的な細胞死であるが、GPx4 のノックアウト依存的な脂質酸化は、鉄によるフェントン反応は介さないものと結論付けた。そこで、GPx4 のノックアウト依存的な細胞死はフェロトーシスとは異なる細胞死であり、この新規細胞死をリポキシトーシスと名付け、以降の解析を行った。

次に、鶴田氏はリポキシトーシスの阻害剤探索を目的として研究を行った。ETK1 細胞にタモキシフェン添加後に誘導される GPx4 のノックアウト依存的なリポキシトーシスの阻害剤のスクリーニングを進めた。その結果、MEK inhibitor I とU0126 の添加によって、リポキシトーシスが抑制されることを見出した。同様に、MEK 1 のノックダウン、ERK 2 の阻害剤がリポキシトーシスを抑制することを明らかにした。GPx4 のノックアウト依存的なリポキシトーシスの過程で蓄積する酸化脂質は、これらのキナーゼ阻害剤によって抑制されないことから、リポキシトーシスでは脂質酸化の下流で MEK1 や ERK2 が活性化し、細胞死が誘導されることを見出した。一方、フェロトーシス誘導剤である RSL3 やエラスチンの処理によって蓄積する酸化脂質の量は MEK 阻害剤によって抑制された。さらに、MEK 1 のノックダウンや ERK 2 の阻害剤ではリポキシトーシスは抑制されるものの、フェロトーシスは抑制されなかった。以上の結果より、フェロトーシスとリポキシトーシスのシグナル伝達経路は異なるものと考えられた。また、リポキシトーシス阻害活性を有する化合物として、リパーゼ阻害剤 KT-195 や Pyrrofenone を見出し、両阻害剤は、リポキシトーシスは阻害するが、フェロトーシスは阻害しないことを示した。以上の阻害剤の探索研究は、リポキシトーシス特異的な阻害剤の発見につながったと同時に、リポキシトーシスのシグナル伝達経路や実行因子の解明にも貢献する研究となった。さらに重要な点は、リポキシトーシスがフェロトーシスとは異なる細胞死であることを裏付ける実験的な証拠を得ることにつながった点である。

フェロトーシスとリポキシトーシスを区別するツールとしてリパーゼ阻害剤KT-195 やPyrrofenone を入手したことから、次に鶴田氏は臓器特異的な GPx4 のノックアウトマウスで見られる細胞死が、リポキシトーシスなのかフェロトーシスなのかを明らかにする研究を行った。その結果、精巣あるいは心筋特異的な GPx4 ノックアウトによる細胞死は、両阻害剤によって抑制されることから、GPx4 をノックアウトした臓器で引き起こされる細胞死は、リポキシトーシスであることが強く示唆された。

本研究ではGPx4 のノックアウト依存的な細胞死リポキシトーシスが、フェロトーシスとは異なることを明らかにした。同時に、リポキシトーシス特異的な阻害剤の同定に成功し、リポキシトーシスにおける細胞死経路の解明や、リポキシトーシスの個体発生や疾患における役割の解明につながるものが期待される。

以上のように鶴田氏による本研究は、新規性及び独創性が高く、博士（薬科学）の学位に十分値するものと判断し、学位審査を合格と判定した。