

学位論文題名

Pharmacological study of BTZO-15, an active BTZO-1 derivative for antioxidant response element (ARE)-activation, on dextran sulfate sodium (DSS) - and 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) - induced colitis in rats.

(ARE活性化薬であるBTZO-1誘導体BTZO-15のデキストラン硫酸ナトリウム又はトリニトロベンゼンスルホン酸誘発大腸炎モデルラットにおける薬理学的研究)

学位論文内容の要旨

炎症性腸疾患(Inflammatory bowel disease: IBD)は潰瘍性大腸炎とクローン病に分類される難治性の慢性炎症性疾患で、患者数は診断基準の明確化や生活の近代化、本邦では生活様式の西洋化に伴って増加の一途にある。薬物治療は維持/寛解導入を目的として行われているものの、作用が不十分あるいは副作用面で懸念を抱えるなど満足できる水準に達していない。また根本治療法が未だないため、患者は再燃/寛解を生涯に渡って繰り返すこととなり、IBDは患者の quality of life を著しく低下させる疾患であるといえる。強力な薬効を有する治療薬の一刻も早い創出が望まれている。

著者らは初代心筋細胞を用いた cell-based assay により、血清除去によって誘発される心筋細胞のアポトーシスを強力に抑制する化合物 BTZO-1 を見出し、BTZO-1 の標的タンパク質が MIF であること、BTZO-1 が MIF との結合を介して antioxidant response element (ARE) 介在性の転写活性を亢進して HO-1 や GST Ya などの細胞保護因子の発現を誘導し細胞保護活性を発揮していることを明らかにした。本研究は、細胞保護活性を有する BTZO-1 誘導体が酸化ストレスの関与が示唆される IBD にも適用できるのではないかとする着想から、BTZO-1 誘導体の中で良好な大腸組織移行性を有する BTZO-15 の IBD 治療薬としての可能性を実験的大腸炎モデルで精査した研究である。

まず BTZO-15 の作用機序を調べ、BTZO-15 と MIF が直接結合していることを Biacore 及び Scintillation proximity assay の 2 種類の結合解析によって明らかにした。次に ARE 介在性の転写に及ぼす BTZO-15 の影響を H9c2 細胞を用いた Luciferase assay により調べ、BTZO-15 が用量依存的に ARE 介在性の転写活性を亢進することを示した。さらに ARE 支配下の細胞保護因子 HO-1 や GST Ya の発現に及ぼす BTZO-15 の影響を H9c2 細胞で調べ、両遺伝子の mRNA 量が BTZO-15 の用量に依存して増加し、BTZO-15 が ARE 活性化を介して細胞保護因子の発現を誘導することを示した。この BTZO-15 による GST Ya mRNA の発現誘導量は、MIF siRNA によって MIF 発現量をノックダウンした場合に減少することから、BTZO-15 による ARE 活性化は MIF を介している可能性が示唆された。

次にBTZO-15のARE活性化による細胞保護因子の誘導及び細胞保護作用が腸管由来の細胞でも認められるか、ラット小腸上皮細胞由来 IEC-18 細胞で調べ、BTZO-15 が IEC-18 細胞においても HO-1 mRNA の発現を亢進すること、一酸化窒素により惹起されるミトコンドリア呼吸能の低下を BTZO-15 が用量依存的に回復させることを明らかにした。以上のことはBTZO-15が腸管由来細胞に対してもARE活性化を介した細胞保護因子の発現誘導作用と、細胞保護作用を有することを示唆していた。

このような作用を有する BTZO-15 の薬理作用を 2 つの実験的大腸炎モデルで調べた。一つ目はデキストラン硫酸ナトリウム(DSS)誘発大腸炎モデルにおける BTZO-15 の薬理作用の検討である。ラットに DSS 含有水を飲水させて、大腸長の短縮、直腸重量の増加、下痢、出血などを伴う大腸炎を惹起させ、実験開始 3 日目から 6 日目までの 4 日間、BTZO-15 を一日二回経口投与して実験開始 7 日目に薬効を評価した。その結果、BTZO-15 は DSS により惹起された大腸長の短縮、直腸重量の増加、下痢、出血を用量依存的かつ有意に抑制した。また直腸組織のミエロペルオキシダーゼ(MPO)の活性を調べると、DSS により増加した MPO 活性を BTZO-15 は用量依存的かつ有意に抑制した。さらに本モデルの直腸組織内の HO-1 と GST Ya mRNA 発現量は BTZO-15 によって増加することが明らかとなった。以上のことは BTZO-15 が DSS 誘発大腸炎モデルの症状を改善し、その薬効は ARE 支配下の細胞保護因子の発現を誘導することで発揮される可能性を示唆していた。

二つ目はトリニトロベンゼンスルホン酸(TNBS)誘発大腸炎モデルにおける BTZO-15 の薬理作用を調べた試験で、ラットの直腸局所に TNBS を摂取することで作成した大腸炎に対する BTZO-15 の作用を調べた。その結果、BTZO-15 は TNBS により惹起された潰瘍の面積を有意に減少させ、直腸組織の MPO 活性も有意に減少させた。

以上、本研究では BTZO-15 が MIF を介して ARE 介在性の転写活性を亢進し ARE 支配下にある細胞保護因子の発現を誘導することで細胞保護作用を示すことと、そのような作用を持つ BTZO-15 が DSS 誘発および TNBS 誘発大腸炎モデルで薬効を示すことを明らかにした。これまでに ARE 活性化作用を持つ IBD 治療薬はなかったことから、BTZO-15 が新規メカニズムの IBD 治療薬となりうるものと考えられた。また本研究は、ARE 活性化が IBD の新しい治療ターゲットとなりうることを示唆している。

# 学位論文審査の要旨

|    |    |    |    |
|----|----|----|----|
| 主査 | 教授 | 有賀 | 寛芳 |
| 副査 | 教授 | 木原 | 章雄 |
| 副査 | 講師 | 米田 | 宏  |
| 副査 | 講師 | 佐々 | 貴之 |

## 学位論文題名

Pharmacological study of BTZO-15, an active BTZO-1 derivative for antioxidant response element (ARE)-activation, on dextran sulfate sodium (DSS) - and 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) - induced colitis in rats.

(ARE活性化薬であるBTZO-1誘導体BTZO-15のデキストラン硫酸ナトリウム又はトリニトロベンゼンスルホン酸誘発大腸炎モデルラットにおける薬理学的研究)

炎症性腸疾患(Inflammatory bowel disease: IBD)は潰瘍性大腸炎(ulcerative colitis: UC)とクローン病(Crohn's disease: CD)に分類される難治性の慢性炎症性疾患で、患者数は診断基準の明確化や生活の近代化、本邦では生活様式の西洋化に伴って増加の一途にある。薬物治療は維持/寛解導入を目的として行われているものの、作用が不十分あるいは副作用面で懸念を抱えるなど満足できる水準に達していない。また根本治療法が未だないため、患者は再燃/寛解を生産に渡って繰り返すこととなり、IBDは患者の quality of life を著しく低下させる疾患であるといえる。強力な薬効を有する治療薬の一刻も早い創出が望まれている。

著者らは初代心筋細胞を用いた cell-based assay により、血清除去によって誘発される心筋細胞のアポトーシスを強力に抑制する化合物 BTZO-1 を見出し、BTZO-1 の標的タンパク質が MIF であること、BTZO-1 が MIF との結合を介して antioxidant response element (ARE) 介在性の転写活性を亢進して HO-1 や GST Ya などの細胞保護因子の発現を誘導し細胞保護活性を発揮していることを明らかにした。本研究は、細胞保護活性を有する BTZO-1 誘導体が酸化ストレスの関与が示唆される IBD にも適用できるのではないかとこの着想から、BTZO-1 誘導体の中で良好な大腸組織移行性を有する BTZO-15 の IBD 治療薬としての可能性を実験的大腸炎モデルで精査した研究である。

まず BTZO-15 の作用機序が調べられ、BTZO-15 と MIF が直接結合していることを Biacore 及び Scintillation proximity assay の 2 種類の結合解析によって明らかにした。次に ARE 介在性の転写に及ぼす BTZO-15 の影響を H9c2 細胞を用いた Luciferase assay により調べ、BTZO-15 が用量依存的に ARE 介在性の転写活性を亢進することが示された。さらに ARE 支配下の細胞保護因子 HO-1 や GST Ya の発現に及ぼす BTZO-15 の影響を H9c2 細胞で調べ、両遺伝子の mRNA 量が BTZO-15 の用量に依存して増加し、BTZO-15 が ARE 活性化を介して細胞保護因子の発現を誘導することが示された。この BTZO-15 による GST Ya mRNA の発現誘導量は、MIF siRNA によって MIF 発現量をノックダウンした場合に減少することから、BTZO-15 による ARE 活性化は MIF を介している可能性が示された。

次に BTZO-15 の ARE 活性化による細胞保護因子の誘導が腸管由来の細胞でも認められるか、ラット小腸上皮細胞由来 IEC-18 細胞で調べ、BTZO-15 が腸管由来の細胞においても HO-1 mRNA の発現を亢進すること、一酸化窒素により惹起される IEC-18 細胞のミトコンドリア呼吸能の低下を BTZO-15 が用量依存的に回復させること

を示した。以上のことは BTZO-15 が腸管由来細胞に対しても ARE 活性化を介した細胞保護因子の発現誘導作用と、細胞保護作用を有することを示唆していた。

このような作用を有する BTZO-15 の薬理作用が 2 つの実験的大腸炎モデルで調べられた。一つ目はデキストラン硫酸ナトリウム(DSS)誘発大腸炎モデルにおける BTZO-15 の薬理作用の検討である。ラットに DSS 含有水を飲水させて、大腸長の短縮、直腸重量の増加、下痢、出血などを伴う大腸炎を惹起させ、実験開始 3 日目から 6 日目までの 4 日間、BTZO-15 を一日二回経口投与して実験開始 7 日目に薬効を評価する試験である。結果、BTZO-15 は DSS により惹起された大腸長の短縮、直腸重量の増加、下痢、出血を用量依存的かつ有意に抑制することが示された。また直腸組織のミエロペルオキシダーゼ(MPO)の活性を調べると、DSS により増加した MPO 活性を BTZO-15 は用量依存的かつ有意に抑制することが示された。さらに本モデルの直腸組織内の HO-1 と GST Ya mRNA 発現量は BTZO-15 によって増加することが示された。以上のことは BTZO-15 が DSS 誘発大腸炎モデルの症状を改善し、その薬効は ARE 支配下の細胞保護因子の発現を誘導することで発揮される可能性を示唆していた。

二つ目はトリニトロベンゼンスルホン酸(TNBS)誘発大腸炎モデルにおける BTZO-15 の薬理作用を調べた試験で、ラットの直腸局所に TNBS を摂取することで作成した大腸炎に対する BTZO-15 の作用を調べたものである。その結果、BTZO-15 が TNBS により惹起された潰瘍の面積を有意に減少させること、直腸組織の MPO 活性も有意に減少させることが示された。

以上、本研究は、BTZO-15 が MIF を介して ARE 介在性の転写活性を亢進し ARE 支配下にある細胞保護因子の発現を誘導することで細胞保護作用を示すことと、そのような作用を持つ BTZO-15 が DSS 誘発および TNBS 誘発大腸炎モデルで薬効を示すことを明らかにした。これまでに ARE 活性化作用を持つ IBD 治療薬はなかったことから、BTZO-15 が新規メカニズムの IBD 治療薬となりうるものと考えられた。また本研究は、ARE 活性化が IBD の新しい治療ターゲットとなりうることを示唆していた。

これらの知見は、BTZO-15 の IBD 治療薬としての可能性に対し大きく貢献するところ大なるものがある。よって著者は、北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格あるものと認める。