

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パミンニューロン死制御に関する研究

2019

猪瀬 由莉

## 諸言

アルツハイマー病やパーキンソン病をはじめとする神経変性疾患の患者数は、人口の高齢化とともに急激に増加しており、社会的に大きな問題となっている。パーキンソン病は、アルツハイマー病に次いで2番目に頻度の高い（本邦での有病率は100から150人/10万人）神経変性疾患である。中脳黒質緻密部のドパミン作動性ニューロンの変性・脱落を病理学的特徴とし、その投射先である線条体のドパミン量が減少することによって安静時振戦・筋固縮・無動・姿勢反射障害を主症状とする運動障害が現れる。現行の主な薬物療法は、ドパミン補充薬による運動機能を改善させる症状の緩和であるが、病態の進行に伴い **Wearing off** 現象やジスキネジアというような副作用が出現しやすくなり治療薬でのコントロールが難しくなるという問題点がある。これは、ドパミンニューロンが失われてドパミンの再取り込み機能が低下することが関係する。したがって、残存するドパミンニューロンの消失を抑える作用機序をもつ根本的な治療薬の開発が重要であると考えられる。しかしながら現在のところ病気の進行を止める有効な治療法は確立されていない。

パーキンソン病の病態形成の詳細な機序は明らかになっていないが、パーキンソン病患者の剖検脳において脂質の過酸化やグルタチオン量の低下が観察されることなどが報告されていることから、パーキンソン病の病態形成に酸化ストレスの関与が挙げられている。さらに、ドパミンが自動酸化して生成する酸化中間体もドパミンニューロン死を引き起こす危険因子として指摘されていることから黒質のドパミンニューロン変性には酸化ストレスが密接に関わっていると考えられる。したがって、酸化ストレスを軽減させることがパーキンソン病の有効な治療戦略として期待される。

そこで、本研究では神経保護を目的として、酸化ストレスに対する生体内に備わる抗酸化酵素誘導経路（Nrf2-ARE 経路）に着目し、同経路活性化物質の同定から保護作用および神経保護作用機序について検討を行い、以下に述べる新知見を得た。

# 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

酸化ストレスは、活性酸素種 (ROS) の産生と除去のバランスが崩れた結果引き起こされる。酸化ストレスによって細胞の DNA やタンパク質、脂質が傷害されることにより、老化や発がん、神経疾患、動脈硬化、心筋梗塞、メタボリックシンドロームなど様々な疾患の病態形成に関与することがこれまでも報告されている。パーキンソン病患者の剖検脳において脂質の過酸化や DNA の傷害、タンパクのカルボニル化およびグルタチオン量の低下が観察されるなどパーキンソン病と酸化ストレスの関係が指摘されている。さらに、ドパミンは自身の自動酸化中間体である  $\alpha$ -キノンやアミノクロームが細胞毒性を示すことが報告されており、ドパミンニューロン死を引き起こす危険因子として指摘されている。ドパミンニューロン死を引き起こす危険因子として指摘されている。パーキンソン病モデル動物の作製に用いられる神経毒である MPTP は、脳内で MPP<sup>+</sup>に代謝されてドパミンニューロンに取り込まれ、ミトコンドリアの呼吸鎖複合体 I を阻害することで大量の ROS を産生させ、ドパミンニューロン変性を促進させる。孤発性パーキンソン病患者の中脳黒質においてミトコンドリアの複合体 I 活性の低下が報告されている。遺伝性パーキンソン病の原因遺伝子産物である PINK1 は、ミトコンドリアの品質管理を担うことが報告されているが、PINK1 遺伝子が障害されることにより ROS の産生が増加することが報告されている。これらより、酸化ストレスを軽減することがドパミンニューロン死の抑制に重要であると考えられる。ROS に応答して抗酸化酵素を誘導する機構として、nuclear erythroid 2 p45-related factor-2 (Nrf2)-antioxidant response element (ARE)経路が知られており、生体を防御する体内抗酸化システムとして重要な役割を担っている。非酸化ストレス状態では、転写因子である Nrf2 は抑制因子である kelch-like ECH-associated protein1 (Keap1)と結合して、プロテアソームによる分解を常に受けて低い Nrf2 レベルが保たれている。しかし、細胞が酸化ストレス条件下になると、Nrf2 のプロテアソームによる分解が抑制され、Nrf2 が Keap1 から解離して核内に移行し、薬物代謝第二相酵素や抗酸化タンパクなどの遺伝子のプロモーター領域に存在する ARE 配列に結合することで遺伝子発現を誘導する。このように Nrf2-ARE 経路は酸化ストレスを軽減することから、酸化ストレスに対するドパミンニューロン保護への応用が期待される。既知の Nrf2-ARE 活性化物質の多くは求電子構造をもち、Nrf2 の抑制因子である Keap1 のシステイン残基のチオール基と反応することで Nrf2 の核移行を促進する。しかしながら、その求電子性により非特異的にチオール基と反応することが問題点として挙げられる。実際、ブロッコリーから単離され ARE 活性化物質として知られるスルフォラファンをはじめとする ARE 活性化物質は、低濃度で細胞保護作用を示す一方で細胞毒性を示す濃度が近く有効濃度域が狭

いことが報告されていることから、より毒性の低い新規 ARE 活性化物質の探索が求められる。そこで、本章では京都大学薬学研究科が保有する化合物ライブラリーに対してスクリーニングを行い高活性かつ低毒性の ARE 活性化物質の探索を試みるとともに、酸化ストレスを惹起する 6-hydroxydopamine (6-OHDA) 誘発性の毒性に対する細胞保護作用とその機序について培養細胞系を用いて検討を行った。

ARE 活性化物質探索のため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 4,776 種の化合物に対してレポーター PC12 細胞を用いてスクリーニングを行い、ARE 活性作用を検討した結果、低濃度域から高濃度域にかけて濃度依存性を示し ARE 活性作用の強い有望な候補化合物として TPNA10168 を得た。Nrf2-ARE 経路活性化物質の多くは親電子性に起因して細胞毒性を示すことが報告されている。そこで、既知の Nrf2-ARE 経路活性化物質との有用性を検討するため、代表的な Nrf2-ARE 経路活性化物質として知られるスルフォラファンと TPNA10168 の ARE 活性作用および細胞毒性を比較検討したところ、ARE 活性作用に差はなかったが、TPNA10168 はスルフォラファンに比べて 50%細胞毒性濃度が 2.66 倍でより低い細胞毒性を示した。このことから、TPNA10168 はより細胞毒性の低い ARE 活性化物質であると考えられる。次に、TPNA10168 の抗酸化酵素遺伝子誘導作用を評価するため、Nrf2-ARE 経路下流の代表的な抗酸化酵素である  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase ( $\gamma$ -GCS)、heme oxygenase-1 (HO-1)、NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) の発現量を調べたところ、PC12 細胞において TPNA10168 の処置により、 $\gamma$ -GCS、HO-1、NQO1 の発現量が濃度依存的に上昇した。活性酸素を生成し細胞死を引き起こすドパミン神経毒である 6-hydroxydopamine (6-OHDA) に対する TPNA10168 の細胞保護作用を検討した結果、TPNA10168 の 24 時間前処置が 6-OHDA 細胞毒性に対して濃度依存的に保護作用を示すことが明らかになった。そこで、PC12 細胞における保護作用機序を解明するため、それぞれの抗酸化酵素の阻害薬による検討を行ったところ、NQO1 阻害薬が TPNA10168 の保護作用を抑制したことから、PC12 細胞の保護作用には NQO1 が関与することが示された。

以上の結果より、化合物ライブラリーより見出した新規 Nrf2-ARE 経路活性化物質である TPNA10168 は、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された。また、ラット副腎褐色細胞株である PC12 細胞において TPNA10168 は、6-OHDA 誘発細胞毒性に対して抗酸化タンパク質である NQO1 を介して保護作用を示すことが明らかになった。

## 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

ドパミンの代謝やミトコンドリア機能障害、神経炎症によって産生された ROS とパーキンソン病との関連を示す知見がこれまでも報告されている。さらに、早期パーキンソン病患者では家族性パーキンソン病遺伝子の発症遺伝子である DJ-1 の酸化型が増加することなどから、酸化ストレスがパーキンソン病発症早期から関わっていることが考えられる。そのため、酸化ストレスを軽減することはパーキンソン病の進行を抑制する有効な治療戦略になり得る。ドパミンニューロンの Nrf2 のノックダウンマウスが 6-OHDA や MPTP 毒性に対して脆弱であることや、Keap1 ノックダウンが MPTP 誘発ドパミンニューロン傷害に対して部分的な保護作用を示すことが報告されていることから Nrf2-ARE 経路はパーキンソン病の病態形成において重要な役割を果たしていると考えられる。実際、パーキンソン病患者においてもドパミンニューロンで Nrf2 の核内移行が報告されている。第一章では、TPNA10168 は PC12 細胞において細胞の抗酸化能を増大させる新規 Nrf2-ARE 経路活性化物質であることが示されたが、動物における黒質ドパミンニューロン変性に対する作用は不明であるので、本章では 6-OHDA 誘発パーキンソン病モデルを作製し、TPNA10168 がドパミンニューロン死に対して保護作用を示すか否かを検討した。

6-OHDA を右脳黒質に投与した一側性パーキンソン病モデルマウスを作製し、TPNA10168 の作用について検討を行ったところ、6-OHDA 投与群では黒質における TH 陽性ドパミンニューロン数の減少および線条体における TH 陽性の神経線維密度の低下が観察されたが、これらは、TPNA10168 を 6-OHDA 投与前日に皮下投与することにより有意に抑制された。6-OHDA の投与により片側の黒質が傷害されたマウスは、メタンフェタミンの投与によって投与側への回転運動が誘発されるが、この運動障害は TPNA10168 の前投与により用量依存的に抑制された。これらより、TPNA10168 は皮下投与により抗パーキンソン病作用を示すことが示唆された。マウス脳内での抗酸化酵素の発現を検討したところ、TPNA10168 の皮下投与により中脳腹側部において HO-1 タンパクの発現量の増加が観察されたが、 $\gamma$ -GCS や NQO1 の発現量に変化は見られなかった。このタンパク発現量の変化は、線条体でも同様に見られた。さらに、TPNA10168 による HO-1 の発現誘導がどの細胞で起こっているかを蛍光二重染色を用いて検討したところ、HO-1 が発現誘導は、GFAP 陽性アストロサイトで観察された。以上、本研究により、第一章で化合物ライブラリーより見出した新規 Nrf2-ARE 経路活性化物質である TPNA10168 の全身投与によって中脳腹側や線条体の脳組織で HO-1 を発現上昇させ、6-OHDA 誘発パーキンソン病モデルマウスに対して抗パーキンソン病作用をもつことが示された。

## 第三章

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

本章では、より詳細な機序を得るため、ラット胎仔より摘出した中脳初代培養細胞を用いて TPNA10168 のドパミンニューロン保護作用について検討を行った。

中脳初代培養細胞においても TPNA10168 の処置によって HO-1 のタンパク発現量は濃度依存的に上昇したが、 $\gamma$ -GCS、NQO1 のタンパク発現量に変化はなかった。初代培養細胞において HO-1 発現細胞を同定するために蛍光二重染色を行ったところ、HO-1 の発現は、マウスへの TPNA10168 の投与と同様に GFAP 陽性アストロサイトで観察された。Nrf2-ARE 経路が活性化したアストロサイトがニューロンを保護することが報告されていることから、アストロサイトがニューロンを間接的に保護することが考えられる。中脳初代培養細胞における TPNA10168 のドパミンニューロン保護作用を検討したところ、6-OHDA 曝露によってドパミンニューロンの生存率低下が惹起されたが、TPNA10168 の 24 時間前処置により有意にドパミンニューロン死が抑制された。この TPNA10168 の 6-OHDA に対する保護作用は、HO-1 阻害薬によりほぼ完全に抑制されたことから、TPNA10168 の保護作用には HO-1 が重要な役割を果たすことが明らかとなった。HO-1 はヘムを分解し、 $\text{Fe}^{2+}$ 、一酸化炭素 (CO)、ビリベルジンを産生する。そこで、CO との結合能をもつヘモグロビンを処置したところ、TPNA10168 のドパミンニューロン保護作用が消失した。さらに、CO はグアニル酸シクラーゼ (GC)/プロテインキナーゼ G (PKG) 経路を活性化する。GC 阻害薬である ODQ および PKG 阻害薬である KT5823 の処置により TPNA10168 によるドパミンニューロンの保護作用は消失したことから、TPNA10168 のドパミンニューロン保護には HO-1 によって産生されるヘムの分解産物である CO および CO が活性化する GC/PKG 経路が神経保護に関与することが示された。

以上より、新規 Nrf2-ARE 経路活性化物質である TPNA10168 はアストロサイトにおいて酸化酵素 HO-1 の発現を誘導し、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ことが明らかになった。さらに、HO-1 によって産生されるヘムの分解産物である CO および CO が活性化する GC/PKG 経路が神経保護に関与することが示された。これらの結果は、アストロサイトの間接的なドパミンニューロン保護作用を支持するものであり、HO-1 のドパミンニューロン保護への関与の役割を提案するものである。

## 総括および結論

本研究ではドパミン神経保護を目的として、酸化ストレスに対する主要な生体防御システムである Nrf2-ARE 経路に着目し、新規 Nrf2-ARE 経路活性化物質の同定から保護作用および神経保護作用機序について検討を行い、以下の新知見を得た。

第一章では、京都大学薬学研究科の化合物ライブラリーより新規 Nrf2-ARE 経路活性化物質の探索を行い、同経路の有望な活性化物質として TPNA10168 を見出した。TPNA10168 は代表的な Nrf2-ARE 経路活性化物質であるスルフォラファンよりも細胞毒性が低いことが示された。また、ラット副腎褐色細胞腫由来ドパミン産生細胞株である PC12 細胞において、TPNA10168 が 6-OHDA 誘発毒性に対して抗酸化酵素を誘導して細胞保護作用を示すことを明らかにした。

第二章では、TPNA10168 の全身投与によりマウス脳内で Nrf2-ARE 経路下流で産生される抗酸化酵素である HO-1 の発現上昇が確認された。6-OHDA を中脳黒質に投与することによって作製した片側パーキンソン病モデルマウスにおける黒質ドパミンニューロンの消失や行動障害に対して、TPNA10168 の皮下投与が改善効果を示すことを確認した。

第三章では、ラット初代培養中脳細胞において TPNA10168 の 6-OHDA 毒性に対するドパミンニューロン保護作用には HO-1 が関与することを明らかにした。この機序として、アストロサイトで発現上昇する HO-1 の分解産物である CO が GC/PKG 経路を介してドパミンニューロン保護に寄与することが示された。

以上、著者は、化合物ライブラリーより見出した新規 Nrf2-ARE 経路活性化物質である 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を示し、同化合物がパーキンソン病モデルマウスへの全身投与によって抗パーキンソン病作用を示すことを明らかにした。さらに、このドパミンニューロン保護作用機序として、ニューロンではなくアストロサイトでの抗酸化酵素 HO-1 の発現誘導が関与することを明らかにした。これらの知見は、パーキンソン病において本化合物がドパミンニューロンを保護するリード化合物となり得ること、アストロサイトにおいて HO-1 発現を制御することが新規治療戦略として有望であることを示唆するものである。