



Title	底生海洋生物由来のストレス誘発神経細胞死に対する保護物質の探索
Author(s)	須那, 秀陽
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49652
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	須那秀陽
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第22883号
学位授与年月日	平成21年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学位論文名	底生海洋生物由来のストレス誘発神経細胞死に対する保護物質の探索
論文審査委員	(主査) 教授 小林 資正 (副査) 教授 藤岡 弘道 教授 小比賀 聡 教授 村上 啓寿

論文内容の要旨

高齢化社会を迎えた日本にとって近年の脳神経疾患の急増は深刻な問題となっており、画期的な治療薬の開発が求められているが、まだ認可されているものは数少ないのが現状である。脳神経疾患は脳血管の循環不全のために脳血流量が減少し、神経細胞が虚血による低酸素状態に曝されることが原因の一つであると考えられている。しかしながら、虚血状態からどのようなシグナル伝達を経て細胞死に至るかというメカニズムは必ずしも一様ではなく、虚血状態から細胞死への経路としていくつかが提唱されている。また一方で、活性酸素種などのフリーラジカルによって引き起こされる酸化ストレスと虚血性脳損傷の関連性が報告され、酸化ストレス克服作用をもつ化合物が脳保護剤として研究・開発されてきた。すなわち、脳虚血のため低酸素状態に陥ると、神経細胞内で発生した活性酸素種により酸化ストレスが引き起こされ、通常とは異なるシグナル伝達系が活性化して細胞死に至ると考えられている。したがって、酸化ストレスによる神経細胞死を抑制することのできる化合物は、脳神経疾患治療薬の有望な候補になりうるとともに、その病態を解明するためのツールとなる可能性がある。このような背景から、著者は二種類の酸化ストレスモデルを構築し、底生海洋生物の抽出物から神経保護活性物質を探索した。

興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸は、疾患時には過剰に放出され神経毒性を誘発することが知られている。高濃度のグルタミン酸は、神経細胞膜上のシスチン/グルタミン酸交換輸送体を阻害して細胞内へのシスチンの取り込みを停止させるため、生体内で活性酸素種の除去に必要なグルタチオンの生合成が阻害され、酸化ストレスが誘発される。そこで、マウス海馬由来神経細胞HT22を用いて構築したグルタミン酸誘発酸化ストレスモデルを用いて、底生海洋生物の抽出エキスをスクリーニングし、2001年にインドネシアで採集した海綿 *Monanchora unguiculata* の抽出エキスを顕著な神経保護活性を見出した。活性試験の結果を指標にこのエキスを精製し、主活性成分として海綿由来グアニジルアルカロイド crambescidin 800 と2種の類縁体 crambescidic acid および neofolitaspate 2 を単離した。Crambescidin 800 は $EC_{50} = 0.06 \mu\text{M}$ という低濃度でグルタミン酸によって引き起こされるアポトーシスを抑制し、2種の類縁体ではわずかながら活性の減弱が見られたが crambescidin 800 と同様に低濃度で神経保護活性を示した。このことから、crambescidin 800 の hydroxyspermidine 構造は活性発現には重要ではないことが示唆された。さらに、crambescidin 800 は低酸素負荷や一酸化窒素誘起酸化ストレスモデルといった数種の系においても神経保護活性を示した。次にその作用について検討したところ、crambescidin 800 は、グルタミン酸処理時に観察される細胞内グルタチオン量の減少には影響せず、細胞内活性酸素種の蓄積やMAPキナーゼ経路の活性化も、神経保護作用を示す濃度では抑制しなかった。そこで、crambescidin 800 の標的分子を明らかにする目的で、DNA マイクロアレイ法による網羅的な遺伝子変動の解析を行った。その結果、大部分が機能未知の遺伝子であったも

の、グルタミン酸処理により変動する遺伝子のうち30種がcrambescidin 800により定常状態に保持されることが明らかとなった。

一方ヨード酢酸 (iodoacetic acid: IAA) は、解糖系酵素のglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を阻害し、HT22細胞に対するIAA処理はATP量を低下させて酸化ストレスを引き起こし細胞死を誘導することから、擬似的な虚血モデルとされている。そこで、HT22細胞にIAAを処理した化学的虚血モデルを構築し、底生海洋生物の抽出エキスをスクリーニングした。その結果、2005年にインドネシアで採取した*Dysidea*属海綿の抽出エキスを活性を見出した。このエキスを活性試験の結果を指標に精製し、dysideamineと命名した新規セスキテルペンキノンと既知類縁体のbolinaquinoneを単離した。その作用機序解析において、dysideamineはIAA処理による細胞内ATPの一過性の減少を抑制しないが、活性酸素種の増加を完全に抑制することを明らかにした。さらに、類似の化学構造を有するsmenospongine類についても神経保護活性を評価し、その活性をdysideamineと比較した。その結果、キノン骨格を持つものはdysideamineとほぼ同等の神経保護活性を示し、さらにフェノールタイプのものであればより顕著な神経保護活性が見られた。

また、神経成長因子 (Nerve Growth Factor: NGF) に代表される神経栄養因子は、神経の分化・維持に大きな役割を果たしているが、これらの因子は神経組織の損傷時にも働いて損傷の拡大を防ぐなど、神経保護効果も併せ持つことが近年明らかになり、神経栄養因子と同じ作用を示す低分子化合物が神経疾患治療薬として期待されている。このような知見から、dysideamineが神経栄養因子様作用も併せ持つか否かを検討した。その結果、dysideamineはマウス神経芽細胞腫Neuro 2Aに対して神経突起形成を誘導し、神経細胞への分化マーカーであるアセチルコリンエステラーゼの活性も上昇させることが確認された。これらのことから、dysideamineがNeuro 2Aを形態的・機能的に神経様細胞へと分化させることが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

日本は、高齢化社会を迎えており、脳梗塞など脳神経疾患が深刻な問題となっている。脳神経疾患は、脳血管が閉塞して脳血流量が減少するために、神経細胞が虚血による低酸素状態に曝されることが原因と考えられているが、画期的な治療薬がなく、認可されているものも数少ないのが現状である。脳虚血のため低酸素状態に陥ると、神経細胞内で発生した活性酸素種により酸化ストレスが引き起こされ、通常とは異なるシグナル伝達系が活性化して細胞死に至ることが明らかにされている。したがって、酸化ストレスによる神経細胞死を抑制することのできる化合物は、脳神経疾患治療薬の有望な候補になりうるとともに、その病態を解明するためのツールとなる可能性がある。このような背景から、申請者は二種類の酸化ストレスモデルを構築し、底生海洋生物の抽出物から神経保護活性物質を探索した。

興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸は、疾患時には過剰に放出され神経毒性を誘発することが知られている。高濃度のグルタミン酸は、神経細胞膜上のシスチン/グルタミン酸交換輸送体を阻害して細胞内へのシスチンの取り込みを停止させるため、生体内で活性酸素種の除去に必要なグルタチオンの生合成が阻害され、酸化ストレスが誘発される。そこで、マウス海馬由来神経細胞HT22を用いて構築したグルタミン酸誘発酸化ストレスモデルを用いて、底生海洋生物の抽出エキスをスクリーニングし、インドネシアで採集した海綿*Monanchora unguiculata*の抽出エキスを顕著な神経保護活性を見出した。活性試験の結果を指標にこのエキスを精製し、主活性成分として海綿由来グアニジルアルカロイドcrambescidin 800と2種の類縁体を単離した。Crambescidin 800は低濃度でグルタミン酸によって引き起こされるアポトーシスを抑制し、神経保護活性を示した。さらに、crambescidin 800は低酸素負荷や一酸化窒素誘起酸化ストレスモデルといった数種の系においても神経保護活性を示した。次にその作用について検討したところ、これまでにcrambescidin 800は、グルタミン酸処理時に観察される細胞内グルタチオン量の減少には影響せず、細胞内活性酸素種の蓄積やMAPキナーゼ経路の活性化も、神経保護作用を示す濃度では抑制しないことが判明している。

一方ヨード酢酸 (iodoacetic acid: IAA) は、解糖系酵素のglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を阻害し、HT22細胞に対するIAA処理はATP量を低下させて酸化ストレスを引き起こして細胞死を誘導することから、擬似的な虚血モデルとされている。そこで、HT22細胞にIAAを処理した化学的虚血モデルを構築し、底生海

洋生物の抽出エキスをスクリーニングした。その結果、インドネシアで採取した*Dysidea*属海綿の抽出エキスを活性を見出した。このエキスを活性試験の結果を指標に精製し、dysideamineと命名した新規セスキテルペンキノンと既知類縁体のbolinaquinoneを単離した。その作用機序解析において、dysideamineはIAA処理による細胞内ATPの一過性の減少を抑制しないが、活性酸素種の増加を完全に抑制することを明らかにした。

以上の成果は、博士（薬学）の学位論文として十分価値のあるものと認められる。