

氏名 (本籍)	山内 圭太 (岐阜県)
学位の種類	博士 (医学)
学位授与番号	甲第 1046 号
学位授与日付	平成 29 年 3 月 25 日
学位授与要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	A novel nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) activator RS9 attenuates brain injury after ischemia reperfusion in mice.
審査委員	(主査) 教授 犬塚 貴 (副査) 教授 塩入 俊樹 教授 武内 康雄

論文内容の要旨

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。マウスは RS9 群と Vehicle 群の 2 群に分け、再灌流直後に RS9 (0.2 mg/kg) もしくはリン酸緩衝生理食塩水 (Vehicle) を腹腔内投与し薬物治療を行った。再灌流 22 時間後に運動機能、感覚機能を総合的に評価する Garcia score と前肢の機能を評価する Grid walk test によって神経症状を評価した。再灌流後 22 時間での脳梗塞の体積は 2, 3, 5- triphenyltetrazolium chloride (TTC) 染色による梗塞面積より算出した。RS9 の作用機序の解明のために、再灌流後 2, 6, 22 時間後に虚血脳をサンプルとして採取しウエスタンブロットにより検討を行った。ウエスタンブロットでは 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、神経炎症に関連する因子として nuclear factor- κ B p65 (NF- κ B p65) のリン酸化による活性化について、その経時的変化を評価した。さらに、虚血後 24 時間以内の RS9 による神経保護効果が長期にわたり継続するのかを評価する為に、虚血後 7 日目までの Garcia score および Grid walk test による神経症状、7 日以内の生存率と虚血後 7 日目における梗塞体積の評価を行った。

【結果】

虚血再灌流 22 時間後に、RS9 投与群では Vehicle 群と比較して梗塞体積を減少させた (RS9 群: $35.4 \text{ mm}^3 \pm 8.4$ [SE], Vehicle 群: $60.6 \text{ mm}^3 \pm 7.8$ [SE], $p < 0.05$)。また、RS9 投与群では再灌流後 22 時間での Garcia score 及び Grid walk test で評価した神経症状の改善を認めた。

ウエスタンブロットでは、はじめに非虚血状態のマウスにおいて RS9 投与による Nrf2 発現の確認を

行った。RS9 群では投与後 2 時間、6 時間において Vehicle 群と比較して Nrf2 の発現上昇を認めた。RS9 による Nrf2 の発現上昇は、虚血状態のマウスにおいても再灌流 2 時間、6 時間後において確認された。この Nrf2 の活性化によって、HO-1 の発現が再灌流後 6 時間、22 時間で上昇した。さらに RS9 は神経炎症の指標である NF- κ B p65 のリン酸化による活性化を再灌流後 2 時間、6 時間後で抑制した。

RS9 群では、虚血後 7 日目においても神経症状の改善効果が認められ、7 日目におけるマウスの生存率も高かった (RS9 群: 92.3 %, Vehicle 群: 53.9 %, $p < 0.05$)。また RS9 群では 7 日後の梗塞体積も抑制されていた (RS9 群: $26.6 \text{ mm}^3 \pm 5.4 [\text{SE}]$, Vehicle 群: $46.6 \text{ mm}^3 \pm 7.1 [\text{SE}]$, $p < 0.05$)。

【考察】

本研究では、新規 Nrf2 活性化薬 RS9 (0.2 mg/kg) が虚血再灌流障害に対する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) が虚血再灌流障害に対する神経保護作用を持つことを報告しているが、RS9 は BARD と比較して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 の発現上昇とそれに引き続く下流因子である抗酸化タンパク質 HO-1 の発現上昇による細胞保護作用とともに、TNF α , 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- κ B p65 の活性化抑制作用が関与していると考えられた。

NF- κ 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が報告されており、Nrf2 経路に対し抑制的に働く可能性が示唆されているが、一方で Nrf2 経路はその下流因子である HO-1 が TNF- α に関連する炎症誘発関連遺伝子を介して NF- κ B を抑制することが報告されている。すなわち RS9 の効果には、Nrf2 経路の直接的な活性化とともに Nrf2 経路に対して抑制的に働く NF- κ B p65 経路の抑制効果という相互作用が加わっ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- κ B p65 の活性化を抑制す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と考えられた。

論文審査の結果の要旨

申請者 山内 圭太は、マウスにおける実験的虚血性脳卒中に対し、新規 Nrf2 活性化薬 RS9 が神経保護作用を有することを示した。本研究の成果は、Nrf2 経路の活性化が急性期虚血性脳卒中に対する新規治療手段となり得る可能性を示唆しており、脳卒中学および脳神経外科学の発展に少なからず寄与するものと認める。

[主論文公表誌]

Keita Yamauchi, Yusuke Nakano, Takahiko Imai, Toshinori Takagi, Kazuhiro Tsuruma, Masamitsu Shimazawa, Toru Iwama, Hideaki Hara : A novel nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) activator RS9 attenuates brain injury after ischemia reperfusion in mice. *Neuroscience* 333, 302-310 (2016). doi:10.1016/j.neuroscience.2016.07.035.