

序を検討した。

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、定量した。また MitoTracker Orange, MitoTracker Green を用いた Fluorescence-activated cell sorter (FACS) 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。Cytochrome C のミトコンドリアよりの流出を Western blot 法により測定した。Caspase 3 の活性は蛍光基質 Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-MCA を用い蛍光法にて測定した。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。細胞死は propidium iodide (PI) の染色で、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。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 段裂をアガロース電気泳動法により測定した。

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。GDNF の定量は ELISA によった。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  $\Delta\Psi_m$  の低下を阻止した。SH-SY5Y 細胞に予め取り込ませた Rhodamine 123 の蛍光強度は神経毒により PTP が開孔に従い低下した。Rasagiline はこの Rhodamine 123 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 rasagiline が PTP の開孔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 cytochrome C の流出、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。

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。

また GDNF も rasagiline により著明に増加した。

Propargylamine に構造が類似した一連の薬剤で抗アポトーシス活性を 1) ミトコンドリア膜電位の安定化、2) anti-apoptotic bcl-2 protein family の誘導、

3) BDNF の誘導、4) 最終的な細胞死の阻止の4点で構造との関連を検討した。各活性には異なる独立の化学構造が必要であることが明らかとなった。Rasagiline, TV3326 は共にこれらの細胞保護活性を有していた。

#### 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 の構造と機能は未だ十分解明されていない。PTP は、ATP 産生、Ca 濃度の調節、など細胞の維持に必修な mega-channel 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。この channel は Bcl-2 等の anti-apoptotic oncogene と Bax 等の pro-apoptotic 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を生存させる活性を持つ Bcl-2 が propargylamine により誘導されることを証明した。また rasagiline は GDNF の産生を促進し、細胞を保護し機能を活性化している。従来 bcl-2, GDNF は神経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 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つつある。

今後、 $\beta$ -amyloid による細胞死のモデ

ルを用い(丸山、錫村、赤尾と共同)細胞保護の機序をあきらかにする。また PTP の開口を調節する機構に対する神経細胞保護剤の作用機序をさらに検討する(辻本と共同)。

#### E. 結論

神経保護活性を持つ propargylamine 誘導体がミトコンドリアの膜電位の安定化と、細胞に内在する抗アポトーシス機構を活性化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. 健康危険情報

なし

#### G. 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 determin 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) Glycerldehyde-3-phosphate dehydrogenase is translocated into nuclei through Golgi apparatus during apoptosis induced by 6-hydrozydopamine 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. Pharmac. 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  $\beta$ -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.
- 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, Grahan 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—、*老年精神医学雑誌*、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
2. 学会発表
- 1) Naoi M., Maruyama W., Akao Y. “Models of Parkinson’s disease”. 9<sup>th</sup> International Catecholamine Symposium, March 31-April 5, 2001, Kyoto, Japan
- 2) Maruyama W., Boulton A. A., Youdim M. B. H., Naoi M. “Anti-apoptotic function of propargylamines”. 9<sup>th</sup> International

- Catecholamine Symposium, March 31-April 5, 2001, Kyoto, Japan
- 3) Maruyama W., Yamada T., Washimi Y., Kachi T., Yanagisawa N., Ando F., Shimokata H., Naoi M. "Neutral (*R*)salsolinol *N*-methyltransferase as a pathogenic factors of Parkinson's disease". 5<sup>th</sup> International Conference on Progress in Alzheimer's and Parkinson's disease. March 31-April 5, 2001, Kyoto, Japan
  - 4) Takahashi T., Maruyama W., Akao Y., Naoi M. "Mechanism of induction of apoptosis by endogenous MPTP-like neurotoxin, *N*-methyl(*R*)salsolinol". 5<sup>th</sup> International Conference on Progress in Alzheimer's and Parkinson's disease. March 31-April 5, 2001, Kyoto, Japan
  - 5) Naoi M., Maruyama W., Boulton A. A., Youdim M. B. H. "Propargylamines as neuroprotective agents in Parkinson's disease". XIV International Congress on Parkinson's Disease. July 27-August 1, 2001, Helsinki, Finland
  - 6) Maruyama W., Naoi M., Akao Y. "Mechanism underlying cell death in dopamine neurons by endogenous neurotoxins and oxidative stress: relevance to Parkinson's disease. XIV International Congress on Parkinson's Disease. July 27-August 1, 2001, Helsinki, Finland
  - 7) 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
  - 8) 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」第9回カテコールアミンと神経疾患研究会、平成13年4月21日、東京
  - 9) 丸山和佳子、直井信、「経口投与可能な神経保護薬の開発」第42回日本神経学会総会、平成13年5月11-13日、東京
  - 10) 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回日本神経化学学会大会、平成13年9月26日—28日、京都
  - 11) 直井信、丸山和佳子、社本雅代、赤尾幸博「Propargylamine 誘導体による神経細胞保護作用の機構」第74回日本生化学会大会、2001年10月25-28日、京都
  - 12) 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

会大会、2001年10月25-28日、  
京都

作用の機序の検討」 基礎老化  
学会

13) 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回日本生化学会大会、2001年10月25-28日、京都

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

14) 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

厚生科学研究費補助金(21 世紀型医療開拓推進事業)  
分担研究報告書

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

分担研究者 錫村明生 名古屋大学環境医学研究所 教授

研究要旨： propargylamine の神経保護作用とその機序への腫瘍壊死因子の関与を検討するために、神経細胞株の細胞死の実験系を作成するとともに、腫瘍壊死因子 (TNF) の抑制剤の候補を検索した。アミロイド A $\beta$ により神経細胞株 Neuro2a は細胞死を起こした。cAMP を上昇させる薬剤はすべてグリア細胞の TNF を抑制することが明らかになった。

A. 研究目的

アミロイド $\beta$ 蛋白(A $\beta$ )の沈着は、アルツハイマー病の主要な病理学的変化であり、A $\beta$ を培養神経細胞に投与すると細胞死を引き起こす。A $\beta$ による神経細胞死のメカニズムを明らかにするとともに、神経保護作用をもつ propargylamine の効果を判定する実験系を確立する。H13 年度は神経細胞死とその抑制機序における腫瘍壊死因子 (TNF) の関与を検討した。

B. 研究方法

1) 神経細胞死のモデルの作成；マウスの神経細胞の細胞株である Neuro2a を用い、Fas リガンド、アミロイド $\beta$  (A $\beta$ )、栄養因子除去による細胞死がおこるか

否か、アポトーシスがおこるか否かを検討した。Neuro2a 細胞に合成 A $\beta$ 1-42 を投与し MTT アッセイにより、細胞毒性を、apoptotic DNA ladder kit によりアポトーシスの有無を検討した。また、A $\beta$ はロット間に活性の差異があるため実験に適したロットの検索も行った。

2) TNF を抑制する薬剤の検索；次年度以降に TNF 抑制の細胞内シグナルを検討するために、既知の薬剤による TNF の抑制を検討した。型のごとく分離培養したミクログリアを LPS(1 $\mu$ g/ml)で刺激し、これに PACAP、VIP、コルホルシン、フォルスコリンなどの adnylate cyclase 活性化薬、イブジラスト、シロスタゾール、カフェインなどの phosphodiesterase 阻害薬を添加し、TNF、

一酸化窒素 (NO) 産生の抑制効果を検討した。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

1) 合成 A $\beta$ 1-42 用量依存的に、neuro2a 細胞の細胞死を誘導した。合成 A $\beta$ 1-42 のロット間による細胞死誘導の差異は認められなかった。合成 A $\beta$ 1-42 による神経細胞死では DNA ladder は検出できなかった。2) 上記すべての cAMP activating agents は容量依存性にミクログリアの TNF 産生、NO 産生を抑制した。

#### D. 考察

合成 A $\beta$ 1-42 は用いたすべてのロットで Neuro2a 細胞の細胞死を誘導することから薬剤による神経細胞死抑制の実験に用いることが可能と考えられた。合成 A $\beta$ 1-42 によっては DNA ladder は検出できず、これがアポトーシスによらない可能性があるが、この細胞死のメカニズムについては更なる検討が必要と考えられた。cAMP activating agents はミクログリアの TNF 産生を抑制することから、今後 TNF の関与する細胞死の検索に陽性コントロールとして用いることが可能と考えられた。これらの結果をふまえ、今後 Propargylamine 化合物の神経変性に対する効果、TNF 産生系に対する効果を検討し、Propargylamine 化合物の効果と作用機序の解明にアプローチする。

#### E. 結論

神経細胞死の実験系と TNF の抑制の実験系が作成できた。

#### F. 健康危険情報

In vitro の実験系で毒性の物質は用いないので健康危険の危惧はなく、本年度の実験でも実験者の健康に問題はなかった。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) 錫村明生。多発性硬化症の治療—フォスフォジエステラーゼ阻害剤、21 世紀の神経免疫学、田中正美、湯浅龍彦編、p93-97、医歯薬出版、東京、2001。

2) 錫村明生。脳のサイトカインネットワーク、21 世紀の神経免疫学、田中正美、湯浅龍彦編、p27-31、医歯薬出版、東京、2001。

3) 水野哲也、錫村明生。脳のサイトカインネットワーク、21 世紀の神経免疫学、田中正美、湯浅龍彦編、p98-101、医歯薬出版、東京、2001。

4) Michikami D, Iwase S, Kamiya A, Fu Q, Mano T, Suzumura A: Interrelations of vasoconstrictor sympathetic outflow to skin and core temperature during unilateral sole heating in humans. AUTONOMIC NEUROSCIENCE: Basic & Clinical 91: 55-61, 2001

5) Fu Q, Iwase S, Niimi Y, Kamiya A, Kawanokuchi J, Cui J, Mano T, Suzumura A: Effects of lower body positive pressure



on muscle sympathetic nerve activity response to head-up tilt. American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology 281: 778-785, 2001

6) Kamiya A, Michikami D, Fu Q, Niimi Y, Iwase S, Mano T, Suzumura A: Static handgrip exercise modifies arterial baroreflex control of vascular sympathetic outflow in humans. American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology 281: 1134-1139, 2001

7) 錫村明生: Hopkins 症候群の免疫学的機序神経内科 56: 41-44, 2002.

8) 小松恵美、錫村明生: Hopkins 症候群の画像診断神経内科 56: 50-53, 2002

9) 錫村明生: 多発性硬化症の治療と予後。脊髄型多発性硬化症 脊髄脊椎ジャーナル 14: 205-208, 2001

10) 錫村明生, 田中正美, 松本陽, 吉良潤

一: 神経免疫学の最近の進歩 神経内科 55: 601-604, 2001

11) 田中正美、松尾秀徳、錫村明生: CIDP の治療指針について 神経内科 55: 409-410, 2001

12) 杉江和馬、村田顕也、市川昌平、錫村明生: 妊娠を契機に発症した重症筋無力症の一症例 神経内科 54: 363-366, 2001

13) 錫村明生: 神経疾患とサイトカイン 最新医学 56: 1265-1270, 2001

## 2. 学会発表

Suzumura, A., Ito, A and Sawada, M.: Regulation of the CNS T cell Responses by Microglia,. The 6th International Congress of Neuroimmunology, Sept 3-7, 2001, Edinburgh

(他 3 編)

H. 知的財産権の出願・登録状況  
特許, 実用新案ともになし.

厚生科学研究費補助金（21世紀型医療開拓促進研究事業）  
分担研究報告書

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 財団法人岐阜県国際バイオ研究所 部長

研究要旨：神経細胞死のモデルとして神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞に神経毒を投与し細胞死シグナル、特にミトコンドリア依存性のシグナルのアッセイ系を確立した。ミトコンドリア膜電位低下、Cytochrome c の細胞質への流出、カスパーゼの活性化、DNA の断列が経時的に惹起されること、これらのシグナルが BCL-2 の過剰発現により抑制されることを見出した。今後この系を amyloid  $\beta$  protein による細胞死モデルに応用し、検討を行なう。

A. 研究目的

アルツハイマー病、パーキンソン病、およびポリグルタミンの蓄積を伴った疾患群など神経変性疾患に共通に観察される細胞学的所見はバリエーションはあるもののニューロンの細胞死であり、周囲に炎症反応が乏しいことからこれらのニューロン死のメカニズムは、アポトーシスではないかと考えられている。したがって、その細胞死のメカニズムを解明することは神経保護薬の開発に欠かせないと思われる。患者の病理標本を使って神経変性疾患のニューロン死が実際どの程度のアポトーシスによるものかを確かめることはきわめて困難である。我々は培養神経細胞において神経毒や酸化ストレスによる細胞死の機序を研究してきた。その結果、アポトーシス伝達経路が明らかになる

と共に細胞死の決定機構にはミトコンドリアの膜透過性に関与する permeability transition pore (PTP)が重要であることが示された。さらに神経細胞死が Bcl-2 蛋白によって調節されている可能性を示す知見が得られた。我々は PTP を制御することで、細胞死をコントロールできるのではないかと考えている。今後、アルツハイマー病の病態モデルとして amyloid  $\beta$  protein (A $\beta$ )による細胞死の分子機構を明らかにし、どの機構に作用する薬剤が神経保護薬として望ましいかを検証することが目的である。

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、N-methyl(R)salsolinol [NM(R)Sal] 内在性神経毒で処理した。

細胞死は propidium iodide (PI)の染色で、またアポトーシスの同定は Hoechst 33342 の核染色および蛍光色素 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。生化学的には DNA ラダーをアガロース電気泳動法により検定した。細胞内伝達機序を明らかにするため、カスパースの活性および anti- または pro-apoptotic protein である Bcl-2, Bcl-X family, BAX の蛋白発現の変化を Western blot 法により検討した。ミトコンドリア膜電位の変化を蛍光指示薬 JC-1 と蛍光顕微鏡により定量した。また MitoTracker/ Orange, MitoTracker/ Green を用いた Fluorescence- activated cell sorter (FACS) 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での permeability transition pore (PTP)の変化を Rhodamine 123 による蛍光法によりそれぞれ測定した。cytochrome c のミトコンドリアよりの放出を Western blot 法により検出した。Bcl-2 蛋白のアポトーシス阻止の有無をみるため SH-SY5Y 細胞に bcl-2 遺伝子を導入し Bcl-2 蛋白が過剰発現した SH-SY5Y トランスフォーマントを作成した。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

NM(R)Sal は、SH-SY5Y 神経芽細胞腫株に対して、濃度依存的に細胞増殖抑制を示した。ヘキスト 33342 核染色の

結果、SH-SY5Y 細胞において核の濃染、核の blebbing、核の分断が認められた。生化学的には DNA のヌクレオゾーム単位の分断 (DNA ラダー) が観察され、アポトーシスであることが確認された。その伝達経路を調べるため、各種カスパースの活性化をウエスタンブロットにて検討した。カスパー 8 は陰性、カスパー 3 の活性化型が観察された。この伝達経路がミトコンドリア経由であるかどうかを調べるため、ミトコンドリアの膜電位について検討した。その結果、ローダミンおよび Mito-Tracker の系においていずれも膜電位の低下が認められ、cytochrome c の放出が検出されたことから Type II のミトコンドリア経由のアポトーシスであることが判明した。この膜電位の低下は全カスパー抑制物質 Z-VAD によっても阻止できなかった。Bid の分解も観察されなかったことから NM(R)Sal はカスパーを介さずミトコンドリアの膜電位を低下させている可能性が示唆された。一方、この細胞死を anti-apoptotic な蛋白である bcl-2 が阻止できるかを調べるため bcl-2 遺伝子を SH-SY5Y 細胞に導入し、bcl-2 蛋白を過剰発現させたトランスフォーマントを作成した。その結果、bcl-2 蛋白の過剰発現によって、このアポトーシスは完全に抑制され、ミトコンドリアの膜電位の低下も阻止された。次に NM(R)Sal 神経毒の直接の影響を調べるため、ラットの肝細胞から単離したミトコンドリアについて同様に検討した。NM(R)Sal によって膜電位は低

下し、その低下はサイクロスポリン A によって完全に阻止されたことから、NM(R)Sal が直接、permeability transition (PT) を誘導し、膜電位を低下させた可能性が強く示唆された。以上から、NM(R)Sal による SH-SY5Y 細胞に対するアポトーシスは NM(R)Sal がカスパーを介さず直接ミトコンドリアの PT を誘導し膜電位を低下させ、cytochrome c の放出を伴ったカスパー 3 の活性化が DNA の分断へと導く Type II アポトーシスであることが明らかになった。さらにこのアポトーシスは bcl-2 蛋白の過剰発現によって完全に阻止された。また、予備実験で A $\beta$  による細胞死は BCL-2 過剰発現により抑制された。

#### D. 考察

今回の研究結果から次のことが明らかになった。

1) 内在性神経毒である NM(R)Sal は SH-SY5Y 細胞に対してアポトーシスを誘導した。

2) このアポトーシスはサイクロスポリン A と bcl-2 蛋白の過剰発現によって抑制された。さらにアポトーシスにおけるミトコンドリア膜電位の低下はサイクロスポリン A と bcl-2 蛋白の過剰発現によって阻止された。

3) ラットの肝細胞から単離したミトコンドリアを用いた系でも NM(R)Sal はミトコンドリア膜電位の低下を引き起こした、この膜電位の低下はサイクロスポリン A によって阻止された。bcl-2 蛋白の過剰発現ラットのミトコンドリ

アでは膜電位の低下はみられなかった。以上より NM(R)Sal による神経細胞死においては PT が強く関与していることが明らかであり、とくに VDAC や ANT は bcl-2 蛋白の機能的なターゲットであることから bcl-2 蛋白がどのように PTP complex を調節しているかを今後、明らかにする必要がある。さらに NM(R)Sal がどの蛋白と associate しているか bcl-2 蛋白との関連と合わせて明らかにしなければならない。今後はこの系を用いて A $\beta$  による細胞死を解析し比較検討する。

#### E. 結論

NM(R)Sal 内在性神経毒による細胞死はアポトーシスであった。アポトーシスの伝達経路は NM(R)Sal が直接ミトコンドリアの PT を誘導し、膜電位が低下することが initiation となり cytochrome c の流出、カスパー 3 の活性化によって実行されるものと考えられた。従って、PTP を調節する物質が最良の神経保護薬のターゲットになりうると考えられる。A $\beta$  による細胞毒性が BCL-2 により抑制されたことは、アルツハイマー病における細胞死にもミトコンドリアシグナルが重要な役割を果たしていると考えられた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 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) 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.
- 4) Akao Y., Maruyama W., Yi H., Shamoto-Naga 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) Nakagawa Y, Akao Y., Morikawa H, Hirata I, Katsu K, Naoe T, Ohishi N, and K Yagi. (2002) Arsenic trioxide-induced apoptosis through oxidative stress in cells of colon cancer cell lines. *Life Sciences*, in press.
- 5) 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.
- 7) Ito T, Akao Y., Tanaka T, Iinuma M, and Nnzawa Y. (2002) Vaticanol C, a novel resveratrol tetramer, inhibits cell growth through induction of apoptosis in colon cancer cell lines. *Biol. Pharm. Bull.*, 25: 147-148.
- 8) Hashimoto K, Nakagawa Y, Morikawa H, Niki M, Egashira Y, Hirata I, Katsu K, and Akao Y. (2001) Co-overexpression of DEAD box protein rck/p54 and c-myc in human colorectal adenomas and the relevance of their expression in cultured cell lines. *Carcinogenesis*, 22, 1965-1970.
- 9) Murate T, Banno T, T-Koizumi K, Watanabe K, Mori N, Wada A, Igarashi Y, Takagi A, Asano H, Akao Y., Yoshida S, Saito H, Nozawa Y. (2001) Cell type-specific localization of sphingosine kinase 1a in human tissues. *J Histochem Cytochem.*, 49, 845-855.
- 10) Banno Y, Takuwa Y, Akao Y., Okamoto H, Osawa Y, Nagakawa T,

- Nakashima S, Suh PG, Nozawa Y. (2001) Involvement of phospholipase D in sphingosine 1-phosphate-induced activation of phosphatidylinositol 3-kinase and Akt in Chinese hamster ovary cells overexpression. *J Biol Chem*, 23,727-735.
2. 学会発表
- 1) Naoi M., Maruyama W., Akao Y. "Models of Parkinson's disease". 9th International Catecholamine Symposium, March 31-April 5, 2001, Kyoto, Japan
  - 2) Takahashi T., Maruyama W., Akao Y., Naoi M. "Mechanism of induction of apoptosis by endogenous MPTP-like neurotoxin, *N*-methyl(*R*)salsolinol". 5th International Conference on Progress in Alzheimer's and Parkinson's disease. March 31-April 5, 2001, Kyoto, Japan
  - 3) Maruyama W., Naoi M., Akao Y. "Mechanism underlying cell death in dopamine neurons by endogenous neurotoxins and oxidative stress: relevance to Parkinson's disease. XIV International Congress on Parkinson's Disease. July 27-August 1, 2001, Helsinki, Finland
  - 4) 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 回日本神経化学学会大会、平成 13 年 9 月 26 日—28 日、京都
  - 5) 直井信、丸山和佳子、社本雅代、赤尾幸博 「Propargylamine 誘導体による神経細胞保護作用の機構」第 74 回日本生化学会大会、2001 年 10 月 25-28 日、京都
  - 6) 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 回日本生化学会大会、2001 年 10 月 25-28 日、京都
  - 7) 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」基礎老化学会
  - 8) 赤尾幸博、中川義仁 翻訳開始に関わる DEAD ボックス蛋白 rck/p54 の発癌への関与 第 60 回日本癌学会 2001 年 9 月 28 日 横浜
  - 9) 赤尾幸博、中川義仁、大石誠子、八木國夫、野沢義則 大腸腺腫における Fragile histidine triad (FHIT) 遺伝子の発現と細胞増殖および細胞死との関連 第 74 回 日本生化学会 2001 年 10 月 28 日 京都
  - 10) 鬼頭万理子、赤尾幸博、大石誠子、八木國夫、野沢義則 培養肝癌細胞に対する亜ヒ酸とブチオニンスルホキシミンの併用による殺細胞効果とその機構 第 54 回日本細胞生物学会 2001 年 5 月 31 日 岐阜

## H. 知的所有権の取得状況

### 実用新案登録

- 1) 癌治療薬（亜ヒ酸とブチオニンスルホキシミンの併用）（特願 2001-023949）
- 2) 癌治療薬及び予防薬（バチカノールC）（特願 2001-265890）

書籍

| 著者氏名                    | 論文タイトル名  | 書籍全体の編集者名         | 書籍名   | 出版者名                    | 出版地     | 出版年  | ページ     |
|-------------------------|--|-------------------|---|-------------------------|---------|------|---------|
| M. Naoi,<br>W. Maruyama | An endogenous dopamine-derived neurotoxin, N-methyl(R)salsolinol: Induction of apoptosis in dopamine neurons | J. Segura-Aguilar | Mechanism of Degeneration and Protection of Dopamine System | FP Graham Publishing Co | Johnson | 2001 | 105-129 |
| 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  | 最新医学社                   | 東京      | 2002 | 308-313 |
| 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   | 先端医療社                   | 東京      | 2001 | 118-122 |
| 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  | 運動障害                    | 東京      | 2001 | 11      |
| 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  | 老年精神医学                  | 東京      | 2001 | 343-348 |
| 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   | 日本老年医学会                 | 東京      | 2001 | 494-497 |
| 錫村明生                    | 多発性硬化症の治療-フォスフォジエステラーゼ阻害剤  | 田中正美、湯浅龍彦         | 21世紀の神経免疫学  | 医歯薬出版                   | 東京      | 2001 | 93-97   |
| 錫村明生                    | 脳のサイトカインネットワーク   | 田中正美、湯浅龍彦         | 21世紀の神経免疫学  | 医歯薬出版                   | 東京      | 2001 | 27-31   |
| 水野哲也、錫村明生               | AIDS脳症   | 田中正美、湯浅龍彦         | 21世紀の神経免疫学  | 医歯薬出版                   | 東京      | 2001 | 98-101  |



雑誌

| 発表者氏名   | 論文タイトル名   | 発表誌名                                | 巻名  | ページ     | 出版年  |
|---|---|-------------------------------------|-----|---------|------|
| 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 |
| 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 |
| 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 |
| M. Naoi, W. Maruyama  | Future neuroprotection in Parkinson's disease.  | Parkinsonism and Related Disorders. | 8   | 139-145 | 2001 |
| 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, <i>N</i> -methyl( <i>R</i> )salsolinol. | J. Neurochem.                       | 78  | 727-735 | 2001 |
| W. Maruyama, M.B.H. Youdim, M. Naoi   | Antiapoptotic properties of rasagiline, <i>N</i> -propargylamine-1( <i>R</i> )-aminoindan, and its optical ( <i>S</i> )-isomer, TV1022.   | Ann. New York Acad. Sci.            | 939 | 320-329 | 2001 |
| 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 |
| K. Oh-hashii, W. Maruyama, K. Isob  | Peroxynitrite induces gadd34, 45 and 153 via p38 MAPK in human neuroblastoma SH-SY5Y cells.   | Free Rad. Biol. Med.                | 30  | 213-221 | 2001 |

|  |  |   |     |           |      |
|--|--|---|-----|-----------|------|
| W. Maruyama, A. A. Boulton, B. A. Davis, P. Dostert and Makoto Naoi        | Enantio-specific induction of apoptosis by an endogenous neurotoxin, <i>N</i> -methyl( <i>R</i> )salsolinol, in dopaminergic SH-SY5Y cells: Suppression of apoptosis by <i>N</i> -(2-heptyl)- <i>N</i> -methylpropargylamine | J. Neural Transm.   | 108 | 11-24     | 2001 |
| 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 |
| 丸山和佳子、直井信  | 内在性神経毒、 <i>N</i> -methyl( <i>R</i> )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 |
| Hata, S., Fukuo, K., Morimoto, S., Eguchi, Y., Tsujimoto, Y., Ogihara, T.  | Vascular smooth muscle maintains the levels of Bcl-2 in endothelial cells  | Atherosclerosis   | 152 | 309-3     | 2001 |
| Shimizu, S., Matsuoka, Y., Shinohara, Y., Yoneda, Y., Tsujimoto, Y.        | Essential role of voltage-dependent anion channel in various forms of apoptosis in mammalian cells   | J. Cell Biol  | 152 | 237-250   | 2001 |
| Michikami D, Iwase S, Kamiya A, Fu Q, Mano T, Suzumura A                   | Interrelations of vasoconstrictor sympathetic outflow to skin and core temperature during unilateral sole heating in humans.   | AUTONOMY C NEUROSCIENCE: Basic & Clinical   | 91  | 55-61     | 2001 |
| Fu Q, Iwase S, Niimi Y, Kamiya A, Kawanokuchi J, Cui J, Mano T, Suzumura A | Effects of lower body positive pressure on muscle sympathetic nerve activity response to head-up tilt.   | American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology | 281 | 778-785   | 2001 |
| Kamiya A, Michikami D, Fu Q, Niimi Y, Iwase S, Mano T, Suzumura A          | Static handgrip exercise modifies arterial baroreflex control of vascular sympathetic outflow in humans.   | American Journal of Physiology Regulatory, Integrative                            | 281 | 1134-1139 | 2001 |

|  |  |                                  |    |             |      |
|--|--|----------------------------------|----|-------------|------|
|  |  | and<br>Comparative<br>Physiology |    |             |      |
| 錫村明生   | Hopkins 症候群の免疫学的機序   | 神経内科                             | 56 | 41-44       | 2002 |
| 小松恵美、錫村明生  | Hopkins 症候群の画像診断   | 神経内科                             | 56 | 50-53       | 2002 |
| 錫村明生   | 多発性硬化症の治療と予後。脊髄型多発性硬化症   | 脊髄脊椎ジャーナル                        | 14 | 205-208     | 2001 |
| 錫村明生, 田中正美, 松本陽, 吉良潤一  | 神経免疫学の最近の進歩  | 神経内科                             | 55 | 601-604     | 2001 |
| 田中正美, 松尾秀徳, 錫村明生   | CIDP の治療指針について   | 神経内科                             | 55 | 409-410     | 2001 |
| 杉江和馬, 村田顕也, 市川昌平, 錫村明生   | 妊娠を契機に発症した重症筋無力症の一症例   | 神経内科                             | 54 | 363-366     | 2001 |
| 錫村明生   | 神経疾患とサイトカイン  | 最新医学                             | 56 | 1265 - 1270 | 2001 |
| Ito T, Akao Y, Tanaka T, Iinuma M, and Nnzawa Y.   | Vaticanol C, a novel resveratrol tetramer, inhibits cell growth through induction of apoptosis in colon cancer cell lines.   | Biol. Pharm. Bull.               | 25 | 147-148     | 2002 |
| Hashimoto K, Nakagawa Y, Morikawa H, Niki M, Egashira Y, Hirata I, Katsu K, and Akao Y.  | Co-overexpression of DEAD box protein rck/p54 and c-myc in human colorectal adenomas and the relevance of their expression in cultured cell lines.                   | Carcinogenesis,                  | 22 | 1965-1970   | 2001 |
| Murate T, Banno T, T-Koizumi K, Watanabe K, Mori N, Wada A, Igarashi Y, Takagi A, Asano H, Akao Y, Yoshida S, Saito H, Nozawa Y. | Cell type-specific localization of sphingosine kinase 1a in human tissues.   | J Histochem Cytochem             | 49 | 845-855     | 2001 |
| Banno Y, Takuwa Y, Akao Y, Okamoto H, Osawa Y, Nagakawa T, Nakashima S, Suh PG, Nozawa Y.  | Involvement of phospholipase D in sphingosine 1-phosphate-induced activation of phosphatidylinositol 3-kinase and Akt in Chinese hamster ovary cells overexpression. | J Biol Chem                      | 23 | 727-735     | 2001 |

20010595

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので  
P34-P37「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください