

機関番号：14301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790070

研究課題名 (和文) 酸化ストレス防御機構の解明およびその新規活性化物質の探索

研究課題名 (英文) Elucidation of defensive mechanisms against oxidative stress and search of novel antioxidative substances

研究代表者

泉 安彦 (IZUMI YASUHIKO)

京都大学・薬学研究科・助教

研究者番号：60456837

研究成果の概要 (和文)：

本研究では、酸化ストレスに対する生体応答であり、抗酸化遺伝子の発現を誘導するNuclear erythroid 2 p45-related factor 2 (Nrf2)-antioxidant response element (ARE) システムの調節機構解明と新規活性化物質の探索を行った。まず、生理活性物質によるNrf2-ARE経路の調節機構を検討したところ、既知のNrf2-ARE活性化物質であるスルフォラファン作用をビタミンAであるレチノイン酸が増強することを見出した。また、青紫蘇の抽出物から新規ARE活性化物質を同定し、6-hydroxydopamine誘発細胞死を抑制することを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：

Nuclear erythroid 2 p45-related factor 2 (Nrf2)-antioxidant response element (ARE) pathway, which induces expression of antioxidant proteins, is a cellular response to oxidative stress. In this study, we clarified the regulatory mechanisms of Nrf2-ARE system and identified a novel activator. First, we examined the effect of bioactive substances on Nrf2-ARE activation by sulforaphan, which is a well-known activator. We found that retinoic acid enhanced sulforaphan-induced ARE activation. Second, we identified a novel activator from extract of *Perilla frutescens* and clarified the protective effect against 6-hydroxydopamine-induced cell death.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：薬理学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：酸化ストレス、Nrf2-ARE 経路

1. 研究開始当初の背景

酸化ストレスは様々な疾患、特に脳梗塞やパーキンソン病の主要な要因として注目されており、酸化ストレスに対する生体防御機構の包括的理解は臨床的見地からも重要である。酸化ストレスに対する生体応答におい

て重要な機能を担っているのが、Nrf2-ARE システムである。しかし、既知の Nrf2-ARE 経路活性化物質は、親電子性物質として作用するため Nrf2 活性化の有効濃度と細胞毒性を発現する濃度が近いことが問題とされている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、細胞死を引き起こさない強力な ARE 活性化方法の開発であり、そのために二つの目標を設定した。一つ目は、(1) 既存の ARE 活性化物質の活性を増強する事。二つ目は、(2) 既存の物質よりも強力な新規の ARE 活性化物質を探索することである。

3. 研究の方法

細胞にはラット副腎髄質由来褐色細胞腫 PC12 細胞を用いた。ARE 活性の評価のために、ルシフェラーゼレポーターアッセイ系を構築した。

4. 研究成果

(1) 神経伝達物質や神経栄養因子などを含む生理活性物質の ARE 活性化作用を網羅的に解析したところ、ビタミン A の一種であるレチノイン酸が弱いながら ARE 活性化作用を有していることが分かった。さらに、レチノイン酸は、既知の ARE 活性化物質であるスルフォラフアンの作用を相乗的に増強することを見出した。レチノイン酸には all-trans 型と cis 型のアイソマーが存在するが、いずれのアイソマーも同様に相乗作用を示した。しかし、レチノイド受容体アゴニストは ARE 活性化作用および増強作用のいずれも有していなかった。したがって、レチノイン酸はレチノイド受容体を介さない経路で ARE 活性増強作用を示すことが示唆された。

(2) 次に、いくつかの食用植物素材から探索した結果、青紫蘇のジエチルエーテル抽出物中に ARE 活性化物質が含まれていることを見出した。HPLC による分離および精製を繰り返し、ARE 活性化物質の単離に成功した。質量分析および NMR 解析により化合物の構造を同定した。本化合物は、細胞毒性を示さない濃度域で、既知の ARE 活性化物質であるスルフォラファンよりも強力な活性化作用を示した。また、細胞に処置すると、細胞内グルタミン酸量や NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 活性、ヘムオキシゲナーゼ-1 タンパク量を増加させ、6-hydroxydopamine 誘発細胞死を抑制することを明らかにした。

以上より、我々は、細胞毒性を低減させた ARE 活性化方法の開発に成功したと言える。したがって、本研究結果は、酸化ストレスが関与する様々な疾患に対する ARE 活性化薬適応の可能性を広げるものであると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 11 件)

① Mizuno, K., Kume, T., Muto, C., Takada-Takatori, Y., Izumi, Y., Sugimoto, H., Akaike, A. Glutathione biosynthesis via activation of the nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2)-antioxidant-response element (ARE) pathway is essential for neuroprotective effects of sulforaphane and 6-(methylsulfinyl) hexyl isothiocyanate. J. Pharmacol. Sci. 査読有、115、2011、320-328

② Wakita, S., Izumi, Y., Matsuo, T., Kume, T., Takada-Takatori, Y., Sawada, H. and Akaike, A. Reconstruction and quantitative evaluation of dopaminergic innervation of striatal neurons in dissociated primary cultures. J. Neurosci. Methods. 査読有、192、2010、83-89

③ Matsuo, T., Izumi, Y., Kume, T., Takada-Takatori, Y., Sawada, H. and Akaike, A. Protective effect of aripiprazole against glutamate cytotoxicity in dopaminergic neurons of rat mesencephalic cultures. Neurosci. Lett. 査読有、481、2010、78-81

④ Ohnishi, M., Katsuki, H., Unemura, K., Izumi, Y., Kume, T., Takada-Takatori, Y. and Akaike, A. Heme oxygenase-1 contributes to pathology associated with thrombin-induced striatal and cortical injury in organotypic slice culture. Brain Res. 査読有、1347、2010、170-178

⑤ Ohnishi, M., Katsuki, H., Izumi, Y., Kume, T., Takada-Takatori, Y. and Akaike, A. Mitogen-activated protein kinases support survival of activated microglia that mediate thrombin-induced striatal injury in organotypic slice culture. J. Neurosci. Res. 査読有、88、2010、2155-2164

⑥ Matsuo, T., Izumi, Y., Wakita, S., Kume, T., Takada-Takatori, Y., Sawada, H. and Akaike, A. Haloperidol, spiperone, pimozide and aripiprazole reduce intracellular dopamine content in PC12 cells and rat mesencephalic cultures: Implication of inhibition of vesicular transport. Eur. J. Pharmacol. 査読有、640、2010、

⑦Katsuki, H., Kurosu, S., Michinaga, S., Hisatsune, A., Isohama, Y., Izumi, Y., Kume, T. and Akaike, A. Depolarizing stimuli cause persistent and selective loss of orexin in rat hypothalamic slice culture.

Peptides 査読有、31、2010、1131-1138

⑧Yamamoto, N., Izumi, Y., Matsuo, T., Wakita, S., Kume, T., Takada-Takatori, Y., Sawada, H. and Akaike, A. Elevation of heme oxygenase-1 by proteasome inhibition affords dopaminergic neuroprotection.

J. Neurosci. Res. 査読有、88、2010、1934-1942

⑨Takada-Takatori, Y., Kume, T., Izumi, Y., Niidome, T., Fujii, T., Sugimoto, H. and Akaike, A. Mechanisms of chronic nicotine treatment-induced enhancement of the sensitivity of cortical neurons to the neuroprotective effect of donepezil in cortical neurons.

J. Pharmacol. Sci. 査読有、112、2010、265-272

⑩Yamakawa, K., Izumi, Y., Takeuchi, H., Yamamoto, N., Kume, T., Akaike, A., Takahashi, R., Shimohama, S. and Sawada, H. Dopamine facilitates α -synuclein oligomerization in human neuroblastoma SH-SY5Y cells.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 査読有、391、2010、129-134

⑪Akaike, A., Takada-Takatori, Y., Kume, T. and Izumi, Y. Mechanisms of neuroprotective effects of nicotine and acetylcholinesterase inhibitors: role of $\alpha 4$ and $\alpha 7$ receptors in neuroprotection.

J. Mol. Neurosci. 査読有、40、2010、211-216

[学会発表] (計 14 件)

①山本隆盛, 泉安彦, 江角将之, 久米利明, 赤池昭紀 パラコート誘発細胞死における細胞内ヘムの関与

日本薬学会第 131 年会、2011. 3. 30、静岡、グランシップ ツインメッセ静岡

②松尾剛明, 泉安彦, 久米利明, 金子周司, 澤田秀幸, 杉本八郎, 赤池昭紀 PC12 細胞における細胞外および細胞内ドパミンに対するクルクミンの作用: 細胞膜および小胞モノアミントランスポーターの関与

第 84 回日本薬理学会年会、2011. 3. 24、横浜パシフィコ横浜

③大西正俊, 香月博志, 井上敦子, 泉安彦, 久米利明, 赤池昭紀 培養大脳皮質-線条体切片におけるトロンビン誘発障害と heme oxygenase-1 の関与

第 84 回日本薬理学会年会、2011. 3. 23、横浜パシフィコ横浜

④五百蔵忠明, 赤尾昌治, 久米利明, 井口守丈, 泉安彦, 赤池昭紀 ラット心虚血-再灌流障害に対するセロフェンド酸による保護作用

第 84 回日本薬理学会年会、2011. 3. 23、横浜パシフィコ横浜

⑤Akaike, A., Kume, T. and Izumi, Y. Neuroprotective effects of nicotine and acetylcholinesterase inhibitors.

The 20th Japan-Korea Joint Seminar on Pharmacology、2010. 11. 25、Kagoshima, Kagoshima Public Center

⑥大西正俊, 香月博志, 井上敦子, 泉安彦, 久米利明, 赤池昭紀 トロンビンによる線条体障害を媒介する活性化ミクログリアにおける MAP キナーゼの役割

第 118 回日本薬理学会近畿部会、2010. 11. 19、大阪 千里ライフサイエンスセンター

⑦水野景太, 久米利明, 大西絵里香, 泉安彦, 赤池昭紀 培養線条体細胞における sulforaphane による Nrf2-ARE 経路活性化機構の解明

第 118 回日本薬理学会近畿部会、2010. 11. 19、大阪 千里ライフサイエンスセンター

⑧畝村和宏, 久米利明, 近藤みなみ, 泉安彦, 赤池昭紀 グルココルチコイドは培養大脳皮質アストロサイトにおいてグルココルチコイド受容体の発現低下を介して細胞増殖を抑制する

第 20 回日本臨床精神神経薬理学会第 40 回日本神経精神薬理学会合同年会、2010. 9. 16、仙台市 仙台国際センター

⑨本郷春幸, 木原武士, 夏目和明, 泉安彦, 久米利明, 杉本八郎, 赤池昭紀 ロテノンによるタウ蛋白のリン酸化および細胞毒性に関する検討

次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム、2010. 9. 11、京都市 京都大学薬学部

⑩松尾剛明, 泉安彦, 久米利明, 澤田秀幸, 赤池昭紀 アリピプラゾールによるグルタミン酸誘発ドパミンニューロン死に対する

保護作用機序の解明

次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム、
2010.9.11、京都市 京都大学薬学部

⑪久米利明, 市川茉莉那, 泉安彦, 赤池昭紀
ラット初代培養心筋細胞における酸化
ストレスに対する sulforaphane の保護作用
機序の解析

第 117 回日本薬理学会近畿部会、2010.7.8、
徳島 徳島県郷土文化会館

⑫Wakita, S., Izumi, Y., Kume, T., Sawada,
H. and Akaike, A. Reconstruction of the
nigrostriatal projections in dissociated
primary cultures: A role of striatal cells
in dopaminergic neurite outgrowth.

World Pharma 2010、2010.6.19、Copenhagen,
Denmark

⑬ Kume, T., Izumi, Y. and Akaike, A.
Neuroprotective effect of serofendic acid
on in vitro and in vivo neuronal injury.
World Pharma 2010、2010.6.19、Copenhagen,
Denmark

⑭Izumi, Y., Matsushima, S., Yamamoto, N.,
Kume, T., Sawada, H. and Akaike, A.
Paraquat activates Nrf2-ARE pathway:
implication of decrease in proteasome
activity in dopamine-mediated
cytotoxicity.

World Pharma 2010、2010.6.19、Copenhagen,
Denmark

6. 研究組織

(1) 研究代表者

泉 安彦 (IZUMI YASUHIKO)
京都大学・薬学研究科・助教
研究者番号：60456837

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし