

厚生科学研究研究費補助金

長寿科学総合研究事業

老化に伴う黒質ドーパミン神経細胞死の機序の解明と

それを防御する薬剤の開発

(研究課題番号 H11-長寿-002)

平成12年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 丸山和佳子

平成13(2001)年3月

目次

I. 総括研究報告書	
老化に伴う黒質ドーパミン神経細胞死の機序の解明とそれを防御する 薬剤の開発	
丸山和佳子	-----1
II. 分担研究報告書	
神経毒あるいは酸化ストレスによるドーパミン神経細胞死の分子メ カニズム	
丸山和佳子	-----6
III. 分担研究報告書	
新しい経口投与可能な神経保護薬の開発	
直井信	-----13
IV. 分担研究報告書	
ドーパミン神経細胞死におけるミトコンドリア遺伝子の関与	
田中雅嗣	-----20
V. 分担研究報告書	
正常老化およびパーキンソン病患者における酸化ストレスによる黒 質ドーパミン神経傷害	
服部信孝	-----25
VI. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----31
VII. 研究成果の刊行物、別刷	-----38

厚生科学研究補助金 (長寿科学総合研究事業)

総括研究報告書

老化に伴うドーパミン神経細胞死の機序の解明とそれを防御する薬剤の開発

主任研究者 丸山和佳子 国立療養所中部病院長寿医療研究センター
老化機構研究部 生化学・代謝研究室長

研究要旨：ドーパミン神経細胞死の機序を、ミトコンドリアを中心とした細胞内アポトーシスシグナルの活性化と、ユビキチン-プロテアソーム系によるタンパク分解の障害の観点から検討した。さらに、細胞死を制御するために、経口投与可能な低分子化合物によるアポトーシスシグナルの制御の機構を解明し、遺伝子導入により異常ミトコンドリアを選択的に排除する試みを行った。今後、ドーパミン神経の生と死を制御する因子を解明するための研究を進めていく。

[研究組織]

○丸山和佳子 (国立療養所中部病院長寿医療研究センター室長)

直井信 (財団法人応用生化学研究所部長)

田中雅嗣 (財団法人岐阜県国際バイオ研究所部長)

服部信孝 (順天堂大学医学部講師)

3. 研究目的

世界に例のない速さで高齢化を迎えているわが国において、老化あるいは加齢に従う変性疾患における神経死の原因を解明し、それを保護する方法を開発することは重要な課題である。本研究課題では、加齢に対して脆弱であることが知られているドーパミン神経細胞をモデルとし、老化、および神経変性疾患であるパーキン

ソン病における細胞死を中心として研究を行う。黒質線条体におけるドーパミン神経細胞は運動の大きさと速さ、協調性などに関わる大脳基底核において中心的な役割を果たしており、この神経の変性脱落により寡動、振戦、筋固縮、姿勢反射障害等の運動障害が引き起こされる。老化あるいはパーキンソン病による運動障害は高齢者の寝たきりの原因として重

要なものであり、この治療法の開発は幸福な未来社会の構築に貢献するものである。ドパミン神経細胞死の原因は酸化ストレス、内因性神経毒、ミトコンドリア呼吸鎖障害等の要因が提唱されているが、現在までのところ結論には至っていない。一方、現在行われている治療法は、L-DOPA製剤を中心とした神経伝達物質の補充療法であり、対症療法に過ぎない。このような対症療法は早期の患者には一定の効果をもたらすものの、数年から十年で多くの患者は薬剤への反応性が低下、あるいは副作用のため十分な投薬が不可能となり、日常生活に支障をきたすに至る。患者の真の quality of life の向上のためには変性死に陥る神経細胞を保護する薬剤の開発が不可欠である。

本研究課題の目的はドパミン神経をモデルとし、老化あるいは神経変性疾患における細胞死の機序を解明し、それを防御する臨床応用可能な薬剤を開発することである。そのために主任研究者と分担研究者は以下のような研究課題を分担するとともに、お互いの研究結果を統合し、更なる研究の発展を進めてきた。

B. 研究方法

本年度は昨年度に得られた基礎データを更に発展させるための研究が行

なわれた。

1)神経毒あるいは酸化ストレスによるドパミン神経細胞死の分子メカニズム (丸山)

昨年度作成したドパミン細胞死の *in vitro* のモデルを用いて研究を行った。ヒトドパミン神経芽細胞腫である SH-SY5Y 細胞にヒト脳内に存在するドパミン細胞を選択的な神経毒である N-methyl(R)salsolinol あるいは強力なラジカルである peroxynitrite (ONOO⁻)で処理することにより、アポトーシス細胞死のモデルを確立した。本モデルを用いてアポトーシスの細胞内シグナル伝達、特にミトコンドリアにおける permeability transition pore (PT pore) に関わる分子と mitogen activated protein kinase (MAP kinase) について検討を行なった。これらの実験には主に蛍光 indicator、immunoblotting、RT-PCR を用いた。また、ラジカルによる細胞内機能分子の酸化修飾について、特異的抗体を用いた immunoblotting と免疫組織染色を行なった。

2)新しい経口投与可能な神経保護薬の開発 (直井)

上記の細胞死モデルを用いて、経口投与可能な低分子化合物によるアポトーシス抑制の機序に関する実験を行なった。昨年度までの結果でこれら低分子には共通の化学構造

(propargylamine 基) が必要であることが証明されている。その中でも本年度は最も神経保護作用の強い rasagiline と R-(2-heptyl)-N-methylpropargylamine (R-2HMP) を中心として研究を行なった。これら薬剤の合成はイスラエルおよびカナダの研究グループとの共同研究によった。薬剤により、細胞死シグナルがどのように変化するかを検討した。また、薬剤投与による細胞内遺伝子発現の変化を定量するため、DNA microarray と RT-PCR、さらに immunoblotting を用いて検討を行なった。

3) ドパミン神経細胞死におけるミトコンドリア遺伝子の関与 (田中)

ミトコンドリアはアポトーシスのシグナル伝達においても、酸化ストレスの場合としても最も重要な細胞内小器官である。加齢に従いミトコンドリア DNA (mtDNA) の変異が引き起こされ、老化に伴う神経の機能低下、あるいは細胞死に関与している可能性がある。細胞内の変異型 mtDNA をもつミトコンドリアを選択的に破壊することができれば、細胞の“若返り”が可能となるかもしれない。そこで、変異型 mt DNA と野生型 mt DNA が混在する培養細胞を作成し、そこにミトコンドリア移行シグナルを付加した制限酵素とミトコンドリア移行シグナルペプチド cDNA の融

合遺伝子を導入した。この制限酵素は変異型 mt DNA を特異的に認識し、破壊する。制限酵素遺伝子の導入前と後で細胞内ミトコンドリア機能を比較した。さらに、正常対照、百寿者、パーキンソン病患者等で mtDNA の多型について検討し、疾病発症に関与する遺伝多型について検討を行なった。

4) 正常老化およびパーキンソン病患者における酸化ストレスによる黒質ドパミン神経傷害 (服部)

遺伝性パーキンソン病の大多数を占める parkin 遺伝子の機能を解明することで、孤発性パーキンソン病あるいは老化に伴う神経細胞死の原因解明を行う。変異 parkin 遺伝子を発現させた細胞、あるいはマウスにおける正常 parkin の発現変化、knock out mouse を用いて解析を行う。

C. 研究結果

1) 神経毒あるいは酸化ストレスによるドパミン神経細胞死の分子メカニズム (丸山)

内在性神経毒である N-methyl(R)salsolinol はミトコンドリアに存在する標的分子と結合し、アポトーシスシグナルを起動することが示唆された。一方 ONOO⁻ は p38 MAP kinase を活性化すると共に、growth arrest and DNA damage-inducible

(GADD) family の誘導、そして酸化タンパクのミトコンドリアにおける増加をもたらした。ONOO⁻によるタンパク酸化の指標であるニトロチロシンは Lewy 小体の alpha-synuclein に存在するが、ニトロチロシン修飾タンパクがユビキチン-プロテアソーム系で分解されることが明らかとなった。

2)新しい経口投与可能な神経保護薬の開発 (直井)

rasagiline および R-2HMP は、神経毒あるいはラジカルによるミトコンドリアの PT pore の開口を抑制した。さらに、PT pore の制御に関わるタンパクの中でも、bcl family の発現を制御することが示された。rasagiline 投与により bcl-2 の mRNA およびタンパクの増加が用量/時間依存的に認められた。gene array を用いた実験でも複数のアポトーシス関連遺伝子が rasagiline 投与によって変化することが示されており、今後細胞内シグナル伝達の経路を明らかとすることが必要と考えられた。

3)ドパミン神経細胞死におけるミトコンドリア遺伝子の関与 (田中)

制限酵素にミトコンドリア移行シグナルを付加した cDNA の導入によって培養細胞における変異型 mtDNA の選択的破壊が起こり、それに引き続く野生型ミトコンドリアの増殖によ

り細胞内ミトコンドリア機能障害 (ATP 産生および膜電位低下など)が回復した。また、マウス、モルモット等の動物に対するこの治療の安全性も確認することができた。また、正常者における mtDNA に多くの多型が存在することが見いだされた。

4)正常老化およびパーキンソン病患者における酸化的ストレスによる黒質ドパミン神経傷害 (服部)

parkin 遺伝子が ubiquitin-ligase であることが証明された。本酵素により分解を受ける基質を明らかとすることができれば、選択的ドパミン神経細胞死の機序が解明される可能性がある。さらに、parkin 変異による遺伝性パーキンソン病においては Lewy 小体が認められないが、ニトロチロシン化タンパク等の Lewy 小体中存在するユビキチン-プロテアソーム系で分解されるべき酸化タンパクが基質候補のとして可能性がある。

D 考察

本年度の研究により、神経毒あるいはラジカルによる細胞死、また神経保護薬の標的はミトコンドリアであることが強く示唆された。今後、MAP kinase 等の細胞質シグナルと bcl family、さらに PT pore の開口を調節する分子等の相互作用を解明することが重要と考えられた。さらに、酸

化タンパクの分解にユビキチン-プロテアソーム系が主要な役割を果たしていることが示された。さらに遺伝性パーキンソン病の原因遺伝子である parkin が ubiquitin-ligase であることが証明されたことから、黒質ドパミン神経細胞の細胞死には分解されるべき変性した機能分子の蓄積が関与している可能性がある。一方 mtDNA の変異はミトコンドリア機能不全を引き起こし、細胞を脆弱とし、あるいは細胞の形質を変化させることによって老化を引き起こしている可能性がある。本研究により、現在まで不可能であった変異 mtDNA をもつミトコンドリアに対する遺伝子治療が可能となる可能性が示された。

E 結論

老化あるいはパーキンソン病におけるドパミン神経細胞死の機序がミト

コンドリアと核シグナル伝達の相互作用を中心に解明されつつある。さらに遺伝性および孤発性パーキンソン病の双方において、変性タンパクのユビキチン-プロテアソームによる分解の障害が関与している可能性が示された。

一方、ドパミン神経の変性を抑制する方策として、経口投与可能な神経保護薬である propargylaine 化合物の作用機序が細胞内アポトーシスシグナルとの関係で解明されつつあると同時に、ミトコンドリア遺伝子治療の基礎実験結果を得ることができた。今後、老化および老年病におけるドパミン神経の細胞死の制御が実現されることが期待される。

F 健康危険情報

なし

厚生科学研究補助金 (長寿科学総合研究事業)
分担研究報告書

神経毒あるいは酸化ストレスによるドーパミン神経細胞死の分子メカニズム

主任研究者 丸山和佳子 国立療養所中部病院長寿医療研究センター
老化機構研究部 生化学・代謝研究室長

研究要旨：老化あるいは加齢に伴う神経変性疾患であるパーキンソン病におけるドーパミン神経細胞死の機序を解明する目的で研究を行った。peroxynitrite による酸化ストレスは MAP kinase に引き続き gadd の誘導といった核シグナルを活性化すると同時に、ミトコンドリアにおけるアポトーシスシグナルを起動した。それと同時に、細胞内タンパクのチロシン残基のニトロ化が引き起こされた。ニトロチロシン修飾タンパクはミトコンドリアの呼吸鎖酵素の中でも complex I に多く認められた。酸化修飾タンパクは細胞内プロテアゾーム-ユビキチン系により分解された。内在性神経毒 N-methyl(R)saloslinol はミトコンドリアに存在する標的因子を介して細胞内アポトーシスシグナルを起動させた。加齢およびそれにもなう神経変性疾患においてはミトコンドリアの機能不全とアポトーシスシグナルが細胞死を司っている可能性がある。

A. 研究目的

黒質線条体ドーパミン神経細胞は加齢によりその数と機能が低下することが証明されている。さらに、加齢に伴い発症が増加するいわゆる老年病の代表であるパーキンソン病においてはドーパミン神経細胞の選択的な変性脱落が起こる。ドーパミン神経細胞がこのように加齢に関して脆弱である理由として、神経伝達物質であるドーパミンを合成、代謝する過程で生

成する活性化酸素 (ROS) あるいは活性化窒素 (RNS) による細胞傷害が関与していると考えられている。ROS あるいは RNS によりアポトーシスシグナルの連続的な活性化が引き起こされ、細胞は最終的に死に至る。パーキンソン病におけるドーパミン神経細胞死にも、酸化ストレスが関与していることが示唆されているが、なぜ特定の間が疾病を発症するのかについて解明することが必要であ

る。我々はドパミンから二段階の酵素反応によって生成されるイソキノリンアルカロイドである N-methyl(R)salsolinol の脳脊髄液中濃度、およびその生成の律速酵素である中正(R)salsolinol N-メチル転移酵素のリンパ球中の活性がパーキンソン病患者で増加していることを見出した。培養ドパミン系神経芽細胞腫を用いた実験で、N-methyl(R)salsolinol は光学異性体選択的にアポトーシスを惹起することが証明された。老化そのものにおける神経細胞死においてアポトーシスが主要な役割を果たしているか否かは明らかではないが、虚血や、パーキンソン病において、アポトーシスマーカーである TUNNEL 陽性細胞や、アポトーシス実行因子である活性化カスパーゼ陽性の神経細胞の増加が報告されている。本研究では、酸化ストレス、あるいは N-methyl(R)salsolinol などのヒト脳に内在する神経毒による細胞死の機序を明らかとすることを目的として研究を行った。

B. 研究方法

ドパミン神経細胞のモデルとして、ヒトドパミン神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞を用いた。ドパミン神経細胞を強力なラジカルである peroxynitrite (ONOO⁻) で処理し、アポトーシスを

誘導した。ONOO⁻の細胞内 mitogen activated protein kinase (MAP kinase) の活性化、あるいは growth arrest and DNA damage-inducible (GADD) 遺伝子発現に及ぼす影響について検討した。さらに、ONOO⁻によるより直接的な細胞傷害の機序を解明する目的で、ONOO⁻によるタンパクの酸化的修飾のマーカーであるニトロチロシン修飾タンパクの定量と細胞内分布について immunoblotting を用い明らかとした。また、修飾タンパクを同定するために二次元電気泳動を行った。

一方、昨年の研究により、N-methyl(R)salsolinol 処理によるアポトーシスはミトコンドリア依存性のシグナルを介すること、その活性化には光学異性体選択性があることから特定の結合分子の存在が示唆されている。この分子がミトコンドリアそれ自身に存在するか否かを検討するため、単離ミトコンドリアに rhodamine を取り込ませた後に N-methyl(R)salsolinol を添加し、ミトコンドリアにおける permeability transition pore (PT pore) の開口におよぼす N-methyl(R)salsolinol の直接の作用を検討した。さらに、N-methyl(R)salsolinol による細胞死における遺伝子発現変化を網羅的に検討するため、DNA array を用いた mRNA

profile の定量を経時的に行った。

C. 研究結果

ヒト老人脳の免疫染色の結果、神経細胞に存在する老化色素であるリポフスチンがニトロチロシンが陽性であった。培養細胞を用いた実験で、ONOO⁻刺激により p38 MAP kinase のリン酸化とそれに引き続く gadd 34、gadd 45 および gadd 153 の mRNA とタンパクの増加が惹起された。さらに、細胞内ニトロチロシン修飾タンパクは定常状態においても核およびミトコンドリア分画に存在したが、ONOO⁻処理により増加した。さらに、プロテアゾーム処理によりニトロチロシン修飾タンパクの増加が認められたことから、細胞内では持続的に ONOO⁻による酸化傷害が起きていること、酸化修飾タンパクはユビキチン-プロテアゾーム系で分解されることが示された。

N-methyl(R)salsolinol は単離ミトコンドリアに対して PT pore を開口させることが示され、本神経毒に対する結合分子がミトコンドリアに存在することが証明された。さらに、N-methyl(R)salsolinol はミトコンドリアからのアポトーシスシグナル活性化の下流で、TNF-alpha、bcl family、caspase family 等の発現を変化させることが示され、今後シグナル伝達の

流れを解明する必要があると考えられた。

D 考察

酸化ストレスは老化あるいは加齢に伴う神経変性疾患の発症に深く関わっている。MAP kinase の活性化は細胞の早期におけるストレス応答に重要な役割を果たしている。本年度は昨年度報告した ONOO⁻による p38 MAPK 活性化の下流シグナルとして、gadd family の遺伝子発現が増加することを見出した。今後 MAPK による細胞の生と死を司る分子をさらに明らかとするとともに、ONOO⁻により活性化をうけるもう一つの系であるミトコンドリアにおけるシグナル伝達との関係を検討したい。近年パーキンソン病の病理的特徴であるレビー小体の主体となるタンパクは alpha-synuclein であり、さらに、このタンパクのチロシン残基自体がニトロ化をうけていることが報告された。ONOO⁻によるタンパク酸化傷害と凝集、そして細胞内封入体の生成が細胞死の機序の中でどのような役割を果たしているのか、今後の検討が必要である。本年度の研究で、ニトロチロシン修飾タンパクがミトコンドリアの、特に complex I 構成分子に存在すること、そして酸化修飾タンパクが主にプロテアゾーム-ユビキチン

ン系で分解されることが示された。近年常染色体劣性のパーキンソニズムの原因遺伝子として同定された parkin が ubiquitin-ligase であることが明らかとなっており、パーキンソン病においてはニトロチロシンを含む酸化修飾タンパクの生成亢進あるいは分解低下による蓄積が細胞死に関わっている可能性がある。一方、内在性神経毒である N-methyl(R)salsolinol がミトコンドリアに存在する標的分子の活性化を介してアポトーシスを起動することが示された。ミトコンドリアは酸化ストレスの場としても、あるいはアポトーシスシグナルを集約し、生と死を司る場としても中心的役割を果たしている細胞内小器官である。今後この標的分子を同定することにより、細胞死の制御に向けてに新たな知見がえられることが期待される。

E 結論

酸化ストレスあるいは内在性神経毒によるドパミン神経細胞死の機序をタンパク修飾および細胞内シグナル伝達から検討した。ミトコンドリアはこの両者による細胞傷害あるいは細胞死において中心的役割を果たしていると考えられ、将来の神経保護療法のターゲットとなる可能性がある。

F 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. M. Naoi, W. Maruyama:

Anti-apoptotic function of (-)deprenyl.

Monoamine oxidases, milestones in deprenyl research. 171-182, 2001

K. Magyar and E.S. Vizi (eds) Medicina Publisher House, Budapest

2. 丸山和佳子、直井信:

内因性パーキンソン病発症物質の探索 日本薬理学会誌 Vol 116, 333-342, 2000

3. 丸山和佳子、直井信:

内因性黒質神経毒 神経研究の進歩 Vol 44, 527-538 2000

4. 丸山和佳子、直井信:

パーキンソン病の機序—ドパミン神経細胞の変性機構を中心に

作業療法ジャーナル Vol 34, 873-877, 2000

5. M. Naoi, W. Maruyama, Y. Akao, J. Zhang, H. Parvez:

Apoptosis induced by an endogenous neurotoxin, N-methyl(R)salsolinol, in dopamine neurons. Toxicology 153: 123-141, 2001.

6. K. Oh-hashi, W. Maruyama, K. Isobe:

Peroxyntirite induces gadd34, 45 and 153

- via p38 MAPK in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Free Rad. Biol. Med.* 30: 213-221, 2001.
7. W. Maruyama, A. A. Boulton, B. A. Davis, P. Dostert and Makoto Naoi: Enantio-specific induction of apoptosis by an endogenous neurotoxin, *N*-methyl(*R*)salsolinol, in dopaminergic SH-SY5Y cells: Suppression of apoptosis by *N*-(2-heptyl)-*N*-methylpropargylamine *J. Neural Transm.* 108: 11-24, 2001.
8. W. Maruyama, Y. Akao, M. Youdim, M. Naoi: Neurotoxin Induced Apoptosis in Dopamine Neurons: Protection by *N*-Propargylamine-1(*R*)- and (*S*)-aminoindan, Rasagiline and TV1022 *J. Neural Transm. (Suppl)* 60: 171-186, 2000.
9. M. Naoi, W. Maruyama, T. Takahashi, Y. Akao, Y. Nagasawa: Involvement of endogenous *N*-methyl(*R*)salsolinol in Parkinson's disease: induction of apoptosis and prevention by (-)deprenyl. *J. Neural Transm. (Suppl)* 58: 111-121, 2000.
10. W. Maruyama, T. Yamamoto, K. Kitani, M. C. Carrillo, M. Youdim, M. Naoi: Mechanism underlying anti-apoptotic activity of a (-)deprenyl-related propargylamine, rasagiline. *Mech. Aging Dev.* 116:181-191, 2000.
11. W. Maruyama, K. Sango, K. Iwasa, C. Minami, P. Dostert, M. Kawai, M. Moriyasu, M. Naoi: Dopaminergic neurotoxins, 6,7-dihydroxy-1-(3'4'-dihydroxybenzyl)-isoquinolines, cause different types of cell death in SH-SY5Y cells: apoptosis was induced by oxidized papaverolines and necrosis by reduced tetrahydropapaverolines. *Neurosci. Lett.* 291:89-92, 2000.
12. M. Naoi, W. Maruyama, K. Yagi, M. B. H. Youdium: Anti-apoptotic function of L-(-)deprenyl (selegiline) and related compounds. *Neurobiology* 8: 69-80, 2000.
13. W. Maruyama, M. Strolin-Benedetti, M. Naoi: *N*-Methyl(*R*)salsolinol and a neutral *N*-methyltransferase as pathogenic factors in Parkinson's disease. *Neurobiology* 8: 55-68, 2000
14. M.C. Carrillo, C. Minami, K. Kitani, W. Maruyama, K. Ohashi, T. Yamamoto, M. Naoi, S. Kanai, M.B.H. Youdim: Enhancing effect of rasagiline on superoxide dismutase and catalase activities in the dopaminergic system in rat. *Life Sci.* 67: 577-585, 2000

15. K. Sango, W. Maruyama, K. Matsubara, P. Dostert, C. Minami, M. Kawai, M. Naoi:
Enantio-selective occurrence of (S)-tetrahydropapaveroline in human brain. *Neurosci. Lett.* 283:224-226 2000.

2. 学会発表

1. W. Maruyama, M. Naoi, Y. Akao:
Mechanism of apoptosis induced by an endogenous neurotoxin, N-methyl(R)salsolinol: 30th Meeting of Society for Neuroscience

November 4-9, 2000, New Orleans, USA

2. J. Zhang, M. Tanaka, W. Maruyama, M. Naoi, Y. Kawamura:

Increased modification of mitochondrial proteins by lipid peroxidation products in cultured cells with respiratory defects.:

30th Meeting of Society for Neuroscience
November 4-9, 2000, New Orleans, USA

3. M. Naoi, W. Maruyama, Y. Akao:
Mechanism of anti-apoptotic activity of propargylamines. 30th Meeting of Society for Neuroscience

November 4-9, 2000, New Orleans, USA

4. W. Maruyama, M. Naoi, Y. Akao, A.A. Boulton, A. Davis:

Mechanism of apoptosis induced by endogenous neurotoxin, N-methyl(R)salsolinol in dopamine cells.

9th International Amine Oxidase

Workshop July 9-12, Barcelona, Spain

5. 丸山和佳子、赤尾幸博、直井信
ヒト脳内在性神経毒、N-methyl(R)salsolinol によるドパミン神経の細胞死の機序 第43回日本神経化学会 2000. 10/18-20 金沢

6. 直井信、丸山和佳子、赤尾幸博、高橋勤

Propargylamine 類による神経細胞のアポトーシス防御の機序 第43回日本神経化学会 2000. 10/18-20 金沢

7. Jin Zhang, 田中雅嗣, 丸山和佳子, 加藤陽二, 内田浩二, 直井 信, 八木國夫

ミトコンドリア遺伝子変異を有する細胞におけるミトコンドリア蛋白質の脂質過酸化反応産物による修飾の増大 過酸化脂質学会 2000. 10/15-16 京都

8. 丸山和佳子 直井信 赤尾幸博
N-methyl(R)salsolinol によるドパミン細胞のアポトーシスと propargylamine 化合物による防御のメカニズム 第73回日生化学会 2000. 10/11-14 横浜

9. 山本 貴子 加藤 陽二 丸山 和佳子 高橋 勤 佐藤 祐造 八木 国夫 直井 信 Peroxynitrite (ONOO-)によるドパミン細胞内タンパクの酸化とアポトーシスの誘導 第73回日生化学会 2000. 10/11-14 横浜

10. ZHANG, Jin, 田中 雅嗣 丸山 和佳子 直井 信 内田 浩二 加藤 陽二 八木 國夫

Increased modification of mitochondrial proteins by lipid peroxidation products in cultured cells with respiratory defects

第 73 回日生化学会 2000. 10/11-14 横浜

11. 丸山和佳子

孤発性パーキンソン病の病因の探索
ノバルティス老化および老年病医学
研究基金 1998 年度受賞者講演 第 42
回日本老年病医学会 2000. 6. 仙台

12. 丸山和佳子、磯部健一、木谷健一、
直井信

Propargylamine 類の抗アポトーシス
作用に関する研究 第 23 回基礎老化
学会、2000. 6. 大府

13. 山本貴子、加藤陽二、丸山和佳子、
大桑哲男、佐藤祐造、木谷健一、直
井信

Peroxynitrite (ONOO-) による細胞内
タンパクの酸化とアポトーシスの誘
導 第 23 回基礎老化学会、2000. 6. 大
府

14. 南知予子、前原佳代子、山本貴子、
丸山和佳子、磯部健一、木谷健一
デプレニルによるラット全身諸臓器
の抗酸化酵素活性上昇効果

第 23 回基礎老化学会、2000. 6. 大府

15. 大橋憲太郎、丸山和佳子、磯部健
一

パーオキシナイトライトによる SH-
SY5Y 細胞への growth arrest and DNA
damaged-inducible gene の誘導

第 23 回基礎老化学会、2000. 6. 大府

16. 丸山和佳子、直井信、柳澤信夫：
N-Methyl(R)salsolinol によるドパミン
神経細胞死の機序とそれを防御する薬
剤の開発 第 40 回日本神経学会総会
2000.5. 松本

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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

新しい経口投与可能な神経保護薬の開発

分担研究者 直井 信 応用生化学研究所 部長

老化に伴う神経変性疾患における神経細胞の死がアポトーシスによると報告されている。アポトーシスの細胞内カスケードを制御することで神経細胞を変性から保護する試みが基礎及び臨床で提唱されている。特にパーキンソン病においては、Parkinson Study Group による propargylamine 化合物 ((-)-deprenyl および rasagiline) 臨床研究が組織的に米国を中心に行われている。しかしその神経細胞保護作用の分子レベルの機序は未だ明らかでなく、神経細胞での研究が求められている。我々はパーキンソン病におけるドパミン細胞の死が内在性の神経毒によるアポトーシスによることを証明してきた。さらに (-)-deprenyl などの propargylamine 化合物がこの細胞死を抑止し神経細胞を保護すること、また保護活性に必須な化学構造を昨年度明らかにした。本年度では更にこれら神経細胞保護剤がミトコンドリアにおけるアポトーシスカスケードの活性化を阻止することによることを見出した。また細胞内で anti-apoptotic protein として知られている Bcl-2 family protein が up-regulation されることを発見した。これらの結果は propargylamine 化合物が細胞に内在する抗アポトーシス機構を活性化し、広く神経細胞の細胞死を予防または遅延できる可能性を示している。

A. 研究目的

神経変性疾患におけるニューロンの選択的な細胞死がアポトーシスによる結果が Alzheimer 病、Huntington 病、Parkinson 病で報告されている。細胞死を誘発する要因としては遺伝因子、環境因子の関与が各々の疾患で提唱されている。しかし最終的な細胞死に至る過程は共通な細胞に内在するアポトーシス機構の活性化による。最近この細胞死を制御する分子が神経細胞の保護

剤の標的となりうる可能性が提唱されている。既に我々は培養細胞を用い propargylamine 誘導体で唯一我が国で臨床で使用されている (-)-deprenyl がアポトーシスを阻止することを見出した。また昨年度の研究で抗アポトーシス活性に必要な化学構造を明かした。本年度ではさらに抗アポトーシス活性の細胞内機構を明かとし、ミトコンドリアが細胞の生と死を決定する場であることを証明した。これらの結果から、本研究の最終の目的とする Parkinson 病

等の神経変性疾患と老化における神経細胞の細胞死を予防または修復する薬剤を開発する基礎的な結果が得られつつある。

B. 研究方法

ドパミン細胞のモデルとしてヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞を用いた。内在性神経毒 N-methyl(R)salsolinol、酸化ストレスを介する神経毒 6-hydroxy-dopamine、細胞毒性の高いラジカルである peroxynitrite を発生する SIN-1 により SH-SY5Y 細胞にアポトーシスを誘発した。また神経細胞保護活性を有する propargylamine 誘導体で最も保護活性の高い rasagiline (イスラエル、M. Youdim 教授より提供) N-(2-heptyl)-N-methylpropargylamine (カナダ、A. Boulton 教授より提供) を用い抗アポトーシス作用の分子メカニズムを検討した。

細胞死は propidium iodide による核染色で、またアポトーシスであることを Hoechst 33342 の核染色により蛍光顕微鏡法により確認した。更に DNA の断裂をアガロース電気泳動法により測定した。細胞内機序を明らかにするため、ミトコンドリア膜電位、 $\Delta\Psi_m$ の変化を蛍光指示薬 JC-1 を用い蛍光顕微鏡により、また MitoTracker Orange, Green を用いた Flow cytometry 法により定量した。細胞とラット肝から単離したミトコンドリアにおける permeability transition pore (PTP) の変化を rhodamin 123 による蛍光法により測定した。PTP

を構成する voltage-dependent anion channel (VDAC), adenosine phosphate translocator (APT), peripheral benzodiazepine receptor (PBR) にたいする propargylamine 類の作用を検討した。最近アポトーシスのシグナルとして注目されている glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の細胞内局在を免疫染色と蛍光顕微鏡により検討した。Anti- または pro-apoptotic protein である Bcl-2, Bcl-X family, BAX family の mRNA の発現を Northern blot analysis にて検討した。

また Bcl-2 protein family のアポトーシスへの関与を明らかにするため、SH-SY5Y 細胞に Bcl-2 を強制発現した細胞を作成し、細胞死に至るシグナル伝達への影響を検討した。

C. 研究結果

N-methyl(R)salsolinol, SIN-1 6-hydroxy-dopamine は SH-SY5Y 細胞にアポトーシスを惹起した。N-methyl(R)salsolinol は SH-SY5Y 細胞にミトコンドリア膜電位 $\Delta\Psi_m$ の低下、GAPDH の細胞質から核への移行、caspase 3 の活性化を段階的に誘発し、核の断裂、凝縮、細胞死が引き起こされた。

細胞に予め rasagiline を添加培養した後、神経毒あるいは、SIN-1 を添加すると、細胞死が抑制された。細胞死のカスケイドのどの点に propargylamine が作用し細胞死を阻止するかを検討したところ、rasagiline が神経毒による $\Delta\Psi_m$ の低下を阻止することが JC-1 の蛍光変

化から証明された。単離ミトコンドリアに予め取り込ませた Rhodamin 123 は神経毒により PTP が開口することにより細胞質へ漏出し、蛍光の増加として観察される。rasagiline は神経毒による rhodamin123 のミトコンドリアからの流出を濃度依存的に抑制した。SH-SY5Y 細胞を用いた実験でも同様な手法により PTP の開口を定量した。細胞を rasagiline で前処理しておくこと、表 1 に示すように、PTP の開口が抑制されることが証明された。また PBR と結合する PK11195 によ惹起された PTP の開口に rasagiline が拮抗することが認められた。

さらに rasagiline は膜電位の変化に続く caspase 3 の活性化、GAPDH の核内蓄積を抑制した。これらの結果は Bcl-2 を過剰発現した SH-SY5Y 細胞においても同様に確認された。このことから、rasagiline がアポトーシス誘発の細胞内機構における Bcl-2 の抗アポトーシス作用と類似の機序により細胞死を制御することが示唆された。

rasagiline による抗アポトーシス作用が細胞内の anti-apoptotic, pro-apoptotic protein family を介するか否かを検討した。Bcl-2 の mRNA のみが濃度また時間依存的に rasagiline により増加することを発見した。これらの結果は propargylamine 誘導体の神経保護活性が細胞に内在する anti-apoptotic protein family の活性化を介することを強く示唆している。

D. 考察

rasagiline と類似の化学構造を持つ propargylamine 類がミトコンドリアにおけるアポトーシス調節機構を介して神経細胞の死を阻止できることを証明した。ミトコンドリアの PTP は PBR, ATP, VDAC からなる mega-channel であり、ATP 産生、Ca 濃度の調節、など細胞の維持に必須である。一方その開口はアポトーシスに至る死のシグナルであることが知られている。この channel は Bcl-2 等の anti-apoptotic protein と Bax 等の pro-apoptotic protein により調節されている。我々の結果は propargylamine が Bcl-2 の作用を増強することを示している。rasagiline 等の経口投与可能な薬剤は米国では既に神経保護剤として Phase 3 での臨床研究が進んでいる。我々の細胞での結果はその分子レベルでの機構を明らかにしつつある。

E. 結論

神経保護活性を持つ propargylamine 誘導体がミトコンドリアに存在する抗アポトーシス機構を活性化し細胞死を抑制することを明らかにした。老化と神経変性疾患における細胞死の予防と治療の分子機構が明かとなり近い将来実用化される可能性が示された。

F. 研究発表

論文発表

1. Maruyama, W., Kato, Y., Yamamoto, T., Oh-hashii, K., Hashizume, Y., Naoi, M. Peroxynitrite induces neuronal cell

- death in aging and age-associated disorders. *Age*, 23 (2001) 11-18
2. Maruyama, W., Boulton, A. A., Davis, B. A., Naoi, M. Enantio-specific induction of apoptosis by an endogenous neurotoxin, N-methyl(R)salsolinol, in dopaminergic SH-SY5Y cells: suppression of apoptosis by N-(2-heptyl)-N-methylpropargylamine. *Journal of Neural Transmission*, 108 (2001) 11-24
 3. Naoi, M., Maruyama, W., Akao, Y., Zhang, J., Parvez, H. Apoptosis induced by an endogenous neurotoxin, N-methyl(R)salsolinol, in dopamine neurons. *Toxicology*, 153 (2001)
 4. Naoi, M., Maruyama, W., Yagi, K., Youdim, M. Anti-apoptotic function of L-(-)deprenyl (selegiline) and related compounds. *Neurobiology* 8 (2000) 69-80
 5. Maruyama, W., Strolin-Benedetti, M., Naoi, M. N-Methyl(R)salsolinol and a neutral N-methyltransferase as pathogenic factors in Parkinson's disease. *Neurobiology* 8 (2000) 55-68
 6. Maruyama, W., Sango, K., Iwasa, K., Minami, C., Dostert, P., Kawai, M., Moriyasu, M., Naoi, M. Dopaminergic neurotoxins, 6,7-dihydrox-1-(3',4'-dihydroxybenzyl)-isoquinolines, cause different types of cell death in SH-SY5Y cells: apoptosis was induced by oxidized papaverolines and necrosis by reduced tetahydropapaverolines. *Neuroscience Letters* 291 (2000) 89-92
 7. Sango, K., Maruyama, W., Matsubara, K., Dostert, P., Minami, C., Kawai, M., Naoi, M. Enantio-selective occurrence of (S)-tetrahydropapaveroline in human brain. *Neuroscience Letters* 283 (2000) 224-226
 8. Carrillo, M. C., Minami, C., Kitani, K., Maruyama, W., Oh-hashii, K., Yamamoto, T., Naoi, M., Kanai, S., Youdim, M. B. H. *Life Sciences* 67 (2000) 577-585
 9. Maruyama, W., Akao, Y., Youdim, M., Naoi, M. Neurotoxin induced apoptosis in dopamine neurons: protection by N-Propargylamine -1(R)- and (S)-aminoindan, Rasagiline and TV1022. *Journal of Neural Transmission [Supplement]* 60 (2000) 147-162
 10. Naoi, M., Maruyama, W., Takahashi, T., Akao, Y., Nakagawa, Y. Involvement of endogenous N-methyl(R)salsolinol in Parkinson's disease: Induction of apoptosis and protection by (-)deprenyl. *Journal of Neural Transmission [Supplement]* 58 (2000) 111-121
 11. Maruyama, W., Yamamoto, T., Kitani, K., Carrillo, M. C., Youdim, M., Naoi, M. Mechanism underlying anti-apoptotic activity of a (-)deprenyl-related propargylamine, rasagiline. *Mechanisms of Ageing and Development* 116 (2000) 181-191
 12. Naoi, M., Maruyama, W., Youdim, M. B. H., Yu, P., Boulton, A. A. Anti-apoptotic function of propargylamine inhibitors of type-B monoamine oxidase. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, in press.
 13. Naoi, M., Maruyama, W. Future of neuroprotection in Parkinson's disease. *Parkinsonism and Related Disorders*, in press.
 14. 直井信、丸山和佳子、ドパミン神経細胞の変性機構、*総合臨床*、48 (2000) 2753-2760
 15. 丸山和佳子、直井信、内在性黒質神経毒、*神経研究の進歩* 44 (2000) 527-538
 16. 丸山和佳子、直井信、パーキンソン病の機序—ドパミン神経細胞の変性機構を中心に— *作業療法ジャーナル* 34 (2000) 873-877

17. 丸山和佳子、直井信、内因性パーキンソン病発症物質の検索、日本薬理学会誌 116 (2000) 333-342
 18. 山本貴子、大桑哲男、伊藤宏、佐藤祐造、直井信、自発的運動による抗酸化機能の誘導：ラットの週齢及び運動期間との関連、東海保健体育下学 22 (2000) 17-24
 19. Naoi, M., Maruyama, W., Anti-apoptotic function of (-)-deprenyl, In: "Monoamine Oxidases. Milestones in deprenyl research" K. Magyar and E. S. Vizi (Eds.) pp. 171-182, Medicina Publisher House, Budapest, 2001
 20. Naoi, M., Maruyama, W., Akao, Y., Nakagawa, Y., Takahashi, T. Apoptosis by an endogenous neurotoxin, N-methyl(R)salsolinol: Relevance to Parkinson's disease. In: Neurotoxic Factors in Parkinson's Disease and Related Disorders, Collins, M., Starch, A. (Eds). pp. 77-89, Charger, 2001
 21. Maruyama, W., Youdim, M. B. H., Naoi, M. Antiapoptotic properties of rasagiline, N-propargylamine-1(R)-aminoindan, and its optical (S)-isomer, TV-1022. Annals of New York Academy of Sciences, The New York Academy of Sciences, in press.
 22. Naoi, M., Maruyama, W. An endogenous dopamine-derived neurotoxin, N-methyl(R)salsolinol: Induction of apoptosis in dopamine neurons. In: Mechanisms of Degeneration and Protection of the Dopaminergic System, Segura-Aguilar J. (ed.) Graham, in press.
- 学会発表
1. Maruyama, W., Naoi, M., Youdim, M. B. H. Mechanism of apoptosis in dopaminergic neurons and protection by selegiline analogues. 8th International Winter Conference on Neurodegeneration. "Neurodegeneration and Neuro-protective Drugs at the Millennium" February 9-13, 2000, Tegensee, Germany
 2. 直井信、「パーキンソン病におけるドーパミンニューロンの選択的細胞死」第2回和歌山、泉南地区パーキンソン病治療研究会、平成12年3月11日、和歌山市
 3. Naoi, M., Maruyama, W., Youdim, M. B. H. Anti-apoptotic activity of rasagiline and related propargylamines. 14th Rapaport Symposium, "The Molecular Biology of Neuropsychiatric Diseases" April 12-13, 2000, Haifa, Israel
 4. 丸山和佳子、直井信、「内在性神経毒、N-methyl(R)salsolinolによるドーパミン神経細胞死と propargylamineによる細胞死防御の機序に関する研究」第8回カテコールアミンと神経疾患研究会、平成12年4月22日、東京
 5. 丸山和佳子、直井信、「N-Methyl(R)salsolinolによるドーパミン神経細胞死の機序とそれを防御する薬剤の開発」第41回日本神経学総会、平成12年24-26日、松本
 6. 衣斐達、丸山和佳子、直井信、佐橋功「病的骨格筋における酸化ストレスによる蛋白障害—抗Ne-(hexanoyl) lysine抗体を用いた免疫組織学的検討—」第41回日本神経学総会、平成12年24-26日、松本
 7. Naoi, M., Maruyama, W., Youdim, M. B. H., Yu, P., Boulton, A. A., Anti-apoptotic function of propargylamine series of

monoamine oxidase inhibitors, 9th International Amine Oxidase Workshop, "Amine Oxidases: Enzymes with Novel functions?" July 9-12, 2000, Barcelona, Spain

8. Maruyama, W., Naoi, M., Akao, Y., Boulton, A. A., Davis, A. Mechanism of apoptosis induced by endogenous neurotoxin, N-methyl(R)salsolinol in dopamine cells. 9th International Amine Oxidase Workshop, "Amine Oxidases: Enzymes with Novel Functions?" July 9-12, 2000, Barcelona, Spain

9. Naoi, M., Maruyama, W., Future of neuroprotection in parkinson's disease. 5th International Symposium on the treatment of Parkinson's disease, September 30-October 1, 2000, 神戸

10. 丸山和佳子、赤尾幸博、直井信、
「N-methyl(R)salsolinol によるドパミン細胞のアポトーシスと propargylamine 化合物による防御のメカニズム」第 73 回日本生化学大会、平成 12 年 10 月 11-14 日、横浜

11. 山本貴子、加藤陽二、丸山和佳子、高橋勤、佐藤祐造、八木国夫、直井信
「Peroxynitrite (ONOO-)によるドパミン細胞内タンパクの酸化とアポトーシスの誘導」第 73 回日本生化学大会、平成 12 年 10 月 11-14 日、横浜

12. Zhang, J., 田中雅嗣、丸山和佳子、直井信、内田浩二、加藤陽二、八木国夫、
"Increased modification of mitochondrial proteins by lipid peroxidation products in cultured cells

with respiratory defects" 第 73 回日本生化学大会、平成 12 年 10 月 11-14 日、横浜

13. 丸山和佳子、赤尾幸博、直井信。「ヒト脳内在性神経毒、N-methyl(R)salsolinol によるドパミン神経の細胞死の機序」第 43 回日本神経化学学会大会、平成 12 年 10 月 18-20 日、金沢

14. 直井信、丸山和佳子、赤尾幸博、高橋勤、「Propargylamine 類による神経細胞のアポトーシス防御の機序」第 43 回日本神経化学学会大会、平成 12 年 10 月 18-20 日、金沢

15. Naoi, M., Maruyama, W., Akao, Y. Mechanism of anti-apoptotic activity of propargylamines. Society for Neuroscience, 30th Annual Meeting, November 4-9, 2000, New Orleans, USA

16. Maruyama, W., Naoi, M., Akao, Y. Mechanism of apoptosis induced by an endogenous neurotoxin, N-methyl-(R)salsolinol. Society for Neuroscience, 30th Annual Meeting, November 4-9, 2000, New Orleans, USA

17. Zhang, J., Tanaka, M., Maruyama, W., Naoi, M., Kawamura, Y. Increased modification of mitochondrial proteins by lipid peroxidation products in cultured cells with respiratory defects. Society for Neuroscience, 30th Annual Meeting, November 4-9, 2000, New Orleans, USA

18. 直井信、「パーキンソン病：その病因と神経細胞の保護」第 21 回運動障害研究会、平成 13 年 1 月 20 日、東京