

京都大学	博士（薬学）	氏名	猪瀬由莉
論文題目	抗酸化酵素誘導経路の新規活性化物質による酸化ストレス誘発ドーパミンニューロン死制御に関する研究		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>パーキンソン病 (PD) は中脳黒質ドーパミン作動性神経細胞の変性・脱落を特徴とする進行性の神経変性疾患であり、主な症状は運動機能障害である。現在主に行われている薬物治療法は、ドーパミンを補充して運動障害を緩和させる対症療法であり、ドーパミン神経細胞死を抑制する治療法の開発が求められている。ドーパミン神経細胞死の要因の一つとして酸化ストレスの関与が挙げられており、酸化ストレスを軽減させることがPDの有効な治療戦略であると考えられる。本研究では、転写因子nuclear erythroid 2 p45-related factor-2 (Nrf2)が抗酸化剤応答配列antioxidant response element (ARE)に結合することで、抗酸化酵素遺伝子発現を誘導するNrf2-ARE経路に着目した。化合物ライブラリーより新規活性化物質を探索し、見出した活性化物質が酸化ストレスを惹起する6-hydroxydopamine (6-OHDA)誘発ドーパミンニューロン死に対して保護作用を示すのかを<i>in vivo</i>および<i>in vitro</i>実験系で検討を行い、以下の新知見を得た。</p> <p>第一章 Nrf2-ARE経路活性化物質の探索とラット副腎褐色細胞腫PC12細胞における6-OHDA毒性に対する作用の検討</p> <p>スルフォラファンをはじめとするNrf2-ARE経路を活性化する既存の物質の多くは有効濃度域が狭いことが問題点としてある。そこで、京都大学薬学研究科が保有する化合物ライブラリーから安全域がより広いARE活性化物質の探索を試みた。ARE活性化作用は、ルシフェラーゼ遺伝子のプロモーター領域にARE配列を組み込んだレポーターアッセイにより測定した。化合物ライブラリー中の4,776種の化合物に対しハイスループットスクリーニングを行い、ARE活性化作用の強い候補化合物としてTPNA10168を得た。TPNA10168とスルフォラファンのARE活性化の効力に差はなかったが、TPNA10168はスルフォラファンに比べて50%細胞毒性濃度が2.66倍高く、より安全域が広がった。TPNA10168をPC12細胞に24時間処置したところ、Nrf2-ARE経路下流で発現が誘導される代表的な抗酸化タンパク質であるheme oxygenase-1 (HO-1)、<math>\gamma</math>-glutamyl-cysteine synthetase (<math>\gamma</math>-GCS)、NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO-1)の発現量が増加した。また、TPNA10168を24時間前処置したところ6-OHDA誘発細胞死に対して有意な保護作用を示した。以上の結果より、化合物ライブラリーより見出したARE活性化物質であるTPNA10168が、細胞の抗酸化能を増大させる物質として有用であることが示唆された。</p> <p>第二章 6-OHDA誘発パーキンソン病モデルマウスにおけるTPNA10168による中脳黒質ドーパミン神経保護作用の解析</p> <p>次に、TPNA10168がパーキンソン病モデルマウスに有効であるか検討した。6-OHDAを右脳黒質に投与したパーキンソン病モデルマウスでは、メタンフェタミンにより投与側の回転行動が誘発された。この回転運動はTPNA10168を6-OHDA投与の24時間前に皮下投与することにより用量依存的に改善した。この際、6-OHDAにより惹起された中脳黒質ドーパミンニューロン数の減少および線条体ドーパミン神経線維密度の低下もTPNA10168により有意に抑制された。また、TPNA10168皮下投与24時間後に中脳黒質においてHO-1タンパクの発現上昇がみられたが、<math>\gamma</math>-GCSおよびNQO-1の発現量に変化は見られなかった。以上の結果より、TPNA10168は皮下投与によりマウス脳内でHO-1発現を誘導し、6-OHDA誘発中脳黒質ドーパミンニューロン変性に対して保護作用を示すことが明らかになった。</p>			

### 第三章 初代培養中脳細胞における6-OHDA毒性に対するTPNA10168のドパミン神経細胞保護作用機序の解明

TPNA10168がドパミン神経保護作用を発揮する機序をラット胎仔より調製した中脳初代培養細胞を用いて検討を行った。TPNA10168を中脳初代培養細胞に24時間処置したところ、HO-1タンパク発現量が濃度依存的に増加した。そのHO-1の発現誘導はニューロンではなくアストロサイトにおいて観察された。また中脳初代培養細胞におけるTPNA10168の24時間前処置は6-OHDA誘発ドパミンニューロン死に対して保護作用を示したが、その保護作用はHO-1阻害薬により消失した。以上の結果より、中脳初代培養細胞において、TPNA10168は、アストロサイトで発現上昇したHO-1を介して6-OHDA毒性に対してドパミン神経保護作用を発揮することが示唆された。

以上、本研究では新規ARE活性化物質としてTPNA10168を化合物ライブラリーから見出した。TPNA10168は酸化ストレスにより誘発されるドパミンニューロン死に対して保護作用を示し、その保護作用にはアストロサイトにおけるHO-1の発現誘導が関与することが明らかとなった。本研究の成果は、PDにおいて本化合物がNrf2-ARE経路を活性化する新規治療薬として有望なリード化合物となり得ることを示唆するものである。

( 論文審査の結果の要旨 )

パーキンソン病 (PD) は中脳黒質ドパミン作動性神経細胞の変性・脱落を特徴とする進行性の神経変性疾患であり、主な症状は運動機能障害である。現在主に行われている薬物治療法は、ドパミンを補充して運動障害を緩和させる対症療法であり、ドパミン神経細胞死を抑制する治療法の開発が求められている。ドパミン神経細胞死の要因の一つとして酸化ストレスの関与が挙げられており、酸化ストレスを軽減させることがPDの有効な治療戦略であると考えられる。本研究では、転写因子nuclear erythroid 2 p45-related factor-2 (Nrf2)が抗酸化剤応答配列antioxidant response element (ARE)に結合することで、抗酸化酵素遺伝子発現を誘導するNrf2-ARE経路に着目した。化合物ライブラリーより新規活性化物質を探索し、見出した活性化物質が酸化ストレスを惹起する6-hydroxydopamine (6-OHDA)誘発ドパミンニューロン死に対して保護作用を示すのかを*in vivo*および*in vitro*実験系で検討を行い、申請者は以下の新知見を得た。

第一章 Nrf2-ARE経路活性化物質の探索とラット副腎褐色細胞腫PC12細胞における6-OHDA毒性に対する作用の検討

スルフォラファンをはじめとするNrf2-ARE経路を活性化する既存の物質の多くは有効濃度域が狭いことが問題点としてある。そこで、京都大学薬学研究科が保有する化合物ライブラリーから安全域がより広いARE活性化物質の探索を試みた。ARE活性化作用は、ルシフェラーゼ遺伝子のプロモーター領域にARE配列を組み込んだレポーターアッセイにより測定した。化合物ライブラリー中の4,776種の化合物に対しハイスループットスクリーニングを行い、ARE活性化作用の強い候補化合物としてTPNA10168を得た。TPNA10168とスルフォラファンのARE活性化の効力に差はなかったが、TPNA10168はスルフォラファンに比べて50%細胞毒性濃度が2.66倍高く、より安全域が広がった。TPNA10168をPC12細胞に24時間処置したところ、Nrf2-ARE経路下流で発現が誘導される代表的な抗酸化タンパク質であるheme oxygenase-1 (HO-1)、 $\gamma$ -glutamyl-cysteine synthetase ( $\gamma$ -GCS)、NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO-1)の発現量が増加した。また、TPNA10168を24時間前処置したところ6-OHDA誘発細胞死に対して有意な保護作用を示した。以上の結果より、化合物ライブラリーより見出したARE活性化物質であるTPNA10168が、細胞の抗酸化能を増大させる物質として有用であることが示唆された。

第二章 6-OHDA誘発パーキンソン病モデルマウスにおけるTPNA10168による中脳黒質ドパミン神経保護作用の解析

次に、TPNA10168がパーキンソン病モデルマウスに有効であるか検討した。6-OHDAを右脳黒質に投与したパーキンソン病モデルマウスでは、メタンフェタミンにより投与側の回転行動が誘発された。この回転運動はTPNA10168を6-OHDA投与の24時間前に皮下投与することにより用量依存的に改善した。この際、6-OHDAにより惹起された中脳黒質ドパミンニューロン数の減少および線条体ドパミン神経線維密度の低下もTPNA10168により有意に抑制された。また、TPNA10168皮下投与24時間後に中脳黒質においてHO-1タンパクの発現上昇がみられたが、 $\gamma$ -GCSおよびNQO-1の発現量に変化は見られなかった。以上の結果より、TPNA10168は皮下投与によりマウス脳内でHO-1発現を誘導し、6-OHDA誘発中脳黒質ドパミンニューロン変性に対して保護作用を示すことが明らかになった。

第三章 初代培養中脳細胞における6-OHDA毒性に対するTPNA10168のドパミン神経細胞保護作用機序の解明

TPNA10168がドパミン神経保護作用を発揮する機序をラット胎仔より調製した中脳初代培養細胞を用いて検討を行った。TPNA10168を中脳初代培養細胞に24時間処置したところ、HO-1タンパク発現量が濃度依存的に増加した。そのHO-1の発現誘導はニューロンではなくアストロサイトにおいて観察された。また中脳初代培養細胞におけるTPNA10168の24時間前処置は6-OHDA誘発ドパミンニューロン死に対して保護作用を示したが、その保護作用はHO-1阻害薬により消失した。以上の結果より、中脳初代培養細胞において、TPNA10168は、アストロサイトで発現上昇したHO-1を介して6-OHDA毒性に対してドパミン神経保護作用を発揮することが示唆された。

以上、本研究では新規ARE活性化物質としてTPNA10168を化合物ライブラリーから見出した。TPNA10168は酸化ストレスにより誘発されるドパミンニューロン死に対して保護作用を示し、その保護作用にはアストロサイトにおけるHO-1の発現誘導が関与することが明らかとなった。本研究の成果は、PDにおいて本化合物がNrf2-ARE経路を活性化する新規治療薬として有望なリード化合物となり得ることを示唆するものである。

よって、本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。また、令和2年2月10日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。