

## 学位論文の内容の要旨

学位論文題目 エパルレスタットによる Nrf2 制御抗酸化因子の発現誘導に関する研究

論文指導教授 丹 保 好 子 ㊦

学位申請者 山 佳 織 ㊦

近年、新薬開発の行き詰まりを打開する方法として、ドラッグリプロファイリング研究が注目されている。ドラッグリプロファイリング研究とは、すでに臨床で使用されヒトでの安全性が確かめられている既存医薬品を網羅的に再解析することにより新規作用を見出し、他の疾患の治療薬として適応拡大するという研究手法である。例えば、胃薬であるテプレノン<sup>®</sup>は、アルツハイマー病への適応拡大に向けて現在臨床試験が行われており、これは基礎研究における新規作用の発見が基となっている。申請者は、糖尿病性末梢神経障害治療薬であるエパルレスタット（EPS）を用い、ドラッグリプロファイリングに結びつくことを目指して、培養細胞を用いた基礎研究を行った。

EPS は、ポリオール経路のアルドース還元酵素を阻害することにより、細胞内のソルビトールの蓄積を抑制し、糖尿病性末梢神経障害の治療に用いられる。通常、成人男性における最高血中濃度は約 12  $\mu\text{M}$  である。EPS は 1992 年に発売されて以降、現在も臨床で使用されており、安全性や薬物動態が既に明らかになっている。一方で、アルドース還元酵素阻害以外の作用については知られていない。

酸化ストレスは、心血管疾患、炎症性疾患、神経変性疾患などの多くの病態の形成に関わっている。酸化ストレスとは、生体内の活性酸素生成系の亢進や抗酸化防御系の低下により引き起こされる。グルタチオン（GSH）は、細胞内に mM オーダーと豊富に存在し、活性酸素

種（ROS）や過酸化脂質の消去に関与するなど、生体内の抗酸化防御系における役割は大きい。GSH量は、GSH生合成律速酵素であるγ-グルタミルシステイン合成酵素（GCL）により調節されている。GCLの発現量を増大することが出来れば、生体組織細胞において抗酸化能を高めることに繋がり、酸化ストレスに対する防御能の増強が期待できる。

GCLの発現誘導は、転写因子 nuclear factor erythroid 2-related factor 2（Nrf2）により制御されている。Nrf2に関する研究は、2000年以降飛躍的に進み、GCLだけでなく生体内のレドックス応答タンパク質であるチオレドキシン（Trx）の発現量もNrf2によって制御されていることが明らかになった。さらに、スーパーオキシドジスムターゼ（SOD）やカタラーゼ、ヘムオキシゲナーゼ-1（HO-1）などの多くの抗酸化因子の発現もNrf2により制御されている。

本研究では、EPSの新規作用を見出すことを目的として、Nrf2制御抗酸化因子に対するEPSの影響について検討した。シュワン細胞および血管内皮細胞をEPSで処理し、細胞内GSH量およびGCL、Trx、SOD、カタラーゼ、HO-1の発現量を測定した。Nrf2の活性化や酸化ストレス誘導細胞傷害に対するEPSの影響について併せて検討した。

## **1. シュワン細胞におけるEPSによるGSHの合成誘導**

ラットシュワン細胞に10~200 μM EPSを添加し、24時間処理した。はじめに、細胞生存率に対するEPSの影響を検討した。100 μMおよび200 μM EPS処理では、4%および18%の細胞傷害が認められ、これにはアポトーシス様の細胞死が関与している可能性が示された。一方、細胞内GSH量はコントロールと比較して10 μM EPS処理により約3倍、50 μM EPS処理では約5倍と濃度依存的に増加した。さらに、EPSによりGCL mRNA発現量は増加した。これらの結果から、EPSは遺伝子レベルで細胞内GSH量を増大させることが明らかとなった。なお、このGSHの合成誘導は、EPS以外のアルドース還元酵素阻害剤では認

められなかったことから、アルドース還元酵素阻害作用に起因しないことが示唆される。

次に、Nrf2 に対する EPS の影響について検討した。Nrf2 は、通常細胞質において Kelch-like ECH-associating protein 1 (Keap1) と結合し不活性な状態にあるが、Keap1 から解離し核へと移行することで活性化される。EPS により Nrf2 mRNA 発現量に影響は認められなかったが、Nrf2 の核内移行が認められ、Nrf2 の活性化が明らかとなった。Nrf2 ノックダウン細胞（ノックダウン効率約 70%）において、EPS による細胞内 GSH 量および GCL 発現量の増大は、いずれも抑制された。これらの結果から、EPS は Nrf2 の活性化を介して、GSH の合成誘導を促進することが示唆される。

EPS の GSH 合成誘導により、細胞の抗酸化能は増大することが期待される。そこで、酸化ストレス誘導細胞傷害に対する EPS の影響について検討した。EPS は、過酸化水素 ( $H_2O_2$ )、*t*-ブチルヒドロペルオキシド (*t*-BHP)、2,2'-アゾビス (アミノプロパン) ジヒドロクロリド (AAPH)、メナジオン (MQ) が誘導する細胞傷害を抑制した。

以上の結果から、EPS はシュワン細胞において、GCL の発現を誘導することにより、細胞内 GSH 量を増大させることが明らかとなった。さらに、EPS は酸化ストレスに対して細胞保護作用を示すことが確認された。また、EPS によるこれらの作用には、Nrf2 の活性化が関与していることが示唆される。

## **2. シュワン細胞における Nrf2 制御抗酸化因子に対する EPS の影響**

EPS による Nrf2 の活性化が明らかとなったことから、EPS は GCL だけでなく様々な Nrf2 制御抗酸化因子を増大させる可能性が考えられる。そこで、Nrf2 制御抗酸化因子である SOD、カタラーゼ、HO-1 に対する EPS の影響について検討した。SOD、カタラーゼ、HO-1 mRNA およびタンパク質発現量は有意に増加した。なかでも、HO-1 発現量の増大は顕著であった。これら抗酸化因子の増大は、いずれも Nrf2 ノックダウン細胞においてほぼ完全に抑制された。これらの結果は、EPS

が GSH の合成誘導のみならず、HO-1 をはじめとした Nrf2 制御抗酸化因子の発現を誘導していることを示している。

HO-1 は抗酸化作用だけではなく、抗炎症作用、抗アポトーシス作用を有することが報告されている。一方、過剰発現した HO-1 は、細胞毒性を示すことが明らかにされている。その毒性発現機構として、遊離鉄を介した Fenton 反応による ROS の増大が提案されている。しかし、EPS で処理した細胞では ROS の増大は認められず、遊離鉄の減少およびこれを捕捉するフェリチンの発現誘導が確認された。このことから、EPS は細胞毒性を示すことなく HO-1 の高発現を誘導することが示唆される。

以上の結果より、EPS は GCL だけでなく HO-1、SOD、カタラーゼを含む様々な Nrf2 制御抗酸化因子の発現を誘導することが考えられる。

### **3. 血管内皮細胞における Nrf2 制御抗酸化因子に対する EPS の影響**

EPS による Nrf2 制御抗酸化因子の発現誘導が多種多様な細胞で認められれば、EPS の適応拡大に繋がる可能性が高いと考えられる。そこで、血管内皮細胞を用いた検討を行った。

ウシ大動脈内皮細胞において、EPS は細胞内 GSH 量および GCL 発現量を増大した。また、SOD、カタラーゼ、HO-1 の発現誘導も認められた。これらの EPS による抗酸化因子の増大は、Nrf2 ノックダウン細胞において抑制された。

Trx は GSH と相互に補完しながらレドックスを調節し、最近では、疾患の予防や治療に有効であると考えられている。血管内皮細胞では Nrf2 の活性化を介した EPS による Trx の発現誘導が認められた。また、酸化ストレス誘導細胞傷害を EPS が抑制することが確認された。さらに、EPS による GSH の合成誘導、Nrf2 の活性化、細胞傷害抑制作用は、ホスホイノシチド 3-キナーゼ (PI3K) の阻害剤により抑制された。このことから、Nrf2 の上流には PI3K の関与が示唆される。

以上の結果から、EPS はシュワン細胞だけではなく、血管内皮細胞においても Nrf2 制御抗酸化因子を増大させ、酸化ストレス誘導細胞傷

害を抑制することが明らかとなった。近年、心血管疾患や炎症性疾患などの種々の疾患に対する Nrf2 の保護的予防的役割が期待され、Nrf2 誘導剤を治療薬として用いることが計画されている。本研究で得られた結果から、EPS は Nrf2 の誘導剤として有用であることが示唆される。

#### まとめ

本研究では、シュワン細胞および血管内皮細胞を用いて、Nrf2 制御抗酸化因子に対する EPS の影響について検討した。EPS は、Nrf2 の活性化を介して細胞内 GSH 量、GCL、Trx、SOD、カタラーゼ、HO-1 の発現量を増大させることが明らかとなった。EPS は、①Nrf2 を活性化し、②抗酸化因子を増大する。これにより、③酸化ストレス誘導細胞傷害に対して細胞保護作用を示す。なお、血管内皮細胞においては Nrf2 の上流への PI3K の関与が明らかとなった。

最近では、Nrf2 誘導剤の心血管疾患、炎症性疾患、神経変性疾患に対する治療効果が期待されている。しかし、実際に認可された医薬品がある一方で、安全性の問題から開発が中止されているものもある。本研究では、安全性や薬物動態が既に明らかとなっている EPS が血中濃度に近い濃度で、Nrf2 制御抗酸化因子を増大させることが明らかとなった。本研究の成果は、EPS のドラッグリプロファイリングへと繋がる基礎研究として、EPS が酸化ストレスの関与する疾患の治療に役立てられる可能性を示すものである。