

厚生科学研究研究費補助金

21世紀型医療開拓推進研究事業

アルツハイマー病に対する経口投与可能な神経保護薬の開発：  
ミトコンドリアにおける細胞死シグナルの制御の試み

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

アルツハイマー病に対する経口投与可能な神経保護薬の開発； ミトコンドリアにおける細胞死シグナルの制御の試み 丸山和佳子	1
---	---

### II 分担研究報告書

1. propargylamine 化合物による神経保護タンパク発現増加の機序の検討 丸山和佳子	5
2. Bcl-2 family のミトコンドリア PT pore に対する調節機構とそれに対する propargylamine 化合物の作用の解析 辻本 賀英	11
3. propargylamine による神経保護作用の構造活性相関の解析 直井 信	17
4. Propargylamine 化合物による神経保護作用における TNF ファミリーの関 与の解析 錫村明生	25
5. 神経細胞死におけるミトコンドリアシグナルの関与 赤尾 幸博	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	38
----------------	----

厚生科学研究費補助金（21世紀型医療開拓推進研究事業）

総括研究報告書

アルツハイマー病に対する経口投与可能な神経保護薬の開発；  
ミトコンドリアにおける細胞死シグナルの制御の試み

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：経口投与可能な神経保護薬の候補である propargylamine 化合物の作用機序、特にミトコンドリア依存性の細胞死シグナルに与える影響を検討した。propargylamine 化合物は転写因子 NF $\kappa$ B の活性化と、ミトコンドリア permeability transition pore (PT pore) 制御を通して神経保護活性を示すことが明らかとなった。アルツハイマー病の細胞モデルを開発した。

[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)

辻本 賀英 (大阪大学大学院医学系研究科 教授)

直井 信 (応用生化学研究所 部長)

錫村明生(名古屋大学環境医学研究所 教授)

赤尾 幸博 (財団法人岐阜県国際バイオ研究所 部長)

A. 研究目的  
B 型モノアミン酸化酵素の阻害剤として既に臨床でパーキンソン病に使用されている(-)deprenyl (selegiline) は、細胞実験、あるいは動物実験において神経保護効果を有することが示されている。神経変性疾患に対する保護療法の試みとして selegiline が未治療パーキンソン病患者に投与され、大規模な患者対照研究が行なわれた

が、その神経保護作用は証明されなかった。この原因は、selegiline による神経保護作用の分子生物学的機序が明らかにされないまま、患者への応用がなされたため、使用量設定や、薬効の評価系が不適切であったことが考えられる。本研究では selegiline およびその類似化合物である propargylamine 化合物の作用機序を *in vitro*、*in vivo* の実験で解明する。さ

らに、作用に必要な化学

構造を明らかとすることによって新規でより効果の高い薬剤を開発することを目的とする。薬剤による神経保護療法は遺伝子治療や神経幹細胞移植等他の方法と比較して簡便性、安全性、経済性において優れている。selegiline は経口投与可能で脳内移行が良好な化合物であり、また、重篤な副作用も現在までのところ報告されていない。従って臨床応用可能な神経保護薬が類似化合物から見い出される可能性は極めて高いと考えられる。世界初の経口投与可能な神経保護薬を開発し、高齢化社会に貢献したい。

## B. 研究方法

初年度は主に培養細胞等を用いた *in vitro* の系で propargylamine 化合物の作用機序を解明した。予備実験で propargylamine 化合物の中でも最も神経保護活性が高かった N-propargylamine-1(R)-aminoindane (rasagiline) を中心に研究を行なった。ヒト神経芽細胞腫である SH-SY5Y 細胞に rasagiline を投与し、神経栄養因子である GDNF、BCL-2 ファミリーの mRNA およびタンパク量の変化を検討した。転写因子である NF $\kappa$ B の活性化を検討した。また、ラットに rasagiline の持続皮下注を行ない、抗

酸化酵素である脳内 superoxide dismutase (SOD) および catalase 活性を測定した。(丸山) 老化に伴う神経変性疾患においてはミトコンドリア依存性のアポトーシスシグナル活性化の関与が示唆されている。このシグナル伝達を制御する中心的機構としてミトコンドリアにおける permeability transition pore (PT pore) に注目した。PT pore の重要な構成分子である voltage dependent anion channel (VDAC) が哺乳類のアポトーシスの系で PT pore の開孔に関与しているかを *in vitro* で研究した。また、BCL-2 ファミリーによる PT pore 制御における機能的標的分子について検討を行なった。実験には VDAC を組み込んだリポソーム、ラット肝臓から調製したミトコンドリア、および抗 VDAC 抗体を用いた。(辻本) propargylamine 化合物による神経保護タンパクの誘導作用、および PT pore 制御作用について必要な化学構造を検討した。SH-SY5Y 細胞を用い、ミトコンドリアの膜電位低下を蛍光色素である JC-1 によって経時的に測定した。酸化ストレスや神経毒により PT pore 開孔を引き起こした。この系を用い膜電位低下に propargylamine 化合物が及ぼす影響について検討を加えた。(直井) rasagiline のミトコンド

リアシグナルに及ぼす作用を分子レベルで解明するために、ラット肝臓より単離したミトコンドリアに rhodamine を予め loading しておき、PT pore 開孔に及ぼす rasagiline の直接作用を in vitro で検討した。(赤尾) アルツハイマー病における細胞死には増加した amyloid  $\beta$  protein ( $A\beta$ ) による直接の毒性とミクログリアの活性化を介した毒性が存在することが示唆されている。アルツハイマー病の神経細胞死モデルを開発する目的で、 $A\beta$  の SH-SY5Y 細胞、マウス神経芽細胞腫 Neuro2a 細胞、あるいはマウスミクログリア初代培養系に与える影響を検討した。(錫村)

倫理面への配慮について：動物実験に関しては各々の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。

### C. 研究結果

propargylamine 化合物である rasagiline は、GDNF および BCL-2 タンパクの増加を SH-SY5Y 細胞に、SOD と catalase の活性増加をラット脳に引き起こした。rasagiline による GDNF の増加は  $NF\kappa B$  の活性化抑制剤である sulfosaladine により阻害された。Rasagiline 添加後 1 時間で  $NF\kappa B$  の活性化と核内移行が観察され

た。(丸山) 哺乳類の PT pore 制御においても VDAC が必須であり、BCL-2 ファミリーの標的分子は VDAC であることが明らかとされた。(辻本) SH-SY5Y 細胞に酸化ストレスや神経毒を負荷することにより PT pore 開孔が引き起こされるとともに膜電位は低下した。propargylamine 化合物によりこの低下は抑制された。膜電位低下抑制作用には propargylamine 基とともに適当な長さの疎水基が必要であった。(直井) ラット肝臓より単離したミトコンドリアに対して神経毒は PT pore を開孔させ、rasagiline はこれを用量依存的に阻害した。(赤尾)  $A\beta$  は SH-SY5Y 細胞および Neuro2a 細胞に対して形態変化と細胞死を惹起した。マウスミクログリア細胞には TNF と NO synthase (NOS) を誘導した。(錫村)

### D. 考察

本研究班の今年度の研究成果により rasagiline などの propargylamine 化合物には、1) ミトコンドリアに存在する permeability transition pore を直接制御する作用 と 2) 神経保護に働く複数のタンパク発現を誘導することによって細胞死を防御する作用の 2 つが存在することが証明された。今後、 $A\beta$  を用いたアルツハイマー病細胞死モデルや動物モデルを用いて

propargylamine 化合物の神経保護効果を検討するとともに、より強力な神経保護薬の開発を目指すことが必要である。

#### E. 結論

propargylamine 化合物は経口投与可

能な神経保護薬として有望である。今後、本薬剤の作用機序の解明と臨床応用、新薬開発に向けて研究を進展させる。

#### F. 健康危険情報

なし

厚生科学研究費補助金（21世紀型医療開拓推進研究事業）  
分担研究報告書

propargylamine 化合物による神経保護タンパク発現増加の機序の検討

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：アルツハイマー病に対する神経保護薬の候補である propargylamine 化合物は、permeability transition pore にはたらきミトコンドリアの膜電位低下を抑制する直接作用の他に、BCL-2、superoxide dismutase、glia derived neurotrophic factor (GDNF)等の神経保護タンパクの発現を増加させることが見いだされた。propargylamine 化合物の慢性投与による神経保護作用には、これらタンパク発現の変化が関与している可能性があると考えられた。

A. 研究目的

propargylamine 化合物による神経保護作用の分子メカニズムの中には、ミトコンドリアに対する直接作用を介する急性の効果と、タンパク誘導を介する慢性効果が存在することが示唆されている。propargylamine 化合物の中でも神経保護作用が最も強い rasagiline により誘導されるタンパク、特に BCL-2 ファミリーメンバー、抗酸化酵素、神経栄養因子について、タンパク誘導の機序を検討した。

B. 研究方法

ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞を rasagiline で処理し、経時的に mRNA およびタンパクサンプルを採取した。

神経栄養因子である glia derived neurotrophic factor (GDNF)タンパクの定量は ELISA 法によった。BCL-2、GDNF、superoxide dismutase (SOD)に共通の転写因子である NF $\kappa$ B が活性化されているか実験を行なった。NF $\kappa$ B 活性化の阻害剤である sulfasalazine で SH-SY5Y 細胞を前処理し、rasagiline による GDNF 増加作用への影響を検討した。NF $\kappa$ B の核内移行を細胞の免疫染色と immunoblotting で検討した。また、活性化 NF $\kappa$ B の NF $\kappa$ B binding site oligonucleotide への結合を ELISA 法にて定量を行なった。ミトコンドリア permeability transition pore に作用してアポトーシスシグナル活性化を

制御する BCL-2 ファミリーを RT-PCR および immunoblotting 法にて定量し、薬剤の影響を検討した。雄 F344 ラットに 0.5 mg/kg の rasagiline をミニポンプで持続的皮下注を行なった。2 週間後に屠殺し、脳組織 (大脳皮質、海馬、線条体、小脳、黒質) における superoxide dismutase (SOD) および catalase 活性を分光高度計にて測定した。

動物実験については長寿医療研究センター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。

### C. 研究結果

GDNF タンパクは、rasagiline 1  $\mu$ M-100 nM 3 時間処理によって顕著な増加が認められた。propargylamine 基をもたない aminoindane によっては GDNF 量の変化は認められなかった。rasagiline による GDNF 増加作用は sulfosaladine により完全に抑制された。Rasagiline 処理後 1 時間以内に NF $\kappa$ B 構成タンパクである p65 の核内移行が免疫染色および immunoblotting 法で認められ、活性化 NF $\kappa$ B が ELISA 法にて確認された。

rasagiline 100 nM 24 時間処理によって抗アポトーシスタンパクである bcl-2 mRNA およびタンパクの有意な増加が認められた。mRNA の増加は 3 時

間、タンパク量は 6 時間後より増加が認められた。BCL-2 ファミリーの中で mRNA の変化が最も顕著であったのは bcl-2 であり、同じく抗アポトーシス作用をもつ bcl-xL の増加は僅かであった。一方アポトーシスを促進する bax の mRNA には変化が認められなかった。

Rasagiline を 2 週間皮下注することにより、ラット脳黒質および線条体で Mn-SOD、Cu/Zn-SOD および catalase 活性の有意な増加が認められた。しかしながら、大脳皮質、海馬、小脳の酵素活性には変化が認められなかった。

### D. 考察

rasagiline などの propargylamine 化合物は、神経保護に働く複数のタンパク発現を誘導することによって細胞死を防御する作用をもつことが証明された。さらに rasagiline による神経保護タンパク発現誘導には転写因子である NF $\kappa$ B の活性化が関与していることが示唆された。今後 rasagiline の標的タンパクを明らかにすることができれば、propargylamine 化合物の神経保護活性を簡便にスクリーニング、あるいは比較するシステムを開発することが可能となる。さらに、今回の研究で、propargylamine 化合物のタンパク誘導作用が動物レベルで



証明されたことは臨床応用にむけて重要なデータと考えられる。今後、神経保護作用発現に関わる分子を解明することとともに、アルツハイマー病の *in vitro*、*in vivo* モデルに対する propargylamine 化合物の有効性について検討が必要である。

#### E. 結論

propargylamine 化合物による神経保護作用の一部は、NF $\kappa$ B 活性化を介したタンパク誘導によるものである可能性が *in vitro*、*in vivo* の研究により示唆された。

#### 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ー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  
*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;  
relavance 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（21世紀型医療開拓推進研究事業）

分担研究報告書

Bcl-2 family のミトコンドリア PT pore に対する調節機構とそれに対する  
propargylamine 化合物の作用の解析

分担研究者 辻本 賀英 大阪大学大学院医学系研究科教授

研究要旨：アポトーシスの制御因子である Bcl-2 ファミリーメンバーは、ミトコンドリアにおいて膜の透過性を調節することにより、ミトコンドリア内在性のアポトーシス誘導因子（シトクロム c など）の細胞質への流出を制御している。その機能ターゲット分子として、PT (permeability transition) pore の構成成分でミトコンドリア外膜に存在する VDAC (voltage-dependent anion channel) を同定し、Bcl-2 ファミリーメンバーは直接結合することによりチャネルの開閉を調節することを示してきたが、数種類の VDAC 中和抗体を作成しそれらを駆使することにより、我々が提唱している上記の「VDAC が Bcl-2 ファミリーたんぱくの機能ターゲットである」というモデルを証明した。

A. 研究目的

神経変性疾患の治療や予防のための有用なアプローチの一つは、神経変性、神経細胞死の分子メカニズムを解明することである。Bcl-2 ファミリーたんぱくは、アポトーシスを制御する機能を持つ分子であり、生理的な状況下で起こる神経細胞死（プログラム細胞死）と病理的状況下で起こる神経変性に深く関与することが知られている。Bcl-2 たんぱくは、また一部のネクローシスをも抑制することが知られており、生体内で起こる種々の神経細胞変性を有効に阻止する可能性を持っている。

この申請研究の目的は、特にミトコンドリア PT pore を如何に調節するかを解析することにより Bcl-2 ファミリーたんぱくの機能の詳細を明らかにし、細胞の生死決定機構を解明すると同時に、そこから得られる成果をベースに神経変性疾患の治療に対し有効なストラテジー、特に薬剤のターゲット候補などを提示することである。

B. 研究方法

VDAC の活性を抑制する抗 VDAC 抗体を作成し、それを用いてアポトーシスにおける VDAC 関与を検討する研究を

行った。必要な材料調製、および実験方法を以下に記載する。

#### (1) 抗 VDAC 抗体作成

ヒト VDAC1 に対する抗体（特に活性を抑制しうる中和抗体）を得るために VDAC の 3 次元構造をもとに、細胞質に露出している 2 つの領域を選択し、それらの領域に対応するペプチドを合成し免疫原とした。ウサギに免疫することにより抗血清を得、アフィニティ精製を行ったものを使用した。

#### (2) 単離したミトコンドリアを用いた *in vitro* 系

定法に従ってラット肝より単離したミトコンドリアは、*in vitro* での Bcl-2 ファミリーたんぱく（大腸菌を用いて作成精製したレコンビナントたんぱく）の機能の解析に用いた。Bcl-2 ファミリーはミトコンドリア膜の透過性を調節するが、膜電位およびシトクロム c の漏出に関して、*in vivo* の現象を反映できる実験系である。

#### (3) マイクロインジェクション法による解析

細胞レベルでの抗体の影響の解析には、マイクロインジェクション法を用い、ミトコンドリア VDAC を飽和する最少量の抗体を導入した。対照実験には中和活性を示さない抗 VDAC 抗体 (31HL) やウサギ IgG を用いた。

動物を用いる実験は、全て大阪大学医学部の動物実験委員会の許可を得ている。動物愛護上の配慮からの審査基準は以下の通りである。(1) 代替え手段

がないこと (*in vitro* 系でのアポトーシスの解析に適したミトコンドリアを得るためには、これまでの知識の蓄積からラットまたはマウスに頼らざるをえない)、(2) 苦痛を回避する手段を講じている（過剰麻酔による安楽死ののちに臓器の摘出を行う）。

### C. 研究結果

#### (1) 抗 VDAC 抗体の解析

上記の記載に従って作成した 2 種類の抗 VDAC 抗体 (#20, #25) は、ウエスタンブロットにより、特異的に VDAC のみを認識することを確認した。VDAC リポソームを用い radioactive 蔗糖の取り込みで VDAC の活性を測定することができるが、これらの抗体は VDAC を飽和する量で 70~80% の活性抑制効果を示した。対照として用いた抗体はいずれもチャンネル活性に影響を与えなかった。

一方、Bax リポソームを用いた系で同様に Bax チャンネルへの影響を検討したが、このチャンネルには全く効果を示さなかった。この事は、抗 VDAC 抗体は VDAC に特異的な中和抗体として用いることができることを示しており、同様な活性を有するが抗原エピトープを異にした 2 種類の抗体を手中にしているので、抗体の効果を VDAC 活性抑制の結果と結論できると言える。

(2) 抗 VDAC 抗体によるミトコンドリアのアポトーテックな変化の抑制  
ラット肝由来のミトコンドリアにリコ

ンビナント Bax (アポトーシス促進活性を有する Bcl-2 ファミリーメンバー) を加えると、膜電位の喪失とシトクロム c の漏出が惹起されるが、リコンビナント Bcl-xL (アポトーシス抑制活性を有する Bcl-2 ファミリーメンバー) を共存させるとこの反応は抑制される。従って細胞レベルでの Bcl-2 ファミリー分子の機能を再現できる *in vitro* 系と言える。この系において Bax を加えた時に、抗 VDAC 抗体 (#20, #25) を共存させると膜電位の喪失とシトクロム c の漏出がともに抑制された。この結果は、Bax による膜電位の喪失とシトクロム c の漏出に VDAC 活性が必須であることを示している。Bax の代わりにアポトーシス促進活性を有する Bcl-2 ファミリーの他のメンバーである Bak を用いても同様の結果が得られた。

ミトコンドリアに  $Ca^{2+}$  や  $H_2O_2$  を加えても膜電位の喪失とシトクロム c の漏出がおこることが知られているが、これらの変化も抗 VDAC 抗体 (#20, #25) により抑制された。 $Ca^{2+}$  による膜電位の喪失とミトコンドリアたんぱくの漏出は、PT に依存した反応であることが知られており (実際に PT 阻害剤、シクロポリン A やボンクレキン酸などにより抑制されることを示している)、この結果は、VDAC 活性が PT に必須であることを示している。PT に VDAC の関与は示唆されてはいたが、実験的な証明は提供されておらず、本結果はそれを始めて証明したことになる。

### (3) 抗 VDAC 抗体によるアポトーシスの抑制

ミトコンドリアにおけるアポトーシス附随変化が抗 VDAC 抗体で抑制されたことから、アポトーシスに VDAC 活性が必須である可能性が極めて強くなった。そこで、これを明確にするために、抗 VDAC 抗体をマイクロインジェクションによりヒト由来の HeLa 細胞内へ導入する実験を行った。抗体のマイクロインジェクションの後、抗体のミトコンドリア分布をみることでミトコンドリア上の VDAC を飽和する最少量を決めた (過剰量の抗体のインジェクションでは、抗体はミトコンドリアと細胞質全体に分布した)。抗体を導入した細胞にアポトーシスを誘導するためにリコンビナント Bax をマイクロインジェクションし、時間経過をおって細胞死の多寡を顕微鏡下でモニターした。コントロール抗体を導入した細胞は、リコンビナント Bax により数時間後からアポトーシスを起こしたのに対し、抗 VDAC 抗体 (#20, #25) を導入した大多数の細胞はアポトーシスを免れた。少なくとも一部の細胞は半日後に増殖を示した。このことは、Bax によるアポトーシスに VDAC 活性が必須であることを示している。同様の実験において、ミトコンドリアからのシトクロム c の漏出も検討したが、コントロール抗体と Bax を導入した細胞では、シトクロム c のミトコンドリアからの漏出を確認できたが、VDAC 抗体を導入した細胞では、Bax の導入後もシトクロ

ム c はミトコンドリア局在を示した。従って、抗 VDAC 抗体は Bax によるミトコンドリアからのシトクロム c の漏出を抑制することでアポトーシスを阻止しているものと考えられる。

抗 VDAC 抗体のアポトーシス抑制効果がより一般的であることを示す目的で、抗 VDAC 抗体 (#20, #25) をマイクロインジェクションした細胞を種々のアポトーシス誘導試薬で処理した。用いたものは、エトポシド、パクリタキセル、スタウロスポリンであり、抗 VDAC 抗体はこれら全ての試薬によるアポトーシスを有意に抑制した。この結果は、哺乳動物細胞におけるアポトーシスに VDAC 活性が必須であることを示している。

#### D. 考察

我々は、Bcl-2 ファミリーたんぱくは、ミトコンドリア外膜に存在するチャンネル VDAC の開閉を制御することで、ミトコンドリア内外膜間隙に存在するアポトーシス誘導因子の漏出を調節し細胞の生死の決定を行っていることを提唱してきた。アポトーシス促進メンバー Bax や Bak は VDAC に結合することで構造変化を誘起しシトクロム c などを通過させるポアを形成するのに対し、アポトーシス抑制ファミリーメンバーである Bcl-2 や Bcl-xL はチャンネルへの結合を通し閉孔することにより膜の透過性を維持する。シトクロム c のミトコンドリアからの漏出に VDAC が必須であることは、yeast を用いた

遺伝学的な実験結果によってもサポートされた。つまり Bax によるシトクロム c 漏出は VDAC1 欠損の yeast においては起こらないことを以前に示した。しかし、哺乳動物細胞におけるシトクロム c 漏出やアポトーシスに VDAC が直接関与する証拠はまだ提示するには至っていなかった。そこで、哺乳動物細胞において VDAC 機能欠損の状態を確立するために、VDAC 活性を抑制する抗 VDAC 抗体を2種類作成し、これらを用いることで、哺乳動物細胞のアポトーシスに VDAC 活性が必須であることを示すことが出来た。アポトーシス制御因子 Bcl-2 ファミリーの機能および細胞の生死決定機構を解明したことになり、過剰なアポトーシスによる起きる疾患の治療のための分子ターゲットの絞り込みに対しても重要な情報を与えるものと考えられる。

さらに VDAC が PT 惹起に必須であることも同時に示すことができ、未だ不明な部分が多い PT の分子メカニズムの解明に向けた重要なワンステップであると考えられる。

#### E. 結論

Bcl-2 ファミリーたんぱくは、その機能場所はミトコンドリアであり、その機能ターゲットは膜上のチャンネル VDAC である。細胞死促進メンバーである Bax や Bak はチャンネルを開孔し、ミトコンドリア膜間隙からアポトーシスシグナル伝達分子（カスパー活性化因子の一つであるシトクロム c など）の漏出



を促進するのに対し、アポトーシス抑制メンバーである Bcl-2 や Bcl-xL は VDAC を閉孔しその反応を抑制する。また VDAC はミトコンドリア膜透過性亢進現象 (mitochondrial permeability transition) に必須である。

#### F.健康危険情報

特になし

#### G.研究発表

##### 1. 論文発表

1. Hata, S., Fukuo, K., Morimoto, S., Eguchi, Y., Tsujimoto, Y. and Ogihara, T. Vascular smooth muscle maintains the levels of Bcl-2 in endothelial cells. *Atherosclerosis*. 152: 309-316, 2001
2. Shimizu, S., Matsuoka, Y., Shinohara, Y., Yoneda, Y. and Tsujimoto, Y. Essential role of voltage-dependent anion channel in various forms of apoptosis in mammalian cells. *J. Cell Biol.* 152: 237-25, 2001
3. Tsujimoto, Y. and Shimizu, S. The voltage-dependant anion channel: an essential player in apoptosis. *Biochimie*, in press
4. Tsujimoto, Y. Bcl-2 family of proteins: life-or-death switch in mitochondria. *Bioscience Report*. In press
5. Tsujimoto, Y. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family of proteins.

In "Apoptosis: The Molecular Biology of Programmed Cell Death: Frontiers in Molecular Biology" eds. N. McCarthy & M. Jacobson. Oxford University Press. In press

##### 3. 学会発表

(国際学会)

##### 1. Tsujimoto, Y.

Bcl-2 family of proteins: Life-or-death switch

5th Joint Conference of the American Association for Cancer Research and the Japanese Cancer Association

2 / 1 4 日 ~ 2 / 1 8、2 0 0 1

Hawaii, USA

##### 2. Tsujimoto, Y.

Regulation of cell death by Bcl-2 family of proteins

The 5th International conference on progress in Alzheimer's and Parkinson's disease, The 9th International Catecholamine Symposium

Kyoto, Japan

3 / 3 1 ~ 4 / 5、2 0 0 1

##### 3. Tsujimoto, Y.

Bcl-2 family of proteins: Life-or-death switch

Advanced FEBS course

Moscow, Russia

9 / 2 ~ 9 / 7、2 0 0 1

##### 4. Tsujimoto, Y.

Bcl-2 family of proteins: Life-or-

death switch

Nobel Conference "Apoptosis"

Stockholm, Sweden

10/4~10/7, 2001

(国内学会)

1 辻本 賀英

細胞の生死決定メカニズム

第1回分子生物学会春季シンポジウム

盛岡

平成13年5月11日

2 辻本 賀英

Bcl-2ファミリーによる細胞死制御

第60回日本癌学会総会

横浜

平成13年9月28日

3 辻本 賀英

Bcl-2ファミリーの機能

第24回日本分子生物学会年会

横浜

平成13年12月9日

4 清水 重臣、辻本 賀英

アポトーシスにおけるミトコンドリア

膜透過性調節機構の解析

第24回日本分子生物学会年会

横浜

平成13年12月11日

5 杉山 智康、清水 重臣、辻本 賀英

BH3-only タンパク質 Bim による

VDAC 活性制御

第24回日本分子生物学会年会

横浜

平成13年12月11日

6 杉岡 理恵、清水 重臣、辻本 賀英

Bcl-xL BH4 ドメイン由来ペプチドの

アポトーシス抑制効果

第24回日本分子生物学会年会

横浜

平成13年12月11日

7 田上 真次、恵口 豊、武田 雅

俊、辻本 賀英

ER ストレス誘導性アポトーシスにおけるレティキュロンファミリーのカス  
ペース活性化能

第24回日本分子生物学会年会

横浜

平成13年12月11日

8 恵口 豊、辻本 賀英

Bcl-2/Bcl-xL は Fas によるアポトーシスを阻止するが、アポトーシス特異的な  
ブレッキングには影響しない

第24回日本分子生物学会年会

横浜

平成13年12月12日

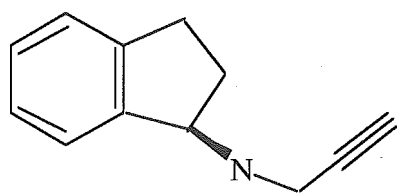
H.知的財産権の出願・登録状況

特になし

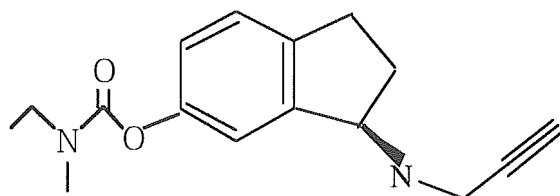
propargylamine による神経保護作用の構造活性相関の解析

分担研究者 直井 信 応用生化学研究所 部長

研究要旨：神経変性疾患とくにアルツハイマー病における主症状は痴呆であり、病的にはアセチルコリン系神経細胞の変性と生化学的には神経伝達物質アセチルコリンの減少がその原因と考えられている。Cholinesterase 阻害剤の投与は痴呆症状の改善をもたらしたが、神経細胞の死を防御または阻止する原因治療には至っていない。アルツハイマー病において関与するニューロンを細胞死より保護し、発症または病状の進行を制御することが本研究の最終目的である。近年、ミトコンドリアに存在するアポトーシス制御機構が細胞の生と死を決定していることが示唆されている。この機構はミトコンドリアの膜透過性に関与する permeability transition pore (PTP) を介して細胞死を誘導する。またこの機構は抗アポトーシス活性を有する Bcl-2, Bcl-xL とアポトーシス誘発活性を有する Bax, Bad により調節されている。我々は PTP を制御することで、細胞死を抑制する化合物の検索を行い、propargylamine 誘導体の一部がその活性を持つことを見出した。下図にその化学構造を示す。



Rasagiline



TV 3326  
(R-enantiomer)

## A. 研究目的

神経変性疾患におけるニューロンの細胞死は酸化ストレス、ミトコンドリアを中心とした代謝系の破綻または興奮性神経毒により惹起される。細胞死の型としてはアポトーシスとネクローシスがあるが、アルツハイマー病での細胞死はアポトーシスによるとの結果が報告されている。この誘因に関しては遺伝、環境因子が種々論じられているが、未だ定説に至っていない。しかし最終的な細胞死に至る過程は細胞に内在する共通の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の保護剤の標的となりうる可能性が提唱されている。我々は既にパーキンソン病の細胞モデルにおいてドパミン細胞をアポトーシスから保護する活性を有する一連の propargylamine 誘導体を発見している。その一つ (-)-deprenyl (selegiline) は現在我が国で L-DOPA 療法の補助剤として使用されている。この (-)-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。NMRSal により段階的に活性化されるアポトーシスにたいし、Propargylamine 誘導体はミトコンドリアにおける膜透過性の変化を阻止し、下流の細胞死カスケイドが活性化することを止めることが明かとなった。Propargylamine 誘導体の構造活性相関を検討したところ、(-)-deprenyl 以外に rasagiline (cyclic benzyl-amine), N-(2-heptyl)-N-methylpropargyl-amine (aliphatic

amines)などが細胞保護活性を示した。その内で rasagiline が最も低濃度で細胞死を阻止出来た。これら従来の結果から、今回アルツハイマー病の細胞モデルを作成し(丸山と共同研究)細胞死に至る情報伝達機構とその制御を研究する(赤尾と共同研究)。その結果より rasagiline 等を用いミトコンドリアにおけるアポトーシスシグナルに介入し細胞死を阻止する機序を研究する。抗アポトーシス活性に必要な化学構造を明らかにし、さらに強力な薬剤の開発を目指す。またアルツハイマー病における低下しているアセチルコリンレベルを改善する為、cholinesterase 活性の阻害基を持つ薬剤の開発もあわせ行う。此の研究から、アルツハイマー病での神経細胞の細胞死を予防または修復する原因療法と痴呆に対する症状の改善を図ることを本研究の最終の目的とする。

## B. 研究方法

神経細胞のモデルとして今回は SH-SY5Y 細胞を用いた。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 peroxy-nitrite 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。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) TV3326 (イスラエル、M. Weinstock 教授より提供) を用い抗アポトーシス作用の細胞内機