

学位論文要約  
Extended Summary in Lieu of the Full Text of a Doctoral Thesis

氏 名： 山 内 圭 太  
Full Name

学位論文題目： A novel nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) activator  
Thesis Title RS9 attenuates brain injury after ischemia reperfusion in mice.

学位論文要約：  
Summary of Thesis

閉塞血管の再開通は、虚血性脳卒中において最も有効な治療手段のひとつである一方、酸化ストレスがその主な原因の一つとされる再灌流障害を引き起こす。転写因子 Nrf2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2)は、通常状態では細胞骨格タンパクである Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap-1)と結合し抑制されているが、酸化ストレス下では結合が解放され核内に移行、抗酸化剤応答配列に作用し、抗酸化タンパクや親電子性物質の解毒化酵素を誘導することで酸化ストレスに対する細胞防御に重要な役割を果たす。新規 Nrf2 活性化薬 RS9 は、すでに 2 型糖尿病を合併する慢性腎臓病患者を対象とした第 III 相プラセボ対照比較試験 (BEACON 試験)が行われた Nrf2 活性化薬である bardoxolone methyl (BARD)より合成され、BARD と比較し Nrf2 活性が高いこと、細胞毒性が低いことが報告されている。本研究では、マウスにおける脳虚血再灌流障害に対する新規 Nrf2 活性化薬 RS9 の効果を検討した。

【対象と方法】

生後 5-8 週齢の雄性 ddy マウスを用い、イソフルランによる全身麻酔下に左総頸動脈より栓子を挿入し、左中大脳動脈を閉塞し、2 時間の虚血の後に栓子を抜去し再灌流を行った。再灌流直後に RS9 (0.2 mg/kg) もしくは溶媒(リン酸緩衝生理食塩水)を腹腔内投与し薬物治療を行った。再灌流 22 時間後に神経症状 (Garcia score, Grid walk test) 及び 2, 3, 5- triphenyltetrazolium chloride 染色による梗塞体積の評価を行った。また、再灌流後 2, 6, 22 時間後に、Nrf2 及び Nrf2 の下流因子である抗酸化タンパク質 Heme oxygenase-1 (HO-1) の発現、炎症に関連する因子として nuclear factor-kappa B p65 (NF- $\kappa$ B p65) の活性化についてウェスタンブロットを行い、その経時的変化を評価した。さらに、RS9 治療後の長期成績を評価する為に、虚血後 7 日目までの神経症状および生存率を評価した。

【結果】

虚血再灌流 22 時間後に RS9 投与群では、溶媒投与群と比較して梗塞体積の減少及び神経症状の改善を認めた。RS9 の sham マウスに対する投与によって投与後 2, 6 時間後において Nrf2 の発現上昇がウェスタンブロットにて確認された。また、脳虚血再灌流モデルマウスにおいても、RS9 投与群において再灌流後 2, 6 時間後で Nrf2 の発現上昇が確認された。また、Nrf2 の下流因子である HO-1 は、RS9 投与群において 6, 22 時間後で上昇を認めた。また、NF- $\kappa$ B p65 は RS9 投与群において 2, 6 時間後で活性化の低下を認めた。また、RS9 投与群では再灌流後 22 時間で認められた神経症状の改善効果が、虚血後 7 日目においても持続していることが確認され、さらに虚血後 7 日目におけるマウスの生存率を改善させた。

【考察】

本研究では、新規 Nrf2 活性化薬 RS9 (0.2 mg/kg) が虚血再灌流後の神経保護作用を持つことを示した。我々は、過去に既存の Nrf2 活性化薬 BARD (2.0 mg/kg) が虚血再灌流後の神経保護作用を持つことを報告しているが、BARD と比較して RS9 は低容量で神経保護作用を示しており、RS9 がより強い Nrf2 活性化作用を持つことが示唆された。

RS9 の神経保護効果には、虚血再灌流後早期からの Nrf2 とその下流因子である抗酸化タンパク質 HO-1 の発現上昇や、TNF $\alpha$ 、iNOS、COX-2 やインターロイキンなどの炎症誘発性サイトカインを活性化する NF- $\kappa$ B p65

の活性化の抑制が関連していることが示唆された。過去の報告では NF- $\kappa$ B 経路と Nrf2 経路に相互作用があることが示唆されている。NF- $\kappa$ B p65 は、転写調節因子 CREB 結合タンパクの減少やヒストン脱アセチル化酵素の誘導により Nrf2 の転写を抑制すること、NF- $\kappa$ B p65 の過剰発現が Nrf2 の転写を抑制することが報告されている。また、Nrf2 経路の下流因子である HO-1 は、TNF- $\alpha$  に関連する炎症誘発関連遺伝子を介して NF- $\kappa$ B を抑制することが報告されている。RS9 の NF- $\kappa$ B p65 活性化の抑制効果は神経炎症の軽減を示すのみではなく、Nrf2 経路と NF- $\kappa$ B の相互作用を介した Nrf2 経路の活性化にも関与している可能性が示唆された。

#### **【結論】**

新規 Nrf2 活性化薬 RS9 は、虚血再灌流後早期から Nrf2 の発現の上昇、Nrf2 の下流因子である HO-1 の発現上昇、NF- $\kappa$ B の活性化を低下させることで脳虚血再灌流後の神経保護効果を示した。新規 Nrf2 活性化薬 RS9 は脳虚血再灌流障害の新たな治療薬となり得る。