

酸化ストレス応答における
オートファジー制御機構に関する薬理学的研究

齋藤 祐一

目次

序論	1項
第1章 Nrf2 活性化薬による網膜色素上皮保護作用へのオートファジーの関与	7項
1節 緒言	
2節 実験材料及び方法	
3節 実験成績	
4節 考察	
第2章 Nrf2 活性化薬による視細胞外節ファゴサイトーシスの活性化作用	37項
1節 緒言	
2節 実験材料及び方法	
3節 実験成績	
4節 考察	
第3章 プロポリス有効成分による酸化ストレス依存的 Nrf2 活性化促進作用	66項
1節 緒言	
2節 実験材料及び方法	
3節 実験成績	
4節 考察	
総括及び結論	85項
謝辞	87項
引用文献	88項
略語一覧表	98項

序論

加齢黄斑変性 (age-related macular degeneration: AMD) は網膜において錐体細胞の密集する黄斑部が変性することにより、不可逆的な中心視野の欠損が生じる網膜の加齢性疾患である。日本では欧米諸国に比べ患者数が少ないとされてきたが、人口の高齢化、食生活の欧米化などの要因により近年増加傾向にあり、成人における視覚障害要因の第4位となっている (1)。AMD はその病型によって、滲出型 (exudative AMD) と萎縮型 (non-exudative AMD) の二種類に分類される。滲出型は網膜色素上皮 (retinal pigment epithelium: RPE) の外側にある脈絡膜から異常な血管新生が起こることにより網膜の障害が起こるものである (2)。萎縮型は古くなった視細胞を貪食することで視細胞の機能維持を行う RPE の萎縮により視細胞をはじめとする網膜の障害を引き起こす (3)。AMD 患者の割合は本邦では滲出型が多く (4)、一方欧米では萎縮型が大半を占めている (5)。

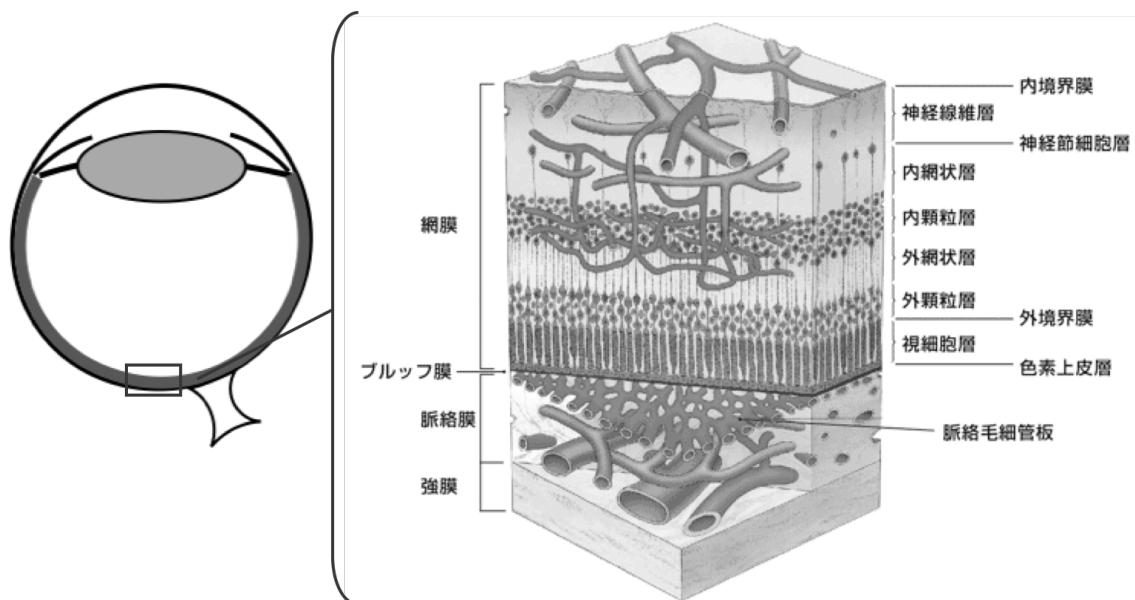


Fig. 1 Schematic diagram of retinal structure.

(http://nakamuraganka.com/kouzou/image/moumaku_myakuraku.html より引用改変)

二種類の AMD 病態のうち、滲出型 AMD に関しては血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) の異常な発現増加が病態の進展に重要な役割を果たすことが明らかにされており、現在では VEGF を標的とした分子標的薬であるラニビズマブやアフリベルセプトなどを用いた抗 VEGF 療法をはじめとした有効な治療法が確立されている (6-8)。一方、萎縮型 AMD に関しては病態形成因子に未解明な部分が多く、有効な治療法は存在しない。萎縮型 AMD は網膜疾患の中でも重要なアンメット・メディカル・ニーズ領域とされ、有効な治療薬の開発が望まれている (9)。

萎縮型 AMD の主要なリスクファクターは以下の通りである。1) 先天的要因及び遺伝性要因として、セリンプロテアーゼの一種である high-temperature requirement A serine peptidase 1 (HTRA1) の変異や (10)、補体活性化第二経路制御因子の一種である補体 H 因子 (complement factor H: CFH) の変異などがある (11, 12)。2) 後天的要因及び環境因子として、加齢 (13, 14)、喫煙 (15, 16)、光の暴露 (17, 18) が挙げられる。萎縮型 AMD では、これらの遺伝性要因と環境要因の複合的かつ継続的な負荷により病態が形成される (6)。萎縮型 AMD の後天的リスクファクターとして病態形成の要因となる加齢性変化には、慢性的な酸化ストレスの寄与が大きいことが報告されている (19)。また、RPE 細胞をタバコ煙抽出物に暴露するとまず酸化ストレスと補体の活性化が協奏的に起こり、それに続いて小胞体ストレス、脂質蓄積を促進することが報告されている (20)。光による視細胞と RPE 細胞の障害も酸化ストレスを介したものであることが多数報告されている (21, 22)。しかしながら、この慢性的な酸化ストレスを緩和させる治療法はいまだ確立されていない。

酸化ストレスの本体は生体内で発生する活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) である。ROS は健常者においてもエネルギー産生の副産物としてミトコンドリアから定常的に産生されるが、過剰に産生されることで DNA やその他の

細胞小器官に損傷が惹起される (23)。またこの他にも、鉄イオンなどが ROS の産生源として知られている (24)。ROS による細胞小器官障害に対処するために、生体内にはこれを除去するための様々な酸化ストレス応答機構が存在する。例えば、電子供与体として抗酸化作用を発揮する還元型グルタチオンや、脂溶性の鉄化合物である遊離ヘムの分解酵素 heme oxygenase-1 (HO-1) などがある (25)。NF-E2-related factor 2 (Nrf2) は ROS 産生に応答して活性化され、これらを含む数多くの酸化ストレス応答機構を広く活性化する転写因子である (26, 27)。Nrf2 は ROS 非存在下では Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) と呼ばれる抑制性因子と細胞質で結合しており、この状態ではユビキチンプロテアソーム系によりただちに分解され、不活性化されている (28, 29)。しかしながら、ROS が細胞内で過剰に産生されると、Keap1 中に存在する電子リッチなシステイン残基と ROS の間で求電子反応が起こり、Nrf2 と Keap1 が結合できなくなる (28, 29)。結果的にフリーになった Nrf2 は核内に移行し、核内において antioxidant responsive element (ARE) と呼ばれるプロモーター配列に結合し、それにより抗酸化応答因子の転写が活性化される (28, 29)。

このように酸化ストレス応答機構の制御に重要な役割を果たす Nrf2 であるが、加齢により RPE 細胞において Nrf2 の応答活性が減弱することが報告されている (19, 30)。このことから、Nrf2 を薬理学的に活性化させる化合物は、このような加齢性病態を改善する可能性がある。

Nrf2 を活性化する化合物は、多く存在する。天然成分ではブロッコリースプラウトに含まれるスルフォラファン、ウコンに含まれるクルクミン、赤ワインに含まれるレスベラトロールなどがある (Fig. 2)。国内で医薬品として承認されているものとしては、多発性硬化症への適応をもつテクフィデラ® (フマル酸ジメチル; 2013 年に米国で初承認、2016 年に日本でも承認) がある (31)。また、

ソロンメチルよりもさらに強い Nrf2 活性化作用を有する化合物がいくつか報告されている (31)。本研究において、検討に用いた化合物 RS9 もその中の一つであり、第一三共株式会社が開発したトリテルペノイド型 Nrf2 活性化薬である (36)。

Nrf2 が ARE に結合することにより転写誘導される抗酸化応答因子には、酸化ストレスの原因の一つである遊離ヘム鉄の代謝を行う HO-1 (25)、第二相異物代謝酵素として NAD(P)H から NAD(P)⁺ への酸化反応を触媒することにより細胞質で抗酸化作用を発揮する NAD(P)H quinone dehydrogenase 1 (NQO1) (37)、同じく第二相異物代謝酵素としてグルタチオン抱合反応を触媒することにより抗酸化作用を発揮する glutathione S-transferase Pi 1 (GSTP1) などがある (38)。この他にも、抗酸化応答作用と関連付けられることはないが、p62/Sequestosome1 (SQSTM1、以降 p62) と呼ばれるオートファジーの標的タンパク質を転写誘導することが知られている (39)。p62 は Keap1 の不活性化因子としての働きも有しており (40)、p62 に存在する keap1-interacting region (KIR) と Keap1 が相互作用することで Keap1 による Nrf2 の不活性化作用が抑制される (Fig. 3)。このように、Nrf2 は p62 を介してオートファジー経路に密接に関与するが、Nrf2 活性化薬のオートファジーに対する作用及びオートファジーに対する作用の抗酸化作用への寄与、加齢性疾患への作用に関してはこれまでに十分に明らかにされていなかった。

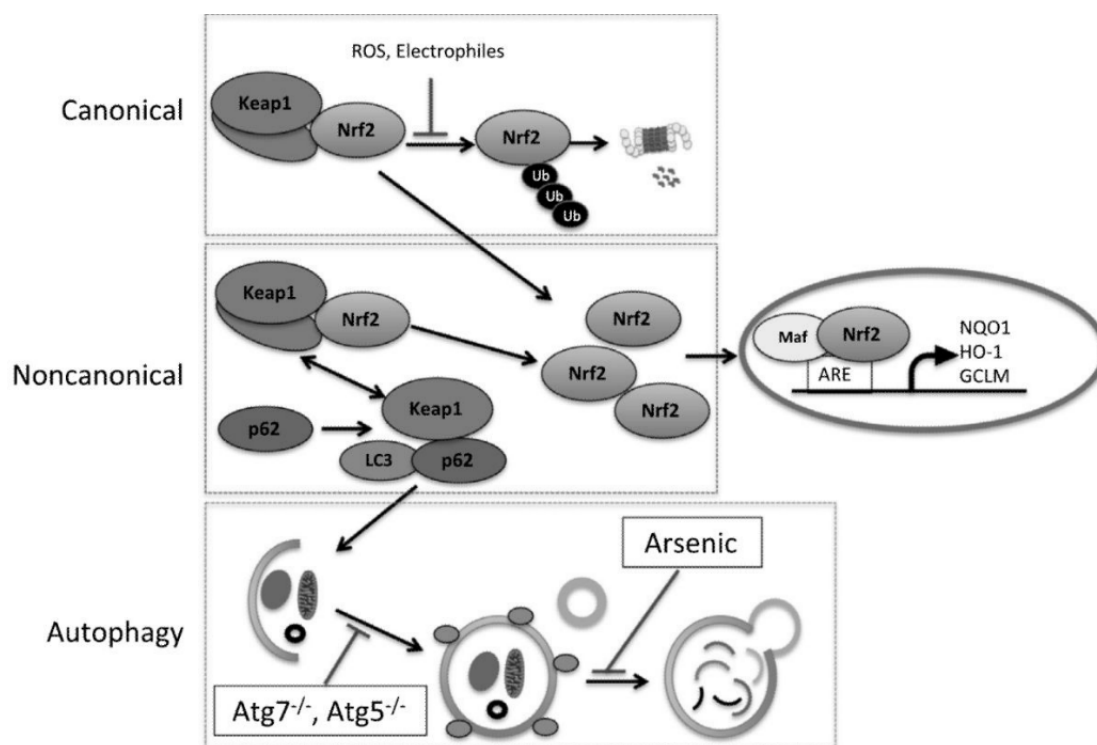


Fig. 3 Interaction between Nrf2-Keap1 system and autophagy flux.

(Tao, J. *et al.*, Free Radic Biol Med. 2015 より引用改変)

本研究では、これまで注目されていなかった Nrf2 の作用におけるオートファジーの役割に着目した。萎縮型 AMD の新規治療法の開発を目的として、強力な Nrf2 活性化作用を有する RS9 を用いて、RPE 細胞の網膜機能維持機構に対する Nrf2 活性化薬の有効性について検討した (第 1 章)。さらに、Nrf2 活性化薬の作用機序解明のために、オートファジーを介した作用に着目し、詳細な検討を行った (第 2 章)。最後に、現在開発されている Nrf2 活性化薬とは異なる Nrf2 活性化作用を有する伝承薬であるブラジル産グリーンプロポリス水抽出物とその有効成分について細胞保護作用の解析を行った (第 3 章)。

第1章 Nrf2 活性化薬による網膜色素上皮保護作用へのオートファジーの関与

第1節 緒言

近年、萎縮型 AMD の発症にオートファジーの機能不全が寄与することが報告されている (41–43)。オートファジーは自食作用と呼ばれ、細胞が飢餓状態におかれた際に内部から新たなエネルギーを産生するための機構として酵母で発見された (44)。オートファジーは飢餓応答だけでなく、細胞内で生じた不要物を除去するための消化機構としても機能している (45)。近年の報告から、萎縮型 AMD 患者の網膜において視細胞外節の貪食 (ファゴサイトーシス) による代謝制御を担う RPE 細胞でオートファジー不全が明らかになった (41, 43, 46)。異物除去のために形成されたオートファゴソームが消化されないことで RPE 内に脂質が蓄積する。さらに、RPE 細胞の外側に脂質代謝産物 (老廃物、ドルーゼン) が放出され、網膜下に蓄積することにより RPE 細胞が萎縮、これに伴って RPE 細胞により維持されていた視細胞の消失が起こるという機序が示唆されている (Fig. 4) (41, 43, 46)。

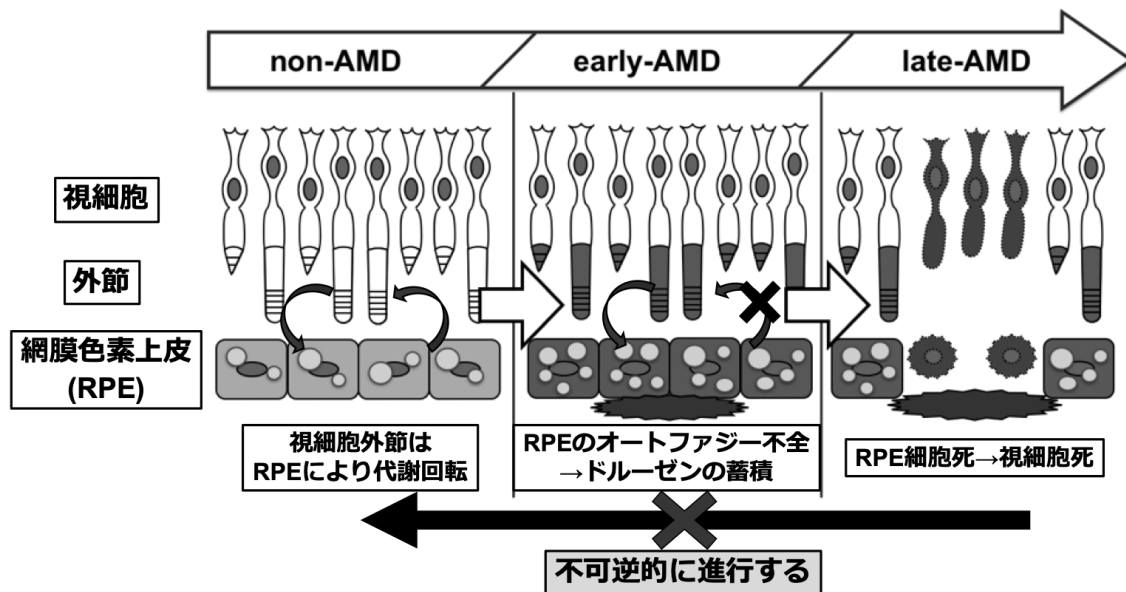


Fig. 4 Retinal degeneration process in non-exudative AMD patients.

萎縮型 AMD の発症・進展要因として知られる慢性的な酸化ストレスは、細胞小器官の損傷による不要物の蓄積や細胞老化を惹起する (47, 48)。一方、オートファジーは機能不全を起こした細胞小器官を除去する自浄作用としての働きを有している (49)。近年、RPE 細胞においてオートファジーを阻害すると酸化ストレスに対する脆弱性が増加することが報告された (41)。このことはオートファジーが酸化ストレスに対する細胞保護機構として機能することを示している。しかしながら、オートファジーが酸化ストレスからどのように細胞を保護するのかについて、その詳細な機序は明らかになっていない。

そこで本研究においては、酸化ストレス防御機構である Nrf2 とオートファジー経路の関連性を明らかにするために、Nrf2 活性化薬を用いて酸化ストレス保護作用におけるオートファジーの関与について詳細な検討を行った。

第2節 実験材料及び方法

2-1 実験材料

本試験に用いた薬物及び試薬は、以下の通りである。

クロロキン (chloroquine: CQ)、スクロース、パラホルムアルデヒド (paraformaldehyde: PFA) は Wako (Osaka, Japan)、リン酸水素二ナトリウム・十二水、リン酸二水素ナトリウム二水和物、2-フェノキシエタノールは Kishida Chemical (Osaka, Japan)、Hoechst 33342 は Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)、Normal Goat Serum は Vector Labs (Burlingame, CA, USA)、フルオロマウントは Diagnostic Bio Systems (Pleasanton, CA, USA)、Triton X-100 は Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)、O.C.T compound は Sakura Finetek Japan (Tokyo, Japan)、Zinc protoporphyrin (ZnPP) は Frontier Scientific Inc. (Logan, Ut, USA) よりそれぞれ購入した。RS9 [C₃₂H₄₃NO₆; methyl (1 α ,2 α ,21 β)-2-cyano-21-hydroxy-3,12-dioxo-1,2-epoxyolean-9(11)-en-28-oate] は第一三共株式会社 (Tokyo, Japan) より提供していただいた (Fig. 2) (36)。

2-2 実験方法

2-2-1 細胞培養

ヒト由来網膜色素上皮細胞株 (ARPE-19) は American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, USA) より購入した。ARPE-19 細胞は 10% ウシ胎児血清 (Fetal Bovine Serum: FBS)、100 U/mL penicillin 及び 100 μ g/mL streptomycin を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/F-12 (Wako, Osaka, Japan) を用い 37°C、5% CO₂ 中にて培養した。また、2–3 日毎に培地交換を行い、4–5 日毎に trypsin 処理による継代操作を行った。

2-2-2 NaIO₃ 誘発細胞障害試験

ARPE-19 細胞を 96 well plate に 1.5×10^4 cells/well の密度で播種し、4 日間培養した。NaIO₃ は Phosphate Buffered Saline (PBS) に溶解し、終濃度 0.1–10 mM の範囲で使用した。NaIO₃ 添加 1 時間前に培地を FBS 不含 DMEM/F-12 に交換した。NaIO₃ の処置は最大 24 時間行い、各評価はその直後に行った。

2-2-3 細胞生存活性評価

細胞生存活性の評価には 2-(2-Methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-2H tetrazolium monosodium salt (WST-8) assay kit (Cell Counting Kit-8; Dojin Kagaku, Kumamoto, Japan) を用いた。WST-8 (無色) は電子メディエーターである 1-Methoxy-5-methylphenazinium methyl sulfate (1-methoxy PMS) の存在下で生細胞内の脱水素酵素により還元され、水溶性のホルマゼン (橙色) を生成する。このホルマゼン吸光度 492 nm (対照波長 660 nm) を直接測定することにより、生細胞を計測した。NaIO₃ 処置開始から 24 時間後に WST-8 を終濃度 10% となるように ARPE-19 細胞に添加し、37°C で 3 時間培養した後、450 nm の吸光度をマイクロプレートリーダー (GloMax-Multi Detection System; Promega, Madison, WI, USA) を用いて測定した。添加直後の値をバックグラウンドとして引いた値を用いて、Control 群との相対吸光度を定量した。

2-2-4 細胞死評価

細胞死の評価には二種類の蛍光染色試薬による二重染色を用いた。核を Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) により、死細胞を propidium iodide (PI; Thermo Fisher Scientific) によりそれぞれ染色した。NaIO₃ 処置開始から 24 時間後に Hoechst 33342 及び PI 溶液をそれぞれ終濃度 8.1 μ M 及び 1.5 μ M となるように添加し、37°C で 15 分間培養した後、Lionheart FX automated microscope (BioTek, Winooski, VT, USA) を用いて撮影を行った。全

細胞数及び死細胞数は取得した画像から Gen5 software (BioTek) を用いて自動解析した。

2-2-5 ミトコンドリア膜電位評価

ミトコンドリア膜電位は JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて販売元のプロトコールに従い測定した。典型画像は BZ-X700 all-in-one fluorescence microscope (Keyence, Osaka, Japan) を用いて、健康な細胞状態を示す JC-1 aggregates (excitation/emission = 540/605 nm; 赤色蛍光) 及びアポトーシスまたは不健康な細胞状態を示す JC-1 monomers (excitation/emission = 480/510 nm; 緑色蛍光) をそれぞれ撮影した。定量評価にはマイクロプレートリーダー (GloMax-Multi Detection System; Promega) を用いてそれぞれの蛍光強度を測定した。緑色蛍光の輝度値を赤色蛍光の輝度値で割った相対輝度値を全細胞数で補正した。全細胞数の評価には BZ-X700 cell analyzer system の自動計数機能を用いて、Hoechst 33342 陽性細胞をカウントした値を使用した。

2-2-6 ウェスタンブロットによる評価

ARPE-19 細胞は、24 well plate に 7.5×10^4 cells/well となるように播種し、37°C、5% CO₂ の条件下で 4 日間培養した。培地交換と試薬添加を行い、NaIO₃ 添加直前、6、24 時間後にそれぞれサンプリングを行った。サンプリング溶液として protease inhibitor cocktail、phosphatase inhibitor cocktail 2 及び 3 を含む RIPA buffer [50 mM Tris HCl (pH 8.0)、150 mM NaCl、0.5% デオキシコール酸ナトリウム、0.1% SDS、1% Igepal CA-630] を用いた。サンプルはタンパク質抽出まで -80°C に保存した。タンパク質抽出には上記の通り作成した試薬 60 µL を各 well に添加し、ホモジナイザー (Physcotron, Microtec Co., Chiba, Japan) を用いて 30 秒

間ホモジナイズした。その後、20 分間水中に静置させ、12,000 rpm、4°C、20 分間遠心分離した。遠心分離した上清を回収し、タンパク質抽出液とした。

SDS ポリアクリルアミドゲルを泳動装置にセットし、内外の泳動槽に泳動用緩衝液 (25 mM Tris、190 mM Glycine、3.5 mM SDS) を入れ、ゲルを溶液に浸した。1 ウェル当りの添加量は分子量マーカーを 3 μ L、各サンプルを 10 μ L とした。サンプルを添加後、ゲル 1 枚当たり 20 mA で泳動した。泳動後、ゲルを cathode buffer (25 mM Tris、40 mM 6-aminohexanoic acid、20% methanol) に 15 分間浸した。転写膜は、メタノールに 15 秒間浸し、超純水に 15 分間浸した。その後、anode buffer 2 (25 mM Tris、20%メタノール) に 20 分間浸した。陽極側から、anode buffer 1 (0.3 M Tris、20%メタノール) に浸したろ紙、anode buffer 2 に浸したろ紙、転写膜、ゲル、cathode buffer に浸したろ紙の順に組み、0.8 mA/cm² の条件で転写した。転写後、0.05% Tween 20 含有 Tris Buffered Saline (TBS; 0.05 M Tris、0.138 M NaCl、0.0027 M KCl) で Blocking One-P に浸し、30 分間ブロッキングした。0.05% Tween TBS で洗浄後、Can Get Signal Solution 1 で一次抗体を希釈し、4°C で一晩反応させた。0.05% Tween TBS で洗浄後、Can Get Signal Solution 2 で二次抗体を希釈して室温で 1 時間反応させた。0.05% Tween TBS で洗浄した後、イムノスターLD に 5 分間浸した。その後、LAS-4000UVmini (Fujifilm、Tokyo、Japan) を用いて検出した。一次抗体には、anti-HO-1 rabbit polyclonal (1:1000、Merck KGaA)、anti-microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) rabbit monoclonal [1:1000、Cell signaling technology (CST)、Beverly、MA、USA]、anti-p62/SQSTM1 mouse monoclonal (1:500、GeneTex、Irvine、CA、USA)、anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) rabbit monoclonal (1:1000、CST) を用いた。二次抗体には、Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:2000、Thermo Fisher Scientific)、HRP-conjugated goat anti mouse antibody (1:2000、Thermo Fisher Scientific) を用いた。タンパク質の発現強度は、Multi Gauge

Ver3.0 (Fujifilm) を用いて解析した。バンドの強度を数値化し、個々の値を算出した。ローディングコントロールとして GAPDH を使用した。

2-2-7 細胞免疫染色による評価

ARPE-19 細胞は 8 well chamber slides (SCS-N08、Matsunami Glass Ind., Ltd., Osaka, Japan) に 4.5×10^4 cells/well の細胞密度で播種し、37°C、5% CO₂ の条件下で 4 日間培養した。RS9 または溶媒を添加し、NaIO₃ 処置開始直前、6 時間後、24 時間後にそれぞれ 4% PFA による固定を 15 分間行い、免疫染色を開始した。3% normal goat serum 含有 PBST (0.5% Tween 含有) で 30 分間ブロッキングした。ブロッキング後、一次抗体を用いて 4°C で一晩反応させた。その後、二次抗体を 1 時間反応させ、Hoechst33342 (1:1000、Thermo Fisher Scientific) を 10 分間反応させた。最後に PBS で洗浄後、chamber を取り除き、スライドガラスをフルオロマウント (水溶性封入基材) を用いてカバーガラスで封入した。一次抗体は、anti-LC3 rabbit monoclonal antibody (1:200、CST)、anti-p62/SQSTM1 mouse monoclonal antibody (1:500、GeneTex)、二次抗体は、Alexa Fluor® 488-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:1000、Thermo Fisher Scientific)、Alexa Fluor® 546-conjugated goat anti-mouse IgG (1:1000、Thermo Fisher Scientific) を使用した。染色した細胞は共焦点レーザ走査型顕微鏡 (FLUOVIEW FV10i; Olympus、Tokyo、Japan) を用いて撮影した。画像解析におけるオートファゴソーム及び p62 陽性班の計数は Image-J (developed by the National Institutes of Health) を用いて行った。

2-2-8 RNA 干渉

ARPE-19 細胞は抗生物質不含 10%FBS DMEM/F-12 培地を用いて 96 well プレートに 1.5×10^4 cells/well で、24 well プレートに 7.5×10^4 cells/well で播種し、37°C、5% CO₂ の条件下で 3 日間培養した。Lipofectamine™ RNAiMAX Reagent

(Thermo Fisher scientific) 及び Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific) への 10 nM siRNA の混合溶液を作製した後、ARPE-19 細胞への siRNA 導入を行った。使用した siRNA の配列は以下の通りである。

HO-1 siRNA

Sequence #1, 5'-CAGCUCUAUCGUGCUCGAAUGAACA-3' (sense)

and 5'-UGUUCAUUCGAGCACGAUAGAGCUG-3' (antisense);

Sequence #2, 5'-GCUUUAAGCUGGUGAUGGCUUCCUU-3' (sense)

and 5'-AAGGAAGCCAUCACCAGCUUAAAGC-3' (antisense);

Sequence #3, 5'-GGCAGUGGGAAUUUAUGCCAUGUAA-3' (sense)

and 5'-UUACAUGGCAUAAAUCCCCACUGCC-3' (antisense).

上記の siRNA 及び陰性対照 siRNA (negative control small interfering RNAs) (Thermo Fisher Scientific) を遺伝子導入 24 時間後に抗生物質含有 10%FBS DMEM/F-12 培地に交換し、RS9 を添加した 24 時間培養後のサンプルを採集してウエスタンブロット解析を行った。

2-2-9 実験動物

ゼブラフィッシュは理化学研究所バイオリソースセンター (RIKEN BRC; Tsukuba, Japan) より提供された野生型 (RIKNE-WT) を交配・繁殖させ使用した。成体のゼブラフィッシュは Westerfield の手法 (50) に従い、水温 $28.5 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ の水槽中で、明期 14 時間/暗期 10 時間 (明期: 午前 8 時–午後 10 時) で飼育した。実験には 4 ヶ月齢の成魚を使用し、岐阜薬科大学本部学舎 7 階の培養室 (動物) で飼育した。すべての実験手順は、岐阜薬科大学動物飼育・動物実験委員会の承認の下で実施した。また、ARVO 宣言 [The Association for Research in Vision

and Ophthalmology (ARVO) Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research] に準じて実験動物を使用した。

2-2-10 ゼブラフィッシュ光誘発網膜障害モデル

過去の報告 (52, 53) に従い、光に対する網膜の感受性を上げるために、ゼブラフィッシュを 14 日間、常時暗期に設定したシステム内で飼育し暗順応させた。光照射直前にゼブラフィッシュを、照射用の水槽 (容量 3 L、中央部に仕切りあり) に移し替え、両側に計 2 台のハロゲンランプを側面から約 30 cm 離れた状態で設置し、水槽側面における照度が 16,000–20,000 lux になるように調整し、白色光の照射を行った。水槽の背部には空気を循環させ、温度上昇を防ぐためのファンを設置した。また、水槽内部には酸素供給用のエアレーター及び水温管理用の温度計を入れた。照射は安全キャビネット内で、前面のシャッターを上げた状態で行った (Fig. 5)。光障害開始の 1 時間前にゼブラフィッシュに麻酔 (0.1% フェノキシエタノール溶液に応答がなくなるまで 1 分程度浸漬) をかけ、0.1–2.5 mM NAC または 3 mM RS9、300 μ M CQ 及び対照群として PBS をそれぞれ両眼に 1 μ L 投与した。RS9 の希釈液は 1 \times PBS を用いた。光照射群はすべて照射 24 時間後にサンプリングし、対照群として暗順応のみを行った群を用意した。

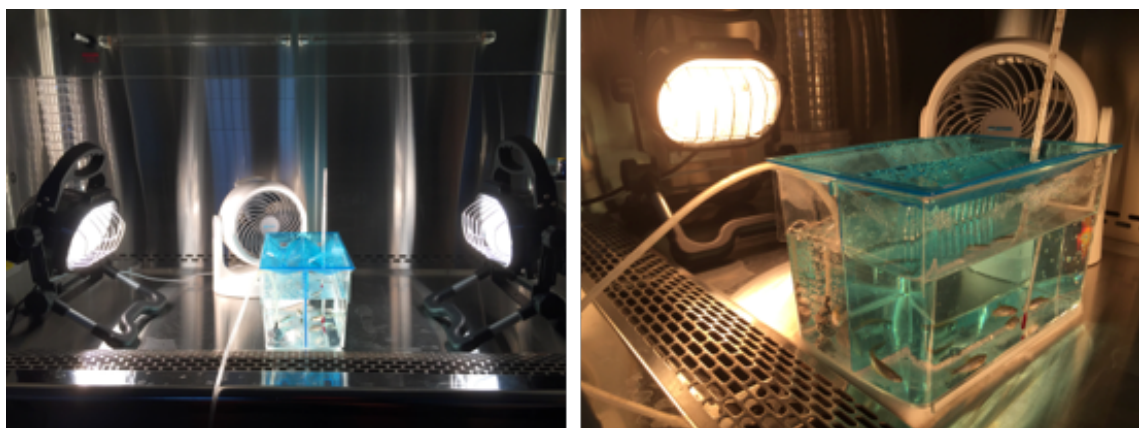


Fig. 5 Light lesion of adult zebrafish retina.

2-2-11 網膜組織凍結切片作製

光照射終了直後にゼブラフィッシュに過麻酔 (0.1%フェノキシエタノール溶液に 5 分間浸漬) をかけ安楽死させた後、眼球を摘出し、4% PFA 含有 0.1 M PB (pH 7.4) 中に浸漬した状態で 4°C に保ち、一晩放置した。ついで、5%スクロース中に眼球を移し常温で 30 分放置、20%スクロース中に移し 4°Cですべての眼球が底に沈むまで (約 4 時間) 放置、20%スクロース: O.C.T compound = 2 : 1 溶液中に移し常温で 30 分放置した後、液体窒素を用いて O.C.T. compound 中に凍結包埋し、薄切するまで -80°C にて保存した。クライオスタット (Leica、Hesse、Germany) を用いて、-20°C で厚さ 12 μ m の切片を作製し、MAS コーティングされたカバーガラス (Matsunami、Osaka、Japan) に載せ、-80°C で保存した。

2-2-12 組織免疫染色

凍結切片は染色時、-80°C より取り出し、-20°C で 1 時間放置した後、4°C で 1 時間放置し、さらに室温で 1 時間乾燥させた。その後、Super PAP pen (Invitrogen) にて反応液の流出を防ぐために切片の周囲を囲んだ。10% normal goat serum 含有 PBST (0.5% Tween 含有) で 1 時間ブロッキングした。ブロッキング後、一次抗体を用いて 4°C で一晩反応させた。その後、二次抗体を 1 時間反応させ、Hoechst33342 (1:1000、Thermo Fisher Scientific) を 10 分間反応させた。一次抗体は、anti-zpr1 mouse monoclonal antibody (1:250、Abcam、Cambridge, UK)、二次抗体は、Alexa Fluor® 546-conjugated goat anti-mouse IgG (1:1000、Thermo Fisher Scientific) を使用した。染色後、Fluoromount (水溶性封入基材) で封入した。染色した切片は共焦点レーザ走査型顕微鏡 (FLUOVIEW FV10i; Olympus、Tokyo、Japan) を用いて撮影した。すべての網膜で光による障害が最も大きい背中側の中央部分を撮影し、212 μ m² の画像内に存在する網膜外顆粒層 (Outer nuclear

layer: ONL) の細胞核数及び ONL の厚さを画像内における 3 点 (画像内の左側、中央、右側からそれぞれ 1 点ずつ) の平均値から算出した。

2-2-13 統計学的解析

実験成績は平均値 (Mean) \pm 標準誤差 (Standard error of the mean: SEM) で示した。統計学的な比較は、SPSS Statistics (IBM、Armonk、NY、USA) software を用いて F 検定を行った後、Student's *t*-test または Welch's *t*-test、一元配置分散分析を行った後、Tukey's test により行った。危険率が 5 %未満を有意差有りとした。

第3節 実験成績

3-1 RS9 による NaIO₃ 誘発酸化ストレス障害からの ARPE-19 細胞保護作用

はじめに、ARPE-19 細胞に対して NaIO₃ を用いて酸化ストレスをかけ、酸化ストレス障害に対する RS9 の保護作用を検討した。既報より、RS9 による Nrf2 活性化には 6 時間程度を要することが明らかになっているため (36, 54)、本試験において RS9 は NaIO₃ 処置の 6 時間前から処置し、NaIO₃ 処置後も継続的に処置した。RS9 は 0.1–10 nM の範囲で濃度依存的な保護作用を示した (細胞生存活性; Fig. 6A、細胞死; Fig. 6B-C)。また、早期アポトーシスの指標であるミトコンドリア膜電位を JC-1 染色により評価した結果、膜電位が消失したミトコンドリアを示す JC-1 monomer の割合が、NaIO₃ 処置により上昇し、この上昇が RS9 の同時処置により抑制された (Fig. 6D-E)。これらの結果より、RS9 は NaIO₃ 誘発酸化ストレスに対して ARPE-19 細胞保護作用を有することが示唆された。

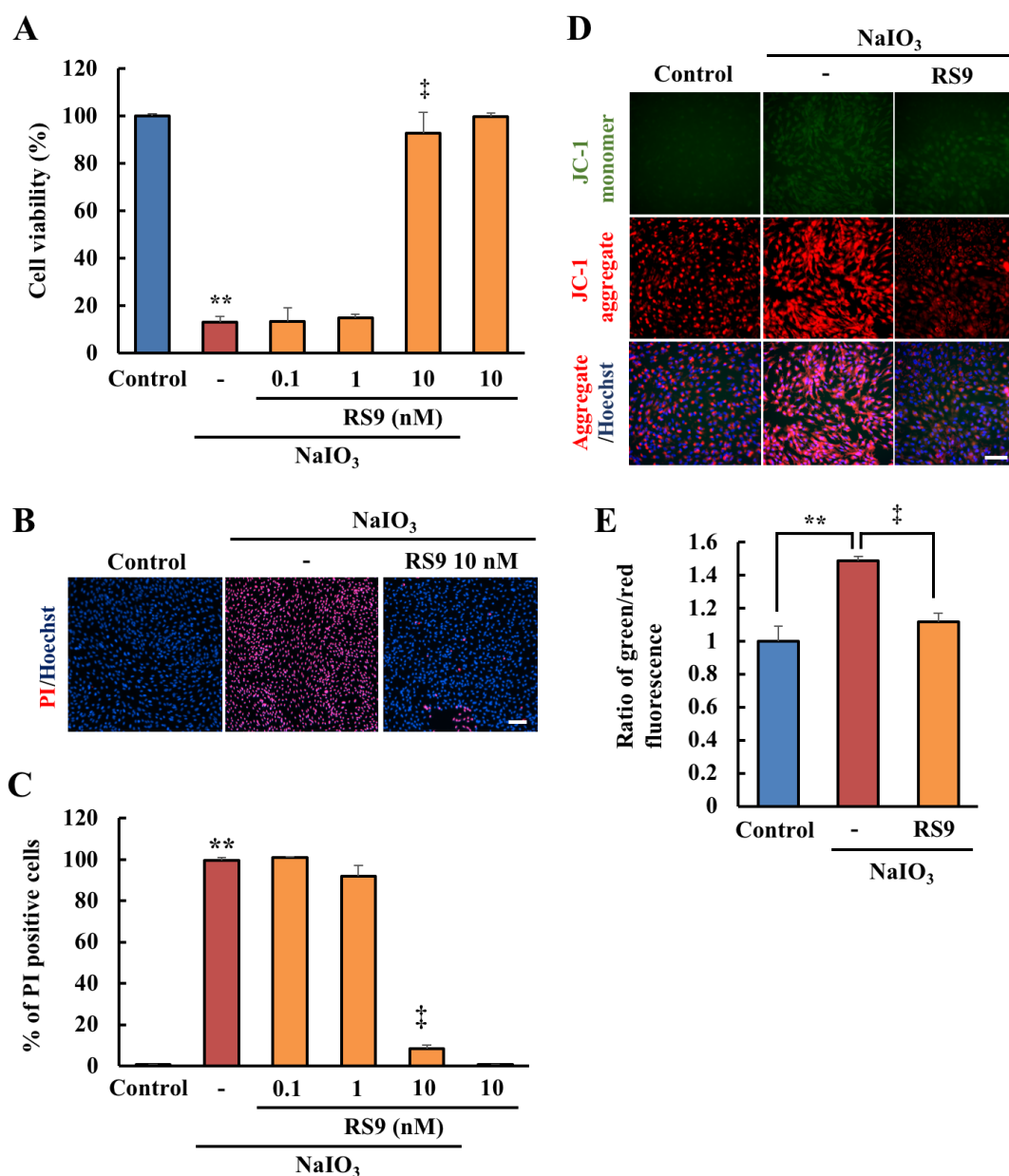


Fig. 6 Protective effects of RS9 on ARPE-19 cells against NaIO₃-induced oxidative stress.

(A) Cell viability was evaluated using the Cell Counting Kit (CCK)-8 assay. (B-C) Cell death rates were evaluated by propidium iodide (PI) (red) /Hoechst 33342 (blue) double staining. (B) Representative images. (C) Quantitative data of the percentage of PI positive cells. (D-E) The ratio of mitochondria that had an impaired membrane potential (JC-1 monomer: green) to healthy mitochondria (JC-1 aggregate: red) was evaluated using the JC-1 assay. (D) Representative images. (E) Quantitative data for the ratio of monomers to aggregates. Scale bar = 100 μ m. In all experiments, NaIO₃ was used at 10 mM final concentration. Scale bar = 100 μ m. Mean \pm SEM (n = 6), **p < 0.01 vs. control, and †p < 0.01 vs. vehicle (Tukey's test).

3-2 RS9 による ARPE-19 細胞保護作用に対する HO-1 誘導作用の寄与

RS9 が NaIO₃ 誘発 APRE-19 細胞障害に対する保護作用を示したため、続いて作用機序について検討を行った。はじめに、Nrf2 の下流で働く主要な抗酸化応答因子の一つである HO-1 について、保護作用に対する寄与を検討するため、HO-1 阻害剤である zinc protoporphyrin (ZnPP) を同時に処置した場合の細胞生存活性への影響を評価した。また、比較対象として Nrf2 活性化作用を持たない抗酸化剤である *N*-acetyl-L-cysteine (NAC) の作用を検討した。NaIO₃ 処置により低下した細胞生存活性は、ZnPP の同時処置により変化しなかった。RS9 による RPE 保護作用は ZnPP の同時処置により有意に抑制されたのに対し、NAC による RPE 保護作用は ZnPP の同時処置により抑制されなかった (Fig. 7)。このことから RS9 による APRE-19 細胞保護作用には Nrf2 活性化及びその下流の HO-1 誘導作用が寄与していることが示唆された。

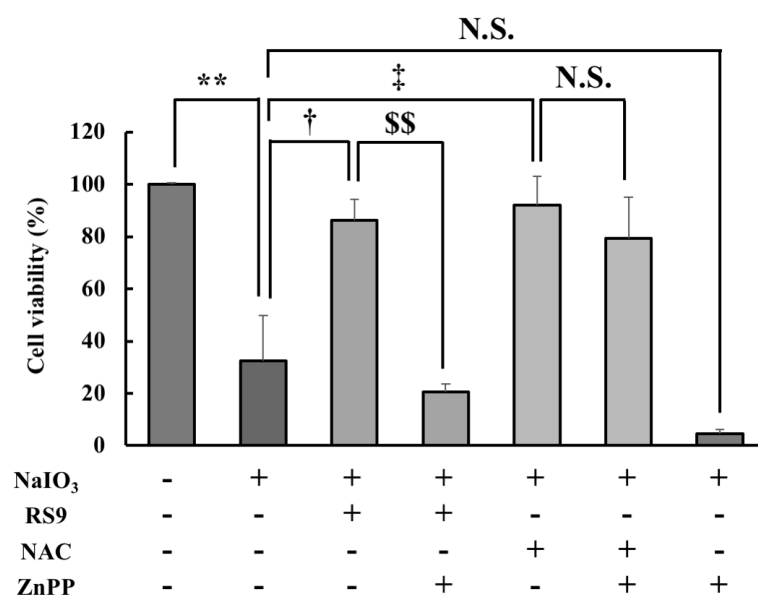


Fig. 7 Effects of HO-1 inhibitor, ZnPP, on protective effects of RS9 and NAC.

Cell viability was evaluated using the CCK-8 assay. NaIO₃, RS9, *N*-acetyl-L-cysteine (NAC), zinc protoporphyrin (ZnPP) were used at 10 mM, 10 nM, 1 mM, and 3 μ M final concentration, respectively. Mean \pm SEM (n = 6), **p < 0.01 vs. control, †p < 0.05, ‡p < 0.01 vs. NaIO₃ (+), and §§p < 0.01 vs. NaIO₃ (+), RS9 (+) (Tukey's test). N.S.: not significant.

3-3 RS9 による APRE-19 細胞保護作用に対するオートファジーの寄与

つづいて、本研究における主要な目的である Nrf2 活性化による細胞保護作用とオートファジーの関連性について検討を行った。オートファジーにおける分解過程の最終段階であるオートファゴソームとリソソームの融合を阻害するクロロキン (CQ) (55) を用いて、RS9 と NAC を比較し、細胞生存活性への影響を検討した。NaIO₃ 処置により低下した細胞生存活性は、CQ の同時処置により変化しなかった。また、CQ は ZnPP と同様に RS9 の保護作用を阻害し、NAC の保護作用を阻害しなかった (Fig. 8)。このことから、RS9 による Nrf2 活性化を介した APRE-19 細胞保護作用にオートファジーの関与が示唆された。

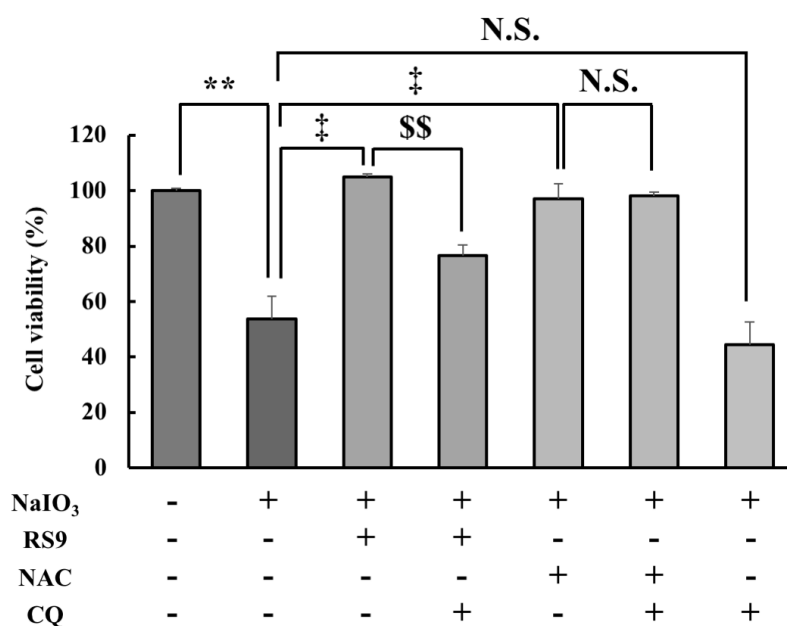


Fig. 8 Effects of autophagy inhibitor, CQ, on protective effects of RS9 and NAC.

Cell viability was evaluated by the CCK-8 assay. NaIO₃, RS9, NAC, chloroquine (CQ) were used at 10 mM, 10 nM, 1 mM, and 30 μM final concentration, respectively. Mean ± SEM (n = 6-12), **p < 0.01 vs. control, ‡p < 0.01 vs. NaIO₃ (+), and §§p < 0.01 vs. NaIO₃ (+), RS9 (+) (Tukey's test). N.S.: not significant.

3-4 NaIO₃ 処置後の APRE-19 細胞における RS9 によるオートファジー促進作用

RS9 による APRE-19 細胞保護作用は一部オートファジーを介することが示唆されたため、続いてオートファジー関連タンパク質の経時的な発現変化についてウエスタンブロット法を用いて検討を行った。本検討では、保護作用を評価した NaIO₃ 処置 24 時間後以外に、6 時間後、処置直前 (RS9 処置開始から 6 時間後) の 3 つのタイムポイントでそれぞれのタンパク質発現を評価した (Fig. 9)。

Nrf2 活性化により転写誘導される主要な抗酸化応答因子であり、Figure 6 で RS9 の保護作用にも寄与していることが示唆された HO-1 については、NaIO₃ 単独処置でも処置 24 時間後には顕著な発現上昇が認められ、RS9 処置群ではより早い 6 時間後のタイミングから 24 時間後までさらに強い発現上昇が認められた (Fig. 8A-B)。

また、オートファゴソーム形成の指標として用いられる LC3-II/I 比は NaIO₃ 単独処置ではほとんど変化しなかったが、RS9 処置により有意に上昇し、さらに CQ 同時処置により LC3-II のさらなる上昇を認めた (Fig. 9A, C)。すなわち、これらの結果から NaIO₃ 処置によって形成されたオートファゴソームが消化されず、APRE-19 細胞に蓄積していることが示唆された。CQ 同時処置による LC3-II の変化はオートファジーフラックスアッセイと呼ばれ、被験薬による LC3-II 発現上昇作用がオートファジーの阻害によるものか、もしくは活性化によるものかを明らかにするために用いられる (56, 57)。

オートファジーフラックスアッセイの結果、RS9 処置群に比べて CQ 同時処置群で顕著な LC3-II の発現上昇が認められたことから (Fig. 9A, C)、RS9 はオートファジーを活性化させ、その過程で一時的にオートファゴソームが増加していることが示唆された。また、LC3-I はオートファゴソームを形成していない細胞質局在型の LC3 アイソフォームであるが、NaIO₃ 処置による細胞障害に伴う不要物の蓄積が起こった結果、オートファジー需要が高まり LC3-II の前駆体としての LC3-I の発現が上昇したものと考えられる (Fig. 9A, D)。

また、オートファジー標的タンパク質であ

る p62 の発現変化についても評価を行った結果、RS9 処置群においてのみ、NaIO₃ 処置 6 時間後に顕著な発現上昇が認められた (Fig. 9A, E)。さらに、NaIO₃ 処置 24 時間後では RS9 処置群における p62 の発現上昇は認められず (Fig. 9A, E)、この間に p62 誘導性のオートファジー消化が完了したものと考えられる。

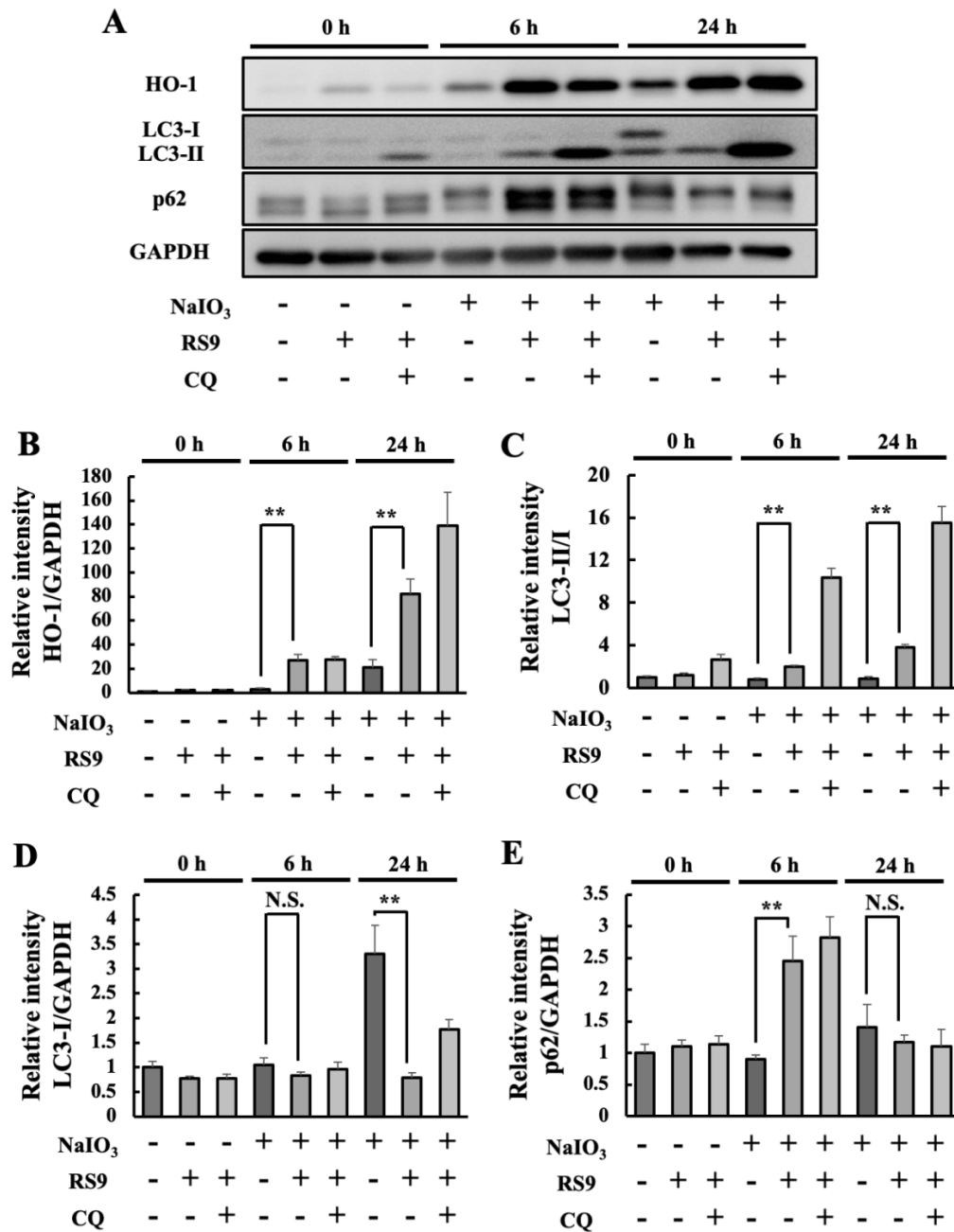


Fig. 9 Time-window of autophagy-related protein expressions after RS9 treatment.

(A) Representative results of the time course analysis by western blotting. Hours indicate the time after NaIO₃ treatment. (B-E) The results of quantitative analysis of the intensity of each immunoreactive protein band. (B) HO-1 expression levels normalized to those of GAPDH. (C) LC3-II levels compared with those of LC3-I. (D) LC3-I levels normalized to those of GAPDH. (E) p62 levels normalized to those of GAPDH. NaIO₃, RS9, CQ were used at 10 mM, 10 nM, and 30 μ M final concentration, respectively. Mean \pm SEM (n = 4), **p < 0.01, (Student's *t*-test). N.S.: not significant.

3-5 NaIO₃ 処置後の RS9 によるオートファゴソーム消化促進作用

ウエスタンブロットの検討に続き、さらに詳細なオートファゴソームの検討を行うため、3-4 と同様のタンパク質の経時変化を免疫染色においても検討した。NaIO₃ 処置 24 時間後、NaIO₃ 単独群において典型例の白矢印で示したようなびつな形で蛍光輝度が弱い細胞核が認められた (Fig. 10A)。LC3 陽性のドットで表されるオートファゴソーム数は、NaIO₃ 処置 6 時間後、NaIO₃ 単独群と比較して RS9 処置群で有意に増加しており、CQ 処置によりさらなる蓄積が認められた。また、NaIO₃ 処置 24 時間後では NaIO₃ 単独群と RS9 処置群の間にオートファゴソーム数の差は認められず、CQ 処置群においては NaIO₃ 処置 6 時間から蓄積が認められた (Fig. 10A, B)。オートファジーの対象となる p62 陽性のドット数も LC3 と同様に変動していた (Fig. 10A, C)。

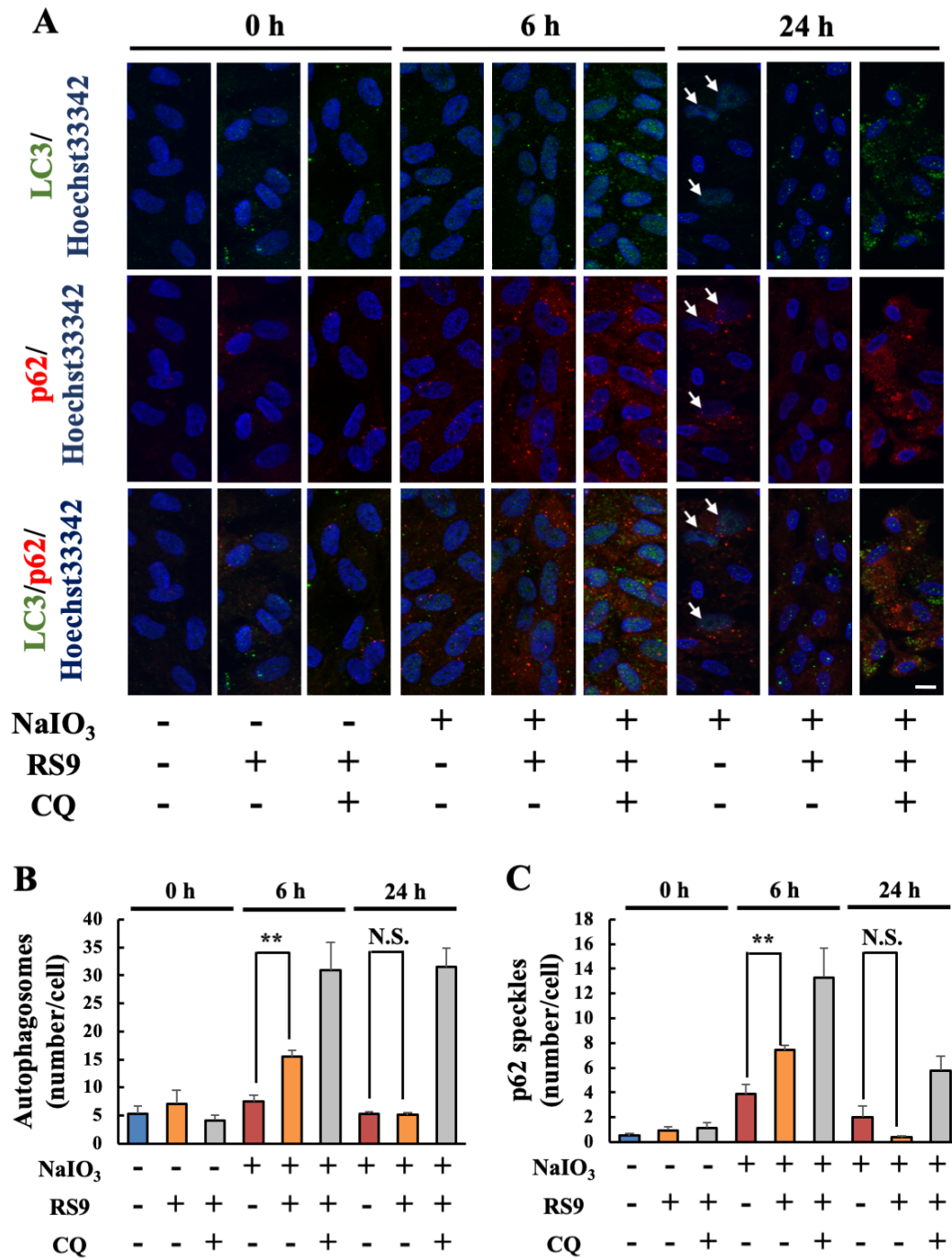


Fig. 10 Immunostaining of autophagy-related proteins after RS9 treatment.

(A) Representative images of LC3 and p62 immunostaining (LC3: green, p62: red, Hoechst 33342: blue). Hours indicate the time after NaIO₃ treatment. White arrows indicate the vacuolated and swollen formed nuclei. (B) Quantitative analysis of the number of LC3 positive autophagosomes. (C) Quantitative analysis of the number of p62-positive speckles. Scale bar = 10 μ m. Mean \pm SEM (n = 4), **p < 0.01, (Student's *t*-test). N.S.: not significant.

3-6 RS9 による p62 誘導作用と HO-1 誘導作用の関係

これまでの検討で見られた RS9 による細胞保護作用と HO-1 誘導作用、オートファジー誘導作用の関連について検討するため、siRNA を用いて HO-1 をノックダウンした際の RS9 の p62 誘導作用の変動をウェスタンブロット法により評価した。その結果、HO-1 をノックダウンしても RS9 による p62 誘導作用への影響はみられなかった (Fig. 11)。このことから、RS9 による HO-1 及び p62 の誘導は Nrf2 活性化の下流で起こるイベントであるが、それぞれの誘導経路は独立していることが示唆された。

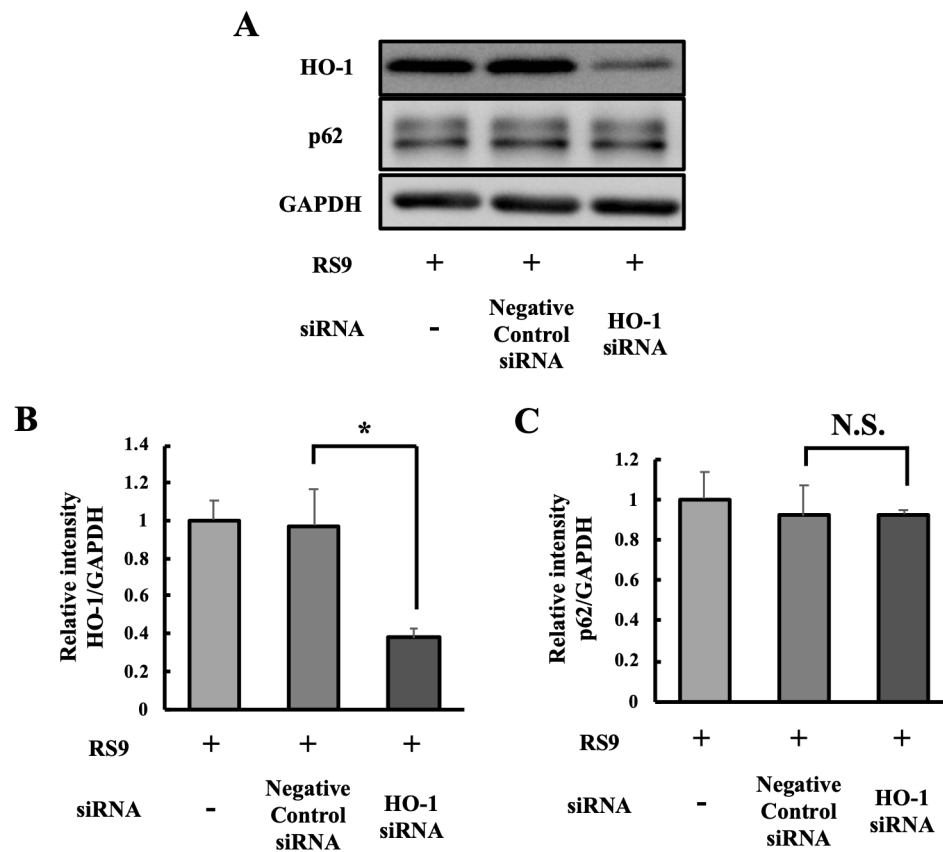


Fig. 11 Effects of HO-1 knockdown on p62 expression after RS9 treatment.

(A) Representative results of RNA interference to HO-1 by western blotting. (B-C) The results of quantitative analysis of the intensity of each immunoreactive protein band. (B) HO-1 expression levels normalized to those of GAPDH. (C) p62 levels normalized to those of GAPDH. RS9 was used at 10 nM final concentration. Mean \pm SEM (n = 3), *p < 0.05, (Student's *t*-test). N.S.: not significant.

3-7 ゼブラフィッシュ網膜光障害モデルにおける NAC の保護作用

光による網膜障害は酸化ストレスを介した複合的な機序によって生じ (22)、その慢性的な負荷が萎縮型 AMD の発症・進展要因となる (9)。哺乳類においてはマウスを用いた光誘発網膜障害モデルが古くから用いられているが、これらのモデルはアルビノのみでしか障害が起こらないという問題点があった。アルビノはメラニンに由来する RPE の着色がほとんどみられず、RPE の特性を反映できていない可能性が危惧されていた。そこで、本検討においてはまず、野生型においても透明度の高いゼブラフィッシュを用いて、哺乳類と同様の網膜光障害薬効評価モデルの確立を行った。野生型ゼブラフィッシュにおいては、14 日間暗順応を行うことにより、光に対する網膜の感受性を上げ網膜障害を引き起こすモデルが報告されていたため (52, 53)、本検討では当該モデルが薬効評価に使用可能であるか検討した。哺乳類の光障害モデルにおいて保護作用が報告されている抗酸化剤 NAC を硝子体内投与により投与し、保護作用を検討した。光照射から 24 時間後のゼブラフィッシュ網膜をサンプリングし、凍結切片により網膜外顆粒層 (ONL) の菲薄化及び細胞数を評価した結果、いずれも NAC 投与により濃度依存的に改善することが確認された (Fig. 12)。

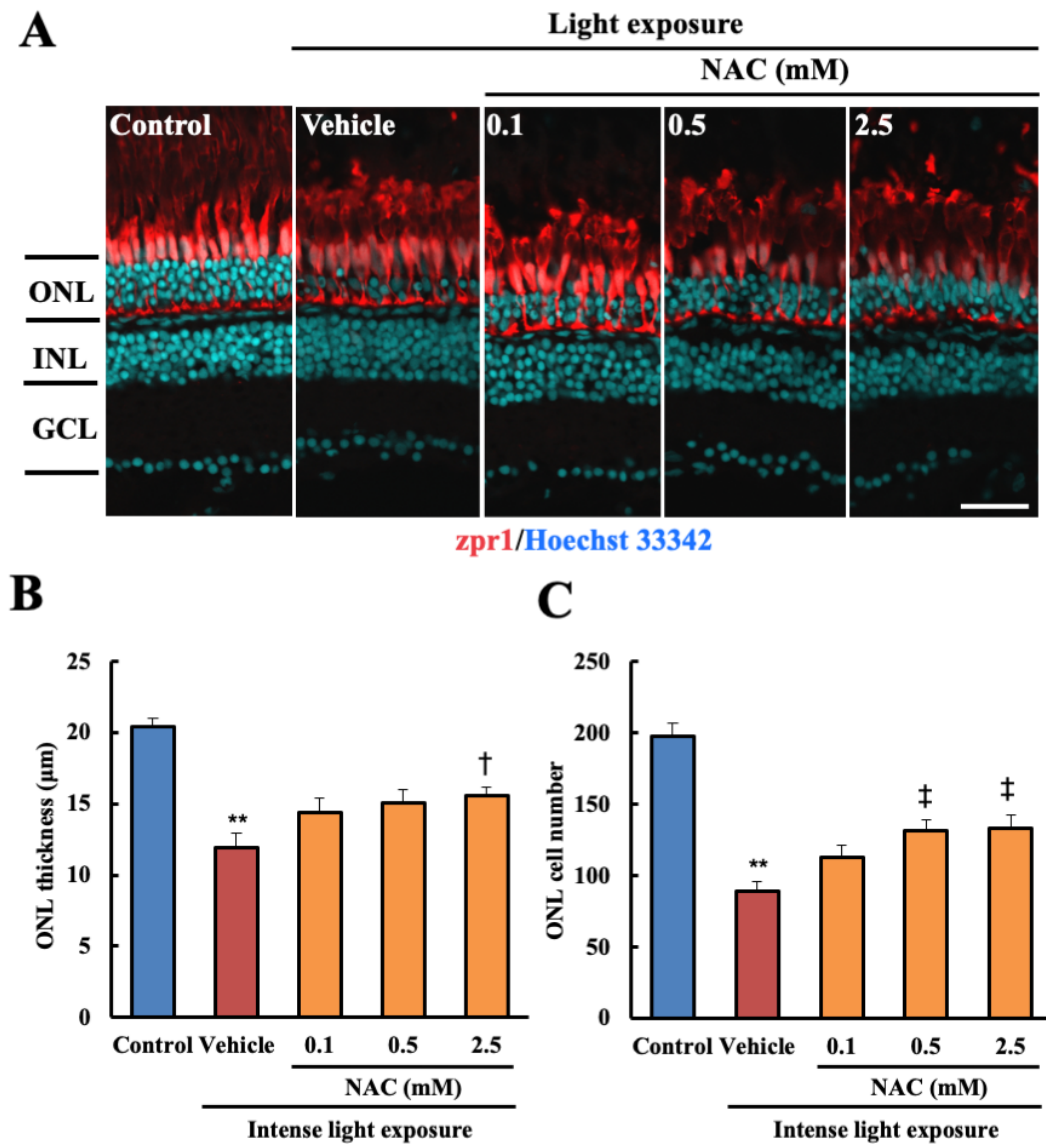


Fig. 12 Protective effects of intravitreal administration of NAC against light-induced retinal degeneration in a concentration-dependent manner.

(A) Typical images immunostained for zebrafish photoreceptor marker, zpr1 (red) and Hoechst 33342 (blue). (B–C) Quantification of ONL thickness and ONL cell number using the immunostaining results. Data are shown as means \pm SEM ($n=4-6$). ** $p < 0.01$ and * $p < 0.05$ vs. control (Student's t -test). † $p < 0.01$, ‡ $p < 0.05$ vs. vehicle (Dunnett's test). Scale bar=30 μm . GCL, ganglion cell layer; INL, inner nuclear layer; NAC, N-acetylcysteine; ONL, outer nuclear layer

3-8 ゼブラフィッシュ網膜光障害モデルにおける RS9 による網膜保護作用へのオートファジーの寄与

つづいて、確立したゼブラフィッシュ網膜光障害薬効評価モデルを用いて、RS9 の網膜保護作用及びその作用機序について検討を行った。特に APRE-19 細胞の NaIO_3 障害と同様に、網膜保護作用がオートファジーを介した機序であるか否かについて検討を行った。凍結切片の核染色を用いた網膜組織評価の結果、光により障害される視細胞の核が存在する ONL の菲薄化は RS9 投与で抑制され、CQ 同時投与により RS9 の抑制作用が消失した (Fig. 13A, B)。また、ONL に存在する核数を定量した結果、ONL 厚と同様に RS9 投与により、光障害による細胞核数の減少が抑制され、CQ により RS9 の抑制作用が減弱する傾向が認められた (Fig. 13A, C)。これらの結果から、ゼブラフィッシュ網膜光障害モデルにおいても、APRE-19 細胞を用いた検討と同様に、RS9 の示す保護作用は一部オートファジー経路を介することが示唆された。

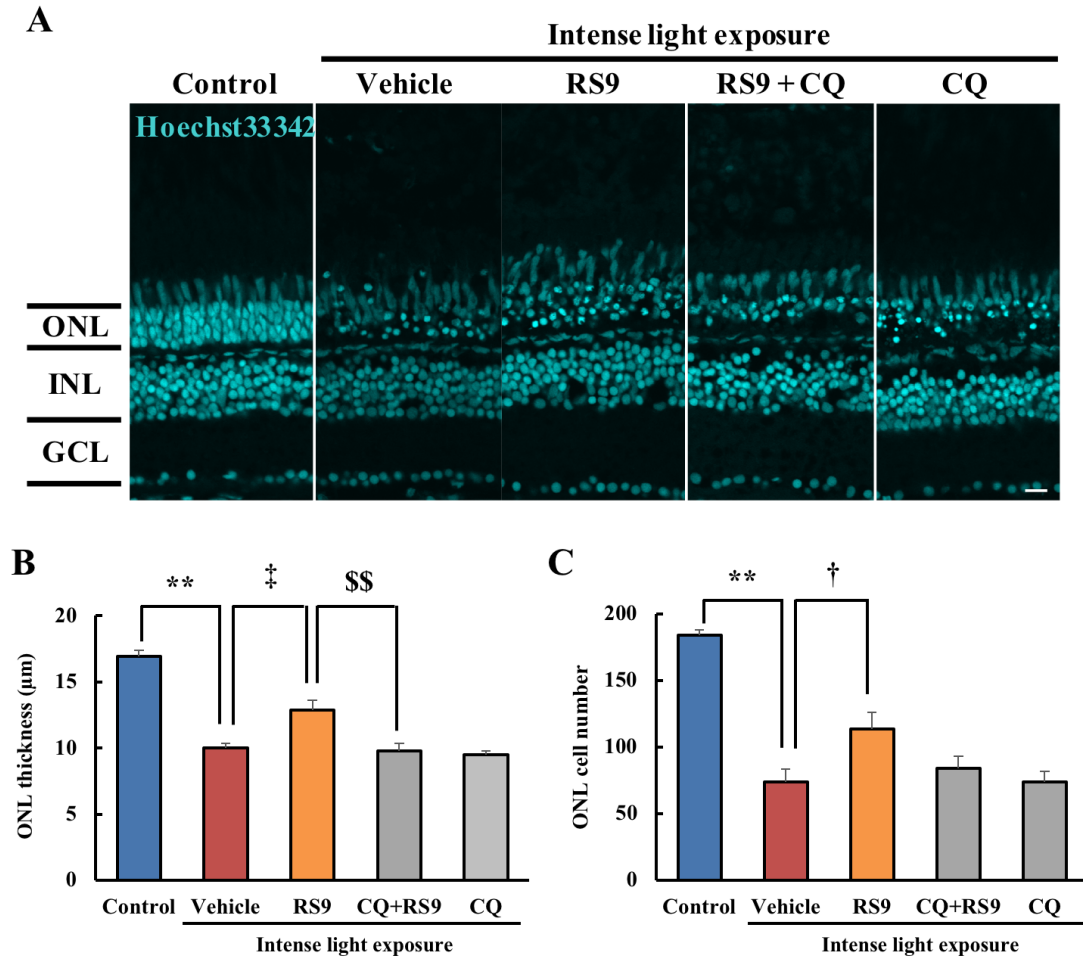


Fig. 13 Autophagy-related protective effects of RS9 on adult zebrafish retina from intense light exposure.

(A-C) Hoechst33342 staining of a cryosection of zebrafish retinas injected intravitreally with RS9 and CQ. (A) Representative image (Hoechst33342: cyan). Scale bar = 10 μm. (B) ONL thickness. (C) ONL cell number. Mean ± SEM (n = 5-6). vs. control; **p < 0.01, vs. vehicle; †p < 0.05, ‡p < 0.01, vs. RS9; \$\$p < 0.01. ONL: outer nuclear layer, INL: inner nuclear layer, GCL: ganglion cell layer.

第4節 考察

本章では強力な Nrf2 活性化薬である RS9 を用いて、Nrf2-Keap1 経路による細胞保護作用の下流にオートファジー経路が存在することを明らかにした (Fig. 14)。酸化剤である NaIO_3 及び光照射による酸化ストレスに対する RS9 の細胞保護作用にオートファジー経路の活性が必要であることが示された。この結果は、Nrf2 の転写活性化により p62 が誘導されること自体に酸化ストレス抑制の分子生物学的意義があることを示すものである。

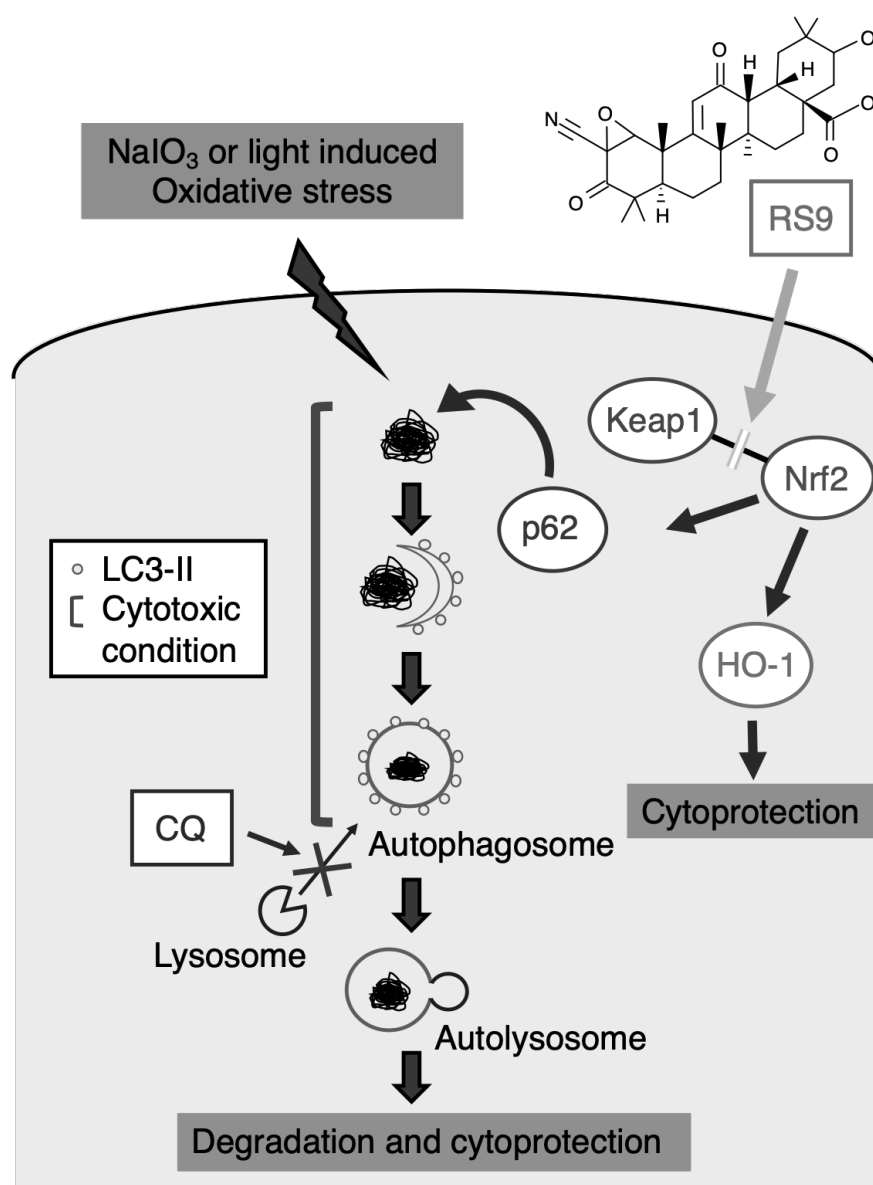


Fig. 14 Schematic diagram of autophagy-related protective effects by RS9.

酸化ストレスに対する細胞保護作用は、活性酸素種 (ROS) のようなストレス源を消去するスカベンジャータンパク質の誘導によってなされるという考え方が一般的である。例として、NAC は生理的なスカベンジャータンパクであるグルタチオンの前駆体としてその細胞保護作用を発揮する (58)。これに対し、本研究の結果から、Nrf2 を介した細胞保護作用において細胞内に生じた不要物をオートファジー機構の活性化によって除去し、細胞障害を抑制する経路の存在が示唆された。

ラジカルスカベンジャーはヒドロキシルラジカルなどのラジカル性の ROS を除去することができ、脳梗塞時の脳保護薬としてエダラボン (ラジカット®) が使用されている (59) ように、急性疾患の治療に対しては有効である (60, 61)。ただし、酸化ストレス障害の本体である ROS はその高い反応性により細胞内で障害を惹起するが、半減期は非常に短く障害反応は速やかに進行する。このため慢性的な酸化ストレスに対する治療としては ROS に対する直接的な抗酸化作用だけではなく、障害を受けた細胞小器官を速やかに除去するオートファジー機構の活性化も考慮する必要がある。

本研究結果より、抗酸化応答機構の誘導だけでなく、酸化ストレスにより生じる損傷オルガネラを除去する機構として、オートファジー経路を活性化できる Nrf2 活性化薬は慢性的な酸化ストレスによる蓄積性の細胞障害に対しても有効である可能性が示唆された。ただし、このような障害性オルガネラの除去による慢性疾患治療に関してはエビデンスが少なく、今後さらなる分子機構の解明を含めたエビデンスの創出並びにオートファジー活性化作用の最適化などの検討が必要である。

RS9 に類似した構造を有するトリテルペノイド型 Nrf2 活性化薬として現在臨床試験が行われているバルドキソロンメチルは、過去に行われた臨床試験 (BEACON study) が心疾患イベントの増加により中止された (62)。この理由とし

て、腎機能が高度に低下した患者における急激な血中ナトリウム濃度の上昇による血圧上昇が関与していることが、その後の解析結果で明らかになった (63)。現在行われている AYAME study は、投与量を段階的に上げていくことにより血圧上昇による心血管イベントの発症に対応している。今後、長期的な投与を行うためには様々な副次的作用への対応が必要であると考えられる。萎縮型 AMD の治療応用に関しては、VEGF 阻害薬のように眼内局所的な投与が可能である (64) ため、眼内局所的な投与による副作用リスクの少ない製剤開発が行われることを期待したい。

今回の検討では、RS9 による p62 誘導を介したオートファジー誘導に着目して検討を行ったが、経時的評価の結果では一部で p62 と LC3-II の発現変動が相関していなかった (Fig. 9, NaIO₃ 処置 24 時間後)。このことから、RS9 により誘導されたオートファゴソームは p62 を含まないものも存在しており、これらは別の機序によって誘導されている可能性がある。第 2 章の結果から、RS9 が AMPK α_1 の活性化を介したオートファジー誘導作用も有していることが明らかとなっており、細胞保護作用に関しても AMPK α_1 の活性化を介したオートファジー誘導作用が関与していることが示唆される。

Nrf2 活性化薬は、RPE 細胞に対して直接的な抗酸化作用及びオートファジー誘導による細胞保護作用を示した。萎縮型 AMD のリスクファクターとして知られる光暴露により引き起こされる網膜障害についても、同様に Nrf2 活性化薬がオートファジーを介して保護作用を示すことが示唆された。ただし、萎縮型 AMD においてどのような細胞障害性オルガネラの蓄積がその病態形成に関与しているかは未だ解明されておらず、さらなる研究が必要である。

本章では、RPE における酸化ストレスとオートファジーの関係性について着目し、抗酸化応答機構に関わる分子の一つである Nrf2 は、オートファジーを介した細胞保護作用を発揮することを明らかにした。第 2 章以降では、RPE で慢

性的に消化が行われる特徴的なものとして、ファゴサイトーシスにより取り込まれる視細胞外節に着目して検討を行った。

第2章 Nrf2 活性化薬による視細胞外節ファゴサイトーシス活性化作用

第1節 緒言

序論でも述べたように、萎縮型 AMD 患者の RPE 細胞においてオートファジーの不全が報告されている (41, 43)。網膜において光の受容体として働く視細胞では、光の受容に伴い日々非常に大きな代謝要求が生じている (3)。その機能を保つために、光を受容する視細胞の外節は古くなると先端部分が切り離され、外側に位置する RPE 細胞によって貪食 (ファゴサイトーシス) される (3)。RPE 細胞による視細胞外節のファゴサイトーシスは認識・取り込み・消化の三段階からなる (3)。認識や取り込みには、クラス B スカベンジャー受容体である CD36 が関与していることなどが知られている (3)。また、細胞内に取り込まれたファゴソームの消化は、LC3 が関与する LC3 関連型ファゴサイトーシスにより行われることが近年明らかにされた (65)。視細胞外節の消化が正常に行われないことによりビジュアルサイクルが破綻し、視機能が低下することも示されており (65)、ファゴサイトーシス過程は、視機能維持にとって非常に重要な役割を果たしている (Fig. 15)。したがって、LC3 関連型ファゴサイトーシス機構を標的とした新たな治療戦略は、萎縮型 AMD に対して有効であると考えられる。

第1章の結果から、Nrf2 活性化薬がオートファジー経路を活性化することが示唆された。しかしながら、LC3 関連型ファゴサイトーシスにおける p62 の関与は明らかにされておらず、Nrf2-p62 経路によるオートファジー経路の活性化が視細胞外節の消化に寄与するかは不明であった。そこで、本章においては、オートファジー活性化作用を有する Nrf2 活性化薬による視細胞外節ファゴサイトーシスへの作用を評価し、Nrf2 の活性化は萎縮型 AMD における新たな治療法となり得るかについてさらなる検討を行った。

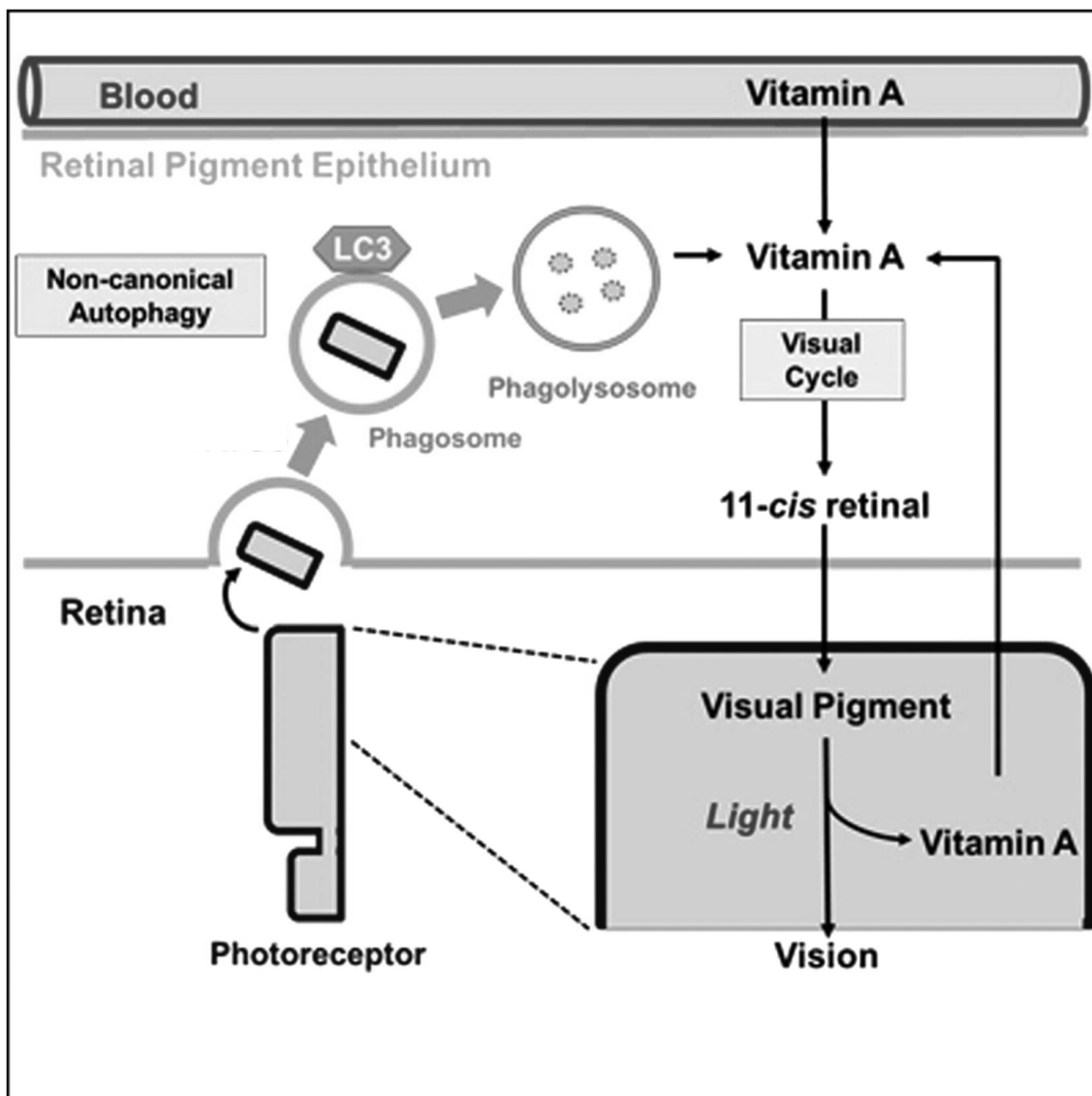


Fig. 15 Schematic diagram of LC3 associated phagocytosis in RPE and visual cycle.

(Kim, J. Y. et al. *Cell* 154, 365–376, 2013 より引用)

第2節 実験材料及び方法

2-1 実験材料

本試験に用いた薬物及び試薬は、以下の通りである。

フマル酸ジメチル (Dimethyl fumarate) は東京化成 (Tokyo, Japan)、スルフォラファン (sulforaphane) は Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA)、スクロース、PFA は、Wako (Osaka, Japan)、リン酸水素二ナトリウム・十二水、リン酸二水素ナトリウム二水和物、Hoechst 33342、pHrodo[®] succinimidyl ester、FITC Isomer I は Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)、フルオロマウントは Diagnostic Bio Systems (Pleasanton, CA, USA) よりそれぞれ購入した。RS9 は第一三共株式会社より提供していただいた。

2-2 実験方法

2-2-1 細胞培養

ヒト由来網膜色素上皮細胞株 (ARPE-19) は American Type Culture Collection (ATCC) より購入した。ARPE-19 細胞は 10% FBS、100 U/mL penicillin 及び 100 µg/mL streptomycin を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/F-12 (Wako, Osaka, Japan) を用い 37°C、5% CO₂ 中にて培養した。また、2-3 日毎に培地交換を行い、4-5 日毎に trypsin 処理による継代操作を行った。

初代培養ヒト網膜色素上皮細胞 (hRPE) は Lonza (Walkersville, MD, USA) より購入した。hRPE 細胞は 2% FBS、L-glutamine、GA-1000、Growth factor (FGF-B) を添加した Retinal Pigment Epithelial Basal Medium を用いて、37°C、5% CO₂ 中にて培養した。また、4-5 日毎に Trypsin/EDTA、Trypsin Neutralizing Solution、HEPES Buffered Saline Solution 処理による継代を行った。

2-2-2 ブタ眼からの視細胞外節単離

ブタ眼からの視細胞外節 (photoreceptor outer segment: POS) 単離については、過去に報告されている二種類のプロトコール (66, 67) を参考に、一部改変した方法で行った。以下にその詳細を記す。単離した網膜を懸濁させる溶液として NaCl (115 mM)、KCl (2.5 mM)、MgCl₂ (1 mM)、HEPES/KOH (10 mM)、dithiothreitol (1 mM) を含む POS buffer (pH7.5) を調整した (66)。食肉加工業者 (丸尚食品、一宮、日本) から購入したブタ眼から網膜を取り出し、0.6 M スクロース入りの POS buffer に 1 眼につき 2.0 mL の割合で懸濁した。二重に重ねた医療用ガーゼを用いて、網膜懸濁液を 3 度濾過した (67)。濾過した溶液を、前日に調製した 0.9 M、1.2 M、1.5 M スクロース濃度勾配溶液に静かに加えた。これを 103,500 × g、4°C で 50 分間遠心した。遠心後、中間に生じる白い POS の層を回収し、4-5 倍量の氷冷 20 mM Tris 酢酸 buffer (pH 7.2)、5 mM タウリン混合溶液に溶解した後、3,000 × g、4°C で 10 分間遠心した。採集した沈殿物を 10 mL の 10% スクロース、20 mM Tris 酢酸 buffer (pH 7.2)、5 mM タウリン混合溶液に溶解した後、3,000 × g、4°C で 10 分間遠心した。さらに沈殿物を採集し、15 mL の 10% スクロース、20 mM リン酸ナトリウム buffer (pH 7.2)、5 mM タウリン混合溶液に溶解した後、3,000 × g、4°C で 10 分間遠心した (67)。沈殿物として得られた POS を 10 mL の DMEM に再懸濁し、血球計算盤を用いて濃度を計算した後、 1×10^7 個/mL の濃度になるようにさらに希釈し、-80°C で保存した。

2-2-3 pHrodo[®] succinimidyl ester または FITC Isomer I の付加

POS (10 mg) を 5 mL の DMEM に溶解し、2 mg/mL に調整した。DMSO (150 μL) に懸濁した 1 mg の pHrodo[®] succinimidyl ester または DMSO (1 mL) に懸濁した 10 mg の FITC Isomer I と共に、Amicon Ultra-15 molecular cutoff: 3,000 (Millipore, Billerica, MA, USA) に入れた。遮光して室温で 1 時間反応させた後、3,000 × g、4°C で 2-6 時間遠心した。

2-2-4 網膜色素上皮 (RPE) 細胞によるファゴサイトーシス活性評価

ARPE-19 細胞または hRPE 細胞は 96 well plate に 1.5×10^4 cells/well で播種し、37°C で 4 日間培養した。細胞がコンフルエントに達した後、ARPE-19 細胞は 1% FBS を含む DMEM/F-12 に、hRPE は 1% FBS を含む Retinal Pigment Epithelial Basal Medium にそれぞれ培地を交換した。RS9 (0.01、0.1、1 μ M) を添加して 6 時間培養した後、 1×10^7 個の POS/well となるよう 10 μ L ずつ添加してさらに 6 時間培養した。培養後、1% FBS 入り DMEM/F-12 で 5 回培地交換し、過剰な POS を取り除いた。hRPE は 1xPBS で 5 回洗浄し、最後の培地交換のみ Retinal Pigment Epithelial Basal Medium を用いた。染色像の撮影は BZ-X700 all-in-one fluorescence microscope (Keyence) を用いて行った。

定量評価にあたっては、撮影した画像をイメージングソフトウェア Image J で解析した。pHrodo[®]は pH 感受性蛍光プローブであり、中性環境下では蛍光を発しないが (68)、ファゴサイトーシスによりファゴリソソーム内に取り込まれて酸性環境下に移行すると赤い蛍光を放出する (69, 70)。つまり、pHrodo の赤色蛍光強度が高いほど、ファゴサイトーシスが活発に起きていることを示している。赤色蛍光に関する各群のヒストグラムを解析し、その平均値を定量した (71)。

2-2-5 ウェスタンブロットによる評価

ARPE-19 細胞は、24 well plate に 7.5×10^4 cells/well となるように播種し、37°C、5% CO₂ の条件下で 4 日間培養した。培地交換と試薬添加を行い、非標識の POS 添加 1-36 時間後にそれぞれサンプリングを行った。以後は第一章 2-2-6 と同様の方法にて評価を行った。本章にて検討に用いた一次抗体は Table 1 に記載した。二次抗体には、Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:2000、Thermo Fisher Scientific)、HRP-conjugated goat anti mouse antibody (1:2000、Thermo Fisher Scientific) を用いた。タンパク質の発現強度は、Multi Gauge Ver3.0

(Fujifilm) を用いて解析した。バンドの強度を数値化し、個々の値を算出した。
 β -Actin はローディングコントロールとして使用した。

Table 1. Antibodies used in this study.

Antigen	Antibody description	Manufacturer	concentrations
HO-1	rabbit polyclonal	Merck KGaA	1:1000
NQO1	rabbit polyclonal	Merck KGaA	1:200
LC3	rabbit monoclonal	CST	1:1000
p62	mouse monoclonal	GeneTex	1:500
β -Actin	mouse monoclonal	Sigma Aldrich	1:2000
AMPK α	rabbit monoclonal	CST	1:1000
phospho-AMPK α (Thr172)	rabbit polyclonal	CST	1:1000
mTOR	rabbit polyclonal	CST	1:1000
phospho-mTOR (Ser2448)	rabbit polyclonal	CST	1:1000
Akt	rabbit polyclonal	CST	1:1000
phospho-Akt (ser473)	rabbit polyclonal	CST	1:1000

CST: Cell Signaling Technology

2-2-6 FITC-POS 分解評価

RPE-19 細胞は 8 well chamber slides (SCS-N08、Matsunami Glass Ind., Ltd.) に 4.1×10^4 cells/well の細胞密度で播種し、37°C、5% CO₂ の条件下で 4 日間培養した。RS9 及びバフィロマイシン A1 (Bafilomycin A1: Baf A1) (Cayman Chemical) または溶媒を添加し、POS 添加 36 時間後に 4% PFA による固定を 15 分間行い、Hoechst33342 (1:1000、Thermo Fisher Scientific) を 10 分間反応させた。PBS で洗浄後、chamber を取り除き、スライドガラスをフルオロマウント (水溶性封入基材) を用いてカバーガラスで封入した。染色像の撮影は BZ-X700 all-in-one fluorescence microscope (Keyence) を用いて行った。画像解析における FITC-POS 数の計数は Image-J (NIH) を用いて行った。

2-2-7 RNA 干渉

ARPE-19 細胞は抗生物質不含 10%FBS DMEM/F-12 培地を用いて 96 well プレートに 15,000 cells/well で、24 well プレートに 7.5×10^4 cells/well で播種し、37°C、5% CO₂ の条件下で 3 日間培養した。Lipofectamine™ RNAiMAX Reagent (Thermo Fisher Scientific) 及び Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific) への 10 nM siRNA の混合溶液を作製した後、ARPE-19 細胞への siRNA 導入を行った。使用した siRNA の配列は以下の通りである。

Table 2. siRNAs used in this study (gray panels indicate siRNA which used in each Figures).

p62 siRNA	
#1 (Sense)	5'-AGAAGUGGACCCGUCUACAGGUGAA-3'
#1 (Antisense)	5'-UUCACCUGUAGACGGGUCCACUUCU-3'
#2 (Sense)	5'-CAGGCUCCUGCAGACCAAGAACUAU-3'
#2 (Antisense)	5'-AUAGUUCUUGGUCUGCAGGAGCCUG-3'
#3 (Sense)	5'-UACGUGAAGGAUGACAUCUUCCGAA-3'
#3 (Antisense)	5'-UUCGGAAGAUGUCAUCCUUCACGUA-3'
AMPK α_2 siRNA	
#1 (Sense)	5'-ACCGAGCUAUGAAGCAGCUGGAUUU-3'
#1 (Antisense)	5'-AAAUCCAGCUGCUUCAUAGCUCGGU-3'
#2 (Sense)	5'-GCAGGUCCUGAAGUUGAUUUCUGGA-3'
#2 (Antisense)	5'-UCCAGAUUAACAACUUCAGGACCUGC-3'
#3 (Sense)	5'-CCCACUGAAACGAGCAACUAUCAA-3'
#3 (Antisense)	5'-UUUGAUAGUUGCUCGUUUCAGUGGG-3'
AMPK α_1 siRNA	
#1 (Sense)	5'-CCCAUCCUGAAAGAGUACCAUUCUU-3'
#1 (Antisense)	5'-AAGAAUGGUACUCUUUCAGGAUGGG-3'
#2 (Sense)	5'-CCCUCAAUAUUUAAAUCCUUCUGUG-3'
#2 (Antisense)	5'-CACAGAAGGAUUUAAAUAUUGAGGG-3'
#3 (Sense)	5'-ACCAUGAUUGAUGAUGAAGCCUUA-3'
#3 (Antisense)	5'-UUAAGGCUUCAUCAUCAUUAUGGU-3'

陰性対照として、siRNA (negative control small interfering RNAs) (Thermo Fisher Scientific) を用いた。遺伝子導入 24 時間後に抗生物質含有 10%FBS DMEM/F-12 培地に交換し、RS9 を添加、さらに 24 時間培養後のサンプルを用いてウェスタンブロット解析を行った。

2-2-8 NAD⁺/NADH アッセイ

ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (Nicotinamide Adenine Dinucleotide: NAD) の酸化型である NAD⁺と還元型である NADH 比の測定には NAD⁺/NADH Assay Kit-WST (Wako) を用いた。本試薬は水溶性色素である Water soluble Tetrazolium salts (WST) の NADH による還元により生じる WST ホルマザンの吸光度を測定するものである。NAD⁺を 60°C、1 時間の加熱処理で除去したサンプルを併せて測定することにより、細胞内の NAD⁺/NADH 比を算出した。測定方法は販売元のプロトコールに従い、吸光度測定はマイクロプレートリーダー (Varioskan Flash 2.4; Thermo Fisher Scientific) を用いて 450 nm の吸光度をそれぞれ測定した。

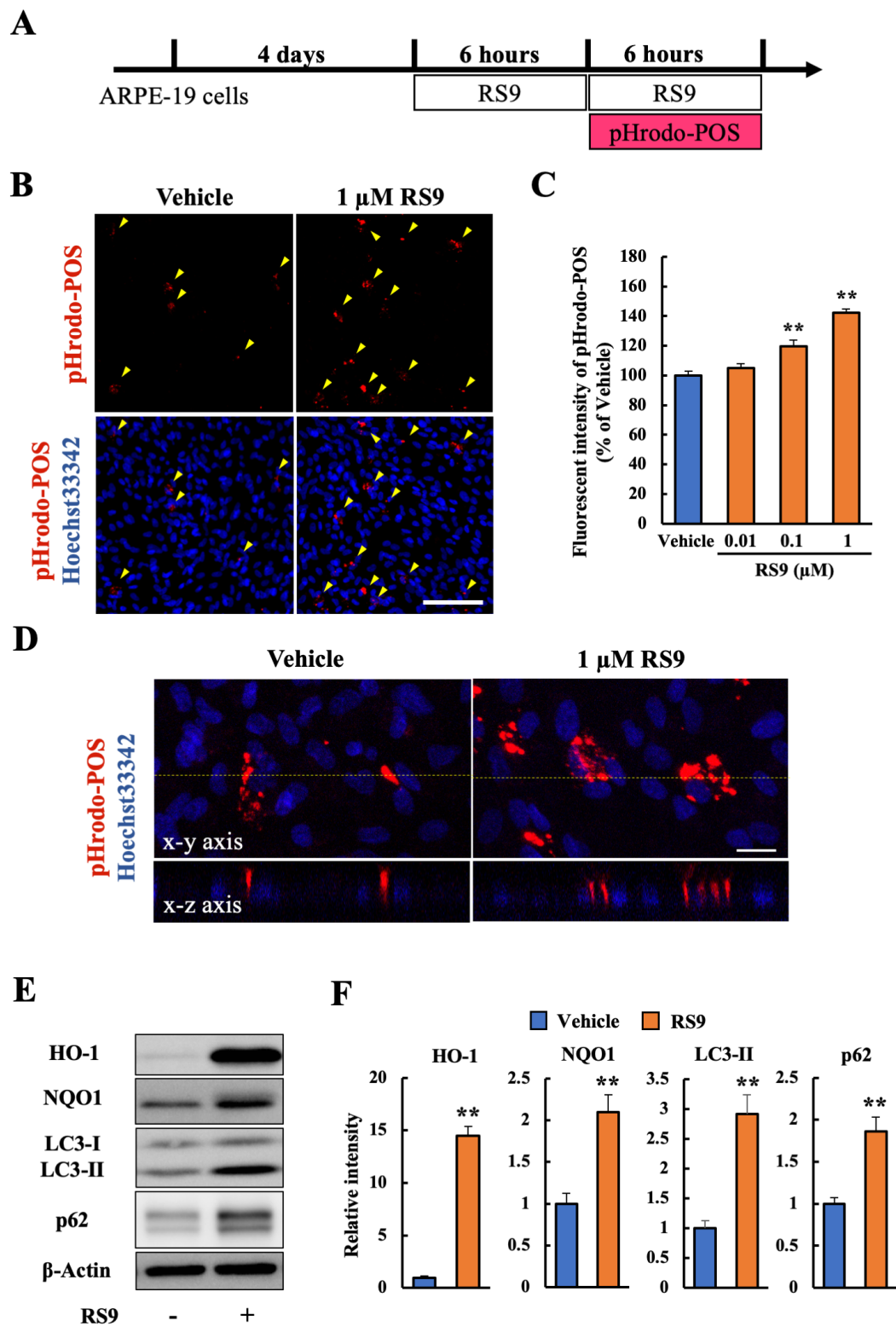
2-2-9 統計学的解析

実験成績は平均値 ± 標準誤差で示した。統計学的な比較は、SPSS Statistics software を用いて F 検定を行った後、Student's *t*-test または Welch's *t*-test、一元配置分散分析を行った後、Dunnett's test、Tukey's test により行った。危険率が 5 % 未満を有意差有りとした。

第3節 実験成績

3-1 RPE 細胞における視細胞外節ファゴサイトーシスの RS9 による促進作用

はじめに、RS9 による RPE 細胞の視細胞外節ファゴサイトーシス活性への影響を検討した。RS9 を 6 時間前処置した後、pH 感受性色素 pHrodo により標識した豚の眼由来の視細胞外節を ARPE-19 細胞に添加した (Fig. 16A)。POS 添加から 6 時間後のファゴリソソーム形成を ARPE-19 細胞に取り込まれた pHrodo-POS の蛍光強度により測定したところ、pHrodo-POS の蛍光強度が RS9 の処置濃度依存的に増加した (Fig. 16B, C)。共焦点顕微鏡を用いた z-stack 画像においても、ARPE-19 細胞に取り込まれた pHrodo-POS が核の周囲に存在することが確認された (Fig. 16D)。同一のタイムポイントにおいて、蛍光標識していない POS を取り込ませた ARPE-19 細胞における Nrf2 下流抗酸化応答タンパク質 (HO-1、NQO1) 及び POS の消化に関与するとされるオートファジーの関連タンパク質 (LC3-II、p62) の発現を評価したところ、いずれも 1 μ M の RS9 処置により増加が認められた (Fig. 16E, F)。また、RS9 によるファゴリソソーム形成促進作用は、7 日間培養したヒト初代培養 RPE 細胞 (hRPE 細胞) においても ARPE19 細胞と同様に認められた (Fig. 16G, H)。



Continued on the next page

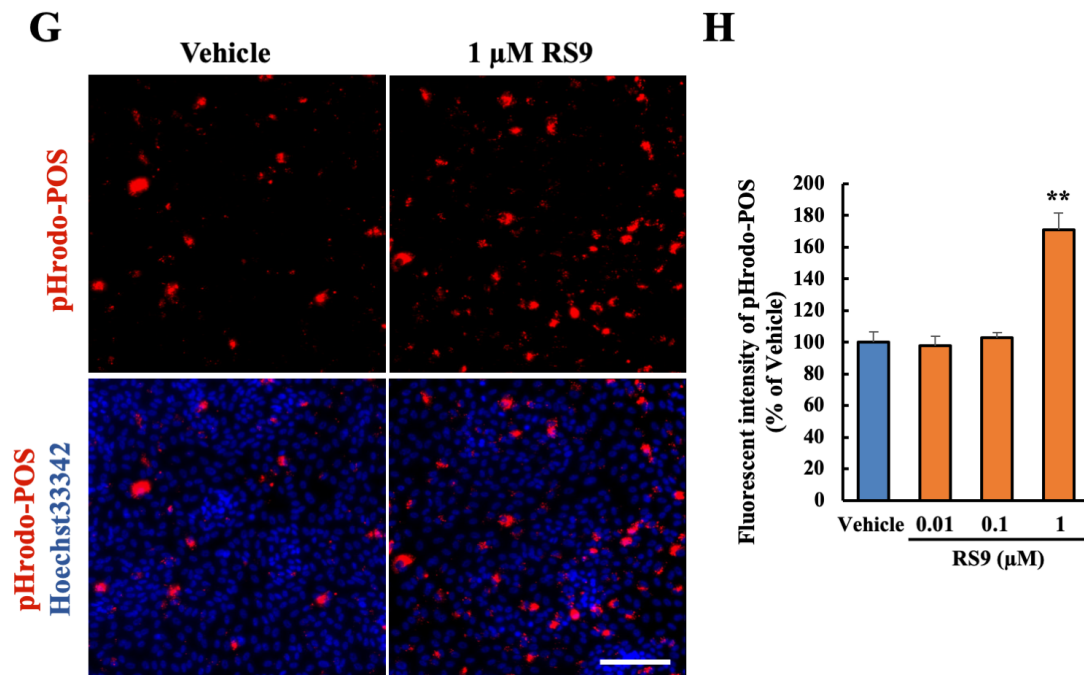
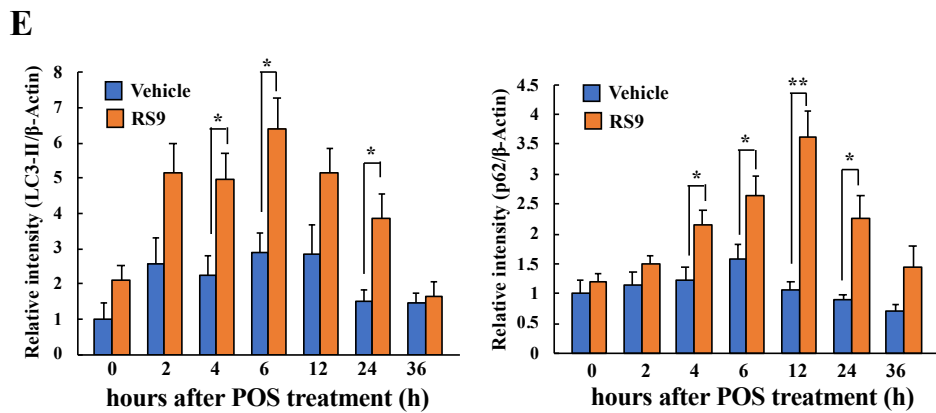
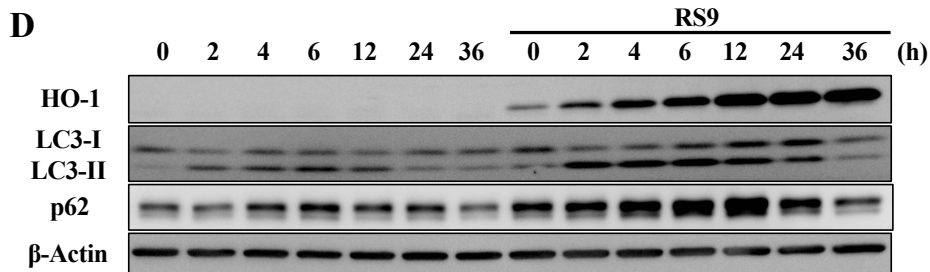
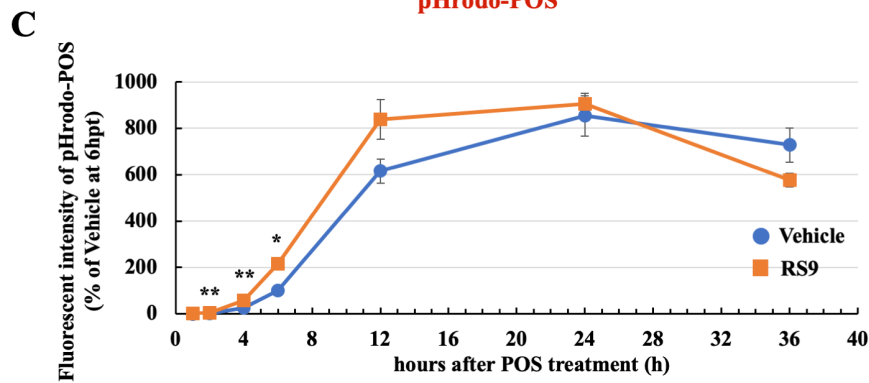
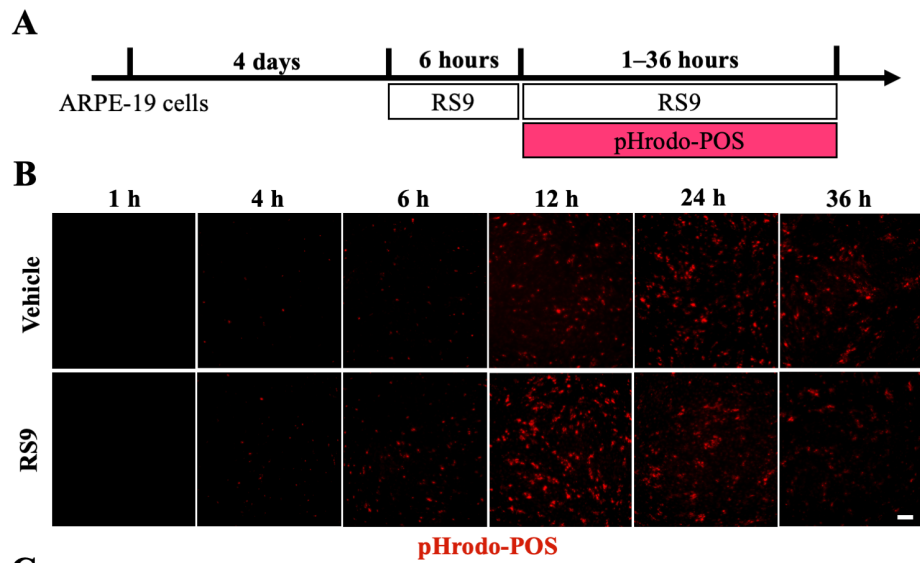


Fig. 16 Effects of RS9 on POS phagolysosomes formation in RPE cells.

(A) Experimental protocol. (B) Representative images of phagocytized pHrodo-SE-labeled POS at 6 hours after POS treatment in ARPE-19 cells. Scale bar indicates 100 μ m. (C) Quantitative data of the phagocytized pHrodo-SE-labeled POS fluorescence intensity. Mean \pm SEM (n = 12), **p < 0.01 vs. vehicle (Dunnett's test). (D) Z projected images of phagocytized pHrodo-SE-labeled POS using confocal microscope. Upper images show XY axis and lower images show XZ axis. Scale bar indicates 20 μ m. (E) Representative band images of western blotting 6 hours after POS treatment. (F) The results of quantitative analysis of the intensity of each immunoreactive protein band. Each relative intensity was normalized to those of β -Actin. RS9 was used at 1 μ M as a final concentration, respectively. Mean \pm SEM (n=5), **p < 0.01 (Student's *t*-test). (G) Representative images of phagocytized pHrodo-SE-labeled POS at 6 hours after POS treatment in hRPE cells. Scale bar indicates 100 μ m. (H) Quantitative data of the phagocytized pHrodo-SE-labeled POS fluorescence intensity in hRPE cells. Mean \pm SEM (n = 6), **p < 0.01 vs. vehicle (Dunnett's test).

3-2 ファゴリソソーム形成促進作用の経時的変化

RS9 処置によるファゴリソソーム形成促進作用について、POS 添加から 36 時間後までの経時的評価を行った (Fig. 17A)。RS9 処置により視細胞外節添加 2 時間後から 6 時間後までファゴリソソーム形成が促進された (Fig. 17B, C)。また、RS9 が RPE 細胞に及ぼすオートファジー活性変化についても検討した。関連タンパク質である LC3-II 及び p62 の発現を同一のタイムポイントで経時的に評価した結果、RS9 処置によりいずれも一過性に上昇した (Fig. 17D, E)。



Continued on the next page

Fig. 17 Accelerated maturation of POS engulfed phagolysosome by RS9.

(A) Experimental protocol. (B) Representative images of phagocytized pHrodo-SE-labeled POS at each time points after POS treatment in ARPE-19 cells. Scale bar indicates 100 μ m. (C) Quantitative data of time course analysis using pHrodo-SE-labeled POS phagocytosis assay in ARPE-19 cells. Mean \pm SEM (n=6), *p < 0.05, **p < 0.01 (Student's *t*-test). (D) Representative band images of western blotting analysis. (E) The results of quantitative analysis of the intensity of each immunoreactive protein band. Each relative intensity was normalized to those of β -Actin. RS9 was used at 1 μ M as a final concentration. Mean \pm SEM (n=4), *p < 0.05, **p < 0.01 (Student's *t*-test).

3-3 オートファゴソーム分解阻害による POS の蓄積

緒言の項で示した通り、RPE 細胞に取り込まれた POS ファゴソームの表面に LC3 がリクルートされ、内容物の消化が行われる (65)。RS9 により POS を取り込んだファゴリソソームが早期に増加することが明らかになった。しかし、RS9 により増加したファゴリソソームが分解に至っているか、その分解にオートファジー経路が関与しているかは明らかでない。これらの点を検討するため、オートファゴソームとリソソームの融合を阻害する後期オートファジー阻害剤 Baf A1 を用いた FITC-POS の分解評価を行った (Fig. 18A)。これまでの検討では、pH 感受性蛍光色素 pHrodo により修飾した POS を用いファゴリソソーム形成を評価したが、本検討では FITC により修飾した POS を用いて、RPE 細胞に取り込まれたすべての POS を評価している。POS 添加から 36 時間後、RPE 細胞内に残存する FITC-POS を分解されていない POS の指標として、その数を定量評価した。この結果、RS9 処置により取り込まれた FITC-POS 数の減少が認められた (Fig. 18B, C)。さらに、RS9 処置群において、Baf A1 の同時処置により残存する FITC-POS の数が増加した (Fig. 18B, C)。これらの結果より、RS9 は POS の RPE 細胞内における取り込み自体を増加させるのではなく、ファゴリソソーム形成を促進していることが示唆された (Fig. 18D)。

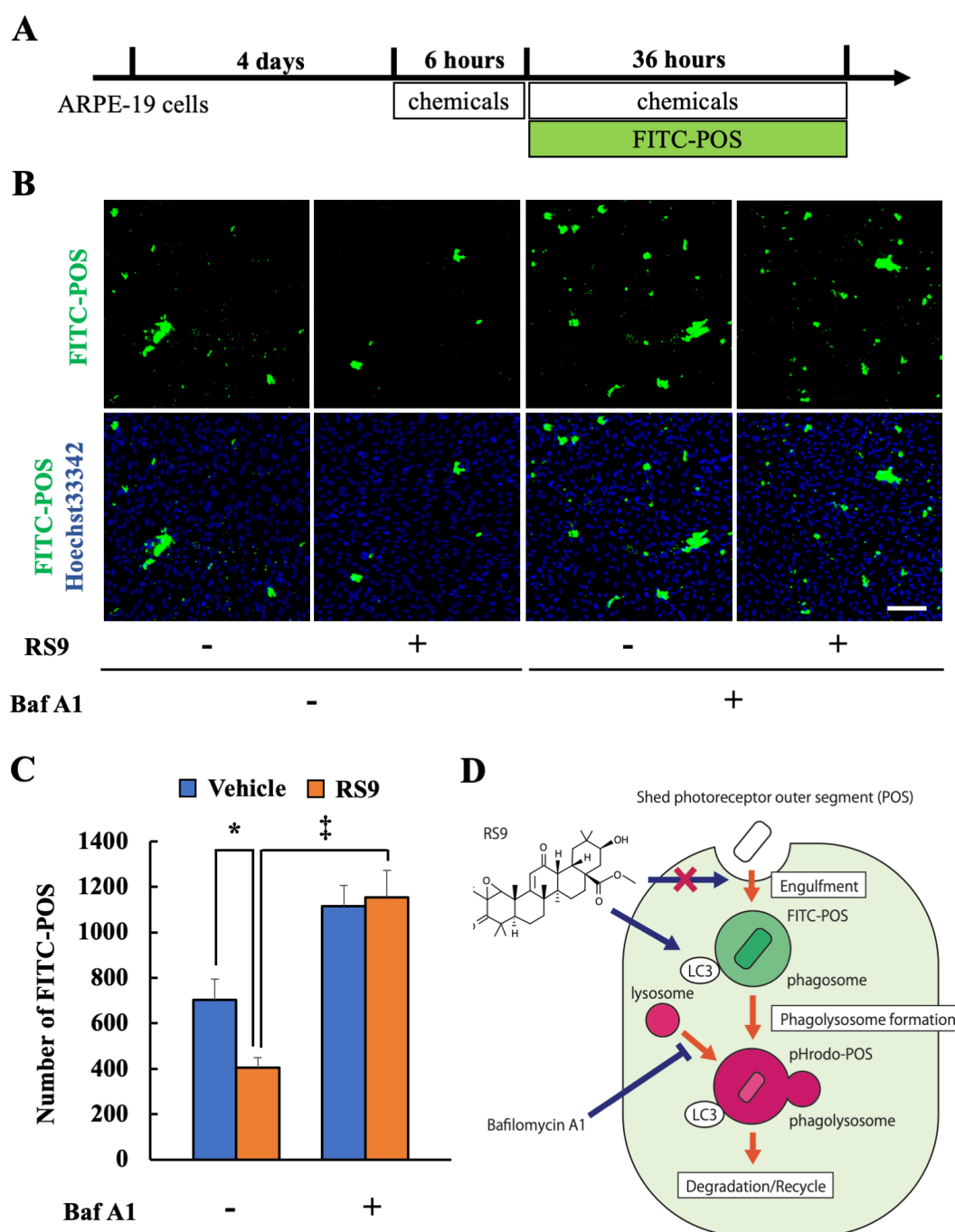


Fig. 18 Effects of inhibition of autophagic degradation on POS accumulation.

(A) Experimental protocol. (B) Representative images of undigested FITC-labeled POS at 36 hours after POS treatment. Scale bar indicates 100 μm . (C) Quantitative data of the number of undigested FITC-labeled POS in ARPE-19 cells in 1730 x 1300 μm^2 . RS9 was used at 1 μM as a final concentration. Baf A1 was used at 75 nM as a final concentration. Mean \pm SEM (n = 4), *p < 0.05 vs. vehicle, ‡p < 0.01 vs. RS9 and Baf A1 (Student's *t*-test). (D) Schematic diagram of RS9 effects on POS phagocytosis process. Baf A1: Bafilomycin A1.

3-4 RS9 によるファゴリソソーム形成促進作用に対する p62 によるオートファジー誘導作用の関与

RS9 がどのようにファゴリソソーム形成を促進しているかについて、Nrf2 活性化の下流で誘導されるオートファジー標的タンパク質である p62 に着目し、p62 の発現を siRNA によりノックダウンした際のファゴリソソーム形成について検討を行った。p62 をノックダウンした結果、RS9 によるファゴリソソーム形成促進作用は変化しなかった(Fig. 19A)。オートファジー関連タンパク質の発現についても確認したところ、p62 をノックダウンした結果、HO-1 の発現上昇作用については変化がなく、LC3 の発現上昇作用は部分的に抑制された (Fig. 19B-C)。これらの結果より、RS9 処置によるファゴリソソーム形成促進作用に、p62 によるオートファジー誘導は関与していないことが示唆された。

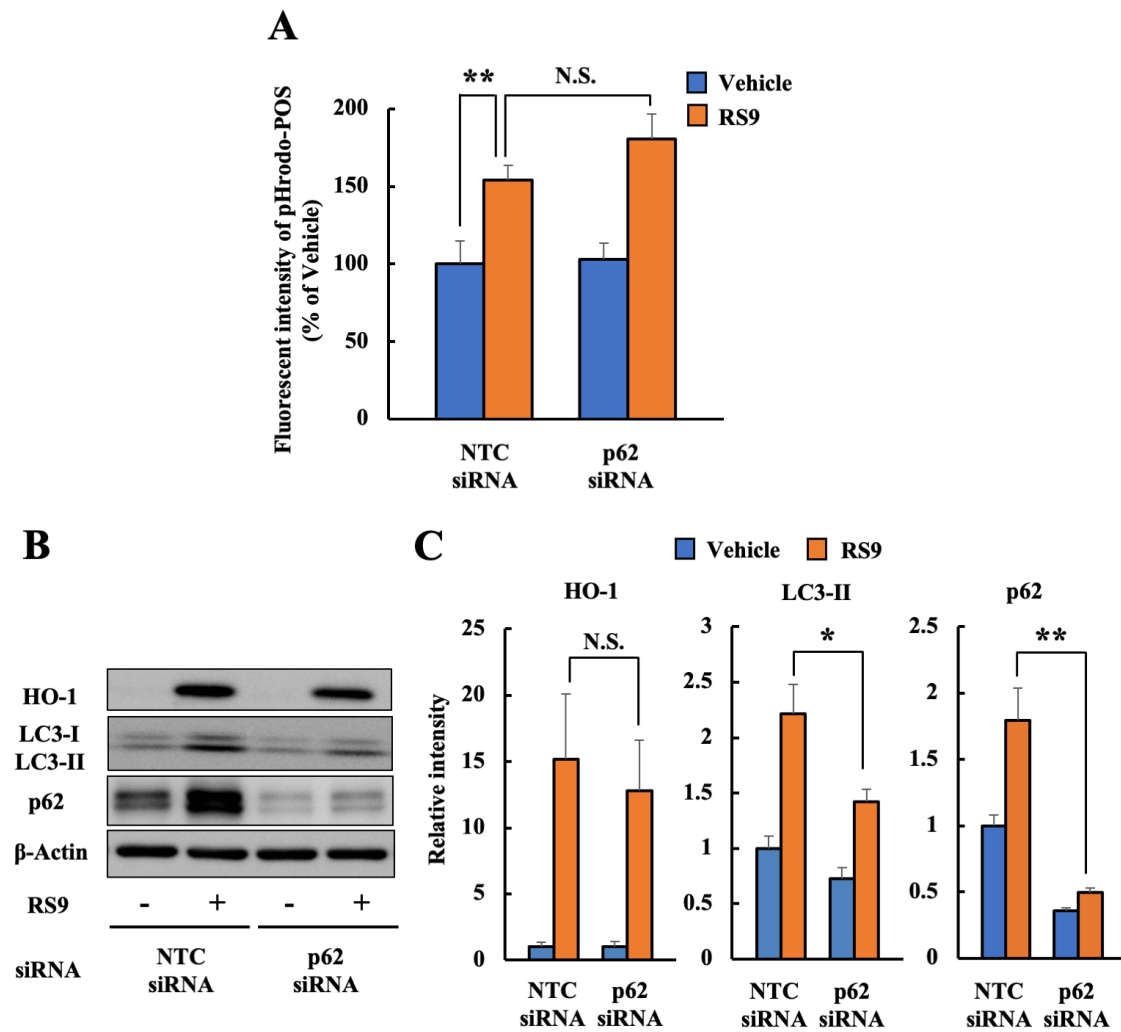


Fig. 19 Effects of p62 knockdown on POS phagolysosomes formation.

(A) Quantitative data of pHrodo-SE-labeled POS phagocytosis assay at 6 hours after POS treatment in ARPE-19 cells. Mean \pm SEM (n=6), **p < 0.01, N.S.: not significant (Student's *t*-test). (B) Representative band images of western blotting 6 hours after POS treatment. (C) The result of quantitative analysis of the intensity of each immunoreactive protein band. Each relative intensity was normalized to those of β -Actin. RS9 was used at 1 μ M as a final concentration. Mean \pm SEM (n=6), *p < 0.05, **p < 0.01 (Student's *t*-test).

3-5 RS9 による AMPK α -mTOR 経路早期活性化作用

多くの Nrf2 活性化薬は、Nrf2 の抑制因子 Keap1 のシステイン残基への求電子反応により Nrf2 を活性化する親電子剤と呼ばれる化合物である (31)。オートファジーを誘導するシグナル経路として、細胞内のエネルギー欠乏に応答する AMPK-mTORC2 経路が存在する (72)。そのため、つづいて AMPK-mTORC2 経路に対する RS9 の作用を検討した。本実験では、AMPK-mTORC2 経路関連タンパク質について、RS9 を前処置してから 6 時間の経時的な発現評価を行った。この結果、RS9 処置 60 分後から AMPK のリン酸化が認められた (Fig. 20A-B)。また、AMPK リン酸化の下流である mTOR の脱リン酸化が RS9 処置 120 分後から認められた (Fig. 20A, C)。さらに、AMPK-mTORC2 経路の下流で脱リン酸化される Akt についても検討したところ、RS9 処置 120 分後から Akt の脱リン酸化が認められた (Fig. 20A, D)。p62 については RS9 処置 360 分の間で有意な発現変化は認められなかったが、HO-1 については RS9 処置 360 分後に有意な発現上昇が認められた (Fig. 20A, E, F)。

AMPK-mTORC2 経路の最も上流に位置する AMPK について、RS9 によるリン酸化誘導の上流となる機構をさらに検討した (Fig. 20G)。NAD⁺は電子の伝達を担う補酵素であり、AMPK の活性化を制御する細胞内のエネルギーセンサーとしての働きも有している (73)。NAD⁺は NADH と平衡状態にあるが、細胞内のエネルギーが欠乏するなどして NAD⁺/NADH 比が増加することにより、AMPK α のリン酸化が起こる。そこで、親電子性 Nrf2 活性化薬である RS9 が上記の平衡状態から電子を奪うことにより平衡を左に傾けているのではないかという仮説を立てこれを検証した。NAD⁺及び NADH 由来の酸化還元反応に基づく比色定量を用いて RS9 添加から 30、60、120 分後の NAD⁺/NADH 比を測定した結果、経時的な上昇傾向及び RS9 添加 120 分後における有意な NAD⁺/NADH 比の上昇が認められた (Fig. 20G)。

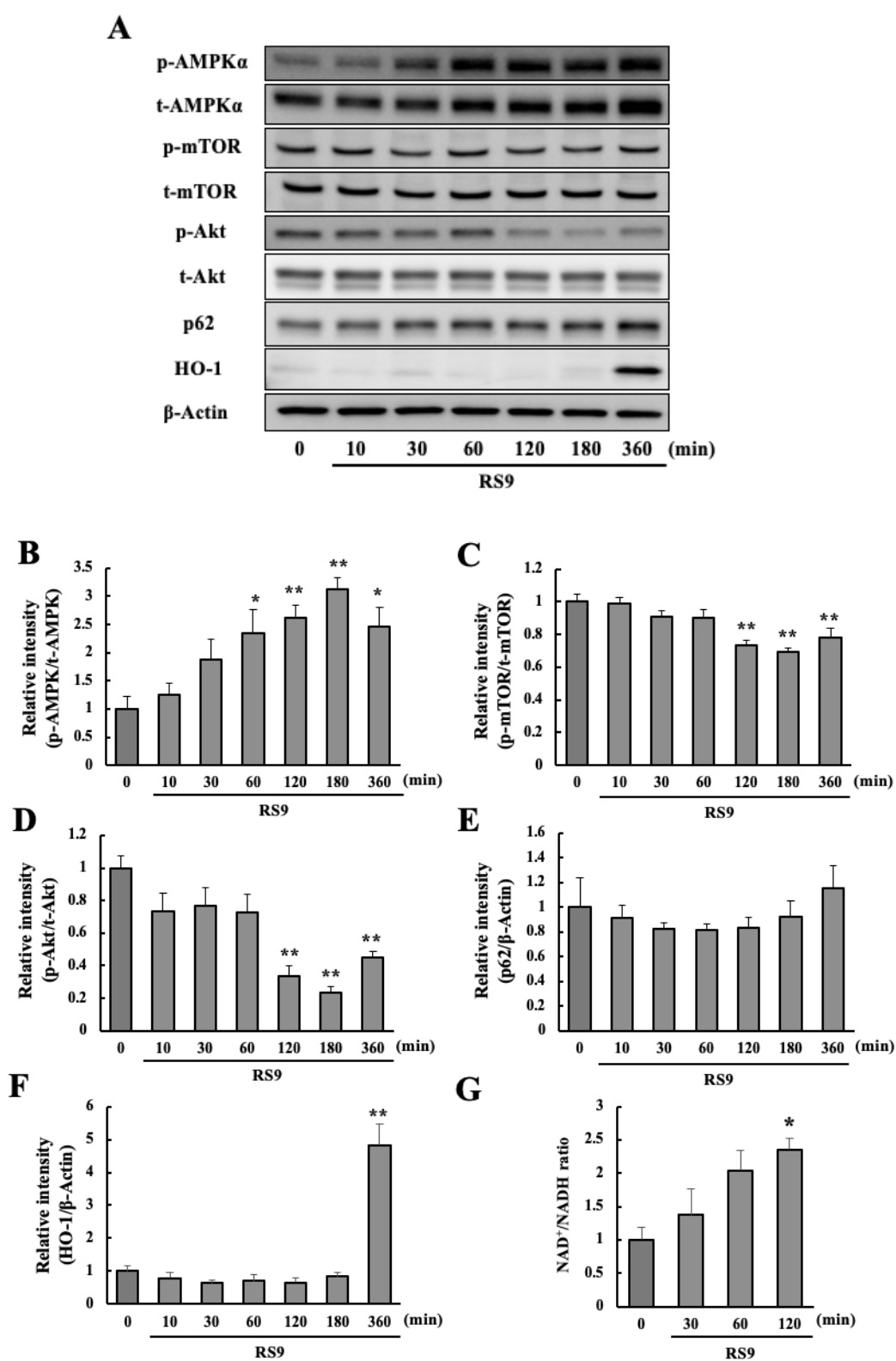


Fig. 20 Effects of RS9 on AMPK signaling-related protein expressions.

Continued on the next page

(A) Representative band images of western blotting. (B-F) The results of quantitative analysis of the intensity of each immunoreactive protein band. (B) Phospho-AMPK (p-AMPK) expression levels compared with those of total-AMPK (t-AMPK). (C) Phospho-mTOR (p-mTOR) expression levels compared with those of total-mTOR (t-mTOR). (D) Phospho-Akt (p-Akt) expression levels compared with those of total-Akt (t-Akt). (E) p62 expression levels normalized to those of β -Actin. (F) HO-1 expression levels normalized to those of β -Actin. Mean \pm SEM (n=6), *p < 0.05, **p < 0.01 vs. 0 min (Dunnett's test). (G) Quantitative data of NAD⁺/NADH ratio. Mean \pm SEM (n=4), *p < 0.05 vs. 0 min (Dunnett's test). RS9 was used at 1 μ M as a final concentration.

3-6 RS9 によるファゴリソソーム形成促進作用における AMPK α_1 の関与

AMPK α には細胞質局在型アイソフォームの AMPK α_1 及び核局在型アイソフォームの AMPK α_2 が存在する (74, 75)。このうち、AMPK α_2 が RPE 細胞における視細胞外節のファゴサイトーシスに関与することが報告されている (76)。このため、まず α_2 サブユニットの阻害が RS9 のファゴリソソーム形成促進作用に及ぼす影響を検討した。siRNA を用いて AMPK α_2 をノックダウンした結果、vehicle 処置群と RS9 処置群それぞれにおいてファゴリソソーム形成が若干低下したものの、RS9 によるファゴリソソーム形成促進作用に明らかな変化は認められなかった (Fig.21A)。つづいて、 α_1 サブユニットについても同様にノックダウンさせると、RS9 によるファゴリソソーム形成促進作用の顕著な抑制が認められた (Fig. 21B)。さらに、 α_1 サブユニットノックダウン条件下でオートファジー関連タンパク質の発現についてもあわせて確認したところ、p62 の発現量は変化がなく、LC3 の発現上昇作用が抑制された (Fig. 21C-D)。また、 α_1 サブユニットの発現抑制は、HO-1 の発現に影響を及ぼさなかった (Fig. 21C-D)。いずれの siRNA においても、導入後 AMPK α の発現が抑制されていることを確認した (data not shown)。これらの結果より、RS9 処置によるファゴリソソーム形成促進作用に AMPK α_1 を介したオートファジー誘導の関与が示唆された。

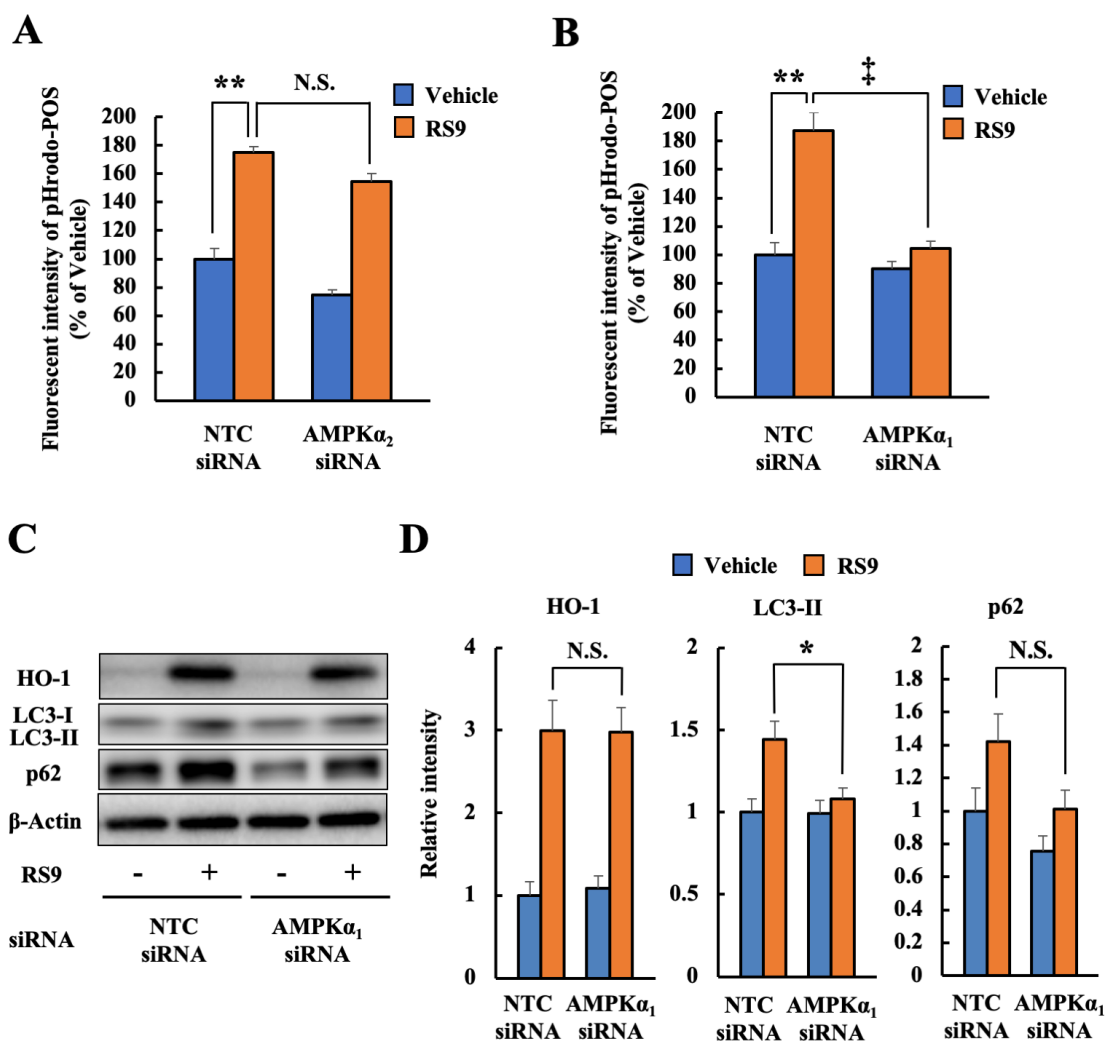


Fig. 21 Effects of AMPK knockdown on POS phagolysosomes formation.

(A-B) Quantitative data of pHrodo-SE-labeled POS phagocytosis assay at 6 hours after POS treatment in ARPE-19 cells. Mean \pm SEM (n=4-6), **p < 0.01, [†]p < 0.01 (Student's *t*-test). (C) Representative band images of western blotting 6 hours after POS treatment. (D) The result of quantitative analysis of the intensity of each immunoreactive protein band. Each relative intensity was normalized to those of β -Actin. Mean \pm SEM (n=6), *p < 0.05, **p < 0.01, N.S.: not significant. (Student's *t*-test). RS9 was used at 1 μ M as a final concentration.

3-7 親電子性 Nrf2 活性化薬によるファゴリソソーム形成促進作用

RS9 以外の Nrf2 活性化薬がファゴリソソーム形成促進作用を有するか否かについて検討するために、古典的な親電子性 Nrf2 活性化薬であるフマル酸ジメチル及びスルフォラファンを用いて同様に実験を行った。この結果、フマル酸ジメチル、スルフォラファンはいずれも視細胞外節のファゴサイトーシスを促進した (Fig. 22A-B)。

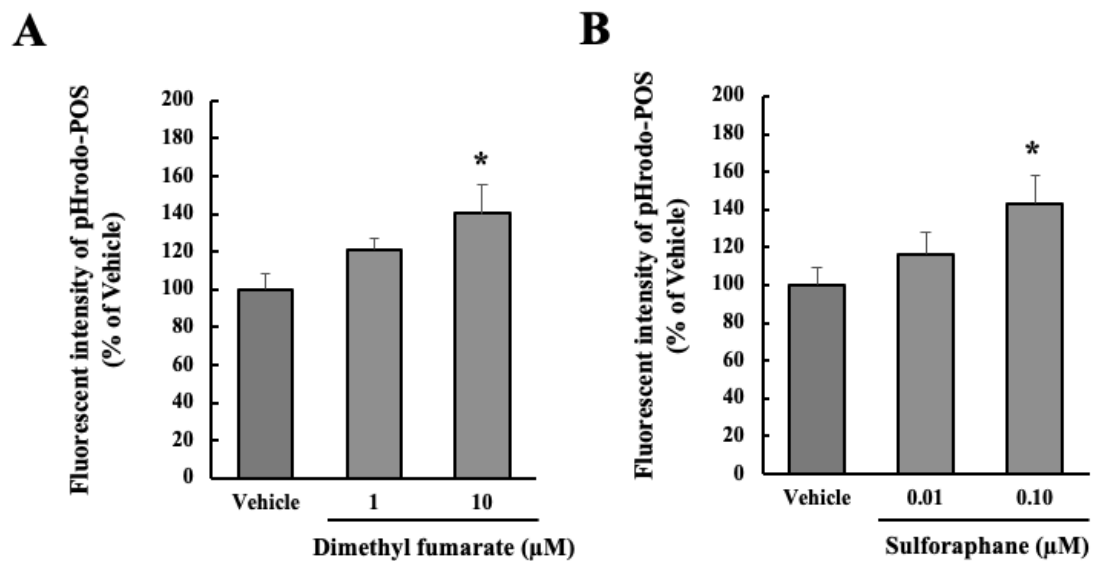


Fig. 22 Effects of Classical electrophiles on POS phagolysosomes formation in RPE cells.

(A-B) Quantitative data using pHrodo-SE-labeled POS phagocytosis assay at 6 hours after POS treatment in ARPE-19 cells. Mean \pm SEM (n=6), *p < 0.05 vs. vehicle (Dunnett's test).

第4節 考察

第2章の研究では、トリテルペノイド型 Nrf2 活性化薬である RS9 が RPE における視細胞外節のファゴリソソーム形成を促進することを明らかにした (Figs. 16-18)。また、この作用は p62 の誘導によるオートファジー誘導に非依存であった (Fig. 19)。検討の結果、ファゴリソソーム形成促進作用は Nrf2 下流因子の誘導よりも早期に起こる AMPK の活性化作用を介することが示唆された (Figs. 20-21)。ファゴリソソーム形成促進作用は、古典的な親電子性 Nrf2 活性化薬であるフマル酸ジメチル及びスルフォラファンにおいても共通して認められた (Fig. 22)。今回の検討結果から予想される RS9 のファゴリソソーム形成促進作用メカニズムは以下の通りである (Fig. 23)。

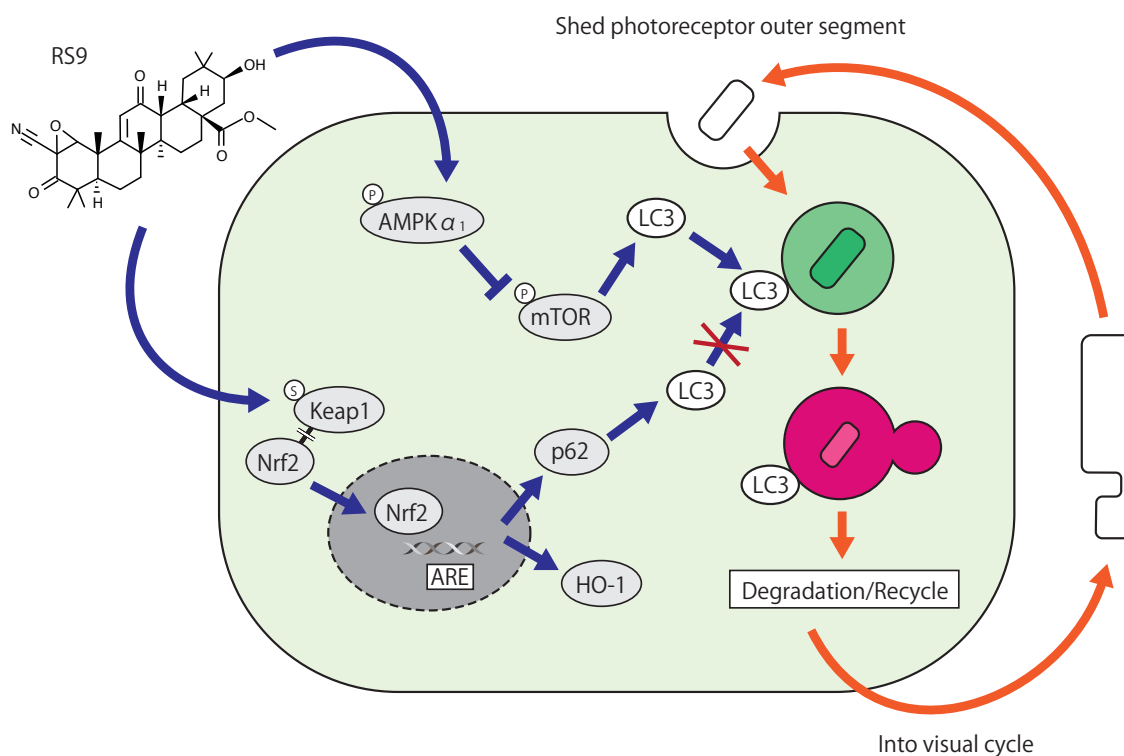


Fig. 23 Schematic diagram of effects by RS9 on POS phagolysosomes formation.

近年、萎縮型 AMD の治療標的としてビジュアルサイクルの調節に必要な酵素のひとつである RPE65 が注目されている (77)。具体的には、RPE65 の酵素活性を抑制するエミクススタト (ビジュアルサイクル調節剤) が開発された (78)。この化合物は網膜障害性のビタミン A 代謝産物の過剰産生を抑制し得るとされたが、臨床試験において期待された萎縮型 AMD の進行抑制作用を示さなかった (79)。このことから、萎縮型 AMD の治療においてビジュアルサイクルを停止させることは有効な戦略ではない可能性が考えられる。第一章でも述べたように、近年、萎縮型 AMD 患者の RPE 細胞ではオートファジー不全が生じていることが指摘されている (41, 43)。しかしながら、萎縮型 AMD 患者 RPE 細胞におけるオートファジー不全により、何が消化不全となることで RPE 細胞の病態に寄与しているのかについては詳細な検討が行われていない。本検討で着目した POS は、光受容器である視細胞を維持する目的で恒常的に RPE 細胞に取り込まれ消化され続けている (3)。光照射により POS は酸化され、その一部が切り出されることで RPE 細胞に取り込まれ消化を受ける (80)。このような性質から POS は RPE 細胞における脂質過酸化物の主要な供給源となっており、RPE 細胞の消化機能低下が萎縮型 AMD における病態形成に寄与している可能性が高い。

本章では、新規トリテルペノイド型 Nrf2 活性化薬 RS9 が AMPK 活性化作用を有することを明らかにしたが、このような作用はメチレンブルー (81)やポリフェノール類のレスベラトロール (82)においても報告されている。これらの化合物はいずれも求電子性の高い部位をその構造式中に有しており、Nrf2 活性化作用が報告されている (83, 84)。また、AMPK 活性化作用を有することで有名な糖尿病治療薬のメトホルミンも Nrf2 活性化作用が報告されているが、この作用は AMPK 依存的な経路である (85)。このように AMPK と Nrf2 は独立した経路ではないため、各種活性化薬の作用点を見極めることはその作用機序を知る上で重要である。加えて、親電子剤による AMPK 活性化と Nrf2 活性化反応の差異

は構造式中の求電子部位の標的因子との反応性の差異により引き起こされるものと考えられ、化合物中のどの部位が求電子反応を起こす部位であるか、またそれが Hard and Soft Acids and Bases 則 (HSAB 則) (86)に照らしてどの程度柔らかいものであるかという点も標的因子の選択性を考える上で重要である。また、親電子性 Nrf2 活性化薬である RS9 処置により NAD^+/NADH 比の増加が起きていることを確認した (Fig. 20G)。本反応様式が親電子性化合物に共通することから、求電子反応が AMPK 活性化のトリガーになっている可能性は高いと考えられる。しかしながら、 NAD^+/NADH 比の増加は AMPK の活性化の後に生じるとの報告もあり (87)、双方向性であることから、 NAD^+/NADH 比の増加が AMPK 活性化作用における真の作用点であるかについては議論の余地があり、さらなる検討が必要である。また、AMPK の活性化は ATP 産生を亢進させ、ネガティブフィードバックにより以降の AMPK 活性にはむしろ抑制的に働くことが考えられる (88)。実際に、今回の検討においても RS9 によるファゴリソソーム形成促進作用が認められた視細胞外節処置 6 時間後においては、AMPK 活性化作用は認められなかった (data not shown)。このことから、RS9 によるファゴリソソーム形成促進作用は一過性のものである可能性が示唆される。

さらに、今回の検討では、すでに報告のある $\text{AMPK}\alpha_2$ サブユニットでなく、 $\text{AMPK}\alpha_1$ サブユニットの視細胞外節ファゴサイトーシスへの作用が確認された (Fig. 21)。過去の報告では、FITC 標識した視細胞外節を用いて RPE 細胞内に取り込まれた視細胞外節を評価しており、この評価系においては $\text{AMPK}\alpha_2$ サブユニットが寄与していることが示されている (76)。今回の検討では pHrodo 修飾した視細胞外節を用いて RPE 細胞内でのファゴリソソーム形成を評価しており、ファゴリソソーム形成の早期 (視細胞外節処置から 6 時間後) においては、 $\text{AMPK}\alpha_2$ サブユニットよりも $\text{AMPK}\alpha_1$ サブユニットによるオートファジー誘導の寄与が大きいことが示唆された。

本研究では、親電子性化合物が視細胞外節のファゴサイトーシス制御に及ぼす影響を検討し、AMPK α_1 サブユニットのリン酸化を介したオートファジー誘導によるファゴリソソーム形成促進作用という新たな知見を得た。また、p62 によるオートファジーの誘導が LC3 関連型ファゴサイトーシスの誘導に十分でないことも示唆された。誘導経路依存的なオートファジー基質の選択性についてはいまだ明らかになっていない。今後、視細胞外節の LC3 関連型ファゴサイトーシスを含む、多岐に渡る選択的オートファジーの中から萎縮型 AMD に有効な治療標的が見出されることに期待したい。

第 1 章及び第 2 章においては、Nrf2 活性化薬としてトリテルペノイド型の RS9 に着目して研究を進めた。第 3 章では、古典的親電子剤と異なる Nrf2 活性化作用を有するブラジル産グリーンプロポリス水抽出物とその有効成分に着目して検討を行った。

第3章 プロポリス有効成分による酸化ストレス依存的 Nrf2 活性化促進作用

第1節 緒言

序論でも述べたように、Nrf2 活性化作用を有する化合物は多数存在しており、そのほとんどが構造中に求電子性の高い部位を有する親電子剤である。しかしながら、親電子剤の中には DNA 障害による発がん作用をもつ 4-nitroquinoline-1-oxide のような化合物も存在する (89)。これまでに検討を行った RS9 やバルドキソロンメチルは、このような DNA 障害を引き起こすことなく Nrf2 を活性化させる薬物として開発が行われている。しかし、生体内で求電子反応を起こす代償として高濃度投与や長期間投与で DNA 障害が全く起こらないとは言い切れず、異なる作用機序をもつ Nrf2 活性化薬の探索もより安全な新薬創出のために重要である。そこで本章では古典的親電子剤と異なる Nrf2 活性化作用を有するブラジル産グリーンプロポリス水抽出物 (Water Extract of Propolis: WEP) とその有効成分に着目して検討を行った。

プロポリスはミツバチが巣の隙間を埋めるために使用するものの総称であり、含まれる成分はその産地や材料となった植物源、抽出方法に依存して変化する。プロポリスは伝承薬として古くより世界中で様々な疾患の治療に用いられてきた。ミツバチはプロポリスによって細菌やウイルスから身体を守るといわれており、実際にプロポリスは高い抗菌作用を有している (90)。しかしながら、抗菌作用のほかにもプロポリスは、数多くの薬効を有していることが報告されている。当研究室の過去の検討において、バッカリスを起源植物とする WEP とその主要有効成分である 3,5-ジカフェオイルキナ酸 (3,5-di-O-caffeoylquinic acid)、3,4-ジカフェオイルキナ酸 (3,4-di-O-caffeoylquinic acid)、クロロゲン酸 (chlorogenic acid)、*p*-クマル酸 (*p*-coumaric acid) は、紫外線の一種である ultra violet A (UVA) から皮膚線維芽細胞を保護することを報告している (91)。WEP は抗酸化作用を有することが報告されており、UVA による細胞障害は酸化ストレスによる DNA

傷害を介することが報告されている (91)。前章までに注目した Nrf2 は UVA からの生理的な皮膚線維芽細胞保護に関与していることが示されているが、WEP による皮膚線維芽細胞の UVA からの保護作用と Nrf2 の関与については不明であった。そこで本研究においては、WEP による皮膚線維芽細胞の UVA からの保護作用に Nrf2 活性化作用が関与するかについて検討を行った。

第2節 実験材料及び方法

2-1 実験材料

本試験に用いた薬物及び試薬は、以下の通りである。

PFA は Wako (Osaka, Japan)、リン酸水素二ナトリウム・十二水、リン酸二水素ナトリウム二水和物、Hoechst 33342 は Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)、フルオロマウントは Diagnostic Bio Systems (Pleasanton, CA, USA)よりそれぞれ購入した。WEP 及びその主要有効成分である 3,5-ジカフェオイルキナ酸、3,4-ジカフェオイルキナ酸、クロロゲン酸及び *p*-クマル酸は、アピ株式会社 (岐阜市、日本)より提供していただいた。

2-2 実験方法

2-2-1 細胞培養

ヒト皮膚線維芽細胞株 (NB1-RGB) は、RIKEN BRC より購入した。NB1-RGB 細胞は、10% FBS、100 U/mL penicillin 及び 100 µg/mL streptomycin を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Nacalai Tesque Inc., Kyoto, Japan) を用い 37°C、5% CO₂ 中にて培養した。また、2 日毎に培地交換を行い、3–4 日毎に trypsin 処理による継代操作を行った。

2-2-2 UVA 誘発細胞障害

4 日間培養した NB1-RGB 細胞に対し、UVA 照射 1 時間前に培地を 1% FBS、フェノールレッド不含 DMEM (Nacalai Tesque Inc.) に交換し、WEP (PBS により希釈) あるいは主要有効成分 (DMSO に溶解後 PBS により希釈) の処置を開始した。UVA 照射には UV クロスリンカー (CL1000; Analytik Jena US LLC, Upland, CA, USA) を使用し、40 分間かけ、10 J/cm² の UVA を照射した。UVA 非照射

群はアルミホイルを二重に巻き、照射中の細胞とともにクロスリンカー内に静置した。

2-2-3 ウェスタンブロットによる評価

NB1-RGB 細胞は、24 well plate に 2.5×10^4 cells/well となるように播種し、37°C、5% CO₂ の条件下で 4 日間培養した。培地交換と試薬添加を行い、UVA 照射 3、6、12、24 時間後にそれぞれサンプリングを行った。以後は第一章 2-2-6 と同様の方法にて評価を行った。一次抗体には、anti-HO-1 rabbit polyclonal (1:1000、Merck KGaA)、anti- β -Actin mouse monoclonal (1:2000、Sigma Aldrich、St. Louis、MO、USA) をそれぞれ用いた。二次抗体には、Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:2000、Thermo Fisher Scientific)、HRP-conjugated goat anti mouse antibody (1:2000、Thermo Fisher Scientific) を用いた。タンパク質の発現強度は、Multi Gauge Ver3.0 (Fujifilm) を用いて解析した。バンドの強度を数値化し、個々の値を算出した。 β -Actin はローディングコントロールとして使用した。

2-2-4 RNA 抽出

2-2-3 ウェスタンブロットによる評価と同様のプロトコールで NB1-RGB 細胞の培養、UVA 照射を行った。UVA 照射 6 時間後、PBS で 1 回洗浄し、サンプリングを行った。RNA の抽出は NucleoSpin® RNA (Takara Bio) を用い、製品のプロトコールに従って行った。

2-2-5 RNA 逆転写

抽出した RNA の濃度は NanoVue Plus (GE Healthcare Bio-Sciences AB) で 260 nm の波長の分光測定により求め、RNase-free H₂O を用いて各サンプルの RNA 濃度が等しくなるよう調整した。cDNA への逆転写 は PrimeScript® RT reagent Kit (Perfect Real Time) (Takara Bio) を用いて、製品プロトコールに従って行った。5 × PrimeScript Buffer (for Real Time) 2 µL、PrimeScript RT Enzyme Mix I 0.5 µL、Oligo dT Primer (50 µM) 0.5 µL、Random 6 mers (100 µM) 0.5 µL、各 RNA サンプル 6.5 µL の全量 10 µL として、混合した。その後、PCR Thermal Cycler Dice (Takara Bio) を用いて 37°C で 15 分間逆転写反応を行い、その後 85°C で 5 秒間静置し、逆転写酵素を失活させた。

2-2-6 リアルタイム RT-PCR

リアルタイム RT-PCR には、SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (Takara Bio) を用いた。SYBR® Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) 10 µL に各 primer 及び滅菌水、cDNA 1 µL を加え、全量を 20 µL とし、primer 濃度が 0.2 µM となるように調整した。その後、Thermal Cycler Dice Real Time System (Takara Bio) を用いて、95°C、30 秒を 1 サイクル、95°C で 5 秒間、60°C で 30 秒間を 40 サイクル行い、PCR 反応を行った。

用いた primer を以下に示す。

Ho-1: 5'-CAAGCCGAGAATGCTGAGTTCATG-3' (センス鎖) 及び

5'-GCAAGGGATGATTCCTGCCAG-3' (アンチセンス鎖)

Nqo1: 5'-AAGCCGCAGACCTTGTGATATTCC-3' (センス鎖) 及び

5'-AACACTCGCTCAAACCAGCCTTTC-3' (アンチセンス鎖)

Gclm: 5'-ACAGCTGTTGACTCACAATGATCC-3' (センス鎖) 及び

5'-GTGCGCTTGAATGTCAGGAATGCT-3' (アンチセンス鎖)

β-Actin: 5'-ATGGAGCCACCGATCCACA-3' (センス鎖) 及び

5'-CATCCGTAAAGACCTCTATGCCAAC-3' (アンチセンス鎖)

各 PCR において、勾配係数、R2 係数、段階希釈したスタンダードカーブの直線範囲を算出した。すべての反応は β -Actin による内部補正を行った後、その平均値を用いた。

2-2-7 細胞免疫染色による評価

NB1-RGB 細胞は、4 well chamber slide (Thermo Fisher Scientific) に 2.5×10^4 cells/well となるように播種し、37°C、5% CO₂ の条件下で4日間培養した。培地交換と試薬添加を行い、UVA 照射6時間後に4% PFA による固定を15分間行い、免疫染色を開始した。3% normal goat serum 含有 PBST (0.5% Tween 含有) で30分間ブロッキングした。ブロッキング後、一次抗体を用いて4°Cで一晩反応させた。その後、二次抗体を1時間反応させ、Hoechst33342 (1:1000、Thermo Fisher Scientific) を10分間反応させた。最後に PBS で洗浄後、chamber を取り除き、スライドガラスをフルオロマウント (水溶性封入基材) を用いてカバーガラスで封入した。一次抗体は、anti-Nrf2 rabbit polyclonal antibody (1:50、Santa Cruz) を、二次抗体は、Alexa Fluor® 488-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:1000、Thermo Fisher Scientific) をそれぞれ用いた。染色した細胞は共焦点レーザー走査型顕微鏡 (FLUOVIEW FV10i; Olympus) を用いて撮影した。

2-2-8 ゼブラフィッシュ稚魚を用いた高グルコース誘発血管障害

ゼブラフィッシュの稚魚は血管内皮に enhanced green fluorescent protein (EGFP) を発現させた Tg (fli1a:EGFP)^{y1} (92) (Zebrafish International Resource Center、Eugene、Oregon、USA) の自然交配により得たものを使用した。得られた胚は6well plate に対し、1 well につき20個の割合で入れ、28.5 °C の Danieau's solution 4 mL/well

で、明期 14 時間/暗期 10 時間 (明期: 午前 8 時–午後 10 時) として飼育した (50)。グルコース及び WEP はそれぞれ終濃度が 200 mM 及び 50 $\mu\text{g/mL}$ となるように飼育液に溶解した状態で胚に暴露した。飼育液は毎日交換した。血管構造を撮影するために、受精 22 時間後以降はメラニン色素の合成阻害剤 1-phenyl-2-thiourea 200 nM をすべての胚に処置した。

血管構造の撮影は受精 3 日後に実施した。500 ppm 2-phenoxyethanol (wako) 中で稚魚を麻酔処置した後、3% low-melting agarose (Sigma Aldrich) により 35 mm glassbottom dish 上に包埋した (Greiner Bio-One International GmbH、Kremsmuenster、Austria)。血管構造の撮影には共焦点レーザー顕微鏡 (LSM700: Carl Zeiss、Jena、Germany) を用いた。撮影画像の解析には Image J Fiji software (93) を用い、maximum projection をそれぞれ作成し硝子体血管構造のグレード評価を行った。

すべての実験手順は、岐阜薬科大学動物飼育・動物実験委員会の承認の下で実施した。また、ARVO 宣言 [The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research] に準じて実験動物を使用した。

2-2-9 統計学的解析

実験成績は平均値 \pm 標準誤差で示した。統計学的な比較は、SPSS Statistics software を用いて F 検定を行った後、Student's *t*-test または Welch's *t*-test、一元配置分散分析を行った後、Dunnett's test、Tukey's test により行った。危険率が 5 % 未満を有意差有りとした。

第3節 実験成績

3-1 WEP による HO-1 誘導促進作用

皮膚線維芽細胞を用いて、WEP による UVA からの細胞保護作用における抗酸化応答機構の関与を検討するため、UVA 照射開始から 3、6、12、24 時間後において 30 $\mu\text{g/mL}$ の WEP 処置による経時的なタンパク質発現変動の評価を行った。その結果、Nrf2 下流で誘導される抗酸化応答因子である HO-1 は、UVA 照射 3 時間後から WEP 処置群で有意な増加が認められた。UVA 照射 6 時間後では WEP 非処置群においても HO-1 の上昇が認められたが、WEP 処置群においてより上昇する傾向が認められた。UVA 照射 12 時間後では WEP 処置群及び非処置群において同程度の HO-1 発現上昇が認められ、UVA 照射 24 時間後では WEP 処置群において有意な発現低下が認められた (Fig. 24A)。また、UVA 非照射群においては、WEP 処置後も HO-1 の発現変動は認められなかった (Fig. 24A)。さらに、30 $\mu\text{g/mL}$ の WEP 処置により有意な HO-1 発現上昇が認められた UVA 照射 3 時間後において、WEP の濃度依存性についても検討を行った (Fig. 24B)。この結果、WEP による HO-1 発現増加作用は、3–30 $\mu\text{g/mL}$ の範囲で WEP の処置濃度依存的に認められた (Fig. 24B)。また、本結果より親電子性 Nrf2 活性化薬の RS9 とは異なり、WEP は酸化ストレス障害がかからない単独処置条件では HO-1 を誘導しなかった。

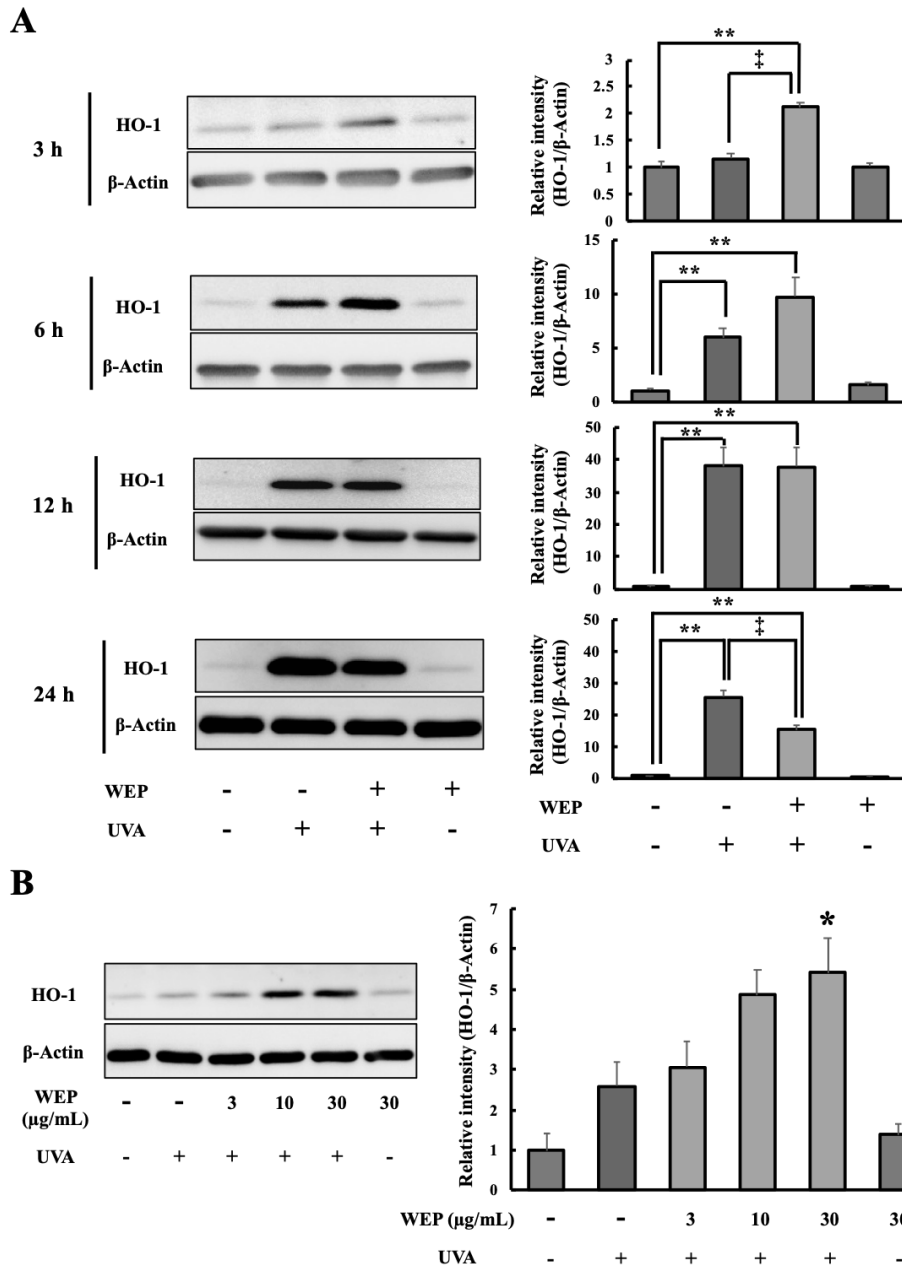


Fig. 24 Changes of HO-1 protein expression.

(A–D) HO-1 expression level in NB1-RGB cells was evaluated using western blotting at each time point after initiating UVA irradiation (A) 3, (B) 6, (C) 12, and (D) 24 h. At all time points, WEP was applied at a concentration of 30 μg/mL. Mean ± SEM (n = 5–6), *p < 0.05, **p < 0.01 vs. control [WEP (-) UVA (-)], and †P < 0.01 vs. vehicle [WEP (-) UVA (+)] (Tukey's test). (E) HO-1 expression level in NB1-RGB cells was evaluated using western blotting. WEP was applied at 3, 10, or 30 μg/mL 3 h after initiating UVA irradiation. Mean ± SEM (n = 6), *p < 0.05 vs. vehicle [WEP (-) UVA (+)] (Dunnett's test).

3-2 WEP による抗酸化応答因子誘導作用

Nrf2 の下流に存在する HO-1 以外の抗酸化応答因子についても、WEP が発現を上昇させるか否かについて、RT-PCR 法を用いて UVA 照射 6 時間後の mRNA の発現を評価した。各種抗酸化応答因子の *ho-1*、*nqo1*、*gclm* はいずれも WEP 処置 UVA 照射群において発現上昇した (Fig. 25)。また、3-1 における HO-1 タンパク質の発現変化と同様に、UVA 非照射群において、WEP 処置後も *ho-1*、*nqo1* 及び *gclm* の発現変動は認められなかった (Fig. 25)。

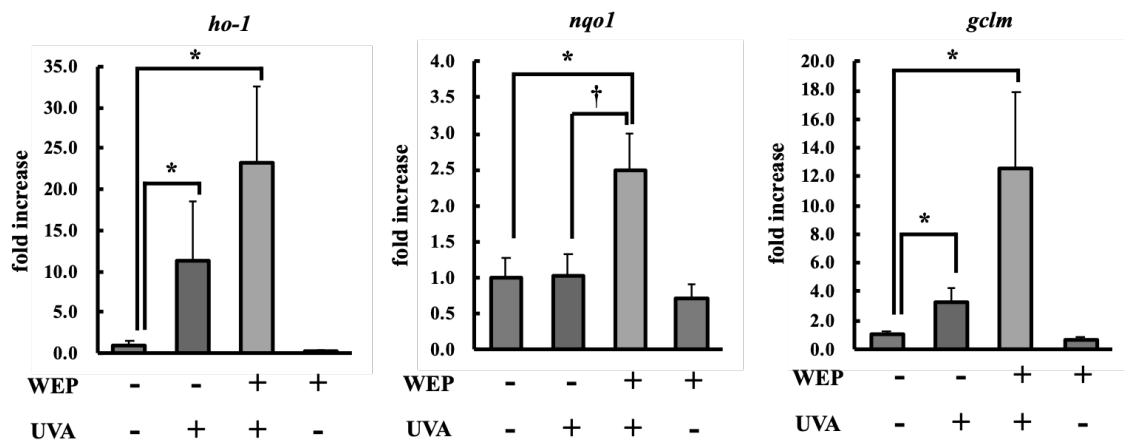


Fig. 25 Changes of anti-oxidative stress-related factors. mRNA expression levels of *ho-1*, *nqo1*, and *gclm* in NB1-RGB cells was evaluated using RT-PCR at 6 h after initiating of UVA irradiation. WEP was applied at a concentration of 30 μ g/mL. Mean \pm SEM (n = 5), *p < 0.05 vs. control [WEP (-) UVA (-)], and †p < 0.01 vs. vehicle [WEP (-) UVA (+)] (Tukey's test).

3-3 WEP 主要有効成分による HO-1 発現促進作用

WEP で認められた HO-1 発現促進作用は、WEP 中に存在するどの成分に由来するかについて明らかにするため、WEP の主要有効成分を用いて同様の検討を行った。その結果、UVA 照射 3 時間後において、WEP の有効成分 4 種類のうち、カテキール骨格を有する 3,5-ジカフェオイルキナ酸、3,4-ジカフェオイルキナ酸及びクロロゲン酸の 3 種類の成分は、HO-1 の発現促進作用が認められた (Fig. 26A-C)。一方、*p*-クマル酸は、HO-1 の発現促進作用が認められなかった (Fig. 26D)。

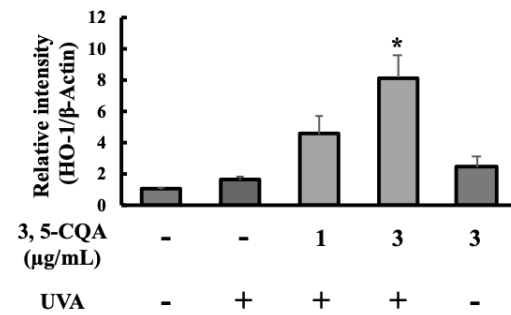
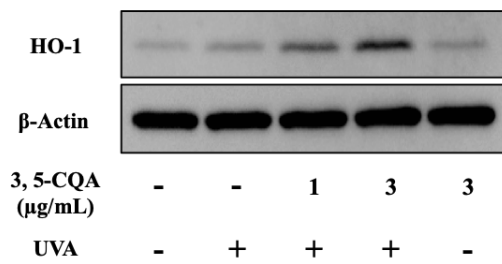
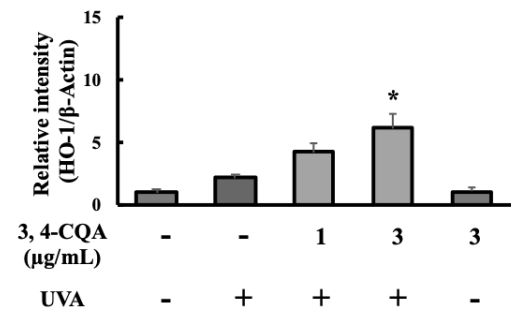
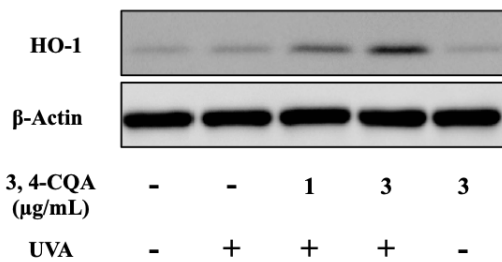
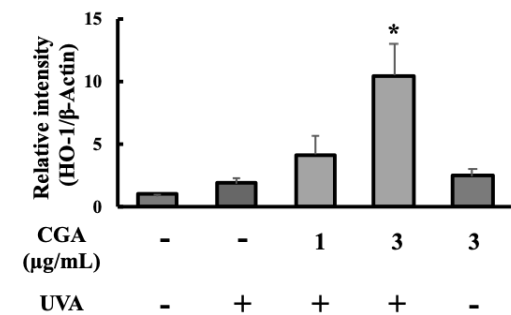
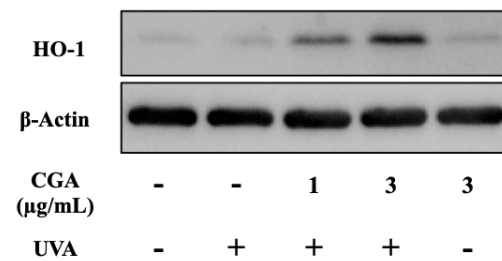
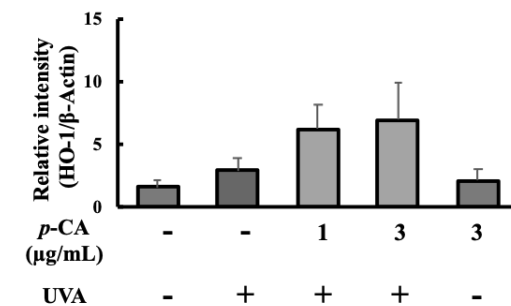
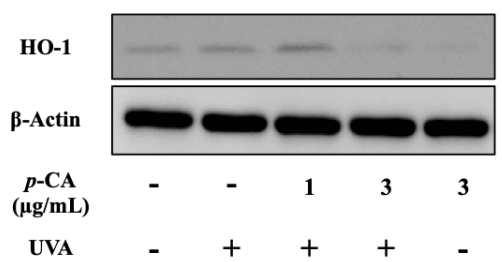
A**B****C****D**

Fig. 26 Effects of main constituents of WEP on HO-1 induction. HO-1 expression level in NB1-RGB cells was evaluated using western blotting 3 h after initiating of UVA irradiation. (A) 3,5-Di-O-caffeoylquinic acid (3,5-CQA), (B) chlorogenic acid (CGA), (C) 3,4-di-O-caffeoylquinic acid (3,4-CQA), and (D) *p*-coumaric acid (*p*-CA). Each constituent was applied at 1 or 3 μg/mL. Mean ± SEM (n = 3 or 4), *p < 0.05 vs. vehicle (Tukey's test).

3-4 WEP による Nrf2 活性化作用

つづいて、WEP 処置後の Nrf2 の発現分布を調べるために、免疫染色法を用いて検討を行った。Nrf2 は活性化すると核内に移行し抗酸化応答配列に結合することで HO-1 を含む種々の抗酸化応答因子を誘導する。UVA 照射 6 時間により Nrf2 の発現が上昇し、WEP 処置 UVA 照射群において、白矢印で示すような Nrf2 の核内移行が認められた (Fig. 27)。一方、UVA 非照射群においては、WEP 処置後も Nrf2 の発現上昇及び核内移行は認められなかった (Fig. 27)。

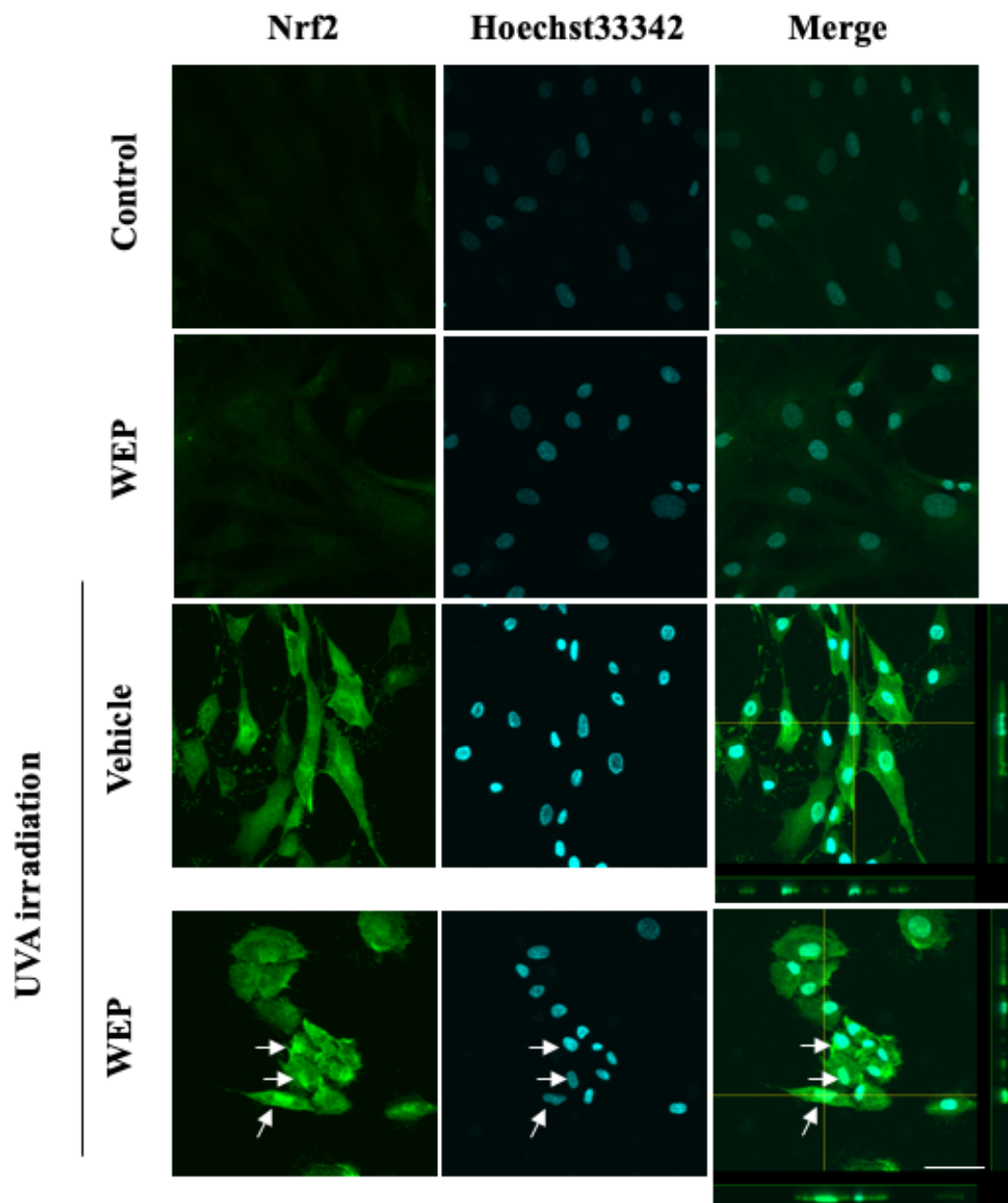


Fig. 27 Effects of WEP on Nrf2 nuclear translocation. Immunostaining for Nrf2 in NB1-RGB cells at 6 h after UVA irradiation showed changes induced by UVA irradiation and WEP treatment. Cells were fixed and stained with Hoechst33342 (blue) and anti-Nrf2 antibody (green). WEP was applied at a concentration of 30 $\mu\text{g/mL}$. White arrows indicate nuclear translocation of Nrf2. scale bar, 50 μm .

3-4 WEP による高グルコース誘発異常血管形成改善作用

最後に、WEP による眼に対する作用として、高グルコース処置を行ったゼブラフィッシュの稚魚における眼内硝子体血管の異常形成への作用を検討した。発生段階における高グルコース (200 mM Glucose) への暴露は稚魚の硝子体血管の網目状構造を破綻させるが、WEP 50 μ g/mL の自由飲水投与により、異常血管構造を有する個体の割合が抑制された (Fig. 28)。

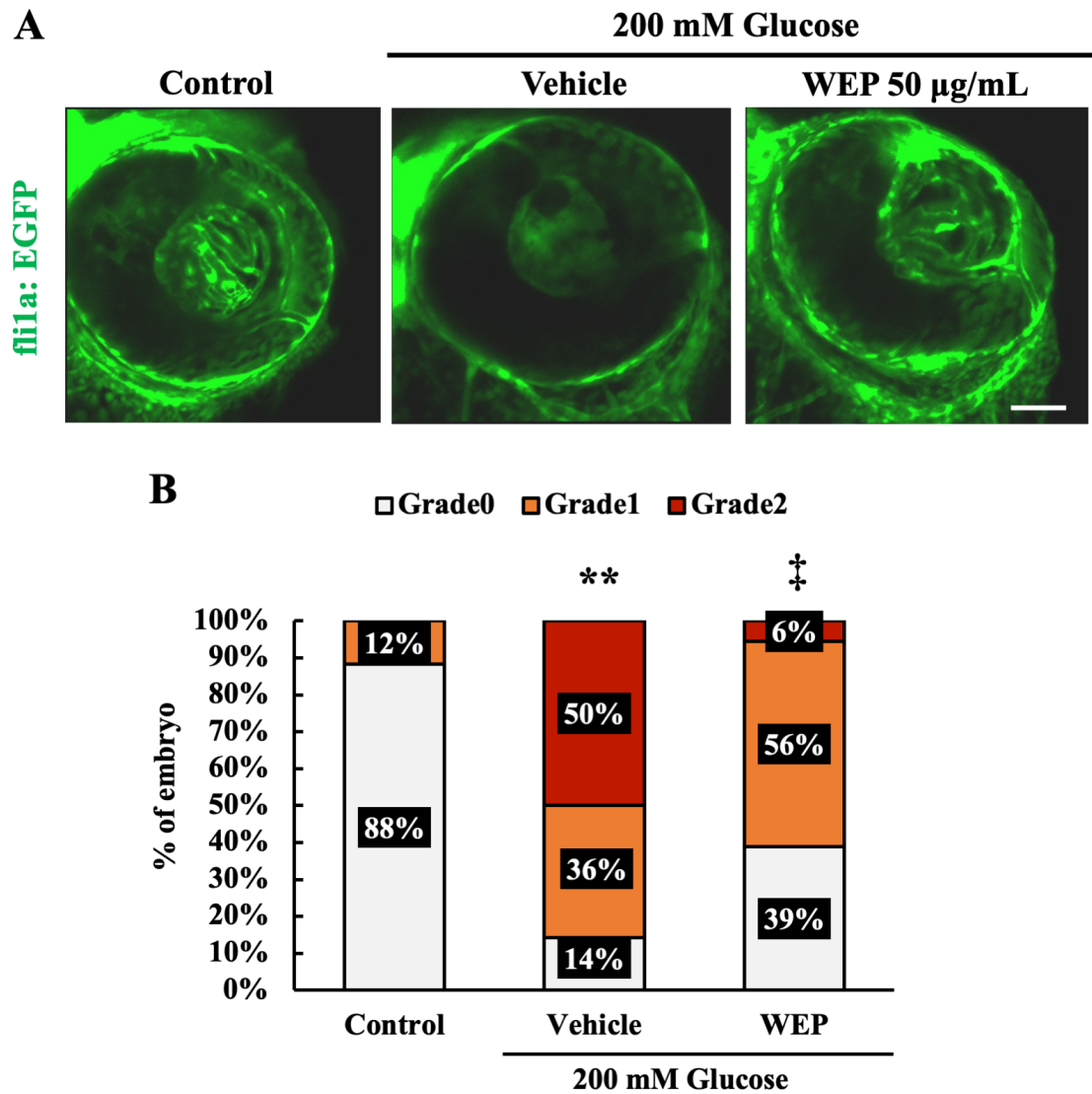
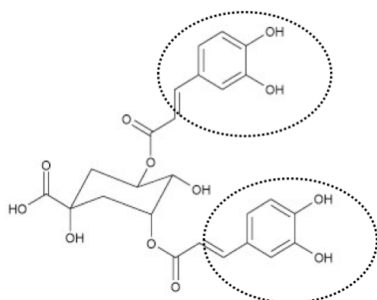


Fig. 28 Occurrence and severity of morphological abnormality in the hyaloid vessels. (A) Representative images of hyaloid vessels structure. Scale bar is 50 µm. (B) Analysis of severity grade. Grade 0: normal structure. Grade 1: abnormal structure. Grade 2: disappearance of vessels. Each group contained 14–18 larvae. Statistical significance was determined by Mann-Whitney U test. ** $p < 0.01$, vs Control, ‡ $p < 0.01$, vs Vehicle.

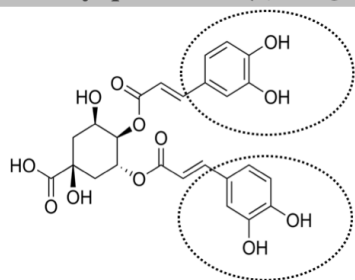
第4節 考察

本章では、皮膚線維芽細胞の UVA 照射モデルを用いて WEP による HO-1 を含む Nrf2 下流に存在する抗酸化応答因子の発現促進作用 (Figs. 24–25) 及び Nrf2 活性化作用 (Fig. 27) を明らかにした。第1章及び第2章で用いた親電子性 Nrf2 活性化薬 RS9 と異なる点として、WEP は UVA 非照射時には Nrf2 活性化作用を示さなかった。この原因として、WEP に含まれる Nrf2 活性化成分は通常状態では Nrf2 活性化作用を示さないと考えられる。関連する報告として過去にカフェ酸フェネチルエステル (caffeic acid phenethyl ester: CAPE) というポプラを起源植物とするプロポリスに含まれる成分の報告がある (94)。この報告では CAPE に含まれるカテコール骨格が酸化されると親電子性を有する構造となり、親電子活性を発揮することが示されている (94)。実際に今回の検討結果においても、WEP に含まれる主要有効成分のうち、カテコール骨格を有する 3,5-ジカフェオイルキナ酸、3,4-ジカフェオイルキナ酸及びクロロゲン酸は、HO-1 の顕著な発現促進作用が認められた。一方、構造中にカテコール骨格をもたない *p*-クマル酸においてはこの作用が認められなかった (Fig. 26, Fig. 29)。これらのことから、CAPE 同様に WEP に含まれる成分においてもカテコール骨格をもつカフェ酸類は、酸化反応依存的に Nrf2 活性化作用を発揮する可能性が示唆された。

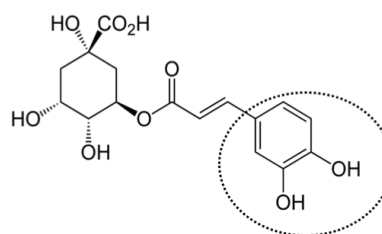
3,5-di-O-caffeoylquinic acid (3,5-CQA)



3,4-di-O-caffeoylquinic acid (3,4-CQA)



Chlorogenic acid (CGA)



p-Coumalic acid (p-CA)

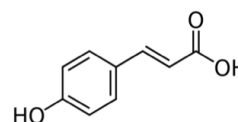


Fig. 29 Chemical structure of main constituents of WEP. Dotted line shows catechol structure. Gray background indicates constituents have the effects of HO-1 induction.

これまでの検討では、常時 Nrf2 を活性化する薬剤である RS9 を用いてきたが、恒常的な Nrf2 の活性化により慢性的な副作用が起こる懸念がある。序論でも紹介した糖尿病性腎臓病に対する国内第 III 相臨床試験が開始されているバルドキソロンメチルは、過去に心血管イベントの有意な増加という副作用により一度臨床試験が中止されている。これは Nrf2 活性化薬の急激な高用量投与によって起こる副作用であったとして、現在進行中の臨床試験では段階的な用量増加を含む投与プロトコールに改善されている (33)。しかしながら、今後も慢性的な Nrf2 活性化による副作用が現れる可能性はあり、親電子性 Nrf2 活性化薬の慢性的な全身投与はある程度リスクを有している。これに対し、本研究で着目した WEP とその主要有効成分であるカフェ酸類は、酸化ストレス依存的に Nrf2 活性化作用を発揮することで、生体内の酸化ストレス応答を増強する作用を有すると考えられる。各成分の安全性についてはさらに詳細な検討が必要であるが、恒

常的な親電子活性を有していないこのような化合物は、親電子性 Nrf2 活性化薬よりも安全に慢性投与が可能であると考えられる。酸化ストレスを主要因とする疾患を対象にした場合、このような酸化ストレス応答性 Nrf2 活性促進薬の開発が望ましいと考えられる。

ただし、本研究において WEP 及びカフェ酸類は、親電子性 Nrf2 活性化薬よりも早い HO-1 誘導作用を示した (Fig. 20, Fig. 24, Fig. 26)。この原因は明らかでないが、WEP 及びカフェ酸類は親電子性 Nrf2 活性化作用とは異なる作用機序を有する可能性がある。安全に長期使用可能な Nrf2 活性化薬を開発するために、今後、カフェ酸類における Nrf2 活性化及び抗酸化因子誘導作用に関してはさらなる研究が必要である。

また、本研究においては、ゼブラフィッシュ稚魚に対し、WEP が高グルコースにより誘導される異常硝子体血管形成を抑制することも確認された (Fig. 28)。高グルコースは、血管平滑筋細胞に対して脂質過酸化を介した酸化ストレス反応を惹起することが知られている (95)。しかしながら本研究では、WEP による異常硝子体血管形成抑制作用と Nrf2 活性化作用の関連性については明らかにできていないため、今後さらなる研究が必要であると考えられる。

総括及び結論

酸化ストレスは慢性的に暴露することにより加齢性疾患を引き起こすが、これを薬理的に制御する方法はいまだ確立されていない。酸化ストレス応答を制御する転写因子のひとつである NF-E2-related factor 2 (Nrf2) は加齢性疾患の発症・進展に密接に関与することが知られており、その薬理的な活性化は細胞保護作用を介した有用な対処法となり得ることが考えられる。しかしながら、Nrf2 活性化による抗酸化応答因子以外の機序による細胞保護作用については、十分に明らかにされていない。そこで本研究では、Nrf2 活性化薬の抗酸化応答因子誘導以外の作用について、オートファジーの誘導、ファゴサイトーシスの活性化、親電子剤以外の Nrf2 活性化薬の作用機序の関与について検討を行った。

第一章では、酸化ストレスからの RPE 細胞保護作用に対するオートファジーの分子生物学的意義を検討するため、主要な酸化ストレス応答機構でありオートファジーとの関与が示唆される Nrf2 活性化薬を用いて RPE 細胞保護作用及びその作用機序に関する検討を行った。

1. Nrf2 活性化薬 RS9 の酸化ストレス保護作用は、オートファジーの阻害によって抑制された。
2. Nrf2 を介さない抗酸化薬である NAC の酸化ストレス保護作用は、オートファジーの阻害では抑制されなかった。
3. Nrf2 活性化薬 RS9 の細胞保護作用機序の一部にオートファジーの活性化が関与することを明らかにした。

第二章では、RPE 細胞による網膜の恒常性維持機構である視細胞外節のファゴサイトーシスに対して、Nrf2 が及ぼす影響を検討した。

1. Nrf2 活性化薬 RS9 は、ファゴリソソーム形成を促進させた。
2. Nrf2 活性化薬によるファゴリソソーム形成促進作用は、p62 によるオートファジーの活性化に非依存적であった。
3. 親電子性 Nrf2 活性化薬は、Nrf2 経路と別の機序で AMPK 経路を活性化させることを明らかにした。
4. 親電子性 Nrf2 活性化薬は、AMPK 活性化作用によってファゴリソソーム形成促進及びオートファジーの活性化を誘導することを明らかにした。

第三章では、親電子性 Nrf2 活性化薬とは異なる Nrf2 活性化薬として、グリーンプロポリス水抽出物 (WEP) 及びその有効成分による抗酸化応答因子誘導作用を検討した。

1. WEP は、UVA 照射後においてのみ抗酸化応答因子の発現を促進した。
2. WEP は、UVA 照射後においてのみ Nrf2 を活性化させた。
3. WEP の主要有効成分のうち、カテコール骨格を有する 3,5-ジカフェオイルキナ酸、3,4-ジカフェオイルキナ酸及びクロロゲン酸は、HO-1 の発現促進作用を示した。

以上より、親電子性 Nrf2 活性化薬は、抗酸化応答因子誘導とは関係なくオートファジーを介した RPE 細胞の機能維持機構を亢進させ、細胞保護作用を示すことが明らかになった。さらに、Nrf2 活性化薬は抗酸化薬と異なり、加齢性疾患の元となる代謝不全を是正し、慢性的な酸化ストレスや過剰な代謝要求による病態進展を抑制する可能性が示唆された。

謝辞

本稿を終えるに臨み本研究の遂行にあたり終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました岐阜薬科大学学生体機能解析学大講座薬効解析学研究室教授 原英彰博士に深甚なる謝意を表します。

また、実験及び本稿の執筆に際して終始御懇切なる御助言を賜りました岐阜薬科大学学生体機能解析学大講座薬効解析学研究室准教授 嶋澤雅光博士、講師 中村信介博士、前講師 鶴間一寛博士、岐阜薬科大学バイオメディカルリサーチ講座特任助教 大津航博士並びに薬効解析学研究室諸氏に心から感謝の意を表します。

加えて、ゼブラフィッシュの飼育及び実験方法に関して、多大なる御助言を賜りました三重大学大学院医学系研究科産学官連携講座システムズ薬理学教授 田中利男博士、基礎医学系講座統合薬理学教授 西村有平博士、Nrf2 活性化薬 RS9 を提供いただいた第一三共株式会社 中神康裕博士、水抽出プロポリス及びその主要有効成分を提供いただいたアピ株式会社に厚く御礼申し上げます。

本論文の審査にあたり、有益なるご助言を賜りました岐阜薬科大学生命薬学大講座生化学研究室教授 五十里彰先生、岐阜薬科大学生命薬学大講座感染制御学研究室教授 井上直樹先生、岐阜薬科大学機能分子学大講座薬理学研究室准教授 田中宏幸先生に深謝致します。

本研究は JSPS 科研費 17J10301 の助成を受けたものです。

引用文献

1. Wako, R., Yasukawa, T., Kato, A., Omori, T., Ishida, S., Ishibashi, T., and Ogura, Y. (2014) Causes and prevalence of visual impairment in Japan. *J Jpn Ophthalmol Soc* **118**, 495–501
2. Campochiaro, P. A. (2000) Retinal and choroidal neovascularization. *J. Cell. Physiol.*
3. Brian, M. K. and Krzysztof, P. (2010) Phagocytosis of Retinal Rod and Cone Photoreceptors. *Physiol.* **25**, 8–15
4. Yasuda, M., Kiyohara, Y., Hata, Y., Arakawa, S., Yonemoto, K., Doi, Y., Iida, M., and Ishibashi, T. (2009) Nine-year incidence and risk factors for age-related macular degeneration in a defined Japanese population the Hisayama study. *Ophthalmology* **116**, 2135–2140
5. Friedman, D. S., O’Colmain, B. J., Muñoz, B., Tomany, S. C., McCarty, C., DeJong, P. T. V. M., Nemesure, B., Mitchell, P., Kempen, J., and Congdon, N. (2004) Prevalence of Age-Related Macular Degeneration in the United States. *Arch. Ophthalmol.* **122**, 564–572
6. Jayakrishna, A. and Benjamin, J. F. (2013) Mechanisms of age-related macular degeneration. **75**, 26–39
7. Schmidt-Erfurth, U., Chong, V., Loewenstein, A., Larsen, M., Souied, E., Schlingemann, R., Eldem, B., Monés, J., Richard, G., and Bandello, F. (2014) Guidelines for the management of neovascular age-related macular degeneration by the European Society of Retina Specialists (EURETINA). *Br. J. Ophthalmol.* **98**, 1144–1167
8. Shi, H. (2015) Intravitreal anti-VEGF injections for treating wet age-related macular degeneration : a systematic review and meta-analysis. 5397–5405
9. Jean-François Girmens. José-Alain Sahel. Katia Marazova. (2012) Dry age-related macular degeneration: A currently unmet clinical need. *Intractable Rare Dis. Res.* **1**, 103–114
10. Cameron, D. J., Chen, H., Harmon, J., Gibbs, D., Zhang, K., Bernstein, P. S., Zhao, Y., Hoh, J., Li, X., Sun, H., Tong, Z., DeWan, A., Pearson, E., Shridhar, V., Zabriskie, N. A., Camp, N. J., Howes, K., Yang, Z., and Chien, J. (2006) A Variant of the HTRA1 Gene Increases Susceptibility to Age-Related Macular Degeneration. *Science* **314**, 992–993

11. Haines, J. L., Hauser, M. A., Schmidt, S., Scott, W. K., Olson, L. M., Gallins, P., Spencer, K. L., Kwan, S. Y., Nouredine, M., Gilbert, J. R., Schnetz-Boutaud, N., Agarwal, A., Postel, E. A., and Pericak-Vance, M. A. (2005) Complement Factor H Variant Increases the Risk of Age-Related Macular Degeneration. *Science* **308**, 419–421
12. Klein, R. J., Zeiss, C., Chew, E. Y., Henning, A. K., Sangiovanni, J. P., Mane, S. M., Ott, J., Barnstable, C., and Hoh, J. (2005) Complement Factor H Polymorphism in Age-Related Macular Degeneration. *Science* **308**, 385–389
13. Cai, H. and Del Priore, L. V. (2006) Bruch membrane aging alters the gene expression profile of human retinal pigment epithelium. *Curr. Eye Res.* **31**, 181–189
14. Anderson, D. H., Mullins, R. F., Hageman, G. S., and Johnson, L. V. (2002) A role for local inflammation in the formation of drusen in the aging eye. *Am. J. Ophthalmol.* **134**, 411–431
15. Kunchithapautham, K., Atkinson, C., and Rohrer, B. (2014) Smoke-exposure causes endoplasmic reticulum stress and lipid accumulation in retinal pigment epithelium through oxidative stress and complement activation. *J. Biol. Chem.* **289**, 0–26
16. Khan, J. C., Thurlby, D. a, Shahid, H., Clayton, D. G., Yates, J. R. W., Bradley, M., Moore, a T., and Bird, a C. (2006) Smoking and age related macular degeneration: the number of pack years of cigarette smoking is a major determinant of risk for both geographic atrophy and choroidal neovascularisation. *Br. J. Ophthalmol.* **90**, 75–80
17. Zhou, J., Jang, Y. P., Kim, S. R., and Sparrow, J. R. (2006) Complement activation by photooxidation products of A2E, a lipofuscin constituent of the retinal pigment epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 16182–16187
18. Akiko Maeda, Tadao Maeda, Marcin Golczak, Yoshikazu Imanishi, Patrick Leahy, Ryo Kubota, and K. P. (2006) Effects of Potent Inhibitors of the Retinoid Cycle on Visual Function and Photoreceptor Protection from Light Damage in Mice. *Mol Pharmacol.* **70**, 1220–1229
19. Datta, S., Cano, M., Ebrahimi, K., Wang, L., and Handa, J. T. (2017) The Impact of Oxidative Stress and Inflammation on RPE Degeneration in Non-neovascular AMD. *Prog Retin Eye Res.* **60**, 201–218

20. Kunchithapautham, K., Atkinson, C., and Rohrer, B. (2014) Smoke exposure causes endoplasmic reticulum stress and lipid accumulation in retinal pigment epithelium through oxidative stress and complement activation. *J. Biol. Chem.* **289**, 14534–14546
21. Jaadane, I., Villalpando Rodriguez, G. E., Boulenguez, P., Chahory, S., Carré, S., Savoldelli, M., Jonet, L., Behar-Cohen, F., Martinsons, C., and Torriglia, A. (2017) Effects of white light-emitting diode (LED) exposure on retinal pigment epithelium in vivo. *J. Cell. Mol. Med.* **21**, 3453–3466
22. Kuse, Y., Ogawa, K., Tsuruma, K., Shimazawa, M., and Hara, H. (2014) Damage of photoreceptor-derived cells in culture induced by light emitting diode-derived blue light. *Sci. Rep.* **4**, 5223
23. Munro, D. and Treberg, J. R. (2017) A radical shift in perspective: Mitochondria as regulators of reactive oxygen species. *J. Exp. Biol.* **220**, 1170–1180
24. Carocci, A., Catalano, A., Sinicropi, M. S., and Genchi, G. (2018) Oxidative stress and neurodegeneration: the involvement of iron. *BioMetals* **31**, 715–735
25. Abraham, N. G., Cao, J., Sacerdoti, D., Li, X., and Drummond, G. (2009) Heme oxygenase: the key to renal function regulation. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **297**, F1137–F1152
26. Tebay, L. E., Robertson, H., Durant, S. T., Vitale, S. R., Penning, T. M., Dinkova-Kostova, A. T., and Hayes, J. D. (2015) Mechanisms of activation of the transcription factor Nrf2 by redox stressors, nutrient cues, and energy status and the pathways through which it attenuates degenerative disease. *Free Radic. Biol. Med.* **88**, 108–146
27. Lambros, M. L. and Plafker, S. M. (2016) Oxidative Stress and the Nrf2 Anti-Oxidant Transcription Factor in Age-Related Macular Degeneration. *Adv Exp Med Biol.* **854**, 67–72
28. Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., Igarashi, K., Engel, J. D., and Yamamoto, M. (1999) Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *GENES Dev.* **13**, 76–86
29. Dinkova-kostova, A. T., Holtzclaw, W. D., Cole, R. N., Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Yamamoto, M., and Talalay, P. (2002) Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2

- enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 11908–11913
30. Mira, M. S., Marisol, C., and Handa, T., J. (2014) Nrf2 signaling is Impaired in the Aging RPE given an Oxidative Insult. *Exp Eye Res.* 111–114
 31. Nakagami, Y. (2016) Nrf2 is an Attractive Therapeutic Target for Retinal Diseases. *Oxid Med Cell Longev.* **2016**, 1–2
 32. Yamawaki, K., Kanda, H., and Shimazaki, R. (2018) Nrf2 activator for the treatment of kidney diseases. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **360**, 30–37
 33. Toto, R. D. (2018) Bardoxolone — the Phoenix ? *J Am Soc Nephrol* **29**, 360–361
 34. Kobayashi, A., Kang, M., Watai, Y., Tong, K. I., Shibata, T., Uchida, K., and Yamamoto, M. (2006) Oxidative and Electrophilic Stresses Activate Nrf2 through Inhibition of Ubiquitination Activity of Keap1 †. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 221–229
 35. Prete, D. Del, Taglialatela-scafati, O., Minassi, A., Sirignano, C., Cruz, C., Bellido, M. L., Mun, E., Appendino, G., Orientale, P., Donegani, L., Farmacia, D., Federico, N., and Montesano, V. (2017) Electrophilic Triterpenoid Enones: A Comparative Thiol-Trapping and Bioactivity Study. *J. Nat. Prod.* **80**, 2276–2283
 36. Nakagami, Y., Masuda, K., Hatano, E., and Inoue, T. (2015) Novel Nrf2 activators from microbial transformation products inhibit blood – retinal barrier. *Br. J. Pharmacol.* **172**, 1237–1249
 37. Ross, D. and Siegel, D. (2018) NQO1 in protection against oxidative stress. *Curr. Opin. Toxicol.* **7**, 67–72
 38. Mian, O. Y., Khattab, M. H., Hedayati, M., Coulter, J., Abubaker-Sharif, B., Schwaninger, J. M., Veeraswamy, R. K., Brooks, J. D., Hopkins, L., Shinohara, D. B., Cornblatt, B., Nelson, W. G., Yegnasubramanian, S., and DeWeese, T. L. (2016) GSTP1 Loss Results in Accumulation of Oxidative DNA Base Damage and Promotes Prostate Cancer Cell Survival Following Exposure to Protracted Oxidative Stress. *Prostate* **76**, 199–206
 39. Jain, A., Lamark, T., Sjøttem, E., Larsen, K. B., Awuh, J. A., Øvervatn, A., McMahon, M., Hayes, J. D., and Johansen, T. (2010) p62/SQSTM1 is a target gene for transcription factor NRF2 and creates a positive feedback loop by inducing antioxidant response element-driven gene transcription. *J. Biol. Chem.* **285**, 22576–22591

40. Tao, J., Bryan, H., Montserrat, R. de la V., Pak, K. W., Chapman, E., and Donna, D. Z. (2015) p62 links autophagy and Nrf2 signaling. *Free Radic Biol Med.* **88**, 199–204
41. Mitter, S. K., Song, C., Qi, X., Mao, H., Rao, H., Akin, D., Lewin, A., Grant, M., Dunn, W., Ding, J., Rickman, C. B., and Boulton, M. (2014) Dysregulated autophagy in the RPE is associated with increased susceptibility to oxidative stress and AMD. *Autophagy* **10**, 1989–2005
42. Yao, J., Jia, L., Khan, N., Lin, C., Mitter, S. K., Boulton, M. E., Dunaief, J. L., Klionsky, D. J., Guan, J. L., Thompson, D. A., and Zacks, D. N. (2015) Deletion of autophagy inducer RB1CC1 results in degeneration of the retinal pigment epithelium. *Autophagy* **11**, 939–953
43. Golestaneh, N., Chu, Y., Xiao, Y.-Y., Stoleru, G. L., and Theos, A. C. (2017) Dysfunctional autophagy in RPE, a contributing factor in age-related macular degeneration. *Cell Death Dis.* **8**, e2537
44. Takeshige, K., Baba, M., Tsuboi, S., Noda, T., and Ohsumi, Y. (1992) Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *J. Cell Biol.* **119**, 301–312
45. Yu, L., Chen, Y., and Tooze, S. A. (2018) Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms. *Autophagy* **14**, 207–215
46. Wang, A. L., Lukas, T. J., Yuan, M., Du, N., Tso, M. O., and Neufeld, A. H. (2009) Autophagy and exosomes in the aged retinal pigment epithelium: Possible relevance to drusen formation and age-related macular degeneration. *PLoS One* **4**
47. Pole, A., Dimri, M., and P. Dimri, G. (2016) Oxidative stress, cellular senescence and ageing. *AIMS Mol. Sci.* **3**, 300–324
48. Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D., and Milzani, A. (2006) Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin. Chem.* **52**, 601–623
49. Scherz-Shouval, R. and Elazar, Z. (2011) Regulation of autophagy by ROS: Physiology and pathology. *Trends Biochem. Sci.* **36**, 30–38
50. Westerfield, M. (2007) The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (*Danio rerio*), 5th Edition. *Univ. Oregon Press. Eugene*
51. Jennifer L. Thomas, Craig M. Nelson, Xixia Luo, David R. Hyde, and R. T. (2012) Characterization of Multiple Light Damage Paradigms Reveals Regional Differences in Photoreceptor Loss. *Exp. Eye Res.* **97**, 105–116

52. Rajaram, K., Summerbell, E. R., and Patton, J. G. (2014) Technical brief : Constant intense light exposure to lesion and initiate regeneration in normally pigmented zebrafish. *Mol. Vis.* **20**, 1075–1084
53. Saito, Y., Tsuruma, K., Shimazawa, M., Nishimura, Y., Tanaka, T., and Hara, H. (2016) Establishment of a drug evaluation model against light-induced retinal degeneration using adult pigmented zebrafish. *J. Pharmacol. Sci.* **131**, 215–218
54. Inoue, Y., Shimazawa, M., Noda, Y., Nagano, R., Otsuka, T., Kuse, Y., Nakano, Y., Tsuruma, K., Nakagami, Y., and Hara, H. (2017) RS9, a novel Nrf2 activator, attenuates light-induced death of cells of photoreceptor cells and Müller glia cells. *J. Neurochem.* **141**, 750–765
55. Mauthe, M., Orhon, I., Rocchi, C., Zhou, X., Luhr, M., Hijlkema, K. J., Coppes, R. P., Engedal, N., Mari, M., and Reggiori, F. (2018) Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy* **14**, 1435–1455
56. Mizushima, N. and Yoshimori, T. (2007) How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy* **3**, 542–545
57. Klionsky, D. J., Abdelmohsen, K., Abe, A., Abedin, J., Abeliovich, H., Arozena, A. A., Adachi, H., Adams, M., Adams, P. D., and ... (2015) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* **8627**
58. Mokhtari, V., Afsharian, P., Shahhoseini, M., Kalantar, S. M., and Moini, A. (2017) A review on various uses of N-acetyl cysteine. *Cell J.* **19**, 11–17
59. Otomo, E., Tohgi, H., Kogure, K., Hirai, S., Takakura, K., Terashi, A., Gotoh, F., Maruyama, S., Tazaki, Y., Shinohara, Y., Ito, E., Sawada, T., Yamaguchi, T., Kikuchi, H., Kobayashi, S., Fujishima, M., and Nakashima, M. (2003) Effect of a novel free radical scavenger, edaravone (MCI-186), on acute brain infarction: Randomized, placebo-controlled, double-blind study at multicenters. *Cerebrovasc. Dis.* **15**, 222–229
60. Akiyama, G., Azuchi, Y., Guo, X., Noro, T., Kimura, A., Harada, C., Namekata, K., and Harada, T. (2017) Edaravone prevents retinal degeneration in adult mice following optic nerve injury. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **58**, 4908–4914
61. Liu, L., Song, Y., Zhao, M., Yi, Z., and Zeng, Q. (2015) Protective effects of edaravone, a free radical scavenger, on lipopolysaccharide-induced acute kidney injury in a rat model of sepsis. *Int. Urol. Nephrol.* **47**, 1745–1752

62. de Zeeuw, D., Akizawa, T., Audhya, P., Bakris, G. L., Chin, M., Christ-Schmidt, H., Goldsberry, A., Houser, M., Krauth, M., Lambers Heerspink, H. J., McMurray, J. J., Meyer, C. J., Parving, H.-H., Remuzzi, G., Toto, R. D., Vaziri, N. D., Wanner, C., Wittes, J., Wrolstad, D., and Chertow, G. M. (2013) Bardoxolone Methyl in Type 2 Diabetes and Stage 4 Chronic Kidney Disease. *N. Engl. J. Med.* **369**, 2492–2503
63. Chin, M. P., Reisman, A., Bakris, G. L., and Grady, O. (2014) Mechanisms Contributing to Adverse Cardiovascular Events in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus and Stage 4 Chronic Kidney Disease Treated with Bardoxolone Methyl. *Am J Nephrol* **39**, 499–508
64. Santarelli, M., Diplotti, L., Samassa, F., Student, M., Veritti, D., Kuppermann, B. D., Lanzetta, P., Santarelli, M., Diplotti, L., Samassa, F., Student, M., Santarelli, M., Diplotti, L., Samassa, F., Veritti, D., Kuppermann, B. D., and Lanzetta, P. (2015) Advances in pharmacotherapy for wet age-related macular degeneration. *Expert Opin. Pharmacother. ISSN* **16**, 1769–1781
65. Kim, J. Y., Zhao, H., Martinez, J., Doggett, T. A., Kolesnikov, A. V., Tang, P. H., Ablonczy, Z., Chan, C. C., Zhou, Z., Green, D. R., and Ferguson, T. A. (2013) Noncanonical autophagy promotes the visual cycle. *Cell* **154**, 365–376
66. Koch, K. W., Lambrecht, H. G., Haberecht, M., Redburn, D., and Schmidt, H. (1994) Functional coupling of a Ca²⁺/calmodulin-dependent nitric oxide synthase and a soluble guanylyl cyclase in vertebrate photoreceptor cells. *EMBO J.* **13**, 3312–3320
67. Parinot, C., Rieu, Q., Chatagnon, J., Finnemann, S. C., and Nandrot, E. F. (2014) Large-Scale Purification of Porcine or Bovine Photoreceptor Outer Segments for Phagocytosis Assays on Retinal Pigment Epithelial Cells. *J. Vis. Exp.* 1–8
68. Miksa, M., Komura, H., Wu, R., Shah, K. G., and Wang, P. (2009) A Novel Method to Determine the Engulfment of Apoptotic Cells by Macrophages using pHrodo Succinimidyl Ester. *J Immunol Methods.* **342**, 71–77
69. Lyons, A. B. (2000) Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. *J. Immunol. Methods*
70. Maurin, M., Benoliel, A. M., Bongrand, P., and Raoult, D. (1992) Phagolysosomes of *Coxiella burnetii*-infected cell lines maintain an acidic pH during persistent infection. *Infect. Immun.* **60**, 5013–5016

71. Murase, H., Tsuruma, K., Shimazawa, M., and Hara, H. (2015) TUDCA promotes phagocytosis by retinal pigment epithelium via MerTK activation. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **56**, 2511–2518
72. Wong, Y. Y., Moon, A., Duffin, R., Barthet-Barateig, A., Meijer, H. A., Clemens, M. J., and De Moor, C. H. (2010) Cordycepin inhibits protein synthesis and cell adhesion through effects on signal transduction. *J. Biol. Chem.* **285**, 2610–2621
73. Rafaeloff-Phail, R., Ding, L., Conner, L., Yeh, W. K., McClure, D., Guo, H., Emerson, K., and Brooks, H. (2004) Biochemical regulation of mammalian AMP-activated protein kinase activity by NAD and NADH. *J. Biol. Chem.* **279**, 52934–52939
74. Turnley, A. M., Stapleton, D., Mann, R. J., Witters, L. A., Kemp, B. E., and Bartlett, P. F. (1999) Cellular distribution and developmental expression of AMP-activated protein kinase isoforms in mouse central nervous system. *J. Neurochem.* **72**, 1707–1716
75. Da Silva Xavier, G., Leclerc, I., Salt, I. P., Doiron, B., Hardie, D. G., Kahn, A., and Rutter, G. A. (2000) Role of AMP-activated protein kinase in the regulation by glucose of islet beta cell gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 4023–4028
76. Qin, S. and Vries, G. W. De. (2008) $\alpha 2$ but Not $\alpha 1$ AMP-activated Protein Kinase Mediates Oxidative Stress-induced Inhibition of Retinal Pigment Epithelium Cell Phagocytosis of Photoreceptor Outer Segments. *J. Biol. Chem.* **283**, 6744–6751
77. Zhang, J., Kiser, P. D., Badiee, M., Palczewska, G., Dong, Z., Golczak, M., Tochtrop, G. P., and Palczewski, K. (2015) Molecular pharmacodynamics of emixustat in protection against retinal degeneration. *J. Clin. Invest.* **125**, 2781–2794
78. Kubota, R., Boman, N., David, R., Mallikaarjun, S., Patil, S., and Birch, D. (2012) Safety and effect on rod function of ACU-4429, a novel small-molecule visual cycle modulator. *Retina* **32**, 183–188
79. Gabisonia, K., Prosdocimo, G., Aquaro, G. D., Carlucci, L., Zentilin, L., Secco, I., Ali, H., Braga, L., Gorgodze, N., Bernini, F., Burchielli, S., Collesi, C., Zandonà, L., Sinagra, G., Piacenti, M., Zacchigna, S., Bussani, R., Recchia, F. A., and Giacca, M. (2019) MicroRNA therapy stimulates uncontrolled cardiac repair after myocardial infarction in pigs. *Nature* **569**, 418–422

80. Sun, M., Finnemann, S. C., Febbraio, M., Shan, L., Annangudi, S. P., Podrez, E. A., Hoppe, G., Darrow, R., Organisciak, D. T., Salomon, R. G., Silverstein, R. L., and Hazen, S. L. (2006) Light-induced oxidation of photoreceptor outer segment phospholipids generates ligands for CD36-mediated phagocytosis by retinal pigment epithelium: A potential mechanism for modulating outer segment phagocytosis under oxidant stress conditions. *J. Biol. Chem.* **281**, 4222–4230
81. Atamna, H., Atamna, W., Al-Eyd, G., Shanower, G., and Dhahbi, J. M. (2015) Combined activation of the energy and cellular-defense pathways may explain the potent anti-senescence activity of methylene blue. *Redox Biol.* **6**, 426–435
82. Dasgupta, B. and Milbrandt, J. (2007) Resveratrol stimulates AMP kinase activity in neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 7217–7222
83. Turpaev, K. T. (2013) Keap1-Nrf2 signaling pathway: Mechanisms of regulation and role in protection of cells against toxicity caused by xenobiotics and electrophiles. *Biochem.* **78**, 111–126
84. Stack, C., Jainuddin, S., Elipenahli, C., Gerges, M., Starkova, N., Starkov, A. A., Jové, M., Portero-Otin, M., Launay, N., Pujol, A., Kaidery, N. A., Thomas, B., Tampellini, D., Flint Beal, M., and Dumont, M. (2014) Methylene blue upregulates Nrf2/ARE genes and prevents tau-related neurotoxicity. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 3716–3732
85. Ashabi, G., Khalaj, L., Khodaghali, F., Goudarzvand, M., and Sarkaki, A. (2015) Pre-treatment with metformin activates Nrf2 antioxidant pathways and inhibits inflammatory responses through induction of AMPK after transient global cerebral ischemia. *Metab. Brain Dis.* **30**, 747–754
86. Pearson, R. G. (1963) Hard and Soft Acids and Bases. *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 3533–3539
87. Cantó, C., Gerhart-hines, Z., Feige, J. N., Lagouge, M., Milne, J. C., Elliott, P. J., Puigserver, P., and Auwerx, J. (2009) AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature* **458**, 1056–1060
88. Herzig, S. and Shaw, R. J. (2018) AMPK: Guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **19**, 121–135
89. Mambo, E., Gao, X., Cohen, Y., Guo, Z., Talalay, P., and Sidransky, D. (2003) Electrophile and oxidant damage of mitochondrial DNA leading to rapid evolution of homoplasmic mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 1838–1843

90. AL-Ani, I., Zimmermann, S., Reichling, J., and Wink, M. (2018) Antimicrobial Activities of European Propolis Collected from Various Geographic Origins Alone and in Combination with Antibiotics. *Medicines* **5**, 2
91. Murase, H., Shimazawa, M., Kakino, M., Ichihara, K., Tsuruma, K., and Hara, H. (2013) The Effects of Brazilian Green Propolis against Excessive Light-Induced Cell Damage in Retina and Fibroblast Cells. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* **2013**, 238279
92. Lawson, N. D. and Weinstein, B. M. (2002) In vivo imaging of embryonic vascular development using transgenic zebrafish. *Dev Biol* **248**, 307–318
93. Schindelin, J., Arganda-carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J., White, D. J., Hartenstein, V., Tomancak, P., and Cardona, A. (2013) Fiji - an Open Source platform for biological image analysis. *Nat Methods* **9**
94. Kim, H., Kim, W., Yum, S., Hong, S., Oh, J. E., Lee, J. W., Kwak, M. K., Park, E. J., Na, D. H., and Jung, Y. (2013) Caffeic acid phenethyl ester activation of Nrf2 pathway is enhanced under oxidative state: Structural analysis and potential as a pathologically targeted therapeutic agent in treatment of colonic inflammation. *Free Radic. Biol. Med.* **65**, 552–562
95. Sharpe, P. C., Liu, W. H., Yue, K. K., McMaster, D., Catherwood, M. A., McGinty, A. M., and Trimble, E. R. (1998) Glucose-induced oxidative stress in vascular contractile cells: comparison of aortic smooth muscle cells and retinal pericytes. *Diabetes* **47**, 801–809

略語一覽表

AMD	age-related macular degeneration
AMPK	AMP-activated protein kinase
ARE	antioxidant responsive element
ARVO	the association for research in vision and ophthalmology
Baf A1	bafilomycin A1
CFH	complement factor H
CQ	chloroquine
DEM	diethyl malate
DMEM	dulbecco's modified eagle's medium
EGFP	enhanced green fluorescent protein
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GCL	ganglion cell layer
GSTP1	glutathione s-transferase pi 1
HO-1	heme oxygenase-1
HTRA1	high-temperature requirement A serine peptidase 1
INL	inner nuclear layer
Keap1	kelch-like ECH-associated protein 1
LC3	microtubule-associated protein 1 light chain 3
mTOR	mammalian target of rapamycin
mTORC2	mammalian target of rapamycin complex 2
NAC	<i>N</i> -acetyl-L-cysteine
NQO1	NAD(P)H quinone dehydrogenase 1
Nrf2	NF-E2-related factor 2

ONL	outer nuclear layer
PBS	phosphate buffered saline
PFA	paraformaldehyde
p62	p62/sequestosome1
RPE	retinal pigment epithelium
SEM	standard error of the mean
TBS	tris buffered saline
ULK 1/2	unc-51 like autophagy activating kinase
VEGF	vascular endothelial growth factor
WEP	water extract of propolis
WST	water soluble tetrazolium salts
ZnPP	zinc protoporphyrin