

平成10年度厚生科学研究費補助金  
長寿科学総合研究事業 研究報告書

---

老化関連疾患の病態形成における  
生体内金属イオン調節機構の  
役割に関する研究

---

1999・3

主任研究者 小川紀雄  
(岡山大学医学部教授)

# 平成10年度厚生科学研究費補助金 長寿科学総合研究事業 研究報告書

研究課題名： 老化関連疾患の病態形成における生体内金属イオン  
調節機構の役割に関する研究

主任研究者： 小川 紀雄（岡山大学医学部神経情報学部門 教授）

## 研究組織：

小川紀雄 岡山大学医学部分子細胞医学研究施設神経情報学部門 教授

浅沼幹人 岡山大学医学部分子細胞医学研究施設神経情報学部門 助手

十川千春 岡山大学歯学部歯科薬理学講座 助手

岩井一宏 京都大学大学院医学研究科感染・免疫学講座 助教授

難波正義 岡山大学医学部分子細胞医学研究施設細胞生物学部門 教授

三野善央 岡山大学医学部衛生学講座 助教授

## 目 次

### <総括研究報告書>

「老化関連疾患の病態形成における生体内金属イオン調節機構の役割に関する研究」

小川 紀雄（岡山大学医学部分子細胞医学研究施設神経情報学部門）... 5

### <分担研究報告書>

「老化モデル動物の脳内金属代謝の解析」

小川 紀雄（岡山大学医学部分子細胞医学研究施設神経情報学部門）... 11

「銅イオンとドーパミン系化合物の結合による障害の発現機序に関する検討」

浅沼 幹人（岡山大学医学部分子細胞医学研究施設神経情報学部門）... 17

「メタロチオネイン-IIIの発現様式と神経生存維持の検討に関する研究」

十川 千春（岡山大学歯学部歯科薬理学講座）... 22

「鉄代謝のマスター蛋白，IRP2の神経変性疾患への関与に関する研究」

岩井 一宏（京都大学大学院医学研究科感染・免疫学講座）... 27

「老化を示すヒト性状線維芽細胞と不死化ヒト線維芽細胞とに対する

鉄イオンの影響に関する研究」

難波 正義（岡山大学医学部分子細胞医学研究施設細胞生物学部門）... 31

「老化性疾患と金属代謝に関するデータベースの作成」

三野 善央（岡山大学医学部衛生学講座）... 35

# 総括報告書

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）  
総括研究報告書

老化関連疾患の病態形成における生体内金属イオン調節機構の  
役割に関する研究

主任研究者 小川 紀雄

岡山大学医学部分子細胞医学研究施設神経情報学部門教授

研究要旨

老化関連疾患の制御を目指して、生体での金属イオン調節異常の役割を検討した。病的老化モデルの脳皮質ではトランスフェリン、フェリチンの異常から、遊離鉄増加の可能性のあること、銅イオンが鉄よりも高いフリーラジカル生成能と脂質過酸化能を示し、ドパミン系化合物は銅と配位することによってそれを抑制すること、鉄代謝制御因子 IRP2 の RNA 結合活性がアルミニウムで増強されて鉄代謝異常を来すこと、IRP2 ノックアウトマウスでは加齢により十二指腸上皮での鉄蓄積と歩行異常を来すこと、メタロチオネイン-III (MT-III) mRNA の発現誘導増加は活性酸素種によって制御されていること、Parkinson 病モデル脳では MT-III mRNA 発現が低下しており、L-DOPA 投与による正常の増加反応がみられないこと、正常細胞に比較して不死化細胞は鉄に対する感受性が高く発がんに関与している可能性のあること等を明らかにした。以上のように、老化に関連した疾患のモデルには、鉄、銅、アルミニウム、亜鉛の調節機構の異常が関与していることを明らかにした。

分担研究者

浅沼幹人 岡山大学医学部分子細胞医学  
研究施設神経情報学部門 助手  
十川千春 岡山大学歯学部歯科薬理学講座  
助手  
岩井一宏 京都大学大学院医学研究科  
感染・免疫学講座 助教授  
難波正義 岡山大学医学部分子細胞医学  
研究施設細胞生物学部門 教授  
三野善央 岡山大学医学部衛生学講座  
助教授

目的として、昨年度は基礎的検討を行った。

本年度は、試験管内での研究に加えて、生体試料、培養細胞、ノックアウトマウスの作成などを組み入れ、生体での金属イオン代謝異常の役割をより明確にすることを目指した。具体的には、① 病的老化モデル動物における鉄結合タンパク質トランスフェリン、フェリチンの検討、② 銅イオンとドパミン (DA) 系化合物 (DA, L-DOPA, 6-ヒドロキシドパミン (6-OHDA)) とによるフリーラジカル生成・脂質過酸化・DNA 傷害の検討、③ DA と 6-OHDA による亜鉛結合タンパク質メタロチオネイン-III (MT-III) の mRNA 発現量増加の機序と防御法の検索、Parkinson 病モデルにおける MT-III mRNA 発現変化と L-DOPA 投与の効果、④ 鉄代謝制御タンパク質 IRP2 の RNA 結合

A. 研究目的

生体内の金属イオン調節機構とその異常機序を明らかにすることによって老化および老化関連疾患の有効な制御法を開発することを

活性を高める鉄イオン以外の因子の検索、ノックアウトマウスを作製することによって IRP2 タンパク質の機能の明らかにすること、⑤ ヒト正常細胞と不死化細胞に対する鉄の傷害作用とその機序の差異の検討、⑥ 本研究の各分担研究者の行っている研究テーマの妥当性と位置づけ、さらには研究分担者の有機的な連携をはかるためのデータベースの作成、等を行った。

## B. 研究方法

① 病的老化モデル動物として老化促進マウス(SAM) P-10 を用い、対照動物として R-1 系マウスを用いた。これらの動物の脳切片でのトランスフェリン、フェリチン陽性細胞を免疫組織化学染色で検出した。

② 銅イオンおよび DA 系化合物の水酸化ラジカル (HO $\cdot$ ) 生成系と脂質過酸化系への影響を電子スピン共鳴装置と過酸化脂質の定量により検討した。

③ 神経芽細胞腫株 Neuro2A を、各種金属イオン存在下で培養し、IRP2 の RNA 結合活性を gel shift assay で、また、IRP2 より発現が制御されるトランスフェリン受容体、フェリチンの産生量を免疫沈降法で検索した。また、精製 IRP2 を用いて、その酸化変化を解析した。さらに、常法に従い、IRP1 および IRP2 ノックアウトマウスを作製した。

④ グリア細胞株に各種薬剤を添加して培養後、RNA を抽出して RT-PCR を用いて MT-III mRNA 発現誘導の変化を調べた。また、6-OHDA を片側黒質-線条体路に注入した hemi-parkinsonism ラットに L-DOPA を腹腔内投与し、黒質および線条体の MT-III mRNA 発現変化を調べた。

⑤ 正常ヒト線維芽細胞と、コバルト 60  $\gamma$ -線照射で不死化した細胞を用い、鉄の影響を細胞増殖率とコロニー形成率で調べた。

⑥ 各分担研究者を対象として「物質」、「方法・部位」、「病態」の3項目に関してキーワードを記入する質問紙調査を行った。次に、

それらのキーワードを含む過去の医学論文を「Medline」で検索し、得られた情報をもとにして本研究領域に関するデータベースを作成した。

## C. 研究結果

① 脳内のトランスフェリン陽性細胞は、加齢に伴って病的老化モデル SAM P-10 の大脳皮質と海馬の CA1 領域では著明に検出されたのが特徴的であった。また、フェリチン陽性細胞は、SAM P-10 の海馬 CA3 領域では 6, 12 カ月齢で特に出現した。

② Cu(II)で著明な HO $\cdot$ の生成がみられ、その生成量は、Fe(II), Fe(III)の場合に比べて 10 倍以上高かった。銅イオンによる HO $\cdot$ 生成は DA, L-DOPA 添加によって著明に、6-OHDA によって軽度に抑制された。また、Cu(II)を脳ホモジネートに添加しても過酸化脂質に変化はなかった。脳ホモジネートに Cu(II)と DA 系化合物を加えた場合には脂質過酸化は著明に抑制された。

③ 神経芽細胞腫株 Neuro 2A ではアルミニウムの添加により IRP2 の RNA 結合活性、タンパク量ともに増加し、それによってトランスフェリン受容体の産生増強とフェリチンの産生低下が認められた。また、鉄イオンによる精製 IRP2 の酸化修飾がアルミニウムの共存により抑制された。また、作製した IRP1 ノックアウトマウスは少なくとも 15 カ月齢まで異常が認められず、同マウスの胎児線維芽細胞では鉄代謝異常は認められなかった。これに対して、IRP2 ノックアウトマウスは、加齢により十二指腸上皮での鉄の蓄積が認められるのに加えて、歩行異常を来とし、消化器系と神経系での異常が示唆された。

④ MT-III mRNA は DA と 6-OHDA によって著しく発現量が増加したが、この増加は抗酸化剤によって抑えられた。DA アゴニストやアンタゴニストでは変化しなかった。また、parkinsonism モデルラットの線条体では、MT-III mRNA 発現レベルは有意に減少してお

り、正常でみられる L-DOPA 投与による増加反応はみられなかった。

⑤ 正常細胞に比べ不死化細胞のほうが鉄に対する感受性が高く、強い細胞傷害を示した。また、鉄の添加では、正常細胞と不死化細胞とで有意な LDH の遊出は認められなかった。このことから、細胞の鉄による傷害は細胞の膜ではなく、ミトコンドリアをターゲットにしていることが判明した。

⑥ 班員の挙げたキーワードを含む論文数は、「物質」では DNA、鉄、亜鉛、グルタチオン、ラジカル、銅、過酸化水素、脂質過酸化、SOD、トランスフェリン、アルミニウム、カタラーゼの順に多かった。「方法・部位」では、RNA、神経細胞、大脳皮質、ネクローシス、ドパミン、海馬、アポトーシスの順で、さらに、「病態」では、がんに関する論文数が圧倒的に多く、次いで神経細胞死、老化、Alzheimer 病、Parkinson 病の順であった。

#### D. 考察

鉄イオンの細胞内外の輸送、細胞内貯蔵にはそれぞれトランスフェリン、フェリチンという鉄結合タンパクが重要な役割を果たしている。大脳皮質においては、対照 R-1 系マウスの 12 カ月齢でトランスフェリンよりもフェリチンの優位な増加であるのに対して、SAM P-10 では逆にトランスフェリン陽性細胞の優位な増加が認められ、SAM P-10 の大脳皮質では鉄の取り込みが貯蔵よりも亢進し、遊離鉄が増加しており、神経細胞傷害性が強まっていると考えられる。

鉄代謝に関して、アルミニウムが IRP2 の IRE 結合活性増強因子であることを示したが、これは脳内での鉄代謝とアルミニウム代謝との密接な共役を示すものである。さらに、IRP1 ノックアウトマウスを作製したが、少なくとも 15 カ月齢までは異常が見られなかった。これに対して、IRP2 ノックアウトマウスにおいては十二指腸上皮での鉄の蓄積、歩行異常という症状が認められ、消化器系と神経系にお

ける IRP2 の重要性が示唆された。

銅イオンは Fenton 様反応を含む連鎖的なラジカル生成機構を介して鉄イオンよりも強い HO $\cdot$ 生成能を示した。銅イオンによる HO $\cdot$ 生成は DA 系化合物の添加により抑制されたが、これは銅イオンがこれらの DA 系化合物と配位したためと考えられる。この HO $\cdot$ 生成抑制により、銅イオンと DA 系化合物の結合体が、脳ホモジネートの脂質過酸化に対して抑制効果を発揮した。

亜鉛は多くの酵素反応や DNA の合成に必須の金属であるが、さらに脳内ではグルタミン酸による神経伝達の調節という重要な役割を担っている。亜鉛代謝調節タンパク質で脳に特異的に発現している MT-III は、培養グリア細胞において DA や 6-OHDA による mRNA 発現誘導の増加がみられるが、これは DA レセプターを介するものではなく、フリーラジカル・活性酸素種によってもたらされていることを明確にした。このことから、DA 系化合物のラジカル産生や消去、細胞傷害性といった二面性に対して、脳内 MT-III は加齢に伴う金属代謝異常と DA 低下による神経細胞死に深く関与しているといえる。Parkinson 病の病態モデルでは線条体の MT-III mRNA 発現レベルは有意に減少しており、正常でみられる L-DOPA 投与による増加反応はみられなかった。したがって、Parkinson 病脳では MT-III などによる生体側のラジカル消去能が低下しており、L-DOPA 投与によって正常であれば生じるはずの生体反応の増加がみられないために病態が進行するという可能性が示唆された。

今年の報告書で、ヒト正常線維芽細胞は不死化細胞に比べ多くのトランスフェリンを合成しているので、鉄の細胞傷害作用は不死化細胞にくらべ正常細胞のほうが軽いのではないかと推定した。今回の検討で、予想したように不死化細胞のほうが正常細胞にくらべ鉄の細胞傷害を強く示すことも分かった。また、鉄による細胞傷害はミトコンドリアをターゲ

ットにしていることが分かった。不死化細胞は著しい染色体の変化を示し、長期にわたって培養されると腫瘍性になる場合が多いことを考え合わせると、トランスフェリンの減少している不死化細胞は、正常細胞に比べて酸化ストレスに過敏になっていると考えられる。さらに、上述のように、IRP2 ノックアウトマウスにおいては十二指腸上皮での鉄の蓄積が認められることから、IRP2 欠如と沈着鉄が消化管のがん化に作用するか否かの検討が重要な研究課題となった。

本研究班のように様々な背景と研究領域を持つ班員で構成された研究班においては、情報の共有化によって新たな研究の進展が期待できる。それを促進するためにも各分担研究者が興味を持ち、しかも精力的に研究している領域のデータベースの作成は重要である。検討の結果、われわれが行い、かつ目指している方向は重要で今後の研究の発展が予想されることが確認できた。

## E. 結論

昨年の基礎的検討に続いて、老化および老化関連疾患制御の端緒を拓くことを目的として生体での金属イオン調節機構の異常の役割をより明確にするとの方針で研究した。その結果、金属イオンの側面から本年度の研究成果をみると、老化に関連した疾患のモデルにおいて、鉄、銅、アルミニウム、亜鉛の調節機構の異常が関与している可能性が高いこと、しかも、個々の金属イオン調節の重要性もさることながら、各金属イオンの調節機構が相互に密接に関連していることも明らかにした。

# 分担報告書



厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）  
分担研究報告書

老化モデル動物の脳内金属代謝の解析

主任研究者 小川 紀雄

岡山大学医学部分子細胞医学研究施設神経情報学部門 教授

研究要旨

鉄結合タンパクの加齢に伴う脳内変化を明らかにするために、老化促進マウスの脳内トランスフェリン、フェリチンの変化を免疫組織化学的に検討した。加齢により大脳皮質、海馬のトランスフェリン、フェリチン陽性細胞は増加しており、これらの部位では遊離鉄、貯蔵鉄がともに増加し、フリーラジカルが発生しやすく神経細胞が傷害されやすい環境にあることを示した。さらに、亜鉛代謝調節タンパクのメタロチオネイン(MT)-III mRNA の Parkinson 病モデルラット脳内での発現と levodopa 投与の影響を解析した。Parkinson 病モデルの黒質-線条体系の MT-III mRNA 発現は down-regulate されており、また levodopa 投与により正常であれば生じるはずの MT-III mRNA の増加がみられず、生体の反応性が低下していることを明らかにした。

A. 研究目的

生体はその代謝活動に種々の金属を利用しているが、その反面、これら金属が惹起する酸化ストレスを受ける危険に常にさらされている。老化による神経細胞死の原因として酸化ストレスの増加が注目されており、そのメカニズムの一つとして脳内の金属代謝の破綻が想定される。老化に伴う脳内の金属代謝の変化を検討するために、昨年度は老齢ラット脳内の微量金属（鉄、銅、亜鉛、アルミニウム）の含有量を原子吸光光度計を用いて測定し、鉄および銅は加齢によりいくつかの脳部位で増加しており、老化脳が酸化ストレスを生じやすい環境にあることを示した。また、神経伝達機構に重要である亜鉛は加齢により減少し、老化脳ではこれら金属の代謝に異常が生じている可能性を明らかにした。本年度は、これら微量金属の代謝に関係する金属結合タンパクの加齢に伴う脳内変化を明らかにするために、鉄イオン調節タンパクで

あるトランスフェリン、フェリチンの脳内変化を老化促進マウス(SAM)P-10 を用いた免疫組織化学法により検討した。

一方、中枢神経系に特異的に発現する亜鉛代謝調節タンパクのメタロチオネイン (metallothionein; MT)-III は、Alzheimer 病、Parkinson 病患者脳で減少していることから神経変性疾患との関連が注目されているものの、その作用および発現調節などは未だ十分に解明されていない。昨年度、分担研究者の十川らはグリア細胞においてドパミンと levodopa により MT-III mRNA の発現誘導が高まることを明らかにした。そこで、本研究では脳内 MT-III の役割および誘導調節を明らかにするために、6-hydroxydopamine (6-OHDA) の黒質-線条体路注入により作製した Parkinson 病モデルラットを用いて、黒質-線条体系での MT-III mRNA 発現、さらには levodopa 投与後の変動を解析した。

B. 研究方法

1. SAM P-10 脳のトランスフェリン, フェリチン免疫組織化学法

病的老化モデル動物として3, 6, 12ヵ月齢の老化促進マウス(SAM)P-10を用いた。対照動物として月齢の一致したR-1系マウスを用いた。Sodium pentobarbital 深麻酔下(70 mg/kg, i.p.)で4% paraformaldehydeによる経左心室灌流固定を行い, 脳を取り出し, 4%

paraformaldehyde, 15% sucrose 中にそれぞれ24, 48時間静置し, その後20 μm厚の凍結切片を作製した(各群 n=4)。脳切片での鉄結合蛋白トランスフェリン, フェリチン陽性細胞の検出は, それぞれに対するポリクローナル抗体を用いたABC法による免疫組織化学染色で行い, シグナルは nickel-diaminobenzidine により増感した。

表1 SAM P-10 におけるトランスフェリン, フェリチンの脳内変化

トランスフェリン陽性細胞

	R-1系					P-10系				
	大脳皮質	脳梁	線条体	海馬	黒質	大脳皮質	脳梁	線条体	海馬	黒質
3ヵ月	+	++	++	+~±	+	++	++	+++	±~+	+
				(CA3)					(CA1,3)	
6ヵ月	++	++	+	+~±	+	+++	++	++	+	+
				(CA3)					(CA1,3,4)	
12ヵ月	++	++	+	+	+~±	+++	++	+	+	+
				(CA3)					(CA1,3)	

フェリチン陽性細胞

	R-1系						P-10系					
	大脳皮質	脳梁	線条体	海馬	第三脳室	手綱核	大脳皮質	脳梁	線条体	海馬	第三脳室	手綱核
3ヵ月	++	+	+		++	+	+	+	+		++	++
6ヵ月	+++	++	++	++	++++	++	+	+	+~±	++	++	+++
				(CA3)						(CA3)		
12ヵ月	++++	++	++++	++	++	++	+	+	++	+++	+	+++
				(CA3,4)						(CA1,3)		

## 2. Parkinson 病モデルラット脳での MT-III の RT-PCR

正常動物に levodopa/carbidopa (10/1, 25/2.5, 50/5 mg/kg)をそれぞれ腹腔内投与し、12, 24, 48 時間後にそれぞれ線条体を摘出した。

6-OHDA を片側黒質-線条体路に注入して hemi-parkinsonism モデルラットを作製し、6-OHDA 処置 3 週間後に levodopa/carbidopa (25/2.5 mg/kg)を腹腔内投与し、24 時間後に黒質および線条体をそれぞれ左右に分けて摘出した。

摘出した各組織から acid-guanidium-phenol-chloroform (AGPC)法に従って total RNA を抽出し、DNase I (0.05U/ $\mu$ g RNA) 処理を行った。MT-III mRNA 発現レベルは、total RNA (0.04  $\mu$ g), MT-III cDNA に特異的な primer set と [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP を用いた reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)を 25 cycle で行い、PCR 生成物をポリアクリルアミドゲルで電気泳動し解析した。内部標準としては glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (G3PDH)を用いた。

### C. 研究結果

#### 1. SAM P-10 におけるトランスフェリン、フェリチンの脳内変化

SAM P-10 および対照 R-1 マウスの脳内トランスフェリン、フェリチン分布の加齢に伴う変化を表 1 に示した。

① 脳内のトランスフェリン陽性細胞は、3 カ月齢では R-1, P-10 系ともに脳梁、線条体 > 大脳皮質 > 海馬の錐体細胞層、黒質の順で分布していた。特に SAM P-10 では、線条体、大脳皮質、海馬 CA1, 3 領域で R-1 系よりも強いシグナルが認められた。加齢に伴いトランスフェリン陽性細胞は、R-1, P-10 系ともに線条体で減少し、脳梁、黒質では不変であったが、大脳皮質、海馬では逆に増加した。特に 12 カ月齢の SAM P-10 の大脳皮質では著明なトランスフェリン陽性細胞の集積がみられ

た。また、SAM P-10 では海馬の CA1 領域でトランスフェリン陽性細胞がみられたのが特徴的であった。これらのトランスフェリン陽性細胞は、主に oligodendrocyte であり、microglia においても認められた。

② フェリチン陽性シグナルは、3 カ月齢では R-1, P-10 系ともに第三脳室周囲視床下核 > 大脳皮質、手綱核 > 脳梁、線条体の順で分布していた。R-1 系マウスでは加齢に伴いフェリチン陽性細胞が大脳皮質、手綱核、脳梁、線条体で増加したのに対して、SAM P-10 では不変あるいは軽微な増加にとどまった。さらに、海馬では R-1, P-10 系ともに 3 カ月齢で認められなかったフェリチン陽性細胞が、6, 12 カ月齢で特に CA3 領域において認められた。これらのフェリチン陽性細胞は、主に microglia や astrocyte であった。

#### 2. Parkinson 病モデルラット脳内 MT-III mRNA の変化と levodopa の影響

① 線条体での MT-III mRNA 発現レベルは levodopa/carbidopa 25/2.5, 50/5 mg/kg で 24 時間後に有意に増加した (図 1)。また、この増加は用量依存性であった。

levodopa/carbidopa 25/2.5 mg/kg を用いた MT-III mRNA の経時的変化の検討では、levodopa 投与 24 時間後に有意に増加した。そこで、以下の実験では、levodopa/carbidopa は 25/2.5 mg/kg 投与し、24 時間後において検討した。

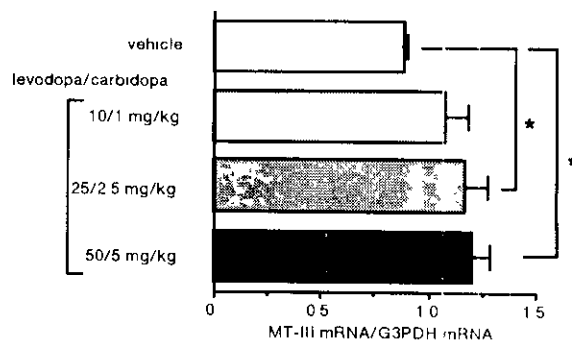


図1 levodopa/carbidopa投与24時間後の線条体MT-III mRNA発現量

\* $p < 0.05$  vs vehicle-treated group

② hemi-parkinsonism モデルラットを用いた検討では、6-OHDA 非投与（正常）側の線条体、黒質における MT-III mRNA 発現は、levodopa 投与により有意に増加した（図 2）。一方、6-OHDA 投与側の線条体では、MT-III mRNA 発現レベルは有意に減少しており、正常側でみられた levodopa 投与による増加反応はみられなかった（図 2 上）。

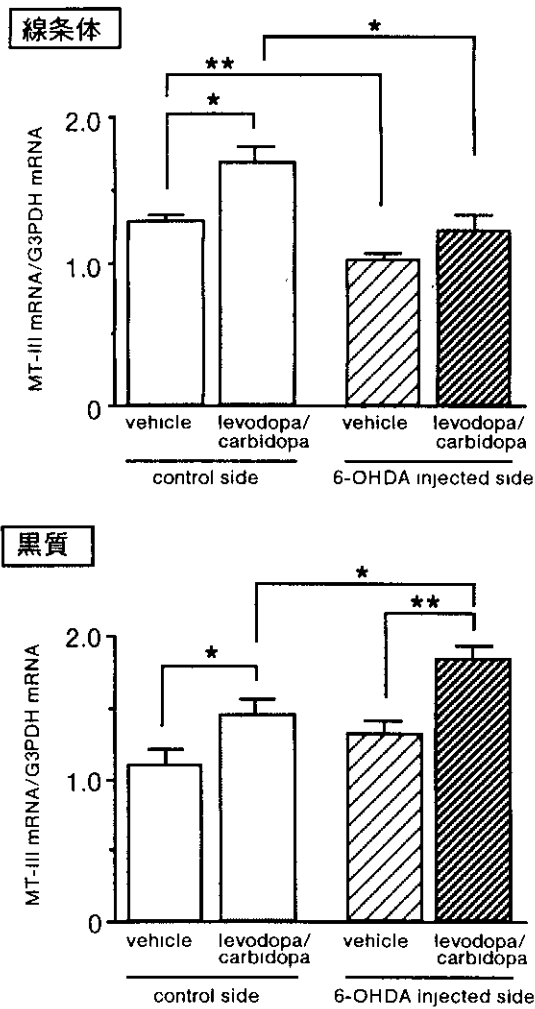


図2 Parkinson病モデルラット線条体、黒質におけるMT-III mRNAの発現と levodopa/carbidopa (25/2.5 mg/kg) 投与の影響  
\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  between indicated two groups

#### D. 考察

脳は種々の金属イオンをエネルギーの産生、酵素の生成、神経伝達等に利用している。特に鉄は脳内に高濃度に存在し、加齢によってその組織含有量は増加することが報告されている。昨年度われわれも老齢ラット脳内の微量金属（鉄、銅、亜鉛、アルミニウム）の含有量を原子吸光光度計を用いて測定し、鉄および銅は加齢によりいくつかの脳部位で成年対照ラットに比して増加していることを明らかにした。鉄や銅はフリーラジカルの発生素地となり得るため、老化脳が酸化ストレスを生じやすい環境にあることが示唆された。このような脳内に蓄積した過剰の金属は神経細胞にとって好ましくなく、加齢による神経細胞死の原因の一つになっている可能性がある。鉄イオンの細胞内外の輸送、細胞内貯蔵にはそれぞれトランスフェリン、フェリチンという鉄結合タンパクが重要な役割を果たしている。そこで本年度は、これらの金属結合タンパクの加齢に伴う脳内変化を SAM P-10 系マウスを用いて明らかにし、表 1 にまとめた。

トランスフェリン、フェリチンともに脳内では脳梁、線条体といった白質に富んだ部位、大脳皮質、海馬といった皮質の錐体細胞の周囲のグリア細胞に多くみられた。皮質（大脳皮質、海馬）ではトランスフェリン、フェリチン陽性細胞は、加齢に伴い増加しており、老化に伴いこれらの部位では鉄の取り込み・貯蔵が亢進し、遊離鉄、貯蔵鉄がともに増加し、フリーラジカルが発生しやすく神経細胞が傷害されやすい環境にあるといえる。大脳皮質においては、対照 R-1 系マウスの 12 ヶ月齢でトランスフェリンよりもフェリチンの優位な増加がみられるのに対して、SAM P-10 では逆にトランスフェリン陽性細胞の優位な増加が認められ、SAM P-10 の大脳皮質では鉄の取り込みが貯蔵よりも亢進し、遊離鉄が増加しており、R-1 系よりも神経細胞傷害性が強まっていると考えられる。一方、線条体

では加齢に伴いフェリチン陽性細胞は増加したが、トランスフェリン陽性細胞は逆に減少した。これは、老化脳の線条体では貯蔵鉄は増加しているものの、遊離鉄が減少していることを示唆しているのかもしれない。

亜鉛は多くの酵素反応やDNAの合成に必須の金属であるが、さらに脳内ではシナプス小胞に存在し、グルタミン酸による神経伝達の調節という重要な役割を担っている。亜鉛代謝調節タンパクのひとつで中枢神経系に特異的に発現しているMT-IIIは、神経成長抑制因子とも呼ばれ、Alzheimer病、Parkinson病患者脳で減少していることから神経変性疾患との関連が注目されている。昨年度、十川らは培養グリア細胞においてドパミン系作用薬（ドパミンとlevodopa）によりMT-III mRNAの発現誘導が高まることを明らかにしたが、本研究ではin vivoにおいてもlevodopaの単独投与により、正常の線条体のMT-III mRNA発現レベルが用量依存性に増加することを明らかにできた（図1）。われわれはlevodopa自体が酸化ストレスを惹起し、神経変性をさらに加速させる可能性を持つことを報告してきたが、MT-IIIがフリーラジカル（特にhydroxyl radical）消去能をもつことから、このlevodopaによるMT-III mRNAの発現増加は、levodopaによって発生する酸化ストレスに対する生体防御反応と考えられる。6-OHDAの黒質線条体路注入によるhemiparkinsonismモデルラットの正常側の線条体、黒質においても、MT-III mRNAはlevodopa投与により有意に増加した（図2）。一方、6-OHDA投与側の線条体のMT-III mRNA発現レベルは有意に減少しており、正常側でみられたlevodopa投与による増加反応はみられなかった（図2上）。この結果から、Parkinson病脳ではMT-IIIなどによる生体側のラジカル消去能が低下しており、levodopa投与によって正常であれば生じるはずの生体反応の増加がみられないために病態が進行するという可能性が示唆された。

## E. 結論

鉄結合タンパクであるトランスフェリン、フェリチンの加齢に伴う変化から、加齢により大脳皮質、海馬では鉄の取り込み・貯蔵が亢進し、遊離鉄、貯蔵鉄がともに増加し、フリーラジカルが発生しやすく神経細胞が傷害されやすい環境にあることを明らかにした。SAM P-10の大脳皮質では鉄の取り込みが貯蔵よりも亢進し、遊離鉄が増加しており、これが皮質の神経細胞傷害性ならびに老化促進性の一因となっていると考えられる。

Levodopaのin vivo投与は正常な黒質線条体系でのMT-III mRNA発現を増加させる。しかし、Parkinson病モデル脳ではMT-IIIがdown-regulateされており、levodopaに対する生体の反応性も低下している。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- ① Gómez-Vargas, M., Nishibayashi, Asanuma, S., Asanuma, M., Kondo, Y., Iwata, E. and Ogawa, N.: Pergolide scavenges both hydroxyl and nitric oxide free radicals in vitro and inhibits lipid peroxidation in different regions of the rat brain. *Brain Res.*, 790: 202-208, 1998.
- ② Kondo, F., Kondo, Y., Gómez-Vargas, M. and Ogawa, N.: Indomethacin inhibits delayed DNA fragmentation of hippocampal CA1 pyramidal neurons after transient forebrain ischemic in gerbils. *Brain Res.*, 791: 352-356, 1998.
- ③ Iida, K., Iwata, E., Asanuma, M., Asanuma, S.N., Gómez-Vargas, M., Miyazaki, I., Nakanishi, T. and Ogawa, N.: Effects of repeated cyclosporin A administration on iminodipropionitrile-induced dyskinesia and TRE-/CRE-binding activities in rat brain. *Neurosci. Res.*, 30: 185-193, 1998.
- ④ Aoki, C., Nakanishi, T., Sogawa, N., Ishii, K., Ogawa, N., Takigawa, M. and Furuta, H.:

Stimulatory effects of 4-methylcatechol, dopamine and levodopa on the expression of metallothionein-III (GIF) mRNA in immortalized mouse brain glial cells (VR-2g). *Brain Res.*, 792: 335-339, 1998.

- ⑤ Iwata, E., Miyazaki, I., Asanuma, M., Iida, A. and Ogawa, N.: Protective effects of nicergoline against hydrogen peroxide toxicity in neuronal cell line. *Neurosci. Lett.*, 251: 49-52, 1998.
- ⑥ Yunoki, M., Kawauchi, M., Ukita, N., Noguchi, Y., Nishio, S., Ono, Y., Asari, S., Ohmoto, T., Asanuma, M. and Ogawa, N.: Effects of lecithinized SOD on sequential change in SOD activity after cerebral contusion in rats. *Acta Neurochir. (Wien)*, 71 (Suppl.): 142-145, 1998.
- ⑦ Kondo, Y., Asanuma M., Iwata, E., Kondo, F., Miyazaki, I. and Ogawa, N.: Early treatment with cyclosporin A ameliorates the reduction of muscarinic acetylcholine receptors in gerbil hippocampus after transient forebrain ischemia. *Neurochem. Res.*, 24: 9-13, 1999.

## 2. 学会発表

- ① Kondo, Y. and Ogawa, N.: Late onset iron deposition, lipid peroxidation and neuronal cell death following transient forebrain ischemia in rat brain, Summer School '98 of The International Society of CBFM, 1998.
- ② Iwata, E., Asanuma, M., Kondo, Y., Miyazaki, I. and Ogawa, N.: Transcriptional response to oxidative stress in cultured neuronal and glial cells, III International Congress of Pathophysiology, 1998.
- ③ 田中健一, 和田尚子, 野村正彦, 小川紀雄: 脳血流慢性低灌流ラットで認められた脳内部位特異性における活性酸素の役割, 第71回日本薬理学会年会, 1998.
- ④ 近藤文雄, 近藤洋一, 飯田あづさ, 小川紀

雄: 一過性前頭虚血後の海馬 CA1 錐体細胞における遅発性神経細胞死に対する indomethacin の保護作用, 第25回日本脳科学学会, 1998.

- ⑤ 近藤洋一, 近藤文雄, 飯田基之, 小川紀雄: ラットの脳部位別金属含量の加齢による変化, 第25回日本脳科学学会, 1998.
- ⑥ 宮崎育子, 十川千春, 中西 徹, 加太英明, 岩田恵美, 近藤洋一, 浅沼幹人, 飯田基之, 小川紀雄: hemi-parkinsonism モデルラットの基底核における MT-III mRNA 発現と levodopa による誘導調節, 第21回日本神経科学・第41回日本神経化学合同大会, 1998.
- ⑦ 近藤文雄, 近藤洋一, 小川紀雄: 高血糖状態にあるスナネズミにおける一過性脳虚血後の遅発性神経細胞死の形態学的検討, 第21回日本神経科学・第41回日本神経化学合同大会, 1998.
- ⑧ 近藤洋一, 岩田恵美, 宮崎育子, 相見良成, 遠山育夫, 木村 宏, 小川紀雄: マウス脳内における鉄結合蛋白ラクトフェリンの分布, 第21回日本神経科学・第41回日本神経化学合同大会, 1998.
- ⑨ 岩田恵美, 宮崎育子, 小川紀雄: 酸化ストレスに対するグリア細胞の抗酸化防御機能亢進および神経細胞保護効果, 第21回日本神経科学・第41回日本神経化学合同大会, 1998.

## 研究協力者

浅沼幹人 (岡山大学医学部神経情報学部門 助手)  
近藤洋一 (岡山大学医学部神経情報学部門 助手)  
宮崎育子 (岡山大学医学部神経情報学部門)  
十川千春 (岡山大学歯学部歯科薬理学講座 助手)

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）  
分担研究報告書

銅イオンとドーパミン系化合物の結合による  
傷害の発現機序に関する検討

分担研究者 浅沼 幹人

岡山大学医学部分子細胞医学研究施設神経情報学部門 助手

研究要旨

銅イオンとドーパミン系化合物の結合による傷害の発現機序を明らかにするために、銅イオンによるフリーラジカル生成とそれに対するドーパミン系化合物：ドーパミン(DA), L-DOPA, 6-hydroxydopamine (6-OHDA)と過酸化水素添加の影響、銅イオンおよび DA 系化合物の脳脂質過酸化、DNA への影響について検討した。銅イオンは Fenton 様反応を介して鉄イオンよりも 10 倍以上強い水酸化ラジカル( $\text{HO}\cdot$ )生成能を有することを明らかにした。また、銅イオンによる  $\text{HO}\cdot$ 生成は、DA, L-DOPA あるいは 6-OHDA の添加により抑制された。これは銅イオンがこれらの DA 系化合物と配位したためと考えられる。さらに、銅イオンと DA 系化合物の結合体が、この  $\text{HO}\cdot$ 生成抑制を介して、脳ホモジネートの脂質過酸化に対して抑制効果を発揮することを示した。

A. 研究目的

近年、老化の機序に関する学説は、遺伝子に老化や寿命がプログラムされているとするプログラム説と外的・内的な様々な傷害因子の蓄積により老化がもたらされるとする生体分子傷害説に大別される。活性酸素種やフリーラジカルは後者の主因子と考えられているが、細胞組織傷害を導く過程で遺伝因子にも影響することから、両説に密接に関係した因子として注目されている。そのなかでも水酸化ラジカル( $\text{HO}\cdot$ )は細胞膜の脂質過酸化、酵素の失活、核酸分解、タンパク変性などを惹起し、最も傷害性の高いフリーラジカルであると考えられている。

一方、生体内微量金属は様々な代謝過程に関与しているが、フリーラジカルの生成過程にも関係しており、活性酸素と結びつくと生体傷害を招く原因物質となりうるとみられている。中枢神経系においても各種神経変性疾

患では、蓄積した鉄やその他の金属イオンが触媒的に作用し、自動酸化などの過酸化傷害を引き起こすと想定されている。このような金属イオンによる細胞傷害が、単に金属イオン自体の作用に基づくとは考えにくく、何らかの生体成分と反応するかあるいは複合化合物を形成することで修飾を受けていると考えられる。われわれは神経伝達物質のドーパミン(DA)と Parkinson 病モデル作製に用いられる神経毒 6-hydroxydopamine (6-OHDA)による傷害と活性酸素種の間関係を研究し、DA をはじめとするこれらの DA 系化合物と金属イオンの関わりが傷害を惹起する可能性について提唱してきた。昨年度、河野らは鉄イオン( $\text{Fe(II)}$ ,  $\text{Fe(III)}$ )と DA 系化合物(DA, L-DOPA, 6-OHDA)さらに過酸化水素( $\text{H}_2\text{O}_2$ )の三元系での  $\text{HO}\cdot$ 発生を検討し、フェントン反応を触媒する  $\text{Fe(II)}$ よりも  $\text{Fe(III)}$ の方が緩徐ではあるもののより多くの  $\text{HO}\cdot$ を発生すること、さらに鉄イオン

単独,あるいは鉄イオンと H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による HO $\cdot$  生成に対して, 6-OHDA 添加は HO $\cdot$  生成を著明に増加させることを明らかにした.

もうひとつの必須微量元素である銅も酸化ストレスを助長する可能性がある. 例えば amyloid precursor protein に結合した銅は Cu(II) から Cu(I) へと還元されて HO $\cdot$  を生じる可能性が指摘されている. そこで, 本研究では, 銅イオン(Cu(II))と DA 系化合物の結合による傷害の発現機序を明らかにするために, 銅イオンによるフリーラジカル生成とそれに対する DA 系化合物(DA, L-DOPA, 6-OHDA)と酸化的刺激としての H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加の影響, 脳ホモジネートの脂質過酸化に対する銅イオンおよび DA 系化合物の影響, さらに銅イオンと DA 系化合物の DNA への傷害性について検討した.

## B. 研究方法

### 1. HO $\cdot$ 生成系への銅イオンおよび DA 系化合物の影響

100  $\mu$ M CuCl<sub>2</sub> (最終濃度 25  $\mu$ M), 100  $\mu$ M DA, L-DOPA あるいは 6-OHDA (最終濃度 25  $\mu$ M), 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (最終濃度 250  $\mu$ M) あるいは蒸留水(溶存酸素: 約 250  $\mu$ M), さらにフリーラジカル捕捉剤 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO; 890 mM) をそれぞれ 50  $\mu$ l ずつ混合し, 37 $^{\circ}$ C で 0-30 分間インキュベートし, 電子スピン共鳴装置(ESR; 日本電子製)により HO $\cdot$  のスピニアダクト(DMPO $\cdot$ HO $\cdot$ )を検出した. スピニアダクトの強度は Mn 標準アダクトに対する相対比として算出した. CuCl<sub>2</sub>, DA 系化合物に対する溶媒はそれぞれ 0.1 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4), 0.25% methylcellulose を用いた.

### 2. 脳ホモジネートの脂質過酸化に対する銅イオンおよび DA 系化合物の影響

雄性 SD ラットの前脳のホモジネートを過酸化脂質測定用の試料とした. ラットを pentobarbital 深麻酔下(70 mg/kg, i.p.)に左心室より冷生理食塩水で灌流し, 脳を摘出し,

前脳組織を 20 vol.の 50 mM Tris-HCl buffer でホモジナイズした. この 20 vol.の前脳ホモジネート 200  $\mu$ l に, 200  $\mu$ M CuCl<sub>2</sub> (最終濃度 25  $\mu$ M), 200  $\mu$ M DA, L-DOPA あるいは 6-OHDA (最終濃度 25  $\mu$ M), 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (最終濃度 250  $\mu$ M) あるいは蒸留水, さらに蒸留水をそれぞれ 50  $\mu$ l ずつ混合し, 37 $^{\circ}$ C で 30 分間インキュベートした. これに 800  $\mu$ l の TBA reagent (0.375% 2-thiobarbiturate, 15% TCA, 0.25N HCl, 0.1 mM EDTA $\cdot$ Na)を加え沸騰水中に 15 分間置き, 氷冷の後 3000 rpm, 10 分間遠沈し, 上清の吸光度(535 nm)を測定した. 段階希釈した malondialdehyde を標準として用い, その検量線から過酸化脂質量を thiobarbiturate reacting substance (TBARS)として算出した. CuCl<sub>2</sub>, DA 系化合物に対する溶媒はそれぞれ 0.1 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4), 0.25% methylcellulose を用いた.

### 3. DNA に対する銅イオンおよび DA 系化合物の影響

雄性 SD ラットの間脳+中脳から抽出した genomic DNA 200 ng に, CuCl<sub>2</sub> (最終濃度 300  $\mu$ M, 3 mM), DA 系化合物(DA, L-DOPA, 6-OHDA: 最終濃度 3 mM)を加え, 室温で 1 時間インキュベートした後, 0.6% agarose gel で電気泳動して DNA 損傷を etidium bromide 染色で検出した.

## C. 研究結果

### 1. 銅イオンによる HO $\cdot$ 生成と DA 系化合物, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の影響

Cu(II)単独あるいは Cu(II)と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による HO $\cdot$  生成の経時的変化を検討した. DMPO に sodium phosphate buffer, methylcellulose, 蒸留水を加えたコントロールに対して, Cu(II)単独で急速で著明な HO $\cdot$  の生成がみられ, 約 30 分後にプラトーに達した. この HO $\cdot$  生成量は, Fe(II), Fe(III)単独の場合に比べて 10 倍以上高かった. Cu(II)と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> では Cu(II)単独より多くの HO $\cdot$  生成がみられたが, これは Fe(II),



Fe(III)と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>による HO・生成に比べて、1.5～2 倍高かった。

次に、銅イオンによる HO・生成に対する DA 系化合物添加の影響を混和 30 分後において検討した(図 1)。Cu(II)単独あるいは Cu(II)と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>によりみられる HO・生成が、DA、L-DOPA 添加において著明に、6-OHDA において軽度に抑制された。

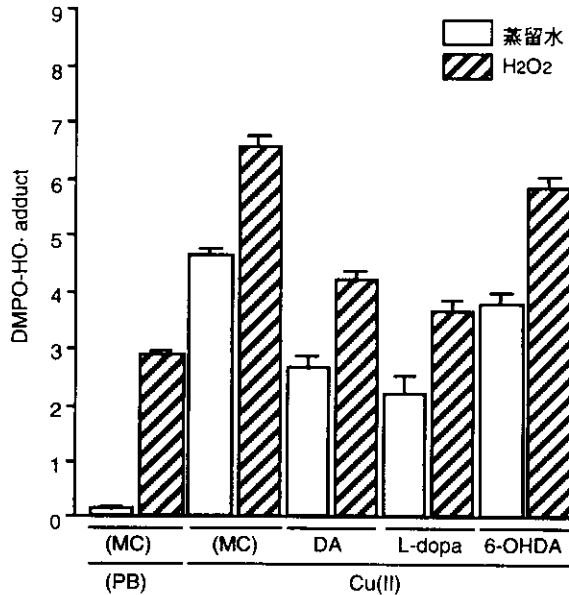


図1 銅イオン(Cu(II))によるHO・生成と DA, L-DOPA, 6-OHDA, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の影響

## 2. 脳ホモジネートの脂質過酸化に対する銅イオンおよび DA 系化合物の影響

銅イオンおよび DA 系化合物の脳ホモジネートの脂質過酸化に対する影響を検討した(図 2)。Cu(II)単独あるいは Cu(II)と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を脳ホモジネートに添加しても過酸化脂質に変化はなかった。脳ホモジネートに Cu(II)と DA, L-DOPA あるいは 6-OHDA を加えた場合には、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の有無にかかわらず、Cu(II)単独あるいは Cu(II)と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の添加の場合に比べ、脂質過酸化は著明に抑制された。

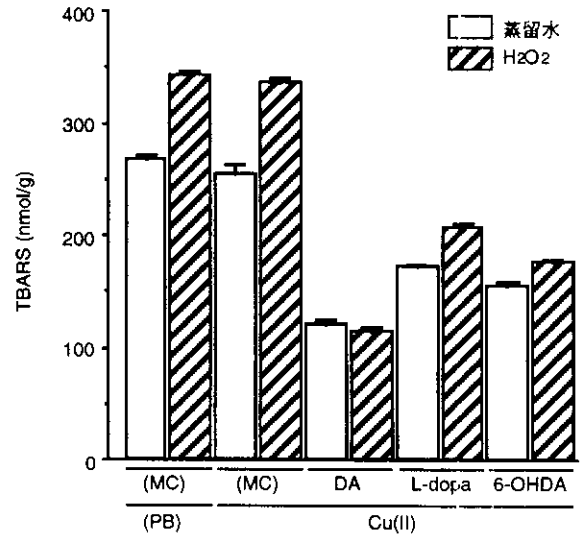


図2 脳ホモジネートの脂質過酸化に対する銅イオン(Cu(II)), DA, L-DOPA, 6-OHDA および H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の影響

## 3. DNA に対する銅イオンおよび DA 系化合物の影響

高濃度(3 mM)の Cu(II)と DA 系化合物を DNA に加えた場合、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の添加の有無にかかわらず著明な DNA の断片化が認められた。また、Cu(II)(3 mM)と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を添加した場合にも DNA の傷害は著明であった。

## D. 考察

銅イオン単独での HO・生成を検討したところ、銅イオン単独において、鉄イオン単独の場合に比べて 10 倍以上高く、急速な HO・の生成がみられた。さらに、銅イオンと H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>では銅イオン単独より多くの HO・生成がみられた。このことは、鉄イオンの場合と同様にあるいはそれ以上に、銅イオンと溶存酸素が反応してスーパーオキシド(O<sub>2</sub><sup>-</sup>), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, HO・を発生させるという連鎖的なラジカル生成機構の存在を示唆している。従来から、鉄イオンによる Fenton 反応で HO・が生成され、組織傷害が惹起されると考えられていたが、銅イオンは Fenton 様反応を介して鉄イオンよりも強い HO・生成能を有することを明らかにした。

銅イオンによる HO $\cdot$ 生成に対する DA 系化合物添加の影響を検討したところ、銅イオン単独あるいは銅イオンと H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> によりみられる HO $\cdot$ 生成が、DA, L-DOPA 添加において著明に、6-OHDA において軽度に抑制された。これは銅イオンがこれらの DA 系化合物と配位したためと考えられる。銅イオンと DA 系化合物は結合していると考えられ、その分子構造が HO $\cdot$ 生成と深く関与しており、酸化還元電位や金属キレート力が重要な指標となることが示唆された。6-OHDA の場合には、O<sub>2</sub> を生成することから、Fenton 様反応がより促進され HO $\cdot$ 生成が高まることから、配位に基づく抑制効果が相殺され軽度にとどまったと推測される。

銅イオンおよび DA 系化合物の脳ホモジネートの過酸化脂質量に対する影響の検討では、脳ホモジネートに銅イオンと DA, L-DOPA あるいは 6-OHDA を加えた場合に、過酸化脂質量は著明に減少した。この結果はこれら DA 系化合物の HO $\cdot$ 生成系への抑制効果と同様の結果であった。したがって、銅イオンと DA 系化合物による脂質過酸化の抑制は、HO $\cdot$ 生成の抑制効果に基づくと考えられる。

高濃度の銅イオンと高濃度の DA 系化合物の genomic DNA への添加実験で、銅イオンと DA 系化合物による著明な DNA 傷害・断片化がみられた。これは、上述の HO $\cdot$ 生成の抑制効果と相反する結果であり、銅イオンと DA 系化合物による DNA 傷害は HO $\cdot$ 以外の因子による可能性が示唆された。

本研究で、銅イオンの強い HO $\cdot$ 生成能と、銅イオンと DA 系化合物による HO $\cdot$ 生成抑制とそれによる脂質過酸化の抑制を明らかにできた。今後は、培養神経細胞での金属イオンと DA 系化合物の結合による細胞傷害を解析する予定である。さらに、金属イオンと DA 系化合物の結合体と結合・配位様式が解明されれば、金属沈着のみられる DA 系が傷害される Parkinson 病のあらたな治療方法開発の糸口を得ることができると期待される。

## E. 結論

銅イオンは Fenton 様反応を含む連鎖的なラジカル生成機構を介して、鉄イオンよりも強い HO $\cdot$ 生成能を有することを明らかにした。銅イオンによる HO $\cdot$ 生成は、DA, L-DOPA あるいは 6-OHDA の添加により抑制された。これは銅イオンがこれらの DA 系化合物と配位したためと考えられる。この HO $\cdot$ 生成抑制により、銅イオンと DA 系化合物の結合体が、脳ホモジネートの脂質過酸化に対して抑制効果を発揮することを示した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- ① Asanuma, M., Hirata, H. and Cadet, J.L.: Attenuation of 6-hydroxydopamine-induced dopaminergic nigrostriatal lesions in superoxide dismutase transgenic mice. *Neuroscience*, 85: 907-917, 1998.
- ② Iwata, E., Miyazaki, I., Asanuma, M., Iida, A. and Ogawa N.: Protective effects of nicergoline against hydrogen peroxide toxicity in neuronal cell line. *Neurosci. Lett.*, 251: 49-52, 1998.
- ③ Gómez-Vargas, M., Nishibayashi-Asanuma, S., Asanuma, M., Kondo, Y., Iwata, E. and Ogawa, N.: Pergolide scavenges both hydroxyl and nitric oxide free radicals in vitro and inhibits lipid peroxidation in different regions of the rat brain. *Brain Res.*, 790: 202-208, 1998.
- ④ Hirata, H., Asanuma, M. and Cadet, J.L.: Superoxide radicals are mediators of the effects of methamphetamine on Zif268 (Egr-1, NGFI-A) in the brain: evidence from using CuZn superoxide dismutase transgenic mice. *Mol. Brain Res.*, 58: 209-216, 1998.
- ⑤ Asanuma, M. and Cadet, J.L.: Methamphetamine-induced increase in striatal NF- $\kappa$ B DNA-binding activity is

- attenuated in superoxide dismutase transgenic mice. *Mol. Brain Res.*, 60: 305-309, 1998.
- ⑥ Yunoki, M., Kawauchi, M., Ukita, N., Noguchi, Y., Nishio, S., Ono, Y., Asari, S., Ohmoto, T., Asanuma, M. and Ogawa, N.: Effects of lecithinized SOD on sequential change in SOD activity after cerebral contusion in rats. *Acta Neurochir. (Wien)*, 71 (Suppl.): 142-145, 1998.
- ⑦ Hirata, H., Asanuma, M. and Cadet, J.L.: Melatonin attenuates methamphetamine-induced toxic effects on dopamine and serotonin terminals in mouse brain. *Synapse*, 30: 150-155, 1998.
- ⑧ Tanaka, K., Wada, N., Hori, K., Asanuma, M., Nomura, M. and Ogawa, N.: Chronic cerebral hypoperfusion disrupts discriminative behavior in acquired-learning rats. *J. Neurosci. Methods*, 84: 63-68, 1998.
- ⑨ Iida, K., Iwata, E., Asanuma, M., Asanuma, S.N., Gómez-Vargas, M., Miyazaki, I., Nakanishi, T. and Ogawa, N.: Effects of repeated cyclosporin A administration on iminodipropionitrile-induced dyskinesia and TRE-/CRE-binding activities in rat brain. *Neurosci. Res.*, 30: 185-193, 1998.
- ⑩ Kondo, Y., Asanuma, M., Iwata, E., Kondo, F., Miyazaki, I. and Ogawa, N.: Early treatment with cyclosporin A ameliorates the reduction of muscarinic acetylcholine receptors in gerbil hippocampus after transient forebrain ischemia. *Neurochem. Res.*, 24: 9-13, 1999.
- Congress of Pathophysiology, 1998.
- ② Asanuma, M. and Cadet, J.L.: Attenuation of methamphetamine-induced increase in striatal NF- $\kappa$ B activity in superoxide dismutase transgenic mice, 28th Annual Meeting Society for Neuroscience, 1998.
- ③ 宮崎育子, 十川千春, 中西 徹, 加太英明, 岩田恵美, 近藤洋一, 浅沼幹人, 飯田基之, 小川紀雄: hemi-parkinsonism モデルラットの基底核における MT-III mRNA 発現と levodopa による誘導調節, 第 21 回日本神経科学・第 41 回日本神経化学合同大会, 1998.

#### 研究協力者

- 河野 雅弘 (日本電子(株) 応用研究センター  
ESR 応用研究グループ長)
- 佐藤 公美 (岡山大学医学部神経情報学部門)

## 2. 学会報告

- ① Iwata, E., Asanuma, M., Kondo, Y., Miyazaki, I. and Ogawa, N.: Transcriptional response to oxidative stress in cultured neuronal and glial cells, III International

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）  
分担研究報告書

メタロチオネイン・III の発現様式と神経生存維持の検討に関する研究

分担研究者 十川 千春  
岡山大学歯学部歯科薬理学講座 助手

研究要旨

メタロチオネイン (MT) は、金属イオン調節に関わる因子の一つである。中でも脳に特異的に発現する MT-III は、種々の神経変性疾患脳で著しく減少し、フリーラジカル消去能を有するといわれている。本研究では、培養グリア細胞を用いた実験において、前年度、dopamine (DA) による MT-III mRNA の発現誘導を報告したが、さらに、その誘導は DA レセプターを介するものではなく、抗酸化物質の共存下で誘導が抑制されることから、活性酸素種による制御機構を介することがわかった。また 6-hydroxydopamine によっても DA 同様 MT-III mRNA の誘導がみられた。これらのことより、脳内の MT-III 発現は、DA 系化合物のラジカル産生や消去、細胞障害性といった二面性に関わっており、老化や老化関連疾患に伴い引き起こされる金属代謝異常と DA 低下による神経細胞死に深く関与しているといえる。

A. 研究目的

メタロチオネイン (metallothionein:MT)-III は金属結合蛋白質の一種で、従来の MT-I, II と異なり脳に特異的に発現し、神経栄養因子活性を押さえるため、当初、成長抑制因子 (GIF) として発見され、Alzheimer 病 (AD) 脳で著しくその発現が減少していることから、AD 発症に大きく関わっていると考えられた。生体内における MT-III の局在および作用については未だ十分解明されてはいないが、AD 脳のみならず種々の神経変性疾患の病変部において神経細胞の脱落と相関して著しく減少すること、フリーラジカル消去作用を有すること、脳内の亜鉛代謝調節に関わる可能性があることなどから、脳内における MT-III 発現の減少は神経細胞死を導く大きな要因の一つと考えらる。

本研究では、老化および老化関連疾患の生体内金属代謝調節異常の機序解明を目的とし、

我々はこれまで、MT-III の主な発現細胞であると考えられているグリア細胞における MT-III mRNA 発現誘導物質の探索を行ってきた。前年度の成果として培養グリア細胞において MT-III mRNA の発現がカテコール化合物、中でも内因性のカテコール化合物である dopamine (DA) によって誘導されることを明らかにした。脳内で金属代謝調節を行っていると考えられる MT-III が加齢および種々の老化関連疾患に関連するといわれている DA によってその発現制御を受けていたことは非常に興味深く、本年度はさらに、DA による MT-III mRNA 発現誘導の経時的変化および、DA 系化合物の中でも神経毒性の強い 6-hydroxydopamine についても MT-III mRNA の発現が影響を受けるか否かを検討した。また、DA による MT-III mRNA の誘導が DA レセプターを介する発現制御機構を経たものであるか否かを検討すると同時に、DA の関与する活