

張 田力 氏の学位論文審査の要旨

論文題目

Enhanced Cellular Polysulfides Negatively Regulate TLR4 Signaling and Mitigate Lethal Endotoxin Shock
(細胞内ポリスルフィドの亢進はTLR4 シグナルを阻害し致死性エンドトキシンショックを軽減させる)

Tumor necrosis factor (TNF)- α などのマクロファージ由来炎症メディエーターは細菌感染に対する宿主免疫応答において、重要な役割を果たす。システインパースルフィド(CysSSH)やシステインポリスルフィド(Cys[S]_nH, n>2)は、システインのチオール基にさらに過剰なイオウ原子(S)が付加したシステイン誘導体である。これまでの研究から、原核および真核生物においてシステインパースルフィドやシステインポリスルフィドが生体レベルで豊富に存在し、抗酸化宿主防御やレドックス依存的シグナル伝達など多様な生物学的プロセスにおいて重要な機能を発揮していることが示唆されている。本研究では、効果的に細胞内ポリスルフィドを亢進させることができるポリスルフィドドナーを化学的に合成し、マクロファージのリポ多糖(LPS)誘導性の自然免疫応答とマウスのエンドトキシンショックに与えるポリスルフィドドナーの影響を調べた。

イオウ原子をN-アセチル-L-システイン (NAC) で安定化させ、ポリスルフィドドナー(NAC ポリスルフィド)を合成した。マウスマクロファージ細胞株であるRAW264.7細胞をNAC ポリスルフィド存在下または非存在下で、各種 Toll 様受容体(TLR) リガンドで刺激した。細胞内ポリスルフィド量は高速液体クロマトグラフィータンデム質量分析装置(LC-MSMS)にて解析した。TNF- α やインターフェロン(IFN)- β は ELISA にて定量した。細胞内シグナル伝達はウェスタンブロットングにより解析した。エンドトキシンショックマウスモデルは、9週齢の雄のC57BL/6マウスの腹腔内にLPS(20 mg/kg)を投与した。LPS投与30分後、NACポリスルフィド(120 μ mol/kg)あるいは対照群として生理食塩水を投与し、24時間毎に観察しマウスの生存率を解析した。

LC-MSMS解析により、NACポリスルフィドはグルタチオン(GSH)と速やかに反応しグルタチオンパースルフィド(GSSH)、グルタチオンテトラスルフィド(GSSSH)、硫化水素、チオ硫酸などが検出されたことから、NACポリスルフィドからGSHにイオウが転移し多様なイオウ代謝分子が生成することが明らかとなった。RAW264.7細胞にNACポリスルフィドを処理すると細胞内のシステインおよびGSHのポリスルフィド誘導体が著しく亢進した。以上からNACポリスルフィドは細胞質に運ばれ、強力な細胞内イオウドナーとして機能することが示唆された。さらに、NACポリスルフィドはLPS(TLR4リガンド)、poly I:C(TLR3リガンド)、zymosan A(TLR2リガンド)で刺激したマクロファージによるTNF- α やIFN- β など炎症性サイトカインの産生を強力に阻害した。また、NACポリスルフィドはNF- κ BおよびSTAT1シグナル伝達経路を有意に阻害した。さらに *in vivo*における研究結果から、NACポリスルフィドがLPS誘導性エンドトキシンショックに対する治療効果を示し、マウスの生存率が著しく改善した。

本研究で、生体内でNACポリスルフィドが効果的なパースルフィド/ポリスルフィドドナーとして機能することを明らかにした。さらに細胞内ポリスルフィドがTLR4を介した炎症性シグナル伝達を負に制御することを見出した。以上のことからポリスルフィドを介したレドックスの制御は致死性エンドトキシンショックなどの炎症性疾患の治療標的になる可能性が示唆された。

審査では、NACポリスルフィドのTLR4 signaling抑制機序について、ミトコンドリアへの影響について、NAC-S2の作用がNAC-S1より強力である理由、内因性のNACポリスルフィドについて、NAC-S2のcell viabilityへの影響について、等様々な質問があり、張氏から適切な回答がなされた。

本研究はNACポリスルフィドのTLR4を介した、炎症性シグナル伝達を負に制御する作用を詳細に明らかにし、NACポリスルフィドが炎症性疾患の治療標的になる可能性を示唆する有意義な研究であり、学位の授与に値すると評価された。

審査委員長 皮膚病態治療再建学担当教授

尹浩信