

平成 15 年度 厚生労働科学研究費補助金
長寿科学総合研究事業
総括・分担研究報告書

大脳基底核部ドパミン神経系の
維持・再生に関する研究

2004 ・ 3

主任研究者 小 川 紀 雄

(岡山大学大学院医歯学総合研究科教授)

平成 15 年度 厚生労働科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業 研究報告書

研究課題名：大脳基底核部ドパミン神経系の再生・維持に関する研究

主任研究者：小川 紀雄（岡山大学大学院医歯学総合研究科 教授）

研究組織：

小川紀雄 岡山大学大学院医歯学総合研究科 神経情報学分野 教授

田中健一 就実大学薬学部医療薬学科 薬物治療学研究室 助教授

岩井一宏 大阪市立大学大学院医学研究科 分子制御分野 教授

目 次

<総括研究報告書>

「大脳基底核部ドパミン神経系の維持・再生に関する研究」

小川 紀雄 （岡山大学大学院医歯学総合研究科 神経情報学分野） ... 5

<分担研究報告書>

「ドパミン神経のアポトーシスに関与する p53 関連遺伝子 PAG608 の細胞内動態と中枢神経系での発現動態」

小川 紀雄 （岡山大学大学院医歯学総合研究科 神経情報学分野） ... 13

「非免疫抑制性イムノフィリンリガンドのドパミン神経毒に対する神経保護作用とその分子機序に関する研究」

田中 健一 （就実大学薬学部医療薬学科 薬物治療学研究室） ... 21

「酸化ストレス障害時のユビキチン系の解析に関する研究」

岩井 一宏 （大阪市立大学大学院医学研究科 分子制御分野） ... 27

<研究成果の刊行に関する一覧表>

平成 15 年度 研究成果の刊行に関する一覧表 ... 33

総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
総括研究報告書

大脳基底核部ドーパミン神経系の維持・再生に関する研究

主任研究者 小川 紀雄

岡山大学大学院医歯学総合研究科脳神経制御学講座神経情報学 教授

研究要旨

ドーパミン関連酸化ストレスによって大脳基底核部に特異的に発現誘導される分子として同定した p53 関連分子 PAG608 について、細胞内動態と機構、中枢神経系での発現動態を明らかにするために、カテコールアミン産生神経細胞や L-DOPA 投与パーキンソン病モデルを用いた検討を行った。その結果、p53 の発現を誘導しミトコンドリア障害を惹起する PAG608 は、酸化ストレスによるドーパミン神経のアポトーシス発現過程に共通して関与していること、第一ジンクフィンガードメインを介して核や核小体に局在しており、その核内移行が酸化ストレスによるアポトーシス誘導過程に必要であることを明らかにできた。また、パーキンソン病モデルの大脳基底核部において L-DOPA 投与により特異的に PAG608 が誘導されることを確認できた。次に、神経保護修復薬として注目されているイムノフィリンリガンド(IPLs)の神経保護作用とその分子機序解明を行い、FK506、非免疫抑制性 GPI1046 と V10367 は過酸化水素による細胞生存率の低下とアポトーシスを有意に抑制すること、その主な作用機序として細胞内グルタチオン(GSH)濃度の増加作用に加え、神経栄養因子の活性化作用によることを明らかにした。また、GSH 増加作用と神経栄養因子の活性化作用を指標にして既存の IPLs よりも強力な神経保護作用を有する非免疫抑制性 IPLs 候補物質の探索したところ、有望な候補物質を数種類見出し出した。酸化蛋白質を選択的に識別し、除去するユビキチン系の解明は治療を考える上で重要といえる。ヘムと酸素により酸化される鉄代謝の制御因子 IRP2 を選択的に識別するユビキチンリガーゼとして同定した HOIL-1 リガーゼの酸化蛋白質の分解における役割を解析すべく、HOIL-1 結合蛋白質の解析を行い、HOIL-1 ノックアウト細胞を作成した。HOIL-1 は未知の RING finger 蛋白質と結合すること、蛋白質凝集を抑制する可能性を明らかにした。

分担研究者

田中健一 就実大学薬学部医療薬学科
薬物治療学研究室 助教授

岩井一宏 大阪市立大学大学院医学研究科
分子制御分野 教授

A. 研究目的

高齢人口の急速な増加にともなって「寝たきり」状態の発生機序の解明と予防が強く求められている。ヒトが独立して動作・歩行で

きるということは想像以上に精緻なメカニズムに支えられており、なかでも大脳基底核部のドパミン神経系はこの巧妙な協調運動の調節機構の中核をなしている。これらの背景から、生理的老化ならびに神経毒などの病的傷害の共通の機序と考えられる酸化ストレスによって大脳基底核部に特異的に発現誘導される遺伝子およびその遺伝子産物（以下、新規分子）を探索・同定し、酸化ストレスによって障害されたタンパク質の処理機構を解明する。次に、その新規分子によるドパミン神経細胞傷害機序への関与を、遺伝子改変細胞ならびにモデル動物を用いて解析し、遺伝子レベルから丸ごとの個体レベルまで総合的に検討することで、「寝たきり」老人の発生の予防に役立つ。本年度は、ドパミン関連酸化ストレスによって大脳基底核部に特異的に発現誘導される分子として同定した p53 関連分子 PAG608 について、その細胞内動態と機構、中枢神経系での発現動態を詳細に明らかにするために、カテコールアミン産生神経細胞や L-DOPA 投与パーキンソン病モデルを用いた検討を行った。また、神経保護修復薬として注目されている 4 種類のイムノフィリンリガンド(IPLs)の神経保護作用とその分子機序解明を行い、 α -シヌクレインに対するこれらの IPLs の神経保護作用を検討した。さらに、既存の IPLs よりも強力な神経保護作用を有する非免疫抑制性 IPLs 候補物質の探索を試みた。酸化された鉄代謝の制御因子 IRP2 を選択的に識別するユビキチンリガーゼとして同定した HOIL-1 の酸化蛋白質の分解における役割を解析すべく、HOIL-1 結合蛋白質の解析を行い、HOIL-1 ノックアウト細胞を作成し、その機能について検討した。

B. 研究方法

1. DA 神経における p53 関連分子 PAG608 の細胞内動態と機構に関する研究

ラット脳組織から RT-PCR 法により

PAG608 cDNA を増幅し、His 標識(His-)野生型PAG608発現ベクター、GFP標識(GFP-)野生型 PAG608 発現ベクター、C 末端あるいは N 末端を欠失させた His-変異型 PAG608 発現ベクター (Δ C582, Δ C741, Δ N207, Δ N522)を作成した。His-変異型 PAG608 発現ベクターを GFP 発現ベクターを共にリポフェクション法で PC12 細胞に導入し、導入 24 時間後から 100 μ M 6-OHDA を 24 時間暴露して GFP 陽性細胞数を蛍光顕微鏡で解析した。さらに、GFP-野生型 PAG608 発現ベクターを His-野生型、変異型 PAG608 発現ベクターと共に PC12 細胞に遺伝子導入し、24 時間後に Hoechst 33342 で核染色した。

PAG608 アンチセンス cDNA 高発現 PC12 細胞株ならびに対照細胞株を樹立し、メタンフェタミン(METH) (250 μ M-5 mM)を 24 時間暴露し、細胞生存率を測定した。また、ドパミン系神経細胞株 B65 に、PAG608 のアンチセンスオリゴヌクレオチドを導入し、METH (500 μ M)暴露後に核染色を行った。

2. PAG608 の中枢神経系での発現動態に関する検討

雄性 Sprague-Dawley ラットの片側黒質線条体路に 6-OHDA (8 μ g)を投与し作製した片側パーキンソン病モデルに L-DOPA/carbidopa (100/10 mg/kg, i.p.)投与を行い、16 時間後に灌流固定し、脳矢状断凍結切片を用い、PAG608 の免疫染色を行った。

3. 酸化ストレスおよび α -シヌクレインによる細胞死に対する IPLs の細胞保護作用に関する検討

ヒト U251 細胞株を用いて、4 種類の IPLs (免疫抑制性 FK506, rapamycin, 非免疫抑制性 GPI1046, V10367)の過酸化水素の細胞毒性に対する細胞保護作用およびその分子機序について、(1)細胞生存率, (2) Hechst33342 核染色, (3)アポトーシス関連分子 bcl-2, bax および p53 mRNA の発現量, (4) caspase-3, caspase-8 および caspase-9 活性測定, (5)

細胞内 GSH 濃度, (6)神経栄養因子活性 GDNF および BDNF 濃度をそれぞれ測定・評価することで検討した。

α -シヌクレイン過剰発現 SH-SY5Y 細胞株と対照細胞株に, 4種類の IPLs を 96 時間添加し, 細胞生存率を測定した。

4. IPLs と同様の神経保護作用を有する非免疫抑制性 IPLs 候補物質の探索

候補物質としては FK506 結合蛋白質 (FKBP)における IPLs との結合部位のアミノ酸配列を参考に構造類似体であるジペプチドを選択した。選択したジペプチド(0.01-10 μ M)をそれぞれ SH-SY5Y 細胞に添加し, 24 時間後に細胞内 GSH 濃度と培養上清中の GDNF あるいは BDNF 遊離量を測定した。既存の IPLs である FK506, GPI1046, V10367, rapamycin についてもそれぞれ検討した。

5. 酸化蛋白質を選択的に識別する HOIL-1 結合蛋白質の検索と解析

大腸菌を用いて HOIL-1 の C 末領域 (アミノ酸番号 405~468) と GST との融合蛋白質を作成し, BALB/c マウスに免疫し, 抗 HOIL-1 モノクローナル抗体を得た。HeLa S3 細胞の S100 ライセートを mono Q カラム, Superdex200 カラムで分画し, HOIL-1 含有分画は抗 HOIL-1 モノクローナル抗体によるウエスタンブロットで確認した。HOIL-1 含有分画をウサギ抗 HOIL-1 抗体で免疫沈降し, SDS-PAGE に泳動した。蛋白質のバンドをゲルから切り出し, ペプチドマスフィンガープリント法にて蛋白質を同定した。

6. HOIL-1 ノックアウト細胞の作成

細胞レベルで HOIL-1 リガーゼの機能を解析するために, 高等真核細胞で高頻度に遺伝子組換えを生じる細胞株であるニワトリ DT40 細胞を用いて, HOIL-1 ノックアウト細胞の作成を行った。ニワトリ HOIL-1 cDNA の同定を RT-PCR 法にて, ニワトリ HOIL-1 遺伝子断片の単離を LA-PCR 法で行った。また, ノックアウト作成用のトランス

フェクションはエレクトロポレーション法で行った。ノックアウト細胞の確認はサザンブロット, ノーザンブロットおよび抗 HOIL-1 抗体を用いたウエスタンブロットで行った。

C. 研究結果

1. DA 神経における p53 関連分子 PAG608 の細胞内動態と機構

空ベクターを導入した GFP 陽性 PC12 細胞数は 6-OHDA 添加により減少したが, N 末端の第一ジンクフィンガードメインを欠失させた His- Δ N522 発現ベクターを導入した GFP 陽性細胞では 6-OHDA による細胞数の減少が抑制されていた。しかし, 他のジンクフィンガードメインを欠失させた Δ N207, Δ C582, Δ C741 の遺伝子導入では 6-OHDA による細胞死に影響はなかった。

Δ N522 以外の His-変異型 PAG608 発現ベクターまたは空ベクターを導入した PC12 細胞では, GFP-野生型 PAG608 のシグナルが核と核小体に集積していた。一方, His- Δ N522 を導入した PC12 細胞では, GFP のシグナルがび慢性に細胞全体に認められ, PAG608 の核への局在が阻害されていた。

METH (1-5 mM) 添加により対照 PC12 細胞の細胞生存率は有意に減少するのに対し, PAG608 アンチセンス cDNA 高発現 PC12 細胞では METH による細胞生存率の減少がほぼ完全に抑制された。また, PAG608 アンチセンスオリゴヌクレオチドを導入した B65 細胞では, METH (500 μ M) 添加による神経細胞死ならびに核クロマチンの凝縮, 核の分葉化・断片化, 細胞質の濃縮といったアポトーシス様形態変化も抑制された。

2. PAG608 の中枢神経系での発現動態

脳組織切片を用いた PAG608 の免疫染色の結果, 橋核, 三叉神経運動核, 顔面神経運動核において PAG608 陽性細胞が認められた。また, 大脳皮質と線条体においても各群で点状の陽性シグナルが認められた。さらに, L-

DOPAを投与されたパーキンソン病モデルの傷害側の内包において著明なPAG608陽性シグナルの誘導がみられた。

3. 酸化ストレスおよび α -シヌクレインによる細胞死に対するIPLsの細胞保護作用

U251細胞にFK506, GPI1046, V10367を予め24時間添加することで、過酸化水素(2mM)による細胞生存率の低下ならびにアポトーシス様形態変化は有意に抑制された。過酸化水素によるcaspase-3, -8および-9の活性亢進は、FK506でのみ抑制された。過酸化水素によるbax mRNA発現の増加は、FK506, GPI1046, V10367の3つのIPLsにより、p53 mRNA発現増加はFK506とV10367により有意に抑制された。rapamycin以外の3つのIPLsは抗アポトーシス作用を有するものの、その力価はFK506 > V10367 > GPI1046の順であった。一方、rapamycin以外の3つのIPLsは細胞内GSH濃度と培養液中の神経栄養因子濃度を増加させた。

α -シヌクレイン過剰発現SH-SY5Y細胞は対照細胞に比べて、細胞生存率が有意に低下していた。4種類のいずれのIPLsも α -シヌクレイン神経毒性に対する有意な神経保護作用を示さなかった。

4. IPLsと同様の神経保護作用を有する非免疫抑制性IPLs候補物質の探索

新規の非免疫抑制性IPLsの候補物質としてFKBPにおけるIPLsとの結合部位のアミノ酸配列を参考に構造類似体であるジペプチドを作製し、SH-SY5Y細胞に添加し、IPLsの神経保護作用に重要なGSH増加作用とGDNF, BDNF遊離量活性化作用を検討した。Leu-ProはGDNF, BDNF遊離量を溶媒に比べて約2倍に増加させた。これは既存IPLsで最も強力なFK506の1.3-1.4倍よりも強い作用であった。Leu-Pro, Ile-Pro, Val-Proの比較により、N末側の側鎖の炭素数と分岐の位置が神経栄養因子活性化作用に関連することが判明した。一方、N末側がLeuでC

末側を変えた5種類のジペプチドでは、BDNFとGDNFで遊離量が異なり構造相関はみられなかった。Leu-Proは細胞内GSH濃度を溶媒に比べて1.4倍程度増加させたが、これはFK506とほぼ同程度であり、Leu-Val, Leu-Met, Met-Proも同様の力価を示した。

5. 酸化蛋白質を選択的に識別するHOIL-1結合蛋白質の検索と解析

ゲル濾過したHeLa S3細胞のS100ライゼートのウエスタンブロットでは、HOIL-1は分子量600kD程度の分画に存在した。HOIL-1の分子量は52kDであることから、複合体を形成していると考えられた。そこで、HOIL-1と複合体を形成する分子を同定するために、S100ライゼートからアフィニティー精製したHOIL-1含有画分を抗HOIL-1抗体で免疫沈降し、電気泳動により複数のバンドを検出した。主なバンドを切り出し、ペプチドマスフィンガープリント法により、未知のRING finger蛋白質を同定した。その未知のRING finger蛋白質とHOIL-1を強制発現させたところ、HOIL-1は600kDの分画に存在したことから、両者はヘテロ多量体を形成することが判った。

6. HOIL-1ノックアウト細胞の作成

DT40細胞はニワトリ由来であるため、ニワトリESTデータベースの中のヒトHOIL-1と相同性を有するcDNA断片の塩基配列をもとに、完全長のニワトリHOIL-1をクローニングした。ニワトリHOIL-1は695アミノ酸で、ヒトHOIL-1に特徴的なRING Finger等のドメインはよく保存されており、N末領域がヒトより約200アミノ酸長い構造であった。樹立した抗ヒトHOIL-1抗体を用いたウエスタンブロットではDT40細胞ライゼート中に約75kDのバンドが検出された。ニワトリHOIL-1 cDNAをトランスフェクトした細胞にも同じサイズのバンドが検出された。

次に同定されたHOIL-1 cDNA塩基配列をもとにHOIL-1遺伝子断片を単離し、定法に

従いノックアウトコンストラクトを作成した。DT40 細胞は 3 つの HOIL-1 遺伝子座を有していたので、異なる薬剤耐性遺伝子を挿入した 3 種類のノックアウトコンストラクトを順々にトランスフェクトし、スクリーニングすることにより、HOIL-1 ノックアウト細胞を作成し、ウェスタンブロットで HOIL-1 が発現していないことを確認した。現在、HOIL-1 ノックアウト細胞を用いて、HOIL-1 リガーゼの機能を検索中である。

D. 考察

昨年度までに、ドパミン関連酸化ストレスによって大脳基底核部に特異的に発現誘導される遺伝子として同定した p53 によって発現誘導される PAG608 は、酸化ストレスによるドパミン神経細胞のアポトーシスにおいて、ミトコンドリア障害より上流の過程で、逆に p53 ならびに Bax の発現を誘導し、ミトコンドリアの膜電位の低下を惹起している可能性を明らかにした。今年度はドパミン神経細胞死における PAG608 の細胞内動態とその機構について検討し、PAG608 が核と核小体に集積し分布していること、PAG608 が第一ジンクフィンガードメインを介して結合することで核や核小体に移行するという細胞内動態、さらに、この核内移行が酸化ストレスによるアポトーシスの過程に必要という障害機構を明らかにできた。また、酸化ストレスが関与する METH によるドパミン神経細胞死についても、PAG608 の遺伝子発現抑制により阻止されたことから、PAG608 は L-DOPA や 6-OHDA によるドパミン細胞障害のみならず、酸化ストレスによるドパミン神経のアポトーシス発現過程に共通して関与していると考えられる。免疫染色による PAG608 の中枢神経系での発現動態の検討で、L-DOPA を投与されたパーキンソン病モデルの傷害側の内包において著明な PAG608 陽性シグナルの誘導がみられた。この結果は PAG608 が傷害

側線条体において L-DOPA で発現が誘導される遺伝子として同定されたという一昨年の結果と合致する。したがって、PAG608 はパーキンソン病モデルの大脳基底核部において L-DOPA により特異的に発現誘導される分子であることを確認できた。一方で、恒常的に橋核、三叉神経運動核、顔面神経運動核での PAG608 の強い発現がみられ、不随意運動などとの関連を示唆する所見として興味深い。

非免疫抑制性 IPLs の FK506 アナログ GPI1046 ならびに V10367 が、神経保護作用を有することを確認した。それらの神経保護作用の分子機序について、細胞内 GSH 濃度の増加作用を主に介した抗酸化作用と神経栄養因子 BDNF および GDNF の活性化による神経再生作用が関与していることをわれわれは明らかにした。また、神経保護作用および GSH 増加作用に関しては FK506 同様に FKBP12 に依存していないことを培養細胞レベルで見出した。特に、FK506 ならびに GPI1046 の GSH 増加作用は、神経細胞よりもアストロサイトなどのグリア細胞でより強く認められたことから、IPLs の脳における作用点は神経細胞よりもむしろグリア細胞であるのかもしれない。以上、IPLs の細胞保護作用には免疫抑制作用が必要ないこと、IPLs の作用機序には GSH 増加作用、神経栄養因子活性化作用に加え、抗アポトーシス作用が関与していることを明らかにした。免疫抑制薬の神経保護作用は以前から報告され、盛んに臨床応用が試みられているが、免疫抑制作用を持たない非免疫抑制性 IPLs の応用が望まれている。したがって、既存の非免疫抑制性 IPLs の神経保護作用が充分でない以上、より強力な新しい非免疫抑制性 IPLs の開発が待たれる。そこで、十分な神経保護作用の力価を有する非免疫抑制性 IPLs を開発するために、非免疫抑制性 IPLs の主要作用と考えられる GSH 増加作用、神経栄養因子活性化作用を指標に候補物質の探索を行い、作用と化学構

造に相関関係がある有望な候補物質を数種類見い出した。強い神経保護作用を示す新しい低分子非免疫抑制性 IPLs の開発をめざし、今後さらに研究を進めたい。

多くの蛋白質が酸化され、ダメージを受けることにより活性を消失し、分解されることが知られている。その分解はユビキチン-プロテアソーム系よると指摘されているが、その E3 は未同定である。酸化ストレス・ユビキチン修飾系は神経変性疾患の病因・病態形成に深く関与していることから、酸化変化を受けた蛋白質を選択的に識別し、ユビキチン化するユビキチンリガーゼの同定は急務である。われわれが昨年度の報告した HOIL-1 ユビキチンリガーゼはヘム依存的に酸化された IRP2 を選択的に識別するユビキチンリガーゼであることから、われわれは HOIL-1 の酸化変化を受けた蛋白質の分解における役割の解析を進めている。近年、RNAi 法を用いた遺伝子発現のノックダウンにより、遺伝子産物の機能解析を進めている例が数多く見られる。しかし、RNAi 法には完全に標的蛋白質が消失しない、あるいは未知の遺伝子の発現にも影響を与える可能性があるなどの問題点もあるので、本研究では HOIL-1 の機能解析が全く存在しないノックアウト法で HOIL-1 に機能解析を進めることを選択し、HOIL-1 ノックアウト細胞を樹立できた。予備的な段階ではあるが、HOIL-1 は蛋白質の凝集を抑制する可能性を示唆する結果を得ることができた。蛋白質凝集は神経変性疾患に特徴的な病理変化である。したがって、HOIL-1 の神経変性疾患への関与が強く示唆され、その検索が望まれることから、現在作成中の HOIL-1 ノックアウトマウスを用いて、その解析をさらに進めたい。

E. 結論

本年度の研究により、p53 によって発現誘導される PAG608 は酸化ストレスによるドパミン神経のアポトーシス発現過程に共通して関与していること、第一ジンクフィンガードメインを介して核や核小体に局在しており、その核内移行が酸化ストレスによるアポトーシス誘導過程に必要であることを明らかにできた。組織学的検討により、PAG608 はパーキンソン病モデルの脳基底核部において L-DOPA により特異的に発現誘導されていることを再確認した。また、IPLs の神経保護作用には免疫抑制作用ならびに FKBP12 は必要なく、GSH 増加作用、神経栄養因子の活性化作用ならびに抗アポトーシス作用が重要であることを明らかにした。さらに、GSH 増加作用と神経栄養因子の活性化作用を指標に、神経保護作用の力価が既存の非免疫抑制性 IPLs より強い候補物質の探索を行い、数種類の候補物質を得ることができた。これらの候補物質が根治的な治療薬を持たない多くの神経変性疾患患者への福音となることが期待できる。酸化蛋白質を選択的に識別するリガーゼとして昨年度同定した HOIL-1 の機能解析のために、HOIL-1 ノックアウト細胞を作成した。予備的な実験ではあるが、HOIL-1 は蛋白質凝集を抑制する可能性が示唆された。蛋白質凝集はパーキンソン病などの神経変性疾患に特徴的なものである。今後は HOIL-1 のそれら疾患における役割の解析を進めたい。

分担研究報告書

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

ドパミン神経のアポトーシスに關与する p53 關連遺伝子 PAG608 の
細胞内動態と中枢神経系での発現動態

主任研究者 小川 紀雄

岡山大学大学院医歯学総合研究科脳神経制御学講座神経情報学 教授

研究協力者：宮崎 育子，浅沼 幹人（岡山大学大学院医歯学総合研究科脳神経制御学講座神経情報学）

田中 健一（就実大学薬学部医療薬学科薬物治療学研究室）

研究要旨

ドパミン關連酸化ストレスによって大脳基底核部に特異的に発現誘導される遺伝子として，パーキンソン病モデルラットへの L-DOPA 投与により特異的に発現が誘導される p53 關連遺伝子 p53-activated gene 608 (PAG608) を同定し，ドパミン神経細胞のアポトーシスにおける作用機構を昨年度までに検討し，PAG608 が酸化ストレスによるドパミン神経のアポトーシスにおいて，ミトコンドリア障害より上流の過程で p53 の発現を誘導しうることを明らかにした。本年度は PAG608 の細胞内動態と機構，中枢神経系での発現動態について検討した。蛍光標識野生型 PAG608 発現ベクターのカテコールアミン産生細胞 PC12 への遺伝子導入では，PAG608 は核と核小体に集積し分布していた。第一ジンクフィンガードメインを欠失させた変異型 PAG608 は 6-hydroxydopamine (6-OHDA) によるアポトーシスならびに野生型 PAG608 の核への移行を阻止した。これらの結果より，酸化ストレスによるドパミン神経のアポトーシスにおいて p53 の発現を誘導しミトコンドリア障害を惹起する PAG608 は，第一ジンクフィンガードメインを介して核や核小体に局在しており，その核内移行が酸化ストレスによるアポトーシス誘導過程に必要であることを明らかにできた。また，L-DOPA や 6-OHDA と同様に酸化ストレスが關与するメタンフェタミンによるドパミン神経細胞死は，PAG608 アンチセンス cDNA の遺伝子導入による PAG608 の発現抑制により有意に阻止された。このことから，PAG608 は酸化ストレスによるドパミン神経のアポトーシス発現過程に共通して關与していると考えられる。さらに，組織学的な検討によりパーキンソン病モデルの大脳基底核部（内包）において L-DOPA 投与により特異的に PAG608 が誘導されることを確認できた。

A. 研究目的

生理的老化ならびに神経毒などの病的傷害の共通の機序と考えられる酸化ストレスによって大脳基底核部のドパミン神経系に特異的に発現誘導される遺伝子を同定し，その機能

解析を行い，ドパミン神経細胞の傷害過程における役割を明らかにするために，一昨年度までに片側パーキンソン病モデルラットにドパミン關連酸化ストレスとして L-DOPA を投与し，傷害側線条体において L-DOPA によ

り特異的に発現が誘導される mRNA を differential display 法で検索し, p53 関連遺伝子 p53-activated gene 608 (PAG608) を同定した. PAG608 は p53 によって発現が誘導される遺伝子であり, PAG608 遺伝子を細胞へ導入し過剰に発現させるとアポトーシスを惹起することが知られている.

パーキンソン病モデルの作製に繁用されている神経毒 6-hydroxydopamine (6-OHDA) はラット副腎褐色細胞腫由来のカテコールアミン産生神経様培養細胞株 PC12 においてアポトーシスを惹起することが知られており, このとき p53 などのアポトーシス誘導分子の発現が増加することも報告されている.

昨年度までに, ドパミン神経細胞死における PAG608 の関与について明らかにするために, PAG608 アンチセンス cDNA を遺伝子導入した PAG608 発現抑制 PC12 細胞を用いて, PAG608 発現抑制 PC12 細胞株では, 6-OHDA による細胞死がほぼ完全に抑制され, 6-OHDA 添加によって惹起されるカスパーゼ 3 の活性化や DNA の断片化, ミトコンドリア膜電位の低下, p53, Bax の発現誘導が著明に抑制されることを明らかにできた. また, PC12 細胞やカテコールアミン系 B65 細胞に PAG608 cDNA を導入すると p53 発現が増加したことから, PAG608 は逆に p53 発現を誘導しうることを明らかにした. これらの結果は, p53 によって発現誘導される PAG608 が, 酸化ストレスによるドパミン神経細胞のアポトーシスにおいて, ミトコンドリア障害より上流の過程で, 逆に p53 ならびに Bax の発現を誘導し, ミトコンドリアの膜電位の低下を惹起していることを示している.

本年度はドパミン神経細胞死における PAG608 の細胞内動態とその機構を詳細に明らかにするために, 酸化ストレスとして 6-OHDA を, カテコールアミン系神経細胞株として PC12 細胞を用いて, His 標識 (His-) 野生型 PAG608 発現ベクター, Green fluorescent protein 標識 (GFP-) 野生型

PAG608 発現ベクターならびに PAG608 の各ドメインを欠失した His-変異型 PAG608 発現ベクターによる遺伝子導入を行った.

また, L-DOPA, 6-OHDA と同様に酸化ストレスによりドパミン神経傷害を惹起する薬剤であるメタンフェタミン (METH) によるドパミン神経細胞死に対する PAG608 発現抑制の効果をみるために, PAG608 アンチセンス cDNA 高発現 PC12 細胞株ならびに PAG608 アンチセンスオリゴヌクレオチド導入ドパミン系神経細胞株 B65 に METH を添加し, 細胞毒性を評価した.

さらに, L-DOPA 刺激による PAG608 の中枢神経系での発現動態を明らかにするために, 片側パーキンソン病モデルラットに L-DOPA を投与し, 脳切片による PAG608 の免疫染色を行った.

B. 研究方法

1. PAG608 野生型, 変異型 cDNA 発現ベクターの作成

Sprague-Dawley 系ラット脳組織より total RNA を抽出し, PAG608 mRNA に特異的な primer を用いた RT-PCR 法により PAG608 cDNA を増幅した. これを用いて, His 標識 (His-) 野生型 PAG608 発現ベクター, GFP 標識 (GFP-) 野生型 PAG608 発現ベクターを作成した. さらに, His-変異型 PAG608 発現ベクター ($\Delta C582$, $\Delta C741$, $\Delta N207$, $\Delta N522$) も同様の方法で C 末端あるいは N 末端を欠失させた cDNA 断片を PCR で増幅し作成した. (図 1)

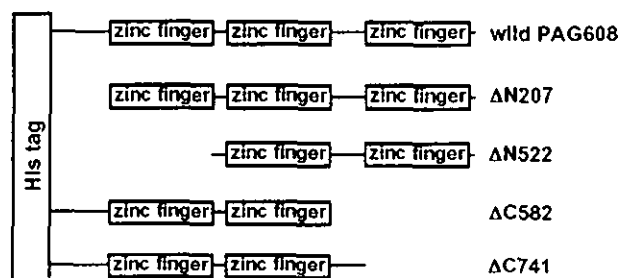


図 1 His-変異型 PAG608 発現ベクターの構築

2. 一過性遺伝子導入

PC12 細胞を 37℃, 5% CO₂ 下で RPMI1640 培養液に 10% 非動化ウマ血清, 5% ウシ胎児血清, 10 U/ml ペニシリン, 10 μg/ml ストレプトマイシンを添加し培養した。His-変異型 PAG608 発現ベクター (2 μg) を GFP 発現ベクター (1 μg) と共にリポフェクション法により遺伝子導入し, 導入 24 時間後から 100 μM 6-OHDA を 24 時間暴露して GFP 陽性細胞数を蛍光顕微鏡で解析した。

3. GFP-野生型 PAG608 の細胞内局在

GFP-野生型 PAG608 発現ベクター (1 μg) を His-野生型, 変異型 PAG608 発現ベクターまたは空ベクター (2 μg) と共にリポフェクション法によって PC12 細胞に遺伝子導入した。導入 24 時間後に細胞を 4% パラホルムアルデヒドで固定し, 10 μg/ml Hoechst 33342 で核染色した。GFP と Hoechst33342 の蛍光シグナルは蛍光顕微鏡で観察した。

4. PAG608 アンチセンス cDNA 高発現細胞株での METH による神経毒性

PAG608 アンチセンス cDNA 発現ベクターを作製した。10 μg PAG608 アンチセンス cDNA 発現 vector ならびに非挿入 vector をリン酸カルシウム法により PC12 細胞株に導入し, 細胞を継代し, 400 μg/ml geneticin を含む培養液でのスクリーニングを行い, geneticin 耐性の PAG608 アンチセンス cDNA 高発現細胞株 (PC12/PAG608AS) ならびに対照細胞株 (PC12/control) を得た。

PC12/PAG608AS ならびに PC12/control を, 96 穴プレートに播き 24 時間培養した後, METH (250 μM-5 mM) にさらに 24 時間暴露させ, 細胞生存率を MTT assay の変法である WST-1 assay により測定した。

5. PAG608 アンチセンスオリゴヌクレオチド導入神経細胞株における METH 神経毒性

ドパミン系神経細胞株 B65 に, PAG608 mRNA の翻訳開始点を含む PAG608 のセンスあるいはアンチセンスオリゴヌクレオチドをリポソームで導入し, 24 時間培養した後,

METH (500 μM) をさらに 2 時間暴露し, Hoechst33342 核染色を行い, アポトーシス様の形態学的変化を観察した。

6. L-DOPA 投与片側パーキンソン病モデル脳各部位での PAG608 発現

雄性 Sprague-Dawley ラットの片側黒質線条体路に 6-OHDA (8 μg) を投与し, 片側パーキンソン病モデルを作製した。6-OHDA 投与 4 週後に apomorphine (0.1 mg/kg, s.c.) 投与を行い, 非傷害側への回旋運動がみられるものを実験に供した。5 週後に L-DOPA/carbidopa (100/10 mg/kg, i.p.) 投与を行い, 16 時間後に灌流固定し, 脳矢状断凍結切片を得た。PAG608 の発現は抗 PAG608 抗体を用いた免疫染色により評価した。

C. 研究結果

1. 6-OHDA によるアポトーシスへの N 末端欠失変異型 PAG608 の影響

空ベクターを遺伝子導入した GFP 陽性 PC12 細胞数は 6-OHDA 添加によって減少したが, N 末端の第一ジンクフィンガードメインを欠失させた His-ΔN522 発現ベクターを導入した GFP 陽性細胞では 6-OHDA による細胞数の減少が抑制されていた (図 2)。さらに, 他のジンクフィンガードメインを欠失させた ΔN207, ΔC582, ΔC741 でも同様の実験を行ったが, 空ベクターを導入した場合と同様に 6-OHDA 添加により GFP 陽性細胞の数は減少しており, 細胞死には影響なかった。

2. PAG608 の核局在に対する N 末端欠失変異型 PAG608 の阻害効果

ΔN522 以外の His-変異型 PAG608 発現ベクターまたは空ベクターを導入した PC12 細胞では, GFP-野生型 PAG608 のシグナルが Hoechst33342 で染色された核と核小体に集積していた。一方, His-ΔN522 を導入した PC12 細胞では, GFP のシグナルが慢性に細胞全体に認められ, PAG608 の核への局在が阻害されていた (図 3)。

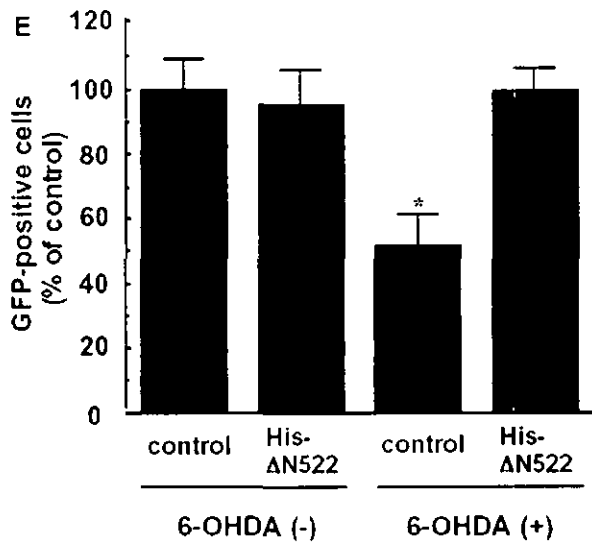


図2 His-変異型PAG608発現ベクターΔN522過剰発現による6-OHDA 誘導アポトーシスの抑制効果。PC12細胞にHis-ΔN522発現ベクターあるいはHis-空ベクターをGFP空ベクターと遺伝子導入し、24時間後の生存GFP陽性細胞数。

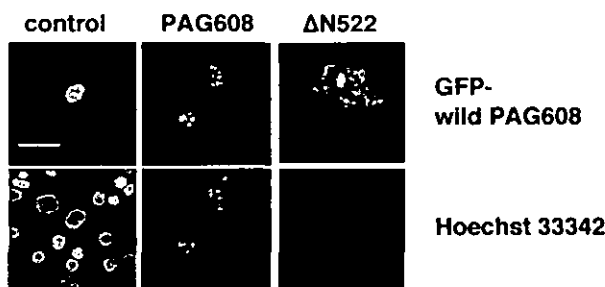


図3 GFP-野生型PAG608の細胞下局在と核内集積に対するHis-野生型PAG608および変異型ΔN522過剰発現の影響。PC12細胞にHis-野生型PAG608発現ベクター、変異型ΔN522発現ベクターおよびHis-空ベクターをGFP-野生型PAG608発現ベクターとともに遺伝子導入し、24時間後にGFP-PAG608の蛍光シグナルとHoechst dyeによる核シグナルを検出した。

3. PAG608 アンチセンス cDNA 高発現細胞株での METH による神経毒性

対照 PC12 細胞, PAG608 アンチセンス cDNA 高発現細胞株(PC12/PAG608AS)の total cell lysate を用いて, 抗 PAG608 抗体による Western blot analysis を行い, PC12/PAG608AS において PAG608 の発現が抑制されていることを確認した。METH (1-5 mM)添加 24 時間後の対照 PC12 細胞の細胞生存率は有意に減少するのに対し, PC12/PAG608AS では METH による細胞生存率の減少がほぼ完全に抑制されていた。

4. PAG608 アンチセンスオリゴヌクレオチド導入神経細胞株における METH 神経毒性

PAG608 センスオリゴヌクレオチドを導入した B65 細胞では, METH (500 μM)添加により 2 時間後より著明な神経細胞死が認められた。また, Hoechst 核染色では核クロマチンの凝縮, 核の分葉化・断片化, 細胞質の濃縮といったアポトーシス様の形態変化がみられた。これに対して, PAG608 アンチセンスオリゴヌクレオチドを導入した B65 細胞では, METH (500 μM)添加による神経細胞死が抑制されており, METH 添加によるアポトーシス様の形態変化も抑制されていた。

5. L-DOPA 投与片側パーキンソン病モデル脳各部位での PAG608 発現

PAG608 の免疫染色の結果, 各群の橋核, 三叉神経運動核, 顔面神経運動核において PAG608 陽性細胞が認められたが, 障害側でやや強い傾向が見られた。また, 大脳皮質と線条体においても各群で点状の陽性シグナルが認められた。さらに, L-DOPA を投与されたパーキンソン病モデルの障害側の内包において著明な PAG608 陽性シグナルの誘導がみられた。

D. 考察

昨年度までにドパミン関連酸化ストレスによって大脳基底核部に特異的に発現誘導される遺伝子として p53 関連遺伝子 PAG608 を同定し, その神経細胞死における役割について検討した。そして, PAG608 の発現抑制により 6-OHDA によるアポトーシスがほぼ完全に抑制され, 6-OHDA 添加によって惹起されるミトコンドリアの膜電位の低下, p53, Bax 発現の誘導が著明に抑制されること, PAG608 は p53 発現を誘導しうることを明らかにし, p53 によって発現誘導される PAG608 は酸化ストレスによるドパミン神経細胞のアポトーシスにおいて, ミトコンドリア障害より上流の過程で, 逆に p53 ならびに Bax の発現を誘導し, ミトコンドリアの膜電

位の低下を惹起している可能性を示した。今年度はドパミン神経細胞死における PAG608 の細胞内動態とその機構について検討した。

GFP 標識野生型 PAG608 発現ベクターのカテコールアミン産生神経様培養細胞 PC12 への遺伝子導入により、PAG608 が核と核小体を集積し分布していることを明らかにできた。また、PAG608 の第一ジンクフィンガードメインを欠失させた N 末端欠損変異型 PAG608 発現ベクターを PC12 細胞に導入すると、6-OHDA によるアポトーシスが阻止され、さらに野生型 PAG608 の核や核小体への集積が阻止された。これらの結果から、PAG608 はそれ自身または他の分子と第一ジンクフィンガードメインを介して結合することで核や核小体に移行するという細胞内動態、さらに、この核内移行が酸化ストレスによるアポトーシスの過程に必要であるという障害機構を明らかにできた。

L-DOPA や 6-OHDA と同様に酸化ストレスが関与したドパミン神経傷害を惹起する METH によるドパミン神経細胞死に対する PAG608 発現抑制の効果をみるために、PAG608 アンチセンス cDNA の神経細胞への遺伝子導入を行い、PAG608 発現抑制の METH 神経毒性への影響について検討した。その結果、METH 添加による細胞死が、PAG608 の発現が抑制された PAG608 アンチセンス cDNA 高発現細胞株ではほぼ完全に抑制されていた。また、METH 添加により惹起されるアポトーシス様の形態変化ならびに細胞死が、PAG608 アンチセンスオリゴヌクレオチドを導入し PAG608 の発現を抑制しておくことで阻止された。6-OHDA により惹起されるアポトーシス様の神経細胞死に PAG608 が関与していることから、PAG608 は L-DOPA によるドパミン細胞障害のみならず、酸化ストレスによるドパミン神経のアポトーシス発現過程に共通して関与していると考えられる。

さらに、L-DOPA 投与による PAG608 の

中枢神経系での発現動態を明らかにするために、L-DOPA を投与された片側パーキンソン病モデルの脳での PAG608 の免疫染色を行った。L-DOPA 投与群の障害側の内包において著明な PAG608 陽性シグナルの誘導がみられた。この結果は PAG608 が傷害側線条体において L-DOPA で発現が誘導される遺伝子として同定されたという一昨年の結果と合致している。したがって、PAG608 はパーキンソン病モデルの脳基底核部において L-DOPA により特異的に発現誘導される分子であることを確認できた。一方で、恒常的に橋核、三叉神経運動核、顔面神経運動核において PAG608 陽性細胞が認められ、障害側でやや強い傾向が見られた。このような脳神経運動核での PAG608 の発現は不随意運動などとの関連を示唆する所見として大変興味深い。今後は発現細胞の同定などを行う必要がある。

E. 結論

本年度までの研究により、p53 によって発現誘導される PAG608 は、酸化ストレスによるドパミン神経細胞のアポトーシスにおいて、ミトコンドリア障害より上流の過程で、逆に p53 の発現を誘導し、ミトコンドリアの膜電位の低下を惹起していること、さらに PAG608 は第一ジンクフィンガードメインを介して核や核小体に局在しており、その核内移行が酸化ストレスによるアポトーシス誘導過程に必要であることを明らかにできた。また、PAG608 は酸化ストレスによるドパミン神経のアポトーシス発現過程に共通して関与していることも示した。中枢神経系での発現動態についての組織学的検討により、PAG608 はパーキンソン病モデルの脳基底核部において L-DOPA により特異的に発現誘導されていることを再確認した。

F. 研究発表

1. 論文発表

① Haque, M.E., Asanuma, M., Higashi, Y.,

- Miyazaki, I., Tanaka, K. and Ogawa, N.: Apoptosis-inducing neurotoxicity of dopamine and its metabolites via reactive quinone generation in neuroblastoma cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 1619: 39-52, 2003.
- ② Tanaka, K., Fujita, N. and Ogawa, N.: Immunosuppressive (FK506) and non-immunosuppressive (GPI1046) immunophilin ligands activate neurotrophic factors in the mouse brain. *Brain Res.*, 970: 250-253, 2003.
- ③ Haque, M.E., Asanuma, M., Higashi, Y., Miyazaki, I., Tanaka, K. and Ogawa, N.: Overexpression of Cu-Zn superoxide dismutase protects neuroblastoma cells against dopamine cytotoxicity accompanied by increase in their glutathione level. *Neurosci. Res.*, 47: 31-37, 2003.
- ④ Asanuma, M., Tsuji, T., Miyazaki, I., Miyoshi, K. and Ogawa, N.: Methamphetamine-induced neurotoxicity in mouse brain is attenuated by ketoprofen, a non-steroidal anti-inflammatory drug. *Neurosci. Lett.*, 352: 13-16, 2003.
- ⑤ Diaz-Corrales, F.J., Asanuma, M., Miyazaki, I. and Ogawa, N.: Rotenone induces disassembly of the Golgi apparatus in the rat dopaminergic neuroblastoma B65 cell line. *Neurosci. Lett.*, 354: 59-63, 2004.
- ⑥ Asanuma, M., Miyazaki, I. and Ogawa, N.: Dopamine- or L-DOPA-induced neurotoxicity: the role of dopamine quinone formation and tyrosinase in a model of Parkinson's disease. *Neurotox. Res.*, 5: 165-176, 2003.
- ⑦ Tanaka, K. and Ogawa, N.: The possibility of non-immunophilin ligands as potential therapeutic agents for Parkinson's disease. *Current Pharmaceutical Design*, 10: 669-677, 2004.
- ⑧ Asanuma, M., Miyazaki, I. and Ogawa, N.: Neuroprotective effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on neurodegenerative diseases. *Current Pharmaceutical Design*, 10: 695-700, 2004.
- ⑨ 浅沼幹人, 宮崎育子, 辻 武史, 小川紀雄: 非ステロイド性消炎鎮痛薬の神経保護作用の新展開. *日本神経精神薬理学会雑誌*, 23: 111-119, 2003.
- ⑩ 浅沼幹人, 宮崎育子, 小川紀雄: 実験的パーキンソニズムに使われる薬剤~MPTP, 6-ヒドロキシドパミンならびにロテノン. *医薬ジャーナル*, 40: 111-116, 2004.
- ⑪ 小川紀雄, 浅沼幹人, 田中健一: Parkinson 病薬物治療の将来—進行抑制薬実現の可能性. *医学のあゆみ*, 208: 583-588, 2004.
- ⑫ 小川紀雄, 宮崎育子: ドパミン受容体とトランスポーター. *脳の科学*, 292 (2004年増刊号): 53-59, 2004.
- ⑬ Higashi, Y., Asanuma, M., Miyazaki, I. and Ogawa, N.: Expression of metallothionein-III and cell death in differentiated catecholaminergic neuronal cells. *Neurol. Res.*, in press.
- ⑭ Higashi, Y., Asanuma, M., Miyazaki, I., Hattori, N., Mizuno, Y. and Ogawa, N.: Parkin attenuates manganese-induced dopaminergic cell death. *J. Neurochem.*, in press.
2. 学会発表
- ① 浅沼幹人, 宮崎育子, M. Emdadul Haque, 東 洋一郎, 小川紀雄: ドパミンおよびその誘導体のキノン体生成を介したアポトーシス誘導性. 第11回カテコールアミ

- ンと神経疾患研究会, 2003.
- ② 浅沼幹人, 東 洋一郎, 宮崎育子, 服部信孝, 水野美邦, 小川紀雄: マンガン誘発ドパミン神経毒性におけるパーキン蛋白の関与. 第44回日本神経学会総会, 2003.
 - ③ 浅沼幹人, 東 洋一郎, 宮崎育子, 服部信孝, 水野美邦, 小川紀雄: Involvement of parkin protein in manganese-induced ER stress in dopaminergic cells. 第26回日本神経科学大会, 2003.
 - ④ 宮崎育子, M. Emdadul Haque, 浅沼幹人, 小川紀雄: Possible involvement of tyrosinase in methamphetamine-induced dopaminergic toxicity. 第26回日本神経科学大会, 2003.
 - ⑤ Asanuma, M., Miyazaki, I., Higashi, Y., Tsuji, T. and Ogawa, N.: Specific gene expression and possible involvement of inflammation in methamphetamine-induced neurotoxicity. International Society For Neurochemistry (ISN) /Asian Pacific Society For Neurochemistry (APSN) Sponsored Satellite Meeting. Current Status of Dependence/Abuse Studies: Cellular and Molecular Mechanisms of Drugs of Abuse and Neurotoxicity, 2003.
 - ⑥ 浅沼幹人, 宮崎育子, 小川紀雄: パーキンソン病モデル線条体へのメラニン合成酵素チロシナーゼ産生細胞の移植. 第46回日本神経化学会, 2003.
 - ⑦ 宮崎育子, 浅沼幹人, 小川紀雄: 線条体アストロサイトにおけるドパミンレセプターの発現. 第46回日本神経化学会, 2003.
 - ⑧ 辻 武史, 浅沼幹人, 宮崎育子, 小川紀雄: メタンフェタミンによるドパミン神経障害に対する非ステロイド性消炎鎮痛薬の効果 -II-. 第33回日本神経精神薬理学会年会, 2003.
 - ⑨ 宮崎育子, 浅沼幹人, 東 洋一郎, 服部信孝, 水野美邦, 小川紀雄: マンガン誘発神経毒性におけるパーキン蛋白のドパミン神経特異的な関与. 第33回日本神経精神薬理学会年会, 2003.
 - ⑩ F. Diaz, 浅沼幹人, 宮崎育子, 小川紀雄: Rotenone induce fragmentation of Golgi apparatus in dopaminergic neuroblastoma cell line. 第33回日本神経精神薬理学会年会, 2003.
 - ⑪ 浅沼幹人, 宮崎育子, 小川紀雄: メタロチオネインとパーキンソン病, 老化. メタロチオネイン 2003, シンポジウムII メタロチオネインの臨床, 2003.

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

非免疫抑制性イムノフィリンリガンドのドパミン神経毒に対する
神経保護作用とその分子機序に関する研究

分担研究者 田中 健一

就実大学薬学部医療薬学科薬物治療学研究室 助教授

研究協力者：浅沼 幹人（岡山大学大学院医歯学総合研究科脳神経制御学講座神経情報学）

研究要旨

平成 13-14 年度における本研究班による検討をさらに進め、神経保護修復薬として注目されているイムノフィリンリガンド (IPLs) の神経保護作用とその分子機序解明を行い、rapamycin (免疫抑制性) を除く、FK506 (免疫抑制性)、GPI1046 (非免疫抑制性) および V10367 (非免疫抑制性) は過酸化水素による細胞生存率の低下とアポトーシスを有意に抑制すること、その主な作用機序として細胞内グルタチオン (GSH) 濃度の増加作用に加え、神経栄養因子である BDNF や GDNF の活性化作用によることを明らかにした。また、FK506 はカスパーゼ活性の阻害作用を柱とする抗アポトーシス作用を有することを示した。一方で GPI1046 と V10367 についてはカスパーゼ阻害作用は認められないものの、bcl-2 family や p53 といったアポトーシス関連分子に対する作用を示すことから、FK506 よりは若干弱いものの、同じように抗アポトーシス作用を有する可能性を明らかにした。次に α -シヌクレインに対するこれら 4 種類の IPLs の神経保護作用を検討したところ、残念ながら有効な効果を見い出せなかった。以上より、既存の非免疫抑制性 IPLs は神経保護作用の力価が足りないと考え、新規候補物質の探索を試みた。IPLs の神経保護作用の主要な分子機序である GSH 増加作用と BDNF および GDNF の活性化作用を指標に検討したところ、有望な候補物質を数種類見い出した。今後、これら候補物質がパーキンソン病進行性病変に対する治療薬として有用であるか否かを検証していきたいと考える。

A. 研究目的

パーキンソン病(PD)では黒質-線条体系のドパミン(DA)神経細胞が特異的に変性・脱落することから、DA の前駆体であるレボドパを補充することを中心に治療が行われている。レボドパ補充療法は初期には劇的な症状改善効果を示すものの、長期にわたる投与の過程で様々な問題症状が発現することも報告されてきた。また、同様に使用されてきた DA ア

ゴニストについても、単独の効果はレボドパに比べて弱い上に DA アゴニスト自身の神経保護作用というよりは併用によるレボドパ投与量の減量による効果の方が主であるものと考えられている。したがって、現時点における治療はすべて対症療法といっても過言ではなく、PD の進行性病変を抑える根本的な治療法の開発は急務といえる。我々は PD の防御法について研究を進めてきたが、本研究では

イムノフィリンリガンド (IPLs) に着目して PD の進行性病変に対する治療薬としての可能性を明らかにする目的で検討を行なった。免疫抑制薬であるタクロリムス (FK506) は、内因性結合タンパク質の FK506 結合タンパク質 (FKBP) であるイムノフィリンと結合して作用を発揮することから、IPLs として知られている。IPLs は従来から知られていた免疫抑制作用に加え、様々な病態モデルにおいて神経変性を阻止する作用を有することが報告されてきた。最近では免疫抑制作用を持たない非免疫抑制性 IPLs が免疫抑制作用を有する IPLs と同様な神経保護作用を有することが報告されつつある。非免疫抑制性 IPLs の有用性を疑問視している研究者もいるが、現在の免疫抑制薬ではいくら実験レベルで有用だとしても、免疫不全という重大な副作用を有する以上、神経保護薬としての可能性は限定的と言わざるを得ない。その点、免疫抑制作用を持たない非免疫抑制性 IPLs への期待は依然として高いものがある。一昨年度報告した通り、我々は既に非免疫抑制性 IPLs の一つである GPI1046 が FK506 と同様な神経保護作用を示し、その作用機序の一つがグルタチオン(GSH)増加作用であることを見出した。平成 15 年度においては代表的な酸化ストレスである過酸化水素による細胞毒性に対する 4 種類の IPLs の保護作用とその分子機序について検討を行った。また、IPLs には進行性病変の阻止も期待していることから、我々が本研究課題において作成した α -シヌクレイン過剰発現細胞株を用いた検討と既存 IPLs よりも強力な神経保護作用を有する非免疫抑制性 IPLs 候補物質の探索研究も行なったので、併せて報告する。

B. 研究方法

① 過酸化水素による細胞死に対する IPLs の細胞保護作用とその分子機序に関する検討

ヒトグリオーマ由来 U251 細胞株を定法により培養した。4 種類の IPLs (免疫抑制性

FK506, rapamycin, 非免疫抑制性 GPI1046, V10367) の細胞保護作用およびその分子機序の解明は次のように行った。(1)細胞生存率: WST-1 測定法 [MTT 改良法], (2)核染色: Hechst33342 染色, (3)アポトーシス関連分子 bcl-2, bax および p53 の mRNA 発現量: RT-PCR 法, (4) caspase-3, -8 および -9 活性: pNA による発色吸光度法, (5)細胞内 GSH 濃度: DTNB 法, (6)神経栄養因子 GDNF および BDNF 活性: ELISA 法をそれぞれ用いた。(1-4)の検討では、IPLs を予め添加し 24 時間培養した後、新しい培養液中に過酸化水素を加えて 1 時間暴露した後に評価した。また、(5-6)については IPLs を培養液に加え 24 時間培養した後に測定した。

② α -シヌクレイン神経毒性に対する IPLs の神経保護作用に関する検討

ヒトニューロblastoma由来 SH-SY5Y 細胞を用い作成した α -シヌクレイン cDNA を恒常的に発現している α -シヌクレイン過剰発現 SH-SY5Y 細胞株(SH-SY5Y/SYN)とコントロールとして未挿入の発現ベクターを導入した細胞株(SH-SY5Y/CTL)の細胞生存率を指標に α -シヌクレイン神経毒性に対する IPLs の神経保護作用について検討した。細胞生存率測定用の 96 well プレートに播いた時から 4 種類の IPLs (FK506, GPI1046, V10367, rapamycin) を 96 時間添加し、WST-1 測定法により評価した。

③ IPLs と同様の神経保護作用を有する非免疫抑制性 IPLs 候補物質の探索

候補物質としては FKBP における IPLs との結合部位のアミノ酸配列を参考に構造類似体であるジペプチドを選択した。選択したジペプチド(最終濃度は 0.01-10 μ M)をそれぞれ SH-SY5Y 細胞株の培養液中に添加し、24 時間後に細胞内 GSH 濃度と培養上清中の GDNF, BDNF 遊離量をそれぞれ DTNB 法および ELISA 法で測定した。比較のために既存の IPLs である FK506, GPI1046, V10367, rapamycin についてもそれぞれ検討した。

C. 研究結果

① 過酸化水素による細胞死に対する IPLs の細胞保護作用とその作用機序に関する検討

一昨年度に報告した通り、U251 細胞に対する過酸化水素の急性毒性実験は 2mM の過酸化水素を 1 時間暴露する条件で実験を行なった。その結果、FK506, GPI1046, V10367 は予め添加して 24 時間培養することで、過酸化水素による細胞生存率の低下を有意に抑制した。また、Hoechst 33342 染色による検討でも、過酸化水素による核の凝集やアポトーシス小体の出現を上記 3 つの IPLs は抑制した。ところが、rapamycin はどちらの検討でも効果を示さなかった。次に IPLs の抗アポトーシス作用の分子機序を明らかにする目的で、アポトーシス関連分子に対する効果についても検討した。caspase-3, -8 および -9 の活性はいずれも過酸化水素により有意に亢進したが、FK506 のみこの亢進を抑制した。過酸化水素による bax mRNA 発現の増加については FK506, GPI1046, V10367 の 3 つの IPLs が、p53 mRNA 発現増加については FK506 と V10367 の 2 つの IPLs が有意に抑制した。したがって、rapamycin 以外の 3 つの IPLs は抗アポトーシス作用を有するものの、その力価は FK506 > V10367 > GPI1046 の順であった。一方、IPLs を培養液に加えて 24 時間培養することで、rapamycin 以外の 3 つの IPLs は細胞内 GSH 濃度と培養液中の神経栄養因子濃度を増加させたことから、IPLs の細胞保護作用の分子機序にこれら分子の活性化が寄与している可能性を確認した。以上、IPLs の細胞保護作用には免疫抑制作用が必要ないこと、IPLs の作用機序には GSH 増加作用、神経栄養因子活性化作用に加え、抗アポトーシス作用が貢献していることを明らかにした。

② α -シヌクレイン神経毒性に対する IPLs の神経保護作用に関する検討

α -シヌクレイン過剰発現 SH-SY5Y/SYN

細胞は空ベクターを導入した SH-SY5Y/CTL 細胞に比べて、WST-1 測定法で評価した細胞生存率が有意に低下していることを見出した。この減少の意味するところは十分に理解できていないものの、 α -シヌクレインの過剰発現が少なくとも SH-SY5Y 細胞においては、毒性を示すことが示唆された。これに対して、4 種類の IPLs を 96 時間添加して α -シヌクレイン神経毒性に対する IPLs の神経保護作用を検討したが、いずれの IPLs とも有意な神経保護作用を示さなかった。

③ IPLs と同様の神経保護作用を有する非免疫抑制性 IPLs 候補物質の探索

これまでの検討結果から、IPLs の神経保護作用の主たる作用機序には GSH 増加作用と神経栄養因子活性化作用が重要な役割を果たしている可能性を明らかにしている。そこで、今回はこれらの作用を有する新規の非免疫抑制性 IPLs の候補物質を探索する端緒として、細胞培養液中への 2 種類の神経栄養因子の遊離量と細胞内 GSH 濃度を指標にして検討した。出発物質である Leu-Pro は神経栄養因子 GDNF, BDNF の培養液中への遊離量を溶媒に比べて 2 倍程度増加させた。これは既存の IPLs の中で最も強力な作用を示す FK506 の 1.3-1.4 倍に比べてもはるかに強い力価を示すと言える。Leu-Pro, Ile-Pro, Val-Pro の比較により、N 末側の側鎖の炭素数と分岐の位置が神経栄養因子活性化作用には関連する可能性を示した。一方、C 末側の化学構造については、N 末側が Leu で C 末側を変えた 5 種類のジペプチドで検討したが、BDNF と GDNF とで結果が異なったことから、さらなる構造相関解析が必要と考えられた。次に細胞内 GSH 濃度について検討したところ、出発物質である Leu-Pro は細胞内 GSH 濃度を溶媒に比べて 1.4 倍程度増加させたが、これは FK506 の力価とほぼ同程度であり、今回検討した中では Leu-Val, Leu-Met, Met-Pro が同様の力価を示した。