

8. 青戸 守、佐原 節子、野崎 正
美、伊川 正人、岡部 勝、辻本賀
英

Acinus 欠損マウスの解析

日本分子生物学会年会

平成14年12月14日

横浜

H.知的財産権の出願・登録状況

特になし

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

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。

本年度においては特に神経細胞の保護作用に加えて cholinesterase を阻害してアセチルコリンの脳内濃度を増加させる事を目的として新たに合成された carbamyl 基を cyclic benzene 構造にもつ Rasagiline 誘導体、TV3326 を用い Rasagiline と比較して神経保護活性を検討した。

1) 神経細胞の保護に必要な propargylamine の化学構造を検討した。aminoindan の基本構造を持つ化合物で、propargyl 基の有無、その光学特異性、cyclic benzene 核に水酸基、carbamyl 基で修飾したもの等を用い比較検討した。神経細胞の保護作用をミトコンドリア膜における透過性亢進の抑制と、Bcl-2 等の抗アポトーシス活性を有するタンパクと遺伝子の誘導能、さらに最終的な細胞死に対する保護活性の3点から検討した。

2) Rasagiline が Bcl-2 と Bcl-xL 等の抗アポトーシスタンパク、Glia cell line-derived nutrition factor 等の神経栄養因子、catalase と SOD などの抗酸化酵素を誘導したことから、Rasagiline による遺伝子誘導を約 3000 種の DNA の変化を定量出来る DNA array 法を用い検討した。Rasagiline を添加培養したヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞から経時的に mRNA を分離精製して DNA array で分析した。

A. 研究目的

神経変性疾患において酸化ストレス、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ニューロンに細胞死が惹起される。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存在する共通のアポトーシス機構の活性化によることから、この機構を神経細胞の保護剤の標的とすることを提唱されている[5, 12, Naoi and Maruyama Parkinson. Rel. Dis. 8 (2001) 139-145]。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が一連の propargylamine 誘導体にあることを発見した [2, 3, 5, 6]。その一つ (-)deprenyl (selegiline, FK) 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 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 によるアポトーシスはミトコンドリア膜透過性の亢進による膜電位の低下、cytochrome C の細胞質への流出、caspase の活性化、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)の核内移行、核 DNA の断裂と濃縮と段階的に進行する。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ードが活性化することを止めることを証明した。構造が類似する Propargylamine 誘導体において (-)deprenyl 以外に rasagiline (cyclic benzylamine), N-(2-heptyl)-N-methylpro-pargylamine (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とから Rasagiline を用いアポトーシスシグナルに介入し細

胞死を阻止する機序の研究を進めた。本研究においては抗アポトーシス活性に必要な化学構造を明らかとし、さらに強力な薬剤の開発を目的とする。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 活性を阻害する carbamate 基を持つ薬剤 TV3326 において、細胞保護活性を検討する。さらに神経細胞に存在する細胞死を制御する Bcl-2, 栄養因子を誘導することで広く神経細胞一般に保護活性を持つ薬剤を開発するために、Rasagiline による遺伝子誘導とその機序を詳細に検討する。これらの結果からアルツハイマー病に対して現在行われている神経伝達物質アセチルコリンの補充療法に加え、神経細胞の細胞死を予防または修復する原因療法を確立することを本研究の最終の目的とする。

B. 研究方法

Propargylamine 誘導体の抗アポトーシス活性に対する構造相関の検討を行った。抗アポトーシス活性はミトコンドリア膜の PTP を安定化する直接作用と、Bcl-2 等の抗アポトーシス活性をもつタンパクを発現誘導する間接作用、さらに細胞死に対する保護活性と比較検討した。神経細胞死のモデルとして SH-SY5Y 細胞に NMRSal によりアポトーシスを誘発させ用いた。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)、他の propargylamine (イスラ

エル TEVA 社から提供) を用いた。

ミトコンドリア膜電位($\Delta\Psi_m$)の変化を MitoTracker Orange, MitoTracker Green を用い Fluorescence-activated cell sorter (FACS) 法と Rhodamine 123 による蛍光法により定量した。細胞死は 蛍光色素 propidium iodide (PI) と YO-PRO を用い FACS によりアポトーシスとネクローシスに分類して定量した

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。BDNF の定量は ELISA によった。

SH-SY5Y 細胞を Rasagiline と反応後、mRNA を mRNA purification kit [Poly(A) Pure, Ambion, Austin, Tex, USA] を用い分離精製し、DNA array (IntelliGene, Takara, Otsu, Japan) にて解析した。

C. 研究結果

1) ミトコンドリア膜透過性の亢進 (Permeability transition, PT) の阻止能に必要な構造の検討:

SH-SY5Y 細胞に NMRSal により惹起した PT にたいし propargyl 基の有無、疎水部 (cyclic benzene) の構造にカルバミル基、水酸基等を持つものを検討した。TV3326 は Rasagiline と同様の膜安定能をしめした。Aminoindan と TV3281 (Propargyl 基にメチル基を持

つ) は膜安定活性を持たず、PT の阻止には Propargyl 基が必修であることが証明された。Rasagiline では R 型が S 型より遥かに活性が高かった。疎水部 cyclic benzene の修飾はこの活性にはあまり影響しなかった。(-)deprenyl 誘導体では活性は (-)Desmethpdeprenyl > (R)deprenyl > (S)deprenyl の順で (S) 体は殆ど活性が認められなかった。

NMRSal によるアポトーシスにたいする保護活性にと化学構造の関連を検討した。細胞死を抑制する活性は PT 阻止能と略同様であり、今回の実験条件下の細胞死に対してはミトコンドリア膜の安定が主なる機序であることが示された。

2) Propargylamine による細胞内の anti-apoptotic, pro-survival protein family の誘導に必要な構造の検討:

Rasagiline は bcl-2, bcl-xl 等の anti-apoptotic gene の mRNA とタンパクレベルを増加する。Rasagiline は 100-10 μ M, 100-10 nM の濃度で bcl-2 の mRNA とタンパクレベルを有為に増加した。一連の Rasagiline 誘導体で検討したところ、propargyl を持たない aminoindan, carbamyl 基を benzene 核に持つ TV-3326 (R-型), TV-3279 (S-型) でも 10-1 μ M の濃度において Bcl-2 タンパクを増加させた。

3) Rasagiline による遺伝子誘導の検討:

SH-SY5Y 細胞に 100 nM の

Rasagiline を添加し、6, 12, 24 時間後、mRNA を分離し、DNA array で分析した。図 2 に主なる変化をまとめた。24 時間の反応により、Bcl-2 family, Transcription factors, Cytokines が著明に増加した。また cell cycle に関与する遺伝子、cell division cycle 10 (3.07 倍), cyclin A2 (2.85), cyclin C (2.78), cell division cycle 27 (2.57), caspase 群、caspase 7 (2.60), caspase 3 (2.58), caspase 1 (2.28), apoptotic protease activating factor (2.12), caspase 10 (2.08), 酸化ストレスと関与する nitric oxide synthase 2A (inducible) (2.28) グルタチオン合成酵素の遺伝子が有為に増加した。

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し、その機序には膜透過性に対する直接的な作用と、抗アポトーシス活性を持つ Bcl-2, GDNF 等の誘導を介する間接的な作用があることを証明した。構造活性相関の検討により、膜の安定性には propargyl 基が関与し、Bcl-2 の誘導には aminoindan 構造が必要であった。さらに cholinesterase 阻害活性を持つ TV3326 が Rasagiline と同様この 2 の活性を持つことが証明された。この結果は TV3326 がアセチルコリンレベルを維持すると共に、神経細胞を保護し脱落を阻止する可能性を示唆している。TV3326 は欧米において既にアルツハイ

マー病での臨床研究が進められている。

Rasagiline により細胞の生死に関与する遺伝子が著明に誘導された。丸山の結果を合わせ考察すると、Rasagiline は kinase 系の活性化により、NF- κ B の活性化と核内移行により、細胞の生存に働く遺伝子の転写を促進し、Bcl-2, Nutrition factor, SOD 等のタンパクの増加により、細胞死から神経細胞を保護するのであろう。

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機能を持つ遺伝子を活性化する経口投与可能な薬剤の細胞内機序を明らかにした。現在技術的、倫理的に実現が困難な遺伝子、神経栄養因子等の脳内導入によらなくとも、神経細胞の生存に関与する遺伝子の活性化が神経変性疾患の原因治療として期待される。今後動物モデルでの検討とともに、臨床サンプルでこれら細胞保護活性物質の測定を目指したい。

E. 結論

神経保護活性を持つ propargylamine 誘導体がその構造により、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し細胞死を阻止することを明らかにした。Cholinesterase 阻害基をもつ、TV3326 でこれら 2 の活性が認められたことから、TV3326 によるアルツハイマー病に対する効果が期待される。さらに構造活性相関の検討から、より有効な薬剤の開発と神経細胞内における生存への情報伝達系の解明を目指したい。

After 6 hours

Mitochondria related enzymes	
Cytochrome c oxidase VIc	1.83*
Cytochrome c oxidase VIIc	1.78
NADH-coenzyme Q reductase	1.78
Cytochrome c oxidase VIIa	1.73
ATP synthase, isoform 3	1.72
Cytochrome c oxidase VIII	1.71
ATP synthase, isoform 2	1.64
Onithine decarboxylase	1.64
Aconitase	1.62

Ubiquitine-proteasome system	
Proreosome subunit, b type 3	1.70
Ubiquitin fusion degradation 1-like	1.66
Proreosome subunit, b type 1	1.60
Proreosome subunit, b type 7	1.59
Proreosome subunit, b type 5	1.59

Bcl-2 family	
Bcl-2	1.56

* relative amount of DNA compared to control, correlated with house-keeping genes

12 hours

Mitochondria related enzymes	
ATP synthase, subunit b, isoform 1	1.76
Cytochrome c oxidase VIIc	1.73
ATP binding protein	1.63

Ubiquitine-proteasome system	
Ubiquitin-conjugating enzyme E2N	1.75
Ubiquitin fusion degradation 1-like	1.65
Proreosome subunit, b type 3	1.62
Proreosome subunit, b type 1	1.50

Transcription factor	
Mitochondrial transcription factor A	1.66
Transcription elongation factor B	1.51

24 hours' incubation

Bcl-2 related proteins	
Apoptosis inhibitor 1	5.00
Bcl-2 related myeloid cell leukemia sequence	3.39
Apoptosis inhibitor 2	3.15
BCL-2 like	2.71
Neuronal apoptosis inhibitory protein	2.49

Kinases	
PTK protein tyrosine kinase 2	4.31
Mitogen-activated protein kinase 6	4.06
MAP kinase kinase 6	2.73
TNFRSF-interacting Ser/Threo kinase 1	2.72
Neurotrophic tyrosine kinase, receptor 2	2.72
Cyclin-dependent tyrosine kinase 5 (p35)	2.23
Neurotrophic tyrosine kinase, receptor 2	2.12

TNF and receptors	
LPS-induced TNF-alpha factor	3.21
TNF receptor superfamily, # 6	2.86
TNF, alpha-inducing protein	2.71
TNF receptor-associated factor 5	2.40
TNF receptor superfamily, # 10	2.34
TNF receptor-associated factor 6	2.24

NF-kB	
	2.13

Transcription factors	
Transcription factor Dp-1	3.34
TRAF-associated NF-kB activator	2.80
Transcription factor Dp-2	2.38

図 1. Rasagiline により誘導された遺伝子の変化を DNA array により解析した。数値は対照との比率で house keeping gene により補正した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Maruyama W, Weinstock M, Youdim MBH, Nagai M, Naoi M. (2003) Anti-apoptotic action of anti-Alzheimer drug, TV3326 [(N-propargyl)-(3R)-aminoindan-5-yl]-ethyl methyl carbamate, a novel cholinesterase-monoamine oxidase inhibitor. *Neurosci. Lett.*, in press.
- 1) Naoi M, Maruyama W, Nagy GM (2003) Dopamine-derived salsolinol derivatives as endogenous monoamine oxidase inhibitors: Occurrence, metabolism and function in human brains. *NeuroToxicol.*, in press.
- 1) Naoi M, Maruyama W, Youdim MBH, Yu P, Boulton AA (2003) Anti-apoptotic function of propargylamine inhibitors of type-B - monoamine oxidase. *Inflammo-pharmacol.*, in press
- 1) Naoi M, Maruyama W., Akao Y., Yi H. (2002) Dopamine-derived endogenous N-methyl(R)salsolinol. Its role in Parkinson's disease. *Neurotoxicol. Teratol.*, 24: 579-591
- 1) 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.* 109: 607-621
- 1) Maruyama W., Takahashi T., Youdim M., Naoi M. (2002) The anti-parkinson drug, rasagiline, prevents apoptotic DNA damage induced by peroxyneurotoxin in human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J. Neural Transm.* 109: 467-481
- 1) 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.*, 82: 913-923

- 1) 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.*, 326: 105-108
- 1) 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-hydroxydopamine in human dopaminergic SH-SY5Y cells. *Neurosci. Lett.* 321: 29-32
- 1) Tanaka M, Borgeld H-J, Zhang J, Matumoto S, Gong J-S, Yoneda M, Maruyama W, Naoi M, Ibi T, Sahashi K, Nishizawa K, Akao Y, Ohishi N, Miyabayashi S, Umemoto H, Muramatsu T, Furukawa K, Kiuchi A, Nakano I, Ozawa K, Yagi K. (2002) Gene therapy for mitochondrial disease by delivering restriction endonuclease SMA1 into mitochondrial. *J. Biomed. Sci.* 9: 534-541
- 1) 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
- 1) Maruyama W, Naoi M. (2002) Cell death in Parkinson's disease. *Journal of Neurology* 249 [Supplement 2]: II/6-10
- 1) Maruyama W, Akao Y, Carrillo MC, Kitani K, Youdim MBH, Naoi M. (2002) Neuroprotection by propargylamines in Parkinson's disease: Suppression of apoptosis and induction of pro-survival genes. *Neurotoxicol. Teratol.* 24: 675-682
- 1) Naoi M, Maruyama W. (2002) Models of Parkinson's disease. In *Catecholamine Research*. Eds. Nagatsu T, et al., Kluwer Academic/Plenum Publishers, pp. 479-482

- 1) Maruyama W, Boulton AA, Youdim MBH, Naoi M. (2002) Anti-apoptotic function of propargylamines. In Catecholamine Research. Eds. Nagatsu T, et al., Kluwer Academic/Plenum Publishers, pp. 241-244
- 1) Maruyama W, Yamada T, Washimi Y, Kachi T, Yanagisawa N, Ando F, Shimokata H, Naoi M. (2002) Neutral (*R*)salsolinol *N*-methyltransferase as a pathogenic factor of Parkinson's disease. In: Mapping the Progress of Alzheimer's and Parkinson's Diseases, Eds. Mizuno Y. et al., Kluwer Academic/Plenum Publishers, pp. 277-280.
- 1) 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
- 1) 丸山和佳子、直井信 (2002) 老化に伴うドパミン神経の選択的細胞死の機序、特集：加齢の克服 - 21世紀の課題- 生体の科学 53: 421-424
- 1) 丸山和佳子、直井信、赤尾幸博 (2002) 弧発性パーキンソン病のドパミン神経細胞死におけるミトコンドリアの役割、Progress in Medicine 22: 2915-2917
- 1) 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.
- 1) 丸山和佳子、直井信 (2002) パーキンソン病の原因とは何か、ケアスタッフと患者、家族のためのパーキンソン病。疾患理解と障害克服の指針、真野行生編集、医歯薬出版 89-95
1. 学会発表
- 1) Naoi M., Maruyama W. "Modified protein by oxidative stress in Parkinson's disease". IAN: Interdisciplinary approaches for the understanding of neuropsychiatric disorders, April 28-31, 2002, Passau, Germany, pp, 50.
- 1) Naoi M., Maruyama W. "Metabolism and pharmacology of amine-derived endogenous MAO-inhibitors" 10th International Amine Oxidase Workshop, August 25-29, 2002, Istanbul, Turkey, pp. 28.
- 1) Maruyama W., Youdim MBH, Naoi M. "Molecular mechanism underlying

- neuroprotection of type B monoamine oxidase inhibitor analogues” 10th International Amine Oxidase Workshop, August 25-29, 2002, Istanbul, Turkey, pp. 58.
- 1) Naoi M., Maruyama W., Akao Y., Yi H., Youdim MBH “Neuroprotection by rasagiline and related compounds” November 2-7, 2002, 32nd Annual Meeting of Society for Neuroscience, Orlando, USA, pp. 54.
 - 1) Maruyama W., Akao Y., Yi H., Tsujimoto Y., Naoi M. “Role of mitochondria in cell death of Parkinson’s disease” November 2-7, 2002, 32nd Annual Meeting of Society for Neuroscience, Orlando, USA, pp. 84.
 - 1) 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 日本神経学会総会、平成 14 年 5 月 29 -31 日、札幌
 - 1) 丸山和佳子、直井信、 「パーキンソン病における神経細胞死におけるミトコンドリアの役割」第 43 回 日本神経学会総会、平成 14 年 5 月 29 - 31 日、札幌
 - 1) Naoi M., Maruyama W. Akao Y., Yi H., Tsujimoto Y. “Mechanism of neuroprotection by propargyl-amines” 第 45 回 日本神経化学会、平成 14 年 7 月 17-19 日、札幌、pp. 354.
 - 1) Maruyama W. Shamoto-Nagai M., Tanak M., Naoi M. “Role of oxidative protein in neuronal cell death in Parkinson’s disease” 第 45 回 日本神経化学会、平成 14 年 7 月 17-19 日、札幌、pp. 353
 - 1) 社本（永井）雅代、西谷弘美、小塚真弓、磯辺健一、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 回日本生化学会大会、平成 14 年 10 月 14-17 日、京都、pp. 811.
 - 1) 丸山和佳子、永井雅代、西谷弘美、小塚真弓、加藤陽一、磯辺健一、大澤俊彦、直井信、 「パーキンソン病の細胞死におけるミトコンドリアの役割」 第 75 回日本生化学会大会、平成 14 年 10 月 14-17 日、京都、pp. 937.
 - 1) 伊紅、丸山和佳子、赤尾幸博、辻本賀英、直井信、 「Propargylamine 誘導体による抗アポトーシス活性の機序」第 75 回日本生化学会大会、平成 14 年 10 月 14-17 日、京都、pp. 937
 - 1) 丸山和佳子、直井信、赤尾幸博 「弧発性パーキンソン病のドパ

ミン神経細胞死におけるミトコ
ンドリアの役割」第10回カテコ
ールアミンと神経疾患研究会、
平成14年4月20日、東京、pp.
5.

1. 実用新案登録
なし
1. その他

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし

Propargylamine化合物の神経保護作用におけるTNF family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神経免疫 教授

研究要旨 アミロイドβ蛋白(Aβ)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、培養神経細胞に Aβを投与すると細胞死が引き起こされる。その細胞死は、アポトーシスによるという報告があるが、その機序については、oxidative stress、peroxynitrite、Fas Ligand の誘導など諸説がある。また、老人斑には活性化されたミクログリアが認められるが、ミクログリアが Aβによって活性化され、TNF、IL-1 等のサイトカイン、NO などを産生し、神経細胞に障害を引き起こす可能性が考えられている。前回、Transwell を用いた系で活性化ミクログリアの neuro2a 細胞におよぼす効果を検討したが、TNF 等のサイトカインの効果は明らかではなかった。今回、神経細胞死の標的細胞として primary neuron を用いて再度、検討を行うとともに、ミクログリアを介さないサイトカインまたは Aβによる神経細胞死の in vitro の実験モデルの作成を試みた。

A. 研究目的

アルツハイマー病における神経細胞死には、蓄積した Aβにより活性化されたミクログリアによる液性因子による神経細胞傷害が関与する可能性が示唆されている。rasagiline による神経保護作用が、これら液性因子に対しても有効であるか否か、初代培養神経細胞を用いて検討した。

B. 研究方法

- 1) 活性化ミクログリアのサイトカイン、NO 産生に対するフォスホジエステラーゼ阻害剤(Ibudilast)、Rasagiline の効果について検討した。
- 2) マウス一次混合グリア細胞からミクログ

リアを分離し、マウス胎生 17 日の大脳皮質より神経細胞を培養した。Transwell の上層にミクログリアを、下層に神経細胞をまき、LPS、IFN-γによってミクログリアを活性化し、神経細胞死が誘導されるかを検討した。さらに Rasagiline の神経細胞死に対する効果を検討した。

- 2) 培養神経細胞に直接 LPS+IFN-γ、Aβ+IFN-γ を加え、神経細胞死が誘導されるかを検討し、それに対する Rasagiline の効果を検討した。

C. 研究結果

- 1) Ibudilast (100 μM) は、活性化ミクログリアの TNF-α、IL-1β、IL-6、NO

産生を抑制したが、Rasagiline にはこれらの作用は認められなかった (図 1,2)。

1) Transwell を用いた実験において活性化ミクログリアは、神経細胞死を誘導し、Ibudilast はこの細胞死を抑制した。しかしながら Rasagiline には、神経細胞死の

抑制効果は認められなかった。(図 3.)

1) 培養神経細胞に直接 LPS+IFN- γ 、 $A\beta$ +IFN- γ を加えることによって神経細胞死が誘導された。この細胞死に対して、Rasagiline は抑制効果を示した。(図 4.)

図 1.

活性化ミクログリアに対するIbudilast, Rasagilineの効果

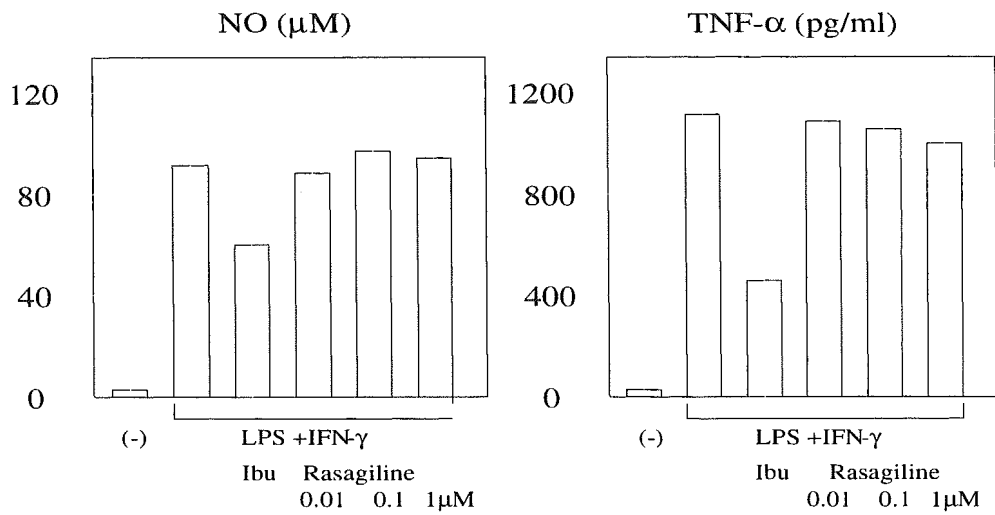


図 2.

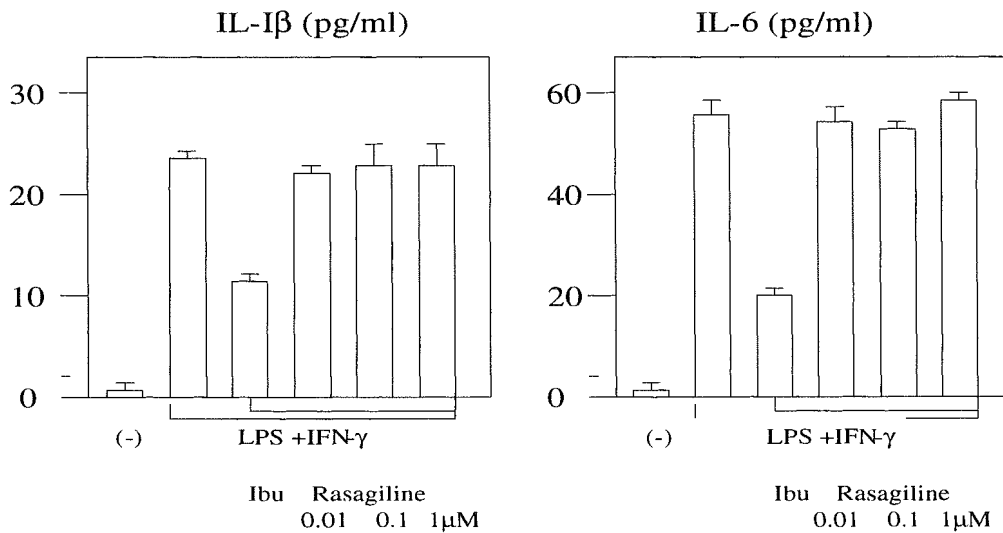


図 3.

活性化ミクログリアによる神経細胞死に対するIbudilast
Rasagilineの効果

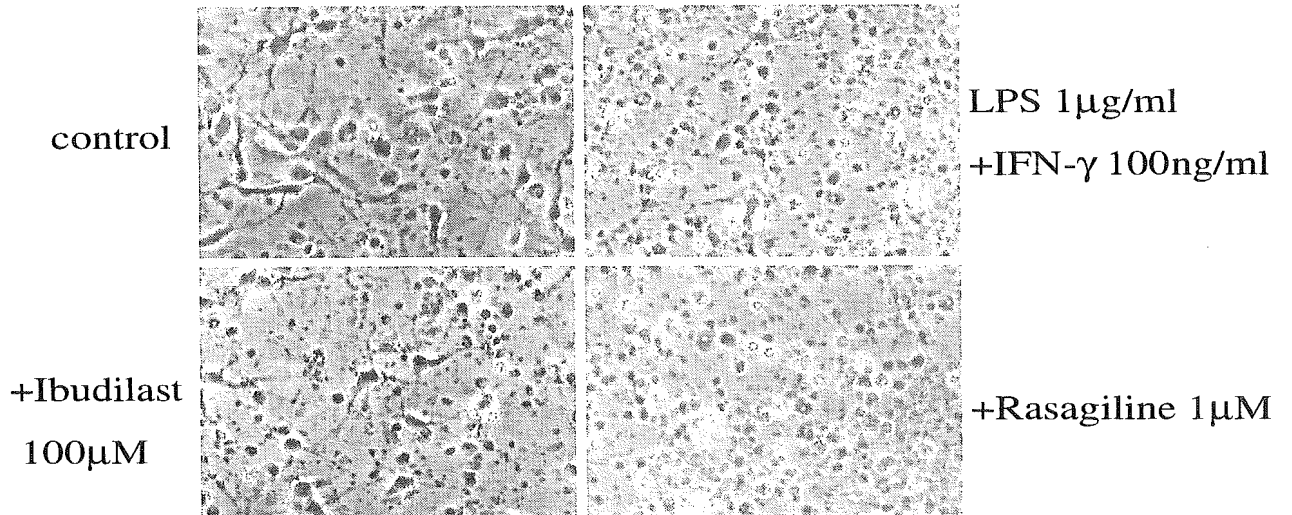
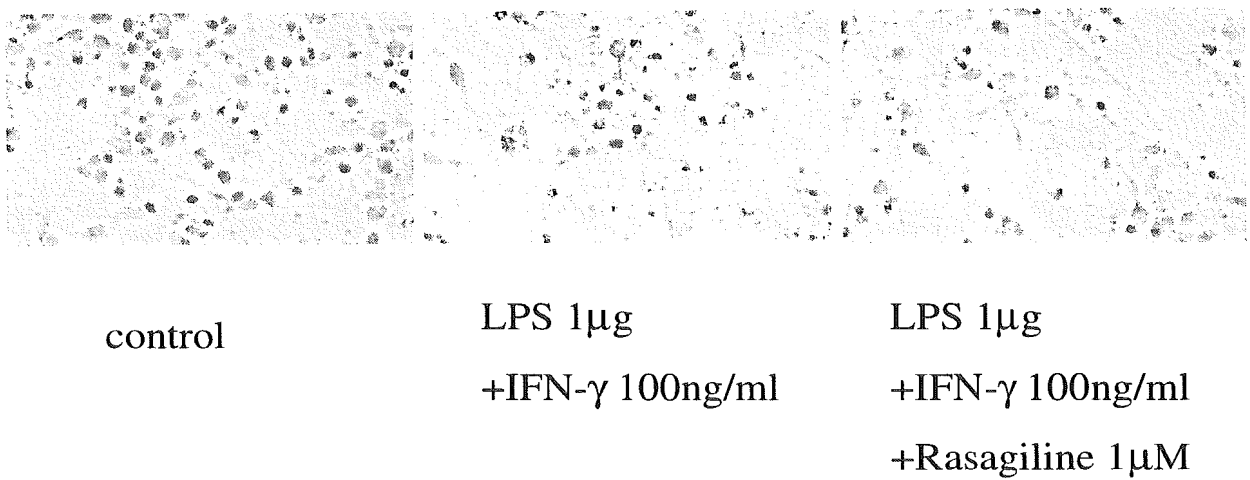


図 4.

LPS + IFN-γ による神経細胞死の誘導および
Rasagilineの効果



D. 考察

今回の検討で、活性化ミクログリアが神経細胞死を引き起こすことが確かめられた。フォスホジエステラーゼ阻害剤は、活性化ミクログリアのTNF- α 、IL-1 β 、IL-6、NO産生を抑制することによって、神経細胞死を抑制することができるが、Rasagilineにはその作用がないため、活性化ミクログリアによる神経細胞死に対しては抑制効果は認められなかった。しかしながら、今回、直接培養神経細胞にLPS+IFN- γ 、A β +IFN- γ を加えることによっても神経細胞死が誘導されることが確かめられ、Rasagilineがその抑制に効果があることが明らかになった。今回の我々の実験系はトランスウェルの上にエフェクター細胞、下に標的細胞をおき、それぞれの変化を見るものであり、薬剤の効果の解析に有効であると考えられる。今後、この系を用い、神経細胞死抑制のメカニズムについて検討する。

E. 結論

rasagilineはA β によるミクログリアの活性化には影響を及ぼさないが、ミクログリアから放出される液性因子による神経細胞死のカスケードを抑制し、神経細胞を防御する可能性がある。

F. 研究危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

錫村明生、神経免疫学、黒川清、松澤

佑次(編)、内科学教科書(第2版)、文光堂、東京、2003 印刷中

Suzumura,A., Microglia; immunoregulatory cells in the central nervous system. Nagoya J. Med. Sci. 65:9-20, 2002.

Fu, Q, Iwase,S, Niimi, Y., Kamiya,A., Michikami, D., Mano, T. and Suzumura, A., Age-related changes in vasomotor reflex control of calf venous capacitance response to lower body negative pressure in humans. Jpn J Phys 52: 69-76, 2002.

Fu, Q, Iwase,S, Niimi, Y., Kamiya,A., Michikami, D., Mano, T. and Suzumura, A., Age-related influence of leg vein filling and emptying on blood volume redistribution and sympathetic reflex during lower body negative pressure in humans. Jpn J Phys 52: 77-84, 2002.

Yoshikawa,M., Suzumura,A., Ito,A., Tamaru,T. and Takayanagi,T. Effects of phosphodiesterase inhibitors on nitric oxide production by glial cells. Tohoku J. Exp. Med. 196:167-177, 2002.

Sugie,K., Futamura,N. Suzumura,A., Tate,G. and Umehara,F., Hereditary motor and sensory neuropathy with minifascicle formation in a patient with 46XY pure gonadal dysgenesis: A new clinical entity. Ann Neurol., 51: 385-388,

2002.

Iwase, S., Mano,T., Kamiya,A., Qi,F., Suzumura, A., Syncopal attack alters the burst properties of muscle sympathetic nerve activity in humans. *Auton Neurosci.* 95:141-5, 2002.

錫村明生、多発性硬化症の治療への展望—in vitroからin vivoへ—、*神経免疫学*、10:213-219、2002

錫村明生、Hopkins症候群の免疫学的機序、*神経内科*、56:41-44, 200

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

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：
神経細胞死の分子メカニズムの解明

分担研究者 赤尾 幸博 （財）岐阜県国際バイオ研究所 部長

研究要旨 アルツハイマー病の病態モデルとして神経細胞にアミロイド前駆蛋白 (APP) を過剰発現させ、細胞外に放出される β -amyloid ($A\beta$) の細胞への影響を検討した。ドパミン作動性のヒト神経芽細胞株 SH-SY5Y に APP 2-3 倍量を過剰発現させた。APP 過剰発現株はコントロールに比べ細胞増殖がやや抑制され、形態学的には神経突起の方向性が失われていた。さらにプロテアゾーム活性、ATP 産生は低下し、anti-apoptotic な bcl-2 蛋白の発現が著明に低下していた。酸化ストレス（過酸化水素、NO）処理により APP 過剰発現株ではプロテアゾーム活性は急速に低下し、活性酸素種の増大がみられアポトーシスが容易に誘導された。プロテアゾーム活性阻害剤の前処理では酸化ストレスによるアポトーシスは相乗的に増多した。コントロール細胞との共発現系により $A\beta$ の影響をみたが形態学のおよび細胞死については変化がみられなかった。以上のことから、アミロイド前駆蛋白の過剰発現とミトコンドリアの機能、プロテアゾーム活性との関連性が示され、細胞死にどのように関わっているか興味深い。

A. 研究目的

老人性痴呆は年々増加しその患者数は平成12年、120万人に達しており、その予防および治療法の開発は急務である。アルツハイマー病は老人性痴呆の主要な原因である。その病理学的特徴所見は神経細胞の変性、シナプス喪失、神経原繊維変性、老人班であり、これらの病態は β -amyloid ($A\beta$) の生成、Tau のリン酸化と深く関連していることが報告されている。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（神経細胞の脱落）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数多く得られた。このような背景から本研究は、アルツハイマー病の病態モデルとして β -amyloid ($A\beta$)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 SH-SY5Y 細胞を用い、 $A\beta$ 蛋白又はアミロイド前駆蛋白の過剰発現系の構築を試みた。発現ベクターとして pIRESneo を用いた。このベクターは一本の mRNA で目的とする遺伝子と選択マーカーとなる遺伝子を発現することから高率に目的遺伝子を発する細胞株が得られる。リポフェクションにより SH-SY5Y 細胞に遺伝子導入を

行い G418 ($700 \mu\text{g/ml}$) にて選択した。APP 過剰発現の確認をウェスタンブロットにて行った。細胞外 $A\beta$ の定量は ELISA によった。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。APP 過剰発現細胞について過酸化水素、SIN-1 (NO 遊離物質) の酸化ストレスによる細胞死を検討。さらにプロテアゾーム活性阻害剤 I, Peripheral Benzodiazepin Receptor (PBR) リガンド (PK11195) による細胞死についても比較検討した。細胞内活性酸素量測定は、DCF 蛍光量を FACS により測定した。プロテアゾーム活性、ATP 産生量についても検討した。

C. 研究結果

pIRESneo 発現ベクターに APPcDNA を挿入し SH-SY5Y 細

胞にリポフェクションにより導入した。G418にて選択し、限界希釈により2つのクローンを単離した。RT-PCR、ウエスタンブロットにより、導入したAPP遺伝子による過剰発現が確認された。さらに細胞外培養液中に $A\beta(1-40)$ がAPP過剰発現細胞で332.30pg/ml(control 11.86 pg/ml)検出された。APP過剰発現細胞はベクターDNAを挿入したコントロール群に比べ

- 1) 細胞増殖が約70%程に抑制されていた。
- 2) 形態的には、細胞突起の連結に方向性が欠如していた。レチノイン酸による分化誘導に際しては突起の伸長が充分でないところが観察された。
- 3) 過酸化水素 H_2O_2 (100 μ M、12h)の処理では感受性が高くFACS、ヘキスト3342染色いずれにおいてもコントロールに比べ約2倍のアポトーシス細胞が観察された。その傾向はDNAラダー形成でも一致していた。
- 4) SIN-1 (NO発生)処理においても過酸化水素処理と同様の結果であった。
- 5) プロテアゾーム活性阻害剤I (PSI)による細胞死では2 μ Mまでは明かにアポトーシス細

胞は多く観察された。

- 6) H_2O_2 にPSIを付加した系では、PSI 1 μ Mに H_2O_2 50 μ Mを付加した場合、APP過剰発現細胞ではアポトーシス細胞がより増多していた (PSI 1 μ M + H_2O_2 50 μ M / PSI 1 μ M アポトーシス細胞比はコントロール細胞で1.7、APP過剰発現細胞で2.6であった)。つまり、PSIにより H_2O_2 による細胞死が相乗的に増加したことが示された。
- 7) プロテアゾーム活性はAPP過剰発現細胞で有意に高く、 H_2O_2 負荷により低下していく。(コントロールでは不変)
- 8) APP過剰発現細胞では、ATP産生、ROS産生が低下していた。 H_2O_2 負荷によりROSが徐々に増大した。
- 9) APP過剰発現細胞ではbcl-2の発現が著明に低下していた。

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) SH-SY5Y細胞にAPPを安定して過剰発現させた細胞株を確立できた。
- 2) APP過剰発現細胞では酸化ストレス (H_2O_2 、NO)、プロテアゾーム活性阻害剤による細胞死が

増多した。

3)処理前の APP 過剰発現細胞ではプロテアゾーム活性は高く ATP 産生、ROS 産生は低下しているものの、H₂O₂ 負荷により容易にプロテアゾーム活性は低下し、ROS は増大した。ATP 産生は低下する傾向があった。

以上より、APP 過剰発現により、細胞内 APP がプロテアゾーム活性を相対的に増大させているのか、細胞外に出た A β (1-40) の影響なのか、さらにプロセスされた N 末の APP 断片のペプチドによるのか検討を加える必要がある。又、細胞膜に十分にプロセスされずに構造変化を受けた A β 、C 末の APP 断片のペプチドが沈着されている可能性も考えられる。さらに APP 代謝が、プロテアゾーム活性に影響を与えていることが明らかになり、今後プロテアゾーム活性がミトコンドリア機能および活性酸素種増大とどのように関連し細胞死に誘導するか解明する必要がある。

E. 結論

SH-SY5Y 細胞にアミロイド前駆蛋白を過剰発現させると各種の酸化ストレスに対しアポトーシス誘導へのポテンシャルが増大した。

さらに活性酸素種の生成、ATP 産生はコントロールと比べ低下しており、プロテアゾーム活性は高かった。このような細胞死の分子機構は神経細胞の変性を考える上で興味深く、その解明は神経細胞保護薬の開発に寄与できると考えられる。

F. 研究危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Tanaka M, Borgeld H. J, Zang J, Muramatsu S, Gong J.S, Yoneda M, Maruyama W, Naoi M, Ibi T, Sahashi K, Shamoto M, Fuku N, Kurata M, Yamada Y, Nishizawa K, Akao Y, Ohishi N, Miyabayashi S, Umemoto H, Muramatsu T, Furukawa K, Kikuchi A, Nakano I, Ozawa K, and Yagi K. Gene therapy for mitochondrial disease by delivering restriction endonuclease SmaI into mitochondria. *J Biomed Sci* 9(6), 534-541 (2002).

(2) Akao Y, Maruyama W, Shimizu S, Yi H, Nakagawa Y, Shamoto-Nagai M, Youdim M. B, Tsujimoto