

論文内容の要旨

博士論文題目 カルノシン酸のNrf2を介した神経保護効果に関する
分子生物学的解析

氏 名 小坂 邦男

【背景】アルツハイマー病や脳梗塞等によっておこる神経変性疾患の発症・増悪には活性酸素が関与していることが示されている。一方、細胞には核内転写因子 Nrf2 (NFE2L2) を介した、抗酸化酵素／解毒酵素発現機構（生体防御機構）があることが知られている。Nrf2 は主に Keap1 により制御されており、Keap1 のセンサーとなるシステインの SH 基が修飾されることによって活性化される。また、神経の生体防御機構には神経成長因子 (NGF) 等のニューロトロフィンが、重要な役割を果たしており、神経変性抑制作用を発揮することが知られている。NGF は抗酸化酵素を誘導することから、NGF の機構には Nrf2 が関与している可能性も考えられた。しかしながら、Nrf2 活性は、加齢と共に低下していくことが報告されており、Nrf2 活性化剤には神経変性疾患等の予防・治療効果が期待される。

【目的】最近、幾つかのポリフェノールや親電子性物質が、Nrf2 生体防御機構を活性化することが報告された。それらの中にはNGF作用促進効果があることが報告されているものもある。ローズマリーには多種多様なポリフェノールが含まれており、様々な生理活性を発揮するが、従来から抗酸化作用や記憶力を維持・増強することが示唆されていた。そこで、本論文では、ローズマリーに含まれるポリフェノール成分に生体防御機構活性化作用を発揮するものがあるのか、あるとすればどのようなメカニズムによるのかを明らかにすることを目的とした。

【結果】1. PC12h 細胞を用い、ローズマリーの成分の Nrf2 活性化作用に対する効果を検討したところ、カルノシン酸 (CA) が強い効果を示すことを見出した。大脳皮質初代培養神経細胞および虚血再還流モデルを用いた実験より、CA は酸化ストレスによる神経変性を抑制することを明らかにした。2. 次に PC12h 細胞を用い CA の神経細胞保護のメカニズムについて検討を行った。Keap1 は Nrf2 を分解するネガティブレギュレーターであるが、Keap1 の BTB 領域のシステインが酸化的修飾されることにより Nrf2 分解作用は抑制され、Nrf2 の活性化がおこる。検討の結果、CA がシステインに結合することおよび BTB 領域に結合することを見出した。3. CA を PC12h に添加すると NGF 様作用がおこることを見出した。この作用は、Nrf2 ノックダウンによって抑制され、NGF 様作用に Nrf2 が寄与していることが示された。更に NGF 受容体 TrkA 補助因子である p62/ZIP が Nrf2 制御下にあること、CA の作用は p62/ZIP ノックダウンで抑制されることを見出した。

以上の結果より、CA は、Nrf2 生体防御機構を活性化し、更に p62/ZIP 発現を介して NGF 様作用を発揮することにより、神経変性を抑制することが明らかとなり、CA の神経変性疾患等の予防・治療への応用が期待される。

(論文審査結果の要旨)

神経変性疾患の発症・憎悪には酸化ストレスが関与していることが示されている。細胞には核内転写因子 Nrf2 (NFE2L2) を介した酸化ストレスに対する生体防御機構がある。生理的条件下では、Nrf2 は、Keap1 と会合体を形成しており、この会合体の形状でユビキチン化され、速やかに分解される。活性酸素種が存在すると、Keap1 の BTB や IVR 領域のシステインの SH 残基が酸化され、その結果 Nrf2 が Keap1 から解離し、核内に移行して DNA 上の親電子性物質応答配列(EpRE)に結合することにより、抗酸化機能を発揮することが知られている。また、Nrf2 活性は加齢により低下するため、Nrf2-EpRE 経路の活性化剤には、神経変性疾患の予防・治療効果が期待されている。ローズマリーには、抗酸化作用のあることが知られており、また認知症の改善にも効果のあることが示唆されているが、その作用機構はよく理解されていなかった。本論文では、ローズマリー中の薬効成分をカルノシン酸 (CA) であると同定し、CA の作用に関して以下に示す結果を得た。

1. CA の Nrf2 活性化作用および神経変性抑制作用

ローズマリーの成分を分離精製し検討した結果、CA に強い Nrf2 活性化作用があることを見出した。更に、CA が Nrf2 活性化を介して、酸化ストレスによる神経変性に対し抑制作用を発揮することを *in vitro* 及び *in vivo* 試験で見出した。

2. CA の Keap1 に対する作用

CA の Nrf2 活性化は Keap1 依存的であったことから、CA は Keap1 に作用することによって Nrf2 の活性化を引き起こしたと考えられた。実際、CA がシステイン-SH 基と結合すること、および Keap1 の BTB 領域に選択的に結合することを見出している。CA はカテコール骨格を有していることから、CA は活性酸素種によりキノン化することによって親電子性物質となり、SH 基がマイケル付加反応をおこすと考えられた。その結果、CA を結合した Keap1 から Nrf2 が解離し、EpRE を介した経路が活性化されると結論した。

3. CA の NGF 様作用

最近、NGF のシグナル伝達において、p62/ZIP 蛋白が必須であることが報告された。興味深いことに、本論文では、CA が NGF 様作用を発揮すること、およびその作用が Nrf2 活性化によること、Nrf2 活性化により p62/ZIP が誘導されることを見出している。従って、CA による NGF 様作用は p62/ZIP によるものと考えられた。

以上のように本論文は、CA が Keap1 のシステインの SH 基への修飾を介し、Nrf2 を活性化し、生体防御機構活性化をもたらすこと及び CA が NGF 様作用を発揮することを示したものであり、生化学的、分子生物学的に重要な成果である。さらに、本研究により得られた知見は、SH 基に作用することにより神経保護作用を発揮する薬物の開発に貢献するものであり、実際、CA を含有するサプリメントが市販されている。これらは、学術的研究として高く評価でき、物質科学の発展に寄与していると認められる。よって、審査員一同は本論文が博士 (理学) の学位論文として価値あるものと認めた。