

学位論文題名

 α -Phenyl-N-*tert*-butylnitronone の細胞内情報伝達に及ぼす
影響と虚血再灌流誘発中枢神経障害に対する防護機構

学位論文内容の要旨

スピントラップ剤 α -phenyl-N-*tert*-butylnitronone (PBN)は生体系でのフリーラジカル研究に最もよく使われている薬剤のひとつであり、低毒性でさまざまな酸化障害に対し防護効果をもつことが知られている。PBN がスナネズミにおいて加齢に伴う蛋白質の酸化や酵素活性の低下および記憶の喪失を抑制することや、海馬細胞を虚血再灌流による神経細胞死から防護すること、さらに LEC ラットの銅誘導性劇症肝炎を抑制することが報告されている。PBN によるこれらの効果はそれぞれの酸化ストレスによる酸化反応を PBN が阻害することによるものとされている。最近、Kotake らにより PBN がリポポリサッカライド投与ラットおよびマウスに対し炎症性サイトカインの産生抑制、抗炎症性サイトカインの産生増強および誘導型一酸化窒素合成酵素の誘導阻害といった抗炎症効果を持つことが報告され、彼らはこれらの作用は PBN が細胞内の酸化還元状態を変化させ（レドックス制御）サイトカインのクロストークを変化させることにより生じるものと推察した。これらの結果は PBN がフリーラジカルを捕捉し、消去する作用のみならず、細胞内のレドックス状態を変化させ、細胞内シグナル伝達に影響を与えうる事を示唆するものである。

本研究では PBN の薬理作用およびそのメカニズムの解析を目的として、まず初めに、神経細胞のモデル系として広く使われているラット副腎由来褐色腫細胞 PC12 細胞を用いた *in vitro* 培養細胞系において、PBN 処理により PC12 細胞に神経様突起が誘導されることを見出し、神経成長因子 (nerve growth factor, NGF) による神経様突起誘導と比較しながら PBN による神経様突起誘導メカニズムについて検討を行った。次に、*in vivo* の系においてスナネズミでの両側頸動脈梗塞による虚血再灌流に対する PBN の神経細胞死抑制効果を確認し、MAP キナーゼカスケードを中心にそのメカニズムの解析を行った。

ラット副腎褐色腫細胞 PC12 細胞を用いた検討において、PBN が用量依存的に神経様突起を誘導することを見出した。10 mM PBN で3日間処理することにより約70%のPC12細胞に神経様突起の伸長が確認された。形態的には NGF により誘導された神経様突起が多極性であるのに対し、PBN により誘導された神経様突起はその多くが二極性であった。さらに PBN による神経様突起誘導のメカニズムについて NGF による神経様突起誘導経路である TrkA-Ras-ERK 経路を中心に検討を行った。PBN 処理により代表的な3種のMAPキナーゼの中で ERK のみが5分以内に活性化し、SAPK および p38 の活性化は観察され

なかった。一方、NGF 刺激ではいずれの MAP キナーゼも活性化した。阻害剤を用いた検討から ERK の活性化が PBN による神経様突起誘導時に必要であることが示され、また、ドミナントネガティブ Ras の過剰発現によっても PBN による神経様突起誘導は有意に抑制された。これらの結果から、Ras-ERK 経路の活性化が PBN による神経様突起誘導に必要であることが示唆された。しかし、NGF による神経様突起誘導とは異なり、PBN は TrkA レセプター型チロシンキナーゼを活性化することはなく、さらに Shc の活性化および Grb2 との会合、ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼの活性化に由来する Akt の活性化およびホスホリパーゼ C γ の活性化も観察されなかった。さらに PBN による神経様突起誘導にはプロテインキナーゼ C (PKC) の活性化が必要であり、PBN 処理後 5 分以内に PKC ϵ の活性化が観察され、この活性化は少なくとも 120 分後まで続いた。また、PKC の阻害により PBN による神経様突起誘導が阻害され、かつ、ERK の活性化もある程度抑制されたことから、PKC は神経様突起誘導に必須であり、かつ ERK の活性化にも部分的に関与していることが示唆された。一方、PBN による神経様突起誘導はチオール性抗酸化剤である N-アセチルシステイン (NAC) により阻害され、処理後 5 分での ERK の活性化は NAC だけでなく他の SH 還元剤であるジチオスレイトールや 2-メルカプトエタノールによっても阻害された。これらの結果から PBN が蛋白質中に生成したアミノ酸ラジカルと結合することにより蛋白質に構造変化を生じさせシグナル伝達系に影響を与えているか、もしくは PBN とラジカルの結合時に生成する一酸化窒素 (NO) が間接的に Ras に影響を与え神経様突起を誘導していることが推察された。

スナネズミへの 200 mg/kg の PBN 投与により 5 分間の脳虚血再灌流後 7 日目において脳海馬 CA1 領域での顕著な神経細胞死抑制効果が観察された。この際、虚血再灌流および PBN 投与処置後 6 時間目での MAP キナーゼファミリーの蛋白質 ERK (extracellular response kinase)、SAPK (stress activated protein kinase) および p38 において、いずれも蛋白質の発現量には変化が見られなかったが、次のようなリン酸化量 (活性化量) の変化が観察された。(1) 虚血再灌流により ERK および SAPK のリン酸化がコントロールに比較し増加した。(2) PBN 投与により自発性の ERK 活性化がコントロールに比較し促進され、一方、自発性の SAPK および p38 の活性化は抑制された。(3) PBN 投与により虚血再灌流誘導の SAPK および p38 の活性化は PBN 未投与虚血処置群に比べて減少し、PBN 投与虚血未処置群と同レベルに抑制された。また、これらと同時に PBN 投与により虚血再灌流時に発現する熱ショック蛋白質 HSP27 および HSP70 の発現量が PBN 非投与群に比較し有意に増加した。これらの結果から PBN が、本来持っているフリーラジカル除去能によってのみでなく、MAP キナーゼシグナル伝達系の調節や熱ショック蛋白質の誘導による耐性状態を誘導することによっても、脳虚血再灌流による神経細胞死を防護していることが示唆された。

以上の結果は、成長因子とは違う PBN という非タンパク性ニトロ系抗酸化剤が、in vitro さらには in vivo においても神経細胞の分化・生存に関与するシグナル伝達系を活性化し、酸化ストレスに防護的に作用するという今まで全く報告されていない事実を示している。したがって、本研究で明らかにされた非タンパク性ニトロ系抗酸化剤のシグナルに及ぼす効果と神経様突起形成メカニズムはアルツハイマー、パーキンソンや老人性痴呆のための創薬研究において重要であると考えられる。

学位論文審査の要旨

主査	教授	桑原幹典
副査	教授	藤田正一
副査	教授	伊藤茂男
副査	助教授	稲波修

学位論文題名

α -Phenyl-N-*tert*-butylnitronone の細胞内情報伝達に及ぼす 影響と虚血再灌流誘発中枢神経障害に対する防護機構

α -phenyl-N-*tert*-butylnitronone (PBN) は本来生体内フリーラジカル反応を検出するため開発された化合物であるが、低毒性で様々な薬理効果を持つことが報告されていることから、本研究では中枢神経系障害に対する PBNの防護効果を検討するとともにその作用機構の解明を試みた。

先ず、神経細胞モデルとしてラット副腎由来褐色腫細胞PC12を用い、*in vitro* 培養系でPBN処理したところ用量依存的にPC12細胞に神経様突起が誘導され、神経成長因子 (NGF) と類似の薬理作用を有することが判明した。NGFによる神経様突起誘導ではTrkA (NGF受容体) -Ras-ERK (extracellular-signal regulated kinase)の情報伝達経路が必須であることから、それと比較しながらPBNによる神経様突起誘導機構を調べた。その結果、PBNはTrkA活性化を介さずにRas-ERK経路を活性化し、さらにその下流の情報伝達経路の活性化と神経様突起誘導をもたらすことが判明した。

ERKの活性化は細胞の生存にも関与していると報告されている。従って、*in vitro* の結果は、PBNが *in vivo* で神経細胞死に対し防護的に作用する可能性を示唆している。そのため、次に *in vivo* 実験としてスナネズミの両側頸動脈を結紮し、5分後血液再灌流することによって作出した酸化ストレス誘導性神経細胞死に対するPBNの抑制効果を調べた。さらに、ERKを中心にMAPK(mitogen-activated protein kinase)活性化を調べ、その防護効果との関連も解析した。200mg/kgPBN投与は脳海馬CA1領域での顕著な細胞死抑制効果をもたらした。この時、PBN投与はERKを活性化する一方で、細胞死をもたらす情報伝達系SAPK/JNK、p38MAPKの活性化を抑制することが観察された。従来までPBNは生体内に生じた活性酸素・フリーラジカルを除去することにより生体防護作用を有すると考えられていたが、本研究結果は、PBNがMAPKシグナル伝達系の調節を通して脳虚血-血液再灌流による神経細胞死防護を行っていることを明らかにした。

以上の結果は、PBNという非タンパク性ニトロン化合物が、in vitro、in vivoにおいて神経細胞の分化・生存に関与するシグナル伝達系を活性化し、酸化ストレスに防護的に作用するという事実を示しており、脳障害に対する新たな創薬研究に貢献するものと考えられる。よって、審査員一同は、上記博士論文提出者辻雅久の博士論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第6条の規定による本研究科の行う博士論文の審査に合格と認めた。