

氏名（本籍）	牧野 純也（愛知県）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	甲 第160号
学位授与年月日	平成28年3月17日
学位授与の条件	学位規則第4条第1項該当者
学位論文の題名	動脈硬化症進展抑制に向けた抗酸化酵素機能の制御に関する研究
論文審査委員	主査 五十里 彰 副査 稲垣 直樹 副査 福光 秀文

## 論文内容の要旨

動脈硬化症は、その過程において単球由来マクロファージの泡沫化や活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS) の過剰産生が認められる疾患である。一方、その過剰な ROS の消去に、血管系における酸化ストレス防御酵素 extracellular-superoxide dismutase (EC-SOD) の有用性が注目されている。それゆえに、単球/マクロファージにおける EC-SOD 発現調節機構の解明ならびに単球の分化を制御する化合物の提案は、動脈硬化症の予防に向けての有用な情報提供に繋がる。本研究では、ヒト単球系細胞株 THP-1 細胞を用いて、マクロファージへの分化過程およびマクロファージの泡沫化過程における EC-SOD 発現変動とそのメカニズムについて検討するとともに、単球分化に対する抑制効果を示すフラボノイドの作用機序について検討した。

### 1. ヒト単球系細胞のマクロファージへの分化過程における EC-SOD 発現調節機構

12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) を用いて単球系細胞株 THP-1 細胞を分化誘導したところ、その過程において EC-SOD 発現の増大が認められた。また、この EC-SOD 発現増大は、PKC および MEK 阻害剤の前処理により有意に抑制された。さらに、TPA 処理により p47phox の膜移行による NADPH oxidase 2 (NOX2) 活性化を介した ROS 産生が亢進し、一方で、NOX 阻害剤により EC-SOD 発現増大が抑制された。以上の結果から、ヒト単球系細胞株の分化過程における EC-SOD 発現増大への PKC、MEK/ERK シグナルの活性化ならびに NOX2 由来 ROS 産生亢進の関与が考えられた。

### 2. ヒト単球系細胞由来マクロファージの oxLDL 曝露による EC-SOD レベルの変動とその調節機構

THP-1 由来マクロファージを酸化 LDL (oxLDL) に曝露したところ、TPA 処理により上昇した EC-SOD mRNA レベルがスカベンジャー受容体 CD36 を介して oxLDL 処理時間依存的に有意に低下した。また、EC-SOD mRNA の発現低下に転写段階での関与が認められなかったため、mRNA の安定性に着目し検討を行った。mRNA の安定性を制御する配列が存在する 3'側非翻訳領域 (3'UTR) を欠損させることにより、EC-SOD mRNA レベル

の低下が抑制された結果から、oxLDL を曝露した場合、3'UTR の不安定化を促進する要因により EC-SOD mRNA の分解が促進されることが明らかになった。以上の結果から、ヒト単球系由来マクロファージの泡沫化過程において、EC-SOD mRNA の分解が促進されることにより、酸化ストレスに対する抵抗性が減弱している可能性が示唆された。

### 3. ヒト単球系細胞株 THP-1 細胞の分化に対するルテオリンの抑制効果

THP-1 細胞の分化に対するフラボノイドの抑制効果を分化マーカーである CD11b、CD14 ならびに CD36 の発現を指標として評価した。ルテオリンなどのフラボノイド存在下で TPA 誘導性の CD ファミリー発現増大と細胞接着が有意に抑制された。また、ルテオリンの抑制作用機構を検討した結果、TPA 処理により活性化される PKC-MEK/ERK-NOX2/ROS のシグナル経路のうち、TPA 誘導性の p47<sup>phox</sup> 細胞膜移行および NOX2 発現を抑制することを見出した。以上の結果から、ヒト単球系細胞株の分化に対するルテオリンの抑制効果のメカニズムを明らかにすることができた。

以上、ヒト単球系細胞の分化や泡沫化過程における EC-SOD 発現調節メカニズムおよび動脈硬化症の予防に有用なルテオリンの作用機構を解明した。動脈硬化症は、脳梗塞や心筋梗塞などの致死的な病態に繋がる危険性を有することから、EC-SOD 発現の制御に関わる知見が、動脈硬化症の予防への有用な情報の提供に繋がり、その罹患率の軽減に寄与するものと考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

本論文は、ヒト単球系細胞株 THP-1 細胞を用いて、マクロファージへの分化過程およびマクロファージの泡沫化過程における酸化ストレス防御酵素 extracellular-superoxide dismutase (EC-SOD) の発現変動とそのメカニズム、THP-1 の分化に対するフラボノイドの抑制メカニズムについて検討した成績をまとめたものである。THP-1 のマクロファージへの分化過程において、MEK/ERK シグナルの活性化、p47<sup>phox</sup> の膜移行による NADPH oxidase 2 (NOX2) の活性化、活性酸素種の産生亢進を介して EC-SOD の発現が増大することを解明した。また、THP-1 由来マクロファージを酸化 LDL に曝露すると、EC-SOD mRNA 量が低下することを見出し、3'-非翻訳領域の不安定化を促進する要因により EC-SOD mRNA の分解が促進されることを明らかにした。さらに、THP-1 細胞の分化に対するフラボノイドの抑制効果を検討し、ルテオリンが p47<sup>phox</sup> の膜移行や NOX2 発現の抑制などを介して、単球系細胞の分化を抑制することを解明した。

以上、本論文は、ヒト単球系細胞の分化や泡沫化過程における EC-SOD 発現調節メカニズムとルテオリンの分化抑制メカニズムを解明し、動脈硬化症の予防に向けた有用な知見を提供しており、博士（薬学）論文として価値あるものと認める。