

200100170A

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

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 丸山和佳子

平成14（2002）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

1. 神経毒あるいは酸化的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

2. 新しい経口投与可能な神経保護薬の開発

直井 信 12

3. 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

田中政嗣 21

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
ドーパミン神経傷害

服部信孝 28

III 研究成果の刊行に関する一覧表 34

IV 研究成果の刊行物・別刷 41

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

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：老化および老化にともなう神経変性疾患の代表である孤発性パーキンソン病における神経細胞死の機序を解明し、それを防御する薬剤を開発した。パーキンソン患者においては変異ミトコンドリア DNA の頻度が増加していた。内在性神経毒 N-methyl(R)salsolinol はミトコンドリア permeability transition (PT) pore の開孔を惹起し、アポトーシスシグナルを活性化させた。一方ミトコンドリア呼吸鎖酵素である complex I 阻害により酸化タンパクの凝集が惹起された。ミトコンドリアはパーキンソン病の細胞死において中心的役割を果たしている可能性がある。propargylamine 化合物は NMRSal とミトコンドリア PT pore において拮抗し、細胞死を防御するとともに、神経保護に働くタンパクの発現誘導を起こした。E3-ユビキチンリガーゼであり、常染色体劣性若年性パーキンソン病の原因遺伝子である park 2 の変異により神経伝達物質の放出が阻害された。放出が抑制され蓄積されたドーパミンにより酸化ストレスが引き起こされる可能性があると考えられた。

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 (応用生化学研究所 部長)

田中政嗣 (財団法人岐阜県国際バイオ研究所 部長)

服部信孝 (順天堂大学医学部神経学教室 老人性疾患病態治療研究センター講師)

A.研究目的

現在日本は世界に例の無い速度で高齢化しており、それに伴う健康と医療の問題を解決することが急務である。老化に従って頻度が増加するいわゆる老年病の中でも、中枢神経の疾患は老人

の quality of life(QOL) を低下させる原因として最も重要なものの一つである。黒質から線条体へ投射するドーパミン神経細胞は運動機能を司り、老化により、あるいは多くの神経変性疾患においてその数と機能が低下することが知られ

ている。この原因としてはこの細胞がドーパミンを代謝する際生成する活性酸素 (reactive oxygen species, ROS) が細胞傷害を引き起こすことが重要である。さらに、黒質ドーパミン神経細胞に高濃度に存在する鉄イオンやメラニンは ROS の生成と細胞傷害をさらに亢進させる。パーキンソン病は老年病の代表的なものであるが、その病因にはやはり酸化ストレスが関わっている。近年申請者らはヒト脳内に存在するドーパミン神経に選択的な神経毒である N-methyl(R)salsolinol(NMRSal) の生成酵素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が、この神経毒はやはり酸化ストレスを介してドーパミン細胞にアポトーシスを惹起する。さらに、分担研究者である服部は近年、遺伝性パーキンソン病の原因遺伝子である parkin が酸化タンパクなどの異常タンパクを分解する酵素である ubiquitin ligase であることを報告した。さらに、分担研究者である直井は経口投与可能な神経保護薬が酸化ストレスや神経毒による細胞死を防御することを発見した。田中はパーキンソン病を初めとする老年病へのミトコンドリア障害の関与を証明した。本研究の目的は、生理的老化あるいは老年病に伴うドーパミン神経細胞死のメカニズムを主に酸化ストレスの面から解明し、それを防御する経口投与可能な薬剤、あるいは遺伝子治療法を開発することである。本研究は高齢者の QOL を改善し幸福な長寿社会の建設に役立つ

だけでなく、医療福祉財政の面からも社会に貢献するところ大であると考えられる。

B. 研究方法

老化および老化に伴う神経細胞死の *in vitro* モデルを作成した。ドーパミン由来の神経毒である NMRSal はパーキンソン病においてドーパミン神経細胞への蓄積と毒性が証明されている。ヒトドーパミン神経芽細胞腫である SH-SY5Y 細胞に NMRSal を添加培養し、それによって活性化されるアポトーシスのシグナルを経時的に検討した。一方、近年パーキンソン病における細胞死には、異常タンパクの蓄積と凝集が関与していることが示唆されている。異常タンパク蓄積にはユビキチン-プロテアゾーム系の障害による分解の低下が関与している可能性がある。一方ミトコンドリア呼吸鎖酵素である complex I の障害によりタンパク凝集が惹起されることが報告されている。SH-SY5Y 細胞を proteasome inhibitor や complex I 阻害剤で処理することにより異常タンパク、特に酸化タンパクの蓄積と凝集を検討した。(丸山) パーキンソン病患者死後脳の分析によりミトコンドリア依存性のアポトーシスシグナルの関与が示されている。経口投与可能な神経保護薬である propargylamine 化合物の作用の分子メカニズムを明

らかとするため検討を行った。NMRSal はミトコンドリアに直接作用することによりアポトーシスを惹起する。propargylamine 化合物は NMRSal によるアポトーシスを抑制する。薬剤の作用点を明らかにするため検討を行った。さらに、propargylamine 化合物によるアポトーシス関連遺伝子の発現誘導について検討した（直井）ミトコンドリア障害は老化、およびパーキンソン病を含めた老年病に關与している。正常人、パーキンソン病患者、百寿者のミトコンドリア DNA の多型を検討し、パーキンソン病発症の危険因子となるか否かを検討した。さらに、ミトコンドリア移行シグナルを付加した制限酵素を作成し、ミトコンドリア DNA の遺伝子治療法の基礎的方法を確立した。（田中）孤発性パーキンソン病の病因を研究するためには、遺伝性パーキンソン病における細胞死のメカニズムを解明することが有用である。常染色体劣性若年性パーキンソン病の原因遺伝子である park 2 はユビキチンリガーゼであることを明らかとしたため、その基質を Yeast two hybrid screening にて検索した。さらに同定された基質タンパク候補についてその機能を解析した。（服部）倫理面への配慮について：動物実験に関しては各施設の実験動物委員会および倫理委員会に諮り、動物愛護の精神

に基づき実験を行なった。ヒトサンプル分析については各施設の倫理委員会に諮るとともに、ミレニアムプロジェクトおよび厚生労働省の倫理指針を遵守した。他施設において分析を行なう場合には当該施設およびミレニアムプロジェクトのための倫理指針にのっとり研究を行なった。

C.研究結果

NMRSal は細胞内および単離ミトコンドリアの膜電位を低下させ、その作用点はミトコンドリア permeability transition (PT) pore であることが証明された。NMRSal 処理により Cytochrome c の漏出、カスパーゼ 3 の活性化、核の凝集と DNA 断裂が認められた。Rotenone 処理により細胞内 ATP 量の低下が引き起こされた。rotenone 25 μ M 処理により不溶画分の酸化タンパクが増加し、異常タンパクの凝集が示唆された。一方 proteasome inhibitor 処理によって増加した酸化タンパクは主に可溶画分に存在した。（丸山） Propargylamine 化合物は、NMRSal によるアポトーシスを抑制した。単離ミトコンドリアを用いた研究で、NMRSal と propargylamine 化合物はミトコンドリア PT pore 構成分子にはたらき、その開孔を抑制することが示された。propargylamine 化合物の結合分子は抗アポトーシス分子である BCL-2 結合分子に極めて近いもの

であることが示唆された。さらに、propargylamine 化合物は bcl-2、glia-derived neurotrophic factor (GDNF) 等の神経保護に働く遺伝子の発現誘導を引き起こした。(直井) ミトコンドリア DNA 多型には疾患特異的なものは認められなかった。しかし、super-normal である百寿者とパーキンソン病患者を比較した場合、パーキンソン病患者には百寿者には稀あるいは全く認められない DNA 変異の頻度が高く認められた。ミトコンドリア移行シグナルを付加した SmaI によって、Leigh 脳症の原因であるミトコンドリア遺伝子変異を選択的に破壊する系を、培養細胞系で確立した。

(田中) Yeast two hybrid screening で park-2 との結合分子として CDCrel-1 が単離された。CDCrel-1 は synaptic vesicle 上に存在し overexpression させると exocytosis を抑制させるという報告がある。事実変異 parkin が dominant negative 的に exocytosis を抑制した。(服部)

D. 考察

NMRSal はミトコンドリア PT pore の BCL-2 結合部近傍に作用して、その開孔を惹起し、アポトーシスシグナルを活性化することが示された。また、complex I 阻害剤により酸化タンパク凝集をともなう細胞死が惹起された。今後 PT pore 開孔がミトコンドリア呼吸鎖

酵素に及ぼす影響について検討が必要と考えられた。(丸山) propargylamine 化合物はミトコンドリアにおいて NMRSal と拮抗し、PT pore 開孔を抑制した。さらに、propargylamine 化合物による抗アポトーシス遺伝子の発現誘導の機序について検討が必要である。

(直井) パーキンソン病患者に変異ミトコンドリア DNA をもつ割合が高かったことより、これら変異をもつヒトは老化および老化にともなう疾患に対して脆弱である可能性が示唆された。今後、特にアミノ酸変異をともなう変異についてミトコンドリア機能に及ぼす影響を明らかとする必要がある。(田中) 変異 parkin が神経伝達物質の exocytosis を dominant negative effect 的に抑制した。今後の課題としては parkin animal model の作製と exocytosis への関与の検討と antisense parkin などを用いて内在性 parkin を減少させた場合の機能変化を検討する必要があると考えている。変異 parkin の exocytosis の関与はドパミンの遊離が十分されず細胞内で溜まることで酸化ストレス介した細胞死を起こしている可能性がある。(服部)

E. 結論

孤発性パーキンソン病における神経細胞死の機序にはミトコンドリアにおける細胞死シグナルの活性化と、ミトコンドリア不全による異常タンパク凝集、酸化ストレス増加が主要な役割を果たしている。

ミトコンドリアは、ドパミン神経細胞の生と死を決定する中心的な細胞内小器官である。

F.健康危険情報
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

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

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：孤発性パーキンソン病の病因に、ドパミン由来の内在性神経毒や、酸化ストレスが関与している可能性が示唆されている。これらの刺激によりパーキンソン病死後脳で認められるのと同様なミトコンドリア依存性のアポトーシスシグナルが活性化されることを見い出した。また、ユビキチン-プロテアゾーム系を proteasome inhibitor で阻害したり、ミトコンドリア complex I 阻害剤 rotenone を用いることにより細胞内酸化修飾タンパクが増加し、細胞死が引き起こされた。パーキンソン病においては神経毒、酸化ストレス、ユビキチン-プロテオゾーム系の障害、ミトコンドリア不全等の複合的な原因が最終的にアポトーシスシグナルの活性化を伴うドパミン神経選択的な細胞死の原因となっている可能性がある。

A. 研究目的

ドパミン神経細胞は、加齢に従いその数と機能が低下することが知られている。また、ドパミン神経細胞の選択的な変性、脱落が起こるパーキンソン病は、アルツハイマー病に次いで頻度が高い老化に伴う神経変性疾患である。加齢に伴うドパミン神経細胞死には、ドパミン代謝に伴う酸化ストレスが主要な役割を果たしている。一方、パーキンソン病においては、老化に加え、それとは独立な要因で神経細胞死が引き起こされている。その一つとして内在性神経毒、ミトコンドリア呼吸鎖酵素 complex

I 障害、ユビキチン-プロテオゾーム系の障害の関与が示唆されている。本研究では、これら種々の要因による細胞死の機序をミトコンドリア依存性のアポトーシスシグナルとタンパクの酸化修飾の観点から検討した。これらの結果をもとに、神経変性防御のための標的分子を見い出すことが最終的な目的である。

B. 研究方法

ヒトドパミン神経芽細胞腫である SH-SY5Y 細胞をドパミン神経のモデルとして用いた。SH-SY5Y 細胞に NMRSal、あるいは proteasome

inhibitor である carbobenzoxy-L-isoleucyl- γ -t-butyl-L-glutamyl-L-alanyl-L-leucinal (PSI)、complex I 阻害剤である rotenone を添加培養し、細胞死の種類 (アポトーシスかネクローシスか) と割合について核染色により検討した。これらの刺激の中でアポトーシスのみを起こした NMRSal の標的分子を明らかとするために、活性化されたアポトーシスシグナルの経路を検討した。ミトコンドリア膜電位の低下は蛍光色素である JC-1、チトクローム c の細胞質への漏出とカスパーゼの活性化は immunoblotting によって定量した。glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の核内移行は免疫染色によった。NMRSal がミトコンドリアに直接作用するか否かを検討するために、ラット肝臓から単離したミトコンドリアの膜電位に対する NMRSal の直接作用を蛍光色素 rhodamine123 により検討した。Rotenone によるミトコンドリア呼吸鎖の阻害を評価するために、細胞内 ATP を燐光法により定量した。Rotenone あるいは proteasome inhibitor を添加培養した細胞中のタンパクについて酸化脂質 4-hydroxy-2-nonenal あるいは acrolein で修飾された分子を immunoblotting にて定量した。さらに、細胞を核、ミトコンドリア、細胞質の各分画に分け、修飾タンパクの細胞内分布を検討した。修

飾タンパクの凝集が認められるか否かについても検討した。倫理面への配慮は細胞実験であるため特に必要ではないと考えられた。

C. 研究結果

NMRSal は単離ミトコンドリア、細胞内ミトコンドリアの両者において膜電位を低下させた。それに引続きチトクローム c の細胞質への漏出、カスパーゼ 3 の活性化、核の凝集と分葉が認められた。カスパーゼ 3 の活性化と同時期、GAPDH の核内移行が認められ、これは BCL-2 を過剰発現させミトコンドリア膜電位を保持することにより阻害された。Rotenone は細胞内 ATP を用量依存的に低下させ、IC₅₀ は約 25 μ M であると得られた。Rotenone は低濃度 (-25 μ M) ではアポトーシス、高濃度 (100 μ M-) ではネクローシスを主に惹起した。15-250 μ M の rotenone 存在下で SH-SY5Y 細胞を培養したところ、酸化タンパクの総量は不変—増加したにも関わらず可溶画分では有意に減少し、酸化タンパクの凝集が示唆された。proteasome inhibitor は 0.1 μ M 以上でアポトーシス主体の細胞死を惹起した。また、同時に酸化タンパクは増加したが、rotenone の場合と異なり殆どが可溶画分に存在していた。

D. 考察

NMRSal はミトコンドリアの膜透過性に関わる permeability transition (PT) pore を制御する分子に直接影響を及ぼし、アポトーシスのシグナルを活性化させたと考えられる。PT pore 開孔により膜電位が低下した際の電子伝達系の機能障害については明らかではなく、今後、NMRSal による PT pore 開孔がミトコンドリア呼吸鎖に影響を及ぼすかを検討する必要があると考えられた。Rotenone、proteasome inhibitor のいずれによっても酸化タンパクは増加したが、不溶分画の酸化タンパクを増加させたのは rotenone のみであった。近年異常タンパク凝集と神経細胞死の関連について注目が集まっているが、ミトコンドリア障害はここでも重要な役割を果たしている可能性がある。パーキンソン病後脳黒質ドパミン神経細胞においては、活性化カスパーゼ 3、核内 GAPDH、4-hydroxy-2-nonenal 化タンパク等の酸化タンパクの増加、complex I タンパクの減少が認められる。本研究の結果これらの全てにミトコンドリアに障害が関わっていることを示唆している。

E. 結論

パーキンソン病におけるドパミン神経細胞死の機構にはミトコンドリアが中心的役割を果たしている可能性が示された。ミトコンドリ

アは神経保護薬の重要な標的である。

F. 健康危険情報

なし

G 研究発表

1. 論文発表

1) W. Maruyama, Y. Akao, M. C. Carrillo, K. Kitani, M. B. H. Youdim, M. Naoi: Neuroprotection by Propargylamines in Parkinson's Disease: Suppression of Apoptosis and Induction of Pro-survival Genes

Neurotoxicol. Teratol. In press.

2) W. Maruyama, T. Takahashi, M. Youdim, M. Naoi: The anti-parkinson drug, rasagiline, prevents apoptotic DNA damage induced by peroxynitrite in human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells. J. Neural Transm. in press.

3) W. Maruyama, T. Ohya-Ito, M. Shamoto-Nagai, T. Osawa, M. Naoi: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is translocated into nuclei through Golgi apparatus during apoptosis induced by 6-hydroxydopamine in human dopaminergic SH-SY5Y cells. Neurosci. Lett. In press.

4) T. Yamamoto, W. Maruyama, Y. Kato, H. Yi, M. Shamoto-Nagai, M. Tanaka, Y. Sato, M. Naoi: Selective nitration of mitochondrial complex I by peroxynitrite: Involvement in mitochondria dysfunction

- and cell death of dopaminergic SH-SY5Y cells. *J. Neural Transm.* 109:1-13, 2002
- 5) T. Uezono, K. Matsubara, W. Maruyama, M. Naoi, K. Shimizu, O. Saito, K. Ogawa, H. Mizukami, N. Hayase, H. Shiono: Norharman, an indoleamine-derived beta-carboline, but not Trp-p-2, a gamma-carboline, induces apoptotic cell death in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J. Neural Transm.* 108:943-953, 2001.
- 6) B. E. Toth, K. Homicsko, B. Radnai, W. Maruyama, J. E. DeMaria, M. Vecsernyes, M. I. K. Fekete, F. Fülöp, M. Naoi, M. E. Freeman, M. Nagy: Salsolinol is a putative endogenous neuro-intermediate lobe prolactin releasing factor. *J. Neuroendocrinol.* 13: 1-14, 2001.
- 7) M. Naoi, W. Maruyama: Future neuroprotection in Parkinson's disease. *Parkinsonism and Related Disorders.* 8: 139-145, 2001.
- 8) W. Maruyama, Y. Akao, M. B. H. Youdim, B. A. Davis, M. Naoi : Transfection-enforced Bcl-2 overexpression and an anti-Parkinson drug, rasagiline, prevent nuclear accumulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase induced by an endogenous dopaminergic neurotoxin, *N*-methyl(*R*)salsolinol. *J. Neurochem.* 78: 727-735, 2001.
- 9) W. Maruyama, M.B.H. Youdim, M. Naoi: Antiapoptotic properties of rasagiline, *N*-propargylamine-1(*R*)-aminoindan, and its optical (*S*)-isomer, TV1022. *Ann. New York Acad. Sci.* 939: 320-329, 2001
- 10) W. Maruyama, Y. Kato, T. Yamamoto, K. Oh-hashii, Y. Hashizume, M. Naoi: Peroxynitrite induces neuronal cell death in aging and age-associated disorders. *J. Amer. Aging Assoc.* 24: 11-18, 2001
- 11) 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.
- 12) K. Oh-hashii, W. Maruyama, K. Isobe: Peroxynitrite induces gadd34, 45 and 153 via p38 MAPK in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Free Rad. Biol. Med.* 30: 213-221, 2001.
- 13) 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.
- 14) 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
- 15) 丸山和佳子、直井信 : パーキンソン病におけるドパミン神経細胞死の機序に関する研究. *Progress in Medicine* 22: 197-201, 2002
- 16) 丸山和佳子、直井信 : 内在性神経毒、*N*-methyl(*R*)salsolinol に

よるド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

Progress in Medicine 21: 1937-1942, 2001

17) 丸山和佳子: 孤発性パーキンソン病の病因の探索

日本老年医学会雑誌 38: 494-497, 2001

18) 丸山和佳子、直井信

パーキンソン病の原因とは何か

ケアスタッフ 医歯薬出版社 印刷中

19) 丸山和佳子、直井信

新しい神経保護療法の可能性

最新医学 2, 308-313, 2002 最新医学社

20) 丸山和佳子、直井信

酸化ストレスから見たドパミン神経細胞死の機序 先端医療シリーズ 14: 神経・筋疾患 118-122, 2001.

21) 直井信、丸山和佳子:

パーキンソン病: その病因と神経細胞の保護 運動障害 The Journal of Movement Disorder and Disability 11 (1) 2001

22) 丸山和佳子、直井信:

パーキンソン病の病因: 最近の研究から 老年精神医学雑誌 Vol 12, 343-348, 2001.

2. 学会発表

1) W. Maruyama:

Cell death in Parkinson's disease

10th International Symposium of Therapy for Parkinson's Disease

October 27, 2001 Tokyo, Japan

2) M. Naoi, W. Maruyama, A.A. Boulton, M. B. H. Youdim:

Propargylamines as a neuroprotective drugs to treat Parkinson's disease.

14th International Congress on Parkinson's Disease

July 27-August 1, 2001 Helsinki, Finland

3) W. Maruyama, M. Naoi, Y. Akao:

Mechanism of cell death of dopamine neurons by endogenous neurotoxins and oxidative stress; relevance to Parkinson's disease.

14th International Congress on Parkinson's Disease

July 27-August 1, 2001 Helsinki, Finland

4) W. Maruyama, A. A. Boulton, M. B. H. Youdim, M. Naoi:

Anti-apoptotic function of propargylamines The 9th international catecholamine symposium

March 31-April 5, 2001, Kyoto Japan

5) M. Naoi, W. Maruyama, Y. Akao:

Models of Parkinson's disease The 9th international catecholamine symposium

March 31-April 5 2001, Kyoto Japan

6) W. Maruyama, T. Yamada, Y. Washimi, T. Kachi, N. Yanagisawa, F. Ando, H. Shimokata, M. Naoi:

Neutral (R)salsolinol N-methyltransferase as a pathogenic factor of Parkinson's disease

The 5th international conference on progress in Alzheimer's and Parkinson's disease

March 31-April 5, 2001, Kyoto, Japan

7) T. Takahashi, W. Maruyama, Y. Akao, M. Naoi:

Mechanism of induction of apoptosis by endogenous MPTP-like neurotoxin, N-

methyl(*R*)salsolinol

The 5th international conference on progress in Alzheimer's and Parkinson's disease

March 31-April 5, 2001, Kyoto, Japan

8) 丸山和佳子、社本雅代、赤尾幸博、田中雅嗣、直井信

ミトコンドリアによるドパミン神経細胞死の制御機構

第74回日本生化学会 2001 10/25-28 京都

9) 社本雅代、張進、Harm-Jan W. Borgeld、倉田美由紀、丸山和佳子、赤尾幸博、直井信、田中雅嗣

ミトコンドリア病に対する遺伝子治療

第74回日本生化学会 2001 10/25-28 京都

10) 直井信、丸山和佳子、社本雅代、赤尾幸博

propargylamine 誘導体による神経保護作用の機構

第74回日本生化学会 2001 10/25-28 京都

11) 丸山和佳子、赤尾幸博、直井信
神経変性疾患におけるミトコンドリア依存性細胞死シグナルとその制御機構
第44回日本神経化学会 2001 9/26-28 京都

12) 丸山和佳子、直井信、赤尾幸博、磯部健一

propargylamine 化合物、rasagiline による神経保護作用の機序の検討

第24回基礎老化学会、2001.6. 大阪

H 知的財産権の出願、登録状況（予定を含む）

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

研究要旨：老化に伴う神経変性疾患における神経細胞の死は酸化ストレス、代謝の破綻、興奮性細胞毒性などによりアポトーシスまたはネクローシスとして惹起される。Parkinson 病黒質においてアポトーシスシグナルの活性化が認められ、細胞死に関与していると考えられている。アポトーシスの細胞死カスケードに介入することで細胞死を阻止することを試みた。

(-)-deprenyl などの propargylamine 誘導体がアポトーシスを阻止し神経細胞を保護することを証明した。本年度では SH-SY5Y 細胞と単離ミトコンドリアを用い、これら神経細胞保護剤がミトコンドリアのアポトーシスカスケードを阻止する機序を検討した。この細胞保護活性が anti-apoptotic protein である Bcl-2 family protein を介するかを検討した。さらに propargylamine 誘導体の神経細胞にたいする保護活性が Bcl-2 family protein とドパミン細胞の選択的な栄養因子 glial cell line-derived nutrition factor (GDNF)の発現を促進することによるかかを研究した。propargylamine 誘導体は細胞保護活性を有する遺伝子を誘導することで、神経細胞を変性より保護する可能性が示された。このことは Parkinson 病以外の神経変性疾患においても同様の細胞保護療法が応用出来ることを示唆している。

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。この結果が Alzheimer 病、Huntington 病、Parkinson 病で報告されている。遺伝、環境因子より酸化ストレス、ミトコンドリアを中心にした代謝系の破綻により細胞死にいたること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

近この機構が神経細胞保護療法の標的となりうる可能性が提唱されている。既に我々はドパミン系 SH-SY5Y 培養細胞を用い propargylamine 誘導体のうち、我が国において臨床で使用されている (-)-deprenyl が内在性神経毒 N-methyl-R-salsolinol (NMRsal)や酸化ストレスによるアポトーシスを阻止することを見出した。この研究を発展させ(-)-deprenyl 以外の rasagiline (cyclic benzyl amine), N-(2-heptyl)-N-methylpropargyl-amine

(aliphatic amines) などの一連の propargylamine 誘導体が細胞保護活性を有するかを検討する。SH-SY5Y 細胞と単離ミトコンドリアを用い細胞保護の機序を明らかにする。また propargylamine 誘導体が細胞に存在し坑アポトーシス活性を有する遺伝子を誘導することにより細胞保護活性を示すという我々の仮説を証明する。これらの結果から Parkinson 病等の神経変性疾患と老化における神経細胞死を予防または修復する更に強力な薬剤を開発することを本研究の最終の目的とする。

B. 研究方法

ドパミン細胞のモデルとして SH-SY5Y 細胞を用いた。ヒト脳内在性神経毒 NMRSal、酸化ストレスを介する神経毒 6-hydroxy -dopamine (6-OHDA)、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させた。また神経細胞保護活性を有する propargylamine 誘導体のうち最も保護活性の高い rasagiline, N-(2-heptyl)-N-methylpropargylamine とその誘導体を用いた細胞内機序を検討した。

細胞死は propidium iodide (PI)の染色で、またアポトーシスであることは Hoechst 33342 の核染色により蛍光顕微鏡法により確認した。また蛍光色素 PI と YO-PRO を用い Fluorescence-activated cell sorter (FACS)によりアポトーシスとネクローシスを定量した。最終的に DNA 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 と蛍光顕微鏡により、また MitoTracker Orange, MitoTracker Green を用いた FACS 法により定量した。または細胞内に予め取り込ませた Rhodamine 123 の蛍光強度の変化より測定した。細胞とラット肝から単離したミトコンドリアでの permeability transition pore (PTP)の変化を Rhodamine 123 による蛍光法により測定した。最近細胞質より核内に移行することにより、アポトーシスシグナルを伝達するとされている 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 reverse transcriptase (RT)-PCR 法により、タンパク量の変化を Western 法により検討した。Propargylamine 誘導体による GDNF 量の変化を ELISA により測定した。

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。

倫理面への配慮は細胞実験であるため特に必要ではないと考えられた。

C. 研究結果

SH-SY5Y 細胞に NMRSal, 6-OHDA, SIN-1 はアポトーシスを惹起した。

NMRSal は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、凝縮を起こし細胞死を惹起した。

細胞を予め rasagiline と反応後、神経毒、SIN-1を添加すると、細胞死は濃度依存的に阻止された。細胞死のカスケイドのどの点で propargylamine が作用し細胞死を阻止するかを検討したところ、rasagiline は神経毒による $\Delta\Psi_m$ の低下を阻止することを見出した。SH-SY5Y細胞に予め取り込ませた Rhodamine 123 は神経毒により PTP が開口すると流出し蛍光強度の低下として観察されるが、rasagiline はこの Rhodamine 123 のミトコンドリアからの流出を濃度依存的に阻止した。単離ミトコンドリアにおいても神経毒を反応させると PTP が開口し Rhodamine 123 の蛍光強度が減少するが、ミトコンドリアを rasagiline で前処理しておく、PTP の開口を防止することが証明された。また rasagiline は膜電位の変化に続く caspase 3 の活性化、GAPDH の核内蓄積、核 DNA の断片化と細胞死を阻止した。これらの結果は Bcl-2 を過剰発現した SH-SY5Y 細胞と Bcl-2 transgenic mice の肝から単離したミトコンドリアにおいて同様に確認された。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。

さらに、rasagiline による抗アポト

シス作用が細胞内の anti-apoptotic、または pro-apoptotic Bcl-2 protein family を介するかを検討した。bcl-2, bcl-xl 等の anti-apoptotic gene の mRNA のみが濃度また時間依存的に rasagiline により増加したが、bax, bad 等の pro-apoptotic gene は変化しなかった。また Western blot 法により Bcl-2 タンパクの増加も確認された。ドパミン細胞の選択的な栄養因子である BDNF も rasagiline により著明に増加した。さらにこの bcl-2 の誘導には Tumor necrosis factor により活性化される転写因子が関与していた。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 の活性化と誘導を介することを強く示唆している。

Propargylamine 誘導体による細胞保護活性をミトコンドリア膜電位の安定化、anti-apoptotic bcl-2 protein family の誘導、GDNF の増加の3点で化学構造との関連を検討したところ、各活性には独自の構造が必要であることが明らかとなった。

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での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 は構造と機能が完全には解明されていない mega-channel であり、ATP 産生、Ca 濃度の調節、など細胞の維持に必修であり、その開孔によりアポトーシスに至る死

のシグナルで活性化されることが知られている。この channel は Bcl-2 等の anti-apoptotic oncogene と Bax 等の proapoptotic gene により調節されている。我々の結果はまさにこの細胞に内在し細胞死を抑制する活性を持つ Bcl-2 を propargylamine が誘導することを証明している。また rasagiline は GDNF の産生を促進し、細胞を保護し活性化している。従来 bcl-2, GDNF はドパミン細胞の保護療法の有力な候補であったが、脳内への投与が困難なため、臨床的に応用することは不可能と考えられて来た。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。我々の培養細胞における結果はその分子レベルでの機構を明らかにしている。

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内在する抗アポトーシス機構を活性し細胞死を阻止することを明らかにした。老化と神経変性疾患での細胞死の予防と治療の分子機構が明らかとすることで、rasagiline 等の propargylamine 誘導体が神経細胞保護剤として実用化される可能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Naoi M, Maruyama W., Akao Y., Yi H. (2002) Dopamine-derived

endogenous N-methyl(R)salsolinol. Neurotoxicol. Teratol., in press.

- 2) Naoi M., Maruyama W., Akao Y., Yi Hong. (2002) Mitochondria determine the survival and death in apoptosis by an endogenous neurotoxin, N-methyl(R)salsolinol, and neuroprotection by propargylamines. J. Neural Transm. Suppl., in press.
- 3) Maruyama W., Takahashi T., Youdim M., Naoi M. (2002) The anti-parkinson drug, rasagiline, prevents apoptotic DNA damage induced by peroxynitrite in human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells. J. Neural Transm., in press.
- 4) Akao Y., Maruyama W., Shimizu S., Nakagawa Y., Shamoto-Nagai M., Youdim M., Naoi M. (2002) Apoptosis induced by N-methyl(R)-salsolinol, an endogenous neurotoxin, is mediated by mitochondrial

- permeability transition and suppressed by Bcl-2 and rasagiline, *N*-propargyl-1(*R*)-aminoindan. *J. Neurochem.*, in press.
- 5) Akao Y., Maruyama W., Yi H., Shamoto-Nagai M., Youdim MBH., Naoi M. (2002) An anti-Parkinson's disease drug, *N*-propargyl-1(*R*)-aminoindan (rasagiline), enhances expression of anti-apoptotic Bcl-2 in dopaminergic SH-SY5Y cells. *Neurosci. Lett.*, in press.
- 6) Maruyama W., Oya-Ito T., Shamoto-Nagai M., Ohsawa T, Naoi M. (2002) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is translocated into nuclei through Golgi apparatus during apoptosis induced by 6-hydroxydopamine in human dopaminergic SH-SY5Y cells. *Neurosci. Lett.*, in press.
- 7) Yamamoto T., Maruyama W., Kato Y., Yi H., Shamoto-Nagai M., Tanaka M., Sato Y., Naoi M. (2002) Selective nitration of mitochondrial complex I by peroxynitrite: involvement in mitochondria dysfunction and cell death of dopaminergic SH-SY5Y cells. *J. Neural Transm.* 109: 1-13
- 8) Maruyama W., Akao Y., Youdim M. B. H., Davis B. A., Naoi M. (2001) Transfection-enforced Bcl-2 overexpression and an anti-Parkinson drug, rasagiline, prevent nuclear accumulation of glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase induced by an endogenous dopaminergic neurotoxin, *N*-methyl(*R*)salsolinol. *J. Neurochem.*, 78: 727-735.
- 9) Maruyama W., Boulton A. A., Davis B. A., Dostert P., Naoi M. (2001) 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.
- 10) Naoi M., Maruyama W. (2001) Future of neuroprotecton in Parkinson's disease. *Parkinson. Rel. Disord.*, 8: 139-145.
- 11) Naoi M., Maruyama W., Youdim M. B. H. (2001) Anti-apoptotic function of propargylamine inhibitors of type-B monoamine oxidase. *J. Pharmacol., in press.*
- 12) Maruyama W., Kato Y., Yamamoto T., Oh-hashii K., Hashizume Y., Naoi M. (2001) Peroxynitrite induces neuronal cell death in aging and age-associated disorders. *J. Amer. Aging Assoc.*, 24: 11-18.
- 13) Uezono T., Maruyama W., Matsubara K., Naoi M., Shimizu K., Saito O., Ogawa K., Mizukmi H., Hayase N., Shiono H. (2001) Norharman, an inoleamine-derived β -carboline, but not Trp-P-2, a γ -carboline, induces apoptotic cell death in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J. Neural Transm.* 108: 943-953.
- 14) Toth B. E., Homicsko K., Radnai B., Maruyama W., DeMaria J. E., Vecsemyes M., Fekete M. I., Fülöp F., Naoi M., Freeman M. E., Nagy GM. (2001) Salsolinol is a putative endogenous neuro-intermediate lobe prolactin releasing factor. *J. Neuroendocrinol.*, 13: 1042-1050.
- 15) Naoi M, Maruyama W. (2001) 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.* ed. Segura-Aguilar, Grahon Publishing, Johnson City, pp. 105-129.
- 16) Maruyama W., Youdim M. B. H., Naoi M. (2001) Anti-apoptotic properties of rasagiline, *N*-

- propargylamine-1(*R*)-
aminoindan and its
optical (*S*)-isomer,
TV1022. Ann. N. Y. Acad.
Sci. "Neuro-protective
Agents" 939: pp. 320-
329.
- 17) Naoi M., Maruyama W.
(2002) Models of
Parkinson's disease. In:
Catecholamine Research:
from Molecular Insights
to Clinical Medicine.
Kluwer
Academic/Plenum
Publishers, in press.
- 18) Maruyama W., Boulton
A. A., Youdim M. B. H.,
Naoi M. (2002) Anti-
apoptotic function of
propargylamines. In:
Catecholamine Research:
from Molecular insights
to Clinical Medicine.
Kluwer
Academic/Plenum
Publishers, in press.
- 19) Maruyama W., Yamada
T., Washimi Y., Kachi T.,
Yanagisawa N., Ando F.,
Shimokata H., Naoi M.
(2002) Neutral
(*R*)salsolinol *N*-methyl-
transferase as a
pathogenic factors of
Parkinson's disease,
Kluwer
Academic/Plenum
Publishers, in press.
- 20) 丸山和佳子、直井信
(2002) 新しい神経保
護療法の可能性、最新
医学、57: 308-313.
- 21) 丸山和佳子、直井信
(2002) パーキンソン病
におけるドパミン神経
細胞死の機序に関する
研究、Progress in
Medicine, 22: 197-201
- 22) 直井信、丸山和佳子
(2001) パーキンソン
病：その病因と神経細
胞の保護、運動障害、11:
37-43.
- 23) 丸山和佳子、直井信
(2001) パーキンソン病
の病因—最近の研究か
ら—、老年精神医学雜
誌、12: 343-348
- 24) 丸山和佳子、直井信
(2001) 内在性神経毒、
N-methyl(*R*)salsolinol に
よるドパミン神経細胞
死と propargylamine に
よる細胞死防御の機序
に関する研究、Progress
in Medicine, 21: 1937-
1941