

学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類	博 士	氏 名	保科 千里
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Paraquat toxicity is attenuated by 4-phenylbutyrate-induced phosphorylation of ERK2 via PI3K in A549 cells (4-フェニル酪酸はERK2のリン酸化を介してパラコート毒性を抑制する)</p> <p>共 著 者 名</p> <p>大村友博、奥田勝博、田中宏樹、浅利 優、磯崎翔太郎、堀岡希衣、山田ひろみ、土井大輝、塩野 寛、松原和夫、清水恵子</p> <p>Biochemical and Biophysical Research Communications 503巻：809頁-814頁、2018年</p> <p>研 究 目 的</p> <p>パラコートは世界で汎用されている除草剤であるが、その毒性により肺線維症等の障害を引き起こす。パラコート中毒に対する治療法はまだまだなく、我々はパラコートによる肺障害を抑制する化合物について研究してきた。今回我々は、4-フェニル酪酸がパラコート毒性を抑制する実験結果を得てそのメカニズムについて検討した。4-フェニル酪酸はケミカルシャペロン（小胞体ストレスを緩和する低分子化合物）やヒストン脱アセチル化酵素阻害剤として広く研究されているが、生存シグナル伝達経路に関する研究はまだ少なく議論の余地がある。本研究は、4-フェニル酪酸がパラコート毒性を抑制する経路に細胞内生存シグナル伝達経路が関与するか否かを検討することを目的とした。またパラコートの毒性機序として酸化ストレスが知られることから¹⁾、4-フェニル酪酸の細胞保護メカニズムを抗酸化剤トロロックスと比較した。</p> <p>材 料 ・ 方 法</p> <p>ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞 A549 を培養して実験に用いた。まず、細胞生存率を MTTアッセイ法で評価し、4-フェニル酪酸がパラコート毒性を抑制することを確認した。次に、主要な生存シグナル伝達キナーゼ Akt 及び ERK のリン酸化、抗酸化酵素カタラーゼ及び SOD2 の発現量をウエスタンブロット法により測定した。そして、4-フェニル酪酸の細胞保護メカニズムに PI3K/Akt 経路及び MEK/ERK 経路が関与するか否かを PI3K阻害剤 LY294001 及び MEK阻害剤 U0126 を用いて、MTTアッセイ法 及びウエスタンブロット法で検討した。</p>			

成 績

A549 細胞の細胞生存率は、パラコート (250 μ M) 曝露 24 時間後に約 30%減少したが、4-フェニル酪酸 (5 mM) またはトロロックス (1 mM) との同時曝露では約 10%の減少に留まった。これにより、4-フェニル酪酸とトロロックスに細胞保護効果があることが確認された。

パラコートと 4-フェニル酪酸の同時曝露 3 時間後において、リン酸化ERK2 の発現量が増加した。リン酸化Akt の発現量は増加傾向が観察されたが有意差は認められなかった。一方、24 時間後ではパラコート単独投与で ERK 及び Akt のリン酸化が増加し、4-フェニル酪酸やトロロックスの影響は観察されなかった。パラコートとトロロックスの同時曝露では Akt と ERK のリン酸化に変化は認められなかった。

Akt または ERK のリン酸化阻害により 4-フェニル酪酸の細胞保護効果が抑制されるか否かを、LY294002 と U0126 を用いて検討した。LY294002 で Akt のリン酸化を阻害すると、4-フェニル酪酸によるパラコート毒性抑制効果が阻害され、リン酸化ERK2 の発現量増加も阻害された。一方、U0126 で ERK のリン酸化を阻害したときは、4-フェニル酪酸によるパラコート毒性抑制効果は阻害されず、Akt のリン酸化が亢進した。トロロックスによる細胞保護効果は LY294002 及び U0126 の影響を受けなかった。

パラコートと 4-フェニル酪酸の同時曝露 24 時間後にカタラーゼの発現量が増加したが、その発現量増加に LY294002 及び U0126 による影響は認められなかった。同条件での SOD2 の発現量及び、パラコートとトロロックスの同時曝露でのカタラーゼ、SOD2 の発現量に変化は認められなかった。

考 案

4-フェニル酪酸とトロロックスは A549細胞においてどちらもパラコート毒性を抑制したが、そのメカニズムは異なっており、4-フェニル酪酸は細胞内生存シグナル伝達経路に影響を及ぼすことが明らかとなった。

パラコートと4-フェニル酪酸の同時曝露でリン酸化ERK2 の発現量が増加したこと及び PI3K阻害剤 LY294002 により ERK2 のリン酸化が阻害され細胞保護効果も抑制されたことから、4-フェニル酪酸は PI3K を介した ERK2 のリン酸化によりパラコート毒性を抑制したと考えられた。

ERK のリン酸化は一過性か持続性かでその効果が異なることが報告されている²⁾。4-フェニル酪酸は、パラコート毒性による ERK リン酸化の増加よりも早く一過性の ERK2 のリン酸化を誘導して細胞を保護することが示唆された。また、U0126 で ERK のリン酸化を阻害すると Akt のリン酸化が亢進して細胞保護効果が阻害されなかったことから、4-フェニル酪酸のパラコート毒性抑制経路において ERK2 と Akt が相補的に働くメカニズムが示唆された³⁾。

4-フェニル酪酸によりカタラーゼの発現量は増加したが、LY294002 の同時投与ではカタラーゼの増加が阻害されなかったにもかかわらず細胞保護効果が阻害された。このことからカタラーゼの増加はパラコート毒性に対する細胞保護効果に関与しないことが示唆された。

トロロックスは ERK と Akt のリン酸化をもたらさず、カタラーゼと SOD2 の発現量にも影響を及ぼさなかった。トロロックスは、パラコートによって産生される活性酸素種や活性窒素種¹⁾を還元する抗酸化作用により細胞を保護すると考えられた。

結 論

1. 4-フェニル酪酸とトロロックスはどちらもパラコート毒性を抑制したが、そのメカニズムは異なっていた。
2. 4-フェニル酪酸は、PI3K を介した ERK2 のリン酸化によりパラコート毒性を抑制したと考えられた。
3. 4-フェニル酪酸によるカタラーゼの増加は、パラコート毒性に対する細胞保護効果に関与しないことが示唆された。
4. トロロックスは抗酸化剤としてパラコートの酸化ストレスを緩和したと考えられた。

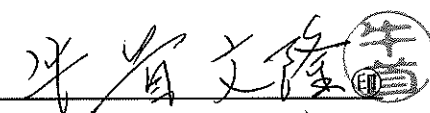
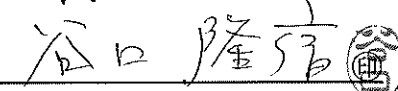
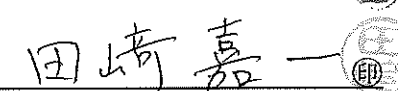
引 用 文 献

1. T. Herraiz, N-methyltetrahydropyridines and pyridinium cations as toxins and comparison with naturally-occurring alkaloids, *Food Chem. Toxicol.* 97 (2016) 23-39.
2. J.C. Chambard, R. Lefloch, J. Pouysségur, P. Lenormand, ERK implication in cell cycle regulation, *Biochim. Biophys. Acta* 1773 (2007) 1299-1310.
3. M.C. Mondoza, E. Emrah Er, J. Blenis, The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation, *Trends Biochem. Sci.* 36 (2011) 320-328.

参 考 論 文

1. T. Omura, M Asari, J. Yamamoto, N. Kamiyama, K. Oka, C. Hoshina, C. Maseda, T. Awaya, Y. Tasaki, H. Shiono, K. Shimizu, K. Matsubara, HRD1 levels increased by zonisamide prevented cell death and caspase-3 activation caused by endoplasmic reticulum stress in SH-SY5Y cells, *J. Mol. Neurosci.* 46 (2012) 527-535
2. T. Omura, M. Asari, J. Yamamoto, K. Oka, C. Hoshina, C. Maseda, T. Awaya, Y. Tasaki, H. Shiono, A. Yonezawa, S. Masuda, K. Matsubara, K. Shimizu, Sodium tauroursodeoxycholate prevents paraquat-induced cell death by suppressing endoplasmic reticulum stress responses in human lung epithelial A549 cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 432 (2013) 689-694.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏 名	保科 千里
<div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-bottom: 10px;"> <div style="text-align: center;">審査委員長 </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-bottom: 10px;"> <div style="text-align: center;">審査委員 </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;">審査委員 </div> </div>			
<p>学位論文題目</p> <p>Paraquat toxicity is attenuated by 4-phenylbutyrate-induced phosphorylation of ERK2 via PI3K in A549 cells</p> <p>(4-フェニル酪酸は ERK2 のリン酸化を介してパラコート毒性を抑制する)</p> <p>掲載雑誌</p> <p>Biochemical and Biophysical Research Communications</p> <p>503 巻 : 809-814 頁、2018 年</p>			
<p>パラコートは除草剤として広く市販され一般民間人でも容易に入手できることから、しばしば事故の原因となり傷害事件でも用いられる。したがって、その対策として、社会的な取組はもとより、医学的な対策も求められている。</p> <p>申請者は、パラコート毒性に対する4-フェニル酪酸 (4PBA) と抗酸化物質Troloxの緩和作用及びその分子機構の解明を行った。4PBAとTroloxは、パラコートによるA5494細胞のアポトーシスを抑制した。この時、4PBAはPI3Kを介してAktリン酸化を亢進させ生存シグナルを増強することが示された。一方、Troloxは生存シグナルに関わるキナーゼのリン酸化に影響を与なかった。申請者は、パラコート毒性の主体である酸化ストレスに対する消去系についても検討している。その結果、4PBAはその毒性緩和作用とは独立してCatalaseの発現を亢進した。一方、TroloxはCatalaseやSODの発現に影響を与えず、自身のもつ抗酸化作用によりパラコート毒性を緩和すると考えられた。</p> <p>本研究は、4PBA のパラコート毒性に対する緩和作用の新規メカニズムを解明したことから、当該分野の発展に大きく貢献するものである。また、パラコート中毒に対する治療に示唆を与えるものであり、その意義は大きいと考えられる。</p> <p>なお、論文提出者に対し各審査委員より、本論文とその関連領域に関して試問が行われ、適切な回答が得られた。</p> <p>以上より、本論文は博士の学位論文として適切であると判定した。</p>			