

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

2012 年 6 月

奈良先端科学技術大学院大学
物質創成科学研究科

小坂 邦男

目 次

第1章 緒 言

1-1. 酸化ストレスと神経変性疾患	P. 1
1-2. Nrf2 生体防御機構	P. 2
1-3. NGF シグナル伝達と p62/ZIP	P. 5
1-4. ローズマリー	P. 7
1-5. 研究の目的	P. 7
1-6. 引用文献	P. 8

第2章 ローズマリーの生体防御機構活性化作用

2-1. 序 論	P. 12
2-2. 実験材料及び方法	P. 15
2-3. 結 果	
■ローズマリー含有成分の EpRE 転写活性化作用	P. 19
■カルノシン酸の第 2 相酵素発現誘導	P. 20
■カルノシン酸の EpRE 転写活性化作用の細胞種による違い	P. 22
2-4. 考 察	P. 23
2-5. 引用文献	P. 25

第3章 大脳皮質初代培養細胞 (*in vitro*) 及び脳 (*in vivo*) に対する カルノシン酸の神経変性抑制効果

3-1. 序 論	P. 29
3-2. 実験材料及び方法	P. 30
3-3. 結 果	
■初代培養神経細胞に対するカルノシン酸の酸化ストレス抑制効果	P. 33
■カルノシン酸の末梢投与による脳内移行	P. 36
■脳内のグルタチオン及び第 2 相酵素遺伝子発現に与える カルノシン酸の影響	P. 37
■脳虚血再還流による神経変性に対するカルノシン酸の抑制効果	P. 37
3-4. 考 察	P. 40
3-5. 引用文献	P. 42

.....

第4章 カルノシン酸の生体防御機構活性化のメカニズム (その1)

—Keap1-Nrf2-EpRE 経路の活性化—

4-1. 序 論	P. 44
4-2. 実験材料及び方法	P. 45
4-3. 結 果	
■Nrf2 ドミナントネガティブ及び Keap1 の影響	P. 49
■カルノシン酸のシステインチオール結合作用	P. 50
■カルノシン酸の Keap1 への結合	P. 52
■カルノシン酸の Nrf2 核内移行作用	P. 54
4-4. 考 察	P. 55
4-5. 引用文献	P. 58

.....

第5章 カルノシン酸の神経分化誘導効果と生体防御機構活性化のメカニズム (その2)

—Nrf2 及びキナーゼ活性化を介した神経分化誘導と生体防御機構の活性化—

5-1. 序 論	P. 60
5-2. 実験材料及び方法	P. 62
5-3. 結果及び考察	
■カルノシン酸による神経突起伸長誘導効果	P. 66
■カルノシン酸の Nrf2 を介した NGF 様作用	P. 67
■カルノシン酸の Erk1/2 及び PI3K を介した分化誘導作用	P. 70
■カルノシン酸による Nrf2 蓄積作用と Erk1/2 及び PI3K の関係	P. 72
■カルノシン酸と NGF の分化に関わる遺伝子発現の誘導作用の違い	P. 74
■カルノシン酸による分化誘導に対する p62/ZIP の関与	P. 75
■Nrf2 と p62/ZIP を介したポジティブフィードバックループの形成	P. 77
■カルノシン酸の NGF の産生促進効果	P. 79
■Nrf2 高発現 PC12h 株の神経突起伸長作用	P. 81
■カルノシン酸の Nrf2-EpRE 活性化・分化誘導作用の推定機構	P. 83
5-4. 引用文献	P. 86

.....	
第 6 章 結 語	P. 90
.....	
謝 辞	P. 93
.....	
研究業績リスト	P. 94

略語表

- AD: Alzheimer's disease, アルツハイマー病
- ALS: amyotrophic lateral sclerosis, 筋萎縮性側索硬化症
- ARE: antioxidant responsive element, 抗酸化物質応答配列
- BDNF: brain-derived neurotrophic factor, 脳由来神経栄養因子
- BSA: bovine serum albmin, 牛血清アルブミン
- BTB: the Broad complex, Tramtrack and Bric-a-Brac
- CA: carnosic acid, カルノシン酸
- cDNA: complementary DNA, 相補鎖 DNA
- COSY: correlation spectroscopy, 相関分光法
- CS: carnosol, カルノソール
- DGR: double glycine repeat region
- DMSO: dimethyl sulfoxide, ジメチルスルフォキシド
- DN: dominant negative, ドミナントネガティブ
- Egr-1: early growth response protein-1, 初期増殖応答タンパク質-1
- ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay, 酵素免疫測定法
- EpRE: electrophile responsive elemen, 親電子性物質応答配列
- Erk1/2: extracellular-signal-regulated kinase1/2, 細胞外シグナル調節キナーゼ 1/2
- FBS: fetal bovine serum, 牛胎児血清
- GCL: γ -glutamylcystein ligase, γ グルタミルシステインリガーゼ
- GCS: γ -glutamylcystein synthetase, γ グルタミルシステイン合成酵素
- GSH: reduced glutathione, 還元型グルタチオン
- GSSG: oxidized glutathione, 酸化型グルタチオン
- GST: glutathione S-transferase, グルタチオン S-転移酵素
- HA: haemagglutinin, ヘマグルチニン
- HD: Huntington's disease, ハンチントン病
- HPLC: high-performance liquid chromatography, 高速液体クロマトグラフィー
- HS: horse serum, 馬血清
- IP: immunoprecipitation, 免疫沈降
- IVR: intervening region
- Keap1: Kelch-like ECH-associated protein 1
- Maf: musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog
- MCAO: middle cerebral artery occlusion, 中大脳動脈閉塞術関連語

- MEK: MAPK/Erk kinase, MAPK/Erk キナーゼ
- miR: micro RNA, マイクロ RNA
- NEM: N-ethylmaleimide, N-エチルマレイミド
- NF: neurofilament, ニューロフィラメント
- NGF: nerve growth factor, 神経成長因子
- NMDA: N-methyl-D-aspartic acid, N-メチル-D-アスパラギン酸
- NMR: nuclear magnetic resonance, 核磁気共鳴
- NOE: nuclear overhauser effect, 核オーバーハウザー効果
- NOESY: NOE correlated spectroscopy, NOE 相関分光法
- NQO-1: NAD(P)H quinone oxidoreductase-1, NAD(P)H キノンオキシド還元酵素-1
- Nrf2: NF-E2-related factor 2 [NFE2L2]
- NT: nontreatment, 未処理
- NT3 (4/5): neurotrophine 3 (4/5), 神経栄養因子 3 (4/5)
- p62/ZIP: p62/PKC- ζ interacting protein, p62/PKC- ζ 相互作用蛋白
- PBS (-): phosphate buffered saline, Mg, Ca free, リン酸緩衝生理食塩水 (Mg, Ca 無添加)
- PCR: polymerase chain reaction, ポリメラーゼ連鎖反応
- PD: Parkinson's disease, パーキンソン病
- PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase, ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ
- PKC: protein kinase C, プロテインキナーゼ C
- qPCR: quantitative PCR, 定量性 PCR
- RT-PCR: reverse transcriptase-PCR, 逆転写 PCR
- SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動
- siRNA: small interfering RNA, 低分子干渉 RNA
- sMaf: small Maf, 小 Maf
- SQSTM1: sequestosome 1, シークエストソーム 1
- SUL: sulforaphane, スルフォラフェン
- Trk: tropomyosin-related kinase, トロポミオシン関連キナーゼ
- WB: Western blotting, ウェスタンブロッティング
- WT: wild-type, 野生型

緒 言

1－1．酸化ストレスと神経変性疾患

活性酸素種（reactive oxygen species: ROS; ヒドロキシルラジカル、スーパーオキシドアニオン、一重項酸素、過酸化水素等）は生体構成成分を酸化する性質を有しており、蛋白や遺伝子の損傷、炎症反応、生体構成成分の機能低下を引き起こす。そのため、ROS は酸化ストレスを生じさせ、様々な疾患さらには老化現象の原因となると考えられている。また、一酸化窒素等や窒素化合物が ROS と反応して生じる活性窒素種（reactive nitrogen species: RNS）も ROS 同様に酸化ストレスを起こす **(1)**。原核細胞を除けば、ほぼすべての地球上の生命体は酸素を利用しミトコンドリアの電子伝達系（呼吸鎖）でエネルギー（ATP）を得ているが、この時に ROS が発生することが知られている **(2)**。また、銅や鉄などの重金属は必須元素でありながら、酸素と反応することにより、もっとも強力な ROS であるヒドロキシルラジカルを発生させ、生体物質を損傷させることが報告されている **(3, 4)**。さらには、紫外線等の電磁波が原因となり ROS が発生することも知られている **(5)**。このように酸化ストレスは、酸素をエネルギー源として利用する地球上の生命体においては避けようの無いことである。

酸化ストレスは神経変性疾患の発症や増悪の要因になることが示されている **(6-10)**。例えばアルツハイマー病（AD）やパーキンソン病（PD）の場合、アミロイドβやタウ蛋白、αシヌクレイン等の変性・蓄積によって発症すると考えられているが、この時に酸化ストレスが起こることが示唆されている。また、神経細胞の異常な興奮により発生する ROS/RNS によって神経変性が起こることが知られており興奮毒性と呼ばれているが、様々な神経変性疾患に興奮毒性が関与していることも示唆されている。一方、生体には酸化ストレスに対する防御機構が備わっており、健常な状態では生体が作り出す抗酸化物質や解毒酵素により恒常性が保たれている。しかしながら加齢と共にその防御能力は低下することが示されており、それが加齢に伴い神経変性疾患はじめ様々な疾患が増大する要因のひとつになっていると考えられている **(11)**。本邦では急速な高齢化の進行にともない神経変性によって起こる疾患である認知症の罹患率が著しく高まっており大きな社会的問題となっている。神経変性疾患の多くは難治性であり治療法や予防法さえも確立されていないのが現状である。

1-2. Nrf2 生体防御機構

最近の研究から、酸化ストレスを起こす物質（ROS や RNS、強い親電子性物質）に対する巧みな生体防御機構が明らかにされつつある（強力な親電子性物質の場合、DNA や蛋白質を酸化的修飾し変性させるため毒性を発揮する）(12-15)。このシステムでは、転写因子 NF-E2-related Factor2 (Nrf2) が重要な役割を担っている。Nrf2 は、主に第 2 相酵素（解毒／抗酸化に関わる酵素等）を誘導する転写因子であり、主要なものとしては、ヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1)、NAD(P)H キノンオキシドリダクターゼ-1 (NQO-1) などがある。細胞内を還元状態に保つために重要な役割を果たしているグルタチオンの合成酵素： γ グルタミルシステインリガーゼ (GCL) やグルタチオン還元酵素 (GR)、更には解毒代謝に関わるグルタチオン抱合酵素（グルタチオン-S-トランスフェラーゼ：GST）やグルクロン酸抱合酵素（UDP グルクロニルトランスフェラーゼ：UGT）等の誘導も Nrf2 によって制御されている(16, 17)。ROS や親電子性物質等の毒性物質に対する主要な抗酸化・解毒システムは Nrf2 を介した生体防御機構の制御下にあるが、Nrf2 の活性は加齢と共に減少していくことが示されており、Nrf2 活性低下が、酸化ストレスに対する抵抗性が低下する要因となっていると考えられている(18)。従って、Nrf2 を介した生体がもつ巧みな生体防御機構の低下を抑えるもしくは活性化することは予防医学的観点からみて好ましいことと思われる。

Nrf2 生体防御機構の概略を Fig. 1 に示した。Nrf2 生体防御機構においては、Keap1 というタンパク質が、細胞内のレドックスセンサーとして働き、Nrf2 活性を調整していることが分かっている(19)。Keap1 は、細胞質にある細胞骨格アクチンファイバーに結合しているが、ホモダイマーとなり Nrf2 を特異的にトラップする性質を有している。そのため Nrf2 は細胞質に集積される。しかしながら Keap1 には Cullin3-Rbx E3 リガーゼ複合体 が結合し、それによって Nrf2 のユビキチン化が起こる。その結果、Nrf2 はユビキチン-プロテアソーム系によって分解される。Nrf2 は恒常的に発現しつづけているが、上記のシステムにより速やかに分解されるため、半減期は 20 分以下と非常に短く、通常の状態（非ストレス下）では Nrf2 蛋白量は低レベルにおさえられている。しかし、いったん ROS などにより、Keap1 のセンサーとなるシステイン残基（チオール）が酸化されたり、親電子性物質によって Keap1 のシステイン残基が酸化修飾されたりすると、Keap1 蛋白にコンフォメーション変化が起こる(20,21)。その結果、新たに作り出された Nrf2 はプロテアソームによる分解を受けなくなり、核内に移行し electrophile responsive element (EpRE) もしくは antioxidant

responsive element (ARE) と呼ばれる DNA 上の配列に sMaf (MafK や MafG) とヘテロダイマーを形成して結合し解毒・抗酸化に関わる遺伝子群の発現を誘導する。

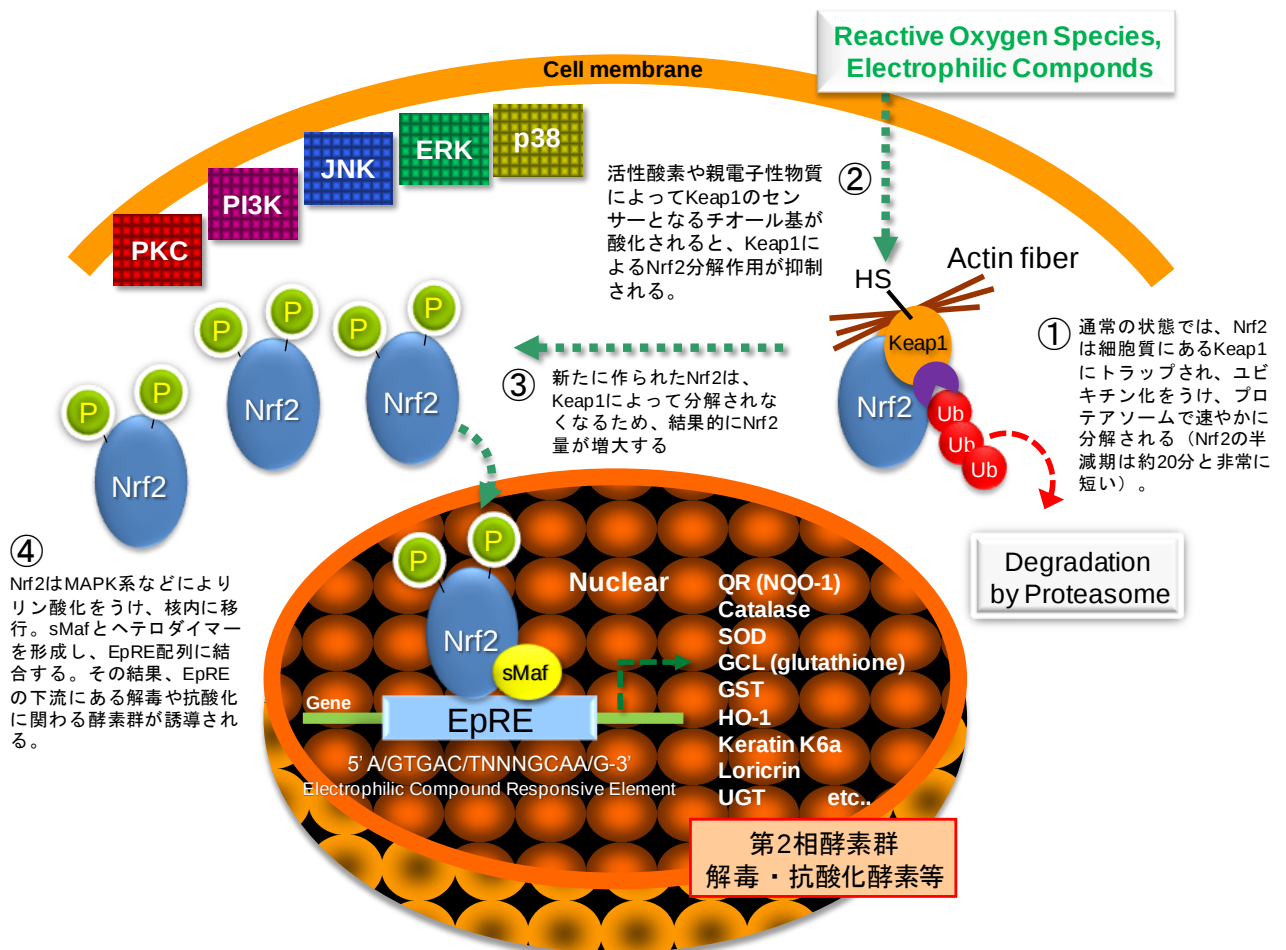


Fig.1. Nrf2 生体防御機構概略

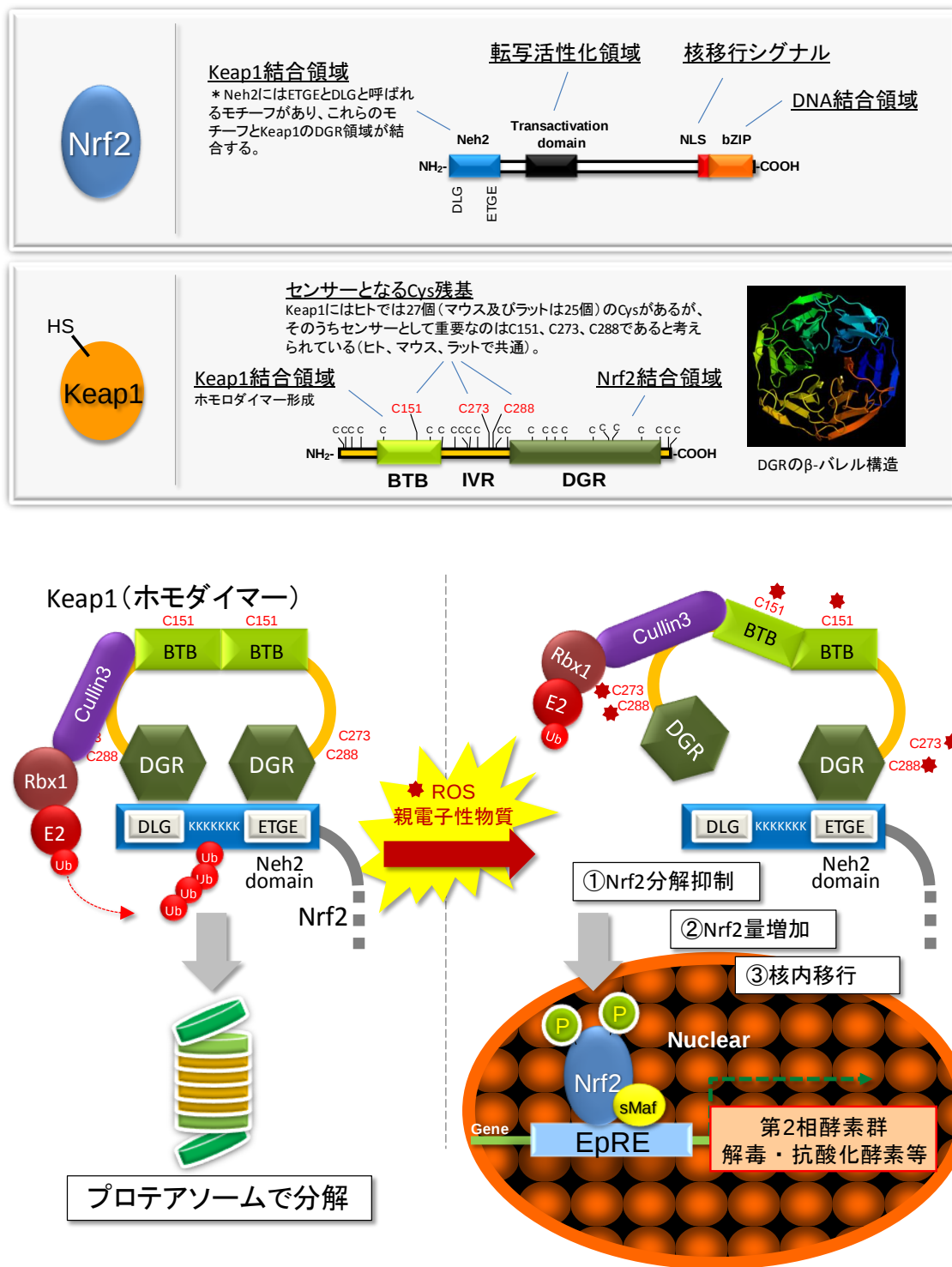


Fig. 2. Keap1, Nrf2 の構造及び反応機構（蝶番一閃モデル）

Keap1 は、BTB 領域で結合しホモダイマーを形成し、Nrf2 の Neh2 領域にある DLG と ETGE モチーフに結合する。Cullin3 E3 リガーゼ複合体は、Keap1 と結合し Nrf2 のポリユビキチン化を起こし、Nrf2 のプロテアソーム分解を促す。ROS や親電子性物質により Keap1 の活性チオール（Cys151, 273, 288）が酸化修飾されると DLG モチーフと DGR の結合が外れ、Nrf2 のユビキチン化が抑制される。引用文献 24 より抜粋（一部改変）

最近、山本等により、Keap1-Nrf2 の反応機構について非常に興味深いモデル hinge and latch mechanism (蝶番と閂) が提唱された (Fig.2) (22-24)。Keap1 には N 末端側から、BTB、IVR 及び DGR と呼ばれる領域が存在している。Nrf2 の N 末端側には Neh2 と呼ばれる領域が存在している。Keap1 は BTB 領域を介してホモダイマーを形成し、Nrf2 の Neh2 領域にある ETGE モチーフと DLG モチーフの両モチーフと結合し、それによって Cullin3-Rbx ユビキチンリガーゼが空間的に配置されたリジンをユビキチン化する。本モデルは、DGR-ETGE を蝶番、DGR-DLG を閂に例えている。DLG モチーフと Keap1 の相互作用は、ETGE モチーフ-Keap1 の相互作用よりも約 2 オーダー弱く、閂部分は Keap1 の僅かなコンフォメーション変化によっても容易に解離すると予想される。これにより基質となる Nrf2 リジン残基の空間配置が乱れ、Nrf2 のユビキチン化は阻害される。新たに作られた Nrf2 は分解されなくなるため Nrf2 量が増大することになる。Nrf2 量の増大だけでも転写活性化は起こるが、Nrf2 は様々なリン酸化酵素 (PI3K、Erk1/2、PKC、JNK、p38 等) によりリン酸化されることも知られており、リン酸化も Nrf2 の制御に関わっていることが示されている (25, 26)。上記のような解毒・抗酸化に関わる多くの遺伝子上流域には EpRE 配列が存在しており、リン酸化された Nrf2 は核内に移行し sMaf とヘテロダイマーを形成して、EpRE に結合することによってこれらの遺伝子発現を誘導する (27)。このように、Keap1-Nrf2-EpRE 経路は、生体防御機構にとって重要な役割を果たしている。

1-3. NGF シグナル伝達と p62/ZIP

ニューロトロフィンもまた生体防御に重要な役割を果たしている (28)。ニューロトロフィンとは、神経細胞に作用して神経突起伸長を誘導したり、抗酸化酵素誘導、アポトーシス抑制効果等を発揮するペプチドである。ニューロトロフィンは神経細胞の生存維持に欠かせない因子であり、ニューロトロフィンが枯渇すると神経変性が起こる。代表的なニューロトロフィンである神経成長因子 (NGF) は、神経細胞表面にある TrkA (高親和性 NGF 受容体) と p75NTR (低親和性 NGF 受容体) に結合して作用する (Fig. 3)。NGF が TrkA に結合すると、TrkA の自己リン酸化が起こり、細胞内へと移行するが、それが NGF のシグナル伝達にとって必須であることが知られている (29, 30)。最近、NGF シグナル伝達に p62/ZIP/A170/SQSTM1 (以下、p62/ZIP と略す) という足場蛋白が重要な役割を果たしていることが報告された (31)。p62/ZIP は TrkA に結合し、TrkA に TRAF6 E3 リガーゼをリクルートする。その結果、TrkA の K63

ユビキチン化が起こる。これにより、TrkA の細胞内移行が引き起こされ、細胞内へシグナルが伝達されていく。その結果、神経突起の伸長作用や抗酸化酵素誘導、アポトーシス抑制作用が発揮され、それらが神経細胞の生存維持に寄与している。

p62/ZIP ノックアウトマウスは、認知症 (AD 様) の症状を呈することも報告されており、p62/ZIP は NGF のシグナル伝達において欠かせない因子と考えられる(32)。すなわち、p62/ZIP は、神経組織の生体防御機構の一端を担い、神経を保護する役割を果たしている。また、興味深いことに p62/ZIP は、Nrf2 により転写誘導されることも報告されている(33)。

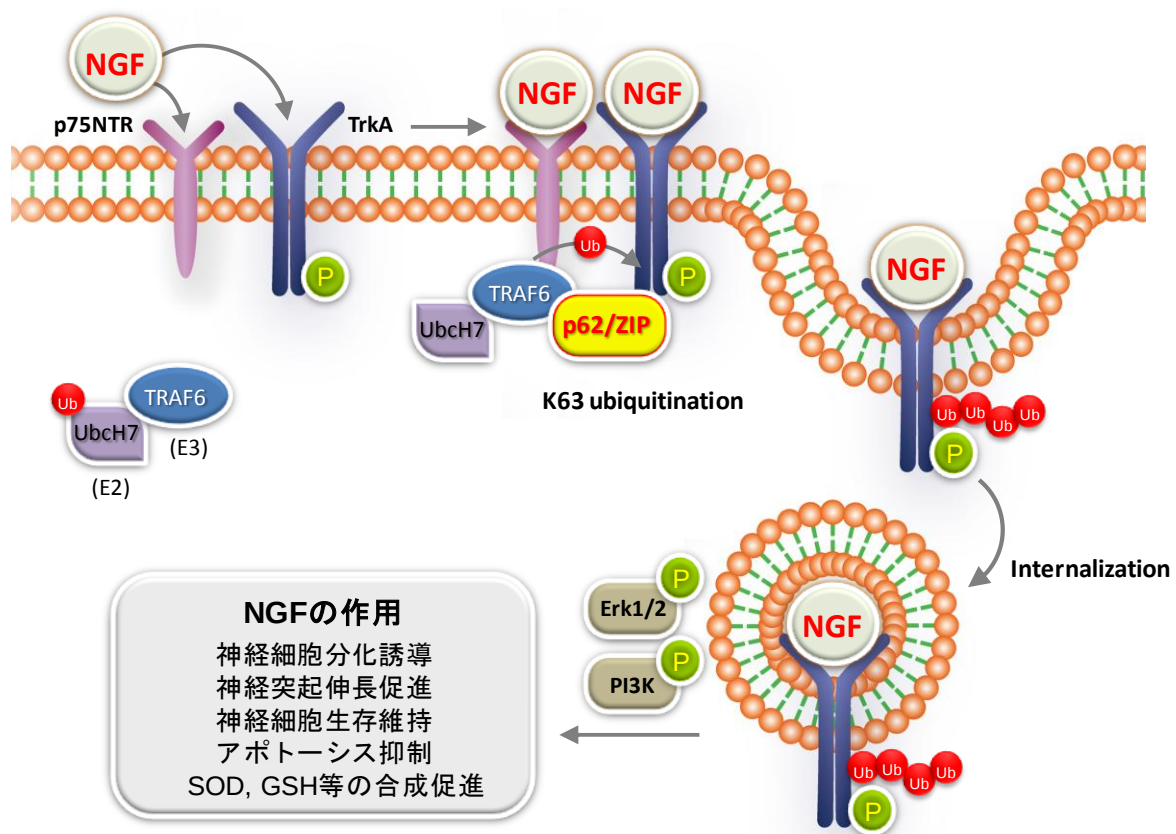


Fig. 3. p62/ZIP を介した TrkA NGF 受容体の細胞内移行機構

NGF が、細胞膜にある NGF 受容体に結合すると TrkA (高親和型 NGF 受容体) のリン酸化が起こる。p75NTR (低親和型 NGF 受容体) は、Ubch7/TRAf6 ユビキチンリガーゼと結合。TrkA に p62/ZIP は結合し、p62/ZIP を介して Ubch7/TRAf6 が結合する。Ubch7/TRAf6 は TrkA の K63 ユビキチン化を起こし、それによって小胞体が形成され、TrkA は細胞内へと移行しシグナル伝達 (Erk1/2 や PI3K のリン酸化等) が起こる。引用文献 31 より抜粋 (一部改変)

1-4. ローズマリー

ローズマリー（学名：*Rosmarinus officinalis* L.、英名：rosemary、和名：マンネンロウ、漢名：迷迭香）は、地中海沿岸が原産といわれている常緑性の低木で独特な芳香を放つハーブとして有名である。その葉は古くより生薬として利用されてきた。また、食用にもスパイスとして一般的に用いられている。ローズマリーには、タンニン類やフラボノイド、テルペノイドなどの多種多様なポリフェノールが多く含まれており、強い抗酸化作用や炎症抑制作用があることが知られている。また、古来より記憶力を増強するといわれており、認知症改善効果があることも示唆されている(34)。しかしながらその機構については不明な点が多い。

1-5. 研究の目的

最近、幾つかのポリフェノール等の抗酸化物質が、Nrf2生体防御機構を活性化することが報告された(35-37)。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(37-39)。前述のとおりNGFは神経組織にとって生体防御を司る因子でもあり興味深い。

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もNrf2生体防御機構活性化作用やNGF作用促進効果があるのか、あるとすればどのようなメカニズムによるのかを解明することを目的とした。

本論文では、

- (1) ローズマリーに含まれるポリフェノールの主成分であるカルノシン酸 (CA) が強力に神経様細胞株の生体防御機構EpREを活性化すること [第2章]
- (2) CAは、酸化ストレスによる神経変性を*in vitro*及び *in vivo*で抑制すること [第3章]
- (3) CAの生体防御機構活性化作用にはKeap1-Nrf2経路が関与していること [第4章]
- (4) CAがNGF様作用を発揮すること [第5章]
- (5) CAによるNGF様作用・生体防御機構活性化作用には、Nrf2を介して誘導されるp62/ZIPが寄与していること [第5章]

について述べる。

1－6. 引用文献

1. 吉川敏一, 河野雅弘, 野原一子. 『活性酸素・フリーラジカルのすべて』 . 2000; 丸善.
2. Marchi S, Giorgi C, Suski JM, Agnoletto C, Bononi A, Bonora M, De Marchi E, Missiroli S, Patergnani S, Poletti F, Rimessi A, Duszynski J, Wieckowski MR, Pinton P. Mitochondria-ros crosstalk in the control of cell death and aging. *J Signal Transduct.* 2012; 2012:329635 Epub.
3. Jomova K, Valko M. Importance of iron chelation in free radical-induced oxidative stress and human disease. *Curr Pharm Des.* 2011; 17(31):3460-3473.
4. See SW, Wang YH, Balasubramanian R. Contrasting reactive oxygen species and transition metal concentrations in combustion aerosols. *Environ Res.* 2007; 103(3):317-324.
5. He YY, Häder DP. UV-B-induced formation of reactive oxygen species and oxidative damage of the cyanobacterium *Anabaena* sp.: protective effects of ascorbic acid and N-acetyl-L-cysteine. *J Photochem Photobiol B.* 2002; 66(2):115-124.
6. Ramalingam M, Kim SJ. Reactive oxygen/nitrogen species and their functional correlations in neurodegenerative diseases. *J Neural Transm.* 2012; Epub ahead of print.
7. Olney JW, Sharpe LG, Feigin RD. Glutamate-induced brain damage in infant primates. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1972; 31(3):464-488.
8. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* 1999; 22(9):391-397.
9. Michaelis EK. Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Prog Neurobiol.* 1998; 54(4):369-415.
10. Greene JG, Greenamyre JT. Bioenergetics and glutamate excitotoxicity. *Prog Neurobiol.* 1996; 48(6):613-634.
11. Devasagayam TP, Tilak JC, Bloor KK, Sane KS, Ghaskadbi SS, Lele RD. Free radicals and antioxidants in human health: current

- status and future prospects. *J Assoc Physicians India*. 2004; 52:794-804.
- 1 2 . Goldring CE, Kitteringham NR, Elsby R, Randle LE, Clement YN, Williams DP, McMahon M, Hayes JD, Itoh K, Yamamoto M, Park BK. Activation of hepatic Nrf2 in vivo by acetaminophen in CD-1 mice. *Hepatology*. 2004; 39(5):1267-1276.
 - 1 3 . Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 1995; 30(6):445-600.
 - 1 4 . Fourquet S, Guerois R, Biard D, Toledano MB. Activation of NRF2 by nitrosative agents and H₂O₂ involves KEAP1 disulfide formation. *J Biol Chem*. 2010; 285(11):8463-8471.
 - 1 5 . Satoh T, Lipton SA. Redox regulation of neuronal survival mediated by electrophilic compounds. *Trends Neurosci*. 2007; 30(1):37-45.
 - 1 6 . Talalay P. Chemoprotection against cancer by induction of phase 2 enzymes. *Biofactors*. 2000; 12(1-4):5-11.
 - 1 7 . Itoh K, Tong KI, Yamamoto M. Molecular mechanism activating Nrf2-Keap1 pathway in regulation of adaptive response to electrophiles. *Free Radic Biol Med*. 2004; 36(10):1208-1213.
 - 1 8 . Suh JH, Shenvi SV, Dixon BM, Liu H, Jaiswal AK, Liu RM, Hagen TM. Decline in transcriptional activity of Nrf2 causes age-related loss of glutathione synthesis, which is reversible with lipoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101(10):3381-3386.
 - 1 9 . Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, Igarashi K, Engel JD, Yamamoto M. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev*. 1999; 13(1):76-86.
 - 2 0 . Villeneuve NF, Lau A, Zhang DD. Regulation of the Nrf2-Keap1 antioxidant response by the ubiquitin proteasome system: an insight into cullin-ring ubiquitin ligases. *Antioxid Redox Signal*. 2010; 13(11):1699-1712.

- 2 1 . Sekhar KR, Rachakonda G, Freeman ML. Cysteine-based regulation of the CUL3 adaptor protein Keap1. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2010; 244(1):21-26.
- 2 2 . Tong KI, Kobayashi A, Katsuoka F, Yamamoto M. Two-site substrate recognition model for the Keap1-Nrf2 system: a hinge and latch mechanism. *Biol Chem.* 2006; 387(10-11):1311-1320.
- 2 3 . Tong KI, Padmanabhan B, Kobayashi A, Shang C, Hirotsu Y, Yokoyama S, Yamamoto M. Different electrostatic potentials define ETGE and DLG motifs as hinge and latch in oxidative stress response. *Mol Cell Biol.* 2007; 27(21):7511-7521.
- 2 4 . Itoh K. *Seikagaku.* 2009; 81(6):447-455.
- 2 5 . Martin D, Rojo AI, Salinas M, Diaz R, Gallardo G, Alam J, De Galarreta CM, Cuadrado A. Regulation of heme oxygenase-1 expression through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and the Nrf2 transcription factor in response to the antioxidant phytochemical carnosol. *J Biol Chem.* 2004; 279(10):8919-8929.
- 2 6 . Papaiahgari S, Zhang Q, Kleeberger SR, Cho HY, Reddy SP. Hyperoxia stimulates an Nrf2-ARE transcriptional response via ROS-EGFR-PI3K-Akt/ERK MAP kinase signaling in pulmonary epithelial cells. *Antioxid Redox Signal.* 2006; 8(1-2):43-52.
- 2 7 . Itoh K, Mimura J, Yamamoto M. Discovery of the negative regulator of Nrf2, Keap1: a historical overview. *Antioxid Redox Signal.* 2010; 13(11):1665-1678.
- 2 8 . Barde YA. The nerve growth factor family. *Prog Growth Factor Res.* 1990; 2(4):237-248.
- 2 9 . Zhang Y, Moheban DB, Conway BR, Bhattacharyya A, Segal RA. Cell surface Trk receptors mediate NGF-induced survival while internalized receptors regulate NGF-induced differentiation. *J Neurosci.* 2000; 20(15):5671-5678.
- 3 0 . Gong J, Xu J, Bezanilla M, van Huizen R, Derin R, Li M. Differential stimulation of PKC phosphorylation of potassium channels by ZIP1 and ZIP2. *Science.* 1999; 285:1565-1569.

- 3 1 . Geetha T, Jiang J, Wooten MW. Lysine 63 polyubiquitination of the nerve growth factor receptor TrkA directs internalization and signaling. *Mol Cell* 2005; 20:301-312.
- 3 2 . Moscat J, Diaz-Meco MT, Wooten MW. Signal integration and diversification through the p62 scaffold protein. *Trends Biochem Sci.* 2007; 32(2):95-100.
- 3 3 . Maruyama A, Tsukamoto S, Nishikawa K, Yoshida A, Harada N, Motojima K, Ishii T, Nakane A, Yamamoto M, Itoh K. Nrf2 regulates the alternative first exons of CD36 in macrophages through specific antioxidant response elements. *Arch Biochem Biophys.* 2008; 477(1):139-145.
- 3 4 . Kennedy DO, Scholey AB. The psychopharmacology of European herbs with cognition-enhancing properties. *Curr Pharm Des.* 2006; 12(35):4613-4623.
- 3 5 . Sagara Y, Vanhnasy J, Maher P. Induction of PC12 cell differentiation by flavonoids is dependent upon extracellular signal-regulated kinase activation. *J Neurochem.* 2004; 90:1144-1155.
- 3 6 . Dikshit P, Goswami A, Mishra A, Chatterjee M, Jana NR. Curcumin induces stress response, neurite outgrowth and prevent NF-kappaB activation by inhibiting the proteasome function. *Neurotox Res.* 2006; 9:29-37
- 3 7 . Reznichenko L, Amit T, Youdim MB, Mandel S. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate induces neurorescue of long-term serum-deprived PC12 cells and promotes neurite outgrowth. *J Neurochem.* 2005; 93:1157-1167.
- 3 8 . Lin CW, Wu MJ, Liu IY, Su JD, Yen JH. Neurotrophic and cytoprotective action of luteolin in PC12 cells through ERK-dependent induction of Nrf2-driven HO-1 expression. *J Agric Food Chem.* 2010; 58(7):4477-4486.
- 3 9 . Liao KK, Wu MJ, Chen PY, Huang SW, Chiu SJ, Ho CT, Yen JH. Curcuminoids promote neurite outgrowth in PC12 cells through MAPK/ERK- and PKC-dependent pathways. *J Agric Food Chem.* 2012; 60(1):433-443.

—第2章—

ローズマリーの生体防御機構活性化作用

2-1. 序 論

ローズマリーは、地中海沿岸が原産とされる常緑性の低木である。その葉から得られる精油は独特な芳香をはなち、ハーブとして有名であるが、食用（スパイス）としても一般的に用いられている。効能効果としては、抗酸化作用、消臭作用、抗ガン作用、抗菌作用、炎症抑制効果などがよく知られており(1-6)、古来より、食品の劣化や腐敗を抑える目的で用いられ、欧州では主に炎症抑制を目的としてリウマチ用の医薬としても用いられている。

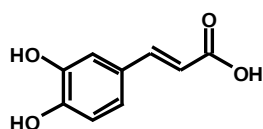
ローズマリーには非常に多種多様なポリフェノールが含まれているが、主要な成分としてはカフェタンニン類であるロズマリニン酸 (rosmarinic acid) やカフェ酸 (caffeic acid)、アビエタン型ジテルペノイドであるカルノシン酸 (carnosic acid) やカルノソール (carnosol)、ロスマノール (rosmanol)、フラボノイドであるゲンクワニン (genkwanin)、ルテオリン (luteolin)、クリシン (chrycin) 及びそれらの配糖体がある（構造を Fig. 4、ローズマリーエキスの HPLC 分析結果を Fig. 5 に示した）(7)。ローズマリーのポリフェノール成分の中で最も含量が多いのがカルノシン酸 (CA) であり、乾燥葉中に 3~5(w/w)%含まれている。CA は、カテコール骨格を有しており強い抗酸化活性を示すため、食品の酸化劣化を防ぐ目的で食品添加物としても利用されている。その他に CA には、抗ガン作用、抗菌活性、抗炎症作用、潰瘍抑制、脂肪蓄積抑制効果、白血病抑制作用など様々な活性があることが報告されている(8-13)。

最近、様々な天然のフラボノイド(14, 15)、ウコンの成分であるクルクミン(16)など幾つかのポリフェノール成分や人工抗酸化剤であるtert-ブチルヒドロキノン(17)がNrf2-EpRE経路を活性化することが報告された。また、プロスタグランディンJ2などの α , β -不飽和シクロペンテノンを含むプロスタグランディン(18, 19)や野菜等に含まれている親電子性物質であるイソチオシアネート誘導体(20, 21)がNrf2-EpRE経路を活性化することも報告されている。特にブロッコリーの芽などに多く含まれるイソチオシアネート誘導体であるスルフォラフェン (Fig. 4 ; sulforaphane : SUL) のNrf2-EpRE活性化機構については詳細な

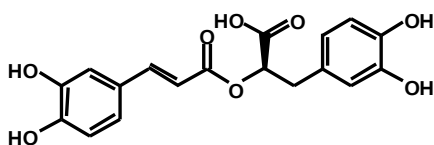
研究がなされている(22, 23)。

そこで、本章では、ローズマリーに含まれているポリフェノールの EpRE を介した遺伝子発現に対する効果について検討を行った。

Caffeic acid derivatives

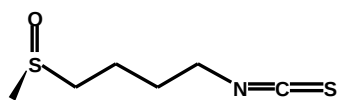


Caffeic acid



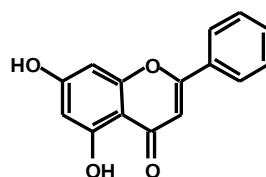
Rosmarinic acid

well-known Nrf2 activator
(ingredient of broccoli)

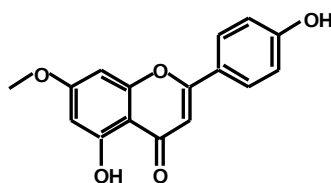


Sulforaphane

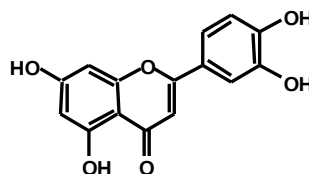
Flavonoids



Chrysin

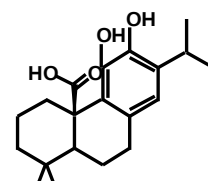


Genkwanin

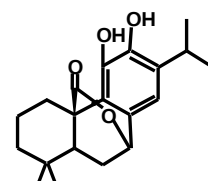


Luteolin

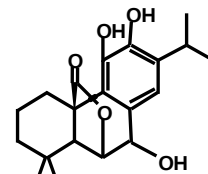
Diterpenoids



Carnosic acid



Carnosol



Rosmanol

Fig. 4. ローズマリー(*Rosmarinus officinalis* L.)に含まれている主なポリフェノール成分

* スルフォラフェン (sulforaphane) はブロッコリーに含まれている Nrf2-EpRE 活性化物質でありポジティブコントロールとして使用した。

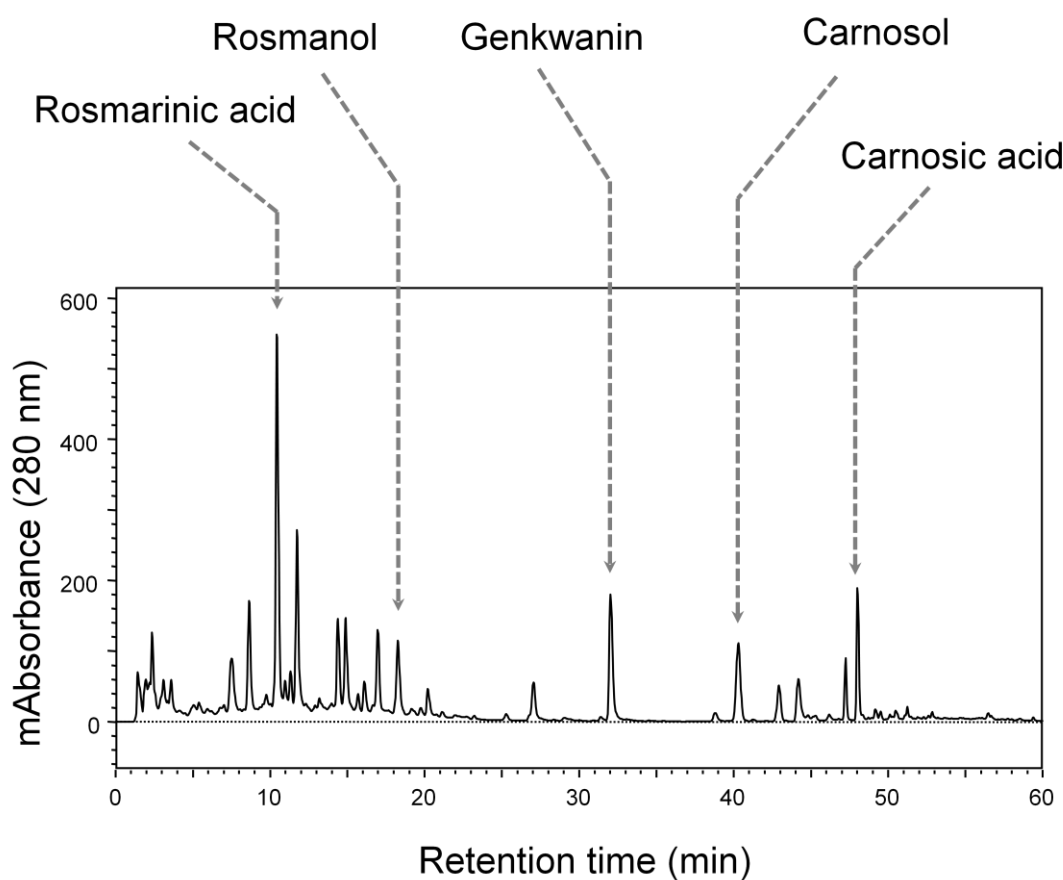


Fig. 5. ローズマリー抽出物（90%エタノール抽出）の HPLC チャート

Rosemary dry leaf was extracted with 90% ethanol for 1 h at room temperature with agitation. The extract was analyzed with HPLC. <HPLC condition> HPLC: LC-10AVp (Shimadzu), Detector: photodiode array, column: micro Bondasphere ODS (Waters), flow rate:1 mL/min, elution: 2% acetic acid (A), acetonitrile (B). Gradation: 10%B (0 min)→ 70%B (60 min)

2-2. 実験材料及び方法

■実験材料

カフェ酸 (CF)、スルホラフェン (SUL) は Sigma-Aldrich より入手した。ロズマリン酸 (RA)、ルテオリン (LU)、クリシン (CH)、ゲンクワニン (GK) はフナコシより購入した。カルノシン酸 (CA) 及びカルノソール (CS) はローズマリーより分離精製した (精製方法は以下に記載した)。その他一般試薬は、ナカライテスクもしくは和光純薬より入手した。

■カルノシン酸及びカルノソールの精製

2 kg のローズマリーの乾燥葉の粉末 (高砂薬業) に 10 L の 90%エタノールを投入し、一晩攪拌しながら浸漬抽出操作を行った。ろ過し不溶物を除去した後、ロータリーエバポレーター (RE-10M, IWAKI) を用い約 2 L にまで濃縮後、精製水を 2 L 添加し更にエバポレートし約 2 L にまで濃縮しエタノールの除去を行った。一晩 4℃で放置した後、ろ過することによって水不溶物を得た。凍結乾燥器 (FreeZone6, Labconco) で水分を除去した後、水不溶物をエタノールに再度溶解し、ドライカラム法 (シリカゲル: ナカライテスク) <展開溶媒: ヘキサン+酢酸エチル+ 4 N 塩酸イソプロパノール (90+9+1) >によって分離精製を行った。分取したものは、HPLC (LC10Avp, Shimadzu) によってモニターリングし、CA 分画と CS 分画に分けた。CA 分画をドライアップした後 (ペースト状) にヘキサンを添加し析出させることにより淡黄色の結晶を得た。CS 含有分画は、ドライアップ後に酢酸エチルを少量加えることによって白色の結晶を得た。それぞれの結晶を DMSO-d₆ に溶解後、NMR (Bruker AMX-400、解析ソフト: Avance-series) にかき ¹H-NMR、¹³C-NMR、CH-COSY、HH-COSY 解析を行った。また、LC-MS (M-8000, HITACHI) を用いて分子量解析を行った。得られた NMR と MS の結果と既報データ(24)を比較することによって得られた結晶が CA 及び CS であることを同定した。

■HPLC

HPLC は以下のシステムを用いた。HPLC システム: LC10Avp (Shimadzu)、カラムオーブン温度 40℃、流速 1 mL/min、検出器: フォトダイオードアレイ UV 検出器 (SPD-M20A, Shimadzu): ODS カラム: μ Bondasphere (Waters)、展開溶媒: ローズマリーのエキスの分析では 2%酢酸 (A 液) + アセトニトリル (B 液) を使用し 10%B (0 分) から 70%B (60 分) のグラデーション条件で

分析した。特に記載の無い限り以下の HPLC 分析は、このシステムを用いた。

■細胞培養

ラット由来神経様細胞株 PC12h は、畠中教授 (25) より提供していただいた。ヒト肝由来細胞株 HepG2 及びマウス線維芽細胞株 L-M は、ヒューマンサイエンス資源バンク (財団法人ヒューマンサイエンス振興財団) より入手した。HepG2 細胞及び L-M 細胞は、Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Sigma-Aldrich) に 10% 非働化牛胎児血清 (FBS, GIBCO) 及び抗生物質 (100 µg/mL ストレプトマイシン + 100 units/mL ペニシリン : GIBCO) を添加した培地を増殖用及び試験用に用いた。PC12h 細胞の増殖用培地は、DMEM に非働化した 8% 馬血清 (HS, GIBCO)、8% FBS + 抗生物質 (100 µg/mL ストレプトマイシン + 100 units/mL ペニシリン) を添加したものをを用いた。増殖時には、いずれの細胞もプラスチックディッシュ (SUMILON) に播種し、5%CO₂ インキュベーター、37℃の条件で実施した。PC12h 細胞は、試験時には 1% FBS、1% HS を添加した DMEM 培地 (低血清培地)、I 型コラーゲンコートディッシュ (IWAKI) <NGF 添加によって分化誘導が可能な条件>を使用した。いずれの細胞も 24 ウェルもしくは 6 ウェルプレート (IWAKI) にそれぞれ 1 X 10⁵ 個、5 X 10⁵ 個ずつ播種し試験を実施した。

■レポーター遺伝子アッセイ

レポーターベクター (pGL3-SV40prom-luciferase) 及びリファレンスベクター (pSV-beta galactosidase) は Promega より、発現用ベクター pEF6 は、Invitrogen より入手した。EpRE のレポーターベクターを作成するために、Wasserman 等の方法 (26) に準じてマウス glutathione-S-transferase (GST) Ya 遺伝子の EpRE コア配列を含む領域 (コア配列を 下線 で示した) の端にそれぞれ制限酵素配列 *Mlu*I 及び *Bgl*II 配列を付加した DNA のセンス鎖 : 5'-CGC GTT AGC TTG GAA ATG ACA TTG CTA ATG GTG ACA AAG CAA CTT TA -3' とアンチセンス鎖 : 5'- GAT CTA AAG TTG CTT TGT CAC CAT TAG CAA TGT CAT TTC CAA GCT -3' を合成し (Sigma-Aldrich)、それらを TE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH8.0) 中で 94℃ に加温してから室温に戻すことで *Mlu*I-GSTYa EpRE-*Bgl*II 二本鎖 DNA を得た。なお前後にコア領域以外が付加されているのは、コア領域以外は遺伝子ごとに配列が異なり明確な規則性が見出されていないものの転写活性増大に影響を与えることが報告されているためである (26)。

次にpGL3-SV40prom-luciferaseベクターを*MluI*と*BglII* (TAKARA) で処理した後、電気泳動によって分離精製した。それを*MluI*-GSTYa EpRE-*BglII*二本鎖DNAと混合しT4リガーゼ (TAKARA) でライゲーション処理を行うことでpGL3-EpRE-luciferaseベクターを得た。トランスフェクションはTrans Fast (Promega) もしくはLipofectamine 2000 (Invitrogen) を用い、マニュアルに従って行った。トランスフェクション操作24時間後に各種サンプルを添加し試験を実施した。特に記載が無い限りサンプル添加した後24時間後にルシフェラーゼ活性及びトランスフェクション効率確認のためのβガラクトシダーゼ活性をキットのマニュアルに従って測定した (Luciferase assay kit/beta-GAL assay kit, Promega)。

■RT-PCR 及びマイクロアレイアッセイ

RT-PCRのcDNAは、次の方法によって作成した。培養方法は6ウェルプレートを用い上記の方法によって行った。HepG2もしくはPC12h細胞にCAを添加し24時間培養を行った後、培地を除去し直ちにTRIzol (Invitrogen) 1 mLを添加しTRIzolのマニュアルの指示に従ってtotal RNAを得た。1 µgのtotal RNAをTranscription First Strand cDNA Synthesis kit (Roche) を用いて逆転写しcDNAを得た (プライマーはキット付属のpoly dTを使用した)。cDNAの増幅は、20 µLのPCR reaction bufferに50 pmolの特異的プライマーを用いて実施した (サーマルサイクラーChromo4 : BioRad)。以下に使用したプライマー配列を示した。ラットGCL-重鎖 (GCL-h) : 5'- GTC TTC AGG TGA CAT TCC AAG C -3' (センス) / 5'- TGT TCT TCA GGG GCT CCA GTC -3' (アンチセンス)、ラットGCL-軽鎖 (GCL-l) : 5'- CTG CTAAAC TGT TCA TTG TAG G -3' (センス) / 5'- CTA TTG GGT TTT ACC TGT G -3' (アンチセンス)、ラットHO-1 : 5'- CAG TCG CCT CCA GAG TTT -3' (センス) / 5'- TAC AAG GAG GCC ATC ACC AGC -3' (アンチセンス)、ラットNQO-1 : 5'- GTG TAC AGC ATT GGC CAC AC -3' (センス) / 5'- AAA TGA TGG CCC ACA GAAAG -3' (アンチセンス)、ラットシクロフィリンA : 5'- ACA GGT CCT GGC ATC TTG TC -3' (センス) / 5'- TTC ACC TTC CCA AAG ACC AC -3' (アンチセンス)。なお、全章を通じてPCR法による遺伝子発現レベル測定時には、内部標準遺伝子としてハウスキーピング遺伝子であるシクロフィリンAもしくはβアクチンを用いた。RT-PCRは、特に記載が無い場合は、上記の方法によって行った。マイクロアレイ解析は、CA (10 µM) で24時間処理したHepG2細胞から得たRNAをHuman1A ver.2 Oligo Microarray (Agilent Technologies) にかけることによって行った。コントロー

ルサンプルとしてUniversal Human Reference RNA (STRATAGENE) を使用した。

■有意差検定

有意差検定は、Student's *t*-testによって行った。 $p < 0.03$ の場合を有意な差があると判断した。全章の有意差検定は、特に断りの無い限り、同様に行った。

2-3. 結 果

■ローズマリー含有成分の EpRE 転写活性化作用

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いることが知られているが、その主要な成分である、カルノシン酸：carnosic acid (CA)、カルノソール：canosol (CS)、ルテオリン：luteolin (LU)、クリシン：chrysin (CH)、ゲンクワンニン：genkwanin (GK)、ロズマリニン酸：rosmarinic acid (RA)、カフェ酸：caffeic acid (CF) (Fig. 4) が、EpRE の遺伝子発現活性に影響を与えるかどうかについて検討を行った。本実験では神経様細胞株である PC12h 細胞を使用した。第 2 相酵素の一つマウス GSTY α 遺伝子の EpRE コア領域の配列を pGL3-SV40prom-luciferase ベクターの SV40 プロモーターの上流に導入したベクターをレポーター遺伝子としてトランスフェクションし、発現誘導効率をルシフェラーゼの活性を測定することによって求めた。また、レポーター遺伝子のトランスフェクション効率の補正のため、pSV40- β galactosidase を同時にトランスフェクションし、 β ガラクトシダーゼ活性を測定した。陽性対照としては、強い Nrf2-EpRE 活性化作用があることが報告されているスルフォラフェン (sulforaphane : SUL) (Fig. 4) を用いた。基本的に培地中の被検体の最終濃度が 10 μ M になるようにして本実験は実施したが、CF と RA は 10 μ M では有意な反応が認められなかったため 50 μ M での実験結果を示した。活性測定は被検体添加 24 時間後に行った。結果を Fig. 6A に示した。SUL (10 μ M) では約 5 倍のルシフェラーゼ活性の上昇が認められた。一方、ローズマリーの各成分全てにルシフェラーゼ活性を上昇させる作用が認められたが、特に CA に著しく強い効果が認められ、ルシフェラーゼ活性は約 25 倍にまで増大した。CA の類似化合物である CS の場合は約 7 倍であり、構造的に類似しているにも関わらずかなりの差が認められた。次に CA の濃度依存的 EpRE 活性化作用を測定した。Fig. 6B に示したように、CA は 20 μ M まで濃度依存的に EpRE レポーター遺伝子発現を誘導した。40 μ M 以上では毒性がでたため測定できなかった。

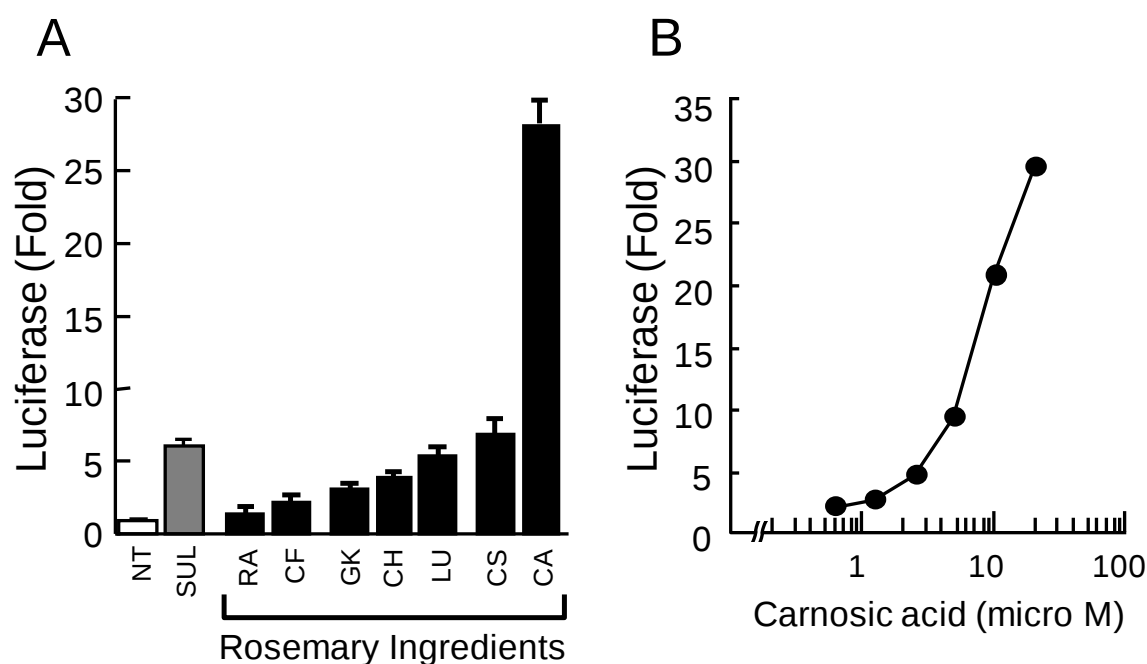


Fig. 6. ローズマリーの成分による PC12h 細胞の EpRE 転写活性化作用

Ingredients of rosemary, rosmarinic acid (RA), caffeic acid (CF), genkwanin (GK), chrysin (CH), luteolin (LU), carnosol (CS), carnosic acid (CA), and sulforaphene (SUL) as a positive control were subjected to EpRE reporter gene assay in PC12h cells. 10 or 50 μ M of compound (CF, RA: 50 μ M) were added to the cells transfected with EpRE-reporter gene vector and then luciferase activity was measured 24 later. The value of nontreatment (NT) was arbitrarily set as 1 and the relative values were presented (A). 0.6-20 μ M of CA was added to PC12h cells transfected with GSTYa EpRE core region-luciferase reporter vector. After 24 h luciferase activity was measured (B).

■カルノシン酸の第 2 相酵素発現誘導

CA によって EpRE-レポーター遺伝子を導入した細胞のルシフェラーゼ活性の増大が認められた。このことは、CA が EpRE の転写活性を増大させることによって第 2 相酵素遺伝子の発現を高める可能性を示すものであった。そこで、CA によって発現誘導される遺伝子群になにがあるのかをマイクロアレイ・DNA チップを用いて測定した。本実験は、ヒト肝臓由来 HepG2 細胞株を用いて行った。結果の一部を Table 1 に示した。発現が上昇したものには、グルタチオンリダクターゼや γ グルタミルシステインリガーゼ重鎖 (*GCL-h*) 及びその軽鎖 (*GCL-l*)、NAD(P)H キノンオキシドリダクターゼ-1 (*NQO-1*) などの第 2 相酵素遺伝子が多く認められた。

Table 1. カルノシン酸が HepG2 細胞遺伝子発現に与える影響：マイクロアレイ分析

Gene name	Accession#	Increase (%)
<i>NQO1</i>	NM_000903	166%
<i>thioredoxin</i>	NM_003329	167%
<i>glutathione reductase</i>	NM_000637	175%
<i>GST A3</i>	NM_000847	181%
<i>GST A5</i>	NM_153699	196%
<i>EGR 1</i>	NM_001964	201%
<i>GST A1</i>	NM_145740	229%
<i>thioredoxin reductase 1</i>	NM_003330	317%
<i>GCL-l</i>	NM_001498	355%
<i>GCL-h</i>	NM_002061	367%

NQO1: NAD(P)H quinone oxidoreductase 1, GST: glutathione S-transferase, EGR: early growth response, GCL: glutamate-cysteine ligase

次に、PC12h 細胞に CA を添加し 6、24、48 時間後に RNA を回収し RT-PCR によって第 2 相酵素（GCL-l, GCL-h, HO-1, NQO-1）の遺伝子発現レベルをみたところ、測定した全ての遺伝子発現が CA 添加 6-24 時間後にかけて上昇していた（Fig. 7）。

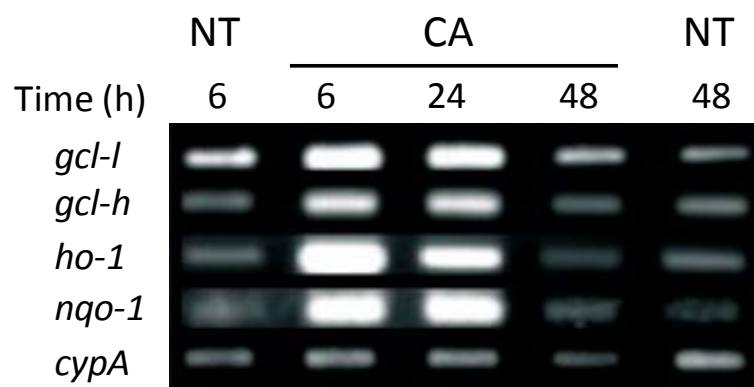


Fig. 7. カルノシン酸が PC12h 細胞の第 2 相酵素遺伝子発現に与える影響

CA: carnosic acid, NT: non-treatment, gcl-l: γ glutamyl cystein ligase-light chain, gcl-h: γ glutamyl cystein ligase-heavy chain, ho-1: hemeoxygenase-1, nqo-1: NAD(P)H quinone oxide reductase-1, cypA: cyclophilinA

■カルノシン酸の EpRE 転写活性化作用の細胞種による違い

上記で示したように CA は他の被検体に比べて PC12h の EpRE 活性を著しく高めた (Fig. 6)。しかしながら同条件で HepG2 を用いて EpRE レポーター遺伝子アッセイを実施したところ、CA の HepG2 に対する EpRE 活性作用は、陽性対照である SUL と比較し 1.5 倍程度の差しか認められなかった (Fig. 8)。更に CA とその類似化合物である CS の EpRE 活性作用を HepG2 及び L-M 細胞を用いて比較したところ、CA と CS の活性はほぼ同等であった (Fig. 8)。以上のように CA の EpRE 活性化作用は細胞種によって明確な違いがあり、CA は PC12h に対してなにか特異な作用を発揮しているように思われた。

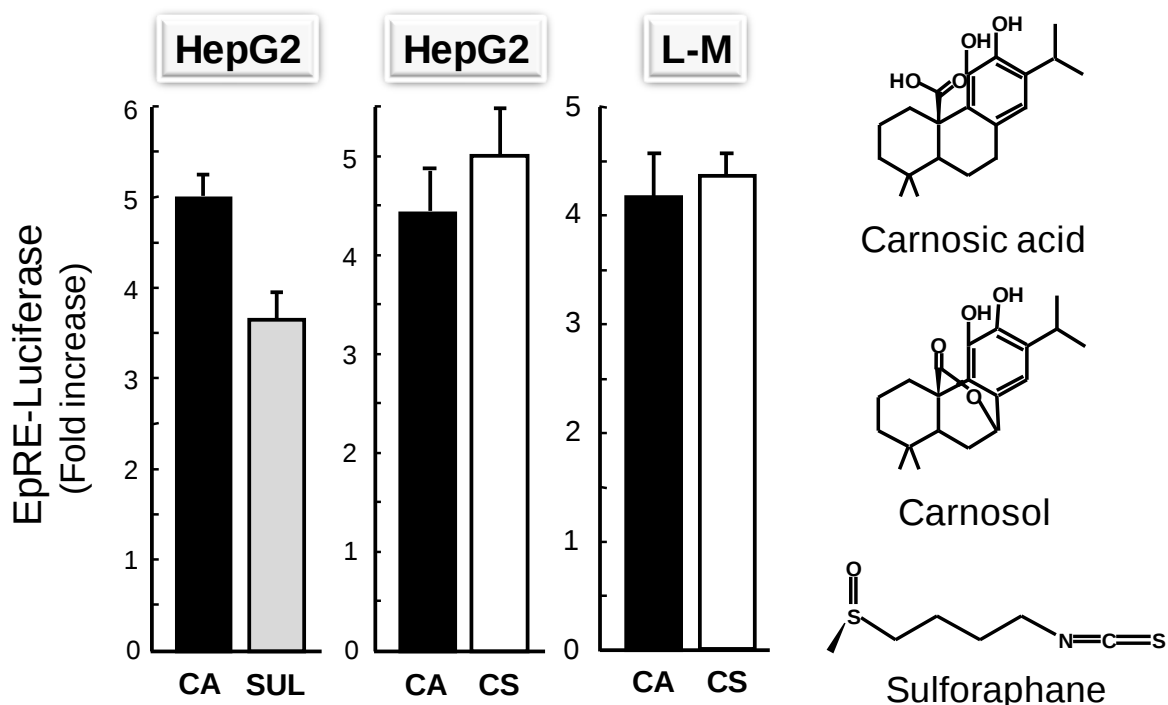


Fig. 8. カルノシン酸の HepG2 及び L-M 細胞に対する EpRE 活性化作用 (CS 及び SUL との比較)

HepG2 or L-M cells were transiently co-transfected with mGSTYa-EpRE-luciferase reporter plasmid. The cells were treated with 10 μ M of SUL, CS or CA for 24 h. Reporter activity was expressed as fold increase in luciferase activity, which was normalized to beta galactosidase expression used as an internal control.

2-4. 考 察

実験に供したローズマリーの成分すべてに PC12h 細胞の EpRE 転写活性化作用が認められたが、特に CA の効果は著しく強かった (Fig. 6)。本章の実験で用いたレポーター遺伝子には EpRE のコア領域部分を挿入しており、EpRE に結合する転写因子が Nrf2 であることから、本活性は Nrf2 に依存していると思われる。

神経細胞様の性質を有した細胞株である PC12h に対する CA の EpRE 転写活性化作用は、強い Nrf2-EpRE 活性化作用があることが報告されている SUL と比べても著しく強いものであった (Fig. 6)。しかしながら、興味深いことに他の細胞株: HepG2 (肝細胞株) 及び L-M (線維芽細胞株) に対しては、CA と SUL、CS の活性にそれほど大きな差は認められなかった (Fig. 8)。CA と CS は構造が類似しており、PC12h に対する EpRE 活性化作用にこのような大きな差がでたことは興味深い知見であった。このことから、CA は PC12 のような神経細胞に対して何らかの特異的な作用を発揮する可能性があると思われる。第 5 章 (Fig. 18) にデータを示したが、本実験条件において、CA は PC12h 細胞に対し強力な神経突起伸長／分化誘導作用を示した。この作用は、弱いものではあったが CS でも認められた。PC12h に対して CS は CA に比べれば弱いものの比較的強い EpRE 活性化作用を示したことから (Fig. 6)、PC12h の分化誘導と Nrf2-EpRE 経路の活性化の間にはなんらかの関係があるように思われた。それらの点については、第 5 章に記載したので本章では省略する。

アルツハイマー病 (AD) やパーキンソン病 (PD)、筋委縮性側索硬化症 (ALS) などは、神経細胞が変性・死滅していく疾患、いわゆる神経変性疾患であり酸化ストレスが発症・増悪に関与していることが示唆されている(27)。また脳梗塞などが原因で生じる虚血再還流による神経系変性も酸化ストレスが原因であることが知られている(28)。細胞は様々な抗酸化酵素や解毒酵素、グルタチオンなどの抗酸化物質を作り出し酸化ストレスから防御している。特にグルタチオンは細胞内に mM 単位で存在していることが知られており、酸化ストレスから細胞を保護するという点において重要な因子である(29, 30)。様々な抗酸化酵素やグルタチオン合成に関わる遺伝子上流には EpRE が存在し、そこに Nrf2 転写因子が作用することによって転写が制御されている。しかし細胞／生体の抗酸化活性は、加齢と共に減少していくことが知られている(31)。また、この加齢による抗酸化力低下と Nrf2 活性の低下 (核内移行 Nrf2 レベルの低下)

の間には相関性があり、加齢による抗酸化力の低下は Nrf2 活性に依存している可能性が高い(32)。しかしながら、加齢しても、Nrf2 活性化剤により、Nrf2 を活性化することは可能であることが示されている(32)。

近年、長寿化に伴い AD や PD などの認知障害を併発する神経変性疾患が増大しており、社会的にも大きな問題となっている。しかしながら、これらの疾患には酸化ストレスが関与していることから、酸化ストレスを抑制することで少なくとも発症の予防もしくは疾患の進行を遅延できる可能性がある。従って、脳に到達する化合物で Nrf2-ARE 経路活性化作用を有するものは、神経変性疾患の予防や治療に役立つと考えられる。そこで、神経系への CA の Nrf2 生体防御機構を介した細胞毒性抑制効果に焦点をあて以降の研究を進めることとした。

2－5. 引用文献

- 1 . Sereiti MR, Abu-Amer KM, Sen P. Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials. *J Exp Biol.* 1999; 37(2):124-130.
- 2 . Ngo SN, Williams DB, Head RJ. Rosemary and cancer prevention: preclinical perspectives. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2011; 51(10):946-954.
- 3 . Rosenbaum CC, O'Mathúna DP, Chavez M, Shields K. Antioxidants and antiinflammatory dietary supplements for osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Altern Ther Health Med.* 2010; 16(2):32-40.
- 4 . Ho CT, Wang M, Wei GJ, Huang TC, Huang MT. Chemistry and antioxidative factors in rosemary and sage. *Biofactors.* 2000; 13(1-4):161-166.
- 5 . Peng CH, Su JD, Chyau CC, Sung TY, Ho SS, Peng CC, Peng RY. Supercritical fluid extracts of rosemary leaves exhibit potent anti-inflammation and anti-tumor effects. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2007; 71(9):2223-2232.
- 6 . Klancnik A, Guzej B, Kolar MH, Abramovic H, Mozina SS. In vitro antimicrobial and antioxidant activity of commercial rosemary extract formulations. *J Food Prot.* 2009; 72(8):1744-1752.
- 7 . Debersac P, Vernevaut MF, Amiot MJ, Suschetet M, Siess MH. Effect of a water-soluble extract of rosemary and its purified component rosmarinic acid on xenobiotic-metabolizing enzymes in rat liver. *Food Chem Toxicol.* 2001; 39(2):109-117.
- 8 . Nabekura T, Yamaki T, Hiroi T, Ueno K, Kitagawa S. Inhibition of anticancer drug efflux transporter P-glycoprotein by rosemary phytochemicals. *Pharmacol Res.* 2010; 61(3):259-263.
- 9 . Oluwatuyi M, Kaatz GW, Gibbons S. Antibacterial and resistance modifying activity of *Rosmarinus officinalis*. *Phytochemistry.* 2004; 65(24):3249-3254.
- 1 0 . Peng CH, Su JD, Chyau CC, Sung TY, Ho SS, Peng CC, Peng RY. Supercritical fluid extracts of rosemary leaves exhibit potent anti-inflammation and anti-tumor effects. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2007; 71(9):2223-2232.

- 1 1 . Pertino MW, Theoduloz C, Rodríguez JA, Yáñez T, Lazo V, Schmeda-Hirschmann G. Gastroprotective effect of carnosic acid gamma-lactone derivatives. *J Nat Prod.* 2010; 73(4):639-643.
- 1 2 . Wang T, Takikawa Y, Satoh T, Yoshioka Y, Kosaka K, Tatemichi Y, Suzuki K. Carnosic acid prevents obesity and hepatic steatosis in ob/ob mice. *Hepatol Res.* 2011; 41(1):87-92.
- 1 3 . Bobilev I, Novik V, Levi I, Shpilberg O, Levy J, Sharoni Y, Studzinski GP, Danilenko M. The Nrf2 transcription factor is a positive regulator of myeloid differentiation of acute myeloid leukemia cells. *Cancer Biol Ther.* 2011; 11(3):317-329.
- 1 4 . Sagara Y, Vanhnasy J, Maher P. Induction of PC12 cell differentiation by flavonoids is dependent upon extracellular signal-regulated kinase activation. *J Neurochem.* 2004; 90:1144-1155.
- 1 5 . Sriram N, Kalayarasan S, Sudhandiran G. Epigallocatechin-3-gallate augments antioxidant activities and inhibits inflammation during bleomycin-induced experimental pulmonary fibrosis through Nrf2-Keap1 signaling. *Pulm Pharmacol Ther.* 2009; 22(3):221-236.
- 1 6 . Yang C, Zhang X, Fan H, Liu Y. Curcumin upregulates transcription factor Nrf2, HO-1 expression and protects rat brains against focal ischemia. *Brain Res.* 2009 28; 1282:133-141.
- 1 7 . Li J, Johnson D, Calkins M, Wright L, Svendsen C, Johnson J. Stabilization of Nrf2 by tBHQ confers protection against oxidative stress-induced cell death in human neural stem cells. *Toxicol Sci.* 2005; 83(2):313-328.
- 1 8 . Satoh T, Furuta K., Suzuki M. Watanabe Y. Prostaglandin J2 and its metabolites promote neurite outgrowth induced by nerve growth factor in PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 258:50-53.
- 1 9 . Itoh K., Mochizuki M, Ishii Y, Ishii T, Shibata T, Kawamoto Y, Kelly V, Sekizawa K, Uchida K, Yamamoto M. Transcription factor Nrf2 regulates inflammation by mediating the effect of 15-deoxy-delta (12,14)-prostaglandin J2. *Mol Cell Biol.* 2004; 24:36-45.
- 2 0 . Toyama T, Shinkai Y, Yasutake A, Uchida K, Yamamoto M, Kumagai Y. Isothiocyanates reduce mercury accumulation via an Nrf2-dependent mechanism during exposure of mice to methylmercury. *Environ*

- Health Perspect. 2011; 119(8):1117-1122.
- 2 1 . Morimitsu Y, Nakagawa Y, Hayashi K, Fujii H, Kumagai T, Nakamura Y, Osawa T, Horio F, Itoh K, Iida K, Yamamoto M, Uchida K. A sulforaphane analogue that potently activates the Nrf2-dependent detoxification pathway. *J Biol Chem*. 2002; 277(5):3456-3463.
 - 2 2 . Cheung KL, Kong AN. Molecular targets of dietary phenethyl isothiocyanate and sulforaphane for cancer chemoprevention. *AAPS J*. 2010; 12(1):87-97.
 - 2 3 . Keum YS. Regulation of the Keap1/Nrf2 system by chemopreventive sulforaphane: implications of posttranslational modifications. *Ann N Y Acad Sci*. 2011; 1229:184-189.
 - 2 4 . Schwarz K, Ternes W. Antioxidative constituents of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*. II. Isolation of carnosic acid and formation of other phenolic diterpenes. *Z Lebensm Unters Forsch*. 1992; 195(2):99-103.
 - 2 5 . Hatanaka H. Nerve growth factor-mediated stimulation of tyrosine hydroxylase activity in a clonal rat pheochromocytoma cell line. *Brain Res*. 1981; 222(2):225-233.
 - 2 6 . Wasserman WW, Fahl WE. Functional antioxidant responsive elements. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94(10):5361-5366.
 - 2 7 . Emerit J, Edeas M, Bricaire F. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomed Pharmacother*. 2004; 58(1):39-46.
 - 2 8 . Ramalingam M, Kim SJ. Reactive oxygen/nitrogen species and their functional correlations in neurodegenerative diseases. *J Neural Transm*. 2012; Epub ahead of print.
 - 2 9 . Pompella A, Visvikis A, Paolicchi A, De Tata V, Casini AF. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem Pharmacol*. 2003; 66(8):1499-1503.
 - 3 0 . Pastore A, Piemonte F, Locatelli M, Lo Russo A, Gaeta LM, Tozzi G, Federici G. Determination of blood total, reduced, and oxidized glutathione in pediatric subjects. *Clin Chem*. 2001; 47(8):1467-1469.
 - 3 1 . Rebrin I, Kamzalov S, Sohal RS. Effects of age and caloric restriction on glutathione redox state in mice. *Free Radical Biol Med*. 2003; 35(6):626-635.

- 3 2 . Suh JH, Shenvi SV, Dixon BM, Liu H, Jaiswal AK, Liu RM, Hagen TM. Decline in transcriptional activity of Nrf2 causes age-related loss of glutathione synthesis, which is reversible with lipoic acid. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004; 101(10):3381-3386.

—第3章—

大脳皮質初代培養細胞 (*in vitro*) 及び脳 (*in vivo*) に対するカルノシン酸の神経変性抑制効果

3-1. 序 論

これまでの結果より、CAはEpREを活性化し第2相酵素の遺伝子発現を促すことによって、生体防御機構を活性化することが示唆された。また神経様細胞株PC12hに対して特に強い効果を示したことから、酸化ストレス等によって起こる神経変性から保護する作用が期待された。神経変性疾患としては、ADやPD、HD、ALS及び脳血管障害（脳梗塞・脳卒中）に起因するもの等があるが、これらの疾患には酸化ストレスが関与していることが知られている(1)。

本邦において死因の約1/6は、脳血管障害に起因しており、脳梗塞等によって神経変性が生じると死に至らないまでも重篤な後遺症が残ることが多い。脳梗塞の場合、梗塞が起こった部位が、いったん虚血状態におちいり、その後、再度血流が戻った時に神経細胞内で強い酸化ストレスが発生し神経細胞が死滅する。これを“興奮毒性”とよぶ(2, 3)。最近では、ADやALS等他の神経変性疾患においても興奮毒性が関与していることがわかってきている(4-8)。興奮毒性には、神経細胞に存在するN-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)型グルタミン酸受容体が関与しており、そのアゴニストであるグルタミン酸やNMDAを神経細胞に大量に添加することで興奮毒性を細胞培養実験で再現することができる。一方、第2相酵素群には酸化ストレスを抑制する作用があることから、EpRE活性化作用を有する化合物には脳梗塞等によって起こる神経変性を抑制する効果が期待できる。

そこで、酸化ストレスに起因する神経変性疾患を抑制しうるかどうかを検討するために、初代培養神経細胞及び脳虚血再還流モデルを用い、CAの効果について実験を行った。

3-2. 実験材料及び方法

■試薬

グルタミン酸、N-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)、ロテノン、Hoechst 33,258、2, 3, 5- triphenyltetrazolium chloride (TTC) は、Sigma-Aldrich もしくは和光純薬から入手した。

■大脳皮質細胞初代培養

妊娠17日目のSDラット (charles river) の胎仔 (E17) より大脳皮質を回収した。細胞を分散するため0.01% DNase I (Sigma-Aldrich) 、papain (9 units/mL, Sigma-Aldrich) 、37℃、15分間酵素処理した。700 rpm、5分間遠心操作し得られた細胞のペレットを5%新生仔ウシ血清、5% HSを含むDF培地 (GIBCO) に分散し培養皿に播種して培養を行った。

培養2日目 (DIV2) もしくは21日目 (DIV21) に培養用培地へCAを添加し、アポトーシスを誘導するため、その1時間後にNMDA、グルタミン酸もしくはロテノンを含むEarle's balanced salt solution [グリシン (5 μ M) 、塩化カルシウム (1.8 mM) 添加] に交換し15分間培養した。その後、再びCAを添加した培養用培地に交換し20時間培養した。神経細胞がアポトーシスを起こしているかどうかの確認は、神経細胞特異的マーカーを抗NeuN抗体 (神経細胞核マーカー) 及び抗MAP-2抗体 (神経細胞突起マーカー) を用いて染色することによって行った。

■細胞蛍光染色

培養細胞の固定は3%パラホルムアルデヒド溶液で20分間行った。3回PBS(-)でリンスした後、抗体の浸透性を上げるため0.2% TritonX100で5分間処理した。次に一次抗体を添加し4℃で一晩放置した。0.2% Tween20・PBS(-)で3回洗浄した後、2次抗体を加え室温で一時間反応させた。核染色 (DNA 染色) はHoechst 33,258 (5 μ g/mL) を用い室温5分間処理することによって行った。一次抗体は、抗NeuN抗体、抗MAP2抗体を使用した。それらの一次抗体に対する2次抗体は、ローダミン標識抗マウスIgG抗体 (SantaCruz) を用いて染色を行った。撮影は、顕微鏡下 (Eclipse TE-2000E, NIKON) で行った。

■組織中のカルノシン酸量の測定

CA が経口投与で脳内にまで到達するかどうかを確認するために以下の実験を行った。7 週齢雄性 C67BL/6 マウス (charles river) を室温 $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、12 時間おきに照明の点灯／消灯を繰り返す環境にて飼育した。餌は通常飼育用餌 MF (オリエンタル酵母)、水は水道水を与え、それぞれ自由摂取できるようにした。環境に馴化させるため上記条件で一週間予備飼育した後、18 時間絶食を実施した。オリーブオイルに CA を溶解したもの (10 mg/mL) を CA 100 mg/kg 体重になるようにゾンデを用いて経口投与した。コントロール群には、オリーブオイルのみを投与した。CA 投与 1 もしくは 3 時間後にエーテル麻酔下で心臓より全採血を行い、その直後に脳及び肝臓を取り出した。取り出した脳及び肝臓にアセトニトリル+エタノール (9 + 1) を添加し、ポリトロン処理により破碎抽出を行った。遠心操作し得た上清を窒素気流下で濃縮し 200 μL のエタノールに再溶解させたものを HPLC 用のサンプルとした。血液は血清を調製し、その血清に等量のアセトニトリルを加えることによって蛋白を変性させ、遠心処理により除蛋白し得られた上清を HPLC 用サンプルとした。

■HPLC

HPLC : LC10Avp (Shimadzu)、ODS カラム : $\mu\text{Bondasphere}$ (Waters)、検出器 : フォトダイオードアレイ UV 検出器 (Shimadzu)、展開溶媒 : 0.1% トリフルオロ酢酸 (A) + アセトニトリル (B) 55%B イソクラチック、流速 : 1 mL/min、カラムオーブン温度 : 40°C 、の条件で CA の測定を行った。

■CA 投与マウスの脳内グルタチオン及び第 2 相酵素

CA を 0.03(w/w)% 含有させた餌 (MF、オリエンタル酵母) を作成し、8 週齢雄性 C57BL/6 マウス (Charles river) に一週間にわたり自由摂取させた。一日の餌摂取量は約 2.5~3.0 g/匹であり、CA を含有していない餌を食べさせた群 (コントロール群) と CA 混餌を食べさせた群の間に差はなかった。その後、エーテル麻酔下にて心臓から全採血することにより脱血し、脳を摘出した。摘出した脳は左右に小分けし、片方には RNA 抽出精製試薬 (TRIzol, Invitrogen) を加えてホモジナイズし凍結保存した (遺伝子発現レベル測定用サンプルとして使用)。グルタチオンの定量にはグルタチオン測定キット (Dojin) を使い、マニュアルに従ってサンプル調製しグルタチオン量を測定した。グルタチオン測定用のサンプル調製は以下のように行った。グルタチオンの酸化を避けるため、小分けした組織に直ちに 10 mM 塩酸、5% 5-スルフォサリチル酸溶液を添加し

ポリトロンで破砕抽出操作を行い、直ちに液体窒素で凍結し-80℃で一時保管した。融解後、遠心操作を行い得られた上清をグルタチオン測定用サンプルとした。

第2相酵素の遺伝子発現レベルを確認するため、RNA抽出用試薬 TRIzol

(Invitrogen)のマニュアルに従い RNA を抽出した。得られた RNA から cDNA を調製し、PCR 法により遺伝子発現レベルを確認した。PCR は第2章と同様な方法により実施した。使用したプライマー：マウス GCL-h : 5'- AGG CTC TCT GCA CCA TCA CT -3' (センス) / 5'- TGG CAC ATT GAT GAC AAC CT -3' (アンチセンス)、マウス HO-1 : 5'- TAC ACA TCC AAG CCG AGAAT -3' (センス) / 5'- GTT CCT CTG TCA GCA TCA CC -3' (アンチセンス)、マウス β アクチン : 5'- AGC CAT GTA CGT AGC CAT CC -3' (センス) / 5'- CTC TCA GCT GTG GTG GTG AA -3' (アンチセンス)。

■脳梗塞モデル

実験の18時間前から絶食させたC57BL/6マウス(8週齢、雄性、charles river)に10% DMSO-PBS(-)に溶解したCAを腹腔内投与した(CA 1 mg/kg体重)。コントロール群には溶媒のみを投与した。中大脳動脈閉塞(MCAO)／再還流(reperfusion)は、以下のように行った。イソフルラン+70%亜酸化窒素による麻酔下、マウスの右側のMCAOを外科的手術により実施した。MCAO処理は2時間実施した。血流量(rCBF)を確認するため、レーザードロップ血流計

(Perimed)によるモニターリングを行った。その間の右脳側血流量は、MCAO前の25%以下にまで低下した。その後MCAOを解き再還流したところ2時間以内に血流量は50%以上に回復した。再還流24時間後、麻酔下にて屠殺し直ちに脳を取り出し、1 mm厚のスライスを作成した。脳スライスは、2.5% TTC溶液に10分間浸け染色した後、保存するため4%ホルムアルデヒドで固定操作を行った。TTC染色された部分の面積の測定はNIHイメージ(version 1.62; Bethesda)によって行った。

3-3. 結 果

■初代培養神経細胞に対するカルノシン酸の酸化ストレス抑制効果

大脳皮質初代培養細胞を用い、NMDA、グルタミン酸及びロテノンの細胞毒性に対するCAの影響をみた。高濃度のグルタミン酸やNMDAを神経細胞に与えるとアポトーシスが誘導されるが、これには興奮毒性に起因するものとそうではないものがあることが知られている。すなわち、機能的なNMDA型グルタミン酸受容体が十分に発現している場合には、興奮毒性に起因する酸化的ストレスが神経細胞死の主原因になる (2-8)。一方、NMDA型グルタミン酸受容体の発現レベルが不十分な場合には、細胞内グルタチオンが枯渇することによって結果的に酸化的ストレスによる細胞死が誘発されることが知られている(9-12)。NMDA型グルタミン酸受容体の発現レベルは、胎仔大脳皮質細胞を培養した日数 (day in vitro: DIV) に依存して異なり、培養日数が短くまだ未成熟な状態では機能的な受容体が十分には発現していないため、過剰なグルタミン酸添加によって起こる細胞死は興奮毒性によるものではないことが示されている (10, 12)。本実験では、これらの知見に従って、妊娠17日目のSDラットの胎仔 (E17) より大脳皮質を回収し、培養2日目 (E17, DIV2) の機能的受容体が十分発現していない初代培養神経細胞を用いたときのグルタミン酸/NMDAによる毒性を“興奮非依存毒性”とした。培養21日目には、神経細胞 (E17, DIV21) に機能的なNMDA型グルタミン酸受容体が十分に発現するため、DIV21を用いた場合を“興奮毒性”とした。ロテノンは、ミトコンドリアの電子伝達系複合体Iを阻害することによってROSを発生させる薬剤であり、酸化的ストレス誘発剤として用いた。

本系では 10 μ M 以上の CA で処理した場合、わずかに毒性が認められたため、毒性が認められなかった 3 μ M で実験を行った。Fig. 9 に染色細胞の結果を示した。DIV2 をグルタミン酸 (2 mM) 及びロテノン (0.3 μ M) で処理した場合、MAP-2/NeuN 陽性の生細胞数は著しく減少し、強い神経細胞毒性が誘発されることが示された。この毒性は、CA を添加することによって著しく軽減された。グルタミン酸もしくはロテノンで処理した場合、MAP2/NeuN 陽性細胞数は、コントロール (未処理群) に対して、それぞれ $30.8 \pm 2.5\%$ (グルタミン酸) 及び $25.8 \pm 1.9\%$ (ロテノン) まで減少していたが、グルタミン酸/ロテノン+CA で処理した群は、それぞれ $73.8 \pm 3.7\%$ 及び $80.4 \pm 3.4\%$ であった。これらの結

果は、CA には中枢神経系の細胞を酸化ストレスから保護する働きがあることを示唆していた (Fig. 9A, B)。

次に、成熟した NMDA 型グルタミン酸受容体を十分に発現している初代培養細胞 (DIV21) を用い、NMDA による興奮毒性に対する CA の効果を検証した。NMDA によって生細胞数 (MAP-2/NeuN 陽性) は $15 \pm 1.6\%$ にまで減少したが、CA 添加した場合は $36 \pm 2.3\%$ となり、細胞死は有意に抑制された (Fig. 9C)。以上の結果より、グルタミン酸／ロテノンによる興奮非依存型の毒性及び NMDA 型グルタミン酸受容体を介した興奮毒性によって起こる酸化ストレス、いずれに対しても CA は抑制作用を発揮することが示された。更に、大脳皮質初代培養細胞の EpRE 転写活性が CA $3 \mu\text{M}$ で有意に活性化されることが確認された (Fig. 9D)。このことから第 2 相酵素の発現誘導が上記の毒性の抑制に寄与していることが示唆された。

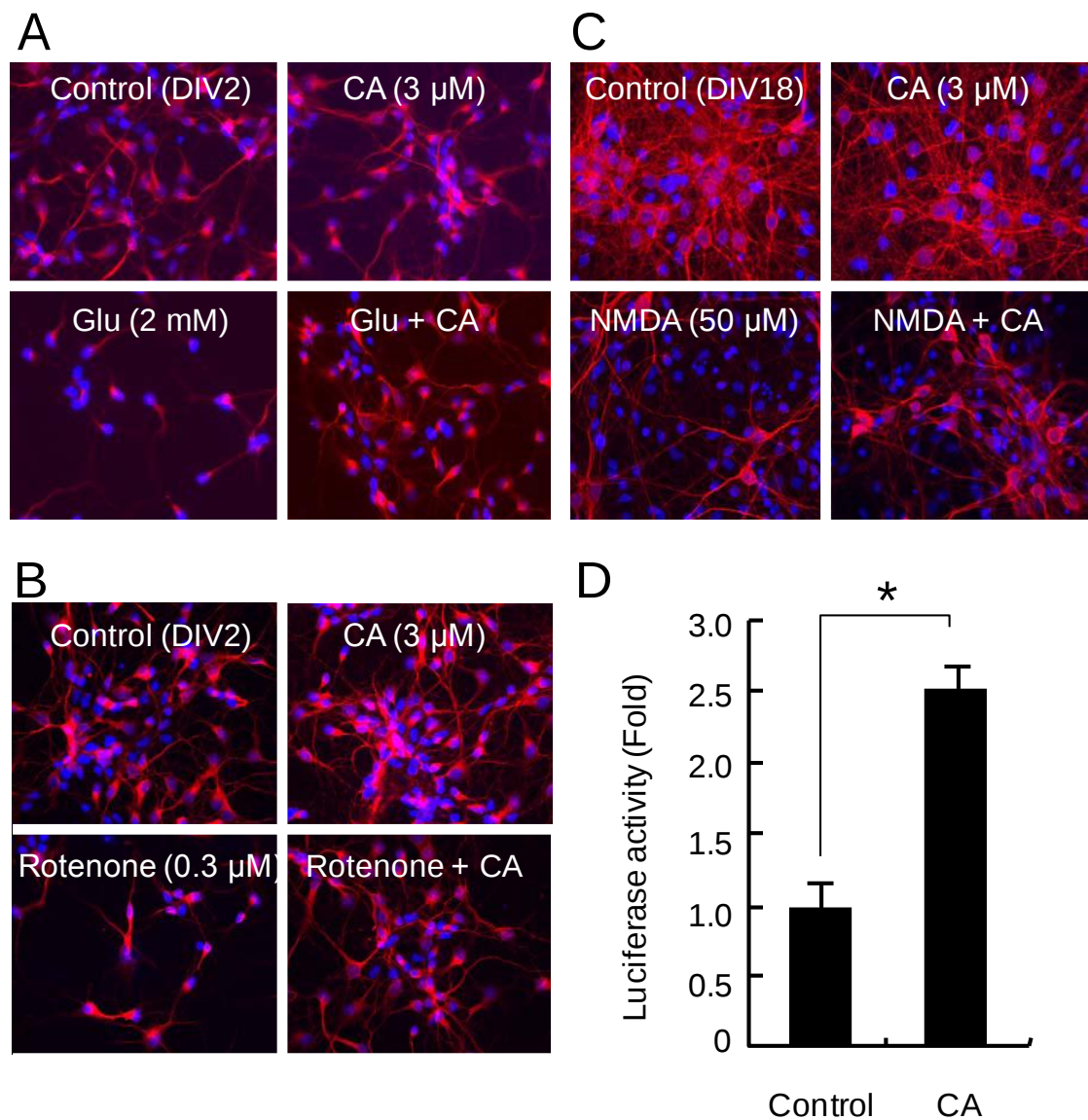


Fig. 9. カルノシン酸の脳皮質初代培養細胞に対する酸化ストレス及び興奮毒性抑制効果と EpRE 転写活性化作用

CA (3 μ M) or vehicle was added to cerebrocortical cultures (E17, DIV2) 1 h prior to exposure to glutamate or rotenone. The cultures were then incubated for 20 h and stained with antibodies for MAP-2/NeuN neuronal markers (red) as well as with Hoechst DNA dye (blue) (A and B). CA (3 μ M) or vehicle was added to cerebrocortical cultures (E17, DIV21) 1 h prior to exposure to NMDA. The cultures were then incubated for 20 h and subsequently stained (C). Cortical cultures (E17, DIV21) were transfected with EpRE-luciferase reporter vector DNA. CA (3 μ M) or vehicle (control) was then added to the cultures. After a 24-h incubation, cell lysates were used for luciferase reporter gene assays (D). Values are mean $\pm$ SEM; * p < 0.01 by ANOVA.

■カルノシン酸の末梢投与による脳内移行

以上の実験結果から、CA は酸化ストレスによって起こる大脳皮質初代培養神経細胞の変性を抑制することが示された。しかしながら体内へ投与する場合、様々な代謝をうけたり、中枢神経組織の血管には特殊なバリア：血液-脳関門

(blood-brain barrier : BBB) があるため、末梢から投与しても中枢にまで到達するかどうか疑問が残った。そこで次に末梢より投与した CA が脳内にまで到達するかどうかを *in vivo* 試験によって検討した。CA を経口投与し、1 時間及び 3 時間後にエーテル麻酔下にて心臓より全採血することによって血液をほぼ完全に除去し、脳を取り出し、回収した血液と脳それぞれの組織中の CA 含量を測定した。その結果、投与 1 時間後には、血液、脳それぞれから 44.3 ± 4.8 、 $4.8 \pm 1.8 \mu\text{mol/kg}$ 組織重量 (平均値 $\pm$ 標準誤差) の CA が検出され、経口投与によって CA が脳にまで到達することが確認された (Fig. 10)。また、Fig. 9D の結果より CA $3 \mu\text{M}$ によって EpRE 活性化が起こることから、これらの濃度は第 2 相酵素の発現を誘導するには十分な濃度であると考えられた。3 時間後には、脳内の CA 量は約半分に減少していた。

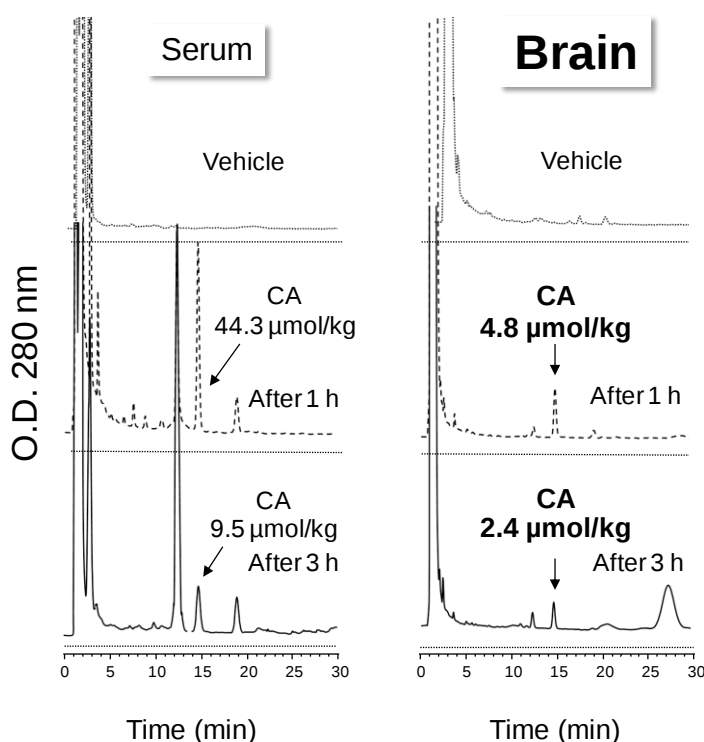


Fig. 10. カルノシン酸の経口投与による脳への移行

C57 BL/6 (4 mice, fasting for 18 h), Sample: carnosic acid in olive oil (10 mg/mL), 0.3 mL /mouse, p.o. (oral administration), After 1 and 3 h, blood was removed from heart under anesthesia with ether and then the brain was eviscerated. Carnosic acid was extracted with acetonitrile and ethanol.

■脳内のグルタチオン及び第2相酵素遺伝子発現に与えるカルノシン酸の影響

次に、CA を末梢から投与することによって、脳内のグルタチオン量及び酸化還元比に変動が起こるかどうか、及び第2相酵素が誘導されるかどうかについて検討を行った。グルタチオンは、細胞内を還元状態に保つために重要な役割を果たしており、第2相酵素であるグルタチオン合成酵素（GCL）やグルタチオンリダクターゼによって調整されている。CA を 0.03 (w/w)%混合した餌をマウスに一週間にわたり自由摂取させ、Fig. 10 の実験同様に全採血することによって血液を除去した後、脳を取り出し二つに小分けし、グルタチオン測定用と第2相酵素発現レベル測定用に供した。結果を Fig. 11 に示した。CA を与えたマウスとコントロール群（CA 未投与群）の脳内総グルタチオン量〔還元型グルタチオン（GSH）＋酸化型グルタチオン（GSSG）〕を比較したところ、僅かではあるが有意に上昇していた。一方、GSH/GSSG の比率は、CA 投与によって顕著に上昇していた。なお、測定した組織中の総グルタチオンに対する GSSG の比率の結果は 0.34-0.65 %であった。通常、細胞内 GSH/GSSG 比は 0.1-1.0% であることから、サンプル調製時に著しい酸化は受けていないと思われた。更に、CA を与えたマウスの脳の第2相酵素（HO-1 及び GCL）の遺伝子発現レベルを RT-PCR 法によってみたところ、上昇していることが確認された。以上の結果は、CA 末梢投与により、脳組織の生体防御機構が誘導されたことを示唆していた。

■脳虚血再還流による神経変性に対するカルノシン酸の抑制効果

次に虚血再還流によって起こる神経変性を CA が抑制できるかどうかの検討を実施した。本実験では、CA もしくは vehicle（10%DMSO-PBS(-)）を腹腔内投与し、その1時間後に MCAO / reperfusion（虚血再還流）を実施した。24 時間後に脳を摘出しスライスを作成した後に、細胞損傷の確認をするために TTC 染色を実施した（赤く染色されなかったところが、損傷が起こっている部位）。結果を Fig. 12 に示した。Vehicle 投与群の損傷量は、 $51.2 \pm 2.4\%$ であった（左脳側〔虚血していない側〕を 100%としたときの右脳側〔虚血した側〕の損傷量の割合）。それに対し、CA を投与したマウスの損傷は $34.5 \pm 3.6\%$ と有意に少なく、虚血再還流によって起こる脳組織の損傷は CA 投与によって抑制できることが示された。

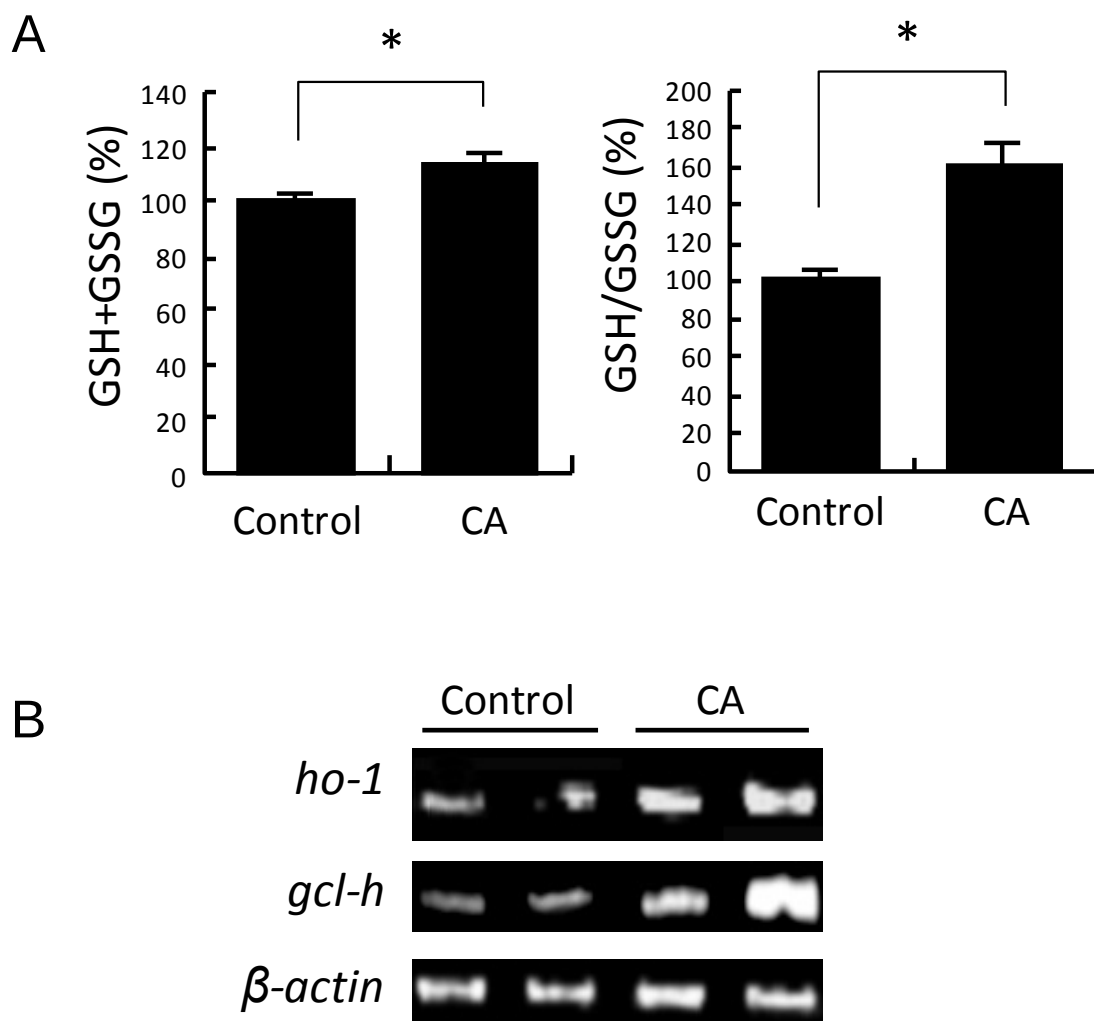
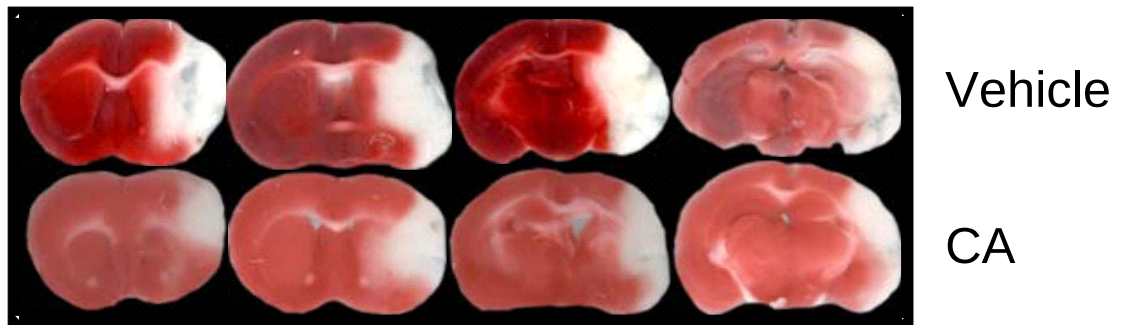


Fig. 11. カルノシン酸経口投与による生体防御機構活性化作用

Mice were fed 0.03% CA for 1 week and then blood was almost completely removed from their hearts. Then their brains were lysed and subjected to quantification of glutathione (A). Total RNA was extracted from the brains and subjected to RT-PCR using the indicated primers in the methods (B).

A



B

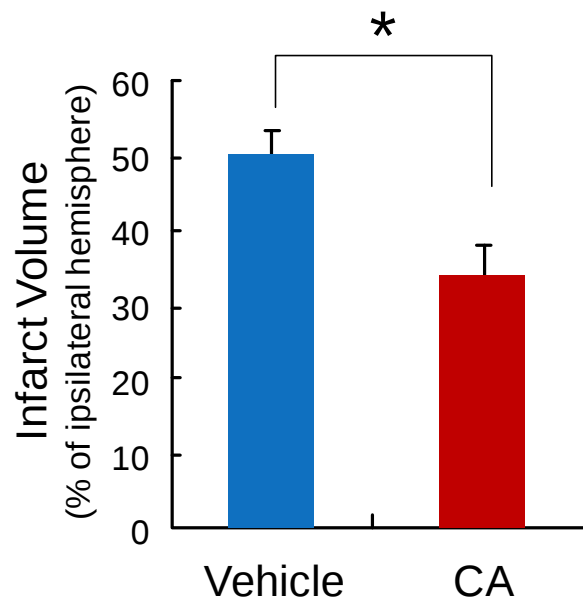


Fig. 12. 脳虚血再還流（脳梗塞モデル）に対するカルノシン酸の神経変性抑制効果

A: Representative TTC staining of brain sections after stroke in CA- versus vehicle-treated mice. CA (1 mg/kg body weight) was administrated intraperitoneally in vehicle solution (10% DMSO in PBS) 1 h prior to MCAO. After 24-h reperfusion, coronal sections, 1 mm in thickness, were prepared and stained with TTC. B: Quantification of infarct volume by TTC staining. CA decreased infarct volume compared to vehicle-treated mice. Data represent mean $\pm$ SEM (vehicle-treated, N = 9; CA-treated, n = 9; $p < 0.05$ by ANOVA).

3-4. 考 察

第2章の結果から、CAは、神経様細胞株 PC12h において EpRE を介した生体防御機構を強力に活性化することが示され、神経変性疾患に対する有効性が期待された。神経変性疾患には様々なタイプがあるが、脳梗塞のみならず AD、ALS や HD 等の発症・増悪にも興奮毒性による酸化ストレスが関与していることが示唆されている(2-8, 13)。そこで、本章では初代培養神経細胞及び *in vivo* 興奮毒性モデル（脳梗塞モデル）を用いて CA の効果を検討することとした。まず、生体への直接投与の前に大脳皮質の初代培養細胞を用い、興奮非依存毒性及び興奮毒性によって起こる酸化ストレスに対して抑制効果を発揮するかどうかについて検討を行った。実験は NMDA 型グルタミン酸受容体が十分に発現していないと考えられる細胞と十分に成熟した受容体が発現していると考えられる細胞とを用いることで、興奮非依存毒性及び興奮毒性に対する効果を検証したが、いずれにおいても CA は毒性を軽減した (Fig. 9A-C)。更に CA は、大脳皮質初代培養細胞に対しても EpRE レポーター遺伝子の転写活性を誘導することが確認された (Fig. 9D)。従って、生体防御機構の活性化が酸化ストレスの低減に寄与し、神経変性を抑制したものと考えられた。CA 自身ラジカルスカベンジャーでもあるため (14)、この酸化ストレス抑制効果には、[1] CA による直接的なラジカルスカベンジ効果、及び[2] 生体防御機構を活性化し第2相酵素を誘導したことによる酸化ストレス抑制効果、これら二つの効果が寄与していると考えられた。

薬物が生体で有効性を発揮するためには、代謝による失活や、薬物が生体バリアを通過できるかなど幾つかの課題をクリアしなければならない。特に脳をはじめとする中枢神経系の血管には血液-脳関門 (blood-brain barrier: BBB) が存在するため、投与しても脳内にまで到達することができない可能性も高い。しかし、CA の場合、経口投与によって脳にまで移行することが確認された (Fig.10)。さらに、CA 投与によって脳内の総グルタチオン量 (GSH+GSSG) 及びその還元型の比率 (GSH/GSSG 比) が増大していることも確認された (Fig. 11A)。EpRE を介して発現が誘導される酵素には、グルタチオンの合成や還元に関わる酵素があり、Fig. 11A の結果は第2相酵素の発現誘導に起因していると思われた。事実、CA を投与したマウスの脳組織では代表的な第2相酵素であり抗酸化作用を発揮する HO-1 及びグルタチオン合成の律速酵素である GCL の遺伝子発現が増大していた (Fig. 11B)。これらの結果は、CA は末梢投与によって脳にまで到達し生体防御機構を誘導することを示していた。更に *in vivo* 脳

梗塞モデル脳虚血再還流実験においても CA は脳組織の壊死を有意に抑制した (Fig. 12)。以上の結果は、CA が神経変性疾患に対する有効な薬剤もしくはそのリード化合物になりうることを示唆していた。

そこで、次に CA の神経変性抑制効果の機構について、分子生物学的なアプローチによる検討を行うこととした。

3—5. 引用文献

1. Ramalingam M, Kim SJ. Reactive oxygen/nitrogen species and their functional correlations in neurodegenerative diseases. *J Neural Transm.* 2012; Epub ahead of print.
2. Choi DW. Excitotoxic cell death. *J. Neurosci.* 1992; 23:1261-1276.
3. Hara MR, Snyder SH. Cell signaling and neuronal death. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2007; 47:117–141.
4. Bossy-Wetzel E, Schwarzenbacher R, Lipton SA. Molecular pathways to neurodegeneration. *Nat Med.* 2004; 10:S2-9.
5. Selkoe DJ. Alzheimer disease: mechanistic understanding predicts novel therapies. *Ann Intern Med.* 2004; 140: 627-638.
6. Johnson FO, Yuan Y, Hajela RK, Chitrakar A, Parsell DM, Atchison WD. Exposure to an environmental neurotoxicant hastens the onset of amyotrophic lateral sclerosis-like phenotype in human Cu²⁺/Zn²⁺ superoxide dismutase 1 G93A mice: glutamate-mediated excitotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011; 338(2):518-527.
7. Jones L, Hughes A. Pathogenic mechanisms in Huntington's disease. *Int Rev Neurobiol.* 2011; 98:373-418.
8. Prediger RD, Aguiar AS Jr, Moreira EL, Matheus FC, Castro AA, Walz R, De Bem AF, Latini A, Tasca CI, Farina M, Raisman-Vozari R. The intranasal administration of 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP): a new rodent model to test palliative and neuroprotective agents for Parkinson's disease. *Curr Pharm Des.* 2011; 17(5):489-507.
9. Murphy TH, Miyamoto M, Sastre A, Schnaar RL, Cole JT. Glutamate toxicity in a neuronal cell line involves inhibition of cysteine transport leading to oxidative stress. *Neuron* 1989; 2(6):1547-1558.
10. Murphy TH, Schnaar RL, Coyle JT. Immature cortical neurons are uniquely sensitive to glutamate toxicity by inhibition of cystine uptake. *FASEB J.* 1990; 4(6):1624-1633.
11. Dargusch R, Schubert D. Specificity of resistance to oxidative stress. *J Neurochem.* 2002; 81(6):1394-1400.

- 1 2 . Lee JM, Calkins MJ, Chan K., Kan YW, Johonson JA. Identification of the NF-E2-related factor-2-dependent genes conferring protection against oxidative stress in primary cortical astrocytes using oligonucleotide microarray analysis. *J Biol Chem.* 2003; 278:12029-12038.
- 1 3 . Rebrin I, Kamzalov S, Sohal RS. Effects of age and caloric restriction on glutathione redox state in mice. *Free Radical Biol Med.* 2003; 35(6):626-635.
- 1 4 . Schwarz K, Ternes WZ. Antioxidative constituents of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*. II. Isolation of carnosic acid and formation of other phenolic diterpenes. *Z Lebensm Unters Forsch.* 1992; 195(2):99-103.

－第4章－

カルノシン酸の生体防御機構活性化のメカニズム (その1)

－Keap1-Nrf2-EpRE 経路の活性化－

4－1. 序 論

ここまでの検討より、CAは神経細胞のEpRE転写活性を上昇させ、生体防御機構を活性化し、酸化ストレス抑制作用を発揮することが示された。そこで、本章では、CAの生体防御機構活性化のメカニズムの解明を目的として、EpREに結合する転写因子であるNrf2とその調節因子であるKeap1に着目し、特にKeap1に対するCAの反応に焦点をあてて研究を進めた。

第1章に記載したようにKeap1は、細胞質に局在化しており、Nrf2と結合しユビキチン化することにより分解を促しNrf2の核内移行を抑制している蛋白である。しかし、Keap1のセンサーとなるシステインが修飾されると、Nrf2分解作用は抑制され、結果的にNrf2量は増大し、核内に移行することによりEpREの活性化が起こる。すなわちKeap1はNrf2-EpRE経路の活性化の鍵を握っている因子といえる。Keap1にはシステインが、マウスやラットでは25個、ヒトでは27個存在している。これらのシステイン残基が、通常の生理的条件下（非ストレス下）においてフリーのチオールとして存在しているのか、ジスルフィド結合を形成しているのか、立体的にどのような配置で存在しているのか等についてはまだ不明な点が多い。しかしながらセンサーとしての役割を主に果たしているのは、反応性が高いBTB領域にあるC151とIVR領域にあるC273、C288であり、幾つかの親電子性物質が、チオール基のアクセプターとしてマイケル付加反応し、Keap1システイン残基を酸化的修飾することによってNrf2-EpREを活性化することが報告されている(1, 2)。

CA自体は親電子性物質ではないが、酸化されカテコール構造がキノン化したCAは α , β -不飽和ケトンの構造をとるため(3)、親電子性物質としてKeap1システイン残基とマイケル付加反応を起こし、それがNrf2経路の活性化を引き起こしている可能性が考えられた。

4－2．実験材料及び方法

■試薬

Fr.V 牛血清アルブミン (BSA) は Sigma-Aldrich より購入した。グルタチオン、N-エチルマレイミド (NEM) は和光純薬より入手した。抗 Nrf2 抗体及び抗 Keap1 抗体は伊東教授 (弘前大医) より供与していただいた。その他の抗体は、Calbiochem もしくは SantaCruz より購入した。2 次抗体は、FITC 標識抗マウス IgG 抗体もしくは HRP 標識抗 IgG 抗体を用いた (Sigma-Aldrich)。その他汎用試薬は Sigma-Aldrich もしくは和光純薬より購入した。

■細胞培養

COS-7 は、細胞バンクヒューマンサイエンス資源バンク (財団法人ヒューマンサイエンス振興財団) より入手した。培養は、DMEM (Sigma-Aldrich) に 10%FBS 及び抗生物質 (100 µg/mL ストレプトマイシン、100 units/mL ペニシリン : GIBCO) を添加した培地を増殖用及び試験用に用いた。その他の細胞培養は、第 2 章に記載の方法のとおりに実施した。

■レポーター遺伝子アッセイ

第2章と同様な方法で行った。

■ベクター

Nrf2 (wild-type: ドミナントネガティブと区別するため Nrf2WT と略す) 及び Nrf2 ドミナントネガティブ (Nrf2DN と略す) の発現ベクターの作成は、Alam 等の方法(4)に従って行った。Nrf2WT 用のインサート DNA は以下のプライマーを使用し PCR によって得た。マウス Nrf2WT : 5' - GCC ATG ATG GAC TTG GAG TTG CCA CCG CCA -3' (センス) / 5' - GTT TTT CTT TGT ATC TGG CTT CTT GCT TTT -3' (アンチセンス)。Nrf2DN は、Fig. 13 に示した様に Nrf2 の N 末側にある転写活性化に関わる領域を全て欠損させ、C 末端側にある核内移行シグナルと DNA 結合に関わる領域のみを残したものをを用いた。Nrf2DN 用のセンス用プライマーは、5' - GCC ATG GGT GAA TCC CAA TGT GAA AAT ACA -3' を用い、アンチセンス用プライマーは Nrf2WT と同じものをを用いて作成した。Keap1 発現用の pEF-Keap1 ベクターの作成には以下のプライマーを用いインサート DNA を作成した : 5' - ACC ATG CAG CCC GAA CCC AAG CTT AGC GGG -3' (センス) / 5' - AAG CAA ATT GAT CAA CAA AAC TGT

ACC TGC -3' (アンチセンス)。得られたインサートDNAは、pEF6-TOPO V5/His (Invitrogen) ヘマニュアルに従って挿入し、それぞれの発現ベクター (pEF-Nrf2WT、pEF-Nrf2DN、pEF-Keap1) を得た。コントロール用発現ベクターには何も挿入されていないpEF6 empty vector (pEF-EV) を用いた。ヘマグルチニン (HA) 標識Keap1発現ベクター (pcDNA-HA-Keap1WT) 及び HA標識欠損変異Keap1発現ベクター (pcDNA-HA- Δ BTB-Keap1, pcDNA-HA- Δ IVR-Keap1, pcDNA-HA- Δ IVR-Keap1) は、小林聡先生 (東北大学) より供与していただいた (Fig. 15)。

■ビオチン標識カルノシン酸の合成

CA (90 mg) をアセトニトリル (2 mL) に溶解し、ジシクロヘキシルカルボジイミド (67 mg) (東京化成工業) を添加し 3 分間氷上で反応させた。直ちに 80% アセトニトリルに溶解した 5-(ビオチンアミド)ペンチルアミン (41 mg) (Pierce) を加え、更に氷上で 10 分間反応させた。得られた反応物を中圧カラム液体クロマトグラフィー (ODS column consisting of ODS-S-50c; Yamazen) にかかけ、UV280 nm でモニターリングしながらビオチン標識 CA 分画を得た。展開溶媒には、アセトニトリル+1 mM 塩酸 (2 + 8) を用いた。分取したものを凍結乾燥器にかけてビオチン標識 CA を得た。得られたサンプルは、NMR (第 2 章に記載の方法による) にかけることによってビオチン標識 CA であることを確認した。

■システイン残基との結合実験

システインのチオール残基と結合するかどうかを確認するため、[1] システインを含むトリペプチドであるグルタチオン、[2] システインの還元型チオール残基を一つ有している蛋白質である牛血清アルブミン (BSA) との結合実験の 2 種類で検討した。

[1]:還元型グルタチオン (GSH, 18 mM) と CA (6 mM) をエタノール+PBS(-) pH7.4 (1 + 1) に溶解させた。エタノール混合 PBS(-)を使用したのは CA が PBS(-)には溶けにくいためである。37°Cにてインキュベートしながらタイムコースをおってサンプリングし、HPLC にて確認した (HPLC の条件は、溶離液が 30%B isocratic であることを除き第 3 章と同じ)。HPLC で検出された未知なピークを得るため、中圧分離カラム (ODS column ODS-S-50c; Yamazen) にかかけ分取した。分取したものをロータリーエバポレーターで濃縮し、更に完全に乾燥させるために凍結乾燥した。得られた白色粉末を第 2 章記載の方法で

MS 分析及び NMR 分析 (^1H -NMR、 ^{13}C -NMR、CH-COSY、HH-COSY、NOESY) にかき構造解析を行った。

[2]: ビオチン標識 CA (1-100 μM) 及び N-エチルマレイミド (NEM: 10-1000 μM) と BSA (1 mg/mL) を 23°C で 5 時間インキュベートし、SDS-PAGE にかけた。ビオチン標識 CA の検出は 2 次抗体の代わりに西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを用いた以外はウェスタンブロッティングに記載の方法と同様な方法で行った。また、同サンプルを同様な方法で SDS-PAGE かけた後、クマシーブリリアントブルー染色を行うことで BSA 蛋白の確認を行った。

■PCR

第2章及び3章と同様な方法で行った。

■免疫沈降

ビオチン標識 CA もしくは vehicle で処理した細胞を PBS(-) でリンスした後、RIPA 緩衝液 [150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.25% deoxycholic acid, 1 mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 50 mM NaF, 1 mM Na_3VO_4 , 50 μM MG132 (Calbiochem), protease inhibitors (Complete, Roch Diagnosis)] を添加した。そのライセートを超音波処理し 15000 rpm, 4°C, 10 分間遠心操作した。そのライセート上清にストレプトアビジン標識アガロースビーズを添加し 4°C で 1 時間インキュベートした。続いてリンスバッファー [150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.1% Nonidet P-40, 1 mM EDTA, 0.02% NaN_3] で洗ったものをウェスタンブロッティングのサンプルとして用いた。

■ウェスタンブロッティング (WB)

細胞のライセートに SDS-PAGE サンプルバッファー (Pierce) を添加し、SDS-PAGE にかけた。電気泳動後、Hybond-P PVDF メンブラン (Amersham Pharmacia) へ iBlot system (Invitrogen) を用いて転写した。続いて、転写されたメンブランを BlockAce (1X) (大日本住友製薬) で室温 1 時間ブロッキング処理を行った。0.1% Tween20 PBS(-) (PBS-T) でリンスした後、各種抗体を加え、室温 1 時間もしくは 4°C 一晩処理した。リンスした後、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識 2 次抗体で室温 1 時間処理し、ECL Western Blotting Detection Reagent (Amersham Pharmacia) を用いて検出を行った。

■細胞蛍光染色

第3章と基本的に同操作で行った。ただし、CAを24時間暴露した後、固定処理時にMG132 (50 μ M) を添加した。核染色にはDAPI (4',6-ジアミノ-2-フェニルインドール) を用いた。Nrf2の検出には抗Nrf2抗体及びFITC標識抗マウスIgG抗体を用いた。

4-3. 結 果

■Nrf2 ドミナントネガティブ及び Keap1 の影響

まず、CA の EpRE 転写活性化作用に Keap1-Nrf2 の経路が関与しているのかどうかを確かめるため、EpRE-ルシフェラーゼレポーター遺伝子と共に Nrf2DN もしくは Keap1 の発現ベクターを細胞に導入し、CA 誘導 EpRE 活性化作用に与える影響について検討を行った。Nrf2DN 及び Keap1 発現ベクター

(pEF-Nrf2DN、pEF-Keap1) の対照には何も挿入していないベクター

(pEF-EV) を用いた。その結果、CA による EpRE 転写活性化作用は、Nrf2DN もしくは Keap1 を過剰発現させることによって著しく抑制された。このことは、CA による EpRE 活性化作用に Nrf2 及び Keap1 が関与していることを示していた (Fig. 13)。

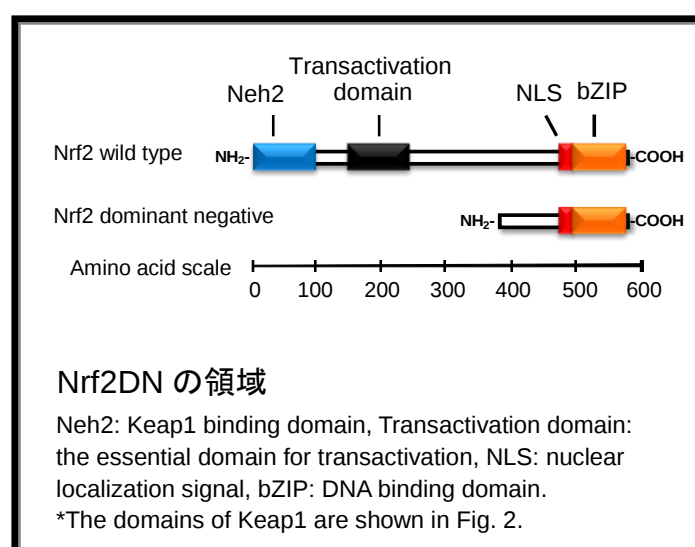
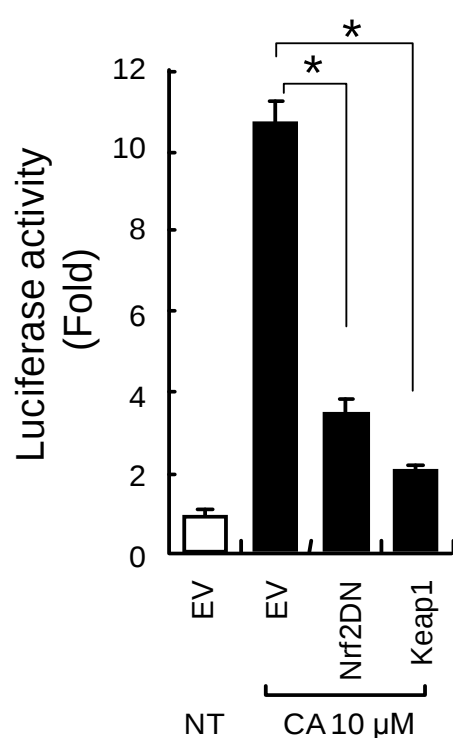


Fig. 13. カルノシン酸誘導 EpRE 活性化作用に対する Nrf2DN 及び Keap1 過剰発現の影響

PC12h cells were co-transfected with [EpRE reporter vector] and [empty vector (EV), Nrf2DN, or Keap1 expression vector]. After 24h 10 μM of CA was added to the cells. The luciferase activities were measured 24 later. The value of NT/EV was set as 1 and the relative values were presented. N=3, mean ± SD, *, $p < 0.03$

■カルノシン酸のシステインチオール結合作用

牛血清アルブミン (BSA) には還元型のチオール基 (システイン残基) が一つあることが知られており、Nrf2 活性化作用を有する親電子性物質が BSA と結合することが報告されている (5)。そこで BSA のチオール基と CA が結合するかどうかを確認するため、以下の実験を行った。まず、CA のカルボキシル基にビオチンを結合させたビオチン標識 CA を合成し、それを BSA と混合しインキュベートした。その後、ウェスタンブロッティング法によってビオチン標識 CA と BSA の結合体を検出した。また、チオール基の強力なアルキル化剤である N-エチルマレイミド (NEM) を添加することで反応が抑制される (ブロックされる) かどうかの検討を実施した。その結果、ビオチン標識 CA と BSA を混合したものは、クマシーブリリアントブルーで検出された BSA と同じ位置にアビジンと反応するバンドが検出された。また、NEM 濃度依存的にそのバンドは消失した (Fig. 14 A)。これらの結果は、CA が蛋白質のシステイン残基に結合することを示唆していた。

次に、CA が実際にシステイン残基と結合するのか、するとすればどのような形で結合するのかを確認するために、構造が単純なシステイン含有ペプチド (GSH) を用いて検討を行った。反応は、比較的細胞内の環境に近い条件、すなわち GSH 濃度 mM オーダー、pH7.4、37°C の条件で行った。CA と GSH を上記条件で反応させ、タイムコースを追ってサンプリングし HPLC で追跡したところ、徐々に生成される未知なピークが出現した (Fig. 14B)。18 時間後、添加した CA のうち 17.5 mol % 変換されていた。このピークを分離精製し、構造解析を実施した。その結果、[1] CA の ^1H -NMR で検出される 6.332 ppm のピーク (C(14) に結合している水素) が消失していた。その他の CA に帰属する水素は全て検出された。[2] ^{13}C -NMR で CA の C(14) に帰属するピークが 119.3 ppm から 147.1 ppm へと大きく低磁場にシフトしていた。他の CA 由来のピークに大きな変化は認められなかった。また、[3] 反応物を NOESY 解析したところ、C(15)–C(21)、C(15)–C(22)、C(17)–C(21)、C(17)–C(22) の水素の間に NOE シグナルが検出されたことより、立体構造上、これらの炭素に結合している水素が近接していることが示された。また、分子量は GSH と CA が共有結合した場合と同じ 637.8 であった。以上の結果とその他の 2D-NMR の分析結果は、CA と GSH を生理的な条件に近い状況で反応させて得られた反応産物が、CA の C(14) とシステインチオール基が共有結合した化合物であることを示していた (構造を Fig. 14B に示した)

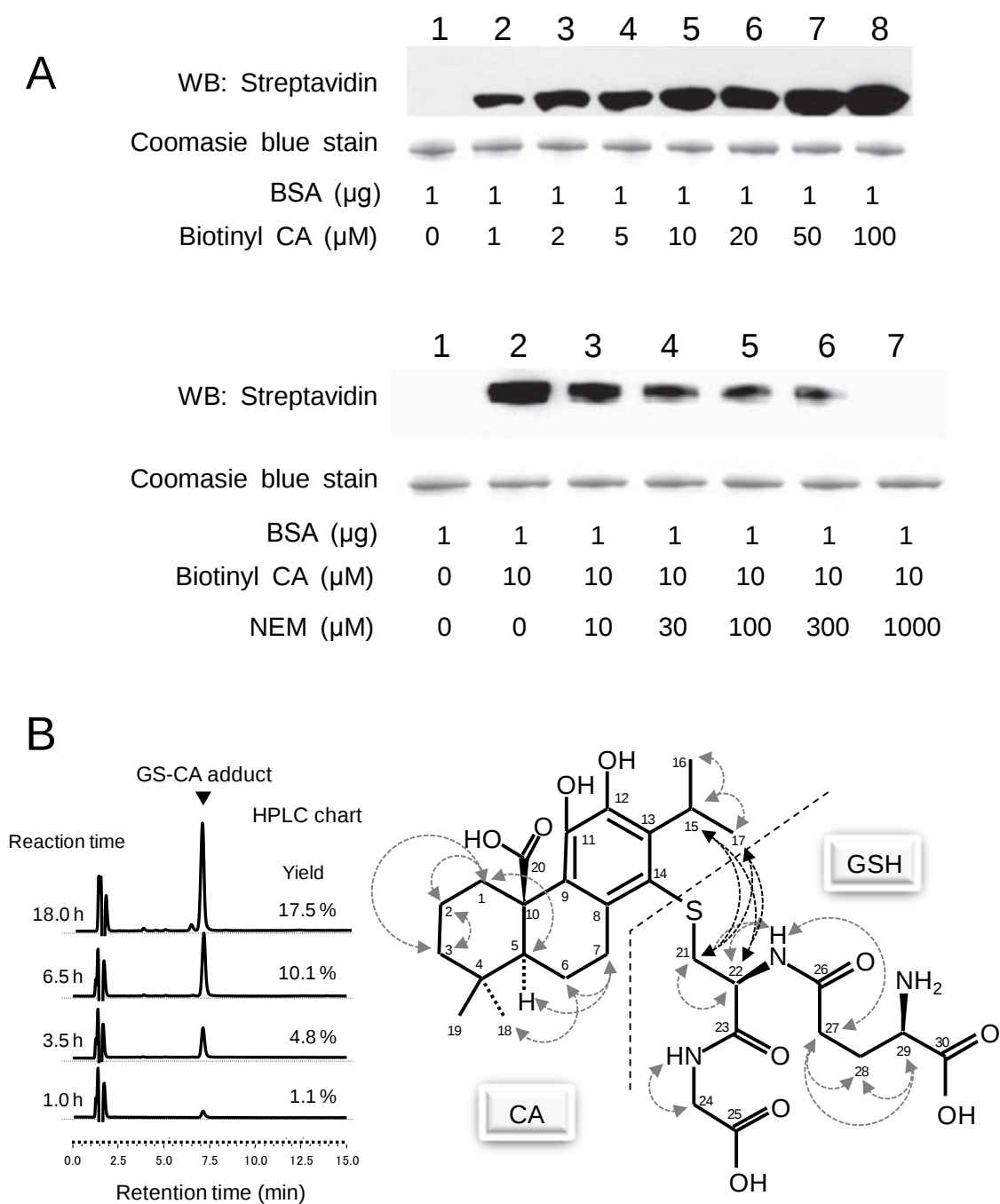


Fig. 14. カルノシン酸のシステイン-SH 残基に対するアルキル化作用

BSA (1 $\mu\text{g}/\text{lane}$) was incubated with various concentrations of biotinyl CA for 5 h at room temperature (r.t.). The obtained samples were subjected to WB (upper panel). BSA was preincubated with NEM for 30 min at r.t. Vehicle (lane 1) or biotinyl CA (lanes 2-7) was then added, and the samples were incubated for 5 h prior to WB (lower panel). A duplicate gel was stained with Coomassie brilliant blue (A). GSH and CA were incubated and slowly mixed in 50% ethanol-PBS(-), pH 7.4, at 37°C. GS-CA formation was then quantified by HPLC. The chemical structure of the GS-CA adduct was confirmed by ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, and nuclear overhauser effect (NOE) analysis. NOE signals were indicated by arrows (B)

■カルノシン酸の Keap1 への結合

少なくとも、システインのチオール基と CA は試験管実験では結合することが示された。では、実際に CA は Keap1 と細胞内で結合しうるのでしょうか。この疑問を解決するために、CA を追跡できるようビオチン標識 CA を用いて検討を行った。

本実験系では、Keap1 の検出感度が悪かったため、Keap1 発現ベクター

(pEF-Keap1) をトランスフェクションし Keap1 を大量発現させた PC12h 細胞を用いることにした。Keap1 発現ベクタートランスフェクション 24 時間後にビオチン標識 CA を細胞に添加した。更に 24 時間培養した後に細胞のライセートを調製し、免疫沈降法 (IP) によってアビジンと結合するもの、すなわちビオチン標識化合物を回収し、それをウェスタンブロッティング法によって分析した。検出には抗 Keap1 抗体を使用した。その結果、ビオチン標識 CA を添加した細胞の場合のみ抗 Keap1 抗体によって明瞭なバンドが検出された (Fig. 15A)。この結果は、CA が細胞内で Keap1 に結合することを強く示唆していた。

次に、CA の Keap1 結合領域の特定をすることを目的として実験を行った。マウスやラットの Keap1 には 25 個のシステイン (ヒトでは 27 個) があることが知られているが、N 末端領域、C 末端領域の間にその特徴から BTB、IVR、DGR と呼ばれる 3 つの領域がある (Fig. 15B)。そのうち BTB と IVR 領域にあるシステインのチオール基 (BTB : C151、IVR : C273、C288 [Fig. 15B 赤字で表示]) がレドックスセンサーとして重要な役割を果たしており、それらが酸化修飾されることでコンフォメーション変化が起こり Nrf2 の分解が抑制されることが報告されている (6)。そこで、BTB、IVR、DGR 領域それぞれを欠損させたヘマグルチニン (HA) 標識 Keap1 発現ベクター (Fig. 15B) を用い、結合領域の特定を試みた (Fig. 15C)。細胞にそれぞれのベクターを導入した後、ビオチン標識 CA で処理し、その細胞のライセートを調製、アビジン標識ビーズを用いて IP (免疫沈降法) を行った。そのサンプルをウェスタンブロッティングにかけ、抗 HA 抗体で検出した。その結果、HA-Keap1WT 発現ベクターを導入した細胞では明瞭なバンドが検出されたのに対し、BTB 欠損 Keap1 発現ベクター導入細胞ではバンドがほぼ消失していた。IVR 欠損 Keap1 発現ベクター導入細胞でも僅かながら減少がみとめられた。DGR 欠損 Keap1 発現ベクター導入細胞では減少は認められなかった。

CA がシステインペプチドのチオール基に結合したこと (Fig. 14B)、及び CA は Keap1WT に結合したが、その結合能は BTB 領域を欠損することによって著

しく減弱したこと (Fig. 15C)、これらの結果は、CA が BTB 領域のシステインに選択的に結合することを示唆していた。

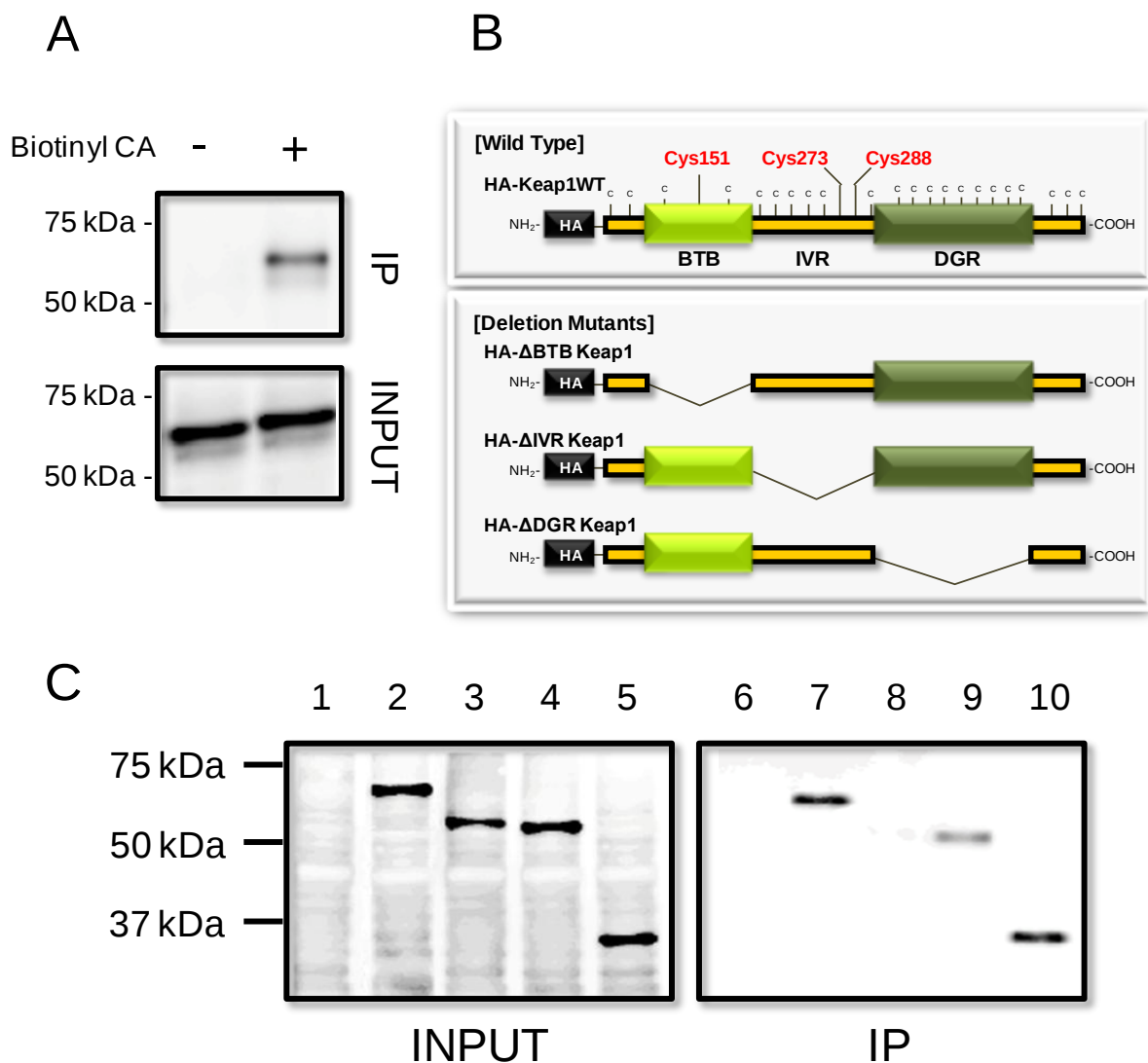


Fig. 15. カルノシン酸の Keap1-BTB 領域への選択的結合

Biotinyl CA was added to PC12h cells. After 24 h the cells were harvested and then the lysates were subjected to IP with strept avidin beads. The streptavidin-binding IP samples were subjected to WB using anti-Keap1 antibody. CAB: byotinyl CA, INPUT: no IP treatment (A). The structure of mouse Keap1 wild Type and deletion mutant Keap1 with HA Tag (B). Biotinyl CA was added to COS-7 cells transfected with wild type or deletion mutant Keap1 expression vector. The cells were lysed 24h later and then the lysates were subjected to IP with streptavidin beads and WB using anti-HA antibody. IP: immunoprecipitation, INPUT: no IP treatment, Lane 1, 6: empty vector, Lane2, 7: HA-Keap1WT, Lane3, 8: HA- ΔBTB Keap1, Lane 4, 9: HA-ΔIVR Keap1, Lane 5, 10: HA-ΔDGR Keap1 (C)

■カルノシン酸の Nrf2 核内移行作用

Keap1 は細胞質にあるアクチンファイバーに結合しているため、Nrf2 は通常の状態では Keap1 にトラップされ細胞質に局在化する (7)。しかし、ROS や親電子性物質により Keap1 が修飾されると、Nrf2 は Keap1 による分解を受けなくなり、核内に移行集積するようになる。そこで、CA 処理によって Nrf2 が核内に移行するかどうかを確かめるため試験を行った。Nrf2 の分布を確認するため、固定した細胞を抗 Nrf2 抗体で処理した後、蛍光標識 2 次抗体 (緑) 及び DAPI (核染色：青) を用いて細胞染色をした (Fig. 16)。未処理の場合、緑の蛍光は細胞質に局在していたが、CA 処理により核内に集積されることが確認された。以上の結果は、CA は Keap1 のシステインを修飾することによって Nrf2 の核内移行を誘導し、Nrf2-EpRE の経路の活性化を介して第 2 相酵素群の発現を促進、生体防御機構を誘導することを示していた。

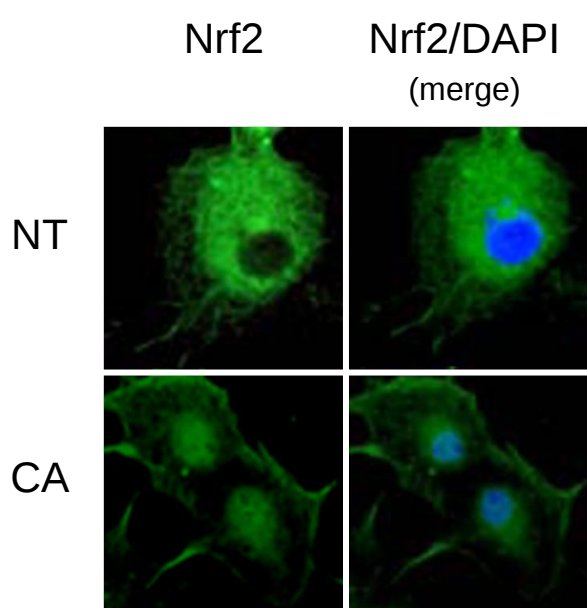


Fig. 16. カルノシン酸の Nrf2 核内移行集積効果

COS-7 cells were either not treated (NT) or treated with CA for 24 h and then stained with anti-Nrf2 antibody (green) and 4', 6-diamino-2-phenylindole (blue)

4-4. 考 察

Keap1 及び Nrf2DN の過剰発現によって CA の EpRE 活性化作用が抑制されたことから Keap1-Nrf2-EpRE 経路を CA は活性化していることが示唆された (Fig. 13)。更に [1] CA はシステイン残基と共有結合する作用を有していた (Fig. 14)。[2] Keap1 には BTB, IVR, DGR それぞれの領域にシステインが存在するが (Fig. 2, 15)、BTB 及び IVR 領域 (主に BTB 領域) に選択的に結合することが欠損変異 Keap1 を用いた実験の結果から示唆された (Fig. 15B,C)。これらの結果から、CA は Keap1-BTB システイン残基のチオールを修飾することにより、Keap1-Nrf2-EpRE 経路の活性化を引き起こすと考えられた。これまでに親電子性物質による Nrf2 活性化は、主に Keap1 の C151 (BTB 領域) を修飾することによって起こることが示されている(8-11)。これらの知見と今回得られた結果をあわせて鑑みれば、CA も他の親電子性物質同様に Keap1-C151 を修飾すると思われる。しかしながら、それを明確にするためには、例えば Keap1 の C151 をセリンに変えた変異体を用いての実験などでの検証が必要である。

CA とチオール基が共有結合する機構については、以下のように考えられる：まず、CA が酸化されキノンになると (CA キノン)、 α, β -不飽和ケトンの形をとるため親電子性物質となる。CA キノンは、マイケル付加反応のアクセプターとして働き、CA キノンの C(14) (*) がチオール基の求核攻撃を受けシステインと共有結合する (Fig. 17)。

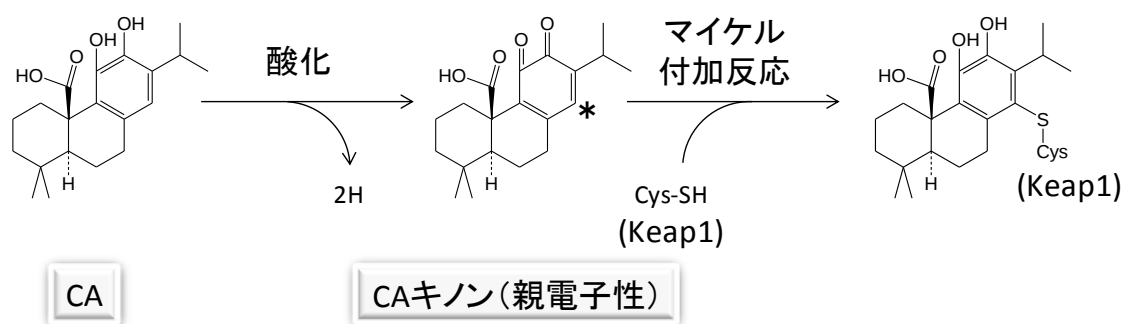


Fig. 17. カルノシン酸とシステイン-SH との反応機構(推定)

以上のことから、以下の仮説が考えられた：[1] 酸化ストレスが高い状態にあるとき、CAは直接酸化されることによってROSをスカベンジし、酸化ストレスを軽減する。この時CAはキノン化される。[2] 次に、Keap1の特にBTB領域のチオール基(C151)が、キノン化したCAにアタックしKeap1-CA付加体が形成される。CAが付加することによってKeap1ホモダイマーのコンフォメーション変化が生じ、Keap1のNrf2をトラップする能力が失われ、Keap1を介したユビキチン-プロテアソーム分解経路からNrf2は逃れる。Nrf2は恒常的に発現しているため、結果的にNrf2量の増大が起こる。Nrf2はリン酸化を受け核内へ移行、続いて第2相酵素の遺伝子発現誘導が起こる。第2相酵素は、酸化ストレス軽減など生体防御の働きを果たす。つまり、CAは[1]と[2]の2段階の仕組みによって細胞を酸化ストレスから守っている可能性がある。[1]は速やかに起こり、[2]の遺伝子発現を伴う酵素的な反応は少し遅れるが持続的に起こると考えられる。事実、培養条件下では培地中のCAは24時間以内に消失したが、酵素誘導は24時間以上持続していた(Fig. 7)。酸化ストレスが高い場所ほどCAはキノン化し親電子性物質になりやすいと考えられるため、酸化ストレスを受けやすい病巣部において、CAはより強くKeap1-Nrf2-EpRE経路を活性化し持続的な生体防御機構を発揮しうるのかもしれない。

ROSによるNrf2-EpREの活性化作用は、通常、親電子性物質よりも弱いことが示唆されている(12)。また、非常に強い親電子性物質、例えばNEMの場合、Keap1に結合しながら、むしろNrf2活性を抑制することがあることも知られている。その要因として、選択性が低く、Nrf2のシステイン残基を修飾することによって不活性化してしまうことが示されている(13, 14)。細胞はKeap1-Nrf2-EpREを介した生体防御機構によって細胞内部を高い還元状態に保ち、常に酸化ストレスに備えている。しかし、大量のROSや強力な親電子性物質に晒された場合、活性が非常に高いがゆえに選択性が低くあらゆるものを酸化修飾してしまうため毒性が出やすく、Nrf2の活性化が起こりにくいのかもしれない。

一方、CAはローズマリーに最も多く含まれているポリフェノールである。ローズマリーは古くからスパイスとして用いられてきたハーブであり、長い食経験があることから、CAの毒性は低いと思われる。実際CAを投与したマウスに毒性は認められていない。従って、CAのようなポリフェノールの場合、おそらく酸化されて親電子性物質になってもその親電子性はそれほど強くでないため、

感受性の高いセンサーとして働くシステイン残基 (Keap1-C151 等) に対して選択的に結合し、毒性が出にくいのかかもしれない。また、Nrf2 によって誘導される解毒酵素 (例えばキノンリダクターゼ等) が毒性軽減に寄与している可能性も考えられるが、更なる検討が必要である。

PC12h 細胞に対し、CA は他のポリフェノールや親電子性物質に比して極めて強い EpRE 転写活性化作用を示した。しかし、他の細胞に対しては、それほど強い EpRE 活性化作用は示さなかった (Fig. 6, 8)。このことから、おそらく CA/CA キノンは、PC12h 細胞に対しては Keap1 以外にも作用することによって、Nrf2-EpRE の活性化を誘導している可能性があると思われた。この機構を解明することができれば、有効性の高い薬剤の開発につながるかもしれない。

4－5. 引用文献

- 1 . Itoh K. Protective mechanism against oxidative stress by Keap1/Nrf2 pathway. *Seikagaku*. 2006; 78(2):79-92.
- 2 . Holland R, Fishbein JC. Chemistry of the cysteine sensors in Kelch-like ECH-associated protein 1. *Antioxid Redox Signal*. 2010; 13(11):1749-1761.
- 3 . Schwarz K, Ternes WZ. Antioxidative constituents of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*. II. Isolation of carnosic acid and formation of other phenolic diterpenes. *Z Lebensm Unters Forsch*. 1992; 195(2):99-103.
- 4 . Alam J, Stewart D, Touchard C, Boinapally S, Choi AM, Cook JL. Nrf2, a cap'n'collar transcription factor, regulates induction of the heme oxygenase-1 gene. *J Biol Chem*. 1999; 274:26071-26078.
- 5 . Satoh T, Okamoto S, Cui J, Watanabe Y, Furuta K, Suzuki M, Tohyama K, Lipton SA. Activation of the Keap1/Nrf2 pathway for neuroprotection by electrophilic phase II Inducers. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 103(3):768-773.
- 6 . Yamamoto T, Suzuki T, Kobayashi A, Wakabayashi J, Maher J, Motohashi H, Yamamoto M. Physiological significance of reactive cysteine residues of Keap1 in determining Nrf2 activity. *Mol Cell Biol*. 2008; 28(8):2758-2770.
- 7 . Tkachev VO, Menshchikova EB, Zenkov NK. Mechanism of the Nrf2/Keap1/ARE signaling system. *Biochemistry*. 2011; 76(4):407-422.
- 8 . Rachakonda G, Xiong Y, Sekhar KR, Stamer SL, Liebler DC, Freeman ML. Covalent modification at Cys151 dissociates the electrophile sensor Keap1 from the ubiquitin ligase CUL3. *Chem Res Toxicol*. 2008; 21:705-710.
- 9 . Zheng XH, Watts GS, Vaught S, Gandolfi AJ. Low-level arsenite induced gene expression in HEK293 cells. *Toxicol*. 2003; 187:39-48.
- 1 0 . Levonen AL, Landar A, Ramachandran A, Ceaser EK, Dickinson DA, Zanoni G, Morrow JD, Darley-Usmar VM. Cellular mechanisms of redox cell signalling: role of cysteine modification in controlling

antioxidant defences in response to electrophilic lipid oxidation products. *Biochem J.* 2004; 378:373-382.

- 1 1 . Wakabayashi N, Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD, Kang MI, Kobayashi A, Yamamoto M, Kensler TW, Talalay P. Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101:2040-2045.
- 1 2 . Prester T, Holtzclaw WD, Zhang Y, Talalay P. Chemical and molecular regulation of enzymes that detoxify carcinogens. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90:2965-2969.
- 1 3 . Holland R, Fishbein JC. Chemistry of the cysteine sensors in Kelch-like ECH-associated protein 1. *Antioxidants & Redox Signaling.* 2010; 13(11):1-13.
- 1 4 . Bloom D, Dhakshinamoorthy S, Jaiswal AK. Site-directed mutagenesis of cysteine to serine in the DNA binding region of Nrf2 decreases its capacity to upregulate antioxidant response element-mediated expression and antioxidant induction of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene. *Oncogene.* 2002; 21:191-2200.

－第 5 章－

カルノシン酸の神経分化誘導効果と 生体防御機構活性化のメカニズム (その 2)

－Nrf2 及びキナーゼ活性化を介した神経分化誘導と生体防御機構の活性化－

5－1. 序 論

神経細胞は、神経突起を伸長させ、その神経突起の先端部分でシナプスを形成し、細胞間で情報伝達を行っている。これによって記憶形成や筋肉を動かす等の重要な神経機能が発揮される**(1)**。近年、神経機能や神経系の生体防御機構にとって重要な役割を果たす因子「ニューロトロフィン」が見出された**(2)**。ニューロトロフィンは、神経成長因子 (NGF) 関連遺伝子ファミリーの総称であり、NGF、BDNF、NT-3、NT-4/5 が知られている。神経細胞の生存維持、分化および機能発現にとってニューロトロフィンは必須の因子であり、神経細胞に対して神経突起伸長誘導作用や抗酸化酵素誘導作用、アポトーシス抑制作用等を発揮する。また、神経変性に対して抑制作用を発揮することから、神経変性疾患の治療への応用が期待されている。しかしながら、ニューロトロフィンはペプチドであり末梢投与では血液-脳関門を通過することができないため、末梢投与によって脳内に到達しニューロトロフィン様作用を発揮する薬剤の開発が望まれている。

ニューロトロフィンは神経細胞表面にあるニューロトロフィン受容体 (TrkA、B、C 等) に結合して作用する。NGF の場合、TrkA に結合し、TrkA の自己リン酸化をひき起こし、更に Erk1/2 や PI3K など様々なキナーゼの活性化を促す**(3)**。TrkA は、NGF が結合すると細胞内へと移行しシグナル伝達を起こす。NGF は p62/ZIP という足場蛋白の発現を誘導することが知られていたが**(4)**、最近、神経系細胞株 PC12 及び HiB5 において、p62/ZIP 量と NGF 作用との間に相関性があることが報告され**(5-8)**、p62/ZIP が TrkA の細胞内への移行のトリIGGERとして重要な役割を果たしていることが見出された (Fig. 3) **(9, 10)**。また、ニューロトロフィンが枯渇すると神経変性が起こることが知られているが、p62/ZIP ノックアウトマウスは、AD 様の症状を示すことが報告されている**(11)**。

一方、Nrf2 によって p62/ZIP の発現が誘導されることが、マクロファージ細胞株 RAW264.7 を用いた実験で報告されていたものの(12)、神経系細胞において p62/ZIP の発現が Nrf2 の制御下にあるかどうかは不明であった。

PC12 系の細胞は、TrkA を発現しており NGF に応答して神経突起を伸長するという特性を有した細胞であるため、NGF/TrkA の作用機構に関する研究にしばしば用いられる。興味深いことに Nrf2 活性化作用を有するポリフェノールや親電子性物質の中には、“微量の NGF 存在下”、PC12 の神経突起伸長を促進させる作用、すなわち NGF 様作用があることが報告されているものがある(13-16)。しかしながら、Nrf2 と NGF 作用との関連性に関する報告は存在していなかった。そこで、CA にも NGF 様作用はあるのか、あるとすれば Nrf2 や p62/ZIP が関わっているのではないかという仮説をたて、PC12h を用いて研究をすすめた。

5-2. 実験材料及び方法

■試薬

NGFβ は R&D systems より購入した。LY294002、U0126、K252a 及び MG132 は Calbiochem より入手した。その他の主な試薬は Sigma-Aldrich より入手した。

■分化・神経突起伸長細胞の観察及び突起伸長細胞の割合の測定

PC12h 細胞は、第 2 章と同様な方法で培養した。細胞播種 48 時間後に CA もしくは NGF-β を培地に添加し、記載の時間培養した後、最低 200 個の細胞の状態を観察した。細胞体の直径（不定形の場合は短い方）よりも長い神経突起を一本以上出している場合は、神経突起が伸長している細胞 (neurite-bearing cell) と判別しカウントした。細胞の撮影は位相差顕微鏡 (Eclipse TE-2000E NIKON) により行った。トランスフェクションをする場合は、細胞播種 24 時間後にトランスフェクション操作を実施し、その 24 時間後に被検体を添加して観察を行った。

■プラスミド及び安定発現株樹立

pGL-hNQO-1 promoter-luciferase プラスミドベクターの作成を以下の方法により得た。人の NQO-1 構造遺伝子上流プロモーター領域のうち EpRE までの部分を PCR により増幅した。PCR では以下のプライマーを使用した： 5'-GGA CGC GTG CAG TCA CAG TGA CTC AGC AGA -3' (wild type 用 センスプライマー)、5'- GGA CGC GTG CAG TCA aAG TGc CTa AGC AGA ATC -3'

(mutant EpRE 用センスプライマー[小文字は変異を入れた部分を示す])(17)、5'- GGAAGC TTT TTA TAT ATC CTG TCC GGC CCG -3' (アンチセンス) (共通)。本 PCR プロダクトにはそれぞれ *Mlu*I 及び *Hind*III (下線で示した) 制限酵素サイトを含んでおり、マニュアルに従い、pGL3-basic vector (プロメガ) のマルチクローニングサイトに挿入し pGL3-hNQO-1 promoter-luciferase (wild type もしくは mutant) を得た。

PC12h 細胞の cDNA から p62/ZIP 発現ベクターを作成するために p62/ZIP の構造遺伝子部分を以下のプライマーを用いて得た。5'- CCG CCA TGG CTT CGC TCA CGG TGAAG -3' (センス) /5'- CAA TGG TGG AGG GTG CTT TGAATA C -3' (アンチセンス)。PCR により増幅した DNA をマニュアルに従い

pEF6-V5-His TOPO ベクター (Invitrogen) に挿入し、pEF-p62/ZIP (p62/ZIP

発現ベクター) を得た。

p62/ZIP 特異的ノックダウン用 micro RNA 発現ベクター (pcDNA-p62miR) を得るため、BLOCK-iT Pol II RNAi Expression Vector kit, Gate Way System (Invitrogen) を使用した。以下の一本鎖 DNA : 5'- **TGC** TGA TAA TTC TTG GTC TGT AGG AGG TTT TGG CCA CTG ACT GAC CTC CTA CAC CAA GAA TTA T -3' (ZIPmiR 用 top strand) 及び 5'- **CCT** GAT AAT TCT TGG TGT AGG AGG TCA GTC AGT GGC CAAAC CTC CTA CAG ACC AAG AAT TAT C -3' (ZIPmiR 用 bottom strand) (**太字**は本キット Gate Way (GW) システムの突出末端) をアニーリングし dsDNA とした後、マニュアルに従って pcDNA6.2-GW-miR ベクターに挿入しクローニングを行った。得られた ZIPmiR 発現ベクターは Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いてトランスフェクションし、ブラストシジン (30 µg/mL) に 2 週間暴露 (2 日おきに培地交換) することによって ZIPmiR 安定発現株を樹立した。

Lipofectamine 2000 を用い第 4 章記載の pEF-Nrf2WT、pEF-Nrf2DN、pEF-Keap1 ベクターを PC12h 細胞へトランスフェクションし、8% FBS + 8% HS DMEM にブラストシジン 30 µg/mL を添加した培地で 2 週間培養を続け (2 日おきに培地交換)、それぞれ Nrf2WT、Nrf2DN、Keap1 の安定発現株 PC12Nrf2WT、PC12Nrf2DN、PC12Keap1 細胞を樹立した。

■ルシフェラーゼアッセイ

本章の実験では、レポーター遺伝子を pGL3-hNQO-1 promoter-luciferase (wild type もしくは mutant) を用いたこと以外は、第 2 章と同じ方法によって行った。

■Small interfering RNA (siRNA)

Stealth siRNA を Invitrogen に合成依頼することによって以下配列のラット Nrf2 特異的 siRNA を得た : 5'- GGG CUG UGA UCU GUC CCU GUG UAA A -3'。非特異的コントロール stealth siRNA (ネガティブコントロール : NC) は Invitrogen より購入したものを用了。siRNA のトランスフェクションは、Lipofectamine2000 を用いマニュアルに従って実施した。

■定量性 PCR (q-PCR)

cDNA の調製は、第 2 章記載の方法と同様な方法で行った。得られた cDNA に 50 pmol のプライマーを添加し最終量が 20 µL になるよう RT-PCR 用バッファ

ー (SYBR Premix EX Taq, TAKARA [Taq, SYBRGreen を含む]) を添加した。プライマーには以下のものを用いた：ラットニューロフィラメント-M (NF-M) : 5'-AGG AGA AAG GGG TGG TCA CT -3' (センス) / 5'- CCT CAA AGG TCT CCT CAT GC -3' (アンチセンス)、ラット Egr-1 : 5'- CCT GTG ACA TTT GTG GGA GA -3' (センス) / 5'- GTG CAG GAG ACG GGT AGG TA -3' (アンチセンス)、ラット MafK : 5'- AAG TGA GTT TTC TGT CTT GTT -3' (センス) / 5'- CAA AGA TAC AAA AGC AGT CAC GG -3' (アンチセンス)、ラット p62/ZIP : 5'- TTG GCC ACC TCT CTG ATA GC -3' (センス) / 5'- GGT TTG CTG ACT TCC GAA G -3' (アンチセンス)、ラットシクロフィリン A : 5'- ACA GGT CCT GGC ATC TTG TC -3' (センス) / 5'- TTC ACC TTC CCA AAG ACC AC -3' (アンチセンス)、ラット β -アクチン : 5'- GTC GTA CCA CTG GCA TTG TG -3' (センス) / 5'- CTC TCA GCT GTG GTG GTG AA-3' (アンチセンス)。測定機器は、Chromo 4 Real Time-PCR analysis system (Bio-Rad) を用いた。PCR 条件は、94°C (1 分間)、続いて [94°C (15 秒間)、60°C (1 分間)、72°C (1 分間)] を 40 サイクル行った。それぞれの遺伝子発現レベルは、2 回ずつ測定し、その平均値でデータは示した。インターナルスタンダードにはシクロフィリン A を用い発現レベルの補正をした。

■NGF の RT-PCR

PC12h 細胞は、第 2 章記載の方法と同じ方法で培養した。PC12h 細胞に CA を添加し、24 時間培養した後、TRIzol (Invitrogen) を用いて RNA を回収、先に記載の方法で cDNA を作成し、RT-PCR を実施した。陽性対照としてラット (8 週齢、雄) の脳をホモジナイズした後、TRIzol により抽出した RNA を用いた。プライマーは以下のものを使用した：ラット *ngf* : 5'- CAA CAG GAC TCA CAG GAG CA - 3' (センス) / 5'- CAC ACA CGC AGG CTG TAT CT -3' (アンチセンス)。ラット β -アクチン : 5'- GAT CAT TGC TCC TCC TGA GC -3' (センス) / 5'- CAC CTT CAC CGT TCC AGT TT -3' (アンチセンス)。T98G 細胞は、96 ウェルプレートに 2×10^4 個ずつ播種した。培地は、Eagle's minimum essential medium (MEM) に FBS (10%) , ピルビン酸ナトリウム (1 X) 及び非必須アミノ酸 (1 X) (GIBCO) を添加したものを用いた。3 日間培養した後、Opti-MEM 培地 (GIBCO) (BSA 5 mg/mL 含有) に交換し 6 日間培養した。培地交換は 3 日置きに行った。その後 CA を添加し 24 時間培養した後、上記の方法で RNA を回収し RT-PCR を行った。プライマーは以下のものを用いた：ヒト *NGF* 用のプライマーは Promega 社より購入した。ヒト β -アクチン : 5'-

GAT CAT TGC TCC TCC TGA GC -3' (センス) / 5'- CAC CTT CAC CGT TCC AGT TT -3' (アンチセンス)。

■細胞毒性試験

PC12h、PC12Nrf2WT もしくは P12Nrf2DN を 96 ウェルコラーゲンコーティングプレート (IWAKI) に播種し (培地: 1%FBS + 1%HS 配合 DMEM 培地)、24 時間培養した後にグルタミン酸 1-5 mM を添加した。20 時間後に細胞のバイアビリティを MTT アッセイキット (Roche Diagnosis) によって測定した。

5-3. 結果及び考察

■カルノシン酸による神経突起伸長誘導効果

PC12h 細胞に CA を添加し培養したところ、NGF 無添加の条件で、濃度依存的に神経突起の伸長が誘導された (Fig. 18)。

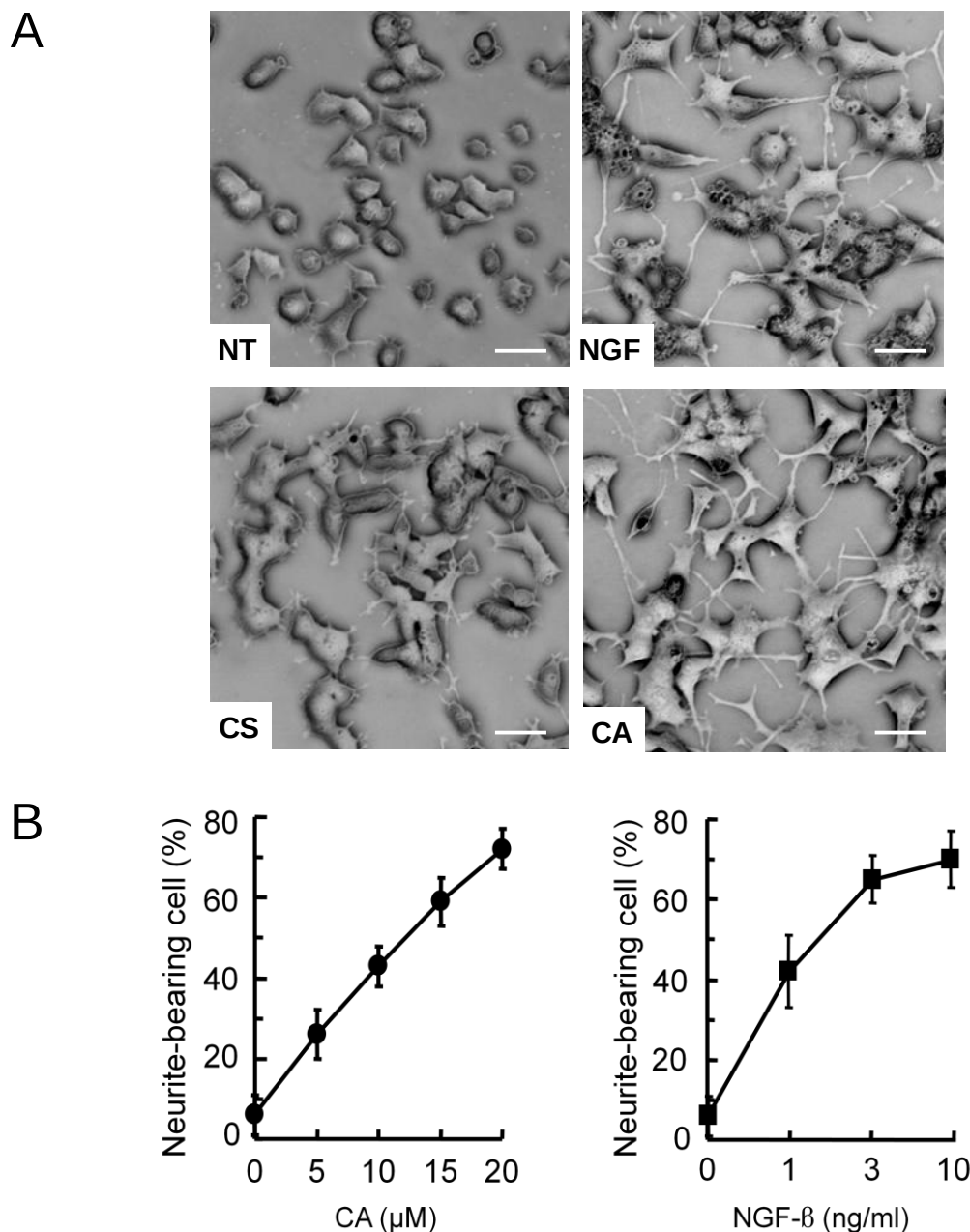


Fig. 18. カルノシン酸の PC12h 細胞神経突起伸長効果

PC12h cells were seeded onto 24-well collagen-coated plates at a density of 10^5 cells per well in DMEM supplemented with 1% FBS and 1% HS (low-sera medium) and cultured for 2 days. Then cells were treated with CA, CS or rat NGF-b for 24 h at the indicated concentrations, followed by observation of the cell morphologies by microscopy. Scale bar, 25 μ m (A). The cells that have neurites after treatments are counted and the means of three independent experiments are shown with SEM (B).

濃度依存的な突起伸長作用をみたところ、NGFの場合、3 ng/mLでその効果はプラトーに達したのに対し、CAの場合15 μ Mでほぼ同レベルの神経突起伸長誘導効果を発揮した。CA 15 μ Mまでは細胞の生存率に影響は認められなかったが、20 μ Mでは僅かながら毒性が認められたため、本章の実験は、断りが無い限りCA 15 μ Mで実施した。神経突起の伸長は、ローズマリーの成分であるカルノソール (CS) でも認められたが、その効果はCAに比して明らかに弱いものであった。

■カルノシン酸の Nrf2 を介した NGF 様作用

第2-4章の実験ではマウスの GSTY α 遺伝子の EpRE コア領域を用いたレポーター遺伝子アッセイを用いて実験してきたが、本章では、ヒト NQO-1 のプロモーター領域 (EpRE を含む) 及びその EpRE 配列に変異を入れたものを用いて再検証を行った。また NGF が Nrf2-EpRE 系に作用するという報告は無いが、NGF も同時に検討を行ってみた。その結果、CA は濃度依存的に NQO-1 プロモーター活性を強く誘導した (Fig. 19A)。この活性は、NQO-1 の EpRE に変異を入れたレポーター遺伝子 (mutanat) では認められなかったことから EpRE 依存적であることが示された (Fig. 19B)。これらの活性はほぼ GSTY α の EpRE コア領域を用いた結果と同等であった (Fig. 6、第2章)。興味深いことに、CAよりは低いものの、NGF も濃度依存的に EpRE を強力に活性化することを見出した (Fig. 19A)。

PC12系の細胞 (PC12hはPC12細胞の垂株のひとつ) は、NGFに依存して遺伝子発現を起こし分化するという特性を有していることから、NGFシグナル機構の解析にしばしば用いられる。NGF添加によって神経突起を伸長させるという特性をもち、この細胞株の神経突起の伸長と神経分化マーカー発現の間には強い相関性があることが知られている(18-20)。実際、Fig. 19 C, Dに示したように、NGF及びCAで処理したPC12h細胞では、神経分化マーカーであるNF-M及びNF-Hの蛋白レベルが時間依存的に増大し、特にNF-Mの変動が顕著であった。神経分化マーカー増大には、量・時間共にCAとNGFの間で大きな差は認められなかった。一方、CA及びNGFで処理した細胞でNrf2蛋白レベルが上昇したが、この効果は、NGFに比べCAほうが顕著に高かった。

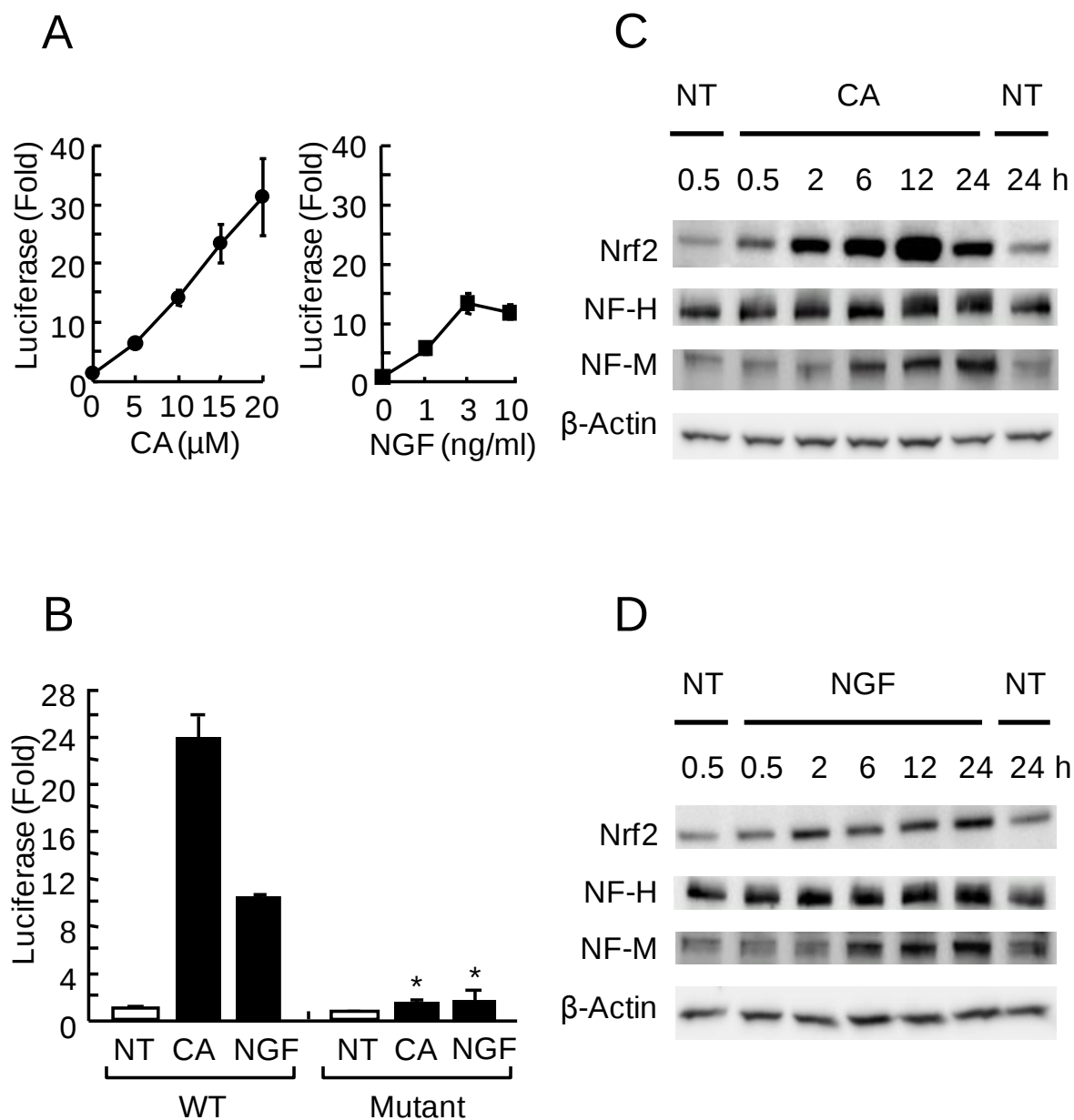


Fig. 19. カルノシン酸／NGF による PC12h の Nrf2-EpRE 活性化作用及び分化誘導作用

Cells were treated with CA or NGF at the indicated concentrations for 24 h and then performed luciferase assay (A). CA (15 μ M) or NGF (10 ng/ml) was added to the PC12h cells transfected with wild-type NQO-1 promoter-luciferase or mutant EpRE promoter-luciferase construct (B). Cells were treated with CA or NGF for 24 h prior to luciferase assay. (C and D) PC12h cells were treated with 15 μ M of CA (C) or 10 ng/ml of NGF (D) for 0.5-24 h, and total cell lysates were then prepared. The lysates were subjected to WB analysis using anti-Nrf2, anti-NF-H, anti-NF-M or anti-b-actin. NT: non-treatment. * p <0.03.

CA によって NF-M 及び Nrf2 蛋白が誘導される時間を比較すると、Nrf2 レベル増大のほう为数時間早かったが、タイムコースに相関性があるように思われた (Fig. 19C)。そこで、PC12h 神経分化に Nrf2 が関与しているのではないかと、この仮説をたて実験をすすめることとした。

まず、Nrf2 を siRNA によりノックダウンすることによって、CA 及び NGF により誘導される PC12h 細胞の分化に影響がでるかどうかが試験した。その結果、CA の場合も NGF の場合も、神経突起の伸長 (Fig. 20A) 及び神経分化マーカー発現 (NF-M, NF-H, MAP2) (Fig. 20B) は、Nrf2 ノックダウンによって抑制された。本結果は、Nrf2 が神経分化に重要な役割を果たしていることを示していた。

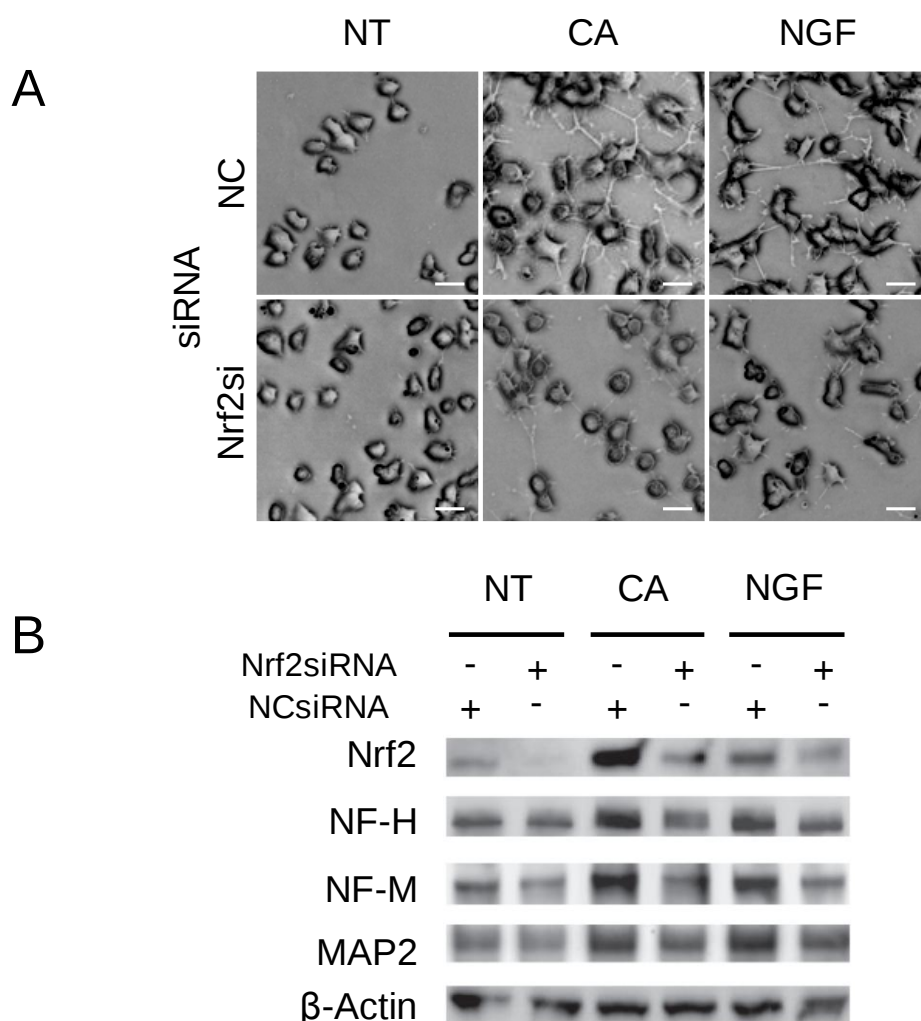


Fig. 20. カルノシン酸／NGF の分化誘導作用に対する Nrf2 ノックダウンの影響

PC12h cells were transfected with Nrf2 siRNA (Nrf2si) or negative control siRNA (NCsi) and then cells were treated with 15 μ M of CA or 10 ng/ml of NGF. After 6 h cell morphologies were observed under microscopy; scale bar: 25 μ m (A), and the whole cell lysates were subjected to WB analysis with anti-Nrf2, anti-NF-H, anti-NF-M, anti-MAP2 or anti-b-actin antibody (B).

■カルノシン酸の Erk1/2 及び PI3K を介した分化誘導作用

NGF は Erk1/2 や PI3K-Akt 系などのキナーゼのリン酸化(キナーゼの活性化)を誘導することが知られており NGF の生理的作用(例えば神経分化促進作用)等においてこれらのリン酸化の過程が重要な役割を果たしていることが知られている。そこで、CA がこれらのキナーゼを活性化するかどうかについて検討した。結果を Fig. 21 に示した。CA は Erk1/2 及び Akt (PI3K のターゲットとなるキナーゼ) のリン酸化 (Erk1/2-P、Akt-P) を誘導した。CA によるこれらのリン酸化作用は NGF に比べれば弱く、リン酸化を引き起こす時間は NGF よりも数時間遅れていた (Fig. 21A)。

CA 及び NGF による神経分化マーカー NF-M の誘導は、PI3K 及び Erk1/2 のリン酸化を阻害する薬剤 (LY294002 及び U0126 : U0126 は Erk1/2 の上流の MEK1/2 阻害剤) によって抑制された (Fig. 22A)。このことは、Erk1/2 及び PI3K が CA による PC12h 分化誘導に寄与していることを示唆していた。

次に、CA がどのようにしてこれらのキナーゼのリン酸化を起こすのかを検討した。TrkA の阻害剤として知られている K252a で細胞を処理したところ、NGF による NF-M、Erk1/2-P、Akt-P の誘導は顕著に抑制された。CA の場合も NF-M の誘導は、K252a によって抑制された (Fig. 21B)。このことは CA による神経分化誘導作用において TrkA 活性が必要であることが示唆していた。

しかしながら、CA による Erk1/2-P 誘導は K252a ではほとんど阻害を受けていなかった。一方、NGF による Erk1/2-P の誘導は完全に阻害されていた。このことから、CA による Erk1/2-P の誘導には、TrkA はあまり関与しておらず、別の未知のパスウェイの寄与が大きいと考えられた。CA による Akt のリン酸化は K252a で部分的ながら阻害されていたことより Akt-P 誘導には TrkA が部分的ではあるが寄与していることが示唆された。

Nrf2siRNA を用いて Nrf2 をノックダウンし、Erk1/2-P 及び Akt-P の誘導に与える影響をみた (Fig. 21B)。NGF 処理した細胞では、Akt-P 誘導は部分的に抑制されていたが、Erk1/2-P 誘導には影響が認められなかった。CA 処理した細胞でもほぼ同様な結果であり、Erk1/2 のリン酸化は、影響をうけていないようであったが、Akt-P は減少していた。これらの結果は、CA による Erk1/2-P 誘導は TrkA 及び Nrf2 とは異なる系によるものであるが、PI3K-Akt 系のリン酸化は、部分的に Nrf2 及び TrkA の経路に依存しているものであることを示していた。

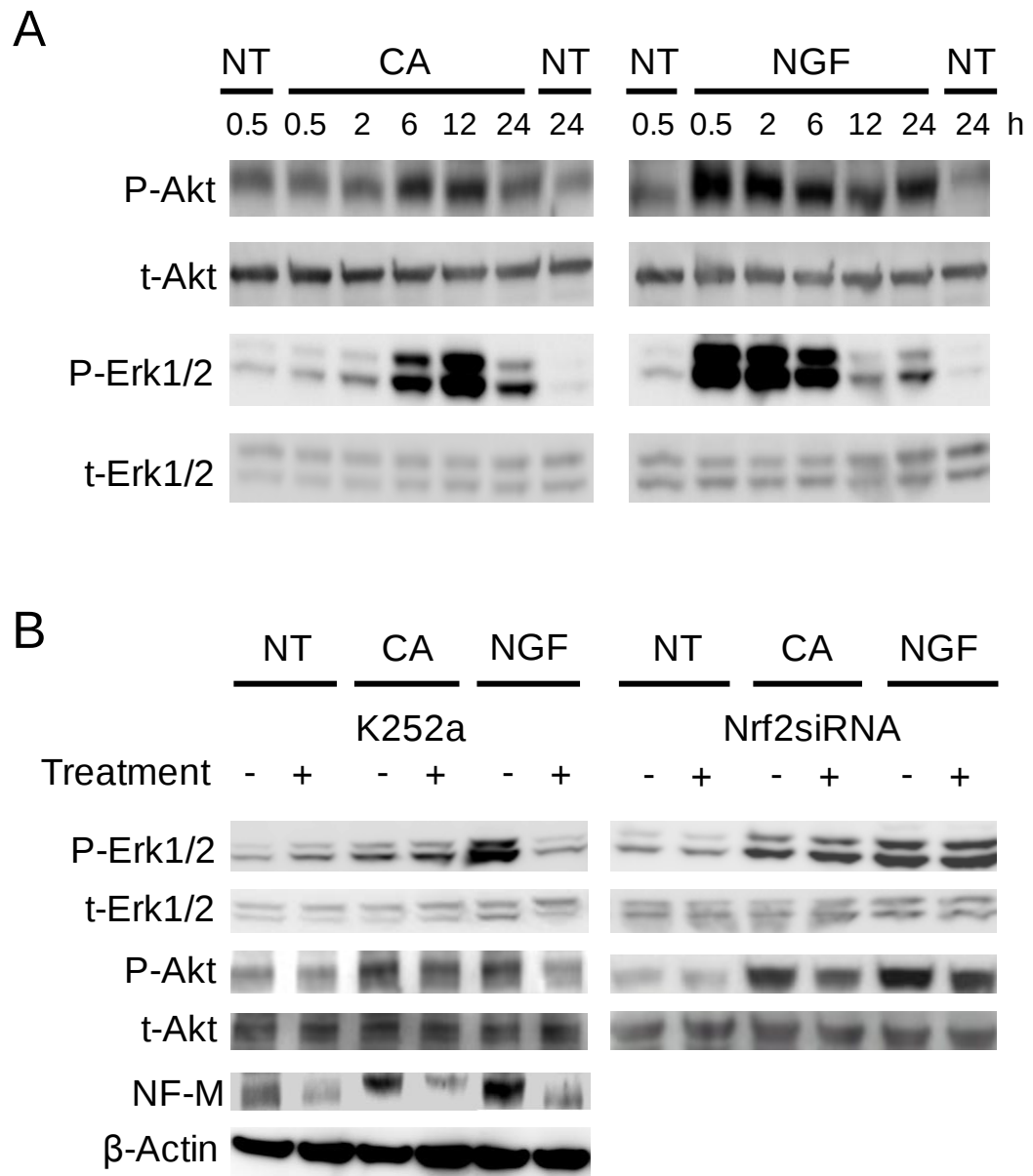


Fig. 21. カルノシン酸による PI3K 及び Erk1/2 活性化作用

PC12h cells were treated with 15 μ M of CA or 10 ng/ml of NGF for 0.5-24 h, and whole cell lysates were prepared. The lysates were subjected to WB analysis using anti-phosphorylated Akt (P-Akt), anti-total Akt (t-Akt), anti-phosphorylated Erk1/2 (P-Erk1/2) or anti-total Erk1/2 (t-Erk1/2) antibodies (A). PC12h cells were treated with 150 nM of K252a for 1 h (left panel) or Nrf2 siRNA for 24 h (right panel). Subsequently, the cells were treated with 15 μ M of CA or 10 ng/ml of NGF for 6 h and the lysates were analyzed by WB analysis (B).

CA による Erk1/2-P 誘導のメカニズムは不明であるが、最近、様々な蛋白において、システイン残基の酸化修飾がシグナル伝達機構に重要な役割を果たしていることがわかってきている(21)。例えば、Ras には、センサーとして働くシステイン残基があり、NGF による Erk1/2 活性化は、Ras の酸化修飾に起因することが示唆されている(22)。従って、CA も Ras のシステインを修飾することによって Erk1/2-P の誘導を起こすのかもしれない。

また、TrkA-P は PTP1B と呼ばれるフォスファターゼによって脱リン酸化されるが、最近、イソチオシアネート誘導体が PTP-1B のシステイン残基を修飾することによってフォスファターゼ活性を阻害し、結果的に NGF によって誘導される TrkA-P のレベルをあげ、Erk1/2-P レベルを高めることが報告された(23)。

CA にも同様な作用があるかもしれない。ただし、CA によって誘導される Erk1/2-P は TrkA 阻害剤 (K252a) の影響をほとんど受けなかったことから、あったとしても僅かなものと思われる。

■カルノシン酸による Nrf2 蓄積作用と Erk1/2 及び PI3K の関係

興味深いことにCAによるNrf2の蓄積促進とErk1/2-P、Akt-P誘導のタイムコースはほぼ一致していた (Fig. 19C, 21A)。これまでに幾つかの親電子性物質が Erk1/2やPI3K-Aktの経路を活性化することが報告されている(24, 25)。そこで、CAによるNrf2の蓄積に対するキナーゼ阻害剤の効果について検討を行った。その結果、Fig. 22Aに示したように、CAによるNF-Mの誘導及びNrf2蓄積はPI3K及びMEK1/2阻害剤 (LY294002及びU0126) によって抑制された。NF-M誘導はいずれの阻害剤も阻害したが特にU0126によって強く阻害された。一方、Nrf2蓄積は特にLY294002によって強く阻害された。同様にCAによるEpRE転写活性化作用も両方のキナーゼ阻害剤によって抑制されたが、LY294002によって顕著に抑制され、U0126による阻害は部分的なものでしかなかった (Fig. 22B)。

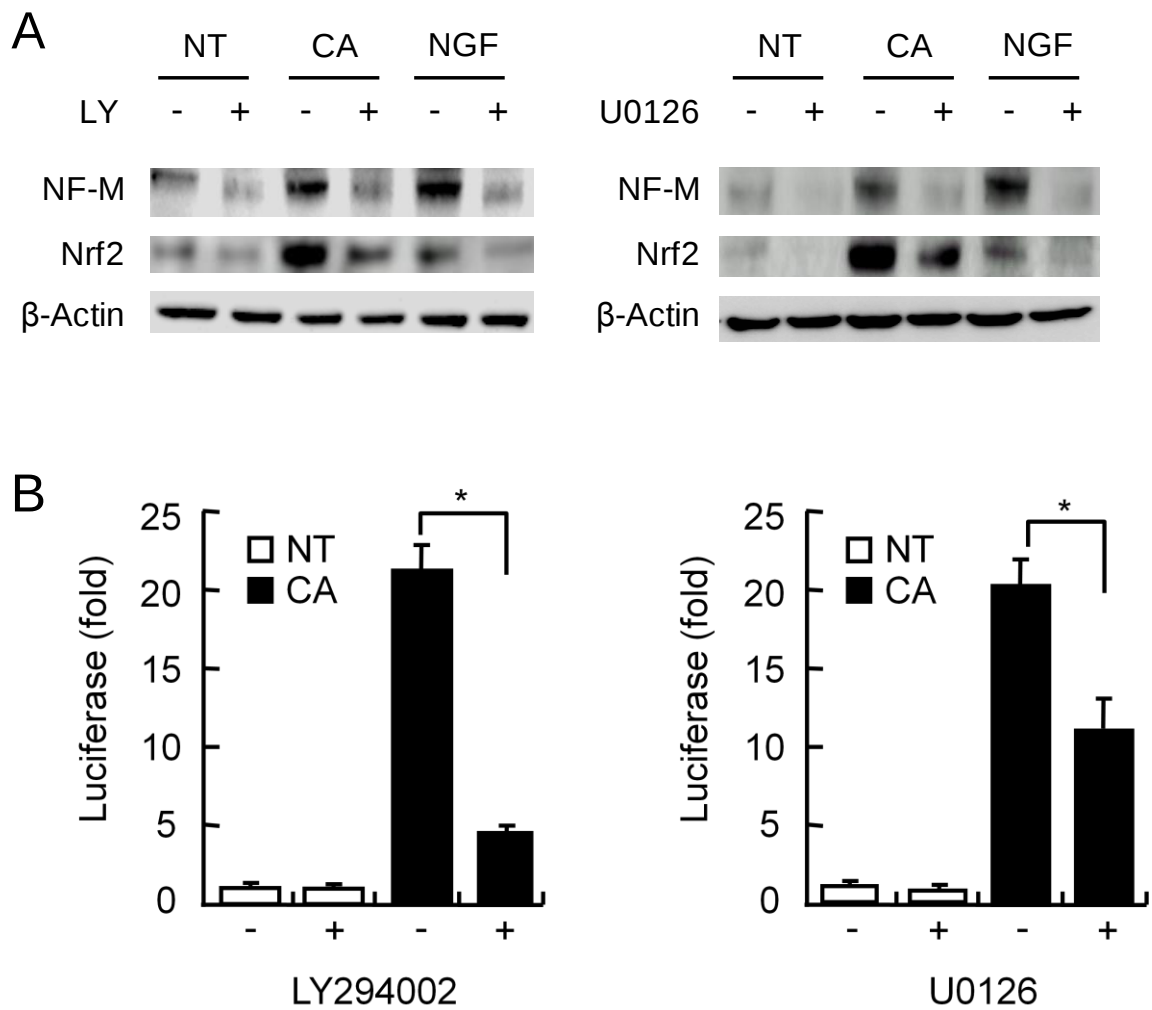


Fig. 22. カルノシン酸による PI3K・Erk1/2 を介した Nrf2-EpRE 活性化及び分化誘導作用

PC12h cells were treated with 30 μ M of LY294002 (left panel) or 10 μ M of U0126 (right panel) for 1 h and then the cells were untreated (NT) or treated with 15 μ M of CA or 10 ng/ml of NGF for 6 h. The whole cell lysates were analyzed by WB analysis using anti-NF-M, anti-Nrf2 or anti- β -actin antibodies (A). hNQO1 promoter-luciferase construct were transfected into PC12h cells. After 24 h LY294002 (30 μ M) or U0126 (10 μ M) were added to the cells 1 h prior to addition of CA. Cells were treated with 15 μ M of CA for 24 h and then luciferase assay was performed. * p <0.03 (B).

以上結果をまとめると、CA による PC12h 分化誘導機構には少なくとも

[1] Nrf2 依存で PI3K-Akt 活性に部分的に依存している系

[2] Nrf2 非依存的、Erk1/2・PI3K 活性（特に Erk1/2）依存系

が存在していると考えられた。[1] は Nrf2si による分化誘導抑制 (Fig. 20)、Nrf2si による Akt-P 誘導抑制 (Fig. 21B)、PI3K 阻害剤による NF-M 誘導の抑制 (Fig. 21A) の結果から想定された。[2] は Nrf2 ノックダウンした場合、CA 処理・NGF 処理共に Erk1/2-P の増加はほぼ変動しなかった (Fig. 21B、Akt-P 誘導は部分的に減少 → [1] の系) にも関わらず MEK1/2 阻害剤・PI3K 阻害剤のどちらで処理した場合も CA による NF-M 誘導は減少したこと (Fig. 21A) から推察された。

Erk1/2 と PI3K は、CA による分化誘導作用と EpRE 活性化作用の両方に寄与しているが、CA 誘導 NF-M は Erk1/2 阻害剤のほうが強く抑制したので、分化誘導作用に対しては Erk1/2 のほうがドミナントに働き、一方、CA による EpRE 活性化は PI3K 阻害剤のほうがより強く抑制したので、EpRE 活性化作用に対しては PI3K のほうがドミナントに働いていると考えられた。

■カルノシン酸と NGF の分化に関わる遺伝子発現の誘導作用の違い

神経分化に関わる遺伝子の発現にあたえる影響に CA と NGF の間でどのような違いがあるのかを確認するため以下の実験を行った。NGF は様々な遺伝子発現を誘導するが(26)、分化誘導に関係している *egr-1*, *p62/zip*, *mafK* と分化マーカーである *nf-M* について q-PCR でタイムコースをおって検討した。MafK 及び p62/ZIP は最近 NGF による分化誘導に必須であることが PC12 細胞において報告された蛋白である(4, 7, 27)。p62/ZIP の発現は Nrf2 によって制御されていることがマクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞で示されている(12)。結果を Fig. 23 に示した。試験した4つの遺伝子の発現は、CA 及び NGF によって全て増大した。CA 及び NGF により *nf-M* の遺伝子発現は24時間で12-14倍ほど上昇し、CA と NGF に大きな差は認められなかった。また、この結果は、Fig. 19C, D に示した NF-M 蛋白レベルのタイムコースの結果とほぼ一致していた。一方、*egr-1* の遺伝子発現誘導効果は NGF のほうが顕著に高かった。それに対し、*mafK* 及び *p62/zip* の発現誘導効果は CA のほうが顕著に高かった。これらの結果は、CA による分化誘導機構は NGF と類似している部分はあるものの、明確に異なることを示していた。

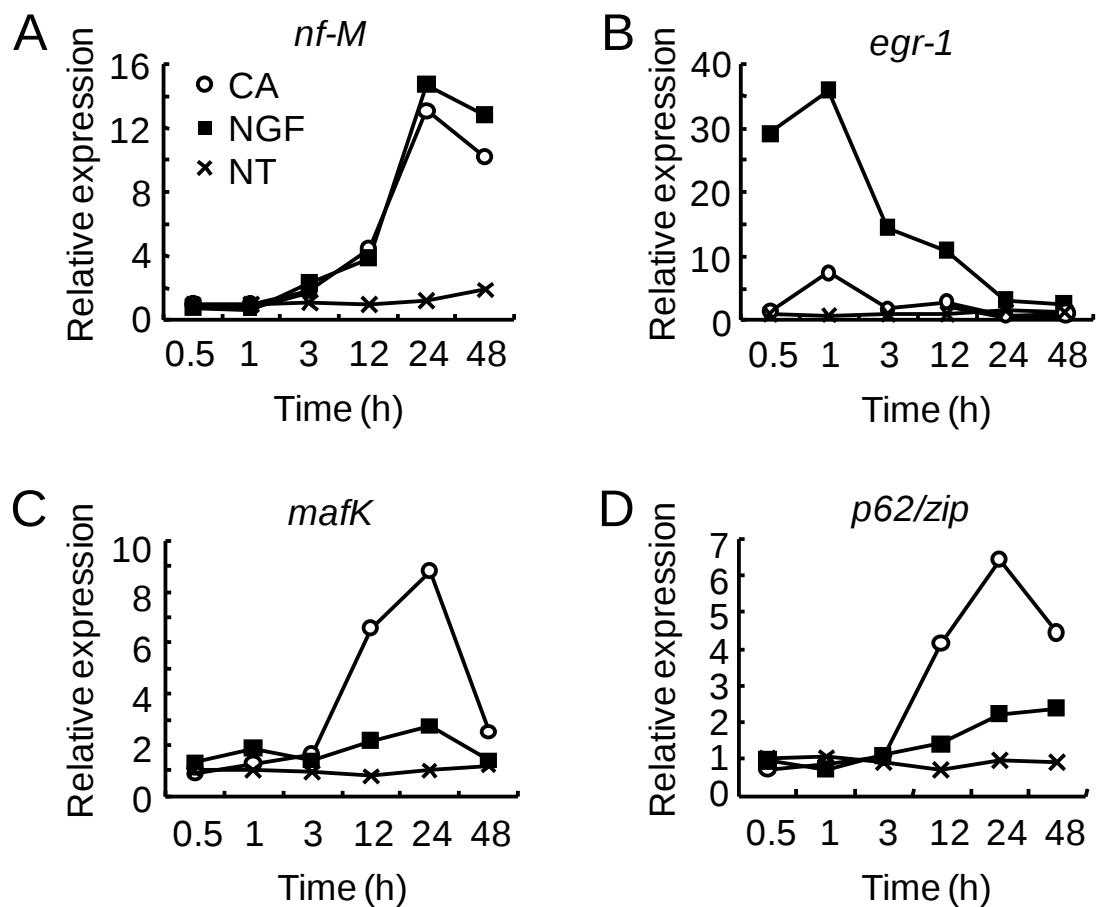


Fig. 23. カルノシン酸及び NGF による神経分化誘導関連遺伝子発現効果の比較

15 μ M of CA or 10 ng/ml of NGF was added to the cells and then RNA was extracted at the times indicated. The mRNA levels of neurofilament-M (*nf-M*) (A), *egr-1* (B), *mafK* (C) and *p62/zip* (D) were examined using quantitative PCR. The value of NT at 0.5 h was arbitrarily set as 1 and the relative values were presented.

■カルノシン酸による分化誘導に対する p62/ZIP の関与

NGF よりも CA によってより強く遺伝子発現が誘導された p62/ZIP 及び MafK は神経分化／突起伸長促進を促すことが既に報告されていたことから、CA による PC12h の分化誘導機構には、これら両方の因子が寄与していると考えられた。MafK は Nrf2 とヘテロダイマーを形成し EpRE に結合し EpRE 転写活性を誘導する蛋白であるため、MafK の分化促進作用には、Nrf2-EpRE 経路の活性化が寄与しているのかもしれない。一方、p62/ZIP は Trk シグナルに関与している蛋白であるが (Fig. 3)、本研究においては p62/ZIP の役割に焦点をあて研究を進めることとした。Fig. 24A に示したように、PC12h 細胞を Nrf2 特異的

siRNA で処理すると CA 及び NGF による p62/ZIP の発現が顕著に抑制された。この結果は、PC12h 細胞において、p62/ZIP の発現が Nrf2 依存的であることを示していた。次に、CA による分化誘導及び神経突起伸長誘導効果に対する p62/ZIP の影響をみるため、p62/ZIP 特異的 microRNA (ZIPmiR) の安定発現 PC12h 細胞株 (p62/ZIP ノックダウン PC12 細胞) を樹立して検討を行った。予想した通り、p62/ZIP ノックダウンによって CA による NF-M の誘導は減少し、細胞の形態も突起伸長が促されず丸いままであった (Fig. 24 B, C)。これらの知見は、CA による分化誘導に p62/ZIP が重要な役割を果たしていることを示していた。

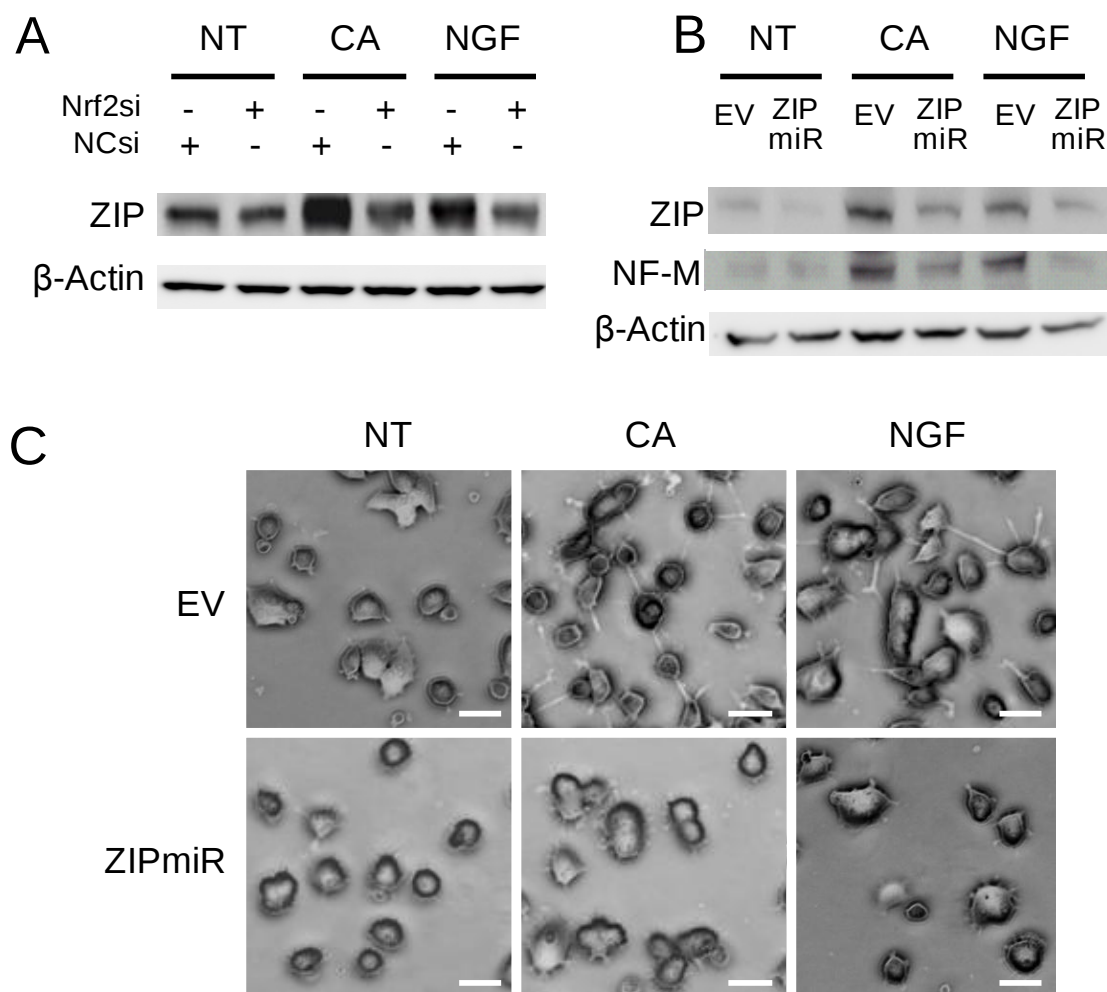


Fig. 24. カルノシン酸の p62/ZIP 誘導を介した神経分化誘導作用

PC12h cells were transfected with Nrf2 siRNA (Nrf2si) or negative control siRNA (NCsi) and then cells were treated with 15 μ M of CA or 10 ng/ml of NGF for 6 h. The lysates were subjected to WB analysis with anti-p62/ZIP or anti- β -actin antibody (A). ZIPmiR or empty vector (EV) stable transformant of PC12h cells were treated with 15 μ M of CA or 10 ng/ml of NGF for 6 h and then the morphologies were observed under microscopy. Scale bar, 25 μ m. p62/ZIP and NF-M protein levels were examined by WB analysis (B, C).

■Nrf2 と p62/ZIP を介したポジティブフィードバックループの形成

本研究過程において、p62/ZIP を PC12h 細胞に強制発現させると EpRE 転写活性が誘導されることを見出した (Fig. 25A)。Nrf2 によって p62/ZIP の発現が誘導されることから (Fig. 24A)、この発見は、p62/ZIP-Nrf2 の間でポジティブフィードバックループ(i) が形成されることを示唆するものであった。また、CA 及び NGF による EpRE 転写活性化作用は、p62/ZIP ノックダウンによって抑制されたことから (Fig. 25B)、CA/NGF 誘導 EpRE 活性化に p62/ZIP が寄与していることが示された。

更に p62/ZIP による EpRE 転写活性化作用は、LY294002 によって強く抑制されたことから PI3K-Akt 依存的であることが示唆された (Fig. 25C)。NGF は TrkA 受容体を介して作用するため、NGF 誘導 EpRE 転写活性化作用は TrkA に依存していると考えられる。事実 NGF による EpRE 転写活性化作用は K252a によって消失したことから、本実験系において K252a は完全に TrkA のシグナルを遮断していることが示唆された (Fig. 25D: NGF vs K252a + NGF)。一方、p62/ZIP による EpRE の活性化は、K252a では阻害されなかった (Fig. 25D: ZIP vs K252a + ZIP)。以上の結果から、p62/ZIP-Nrf2 ポジティブフィードバックループ(i) は TrkA 非依存的に起こると考えられた。

上記のポジティブフィードバックループ(i) は、TrkA 非依存的に p62/ZIP によって起こりうることであるが、CA 処理の場合には、更にもう一つのポジティブフィードバックループ(ii)の形成が起こっている可能性が考えられた。なぜなら: Geetha 等は、TrkA シグナル伝達には p62/ZIP が必須であることを報告している(10)。本研究過程において、NGF によって EpRE 活性化が誘導されることを発見したが、これは TrkA シグナルが EpRE を活性化していることを示唆していた。一方、CA による EpRE 転写活性化作用も、K252a によって部分的ではあったが、有意に阻害されたことから (Fig. 25D: CA vs K252a + CA)、CA による EpRE 転写誘導に TrkA が寄与していることが示唆された。これらのデータより、CA 処理した PC12h 細胞では、TrkA 依存的な p62/ZIP-Nrf2 ポジティブフィードバックループ(ii) も形成されていると考えられた。

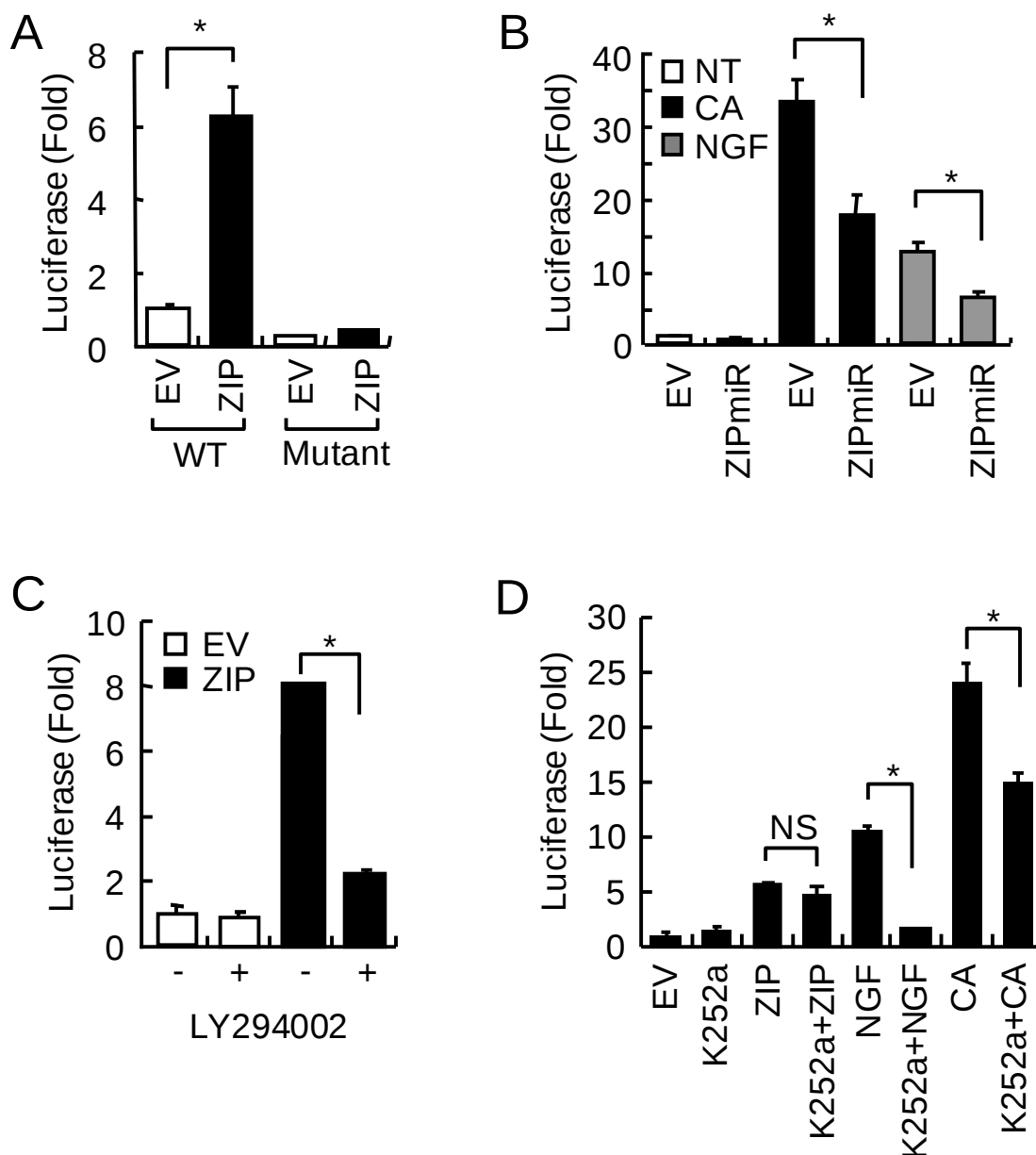


Fig. 25. カルノシン酸による EpRE 活性化作用に対する p62/ZIP の役割

hNQO1 promoter-luciferase construct (wild-type or ARE mutant) and the expression vectors (pEF-p62/ZIP or pEF-EV) were co-transfected into PC12h cells. Luciferase assay was performed 24 h later (A). hNQO1promoter-luciferase vector and the knockdown vector (pcDNA-ZIPmiR or pcDNA-EV) were co-transfected. After 24 h cells were treated with 15 μ M of CA or 10 ng/ml of NGF for 24 h and then luciferase assay was performed (B). hNQO1promoter-luciferase vector and the expression vector (pEF-p62/ZIP or pEF-EV) were co-transfected into the cells. After 24 h, the cells were treated with 15 μ M of CA or 10 ng/ml of NGF in the presence or absence of 30 μ M LY294002 or 150 nM K252a for 24 h and then luciferase assay was performed (C, D). ZIP: ZIP expression vector, ZIPmiR: ZIP knock down vector, EV: empty vector, NS: not significant. * p <0.03.

■カルノシン酸の NGF 産生促進効果

上記の実験結果より、CA の PC12h 細胞に対する作用には TrkA に依存している部分があることが示唆された。NGF は TrkA のリガンドであることから、PC12h に NGF 中和抗体を添加して培養してみたところ、CA ありなしに関わらず細胞が死滅してしまった。このことは、本実験条件では PC12h の生存に NGF が必須であり、培地中に NGF が存在していることを示していた。培地中の NGF が添加した血清由来であるのか、PC12h が分泌したものなのかは不明だが、CA は PC12h の NGF 発現を誘導するのではないかとという仮説のもと実験をすすめた。本仮説を検証すべく CA で処理した PC12h 細胞の *ngf* 遺伝子発現を RT-PCR で確認した。結果を Fig. 26A に示した。コントロール (vehicle) では、PCR 35 サイクルで僅かに *ngf* の発現を確認することができたのに対し、CA で処理した PC12h 細胞では明らかに *ngf* 発現が上昇していた。

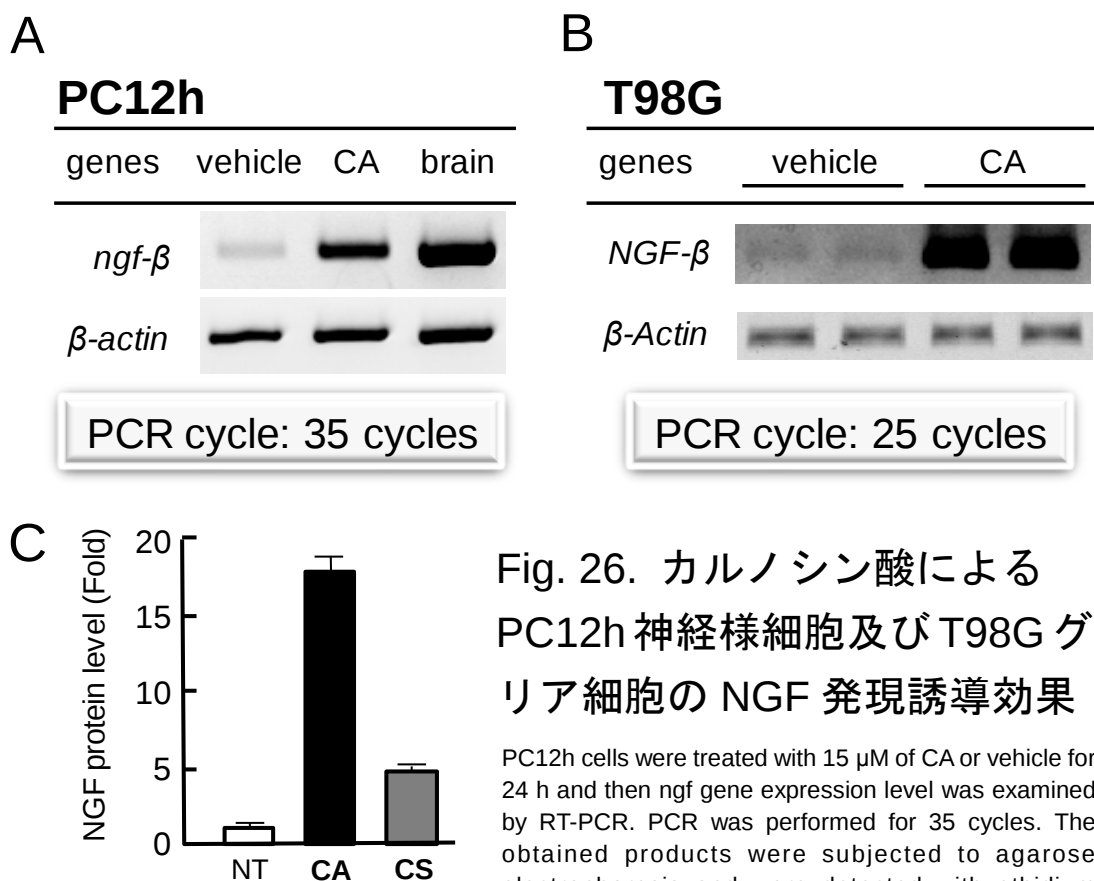


Fig. 26. カルノシン酸による PC12h 神経様細胞及び T98G グリア細胞の NGF 発現誘導効果

PC12h cells were treated with 15 μ M of CA or vehicle for 24 h and then *ngf* gene expression level was examined by RT-PCR. PCR was performed for 35 cycles. The obtained products were subjected to agarose electrophoresis and were detected with ethidium

bromide. cDNA obtained from rat brain was used as a positive control (A). T98G human glioblastoma cells were treated for 24 h with vehicle or 50 μ M CA and then were examined by RT-PCR. PCR products were detected with ethidium bromide. PCR: 25 cycles (B). T98G cells were treated with 50 μ M of CA or CS and then NGF content in the cultured supernatant was measured by ELISA. The value of no treatment (NT) was set as 1 and the relative values were presented (C).

神経組織を形成する細胞は、神経細胞（ニューロン）とそれ以外の細胞（グリア）に分けられる。神経組織中では NGF の産生は主にグリア細胞が担っていると考えられている。そこで、ヒトグリア細胞株である T98G 細胞の NGF 発現についても検討を行ってみた。その結果、PC12h では 35 サイクル必要であったのに対し（Fig. 26A, vehicle）、T98G 細胞では 25 サイクルで NGF を検出することができた（Fig. 26B, vehicle）。このことは、T98G 細胞は PC12h 細胞に比して強く NGF を発現していることを示していた。逆にいえば PC12h 細胞が分泌している NGF 量はごく僅かな量であることを示すものであった。また、T98G 細胞においても CA で処理した細胞では著しく NGF 発現が上昇していた（Fig. 26B）。実際、CA で処理した T98G の培地中の NGF の蛋白量を酵素免疫測定法（ELISA）によって測定したところ著しい増加が認められた（Fig. 26C）。

最近、マウスに CA を鼻腔から投与することで脳内の NGF 発現が上昇することが報告された(28)。また、三村等は、T98G 細胞を用いた実験で CA による NGF 発現が Nrf2 依存的に起こることを報告している(29)。従って、CA を投与した場合、CA は神経細胞に直接働きかけ Nrf2 生体防御機構を活性化すると共にグリア細胞にも作用することで、グリア細胞からの NGF 発現を誘導し、それによっても神経保護作用を発揮するものと思われる。

NGF が TrkA 受容体に作用すると、TrkA は自己リン酸化を起こし、リン酸化 TrkA (TrkA-P) が誘導される。PC12h 細胞において、CA が NGF 発現を誘導することが認められたことから（Fig. 26A）、CA によって TrkA-P が誘導される可能性が考えられた。そこで、ウェスタンブロッティングによって確認を試みたが、TrkA-P のバンドを検出することはできなかった。これは、CA によって誘導される NGF がほんの僅かな量であり、誘導される TrkA-P が検出限界に達していなかったためではないかと推察している。事実、NGF 誘導 Erk1/2-P が K252a で消失したのに対し、CA 誘導 Erk1/2-P は、ほとんど減少しなかった（Fig. 21B）。すなわち、仮に PC12h 細胞の NGF 発現が誘導されることによって TrkA-P 誘導が起こり、それが TrkA シグナルパスウェイの活性化に寄与していたとしても、Erk1/2-P を十分に誘導できないほど僅かにしか起こっていないことになる。しかしながら、それを証明するためには更なる検証が必要である。

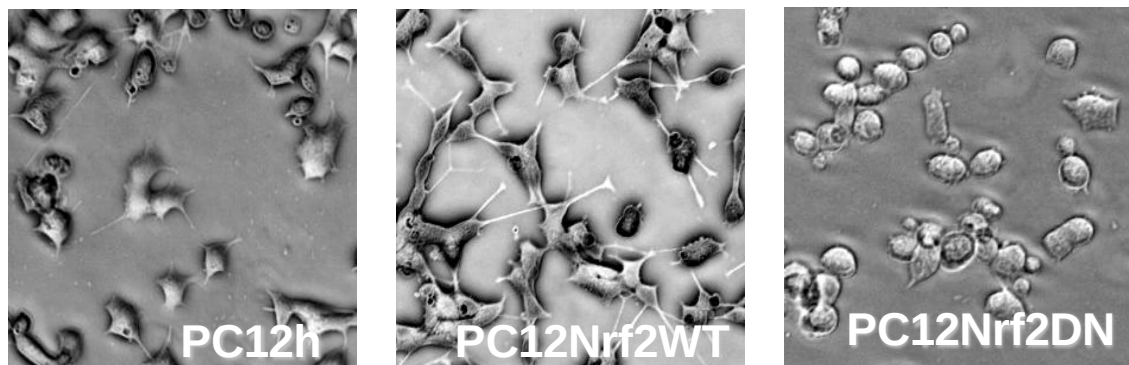
■Nrf2 高発現 PC12h 株の神経突起伸長作用

PC12 細胞の分化誘導に Erk1/2 や PI3K などのキナーゼが関与していることは既知なことであったが、Nrf2 が関与していることは新規な知見であった。ここで、Nrf2 の活性化のみでも PC12h の分化／突起伸長は誘導されるのであろうか？という疑問が残った。そこで、pEF-Nrf2WT、pEF-Nrf2DN ベクターを PC12h 細胞へトランスフェクションし、トランスフェクションが成功している細胞をブラスチジン添加によって選択、Nrf2、Nrf2DN 強制発現ステーブルトランスフォーマント細胞（PC12Nrf2WT、PC12Nrf2DN）を樹立し実験に供した。

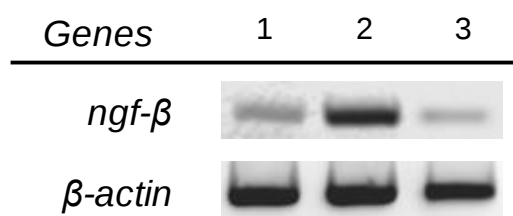
これらの樹立した細胞を増殖培地（8%FBS+8%HS-DMEM）で培養しても形態的に特筆するような差は認められなかった。しかしながら、PC12Nrf2WT は低血清培地（1%FBS+1%HS-DMEM、コラーゲンコーティングプレート：NGF や CA で分化誘導が可能な条件）で培養を続けてみたところ、培養 24 時間後では特に変化は認められなかったが、培地交換無しで 72 時間培養を継続することで明らかな神経突起伸長が認められるようになった（Fig. 27A）。それに対して、PC12Nrf2DN は、同条件で培養しても 72 時間後も丸い形態のままであった。形態観察後、細胞を回収し、Fig. 26A の時と同条件の RT-PCR により NGF の遺伝子発現レベルを確認したところ、PC12Nrf2WT は PC12h に比べて ngf 発現が上昇していることが確認された（Fig. 27B）。逆に PC12Nrf2DN では ngf 発現は減少していた。この結果は、PC12h 細胞は、Nrf2 の活性化により NGF 発現が増大し、その結果分化誘導が起こることを示唆していた。なお、これらの安定株のグルタミン酸毒性（酸化的ストレス）に対する抵抗性をみたところ、予想通り、PC12Nrf2WT は強い耐性を示し、逆に PC12Nrf2DN は、PC12h に比べ有意に耐性が低下していた（Fig. 27C）。

しかし、CA や NGF の場合、新鮮な培地に交換し CA/NGF を添加して 6 時間後には明確な突起伸長が観察できたのに対して（Fig. 20A）、PC12Nrf2WT 細胞は 72 時間培養しないと明確な突起伸長が認められなかったことから、細胞が培地中に分泌する NGF 等のサイトカイン濃度がある程度上昇することが必要なかもしれない。

A



B



C

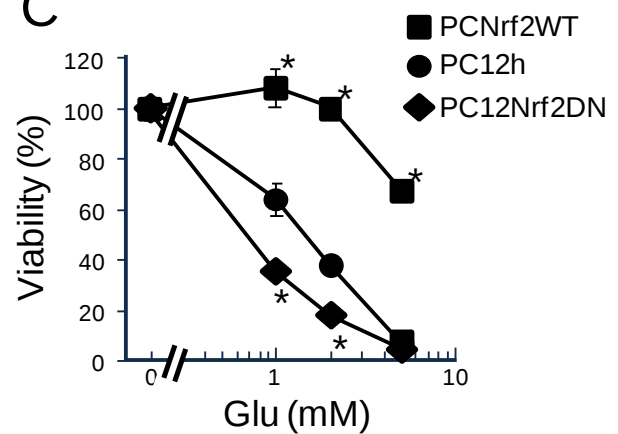


Fig. 27. PC12h 細胞の神経突起伸長及び NGF 発現に対する Nrf2 の影響

Nrf2WT, Nrf2DN - stable transformant cells (PC12Nrf2WT, PC12Nrf2DN) or PC12h cells were cultured onto 6 well collagen-coating plates in 1%FCS+1%HS DMEM medium for 72 h. (A) The shape of cells were confirmed with microscope (phase-contrast) and then (B) the cells were subjected to RT-PCR. Lane 1: PC12h, Lane 2: PC12Nrf2WT, Lane 3: PC12Nrf2DN. (C) Cells were treated with glutamate (1-5 mM) for 20 h and then the each cell survivals were quantified by the MTT assay. *: $p < 0.01$

本論文では、Nrf2 の活性化によって PC12h 細胞の分化が誘導されることを示した (Fig. 27)。ROS も Nrf2 の活性化を誘導する。しかしながら、PC12 に ROS を添加しても NGF 様作用 (分化誘導や突起伸長促進) は起こらず、アポトーシスが誘導されることが多数報告されている(30)。Nrf2 は ROS によって崩れる細胞内レドックスバランスを修復し維持するために重要な役割を果たしているが、細胞は過剰な ROS に晒された場合にはむしろ Nrf2 の活性化を抑制しアポトーシスを誘導するようにプログラミングされていることが Villeneuve 等の研究によって示唆されている(31)。一方、親電子性物質の Nrf2 活性化作用は ROS に比べてかなり高いことが示されている(32)。従って、ROS によって NGF 様作用が起こらないのは、ROS によって誘導可能な Nrf2 のレベルが CA に比べてかなり低いと思われる。

興味深いことに、NGF は酸化ストレスに対し抑制作用を発揮することが知られているが、一方で、NGF を PC12 細胞に添加するとミトコンドリアで過酸化水素が発生し、その過酸化水素が突起伸長促進に必要であることが報告されている(22)。おそらく、この場合の過酸化水素は、NGF シグナル制御下、局所 (ミトコンドリア) で、且つあるタイミングで僅かな量発生するものであり、シグナル伝達物質として誘導されるものと考えられ (Ras 活性化に関与していることが示唆されている)、Nrf2 の活性化にはあまり寄与していないと思われる。

■カルノシン酸の Nrf2-EpRE 活性化・分化誘導作用の推定機構

以上の結果に基づき、想定される CA による PC12h 細胞分化誘導促進及び強い EpRE 活性化作用の機構を Fig. 28 に示した。簡単にまとめると、CA は、(a) Keap1 に結合することによって Nrf2 の活性化を引き起こす。(b) Nrf2 依存的／非依存的にキナーゼ (少なくとも Erk1/2 及び PI3K-Akt) を活性化する。(c) Nrf2 の活性化によって p62/ZIP を誘導し、Nrf2-p62/ZIP-TrkA の間でポジティブフィードバックループを形成する。これらが相乗的に作用することによって強力な EpRE 転写活性及び神経突起伸長作用が引き起こされたと考えられた。CA による分化誘導活性は、Erk1/2 の活性を阻害することで強く抑制されたのに対し、PI3K 阻害剤による抑制は部分的なものであった (Fig. 22A)。一方、CA による EpRE 活性化作用は、PI3K 阻害剤で強力に抑制されたのに対し、Erk1/2 阻害剤では部分的にしか阻害されなかった (Fig. 22B)。また、p62/ZIP による EpRE 活性化作用も PI3K に強く依存していた (Fig. 25C)。従って、おそらく、分化誘導作用に対しては Erk1/2 の活性化がドミナントに、EpRE 活性

化作用に対しては、Nrf2-p62/ZIP-TrkA (PI3K を含む) を介したポジティブフィードバックループがドミナントに働いていると思われた。

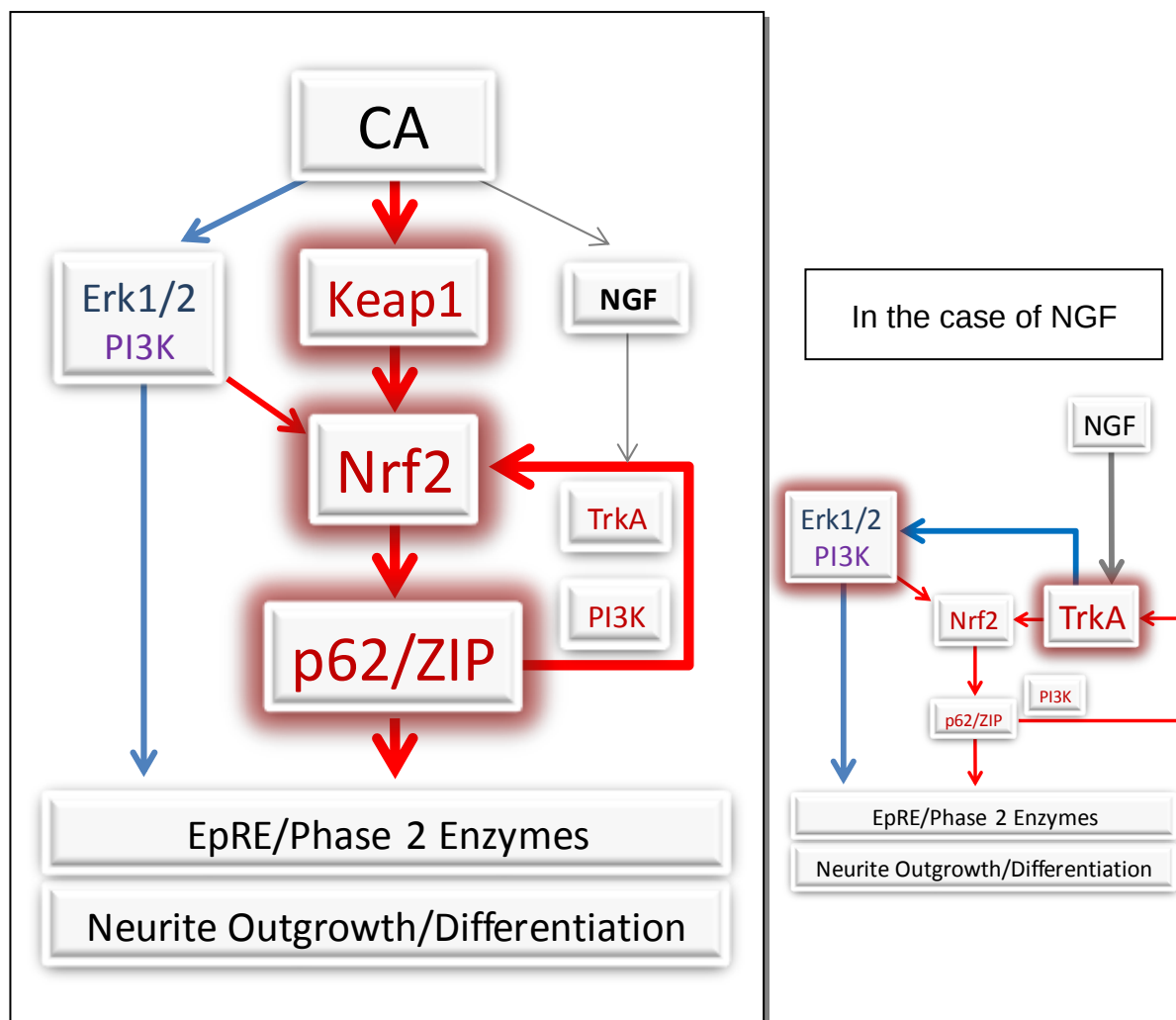


Fig. 28. カルノシン酸による PC12h 細胞の EpRE 転写活性化作用及び神経突起伸長/分化誘導作用の推定メカニズム

CA activates Nrf2 via the direct modification of Keap1. CA also activates Erk1/2 and PI3K by yet unidentified mechanisms. The activation of these kinases leads to the enhanced Nrf2 accumulation. Activated Nrf2 induce p62/ZIP that enhances TrkA signaling and facilitates neural differentiation. p62/ZIP in turn activates Nrf2 pathway, establishing the positive feed-back loop in TrkA-independent (i) or -dependent manner (ii). NGF also activates Nrf2 via TrkA in an Erk1/2- and PI3K-dependent manner. CA promotes NGF synthesis, but it is not clear whether CA-induced NGF contribute to EpRE transactivation and differentiation in PC12h cells. See also RESULTS and DISCUSSION section (Chapter 5).

CA の PC12h に対する EpRE 活性作用は、調べた他の成分に比べて著しく強かった (Fig. 6)。この要因としては、CA によって誘導される NGF (Fig. 26) の寄与が大きいと思われる。

なぜなら、[1] PC12h は TrkA を発現しており、実験に供した他の細胞とは異なり、その活性化 (TrkA リン酸化) により分化が誘導されるという特性を有した神経系細胞株であること。TrkA を活性化する因子である NGF によって PC12h の EpRE 活性化が誘導されたこと (Fig. 19)。CA の EpRE 活性化作用は、TrkA 阻害剤によって抑制されたこと (Fig. 25D)。これらのことは、PC12h の場合、EpRE 活性化に少なからず TrkA 活性が寄与していることを示していた (Nrf2-p62/ZIP-TrkA ポジティブフィードバックループ)。次に [2] CA と CS は構造的に類似した化合物であり (Fig. 4)、PC12h 以外の細胞に対しては CA と CS の EpRE 活性化作用に大きな違いは認められなかった (Fig. 8)。このことから、おそらく CA と CS の親電子性物質としての特性は似ており、CA と CS の Keap1 を介した Nrf2-EpRE 活性化作用はほぼ同等であると思われる。しかし、PC12h 細胞の場合に限り、CA は CS に比べ著しく強い EpRE 活性化作用を示した (Fig. 6)。[3] NGF 発現は Nrf2 活性に依存して起こる。しかし、T98G グリア細胞において、CA による NGF 発現は CS よりも著しく強かった (Fig. 26C)。このことは、上記 [2] の推論と合わせて考えると、CA による NGF 発現には Keap1-Nrf2 以外の未知な機構が関与していることを示唆していた。

これらのことから、他の化合物に比べて、CA の場合、NGF 誘導活性が強いため、Nrf2-p62/ZIP-TrkA ポジティブフィードバックループがより強く活性化され (TrkA を介した本ポジティブフィードバックループの活性化には、ある程度の TrkA-P が必要であり、微量の NGF がブースター的に働く)、その結果、強力な Nrf2-EpRE の活性化及び分化誘導が起こるという仮説が考えられた。Nrf2 を活性化するポリフェノールや親電子性物質が PC12 の神経突起伸長促進作用を示すことが報告されているが(13-16)、いずれも、分化を起こさない程度の微量な NGF の添加を必要とする。このことから本仮説は支持されると思われる。しかしながら、本仮説を立証するには更なる検証が必要である。

5-4. 引用文献

1. Gordon MW. Neuronal plasticity and memory. *Am J Orthopsychiatry*. 1969; 39(4):578-594.
2. Brade YA. The nerve growth factor family. *Prog Growth Res*. 1990; 2(4): 237-248.
3. Arevalo JC, Wu SH. Neurotrophin signaling: many exciting surprises! *Cell Mol Life Sci*. 2006; 63(13):1523-1537.
4. Gong J, Xu J, Bezanilla M, van Huizen R, Derin R, Li M. Differential stimulation of PKC phosphorylation of potassium channels by ZIP1 and ZIP2. *Science*. 1999; 285(5433):1565-1569.
5. Samuels IS, Seibenhener ML, Neidigh KB, Wooten MW. Nerve growth factor stimulates the interaction of ZIP/p62 with atypical protein kinase C and targets endosomal localization: evidence for regulation of nerve growth factor-induced differentiation. *J Cell Biochem*. 2001; 82:452-466.
6. Geetha T, Wooten MW. Association of the atypical protein kinase C-interacting protein p62/ZIP with nerve growth factor receptor TrkA regulates receptor trafficking and Erk5 signaling. *J Biol Chem*. 2003; 278:4730-4739.
7. Wooten MW, Seibenhener ML, Mamidipudi V, Diaz-Meco MT, Barker PA, Moscat J. The atypical protein kinase C-interacting protein p62 is a scaffold for NF-kappaB activation by nerve growth factor. *J Biol Chem*. 2001; 276:7709-7712.
8. Joung I, Kim HJ, Kwon YK. p62 modulates Akt activity via association with PKCzeta in neuronal survival and differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 334:654-660.
9. Zhang Y, Moheban DB, Conway BR, Bhattacharyya A, Segal RA. Cell surface Trk receptors mediate NGF-induced survival while internalized receptors regulate NGF-induced differentiation. *J Neurosci*. 2000; 20(15):5671-5678.
10. Geetha T, Jiang J, Wooten MW. Lysine 63 polyubiquitination of the nerve growth factor receptor TrkA directs internalization and signaling. *Mol Cell*. 2005; 20:301-312.

- 1 1 . Moscat J, Diaz-Meco MT, Wooten MW. Signal integration and
diversification through the p62 scaffold protein. *Trends Biochem Sci.*
2007; 32(2):95-100.
- 1 2 . Maruyama A, Tsukamoto S, Nishikawa K, Yoshida A, Harada N,
Motojima K, Ishii T, Nakane A, Yamamoto M, Itoh K. Nrf2 regulates
the alternative first exons of CD36 in macrophages through specific
antioxidant response elements. *Arch Biochem Biophys.* 2008;
477(1):139-145.
- 1 3 . Reznichenko L, Amit T, Youdim MB, Mandel S. Green tea
polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate induces neurorescue of
long-term serum-deprived PC12 cells and promotes neurite
outgrowth. *J Neurochem.* 2005; 93:1157-1167.
- 1 4 . Lin CW, Wu MJ, Liu IY, Su JD, Yen JH. Neurotrophic and
cytoprotective action of luteolin in PC12 cells through
ERK-dependent induction of Nrf2-driven HO-1 expression. *J Agric
Food Chem.* 2010; 58(7):4477-4486.
- 1 5 . Liao KK, Wu MJ, Chen PY, Huang SW, Chiu SJ, Ho CT, Yen JH.
Curcuminoids promote neurite outgrowth in PC12 cells through
MAPK/ERK- and PKC-dependent pathways. *J Agric Food Chem.*
2012; 60(1):433-443.
- 1 6 . Satoh T, Furuta K, Tomokiyo K, Namura S, Nakatsuka D, Sugie Y,
Ishikawa Y, Hatanaka H, Suzuki M, Watanabe Y. Neurotrophic
actions of novel compounds designed from cyclopentenone
prostaglandins. *J Neurochem.* 2001; 77(1):50-62.
- 1 7 . Wasserman WW, Fahl WE. Functional antioxidant responsive
elements. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94(10):5361-5366.
- 1 8 . Zopf D, Dineva B, Betz H, Gundelfinger ED. Isolation of the
chicken middle-molecular weight neurofilament (NF-M) gene and
characterization of its promoter. *Nucleic Acids Res.* 1990;
18:521-529.
- 1 9 . Suzuki A, Tsutomi Y. Bcl-2 accelerates the neuronal differentiation:
new evidence approaching to the biofunction of bcl-2 in the neuronal
system. *Brain Res.* 1998; 801:59-66.
- 2 0 . Fischer I, Richter-Landsberg C, Safaei R. Regulation of microtubule

- associated protein 2 (MAP2) expression by nerve growth factor in PC12 cells. *Exp. Cell Res.* 1991; 194:195-201.
- 2 1 . Satoh T, Lipton SA. Redox regulation of neuronal survival mediated by electrophilic compounds. *Trends Neurosci.* 2007; 30(1):37-45.
 - 2 2 . Cassano S, Agnese S, D'Amato V, Papale M, Garbi C, Castagnola P, Ruocco MR, Castellano I, De Vendittis E, Santillo M, Amente S, Porcellini A, Avvedimento EV. Reactive oxygen species, Ki-Ras, and mitochondrial superoxide dismutase cooperate in nerve growth factor-induced differentiation of PC12 cells. *J Biol Chem.* 2010; 285(31):24141-24153.
 - 2 3 . Shibata T, Nakahara H, Kita N, Matsubara Y, Han C, Morimitsu Y, Iwamoto N, Kumagai Y, Nishida M, Kurose H, Aoki N, Ojika M, Uchida K. A food-derived synergist of NGF signaling: identification of protein tyrosine phosphatase 1B as a key regulator of NGF receptor-initiated signal transduction. *J Neurochem.* 2008; 107(5):1248-1260.
 - 2 4 . Martin D, Rojo AI, Salinas M, Diaz R, Gallardo G, Alam J, De Galarreta CM, Cuadrado A. Regulation of heme oxygenase-1 expression through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and the Nrf2 transcription factor in response to the antioxidant phytochemical carnosol. *J Biol Chem.* 2004; 279:8919-8929.
 - 2 5 . Nakaso K, Yano H, Fukuhara Y, Takeshima T, Wada-Isoe K., Nakashima, K. PI3K is a key molecule in the Nrf2-mediated regulation of antioxidative proteins by hemin in human neuroblastoma cells. *FEBS Lett.* 2003; 546:181-184.
 - 2 6 . Greene LA, Angelastro JM. You can't go home again: transcriptionally driven alteration of cell signaling by NGF. *Neurochem Res.* 2005; 30:1347-1352.
 - 2 7 . Torocsik B, Angelastro JM, Greene LA. The basic region and leucine zipper transcription factor MafK is a new nerve growth factor-responsive immediate early gene that regulates neurite outgrowth. *J Neurosci.* 2002; 22:8971-8980.
 - 2 8 . Vaka SR, Murthy SN, Repka MA, Nagy T. Upregulation of endogenous neurotrophin levels in the brain by intranasal

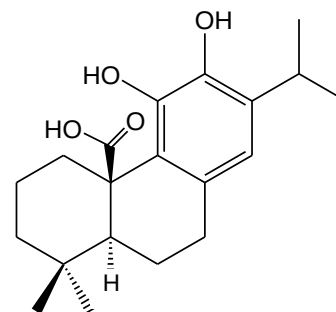
- administration of carnosic acid. *J Pharm Sci.* 2011; 100(8):3139-3145.
- 2 9 . Mimura J, Kosaka K, Maruyama A, Satoh T, Harada N, Yoshida H, Satoh K, Yamamoto M, Itoh K. Nrf2 regulates NGF mRNA induction by carnosic acid in T98G glioblastoma cells and normal human astrocytes. *J Biochem.* 2011; 150(2):209-217.
 - 3 0 . Luo T, Zhang H, Zhang WW, Huang JT, Song EL, Chen SG, He F, Xu J, Wang HQ. Neuroprotective effect of Jatrorrhizine on hydrogen peroxide-induced cell injury and its potential mechanisms in PC12 cells. *Neurosci Lett.* 2011; 498(3):227-231.
 - 3 1 . Villeneuve NF, Sun Z, Chen W, Zhang DD. Nrf2 and p21 regulate the fine balance between life and death by controlling ROS levels. *Cell Cycle.* 2009; 8(20):3255-3256.
 - 3 2 . Prestera T, Holtzclaw WD, Zhang Y, Talalay P. Chemical and molecular regulation of enzymes that detoxify carcinogens. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90:2965-2969.

結 語

アルツハイマー病やパーキンソン病、脳梗塞等によって起こる神経変性の発症・増悪には酸化ストレスが関与していることが示唆されている。そのため過剰な活性酸素の発生を抑制することが予防医学的に重要であると考えられている。一方、細胞には核内転写因子 Nrf2 (NFE2L2) を介して抗酸化酵素や解毒酵素 (第2相酵素) の発現を促進する機構「生体防御機構」があることが知られている。Nrf2 は DNA 上の親電子性物質応答配列 (EpRE) に結合することによって、数多くの生体防御に関わる遺伝子の転写活性化を誘導する。しかしながら、Nrf2 活性は、加齢と共に低下していくことが知られており、Nrf2-EpRE 経路の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ている。そこで、Nrf2-EpRE を活性化し、神経変性疾患を抑制しうる化合物を見出すことを目的として実験を行った。

1. CA の Nrf2 を介した虚血再還流神経変性に対する抑制効果

まず、神経系細胞株 PC12h を用い、種々の成分を EpRE を用いたレポーター遺伝子アッセイにかけ、ローズマリー (*Rosmarinus officinalis* L.) の成分であるカルノシン酸 (carnosic acid : CA) が EpRE の下流遺伝子の転写を強く誘導することを見出した。



カルノシン酸 (CA)

脳梗塞などにより虚血再還流が起こると、酸化的ストレスによって神経変性が起こる (興奮毒性)。この毒性機構には NMDA 型グルタミン酸受容体経路の活性化が関与していることが知られているため、初代培養大脳皮質神経細胞に対し、CA がグルタミン酸による毒性を抑制しうるかどうかの検討を行った。その結果、グルタミン酸による毒性を CA は有意に抑制した。また、CA は初代培養神経細胞においても EpRE の転写活性化を起こした。

CA をマウスに経口投与し、マウスの脳内 CA 量を測定したところ、Nrf2-EpRE 経路を活性化しうる濃度の CA が検出された。また CA を投与したマウスの脳内グルタチオン量は増大していた。加えて、グルタチオン合成の律速酵素であ

るγグルタミルシステインリガーゼを含む第2相酵素の脳内遺伝子発現レベルが上昇していた。更にマウス脳虚血再還流実験を実施した結果、CAを投与したマウスの脳細胞の変性は有意に抑制された。以上の結果は、CAは、末梢投与によって脳内に到達し Nrf2-EpRE 経路を活性化することを示唆していた。

2. カルノシン酸の Nrf2 活性化機構

活性酸素のセンサーとして Keap1 という蛋白質が重要な役割を果たしていることが知られている。Keap1 は Nrf2 の分解を誘導する蛋白質であるが、Keap1 にあるセンサーとして働くシステイン残基が修飾されると Nrf2 の安定化及び活性化が起こり、その結果第2相酵素の遺伝子発現が誘導される。実験の結果、[1] CA は生理的条件下でシステインのチオール基と共有結合した。[2] CA は Keap1 には結合したが、Keap1 のセンサーを含む領域を除いた mutant Keap1 には結合しなかった。[3] Keap1 及び Nrf2 ドミナントネガティブを過剰発現させることによって EpRE レポーター遺伝子の発現は著しく低下した。[4] 酸化ストレスにより PC12h 細胞のバイアビリティは著しく低下したが、CA はそれを抑制した。その抑制効果は、Nrf2 ドミナントネガティブを過剰発現させることによって低下した。これらの結果は、CA が Keap1 のシステイン残基と反応することによって Nrf2-EpRE 経路を活性化することを示唆していた。

3. カルノシン酸の神経分化／突起伸長誘導効果

ニューロトロフィンの一つである神経成長因子 (NGF) は、神経細胞の増殖、分化、突起伸長、生存維持等の作用を発揮する。すなわち神経組織の機能発現および生体防御機構にとって欠かすことのできない因子である。PC12h 細胞は NGF によって分化誘導・神経突起伸長が起こるという特性をもった細胞株であるが、本研究過程で CA が PC12h 細胞の分化を促し神経突起の伸長を誘導する作用、すなわち NGF 様作用を有していることを見出した。更に NGF もまた Nrf2-EpRE 経路を活性化することを発見した。そこで、PC12h 細胞の Nrf2 をノックダウンしてみたところ、CA 及び NGF による神経突起伸長誘導作用が抑制された。更に検討を重ねた結果、CA は Nrf2 非依存的に Erk1/2 及び PI3K-Akt 経路の活性化を誘導し、これらのキナーゼの活性化が Nrf2 活性化及び神経分化に寄与していることが示唆された。

CA は NGF シグナル伝達に重要な役割を果たす p62/ZIP (TrkA [NGF 受容体] 補助因子) の発現を著しく増強させることを見出した。この反応は Nrf2 依存的

であった。更に p62/ZIP によって EpRE 活性化が誘導されることを発見した。また、CA による EpRE 活性化は p62/ZIP ノックダウン及び TrkA 阻害によって抑制された。これら結果は Nrf2-p62/ZIP-TrkA の間でポジティブフィードバックループが形成されることを示唆していた。

CA の NGF 様作用もまた p62/ZIP ノックダウン及び TrkA 阻害により抑制された。これらの結果は、CA による PC12h 細胞の分化／神経突起伸長において上記ポジティブフィードバックループが重要な役割を果たしていることを示唆していた。一方で CA は Nrf2 非依存的に分化誘導に必要なキナーゼの活性化を起こすことから、CA の NGF 様作用は Nrf2 とキナーゼ活性化の二つの作用の結果と考えられた。CA によって Nrf2-EpRE の著しい活性増強作用が認められたのは、上記ポジティブフィードバックループの形成やキナーゼ活性化等の作用が相乗的に働いたためと思われた。以上の結果より、CA は Nrf2 を介した第 2 相酵素誘導による解毒作用や酸化ストレス低減作用のみでなく、NGF 様作用（神経細胞分化／神経突起伸長／生存維持作用等）によって、神経変性疾患に対して予防／治療効果を発揮しうる可能性があると考えられた。

一謝 辞一

本論文を纏めるにあたり終始ご懇意なるご指導ご鞭撻を賜りました奈良先端科学技術大学院大学物質創成科学研究科 垣内喜代三教授に深く感謝し心から御礼申し上げます。また、本論文作成にあたり有益なご助言を賜りました奈良先端科学技術大学院大学物質創成科学研究科 片岡幹雄教授、廣田俊教授、森本積准教授に心から感謝申し上げます。

本論文のテーマである生体防御機構に関する研究を進めるにあたり多大なるご指導ご鞭撻を賜りました弘前大学大学院医学研究科附属高度先進医学研究センター 伊東健教授ならびに三村純正博士、岩手大学工学部応用化学生命工学科 佐藤拓己准教授、順天堂大学医学部大学院医学研究科 白澤卓二教授に心から感謝申し上げます。また、天然物の分離精製、同定等においてお力添え頂きました京都大学名誉教授 財団法人生産開発科学研究所学術顧問 藤多哲朗博士、神戸学院大学薬学部薬学科 横井利夫教授に深く感謝申し上げます。

本研究は主に長瀬産業株式会社研究開発センターにおいて行われました。本研究を支援して戴いた元長瀬産業株式会社執行役員 小野誠様、及び長瀬産業株式会社 宮崎寿次様、伊藤久富様、下条洋輔様、北島智恵子様をはじめとする BCP 研究開発チームのメンバーの皆さまに心より感謝申し上げます。

ー研究業績リストー

■学位論文の主たる部分を公表した論文

1. **Kosaka K**, Mimura J, Itoh K, Satoh T, Shimojo Y, Kitajima C, Maruyama A, Yamamoto M, Shirasawa T. Role of Nrf2 and p62/ZIP in the neurite outgrowth by carnosic acid in PC12h cells. J Biochem. 2010; 147(1):73-81.
2. Satoh T, **Kosaka K**, Itoh K, Kobayashi A, Yamamoto M, Shimojo Y, Kitajima C, Cui J, Kamins J, Okamoto S, Izumi M, Shirasawa T, Lipton SA. Carnosic acid, a catechol-type electrophilic compound, protects neurons both in vitro and in vivo through activation of the Keap1/Nrf2 pathway via S-alkylation of targeted cysteines on Keap1. J Neurochem. 2008; 104(4):1116-1131.
3. **Kosaka K**, Yokoi T. Carnosic acid, a component of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), promotes synthesis of nerve growth factor in T98G human glioblastoma cells. Biol Pharm Bull. 2003; 26(11):1620-1622.

■国際学会発表

1. **Kunio Kosaka**, Ken Itoh, Yosuke Shimojo, Takumi Satoh, Junsei Mimura, Atsushi Maruyama. Nrf2-mediated positive feedback mechanisms regulate carnosic acid-induced neural differentiation in PC12h cells. Meeting of Hirosaki International Forum of Medical Science 11th, Emerging Frontiers in Brain Research. March 19 2009 in Hirosaki, JAPAN
2. **Kunio Kosaka**, Yi Wang. Activation of Transcription Factor Nrf2 Plays Important Roles in Neural Protection and Differentiation by Carnosic Acid, a Component of Rosemary. International Community Healthcare and Healthcare Management Summit. May 24-25 2010 in Shanghai, CHINA

■取得特許

1. Inventors: **Kunio Kosaka** (Kobe, JP), Toshitsugu Miyazaki (Kobe, JP), Hisatomi Ito (Kobe, JP). “Method of promoting synthesis of nerve growth factor.” United States Patent 6,391,344.
2. Inventors: **Kunio Kosaka** (Kobe, JP), Toshitsugu Miyazaki (Kobe, JP), Toshio Yokoi (Akashi, JP). “Carnosic acid derivatives for promoting synthesis of nerve growth factor.” United States Patent 6,479,549.
3. Inventors: Toshitsugu Miyazaki (Kobe, JP), **Kunio Kosaka** (Kobe, JP), Hisatomi Ito (Kobe, JP). “Method of treating ulcers.” United States Patent 6,638,523.