

- W. Maruyama, T. Takahashi, M. Naoi:
(-)-Deprenyl protects human
dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y
cells from apoptosis induced by
peroxynitrite and nitric oxide. *J.*
Neurochem. 70:2510-2515, 1998
- M. Naoi, W. Maruyama, T. Kasamatsu, P.
Dostert: Oxidation of N-
methyl(R)salsolinol : Involvement to
neurotoxicity and neuroprotection by
endogenous catechol isoquinolines.
J. Neural Transm. [Suppl] 52:125-138,
1998
- M. Naoi, W. Maruyama, N. Nakao, T. Ibi,
K. Sahashi, M. Strolin Benedetti:
(R)Salsolinol N-methyltransferase
activity increases in parkinsonian
lymphocytes. *Ann. Neurol.* 43:212-216,
1998
- 丸山和佳子、直井 信 : ヒト脳内在性物質、
N-methyl(R)salsolinol はドーパミン細胞
にアポトーシスを惹起する *Progress in*
Medicine 18: 1425-1432, 1998
- M. Naoi and W. Maruyama:
N-Methyl(R)salsolinol, and endogenous
MPTP-like dopamine neurotoxin and its
relevance to Parkinson's disease.
Advances in Neurology in press
G. Stern (Eds) Lippincott-Raven,
Philadelphia
- M. Naoi, W. Maruyama, K. Matsubara, K.
Tipton, M. Strolin Benedetti, H. Parvez:
Analysis of endogenous neurotoxins,
salsolinol derivatives, in human
materials for the study on pathogenesis
of neurodegenerative disorders.
Progress in HPLC-HPCE Vol 7: pp 413-
460, *Neurochemical markers of*
Degenerative Nervous Diseases and
Drug Addiction A. G. Qureshi, H. Parvez,
P. Caudy and S. Parvez (eds), VSP press,
Utrecht-Tokyo, 1998
- W. Maruyama and M. Naoi:
Studies on neuronal apoptosis using a
comet assay and cultured cells.
Progress in HPLC-HPCE Vol 7: pp781-
816, *Neurochemical markers of*
Degenerative Nervous Diseases and
Drug Addiction A. G. Qureshi, H. Parvez,
P. Caudy and S. Parvez (eds), VSP press,
Utrecht-Tokyo, 1998
- M. Naoi and W. Maruyama:
N-Methyl(R)salsolinol and (R)salsolinol
N-methyltransferase as possible
pathogenic faactors in Parkinson's
disease. *Progress in Alzheimers and*
Parkinson's disease: pp 413-420
A. Fisher, M. Yoshida and I. Hanin (Eds),
Plenum Publisher, New York, 1998
- W. Maruyama and M. Naoi:
N-Methyl(R)salsolinol, a neurotoxin
candidate to induce Parkinson's disease,
caused apoptosis in dopamine cells.
Progress in Alzheimers and Parkinson's
disease: pp 105-112 A. Fisher, M. Yoshida
and I. Hanin (Eds), Plenum Publisher,
New York, 1998
- W. Maruyama and M. Naoi:
Quantitative analysis of apoptotic

neuronal cell death by single cell gel electrophoresis assay.

Advances in Molecular Toxicology : pp 35-51 C. Reiss, S. Parvez, G. Labbe and H Parvez (Eds), VSP press, Utrecht, 1998

M. Naoi and W. Maruyama:
Cytotoxicity of an endogenous dopaminergic neurotoxin, N-methyl(R)salsolinol; Relevance to Parkinson's disease. Advances in Molecular Toxicology : pp 339-355 C. Reiss, S. Parvez, G. Labbe and H Parvez (Eds), VSP press, Utrecht-Tokyo, 1998

M. Naoi, W. Maruyama, P. Dostert:
An animal model of Parkinson's disease prepared by endogenous N-methyl-(R)salsolinol. Handbook of Endogenous Neurotoxins: pp 41-61 A. Moser (Eds), Birkhaeuser, Berlin, 1998

直井 信、丸山和佳子：黒質に選択的な神経毒の代謝酵素は Parkinson 病の内因か
医学のあゆみ 別冊 95-101, 1998

直井 信、丸山和佳子：黒質ドパミン細胞に選択的な神経毒は存在するのか？

Pharma Medica vol 16, No10, 47-53, 1998

2. 学会発表

W. Maruyama: Neuroprotection by (-)deprenyl and related compounds. The Third International NILS Workshop on Longevity Sciences "Interventions in Aging and Age-associated Disorders" November 26-27, Obu, Aichi, Japan (oral)

J. Sholz, W. Maruyama, M. Naoi, A.

Moser: Endogenous neurotoxins in animal model of Parkinson's disease. 71th Meeting of German Society of Neurology September 2-6, 1998, Munich, Germany

W. Maruyama, M. Naoi, M. B. H. Youdim:
Rasagiline protects dopamine cells from apoptosis induced by peroxynitrite. 28th Meeting of Society for Neuroscience November 7-12, 1998, Los Angeles, USA (poster)

M. Naoi, W. Maruyama, C. Minami, K. Sango, M. Kawai, K. Matsubara:
Dopamine-derived tetrahydroisoquinoline; its enantio-specific occurrence in human brain and induction of apoptosis. 28th Meeting of Society for Neuroscience November 7-12, 1998, Los Angeles, USA (poster)

M. Naoi, W. Maruyama, K. Yagi and M. Youdim: Anti-Apoptotic Function of (-)Deprenyl and Related Compounds 8th Amine Oxidase Workshop September 6-10, 1998, Lake Balaton, Hungary (symposium)

W. Maruyama, M. Strolin-Benedetti and M. Naoi: N-Methyl(R)salsolinol and a Neutral N-Methyltransferase as pathogenic factors in Parkinson's disease 8th Amine Oxidase Workshop September 6-10, 1998, Lake Balaton, Hungary (poster)

Wakako Maruyama, Makoto Naoi:
Etiology and biological marker of

Parkinson's disease. German-Japanese Workshop April 26-29, 1998, Heidelberg German

Wakako Maruyama, Makoto Naoi, Moussa Youdim: Anti-apoptotic potency of deprenyl and demethyldeprenyl. Understanding of Parkinson's disease. May 10-13, 1998, Zichron Yaakov, Israel

Makoto Naoi, Wakako Maruyama: An N-methyltransferase as an endogenous for in sporadic Parkinson's disease" Understanding of Parkinson's disease. May 10-13, 1998, Zichron Yaakov, Israel

直井 信、丸山和佳子、赤尾幸博、中川義仁：内在性神経毒、N-methyl(R)salsolinolにより惹起されるドーパミン細胞のアポトーシス；パーキンソン病との関連 第3回東海アポトーシス研究会 1999, 2, 名古屋

丸山和佳子、高橋 勤、直井 信：selegiline 誘導体の抗アポトーシス作用に関する研究 第71回日本生化学会大会 1998, 10, 名古屋

三後久美子、南知予子、丸山和佳子、川井正雄、直井信：ヒト脳に選択的に存在する(S)-tetrahydropapaveroline 第71回日本生化学会大会 1998, 10, 名古屋

南知予子、三後久美子、丸山和佳子、川井正雄、高橋勤、直井 信：Tetrahydropapaveroline によるDNA 傷

害の検討 第71回日本生化学会大会 1998, 10, 名古屋

丸山和佳子、高橋勤、直井 信：selegiline 誘導体の抗アポトーシス作用 第41回日本神経化学会 1998, 9, 東京

南知予子、三後久美子、丸山和佳子、川井正雄、高橋 勤、直井 信：Tetrahydropapaveroline によるDNA 傷害の検討 第41回日本神経化学会 1998, 9, 東京

直井 信、三後久美子、南知予子、丸山和佳子、川井正雄、松原和夫 ヒト脳には(S)型 tetrahydropapaveroline のみが存在する。 第41回日本神経化学会 1998, 9, 東京

丸山和佳子、直井 信、橋詰良夫：ヒト脳に内在するMPP+様神経毒1,2-dimethyl-6,7-dihydroxyisoquinolinium ionの黒質濃度は線条体における中性N-メチル転移酵素の活性が決定する 第39回日本神経学会総会 5月20-22日 1998 京都

直井 信、丸山和佳子(老化機構研究部)、阿部隆志、東儀英夫：パーキンソン病発症に中性N-メチル転移酵素は関与するか 第39回日本神経学会総会 5月20-22日 1998 京都

G. 知的所有権の取得状況
なし

厚生科学研究補助金（長寿科学総合研究業）
分担研究報告書

コレステロール合成抑制により誘導される神経細胞死
アルツハイマー病発症に果たすアポリポプロテインEの分子機構の検討

分担研究者 道川 誠 国立療養所中部病院 長寿医療研究センター 痴呆疾患研究部室長

研究要旨 Apolipoprotein E(ApoE)のアイソフォームの一つである ApoE4 のアルツハイマー病発症における分子機構の解明をコレステロール合成抑制により誘導される神経細胞死の観点から検討した。我々は、コレステロール合成抑制により神経細胞特異的に細胞死を引き起こすことを明らかにした。さらに ApoE4 と VLDL を投与するとコレステロール合成阻害剤存在下に神経細胞死を誘導すること、この細胞死は細胞内コレステロール合成量に依存して誘導されることが明らかになった。

A. 研究目的

アルツハイマー病は脳血管性痴呆と並んで痴呆性疾患患者数の大きな割合を占めるにも関わらずその原因は不明であり、その病因解明は予防法、治療法の開発に重要であると考えられる。最近 apolipoprotein E(ApoE)のアイソフォームの一つである ApoE4 がアルツハイマー病の強力な危険因子であることが明らかとなったが、ApoE のアルツハイマー病発症に関与する分子機構についての詳細は明らかではない。我々は、(1) 外傷後の脳ではコレステロール生合成が低下し、apoEの産生が増加すること、(2) 外傷後にアミロイドベータ蛋白質の脳内沈着が促進されること、特に apoE4 のアイソフォームの人ではその頻度が著しいという事実に着目し、外傷後においてコレステロール生合成が低下し、apoE の産生が増加する状況が、アルツハイマー病の脳内病態に類似した条件である可能性を考えた。一方、アルツハイマー病における痴呆の程度と進行は神経細胞の脱落、シナプスの機能障害および形態的変

化によく相関することが知られている。従って我々はアルツハイマー病の疾患モデルとしてコレステロール合成を抑制した培養系を確立し、その系を用いて apoE の作用について特に神経細胞死の観点から、検討を加えた。

B. 研究方法

妊娠 17-18 日目のラット胎仔脳を無菌的に取り出し、膜を剥離した後メスで細かく切断した後、0.25%のトリプシンで 37℃、20 分間 incubation した後、パスツールピペットでピペティングして、神経細胞を単離し poly-D-lysine でコートした 6 ウェルあるいは径 35mm ディッシュに N2 添加した DMEM/F12 の無血清培地で培養した。培養 6 時間後に N2 添加した DMEM/F12 の無血清培地に交換し、同時に ApoE3, ApoE4, compactin, β -VLDL, およびそれらの組み合わせを投与した。ApoE3/4 と β -VLDL は preincubation して ApoE 豊富な β -VLDL として投与した。生存および死細胞は calceinAM/ethidium

homodimer(Molecular Probes 社)により染色したのち、蛍光顕微鏡下で写真撮影し、評価した。コレステロール合成阻害剤による細胞死の検討では compactin, mevalonate, squalene, cholesterol, β -VLDL 等を適宜組み合わせ投与し、生存の評価には LDH を定量した。また de novo コレステロール合成量の測定は [14C]-acetate を培養細胞に投与し、37°C で 1 時間の incubation 後回収し薄層クロマトグラフィーで分離、シンチレーションカウンターで計測した。

C. 研究結果

大脳皮質から取り出した培養神経細胞に ApoE3, ApoE4, ApoE3+ β -VLDL, ApoE4 + β -VLDL, β -VLDL, compactin(100, 300, 1000, 3000 nM), ApoE3 + β -VLDL + compactin, ApoE4 + β -VLDL + compactin をそれぞれ加え、24 時間、48 時間後に生存細胞をカウントしたところ、ApoE4 + β -VLDL + compactin 添加群でのみ生存細胞が対照群に比し 47% の減少を示した。なお compactin の de novo 合成に対する抑制効果は量依存的に認められ、1000nM でほぼプラトーに達した。このときの合成量は対照の 20% に抑制された。なお、記載のない reagent の投与濃度は ApoE3/4 はそれぞれ 25 μ g/ml、 β -VLDL は cholesterol 量で 50 μ g/ml、compactin は 300nM であった。

また、培養神経細胞に対して 1mM 以上の濃度で添加した compactin は細胞死を誘導した。Compactin によって引き起こされた細胞死は中間代謝物である mevalonate のみならずより下流の squalene や最終産物である cholesterol によって抑制された。更に apoE4 によって誘導される細胞死は mevalonate および squalene によって抑制された。

D. 考察

従来、HMG-CoA reductase inhibitor によっ

て引き起こされる現象としては DNA 複製およびその結果としての細胞増殖抑制ならびに細胞死がいられている。その原因としてコレステロールの産生低下ではなく farnesyl pyrophosphate の産生低下が指摘されてきた。しかし、今回の実験から非増殖細胞である神経細胞については、farnesyl pyrophosphate の産生低下がその主要因ではなく、最終産物のコレステロールの欠乏に由来していることが明らかとなった。更に apoE4 によって誘導される神経細胞死もコレステロール合成系の代謝物である mevalonate だけではなくより下流の squalene によっても抑制されたことから、コレステロールの細胞内合成と関わりがあることが示唆された。

E. 結論

(1) ApoE4 はアイソフォーム特異的にコレステロール合成抑制下において神経細胞死を誘導することを明らかにしたが、その原因として細胞内コレステロール合成が関与していると考えられた。(2) 培養神経細胞では、HMG-CoA reductase inhibitor によって細胞死が誘導されるが、その主要因は他の増殖性細胞と大きく異なりコレステロールの低下による事を明らかにした。これは (1) の結果を支持すると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Michikawa M. and Yanagisawa K
cholesterol biosynthesis is critical for apolipoprotein E4-induced neuronal cell death. J Neurosci Res.4: 58-67, 1998.

Mizuno. T., Haars C., Michikawa M. and Yanagisawa K. Cholesterol-dependent generation of a unique amyloid β -

protein from apically missorted amyloid precursor protein in MDCK cells. *Biochem Biophys Acta* 1373: 119-130, 1998.

Sanjo N., Owada K., Kobayashi T., Awaya A., Mizusawa H. and Michikawa M. A novel neurotrophic pyrimidine compound MS-818 enhances neurotrophic effects of basic fibroblast growth factor. *J Neurosci Res* 54: 604-612, 1998.

Michikawa M. and Yanagisawa K. Deficiency of cholesterol and not of nonsterol isoprenoid products causes neuronal cell death induced by HMG-CoA reductase inhibitors. *J. Neurochem.* (in press).

Owada K., Sanjo N., Kobayashi T., Kamata T., Mizusawa H., Muramatsu H., Muramatsu T., and Michikawa M. Midkine inhibits apoptosis via ERK activation in PC12 cells. *Bull Tokyo Med Dent Univ* (in press).

Michikawa M. and Yanagisawa K. Apolipoprotein E4 isoform-specific actions on neuronal cells in culture. *Mechanisms of Aging and Development* (in press).

道川 誠 アルツハイマー病研究の動向 神経細胞に対するアポリポ蛋白 E の作用 医学の歩み (印刷中)

2. 学会発表

道川 誠 ミニシンポジウム「アルツハイマー病研究最前線の紹介、問題点」

「コレステロール代謝からアルツハイマー病をみる：アポリポ蛋白 E の役割」 (1998年2月9日、東京)

道川 誠、柳澤勝彦 シンポジウム「アルツハイマー病の分子遺伝学と治療の展望」 Alzheimer 病におけるアポリポ蛋白 E の役割-コレステロール代謝の観点から 第17回日本薬理学会年会 シンポジウム (1998年3月24-26日、京都)

Michikawa M. Pathogenesis of Alzheimer's disease Japanese and Germany Workshop on Age-Related Diseases. (Heidelberg, Germany, April 27, 1998.)

道川 誠、柳澤勝彦 培養神経細胞におけるコレステロール合成抑制と細胞死 日本神経化学会 (1998年9月22日、東京)

道川 誠 コレステロール合成と神経細胞死 日本痴呆学会 (1998年10月1日、東京)

G. 知的所有権の取得状況

なし

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

組織特異的活性酸素制御法の開発と血管源性加齢病態の解明

分担研究者 井上 正康 大阪市立大学医学部教授

研究要旨 加齢性脳心血管障害をはじめとする老化関連疾患にはスーパーオキシドやNOなどの活性酸素フリーラジカルが関与することが示唆されているが、その実態は尚不明である。本研究は、活性酸素病態の解析により加齢現象の背景に潜む活性酸素の役割を解明すると同時に、新たな抗酸化代謝制御法を開発し、動脈硬化、心脳血管病変、パーキンソン病等の加齢関連疾患を阻止軽減する予防治療法を開発することを目的として行われた。解析の結果、活性酸素代謝がエネルギー代謝を制御する必須な因子であること、これに付随する酸化ストレスが血管、神経系、生殖系組織細胞のミトコンドリア、ライソゾーム、DNA、酵素系の加齢性変化の重要な原動力として作用していることが判明した。さらに、酸化ストレスを軽減する薬剤などは、血管や神経細胞の加齢性病態を抑制しうる可能性が示唆された。

A. 研究目的

加齢性脳心血管障害をはじめとする老化関連疾患にはスーパーオキシドやNOなどの活性酸素フリーラジカルが関与することが示唆されているが、その実態は尚不明である。本分担研究は、活性酸素病態の解析により加齢現象の背景に潜む活性酸素の役割を解明すると同時に、新たな抗酸化代謝制御法を開発し、動脈硬化、心脳血管病変、パーキンソン病等の加齢関連疾患を阻止軽減する予防治療法を開発することを目的としている。高齢化社会の医学的問題が山積みされている日本において、加齢関連病態を阻止軽減し、健康な老人集団を確保することを旨とする本研究プロジェクトの医学的および社会的意義は極めて大きい。

B. 研究方法

生体エネルギー代謝を活性酸素のクロストークが制御する様相を分子、ミトコンドリア(Mt)、細胞、および組織のレベルで、オキシメーターや ESR による酸素関連代謝を中心に解析した。特に、Mt の加齢性変化に関しては老化促進マウス(SAM)を用いて解析した。生体維持には細胞分裂と共役するアポトーシスが重要であり、これに対する活性酸素代謝の影響を神経系細胞を用いて解析した。ヒトの血管老化の主役を担う動脈硬化の予防治療法開発は特に重要である。加齢性神経障害として重要なパーキンソン病にもアポトーシスが関与するので、ヒトドーパミン神経芽細胞腫を peroxynitrite 発生剤 SIN-1 で処理し、その DNA 傷害を定量評価した。また、本アポトーシスに対する神経保護剤

(-)-deprenyl [selegiline]の作用を検討した。老化制御には生活習慣病の病因解明と予防法確立が重要なので、加齢性変化の分子マーカーを検出する特異抗体を作成して解析した。

C. 研究結果

生体のエネルギー合成には酸素を運搬する動脈とMtが重要であるが、両者は活性酸素産生の主座でもある。解析の結果、NOとスーパーオキシドを主体とする酸素ラジカル間のクロストークが血流を介して本代謝をポジティブに、またMtにおける代謝をネガティブに制御し、両者が精密なバイオリアクターとして作動していることが判明した。また、その代謝の歪みが高血圧や動脈硬化の病因に深く関与していることが判明した。

SAMを用いて解析した結果、加齢に伴い8-oxodGが対照群に比べて著しく高くなること、したがって、DNAの酸化損傷が加速されている可能性が示唆された。現在、肺、脳など、他の臓器の8-oxodG生成量についても測定中である。SAMの肝や心のミトコンドリアを用いて解析した結果、SAMではATP合成能が著しく低下していること、および加齢によりこの変化が増強することが判明した。特に、ミトコンドリア膜機能を保護してアポトーシスを抑制する発癌遺伝子産物Bcl-2は生後一年を過ぎると著明に低下していた。活性酸素はMtやリソゾーム膜の脂質過酸化を介してシトクロームcやプロテアーゼを漏出させ、カスパーゼ-3を活性化することも判明した。

生殖能力の成熟点は老化の出発点でもあり、生殖系機能と活性酸素代謝系の加齢性変化は老化機構に重要である。In situ hybridization法で解析した結果、精巣のglutathione peroxidase (GPX)の遺伝子発現が著明に低下することが判明した。また、卵

巣や子宮におけるMn-SODの遺伝子発現が性周期に連動して変化すること、およびこれが加齢により縮退することが判明した。これらのことから、老化現象における性差が生殖器における活性酸素関連代謝と極めて密接な相関性を有することが示唆された。

NOとスーパーオキシドの反応産物であるperoxynitriteはパーキンソン病、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症などの加齢性神経病態に重要である。ドーパミン神経芽細胞腫SH-SY5Y細胞を用いて解析した結果、peroxynitriteが本細胞のapoptosisを誘起すること、およびこれが神経保護剤デプレニールにより阻止されることが判明した。解析の結果、その保護作用がミトコンドリア機能の維持による可能性が示唆された。

D. 考察

本研究により、スーパーオキシドを主体とする活性酸素とNOのクロストークが血液循環動態やエネルギー代謝を部位特異的に制御するスーパーシステムを形成していること、そのバランスの歪みが脳を初めとする書組織の様々な病態を誘起すること、およびその長期的医影響が加齢関連病態の基盤となりうるということが明らかになった。これらの酸素関連分子群は極めて夫なんて否短寿命物質であるため、その制御には関連抗酸化分子群を発生局所にターゲティングする事が不可欠であることが示唆された。また、長期間に渡り活性酸素種の影響を受ける加齢性変化の制御には、薬物による介入に加え、日々の食品や生活様式による代謝制御が重要であることが示唆された。

E. 結論

本研究により、活性酸素代謝が生体の好氣的エネルギー代謝を制御する必須な因子であると同時に、その過程で誘起される酸化ス

トレスが血管、神経系、生殖系組織細胞のミトコンドリア、ライソゾーム、DNA、蛋白酵素系の加齢性変化の重要な原動力として作用していることが判明した。また、加齢性組織細胞成分の変化を分子レベルで認識評価する方法論が確立された。さらに、酸化ストレスを軽減する薬剤などは、血管や神経細胞の加齢性病態を抑制しうる可能性が示唆された。加齢性変化は長期に渡りゆっくりと進行する不可逆的過程であり、その阻止軽減には日々のライフスタイルが重要と考えられる。したがって、毎日の食事での新旧抗酸化成分の探索解析やデザインフードの研究が重要であり、本研究班もこれらに関連する問題にターゲットを絞って解析する必要性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Nishikawa, M., Sato, E. F., Kashiba, M., Kuroki, T., Utsumi, K., and Inoue, M. (1998). Role of glutathione in nitric oxide-dependent regulation of energy metabolism in rat hepatoma cells. *Hepatology* 27, 422-6.

Nishikawa, M., Takeda, K., Sato, E. F., Kuroki, T., and Inoue, M. (1998). Nitric oxide regulates energy metabolism and Bcl-2 expression in intestinal epithelial cells. *Am-J-Physiol* 274, G797-801.

Nakanishi, T., Nishi, Y., Sato, E. F., Ishii, M., Hamada, T., and Inoue, M. (1998). Thermal injury induces thymocyte apoptosis in the rat. *J-Trauma* 44, 143-8.

Nagata, K., Yu, H., Nishikawa, M., Kashiba, M., Nakamura, A., Sato, E.

F., Tamura, T., and Inoue, M. (1998). *Helicobacter pylori* generates superoxide radicals and modulates nitric oxide metabolism. *J-Biol-Chem* 273, 14071-3.

Morishita, S., Sato, E. F., Takahashi, K., Manabe, M., and Inoue, M. (1998). Insulin-induced hypoglycemia elicits apoptosis in the rat. *Diabetic Res. Clin. Pract.* 40, 1-7.

Dunlap, W. C., Yamamoto, Y., Inoue, M., Kashiba, M., and Tomita, K. (1998). Uric acid photo-oxidation assay: in vitro comparison of sunscreens agents. *International Journal of Cosmetic Science* 20, 1-18.

Minamiyama, Y., Takemura, S., Toyokuni, S., Tanimoto, Y., Sato, E. F., and Inoue, M. (1998). A processed grain food inhibits hepatic injury in endotoxemic rats. *J. Nutr Sci Vitaminol* 44, 547-59.

Minamiyama, Y., Takemura, S., Kawada, N., and Inoue, M. (1998). Role of nitric oxide in extracellular nucleotide-induced contractile status of assorted vessels including parts of the portal vasculature. *J-Hepatol* 28, 314-9.

Konaka, R., Kasahara, E., Dunlap, W. C., Yamamoto, Y., Chein, K., and Inoue, M. (1998). Irradiation of titanium dioxide generates both singlet oxygen and superoxide radicals. *International Journal of Cosmetic Science* 20, 1-18.

- Yamada, T., Yukioka, H., Hayashi, M., Asada, A., and Inoue, M. (1998). Effects of inhaled nitric oxide on platelet-activating factor-induced pulmonary hypertension in dogs. *Acta-Anaesthesiol-Scand* 42,358 - 68.
- Kawada, N., Seki, S., Inoue, M.; and Kuroki, T. (1998). Effect of antioxidants, resveratrol, quercetin, and N-acetylcysteine, on the functions of cultured rat hepatic stellate cells and Kupffer cells. *Hepatology* 27, 1265-74.
- Takemura, S., Minamiyama, Y., Kawada, N., Inoue, M., Kudo, S., Hirohashi, K., and Kinoshita, H. (1998). Extracellular nucleotides modulate the portal circulation with generation of nitric oxide. *Hepatology Research* 13, 29-36.
- Kaneko, H., Koshi, S., Hirota, T., Miyauchi, Y., Kitamura, N., and Inoue, M. (1998). Inhibition of post-ischemic reperfusion injury of the kidney by diamine oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1407, 193-99.
- Sasaki, J., Yamamoto, H., Nomura, T., Matsuura, J., Seno, M., Sato, E. F., and Inoue, M. (1998). Multiple-labeling of oligonucleotide probes for in situ hybridization. *Acta Histochem. Cytochem.* 31, 275-79.
- Ishisaka, R., Utsumi, T., Yabuki, M., Kanno, T., Furuno, T., Inoue, M., and Utsumi, K. (1998). Activation of caspase-3-like protease by digitonin-treated lysosomes. *FEBS Letters* 435, 233-36.
2. 学会発表
- M. Inoue (1998) Role of cross-talk of reactive oxygen species, nitric oxide, antioxidants, and vitamins in health and diseases. Ist Japan-China Conference on Vitamins (Peigin)
- M. Inoue (1998) Role of cross-talk of nitric oxide, reactive oxygen species, GSH and related antioxidants in the regulation of energy metabolism. IInd. Int. Conf. Pathophysiology (Finland, Alton Meister Symposium)
- M. Inoue (1998) Role of nitric oxide and related oxyradicals in the regulation of energy metabolism and circulatory status. VIIIth Ann. I. M. Arias Symposium "Bridging Basic Science and Liver Disease" American Liver Foundation (Boston)
- M. Inoue (1998) Role of nitric oxide and related oxyradicals in the regulation of energy metabolism and enteric bacteria. IInd Japan-UK Conference (Tsukuba)
- M. Inoue (1998) Nitric oxide and related oxyradicals, majesties of aerobic life. IInd Cong. SFRR Asia "Emerging potential of Antioxidant Therapy" (Goa)
- 井上正康 (1998) 「活性酸素病態」日本呼吸器学会・シンポジウム講演 (熊本)
- 井上正康 (1998) 活性酸素・NO病態：生体防御機構の源流を探る 日本炎症学会教育講演 (東京)

G. 知的所有権の取得状況
なし

血液脳関門を介した脳へのドラッグデリバリーの開発

分担研究者 杉山 雄一 東京大学大学院薬学系研究科教授

研究要旨 高齢化社会を迎え、脳への薬物移行を制御するドラッグデリバリーシステムの開発は、高齢者の quality of life 向上のため、これまで以上に強い期待を集めている。血液から脳への薬物移行を制限する血液脳関門は単純な細胞間どうしの tight junction だけではなく物質を脳側から血液側へ積極的に汲み出すことにより脳を外界から守る働きを有していることが次第に明かにされつつある。従って、それら汲み出し輸送機構を解明することは、脳へのドラッグデリバリーを開発する上で極めて重要な課題である。本研究では脳に発現する新規トランスポーターの遺伝子クローニングを試み、その機能解析を行った。本研究で得られた知見は、薬物を脳へターゲットングする際の重要な知見となるものと考えられる。

A. 研究目的

脳はその生理的な重要性から、血液脳関門・血液脳脊髄液関門の2つの生理的なバリアーを介して、物質交換を行っている。血液脳関門は脳毛細血管内皮細胞により、血液脳脊髄液関門は脈絡上皮細胞により、構成されている。内皮細胞・上皮細胞共に、細胞間は tight junction により接合されており、細胞間隙を介した非特異的な透過は大きく制限されている。近年の研究により、両バリアーには tight junction に代表されるような解剖学的な特徴だけではなく、トランスポーターと呼ばれる一群の膜蛋白が薬物の脳からの排出に関与していることが示唆されている。従って脳への薬物のデリバリーを考える上では細胞間の tight junction ばかりでなく、これらトランスポーターの発現や機能について考慮する必要がある。近年、GABA の排出トランスポーターあるいは neurosteroid

と呼ばれる一群の steroid の排出トランスポーターが、それぞれ血液脳関門・血液脳脊髄液関門に存在することも示唆されており、神経伝達物質の不活化機構の一つとしても機能している可能性を考えることもできる。しかし現在までに、トランスポーターが同定されている例は少ない。

p-アミノ馬尿酸は腎臓側底膜での有機アニオントランスポーターの代表的な基質になるが、血液脳関門を介した排出輸送機構が存在すること、および血液脳脊髄液関門を介した有機アニオン排出輸送機構を阻害することが報告されている。最近腎臓側底膜での有機アニオントランスポーター（OAT1）がクローニングされたことから、脳にその類縁蛋白が発現していることが期待できる。本研究は脳への薬物デリバリーをデザインするための基礎的知見として、血液脳関門における有機アニオントランスポーターの存在と機

能を明らかにすることを目的として、OAT familyの検索およびその機能解析を行った。

B. 研究方法

OAT1, OAT2において保存されている核酸配列に対して、degenerate primerを作成した。ラット脳から調整した mRNA を鋳型として、RT-PCR をおこなった。その結果、OAT1 とアミノさん配列で 42% 程度の相同性を示す PCR 産物 (B10) が得られた。これをプローブとして、Northern blot を行ったところ、特に腎臓での発現が高かった。そこで、ラット腎臓から作成した cDNA ライブラリーから、B10 をプローブとして OAT3 をクローニングした。得られた cDNA の核酸配列は dye-terminator 法を用いて決定した。

機能解析はアフリカツメガエル卵母細胞 (oocyte) を用いた発現系を利用して行った。T7 RNA polymerase を用いて、in vitro で OAT3 の cRNA の合成を行った。oocyte に cRNA (10ng) をインジェクションし、2-3 日間 18°C にて培養した後、輸送実験に用いた。

培養液をトランスポート溶液に置換した後、薬液を加え、輸送実験を開始した。一定時間後氷冷したトランスポート溶液で、oocyte を 5 回 wash した後、可溶化し、取り込まれた薬物量を測定した。Na⁺ に対する感受性を検討する場合には、Na⁺ を Li⁺、choline、N-methyl-glucamine に置換し、取り込み実験を行った。

常法に従い、Northern blot 法により mRNA の組織分布を、OAT3 の C 末の 13 個のアミノ酸に対して作成した polyclonal 抗体を用いて、脳に対して免疫染色を行った。

C. 研究結果

ラット腎臓からクローニングした cDNA は 2191bp であり、536 個のアミノ酸をコードしていた。アミノ酸配列の相同性を OAT1、

OAT2 と比較すると、それぞれ 49%、39% を示した。Northern blot 法により、その組織分布は肝臓、腎臓、脳、眼に発現しており、免疫染色を行ったところ脈絡叢に発現していることが明らかとなった。oocyte 発現系を用いて、その基質を検索したところ、p-アミノ馬尿酸、estrone sulfate、dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S)、ochratoxin A、cimetidine、benzylpenicillin、estradiol glucuronide が基質とし、その輸送は Na⁺ 非依存的であった。速度論解析の結果、p-アミノ馬尿酸、estrone sulfate、ochratoxin A の OAT3 発現 oocyte への取り込みは飽和性を示し、その K_m 値はそれぞれ、65μM、0.74μM、2.3μM であった。さらに基質認識性を cis-inhibition により検討したところ、有機カチオンでは全く阻害がかからず、probenecid、sulfobromophthalein、indocyanin green など有機アニオンにより阻害された。また catecholamine の酸性代謝物も OAT3 の輸送を阻害することが明らかとなった。

OAT1 が有機アニオンをあらかじめ preload しておくことで、取り込み初速度が増加する、いわゆる trans-stimulation を示すことから、同様の実験を OAT3 発現 oocyte を用いて行った。OAT3 発現 oocyte では、trans-stimulation は観察されなかった。

D. 考察

OAT family とのアミノ酸配列の相同性や p-アミノ馬尿酸を基質とすることから、単離した cDNA は OAT family に属するトランスポーター (OAT3) であると考えられる。OAT1 あるいは OAT2 との相違点に焦点を当てると、OAT1 と比較して、p-アミノ馬尿酸に対して低親和性であること、また estrone sulfate や estradiol glucuronide の輸送活性が高いことを挙げるができる。一方、OAT2 に対しては p-アミノ馬尿酸以外、その基質認識特

性は全く異なる。OAT1はジカルボン酸との anti-port により有機アニオンを輸送する anion exchanger とされている。OAT2、OAT3はOAT1同様Na⁺非依存的な輸送を行うが、trans-stimulationは観察されず、その輸送様式に関しては今後の検討を必要とする。

OAT3の基質特異性や輸送様式は、これまで血液脳脊髄液関門で報告されている benzylpenicillin の輸送活性と一致しており、更に免疫染色により脈絡叢における発現が確認されたことから、OAT3が血液脳脊髄液関門において機能していると考えられる。また neurosteroid の DHEA-S を基質とし、また神経伝達物質の酸性代謝物によりその輸送が阻害されることから、これらの脳からの排出輸送機構として機能していることが考えられる。しかし、脈絡叢の刷子縁膜には肝臓の血管側膜のトランスポーターである organic anion transporting polypeptide1 (oatp1)も発現している。oatp1とOAT3の基質はoverlapしていることから、有機アニオンの排出に対するそれぞれの寄与など、今後の検討が必要である。

E. 結論

ラット脳において機能していると考えられる p-アミノ馬尿酸を基質とするトランスポーターをクローニングした。そのアミノ酸配列の相同性から、OAT family に属するトランスポーターである。familyの中で脳における発現量が最も多く、基質選択性あるいは輸送活性はOAT1やOAT2とは異なる。これまで in vivo あるいは in vitro 実験により明らかにされてきた血液脳脊髄液関門の有機アニオン輸送担体の特徴と一致し、血液脳脊髄液関門において機能していることが期待される。今後OAT3の脳での役割をさらに詳細に明らかにする必要があるものの、脳への薬物

のデリバリーを考えた場合、本トランスポーターの機能について考慮に入れる必要があるものと考えられる。脳への薬物移行を制限するトランスポーターは未だ全貌が解明されたわけではなく、本研究のさらなる発展により血液脳関門、血液脳脊髄液関門の実体を明らかにする必要があるものとする。

F. 研究発表

1. 論文発表

H. Kusuhara, T. Sekine, N. Utsunomiya-Tate, M. Tsuda, R. Kojima, S.H. Cha, Y. Sugiyama, Y. Kanai and H. Endou: Molecular cloning and characterization of a new multispecific organic anion transporter from rat brain. J. Biol. Chem. in press

2. 学会発表

楠原洋之、関根孝司、楯直子、杉山雄一、金井好克、遠藤仁 有機アニオントランスポーター (OAT3) のクローニングと解析、第13回日本薬物動態学会年会 1998, 11 仙台

津田実、楠原洋之、関根孝司、遠藤仁 多選択性有機アニオントランスポーターファミリー (OAT1, OAT2及びOAT3) による各種抱合体の輸送、第13回日本薬物動態学会年会 1998, 11 仙台

G. 知的所有権の取得状況

なし

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

食物の抗酸化成分の探索と加齢病態の制御

分担研究者 大澤 俊彦 名古屋大学大学院生命農学研究科教授

研究要旨 香辛料、特に、ゴマに含まれる「抗酸化リグナン類」やインド料理に不可欠な香辛料「ターメリック」の黄色色素「クルクミン」とその代謝物「テトラヒドロクルクミン」による老化抑制機能について検討をすすめ、分子レベルでの「酸化ストレス」予防機能発現のメカニズムの解析を行った。

A. 研究目的

老化に関連したさまざまな疾病の原因である「酸化ストレス」を予防する食品素材として我々が特に着目したのが、「ゴマ」や「ターメリック」などの香辛料である。インド料理や生薬の主成分として伝統的に用いられてきた香辛料「ターメリック」の黄色色素「クルクミン」を経口摂取すると腸管の部分で上皮細胞で吸収される際に「テトラヒドロクルクミン」に変換されることが明らかになることができたので、われわれは、強力な抗酸化性をもつ「テトラヒドロクルクミン」を対象に、「酸化ストレス」に関連した疾病の予防効果の検討を進めることを目的に研究を行った。また、「ゴマ」については、ゴマ油を抽出した後の脱脂粕中に「セサミノール配糖体」が大量に存在し、これを摂取すると腸内細菌により加水分解され、強力な抗酸化物質「セサミノール」になることを明らかにしている。最近、この「セサミノール配糖体」が強力な動脈硬化予防作用があるのではないかと期待されているので、ウサギへの高コレステロール負荷実験に対する防御効果についても併せて報告する。

B. 実験方法

2-ジメチルヒドラジン及びアゾキシメタンで誘導された大腸がんや肺癌に対して、

「クルクミン」及び「テトラヒドロクルクミン」を0.5%の投与での抑制効果の検討を行った。また、「セサミノール配糖体」については、「セサミノール配糖体」を1%含む脱脂ゴマタンパクを調製し、これを10%投与することにより、1%コレステロール投与によりウサギに引き起こされる動脈硬化に対する予防効果の検討を行った。

C. 研究結果

テトラヒドロクルクミンは無色、無臭であり、また、クルクミンよりも強力な抗酸化性を示しているために、特に生体系での応用・開発の可能性は非常に高い化合物であると期待される。さらに、分子レベルの研究を行ったところ、この「テトラヒドロクルクミン」は、ラジカルを捕捉しながら自身は分解され、さらに抗酸化力を持つジヒドロフェルラ酸に変換された。さらに、アゾキシメタンや1、2-ジメチルヒドラジンにより誘導されたマウス大腸がんや肺癌を「クルクミン」よりも強く抑制することを明らかにすることができたので、現在、「テトラヒドロクルクミン」の持つ「酸化ストレス」予防メカニズムの解析を進めつつある。一方、「セサミノール配糖体」は、コレステロールによる動脈硬化巣の形成に対して、有効に抑制すると共に、血液中の脂質過酸化度の抑制や腎臓や肝臓への

酸化ストレスの軽減効果をはじめ、尿中への8-ヒドロキシデオキシグアノシンの排泄の低下作用など、興味ある結果をえることができた。

D. 考察

われわれは、香辛料、特に、ゴマに含まれる「抗酸化リグナン類」やインド料理に不可欠な香辛料「ターメリック」の黄色色素「クルクミン」とその代謝物「テトラヒドロクルクミン」による老化抑制機能について検討をすすめたが、今後は、脳内代謝も含めた分子レベルでの「酸化ストレス」予防機能発現のメカニズムの解析を行うことが重要な課題である。

E. 結論

辛料、特に、ゴマとターメリックに含まれる抗酸化物質、特に「セサミノール配糖体」と「テトラヒドロクルクミン」を用いて、マウス及びウサギを対象に顕著な「がん予防効果」と「動脈硬化予防効果」を見いだすことに成功した。これらの結果は、発がん剤やコレステロール投与における「酸化ストレス」に対する強力な予防効果であったので、今後、自然発症のモデル系や老化抑制効果の検討を進めて行きたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kang, M-H., Naito, M., Tsujihara, N. and Osawa, T. (1998) Sesamolin Inhibits Lipid Peroxidation in Rat Liver and Kidney, *J. Nutrit.* 128 1018-1022

Kim, J-M., Araki, S., Kim, D-J., Park, C-B., Takasuka, N., Baba-Toriyama, H., Ota, T., Nir, Z., Khachik, F., Shimidzu, N., Tanaka, Y., Osawa, T.,

Uraji, T., Murakoshi, M., Nishino, H. and Tsuda, H. (1998) Chemopreventive Effects of Carotenoids and Curcumins on Mouse Colon Carcinogenesis after 1,2-Dimethylhydrazine Initiation, *Carcinogenesis* 19 81-85

2. 学会発表

大澤俊彦、チャンティマー ワンプントラグーン、内田浩二、岡田邦彦：酸化ストレスに対するクルクミノイドの防御機構。日本栄養食糧学会 1998 年度大会（沖縄）1998.4.

大澤俊彦、河合慶親、内藤通孝、野村秀樹、井口昭久、内田浩二、姜明花：高コレステロールウサギモデルにおけるゴマ粕中に含まれるリグナン配糖体の抗酸化効果について。日本農芸化学会 1998 年度大会（名古屋）1998.4

姜明花、内藤通孝、辻原命子、内田浩二、勝崎裕隆、大澤俊彦：ゴマに含まれるリグナンの抗酸化作用について。ゴマ研究会（静岡）1997.11

姜明花、内藤通孝、河合慶親、野村秀樹、井口昭久、内田浩二、大澤俊彦、：高コレステロールウサギの動脈硬化に対するゴマ粕中に含まれるリグナン配糖体の抑制効果について。日本栄養食糧学会 1998 年度大会（沖縄）1998.4.

G. 知的所有権の取得状況
なし

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

平成11年3月31日発行

発 行 所 愛知県大府市森岡町源吾36-3
国立療養所中部病院・長寿医療研究センター
編集発行人 木 谷 健 一
印 刷 所 社会福祉法人 仁 至 会