

学会発表

1. Mizuno Y, Autosomal recessive parkinsonism. 6th International Congress of Parkinson's Disease And Movement Disorders, Barcelona, Spain, June 11–15, 2000
2. Mizuno Y, Message from the Asia Pacific Rim. The Fourth European Parkinson's Disease Association Conference, Vienna, Austria, November 9–12, 2000
3. Mizuno Y, Guidelines for the Treatment of Parkinson's Disease Based on Evidence Based Medicine. Philippine Neurological Association's 22nd Annual Convention, Baguio City, Philippine, November 15–18, 2000
4. Mizuno Y, Progress in Genetic Aspects of Dystonias & Parkinsonism. Philippine Neurological Association's 22nd Annual Convention, Baguio City, Philippine, November 15–18, 2000
5. Mizuno Y, Molecular bases of familial Parkinson's disease. COE International Symposium on Molecular Bases of Neural Development and Neurodegenerative Diseases, Nagoya, Japan, November 30, 2000
6. Mizuno Y. Progress in familial Parkinson's disease clinical and genetic aspects. Mayo Alzheimer's and Parkinson's Disease Center Seminar Series, Jacksonville, USA, July 21, 2000
7. Mizuno Y. Progress in Genetic and Clinical Aspects of Familial Parkinson's Disease Melvin D. Yahr Lecture / Department of Neurology Grand Rounds, The Mount Sinai Medical Center, NY, USA, November 24, 2000
8. Mori H, Takanashi M, Komori T, Arai N, Mizutani T, Mizuno Y. Cortical pathology in progressive supranuclear palsy. 6th International Congress of Parkinson's Disease And Movement Disorders, Barcelona, Spain, June 11–15, 2000
9. Hattori N, Asakawa S, Minoshima S, Yohino H, Yoshikawa M, Shimizu N, Mizuno Y. mutational analysis for compound heterozygotes in AR-JP. 6th International Congress of Parkinson's Disease And Movement Disorders, Barcelona, Spain, June 11–15, 2000
10. Kobayashi T, Hattori N, Mori H, Kondo T, Mizuno Y. Sequencing search for the parkin gene mutations on sporadic cases with Parkinson's disease. 6th International Congress of Parkinson's Disease And Movement Disorders, Barcelona, Spain, June 11–15, 2000
11. Kubo S, Hattori N, Shimura H, Mizuno Y. Parkin protein is associated with the Golgi membrane. 6th International Congress of Parkinson's Disease And Movement Disorders, Barcelona, Spain, June 11–15, 2000
12. Shimura H, Hattori N, Knag D, Nakabeppu Y, Mizuno Y. Increase of 8-oxo-dGTPase [hMTH1] in mitochondria of nigrostriatum of parkinsonian brain. 6th International Congress of Parkinson's Disease And Movement Disorders, Barcelona, Spain, June 11–15, 2000
13. Shimura H, Hattori N, Suzuki T, Kubo S, Shimizu N, Tanaka K, Mizuno Y. Immunohistochemical and subcellular localization of parkin: parkin is contained with Lewy body. 6th International Congress of Parkinson's Disease And Movement Disorders, Barcelona, Spain, June 11–15, 2000

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）
分担研究報告書

神経変性に対する免疫抑制薬の保護修復作用に関する研究

分担研究者 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

異なったタイプの細胞株を用いた検討において、免疫抑制性（FK506）、ならびに非免疫抑制性（GPI1046）イムノフィリンリガンドは、共に同じ力価で過酸化水素（ H_2O_2 ）による細胞生存率の低下とアポトーシスを有意に抑制した。また、どちらも細胞保護効果を示した濃度で細胞内グルタチオン（GSH）濃度の有意な増加を認めた。以上より、イムノフィリンリガンドの保護効果の発現に免疫抑制作用が必要ないことを明らかにした。一方、少なくとも GSH 増加作用については、グリオーマでより強い効果を示すことから、グリア細胞を介して保護効果を発揮している可能性が示された。

また、ドパミン（DA）のアポトーシス関連分子におよぼす影響とその防御法について検討した。DA は濃度依存的に p53 や Bax を介したアポトーシス様の細胞死を惹起させるものの、GSH の同時添加により DA が引き起こすアポトーシスは抑制された。したがって、イムノフィリンリガンドの抗アポトーシス作用に GSH 増加作用が寄与していることが推察された。

In vivo における保護効果の作用機序を明らかにする目的でイムノフィリンリガンドを7日間投与したマウスの線条体を用いて脂質過酸化反応に対する効果を検討したところ、FK506、GPI1046 は共に脂質過酸化反応を有意に抑制した。カタラーゼや SOD の活性に対しては有意な作用を示さなかったことから、FK506 と GPI1046 は主に GSH 系を介して抗酸化作用を示すことが示唆された。そこで、脳内における GSH 含量を制御している関連酵素の遺伝子発現についても検討したところ、GSH 合成酵素の遺伝子発現を亢進させることから、イムノフィリンリガンドの GSH 増加作用は主に合成酵素を介したものであることが示唆された。以上より、イムノフィリンリガンドの神経保護効果において GSH 増加作用は極めて重要な役割を果たしていることを明らかにした。

A. 研究目的

L-DOPA 内服療法の導入により、パーキンソン病治療は劇的な進歩を遂げたが、病気の進行は抑えられず、その上、L-DOPA の服用が大量かつ長期におよぶことで問題症状が認められるようになる。そのため、L-DOPA 投与量の減量は重要であり、ドパミン（DA）アゴニストなどの導入が最近の主流となりつつある。しかし、DA アゴニストについても、一部の薬剤で神経保護作用が報告されているものの、長期にわたる病気の進行を臨床的に抑制するか否かについては結論が出ていない。したがって、病気の進行を抑制し得る根

本的な治療薬の開発は、高齢化社会を迎えた我が国にとって、緊急かつ重要な課題である。そこで、本研究ではイムノフィリン結合性薬剤（イムノフィリンリガンド）に着目して、神経変性に対する保護修復作用について検討を進めた。

すでに我々はイムノフィリンリガンド cyclosporin A (CsA) や tacrolimus (FK506) が様々な病態モデルにおいて神経変性を阻止することを報告してきた。しかもこれらの結果から、CsA や FK506 の作用は従来報告されていた免疫抑制作用ではなく、これまで知られていない未知の作用機序に基づく可能性を指摘し

た。実際、免疫抑制作用を持たない FK506 や CsA の誘導体がいくつかの病態モデルに対して、保護作用を示すことが報告されつつある。我々は昨年度、NG108-15 雑種細胞株を用いた過酸化水素 (H_2O_2) による細胞死に対する検討で、FK506 誘導体で非免疫抑制性イムノフィリンリガンドである GPII046 が FK506 と同程度の保護効果を示し、その保護効果の一部にグルタチオン (GSH) 増加作用が寄与していることを明らかにした。また、GPII046 はマウスに 7 日間連続投与することで *in vivo* においても GSH 濃度を有意に増加させた。そこで今年度は、(1) イムノフィリンリガンドの標的細胞の種類を明らかにする目的で異なったタイプの培養細胞株を用いた比較検討、(2) 培養細胞系における抗アポトーシス作用の分子機序の解明、(3) 「*in vivo*」病態モデルにおける保護効果の作用機序解明、の 3 点を中心に行なった。

B. 研究方法

1. H_2O_2 による神経・グリア細胞死に対するイムノフィリンリガンドの保護効果

検討に用いたニューロブラストーマ (Neuro 2A) とグリオーマ (C6) 細胞株は定法により培養した。イムノフィリンリガンドの保護作用は WST-1 測定法 (MTT 改良法) による細胞生存率、Hoechst 33342 核染色によるアポトーシスの有無、DTNB 法により測定した細胞内 GSH 濃度を指標として評価した。実験スケジュールについては、細胞生存率とアポトーシスの検討には、イムノフィリンリガンド (FK506/GPII046 最終濃度: 1, 10, 100nM) を予め 24 時間添加した後、新しい培養液中に H_2O_2 (最終濃度; Neuro 2A: 300 μ M, C6: 1mM) を加えてさらに 24 時間暴露した後に評価した。また、細胞内 GSH 濃度については、イムノフィリンリガンド (FK506/GPII046 最終濃度: 1, 10, 100nM) を培養液に加えて 24 時間培養した後に測定した。

2. ドパミンによるアポトーシスと関連分子の動態に及ぼす影響とその防御法の探索

SH-SY5Y 細胞を 10% FBS を含む DMEM で定法に従って培養した。DA およびその誘導体である HMPE

(ドパミン 4 位メトキシ誘導体)、3-MT (ドパミン 3 位メトキシ誘導体) を各々添加し、24 時間後の細胞生存率を WST-1 測定法により測定し、Hoechst33342 による核染色を行いアポトーシスの有無を検討した。また、DA およびメトキシ誘導体による細胞死における DA トランスポーターならびに活性酸素種の関与について検討するために、DA トランスポーターの阻害剤である GBR12909 や活性酸素種のスカベンジャーである SOD、カタラーゼ、GSH を各々同時に添加し、細胞生存率への影響を検討した。

次に、アポトーシス関連分子である p53, Bax, Bcl-2 の動態について検討した。評価は、抗 p53, Bax, Bcl-2 抗体による Western blot 解析と p53, bax, bcl-2 cDNA に特異的な primer set による RT-PCR 法で行なった。

3. *In vivo* パーキンソン病モデルに対するイムノフィリンリガンドの効果

In vivo での検討には ICR 系雄性マウス (7 週齢) を用いた。イムノフィリンリガンドである FK506 (0.05-1.5 mg/kg), GPII046 (1-30 mg/kg) は各々 1 日 1 回 7 日間皮下投与し、最終投与 1 時間後に線条体を取り出し測定に供した。抗酸化作用については、GSH 含量と GSH 合成酵素 (γ -GCS) の mRNA 発現ならびにカタラーゼと SOD の活性を指標とした。また、酸化ストレスに基づく細胞傷害は脂質過酸化反応 (TBA-RS 量) で評価した。一方、神経保護効果については 6-OHDA による DA 神経傷害 (線条体 DA 濃度) を指標とした。予め FK506 か GPII046 を 7 日間皮下投与した後、最終投与 1 時間後に 6-OHDA (60 μ g/2 μ l) を右側脳室内に単回投与した。脳室内投与 7 日後に断頭屠殺して線条体を速やかに取り出した。測定方法は、1) GSH 含量: DTNB 法, 2) γ -GCS mRNA 発現: RT-PCR 法, 3) カタラーゼ活性: H_2O_2 の減衰を直接測定する方法, 4) SOD 活性: xanthine/xanthine oxidase- NBT 法, 5) TBA-RS 量: 2-thiobarbituric acid 法, 6) DA 濃度: HPLC-ECD 法, をそれぞれ用いた。

実験動物はヘルシンキ宣言に則り、実験に関しては岡山大学の動物実験指針に準拠して行なった。

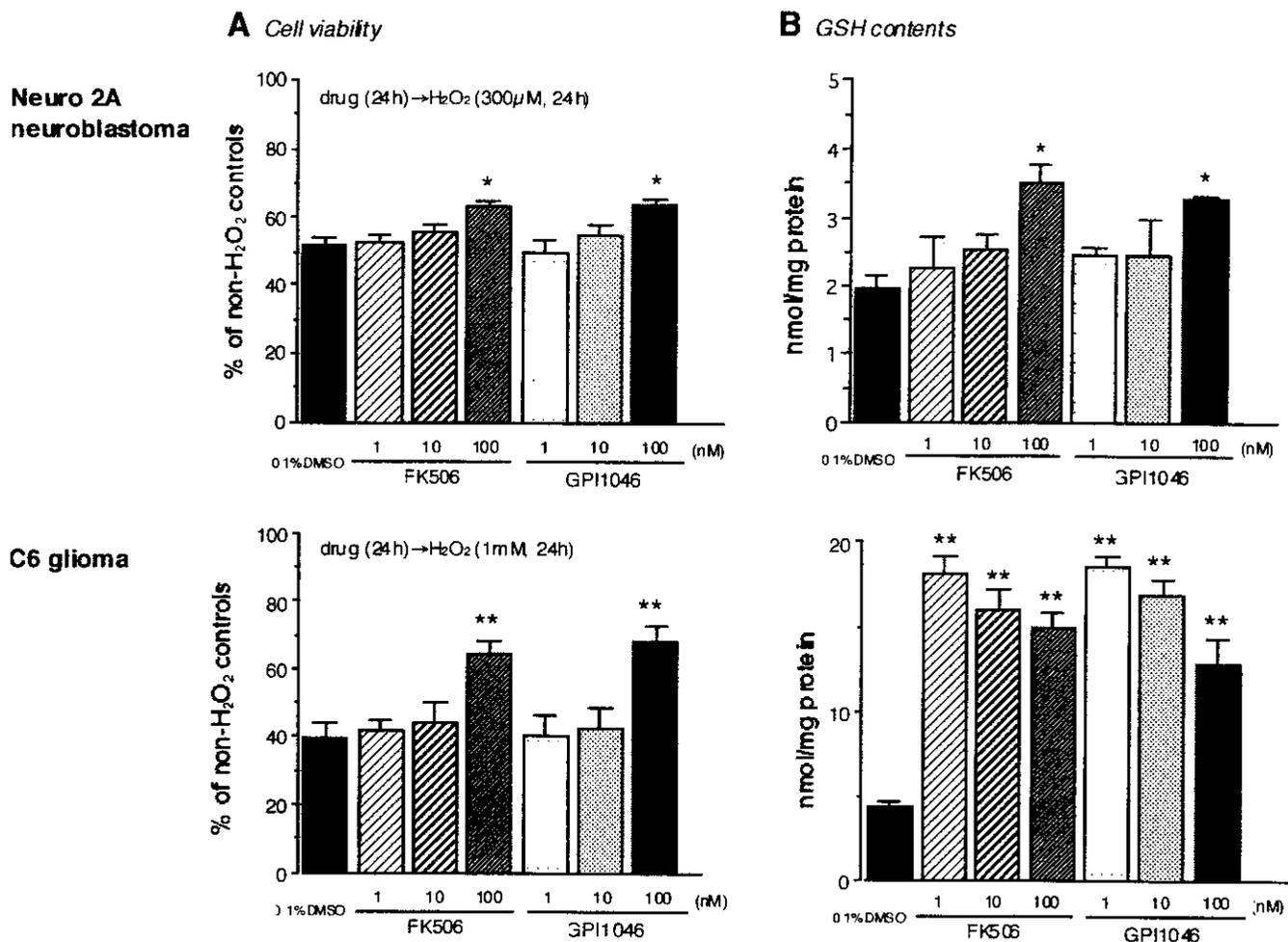


図1 培養細胞系におけるイムノフィリンリガンドの保護効果

C. 研究結果

1. H₂O₂による神経・グリア細胞死に対するイムノフィリンリガンドの保護効果

ニューロblastoma (Neuro 2A) とグリオーマ (C6) を用いた場合、細胞株によってイムノフィリンリガンドの保護効果発揮のための有効濃度は異なったものの、H₂O₂による細胞生存率の低下およびアポトーシスを有意に抑制した(図1A)。また、GSH濃度については、細胞保護効果を示した濃度において有意な増加を認めた(図1B)。

2. ドパミンによるアポトーシスと関連分子の動態に及ぼす影響とその防御法の探索

DAはSH-SY5Y細胞に添加6時間後から始まる濃度依存的な(IC₅₀: 200 μM)核の凝集・分葉化を伴うアポトーシス様の細胞死を惹起させた。これに対し、HMPEは同様の濃度依存的な細胞死を引き起こすも

の、DAに比べ毒性は弱く、高濃度(200-400 μM)添加しても約50%以上の細胞死はみられなかった。一方、3-MTは細胞生存率に全く影響をおよぼさなかった。DA(200 μM)、HMPE(200 μM)によって惹起される細胞死はGBR12909の添加では抑制されなかった。これに対して、SODやGSHをDAあるいはHMPEと同時に添加すると細胞死は濃度依存的に抑制されたが、カタラーゼ同時添加は細胞死に影響しなかった(表1)。次に、DA、HMPE添加後のp53、Bax、Bcl-2およびそのmRNAの発現動態を検討した。アポトーシス誘導因子であるp53はDAまたはHMPE添加3-6時間後に一過性に発現が増加した。また、bax mRNAの発現についても、DA添加6時間後に増加していることから、DAおよびその誘導体による神経細胞死にp53、Baxからなるアポトーシスカスケードの活性化が関与していると考えられた。

表1 ドパミンとその誘導体によるアポトーシス関連分子の動態に及ぼす影響

| | DA | HMPE | 3-MT |
|--------------|--------------|--------------|------|
| 細胞生存率 | ↓↓ | ↓ | ~ |
| +GBR12909 | - | - | - |
| +SOD | + (抑制) | + (抑制) | - |
| +catalase | - | - | - |
| +GSH | + (抑制) | + (抑制) | - |
| 核染色(Hoechst) | 核凝集・分葉化 | | |
| キノン体形成 | ↑↑ | ↑ | ~ |
| +SOD | + (抑制) | + (抑制) | - |
| +catalase | - | - | - |
| +GSH | + (抑制) | + (抑制) | - |
| アポトーシス関連分子 | | | |
| p53 | ↑ (3-6時間後) | ↑ (3-6時間後) | ~ |
| p53 mRNA | ~ | ~ | ~ |
| Bax | | | |
| bax mRNA | ↑ (6時間後) | ~ | ~ |
| Bcl-2 | ↓ (12-24時間後) | ↓ (12-24時間後) | ~ |
| bcl-2 mRNA | ~ | ~ | ~ |

↑：増加， ↓：減少， ~：変化なし， +：効果あり， -：効果なし

これに加え，DA 添加 12-24 時間後にアポトーシス抑制因子である Bcl-2 の発現は有意に減少していた（表 1）。

3. In vivo パーキンソン病モデルに対するイムノフィリンリガンドの効果

昨年度の検討により，マウス線条体の GSH 含量は FK506 (0.5mg/kg) と GPI1046 (10 mg/kg) 投与により，有意に増加することが明らかとなっている（図 2A）。そこで，この用量における GSH 合成酵素の遺伝子発現に対するイムノフィリンリガンドの効果について検討したところ，FK506，GPI1046 とともに線条体における γ -GCS mRNA 発現を有意に増加した（図 2B）。一方，イムノフィリンリガンドは GSH と同じ脳内消去系であるカタラーゼや SOD の活性に対しては有意な作用を示さなかった。ところが，7日間イムノフィリンリガンドを投与したマウス線条体を用いて TBA-RS 量を測定したところ，FK506，GPI1046 はどちらも自動酸化による脂質過酸化反応を有意に抑制した（図 2 C）。

さらに，6-OHDA 脳室内投与マウスを用いて DA 神経傷害（線条体 DA 濃度）に対する FK506 および

GPI1046 の保護効果を検討したところ，予め FK506 または GPI1046 を投与しておくことで，有意な神経保護効果が認められた（図 2 D）。

D. 考察

H_2O_2 による細胞生存率の低下およびアポトーシスに対するイムノフィリンリガンドの抑制作用は，2種類の細胞間で顕著な差は認められなかった。ところが，GSH 増加作用については C6 細胞でより強く認められたことから，神経細胞よりもグリア細胞に対して強く作用をするものと考えられた。またこれらの検討により，免疫抑制作用を持たない GPI1046 は H_2O_2 による神経・グリア細胞死に対しても，FK506 と同程度の細胞保護効果を示すことを確認した。したがって，イムノフィリンリガンドの細胞保護効果の作用機序には免疫抑制作用は必要なく，代表的な抗酸化物質である GSH が重要な役割を果たしていることを見出した。

次にイムノフィリンリガンドのアポトーシス抑制作用の分子機序を明らかにする目的で DA によるアポトーシスについて検討を行なった結果，DA および HMPE は濃度依存的にアポトーシス様神経細胞死を

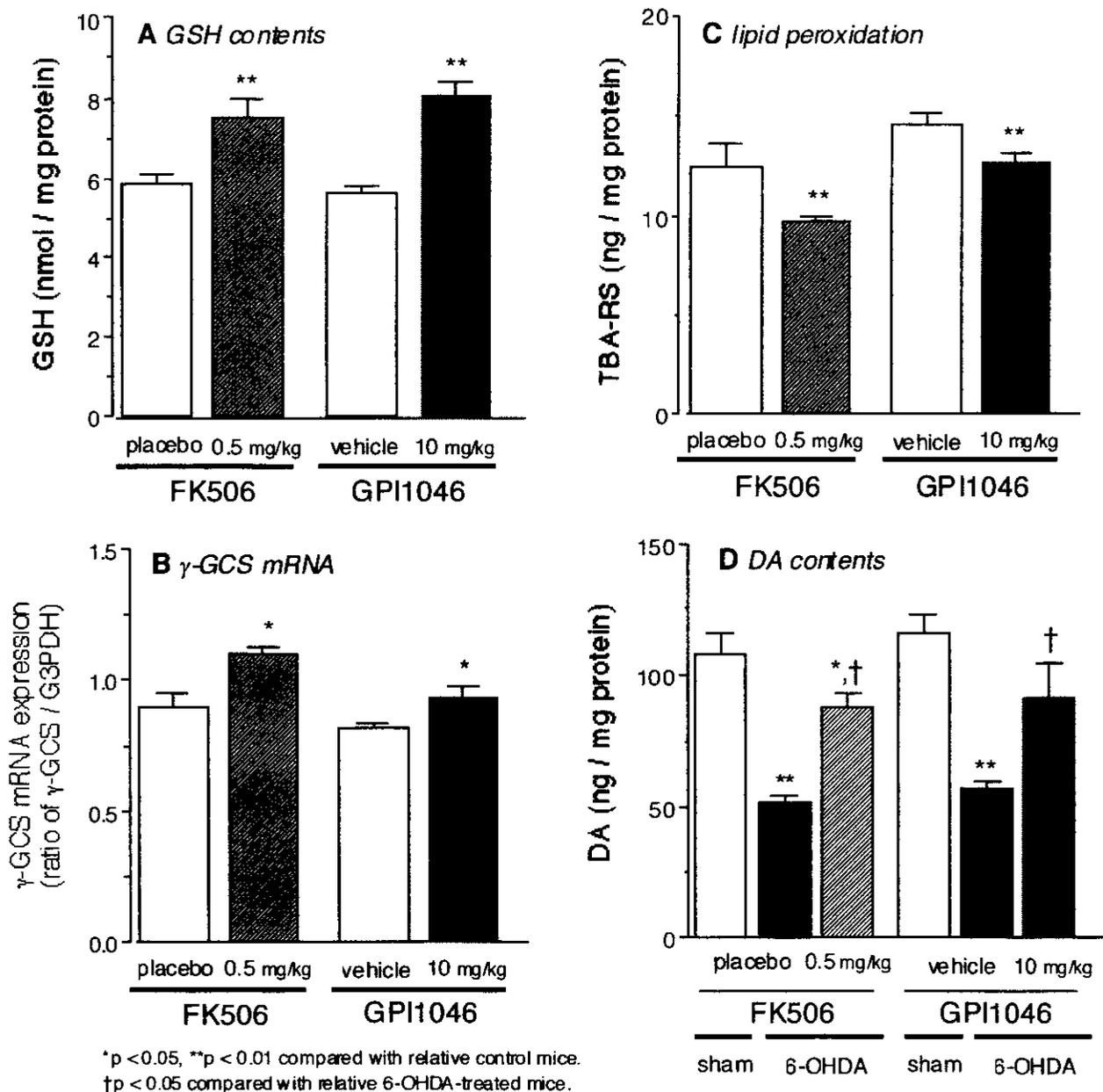


図2 In vivo におけるイムノフィリンリガンドの保護効果

引き起こした。既に DA や HMPE が中性環境下において DA キノン体を形成するのに対し、アポトーシスを惹起しない 3-MT はキノン体を形成しないことを電子スピン共鳴法で確認している。キノン体形成の際にスーパーオキシドが生成されることが知られており、カテコールキノン特に DA キノンはタンパクのシステイン残基に結合してシステニル DA となりタンパクの機能を障害することも報告されている。本研究においても、DA や HMPE によるアポトーシスが SOD や

GSH 添加で抑制されるものの、カタラーゼでは抑制されなかったことから、細胞外で DA や HMPE から生成されたキノン体がスーパーオキシドを発生するとともに、機能性タンパク質とシステイン残基において結合することでその機能を阻害しているものと考えられた。すなわち、SOD は生成されたスーパーオキシドを無毒化し、GSH はキノン体がシステイン残基により他のタンパク質と結合するのを阻止することで、DA や HMPE による細胞死を抑制したものと推察された。以

上より、カテコール骨格を有する化合物の3位の水酸基はアポトーシス様の神経細胞死発現に重要であることを明らかにした。一方、アポトーシス誘導因子である p53 および Bax の発現変化の結果から DA およびその誘導体による神経細胞死に p53, Bax からなるアポトーシスカスケードの活性化が関与していることが示唆された。また、Bcl-2 は Bax によるミトコンドリアにおける permeability transition pore を抑制することから、DA による Bcl-2 発現抑制もアポトーシス様神経細胞死を助長しているものと考えられた。

In vivo においてイムノフィリンリガンドはカタラーゼや SOD の活性に対しては効果を示さないものの、自動酸化による脂質過酸化反応を有意に抑制したことから、主に GSH 系を介して抗酸化作用を発現することが示唆された。このマウス線条体における GSH 含量の増加は合成酵素である γ -GCS の活性化に基づくことを示した。

E. 結論

本研究により、免疫抑制作用の有無にかかわらずイムノフィリンリガンドは細胞死に対して保護効果を示すことを培養細胞系、in vivo 両面で確認した。したがって、GPI1046 のような非免疫抑制性イムノフィリンリガンドが、免疫不全という重大な副作用のない新しいタイプの神経保護修復薬となる可能性を示した。また本研究を通じて、GSH 増加作用がイムノフィリンリガンドの保護効果の作用機序において重要な役割を果たしていることを明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

Higashi, Y., Asanuma, M., Miyazami, I. and Ogawa, N., *J. Neurochem.*, 75: 1771-1774, Inhibition of tyrosinase reduces cell viability in catecholaminergic neuronal cell, 2000.

Kondo, F., Kondo, Y., Makino, H. and Ogawa N., *Brain Res.*, 853: 93-98, Delayed neuronal death in hippocampal CA1 pyramidal neurons after forebrain ischemia in hyperglycemic gerbils: amelioration by indomethacin, 2000.

Sogawa, C.A., Miyazaki, I., Sogawa, N., Asanuma,

M., Ogawa, N. and Furuta, H., *Brain Res.*, 853: 310-316, Antioxidants protect against dopamine-induced metallothionein-III (GIF) mRNA expression in mouse glial cell line (VR-2g), 2000.

Kondo, Y., Kondo, F., Asanuma, M. Tanaka, K. and Ogawa, N., *Neurochem. Res.*, 25: 205-209, Protective effect of oren-gedoku-to against induction of neuronal death by transient cerebral ischemia in the C57BL/6 mouse, 2000.

Tanaka, K., Wada, N. and Ogawa, N., *Neurochem. Res.*, 25: 313-320, Chronic cerebral hypoperfusion induces transient reversible monoaminergic changes in the rat brain, 2000.

Ogawa, N., Tanaka, K. and Asanuma, M., *Neurochem. Res.*, 25: 755-758, Bromocriptine markedly suppresses levodopa-induced abnormal increase of dopamine turnover in the parkinsonian striatum, 2000.

Mogi, M., Togari, A., Tanaka, K., Ogawa, N., Ichinose, H. and Nagatsu, T., *Neurosci. Lett.*, 289: 165-168, Increase in level of tumor necrosis factor- α in 6-hydroxydopamine-lesioned striatum in rats is suppressed by immunosuppressant FK506, 2000.

Asanuma, M., Hayashi, T., Ordonez, S.V., Ogawa, N. and Cadet, J.L., *Mol. Brain Res.*, 237-243, Direct interactions of methamphetamine with the nucleus, 2000.

Yamashiro, T., Kabuto, H., Fukunaga, T., Ogawa, N. and Takano-Yamamoto, T., *Brain Res.*, 878: 199-203, Medullary monoamine levels during experimental tooth movement., 2000.

Miyazaki I., Aoki Sogawa, C., Asanuma, M., Higashi, Y., Tanaka, K., Nakanishi, T. and Ogawa, N., *Neurosci. Lett.*, 293: 65-68, Expression of metallothionein-III mRNA and its regulation by levodopa in the basal ganglia of hemi-parkinsonian rats, 2000.

Tanaka, K., Fujita, N., Asanuma, M. and Ogawa, N., *Act Med. Okayama*, 54: 275-280,

- Immunophilin ligands prevent H₂O₂-induced apoptotic cell death by increasing glutathione levels in Neuro 2A neuroblastoma cells, 2000.
- Tanaka, K., Fujita, N., Yoshioka, M. and Ogawa, N., Brain, Res., 889: 236-239, 2000.
- Immunosuppressive and non-immunosuppressive immunophilin ligands improve H₂O₂-induced cell damage by increasing glutathione levels in NG108-15 cells, 2001.
- Tanaka, K., Miyazaki, K., Fujita, N., Haque, Md E., Asanuma, M. and Ogawa, N., Neurochem. Res., 26: 31-36, Molecular mechanism in a ctivation of glutathione system by ropinirole, a selective dopamine D2 agonist, 2001.
2. 学会発表
- ① 国際学会
- Fujioka, M., Taoka, T., Matsuo, Y., Hiramatsu, K., Kondo, Y., Miyasaki, A., Sakaki, T., Kato, K., Siesjo, B. Delayed ischemic hyperintensity on T1 weighted magnetic resonance image and induced manganese superoxide dismutase in mitochondria after mild focal ischemia: long-lasting oxidative stress hypothesis. International Conference of Stroke, New Orleans, February 10, 2000.
- Asanuma, M. and Ogawa, N. Effects of different transition metals on free radical generation and peroxide reaction in the brain: Modicfication by dopamine-related compounds. 6th Internet World Congress for Biomedical Sciences [Invited Synmposia], February 14, 2000.
- Tanaka, K., Miyazaki, I., Fujita, N. and Ogawa, N. Neuroprotective and anti-oxidative properties of the dopamine agonist cabergoline. 22nd Collegium Internationale Neuro-Psychopharmacologicum (CINP) Congress, Brussels, Belgium, July 10, 2000.
- Ogawa, N., Miyazaki, K., Asanuma, M. and Aoki-Sogawa, C. Changes in expression of metallothionein-III messenger RNA in rat brain related to dopaminergic neurodegeneration and aging. 22nd Collegium Internationale Neuro-Psychopharmacologicum (CINP) Congress, Brussels, Belgium, July 10, 2000.
- Ogawa, N. Potential of immunophilin-ligands for neuronal cell rescue. International Symposium on Molecular Mechanism and Therapeutics of Amyotrophic Lateral Sclerosis, Kurashiki, September 24, 2000.
- Ogawa, N. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. Fifth International Symposium on the Treatment of Parkinson's Disease [Early Mornig Seminer], Kobe, October 1, 2000.
- ② 国内学会
- 田中健一, 宮崎育子, 浅沼幹人, 藤田尚子, 小川紀雄. ドパミンアゴニスト cabergoline の抗酸化作用と神経保護効果. 第 73 回日本薬理学会年会, 横浜, 2000 年 3 月 23 日
- 小川紀雄. パーキンソン病における神経保護療法の将来. 第 41 回日本神経学会総会 [ランチョンセミナー], 松本, 2000 年 5 月 24 日
- 浅沼幹人, 小川紀雄. チロシナーゼとドパミン神経障害の相互連関に関する検討. 第 41 回日本神経学会総会, 松本, 2000 年 5 月 25 日
- 浅沼幹人, 東 洋一郎, 宮崎育子, 小川紀雄. ニューロンメラニン合成酵素チロシナーゼ機能抑制によるドパミン神経障害に関する検討. 第 27 回日本脳科学会学術集会, 浜松, 2000 年 5 月 27 日
- 田中健一, 藤田尚子, 小川紀雄. 過酸化水素による神経・グリア細胞死に関するイムノフィリンリガンドの保護効果. 第 23 回日本神経科学大会・第 10 回日本神経回路学会大会合同大会, 横浜, 2000 年 9 月 5 日.
- 東 洋一郎, 浅沼幹人, 宮崎育子, 小川紀雄. ドパミン系神経細胞における増殖抑制因子メタロチオネイン-3 の発現と動態. 第 23 回日本神経科学大会・第 10 回日本神経回路学会大会合同大会, 横浜, 2000 年 9 月 5 日.
- Tanaka, K., Fujita, N., Asanuma, M. and Ogawa, N.

Mechanism of neuroprotective effect of immunophilin ligands against cell death. 第 43 回日本神経化学会, 金沢, 2000 年 10 月 19 日
Fujita, N., Tanaka, K. and Ogawa, N. Effects of levodopa combined with dopa decarboxylase inhibitor on dopaminergic dysfunction in the 6-OHDA-lesioned mouse striatum. 第 43 回日本神経化学会, 金沢, 2000 年 10 月 19 日
宮崎育子, 浅沼幹人, 小川紀雄. 非ステロイド性消炎鎮痛薬は NO による神経細胞死を抑制する. 第 43 回日本神経化学会, 金沢, 2000 年 10 月 19 日
浅沼幹人, 宮崎育子, 田中健一, 小川紀雄. ドパミンの核内への直接移行と集積に関する検討. 第 43 回日本神経化学会, 金沢, 2000 年 10 月 20 日

浅沼幹人, 宮崎育子, 東 洋一郎, 田中健一, Cadet, J.L., 小川紀雄. メタンフェタミンによる p53 の DNA 結合活性の変化と核内への直接移行・蓄積に関する検討. 第 30 回日本神経精神薬理学会年会, 仙台, 2000 年 10 月 26 日

田中健一, 宮崎育子, 藤田尚子, 浅沼幹人, 吉岡真世. 非免疫抑制性イムノフィリンリガンド GPI1046 の抗酸化作用ならびに神経保護修復効果. 第 30 回日本神経精神薬理学会年会, 仙台, 2000 年 10 月 26 日

研究協力者

田中健一 (岡山大学医学部神経情報学部門 助手)
浅沼幹人 (岡山大学医学部神経情報学部門 助教授)

厚生科学研究費補助金 (脳科学研究事業)
分担研究報告書

パーキンソン病における神経細胞死の分子機構とその保護治療に関する研究

分担研究者 久野 貞子 国立療養所宇多野病院 臨床研究部長

研究要旨 パーキンソン病の保護治療に関する実験的アプローチとして
(1) 培養アストロサイトにおける薬剤による神経栄養因子刺激作用の研究
(2) パーキンソン病疾患感受性遺伝子の研究を行い、以下の結果を得た。
(実験1) パーキンソン病治療薬セレギリンおよびその代謝物であるデスマチルセレギリンは培養アストロサイトの nerve growth factor (NGF), brain-derived growth factor (BDNF), glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) の産生を遺伝子、蛋白両レベルで刺激する。(実験2) パーキンソン病患者においてサイトカイン遺伝子多型を解析したところ、TNF, IL-1 β , MCP-1 の分泌型に関する多型が発症年齢に影響することがわかった。また catechol-O-methyl transferase (COMT) 多型をメタアナライシスレコントロールと差のないことを確認した。以上の結果からセレギリン、デスマチルセレギリンによる神経栄養因子刺激を介した神経保護治療、およびサイトカインの分泌調節を介した神経保護治療の可能性が示唆された。

A. 研究目的

実験1: GDNF, BDNF などの神経栄養因子はドーパミンニューロン保護作用を持つ。我々はパーキンソン病治療薬が脳内の神経栄養因子を高めることによってドーパミンニューロン保護をもたらす可能性を検討するために、マウス由来の培養アストロサイトに対する神経栄養因子生成刺激効果を調べるアッセイ系を確立した。今年度はモノアミンオキシダーゼ B (MAO-B) 阻害剤であるセレギリン (L-デプレニール) に着目した。セレギリンはモデル動物あるいは細胞培養系を用いた実験から、パーキンソン病の神経保護治療薬として注目されている (Tatton WG et al: J.

Neural. Transm. (Suppl) 48: 45-59, 1996.)。また、セレギリンの代謝物であるデスマチルセレギリンにもドーパミンニューロン保護効果が報告されている (Mytilineou C et al: J. Neurochem. 68: 33-39, 1997; Mytilineou C et al: J. Pharmacol. Exp. Ther. 284: 700-706, 1998.)。

そこで今回我々はセレギリン、デスマチルセレギリンの培養アストロサイトにおける NGF, BDNF, GDNF 刺激作用を調べた。

実験2: パーキンソン病の発症機構には多くの因子が関与すると考えられている。患者死後脳において

種々のサイトカインの上昇が報告され(Mogi and Nagatsu: Adv. in Neurol. 80: 135-139, 1999) サイトカインの関与が注目されているが、この変化が神経変性の原因であるのか二次的变化であるのかはわからない。この問題に対するひとつのアプローチとして、我々は分泌機能に差異を認めるようなプロモーター領域を中心としたサイトカイン遺伝子多型をパーキンソン病患者群で解析した。比較のため多系統萎縮症およびアルツハイマー病でも同様の解析を行った。

また、ドパミン代謝酵素である COMT 遺伝子多型を解析し他施設からの報告と併せてメタアナライシスした。

B. 研究方法

実験 1 : 培養マウスアストロサイトは 8 日齢 ICR マウス全脳由来のものをを用いた。細胞を 10% 血清 DMEM 培養液にてプレートまたはディッシュに $2 \times 10^4 / \text{cm}^2$ の密度でまき、底面一杯に広がれば無血清 DMEM 培養液に交換し、さらに 1 週間以上培養した後、薬剤を添加した。培養上清中の NGF, BDNF, GDNF タンパク量は ELISA 法で、細胞中の遺伝子発現は半定量的 RT-PCR 法で調べた。

実験 2 : 日本人パーキンソン病患者 172 例、健常コントロール 157 例、多系統萎縮症 111 例、アルツハイマー病 172 例を対象とした。PCR 法を用いて IL-1 α , IL-1 β , TNF,

IL-4, IL-6, IL-10, TGF β 1, MCP-1, CCR-2 遺伝子多型を解析した。COMT 遺伝子多型は PCR-RFLP 法で解析し、既報(Kunugi et al: Neurosci. Lett. 221:202-204, 1997; Yoritaka et al: J. Neural. Transm. Gen. Sect. 104: 1313-1317) とあわせてメタアナライシスした。

C. 研究結果

実験 1 : 培養上清中の NGF, BDNF, GDNF タンパク量はセレギリン、デスマチルセレギリンの濃度に依存して分泌刺激が見られた。セレギリンは濃度 2mM で、デスマチルセレギリンは 1.68mM で最大の分泌刺激がみられたのでこれらの濃度で分泌量の経時変化をみた。セレギリン刺激による NGF 分泌量は、薬剤添加 6 時間後にコントロールの 13 倍に達し、24 時間後には 26 倍にもなった。BDNF 分泌量は 24 時間後にコントロールの 1.7 倍に上昇していた。GDNF 分泌もセレギリンによって 6 時間で 1.4 倍、24 時間で 4.2 倍に達した。デスマチルセレギリンの刺激効果はセレギリンよりも弱い傾向にあった。デスマチルセレギリンによる NGF 分泌刺激は、24 時間後に 4.1 倍に達した。BDNF 分泌量はセレギリン同様 24 時間後にコントロールの 1.7 倍に上昇していた。GDNF 分泌は 24 時間後にコントロールの 2.4 倍に達した。そして NGF, BDNF, GDNF 各遺伝子発現のピークは両薬剤ともそれぞれ添加 2 時間、6 時間、2 時間後に見られた。以上のこ

とから、セレギリン、デスメチルセレギリンとも培養アストロサイトの NGF, BDNF, GDNF 生成を蛋白、mRNA 両レベルで刺激することがわかった。

実験 2：パーキンソン病患者においては、いずれの遺伝子多型もコントロールに対して有意な違いはなかった。しかしながら、若年発症群では、TNF 分泌亢進アリルが有意に増加していた。また、IL-1 β 分泌低下アリルのホモ群が、分泌亢進アリルのホモ群に比べ有意に発症年齢が若かった (Nishimura et al: Neurosci Lett 284: 73-76)。逆に MCP-1 では分泌低下アリルのホモ群で発症年齢の遅れを認めた。多系統委縮症患者でも同様の傾向を認めた。一方、アルツハイマー病ではいずれの多型も単独ではコントロールとの差も発症年齢に対する相関もみられなかった。しかし、TGF β 1 と IL-1 β 、および TGF β 1 と IL-6 の遺伝子多型の間で combined effects が存在し、アルツハイマー病に対して toxic に作用する傾向を認めた。

COMT 遺伝子多型頻度は我々の解析及びメタアナライシスのいずれともパーキンソン病と対照群とで違いはなかった

D. 考察

実験 2：すでにセレギリンにより刺激されることが報告されている神経栄養因子には、NGF, bFGF, GDNF, CNTF がある。これらのうちタンパク、mRNA 両レベルで発現を調べているのは NGF, bFGF のみであり、GDNF, CNTF

については、mRNA 発現は調べられているが、蛋白刺激についてはまだ調べられていない。BDNF 刺激作用については、まだ報告が無い。デスメチルセレギリンの神経栄養因子発現刺激作用については全く報告が無い。我々の結果は、セレギリンの NGF 刺激作用を再確認し、GDNF 刺激作用については、mRNA のみならず、蛋白量の上昇も示した。そしてセレギリンの BDNF 刺激作用は新しい知見である。また、デスメチルセレギリンの NGF, BDNF, GDNF 刺激作用は、最初の報告となる。以上の結果、両薬剤が脳内の NGF, BDNF, GDNF 産生刺激を介して神経保護効果をもたらす可能性が示唆された。

実験 2：遺伝子多型と発症年齢を比較検討した結果、TNF および MCP-1 の分泌亢進はパーキンソン病に対して toxic な作用をもつ可能性が示唆される。逆に IL-1 β の分泌亢進は protective にはたらく可能性が示唆される。TNF、IL-1 β ともにパーキンソン病脳で上昇していることが報告されているが、今回の結果から TNF は原因に、IL-1 β は反応性変化と解釈することが可能ではないかと思われる。また、治療には TNF、MCP-1 を抑制して、IL-1 β を刺激するような薬剤投与が有用かと考えられる。

多系統委縮症はパーキンソン病と同様の解析結果が得られたことから、両者には共通の発症、進行メカニズムが存在するのではないかと思われる。アルツハイマー病はこれらの疾患と異なったパターンを示し、サ

イトカインを介した治療などを考える際にまた別のアプローチが必要となるであろう。
COMT 遺伝子多型については他の人種での報告と同様に疾患との関係が無いことが確認された。

E. 結論

アストロサイトを用いたアッセイ系を使って、昨年度のアポモルフィンに引き続き、セレギリン、デスメチルセレギリンの NGF, BDNF, GDNF の刺激効果を報告することができた。その他のパーキンソン病治療薬さらに他の神経変性疾患治療薬についても同様の解析を行っていきたい。遺伝子多型解析によりいくつかのサイトカインがパーキンソン病の発症年齢に関係するという興味深い結果が得られた。サイトカインがパーキンソン病治療を考える上で新たなアプローチとなることが期待される。

F. 研究発表

英文原著論文

Nishimura M, Mizuta I, Mizuta E, Yamasaki S, Ohta M, Kuno S. Influence of interleukin-1 β gene polymorphisms on age-at-onset of sporadic Parkinson's disease. *Neuroscience Letters*, 284:73-76 (2000)

Araki I, Kuno S. Assessment of voiding dysfunction in Parkinson's disease by the international prostate symptom score. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 68:429-433

(2000)

Ohta M, Mizuta I, Ohta K, Nishimura M, Mizuta E, Hayashi K, Kuno S. Apomorphine up-regulates NGF and GDNF synthesis in cultured mouse astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 272:18-22 (2000)

Mogi M, Togari A, Kondo T, Mizuno Y, Komure O, Kuno S, Ichinose H, Nagatsu T. Caspase activities and tumor necrosis factor receptor R1 (p55) level are elevated in the substantia nigra from Parkinsonian brain. *J Neural Transm* 107:335-341 (2000)

Yasuda M, Tanaka C, Komure O, Kuno S. A mutation in the microtubule-associated protein tau in pallido-nigro-luysian degeneration. *Neurology* 54:2028-2030 (2000)

Mizuta I, Mizuta E, Yamasaki S, Yasuda M, Tanaka C, Kuno S. Meta-analysis of polymorphism of the catechol-O-methyltransferase gene in relation to the etiology of Parkinson's disease in Japan. *Movement Disorders* 15: 1013-1014 (2000)

Araki I, Kitahara M, Oida T, Kuno S. Voiding dysfunction and Parkinson's

disease; Urodynamic abnormalities and urinary symptoms. J Urol 164:1640-1643 (2000)

Mizuta I, Ohta M, Ohta K, Nishimura M, Mizuta E, Hayashi K, Kuno S. Selegiline and desmethylselegiline stimulate NGF, BDNF and GDNF synthesis in cultured mouse astrocytes. Biochem Biophys Res Commun 279:751-755 (2000)

日本語単行本

久野貞子：パーキンソン病の薬物療法と悪性症候群の関係は？ パーキンソン病 Q&A、医薬ジャーナル社、平井俊策編、大阪、p111-113, 2000

久野貞子：パーキンソン病の一般的予後は？ パーキンソン病 Q&A、医薬ジャーナル社、平井俊策編、大阪、p134-135, 2000

久野貞子：パーキンソン病の内科的治療 今日の治療指針 2000、医学書院、多賀須幸男、尾形悦朗編、東京、p241-244, 2000

久野貞子：病期別にみた薬物治療の実際 パーキンソン病—診断と治療？ 金原出版、柳原信夫編、p139-146, 2000

日本語総説

久野貞子：老年期パーキンソン病へのアプローチ-最近の進歩-新しい治

療薬と今後の展開 GERONTOLOGY12(1);p58-64, 2000

久野貞子：標準治療と再診治療-メリット・デメリット-Parkinson 病 Clin Neurosci 18(3): p348-349, 2000

久野貞子：成人病の自己管理はどこまで有効か？-その pit fall と対策、指導法 パーキンソン病の自己管理臨床成人病 30 巻 8 号、p976-980, 2000

久野貞子：神経内科的治療 特集； Parkinson 病治療の進歩 日本臨床第 58 巻・第 10 号、p154 (2110) -158(2114), 2000

久野貞子：パーキンソン病の薬物療法 臨床成人病 30 巻 10 号、p1288-1292, 2000

久野貞子：ドパミンアゴニストの使い方とカベルゴリンの特徴 パーキンソン病治療の新しい考え方-第二世代ドパミンアゴニストの使用法を中心に 日経メディカル2000年11月10日号、p56-57

久野貞子：パーキンソン病を考える・パーキンソン病と悪性症候群 ファルマシア・アップジョン社 SCOPE Vol.39, No.9 通巻 463 号、p18-19, 2000

久野貞子：パーキンソン病治療への

応用-利点と問題点-

新薬と臨床 第49巻No.11 p28
(1154) -35 (1161), 2000

国際学会

Kuno, S., Ohta, M., Ohta K. and Mizuta I.: Expression of neurotrophic factors in cultured mouse astroglial cells by apomorphine. The Movement Disorder Society's 6th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders June 11-15, 2000, Barcelona, Spain.

国内学会

第41回 日本神経学会総会 5月
長野 孤発性パーキンソン病におけるサイトカイン遺伝子(IL-1, TNF)の役割 西村公孝 久野貞子

第41回 日本神経学会総会 5月
長野 パーキンソン病自己評価としてのUPDRS Part2 水田英二 山崎俊

三 久野貞子

第41回 日本神経学会総会 5月
長野 glutamate channel blocker riluzole のパーキンソン病モデルサルにおける作用の検討 齋木英資 山崎俊三 水田英二 久野貞子

第41回 日本神経学会総会 5月
長野 パーキンソン病における一側後腹側淡蒼球破壊術の長期予後 久野貞子 水田英二 山崎俊三 齋木英資 武内重二

第18回 日本神経治療学会総会
6月 北海道 両側淡蒼球破壊術の長期経過を検討したパーキンソン病の3例 水田英二 山崎俊三 久野貞子 齋木英資

第18回 日本神経治療学会総会
6月 北海道 経過中に尿閉を来したParkinson病の2例 久野貞子 山崎俊三 北原光輝 荒木勇雄

20000471

以降のページは雑誌／図書等に掲載された論文となりますので
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

「研究成果の刊行に関する一覧表」

Positive charge intrinsic to Arg(37)-Arg(38) is critical for dopamine inhibition of the catalytic activity of human tyrosine hydroxylase type 1.

Nakashima A, Hayashi N, Mori K, Kaneko YS, Nagatsu T, Ota A.
FEBS Lett 2000 Jan 7;465(1):59-63

Modest neuropsychological deficits caused by reduced noradrenaline metabolism in mice heterozygous for a mutated tyrosine hydroxylase gene.

Kobayashi K, Noda Y, Matsushita N, Nishii K, Sawada H,
Nagatsu T, Nakahara D, Fukabori R, Yasoshima Y, Yamamoto T,
Miura M, Kano M, Mamiya T, Miyamoto Y, Nabeshima T.
J Neurosci 2000 Mar 15;20(6):2418-26

Caspase activities and tumor necrosis factor receptor R1 (p55) level are elevated in the substantia nigra from parkinsonian brain.

Mogi M, Togari A, Kondo T, Mizuno Y, Komure O, Kuno S,
Ichinose H, Nagatsu T.
J Neural Transm 2000;107(3):335-41

Normal values and age-dependent changes in GTP cyclohydrolase I activity in stimulated mononuclear blood cells measured by high-performance liquid chromatography.

Hibiya M, Ichinose H, Ozaki N, Fujita K, Nishimoto T, Yoshikawa T, Asano Y, Nagatsu T.

J Chromatogr B Biomed Sci Appl 2000 Mar 31;740(1):35-42

NTAKalpha and beta isoforms stimulate breast tumor cell growth by means of different receptor combinations.

Nakano N, Higashiyama S, Kajihara K, Endo T, Ishiguro H, Yamada K, Nagatsu T, Taniguchi N.

J Biochem (Tokyo) 2000 May;127(5):925-30

Triple transduction with adeno-associated virus vectors expressing tyrosine hydroxylase, aromatic-L-amino-acid decarboxylase, and GTP cyclohydrolase I for gene therapy of Parkinson's disease.

Shen Y, Muramatsu SI, Ikeguchi K, Fujimoto KI, Fan DS, Ogawa M, Mizukami H, Urabe M, Kume A, Nagatsu I, Urano F, Suzuki T, Ichinose H, Nagatsu T, Monahan J, Nakano I, Ozawa K.

Hum Gene Ther 2000 Jul 20;11(11):1509-19

Direct imaging of phosphorylation-dependent conformational change and DNA binding of CREB by electron microscopy.

Usukura J, Nishizawa Y, Shimomura A, Kobayashi K, Nagatsu T, Hagiwara M.

Genes Cells 2000 Jun;5(6):515-22

Synaptic integration mediated by striatal cholinergic interneurons in basal ganglia function.

Kaneko S, Hikida T, Watanabe D, Ichinose H, Nagatsu T, Kreitman RJ, Pastan I, Nakanishi S.

Science 2000 Jul 28;289(5479):633-7

Increase in level of tumor necrosis factor-alpha in 6-hydroxydopamine-lesioned striatum in rats is suppressed by immunosuppressant FK506.

Mogi M, Togari A, Tanaka K, Ogawa N, Ichinose H, Nagatsu T.
Neurosci Lett 2000 Aug 11;289(3):165-8

GTP cyclohydrolase I from *Tetrahymena pyriformis*: cloning of cDNA and expression.

Tazawa M, Ohtsuki M, Sumi-Ichinose C, Shiraishi H, Kuroda R, Hagino Y, Nakashima S, Nozawa Y, Ichinose H, Nagatsu T, Nomura T.

Comp Biochem Physiol B 2000 Sep 1;127(1):65-73

Molecular mechanisms of hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation, Segawa's disease.

Ichinose H, Inagaki H, Suzuki T, Ohye T, Nagatsu T.

Brain Dev 2000 Sep;22 Suppl 1:S107-10

Characterization of the human NTAK gene structure and distribution of the isoforms for rat NTAK mRNA.

Yamada K, Ichino N, Nishii K, Sawada H, Higashiyama S, Ishiguro H, Nagatsu T.

Gene 2000 Sep 5;255(1):15-24

Expanded polyglutamine stretches interact with TAFII130, interfering with CREB-dependent transcription.

Shimohata T, Nakajima T, Yamada M, Uchida C, Onodera O, Naruse S, Kimura T, Koide R, Nozaki K, Sano Y, Ishiguro H, Sakoe K, Ooshima T, Sato A, Ikeuchi T, Oyake M, Sato T, Aoyagi Y, Hozumi I, Nagatsu T, Takiyama Y, Nishizawa M, Goto J, Kanazawa I, Davidson I, Tanese N, Takahashi H, Tsuji S.

Nat Genet 2000 Sep;26(1):29-36

Cytokines in Parkinson's disease.

Nagatsu T, Mogi M, Ichinose H, Togari A.

J Neural Transm Suppl 2000;(58):143-51

Changes in cytokines and neurotrophins in Parkinson's disease.

Nagatsu T, Mogi M, Ichinose H, Togari A.
J Neural Transm Suppl 2000;(60):277-90

Transgenic rescue of tyrosine hydroxylase-deficient mice: application for generating animal models with catecholamine dysfunction.

Kobayashi K, Nagatsu T.
267-288

Progress in gene therapy: basic and clinical frontiers. Bertolotti, R., et al. VSP; 2000

Isoquinoline neurotoxins.

Nagatsu T.
69-76

Neurotoxic factors in Parkinson's Disease and related disorders. Edited by Storch and Collins. Kluwer Academic/Plenum Publishers; 2000

A branch site mutation leading to aberrant splicing of the human tyrosine hydroxylase gene in a child with a severe extrapyramidal movement disorder.

Janssen RJ, Wevers RA, Haussler M, Luyten JA, Steenbergen-Spanjers GC, Hoffmann GF, Nagatsu T, Van den Heuvel LP.
Ann Hum Genet 2000 Sep;64(Pt 5):375-82

Association between a polymorphism of ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 (UCH-L1) gene and sporadic Parkinson's disease.

Zhang J, Hattori N, Leroy E, Morris HR, Kubo S, Kobayashi T, Wood NW, Polymeropoulos MH, Mizuno Y.
Parkinsonism Relat. Disord. 2000 Oct 1;6(4):195-197

Failure to find mutations in ubiquitin carboxy-terminal hydrolase

L1 gene in familial Parkinson's disease.

Zhang J, Hattori N, Giladi N, Mizuno Y.

Parkinsonism Relat. Disord. 2000 Oct 1;6(4):199-200

Differential expression of c-fos following administration of two tremorogenic agents: harmaline and oxotremorine.

Miwa H, Nishi K, Fuwa T, Mizuno Y.

Neuroreport 2000 Aug 3;11(11):2385-90

Effects of blockade of metabotropic glutamate receptors in the subthalamic nucleus on haloperidol-induced Parkinsonism in rats.

Miwa H, Nishi K, Fuwa T, Mizuno Y.

Neurosci Lett 2000 Mar 17;282(1-2):21-4

Progress in the clinical and molecular genetics of familial parkinsonism.

Kitada T, Asakawa S, Matsumine H, Hattori N, Shimura H, Minoshima S, Shimizu N, Mizuno Y.

Neurogenetics 2000 2: 207-218

Molecular cloning, gene expression, and identification of a splicing variant of the mouse parkin gene.

Kitada T, Asakawa S, Minoshima S, Mizuno Y, Shimizu N.

Mamm Genome 2000 Jun;11(6):417-21

Exonic deletion mutations of the Parkin gene among sporadic patients with Parkinson's disease.

Kobayashi T, Wang M, Hattori N, Matsumine H, Kondo T, Mizuno Y.

Parkinsonism Relat. Disord. 2000 Jul 1;6(3):129-131

Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase.