



Title	Febuxostat ameliorates secondary progressive experimental autoimmune encephalomyelitis by restoring mitochondrial energy production in a GOT2-dependent manner
Author(s)	清水, 幹人
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/72514
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について 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

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 清水 幹人	
論文審査担当者	(職) 氏 名
	主 査 大阪大学教授 望月 秀 樹
	副 査 大阪大学教授 骨島 晴 彦
	副 査 大阪大学教授 池 田 亨
<p>論文審査の結果の要旨</p> <p>二次進行型多発性硬化症の主病態である神経変性に対するフェブキソスタット(Fx)の効果の確認とその機序の同定のため、モデルマウス(SP-EAE)を使用し研究を行った。FxはSP-EAEマウスの臨床症状を改善したため、脳脊髄でDNAマイクロアレイ解析を行ったところ、Fx投与によりミトコンドリア関連遺伝子の著明な増大を認めた。その中でATP産生に直接寄与するglutamate oxaloacetate transaminase2 (GOT2)を調べたところ、SP-EAEで炎症部位に一致しGOT2が低下し、Fxの投与で改善することを突き止めた。さらにロテノン(Rot)をNeuro2aに添加しエネルギー欠乏モデルを作成したところ、Rotにより低下したATP合成はFxを投与により増加増加するものの、GOT2をノックダウンすると改善効果は消失した。これによりFxはGOT2を介してミトコンドリア機能を改善することが示唆された。治療法の少ない二次進行型多発性硬化症の治療薬開発に寄与する有意義な研究と思われ、学位に値するものと認める。</p>	

論 文 内 容 の 要 旨
Synopsis of Thesis

氏 名 Name	清水 幹人
論文題名 Title	Febuxostat ameliorates secondary progressive experimental autoimmune encephalomyelitis by restoring mitochondrial energy production in a GOT2-dependent manner(フェブキソスタットによる神経細胞のミトコンドリア機能と二次進行型EAE の改善に関して)
論文内容の要旨	
<p>〔目的(Purpose)〕</p> <p>多発性硬化症(MS)は中枢神経の脱髄を特徴とする疾患であるが、進行期には神経細胞の変性も認められ不可逆的な中枢神経のダメージを来すことが知られている。神経変性の進行はミトコンドリア機能障害と活性酸素種動態がその一因となることが示されてきており、それらを阻害することで悪化を食い止める試みが様々な研究で行われている。一方、キサンチンオキシダーゼ(XO)阻害薬であるフェブキソスタット(Fx)は、薬効機序の過程で活性酸素種の生成を阻害することが知られており、すでに様々な疾患において投与による改善効果が報告されている。中枢神経系に対しても筋萎縮性側索硬化症モデル(SODマウス)の解析で神経変性への保護効果を示すことが報告されている。われわれの研究室では、多発性硬化症への応用を考え、その疾患モデル(EAE)マウスにおいて解析を行ったところ脳脊髄・血清でFxの阻害対象であるXOの活性が増大おり、さらにFx投与によりEAE所見が臨床的・病理学的に改善することを示してきた。特に興味深いことに脱髄所見だけでなく、軸索障害も改善させることから、神経変性が病態の主体であり従来の免疫療法の効果が限定的な二次進行型多発性硬化症(SP-MS)をターゲットに、その効果と機序の解明を行うこととした。</p> <p>〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕</p> <p>まずSP-MSへのFxの効果を確認するため、NOD(Non Obese Diabetes)マウスを免疫してモデルを作成し(SP-EAEマウス)、Fxの投与を試みた。SP-EAEマウスは一度の再発寛解経て、その後徐々に臨床症状を悪化させてゆくが、Fx投与によりその臨床症状は有意に改善した。次にその機序を明らかにするために、SP-EAEマウスの脳脊髄でDNA マイクロアレイ解析を行ったところ、Fxの投与によりミトコンドリア関連遺伝子が多数増大することを突き止めた。さらにラットのprimary neuronを用いて、Fx投与による発現の変化を確認したところ、マイクロアレイでターゲット候補として挙がっていた遺伝子の一つであるGlutamate oxaloacetate transaminase2 (GOT2)の発現が、タンパクレベルでも増大していることが免疫染色とウェスタンブロットにより確認された。GOT2はミトコンドリア内膜に存在し、クレブス回路の副経路としてATP産生にかかわることが知られているため、Fxはミトコンドリア機能改善効果を持つことが想定された。次にマウスの脊髄でGOT2の発現パターンを確認したところ、神経細胞のミトコンドリアに高発現していることが免疫染色で確認された。そこでSP-EAEマウスにおいてFxによる脊髄GOT2の変化を解析したところ、免疫染色により炎症部位に一致してGOT2の低下が引き起こされ、Fx投与によりそれが改善することが明らかになった。</p> <p>Fxによるミトコンドリア機能の改善効果を確認するため、ATPをミトコンドリア機能の指標として、マウス神経芽細胞腫のcell lineであるNeuro2a(N2a)を用いて実験を行った。まず単純にN2aにFxを投与しただけではATPは増大しないことを確認した。これは、GOT2はATP産生の副経路にかかわる分子であることと矛盾しないと考えられた。そこで電子伝達系に関わるComplex1の阻害剤(ロテノン)をN2aに添加することでエネルギー欠乏のモデルを作成し、Fxの効果を解析したところ、ロテノンにより低下したATP合成はFxにより有意に改善することが判明した。さらにsiRNAによりGOT2をノックダウンしたところ、FxによるATP合成改善効果は消失した。従ってFxはGOT2の増加を介してミトコンドリア機能を改善させることが示唆された。</p> <p>〔総括(Conclusion)〕</p> <p>Fxは従来活性酸素種合成を抑制することで、神経変性に保護的に作用することが知られていたが、今回の実験によりFxはGOT2の増加とそれに伴うミトコンドリア機能の改善により神経変性を抑制することが新たに判明した。FxがGOT2を増大させる機序に関しては未だ不明な点が多いが、その神経変性抑制効果は治療法が限られる二次進行型多発性硬化症の新たな治療選択肢となるものと考えられた。</p>	