

(続紙 1)

京都大学	博士（薬学）	氏名	水野 景太
論文題目	イソチオシアネートによるNrf2-ARE経路を介した神経保護作用機序に関する研究		
（論文内容の要旨） イソチオシアネートは-N=C=Sという官能基を有する化合物群であり、アブラナ科の植物においてsulforaphane、6-(methylsulfinyl) hexyl isothiocyanate（6-HITC）などが同定されている。最近、イソチオシアネートは、末梢由来細胞において転写因子であるnuclear factor-erythroid 2 related-factor 2（Nrf2）を活性化し、antioxidant response element（ARE）への結合を介して、第二相解毒酵素や抗酸化酵素をコードする遺伝子の転写を活性化させることが報告されてきた。酸化ストレスやグルタミン酸神経毒性は、脳梗塞やアルツハイマー病などの難治性神経変性疾患の病態形成の一因として、様々な中枢神経疾患への関与が示唆されている。イソチオシアネートによる生体内防御システムの賦活がこれら神経毒性を抑制し、種々の神経疾患の有効な予防・治療戦略になりうる可能性があるが、中枢神経系におけるイソチオシアネートの作用については不明な点が多い。そこで、本研究において著者は、in vitroおよびin vivo実験系を用い、中枢神経系におけるイソチオシアネートの神経保護作用およびその作用機序の解析を進めた結果、以下の新知見を得た。			
第一章 イソチオシアネートの神経保護作用機序の解明 ラット胎仔由来初代培養線条体細胞を用い、酸化ストレスに対するsulforaphaneおよび6-HITCの作用を検討した。Sulforaphaneあるいは6-HITCを24時間前処置したところ、H₂O₂により惹起される細胞毒性に対して濃度依存的に保護作用を示した。次いで、初代培養大脳皮質細胞を用いた検討において、sulforaphaneは興奮性アミノ酸であるグルタミン酸神経毒性に対して保護作用を有することを見出した。そこで、培養線条体細胞を用いてイソチオシアネートの神経保護作用機序の解析を行った。Nrf2の細胞内局在に対する作用を検討したところ、sulforaphaneあるいは6-HITCはNrf2の核内移行を促進することが示唆された。Nrf2-ARE経路の活性化により、細胞内抗酸化物質であるグルタチオンの律速酵素であるγ-glutamyl cysteine synthetase（γ-GCS）の誘導が報告されている。培養線条体細胞においてsulforaphaneあるいは6-HITCの処置はγ-GCS発現量を上昇し、さらに細胞内グルタチオン含有量を増加した。そこで、細胞内グルタチオン量上昇作用の保護作用への関与を検討した。γ-GCS阻害薬であるL-buthionine-[S, R]-sulfoximine を前処置したところ、sulforaphaneおよび6-HITCによるH₂O₂毒性に対する保護作用は有意に抑制された。以上の結果から、初代培養線条体細胞において、sulforaphaneおよび6-HITCは酸化ストレスに対して保護作用を示し、その保護作用機序には、細胞内防御システムであるNrf2-ARE経路を活性化し、細胞内グルタチオン量を上昇することが重要な役割を果たすことが示唆された。			

第二章 SulforaphaneによるNrf2-ARE経路活性化機構の解析

転写因子であるNrf2は、kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) と結合することにより細胞質に存在しており、Keap1との解離により核内に移行する。Sulforaphaneは、Keap1と直接相互作用することによりNrf2との解離を惹起するが、最近Nrf2活性化に種々の細胞内シグナル伝達系も関与することを示唆する知見も肝細胞などで報告されている。そこで、培養線条体細胞におけるsulforaphaneのNrf2-ARE経路活性化機構の解明を目的とし、sulforaphaneの保護作用における各種キナーゼ阻害薬の作用を検討した。PI3-kinase阻害薬であるLY294002およびwortmanninは、H₂O₂毒性に対するsulforaphaneによる保護作用を抑制した。一方、protein kinase C阻害薬であるbisindolylmaleimide Iおよびmitogen-activated protein kinase阻害薬であるPD98059、SP600125、SB203580は、保護作用に影響を与えなかった。SulforaphaneによるPI3-kinase/Akt経路の活性化を検討する目的でリン酸化Aktを検討したところ、sulforaphaneはAktのリン酸化レベルを一過性に上昇した。さらに、sulforaphaneにより誘発されるNrf2の核内移行ならびに細胞内グルタチオン含有量上昇作用は、LY294002により抑制された。以上の結果から、培養線条体細胞におけるsulforaphaneによるNrf2-ARE経路の活性化には、PI3-kinase/Akt経路が重要な役割を果たしていることが示唆された。

第三章 ラット中大脳動脈閉塞モデルに対するイソチオシアネートの作用

イソチオシアネートの神経保護作用をin vivo実験系で検討するため、ラット中大脳動脈閉塞モデルを用い、sulforaphaneおよび6-HITCの作用を検討した。Sulforaphaneあるいは6-HITCを虚血開始24時間前に腹腔内投与したところ、vehicle群に比較して虚血側梗塞巣体積およびneurological deficit score (NDS)に改善効果が認められた。一方、sulforaphaneを虚血負荷15分後に腹腔内投与したところ、vehicle群と比較して虚血側梗塞巣体積およびNDSに有意な変化は認められなかった。以上の結果より、イソチオシアネートがin vivoにおいて神経保護作用を有することが確認された。

以上、著者は、初代培養神経細胞系を用いて、イソチオシアネートの中枢神経細胞保護作用を明らかにし、その機序として細胞内防御システムであるNrf2-ARE経路の活性化を介した抗酸化系の賦活が重要であることを示した。さらにラット中大脳動脈閉塞モデルを用いたin vivo実験系においてイソチオシアネートが保護作用を有することを明らかにした。本研究の成果は、中枢神経細胞において植物由来成分のイソチオシアネートがNrf2-ARE経路を活性化し、生体内抗酸化システムを賦活することを明らかにしたものであり、酸化ストレスの関与する様々な中枢神経疾患の予防・治療薬を開発する上で重要な基礎的知見を提供するものである。

(論文審査の結果の要旨)

イソチオシアネートは $-N=C=S$ という官能基を有する化合物群であり、アブラナ科の植物においてsulforaphane、6-(methylsulfinyl) hexyl isothiocyanate (6-HITC) などが同定されている。最近、イソチオシアネートは、末梢由来細胞において転写因子であるnuclear factor-erythroid 2 related-factor 2 (Nrf2) を活性化し、antioxidant response element (ARE) への結合を介して、第二相解毒酵素や抗酸化酵素をコードする遺伝子の転写を活性化させることが報告されてきた。酸化ストレスやグルタミン酸神経毒性は、脳梗塞やアルツハイマー病などの難治性神経変性疾患の病態形成の一因として、様々な中枢神経疾患への関与が示唆されている。イソチオシアネートによる生体内防御システムの賦活がこれら神経毒性を抑制し、種々の神経疾患の有効な予防・治療戦略になりうる可能性があるが、中枢神経系におけるイソチオシアネートの作用については不明な点が多い。そこで、in vitroおよびin vivo実験系を用い、中枢神経系におけるイソチオシアネートの神経保護作用およびその作用機序の解析を行った。

ラット胎仔由来初代培養線条体細胞を用い、酸化ストレスに対するsulforaphaneおよび6-HITCの作用を検討した。Sulforaphaneあるいは6-HITCを24時間前処置したところ、 H_2O_2 により惹起される細胞毒性に対して濃度依存的に保護作用を示した。次いで、初代培養大脳皮質細胞を用いた検討において、sulforaphaneはグルタミン酸神経毒性に対して保護作用を有することを見出した。そこで、培養線条体細胞を用いてイソチオシアネートの神経保護作用機序の解析を行った。Nrf2の細胞内局在に対する作用を検討したところ、sulforaphaneあるいは6-HITCはNrf2の核内移行を促進することが示唆された。培養線条体細胞においてsulforaphaneあるいは6-HITCの処置は γ -GCS発現量を上昇し、さらに細胞内グルタチオン含有量を増加した。 γ -GCS阻害薬であるL-buthionine-[S, R]-sulfoximine を前処置したところ、sulforaphaneおよび6-HITCによる H_2O_2 毒性に対する保護作用は有意に抑制された。以上の結果から、初代培養線条体細胞において、sulforaphaneおよび6-HITCは酸化ストレスに対して保護作用を示し、その保護作用機序には、細胞内防御システムであるNrf2-ARE経路を活性化し、細胞内グルタチオン量を上昇することが重要な役割を果たすことが示唆された。

転写因子であるNrf2 は、kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) と結合することにより細胞質に存在しており、Keap1 との解離により核内に移行する。Sulforaphaneは、Keap1 と直接相互作用することによりNrf2 との解離を惹起するが、最近Nrf2 活性化に種々の細胞内シグナル伝達系も関与することを示唆する知見も肝細胞などで報告されている。そこで、培養線条体細胞におけるsulforaphaneのNrf2-ARE経路活性化機構の解明を目的とし、sulforaphaneの保護作用における各種キナーゼ阻害薬の作用を検討した。PI3-kinase阻害薬であるLY294002 およびwortmannin は、 H_2O_2 毒性に対するsulforaphaneによる保護作用を抑制した。一方、protein kinase C阻害薬であるbisindolylmaleimide I およびmitogen-activated protein kinase阻害薬であるPD98059、SP600125、SB203580 は、保護作用に影響を与えなかった。Sulforaphaneによ

るPI3-kinase/Akt経路の活性化を検討する目的でリン酸化Aktを検討したところ、sulforaphaneはAktのリン酸化レベルを一過性に上昇した。さらに、sulforaphaneにより誘発されるNrf2 の核内移行ならびに細胞内グルタチオン含有量上昇作用は、LY294002 により抑制された。以上の結果から、培養線条体細胞におけるsulforaphaneによるNrf2-ARE経路の活性化には、PI3-kinase/Akt経路が重要な役割を果たしていることが示唆された。

イソチオシアネートの神経保護作用をin vivo実験系で検討するため、ラット中大脳動脈閉塞モデルを用い、sulforaphaneおよび6-HITCの作用を検討した。Sulforaphaneあるいは6-HITCを虚血開始24時間前に腹腔内投与したところ、vehicle群に比較して虚血側梗塞巣体積およびneurological deficit score (NDS) に改善効果が認められた。一方、sulforaphaneを虚血負荷15分後に腹腔内投与したところ、vehicle群と比較して虚血側梗塞巣体積およびNDSに有意な変化は認められなかった。以上の結果より、イソチオシアネートがin vivo において神経保護作用を有することが確認された。

以上、初代培養神経細胞系を用いて、イソチオシアネートの中枢神経細胞保護作用を明らかにし、その機序として細胞内防御システムであるNrf2-ARE経路の活性化を介した抗酸化系の賦活が重要であることを示した。さらにラット中大脳動脈閉塞モデルを用いたin vivo実験系においてイソチオシアネートが保護作用を有することを明らかにした。本研究の成果は、中枢神経細胞において植物由来成分のイソチオシアネートがNrf2-ARE経路を活性化し、生体内抗酸化システムを賦活することを明らかにしたものであり、酸化ストレスの関与する様々な中枢神経疾患の予防・治療薬を開発する上で重要な基礎的知見を提供するものである。

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。

さらに、平成23年2月21日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 平成 年 月 日以降