

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

# 目次

諸言	2
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	5
実験方法	7
実験結果	10
考察	17
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	19
実験方法	20
実験結果	23
考察	27
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	29
実験方法	30
実験結果	32
考察	36
総括および結論	38
謝辞	39
発表論文目録	40
引用文献	41

## 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、大きな社会問題となっている。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、以下の新知見を得た。

第一章では、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。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 誘発毒性に対して細胞保護作用を示すことを明らかにした。

第二章では、6-OHDA によって惹起されるマウス中脳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、初代培養中脳細胞において TPNA10168 のドパミン神経保護作用にはアストロサイトで産生された抗酸化酵素のひとつである HO-1 が関与することを示した。

これらの研究成果について、以下に論述する。

なお、本文中および図中で使用した略語は以下の通りである。

ARE; antioxidant response element

BSO; buthionine sulfomine

CO; carbon monoxide

DAB; diaminobenzidine

DDC; 2'3'-dihydroxy-4'6'-dimethoxychalcone

DMEM; Dulbecco's modified Eagle medium

DPPH; 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

EMEM; Eagle's minimum essential medium

FBS; fetal bovine serum

EGTA; ethyleneglycol bis(2-amino-ethylether)tetraacetic acid

GAPDH; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

GC; guanylate cyclase

$\gamma$ -GCS;  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase

GFAP; glial fibrillary acidic protein

GSH; reduced form of glutathione

HO-1; heme oxygenase-1

HPR; horseradish peroxidase

HS; horse serum

Iba1; ionized calcium-binding adapter molecule 1

Keap1; Kelch-like ECH-associated protein 1

MAP2; microtubule associated protein 2

MPTP; 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine

MTT; 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide

Nrf2; erythroid 2-related factor 2

NQO1; NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1

ODQ; 1*H*-[1,2,4] oxaziazolo [4,3-*a*] quinoxalin-1-one

PBS; phosphate buffered saline

PI3K; phosphatidylinositol 3-kinase

PKG; protein kinase G

PVDF; polyvinylidene difluoride

ROS; reactive oxygen species

SDS; sodium dodecyl sulfate

siRNA; small interfering RNA

TBS; Tris buffered saline

TH; tyrosine hydroxylase

ZnPPIX; zinc protoporphyrin IX

6-OHDA; 6-hydroxydopamine

# 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[1-6]。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[7-10]などの報告より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[11-14]。さらに、ドパミンは自身の自動酸化中間体である  $\sigma$ 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[15-16]、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 [17]。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[18]。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[19]、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[20]。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 (図 1-1)、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[21]。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[22]。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[23]。酸化ストレスから生体を防御するにはビタミン C やビタミン E などの抗酸化物質を摂取する方法もあるが、生体内で細胞を保護する濃度を常に維持することは非常に難しい。そこで、Nrf2-ARE 経路を活性化して酸化ストレスに対する細胞の抵抗性を上げることで、酸化ストレスからのドパミンニューロン保護への応用が期待できると考える。

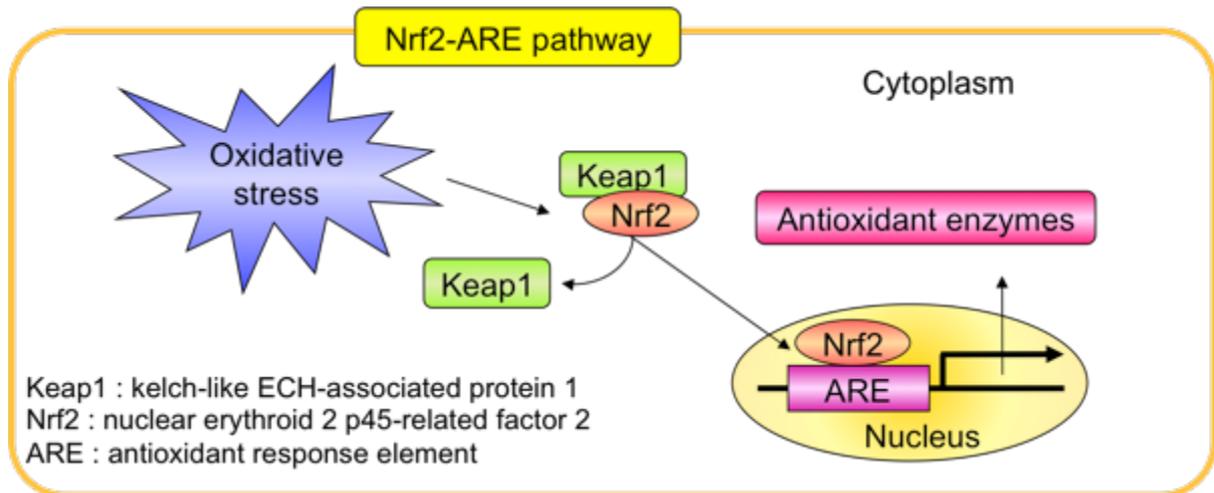


図 1-1 Nrf2-ARE 経路の模式図

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[24-25]。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[26-28]、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。

## 実験方法

### 試薬

6-OHDA hydrochloride, buthionine sulfoximine (BSO)は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)から購入し、ジクマロールは和光純薬工業株式会社（大阪、日本）から購入した。Zinc protoporphyrin IX (ZnPPIX)は Merck Millipore (Darmstadt, Germany)より、LY294002 は Calbiochem (San Diego, CA, USA)より購入した。

### PC12 細胞培養

ラット副腎髄質褐色細胞腫由来ドパミン産生細胞株 PC12 細胞は、5% fetal calf serum (FBS) と 10% horse serum (HS) 含有 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)を用いて、5% CO<sub>2</sub>、37°Cの環境下で培養維持した。

### ルシフェラーゼレポーターアッセイ

ラット NQO1 遺伝子の ARE 配列を含むプロモーター領域をルシフェラーゼ遺伝子の上流に組み込み PC12 細胞に安定発現させたレポーター細胞[29]を用いて、ARE 活性化により生成したルシフェラーゼによる発光強度を EnVision Multilabel Plate Reader (PerkinElmer, Waltham, MA)により検出した。Nrf2 活性化物質のスクリーニングは Biomek NX liquid handling automation workstation (Beckman Coulter Inc, Brea, CA)を用いて行った。4,776 種の化合物を保有する化合物ライブラリーは京都大学薬学研究科から得た。PC12 レポーター細胞は 384 穴マイクロプレートに 20  $\mu$ l ずつ播種し 24 時間培養した。薬物が最終濃度を 10  $\mu$ M となるよう細胞に薬物を 9 時間処置した後、発光試薬 ONE-Glo luciferase assay reagent (Promega, Madison, WI)を加えて上記検出器により測定した。

### ラジカル捕捉能力の評価

ラジカル捕捉能力は[30]に記載の方法を基本としてメタノール中 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)ラジカルの減少を評価した。DPPH ラジカルは溶媒に溶かすと紫色を呈するが DPPH ラジカルが消去されると色が薄くなる。180  $\mu$ l の DPPH ラジカル溶液に 20  $\mu$ l の薬物含有溶液を加え、最終濃度を 1-300  $\mu$ M に調整し、30 分後に DPPH ラジカル残量を 540 nm の吸光度により測定した。

## PC12 細胞生存率の評価

PC12 細胞生存率の評価は 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay により行った。MTT は、細胞内の脱水素酵素により還元され、青色の不溶性ホルマザンを生成し、このホルマザン量は生存細胞数に依存して増加するため溶解液の吸光度は生存細胞数を比例関係的に反映する。薬物処置後の細胞を、MTT(0.5 mg/ml)含有血清不含 DMEM 中で 30 分間、37°C で反応させた。イソプロパノールで細胞を可溶化して生成したホルマザン色素を漏出させ、マイクロプレートリーダーで吸光度 (570 nm) を測定した。コントロール細胞における吸光度を 100% として生存率を算出した。

## RNA 干渉による Nrf2 のノックダウン

Small interfering RNAs (siRNA) は Invitrogen から購入し、製品プロトコールに従って行った。Nrf2 を標的とする siRNA の配列は以下の通りである。

#1: 5'-UUAA GACA CUGU AACU CGGG AAUGG-3'

#2: 5'-UUUA AGUG GCCC AAGU CUUG CUCCA-3'

Steath™ RNA Negative Control Medium GC Duplex #2 (Invitrogen) を siRNA のネガティブコントロールとして使用した。培地は 48 時間インキュベートした後に交換し、さらにその後 9 時間薬物処置をした。

## ウエスタンブロットティング

薬物処置後の細胞を TBS で洗浄後、氷冷した細胞溶解液 (20 mM Tris, 25 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 2 mM EGTA, 1% TritonX-100, 1mM vanadate, 1% aprotinin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 2mM dithiothreitol, pH 7.0) を用いて回収し、4°C、17,000 g で 30 分間遠心分離することによりタンパク上清を得た。Bio-Rad Protein assay kit によりタンパク濃度を揃えた後、タンパク上清液と等量のサンプル緩衝液 (124 mM Tris, 4% SDS, 10% glycerol, 0.02% bromophenol blue, 4% 2-mercaptoethanol, pH 6.8) を混合した。100°C で 5 分間熱処理することでタンパクの変性と SDS 化を行った後、12% SDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行った。分離されたタンパクは 15V の電圧をかけることにより PVDF 膜 (Millipore) に転写した。転写後の PVDF 膜は、0.1% Tween20 含有 TBS (TBS-T) で洗浄し、5% スキムミルク含有 TBS を用い室温で 1 時間ブロッッキング処理を施した。その後、一次抗体液と西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP) 標識二次抗体を順に室温で 1 時間反応させた。二次抗体反応後、PVDF 膜を TBS-T で洗浄し、Enhanced Chemiluminescence detection system (GE Healthcare) を用い、luminescence image analyzer (LAS-4000, FUJIFILM) でバンドを検出した。バンドの発光強度は Image-J software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) を用いて解析した。一次抗体として、抗  $\beta$ -actin 抗体 (1:100,000; A1998, Sigma-Aldrich)、抗  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase ( $\gamma$ -GCS) 抗体 (1:1000; H300, Santa Cruz Biotechnology)、抗 heme oxygenase-1 (HO-1) 抗体 (1:1000;

ADI-SPA-895, Enzo Life Science)、抗リン酸化 Akt 抗体 (1:1000; #9271, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)、抗 NAD(P)H:quinine oxidoreductase 1 (NQO1)抗体 (1:1000, sc16464, Santa Cruz Biotechnology) を使用した。

#### 細胞内還元型グルタチオン量の測定

細胞内グルタチオン (GSH) 量は GSH と結合して蛍光を発する monochlorobimane (Sigma) を用いて評価した。薬物処置した PC12 細胞を 50  $\mu$ M 含有 Krebs-Ringer 緩衝液 (125 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 25 mM HEPES, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5.6mM glucose, 2.2 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4) で 30 分間インキュベート後、1% Triton X-100 を含む同緩衝液で細胞を破壊し、細胞溶解液の蛍光強度を蛍光測定器により測定した。(励起波長 355 nm, 蛍光波長 460 nm)

#### NQO-1 活性の測定

薬物処置した PC12 細胞を回収し、potassium buffer (50 mM potassium phosphate, pH 7.4, containing 1 mM EGTA)を加えてソニケーションにより上清を回収した。40  $\mu$ l の上清と 160  $\mu$ l の酵素反応液 (potassium buffer containing 50  $\mu$ M menadine, 0.5% bovine serum albumin, 0.025% Tween-20, 5  $\mu$ M flavin adenine dinucleotide, 1 mM glucose-6-phosphate, 2 U/ml glucose-6-phosphate dehydrogenase, 30  $\mu$ M nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, 0.3 mg/ml MTT) を混合して発光させ、570 nm の吸光度を測定した。非特異的な反応には 50  $\mu$ M のジクマロールを用い、測定値から引くことで値を算出した。

#### 統計処理

データは平均値 $\pm$ 標準誤差で表した。統計学的有意差は、一元配置分散分析法後の Turkey's test により評価した。危険率 5%未満の場合に統計学的に有意な差があると判定した。

## 実験結果

### スクリーニングによる新規 Nrf2-ARE 活性化物質の選択

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、ARE 活性化物質探索のためレポーターPC12 細胞を用いてスクリーニングを行った (図 1-2A)。レポーターアッセイにより ARE 活性の高かった上位 10 種類の化合物の ARE 活性を再検討した結果、すべての化合物において濃度依存的な活性の上昇が観察された (図 1-2B)。これらの化合物の構造を図 1-2C に示す。この 10 種類の化合物中、TPNA10168 は低濃度域から作用が強く最大活性作用を示すことが明らかになった。よって、TPNA10168 を用いて以降の検討を行った。

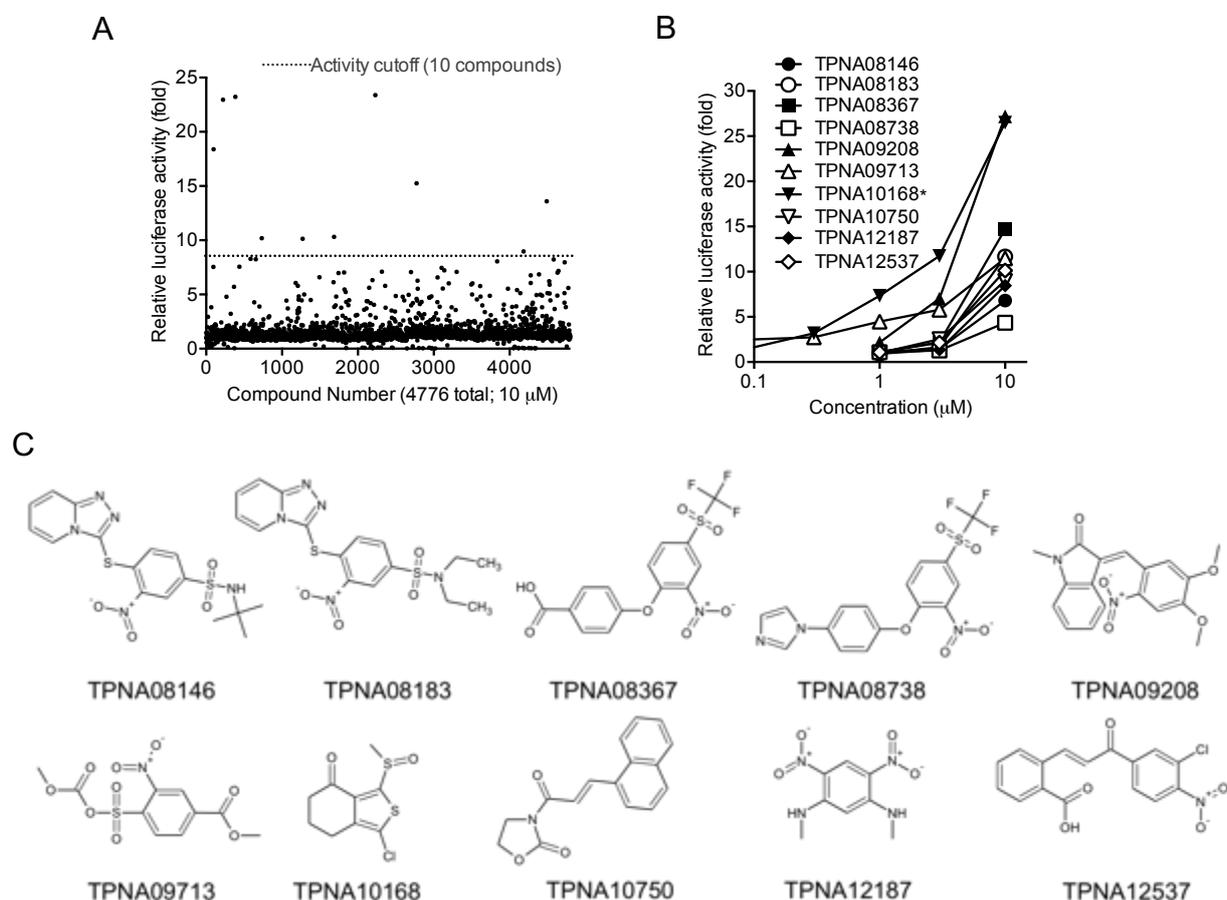


図 1-2 レポーターアッセイによる ARE 活性化物質の同定

(A) 化合物ライブラリーの化合物による ARE 活性化の散布図。上位 10 種の化合物を点線で区切った。化合物 (10  $\mu\text{M}$ ) を PC12 レポーター細胞に 9 時間処置した。n = 1. (B) 上位 10 種の化合物による濃度依存的 ARE 活性化作用。PC12 レポーター細胞に 10 種の化合物を 9 時間処置した。n = 3. (C) スクリーニングより得られた上位 10 種の化合物の構造。

### TPNA10168 の Nrf2-ARE 活性化物質としての特性

ARE ルシフェラーゼレポーターアッセイによって、TPNA10168 はサブマイクロ濃度域から発光反応を増加させ、濃度依存的に ARE 活性化作用を示すことが分かった (図 1-3A)。ルシフェラーゼ活性は TPNA10168 処置 12 時間後にピークを示した (図 1-3B)。Nrf2-ARE 経路活性化物質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[31]。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に、代表的な Nrf2-ARE 経路活性化物質として知られるブロッコリーから単離されたスルフォラファンと TPNA10168 の ARE 活性化作用および単独毒性の比較検討を行った。スルフォラファンと比較して、TPNA10168 は低濃度では ARE 活性化の効力に差はないが、高濃度においては毒性が見られずより高い ARE 活性化作用を示した (図 1-3C)。単独毒性の比較検討において、スルフォラファンの 50%細胞毒性濃度は 18.90  $\mu\text{M}$  だったのに対し、TPNA10168 は 50.34  $\mu\text{M}$  で 50%細胞毒性濃度が 2.66 倍であった (図 1-3D)。また、TPNA10168 のラジカル捕捉能力を評価するために DPPH アッセイを行ったところ、TPNA10168 自身には DPPH ラジカルスカベンジャー活性が見られなかった (図 1-3E)。

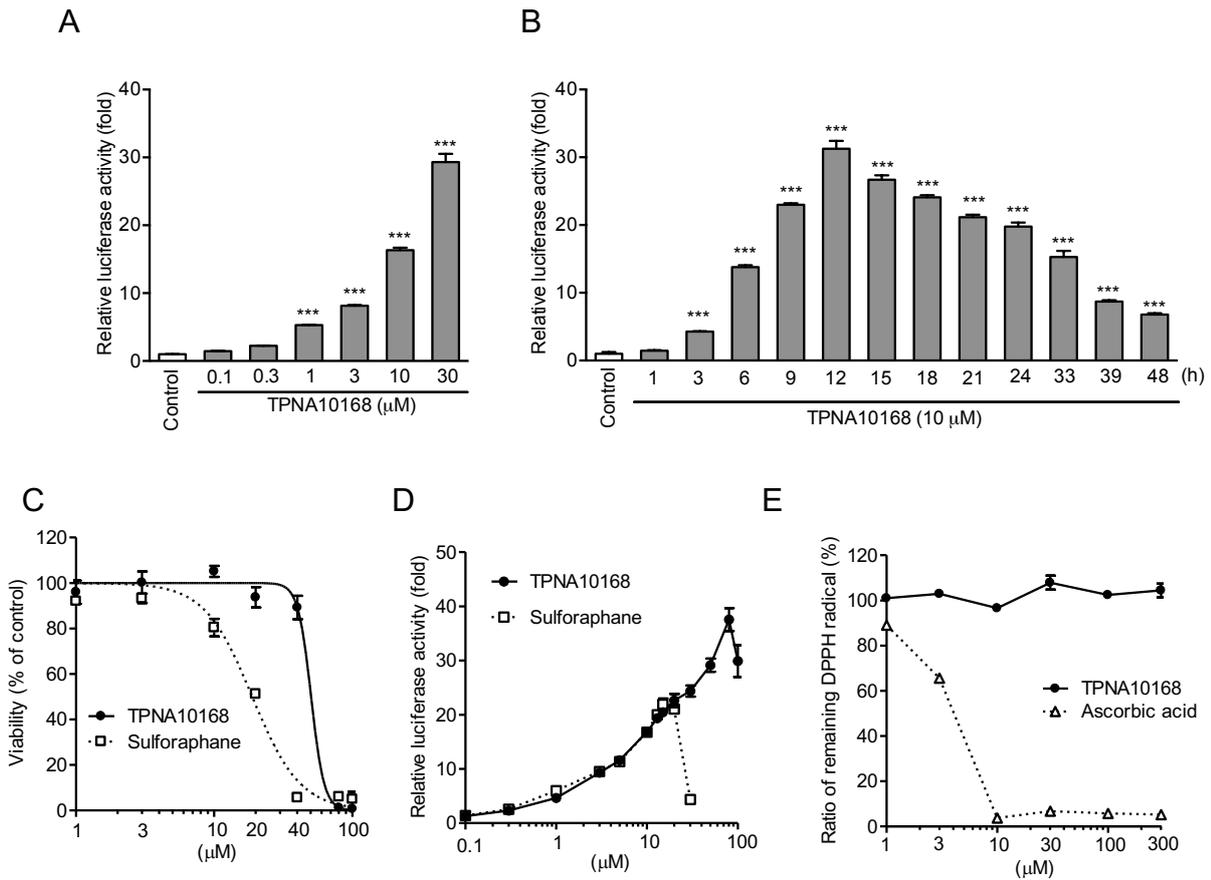


図 1-3 ARE 活性化物質として同定された TPNA10168 の効力と安全性

(A) ARE 活性化における TPNA10168 の濃度依存的な作用。PC12 細胞に TPNA10168 (0.1-30 μM) を 9 時間処置した。n = 3。  
 (B) TPNA10168 処置による ARE 活性化作用の経時変化。PC12 細胞に TPNA10168 を 1-48 時間処置した。n = 3。  
 C-D: ARE 活性化作用(C)と細胞毒性(D)における TPNA10168 とスルフォラファンとの比較。PC12 レポーター細胞および PC12 細胞に TPNA10168 およびスルフォラファン処置を 9 時間(C)あるいは 24 時間(D)行った。  
 (E) セルフリー条件下での TPNA10168 とアスコルビン酸のラジカル捕捉作用。\*\*\*P < 0.001 vs. control.

### PC12 細胞において TPNA10168 が抗酸化酵素発現誘導に与える影響

TPNA10168 の ARE 活性化作用に Nrf2 が関与することを確認するため、Nrf2 のノックダウンを行った。ここでは、Nrf2 の mRNA を 50%程度低下させることが確認されている二種類の siRNA を用いた[29]。TPNA10168 によって増加した ARE ルシフェラーゼ活性は、これらの siRNA による mRNA ノックダウンにより顕著に低下した (図 1-4A)。Nrf2 活性の制御には、phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)などの様々なキナーゼが関与することが報告されている[29,32-33]。PC12 細胞への TPNA10168 の処置は、PI3K の下流である Akt のリン酸化を誘導した (図 1-4B)。さらに、TPNA10168 によって増加した ARE 活性は、PI3K の阻害薬である LY294002 によって有意に低下した (図 1-4C)。これらの結果より、TPNA10168 の Nrf2-ARE 経路の活性化には PI3K 経路が関与することが示された。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  $\gamma$ -GCS、HO-1、NQO1 の発現量を調べた。PC12 細胞に TPNA10168 を処置したところ、 $\gamma$ -GCS、HO-1、NQO1 の発現量が濃度依存的に上昇した (図 1-4D)。さらに、細胞内 GSH 量 (図 1-4E)および NQO1 活性 (図 1-4F)も濃度依存的に上昇した。

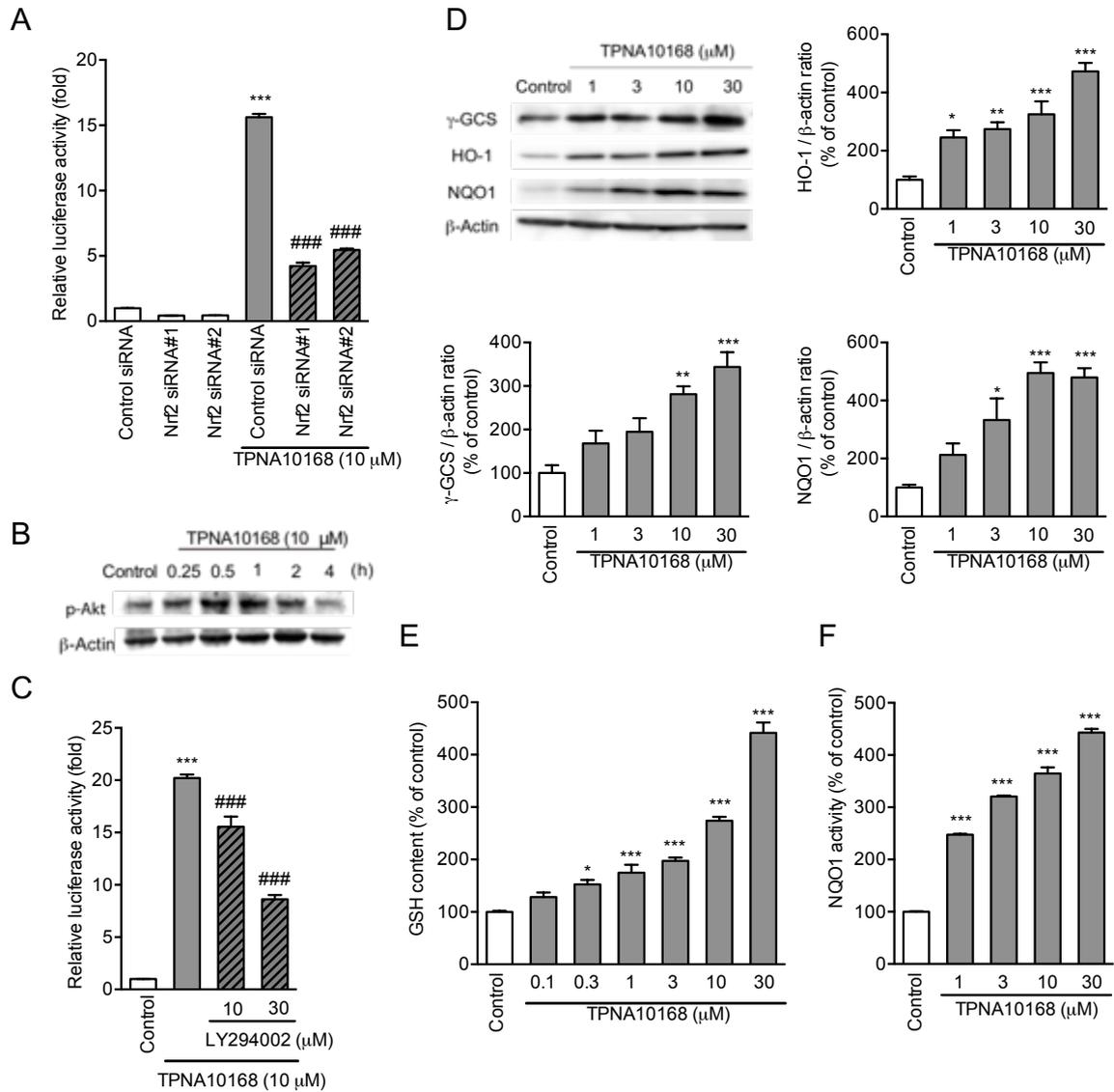
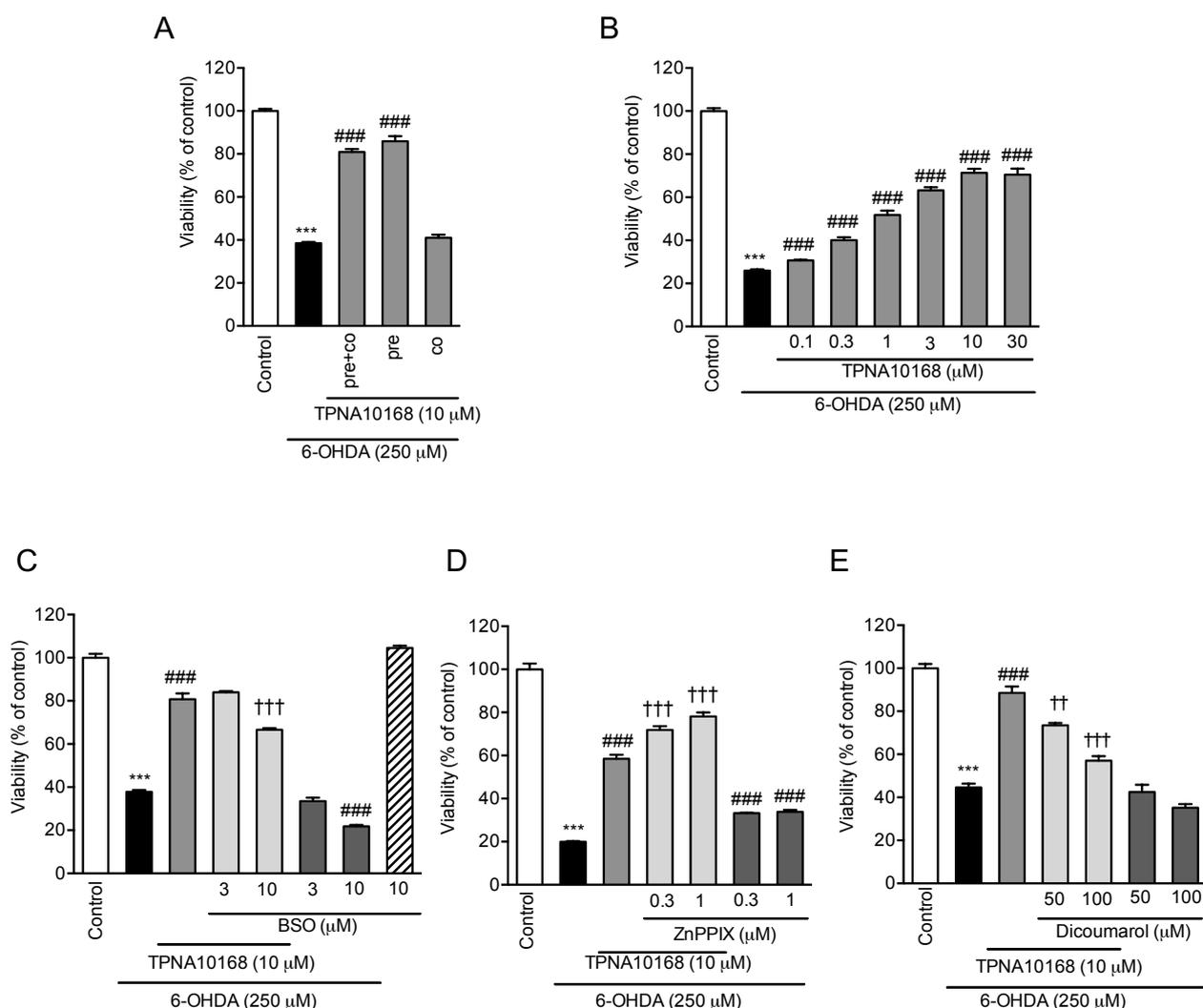


図 1-4 PC12 細胞における ARE 由来抗酸化酵素誘導に対する TPNA10168 の作用

(A) TPNA10168 による ARE 活性化における siRNA の作用。PC12 レポーター細胞に siRNA トランスフェクトした 48 時間後、TPNA10168 (10 μM) を 9 時間処置した。n = 3. (B) Akt のリン酸化に対する TPNA10168 の作用。PC12 細胞に TPNA10168 (10 μM) を 0.25-4 時間処置した。β-actin はローディングコントロールとして用いた。(C) TPNA10168 による ARE 活性化における LY294002 の作用。PC12 レポーター細胞に LY294002 (10-30 μM) の存在下もしくは非存在下で TPNA10168 (10 μM) を 9 時間処置した。n = 3. (D) γ-GCS、HO-1、NQO1 の発現量における TPNA10168 の作用。PC12 細胞に TPNA10168 (10-30 μM) を 24 時間処置した。β-actin はローディングコントロールとして用いた。n = 3. (E) TPNA10168 が GSH 量に与える影響。PC12 細胞に TPNA10168 を 24 時間処置した。n = 4. (F) TPNA10168 が NQO1 活性に与える影響。PC12 細胞に TPNA10168 を 24 時間処置した。n = 4. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 vs. control, ###P < 0.001 vs. TPNA10168.

## PC12 細胞において TPNA10168 が 6-OHDA 毒性に与える影響

6-OHDA は、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-OHDA の処置に対して TPNA10168 を 24 時間前処置 (pre)、前処置に加えて 6-OHDA と同時処置 (pre+co) を比較したところ、双方の保護作用は同程度であった。一方、6-OHDA と同時処置 (co) は保護作用を示さなかった (図 1-5A)。そこで、以降では TPNA10168 の前処置のみによる検討を行った。TPNA10168 は、6-OHDA 細胞毒性に対して濃度依存的に保護作用を示し、10  $\mu\text{M}$  でプラトーに達した (図 1-5B)。そこで、保護作用機序を解明するため以降の検討では 10  $\mu\text{M}$  の濃度を用いた。 $\gamma$ -GCS、HO-1、NQO1 が TPNA10168 の保護作用に関与するかを検討するために、それぞれの酵素の阻害薬である BSO、ZnPPiX、ジクマロールによる検討を行った。BSO (10  $\mu\text{M}$ ) は TPNA10168 の保護作用を部分的に抑制したが、BSO 単独(10  $\mu\text{M}$ )で 6-OHDA 毒性を増悪した (図 1-5C)。ZnPPiX は単独で保護作用が見られ、TPNA10168 の保護作用を増強した (図 1-5D)。ジクマロールは、濃度依存的に TPNA10168 の保護作用を抑制した (図 1-5E)。



**図 1-5 PC12 細胞における 6-OHDA 誘発細胞毒性に対する TPNA10168 の作用**

(A) 6-OHDA 毒性に対する TPNA10168 の細胞保護作用におけるタイムコースの検討。PC12 細胞に TPNA10168 (10  $\mu$ M) の 24 時間前処置条件下または非条件下および共処置条件下または非条件下で 6-OHDA (250  $\mu$ M) を 24 時間処置した。n = 4. (B) 6-OHDA 細胞毒性に対する TPNA10168 の濃度依存的保護作用。PC12 細胞に TPNA10168 (0.1-30  $\mu$ M) 存在下もしくは非存在下で 24 時間処置した後、6-OHDA (250  $\mu$ M) を 24 時間曝露した。n = 4. (C) TPNA10168 による細胞保護作用における BSO の作用。PC12 細胞に TPNA10168 (10  $\mu$ M) を BSO (3-10  $\mu$ M) の存在下もしくは非存在下で 24 時間処置した後、BSO (3-10  $\mu$ M) の存在下もしくは非存在下で 6-OHDA (250  $\mu$ M) を 24 時間処置した。n = 4. (D) TPNA10168 による細胞保護作用における ZnPPIX の作用。PC12 細胞に TPNA10168 (10  $\mu$ M) を ZnPPIX (0.3-1  $\mu$ M) の存在下もしくは非存在下で 24 時間処置した後、6-OHDA (250  $\mu$ M) を 24 時間処置した。n = 4. (E) TPNA10168 による細胞保護作用におけるジクマロールの作用。PC12 細胞に TPNA10168 (10  $\mu$ M) を 24 時間処置した後、ジクマロール (50-100  $\mu$ M) の存在下もしくは非存在下で 6-OHDA (250  $\mu$ M) を 24 時間処置した。n = 4. \*\*\*P < 0.001 vs. control, ####P < 0.001 vs. 6-OHDA alone, \*\*P < 0.01, +++P < 0.001 vs. 6-OHDA + TPNA10168.

## 考察

本研究では、PC12 細胞を用いたレポーターアッセイによるスクリーニングにより化合物ライブラリーから新規 Nrf2-ARE 活性化物質として TPNA10168 を見出した。この検討において、TPNA10168 は代表的な ARE 活性化物質であるスルフォラファンと同程度の効力を示したがより高濃度においては細胞毒性を示さずに ARE 活性化能を持つことが明らかになった。さらに、50%細胞毒性濃度がスルフォラファンと比較して 2.66 倍であったことから、TPNA10168 はより毒性の低い ARE 活性化物質であると考えられる。

ハイスループットスクリーニングより見出された Nrf2-ARE 経路活性化物質はいくつか報告されている[31,33-34]。これらの中でも、[33]より報告される AI-3 は TPNA10168 の構造と類似している。AI-3 と TPNA10168 は求電子性のマイケル付加アクセプターとして重要である enone 構造を共通構造として持ち、keap1 のシステイン残基と反応すると考えられる。また、AI-3 がもつ methyl sulfonyl 構造よりも TPNA10168 にみられる methyl sulfoxide 構造がより反応性が高いことが記されている。これらの報告は TPNA10168 の Nrf2-ARE 経路活性化物質としての有用性を高めるものである。さらに、AI-3 の検討では Nrf2 の標的遺伝子下流で誘導される抗酸化酵素発現の評価は行われているが、その細胞保護作用についての検討は行われていない。また、Nrf2-ARE 経路活性化の制御には、keap1 の親電子物質によるシステイン残基の修飾反応のほかに、phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)などの様々なキナーゼによる Nrf2 のリン酸化が Nrf2 活性に関与することが報告されている[29,32-33]。PC12 細胞への TPNA10168 の処置は、PI3K の下流である Akt のリン酸化を誘導し、TPNA10168 によって増加した ARE 活性が PI3K の阻害薬によって有意に低下したことから、TPNA10168 の Nrf2-ARE 経路の活性化には PI3K 経路が関与することが考えられる。

PC12 細胞において、TPNA10168 の前処置は 6-OHDA 毒性に対して細胞保護作用を示した。TPNA10168 が同時処置により保護作用を示さないという結果は、TPNA10168 自身はラジカルスカベンジ能を示さないという結果と一致している。よって細胞保護には先に Nrf2-ARE 経路活性化による抗酸化酵素発現を誘導することが重要であると考えられる。 $\gamma$ -GCS の阻害薬である BSO は TPNA10168 による細胞保護作用を抑制したが 6-OHDA 毒性に対しても増悪作用が見られた。そのため、細胞保護作用への  $\gamma$ -GCS の関与については結論付けられなかった。BSO は単独でも 6-OHDA 毒性を促進させることは当研究室ですでに報告されている[15]。HO-1 阻害薬である ZnPPiX は 6-OHDA 毒性に対して逆に保護作用が見られた。HO-1 は細胞内のヘムを分解してビリベルジン、一酸化炭素、鉄を産生する。これは、ヘム由来の二価鉄と 6-OHDA 由来の過酸化水素が反応してフェントン反応 ( $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH} + \text{OH}^\cdot$ )により生成するヒドロキシラジカルによると考えられ[35]、さらに細胞内の遊離鉄が 6-OHDA 毒性を増強することが報告されている[36]。NQO-1 の阻害薬であるジクマロールによって

TPNA10168 の細胞保護作用が有意に抑制されたことから、PC12 細胞における TPNA10168 の保護作用には NQO-1 が関与することが明らかとなった。ドパミン神経毒である 6-OHDA は自動酸化によって生じる *p*-quinone や、それがさらに環化した aminochrome が細胞毒性を示すことが報告されている[15]。NQO1 はこれらキノンを還元して毒性の低い Hydroquinone にすることにより保護作用に関与したと考えられる[37] (図 1-6)。

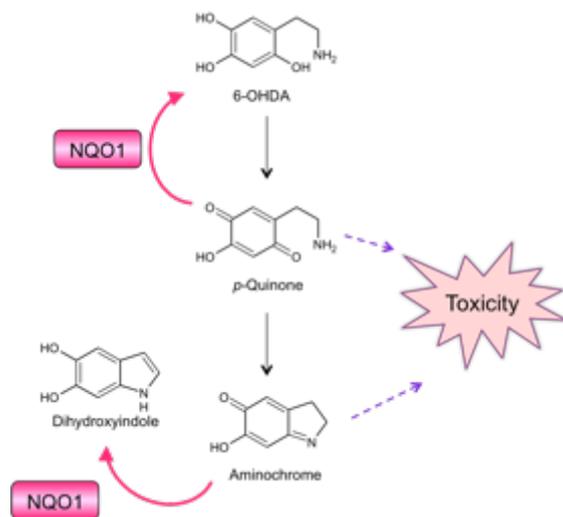


図 1-6 NQO1 の 6-OHDA 毒性に対する細胞保護作用メカニズム

以上の結果より、化合物ライブラリーより見出した 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 において TPNA10168 は、6-OHDA 誘発細胞毒性に対して NQO1 を介して保護作用を示すことが明らかになった(図 1-7)。

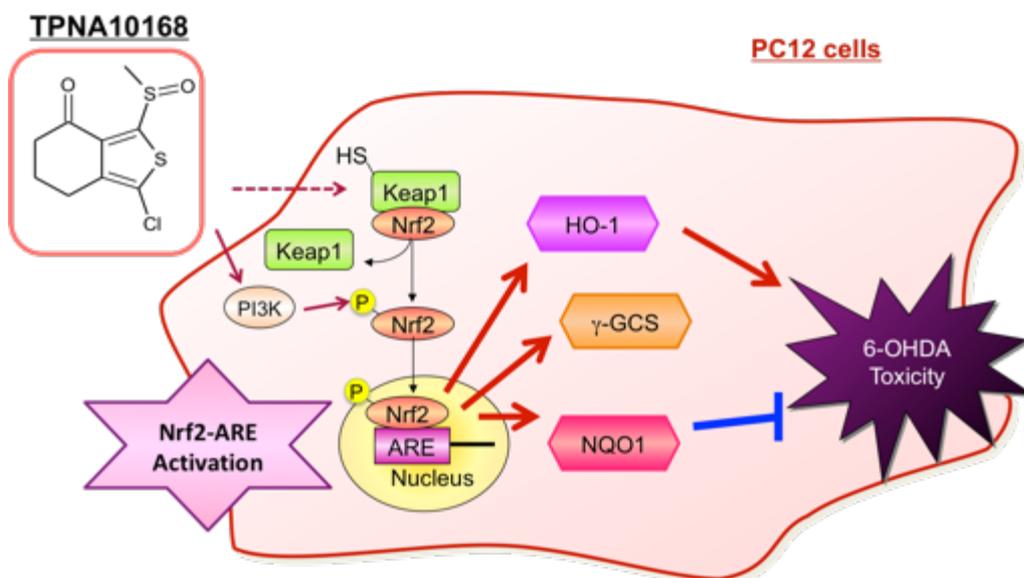


図 1-7 PC12 細胞における TPNA10168 の 6-OHDA 毒性に対する細胞保護作用メカニズム

## 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[38-39]。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[40]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[41-42]、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[43]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[44]。

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 Nrf2-ARE 経路活性化物質であることが示し、その作用メカニズムを明らかにしたが、*in vivo* 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。そこで本章ではパーキンソン病モデルマウスとして 6-OHDA 誘発ドパミンニューロン障害モデルマウスを作製し、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。

# 実験方法

## 試薬

6-OHDA hydrochloride は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入し、1-chloro-3-methanesulfinyl-6,7-dihydro-5H-2-benzothiophen-4-one (TPNA10168) は Maybridge (Loughborough, UK) から購入した。

## 動物

実験には 5 週齢の C57BL/6N 系雄性マウス（日本 SLC、静岡、日本）を用いた。全てのマウスは室温が  $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、明暗周期が 12 時間の条件下で飼育し、餌および水は自由に摂食させた。実験は全て、京都大学動物実験委員会による審査・承認を受け、「動物実験に関する日本薬理学会指針」を遵守して行った。

## マウスへの薬物の投与

マウスにデシプラミン (20 mg/kg) を腹腔内投与した 30 分後に、ペントバルビタール (60 mg/kg、腹腔内投与) で麻酔下、右脳黒質 (bregma より尾側 3.0 mm、左外側 1.4 mm、腹側 4.4 mm) に 6-OHDA (3  $\mu\text{g}$ ) を 0.2 mg/mL L-アスコルビン酸添加生理食塩水に溶解したものをマイクロシリンジポンプを用いて 1.5  $\mu\text{L}$  投与することにより、一側性 PD モデルを作製した。TPNA10168 の皮下投与は、TPNA10168 を DMSO に溶解後、オリーブオイルに懸濁して DMSO の割合を 10% に調整したものを 6-OHDA 投与の 1 日前にマウスに投与した。TPNA10168 の黒質内投与は、TPNA10168 を DMSO に溶解したものを 6-OHDA の投与と同じ位置に 0.5  $\mu\text{L}$  投与した。

## Methamphetamine 誘発 rotation test

6-OHDA 投与から 2 週間後、マウスを直径 20 cm のボウルに入れ 5 分間慣らしてから methamphetamine (3 mg/kg) を腹腔内投与し、60 分間マウスの回転行動を観察した。1 分間あたりの [6-OHDA 投与側 (右側) への回転] - [非投与側への回転] を rotation score として算出した。

## 免疫組織化学

免疫組織化学染色は、6-OHDA 投与の 2 週間後もしくは TPNA10168 投与の 24 時間後に行った。マウスをペントバルビタール麻酔下で開胸し、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を経心灌流することで脱血し、4% パラホルムアルデヒドを経心灌流し固定した。全脳摘出後、4% パラホルムアルデヒド中で  $4^{\circ}\text{C}$  において 1 時間固定し、15% スクロース溶液に浸して  $4^{\circ}\text{C}$

で一晩静置した後、30%スクロース溶液に置換して4°Cで一晩静置した。その後、凍結組織切片作製用包埋剤 (Sakura Finetek Japan) を用いて脳を包埋した。全脳は-80°Cで凍結し、凍結ミクロトーム (LEICA CM3050S; Leica Biosystems, IL, USA) によって厚さ 20 μm の凍結切片を作製した。脳切片を PBS で洗浄後、1.5%ヤギ血清/0.3% Triton X-100/PBS あるいは3% ウシ由来アルブミン/1% Triton X-100/PBS で室温にて 60 分間ブロッキングと透過処理を行った。一次抗体として、抗 anti-glia fibrillary acidic protein 抗体 (GFAP; G8393, Sigma-Aldrich)、抗 HO-1 抗体 (ADI-SPA-895 and ADI-OSA-110, Enzo Life Science)、抗 ionized calcium-binding adapter molecule 1 抗体 (Iba1; #019-19741, Wako Pure Chemical Industries)、抗 tyrosine hydroxylase 抗体 (TH; AB152, Merck Millipore) を使用した。免疫反応はジアミノベンチジン (DAB) 標識または蛍光標識二次抗体を使用して可視化した。

#### ドパミンニューロン生存率の評価

黒質のドパミンニューロン生存率の評価は、TH 陽性細胞を計数することにより行った。線条体のドパミン神経線維密度の評価は、線条体の TH 陽性染色強度を Image-J software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) を用いて定量することにより行った。

#### RT-qPCR

TPNA10168 の皮下投与 12 時間後に PBS を経心灌流することで脱血して脳を摘出した。中脳腹側部の組織を溶解液に浸してホモジナイズした後、ReliaPrep™ RNA Tissue miniprep system (Promega) を使用して mRNA を回収した。mRNA の逆転写には、Goscript™ reverse transcription system (Promega) を使用した。PCR には GoTaq™ qPCR master mix (Promega) を使用して、変性 (95°C、2 分間)、増幅 (40 サイクル: 95°C 15 秒間・60°C 60 秒間) の条件で TaKaRa PCR thermal cycler Dice (TaKaRa Bio、滋賀、日本) を用いて行った。GAPDH を内在性コントロールとした。

プライマーは以下の配列のものを使用した。

*Gapdh* forward : 5'-AGTGTAGCCCAGGATGCCCTT-3'

*Gapdh* reverse : 5'-GCCAAGGTCATCCATGACAAC -3'

*Ho-1* forward : 5'- ACAGAAGAGGCTAAGA -3'

*Ho-1* reverse : 5'- GCAGTATCTTGCACCA-3'

*Gclc* forward : 5'- TGCTGTCCCAAGGCTC -3'

*Gclc* reverse : 5'- ACTCCACCTCGTCACC -3'

*Nqo1* forward : 5'- TACGACAACGGTCCTT-3'

*Nqo1* reverse : 5'- CACAGAAACGCAGGAT -3'

### ウエスタンブロッティング

TPNA10168 の皮下投与 24 時間後の脳を摘出し、中脳腹側部および線条体の組織を細胞溶解液に浸してホモジナイズを行った。ライセートを SDS 化し、SDS-PAGE によりタンパクを分離し、PVDF 膜に転写した後、各抗体と反応させ、化学発光により検出した。一次抗体として、抗  $\beta$ -actin 抗体 (1:100,000; A1998, Sigma-Aldrich)、抗  $\gamma$ -GCS 抗体(1:1,000; H300, Santa Cruz Biotechnology)、抗 HO-1 抗体 (1:500; Enzo Life Sciences)、抗 NQO-1 抗体 (1:500; sc16464, Santa Cruz Biotechnology)を使用した。ローディングコントロールとして  $\beta$ -actin を用いた。

### 統計処理

データは平均値 $\pm$ 標準誤差で表した。統計学的有意差は、一元配置分散分析法後の Dunnett's test あるいは Students's t-test により評価した。危険率 5%未満の場合に統計学的に有意な差があると判定した。

## 実験結果

### TPNA10168 の皮下投与が 6-OHDA 誘発 PD モデルマウスに与える影響

6-OHDA 誘発パーキンソン病モデルマウスに対する TPNA10168 の作用について検討を行った。マウス黒質への 6-OHDA の投与より 2 週間後、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(図 2-1A-D)。これらの変化は、TPNA10168 (200 mg/kg)を 6-OHDA 投与前日に投与することにより有意に抑制された(図 2-1A-D)。行動学的解析には Rotation test を用いた評価を行った。6-OHDA の投与により片側の黒質が傷害されたマウスは、methamphetamine の投与によって投与側への回転運動が誘発される。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(図 2-1E)。

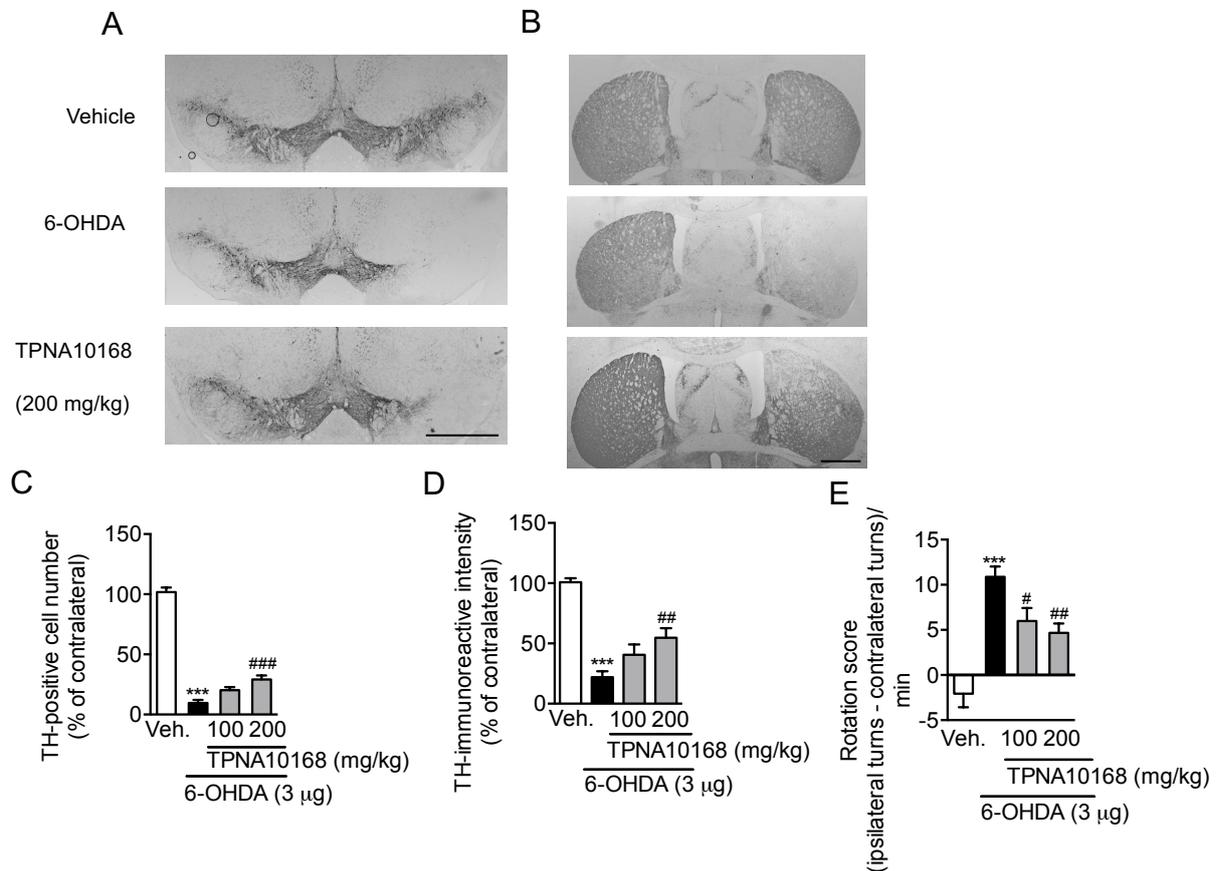
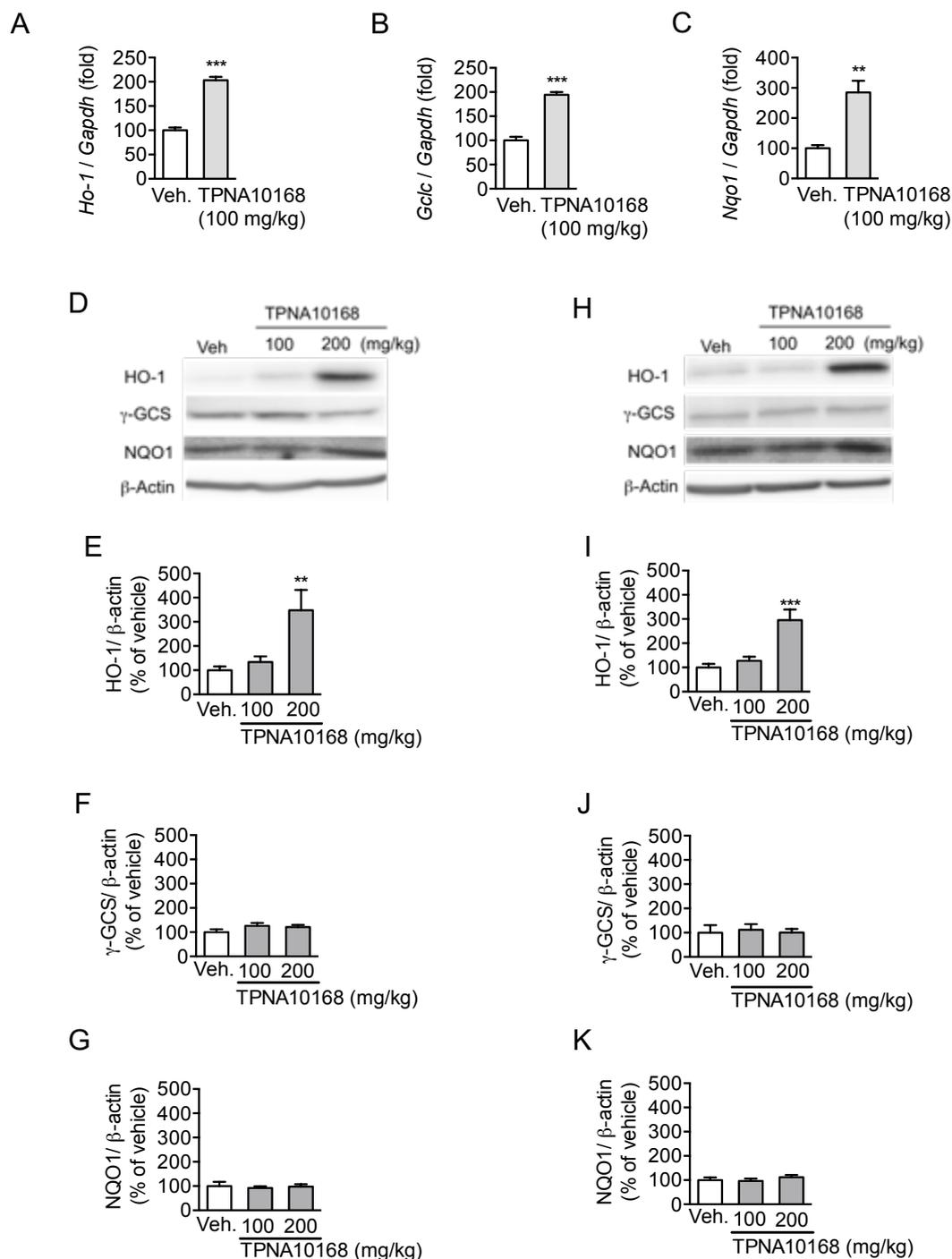


図 2-1 6-OHDA 誘発 PD モデルマウスにおけるドパミンニューロン死と行動機能障害に対する TPNA10168 の作用

(A, B) TH 陽性染色による黒質を含む中脳 (A)と線条体 (B)の顕微鏡画像。6-OHDA (3 µg)をマウスの右脳側黒質に投与した。TPNA10168 の投与は、6-OHDA 傷害の前日に皮下投与により行った。スケールバーは 1 mm を示す。(C) 黒質における 6-OHDA 誘発ドパミンニューロン死に対する TPNA10168 の作用。(D) 線条体における 6-OHDA 誘発ドパミン神経線維消失に対する TPNA10168 の作用。(E) methamphetamine 誘発 Rotation test における 6-OHDA 投与マウスの非対称性行動に対する TPNA10168 の作用。n = 9-10. \*\*\*P < 0.001 vs. the vehicle; #P < 0.05, ###P < 0.01, ####P < 0.001 vs. 6-OHDA

## TPNA10168 の投与が Nrf2-ARE 経路下流の抗酸化酵素発現に与える影響

TPNA10168 皮下投与によるマウス黒質線条体での抗酸化酵素誘導に対する作用を検討した。TPNA10168 の投与から 12 時間後、中脳腹側部の *Ho-1*、*Gclc* (グルタミン酸システインリガーゼの触媒サブユニット)、*Nqo1* の mRNA の上昇が見られた(図 2-2A-C)。一方、TPNA10168 の投与から 24 時間後、黒質を含む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 (図 2-2D-G)。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 (図 2-2H-K)。



**図 2-2 黒質線条体領域における Nrf2-ARE 経路下流の抗酸化酵素発現に対する TPNA10168 の作用**

**A-C:** マウス中脳腹側部で TPNA10168 により変化する *Ho-1* (**A**)、*Gclc* (**B**)、*Nqo1* (**C**) の mRNA レベル。TPNA10168 (100 mg/kg) の投与は皮下投与により行い、TPNA10168 投与 12 時間後に、中脳腹側部における mRNA 発現を Real-time qPCR 法より定量した。各 mRNA 量は *Gapdh* の発現量を用いて標準化した。n = 4-5. **(D)** マウス中脳腹側領域で TPNA10168 投与により誘導される抗酸化タンパク質の発現変化。**E-G:** HO-1 (**E**)、 $\gamma$ -GCS (**F**)、NQO1 (**G**) の発現量を定量化した。**(H)** マウス線条体で TPNA10168 投与により誘導される抗酸化タンパク質の発現変化。**I-K:** HO-1 (**I**)、 $\gamma$ -OGS (**J**)、NQO1 (**K**) の発現量を定量した。TPNA10168 (100-200 mg/kg) の投与は皮下投与により行った。TPNA10168 投与 24 時間後に、中脳腹側部および線条体における抗酸化酵素の発現をウエスタンブロット法により定量した。 $\beta$ -actin はローディングコントロールとして用いた。n = 6. \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 vs. vehicle.

### TPNA10168 の投与により誘導される HO-1 の発現細胞の同定

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明らかにするために蛍光二重染色を用いた。TPNA10168 の黒質内投与により 24 時間後、黒質において HO-1 発現細胞の増加が観察された (図 2-3A)。TPNA10168 の投与による HO-1 の発現誘導は、TH 陽性ドパミンニューロンおよび Iba1 陽性ミクログリアではみられなかったのに対し (図 2-3B-C)、GFAP 陽性アストロサイトで観察された (図 2-3D)。

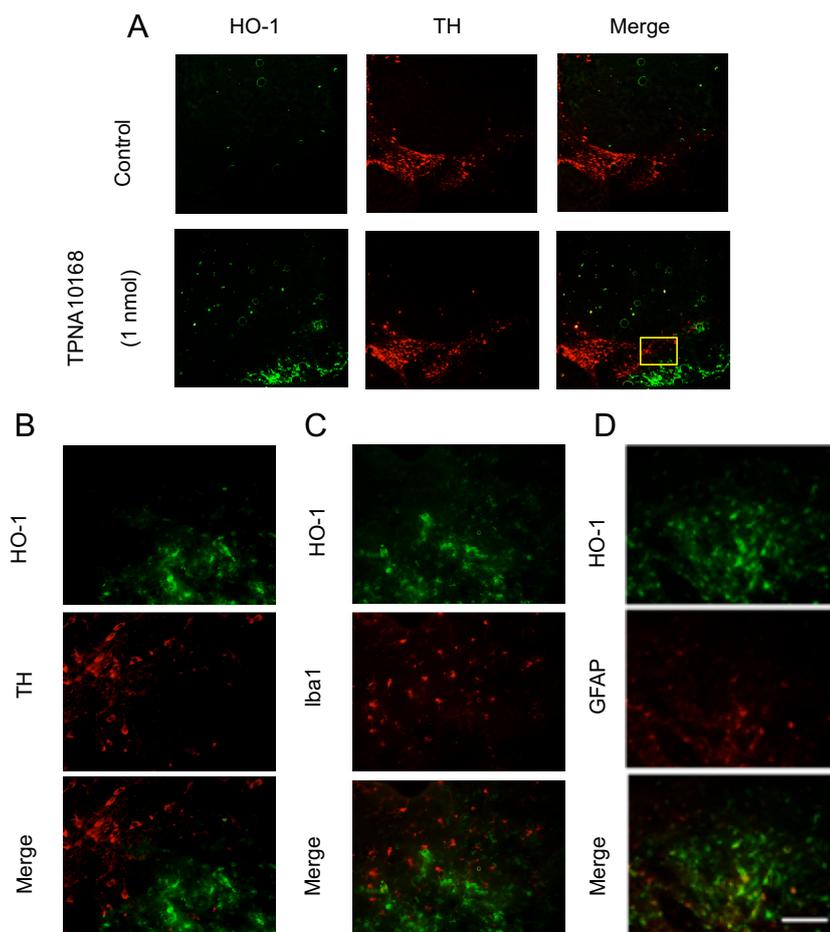


図 2-3 TPNA10168 の投与による黒質での HO-1 発現誘導細胞の同定

(A) 中脳腹側部における HO-1 と TH の蛍光二重染色画像。(B-D) A で示す範囲の拡大画像。HO-1 と TH (B)、Iba1 (C)、GFAP (D) で染色した。脳サンプルは、マウス黒質への TPNA10168 (1 nmol) 投与翌日に摘出した。脳切片は、抗 HO-1、抗 TH、抗 Iba1、抗 GFAP 抗体を用いて免疫組織化学により可視化した。スケールバーは 100  $\mu\text{m}$  を示す。

## 考察

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 が、全身投与により 6-OHDA 誘発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変性に対して保護作用を示すことが明らかになった。さらに、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 が発現上昇することが示された。アストロサイトは黒質網様部に多く局在することが観察されている[45]。TPNA10168 の投与により黒質緻密部でなく黒質網様部の HO-1 の発現上昇がみられたのはこのためだと考えられる。

当研究室では以前、Nrf2-ARE 経路を活性化する新規成分として青ジソより 2'3'-dihydroxy-4'6'-dimethoxychalcone (DDC)を単離した。DDC はスルファラファンに比べて高い ARE 活性作用を示し[29]、食品由来であることから安全性が高いと考えられる[46]。しかしながら、水溶液中で分解することにより全身投与での脳移行が課題であった。一方、TPNA10168 は本検討において全身投与により脳内で抗酸化酵素を誘導することを明らかにした。

TPNA10168 の構造類似体である Nrf2-ARE 経路活性化物質である AI-3 は全身投与によって、肝臓や腎臓で抗酸化酵素を発現上昇することが報告されている。本検討では TPNA10168 が全身投与により脳内で抗酸化酵素を誘導することを示したとともに、マウス中脳腹側部で  $\gamma$ -GCS や HO-1、NQO1 の mRNA レベルが上昇していることから TPNA10168 は脳内で抗酸化経路を活性化していると考えられる。第一章の PC12 細胞では  $\gamma$ -GCS、HO-1、NQO1 の抗酸化タンパク量の発現上昇がみられたが、中脳腹側部および線条体では HO-1 タンパク量のみが発現上昇し  $\gamma$ -GCS や NQO1 の発現量に変化はみられなかった。TPNA10168 が HO-1 を特異的に発現誘導する機序については不明であるが、これまでも組織の違いにより Nrf2 や HO-1 の発現パターンが変化することが報告されていることや[47]、実際に皮膚では HO-1 についての報告が多いことからラット副腎髄質由来の PC12 細胞とマウス脳の組織の違いであることが考えられる。

ウエスタンブロッティングにより中脳腹側での HO-1 の発現上昇が見られたが、TPNA10168 の皮下投与による中脳腹側部の免疫組織染色では、HO-1 の発現が確認できなかった (data not shown)。これは、双方の方法や抗体の特性による検出感度の違いに起因すると考えられる。黒質投与によっては HO-1 の発現上昇が確認された。さらに、これはドパミンニューロンでなくアストロサイトで観察された。この結果は、成熟したニューロンにおいては Nrf2 プロモーターがエピジェネティックに抑制されることにより Nrf2 遺伝子の発現を抑制するためと考えられる[48]。さらに、アストロサイト特異的な Nrf2 の過剰発現が MPTP 誘発毒性を抑制することや、Nrf2 発現アストロサイトの線条体への移植により 6-OHDA 誘発ドパミンニューロン死が保護されることが報告されていることから[49-50]、アストロサイトにお

ける Nrf2-ARE 経路の活性化は 6-OHDA 誘発ドパミンニューロン死に対して保護作用に寄与することが考えられる。

以上の結果より、TPNA10168 は全身投与によって脳内の Nrf2-ARE 経路を活性化し、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

第一章では、京都大学薬学研究科より新規 Nrf2-ARE 経路活性化物質である TPNA10168 を見出し、TPNA10168 が培養細胞系において抗酸化酵素発現を誘導することを明らかにした。第二章では、中脳黒質ドパミンニューロンを 6-OHDA により脱落させたパーキンソン病モデルマウスを作製し、TPNA10168 の全身投与によりマウス黒質ドパミンニューロンの保護作用を確認した。さらに、マウス脳内で HO-1 の発現上昇がみられた。しかしながら、HO-1 がドパミンニューロン死保護に寄与するかについては結論づけられていない。

そこで本章では、TPNA1016 の神経保護作用機序を解明するため、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機序について詳細な検討を行った。

## 実験方法

### 試薬

6-OHDA hydrochloride は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入し、1*H*-[1,2,4] oxadiazolo [4,3-*a*]quinoxalin-1-one (ODQ) は R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) より購入した。Zinc protoporphyrin IX (ZnPPIX) は Merk Millipore (Darmstadt, Germany) より、KT5823 は Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA) より購入した。

### 中脳初代細胞培養

胎生 16 日齢の Wistar/ST 系ラット胎仔より中脳細胞を摘出単離した。培養 4 日目までは 10% FBS、5 日目以降は 10% HS 含有 Eagle's minimum essential medium (EMEM) 中で 5% CO<sub>2</sub>、37°C の環境下で維持し、培養 9 日目に 6-OHDA 処置を 24 時間行った。実験動物は京都大学動物実験委員会による審査・承認を受け、「動物実験に関する日本薬理学会指針」を遵守して行った。

### RT-qPCR

薬物処置後、細胞を PBS で洗浄し ReliaPrep<sup>TM</sup> RNA cell miniprep system (Promega) を使用して mRNA を回収した。以降は第二章と同様の方法で行った。β-actin を内在性コントロールとした。

プライマーは以下の配列のものを使用した。

*β-actin* forward : 5'-GGAGATTACTGCCCTCGCTCCTA-3'

*β-actin* reverse : 5'-GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTC-3'

*γ-GCS* forward : 5'-CCTTCTGGCACAGCACGTTG-3'

*γ-GCS* reverse : 5'-TAAGACGGCATCTCCGCTCCT-3'

*HO-1* forward : 5'-TGCTCGCATGAACACTCTG-3'

*HO-1* reverse : 5'-TCCTCTGTCAGCAGTGCC-3'

*NQO1* forward : 5'-TCCGCCCCCAACTTCTG-3'

*NQO1* reverse : 5'-TCTGCGTGGGCCAATACA-3'

### ウエスタンブロッティング

第一章実験方法に同じ。

### 免疫細胞化学

細胞を 4%パラホルムアルデヒドで固定後、0.2% Triton X-100 含有 PBS で細胞膜透過処理を行った。その後、各一次抗体および二次抗体と反応させた。ペルオキシダーゼ-ジアミノベンチジン (DAB) 染色の場合、HRP 標識アビジン-ビオチン複合体 (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) をさらに室温で反応させた後、ジアミノベンチジン溶液 (Dojindo Laboratories、熊本、日本) と反応させた。蛍光観察の場合、二次抗体反応後、核染色として 0.1 mg/ml Hoechst 33258 (Calbiochem) に 15 分間反応させた。一次抗体として、抗 GFAP 抗体 (Z0334, Dako Denmark, Glostrup, Denmark)、抗 HO-1 抗体 (ADI-SPA-895・ADI-OSA-110, Enzo Life Science)、抗 CD11b 抗体 (#1105, Serotec, Raleigh, NC)、抗 microtubule associated protein 2 抗体 (MAP2; M1406, Sigma)、抗 TH 抗体 (AB152, Merk Millipore) を使用した。

#### ドパミン神経細胞の生存率の評価

中脳初代培養細胞のドパミンニューロンの生存率を評価するにあたって、20 個のランダムに選択した範囲 (550 × 830 μm) から TH 陽性細胞数を顕微鏡下で計数した。

#### 統計処理

第一章実験方法に同じ。

## 実験結果

### 中脳初代培養細胞における TPNA10168 が抗酸化酵素発現に与える影響

TPNA10168 を中脳初代培養細胞に 24 時間処置したところ、 $\gamma$ -GCS の mRNA 発現は 12 時間をピークとする上昇を示し、HO-1、NQO1 の mRNA 量は 12 時間から 24 時間にかけて有意に増加した (図 3-1A-C)。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 (図 3-1D)。

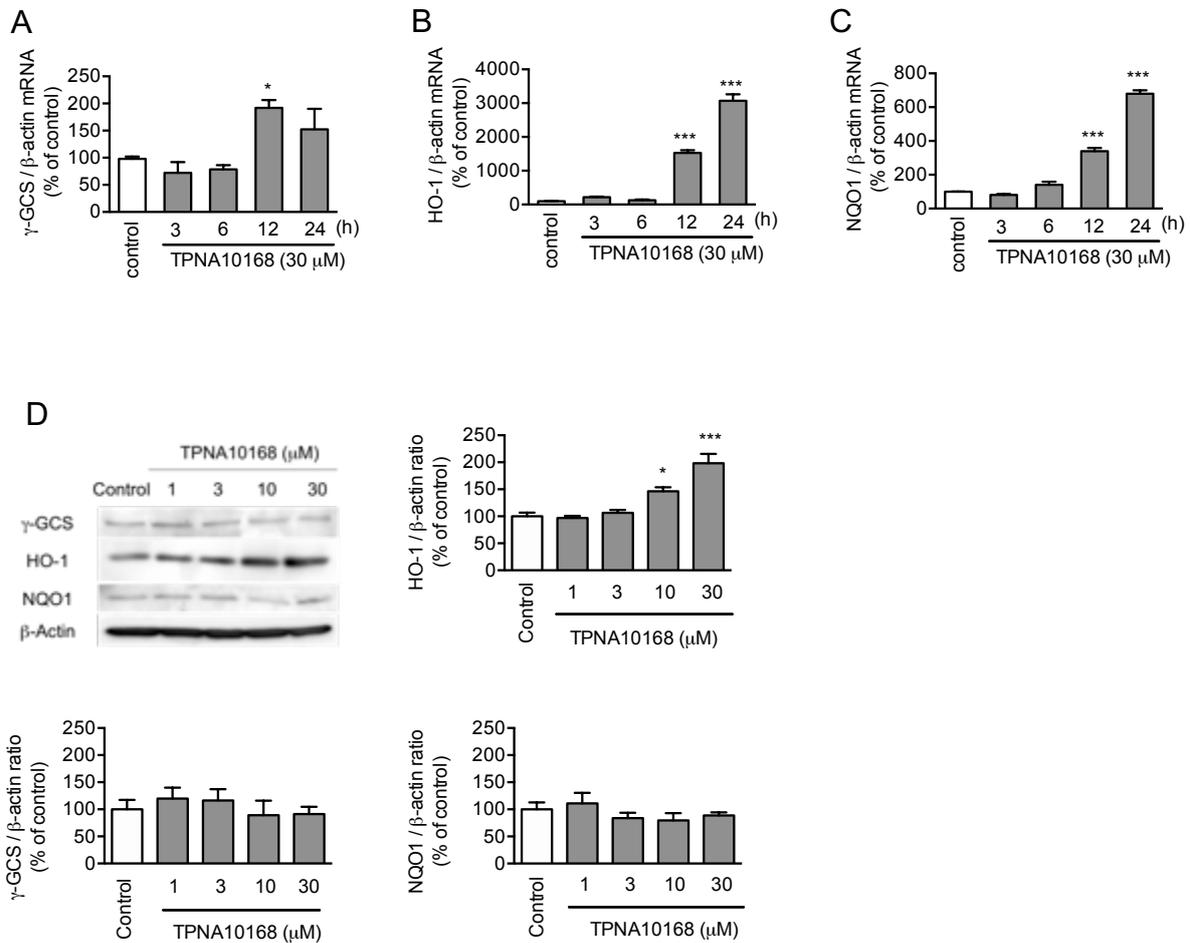


図 3-1 中脳初代培養細胞における ARE 由来抗酸化酵素誘導に対する TPNA10168 の作用

**A-C:**  $\gamma$ -GCS、HO-1、NQO1 の mRNA 発現量における TPNA10168 の時間的作用。中脳初代培養細胞に TPNA10168 (30  $\mu$ M) を 3-24 時間処置した。n = 3. **(D)**  $\gamma$ -GCS、HO-1、NQO1 のタンパク発現量における TPNA10168 の作用。中脳初代培養細胞に TPNA10168 (30  $\mu$ M) を 24 時間処置した。 $\beta$ -actin はローディングコントロールとして用いた。n = 3. \*P < 0.05, \*\*\*P < 0.001 vs. control.

### 中脳初代培養細胞において TPNA10168 処置により誘導される HO-1 発現細胞の同定

中脳初代培養細胞は主にドパミンニューロンを含むニューロン、アストロサイトおよびミクログリアで構成される。初代培養細胞における 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、TPNA10168 の 24 時間処置によって HO-1 発現細胞数および HO-1 蛍光強度の増加が見られた。HO-1 の発現は、MAP2 および TH 陽性のニューロンでは観察されなかった (図 3-1A,B)。HO-1 発現細胞は、CD11b 陽性ミクログリアでも観察されたが、ほとんどは GFAP 陽性アストロサイトで、TPNA10168 による HO-1 の誘導はアストロサイトにおいて観察された (図 3-1C,D)。

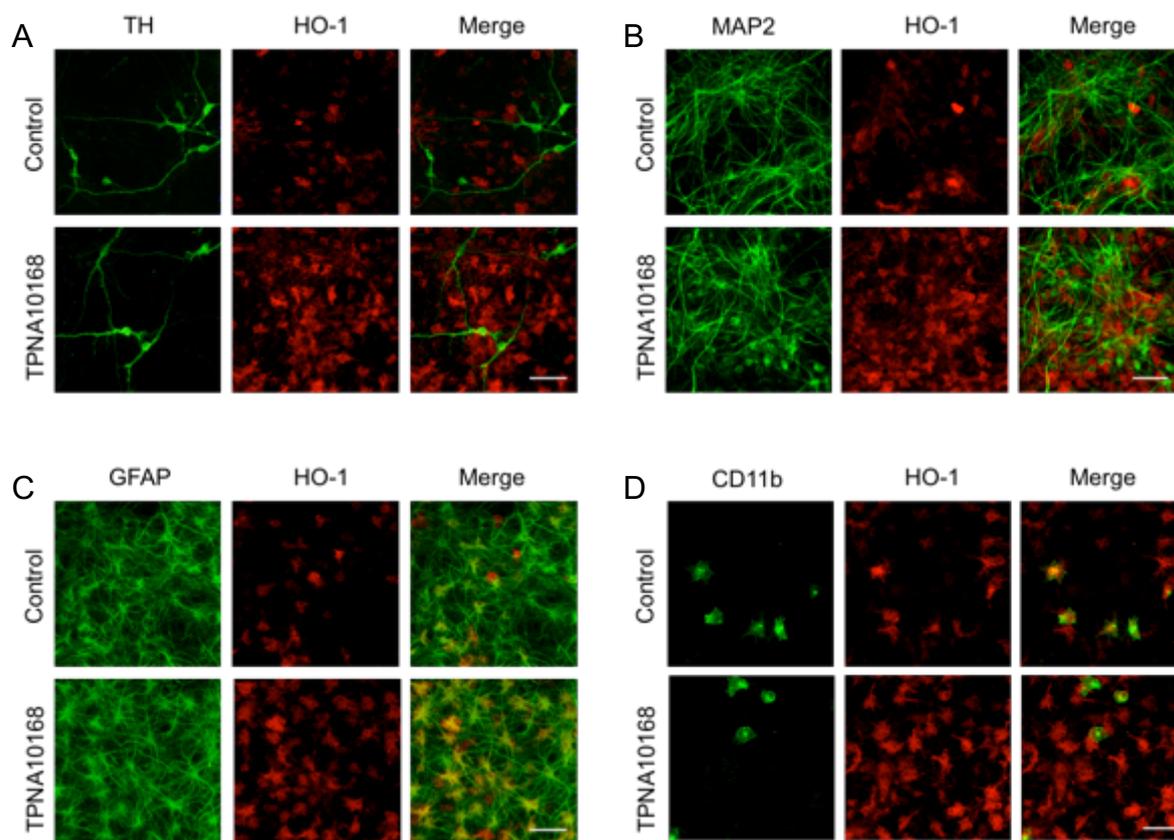
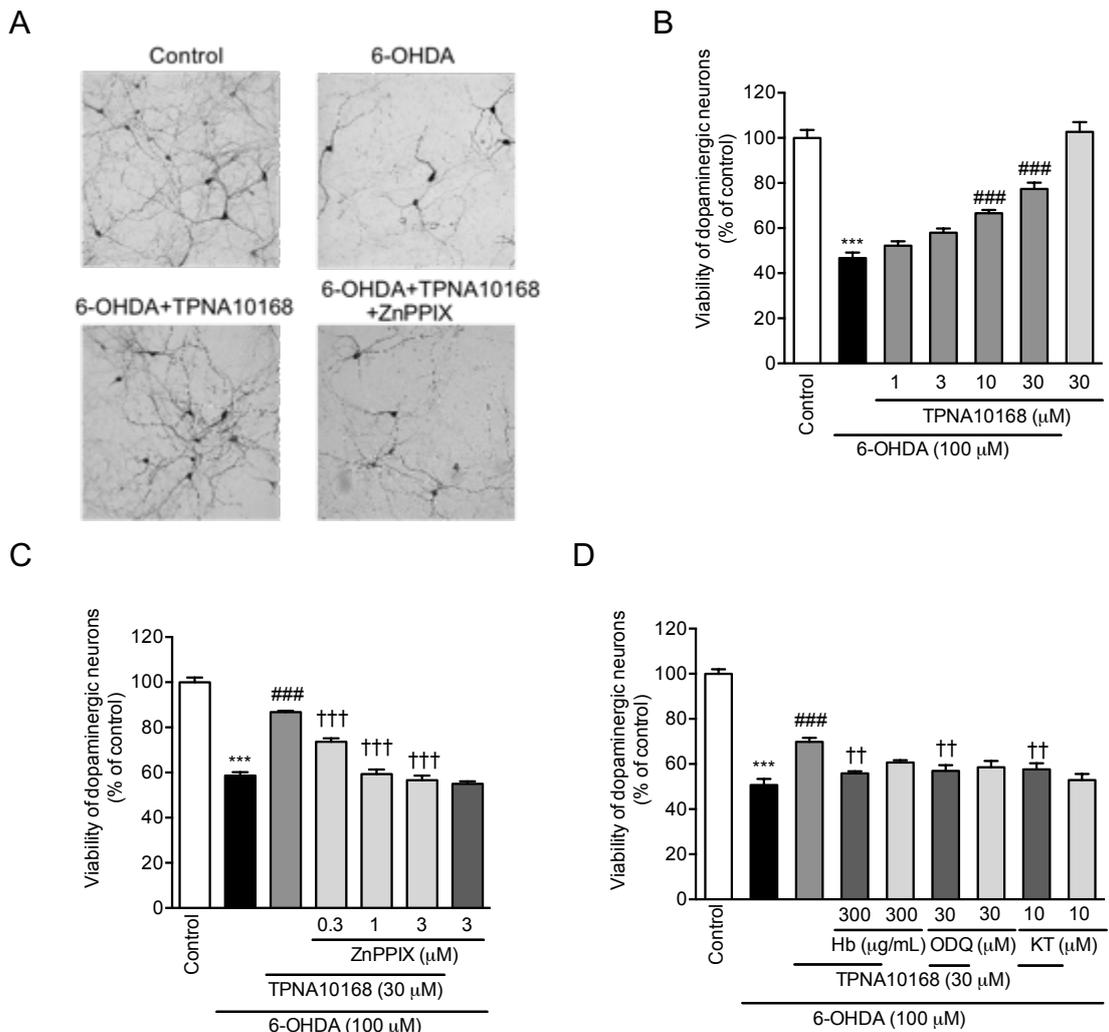


図 3-2 中脳初代培養細胞における ARE 由来抗酸化酵素誘導に対する TPNA10168 の作用

A-D: 中脳初代培養細胞における TPNA10168 によって誘導される HO-1 発現細胞の同定。中脳初代培養細胞に TPNA10168 を 24 時間処置し、HO-1 と TH (A)、MAP2 (B)、GFAP (C)、CD11b (D)を染色した。スケールバーは 50  $\mu\text{m}$  を示す。

中脳初代培養細胞において TPNA10168 が 6-OHDA 誘発ドパミンニューロン死に与える影響

中脳初代培養細胞への 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、TPNA1068 の前処置は有意にドパミンニューロン死を抑制した (図 3-3A,B)。TPNA10168 のドパミンニューロン保護作用は 30  $\mu\text{M}$  まで上昇したため、以降の検討では保護作用機序を解明するために 30  $\mu\text{M}$  の濃度を用いた。TPNA10168 の 6-OHDA に対する保護作用は、HO-1 阻害薬の ZnPPIX によりほぼ完全に抑制された (図 3-3A,C)。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[51-52]。TPNA10168 の詳細な保護作用機序を検討するために、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 (図 3-3D)。CO はグアニル酸シクラーゼ (GC)/プロテインキナーゼ G (PKG)経路を活性化することが知られている[52]。そこで、GC 阻害薬である ODQ および PKG 阻害薬である KT5823 の処置したところ、TPNA10168 によるドパミンニューロンの保護作用は消失した (図 3-3D)。



**図 3-3 中脳初代培養細胞における 6-OHDA 誘発ドパミンニューロン毒性に対する TPNA10168 の作用**

(A) 中脳初代培養細胞における TH 染色の顕微鏡図。中脳初代培養細胞に TPNA10168 (30  $\mu$ M) を ZnPPIX (3  $\mu$ M) の存在下もしくは非存在下で 24 時間処置した後、6-OHDA (100  $\mu$ M) を 24 時間処置した。スケールバーは 200  $\mu$ m を示す。(B) 6-OHDA 誘発ドパミンニューロン毒性に対する TPNA10168 の濃度依存的保護作用。中脳初代培養細胞に TPNA10168 (1-30  $\mu$ M) 存在下もしくは非存在下で 24 時間処置した後、6-OHDA (100  $\mu$ M) を 24 時間曝露した。(C) TPNA10168 によるドパミンニューロン保護作用における ZnPPIX の作用。中脳初代培養細胞に TPNA10168 (30  $\mu$ M) を ZnPPIX (0.3-3  $\mu$ M) の存在下もしくは非存在下で 24 時間処置した後、6-OHDA (100  $\mu$ M) を 24 時間処置した。(D) TPNA10168 によるドパミンニューロン保護作用におけるヘモグロビン、ODQ、KT5823 の作用。中脳初代培養細胞に TPNA10168 (30  $\mu$ M) をヘモグロビン (Hb; 300  $\mu$ g/ml)、ODQ (30  $\mu$ M)、KT5823 (KT; 10  $\mu$ M) の存在下もしくは非存在下で 24 時間処置した後、6-OHDA (100  $\mu$ M) を 24 時間処置した。\*\*\*P < 0.001 vs. control, ####P < 0.001 vs. 6-OHDA alone, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 vs. 6-OHDA + TPNA10168.

## 考察

本研究により、TPNA10168 が中脳初代培養細胞において 6-OHDA 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すことが明らかになった。HO-1 阻害薬の処置により TPNA10168 のドパミンニューロン保護作用が消失したことから、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。また、TPNA10168 はニューロンではなくアストロサイトにおいて HO-1 の発現上昇を誘導した。このアストロサイトにおける HO-1 の発現誘導は第二章における vivo の結果と一致する。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[53]。このような知見と本研究結果を考え合わせると、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。多発性硬化症治療薬のジメチルフマル酸は、ニューロンおよびアストロサイトで Nrf2 の活性化を誘導することが報告されているが[54]、アストロサイトで上昇した HO-1 が産生する CO ガスのニューロン保護作用については検討されていない。

TPNA10168 の処置により  $\gamma$ -GCS、NQO1 の mRNA の発現は上昇したが、そのタンパク発現に変化は見られなかった。これまでの研究から MicroRNA-433 が  $\gamma$ -GCS の mRNA の翻訳を直接的に制御することが報告されていることから[55]、mRNA とタンパク発現の違いを説明する可能性の一つとして、mRNA の転写後に翻訳反応を阻害する microRNA の関与によりタンパク発現が制御されていると考えられる。In vivo の検討で、マウスの皮下投与によって脳内で抗酸化酵素を誘導する用量は TPNA10168 (200 mg/kg)であった。In vitro と同様の濃度 (10-30  $\mu$ M)に達するには皮下投与された TPNA10168 の 0.05%程度が脳内で抗酸化酵素の発現を誘導していると推定される。

6-OHDA はアポトーシス関連タンパクの誘導を伴ってドパミンニューロン死を誘導することが報告されている[56]。一方、HO-1 は細胞内のヘムを分解し、ビリベルジン、CO、 $Fe^{2+}$ を産生する[51]。CO は、GC/PKG 経路を活性化し、下流の細胞シグナルを誘導することにより抗アポトーシス作用を示すことが知られている[52]。GC および PKG の阻害薬により TPNA10168 の保護作用が消失したことから、TPNA10168 の保護作用には GC/PKG 経路が関与することが考えられる。当研究室では以前にも GC/PKG 経路を介して HO-1 がニューロン保護作用を示すことを報告していることから、過去の報告とも一致する[46,57]。

ここで、TPNA10168 により誘導される HO-1 は、中脳初代培養細胞では保護作用に寄与するが、PC12 細胞では寄与しないという相違点が見出された。これは、ドパミンニューロン自身で HO-1 発現誘導が起こらなかったことが原因であると考えられる。CO ガスは細胞膜を容易に通過する[58]のに対し、遊離鉄の細胞間輸送にはトランスポーターが必要であることが知られている[59-60]。これらを合わせると、PC12 細胞は HO-1 により生成した遊離鉄の影響を直接受けてしまうが、アストロサイトで生成した遊離鉄はドパミンニューロンに影響し

にくいことが推定される。そのため、中脳初代培養細胞と PC12 細胞において HO-1 の細胞保護作用への関与が異なっていたと考えられる。よって、アストロサイトにおいて HO-1 により産生された CO が細胞膜を透過し GC/PKG 経路を介してドパミンニューロン保護作用を発揮すると考えられる(図 3-3)。

パーキンソン病患者の黒質においてグリア細胞で HO-1 の発現上昇が観察されている[61]。これは、黒質が酸化ストレスに曝されたことに対するグリア細胞の応答反応である一方、過剰な HO-1 の上昇は鉄の蓄積を促進し病態悪化に繋がることが指摘されている。HO-1 の 2~5 倍の発現誘導は細胞保護的に作用するが、15 倍以上の過剰な発現はむしろ毒性に働くことが報告されている[62-63]。本検討で TPNA10168 によって HO-1 は 2~5 倍の発現上昇していることにより、保護的に作用したと考えられる。そのため、アストロサイトの Nrf2-ARE 経路をコントロールすることは、パーキンソン病におけるドパミンニューロン死を抑制するのに重要であると考えられる。

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。

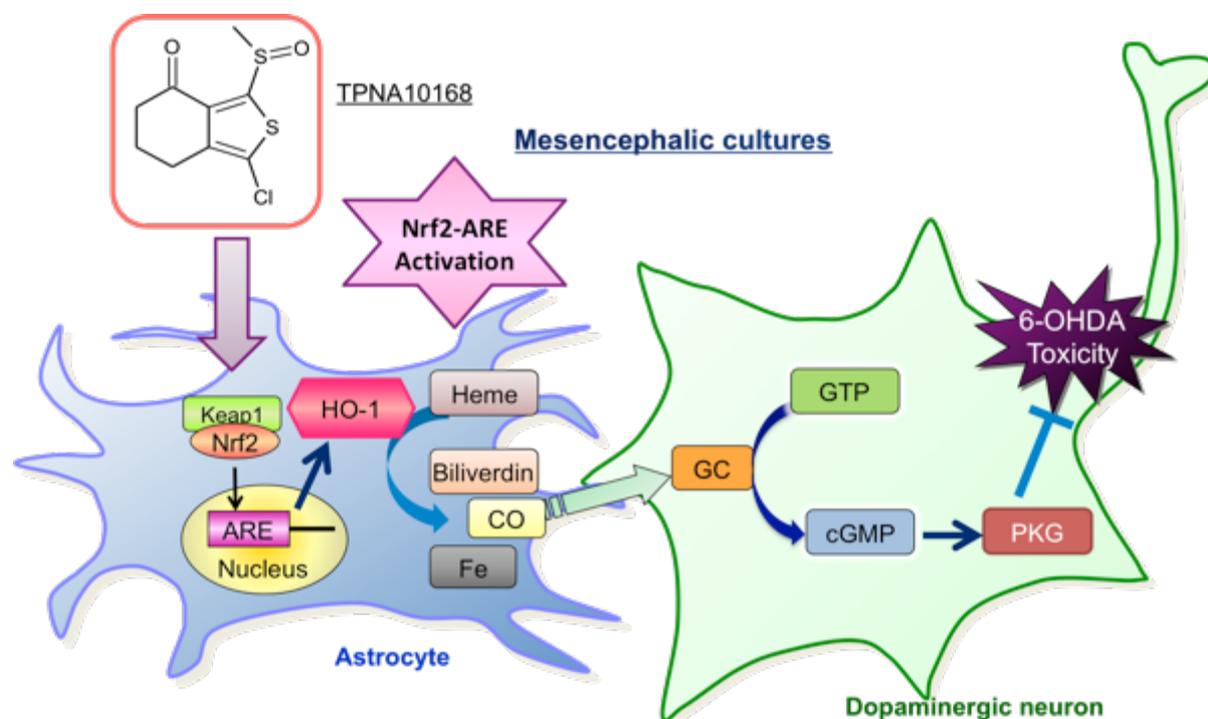


図 3-3 中脳初代培養細胞における TPNA10168 の 6-OHDA 誘発ドパミンニューロン死に対する保護作用機序

## 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。

## 謝辞

本研究に際しまして、終始懇切丁寧な御指導と御鞭撻を賜りました富山大学大学院医学薬学研究部 久米利明 教授に謹んで感謝の意を表します。また、直接御指導を賜り、多くの有益な御助言を頂きました神戸薬科大学 泉安彦 講師に心から感謝の意を表します。さらに、終始有益な御助言を頂きました京都大学 赤池昭紀 名誉教授、京都大学大学院薬学研究科 金子周司 教授、白川久志 准教授、永安一樹 助教、同志社女子大学薬学部 高鳥悠記 特任助教ならびに長崎大学 植田弘師 名誉教授に深く感謝いたします。本研究の遂行は、創薬等支援技術基盤プラットフォーム事業の御支援を受けました。

研究生生活を始めるにあたり御指導、御助言をいただきました池口詩織 博士をはじめ諸先輩方に心から感謝いたします。また、研究の遂行に多大なるご協力をいただきました、正木雄太 修士、片岡春恵 学士に心から感謝いたします。そして、日々の研究生生活において互いに切磋琢磨し合えた松本真実 学士に心からお礼を述べるとともに、中川翔太 修士、熊澤枝里香 学士、丹羽健太 学士、宮本萌里 学士、山本彩加 学士、川地隆太 修士、中西涼介 修士、平柴大地 修士、有福萌波 学士、木下慎一 学士、三羽伸明 学士、村上茅佳 学士、亀井優一 くん、福澤萌香 さん、二井春香さん、増田崇 くんをはじめとする京都大学大学院薬品作用解析学分野、および京都大学大学院生体機能解析学分野の諸氏に深く感謝いたします。

最後に、著者の良き理解者であり研究活動に専念できるよう終始支えて下さった父 純夫、母 ルミ子に心から感謝いたします。

## 発表論文目録

本研究は以下の論文にて公表済みである。

第一章および第三章

Neuroprotective effect of an Nrf2-ARE activator identified from a chemical library on dopaminergic neurons.

Yasuhiko Izumi, Harue Kataoka, Yuri Inose, Akinori Akaike, Yutaka Koyama, Toshiaki Kume  
*European Journal of Pharmacology* (2018) 818:470-479. に掲載

## 引用文献

1. Diaz MN, Frei B, Vita JA, Keaney JF Jr. Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *N Engl J Med.* 337(6):408-16 (1997).
2. Giasson BI, Ischiropoulos H, Lee VM, Trojanowski JQ. The relationship between oxidative/nitrative stress and pathological inclusions in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Free Radic Biol Med.* 32(12):1264-75 (2002).
3. Klaunig JE, Kamendulis LM. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 44:239-67 (2004).
4. Olinski R, Siomek A, Rozalski R, Gackowski D, Foksinski M, Guz J, Dziaman T, Szpila A, Tudek B. Oxidative damage to DNA and antioxidant status in aging and age-related diseases. *Acta Biochim Pol.* 54(1):11-26 (2007).
5. Massy ZA, Stenvinkel P, Druke TB. The role of oxidative stress in chronic kidney disease. *Semin Dial.* 22(4):405-8 (2009).
6. Roberts CK, Sindhu KK. Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Sci.* 84(21-22):705-12 (2009).
7. Dexter DT, Carter CJ, Wells FR, Javoy-Agid F, Agid Y, Lees A, Jenner P, Marsden CD. Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. *J Neurochem.* 52(2):381-389 (1989).
8. Alam ZI, Jenner A, Daniel SE, Lees AJ, Cairns N, Marsden CD, Jenner P, Halliwell B. Oxidative DNA damage in the parkinsonian brain: an apparent selective increase in 8-hydroxyguanine levels in substantia nigra. *J Neurochem.* 69(3):1196-203 (1997).
9. Floor E, Wetzel MG. Increased protein oxidation in human substantia nigra pars compacta in comparison with basal ganglia and prefrontal cortex measured with an improved dinitrophenylhydrazine assay. *J Neurochem.* 70(1):268-75 (1998).
10. Martin HL, Teismann P. Glutathione--a review on its role and significance in Parkinson's disease. *FASEB J.* 23(10):3263-72 (2009).
11. Barnham KJ, Masters CL, Bush AI. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat Rev Drug Discov.* 3(3):205-14 (2004).
12. Blesa J, Trigo-Damas I, Quiroga-Varela A, Jackson-Lewis VR. Oxidative stress and Parkinson's disease. *Front Neuroanat.* 9:91 (2015).
13. Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem.* 59(5):1609-23 (1992).
14. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 39(1):44-84 (2007).

15. Izumi Y, Sawada H, Sakka N, Yamamoto N, Kume T, Katsuki H, Shimohama S, Akaike A. p-Quinone Mediates 6-Hydroxydopamine-Induced Dopaminergic Neuronal Death and Ferrous Iron Accelerates the Conversion of p-Quinone Into Melanin Extracellularly. *Journal of Neuroscience Research*. 79:849-860 (2005).
16. Izumi Y, Sawada H, Yamamoto N, Kume T, Katsuki H, Shimohama S, Akaike A. Iron accelerates the conversion of dopamine-oxidized intermediates into melanin and provides protection in SH-SY5Y cells. *J Neurosci Res*. 82(1):126-37 (2005).
17. Schapira AH. Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Lancet Neurol*. 7(1):97-109 (2008).
18. Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Clark JB, Jenner P, Marsden CD. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem*. 54(3):823-7 (1990).
19. Scarffe LA, Stevens DA, Dawson VL, Dawson TM. Parkin and PINK1: much more than mitophagy. *Trends Neurosci*. 37(6):315-24 (2014).
20. Wood-Kaczmar A, Gandhi S, Yao Z, Abramov AY, Miljan EA, Keen G, Stanyer L, Hargreaves I, Klupsch K, Deas E, Downward J, Mansfield L, Jat P, Taylor J, Heales S, Duchen MR, Latchman D, Tabrizi SJ, Wood NW. PINK1 is necessary for long term survival and mitochondrial function in human dopaminergic neurons. *PLoS One*. 3(6):e2455 (2008).
21. Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 47:89-116 (2007).
22. Kobayashi A, Kang MI, Okawa H, Ohtsuji M, Zenke Y, Chiba T, Igarashi K, Yamamoto M. Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol Cell Biol*. 24(16):7130-9 (2004).
23. Motohashi H, Yamamoto M. Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends Mol Med*. 10(11):549-57 (2004).
24. Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD, Cole RN, Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Yamamoto M, Talalay P. Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99(18):11908-13 (2002).
25. Kobayashi A, Kang MI, Watai Y, Tong KI, Shibata T, Uchida K, Yamamoto M. Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of Keap1. *Mol Cell Biol*. 26(1):221-9 (2006).
26. Singh SV, Srivastava SK, Choi S, Lew KL, Antosiewicz J, Xiao D, Zeng Y, Watkins SC, Johnson CS, Trump DL, Lee YJ, Xiao H, Herman-Antosiewicz A. Sulforaphane-induced cell death in human prostate cancer cells is initiated by reactive oxygen species. *J Biol Chem*. 80(20):19911-24 (2005).

27. Mizuno K, Kume T, Muto C, Takada-Takatori Y, Izumi Y, Sugimoto H, Akaike A. Glutathione biosynthesis via activation of the nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2)--antioxidant-response element (ARE) pathway is essential for neuroprotective effects of sulforaphane and 6-(methylsulfinyl) hexyl isothiocyanate. *J Pharmacol Sci.* 115(3):320-8 (2011).
28. Satoh T, McKercher SR, Lipton SA. Nrf2/ARE-mediated antioxidant actions of pro-electrophilic drugs. *Free Radic Biol Med.* 65:645-657 (2013).
29. Izumi Y, Matsumura A, Wakita S, Akagi K, Fukuda H, Kume T, Irie K, Takada-Takatori Y, Sugimoto H, Hashimoto T, Akaike A. Isolation, identification, and biological evaluation of Nrf2-ARE activator from the leaves of green perilla (*Perilla frutescens* var. *crispa* f. *viridis*). *Free Radic Biol Med.* 53(4):669-79 (2012).
30. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199–1200 (1958).
31. Hur W, Sun Z, Jiang T, Mason DE, Peters EC, Zhang DD, Luesch H, Schultz PG, Gray NS. A Small-Molecule Inducer of the Antioxidant Response Element. *Chemistry & Biology.* 17:537–547 (2010).
32. Sherratt PJ, Huang HC, Nguyen T, Pickett CB. Role of protein phosphorylation in the regulation of NF-E2-related factor 2 activity. *Methods Enzymol.* 378:286-301 (2004).
33. Wang R, Mason DE, Choe KP, Lewin AS, Peters EC, Luesch H. In Vitro and in Vivo Characterization of a Tunable Dual-Reactivity Probe of the Nrf2-ARE Pathway. *ACS Chem Biol.* 8:1764–1774 (2013).
34. Wu1 KC, McDonald PR, Liu JJ, Chaguturu R, Klaassen CD. Implementation of a High-Throughput Screen for Identifying Small Molecules to Activate the Keap1-Nrf2- ARE Pathway. *PLoS One.* 7:e44686 (2012).
35. Fenton HJH. Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J Chem Soc Trans.* 65:899–910 (1894).
36. Haleagrahara N, Siew CJ, Ponnusamy K. Effect of quercetin and desferrioxamine on 6-hydroxydopamine (6-OHDA) induced neurotoxicity in striatum of rats. *J Toxicol Sci.* 38(1):25-33 (2013).
37. Ross D, Kepa JK, Winski SL, Beall HD, Anwar A, Siegel D. NAD(P)H:quinone .oxidoreductase 1 (NQO1): chemoprotection, bioactivation, gene regulation and genetic polymorphisms. *Chemico-Biological Interactions.* 129:77-97 (2000).
38. Hwang O. Role of oxidative stress in Parkinson's disease. *Exp Neurobiol.* 22(1):11-7 (2013).
39. Blesa J, Trigo-Damas I, Quiroga-Varela A, Jackson-Lewis VR. Oxidative stress and Parkinson's disease. *Front Neuroanat.* 9:91 (2015).
40. Saito Y, Akazawa-Ogawa Y, Matsumura A, Saigoh K, Itoh S, Sutou K, Kobayashi M, Mita Y, Shichiri M, Hisahara S, Hara Y, Fujimura H, Takamatsu H, Hagihara Y, Yoshida Y, Hamakubo T,

Kusunoki S, Shimohama S, Noguchi N. Oxidation and interaction of DJ-1 with 20S proteasome in the erythrocytes of early stage Parkinson's disease patients. *Scientific Reports*. 6:30793 (2016).

41. Jakel RJ, Townsend JA, Kraft AD, Johnson JA. Nrf2-mediated protection against 6-hydroxydopamine. *Brain Res*. 1144:192-201 (2007).

42. Chen PC, Vargas MR, Pani AK, Smeyne RJ, Johnson DA, Kan YW, Johnson JA. Nrf2-mediated neuroprotection in the MPTP mouse model of Parkinson's disease: Critical role for the astrocyte. *Proc Natl Acad Sci USA*. 106(8):2933-8 (2009).

43. Williamson TP, Johnson DA, Johnson JA. Activation of the Nrf2-ARE pathway by siRNA knockdown of Keap1 reduces oxidative stress and provides partial protection from MPTP-mediated neurotoxicity. *Neurotoxicology*. 33(3):272-9 (2012).

44. Ramsey CP, Glass CA, Montgomery MB, Lindl KA, Ritson GP, Chia LA, Hamilton RL, Chu CT, Jordan-Sciutto KL. Expression of Nrf2 in neurodegenerative diseases. *J Neuropathol Exp Neurol*. 66(1):75-85 (2007).

45. Minnema DJ, Travis KZ, Breckenridge CB, Sturgess NC, Butt M, Wolf JC, Zadory D, Beck MJ, Mathews JM, Tisdell MO, Cook AR, Botham PA, Smith LL.

Dietary administration of paraquat for 13 weeks does not result in a loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra of C57BL/6J mice. *Regul Toxicol Pharmacol*. 68(2):250-8 (2014).

46. Masaki Y, Izumi Y, Matsumura A, Akaike A, Kume T. Protective effect of Nrf2-ARE activator isolated from green perilla leaves on dopaminergic neuronal loss in a Parkinson's disease model. *Eur J Pharmacol*. 798:26-34 (2017).

47. Davinelli S, Scapagnini G, Denaro F, Calabrese V, Benedetti F, Krishnan S, Curreli S, Bryant J, Zella D. Altered expression pattern of Nrf2/HO-1 axis during accelerated-senescence in HIV-1 transgenic rat. *Biogerontology*. 5(5):449-61 (2014).

48. Bell KF, Al-Mubarak B, Martel MA, McKay S, Wheelan N, Hasel P, Márkus NM, Baxter P, Deighton RF, Serio A, Bilican B, Chowdhry S, Meakin PJ, Ashford ML, Wyllie DJ, Scannevin RH, Chandran S, Hayes JD, Hardingham GE. Neuronal development is promoted by weakened intrinsic antioxidant defences due to epigenetic repression of Nrf2. *Nat Commun*. 6:7066 (2015).

49. Chen PC, Vargas MR, Pani AK, Smeyne RJ, Johnson DA, Kan YW, Johnson JA. Nrf2-mediated neuroprotection in the MPTP mouse model of Parkinson's disease: Critical role for the astrocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106(8):2933-8 (2009).

50. Jakel RJ, Townsend JA, Kraft AD, Johnson JA. Nrf2-mediated protection against 6-hydroxydopamine. *Brain Res*. 144:192-201 (2007).

51. Abraham NG, Kappas A. Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase. *Pharmacol Rev*. 60(1):79-127 (2008).

52. Ryter SW, Alam J, Choi AM. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to

- therapeutic applications. *Physiol Rev.* 86(2):583-650 (2006).
53. Vargas MR, Johnson JA. The Nrf2-ARE cytoprotective pathway in astrocytes. *Expert Rev Mol Med.* 3;11:e17 (2009).
54. Linker RA, Lee DH, Ryan S, van Dam AM, Conrad R, Bista P, Zeng W, Hronowsky X, Buko A, Chollate S, Ellrichmann G, Brück W, Dawson K, Goelz S, Wiese S, Scannevin RH, Lukashev M, Gold R. Fumaric acid esters exert neuroprotective effects in neuroinflammation via activation of the Nrf2 antioxidant pathway. *Brain.* 134(Pt 3):678-92 (2011).
55. Espinosa-Diez C, Fierro-Fernández M, Sánchez-Gómez F, Rodríguez-Pascual F, Alique M, Ruiz-Ortega M, Beraza N, Martínez-Chantar ML, Fernández-Hernando C, Lamas S. Targeting of Gamma-Glutamyl-Cysteine Ligase by miR-433 Reduces Glutathione Biosynthesis and Promotes TGF- $\beta$ -Dependent Fibrogenesis. *Antioxid Redox Signal.* 23(14):1092-105 (2015).
56. Jing X, Wei X, Ren M, Wang L, Zhang X, Lou H. Neuroprotective Effects of Tanshinone I Against 6-OHDA-Induced Oxidative Stress in Cellular and Mouse Model of Parkinson's Disease Through Upregulating Nrf2. *Neurochem Res.* 41(4):779-86 (2016).
57. Yamamoto N, Izumi Y, Matsuo T, Wakita S, Kume T, Takada-Takatori Y, Sawada H, Akaike A. Elevation of heme oxygenase-1 by proteasome inhibition affords dopaminergic neuroprotection. *J Neurosci Res.* 88(9):1934-42 (2010).
58. Verma A, Hirsch DJ, Glatt CE, Ronnett GV, Snyder SH. Carbon monoxide: a putative neural messenger. *Science.* ;259(5093):381-4 (1993).
59. Weinreb O, Mandel S, Youdim MBH, Amit T. Targeting dysregulation of brain iron homeostasis in Parkinson's disease by iron chelators. *Free Radic Biol Med.* 62:52-64 (2013).
60. Texel SJ, Xu X, Harris ZL. Ceruloplasmin in neurodegenerative diseases. *Biochem Soc Trans.* 36:1277-81 (2008).
61. Schipper HM. Heme oxygenase expression in human central nervous system disorders. *Free Radic Biol Med.* 37(12):1995-2011 (2004).
62. Suttner DM, Dennery PA. Reversal of HO-1 related cytoprotection with increased expression is due to reactive iron. *FASEB J.* 13: 1800-1809 (1999).
63. Kirino Y, Takeno M, Kobayashi H, Ishigatsubo Y. The roles of heme oxygenase (HO)-1 in human inflammations. *Inflammation and Regeneration.* 25(5): 431-435 (2005).