

氏名（本籍）	柴田 翔子（岐阜県）
学位の種類	博士（工学）
学位授与番号	甲第 374 号
学位授与日付	平成 21 年 9 月 9 日
専攻	物質工学専攻
学位論文題目	Studies on neuroprotective effects of (arylthio)cyclopentenone derivatives (アリルチオシクロペンテノン誘導体の神経保護作用に関する研究)
学位論文審査委員	(主査) 木内 一 壽 (副査) 北出 幸夫 森田 洋子

論文内容の要旨

神経変性疾患は中枢神経系の神経細胞が変性・脱落することにより起こる疾患で、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、ハンチントン病などが知られている。これらはいずれも難治性の疾患で、認知症や運動障害などを伴うため通常の生活にも多大な支障を来すが、現在までのところ、これら疾患の治療薬として臨床で使用されているものは対症療法のためのものがほとんどである。本研究では、様々な神経変性疾患に関わるとされる神経細胞死を効果的に阻止し、神経細胞を保護する新規化合物の創製、およびその作用機構の解明に取り組んだ。

シクロペンテノン型のプロスタグランジンは様々な系で神経保護作用を示すことが報告されている。Prostaglandin A₁ は SH-SY5Y 細胞のロテノン誘導性アポトーシスを、15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ は HT22 細胞でグルタミン酸および過酸化水素による細胞死を抑制する。一方で、 Δ^{12} -prostaglandin J₂ から合成展開された neurite outgrowth-promoting prostaglandin 11 (NEPP11) は、マウス海馬由来 HT22 細胞においてグルタミン酸誘導性の酸化ストレスによる細胞死を、ラット副腎髄質褐色細胞腫 PC12 細胞においてマンガン誘導性のアポトーシスを抑制する。しかし、これらの化合物はいずれも高濃度で細胞に対し毒性を示すため、さらに適切な化学修飾を施すことによって、より低い細胞毒性とより高い細胞保護作用とを実現していく必要があると考えられる。

そこで申請者は、まず第 1 章において、同大学の有機化学合成を専門とする研究チームとの共同研究により、44 個のシクロペンテノン化合物の中からアリルチオ基を共通構造として有する GIF-0642, GIF-0643, GIF-0644, GIF-0745, GIF-0747 の 5 つのアリルチオシクロペンテノン誘導体を見出した。これらの初期のスクリーニングには、カスパーゼ-3,7 活性の測定を使用し、マンガンによって誘導される PC12 細胞のアポトーシスに対する抑制効果を調べた。マンガンによる慢性中毒患者はパーキンソン病で認められる錐体外路症状を起こすことが古くから知られていたが、最近、マンガンが培養細胞で神経細胞死において重要な役割を担っているアポトーシスを誘導することが報告されている。前述の 5 つの化合物は、いずれもマンガンの誘導されるカスパーゼ-3 活性化を濃度依存的に抑制するだけでなく、アポトーシスの生化学的指標とされる DNA の断片化や、カスパーゼ-3 の上流に位置する カスパーゼ-9 の活性化も同様に抑制した。また、GIF-0747 はカスパーゼ-9 の上流であるミトコンドリアからのサイトクローム c の放出を有意に抑制した。これらのことから、アリルチオシクロペンテノン誘導体は、ミトコンドリアもしくはそれよりも上流に作用し、サイトクローム c の放出、カスパーゼ-9 および カスパーゼ-3 の活性化、DNA の断片化を阻止することで、マンガンによる誘導されるアポトーシスを抑制するという一連の機構が明らかになった。

次の第 2 章においては、これらの化合物がグルタミン酸誘導性細胞死に及ぼす影響を、マウス海馬由来 HT22 細胞で検討した。酸化ストレスは様々な神経変性疾患に関与していると考えられているため、この効果的な抑制は種々の神経変性疾患の予防に有用であると考えられる。上記 5 つの化合物のうち、GIF-0747 を除く 4 つの化合物がグルタミン酸誘導性 HT22 細胞死を阻止し、その神経保護作用は peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ) アンタゴニスト T0070907 によって拮抗された。さらに、ビオチン化したアリルチオシクロペンテノン誘導体

(GIF-0643-biotin) を用いたプルダウンアッセイにより、GIF-0643 は PPAR γ に結合することが明らかになった。これらのことから、アリルチオシクロペンテノン誘導体は PPAR γ のリガンドとなりうることが証明された。また、PPAR γ はそれ自身では DNA への結合力が低く、retinoid X receptor- α (RXR α) とヘテロダイマーを形成して DNA に作用することが知られているが、実際に RXR α が GIF-0643-PPAR γ の複合体と共沈してくること、さらに、GIF-0643-PPAR γ -RXR α の複合体が核に局在していることも確認され、これにより、アリルチオシクロペンテノン誘導体が核内で PPAR γ -RXR α ヘテロダイマーを活性化し、DNA に結合している可能性が示唆された。さらに、アリルチオシクロペンテノン誘導体のリード化合物となった PGJ₂ および NEPP11、またわずかではあるが PGA₁ では同様の結果が得られたが、グルタミン酸誘導性細胞死に効果のなかった GIF-0747 では PPAR γ との結合は確認されなかった。従って、アリルチオシクロペンテノン誘導体の神経保護作用には、PPAR γ アゴニストとしての機能が重要であると推測される。

続く 3 章では、細胞の生存に深く関わっている extracellular signal-regulated kinase (ERK) シグナル経路に対しアリルチオシクロペンテノン誘導体の及ぼす影響を検討した。ERK シグナル経路の ERK1/2、その上流の mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 (MEK1/2)、さらにその上流の c-Raf はグルタミン酸処理によってリン酸化レベルが低下した。アリルチオシクロペンテノン誘導体はこの ERK シグナル分子のリン酸化の低下を抑制し、ERK 経路を活性化することによって細胞保護効果をもたらしている可能性が示唆された。

以上のように、アリルチオシクロペンテノン誘導体は複数の細胞傷害系で有効に作用した。その広範な薬理作用から、アリルチオシクロペンテノン誘導体に関する研究は様々な神経変性疾患に有効な薬剤開発の一助となることが期待される。

論文審査結果の要旨

アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、ハンチントン病などの神経変性疾患は、特定の神経細胞の変性・脱落を伴う疾患であり、認知症、運動障害などの原因の一つとなる。症状は慢性かつ進行性に推移する。現在、臨床で使用されているアルツハイマー病やパーキンソン病の治療薬は、身体機能の低下を補うための対処療法がほとんどであり、その薬効も不十分である。本論文は、神経の変性から神経細胞を保護する新規化合物の創製とその作用機序の解明について研究したものである。

シクロペンテノン型のプロスタグランジンは様々な系で神経保護効果を示すことが報告されている。例えば、prostaglandin A₁ は SH-SY5Y 細胞のロテノン誘導性アポトーシスを、また、15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ は HT22 細胞においてグルタミン酸および過酸化水素による細胞死を抑制することが報告されている。一方、1 Δ^{12} -prostaglandin J₂ から合成展開された neurite outgrowth-promoting prostaglandin 11 (NEPP11) は HT22 細胞においてグルタミン酸により誘導される酸化ストレスによる細胞死を、PC12 細胞においてマンガンによる誘導されるアポトーシスを抑制する。しかし、これらの化合物はいずれも高濃度で細胞に対する毒性をもっているため、様々な化学修飾により細胞保護活性の高い、細胞毒性の低い化合物の創製が必要である。

1 章で申請者は有機化学合成の専門家との共同研究により、44 個のシクロペンノン化合物の中からアリルチオ基を有するシクロペンテノン化合物が有用であることを見いだした。初期のスクリーニングは、マンガンにより誘導される PC12 細胞のアポトーシス抑制活性により行い、GIF-0642, GIF-0643, GIF-0644, GIF-0745, GIF-0747 のアリルチオシクロペンテノン化合物がアポトーシスに伴い活性化されるカスパーゼ-3 を濃度依存的に抑制することが明らかとなった。アリルチオシクロペンテノン化合物は他にもアポトーシスに典型的な DNA 断片化、カスパーゼ-3 の上流のカスパーゼ-9 の活性化を抑制した。また、GIF-0747 はカスパーゼ-9 の上流に位置するシトクローム c のミトコンドリアからの遊離にも抑制的に作用した。これらの結果からアリルチオシクロペンテノン化合物はミトコンドリアより上流で典型的なアポトーシスを抑制することが明らかになった。

次に2章では酸化ストレスによる細胞死モデルにおいてアリルチオシクロペンテノン化合物の有用性を検討している。酸化ストレスは様々な神経変性疾患に関わる重要な因子であり、酸化ストレスを抑制することは複数の神経変性疾患の予防に重要であると考えられる。GIF-0747を除くアリルチオシクロペンテノン化合物はグルタミン酸による酸化ストレスから細胞を保護した。細胞保護効果の分子機構を種々の生化学的手法を用いて検討し、酸化ストレスから細胞を保護できるアリルチオシクロペンテノン化合物は転写因子の peroxisome proliferators-activated receptor- γ (PPAR γ) に結合すること即ち、PPAR γ のリガンドとなりうることを証明した。逆に細胞保護活性を示さなかった GIF-0747 は PPAR γ に結合しなかった。また、通常 PPAR γ は RXR とヘテロダイマーを形成し DNA に結合するが、GIF-0643 は核内の PPAR γ -RXR 複合体に結合することも示している。

3章では細胞の生存に深く関与することが知られている ERK キナーゼ経路に対するアリルチオシクロペンテノン化合物の影響を検討している。アリルチオシクロペンテノン化合物はグルタミン酸により低下した ERK キナーゼ経路のシグナル分子のリン酸化を増加させることを明らかにした。この結果はアリルチオシクロペンテノン化合物が ERK 経路を活性化することにより細胞保護効果を示すことを示唆している。

以上のように申請者は新規のアリルチオシクロペンテノン化合物が複数の細胞傷害モデルにおいて有効であることを見だし、その細胞保護活性に関わる細胞内分子機構について明らかにした。

最終試験結果の要旨

(1) 公表論文について

学位論文の骨子となる原著論文(筆頭著者)2報は査読審査のある国際専門誌(英文)に受領され掲載予定であることを、学位論文に添付されている資料により確認した。原著論文の掲載予定の専門誌はいずれも Brain Research で、この国際専門誌は神経科学分野ではよく知られており、その Impact Factor は 2.494 である。協議の結果、学位論文の基本となる公表論文2報は学位授与に値する内容を有していると判断した。

(2) 単位取得について

工学研究科博士後期課程物質工学専攻の修了に必要な単位数の取得を学業成績証明書にて確認した。

(3) 審査及び試験について

学位論文審査委員会においては、学位申請に係わる論文の説明は分かり易く丁寧なものであった。また、公聴会では主査、副査及び公聴会出席者の質疑に対し、的確な応答を行っていた。主査及び副査による質問は下記の通りである。

1. 神経保護効果を有するアリルチオシクロペンテノン化合物 GIF-0643 との結合に係わる PPAR γ の Cys 残基は明らかにされているのか。
2. PPAR γ のアンタゴニスト T0070907 作用点と GIF-0643 の作用点は同じか、また、T0070907 10 μ M と 50 μ M では GIF-0643 の PPAR γ への結合に対する遮断効果はほぼ同じだが、この結果はどのようなことを意味するのか。
3. PPAR γ は細胞質にも存在するが、どうして GIF-0643 は殆ど結合しないのか。
4. GIF-0747 は PPAR γ に結合しないが、この物質の化学構造からどのようなことが推測されるか。
5. GIF-0747 はマンガニン処理によるミトコンドリア内膜からのシトクローム c の細胞質への放出を抑制するが、その分子レベルでのメカニズムを明らかにするにはどのような分析が必要か、また、これまでに試みた分析はあるのか。

以上の質問に対する各々の解答は、博士後期課程を修了するに相応しい一定のレベル以上のものであった。申請者は本研究に対して深い洞察力を有しており、学位授与に値する能力を有していると判断した。

公聴会終了後、学位審査委員会委員全員により、柴田翔子さんは最終試験に「合格」と判定した。

