

氏 名	千 葉 陽 一
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2907 号
学位授与の日付	平 成 17 年 9 月 26 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	医 学 研 究 科 脳 統 御 医 科 学 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	Cultured murine dermal fibroblast - like cells from Senescence - Accelerated Mice as <i>in vitro</i> models for higher oxidative stress due to mitochondrial alterations. (ミトコンドリア異常による高酸化ストレス状態の試験管内モデルとしての老化促進モデルマウス由来培養マウス皮膚線維芽細胞)
論文調査委員	(主 査) 教 授 鍋 島 陽 一 教 授 淀 井 淳 司 教 授 芹 川 忠 夫

論 文 内 容 の 要 旨

老化に伴う高酸化ストレス状態とミトコンドリア異常の本態を解明することは、加齢性変性疾患発症の基盤となる細胞の形態・機能変化を理解する上で重要である。老化促進モデルマウスの1系統である SAMP11 は、新生仔由来培養皮膚線維芽細胞の分裂寿命が対照の SAMR1 マウス由来線維芽細胞 (SAMR1 細胞) に比べて短い。これまでの研究で、SAMP11 由来線維芽細胞 (SAMP11 細胞) の試験管内寿命の短縮に酸化ストレスが関与することを示唆する証拠が得られている。この培養系は、老化に伴う細胞障害と酸化ストレスとの関連を解析するためのモデルとなることが期待される。そこで本研究では、SAMP11 細胞の酸化ストレス状態とミトコンドリアの形態・機能について解析した。

マウス新生仔皮膚より線維芽細胞を単離し数日培養した後、別ディッシュに再播種し実験に用いた。酸化ストレスのマーカーである dichlorofluorescein diacetate と O_2^- のマーカーである hydroethidine (HEt) で活性酸素種 (ROS) の産生量を評価すると、SAMP11 細胞では再播種後5日目に ROS 量が増加しその後11日目まで ROS 量が多い状態で推移するのに対し、SAMR1 細胞では5日目に一旦 ROS 量は増加するが、7日目以降は3日目と同レベルまで低下し、両系統間の比較では7日目以降に有意差がみられた。7日目における主な抗酸化酵素の活性とその mRNA の発現、及びグルタチオン量を比較したが、上述の ROS 量の違いを説明しうる抗酸化系の誘導の相違はみられなかった。そこで、細胞内の ROS 産生源の一つであるミトコンドリアに着目し、HEt とミトコンドリアマーカーである MitoTracker Green FM で細胞を二重染色すると、細胞質内の O_2^- 産生部位のほとんどがミトコンドリア上に分布していた。ミトコンドリア量のマーカーである 10-n-nonyl acridine orange と内膜電位のセンサーである JC-1 によりミトコンドリア機能を評価すると、SAMP11 細胞で時間経過と共に内膜電位の低いミトコンドリアが増加していた。透過型電顕による観察で、SAMP11 細胞では培養日数の経過に伴い、膨化、クリステの変性消失、マトリックスの電子密度の増加などの異常を示すミトコンドリアが増加していたが、SAMR1 細胞ではそのような異常は軽度であった。老齢 SAMP 系マウスの神経細胞を始めとした諸臓器でも SAMP11 細胞に見られたのと同様のミトコンドリアの形態異常が観察された。

以上の結果から、SAMP11 細胞は SAMR1 細胞に比べ高い酸化ストレス状態にあり、その ROS の主な発生源はミトコンドリアであることが明らかとなった。低電位のミトコンドリアの増加は、ROS により傷害されたミトコンドリアの増加を反映しており、異常な超微形態を示すミトコンドリアの増加と対応するものと考えられる。*In vivo* でも同様の異常を示すミトコンドリアが加齢に伴って出現することから、培養細胞系でみられた異常が生体内でも存在すると推察される。本研究の意義は、SAMP11 細胞がミトコンドリア由来の ROS の増加に起因する高酸化ストレス状態を自然発症するモデルとして有用であることを示した点にある。

今後本実験系を応用して、老化やアルツハイマー病などの加齢性神経変性疾患の基礎的なメカニズムの解明とその治療法開発に向けた、培養神経細胞を用いた研究の発展が期待できる。

論文審査の結果の要旨

本研究では、試験管内寿命の短縮を示す SAMP11 由来培養線維芽細胞（SAMP11 細胞）と対照の SAMR1 マウス由来線維芽細胞（SAMR1 細胞）を用いて、試験管内加齢と酸化ストレス及びミトコンドリアの形態・機能変化との関連が検討された。

酸化ストレスの蛍光マーカーによる検討で、SAMP11 細胞では SAMR1 細胞に比べて高い酸化ストレス状態にあることが明らかにされた。抗酸化酵素の発現及びグルタチオン量の検討では、両系統間の酸化ストレス状態の違いを説明し得るような相違はなかった。細胞内のスーパーオキシド産生部位がミトコンドリアであることが、蛍光マーカーの二重染色により示された。ミトコンドリア内膜電位のマーカーによる検討で、SAMP11 細胞では時間経過と共に電位の低いミトコンドリアが増加することが示された。電顕による観察で、SAMP11 細胞では培養日数の経過に伴い超微形態の異常を示すミトコンドリアが増加しており、同様の变化は老齢 SAMP 系マウスの諸臓器でも観察された。これらの結果から、SAMP11 細胞はミトコンドリア由来の活性酸素種の増加を伴う高酸化ストレス状態を自然発症するモデル系として有用であると考えられた。

以上の研究は、老化における酸化ストレスとミトコンドリアの形態・機能変化との関連の解明に貢献し、ヒトの加齢性変性疾患の病態発生機構に関する研究に寄与するところが多い。したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位申請者は、平成17年7月20日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。