

論 文 要 旨

Mitochondrial dysfunction promotes aquaporin expression that controls hydrogen peroxide permeability and ferroptosis

〔 ミトコンドリア機能障害は過酸化水素の膜透過性と
フェロトーシスを制御するアクアポリンの発現を促進させる 〕

高 裕 子

【序論及び目的】

がんの治療法選択肢の一つである化学療法においては、活性酸素種 (ROS) の生成を介してその効果を発揮するものが多数ある。ROS の一種である過酸化水素 (H_2O_2) は、放射線療法を用いたがん治療の増感剤としても用いられているが、生体内で Fe^{2+} と反応し、より反応性の高いヒドロキシラジカル ($\cdot OH$) を生じることが分かっている。 $\cdot OH$ は、細胞膜やミトコンドリアの脂質二重膜を酸化することで細胞死を誘導することが知られており、最近になって、フェロトーシスと呼ばれる Fe^{2+} 依存性の脂質過酸化を伴う新しい細胞死に関与することも報告されている。生体内において ROS は、細胞質内の酵素によっても産生されるが、その主要な発生源はミトコンドリアの電子伝達系である。ミトコンドリアは独自の DNA (mtDNA) を持つ細胞内小器官で、ATP 産生や細胞死に重要な役割を果たしているが、mtDNA が欠失した ρ^0 細胞は H_2O_2 に対して感受性との報告がある。さらに、 ρ^0 細胞においては、 H_2O_2 を透過させるアクアポリン (AQP) の遺伝子発現も亢進している。しかしながら、 H_2O_2 で誘導される細胞死がフェロトーシスであるか、また、この細胞死にミトコンドリアが関与しているかどうかについては未だ明らかではない。そこで本研究では、 H_2O_2 で誘導される細胞死におけるミトコンドリアの関与を解明することを目的とし、特にフェロトーシスを調節する分子についての解析を行った。

【材料及び方法】

実験材料には子宮頸がん由来の細胞株である HeLa と舌がん由来の細胞株である SAS の親株と ρ^0 細胞を用いた。実験は、以下の 1-7 を行った。

1. ρ^0 細胞を H_2O_2 処理後、アポトーシスマーカーの Annexin V もしくはフェロトーシスマーカーの Liperfluo[®]にて染色し、フローサイトメトリー解析と蛍光顕微鏡観察を行い H_2O_2 誘導細胞死の種類について調べた。
2. 使用した各細胞から RNA を抽出し、アポトーシスを制御する Caspase8, 9 およびフェロトーシスを抑制する GPx4 と、その発現を調節する Nrf2 の発現を定量 PCR で調べた。
3. ミトコンドリア内の Fe^{2+} 量を検出する Mito-FerroGreen[®] と細胞質内の Fe^{2+} 量を検出する FerroOrange[®]を用いて、各細胞の Fe^{2+} 量を半定量解析し、親株と ρ^0 細胞における Fe^{2+} 量を調べた。
4. ρ^0 細胞に鉄キレート薬であるフェナントロリン (PHE)、デフェロキサミン (DFO)、デフェロシロクス (DFX) 処理を行い H_2O_2 処理による細胞生存率の変化を検討した。
5. 各細胞における AQP3, 5, 8 のタンパク質発現を免疫染色とウェスタンブロットで調べ、NADPH oxidase 2 (NOX2) と AQP の相互作用を調べるために免疫沈降を行い、 ρ^0 細胞に siRNA を用いて AQP の発現抑制を行うことにより H_2O_2 処理に対する AQP の関与を調べた。

6. ρ^0 細胞に正常細胞由来のミトコンドリアを移植し、AQPの発現、 H_2O_2 処理による細胞生存率の変化、 Fe^{2+} 量の変化、ミトコンドリア機能をつかさどるプロヒビチン2 (PHB2)の発現について検討した。
7. PHB2のノックダウンを行い、AQPの発現が抑制されるかを定量PCRにて調べた。

【結果】

1. フローサイトメトリーと蛍光顕微鏡の観察により、 ρ^0 細胞においては、 H_2O_2 処理後3時間でフェロトーシスのマーカーであるLiperfluor[®]のシグナル増大が、未処理群に比べ観察された。しかしアポトーシスのマーカーであるAnnexin Vのシグナルは増大しなかった。
2. ρ^0 細胞においてアポトーシスを亢進させるCaspase 8, 9の発現は H_2O_2 処理2時間後で減少しており、フェロトーシスを抑制する抗酸化酵素GPx4の発現は、 H_2O_2 処理で亢進せず、Nrf2の発現は親株に比べ少なかった。
3. 細胞質およびミトコンドリア内の Fe^{2+} の量を解析すると、 ρ^0 細胞では親株に比べ Fe^{2+} の量が多かった。
4. 鉄キレート薬を用いて H_2O_2 処理後の細胞生存率を調べたところ、未処理に比べPHEとDFX処理で細胞生存率が上昇した。
5. AQP3, 5, 8の発現を調べた結果、その発現は ρ^0 細胞で亢進しており、NOX2と直接結合していた。また、siRNAでAQPの発現を抑制すると H_2O_2 処理後の細胞生存率は有意に上昇した。
6. ρ^0 細胞に正常細胞のミトコンドリアを移植すると、AQPの発現は抑制され、 H_2O_2 処理後の細胞生存率は有意に上昇し、 Fe^{2+} の量が減少し、PHB2の発現は有意に増加した。
7. 親株でPHB2の発現をsiRNAにてノックダウンすると、AQPの発現は有意に亢進した。

【結論及び考察】

本研究により H_2O_2 感受性はミトコンドリアによって制御されており、ミトコンドリア内のPHB2がAQPの発現を抑制することにより細胞死、特にフェロトーシスを制御していることが示された。

H_2O_2 の膜透過性は、細胞表面のAQP量と、膜の酸化状態に制御されていることが示されているが、 ρ^0 細胞においては、細胞膜の脂質過酸化が亢進していることが明らかとなっている。本研究で、 ρ^0 細胞ではAQP発現量が增大していることが明らかとなり、その結果、 ρ^0 細胞においては、 H_2O_2 処理により細胞内 H_2O_2 量が親株に比べて増大しやすく、細胞内、ミトコンドリアの Fe^{2+} の量も多いことから、いわゆるフェントン反応により $\cdot\text{OH}$ 量も増大していると考えられる。また、 ρ^0 細胞においては、mtDNAが欠失しており、PHB2の発現が減少していることからミトコンドリア機能障害が生じており、ミトコンドリアにおいても親株に比べ多くのROSが産生されていると考えられる。実際、 ρ^0 細胞においては $\cdot\text{OH}$ 量が増大していることが報告されており、この $\cdot\text{OH}$ 量の増大により、脂質の過酸化が引き起こされ、その結果、 H_2O_2 透過性亢進によるフェロトーシスが惹起されやすいと考えられる。さらに、ミトコンドリア障害によって引き起こされたNrf2を介したGPx量の減少は、細胞膜脂質過酸化を抑制することが出来ず、 ρ^0 細胞におけるフェロトーシスをさらに加速させていると推察される。

以上より、ミトコンドリアは、AQP発現を介して、ROS感受性、ひいては抗がん薬の感受性をコントロールする可能性が示唆された。今後、ミトコンドリア機能もしくは、AQP発現量をコントロールするような薬物を投与することにより、がんの薬物感受性を高める事が期待できるので、更に治療効果の高い治療法の提示が可能となると考えられる。