

20020568A

厚生労働科学研究研究費補助金

効果的医療技術の確立推進臨床研究事業

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
(H13-痴呆-008)

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 丸山和佳子

平成15(2003)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 12
3. propargylamine による神経保護作用の構造活性相関の解析
直井 信 20
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 30
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 35

III 研究成果の刊行に関する一覧表 41

IV 研究成果の刊行物・別刷 45

厚生労働科学研究費補助金（効果的医療技術の確立推進臨床研究事業）

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 室長

研究要旨 老化に伴う神経変性疾患であるアルツハイマー病は 65 歳以上の日本人の 5%が罹患するとされ、高齢化社会をむかえた日本で大きな問題となっているが、現在のところ有効な治療法は見い出されていない。また、痴呆の原因となっている神経細胞死の機序も解決されていない。多数の患者に対し、安全に治療を行うために経口投与可能で脳内移行が良好な薬剤の開発を目指して研究を行った。B 型モノアミン酸化酵素の阻害剤として開発された propargylamine 化合物は *in vivo*、*in vitro* の実験でラジカルや神経毒による神経細胞死を防御することが報告されているが、そのメカニズムは解明されていない。propargylamine 化合物による神経保護作用について、標的分子を明らかとし、作用に必要な化学構造を検討することで、新規な神経保護薬の開発することを目標として研究を行った。その結果、propargylamine 化合物は MAP kinase と I κ B kinase の活性化を介して神経保護活性をもつたんぱくを増加させ、他方 amyloid precursor protein (APP) から amyloid β protein (A β) の生成を抑制することが示された(丸山)。神経変性疾患における細胞死シグナル活性化にはミトコンドリアの permeability transition (PT) pore の開閉が主要な役割を果たしていることが示唆されている。PT pore の構成分子である voltage-dependent anion channel の制御分子である BCL-2 アンタゴニストや PTD (tat)-BH4 は種々の刺激による細胞死を抑制することを証明した(辻本)。propargylamine 化合物により誘導される神経保護たんぱくを gene array を用い分析したところ、PT pore を制御する BCL-2 family protein が有意に増加することを見い出した。さらに、propargylamine 化合物自身にミトコンドリアの膜電位保持作用が存在することを見い出した(直井)。propargylamine 化合物は cytokine による神経傷害も抑制した(錫村)。アルツハイマー病の細胞モデルとして APP 過剰発現細胞を確立した。この細胞は、酸化ストレスに対し脆弱であり、その原因としてミトコンドリア機能障害が示唆された(赤尾)。

[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

現在大きな社会的問題となっている
アルツハイマー病の原因を解明し、
それを防御する臨床応用可能な薬剤
を開発することを目的として研究を
行った。神経変性疾患における細胞
死シグナルのカスケードには、ミト
コンドリアが主要な役割を果たして
いると考えられる。本研究において
は、アルツハイマー病の細胞死にお
けるミトコンドリア permeability
transition (PT) pore の役割を明ら
かとし、それを制御する経口投与可
能で脳内移行が良好な化合物につい
て研究を行った。

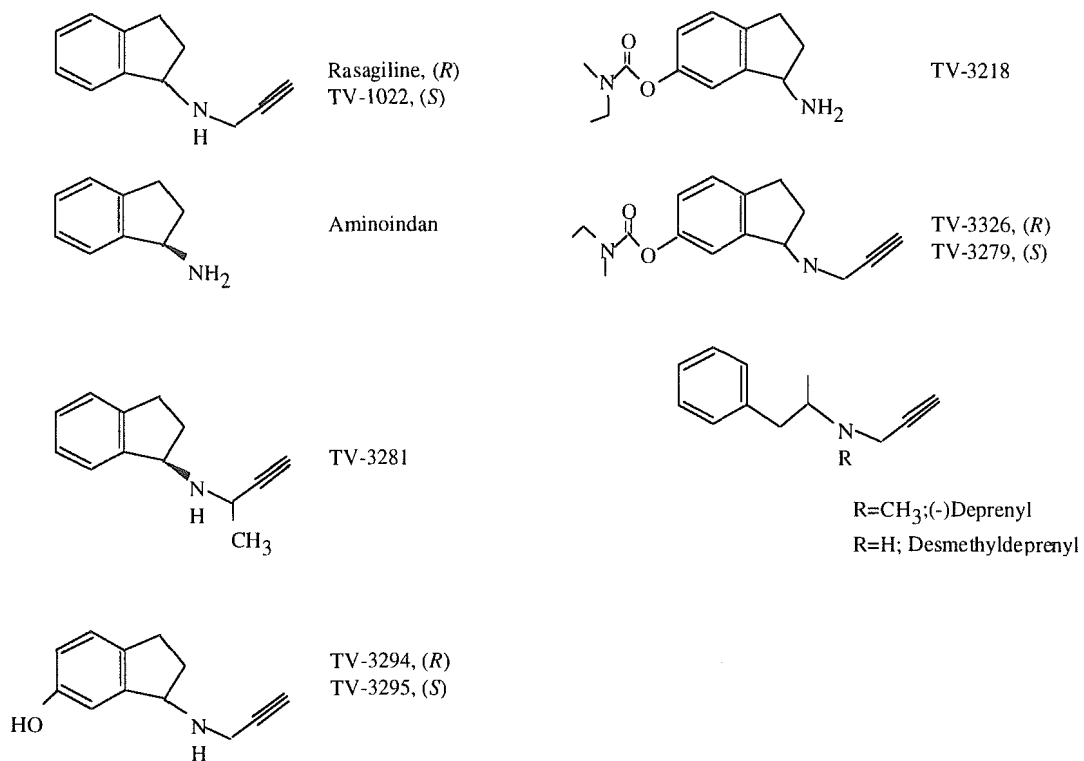
B.研究方法

今回は propargylamine 化合物の中
でも、aminoindan を中心骨格とし、
そこに propargylamine 基を付加し
た rasagiline と、さらに rasagiline

に carabamyl 基を付加し、
cholineesterase 阻害作用を付与し
た TV3326 を中心に研究を行った。
ヒト神経芽細胞腫である SH-SY5Y
細胞に、propargylamine の添加培
養を行い、一定時間後に細胞を回収
した。mRNA を採取し、各々の遺伝
子に対する gene chip を用いて対照
細胞と比較した増減を定量した。神
経保護にはたらく遺伝子の誘導に関
わる転写因子について、ELISA 法と
immunoblotting を用いて検討した。
propargylamine の標的たんぱくを
kinase を中心に探索した。アルツハ
イマー病の細胞死の原因に関与して
いるとされる A β 生成を定量するため、
その前駆たんぱくである APP を過剰
発現した培養細胞を樹立した。APP
過剰発現細胞に酸化ストレスを加え
ることにより誘導される細胞死の機
序について検討した。一方、アルツ
ハイマー病においては活性化ミクロ
グリアによる液性因子の関与が示唆
されている。初代培養神経に対する
cytokine や NO による傷害が
propargylamine によって防御され
るか否かについて検討した。

(倫理面への配慮)

厚生労働省の指針に基づき、必要に
応じて各施設の倫理委員会に諮って
研究は行われた。



細胞保護活性を検討した propargylamine 化合物の構造

C. 研究結果

rasagiline は、転写因子である NFκB の活性化を介して神経保護に働くたんぱく (glial cell line-derived neurotrophic factor や BCL-2) を誘導することが示された。NFκB の活性化は IκB kinase のリン酸化が関与しており、その上流の MAP kinase 経路が活性化している可能性が示唆された。さらに、TV3326 は APP の α-secretion を増加させることにより Aβ の生成を抑制することが示された。rasagiline を初めとする propargylamine は、ミトコンドリ

ア PT pore の開孔を直接あるいは BCL-2 たんぱくの誘導を介して制御することが示された。PT pore の構成たんぱくである voltage-dependent anion channel (VDAC) の antagonist あるいは細胞内に移行可能な BH4 domain によって、アポトーシスあるいはネクローシスによる細胞死が抑制されることが証明され、ミトコンドリアシグナルを制御することにより神経細胞死を防御できる可能性が示された。rasagiline は、cytokine による初代培養神経細胞の傷害を抑制した。APP を過剰発

現した神経芽細胞腫は、酸化ストレス等に対して脆弱であることが示された。さらに、APP 過剰発現細胞においてはミトコンドリア機能が障害されていることが示された。

F.健康危険情報

なし

D.考察

アルツハイマー病における神経細胞死の機序は不明であるが、異常 A β の蓄積や、活性化ミクログリアからの液性因子が関与していることが示唆されている。今回の研究により、propargylamine はミトコンドリアにおける細胞死シグナルの制御と、神経保護に働くたんぱく質の誘導、および A β 生成抑制を介してこれら侵害刺激から細胞を防御する可能性が示された。今後の研究の発展として、propargylamine の作用点を解明し新規でより強力な神経保護薬の開発を目指すと同時に、アルツハイマー病患者への投与を目指した臨床研究を行っていきたい。

E.結論

propargylamine 化合物による神経保護作用には、ミトコンドリア依存性のアポトーシスシグナル制御および A β 生成抑制作用があることが示された。今後、臨床応用に向けての研究を行っていく。

厚生労働科学研究費補助金（効果的医療技術の確立推進臨床研究事業）

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 室長

研究要旨 N-propargyl-1(R)-aminoindane (rasagiline) およびその類似化合物は、経口投与可能な神経保護薬候補である。rasagiline の作用の一部は神経保護にはたらくたんぱくの増加によることが示されたため、その機序を解明するための研究を行った。rasagiline を神経芽細胞腫である SH-SY5Y 細胞に投与することによって、I κ B のリン酸化とそれに引き続く転写因子 NF κ B の活性化を介して glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) の mRNA およびたんぱくレベルが増加することが見いだされた。さらに、(N-propargyl-(3R)-aminoindan-5-yl)-ethyl methyl carbamate (TV3326)は、Erk1/2 の活性化(リン酸化)と amyloid precursor protein (APP)の α -secretion を増加させ、その結果 amyloid β protein (A β)の生成を低下させる可能性が示された。今後は以上の結果を発展させ、アルツハイマー病患者に対する propargylamine 化合物の神経保護効果を臨床的に評価するための研究を行っていく予定である。

A. 研究目的

propargylamine 化合物による神経保護たんぱく、特に強力な神経保護効果をもつ神経栄養因子である glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) 誘導の分子メカニズムを明らかとするため、培養細胞を用いたモデル実験で研究を行った。さらに、アルツハイマー病における神経細胞死に主要な役割を果たしていると考えられている amyloid

β protein (A β) の生成、分泌に対する propargylamine 化合物の影響を検討した。

B. 研究方法

ヒト神経芽細胞腫である SH-SY5Y 細胞に、rasagiline を添加培養を行い、GDNF たんぱく量の変化を EIA 法で測定した。同時に、その mRNA 量を定量的 RT-PCR 法で比較した。NF κ B 活性化に必須である I κ B リン

酸化の阻害剤である sulfasaladine が rasagiline による GDNF たんぱく誘導に影響を及ぼすか否か調べた。不活性型 NF κ B は I κ B と結合して細胞質に存在するが、I κ B が I κ B kinase(IKK)によりリン酸化をうけ、分解されることによりこれと解離して核内へ移行する。rasagiline による I κ B のリン酸化を immunoblotting により同定した。さらに、rasagiline の NF κ B p65 の DNA への結合活性に及ぼす影響とその結合の特異性について、ELISA 法を用いて検討した。MAP kinase の中で、細胞の生存シグナルに重要な役割を果たす Erk1/2 のリン酸化についてリン酸化 Erk 特異抗体を用いた immunoblotting を行った。

A β の前駆たんぱくである amyloid precursor protein (APP) を遺伝子導入し、過剰発現させた SH-SY5Y 細胞を作成した。この細胞に rasagiline あるいは TV3326 を添加培養し、これら薬剤が A β 1-40 と 1-42 生成量に及ぼす影響について、ELISA 法を用い定量した。

C. 研究結果

rasagiline 添加 3 時間後より GDNF たんぱくの増加が認められ、24 時間後までその増加は持続した。同時に GDNF の mRNA レベルも増加して

いた。GDNF たんぱくの増加は sulfasaladine により有意に抑制された。Rasagiline 添加後 30 分でリン酸化 I κ B が認められたが、3 時間後にはリン酸化は減少していた。 κ B site への NF κ B p65 の結合活性は rasagiline 処理後 30 分で最大となった。この結合は sulfasaladine の投与で抑制された。また、wild type oligonucleotide により結合が阻害されたことから、結合の特異性が証明された。

rasagiline 添加培養後 30 分より Erk1/2 のリン酸化が確認された。

SH-SY5Y 細胞培養液中には A β 1-40 が認められたが、A β 1-42 は測定感度以下(< 30 pg/ml) であった。APP 過剰発現細胞では A β 1-40、1-42 共に測定可能であった。rasagiline (1 μ M-10 nM) 添加培養 3 日後の培養液中の A β 1-40、1-42 は低下傾向を示したが、有意ではなかった。一方 TV3326(100-1 nM) 添加培養により A β は有意に低下し、10 nM の TV3326 により対照の 2/3 程度となった。

D. 考察

今回の研究により rasagiline は IKK の上流に存在する kinase を活性化し、転写因子である NF κ B の活性化を介して神経保護に関わるたんぱく

の転写を引き起こしたことが示された。IKK のリン酸化に至る経路は MAP kinase である JNK および PI3 kinase-Akt の活性化による経路が主要なものと考えられているが、今回の研究では rasagiline によるこれら kinase の活性化は証明できず (data not shown)、Erk1/2 の活性化が認められた。今後、IKK のリン酸化と Erk1/2 リン酸化が上流—下流の位置関係にあるのか、あるいは共通の kinase が両者を活性化している(並列関係にある)のかを解明する必要があると考えられた。

一方アルツハイマー病における神経細胞死には A β の脳内蓄積が主要な役割を果たしているとの仮説が広く受け入れられている。APP が β -および γ -secretase により 2 箇所を切断を受け、A β が生成される。一方、 α -および γ -secretase による切断は無毒なアミノ酸断片である p3 を生成する。Erk1/2 の活性化は α -secretase の活性化を引き起こすことが報告されており、間接的に A β 生成を抑制し、アルツハイマー病の進行を抑制することが期待される。今回の研究で、rasagiline が早期に Erk1/2 をリン酸化しただけでなく、GDNF の生成を増加させることが示されたことは、本薬剤により持続的な Erk1/2 経路の活性化が引き起こされる可能性を

示している。事実、rasagiline の構造類似化合物 TV3326 は SH-SY5Y 細胞からの A β 生成を抑制することが示された。TV3326 は rasagiline に choline esterase 活性阻害をもつ carbamyl 基を付加したものである。アルツハイマー病で低下する神経伝達物質アセチルコリンを増加させ、同時に神経保護活性を示すとすれば、将来の治療薬として有望であると考えられる。

E. 結論

rasagiline、TV3326 といった propargylamine 化合物は、経口投与可能で脳内移行が良好な化合物である。また、これらの薬剤の prototype である(-)deprenyl は大きな全身性の副作用なく神経変性疾患患者に用いられている。現在までのところ(-)deprenyl の神経保護活性は証明されていないが、ヒトに対する神経保護作用の適切な評価法を確立することにより新たな神経保護薬の開発を進めていくことが必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

M. Tanaka, N. Fuku, T. Takeyasu,

L-J. Guo, R. Hirose, M. Kurata, H.-J. W. Borgeld, Y. Yamada, W. Maruyama, Y. Arai, N. Hirose, Y. Oshida, Y. Sato, N. Hattori, Y. Mizuno, S. Iwata, K. Yagi: Golden Mean to Longevity: Rareness of Mitochondrial Cytochrome b Variants in Centenarians but Not in Patients with Parkinson's Disease. J. Neurosc. Res. In press

N. Naoi, W. Maruyama, Y. Akao, H. Yi: Mitochondria determine the survival and death in apoptosis by an endogenous neurotoxin, N-methyl(R)salsolinol, and neuroprotection by propargylamines. J. Neural Transm. 109: 607-621, 2002

Y. Akao, W. Maruyama, H. Yi, M. Shamoto-Nagai, M. B. H. Youdim, M. Naoi: 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.

326:105-108, 2002.

Y. Akao, W. Maruyama, S. Shimizu, H. Yi, Y. Nakagawa, M. Shamoto-Nagai, M. B. H. Youdim, Y. Tsujimoto, M. Naoi: Mitochondrial Permeability Transition Mediates Apoptosis Induced By N-Methyl(R)salsolinol, An Endogenous Neurotoxin, and Is Inhibited by Bcl-2 and Rasagiline, N-Propargyl-1(R)-aminoindan. J. Neurochem. 82:913-923, 2002.

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. Neurotoxcol. Teratol. 24: 675-682, 2002

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.* 109:467-481, 2002.

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.* 321:29-32, 2002

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

M. Naoi, W. Maruyama: Models of

Parkinson's disease.

Catecholamine research Vol 53, 479-482, 2002 T. Nagatsu, T. Nabeshima, R. McCarty, D.G. Goldstein (eds) Kluwer Academic/Plenum Publisher, New York

W. Maruyama, M. Naoi: Cell death in Parkinson's disease. *Journal of Neurology Suppl 2.* Vol 249, 6-10, 2002

W. Maruyama, T. Yamada, Y. Washimi, T. Kachi, N. Yanagisawa, F. Ando, H. Shimokata, M. Naoi: Neutral (R)salsolinol N-methyltransferase as a pathogenetic factor of Parkinson's disease. *Mapping the Progress of Alzheimer's and Parkinson's disease.* 277-280. 2002. Y. Mizuno (eds) Kluwer Academic/Plenum Publisher, New York

丸山和佳子

老化に伴うドパミン神経細胞死
基礎老化研究 26(2): 146-151,
2002 基礎老化学会

丸山和佳子、直井信

胞死の機序

生体の科学 53(5): 421-424, 2002

金原一郎記念医学医療振興財団

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 89-95, 2002 医歯薬

出版社

1. 学会発表

W. Maruyama, Y. Akao, H., Yi, Y.

Tsujimoto, M. Naoi:

Role of mitochondria in cell death
of Parkinson's disease.

32th Meeting of Society for
Neuroscience

November 4, 2002, Orland, USA
(poster)

Neuroscience program Monday 84

M. Naoi, W. Maruyama, Y. Akao, H.

Yi, M.B.H. Youdim:

Neuroprotection by rasagiline and
related compounds.

32th Meeting of Society for
Neuroscience

November 4, 2002, Orland, USA
(oral)

Neuroscience program Monday 54

W. Maruyama, M.B.H. Youdim, M.

Naoi:

Molecular mechanism underlying
neuroprotective function of type B
monoamine oxidase inhibitor
analogues

10th International Amine Oxidase
Workshop

August 28 2002 Istanbul, Turkey
(poster)

Book of Abstract 58

W. Maruyama, M. Naoi:

Modified protein by oxidative
stress in Parkinson's disease.

Interdisciplinary approaches for
the understanding of
neuropsychiatric disorders.

April 28 2002 Passau, Germany
(oral)

Book of Abstract 50

W. Maruyama:

Cell death in Parkinson's disease

10th International Symposium of
Therapy for Parkinson's Disease

October 27, 2001 Tokyo, Japan
(symposium)

丸山和佳子、永井雅代、西谷弘美、
小塚真弓、加藤陽二、磯部健一、大
澤俊彦、直井信：パーキンソン病の
神経変性におけるミトコンドリアの
役割

第 75 回日本生化学会 2002 10/16
京都

生化学 74: 937, 2002

永井雅代、西谷弘美、小塚真弓、磯部健一、大澤俊彦、田中雅嗣、直井信、丸山和佳子：ミトコンドリア不全によるパーキンソン病の細胞死モデル

第 75 回日本生化学会 2002 10/16
京都

生化学 74: 811, 2002

丸山和佳子、社本雅代、田中雅嗣、直井信：Role of oxidized protein in neuronal cell death of Parkinson's disease

第 45 回日本神経化学会 札幌 7/17、18

神経化学 41: 354

直井信、丸山和佳子、赤尾幸博、辻本 賀 英：Mechanism of neuroprotection by propargylamine

第 45 回日本神経化学会 札幌 7/17、18

神経化学 41: 354

丸山和佳子、直井信：パーキンソン病の神経細胞死におけるミトコンドリアの役割

第 43 回日本神経学会 2002 5/29
札幌

日本神経学総会 プログラム 抄録集 68

直井信、丸山和佳子：神経変性疾患に対する新たな神経保護薬の開発

第 43 回日本神経学会 2002 5/30
札幌

日本神経学総会 プログラム 抄録集 207

丸山和佳子：神経細胞の老化と個体老化

第 25 回日本基礎老化学会 東西競演若手企画シンポジウム 2002 5/18
筑波

基礎老化研究 26: 36

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

1. 実用新案登録

なし

1. その他

特記なし

厚生労働科学研究費補助金（効果的医療技術の確立推進臨床研究事業）
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に関する研究

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。今年度、このモデルをさらに支持する結果として、(1) Bcl-2 アンタゴニストの中に、VDAC を介して機能するものを見出し、さらに(2) Bcl-2 の BH4 ドメインが VDAC 抑制活性を有し、膜透過性を付与した PTD (tat)-BH4 ペプチドは細胞死抑制機能を発揮することを見出した。さらに、PT の分子メカニズムの解明と細胞死における役割を解明するために、PT の構成成分であり、その制御分子と考えられている cyclophilin D のターゲッティングを行い、ヘテロマウス系統を得た。

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、神経細胞死の分子機構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）と病理的な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死を有効に阻止することが予想される。

この申請研究の目的は、特にミトコンドリア PT pore あるいはその構成成分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、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

(1) Bcl-2 アンタゴニスト tetrocarcin A の機能ターゲットの同定

Bcl-2 アンタゴニスト tetrocarcin A の作用機序を明らかにするために、単離ミトコンドリア系および VDAC リポソーム系を利用し、tetrocarcin A の Bcl-xL に対する効果を検討した。ミトコンドリアはラット肝より調整したものをを用い、VDAC はラット肝ミトコンドリアよりカラムクロマトグラフィにより精製したものをを用いた。Bcl-xL は E. coli で作成精製したリコンビナントたんぱくを用いた。ミトコンドリアに対する効果を判定するために、シトクロム c 漏出および膜電位喪失を利用した。VDAC リポソームにおいて、VDAC の活性は ¹⁴C-sucrose のリポソームへの取り込みにより測定した。

(2) Bcl-2/Bcl-xL の BH4 ドメインの解析

抗アポトーシス機能を有した Bcl-2 ファミリーメンバー (Bcl-2/Bcl-xL) の BH4 ドメインの機能を解析するために、それぞれの BH4 ドメイン領域に対応するオリゴペプチドを

合成した。また、BH4 ドメインペプチドに膜透過性を付与するために、N 末側に 9 つのアミノ酸残基 (HIV の tat たんぱく由来の protein-transduction ドメイン) を追加したものを (tat-BH4) を合成した。

(3) cyclophilin D 遺伝子のターゲッティング

マウス cyclophilin 遺伝子を欠失させるようなターゲッティングベクターを作成し、常法に従い ES 細胞株に導入した。得られた G418 耐性株の中から cyclophilin D のターゲッティングに成功した ES 細胞株数株を PCR 法により同定し、さらにホモロガスリコンビネーションをサザン法により確認した。この ES 株をマウス胚盤胞に移植し仮親に戻し個体とした。得られたキメラマウスを BL6 マウスと交配し、変異 cyclophilin 遺伝子 (m) をジャームライントランスミッションする系統を選択した。マウス個体のレベルでの cyclophilin 遺伝子型は PCR 法により確認した。

動物を用いる実験は、全て大阪大学医学部の動物実験安全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得ない、また特定遺伝子の生体内での機能解析のためにジーンターゲット法を利用できるのはマウスに限られている)、(2) 苦痛を回避する手段を講じている(肝摘出は過剰麻酔による安楽死ののちに行う)。

B. 研究結果

(1) Bcl-2 アンタゴニストとして知られている tetrocarcin A の標的は VDAC である。

tetrocarcin A は Actinomycetes 由来の 2 次代謝物であり、Bcl-2 や Bcl-xL のアンタゴニストとして知られていたが、その作用機序は不明であった。我々は、tetrocarcin A の標的分子を絞り込む目的で、tetrocarcin A が単離ミトコンドリア系においても Bcl-2 や Bcl-xL のアンタゴニストとして機能するかどうかを検討した。ラット肝由来のミトコンドリアを Ca^{2+} 処理を行うとシトクロム c の漏出と膜電位の低下がおこり、この両現象をリコンビナント Bcl-xL たんぱくは効率良く抑制した。この条件下で、tetrocarcin A は Bcl-xL の抑制活性をキャンセルし、tetrocarcin A が単離ミトコンドリア系においても Bcl-xL のアンタゴニストとして機能

することが判明した。そこで、Bcl-2/Bcl-xL をダイレクトにターゲットする可能性と Bcl-2/Bcl-xL の機能ターゲットを標的としている 2 つの可能性を検討することとした。まず Bcl-2/Bcl-xL やその機能ターゲット VDAC への直接結合を見ることを検討したが、tetrocarcin A を標識する簡便な方法がなかったため、機能的な検討に頼らざるを得ず、Bcl-xL の VDAC 抑制機能への効果を検討できる VDAC-リポソーム法を用いた。VDAC の活性は、14C-sucrose のリポソーム内への取り込みにより測定した。Bcl-xL は VDAC 活性を抑制したが、tetrocarcin A はこの Bcl-xL 活性をキャンセルした。このことは、VDAC と Bcl-xL の 2 種類のたんぱくしか含まない系においても、tetrocarcin A が Bcl-xL のアンタゴニストとして機能すること示しており、tetrocarcin A は Bcl-xL か VDAC のいずれかを機能ターゲットとしていることが示唆された。次に、VDAC の活性を Bcl-xL の代わりにポリアニオンを用いたところ、tetrocarcin A はポリアニオンによる VDAC 活性抑制もキャンセルし、tetrocarcin A の機能ターゲットは Bcl-xL ではなく VDAC であることが強く示唆された。

(2) Bcl-2/Bcl-xL の BH4 ドメイ

ンによる細胞死抑制

Bcl-2/Bcl-xL は VDAC 抑制を通して、アポトーシスを抑制することを報告してきたが、Bcl-2/Bcl-xL の VDAC 抑制のための必須領域の同定を行ったところ、BH4 ドメインがこの活性に必要かつ十分であることが判明し、BH4 ドメインペプチドそのものに細胞死抑制機能があることが示唆された。膜透過性を付与するために BH4 ペプチドの N 末に protein-transduction ドメイン (9 アミノ酸残基) を追加した tat-BH4 ペプチドを合成しその活性を検討した結果、tat-BH4 ペプチドは培養細胞に加えるだけで、アポトーシスを有意に抑制しうる事が明らかになった。そこで、細胞死抑制薬剤のモデルになる可能性を念頭に、マウス、ラット動物モデルにおいて tat-BH4 ペプチドが細胞死抑制機能を発揮しうるか否かを検討した。用いたモデルシステムは、X 線照射による小腸上皮細胞のアポトーシス、抗 Fas 抗体の投与により起こる劇症肝炎および心筋梗塞モデル (摘出心臓を用いた系) である。腹腔投与した tat-BH4 ペプチドは、X 線照射による小腸上皮細胞のアポトーシスを非常に効率よく抑制し、抗 Fas 抗体の投与により起こる劇症肝炎はそのオンセットを遅延させ、一部の動物におい

てはその発症を阻止した。また、摘出ラット心臓を用いた心筋梗塞モデルにおいても、tat-BH4 ペプチドは、虚血・再酸素化後の心機能を正常レベルに近い程度にまで回復させた。一方、BH4 領域に変異を有した tat-BH4 ペプチドや tat ペプチドにはこのような活性は見出されなかった。これらの結果は、BH4 ドメインに細胞死抑制活性があることを意味し、細胞死の過剰やミトコンドリア脱機能による疾患の治療薬として応用できる可能性を示唆している。

(3) cyclophilin D ターゲッティングマウスの作成

マウス cyclophilin 遺伝子を欠失させ機能喪失型のアレルを導入するターゲッティングベクターを作成し、ホモロガスリコンビネーションにより変異 cyclophilin 遺伝子アレルを有した ES 数クローンを得た。ホモロガスリコンビネーションは PCR 法およびサザン法により確認した。この ES 株をマウス胚盤胞に移植し仮親に戻した後、キメラマウスを得、BL6 マウスと交配し、変異 cyclophilin 遺伝子 (m) をジャームライントランスミッションする系統 (+/m ヘテロマウス) を得た。+/m ヘテロマウスは正常に生まれ、現時点では異常は観察されない。現在、m/m マウスを作成

中である。

B. 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。このモデル検証の一環として、Bcl-2 アンタゴニスト tetrocarcin A の解析を行い、tetrocarcin A は、VDAC を介して Bcl-2/Bcl-xL の機能を抑制する活性を持つことを示した。この結果は、Bcl-2/Bcl-xL が VDAC 抑制を介してアポトーシスを抑制しているという我々のモデルを支持するものであり、VDAC が細胞死抑制薬剤の開発のための有用な標的分子であることを示している。

また、VDAC 抑制という観点から Bcl-2/Bcl-xL の機能解析を行った結果、BH4 ドメインがその機能を担っていることが判明し、またこのペプチドのみで細胞死抑制活性を発揮しうることを明らかにした。細胞膜透過性（脳血管関門透過性）を有した tat-BH4 ペプチドが、神経細胞死による変性疾患などの治療のためのモデル薬剤になりうる可能性を示唆した。

ミトコンドリア膜透過性亢進現象（mitochondrial permeability transition: MPT）を制御する cyclophilin D 遺伝子に変異を持つグマウス系統は、MPT の分子メカニズム、その制御機構および MPT の細胞死における役割などの解析に極めて有用なものと考えられる。

E. 結論

Bcl-2 ファミリーたんぱくの主な機能場所はミトコンドリアで、その機能ターゲットは膜上のチャンネル VDAC である。さらに VDAC はネクローシスに深く関わるミトコンドリア膜透過性亢進現象（mitochondrial permeability transition）にも必須の分子であり、細胞死制御破綻による疾患の治療のための有用な標的分子である。Bcl-2/Bcl-xL の VDAC 抑制活性は、BH4 ドメインに依存しており、このペプチドのみで培養細胞系および動物（マウス、ラット）系において細胞死を抑制することができる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sugiyama, T., Shimizu, S.,

- Matsuoka Y, Yoneda, Y. and Tsujimoto, Y. Activation of mitochondrial voltage-dependent anion channel by a pro-apoptotic BH3-only protein Bim. *Oncogene*, 21: 4944-4956 (2002)
2. Akao, Y., Maruyama, W., Shimizu, S., Yi H., Nakagawa, Y., Shamoto-Nagai, M., Youdim, M. B. H., Tsujimoto, Y. and Naoi, M. Mitochondrial permeability transition mediates apoptosis induced by N-methyl(R)salsolinol, an endogenous neurotoxin, and is inhibited by Bcl-2 and rasagiline, N-propargyl-1(R)-aminoindan. *J. Neurochem.* 82: 913-923 (2002)
3. Lee, M. Y., Kim, S. Y., Shin, S. L., Choi, Y. S., Lee, J. H., Tsujimoto, Y., Lee, J. H., Reactive astrocytes express bis, a bcl-2-binding protein, after transient forebrain ischemia. *Exp. Neurol.* 175: 338-346 (2002)
4. Nomura, M., Shimizu, S., Sugiyama, T., Narita, M., Ito, T., Matsuda, H. & Tsujimoto, Y. 14-3-3 interacts directly with and negatively regulates pro-apoptotic Bax. *J. Biol. Chem.* 278: 2058-2065 (2003)
1. 学会発表
(外国学会)
1. Tsujimoto, Y. Bcl-2 family of proteins: Regulation of the mitochondrial channel AACR Special Conference "Apoptosis and Cancer" 2/13~2/17, 2002 Hawaii, USA
2. Tsujimoto, Y. The Bcl-2 family of proteins: Life-or-death switch. Korean Cancer Association. Symposium 6/20, 2002 Seoul, Korea
3. Tsujimoto, Y. Regulation of Cell death by Bcl-2 family of proteins 17th Workshop on France-Japan Cooperative Cancer Reserch

Program) 「From Cell Cycle to
Cancer Therapy」
10/14~10/19, 2002
Montpellier, France

4. Tsujimoto, Y.

The Bcl-2 family of proteins: Life-
or-death switch. Korean
Association of Medical
Biochemistry and Molecular
Biology. Plenary lecture

10/25, 2002

Seoul, Korea

(国内学会)

1. 辻本 賀英

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

COE 国際シンポジウム (精神神経セ
ンター)

平成14年3月5日

東京

2. 辻本 賀英

Molecular basis of apoptosis: Bcl-2
family proteins as a life-or-death
switch

神経化学会年会 特別講演

平成14年7月18日

札幌

3. 辻本 賀英

Bcl-2 ファミリーによる細胞死制御

日本癌学会総会 レクチャー

平成14年10月3日

横浜

4. 鶴田 文憲、砂山 潤、善岡 克
次、清水 重臣、辻本 賀英、増山 典
久、後藤 由季子

JNK による BAX のミトコンドリア
移行メカニズム

日本分子生物学会年会

平成14年12月12日

横浜

5. 柳田寛太、恵口 豊、辻本 賀英
Semi-intact 細胞を用いたアポトー
シスブレッキングを誘導する因子の
検索

日本分子生物学会年会

平成14年12月14日

横浜

6. 新沢康英、辻本賀英

Caspase非依存的細胞死の解析

日本分子生物学会年会

平成14年12月14日

横浜

7. 中尾 齊仙、恵口 豊、児玉 高
志、辻本 賀英

アポトーシス促進因子 Bax の構造変化の解
析

日本分子生物学会年会

平成14年12月14日

横浜