

イミダゾリン誘導体の細胞内自食作用
(オートファジー) 誘導能に関する生化学的解析

中川 詩織

(NAKAGAWA Shiori)

同志社女子大学大学院

薬学研究科 医療薬学専攻

目次

| | |
|---|----|
| 緒言 | 4 |
| 第 1 章 イミダゾリン誘導体によるオートファジー誘導能の解析 | 7 |
| 1-1 研究目的 | 7 |
| 1-2 実験材料と方法 | 8 |
| 1-2-1 試薬 | 8 |
| 1-2-2 細胞培養 | 8 |
| 1-2-3 タンパク質調製 | 9 |
| 1-2-4 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 法及びウェスタン ブロット法 | 9 |
| 1-2-5 Cyto-ID の蛍光検出 | 10 |
| 1-2-6 MDC の蛍光検出 | 11 |
| 1-3 結果 | 12 |
| 1-3-1 イダゾキサンのオートファジーの誘導 | 12 |
| 1-3-2 イミダゾリン誘導体によるオートファジーの誘導 | 15 |
| 1-4 考察 | 17 |
| 第 2 章 オートファジー誘導メカニズムの解析 | 20 |
| 2-1 研究目的 | 20 |
| 2-2 実験材料と方法 | 22 |
| 2-2-1 試薬 | 22 |
| 2-2-2 タンパク質調製 | 22 |
| 2-2-3 SDS-PAGE 法及びウェスタンブロット法 | 23 |
| 2-2-4 NO 定量 | 25 |
| 2-2-5 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法 | 26 |
| 2-2-6 核タンパク質抽出 | 26 |

| | |
|---|----|
| 2-2-7 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) 法 | 27 |
| 2-3 結果..... | 29 |
| 2-3-1 イダゾキサンのによる mTOR 及び I ₁ 受容体への作用 | 29 |
| 2-3-2 イダゾキサンのによる p62 への作用 | 29 |
| 2-4 考察..... | 33 |
| 総括 | 35 |
| 謝辞 | 37 |
| 参考文献 | 38 |
| 図 | 43 |

本文中で使用した略語

略語

| | |
|----------------|--|
| AP-1 | activator protein 1 |
| 2-BFI | 2-(2-benzofuranyl)-2-imidazoline |
| BCA | bicinchoninic acid |
| BSA | bovine serum albumin |
| CBB | coomassie brilliant blue |
| ELISA | enzyme-linked immunosorbent assay |
| EMSA | electrophoretic mobility shift assay |
| HO-1 | heme oxygenase 1 |
| HRP | horseradish peroxidase |
| IL-1 β | interleukin-1 beta |
| JNK | c-Jun N-terminal kinase |
| Keap1 | Kelch-like ECH-associated protein 1 |
| LC3 | microtubule-associated protein 1 light chain 3 |
| LPS | lipopolysaccharide |
| MAO | monoamine oxidase |
| MDC | monodansylcadaverine |
| mTOR | mammalian target of rapamycin |
| NF- κ B | nuclear factor-kappa B |
| NQO-1 | NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 |
| Nrf2 | nuclear factor erythroid 2-related factor 2 |
| PBS | phosphate buffered saline |
| PVDF | polyvinylidene difluoride |
| SDS | sodium dodecyl sulfate |
| SDS-PAGE | SDS-polyacrylamide gel electrophoresis |
| TBS | tris buffered saline |
| TNF- α | tumor necrosis factor-alpha |

緒言

生体は細菌などの外敵から身を守るため、免疫応答によってさまざまな方法で対応している。免疫応答は獲得免疫と自然免疫に分けられ、自然免疫では侵入した菌体をマクロファージが認識し、細菌の貪食や炎症反応を誘起する。炎症反応において、マクロファージにより産生される炎症物質は発熱及び血管拡張作用を示し、細菌の増殖抑制や免疫細胞の遊走を補助することによって生体防御に寄与している。一方で、クローン病など炎症性の自己免疫疾患では、免疫細胞が自己細胞を誤って異物と認識し、過剰な炎症反応による組織障害を引き起こす。そのため、これらの疾患治療においては薬剤により炎症反応を抑制することが重要となる。しかし、抗炎症薬として免疫応答を抑制するステロイドなどの薬剤を長期使用することは、副作用の観点から問題点もある。従って、このような免疫応答を抑制する薬剤とは異なるメカニズムを介した抗炎症薬の開発が求められており、新たな標的としてオートファジーに着目した。

オートファジーは酵母からヒトまで多くの真核生物に共通して備わっている、細胞内分解システムの一つである。オートファジーは **auto** (自己) と **phagy** (食べる) を組み合わせた言葉で、その言葉に示される通りオルガネラなど細胞自らの一部を膜内に包み込み分解する機構のことである。オートファジーの過程では、まず細胞質中に隔離膜が現れ、膜の伸長に伴って細胞質の一部を取り込み、オートファゴソームと呼ばれる脂質二重膜の小胞を形成する。オートファゴソームはリソソームと膜融合してオートリソソームとなり、内容物をリソソーム内の加水分解酵素により分解する。その後、リソソームは再生するが、オートリソソームは消滅する (図 1) [1]。

これまで、オートファジーは細胞が飢餓に陥った際に栄養源となるアミノ酸などを供給するため、細胞内の内容物を非選択的に分解する機能を持つと考えられてきた。しかし、近年の研究からオートファジーは、損傷したミトコンドリアや変性タンパク質、さらには生体内に侵入した細菌などを認識して積極的に除去するなど、細胞内の有害物を

選択的に分解する機能を持つことも明らかになった [2-4]。このように、オートファジーは細胞に栄養素を供給する以外に、細胞の生存環境を整えて恒常性を保つ役割を担う。また、オートファジーがパーキンソン病やポリグルタミン病などの神経変性疾患やがん、サルモネラなどの細胞内寄生細菌による感染症など、さまざまな疾患に関与することが報告されている [5]。そして、オートファジーはこれらの疾患に対する治療標的になりうるのではないかと注目されている。例えば、神経変性疾患の一つであるポリグルタミン病については、オートファジーの誘導による異常タンパク質の分解促進を治療標的としている。ポリグルタミン病の一つであるハンチントン病モデルマウスを用いた実験で、オートファジー誘導剤が異常タンパク質を減少させ、細胞毒性を低減する効果を持つことが確認されており [6]、今後の臨床応用を期待されている。逆に、がんについては、オートファジーが腫瘍細胞の高い代謝要求を満たし、その生存に有利に働くことから、オートファジーの阻害による腫瘍細胞への栄養供給の阻害を治療標的としている。オートファジー阻害薬の一つであるクロロキン (chloroquine) が臨床試験にて、抗がん剤としての治療効果を検証されている [7]。このように、オートファジーに働きかける化合物はさまざまな疾病に対する治療薬につながる可能性を持つが、オートファジーを標的とした治療について、オートファジーの誘導若しくは阻害のどちらが適切なのかは、組織や病態におけるオートファジーの役割によって異なる。従って、オートファジーを標的とした薬剤を治療薬として用いるには、病態ごとのオートファジーの機構及び生体反応への影響を理解することが重要である。

オートファジーと炎症応答との関係についても複数報告されている。例えば、オートファジー関連遺伝子を欠損させたマウスでは、野生型のマウスと比較して、lipopolysaccharide (LPS) 刺激による炎症性サイトカインの分泌が過剰になることが示されており [8]、損傷したミトコンドリアなどがオートファジーの欠損により除去されず蓄積することで、過剰な炎症反応に繋がったのではないかと考えられている。また、

オートファジーが interleukin-1 beta (IL-1 β) の前駆体を分解し、その分泌を抑制することも報告されており [9]、オートファジーはさまざまな段階で炎症応答に関わることが考えられる。そして、オートファジーを誘導する薬剤のうち、ラパマイシン (rapamycin) を始めとした mammalian target of rapamycin (mTOR) 阻害剤が、LPS 刺激による NO 産生を抑制するなどの抗炎症作用を持つことも報告されていることから [10] [11]、オートファジー誘導剤は抗炎症薬として利用できる可能性を持つのではないかと考えた。抗炎症作用を示す化合物の中からオートファジー誘導作用を併せ持つ化合物を発見し、抗炎症作用とオートファジー誘導作用の関係性を明らかに出来れば、抗炎症薬の新たな標的としてオートファジーを提示できる。そこで、本論文の第 1 章では、炎症反応に関与するマクロファージでの作用を調べるためにマウスマクロファージ様細胞である RAW264.7 を用いて、当該細胞で抗炎症作用を示すイダゾキサンを筆頭に、類似骨格を有するイミダゾリン誘導体のオートファジーの誘導能を検証した。第 2 章では第 1 章にて明らかとなったイダゾキサンのオートファジー誘導作用について、作用メカニズムの解析を行った。

本研究の内容は以下の論文にて発表した。

Nakagawa S, Ueno T, Manabe T, Kawasaki K. Imidazolines increase the levels of the autophagosomal marker LC3-II in macrophage-like RAW264.7 cells. *Can J Physiol Pharmacol.* 2018;96(8):845-9. Epub 2018/04/11. doi: 10.1139/cjpp-2018-0021.

第1章 イミダゾリン誘導体によるオートファジー誘導能の解析

1-1 研究目的

本研究では、オートファジーを誘導する化合物の発見とその化合物の抗炎症薬としての利用を展望して、抗炎症作用を持つ候補化合物がオートファジーを誘導するののかどうかを検証することにした。そして、候補化合物にはマウスマクロファージ様細胞である RAW264.7 細胞において、LPS 刺激による NO 産生を抑制する作用を持つ [12] イダゾキサン (idazoxan) に注目した。イダゾキサンはイミダゾリン誘導体の一つで、 α_2 -アドレナリン受容体やイミダゾリン受容体に結合することで血圧降下作用を示す [13] [14]。しかし、イダゾキサンの抗炎症作用については詳しい作用メカニズムが明らかになっておらず、 α_2 -アドレナリン受容体やイミダゾリン受容体が関与するのかは不明である。一方、イダゾキサンと同じイミダゾリン誘導体であるクロニジン (clonidine) やリルメニジン (rilmenidine) が、神経系の細胞でイミダゾリン受容体を介してオートファジーを誘導することが報告されている [6, 15]。イダゾキサンはクロニジンやリルメニジンと類似の骨格を持ち、ラパマイシンと同様に RAW264.7 細胞において LPS 刺激による NO 産生を抑制することから、当該細胞にてオートファジー誘導作用を持つのではないかと考えた。そこで、オートファゴソームの増加を指標に、イダゾキサンがオートファジーを誘導するののか検証を行うことにした。また、オートファジーの誘導作用がイミダゾリン誘導体に共通なのか、クロニジンやリルメニジンを含め複数のイミダゾリン誘導体についてもオートファジーを誘導するののか調べた。

1-2 実験材料と方法

1-2-1 試薬

抗 microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) 抗体 (8E10) は医学生物学研究所 (名古屋) から購入した。イダゾキサシ、ビンブラスチン (vinblastine)、リルメニジン、クロニジンは Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas) から購入した。ラパマイシン、coomassie brilliant blue (CBB) R-250 はナカライテスク (京都) から購入した。デクスメデトミジン (dexmedetomidine) は富士フィルム和光純薬 (大阪) から購入した。ペプスタチン A (pepstatin A)、Cyto-ID autophagy detection kit は Enzo Life Sciences (Farmingdale, New York) から購入した。E-64d はペプチド研究所 (大阪) から購入した。バフィロマイシン A₁ (bafilomycin A₁)、2-(2-benzofuranyl)-2-imidazoline (2-BFI) は Tocris Bioscience (Bristol) から購入した。エファロキサシ (efaroxan) は LKT Laboratories (St. Paul, Minnesota) から購入した。Monodansylcadaverine (MDC) は Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri) から購入した。Pierce™ bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit は Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts) から購入した。その他の試薬類は市販の試薬特級品を用いた。

1-2-2 細胞培養

RAW264.7 細胞 (DS Pharma Biomedical) は 10 % 非働化ウシ胎児血清 (Sigma-Aldrich)、100 U/mL ペニシリン (penicilin)、及び 100 µg/mL ストレプトマイシン (streptomycin) (Thermo Fisher Scientific) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma-Aldrich) 中で 37 °C、5 % CO₂ 条件下で培養した。

1-2-3 タンパク質調製

薬剤処理を行った細胞の培養上清を取り除き、4 °Cに冷却した phosphate buffered saline (PBS) {137 mM NaCl、2.7 mM KCl、1.47 mM KH₂PO₄、8.1 mM Na₂HPO₄ (pH7.4)} を加えて洗浄した。洗浄後、プレートに接着した細胞を PBS 中でスクレーピングを行うことにより剥離し、チューブ内へ回収した。回収した細胞は 1,000 × *g*、4 °C で 10 分間遠心分離することで、ペレット状にした。ペレット状の細胞を約 150 μL の PBS で再懸濁し、branson sonifier model S-150 を用いて 10 秒間 × 3 回、超音波破碎を行った。破碎後、サンプルのタンパク質濃度は bovine serum albumin (BSA) を検量線の標準溶液に用いて bicinchoninic acid (BCA) 法 (Pierce™ BCA protein assay kit) により測定した。

1-2-4 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 法及びウェスタンブロット法

1) LC3 の検出

BCA 法の結果からタンパク質の泳動量が等量になるように、試料溶液を作製した。試料溶液に還元剤を含む試料緩衝液 (ナカライテスク) を加え、70 °C で 15 分間の加熱、還元処理を行った。還元処理を行った試料溶液は、15 % アクリルアミドゲルを用いて、泳動用緩衝液 {25 mM Tris、192 mM glycine、0.1 % sodium dodecyl sulfate (SDS)} 内で、電圧 50 V で 30 分間、次に電圧 100 V で 90 分間泳動することにより分離した。分離したタンパク質は、転写用緩衝液 (25 mM Tris、192 mM glycine、20 % methanol、0.02 % SDS) 内でニトロセルロース膜に電圧 100 V、45 分間若しくは 60 分間転写した。転写膜は、10 % スキムミルク/PBS 中に 4 °C で一晩静置し、ブロッキングを行った。その後、PBS-T (0.05 % Tween-20、PBS) で洗浄し、1 % スキムミルク/PBS で 1,000 倍希釈した抗 LC3 抗体 (8E10) を、室温で 1 時間振盪しながら一次抗体反応を行った。

一次抗体を反応させた後、余分な抗体を PBS-T により洗浄し、1 % スキムミルク/PBS で 1,000 倍希釈した horseradish peroxidase (HRP) 結合抗マウス IgG 抗体を室温で 1 時間振盪させ、二次抗体反応を行った。反応後、再び転写膜を PBS-T で洗浄し、SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific) を用いた化学発光法により LAS-3000 mini (富士フイルム、京都) を使用してシグナルを検出した。

1-2-5 Cyto-ID の蛍光検出

1) フローサイトメトリー

薬剤処理した細胞はスクレーピングによりプレートから剥離させ、遠沈管に回収した後、 $800 \times g$ 、 4°C で 10 分間遠心分離することによりペレット状にした。その後、培養上清を取り除き、約 9 mL の PBS で再懸濁した。再懸濁した細胞から、 2×10^6 個の細胞だけ別の遠沈管へ回収し、再び $800 \times g$ 、 4°C で 10 分間遠心分離することによりペレット状にした。その後、PBS で 1,000 倍希釈した Cyto-ID (Cyto-ID autophagy detection kit) を 250 μL 加え、遮光下、 37°C で 30 分間、染色した。染色後、細胞を PBS で洗浄し、約 2 mL の PBS で再懸濁した後に蛍光を測定した。蛍光は FACS Calibur (BD FACSCalibur™、BD bioscience、Franklin、New Jersey) を用いて FL1 ($530 \pm 30 \text{ nm}$) で検出した。

2) 共焦点顕微鏡

細胞をノンコート 8 ウェルチャンバースライド (松波硝子工業、大阪) に播種し、薬剤処理を行った。薬剤処理後、細胞を PBS (+) (0.9 mM CaCl_2 、0.33 mM MgCl_2 、PBS) で洗浄した。洗浄後、PBS で 500 倍希釈した Cyto-ID (Cyto-ID® autophagy detection kit) と 1,000 倍希釈した Hoechst 33342 (Cyto-ID® autophagy detection kit) を 200 μL

加え、遮光下、37 °Cで 30 分間染色した。染色後、細胞を 37 °Cに温めた PBS (+) で洗浄し、同様に温めた 4 % paraform aldehyde/PBS を遮光下、室温で 10 分間反応させ固定した。固定した細胞は、PBS (+) で 3 回洗浄し、VECTASHIELD® Mounting Medium (Vector Laboratories, Burlingame, California) を加えて、スライドガラス内に封入した。その後、A1R 共焦点顕微鏡 (ニコン、東京) を用いて細胞を観察した。

1-2-6 MDC の蛍光検出

薬剤処理を行った後、培養上清を除去し 50 μ M の MDC を含む PBS を加え、遮光下、37 °Cで 1 時間染色した。染色後、細胞を PBS で洗浄し、細胞溶解液 {0.1 % Triton X-100、10 mM Tris-HCl (pH 8.0)} で可溶化した。可溶化した細胞溶解液のうち、一部は黒色の 96 ウェルプレートに分取し、Spectra Max (モレキュラーデバイスジャパン、東京) を用いて、励起波長 365 nm、蛍光波長 550 nm で蛍光強度を測定した。また、細胞密度の違いによる蛍光強度のバラつきを補正するため、残りの細胞溶解液は BCA 法に供してタンパク質濃度を測定した。

1-3 結果

1-3-1 イダゾキサンのオートファジーの誘導

イダゾキサンによるオートファジー誘導作用は、オートファゴソームの増加を指標に検証した。オートファゴソームの膜には Atg タンパク質とよばれる一連のタンパク質群が含まれ、その内の LC3 がオートファゴソームのマーカータンパク質として使用されている [16]。LC3 は前駆体の状態から末端を切断されて LC3-I となり、LC3-I が脂質修飾を受けて LC3-II になることでオートファゴソームの膜を構成する (図 2)。LC3-II の存在量はオートファゴソームの量と相関するため、LC3-II の増加によりオートファゴソームが増加したと判断した。

イダゾキサンを処理した時の LC3-II の存在量をウェスタンブロット法により調べた結果、イダゾキサンの濃度を 10、30、100 μM と高くするに従い、濃度依存的に LC3-II が増加した (図 3-A)。また、100 μM のイダゾキサンの処理時間を 4、8、24 時間と延長するに伴い、処理時間依存的な LC3-II の増加も認められた (図 3-B)。そこで、イダゾキサンによる LC3-II の増加が確かな現象であることを示すため、先の実験で比較的特徴的な LC3-II の増加が認められた、100 μM のイダゾキサンを 24 時間処理した条件で、3 サンプル処理してウェスタンブロット法に供した。同様の操作を、陽性対照としてオートファジー誘導剤であるラパマイシンを処理した条件でも行った (図 3-C)。図 3-C の結果から得られた LC3-II のシグナル強度について、薬剤未処理群、ラパマイシン処理群、イダゾキサン処理群と、同じ群の 3 つのサンプル間からシグナル平均値を算出し、グラフに示した (図 3-D)。算出した値を用いて、薬剤未処理群を比較対照に Student's *t*-test により統計解析を行った結果、ラパマイシンより小さいが、イダゾキサンでも危険率 5 % で有意な LC3-II の増加が認められた (図 3-D)。よって、イダゾキサンはオートファゴソームを増加させることが示唆された。

また、オートファゴソームの増加について、LC3-II の存在量だけでなく、オートフ

オートファゴソームを蛍光染色するという別の実験方法でも検証を行った。蛍光試薬には、オートファゴソームに選択的に集積することが知られるカチオン性の蛍光試薬の Cyto-ID [17] 及びリソソーム親和性色素である MDC [18] を用いた。Cyto-ID の蛍光強度の変化を共焦点顕微鏡により調べた結果、100 μM のイダゾキサンを 16 時間及び 100 nM のラパマイシンを 4 時間処理した条件で、Cyto-ID 蛍光強度の増加が観察された (図 4-A)。その増加は、2 $\mu\text{g/mL}$ のペプスタチン A と 10 $\mu\text{g/mL}$ の E-64d を 100 μM のイダゾキサンと 24 時間併用した条件で、更に顕著に認められた (図 4-B)。フローサイトメトリの結果からも、100 μM のイダゾキサンを 16 時間処理した条件で、高い蛍光強度を示す細胞数の増加が認められた (図 5-A、B)。また、1 mM のイダゾキサンを 3 時間及び 1 μM のラパマイシンを 30 分間処理した条件で MDC の蛍光強度を測定した結果、いずれも MDC の蛍光強度の増加が認められた (図 5-C)。これらの結果は LC3-II の結果より得られた推察を支持するものであり、イダゾキサンがオートファゴソームを増加させるのは確かな現象であると判断した。

次に、イダゾキサンによるオートファゴソームの増加が、分解阻害による増加ではなく誘導による増加であることを示すため、誘導された LC3-II の量を調べることにした。誘導された LC3-II の量は、誘導剤と分解阻害剤を併用した条件で増加した LC3-II の存在量と分解阻害剤のみを処理した条件で増加した LC3-II の存在量の差で見ることが出来る。従って、イダゾキサンと分解阻害剤を併用したときの LC3-II の存在量が、分解阻害剤のみを処理したときの LC3-II の存在量より多ければイダゾキサンはオートファゴソームを誘導したことが示唆され、LC3-II の存在量に差がなければ分解を阻害したことが示唆される (図 6)。そこで、併用する分解阻害剤には、オートファゴソームとリソソームの融合を阻害するバフィロマイシン A₁ [19]、さらにリソソームの加水分解酵素を阻害するペプスタチン A、E-64d と、分解阻害のメカニズムが異なる阻害薬を選択し、イダゾキサンと併用した条件での LC3-II の存在量を調べた。その結果、バフィ

ロマイシン A₁ の濃度が 12.5、25、50 nM いずれの濃度であっても、バフィロマイシン A₁ 処理のみと比較して、100 μ M のイダゾキサンと併用することにより LC3-II が増加した (図 7-A)。また、ペプスタチン A と E-64d により分解を阻害した条件でも、イダゾキサンとの併用により更なる LC3-II の増加が認められた (図 7-B)。分解阻害剤を併用した条件でも LC3-II が増加したことから、イダゾキサンは誘導により LC3-II を増加したことが示された。従って、イダゾキサンはオートファゴソームを誘導により増加したと推察される。

しかし、誘導された LC3-II の量を調べるための実験条件として、薬剤処理により細胞内での LC3-II の分解が完全に飽和していること、また、LC3-II の検出が、実験手法による検出限界に達していないことを確認する必要がある。そこで、今回用いたバフィロマイシン A₁ の処理条件について、既知のオートファジー誘導剤及び分解阻害剤を併用することにより実験条件が十分であったかを判断することにした。まず、バフィロマイシン A₁ の作用は、12.5 nM 以上の濃度で濃度依存的な LC3-II の増加を認められないことから、25 nM で飽和に達していることが示された (図 7-A)。そこで、25 nM のバフィロマイシン A₁ を 4 時間処理した条件で、オートファジー誘導剤であるラパマイシン、オートファゴソームとリソソームの融合を阻害するビンブラスチン [20] 並びに、リソソーム内の加水分解酵素を阻害するペプスタチン A と E-64d を併用し、LC3-II の変化を調べた。その結果、100 nM のラパマイシンを 25 nM のバフィロマイシン A₁ と併用した条件では LC3-II の増加が認められた (図 7-C)。一方、25、50、100 μ M のビンブラスチンを処理した条件では、ビンブラスチンのみでの LC3-II の増加が認められたが、バフィロマイシン A₁ と併用した条件ではいずれの濃度でも認められなかった (図 7-D)。同様に、ペプスタチン A と E-64d をバフィロマイシン A₁ と併用した条件でも、ペプスタチン A と E-64d がいずれの濃度でも LC3-II の増加は認められなかった (図 7-E)。誘導剤であるラパマイシンと併用したとき、更なる LC3-II の増加を検出で

きたことから、今回用いた実験手法について LC3-II の検出限界には達していないと判断した。また、ビンブラスチン及びペプスタチン A と E-64d を併用した条件では、LC3-II の更なる増加は認められず、バフィロマイシン A₁ 処理により LC3-II の分解は十分に飽和に達していると判断した。従って、今回用いたバフィロマイシン A₁ の処理条件は、誘導された LC3-II の量を調べるうえでの実験条件を満たしていると判断した。

1-3-2 イミダゾリン誘導体によるオートファジーの誘導

オートファジー誘導作用がイミダゾリン誘導体に共通の現象なのかを検証するため、クロニジン、リルメニジン、エファロキサン、デクスメデトミジン、2-BFI といった複数のイミダゾリン誘導体 (図 8) を用いて、イダゾキサランと同様に RAW264.7 細胞で誘導された LC3-II の量を調べた。まず、1 mM のエファロキサン及び 1 mM のクロニジンにより LC3-II が増加し、その増加は 25 nM のバフィロマイシン A₁ と併用した条件でも認められた (図 9-A、B)。2-BFI も 0.1、0.5、1 mM と処理濃度を増加させるに伴って LC3-II が増加し、バフィロマイシン A₁ 併用下でも、濃度依存的な LC3-II の増加が認められた (図 9-C)。一方、0.42 mM のリルメニジンを処理した条件では、リルメニジン処理のみによる LC3-II の増加は認められたが、バフィロマイシン A₁ と併用した条件では、更なる LC3-II の増加は認められなかった (図 9-D)。0.1、0.3、0.5 mM のデクスメデトミジンを処理した条件でも、デクスメデトミジン処理のみによる濃度依存的な LC3-II の増加が認められたが、バフィロマイシン A₁ と併用した条件ではいずれの濃度でも LC3-II の増加は認められなかった (図 9-E)。

次に、分解阻害剤としてペプスタチン A と E-64d を併用した条件では、選択したイミダゾリン誘導体のうち、エファロキサン、クロニジン、及び 2-BFI が 0.1、0.5、1 mM と処理濃度の増加に伴い LC3-II を増加させ、その増加は 2 µg/mL のペプスタチン A と 10 µg/mL の E-64d を併用した条件でも認められた (図 10-A、B、C)。一方、リルメニ

ジンでは、0.3、0.42 mM の濃度において、リルメニジン処理による LC3-II の増加が認められたが、ペプスタチン A と E-64d を併用した条件では認められなかった (図 10-D)。同様に、デクスメデトミジンでも、0.1、0.3、0.5 mM の濃度において、デクスメデトミジン処理のみによる LC3-II の増加が認められたが、ペプスタチン A と E-64d を併用した条件では認められなかった (図 10-E)。これらの結果から RAW264.7 細胞において、イダゾキサン以外にエファロキサン、クロニジン、2-BFI がオートファジーを誘導することが示された。一方、リルメニジンとデクスメデトミジンではバフィロマイシン A₁ 併用下での LC3-II の増加は認められず、オートファジーの誘導作用はイダゾキサンを含む一部のイミダゾリン誘導体に認められた。

1-4 考察

イダゾキサンがオートファジーを誘導するのかを検証したところ、LC3-II、Cyto-ID 並びに MDC の結果よりイダゾキサンはオートファゴソームを増加させることが示された。そして、イダゾキサンによる LC3-II 存在量の増加は誘導によるものであったことから、イダゾキサンは RAW264.7 細胞においてオートファジーを誘導したことが立証された。また、イミダゾリン誘導体がオートファジーを誘導するのかどうかを調べた結果、イダゾキサン以外にエファロキサン、クロニジン、2-BFI がオートファジーを誘導することが示された。一方、リルメニジンとデクスメドミジンではその作用は認められなかったことから、オートファジーの誘導作用は全てのイミダゾリン誘導体に共通の現象ではなく、イダゾキサンを含む一部のイミダゾリン誘導体にみられる現象であることが示された。

ところで、実験に用いたイミダゾリン誘導体は、イミダゾリン受容体のサブタイプに対する親和性が異なる。多くのイミダゾリン誘導体はイミダゾリン受容体に結合するが、イミダゾリン受容体は I₁、I₂、I₃ の 3 つのサブタイプを持ち、それぞれ細胞内での局在や生体内での機能が異なっている [13]。そして、イミダゾリン誘導体の立体構造の違いにより I₁、I₂ 受容体への親和性に差がある。I₁ 受容体は細胞膜上に存在し、ホスファチジルコリン感受性ホスホリパーゼ C (PC-PLC) の活性化作用やアデニル酸シクラーゼ (AC) の阻害作用、その他 c-Jun N-terminal kinase (JNK) の活性化作用を持つ [21] [22]。I₁ 受容体への作用は PC-PLC の活性化と AC の阻害作用で区別されており、クロニジンやリルメニジンは I₁ 受容体アゴニストとして、イダゾキサンは I₁ 受容体アンタゴニストとして作用する。一方、イダゾキサンは I₁ 受容体よりも I₂ 受容体に親和性が高い [14]。I₂ 受容体はミトコンドリアの monoamine oxidase (MAO) 上に存在し、アロステリック部位でイミダゾリン誘導体と結合することにより MAO の活性を抑制する [23]。よって、MAO への作用については I₁ 受容体のようにアゴニスト、アンタゴ

ニスト活性の区別がされていない。また、 I_2 受容体は MAO の阻害以外にも複数の作用が報告されており、その機能の全貌については明らかとなっておらず、本研究では I_2 受容体へ親和性を持つイダゾキサンや 2-BFI は潜在的な I_2 受容体アゴニストとした (図 8) [24] [25]。

そして、クロニジンやリルメニジンはイミダゾリン受容体のサブタイプのうち I_1 受容体を介してオートファジーを誘導することが報告されている [6]。しかし、本研究の結果では、オートファジーの誘導作用は RAW264.7 細胞において、クロニジンでは確認できたがリルメニジンでは確認できなかった。Williams らにより報告 [6] されているクロニジンとリルメニジンによるオートファジー誘導作用は、神経細胞のモデル細胞であるラットの副腎髄質由来クロム親和性細胞腫 PC12 細胞とヒト神経芽細胞腫 SK-N-SH 細胞において確認されている。クロニジンとリルメニジンは I_1 受容体と α_2 -アドレナリン受容体に親和性を持つが、SK-N-SH 細胞は I_1 受容体と α_2 -アドレナリン受容体を発現しているのに対し、PC12 細胞は α_2 -アドレナリン受容体を発現していないことから、著者らはオートファジーの誘導作用に I_1 受容体が関与するのではないかと考えている。しかし、今回実験に用いた RAW264.7 細胞についてはイミダゾリン受容体の発現がないことを示唆する報告がある [26]。また、同じ I_1 受容体アゴニストであるデクスメトミジンでもオートファジーの誘導作用が認められなかった。一方で、オートファジー誘導作用が認められた 2-BFI は I_1 受容体よりも I_2 受容体に高い親和性をもつ。また、イダゾキサンも I_1 受容体にはアンタゴニスト活性を持ち、 I_1 受容体よりも I_2 受容体に高い親和性をもつ [14] ことから、RAW264.7 細胞におけるオートファジーの誘導作用は神経系の細胞とは異なり I_1 受容体を介さない可能性があった。また、オートファジー誘導作用は I_2 受容体に選択性の高い 2-BFI だけでなく、 I_1 受容体に選択性の高いエファロキサンにも認められた。エファロキサンの I_2 受容体への親和性は 2-BFI と比較して 10,000 倍以上差があるにもかかわらず、2-BFI と同様にオートファジーの誘

導作用が認められたことから、オートファジーの誘導作用に対する I_2 受容体の関与も少ないと推察される。よって、イミダゾリン受容体とオートファジー誘導作用に関連は認められず、RAW264.7 細胞におけるオートファジーの誘導にイミダゾリン受容体が関与しない可能性が考えられた。しかし、クロニジンのオートファジー誘導作用は認められており、イミダゾリン誘導体間でオートファジー誘導メカニズムが異なる可能性もあった。そこで、イダゾキサンのによるオートファジー誘導メカニズムについて、詳しく調べることにした。

第2章 オートファジー誘導メカニズムの解析

2-1 研究目的

第1章では一部のイミダゾリン誘導体が RAW264.7 細胞でオートファジーを誘導することを示したが、当該細胞でのオートファジー誘導にイミダゾリン受容体が関与しない可能性が示された。そこで、イダゾキサンのによるオートファジーの誘導に関わる分子について検証を行うことにした (図 11)。

まず、既知のオートファジー誘導剤のように、イダゾキサンがオートファジーを調節する分子に働きかけ、オートファジーを誘導した可能性を考えた。そして、オートファジーの誘導に関連する分子として mTOR に注目した。mTOR はセリン・スレオニンキナーゼのひとつで、富栄養時には p70 S6 キナーゼなどの下流シグナルのリン酸化を介してタンパク質合成や細胞増殖などを促進する。また、飢餓時にはオートファジーを誘導するなど、mTOR は同化、異化などの代謝反応を調節する。通常時、オートファジーは mTOR により抑制されているが、ラパマイシンなどの mTOR 阻害剤により抑制が解除されることで、オートファジーが誘導される [27]。そこで、イダゾキサンもラパマイシンと同様に mTOR の活性を阻害するのかを調べた。

また、オートファジーの誘導に関連する分子として I₁ 受容体にも注目した。前章でも述べたように、クロニジンやリルメニジンが I₁ 受容体を介してオートファジーを誘導することが報告されている。一方、本研究結果からは、RAW264.7 細胞におけるオートファジー誘導に I₁ 受容体が関与しない可能性が示され、Feinstein らの報告 [12] では RAW264.7 細胞にイミダゾリン受容体が発現していないことも示されており、イミダゾリン誘導体が RAW264.7 細胞でイミダゾリン受容体に作用するのかも不明である。しかし、クロニジンのオートファジー誘導作用は認められており、イミダゾリン誘導体間でオートファジー誘導メカニズムが異なる可能性もある。そこで、イダゾキサンとクロ

ニジンが RAW264.7 細胞において I_L 受容体に作用するのかを検証することにした。

次に、イダゾキサンがオートファジーの基質となる分子に作用して、オートファジーを誘起した可能性を考えた。まず、イダゾキサンは前章で明らかにしたオートファジー誘導作用以外に、抗炎症作用を持つことがわかっている。炎症応答とオートファジーについて、オートファジーがサイトカインの一つである $IL-1\beta$ の前駆体を分解するほか、抗酸化タンパク質の発現に関わるシグナル分子 p62 を分解するなど、炎症応答に関与する分子がオートファジーの基質となることが報告されている。これらの知見より、イダゾキサンはこのような分子に作用することで、オートファジーを誘起すると共に抗炎症作用も示したのではないかと仮説をたてた。そこで、イダゾキサンが作用する分子が、 $IL-1\beta$ の前駆体のように炎症物質なのか若しくは p62 のように炎症応答に関わるシグナル分子なのか、イダゾキサンの抗炎症作用について解析を行った。そして、その結果をうけてイダゾキサンが作用する分子として、抗炎症反応に関わりかつオートファジーの基質としても知られる p62 に注目した。p62 は Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1)-nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) シグナルに関与する分子である。細胞がストレスにさらされた時、転写因子である Nrf2 が活性化され、p62 の発現が増加する [28]。増加した p62 は Nrf2 を抑制する因子 Keap1 と結合することで、Nrf2 の活性化を促進するといった正の制御ループが働いている [29] [30]。そして、活性化した Nrf2 は p62 のほかに NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 (NQO-1) や heme oxygenase 1 (HO-1) といった抗酸化タンパク質の産生を促進することによりストレスに対処する。また、p62 はユビキチン化されたタンパク質とも結合して、自己凝集する。その後、自己凝集した p62 はオートファゴソームの膜タンパク質である LC3 と相互作用することで、オートファジーにより選択的に分解される (図 12) [31]。そこで、イダゾキサンがどのように p62 に作用するのかを調べた。

2-2 実験材料と方法

2-2-1 試薬

抗 p70 S6 キナーゼ抗体及び抗リン酸化 p70 S6 キナーゼ (Ser371) 抗体は Cell signaling Technology (Danvers, Massachusetts) から購入した。抗 JNK (C-17) 抗体、抗リン酸化 JNK (G-7) 抗体は Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas) から購入した。アニソマイシン (anisomycin)、phosphatase inhibitor cocktail、10 × Tris-borate-EDTA (TBE)、 H_3PO_4 はナカライテスク (京都) から購入した。Protease inhibitor cocktail は F.Hoffman-La Roche (Basel) から購入した。Sulfanilamide、N-(1-naphthyl) ethylenediamine は Sigma-Aldrich (St.Louis, Missouri) から購入した。抗マウス tumor necrosis factor- α (TNF- α) モノクローナル抗体、マウス TNF- α 組換えタンパク質、ビオチン化抗 TNF- α モノクローナル抗体は Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts) で購入した。VECTASTAIN ABC kit、TMB Peroxidase Substrate Kit は VECTOR LABORATORIES (Burlingame, California) から購入した。Salmon DNA は富士フイルム和光純薬 (大阪) から購入した。抗 p62 抗体 (PM045) は医学生物学研究所 (名古屋) から購入した。その他の試薬類は市販の試薬特級品を用いた。

2-2-2 タンパク質調製

1) p70 S6 キナーゼ及びリン酸化 p70 S6 キナーゼ検出用のタンパク質溶解液の調製

1-2-3 と同様の操作を行った。

2) JNK およびリン酸化 JNK 検出用のタンパク質溶解液の調製

薬剤処理後に培養上清を取り除き、細胞を 4 °C に冷却した 138 mM NaCl を含む 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) で洗浄した。その後、プレートに RIPA 細胞溶解液 {50 mM Tris-

HCl (pH 7.5)、1 % NP-40、0.25 % sodium deoxycholate、150 mM NaCl、1 mM EDTA、protease inhibitor cocktail (cOmplete Mini)、phosphatase inhibitor cocktail} を約 300 μ L 加え、氷上で 15 分間静置後にチューブへ回収し、さらに 60 分間溶解させた。その後 10,000 $\times g$ 、4 $^{\circ}$ C で 10 分間遠心分離し、回収した上清をサンプルとした。

3) p62 検出用のタンパク質溶解液の調製

細胞の回収操作は 1-2-3 と同様に行った。

回収した細胞は 200 $\times g$ 、4 $^{\circ}$ C で 10 分間遠心分離することで、ペレット状にした。ペレット状にした細胞を約 1 mL の PBS で再懸濁し、一部を分取した。分取した懸濁液を branson sonifier model S-150 を用いて 10 秒間 \times 3 回、超音波破碎したものを全細胞画分とした。残りの細胞懸濁液は、再び 200 $\times g$ 、4 $^{\circ}$ C で 10 分間遠心分離し、PBS を取り除いた。その後、可溶性画分抽出液 (1 % Triton X-100、protease inhibitor cocktail、PBS) を約 800 μ L 加え 4 $^{\circ}$ C で 30 分間、回転させながら溶解した。その後、15,000 $\times g$ 、4 $^{\circ}$ C で 30 分間遠心分離した。遠心後の上清を可溶性画分として回収した。沈査は、洗浄液 (1 % Triton X-100、PBS) で 4 回洗浄し、不溶性画分抽出液 (1 % Triton X-100、1 % SDS、protease inhibitor cocktail、PBS) を約 150 μ L 加えた。その後、沈査を branson sonifier model S-150 を用いて 10 秒間 \times 3 回、超音波破碎し、60 $^{\circ}$ C で 1 時間溶解させた。再び 15,000 $\times g$ 、4 $^{\circ}$ C で 30 分間遠心分離し、上清を不溶性画分として回収した。

2-2-3 SDS-PAGE 法及びウェスタンブロット法

1) p70 S6 キナーゼ及びリン酸化 p70 S6 キナーゼの検出

調製した試料溶液に還元剤を含む試料緩衝液を加え、98 $^{\circ}$ C、5 分間の加熱、還元処理を行った。還元処理を行った試料溶液は 10 % アクリルアミドゲルを用いて、泳動用緩

衝液内で電圧 50 V で 30 分間、電圧 100 V で約 90 分間泳動することにより分離した。分離したタンパク質は、転写用緩衝液内でニトロセルロース膜に電圧 100 V、75 分間転写した。転写膜は、5 % スキムミルク/Tris buffered saline (TBS)-T (0.1 % Tween-20、TBS) 中に、4 °C で一晩静置しブロッキングを行った。その後、TBS-T で洗浄し、5 % BSA/TBS-T で 1,000 倍希釈した抗 p70 S6 キナーゼ抗体、若しくは抗リン酸化 p70 S6 キナーゼ (Ser371) 抗体を室温で 4 時間振盪しながら一次抗体反応を行った。一次抗体を反応させた後、余分な抗体を TBS-T により洗浄し、5 % スキムミルク/TBS-T で 2,500 倍希釈した HRP 結合抗マウス IgG 抗体を室温で 1 時間振盪させ二次抗体反応を行った。反応後、再び転写膜を TBS-T で洗浄し、化学発光法により LAS-3000 mini を使用して検出した。

2) JNK の検出

調製した試料溶液に還元剤を含む試料緩衝液を加え、100 °C、5 分間の加熱、還元処理を行った。還元処理を行った試料溶液は、2-2-3 1) と同様に分離、転写した。転写膜は、10 % スキムミルク/TBS 中に、4 °C で一晩静置し、ブロッキングを行った。その後、TBS-T (0.1 % Tween-20、TBS) で洗浄し、1 % スキムミルク/TBS で 250 倍希釈した抗 JNK (C-17) 抗体を室温で 1 時間振盪しながら一次抗体反応を行った。一次抗体を反応させた後、余分な抗体を TBS-T により洗浄し、1 % スキムミルク/TBS で 2,500 倍希釈した HRP 結合抗ヤギ IgG 抗体を室温で 1 時間振盪させ二次抗体反応を行った。検出操作も 2-2-3 1) と同様に行った。

3) リン酸化 JNK の検出

転写までの操作は、2-2-3 2) と同様に行った。
転写膜は、3 % BSA/TBS 中に、4 °C で一晩静置し、ブロッキングを行った。その後、

TBS-T (0.1 % Tween-20、TBS) により洗浄し、3 % BSA/TBS-T で 1,000 倍希釈した抗リン酸化 JNK (G-7) 抗体を室温で 1 時間振盪しながら一次抗体反応を行った。一次抗体を反応させた後、余分な抗体を TBS-T により洗浄し、3 % BSA/TBS-T で 10,000 倍希釈した HRP 結合抗マウス IgG 抗体を室温で 1 時間振盪させ二次抗体反応を行った。検出操作は 2-2-3 1) と同様に行った。

4) p62 の検出

泳動までの操作は、1-2-4 と同様に行った。

10 % アクリルアミドゲルで分離したタンパク質は、転写用緩衝液内で polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜に電圧 100 V、60 分間転写した。転写膜は、10 % スキムミルク/PBS 中に、4 °C で一晩静置し、ブロッキングを行った。その後、PBS-T (0.05 % Tween-20、PBS) で洗浄し、1 % スキムミルク/PBS で 1,000 倍希釈した抗 p62 抗体 (PM045) を室温で 1 時間振盪しながら一次抗体反応を行った。一次抗体を反応させた後、余分な抗体を PBS-T により洗浄し、1 % スキムミルク/PBS で 5,000 倍希釈した HRP 結合抗ラビット IgG 抗体を室温で 1 時間振盪させ二次抗体反応を行った。反応後、再び転写膜を PBS-T で洗浄し、化学発光法により Amersham Imager 600 (GE ヘルスケア・ジャパン、東京) を使用して検出した。

2-2-4 NO 定量

細胞に薬剤を処理した後、培養上清をサンプルとして回収した。その後、培養上清と等量の Griess 試薬 (1 % sulfanilamide、0.1 % N-(1-naphthyl)ethylenediamine、2.5 % H_3PO_4) を加え、室温で 10 分間静置した。その後、BioSpec-mini (島津理化、東京) を用いて波長 550 nm の吸光度を測定した。検量線作製の標準溶液には、DMEM を溶媒に NaNO_2 溶液を二倍段階希釈したものをを用いた。

2-2-5 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法

細胞に薬剤を処理した後、培養上清をサンプルとして回収した。捕捉抗体として抗マウス TNF- α モノクローナル抗体を5 $\mu\text{g/mL}$ になるよう PBS で希釈し、96 ウェルプレート (Immulon® 2 HB、Thermo Fisher Scientific) に入れ、4 $^{\circ}\text{C}$ で一晩静置した。その後、余分な捕捉抗体を除去し、3 % BSA/PBS を入れ室温で 2 時間静置することでブロッキングを行った。その後、ブロッキング液を除去し、プレートを PBS-T (0.1 % Tween-20、PBS) で洗浄した。洗浄後、検量線の標準溶液として 1 % BSA/PBS を溶媒に、マウス TNF- α 組み換えタンパク質を 2 倍段階希釈したものと、回収したサンプルをそれぞれ別のウェルに入れた。そこに、検出抗体として 1 % BSA/PBS で 0.25 $\mu\text{g/mL}$ になるよう希釈したビオチン化抗 TNF- α モノクローナル抗体を入れて、室温で 3 時間振盪した。その後、HRP で標識されたアビジン (VECTASTAIN ABC kit) を加え 37 $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間反応させた。培養後、HRP の基質となる 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) (TMB Peroxidase Substrate Kit) を入れ、発色を確認した後、1 N の硫酸溶液を処理して反応を停止させた。その後、マイクロプレートリーダー (Model 680、BIO-RAD) を用いて波長 450 nm での吸光度を測定した。

2-2-6 核タンパク質抽出

培養上清を取り除いた後、細胞を 4 $^{\circ}\text{C}$ に冷却した PBS で洗浄した。洗浄した細胞は、スクレーピングにより PBS 中に回収し、100 $\times g$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ で 10 分間遠心分離することでペレット状にした。遠心後、上清を取り除き、細胞溶解液 {10 mM HEPES-NaOH (pH 7.9)、10 mM KCl、0.1 mM EDTA、0.1 mM EGTA、1 mM dithiothreitol (DTT)、0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)} を 200 μL 加えてペレットを懸濁し、15 分間静置した。その後、NP-40 を 0.6 % になるよう懸濁液に加え 10 秒間攪拌した。攪拌後、20,400 $\times g$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ で 1 分間遠心分離し、上清を取り除いた。残った沈査は核タン

パク質抽出液 {20 mM HEPES-NaOH (pH 7.9)、0.4 mM NaOH、1 mM EDTA、1 mM EGTA、0.5 mM DTT、0.1 mM PMSF} を 40 μ L 加え、4 $^{\circ}$ C で 15 分間攪拌振盪した。その後、再び 20,400 $\times g$ 、4 $^{\circ}$ C で 5 分間遠心分離し上清を核タンパク質として回収した。

2-2-7 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) 法

1) Nuclear factor-kappa B (NF- κ B) の検出

回収した核抽出タンパク質を、1 mM DTT 及び 50 mM NaCl を含む 5 mM Tris-HCl (pH 8.0) で希釈した。その後、poly(deoxyinosinic-deoxycytidylic) {poly(dI-dC)} を 0.75 μ g、salmon DNA を 4 μ g 加え、室温で 20 分間反応させた。その後、反応緩衝液 {5 mM Tris-HCl (pH 8.0)、50 mM NaCl、0.05 % NP-40、1 mM MgCl₂、0.5 mM DTT、5 % glycerol、0.25 mM EDTA、40 ng/mL BSA、0.1 μ M オリゴ DNA} を 5.8 μ L 加えて混和後、遮光下、室温で 30 分間反応させた。NF- κ B オリゴ DNA は 6'-carboxyfluorescein (6'-FAM) で標識し、配列を 5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3'とした。その後、5 % Tris-borate-EDTA (TBE) ゲルを用いて、オリゴ DNA と反応させた核タンパク質 9 μ g を、泳動用緩衝液 {0.25 \times TBE (pH 8.3)、H₂O} 内で電圧 150 V、4 $^{\circ}$ C で 50 分間泳動した。その後、標識された DNA は FLA-5100 を用いて検出した (励起波長 473 nm、蛍光波長 510 nm)。

2) Activator protein-1 (AP-1) の検出

回収した核抽出タンパク質を、1 mM DTT 及び 50 mM NaCl を含む 5 mM Tris-HCl (pH 8.0) で希釈した。その後、poly(dI-dC)を 4.2 μ g 加え、室温で 20 分間反応させた。その後、反応緩衝液 {5 mM Tris-HCl (pH 8.0)、50 mM NaCl、0.05 % NP-40、1 mM MgCl₂、0.5 mM DTT、5 % glycerol、0.25 mM EDTA、40 ng/mL BSA、1 μ M オリゴ

DNA} を 5.8 μ L 加えて混和後、遮光下、室温で 30 分間反応させた。NF- κ B オリゴ DNA は 6'-FAM で標識し、配列を 5'-CGCTTGATGACTCAGCCGGAA-3'とした。その後、5 % TBE ゲルを用いて、オリゴ DNA と反応させた核タンパク質 9 μ g を、泳動用緩衝液 {0.25 \times TBE (pH 8.3)、H₂O} 内で電圧 150 V、4 $^{\circ}$ C で 50 分間泳動した。その後、標識された DNA は FLA-5100 を用いて検出した (励起波長 473 nm、蛍光波長 510 nm)。

2-3 結果

2-3-1 イダゾキサンによる mTOR 及び I₁ 受容体への作用

イダゾキサンがラパマイシンと同様に mTOR の活性を阻害することでオートファジーを誘導するののかについて、mTOR の下流シグナルである p70 S6 キナーゼのリン酸化を指標 [32] に調べた (図 11)。その結果、100 nM のラパマイシンを 24 時間処理した条件ではリン酸化 p70 S6 キナーゼが減少したが、100 μ M のイダゾキサンを 24 時間処理した条件で減少は認められなかった。一方、リン酸化していない p70 S6 キナーゼに、薬剤処理による変化は認められなかった (図 13)。従って、イダゾキサンは p70 S6 キナーゼのリン酸化を抑制せず、mTOR を阻害しないことが示された。

次に、イダゾキサン及びクロニジンが I₁ 受容体を介してオートファジーを誘導するの点について、下流シグナルである JNK のリン酸化を指標 [21] に調べた (図 11)。その結果、陽性対照として用いたアニソマイシンを 25 ng/mL で 0.5 時間処理した細胞ではリン酸化 JNK が検出された。一方、100 μ M のイダゾキサンを処理した条件では、0.5 から 2 時間のいずれの処理時間でもリン酸化 JNK は検出されなかった (図 14-A)。また、1 mM のクロニジンを処理した条件でも同様に、いずれの処理時間においてもリン酸化 JNK は認められなかった (図 14-B)。リン酸化していない JNK も、薬剤処理による変化は認められなかった (図 14-A、B)。従って、イダゾキサンやクロニジンは JNK を活性化せず、RAW264.7 細胞では I₁ 受容体に作用しない可能性が示された。

2-3-2 イダゾキサンによる p62 への作用

イダゾキサンはオートファジーの基質となる分子に働きかけてオートファジーを誘起したのではないかという仮説を検証するにあたり、基質となる分子が炎症物質又はシグナル分子なのかを調べるため、イダゾキサンによる抗炎症作用について調べた。まず、

イダゾキサンが RAW264.7 細胞において、LPS 刺激による NO 産生を抑制するのかどうかを確認した結果、100 μ M のイダゾキサンを 24 時間処理した条件で、LPS による NO 産生量は危険率 1 % で有意に減少した (図 15-A)。次に、サイトカインである TNF- α の分泌を調べた結果、LPS 刺激による TNF- α の分泌も、100 μ M のイダゾキサンを 12 時間処理した条件で、危険率 1 % で有意に減少した (図 15-B)。また、NO 産生量及び TNF- α の分泌量の低下が、シグナル分子の抑制に伴うのかどうかを検証するため、炎症物質の産生に関わる転写因子 NF- κ B 及び AP-1 の活性化が抑制されるのかを調べた。転写因子の活性化の指標として転写因子の DNA 結合量の変化を、EMSA 法により調べた。その結果、100 μ M のイダゾキサン処理により、10 ng/mL の LPS を刺激した時の NF- κ B の DNA 結合量は減少した (図 16-A)。同様に、100 μ M のイダゾキサンを 100 ng/mL の LPS と 1 時間処理した条件でも、AP-1 の DNA 結合量の減少が認められた (図 16-B)。よって、イダゾキサンによる NO 産生及び TNF- α 分泌量の低下は NF- κ B や AP-1 などの転写因子の活性化抑制に伴うものであり、イダゾキサンはシグナル分子に作用する可能性が示された。

イダゾキサンが炎症応答に関わるシグナル分子に作用する可能性があることから、オートファジーによる分解の基質として p62 に注目した。そして、イダゾキサンが p62 を誘導することでオートファジーを誘起したという仮説通り、p62 が誘導されることで増加し、オートファジーにより分解され減少するのかどうか、イダゾキサンを処理した後の p62 存在量の変化を経時的に調べることで検証した。また、オートファジーによる p62 の分解について、比較対照にオートファジー誘導剤であるラパマイシンを処理した条件でも調べた。その結果、100 nM のラパマイシン及び 100 μ M のイダゾキサンをそれぞれ 4 時間処理した条件では、薬剤未処理と比較して、p62 に変化はなかった (図 17-A)。その後、ラパマイシンを処理した条件では 8、12、24、36、48 時間といずれの処理時間でも p62 の低下が認められた (図 17-B~F)。一方、イダゾキサンでは 8、12 時

間処理において経時的に p62 が増加した (図 17-B、C)。しかし、24 時間処理では薬剤未処理と同程度にまで減少し (図 17-D)、36、48 時間処理ではラパマイシンよりも更なる減少が認められた (図 17-E、F)。よって、イダゾキサンにより、p62 は一時的に増加しその後、減少することが示された。また、p62 の減少は、ラパマイシンと同様に薬剤未処理よりも減少したことから、イダゾキサンにより p62 の分解が促進されたことが示された。

さらに、イダゾキサンが誘導により p62 を増加させたことを検証するため、増加した p62 の状態を調べることにした。p62 は誘導されたときには凝集していない状態で存在するが、分解を受ける前には他のタンパク質を巻き込みながら自己凝集した状態で存在する。従って、イダゾキサンにより凝集していない状態の p62 が増加すれば、誘導により増加したことが示唆される。一方、凝集した状態の p62 が増加すれば、分解阻害により蓄積したことが示唆される。また、凝集していない p62 は界面活性剤の Triton X-100 に可溶性なのに対し、凝集した p62 は Triton X-100 に不溶化するため、その性質を利用して両者を区別することが出来る [33] [34]。そこで、イダゾキサンを処理した細胞のタンパク質を Triton X-100 を用いて分画し、それぞれの画分での p62 存在量を調べることで検証した。

その結果、100 nM のバフィロマイシン A₁ を 1 時間、100 μ M のイダゾキサンを 8 時間処理した条件では、薬剤未処理と比較して、全細胞画分及び可溶性画分での p62 が増加した。不溶性画分においても、イダゾキサン及びバフィロマイシン A₁ 処理による p62 の増加は認められたが、可溶性画分とは異なりバフィロマイシン A₁ の方がイダゾキサンよりも多く増加した (図 18-A)。また、100 nM のバフィロマイシン A₁ を 3 時間、100 μ M のイダゾキサンを 24 時間処理した条件では、全細胞画分において、イダゾキサン処理により p62 に変化はなく、バフィロマイシン A₁ 処理では p62 の増加が認められた。可溶性画分においては、イダゾキサン、バフィロマイシン A₁ 処理による変化は

認められなかった。一方、不溶性画分では、イダゾキサン処理では変化はなかったが、バフィロマイシン A₁ 処理では顕著な p62 の増加が認められた (図 18-B)。可溶性画分と不溶性画分において、薬剤間で p62 の変化を比較した場合、イダゾキサンは可溶性画分で p62 を増加させ、バフィロマイシン A₁ は不溶性画分で増加させた。この結果から、バフィロマイシン A₁ による p62 の増加は不溶性画分での p62 の増加によるものであり、凝集した p62 が増加したことが示された。一方、イダゾキサン処理による p62 の増加は、可溶性画分での p62 の増加によるものであり、凝集していない p62 が増加したことが示された。イダゾキサンが凝集していない状態の p62 を増加させたことから、イダゾキサンが p62 の発現を誘導したことが示された。

2-4 考察

第 1 章では一部のイミダゾリン誘導体が RAW264.7 細胞においてオートファジーを誘導することが示されたが、誘導作用にはイミダゾリン受容体が関与しない可能性が示された。そこで、第 2 章ではイダゾキサンのによるオートファジーの誘導に関与する分子について調べた。

まず、他のオートファジー誘導剤と同様に、イダゾキサンが誘導に関与する分子に作用することでオートファジーを誘導した可能性について考え、誘導に関与する分子として mTOR と I₁ 受容体に注目し検証を行った。その結果、mTOR や I₁ 受容体の下流シグナルにイダゾキサンが作用しなかったことから、オートファジーの誘導は mTOR と I₁ 受容体を介さないことが推察された。よって、RAW264.7 細胞でのイミダゾリン誘導体によるオートファジー誘導メカニズムは、既知のオートファジー誘導剤であるラパマイシンやクロニジンと異なることが推察される。

次に、イダゾキサンはオートファジーの分解の基質となる分子を誘導することで、オートファジーを誘起したのではないかという仮説について検証を行った。まず、分解の基質となる分子が炎症物質若しくは炎症応答に関与するシグナル分子なのか、見当をつけるためにイダゾキサンの抗炎症作用について調べた。その結果、イダゾキサンによる抗炎症作用はシグナル分子の抑制によることが推察された。

そこで、オートファジーの選択的基質で、抗酸化ストレスシグナルに関わる分子である p62 に注目して検証を行った。その結果、イダゾキサンは一時的に p62 を誘導したのち、徐々に減少させることが明らかとなった。これは、イダゾキサンがオートファジーの基質として p62 を誘導し、誘導された p62 がオートファジーにより分解されるという仮説と一致した。イダゾキサンによる p62 の減少がオートファジーの分解によるものかは、本研究での実験結果では示せていない。しかし、第 1 章の結果よりイダゾキサンによるオートファジーの誘導作用が最も認められる処理時間が 16 から 24 時間な

のに対し、p62 の増加が認められる処理時間が 8 から 12 時間で、24 時間以降は薬剤未処理群よりも減少していくことから、その可能性は高いのではないかと推察した。従って、イダゾキサンによるオートファジーの誘導作用は、p62 の誘導に伴う作用である可能性が示された。これまでに p62 の誘導によりオートファジーが誘起されるということ を明らかにした論文はないが、p62 を過剰発現した細胞ではオートファジーによる異常タンパク質などの分解が促進されることが報告されている [35] ことから、その可能性は高いのではないかと考えている。

また、イダゾキサンによる抗炎症作用についても、p62 の誘導が関与する可能性がある。p62 は Keap1-Nrf2 シグナルに関与する分子だが、イダゾキサンが肝細胞において Nrf2 を活性化し、HO-1、NQO-1 など抗酸化ストレスタンパク質の発現を促進することが報告されている [36]。また、オートファジーによる p62 を介した Keap1 の分解は、Nrf2 を活性化し肝臓での酸化ストレスを軽減することも報告されている [37]。従って、イダゾキサンは p62 を誘導することによりオートファジーを誘導したほか、誘導された p62 が Keap1 と結合することで Nrf2 が活性化され、抗炎症作用を示したのではないかと考えられる (図 19)。RAW264.7 細胞でのイダゾキサンによる Nrf2 の活性化については確認できていないが、Nrf2 の活性化により分泌される HO-1、NQO-1 は NF- κ B の活性化や TNF- α の分泌を抑制することも報告されており [28]、本研究で示されたイダゾキサンの抗炎症作用とも一致する。従って、イダゾキサンの抗炎症作用にも p62 が関与する可能性が考えられる。

総括

近年の研究により、オートファジーは飢餓時における栄養素の供給だけでなく、損傷したオルガネラや感染細菌の除去など、細胞に有害な物質を取り除くことで細胞内の恒常性を維持する役割を持つことが新たにわかってきた。さらに、オートファジー欠損による細胞内恒常性の破綻が、パーキンソン病やがんなどさまざまな疾患に関与することが報告されており、オートファジーに働きかける薬剤はこれらの疾病に対する治療薬の標的として注目されている。また、オートファジーが炎症物質の分泌を抑制するなどオートファジーと炎症応答の関係についても複数報告されている。これらの知見から、オートファジー誘導剤は抗炎症薬として利用できる可能性を持ち、抗炎症作用とオートファジー誘導作用を併せ持つ化合物をみつけ、両者の作用メカニズムを解明することで、よりその可能性を提示できるのではないかと考えた。そこで、RAW264.7 細胞にて NO 産生を抑制するといった抗炎症作用を示すイダゾキサンを候補化合物に、オートファジー誘導作用及びその作用メカニズムについて検証を行った。

そして、LC3-II、Cyto-ID 並びに MDC の結果より、イダゾキサンが RAW264.7 細胞にてオートファジーを誘導することを明らかにした。また、イダゾキサン以外の 2-BFI やエファロキサンといった一部のイミダゾリン誘導體も同様にオートファジーを誘導することを示した。しかし、誘導作用が認められたイミダゾリン誘導體は、オートファジー誘導に関わるイミダゾリン I_1 受容体に対する親和性が異なっており、RAW264.7 細胞でのイミダゾリン誘導體によるオートファジーの誘導に I_1 受容体とは異なる分子が関与する可能性が示唆された。さらに、オートファジーの誘導メカニズムについて解析をすすめた結果、イダゾキサンは mTOR や I_1 受容体を介さずにオートファジーを誘導することが推察され、イミダゾリン誘導體によるオートファジー誘導メカニズムは、オートファジー誘導剤として知られる化合物の作用メカニズムと異なることが推察された。

そこで、イダゾキサンによるオートファジーの誘導メカニズムについて、炎症応答とオートファジーの関係性についての知見から、イダゾキサンはオートファジーの基質となる分子を誘導し、オートファジーを誘導したのではないかと仮説をたてた。また、仮説におけるオートファジーの基質となる分子については、イダゾキサンによる抗炎症作用を調べた結果から、p62 に注目し検証を行った。その結果、イダゾキサンは p62 を誘導したのちに減少させることから、イダゾキサンによるオートファジー誘導メカニズムに p62 が関与する可能性が示された。また、イダゾキサンが Nrf2 を活性化するとの報告からイダゾキサンの抗炎症作用にも p62 が関与する可能性も考えられた。しかし、イダゾキサンの作用が p62 を介した作用であることを立証するには、イダゾキサンによる p62 の増加がオートファジーを誘導するのか、また、増加した p62 が Keap1 と結合しオートファジーにより分解されるのかなど、重要な点で確認すべきことが多く残っており、今後さらなる検証が必要である。

本研究より、イダゾキサンを始めとする一部のイミダゾリン誘導体が、マクロファージ様の細胞である RAW264.7 細胞で、mTOR や I₁ 受容体を介さずオートファジーを誘導することを明らかにした。また、イダゾキサンによるオートファジー誘導作用や抗炎症作用に p62 が関与し、これが主要制御因子である可能性が示された。これは、新たに p62 を介したオートファジーの誘導作用及び抗炎症作用を示す化合物の存在を示唆するものであり、今後イダゾキサンの作用メカニズムをより明らかに出来れば、炎症性疾患に対する新たな治療薬の開発につながると考えられる。

謝辞

本論文をまとめるにあたり、終始御懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました同志社女子大学大学院 微生物薬品化学研究室 川崎清史教授に深甚なる感謝の意を表します。学術論文執筆の際にも、御多忙の中にも関わらず、御指導及び御助言を賜りましたことも深く感謝の意を表します。

学位論文審査において、終始有益なる御助言と御校閲を承りました同志社女子大学大学院 生化学研究室 和田戈虹教授及び臨床薬剤学研究室 森田邦彦教授に深く感謝の意を表します。

また、本研究を遂行するにあたり、さまざまな御助言及び御協力を頂きました同志社女子大学大学院 微生物薬品化学研究室 上野貴之助教及び眞鍋貴行助教（現 旭川医科大学病院）に感謝の意を表します。

そして、本研究の実施にあたり、快くご協力及びご支援を下された家族、友人、並びに微生物薬品化学研究室の後輩に心より感謝を申し上げます。

参考文献

1. Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*. 2011;147(4):728-41. Epub 2011/11/15. doi: 10.1016/j.cell.2011.10.026. PubMed PMID: 22078875.
2. Youle RJ, Narendra DP. Mechanisms of mitophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011;12(1):9-14. Epub 2010/12/24. doi: 10.1038/nrm3028. PubMed PMID: 21179058; PubMed Central PMCID: PMC4780047.
3. Nakagawa I, Amano A, Mizushima N, Yamamoto A, Yamaguchi H, Kamimoto T, et al. Autophagy defends cells against invading group A Streptococcus. *Science*. 2004;306(5698):1037-40. Epub 2004/11/06. doi: 10.1126/science.1103966. PubMed PMID: 15528445.
4. Birmingham CL, Smith AC, Bakowski MA, Yoshimori T, Brumell JH. Autophagy controls Salmonella infection in response to damage to the Salmonella-containing vacuole. *J Biol Chem*. 2006;281(16):11374-83. Epub 2006/02/24. doi: 10.1074/jbc.M509157200. PubMed PMID: 16495224.
5. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*. 2008;132(1):27-42. Epub 2008/01/15. doi: 10.1016/j.cell.2007.12.018. PubMed PMID: 18191218; PubMed Central PMCID: PMC2696814.
6. Williams A, Sarkar S, Cuddon P, Ttoli EK, Saiki S, Siddiqi FH, et al. Novel targets for Huntington's disease in an mTOR-independent autophagy pathway. *Nat Chem Biol*. 2008;4(5):295-305. Epub 2008/04/09. doi: 10.1038/nchembio.79. PubMed PMID: 18391949; PubMed Central PMCID: PMC2635566.
7. Jiang P, Mizushima N. Autophagy and human diseases. *Cell Res*. 2014;24(1):69-79. Epub 2013/12/11. doi: 10.1038/cr.2013.161. PubMed PMID: 24323045; PubMed Central PMCID: PMC3879707.
8. Saitoh T, Fujita N, Jang MH, Uematsu S, Yang BG, Satoh T, et al. Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1beta production. *Nature*. 2008;456(7219):264-8. Epub 2008/10/14. doi: 10.1038/nature07383. PubMed PMID: 18849965.
9. Harris J, Hartman M, Roche C, Zeng SG, O'Shea A, Sharp FA, et al. Autophagy controls IL-1beta secretion by targeting pro-IL-1beta for degradation. *J Biol Chem*. 2011;286(11):9587-97. Epub 2011/01/14. doi: 10.1074/jbc.M110.202911. PubMed PMID: 21228274; PubMed Central PMCID: PMC3058966.

10. Tunon MJ, Sanchez-Campos S, Gutierrez B, Culebras JM, Gonzalez-Gallego J. Effects of FK506 and rapamycin on generation of reactive oxygen species, nitric oxide production and nuclear factor kappa B activation in rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol.* 2003;66(3):439-45. Epub 2003/08/09. PubMed PMID: 12907243.
11. Jin HK, Ahn SH, Yoon JW, Park JW, Lee EK, Yoo JS, et al. Rapamycin down-regulates inducible nitric oxide synthase by inducing proteasomal degradation. *Biol Pharm Bull.* 2009;32(6):988-92. Epub 2009/06/02. PubMed PMID: 19483303.
12. Feinstein DL, Reis DJ, Regunathan S. Inhibition of astroglial nitric oxide synthase type 2 expression by idazoxan. *Mol Pharmacol.* 1999;55(2):304-8. Epub 1999/02/03. PubMed PMID: 9927622.
13. Head GA, Mayorov DN. Imidazoline receptors, novel agents and therapeutic potential. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem.* 2006;4(1):17-32. Epub 2006/03/15. PubMed PMID: 16529547.
14. Dardonville C, Rozas I. Imidazoline binding sites and their ligands: an overview of the different chemical structures. *Med Res Rev.* 2004;24(5):639-61. Epub 2004/06/30. doi: 10.1002/med.20007. PubMed PMID: 15224384.
15. Rose C, Menzies FM, Renna M, Acevedo-Arozena A, Corrochano S, Sadiq O, et al. Rilmenidine attenuates toxicity of polyglutamine expansions in a mouse model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet.* 2010;19(11):2144-53. Epub 2010/03/02. doi: 10.1093/hmg/ddq093. PubMed PMID: 20190273; PubMed Central PMCID: PMC2865373.
16. Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* 2000;19(21):5720-8. Epub 2000/11/04. doi: 10.1093/emboj/19.21.5720. PubMed PMID: 11060023; PubMed Central PMCID: PMC2865373.
17. Guo S, Liang Y, Murphy SF, Huang A, Shen H, Kelly DF, et al. A rapid and high content assay that measures cyto-ID-stained autophagic compartments and estimates autophagy flux with potential clinical applications. *Autophagy.* 2015;11(3):560-72. Epub 2015/02/26. doi: 10.1080/15548627.2015.1017181. PubMed PMID: 25714620; PubMed Central PMCID: PMC4502761.
18. Niemann A, Takatsuki A, Elsasser HP. The lysosomotropic agent monodansylcadaverine also acts as a solvent polarity probe. *J Histochem Cytochem.* 2000;48(2):251-8. Epub 2000/01/20. doi:

- 10.1177/002215540004800210. PubMed PMID: 10639491.
19. Yamamoto A, Tagawa Y, Yoshimori T, Moriyama Y, Masaki R, Tashiro Y. Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. *Cell Struct Funct.* 1998;23(1):33-42. Epub 1998/06/25. PubMed PMID: 9639028.
 20. Punnonen EL, Reunanen H. Effects of vinblastine, leucine, and histidine, and 3-methyladenine on autophagy in Ehrlich ascites cells. *Exp Mol Pathol.* 1990;52(1):87-97. Epub 1990/02/01. PubMed PMID: 2307216.
 21. Edwards L, Fishman D, Horowitz P, Bourbon N, Kester M, Ernsberger P. The I1-imidazoline receptor in PC12 pheochromocytoma cells activates protein kinases C, extracellular signal-regulated kinase (ERK) and c-jun N-terminal kinase (JNK). *J Neurochem.* 2001;79(5):931-40. Epub 2001/12/12. PubMed PMID: 11739604.
 22. Nikolic K, Agbaba D. Pharmacophore development and SAR studies of imidazoline receptor ligands. *Mini Rev Med Chem.* 2012;12(14):1542-55. Epub 2012/04/20. PubMed PMID: 22512575.
 23. Tesson F, Limon-Boulez I, Urban P, Puype M, Vandekerckhove J, Couprie I, et al. Localization of I2-imidazoline binding sites on monoamine oxidases. *J Biol Chem.* 1995;270(17):9856-61. Epub 1995/04/28. PubMed PMID: 7730367.
 24. Thorn DA, An XF, Zhang Y, Pignini M, Li JX. Characterization of the hypothermic effects of imidazoline I(2) receptor agonists in rats. *Br J Pharmacol.* 2012;166(6):1936-45. Epub 2012/02/14. doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.01894.x. PubMed PMID: 22324428; PubMed Central PMCID: PMC3402816.
 25. Eglen RM, Hudson AL, Kendall DA, Nutt DJ, Morgan NG, Wilson VG, et al. 'Seeing through a glass darkly': casting light on imidazoline 'I' sites. *Trends Pharmacol Sci.* 1998;19(9):381-90. Epub 1998/10/24. PubMed PMID: 9786027.
 26. Regunathan S, Feinstein DL, Reis DJ. Anti-proliferative and anti-inflammatory actions of imidazoline agents. Are imidazoline receptors involved? *Ann N Y Acad Sci.* 1999;881:410-9. Epub 1999/07/23. PubMed PMID: 10415945.
 27. Noda T, Ohsumi Y. Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J Biol Chem.* 1998;273(7):3963-6. Epub 1998/03/28. PubMed PMID: 9461583.
 28. Rushworth SA, MacEwan DJ, O'Connell MA. Lipopolysaccharide-induced

- expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 and heme oxygenase-1 protects against excessive inflammatory responses in human monocytes. *J Immunol.* 2008;181(10):6730-7. Epub 2008/11/05. PubMed PMID: 18981090; PubMed Central PMCID: PMCPMC2923058.
29. Jain A, Lamark T, Sjøttem E, Larsen KB, Awuh JA, Overvatn A, et al. 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.* 2010;285(29):22576-91. Epub 2010/05/11. doi: 10.1074/jbc.M110.118976. PubMed PMID: 20452972; PubMed Central PMCID: PMCPMC2903417.
 30. Komatsu M, Kurokawa H, Waguri S, Taguchi K, Kobayashi A, Ichimura Y, et al. The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nat Cell Biol.* 2010;12(3):213-23. Epub 2010/02/23. doi: 10.1038/ncb2021. PubMed PMID: 20173742.
 31. Mathew R, Karp CM, Beaudoin B, Vuong N, Chen G, Chen HY, et al. Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell.* 2009;137(6):1062-75. Epub 2009/06/16. doi: 10.1016/j.cell.2009.03.048. PubMed PMID: 19524509; PubMed Central PMCID: PMCPMC2802318.
 32. Nojima H, Tokunaga C, Eguchi S, Oshiro N, Hidayat S, Yoshino K, et al. The mammalian target of rapamycin (mTOR) partner, raptor, binds the mTOR substrates p70 S6 kinase and 4E-BP1 through their TOR signaling (TOS) motif. *J Biol Chem.* 2003;278(18):15461-4. Epub 2003/02/27. doi: 10.1074/jbc.C200665200. PubMed PMID: 12604610.
 33. Fujita K, Maeda D, Xiao Q, Srinivasula SM. Nrf2-mediated induction of p62 controls Toll-like receptor-4-driven aggresome-like induced structure formation and autophagic degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(4):1427-32. Epub 2011/01/12. doi: 10.1073/pnas.1014156108. PubMed PMID: 21220332; PubMed Central PMCID: PMCPMC3029726.
 34. Lim J, Kim HW, Youdim MB, Rhyu IJ, Choe KM, Oh YJ. Binding preference of p62 towards LC3-II during dopaminergic neurotoxin-induced impairment of autophagic flux. *Autophagy.* 2011;7(1):51-60. Epub 2010/11/04. PubMed PMID: 21045561.
 35. Xu Y, Zhang J, Tian C, Ren K, Yan YE, Wang K, et al. Overexpression of p62/SQSTM1 promotes the degradations of abnormally accumulated PrP mutants in cytoplasm and relieves the associated cytotoxicities via

- autophagy-lysosome-dependent way. *Med Microbiol Immunol*. 2014;203(2):73-84. Epub 2013/11/19. doi: 10.1007/s00430-013-0316-z. PubMed PMID: 24240628.
36. Xuanfei L, Hao C, Zhujun Y, Yanming L, Jianping G. Imidazoline I2 receptor inhibitor idazoxan regulates the progression of hepatic fibrosis via Akt-Nrf2-Smad2/3 signaling pathway. *Oncotarget*. 2017;8(13):21015-30. Epub 2017/04/21. doi: 10.18632/oncotarget.15472. PubMed PMID: 28423499; PubMed Central PMCID: PMC5400562.
 37. Bae SH, Sung SH, Oh SY, Lim JM, Lee SK, Park YN, et al. Sestrins activate Nrf2 by promoting p62-dependent autophagic degradation of Keap1 and prevent oxidative liver damage. *Cell Metab*. 2013;17(1):73-84. Epub 2013/01/01. doi: 10.1016/j.cmet.2012.12.002. PubMed PMID: 23274085.

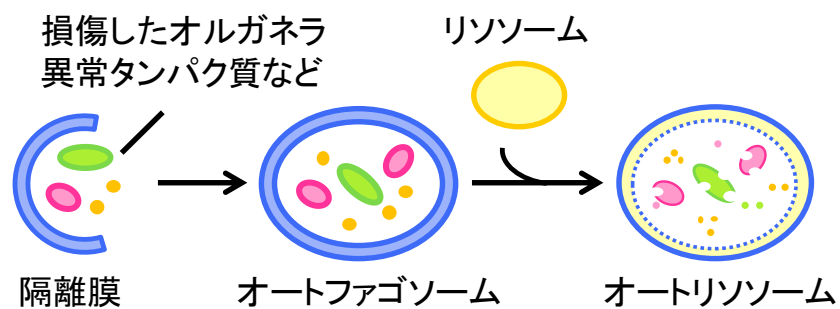


図1 オートファジーの過程

細胞内で起きるオートファジーの過程を段階を追って示す。まず、オートファジーが誘導されると、細胞質中に隔離膜と呼ばれる扁平性の膜が生じる。その後、隔離膜の伸長に伴い、損傷したタンパク質やオルガネラなどを取り込みながらオートファゴソームと呼ばれる脂質二重膜の小胞を形成する。オートファゴソームはリソソームと膜融合してオートリソソームとなり、小胞内に包み込んだ内容物をリソソーム内の加水分解酵素により分解する。オートリソソームも内容物と同様に分解され、消滅する。その後、リソソームだけが再生する。

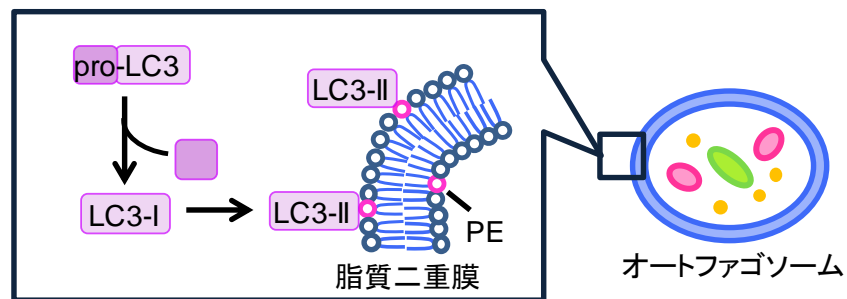


図 2 オートファゴソーム膜への LC3 タンパク質の結合

オートファゴームの膜を構成するタンパク質の一つである LC3 について、LC3 がオートファゴソーム膜を構成するまでの過程を示した。LC3 は、まず細胞質中に前駆体 (pro-LC3) が合成され、システインプロテアーゼにより C 末端側の 22 残基を切断されることで LC3-I になる。次に、LC3-I がホスファチジルエタノールアミン (PE) と共有結合することで脂質修飾を受けて LC3-II となる。そして、LC3-II はオートファゴソームの脂質二重膜の伸長と閉鎖に関与する。

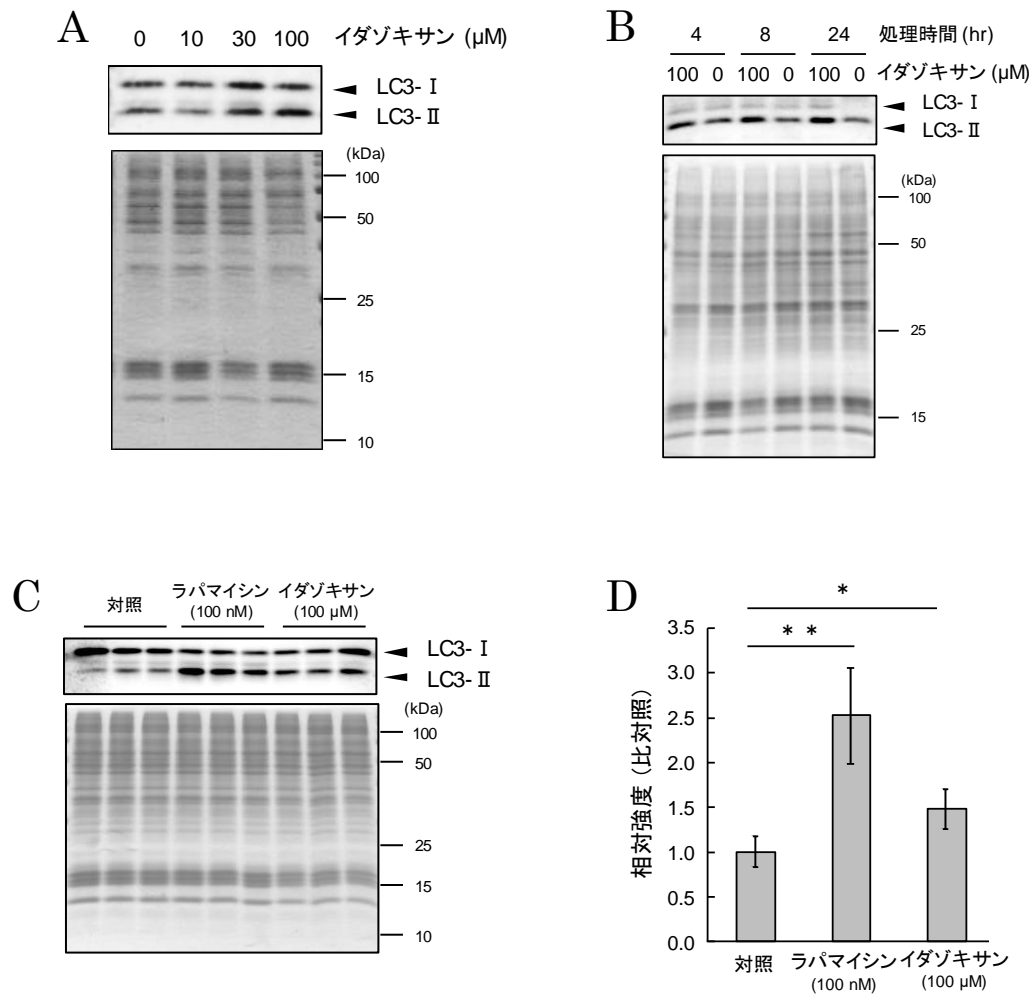


図 3 イドゾキサンは RAW264.7 細胞において LC3-II を増加させた。

RAW264.7 細胞に 10、30、100 μM のイドゾキサンを 16 時間 (A)、100 μM のイドゾキサンを 4、8、24 時間 (B)、100 μM のイドゾキサン及び 100 nM のラパマイシンを、3 サンプルずつ 24 時間 (C) 処理した。細胞からタンパク質を調製し、ウェスタブロット法により LC3 を検出した。上の図はウェスタブロット法により検出した LC3-I と LC3-II のシグナルを、下の図はローディングコントロールとして CBB 染色を行った結果を示す。(D) グラフは C の結果から得られた LC3-II シグナル強度を、薬剤未処理群のシグナル強度の平均値を 1 としたときの相対強度で示した。エラーバーは 3 サンプルから算出した標準偏差を示す。結果は Student's *t*-test で評価した (* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$)。

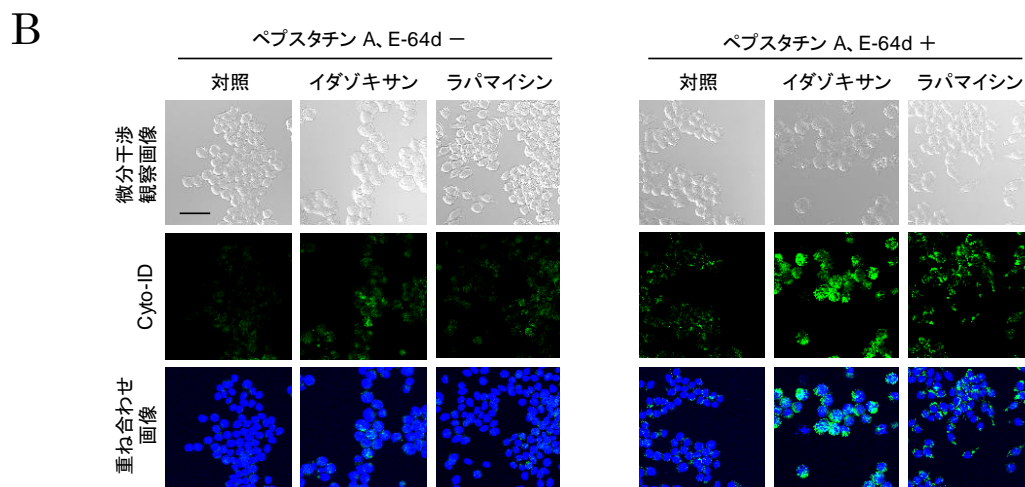
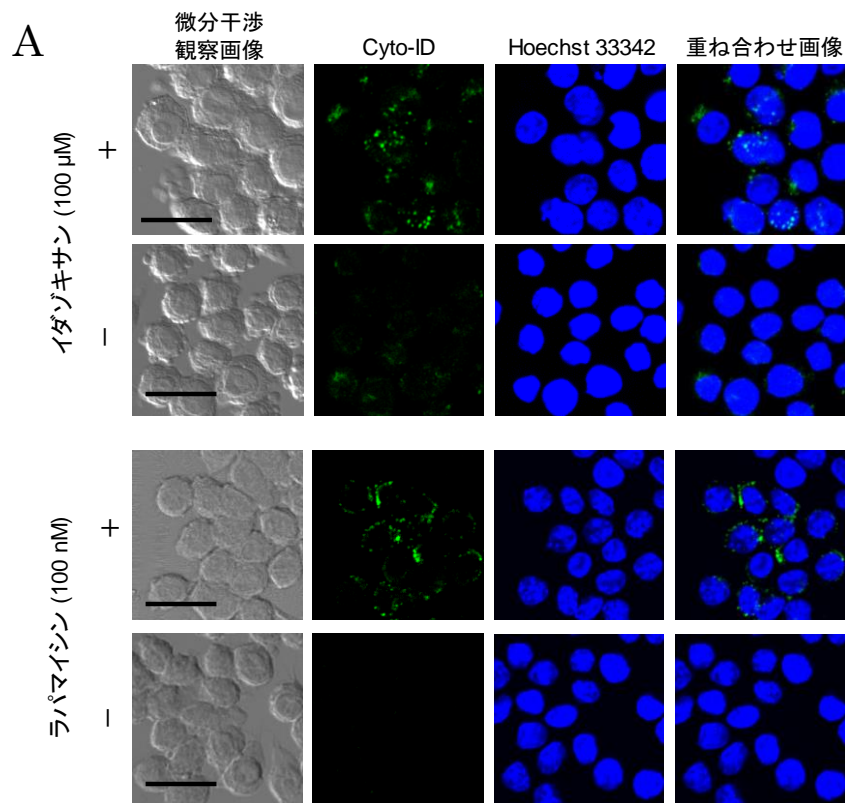


図4 イダゾキサンは Cyto-ID の蛍光強度を増加させた。

RAW264.7 細胞に 100 μ M のイダゾキサンを 16 時間、100 nM のラパマイシンを 4 時間処理 (A)、また、100 μ M のイダゾキサン若しくは 100 nM のラパマイシンを、2 μ g/mL のペプスタチン A 及び 10 μ g/mL の E-64d と併用して 24 時間処理 (B) した。薬剤処理後、細胞内のオートファゴソームと核を、それぞれ Cyto-ID、Hoechst 33342 を用いて蛍光染色した。染色後、共焦点顕微鏡を用いて Cyto-ID (励起波長 488 nm、蛍光波長 500-550 nm) と Hoechst 33342 (励起波長 405 nm、蛍光波長 425-475 nm) の蛍光を観察した。スケールバーの大きさは 25 μ m を示す。

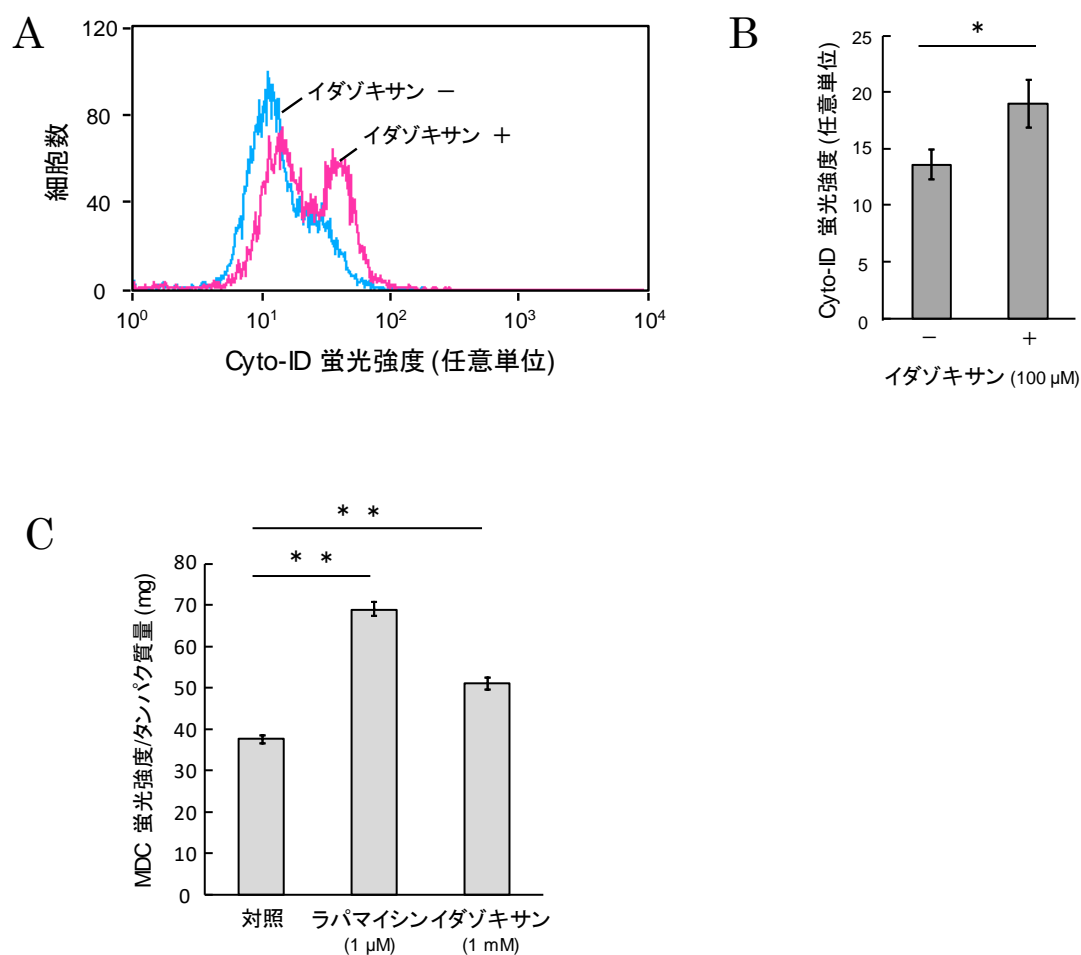


図5 イダゾキサンは Cyto-ID 及び MDC の蛍光強度を増加させた。

(A) RAW264.7 細胞に 100 μM のイダゾキサンを 16 時間処理した。その後、Cyto-ID で染色しフローサイトメトリーを用いて蛍光強度を測定した。(B) グラフはフローサイトメトリーの結果からえられた Cyto-ID の蛍光強度の幾何平均値を示し、エラーバーは 3 サンプル間の標準偏差を示す。(C) RAW264.7 細胞に 1 μM のラパマイシンを 30 分間、1 mM のイダゾキサンを 3 時間処理した。その後、MDC で蛍光染色を行い、マイクロプレートリーダーを用いて MDC (励起波長 365 nm、蛍光波長 550 nm) の蛍光を測定した。グラフは、得られた蛍光強度をウェル当たりのタンパク質量で補正した数値を示し、エラーバーは 3 サンプル間の標準偏差を示す。結果は Student's *t*-test で評価した (* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$)。

LC3-II シグナルの挙動

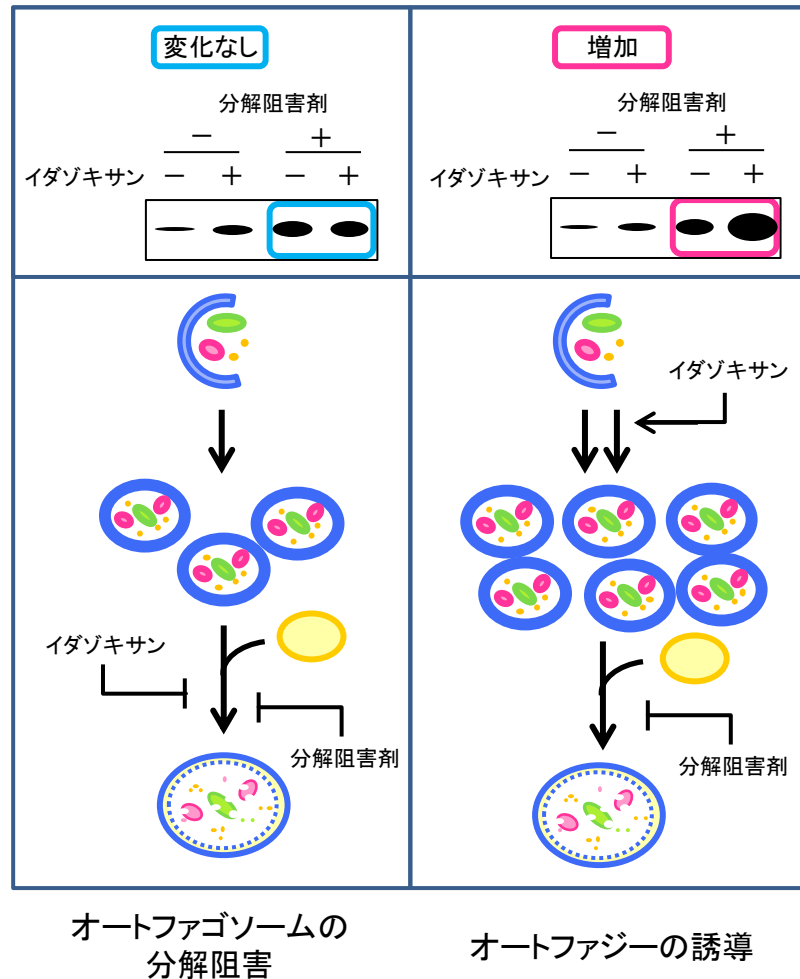


図 6 LC3-II シグナルによるオートファゴソームの分解阻害剤とオートファジーの誘導剤の判別方法

オートファゴソームの分解阻害剤若しくはオートファジーの誘導剤かを区別する方法の一つに、既知の分解阻害剤と併用した時の LC3-II シグナルの挙動から判別する方法がある。実験結果として予想される LC3-II シグナルの挙動とその結果から予想されるイダゾキサンの作用点を図に示した。図のように、イダゾキサンが分解阻害剤であった場合、分解阻害されるオートファゴソームの量に変化はないため、併用した条件での LC3-II シグナルに変化は認められない。一方、イダゾキサンが誘導剤であった場合、分解阻害されるオートファゴソームの量は誘導によりさらに増加するため、併用した条件での LC3-II シグナルもさらに増加する。このシグナルの違いを利用し、分解阻害剤と誘導剤を区別する。

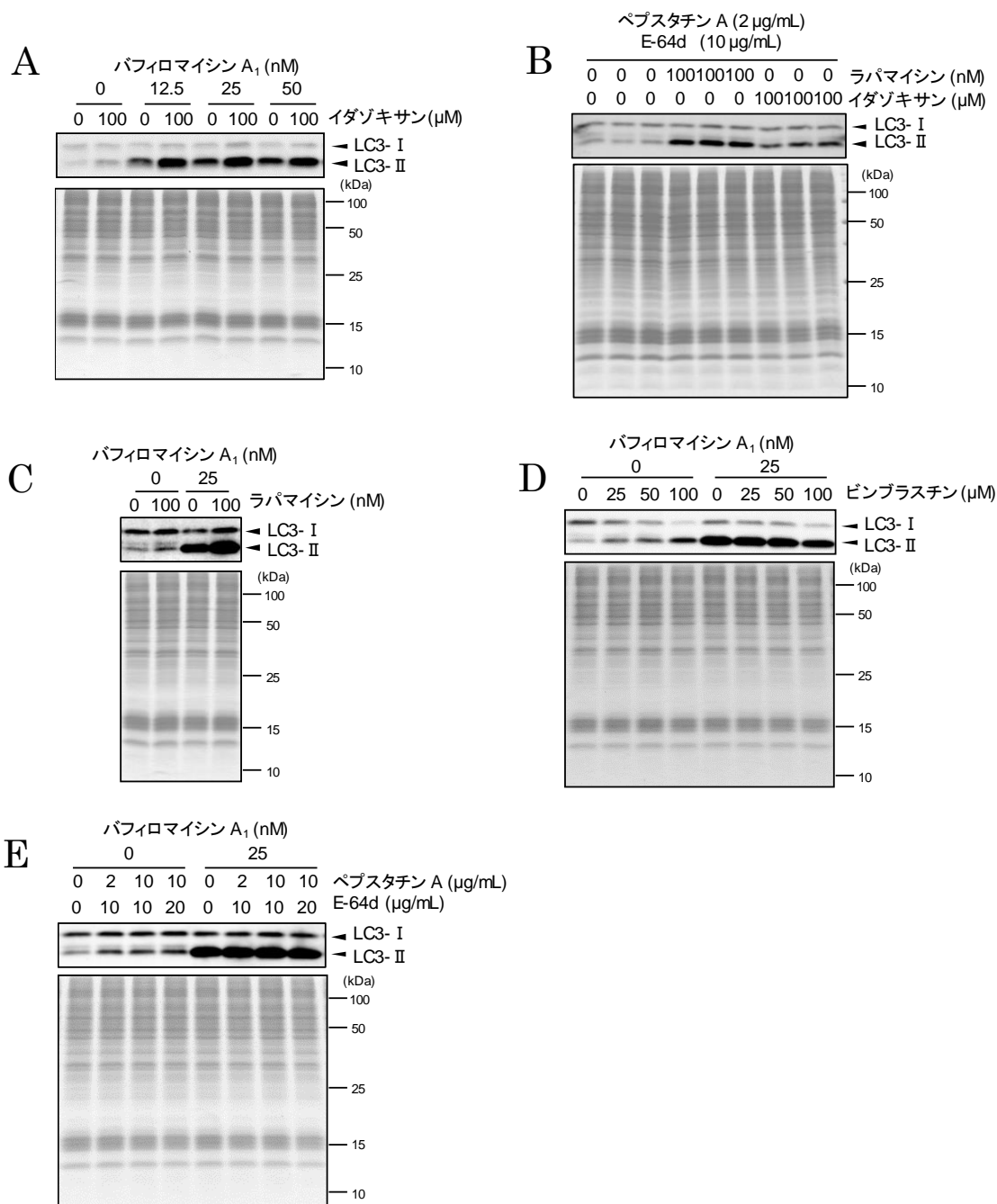
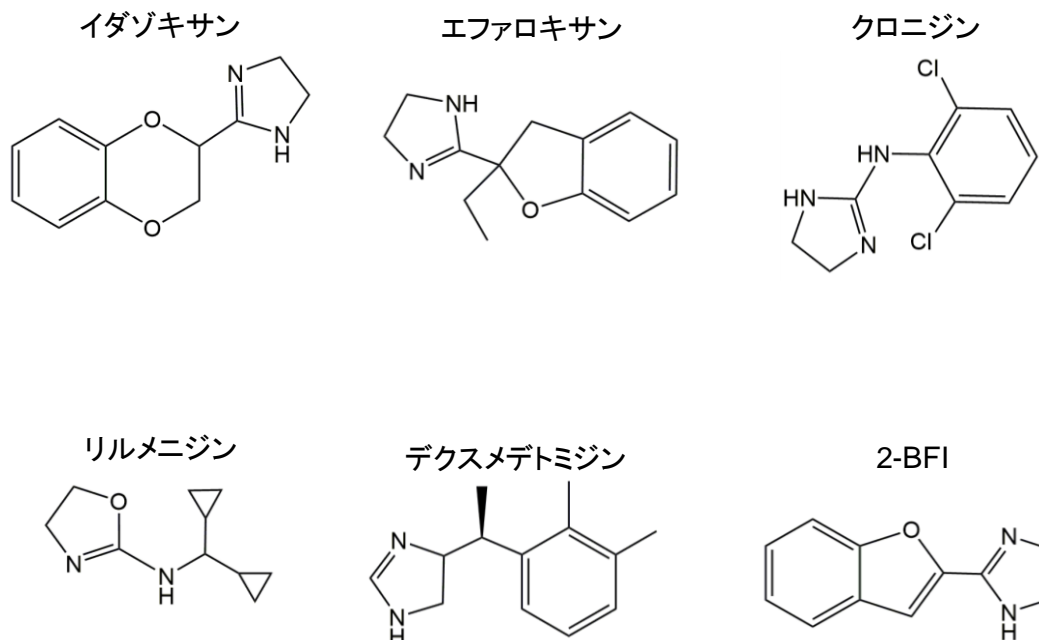


図7 イダゾキサンはバフィロマイシン A₁ 併用下でも LC3-II を増加させた。

RAW264.7 細胞に 100 μM のイダゾキサンを 16 時間 (A)、100 nM のラパマイシンを 4 時間 (C)、25、50、100 μM のビンブラスチンを 4 時間 (D)、2、10 μg/mL のペプスタチン A と 10、20 μg/mL の E-64d を 16 時間 (E) 処理した。バフィロマイシン A₁ は図に示す濃度で、他の薬剤処理時間のうち最後の 4 時間のみ処理した (A、C、D、E)。(B) RAW264.7 細胞に 100 nM のラパマイシン若しくは 100 μM のイダゾキサンを処理し、さらに 2 μg/mL のペプスタチン A と 10 μg/mL の E-64d を加え 24 時間処理した。上の図はウェスタンブロット法により検出した LC3-I と LC3-II のシグナルを、下の図はローディングコントロールとして CBB 染色を行った結果を示す。



イミダゾリン受容体への親和性

| 化合物名 | 活性 | I ₁ (Ki:nM) | I ₂ (Ki:nM) | I ₂ /I ₁ | 参考文献 |
|---------|---|------------------------|------------------------|--------------------------------|------|
| エファロキサン | I ₁ アゴニスト | 52 | >10,000 | <0.005 | [25] |
| クロニジン | I ₁ アゴニスト | 56 | 955 | 17 | [25] |
| リルメニジン | I ₁ アゴニスト | 60 | 1096 | 18 | [25] |
| イダゾキサン | I ₁ アンタゴニスト/I ₂ アゴニスト | 1259 | 10.6 | 119 | [25] |
| 2-BFI | I ₂ アゴニスト | 6392 | 1.3 | 4917 | [24] |

図 8 イミダゾリン誘導体の骨格及びイミダゾリン受容体への作用

上の図は実験に用いたイミダゾリン誘導体の骨格を、下の表はイミダゾリン誘導体のイミダゾリン受容体に対するサブタイプごとの親和性を示した。イミダゾリン誘導体は含窒素複素環化合物で、誘導体に共通の骨格として、窒素原子を含んだ 5 員環を持つ。そして、その他の構造の違いから、イミダゾリン受容体のサブタイプ (I₁、I₂) に対して異なる親和性を示す。イミダゾリン誘導体間の違いについて、親和性は Ki 値を、受容体への選択性は I₂ の Ki 値を I₁ の Ki 値で除算した値 (I₂/I₁) をもとに比較した。デクスメドミジンの Ki 値については、算出されたデータがなく記載していない。

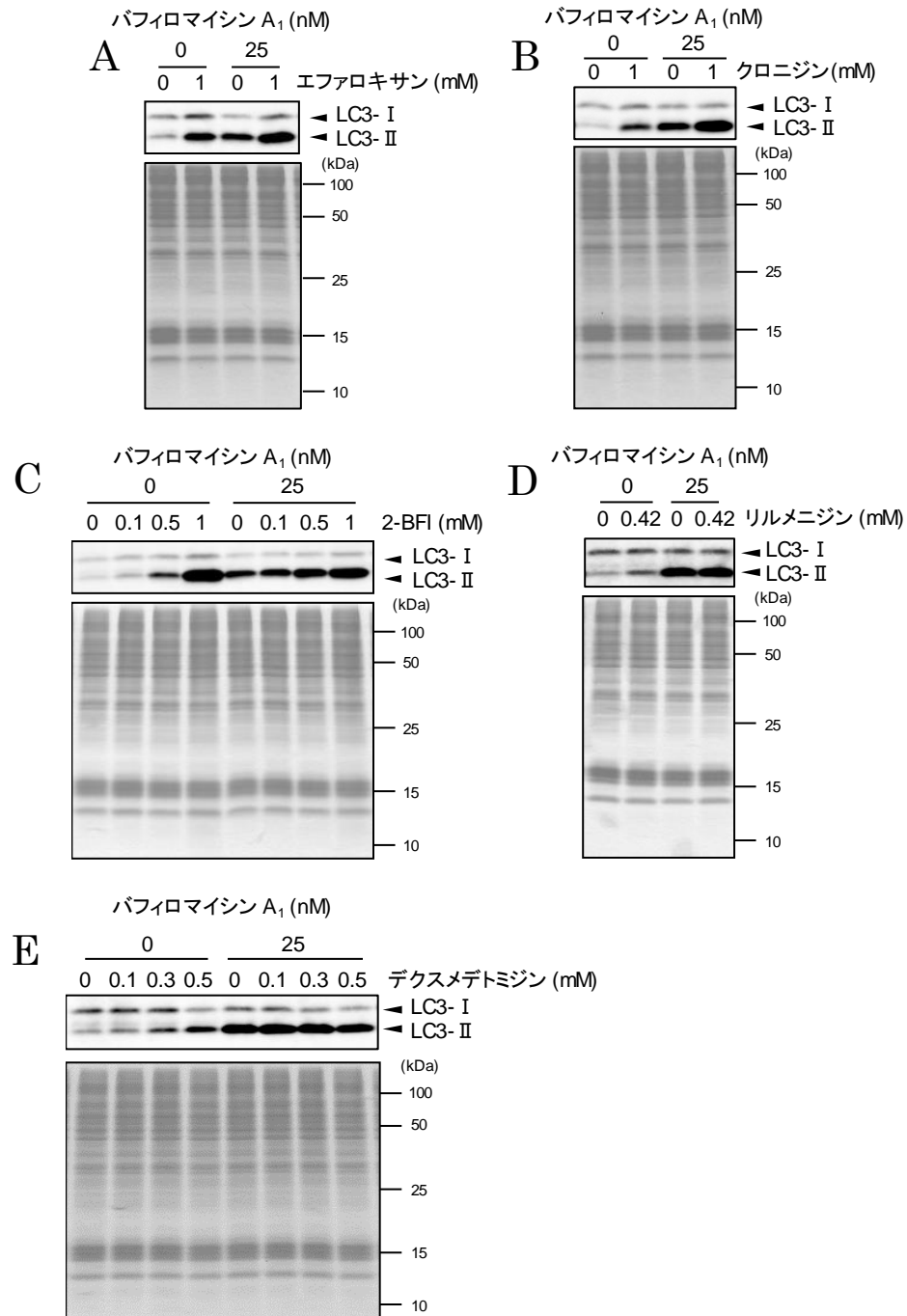


図 9 エファロキサン、クロニジン及び 2-BFI はパフィロマイシン A₁ 併用下でも LC3-II を増加させた。

RAW264.7 細胞にエファロキサンを 8 時間 (A)、クロニジンを 4 時間 (B)、2-BFI を 16 時間 (C)、リルメニジンを 4 時間 (D)、デクスメデトミジンを 4 時間 (E) 処理した。パフィロマイシン A₁ は図に示す濃度で、他の薬剤処理時間のうち、最後の 4 時間のみ処理した (A ~ E)。上の図はウェスタンブロット法により検出した LC3-I と LC3-II のシグナルを、下の図はローディングコントロールとして CBB 染色を行った結果を示す。

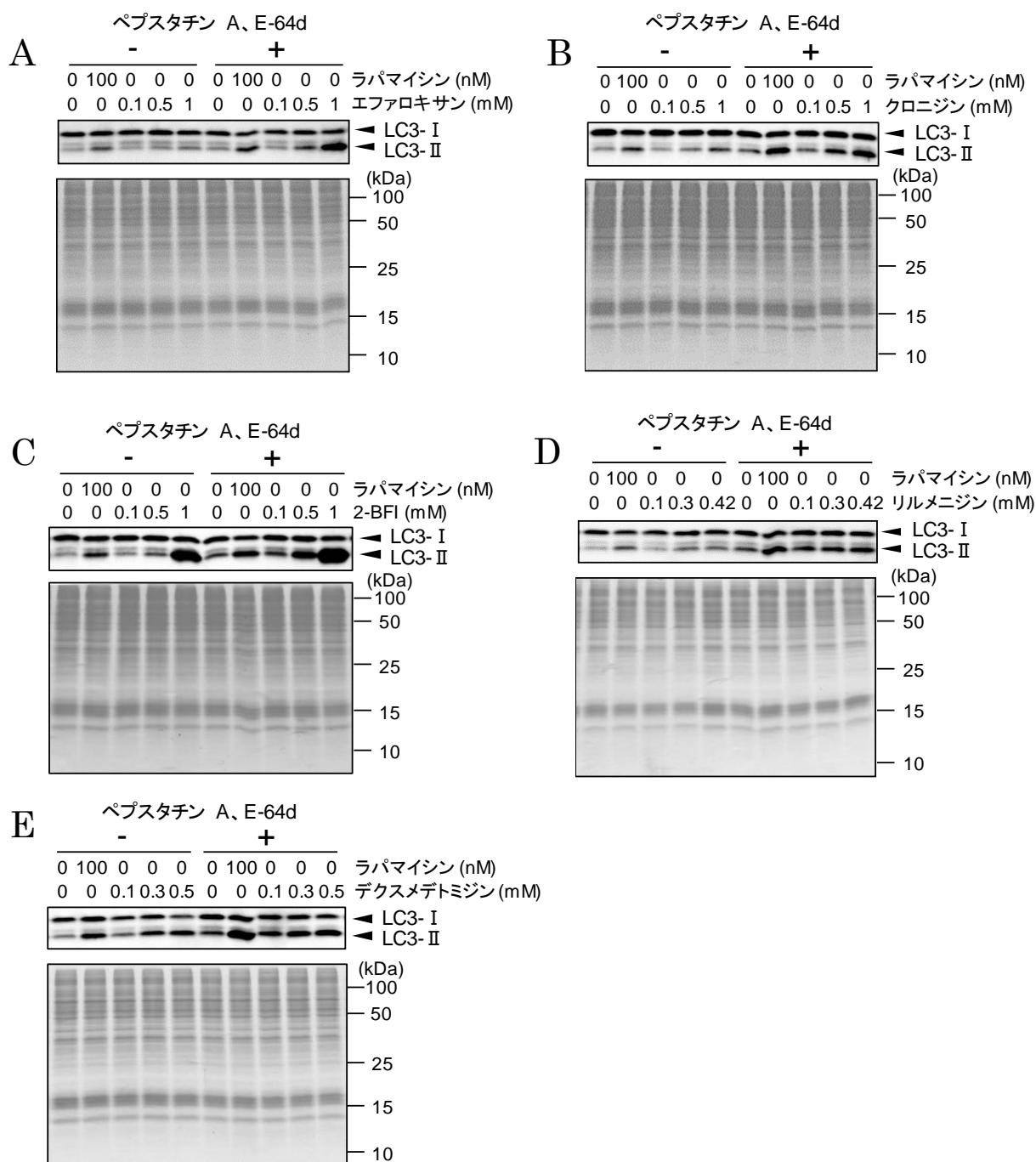


図10 エファロキサ、クロニジン及び2-BFIはペプスタチンAとE-64d併用下でもLC3-IIを増加させた。

RAW264.7細胞にエファロキサを24時間(A)、クロニジンを24時間(B)、2-BFIを24時間(C)、リルメニジンを24時間(D)、デクスメデトミジンを4時間(E)処理した。さらに2 μ g/mLのペプスタチンAと10 μ g/mLのE-64dを共に24時間処理した(A~E)。上の図はウェスタンブロット法により検出したLC3-IとLC3-IIのシグナルを、下の図はローディングコントロールとしてCBB染色を行った結果を示す。

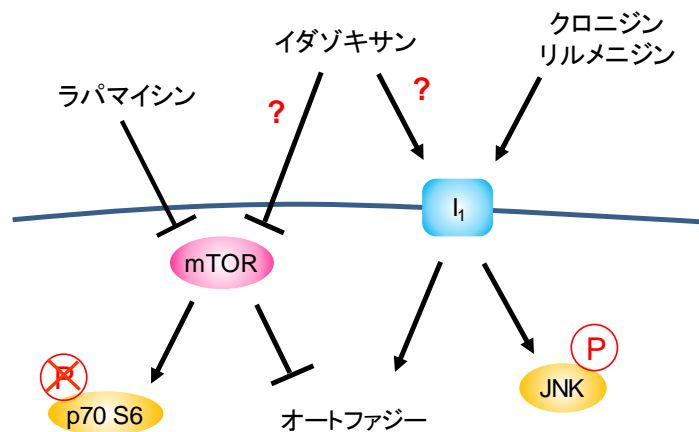


図 11 オートファジー関連因子とその下流シグナル

ラパマイシンやクロニジンなど既知のオートファジー誘導剤について、誘導メカニズムに関わる分子とその下流シグナルに位置する分子を図に示した。mTOR は、オートファジーを抑制するほか、p70 S6 キナーゼをリン酸化する。従って、mTOR 阻害剤であるラパマイシンは mTOR を阻害した結果として p70 S6 キナーゼのリン酸化を抑制する。また、I₁ 受容体は、オートファジーを誘導するほか、JNK をリン酸化する。I₁ 受容体アゴニストであるクロニジンやリルメニジンは I₁ 受容体に作用した結果として JNK をリン酸化する。

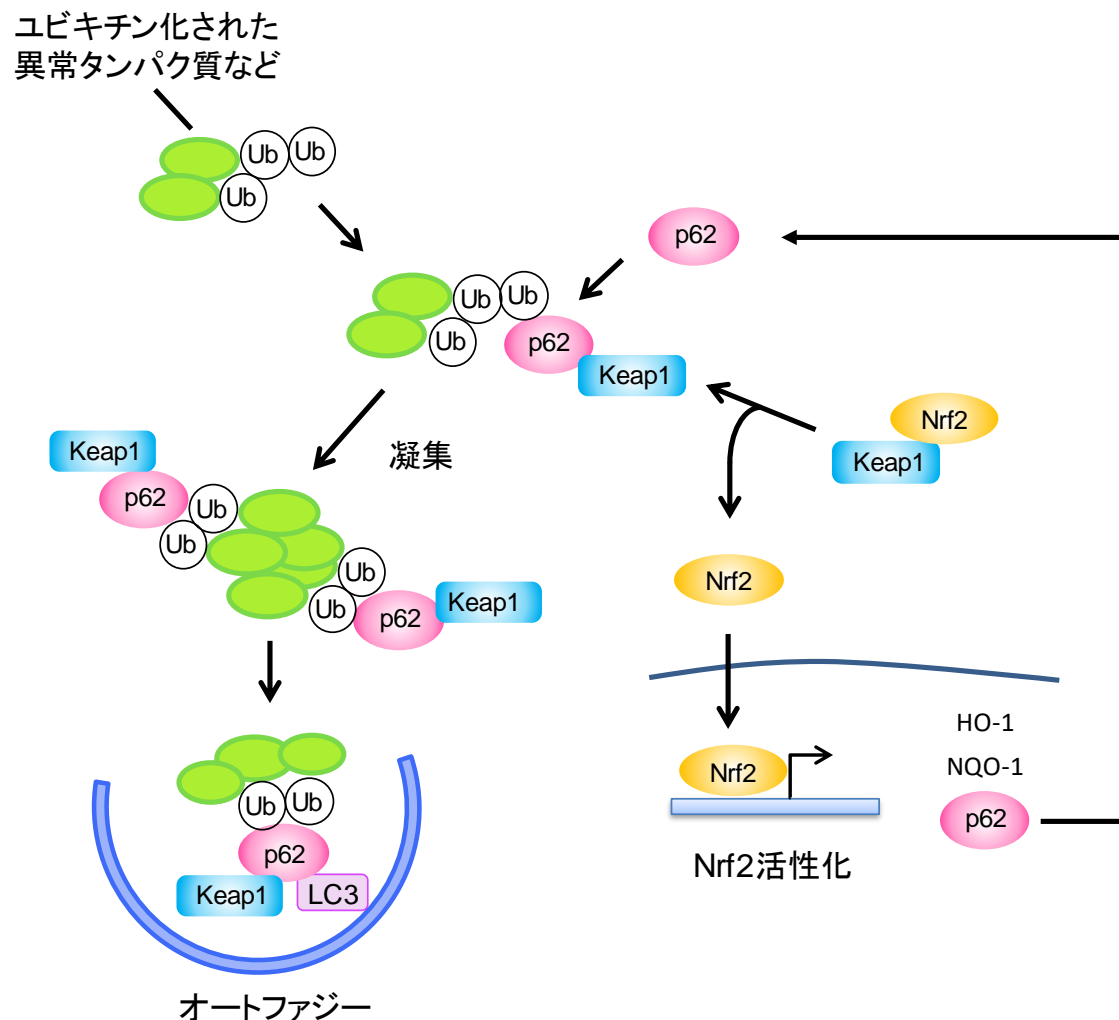


図 12 オートファジー及び Keap1-Nrf2 シグナルに対する p62 の関与

オートファジーと p62 及び Keap1-Nrf2 シグナルと p62 の関係性について図で示した。まず、細胞内の p62 が増加すると、p62 同士で自己凝集をおこす。自己凝集化した p62 はリン酸化 (S407、S403) を受けることでユビキチンドメインとの結合力が増し、ユビキチンタンパク質なども巻き込みながら凝集する。その後、凝集化したタンパク質はオートファジーによって隔離され、分解される。また、ユビキチンだけでなく p62 のリン酸化 (S349) により Keap1 との結合も増加する。その結果、Nrf2 が遊離され活性化することで、HO-1 などの抗酸化タンパク質の発現を誘導する。発現が誘導されたタンパク質の中には p62 も含まれており、フィードバックループが成立する。

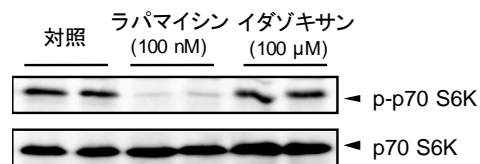


図 13 イダゾキサンは p70 S6 キナーゼのリン酸化を抑制しなかった。

RAW264.7 細胞に 100 nM のラパマイシン及び 100 μM のイダゾキサンを 24 時間処理した。その後、細胞から調製したタンパク質を 2 サンプルずつ泳動し、ウェスタンブロット法に供した。上の図はリン酸化した p70 S6 キナーゼ (p-p70 S6K) のシグナルを示し、下の図は p70 S6 キナーゼ (p70 S6K) のシグナルを示す。

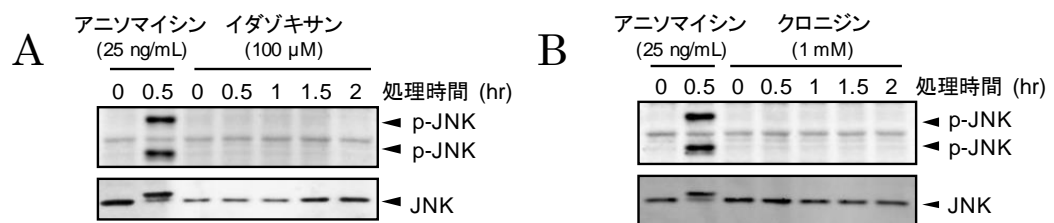


図 14 イダゾキサン及びクロニジンは JNK をリン酸化しなかった。

RAW264.7 細胞に 25 ng/mL のアニソマイシンを 0.5 時間、100 μM のイダゾキサン (A) 及び 1 mM のクロニジン (B) をそれぞれ図に示す時間処理した。その後、ウェスタンブロット法によりリン酸化 JNK (p-JNK) 及び JNK を検出した。タンパク質合成阻害薬であるアニソマイシンは JNK リン酸化の陽性対照として用いた。

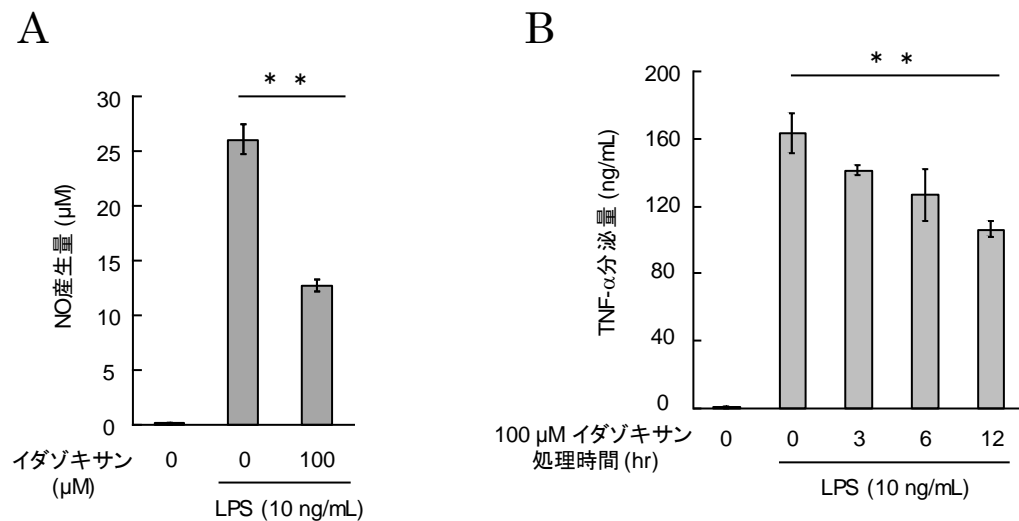


図 15 イダゾキサンは LPS 刺激による NO 産生量及び TNF- α の分泌量を減少させた。

(A) RAW264.7 細胞に 10 ng/mL の LPS 及び 100 μ M のイダゾキサンを 24 時間処理した。薬剤処理後、培養上清を回収して NO 定量を行った。グラフは検量線より算出した NO 産生量を示す。エラーバーは 3 サンプル間の標準偏差を示す。(B) RAW264.7 細胞に 100 μ M のイダゾキサンを上記に示す時間、10 ng/mL の LPS を 6 時間処理した。薬剤処理後に培養上清を回収し、ELISA 法により TNF- α 分泌量を測定した。グラフは検量線より算出した TNF- α 分泌量を示す。エラーバーは 3 サンプル間の標準偏差を示す。

結果は Student's *t* test で評価した (***p* < 0.01)。

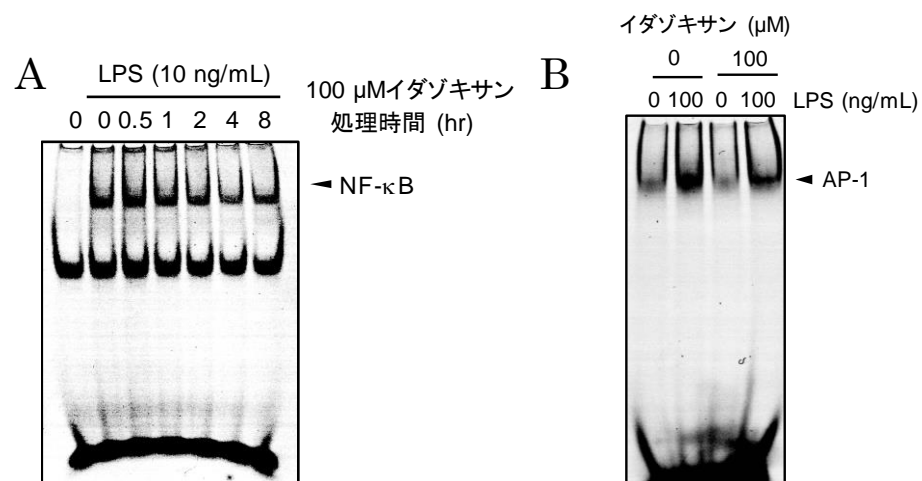


図 16 イダゾキサンは LPS 刺激による NF-κB 及び AP-1 の DNA 結合を減少させた。

(A) RAW264.7 細胞に 10 ng/mL の LPS を 0.5 時間、100 μM のイダゾキサンを図に示す時間処理し、核タンパク質を抽出後に EMSA 法により DNA に結合した NF-κB を検出した。(B) RAW264.7 細胞に 100 ng/mL の LPS 及び 100 μM のイダゾキサンを 1 時間処理し、核タンパク質を抽出後に EMSA 法により DNA に結合した AP-1 を検出した。

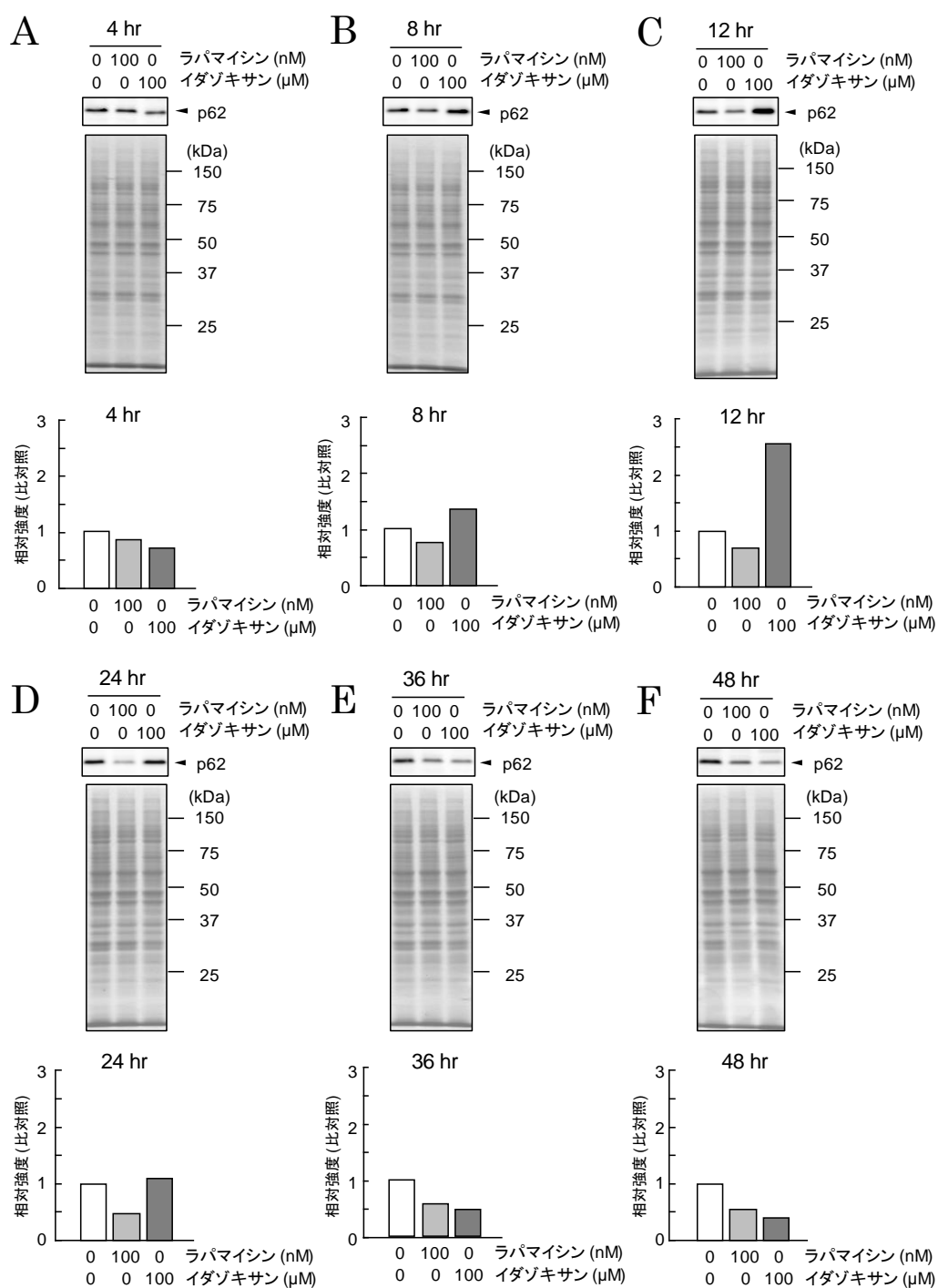


図 17 イダゾキサンは p62 を増加させた後に、減少させた。

RAW264.7 細胞に 100 nM のラパマイシン、100 μM のイダゾキサンを 4 (A)、8 (B)、12 (C)、24 (D)、36 (E)、48 (F) 時間処理した。薬剤処理を行った細胞からタンパク質を調製し、ウェスタンブロット法に供した。上の図はウェスタンブロット法により検出した p62 のシグナルとローディングコントロールとして CBB 染色を行った結果を示す。下のグラフは p62 のシグナル強度を測定し、薬剤未処理を 1 とした時の相対強度を示す。

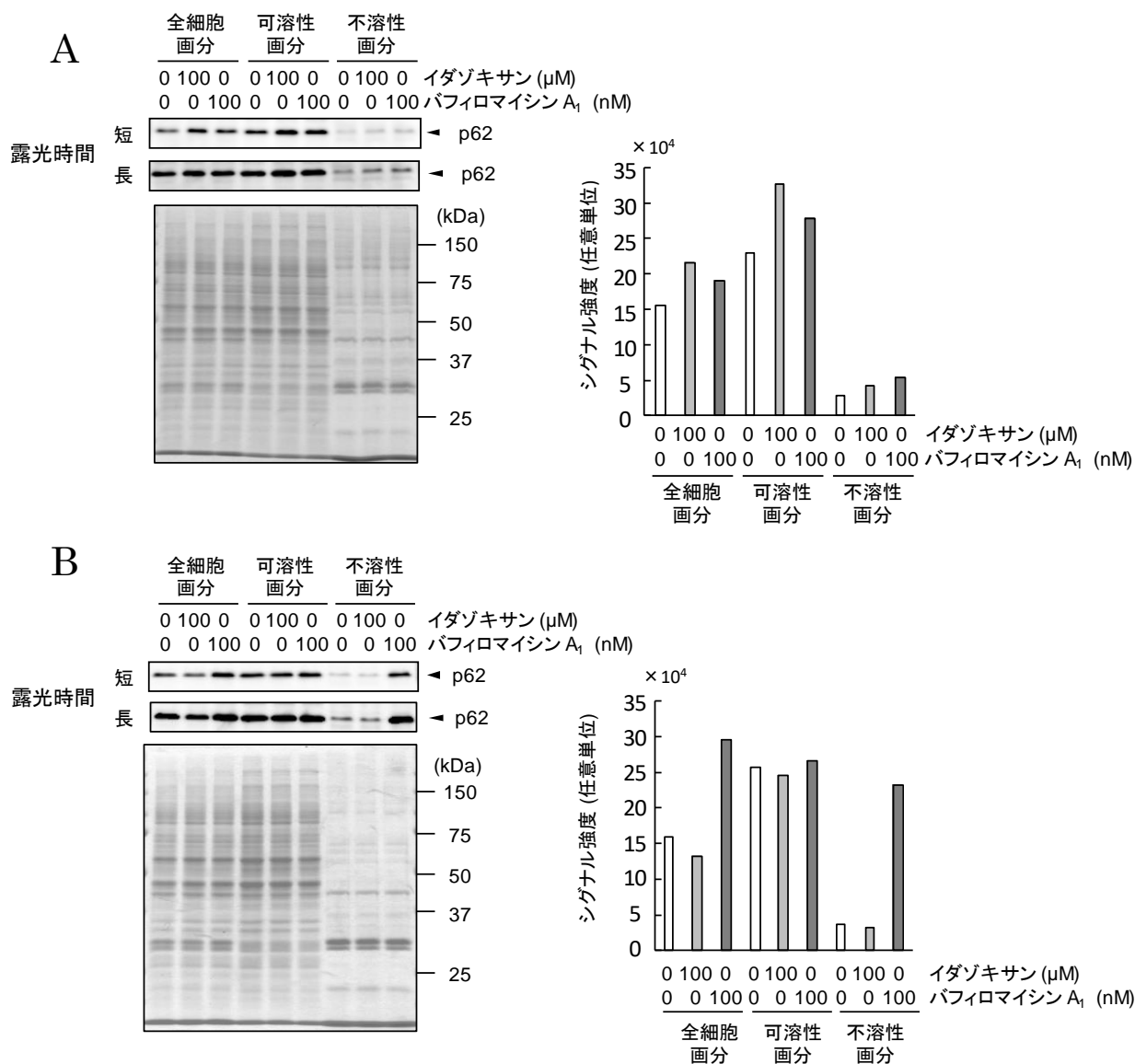


図 18 イダゾキサンは全細胞画分及び可溶性画分での p62 量を増加させた。

RAW264.7 細胞に 100 μM のイダゾキサンを 8 時間、100 nM のバフィロマイシン A₁ を 1 時間 (A) また、100 μM のイダゾキサンを 24 時間、100 nM のバフィロマイシン A₁ を 3 時間 (B) それぞれ処理した。薬剤処理後、細胞のタンパク質を全細胞画分、可溶性画分、不溶性画分に分けて回収した。そして、それぞれのサンプルをウェスタンブロット法に供した。左上の図はウェスタンブロット法により検出した p62 のシグナルについて短時間 (8.9 秒、8.6 秒) と長時間 (49.7 秒、45 秒) で露光した結果を示す。左下の図はローディングコントロールとして CBB 染色を行った結果を示す。右のグラフは短時間で露光した p62 のシグナル強度を算出した値を示す。

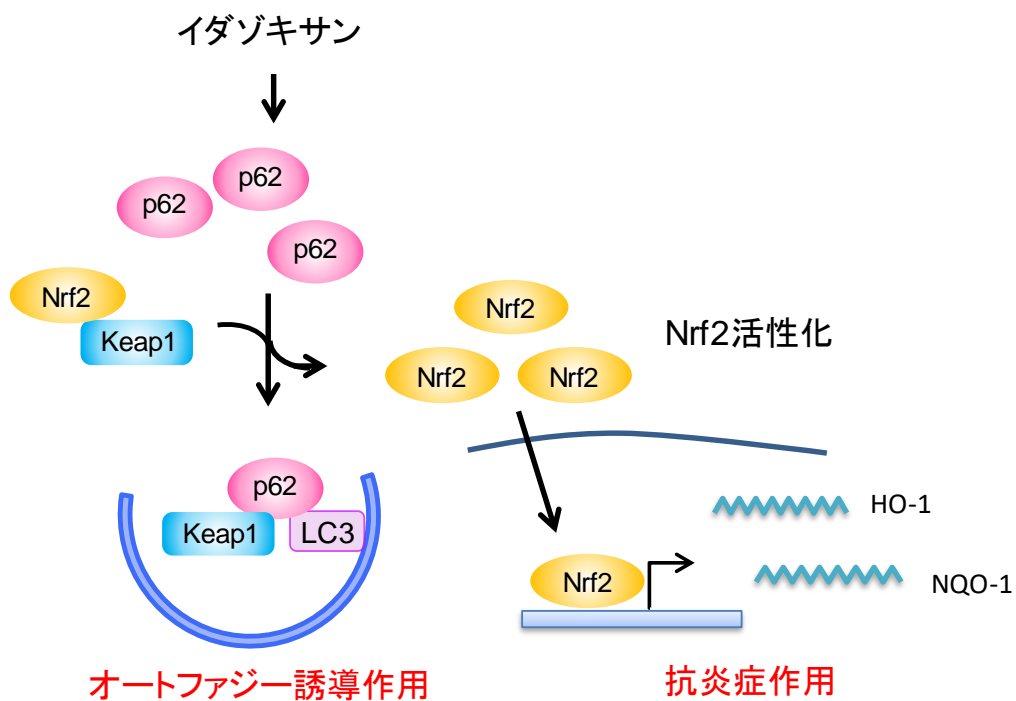


図 19 イダゾキサンの作用メカニズムについてのモデル予想図

本研究の結果とこれまでの知見より推察したイダゾキサンの作用メカニズムについてのモデル予想図を示す。イダゾキサンは p62 の発現を誘導し、増加した p62 を分解するためにオートファジーが誘導された。また、イダゾキサンにより増加した p62 が Keap1 と結合することにより、Nrf2 が活性化されて抗炎症作用を示したのではないかと予想した。