

「博士論文」合否査定資料

申請者 同志社女子大学大学院 薬学研究科医療薬学専攻
職・氏名 中川 詩織

学位の名称 博士（薬学）

論文名 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

審査委員 主 査 和田 戈虹

副 査 森田 邦彦

副 査 川崎 清史

審査結果 合格

博士学位論文審査結果報告書

2019年 2月13日

学位申請者	中川詩織	
審査委員	主査	和田戈虹 
	副査	森田邦彦 
	副査	川崎清史 
<p>本学大学院薬学研究科医療薬学専攻在学中の中川詩織氏から必要書類を添えて論文「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」が提出された。提出を受けて本研究科では1月17日に公開で博士論文発表会を開催した。そして同日開催した研究科委員会で主査として和田戈虹教授、副査として森田邦彦教授と川崎清史教授の3名の審査委員を選出した。和田教授と森田教授は研究分野の専門性から、川崎教授は中川氏の指導教授としての選出である。各委員は発表会での議論を踏まえて論文を査読したうえで、申請者に試問を行った。論文の内容はイミダゾリン誘導体がこれまでに知られていない機構でオートファジーを誘導する可能性を示すものであり、新しい医薬品開発につながる基礎研究として十分な成果が挙げられていた。さらに、申請者は研究成果を挙げるにとどまらず、その成果について発展的な議論ができる点で、研究者として大変に優れた資質を備えていると評価できた。審査過程を通じて審査委員は申請者の研究科での研究活動がディプロマポリシー(学位授与の方針)の各基準を満たしていることを確認した。そして、提出論文の水準が研究科で定めた「学位論文審査基準」の評価項目を十分に満たすものであることを確認した。</p> <p>従って、審査委員は全員一致して中川詩織氏に対して博士(薬学)の学位を授与することが相応しいと判断した。</p>		

博士学位論文審査結果要旨

2019年2月13日

学位申請者	中川詩織	
審査委員	主査	和田戈虹 
	副査	森田邦彦 
	副査	川崎清史 
<p>論文題名</p> <p>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</p>		
<p>(要旨)</p> <p>本論文はまず研究全体の背景を解説する「緒言」に引き続き「第1章 オートファジー誘導作用の解析」が書かれている。この章ではイミダゾリン誘導体によるマクロファージ様細胞株に対するオートファジー誘導能について論述されており、本論文の学術的及び社会的重要性を理解するのに十分な内容が記述されていた。「研究目的」ははっきりと述べられており、先行研究の状況を踏まえて本研究で明らかにするべき課題を明確に述べている。「実験材料と方法」では研究に利用した試薬や実験条件等が詳細かつ適切に記述されていた。そして「結果」ではイダゾキサンのによるオートファジー誘導がオートファゴソーム膜のマーカータンパク質である LC3-II の増加と蛍光顕微鏡等を利用したオートファゴソームの増加により示された。さらにイダゾキサン以外のイミダゾリン化合物のオートファジー誘導能については LC3-II の増加を指標に解析されており、エファロキサンの誘導活性があることが示された。これらは実験手法として適切であり、結果の判断は妥当であると考えられた。「考察」ではこのオートファジー誘導がイミダゾリン受容体である I_1 受容体や I_2 受容体を介する作用では</p>		

ない可能性が述べられている。この指摘はイミダゾリン化合物のオートファジー誘導能を応用していくうえで重要である。「第2章 オートファジー誘導メカニズムの解析」でイミダゾリン誘導体のオートファジー誘導メカニズムについて、イダゾキサンのマクロファージ様細胞株に対するオートファジー誘導の分析結果が論述されている。第1章と同様に「研究目的」がはっきりと述べられており、先行研究の状況を踏まえて本研究で明らかにすべき課題を明確に述べている。「実験材料と方法」では研究に利用した試薬や実験条件等が詳細かつ適切に記述されている。そして「結果」ではまずイダゾキサンがmTOR や I_1 受容体を介してオートファジーを誘導しているのではないことを示す結果が示された。次にイダゾキサンが p62 の細胞内増加を誘導することが示された。「考察」では、この作用がオートファジー誘導の引き金となっている可能性が指摘された。用いられている実験手法は適当であり、結果に対する考察も妥当なものであると判断された。引き続き本論文では「総括」で全体の内容がまとめられている。ここまでの内容から本研究論文が学術的に新規性を有しかつ独創性の高いものであることが十分に理解できた。「謝辞」に続く「参考文献」で引用されている論文等も適当であると判断された。「図」は大変にわかりやすく適切なものであった。

以上の審査結果から、審査委員は全員一致で、本論文が博士論文の水準に十分達していると結論した。

博士学位論文要旨

2019年 1月 7日

学籍番号 9Y15203

学位申請名 中川 詩織

論文題目：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

【背景・目的】

生体が細菌から身を守る手段に、自然免疫応答がある。自然免疫応答では、マクロファージが細菌を認識し、貪食の促進や炎症反応を誘起する。炎症反応は、炎症物質により発熱や血管拡張作用を示すことで、細菌の増殖抑制や免疫細胞の遊走を補助する。一方で、炎症性の自己免疫疾患においては過剰な炎症により組織障害などを引き起こす。そのため、治療では、薬剤により過剰な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薬剤の長期使用は副作用などの問題もあり、新規メカニズムを介した抗炎症薬の開発が求められている。

近年、発見された細胞内分解システムの一つにオートファジーがある。オートファジーでは、まず隔離膜が現れ、細胞質の一部を取り込みながらオートファゴソームと呼ばれる小胞を形成する。オートファゴソームはリソソームと融合して内容物を分解する。近年の研究から、オートファジーは、飢餓時に細胞成分を分解することで栄養を供給するほか、変性タンパク質など有害物を分解することで細胞内の恒常性を保つことが明らかとなった。また、オートファジーの破綻は、神経変性疾患やがん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化合物は様々な疾病に対する治療薬につながる可能性を持つ。また、オートファジーは炎症反応に関与するとの報告がある。例えば、オートファジー関連因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) 刺激による炎症物質の分泌が過剰になる。また、オートファジーが炎症物質である IL-1 β の前駆体を分解することも報告されており、オートファジーは様々な段階で炎症反応に関与す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 mammalian target of rapamycin (mTOR) 阻害剤が、LPS 刺激による NO 産生を抑制する作用を持つことから、抗炎症作用を示す薬剤の中には mTOR 阻害剤以外にオートファジー誘導作用を併せ持つ薬剤が存在するのではないかと推察した。抗炎症作用を示す化合物の中からオートファジーを誘導する化合物を発見し、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、炎症性疾患に対する治療薬としてのオートファジー誘導剤の使用を期待できる。そこで、抗炎症作用を示す薬剤の中から候補化合物を選択し、オートファジーの誘導作用およびその作用メカニズムについて調べることにした。

【結果・考察】

候補化合物には、LPS 刺激による NO 産生を抑制するイダゾキサンを選択した。イダゾキサンはイミダゾリン誘導体の一つで、イミダゾリン受容体に作用する。イダゾキサンによる抗炎症作用とイミダゾリン受容体の関連は明らかになっていないが、同じイミダゾリン誘導体であるクロニジンがイミダゾリン受容体を介してオートファジー誘導することが知られている。イダゾキサンは、クロニジンと類似骨格を持ち、mTOR 阻害剤と同様に NO 産生を抑制することからオートファジーを誘導する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、イダゾキサンによるオートファジー誘導作用を検証した。オートファゴソームの増加は、膜構成タンパク質である microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3)-II の存在量と、オートファゴソームに集積する蛍光色素 Cyto-ID と MDC を用いて染色した時の蛍光強度をもとに調べた。その結果、イダゾキサンによりいずれも増加したことから、オートファゴソームを増加させたことが示された。次に、オートファゴソームが誘導により増加したのか、誘導された LC3-II の量をもとに検証した。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の LC3-II 量と分解阻害剤のみを処理した条件の LC3-II 量の差で示される。よって、イダゾキサンと分解阻害剤を併用したときに、分解阻害剤のみよりも LC3-II を増加すれば、誘導による増加だと判断できる。分解阻害剤として、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バフィロマイシン A₁ をイダゾキサンと併用した条件では、バフィロマイシン A₁ のみの条件より LC3-II の量が増加した (図 1)。また、加水分解酵素を阻害するペプスタチン A と E-64d と、阻害メカニズムが異なる分解阻害剤を併用した条件でも、同様に増加した。よって、イダゾキサンはオートファジーを誘導したと推察される。

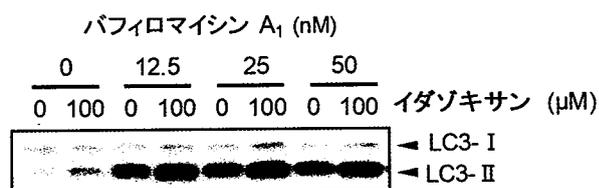


図1 イダゾキサンによるLC3-IIの誘導

さらに、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の作用なのかを調べるため、他のイミダゾリン誘導体についても誘導された LC3-II の量を調べた。その結果、エファロキサン、クロニジン、2-BFI は阻害剤と併用した条件で LC3-II を増加したが、リルメニジン、デクスメデトミジンでは増加は認められなかった。よって、オートファジーの誘導作用は、共通の作用ではなく、一部のイミダゾリン誘導体を持つ作用だと推察された。また、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 I₁、I₂ 受容体に対する親和性が異なる (図 2)。イミダゾリン受容体はサブタイプの違いにより、細胞内の局在や機能が異なるが、サブタイプに対する親和性とオートファジーの誘導作用に相関は認められなかった。従って、オートファジーの誘導作用にこれまでの知見と異なりイミダゾリ

ン受容体が関与していない可能性が考えられた。

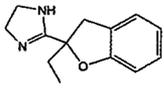
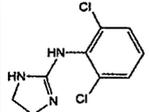
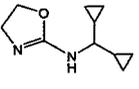
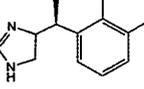
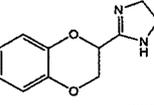
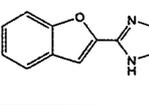
エファロキサン	クロニジン	リルメニジン	デクス メドミジン	イダゾキサン	2-BFI
					
I1アゴニスト	I1アゴニスト	I1アゴニスト	I1アゴニスト	I2アゴニスト	I2アゴニスト

図2 イミダゾリン誘導体の骨格およびイミダゾリン受容体への作用

そこで、オートファジー誘導メカニズムについて調べることにした。まず、イダゾキサンが他のオートファジー誘導剤と同じ因子に作用した可能性を考え、mTORに着目した。オートファジー誘導剤であるmTOR阻害剤は、mTORを抑制することによりオートファジーを誘導する。そこで、イダゾキサンがmTORを抑制するか、下流シグナルであるp70 S6キナーゼのリン酸化を指標に調べた。また、関与する分子としてI₁受容体にも着目した。これまでに、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ことが知られており、本研究でもクロニジンによるオートファジーの誘導作用は認められた。しかし、これまでに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唆されており、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かも不明であった。よって、イダゾキサンおよびクロニジンがI₁受容体に作用するののかについて、下流シグナルであるJNKのリン酸化を指標に調べた。これらの結果、イダゾキサンはp70 S6キナーゼ、JNKいずれのリン酸化にも作用しなかった。また、クロニジンもJNKのリン酸化に作用しなかった。よって、RAW264.7細胞においては、イミダゾリン誘導体によるオートファジーの誘導作用にmTORおよびI₁受容体は関与しないと推察された。

次に、オートファジーと炎症反応についての知見から、イダゾキサンが炎症物質や炎症応答に関わる分子など、オートファジーの基質となる分子を誘導し、オートファジーにより分解させることで、抗炎症作用を示したのではないかと考えた。イダゾキサンが作用するのが、炎症物質なのか、またはシグナル分子なのかを絞り込むため、イダゾキサンの抗炎症作用について調べた。その結果、イダゾキサンはこれまでの知見と同様に、NOおよびTNF- α の分泌を減少した。また、NF- κ BおよびAP-1のDNA結合量を減少したことから、新たに転写因子の活性化も抑制することが示された。よって、イダゾキサンはシグナル経路に作用すると推察された。そこで、炎症応答に関与するシグナル分子であり、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は抗酸化ストレスシグナルであるNuclear factor erythroid 2 related factor 2 (Nrf2)経路に関与する。p62はNrf2を抑制するKelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1)と結合することでNrf2を活性化する。また、Keap1と結合したp62はオートファジーにより選択的に分解されることが知られている。まず、イダゾキサンがp62を誘導し分解により減少するのか、p62の変化を経時的に調べることで検証した。その結果、イダゾキサンを8、12時間処理した条件ではp62量が増加したが、

36、48 時間後には薬剤未処理よりも減少した。さらに、イダゾキサンの誘導により p62 を増加したことを確認するため、増加した p62 の状態を調べた。p62 は誘導された後、凝集していない状態から、分解をうける前には凝集した状態で存在する。よって、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、それは誘導により増加したことが示される。また、凝集していない p62 は界面活性剤である Triton X-100 に可溶だが、凝集した p62 は不溶化する。その性質を利用して、増加した p62 の状態を調べた。その結果、イダゾキサンにより、可溶性画分では明らかな p62 の増加が認められたのに対し、不溶性画分での p62 の増加はわずかであった。よって、イダゾキサンは、p62 を誘導し、その後、分解により減少させたと推察された。従って、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、イダゾキサンは Nrf2 を活性化することも報告されていることから、イダゾキサンによる抗炎症作用も p62 が関与する可能性が考えられた。

【結論】

本研究より、イダゾキサンを初めとする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明かにした。また、その誘導作用は mTOR や I₁ 受容体を介した作用ではなく、他のオートファジー誘導剤と異なることを示した。そして、作用メカニズムについての解析から、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は、p62 を主要制御因子とした作用である可能性が示唆された。これは、新たに p62 を介したオートファジーの誘導作用およ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、その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。

試問結果の要旨

2019年 2月 13日

学位申請者	中川詩織	
審査委員	主査	和田戈虹 
	副査	森田邦彦 
	副査	川崎清史 
<p>(要旨)</p> <p>公開で行われた博士論文発表会、および審査委員（主査・副査）による面談において、申請者に対して試問が行われた。その結果、申請者の研究の新規性、独自性、そして薬学上の価値を確認できた。さらに薬学上の見識を備えた人物であることが確認でき、博士（薬学）の学位を授与するにふさわしい人物であると判断できた。以下に試問のやりとりをまとめる。</p> <p><u>質問1</u>「イダゾキサンを調べた理由は何か」 <u>回答1</u>「イダゾキサンの抗炎症作用を持つこと、類似化合物がオートファジー誘導作用を持つことから、抗炎症作用とオートファジー誘導作用を併せ持つと考えた」</p> <p><u>質問2</u>「ラパマイシンと比較してイダゾキサンの濃度が高い。特異性が低いのではないか。非特異的な現象を見ている可能性がある。生体レベルで意味のある現象になるのか。」 <u>回答2</u>「ラパマイシンと比較して高い濃度が必要なのは作用メカニズムの違いによると考えている。濃度が高いため非特異的な現象なのではないかという点は、同じくらい高濃度で用いているイミダゾリン誘導体間でもオートファジー誘導作用が異なる化合物が存在するのでイダゾキサン特有の作用だと考えられる。生体レベルで意味のある現象なのかという点で、オートファジーの性質から今回の実験条件は細胞にとって非常に極端な状態を見ていると考えている。しかし、イダゾキサンの作用メカニズムを調べるうえで極端であっても、その結果より、作用メカニズムや作用する因子を明らかすれば、今後、低濃度で作用する化合物を探し出すことなどができると考えている。」</p> <p><u>質問3</u>「イミダゾリン化合物のオートファジー誘導について、構造活性相関が認められるのではないか」 <u>回答3</u>「現時点で調べているイミダゾリン誘導体のうち、オートファジー誘導作用を持つ化合物と持たない化合物、それぞれに骨格の相関があるのかわからない。誘導された LC3-II の量については、実験条件による影響をうけてオートファジー誘導作用が見てない可能性も含んでおり、明確に区別がつけきれていないこともある」</p>		

質問4 「シグナル伝達について、mTOR や JNK と比べると、p62 はその誘導の仕組みがブラックボックスになっており、結局よくわからないのでは。なぜ、p62 を選択したか、I₂受容体の可能性は考えなかったのか。」回答4 「イダゾキサンの作用に対し、p62 へ注目した理由は、オートファジー誘導作用と抗炎症作用の関係性を考えたときに、関与するのではないかと考えたから。I₂受容体については、これまでの知見で、RAW264.7 細胞においてイダゾキサンに結合するイミダゾリン受容体関連タンパク質がないと報告されていることから I₁受容体と同様に可能性が低いと考えた。」

質問5 「イダゾキサンの作用は p62 増加、Nrf2 の活性化が主流であって、オートファジーは p62 の作用によるものではなく、単に p62 のような不要物質のゴミ掃除のために起きたのでは？」回答5 「その可能性もあるが、p62 はオートファジーの選択的な基質として知られており、ゴミ掃除、非特異的な分解よりも選択的な分解に関わると報告されている。よって、オートファジーは p62 を分解するために誘導されたのではないかと私は考えている。」

質問6 「オートファジーの誘導が抗炎症作用に関与しているのではなく、オートファジーは副作用みたいなもの、それぞれ別個の作用ではないのか。その二つの作用の関与を証明するためにどのような実験を計画しているのか」回答6 「その点はさらに検証する必要がある。しかし、まずオートファジーの誘導作用と p62 の誘導と関連を証明できていないのでそちらを進めてから、クロストークなどについては検討しようと考えている。その方法としては p62 と Keap1 の結合やオートファゴソーム膜との共局在性を調べたり、リン酸化 p62 などの p62 活性化を調べるなどにより行うことを考えている。」