

氏 名	布施 雄士
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 記 番 号	博甲第 8682 号
学位授与年月	平成 30年 3月 23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審 査 研 究 科	人間総合科学研究科
学位論文題目	Modulation of biological defense by the use of different Nrf2-activating compounds (多様な Nrf2 活性化剤を活用した生体防御機構の適正な制御)
主 査	筑波大学教授 薬学博士 熊谷 嘉人
副 査	筑波大学准教授 博士（薬学） 鈴木 裕之
副 査	筑波大学准教授 博士（医学） 松坂 賢
副 査	筑波大学助教 博士（医学） 濱田 理人

論文の内容の要旨

布施雄士氏の博士学位論文は、ゼブラフィッシュにおける Nrf2 活性化剤曝露による臓器特異的誘導メカニズムおよび異なる Nrf2 活性化剤の前処置による化学物質の毒性軽減について検討したものである。その要旨は以下のとおりである。

（目的）

Nrf2 システムは、酸化ストレスや化学物質を代謝・除去する生体防御機構である。薬や食品中の成分を利用した Nrf2 活性化は、酸化ストレス関連疾病の予防・治療や、環境汚染物質による健康被害軽減策への応用が期待されているが、実用化する上で解決しなければならない課題がいくつかある。例えば、生体防御遺伝子の転写活性化を、必要とする臓器で起こせなければ、効率的な予防・治療効果が得られない。また、Nrf2 活性化剤自体の毒性によって、体を傷つけることがあってはならない。本研究では、著者は一連の課題に対する解決策をみつけることを目的とした。

（対象と方法）

著者は全身における転写活性化を一度に観察することができ、また化合物の薬効と毒性を簡単に評価できるゼブラフィッシュ胚を活用している。全身における遺伝子発現プロファイルは、whole-mount *in situ* hybridization 法で、遺伝子発現量は、RT-PCR 法やリアルタイム qPCR 法で評価している。

著者は化合物の薬理・毒性効果は、受精後 4 日目のゼブラフィッシュ胚を培養ディッシュ内で毒物やストレスに曝露し、その後の生存率によって検討している。Nrf2 活性化剤の効果は、受精後 3.5 日から 12 時間の前処理を行い、その後ストレスに曝露することで同様に評価している。

現象の Nrf2 依存性を調べる場合には、著者は Nrf2 変異型ゼブラフィッシュ系統（*nrf2a^{fh318}* 系統）を

用いて、上記アッセイを行った。その他の生体分子の機能評価には、初期胚にモルフォリノオリゴヌクレオチドを注入することによってノックダウン解析を行っている。

(結果)

まず、著者は組織による転写活性化メカニズムの違いを明らかにすることを試みている。先行研究成果より、多くのゼブラフィッシュ Nrf2 標的遺伝子は親電子物質刺激によって、肝臓、エラ、鼻で誘導されるが、著者は抗酸化遺伝子 *hmx1a* は、肝臓特異的に誘導されることを明らかにしている。また、この誘導プロファイルには、Bach1b という転写抑制因子およびその転写抑制を解除するヘムが重要であることを解明している。本研究では、さらにゼブラフィッシュにおけるヘム-Bach1 軸を詳細に解析し、このメカニズムの理解を目指している。ゼブラフィッシュにおける Bach1 遺伝子のホモログである *bach1a* および *bach1b* をノックダウンすると *hmx1a* が肝臓以外でも誘導されることを見出している。さらに、両 Bach1 オルソログとも全身に発現していたため、著者は肝臓では Bach1 による抑制が解除されていると考え、肝臓に高濃度で存在しているヘムがその役割を担っていると予想している。ヘム濃度を薬理的に変化させると、*hmx1a* の誘導プロファイルが Bach1 依存的に変化したことから、著者はヘム-Bach1 軸のはたらきによって *hmx1a* の誘導臓器が決定されていることを明らかにしている。

さらに、Nrf2 活性化剤による生体防御能の誘導について調べている。よく利用される Nrf2 活性化剤サルフォラフェンは、亜ヒ酸曝露後の生存率を改善した。しかし、亜ヒ酸曝露時間が 48 時間以上になると複合毒性が現れることも発見している。この複合毒性は、抗リウマチ薬として市販されている Nrf2 活性化剤オーラノフィンとの組み合わせでは現れず、生存率改善効果のみが見られている。また、著者はオーラノフィンが過酸化水素曝露時の生存率も顕著に改善することを見出し、より安全に Nrf2 を活性化できる化合物であることを示唆している。

(考察)

本研究において、著者はゼブラフィッシュを活用し、臓器特異的・標的遺伝子特異的な誘導メカニズムの一つを明らかにしている。また、Nrf2 標的遺伝子の誘導に影響を与える因子として各臓器の代謝特性の違い（ヘム濃度）を示している。このことは、各臓器の特性に応じた Nrf2 活性化剤を活用することで、ストレス抵抗性を誘導する臓器を変えることができる可能性を示唆している。

Nrf2 活性化剤曝露により酸化ストレスや亜ヒ酸の毒性を軽減できるが、薬剤とストレスとの組み合わせによっては複合毒性を生じる可能性があるため、注意が必要であると考えている。最終的に著者は、毒性がある程度低いということがわかっている既承認薬の中から、Nrf2 活性化剤を探すというアプローチを介して実用化を期待している。

審査の結果の要旨

(批評)

著者はゼブラフィッシュを用いて、毒性の少ない Nrf2 活性化剤を探索する一方で、臓器特異的な遺伝子誘導を起こさせる化合物を探すことで、疾病や病態に応じて Nrf2 依存的な生体防御機構を適正に制御できる可能性を示した。今後は得られた知見を基にして、マウス等を用いた検討を行うことが望まれる。

平成 29 年 12 月 21 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。よって、著者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。