

博士学位論文審査要旨

2022年7月8日

論文題目： Singlet Oxygen from Endoperoxide Initiates an Intracellular ROS Release in HaCaT Keratinocytes
(エンドペルオキシドからの一重項酸素は、HaCaT ケラチノサイトにおける細胞内活性酸素産生を誘導する)

学位申請者： ELSHAFEI MARYAM EMAD

審査委員：

主査： 生命医科学研究科 教授 市川 寛
副査： 生命医科学研究科 教授 米井 嘉一
副査： 生命医科学研究科 教授 池川 雅哉

要 旨：

一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) は、生体系で自然に生成される活性酸素種 (ROS) の一つである。この $^1\text{O}_2$ は、細胞シグナル伝達を通じて恒常性を維持する上で重要な役割を果たしているが、生体分子を酸化する能力があるため、その毒性も問題となる。Elshafei Maryam Emad 氏は、HaCaT ケラチノサイトに対する $^1\text{O}_2$ の障害機序を明らかにするために、 $^1\text{O}_2$ 刺激剤として疎水性エンドペルオキシド (EP) 溶液による細胞障害モデルを確立させた。次に、 35°C 以上で EP より自発的に $^1\text{O}_2$ が産生されることを化学発光法で確認後、HaCaT ケラチノサイトと EP の共存下では、ROS 産生量が増大することを明らかにした。すなわち、EP 刺激をきっかけに、2 次的に細胞内から持続的に ROS が新たに産生されることを証明した。さらに EP 刺激による細胞障害の機序を明らかにするために、様々な抗酸化酵素、抗酸化物質を用いて検討したところ、血小板活性化因子受容体拮抗薬 (WEB2086)、アジ化ナトリウム (NaN_3)、ヒスチジンが、EP 刺激後の添加にもかかわらず細胞障害が有意に抑制された。すなわち、EP 刺激後に細胞内に 2 次的に産生された過酸化水素、 $^1\text{O}_2$ がその後の細胞障害に関与していることを明らかにした。細胞内に 2 次的に産生される ROS の産生源を明らかにするために、Si-DMA 蛍光プローブを使用した共焦点顕微鏡を使用して、ミトコンドリア内の $^1\text{O}_2$ の検出を試みた。その結果、EP 刺激後、EP からの $^1\text{O}_2$ 産生が消失した後も、持続的にミトコンドリア内に $^1\text{O}_2$ が産生されることを確認した。また、EP 刺激により 2 次的に産生された細胞内 $^1\text{O}_2$ は、ミトコンドリア電子伝達系阻害剤、細胞内スーパーオキシド消去剤 (MnTMPyP)、WEB2086 の添加により消失したことにより、EP 刺激により細胞内に産生された $^1\text{O}_2$ は、ミトコンドリアおよび血小板活性化因子受容体由来であることが推測された。最後に、細胞内カルシウムレベルを細胞内カルシウムアッセイ法にて検討した。その結果、EP 刺激により細胞内カルシウムレベルは上昇し、その上昇は、NADPH オキシダーゼ阻害剤 (DPI)、および WEB2086 により抑制されることが明らかになった。以上の結果は、EP より産生された $^1\text{O}_2$ に応答した細胞内 ROS の間接的な持続放出が細胞障害に関与している可能性を示唆しており、同時に、これらの ROS は、カルシウム感受性経路を介して血小板活性化因子受容体およびミトコンドリアを介して生成される可能性がはじめて明らかにされた。よって、本論文は、博士 (理学) (同志社大学) の学位論文として十分な価値を有するものと認められる。

総合試験結果の要旨

2022年7月8日

論文題目： Singlet Oxygen from Endoperoxide Initiates an Intracellular ROS Release in HaCaT Keratinocytes
(エンドペルオキシドからの一重項酸素は、HaCaT ケラチノサイトにおける細胞内活性酸素産生を誘導する)

学位申請者： ELSHAFEI MARYAM EMAD

審査委員：

主査： 生命医科学研究科 教授 市川 寛
副査： 生命医科学研究科 教授 米井 嘉一
副査： 生命医科学研究科 教授 池川 雅哉

要 旨：

上記審査委員は Elshafei Maryam Emad 氏に対する総合試験を2022年7月6日午後4時より約1時間40分実施した。時間構成は口頭発表60分、質疑応答20分、口頭試問20分であった。

総合試験において学位申請者は、提出された論文の内容に関する口頭試問に適切に回答し、研究内容と意義、研究方法、解析法について深い理解を示すとともに、研究の背景について広範な専門知識を有していることを示した。

本研究では、学位申請者は、HaCaT ケラチノサイトに対する一重項酸素 (1O_2) の障害機序を明らかにするために、 1O_2 刺激剤として疎水性エンドペルオキシド (EP) 溶液による細胞障害モデルを確立させ、その細胞障害機序に関し様々な抗酸化酵素、抗酸化物質を用いて検討した。その結果、細胞障害は外因性の酸化ストレスによるものではなく、EP 刺激後に細胞内に2次的に誘導された過酸化水素、 1O_2 がその後の細胞障害に関与していることを明らかにしている。また、EP 刺激により2次的に産生された細胞内 1O_2 は、ミトコンドリア電子伝達系阻害剤、細胞内スーパーオキシド消去剤 (MnTMPyP)、血小板活性化因子受容体拮抗薬 (WEB2086) の添加により消失した結果より、EP 刺激により細胞内に産生された 1O_2 は、ミトコンドリアおよび血小板活性化因子受容体由来であることを突き止めた。さらに、これらの2次的に産生された活性酸素種は、カルシウム感受性経路を介して血小板活性化因子受容体およびミトコンドリアを介して生成される可能性をはじめ明らかにした。

これらの所見は、多くの酸化ストレス関連疾患の病態や発症機序を明らかにし、さらに、細胞内の酸化ストレスに着目した疾患予防法の開発に寄与できる可能性があり、期待できると考える。

学位申請者は、本研究科修了に必要な所定の単位を修得していること、修了要件を満たしていることを成績原簿より確認した。語学能力については、日本語能力試験 (JLPT) N1 の上級レベルである。英文原著論文を1編執筆、国際学会での発表経験 (3回) があり、語学の資質は十分備わっていると判断した。

よって、総合試験の結果は合格であると認める。

博士學位論文要旨

論文題目：Singlet Oxygen from Endoperoxide Initiates an Intracellular ROS Release in HaCaT Keratinocytes

(エンドペルオキシドからの一重項酸素は、HaCaT ケラチノサイトにおける細胞内活性酸素産生を誘導する)

氏名： ELSHAFEI MARYAM EMAD

要旨： Singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) is a selective intermediate reactive oxygen species (ROS) generated naturally in biological systems by light- and non-light mediated processes. Although $^1\text{O}_2$ plays important roles in maintaining homeostasis through cell signaling, this ROS can be toxic due to its ability to diffuse across considerable distances and oxidizing biological molecules. Several *in vitro* studies have investigated the pathways by which this occurs, but understanding if and how singlet oxygen exerts cell injury through the production of subsequent ROS remains unexplored. To study this, a hydrophobic endoperoxide (EP) solution was prepared and used as a source of $^1\text{O}_2$ stimulation *in vitro*. Chemiluminescence (CL) assay was first employed to determine if EP stimulation leads to the release of ROS intracellularly. Both MCLA and L-012 CL results showed that ROS detection was significantly higher in samples containing cells when compared to those without. Additionally, this production was not limited to $^1\text{O}_2$, superoxide ($\text{O}_2^{\cdot-}$) was also detected according to the data containing scavengers targeting this ROS. However, as there is no specific CL reagent used for the detection of hydrogen peroxide (H_2O_2), an assay kit was used to measure its intracellular concentration. According to the red hydrogen peroxide assay data in media only, EP released approximately 5 μM extracellular hydrogen peroxide via normal ROS cascade. Moreover, treating the cells with a platelet activating factor receptor antagonist (WEB2086), catalase, and sodium azide (NaN_3) showed significant alleviation of H_2O_2 . These data confirmed that cellular

To analyse the effect of EP stimulation on cell function and to further confirm the aforementioned CL and H₂O₂ assay data, a cell viability assay kit (WST-8) was used. The results revealed that treating the cells with scavengers targeting intracellular superoxide (i.e., MnTMPyP), singlet oxygen (i.e., His and NaN₃), and WEB2086 improved viability, which was consistent with the CL data. Post-incubation data especially upholds the theory that exposure to EP resulted in an intracellular ROS response, as the scavengers were still effective even after removal of the stimulant. Yet, it is still unclear whether this effect is due to the oxidation of biological molecules or the consequent ROS production caused by singlet oxygen.

It was then important to identify the source of intracellular ROS in response to singlet oxygen stimulation. HaCaT keratinocytes are known to express the enzymes NADPH oxidases (Nox) at the mRNA level with different subcellular localizations, and are a source of ROS in HaCaT in response to UV irradiation. Therefore, the cells were treated with the widely used Nox inhibitor, diphenyleneiodonium chloride (DPI), prior to EP stimulation to determine if Nox is involved in this model. WST-8 assay and CL data did not show significant difference when compared to the untreated group, negating Nox as a main source of ROS in this system.

HaCaT keratinocytes express functional platelet activating factor receptor (PAF-Rs) and synthesize the potent inflammatory lipid mediator, PAF. Accordingly, using WEB2086 in the WST-8 and H₂O₂ assay was effective in improving the cell viability and lowering H₂O₂ concentration with EP stimulation. These data demonstrate that PAF-R is a source of intracellular ROS production, particularly intracellular hydrogen peroxide, in this system. Another important source for ROS in skin cells is the mitochondrial electron transport chain (ETC) as the skin is reliant on the production of ATP to undergo constant regeneration. The ETC is a system composed of transmembrane protein

complexes (I–IV) and is responsible for electron leakage leading to the production of ROS including $^1\text{O}_2$. Therefore, confocal microscopy with Si-DMA fluorescence probe was used to detect intramitochondrial singlet oxygen. The data revealed consequent intramitochondrial singlet oxygen with EP exposure for 30 minutes, which was alleviated with ETC inhibitors pre-treatment. This is in accord with the theory that singlet oxygen generation in the respiratory chain is a necessary step in ATP production. Moreover, treating the cells with the ROS scavengers targeting singlet oxygen and intracellular superoxide, and PAF-R antagonist effectively reduced intramitochondrial singlet oxygen production; which is consistent with the WST-8 assay, H_2O_2 assay, and CL data. Similarly, pre-treating the cells with DPI failed to suppress this production, further disputing Nox as a source. Lastly, intracellular calcium ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) levels play a critical role in the epidermis for normal physiological functions and ROS production. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ is implicated in the activation of Nox and mitochondrial ATP synthesis (via Krebs cycle), and is sensitive to changes in PAF concentration. Thus, intracellular calcium assay method was employed to determine whether EP stimulation induces a rise in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in this model. The data showed a dose-dependent increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ levels following EP stimulation. Furthermore, treatment of cells with WEB2086 or DPI notably alleviated $[\text{Ca}^{2+}]_i$ levels.

In conclusion, this study highlights the possibility of an indirect sustained release of intracellular ROS in response to singlet oxygen obtained via thermal decomposition of EP. These ROS are potentially generated through PAF-Rs and mitochondria via a calcium sensitive pathway.