

博士学位論文審査要旨

2013年 2月 20日

論文題目: ApoE 欠損マウスの動脈硬化発症に対するラジカル捕捉と Nrf2 活性化の作用
効果に関する研究

学位申請者: 澤田 浩隆

審査委員

主査: 同志社大学大学院生命医科学研究科 教授 野口 範子

副査: 同志社大学大学院生命医科学研究科 教授 萩原 明郎

副査: 同志社大学大学院生命医科学研究科 教授 米井 嘉一

要 旨:

本論文は、動脈硬化発症の抑制に関わるとされる2つの因子について、化合物の構造—機能相関を活用して、それぞれの因子の重要性を *in vitro* および *in vivo* 実験にて証明することを目的として行った研究結果をまとめたものである。動脈硬化を抑制するために、リポ蛋白の酸化変性を抑制するラジカル捕捉型抗酸化作用と、動脈硬化が発症しにくい血管の直線部で活性化する転写因子 Nrf2 の活性化作用のどちらがより重要であるか明らかになっていない。そこで本研究では、ショーガオールを元に、抗酸化作用のみを有する誘導体、Nrf2 転写活性化作用のみを有する誘導体、双方を有する誘導体を合成し、これに加えて同じく双方を有する Curcumin の4種類の化合物について、*in vitro* 系の活性評価を行うとともに、ApoE 欠損型 C57BL/6 マウスに長期混餌投与し、動脈硬化病変に及ぼす影響を検証した。*In vitro* では、評価した抗酸化能と Nrf2 活性化能は、化合物の構造に基づいて予測される結果が得られた。化合物を投与されたマウスの血漿の抗酸化活性は、Curcumin 以外の Nrf2 転写活性化作用をもつ化合物で高く維持されていた。マウスの動脈硬化巣の進展にはショーガオール誘導体3種はいずれも有意な抑制効果を示さなかった。また、Curcumin は動脈硬化促進因子である CD36 を誘導して動脈硬化病変を増悪させることがわかった。CD36 は Nrf2 の標的遺伝子の1つであることから、生体の抗酸化能を上げるためには Nrf2 を活性化することが有効であるが、CD36 を発現させないことが重要であることを明らかにした。

本研究によって明らかにされた重要な点は以下の2点である。1) 生体の抗酸化能を効率よく高めるためには、ラジカル補足型抗酸化物ではなく Nrf2 活性化物を摂取する。2) 動脈硬化を抑制するためには CD36 を誘導しない化合物構造を選択する。ここで得られた知見は、動脈硬化を代表とする、酸化ストレスが関与する疾患の治療・予防のための、薬剤や機能性食品の分子設計に役立つものと評価できる。

よって、本論文は、博士(理学)(同志社大学)の学位を授与するにふさわしいものであると認められる。

総合試験結果の要旨

2013年 2月 20日

論文題目: ApoE 欠損マウスの動脈硬化発症に対するラジカル捕捉と Nrf2 活性化の作用
効果に関する研究

学位申請者: 澤田 浩隆

審査委員

主査: 同志社大学大学院生命医科学研究科 教授 野口 範子

副査: 同志社大学大学院生命医科学研究科 教授 萩原 明郎

副査: 同志社大学大学院生命医科学研究科 教授 米井 嘉一

要 旨:

上記審査委員は、澤田浩隆氏に対する総合試験を、2013年1月26日午前10時より口頭発表60分、質疑応答60分実施し、2013年1月29日午後5時30分より口頭試問30分実施した。

総合試験において学位申請者は、提出された論文の内容に関する質問および諮問に的確に応答し、研究の内容と意義、研究方法、解析法について理解を示すとともに、研究の背景について専門知識を有していることを示した。本申請者は社会人大学院生であるため、本論文作成に関わる研究時間の確保は容易ではなかったが、会社で得た知識と技能も活用し、工夫と努力によって克服したことが伺われた。とくに、本研究でもっとも重要な実験である、実験動物への化合物投与方法の確立や薬物動態の評価は高い専門性を有するものであるが、申請者は信頼性の高い結果を得ていることが示された。

申請者は自コースの「特殊研究」を履修し、研究科内に設置されている授業科目から合計4単位以上を履修していた。語学試験「英語」は入学時に高得点で合格しており、また、参考論文である学術雑誌 *Atherosclerosis* への投稿論文の執筆内容から、申請者が研究遂行上必要な読解能力と作文能力を有することが確認された。よって、総合試験の結果は合格と認める。

博士學位論文要旨

論文題目： ApoE 欠損マウスの動脈硬化発症に対するラジカル捕捉と
Nrf2 活性化の作用効果に関する研究

氏名： 澤田 浩隆

要 旨：

動脈硬化は血管壁内の炎症が主体であると考えられ、脂質異常症では酸化ストレスによる低比重リポ蛋白(LDL)の酸化が動脈硬化を惹起するとされている。酸化 LDL は、血管内膜に侵入した LDL が酸化ストレスを受けることによって生成し、マクロファージに発現するスカベンジャー受容体に認識されて取り込まれる。マクロファージは酸化 LDL を過剰に取り込んでコレステロールエステルを蓄積した泡沫細胞へと変化し、プラークの初期段階である肉眼で観察できる動脈硬化の前駆病変を形成する。また、酸化 LDL は炎症反応、血栓形成等を誘発し、プラークの破綻、心血管イベントの発症にも影響を与えるとされている。このことから、酸化 LDL をターゲットとした動脈硬化治療が期待される。

生体内には酸化-抗酸化のバランスを調整し、細胞内の酸化還元状態を一定に維持する二つの相補的な機能が備わっている。一つは摂取された抗酸化作用を有する低分子化合物または内因性の抗酸化物質による「直接作用」であり、もう一つは内因性または外因性物質がレドックス感受性の転写因子 nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)等を活性化して抗酸化遺伝子群の転写を誘導する「間接作用」である。

フェノール基を有する化合物には、ラジカル捕捉型抗酸化物質としての作用があり、天然由来の抗酸化物質が、LDL の酸化を抑制することが確認されている。これらには「直接作用」が期待されるが、ラジカル捕捉型抗酸化能を有するビタミン E やビタミン C の積極的な投与による動脈硬化抑制効果について、これまでの大規模臨床研究からは一定の見解が得られておらず、抗動脈硬化作用のために抗酸化ビタミンを摂取する有用性は明らかとされていない。

一方、生体内には酸化ストレスを感知し、無害化する仕組みが備わっており、細胞内に酸化ストレスが出現すると、抗酸化酵素や解毒代謝酵素の遺伝子群が活性化され、ストレス分子が無毒化される。このような「間接作用」の機構の中心を担うのが、転写因子 Nrf2 とその制御因子である Keap 1 であり、Keap 1-Nrf2 系の制御機構、生理的機能及び疾患との関係は明らかとされてきた。Nrf2 は抗酸化遺伝子、グルタチオン合成関連遺伝子及び異物解毒化酵素等の発現を誘導する。

動脈硬化は血管分岐部で頻発するが、Nrf2 標的遺伝子が発現誘導されている血管の直線部では起こりにくいため、Nrf2 標的遺伝子の発現は動脈硬化を抑制すると考えられている。一方、動脈硬化モデルマウスとして汎用されるアポリポ蛋白 E (ApoE) KO マウスから、Nrf2 を欠失させた ApoE/Nrf2 ダブル KO マウスでは、動脈硬化巣の形成が顕著に軽減するという報告がある。総じて、Nrf2 は動脈硬化の発症に関与することは明らかではあるが、その作用は動脈硬化の発症を抑制するのか促進するのかは、基礎研究が不十分である。

そこで本研究では、抗酸化作用と Nrf2 転写活性化作用のどちらが動脈硬化の発症を抑制させる効果を示すか、あるいはその相乗効果等が観察されるかを明らかとするため、抗酸化作用のみを有するショーガオール誘導体(Shogaol A), Nrf2 転写活性化作用のみを有するショーガオール誘導体(Shogaol N), 双方を有するショーガオール誘導体(Shogaol N+A), 同じく双方を有する Curcumin を、ApoE 欠損 C57BL/6 マウスに長期混餌投与し、動脈硬化に及ぼす作用

を検証した。

本研究では、37°C の PBS 存在下でラジカル開始剤 AAPH を添加後、ラジカルを捕捉して消失するプローブ pyranine を経時的に測定するラジカル捕捉型抗酸化能の評価系を小スケール化し、96 well プレートで多検体を処理できるように改良した。本評価系を応用することで、少量の血漿を用いるだけで、検査した各時点における生体のラジカル捕捉型抗酸化能を定量的に評価することが可能となった(特許出願済)。本来は LDL の酸化抑制を評価することが望ましいが、ヒトとマウスではリポ蛋白の組成や脂質代謝が異なるため、本研究ではマウス血漿を対象とした実験を実施した。

本評価系で既知の抗酸化物質である4種類のフラボノイドを正常 C57BL/6 マウスに単回経口投与し、マウス血漿中薬物濃度とそのラジカル捕捉型抗酸化能を定量した。その結果、Catechin を投与後の血漿中濃度と抗酸化能との間には相関性が認められ、その作用は摂取された Catechin による「直接作用」であったと推察された。逆に、明確な相関性が認められない化合物も確認された。このことから、抗酸化物質を生体に投与した場合に生体内の抗酸化能がどのように変化するかについては、抗酸化物質の血漿中濃度だけでは評価が不十分であり、ラジカル捕捉型抗酸化能の評価と併せる必要があると考えられた。

評価した3種類のショーガオール誘導体(Shogaol N, Shogaol A 及び Shogaol N+A)は、直鎖末端がエチルエステル化されており、C57BL/6 マウス血漿中では速やかに加水分解されて脱エチル体となることが確認された。

α 、 β -不飽和カルボニル構造を有する Shogaol N 脱エチル体、Shogaol N+A 脱エチル体及び Curcumin が Nrf2 標的遺伝子を発現誘導することを確認するため、各薬物を PMA 誘導 THP-1 マクロファージに添加し、Nrf2 標的遺伝子である *HO-1*, *xCT*, *GCLM* 及び *NQO-1* の mRNA を定量した。その結果、 α 、 β -不飽和カルボニル構造を有する薬物は Nrf2 標的遺伝子を発現誘導することが確認され、 α 、 β -不飽和カルボニル構造を持たない Shogaol A にはその作用が認められなかった。フェノール基を有する Shogaol A, Shogaol N+A 及び Curcumin の AAPH によるラジカル酸化に対する抗酸化作用を評価した。その結果、フェノール基を有する薬物にはラジカル捕捉型抗酸化能を持つことが確認され、フェノール基を持たない Shogaol N にはその作用が認められなかった。

0.5%の3種類のショーガオール誘導体及び Curcumin をそれぞれ含む普通食を約 100 日間混餌投与した結果、各薬物が動脈硬化の発症を抑制する作用は認められず、予想に反し、Nrf2 転写活性化作用と抗酸化作用を併せ持つ Curcumin の投与群の大動脈弓部に動脈硬化巣の明らかな増加が確認された。

Curcumin を LDL 受容体 KO マウス、ApoE KO マウス及び ApoE/LDL 受容体ダブル KO マウスに高脂肪食負荷で混餌投与した結果、動脈硬化の発症が抑制された報告がある。本研究における投与量(約 1000 mg/kg/day)は既報の条件より高く、普通食負荷で混餌投与した点に相違があった。ただし、投与期間中の体重は順調に推移し、肝障害のバイオマーカーは投与群間に差がなく、剖検所見に異常は認められなかった。このことから、本研究において Curcumin の投与量が高かったことによる毒性はなかったものと判断された。

本研究では、Curcumin の投与により総頸動脈において、血管内皮にスカベンジャー受容体 CD36 発現部位の斑点状の局在が確認された。また、PMA 誘導 THP-1 マクロファージを用いた追加検討において、Curcumin が CD36 発現を誘導することが確認された。CD36 が Nrf2 転写活性化を介して動脈硬化の発症に寄与する報告がある。本研究では、Nrf2 転写活性化作用

を有する化合物を ApoE 欠損マウスに長期混餌投与することにより動脈硬化巣が増加することが確認され、CD36 の発現誘導が動脈硬化の発症と進展に影響を与えることを確認した。

Curcumin と同様、抗酸化作用と Nrf2 転写活性化作用を有する Shogaol N+A 投与群においても大動脈弓部の動脈硬化巣が増加する傾向が示されたが、統計的に有意な増加ではなかった。また、Nrf2 転写活性化作用のみを有する Shogaol N 投与群では動脈硬化巣は増加せず、血管内皮における CD36 発現も対照群との差は認められなかった。

混餌投与期間中の血漿中 Shogaol N+A 濃度及び Shogaol N 濃度は Curcumin より高く推移していた。Curcumin のように動脈硬化巣が増加しなかった理由として、Shogaol N 及び Shogaol N+A 投与群では、投与期間中に血漿中ラジカル捕捉型抗酸化能が高く保たれて推移していた効果が考えられた。本研究では高く保たれた血漿中の抗酸化作用により酸化 LDL の生成が抑制され、マクロファージにおける酸化 LDL の取り込みが低下したと推察された。

一方、抗酸化作用のみを有する Shogaol A 投与群から得たマウス血漿中のラジカル捕捉型抗酸化能は、投与期間中を通じて対照群と同程度であった。これは投与期間中の血漿中 Shogaol A 濃度が低く、*in vitro* で作用が検出できなかったことが原因と考えられた。このことから、摂取された抗酸化作用を有する低分子化合物による「直接作用」で血漿中のラジカル捕捉型抗酸化能を維持するには、Nrf2 転写活性化作用を介した「間接作用」を利用するよりも、高い血漿中薬物濃度が必要であったことが示された。

動脈硬化巣の形成を抑制するには、Nrf2 転写活性化作用を介した「間接作用」によって血漿中のラジカル捕捉型抗酸化能を維持することが重要である。ただし、Nrf2 標的遺伝子である CD36 の発現は、血管内皮において抑制されることが望ましく、動脈硬化の発症を抑制するには Nrf2 転写活性化作用に選択性が求められる。