

様式3

群馬大学生体調節研究所内分泌・代謝学共同研究拠点共同研究報告書

平成 29 年 4 月 6 日

群馬大学生体調節研究所長 殿

所属機関名 群馬大学大学院保健学研究科
職 名 教授
研究代表者 輿石一郎

下記のとおり平成 28 年度の共同研究成果を報告します。

記

(課題番号:16034)

| | | | |
|----------------------------------|---|--------------------------|--|
| 1. 共同研究課題名 | フェロトーシス誘導細胞内脂質ラジカル反応の解析 | | |
| 2. 共同研究目的 | 近年、酸化ストレス疾患における新たな細胞死の概念としてフェロトーシスがクローズアップされている。本研究では、フェロトーシスの鍵となる分子種の発現に係わる遺伝子を改変した細胞を用い、フェロトーシス誘導・進展・細胞死とラジカル反応との関連を明らかにする。 | | |
| 3. 共同研究期間 | 平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日 | | |
| 4. 共同研究組織 | | | |
| 氏 名 | 所属部局等 | 職名等 | 役割分担 |
| (研究代表者) 輿石一郎 | 保健学研究科 | 教授 | 研究の総括 |
| (分担研究者) 時田佳治 瀧川雄太 川島早耶香 | 保健学研究科 保健学研究科 保健学研究科 | 助教 修士 2 年生 修士 2 年生 | 培養細胞を用いたラジカル解析 培養細胞を用いたラジカル解析 培養細胞を用いたラジカル解析 |
| 5. 群馬大学生体調節研究所 の共同研究担当教員 | 分野名 | 内分泌制御分野 | 氏 名 鳥居征司 |

※ 次の6, 7, 8の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6, 7, 8の項目全体では1頁に収めて下さい。

(課題番号:16034)

6. 共同研究計画

5員環状ニトロキシルラジカルおよび6員環状ニトロキシルラジカルは、炭素中心ラジカルと特異的にラジカルラジカル付加体を生成する。生成した付加体を、HPLC および LC-MS により解析することで、炭素中心ラジカルの同定を行う(スピンプローブ法)。本スピンプローブ法を以下の細胞に適用し、産生する脂質ラジカルの解析を行う。

- ① 15-リポキシゲナーゼ、12-リポキシゲナーゼ、5-リポキシゲナーゼをノックダウンしたフェロトーシス誘導細胞
- ② 15-リポキシゲナーゼ、12-リポキシゲナーゼ、5-リポキシゲナーゼを過剰発現したフェロトーシス誘導細胞
- ③ 各種多価不飽和脂肪酸を導入したフェロトーシス誘導細胞
- ④ 各種ラジカルスカベンジャーを含有する①～③の細胞

7. 共同研究の成果

細胞内で産生されるラジカル種を解析する手法として、スピンプローブ法とスピントラップ法がある。スピントラップ法としては、脂質ラジカルを標的としたスピントラップ剤が確立されているが、欠点として、トラップ効率の低さが挙げられ、そのため、細胞に対して高濃度のスピントラップ剤を付加しなくてはならない。一方、スピンプローブ法は安定ラジカルを用いたラジカル種の解析法であり、ラジカルラジカル付加反応は活性化エネルギーの無い反応であり、反応効率が高い。本年度は、フェロトーシスを誘導した細胞に対してスピンプローブ法ならびにスピントラップ法を応用するにあたり、フェロトーシス誘導細胞において産生される脂質ラジカルとスピントラップ剤ならびにスピンプローブ剤が反応することでフェロトーシスによる細胞死が抑制されるか否について検討を行った。また、同時に、レドックスポテンシャル感受性蛍光プローブおよび脂質ラジカル感受性蛍光プローブを用いた画像解析を組み合わせて、活性酸素種産生および脂質ラジカル産生への影響を評価した。

検討の結果、細胞への影響を示さない濃度下でのスピントラップ剤(PBN および POBN)はフェロトーシスによる細胞死を抑制しなかった。一方、細胞膜透過性の六員環状ニトロキシルラジカル(TEMPO 系)および五員環状ニトロキシルラジカル(PROXYL 系)は、いずれも、フェロトーシスによる細胞死を抑制した。しかしながら、興味深いことに、TEMPO 系ニトロキシルラジカルは、細胞内レドックスポテンシャルを酸化側にシフトさせることが明らかとなった。これは、デフェロキサミンによる鉄キレートの際に認められる現象と類似していた。一方、PROXYL 系ニトロキシルラジカルは、細胞内レドックスポテンシャルに影響することなく、脂質ラジカルの産生を抑制した。

以上、これら性質の異なるニトロキシルラジカルを使い分け、その反応生成物を解析することで、フェロトーシス誘導細胞における脂質ラジカル産生に関する情報を取得することが可能であると結論できた。

8. 共同研究成果の学会発表・研究論文発表状況

(本研究所の担当教員の氏名の記載、又はこの共同研究に基づくとの記載のある論文等を記載して下さい。なお、論文の場合は、別刷りを1部提出してください。)

本研究成果は、平成29年度日本酸化ストレス学会(つくば)で発表する予定である。また、投稿論文については、現在準備中である。

分担研究者として大学院学生瀧川雄太(修士2年生)を入れているが、本課題研究の成果を修士論文として発表した。