



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Title	オキシインドール-クルクミンハイブリッド化合物のグルタチオン合成調節による抗酸化防御機構の解明(内容と審査の要旨(Summary))
Author(s)	井川, 貴礼
Report No.(Doctoral Degree)	博士(工学) 連創博甲第53号
Issue Date	2021-03-25
Type	博士論文
Version	ETD
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/81592

この資料の著作権は、各資料の著者・学協会・出版社等に帰属します。

氏名（本籍）	井川 貴礼（岐阜県）		
学位の種類	博士（工学）		
学位授与番号	甲第 53 号		
学位授与日付	令和 3 年 3 月 25 日		
専攻	創薬科学専攻		
学位論文題目	オキシインドール-クルクミンハイブリッド化合物のグルタチオン生合成調節による抗酸化防御機構の解明 (Elucidation of antioxidative properties of the oxindole-curcumine hybrid compound in glutathione biosynthesis)		
学位論文審査委員	(主査) 教授	横川 隆志	
	(副査) 教授	田中 香お里	
	(副査) 教授	竹森 洋	
	(副査) 教授	森田 洋子	

論文内容の要旨

神経変性疾患は、その発症のメカニズムの詳細は明らかになっておらず、完治させる治療法もいまだに確立されていない。細胞内の主要な抗酸化物質であるグルタチオンの欠乏は、アルツハイマー病、パーキンソン病などの神経変性疾患および統合失調症などの神経精神疾患を含む様々な疾患の病態において重要とされている酸化ストレスに関与していることが報告されている。本研究では、グルタチオン産生を制御している γ -グルタミルシステイン合成酵素 (GCLC) を標的として、GCLC プロモーター活性を指標に神経保護活性を持つオキシインドール化合物をスクリーニングし、GCLC の発現を増強させる化合物の探索を行った。その結果、GCLC の転写を強く誘導する化合物 GIF-2165X-G1 を見出し、GIF-2165X-G1 の GCLC 誘導機構を解析した。

はじめに、GCLCプロモーターをPCR法によりクローニングし、1.7 kbのレポーターコンストラクトを用いてプロモーター活性を増加させる新規オキシインドール誘導体を探した。約220 個のオキシインドール誘導体のうち、5個の化合物 GIF-0726-r、GIF-0885-r、GIF-2017、GIF-2127-r、および GIF-2165X-G1 が、HT22 細胞において濃度依存的に GCLCプロモーター活性を増加させた。最も強い効果をもつGIF2165X-G1はオキシインドール-クルクミンハイブリッドの化合物であった。クルクミンはHT22細胞に添加した際、25 μ M 以上の濃度において、強い細胞毒性を示すのに対し、GIF-2165X-G1は25~50 μ M の濃度でGCLCプロモーターを6倍程度活性化した。これらの結果は、クルクミン単独の構造よりもオキシインドールを付加したGIF-2165X-G1は、GCLCプロモーターの活性化増強という有効性と、クルクミンによる細胞毒性の低下という安全性の両面で有益な化合物であることを示している。次に、GIF-2165X-G1のGCLC mRNA、タンパク質発現に及ぼす影響およびラットGCLCプロモーターにおけるGIF-2165X-G1の応答領域の解析を行った。その結果、GIF-2165X-G1はマウス、ラットの種差を問わず GCLC mRNAの発現量増加を誘導し、それに伴ってタンパク質レベルでもGCLCの発現量を増加させることが明らか

かとなった。5 kbのGCLCプロモーター5'末端を段階的に欠失した5つのデリーションコンストラクトを用いたプロモーター解析から、GIF-2165X-G1は抗酸化剤応答配列 (ARE) の有無を問わず一様に GCLC プロモーター活性を上昇させた。抗酸化剤応答配列に結合する転写因子の Nrf2をノックアウトした Nrf2-KO HT22 を使用し、GIF2165X-G1による GCLC 転写活性と Nrf2-ARE 経路との関連をより詳細に調べたところ、Nrf2-KO 細胞においてもGIF-2165X-G1によるGCLC転写誘導が認められた。このことから、GIF-2165X-G1のGCLC転写活性の増加は Nrf2-ARE 経路とは無関係に誘導していること明らかとなった。さらに、転写促進に関連する転写因子の結合配列を欠落させたGCLCプロモーターを用いて解析を行った結果、Sp1結合配列がGIF2165X-G1による GCLC 遺伝子の誘導活性化に関与していることが明らかになった。本研究では、細胞内の主要な抗酸化物質・グルタチオン量を調節する化合物として、オキシインドール-クルクミンハイブリッド化合物GIF-2165X-G1を見出した。また、グルタチオンによる抗酸化防御機構において、Keap-1-Nrf2-ARE経路に加えて転写因子Sp1の活性化が重要であることを示した。これらの結果は、GIF-2165X-G1が酸化ストレス誘導性細胞死であるオキシトキシス/フェロトキシスの研究及び神経変性疾患の予防・治療薬のシーズとして有用な化合物であることを示している。

論文審査結果の要旨

アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、脊髄小脳変性症などの神経変性疾患は、加齢、ストレス、遺伝、生活習慣、環境因子など、様々な要因が複雑に絡み合って発症すると考えられている。最も患者数の多いアルツハイマー病、パーキンソン病は、そのほとんどが高齢で発症することから、我が国では介護による経済的および人的負担が増大し社会問題になっている。神経変性疾患は特定の神経細胞の変性・脱落を伴う疾患であり、認知症、運動障害などの原因の一つとなる。現在、臨床で使用されているアルツハイマー病やパーキンソン病の治療薬は、症状の進行を遅らせる、身体機能の低下を補う、などの対症療法に使用されることがほとんどであり、その薬効も不十分である。

細胞内抗酸化物質であるグルタチオン(GSH)の欠乏は、神経変性疾患および神経精神疾患などの病態形成において重要とされている酸化ストレスに直接関与していることが報告されている。本研究では、GSH合成の律速酵素であるグルタミン酸システインリガーゼ触媒サブユニット(γ -glutamylcysteine ligase catalytic subunit; GCLC)を標的として、GCLC プロモーター活性を指標に神経保護剤の候補であるオキシインドール化合物のスクリーニングにより、GCLC の発現増強を担う化合物の探索を行った、その結果、220個のオキシインドール誘導体のうち、5個の化合物 GIF-0726-r、GIF-0885-r、GIF-2017、GIF-2127-r、および GIF-2165X-G1 は、HT22 細胞において濃度依存的に GCLC プロモーター活性を増加させた。最も強い効果を示した GIF2165X-G1 はオキシインドールとクルクミンのハイブリッド化合物であり、両者と共通の特徴を有していた。しかし、クルクミンは 25 μ M 以上の濃度で強い細胞毒性を示すのに対し、GIF-2165X-G1 は 25~50 μ M の濃度で GCLC プロモーターを 6 倍以上に活性化することから、クルクミンによる細胞毒性が改善され安全性の面からも有益な化合物であることが示された。次に、GIF-2165X-G1 の GCLC mRNA 量およびタンパク質量に及ぼす影響を、リアルタイム PCR 法およびウエスタンブロット法を用いて評価した結果、GIF-2165X-G1 はマウス、ラットの種差を問わず GCLC mRNA およびタンパク質の発現量を増加させた。様々な長さのラット GCLC プロモーターをクローニングし、GIF-2165X-G1 の応答領域の解析を行った結果、GIF-2165X-G1 は、実験に用いたプロモーターに少なくとも 3 箇所報告されている抗酸化剤応答配列(antioxidant response element; ARE)の有無を問わず一様に GCLC プロモ

ーター活性を上昇させた。したがって、GIF-2165X-G1によるGCLCの転写活性化は、細胞内の主要な抗酸化機構であるNF-E2-related factor 2 (Nrf2)-ARE経路とは無関係であることが明らかとなった。詳細にGCLCプロモーターを解析した結果、転写開始部位に比較的近いSp1結合配列がGIF2165X-G1によるGCLC遺伝子の誘導活性化に関与していることが明らかになった。これまで報告された様々なGCLC転写誘導剤はNrf2-ARE経路を介することが知られているが、本研究では、オキシインドール-クルクミンハイブリッド化合物はSp1転写因子を介してGCLCの転写を調節することを示した。以上の知見は、GSH生合成の誘導を目的とした抗酸化剤の研究開発において、転写因子Sp1が新規の標的となることを示したもので、酸化ストレス関連疾患の治療薬開発においても重要な標的となることが期待できる。

本知見は、細胞内の主要な抗酸化物質であるGSHの生合成を上方制御するオキシインドール-クルクミンハイブリッド化合物を見出し、GCLCのプロモーター解析からその作用機構の一端を解明したもので、神経変性疾患の病態解明に貢献することが期待できる。こうした観点より、本論文は学術的価値が極めて高く、博士学位論文に値するものと判定した。

最終試験結果の要旨

井川氏の学位論文は、細胞内の主要な抗酸化物質グルタチオンの生合成を制御する化合物を探索し、その特徴を同定したものである。グルタチオン生合成の律速段階を触媒するGCLCの転写活性を指標として、神経保護活性を有する約200個のオキシインドール誘導体をスクリーニングした結果、オキシインドール-クルクミンハイブリッド化合物のGIF-2165X-G1を見出した。この化合物のGCLC上方制御機構を様々な方法で解析した結果、GCLCの誘導に転写因子のSp1が関与することが明らかとなった。酸化ストレスが関わる神経変性疾患の新規標的分子として、治療薬の開発に貢献することが期待できる知見である。審査付き論文としても公表済みで、本論文が学位論文として価値のある内容であることを確認した。公聴会においては学位論文の内容に関する事項、すなわち、GCLCの神経保護における役割、プロモーター解析の詳細、抗酸化応答機構Nrf2-ARE経路の神経保護における意義などに関して諮問を行った。申請者からは十分な内容の回答が得られたので、博士（工学）の学位に適するものと判断し、最終試験に合格したと判定した。

論文リスト

Ikawa T, Sato M, Oh-hashii K, Furuta K, Hirata Y, Oxindole-curcumin hybrid compound enhances the transcription of γ -glutamylcysteine ligase, *European Journal of Pharmacology* 896 (2021) 173898 【Impact Factor: 3.263, CiteScore: 5.5】