

20030493

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15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 丸山和佳子

平成16 (2004) 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 化合物による神経保護作用の構造活性相関の解析

直井 信 . . . . . 18

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 . . . . . 28

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 . . . . . 31

III 研究成果の刊行に関する一覧表 . . . . . 36

IV 研究成果の刊行物・別刷 . . . . . 41

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 長寿医療センター 室長

研究要旨 高齢者に認められる代表的な痴呆性疾患あるアルツハイマー病における進行性の神経細胞死(変性)を防御する薬剤の開発を目的として研究を行った。経口投与可能で、脳内移行性が良好、しかも副作用の少ない神経保護薬の候補として、propargylamine 化合物に着目した。B 型モノアミン酸化酵素(MAO)の阻害剤として開発された propargylamine 化合物は、多くの実験で酵素阻害とは独立した神経保護作用をもつことが報告されているもののその機序は明らかとされていなかった。本年度の研究で、propargylamine 化合物がミトコンドリアにおいて細胞死 (アポトーシス)シグナルの initiation に関わる mega channel である permeability transition (PT) pore の制御に関わる分子に作用し、細胞内 mitogen activated protein kinase (MAPK)の活性化を介してストレス応答性転写因子の活性化を引き起こすことが明らかとなった。さらに、わが国で唯一臨床使用な propargylamine 化合物である selegiline 投与により患者脳内における神経保護タンパクの発現が増加することが示され、神経保護療法の開始にむけての基礎データが得られた(丸山)。Propargylamine 化合物のミトコンドリアにおける標的分子を明らかとするために、ミトコンドリア外膜に対する多数のモノクローナル抗体を作成し、その中で PT に影響を及ぼすクローンを複数得られたため、それらが認識するタンパクを同定中である(辻本)。A 型および B 型の MAO はミトコンドリア外膜に存在するが、神経細胞に存在するのは主に A 型 MAO である。propargylamine 化合物は B 型 MAO と結合し酵素活性を阻害するため、これと立体構造の類似した A 型 MAO にも結合する可能性がある。propargylamine 化合物の中で最も神経保護活性が強かった rasagiline においては、A 型 MAO への結合が PT に直接影響を及ぼすことが示された(直井)。アルツハイマー病において神経細胞死を引き起こす原因として最も重要なものは、amyloid beta

protein (A $\beta$ )の蓄積と、活性化されたミクログリアが産生する炎症性サイトカイン、活性化酸素種などである。amyloid precursor protein (APP)を過剰発現させた細胞株を作成し実験を行ったところ、rasagiline は APP の alpha-secretion を増加させることによって A $\beta$  の生成を抑制することが示された(赤尾)。また、C57B6Jmouse より得られたミクログリアと神経細胞の共培養系を用いた実験で rasagiline は interfereone  $\gamma$ および A $\beta$ による神経細胞死を防御することが示された(錫村)。

#### [研究組織]

○丸山和佳子(長寿医療センター 室長)

辻本賀英(大阪大学大学院医学系研究科 教授)

直井 信(財団法人岐阜県国際バイオ研究所 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

アルツハイマー病は高齢者に認められる代表的な痴呆性疾患であり、60歳以上の3-5%が発症すると同時に、加齢に従い発症率が増加する。アルツハイマー病に対する治療薬は現在までのところ細胞死によって低下した神経伝達物質であるアセチルコリンを増加させるコリンエステラーゼ阻害剤のみが承認されているに過ぎないが、疾患の進行を防止すること

はできない。痴呆患者の大多数は高齢者であり、安全で侵襲の少ない治療法が求められている。経口投与可能な神経保護薬の開発は、痴呆高齢者のADL、QOLを改善することにより厚生労働上現在問題となっている社会福祉、保険財政を改善するだけでなく、新たな創薬の可能性が期待される。

昨年までの本研究課題の結果より、propargylamine 化合物はミトコンドリアに直接作用し膜透過性(PT)を制御すると同時に、神経保護タンパク発現を誘導することによって神経細胞死を防御することが示された。本年度ではこの分子メカニズムをさらに詳細に検討すると同時に、アルツハイマー病の細胞モデルに対する神経保護効果を証明した。さらに本薬剤が神経変性疾患患者の脳内で、神経保護タンパクを増加させることができるか検討を行った。

## B. 研究方法

前年度までの研究で最も神経保護活性が強かった propargylamine 化合物である rasagiline を中心に研究を行った。ヒト神経芽細胞腫である SH-SY5Y 細胞を rasagiline を添加下に培養を行い、細胞内シグナル伝達、転写因子活性化、mRNA およびタンパクレベルの変化について RT-PCR、immunoblotting、ELISA 法によって解析を行った(丸山)。さらに、ミトコンドリアにおける PT 制御タンパクを同定するために、ラット肝臓から精製したミトコンドリア外膜を抗原としてマウスを免疫し、約 3000 種類のモノクローナル抗体を作成した。この抗体が単離ミトコンドリアからのシトクロム c の漏出(アポトーシスマーカー)を押さえられるかどうかを指標としてバイオアッセイを行った(辻本)。また、rasagiline の標的タンパク候補として、神経細胞のミトコンドリアに豊富に存在する A 型モノアミン酸化酵素(MAO)に着目した。SH-SY5Y 細胞は A 型 MAO のみを発現しているが、ここに A 型 MAO の阻害剤を加えることにより、rasagiline のミトコンドリア膜電位保持効果が影響をうけるか否か検討した(直井)。アルツハイマー病のモデル細胞として、正常あるいは変異型の amyloid precursor protein (APP)を発現させ

た SH-SY5Y 細胞株を樹立し、酸化ストレスに対する脆弱性を検討した(赤尾)。また、本細胞株を用いて、rasagiline の amyloid beta protein (A $\beta$ ) 生成に対する影響を検討した(赤尾、丸山)。よりインビボの神経細胞に近いモデルとしてマウス大脳神経細胞とアストロサイトの共培養系を確立し、炎症性サイトカインにより神経細胞死を惹起した。この系に rasagiline を予め添加しておくことで細胞死が抑制されるか否か検討した(錫村)。本研究の最終目標は、痴呆疾患患者に対し、propargylamine 化合物の神経保護効果を証明することである。現在我が国で唯一臨床使用が可能な propargylamine 化合物である selegiline 投与前後における脳脊髄液中の神経栄養因子の定量を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては、各施設の実験動物委員会の承認のもとに、動物愛護の精神に沿って実験を行った。

ヒトサンプルの採取および分析に関しては、厚生労働省の指針に基づき、各施設の倫理委員会の承認のもとに行った。患者からは書面によるインフォームドコンセントを得た

## C. 研究結果

rasagiline は SH-SY5Y 細胞に対して

MAPK(Erk1/2)の活性化を介してストレス応答性転写因子である NF $\kappa$ B や FOX の活性化を引き起こした。これら転写因子の活性化により、bcl-2、bcl-xL、神経栄養因子、superoxide dismutase (SOD)などの mRNA とタンパクを誘導した。さらに、MAPK 下流の tyrosine リン酸化酵素の活性化は APP  $\alpha$ -secretase の活性を増加させた(丸山)。ミトコンドリア外膜に対する多数のモノクローナル抗体の中で PT に影響を及ぼすクローンが複数(数個)得られた。それらが認識するタンパクを同定中である(辻本)。rasagiline による A 型 MAO への結合が PT に直接影響を及ぼすことが示された(直井)。APP を過剰発現させた細胞株を作成し実験を行った。APP 過剰発現細胞は酸化ストレスに対し脆弱であり、rasagiline は APP の alpha-secretion を増加させることによって A $\beta$  の生成を抑制することが示された(赤尾)。ミクログリアと神経細胞の共培養系を用いた実験で rasagiline は interferone  $\gamma$ および A $\beta$ による神経細胞死を防御することが示された(錫村)。selegiline 投与によりパーキンソン患者脳脊髄液中の神経栄養因子濃度が有意に増加した(丸山)。

### C. 考察

rasagiline (propargylamine 化合物)はミトコンドリアの PT pore の制御に関わる分子に作用し、細胞内 mitogen activated protein kinase (MAPK)の活性化を介してストレス応答性転写因子の活性化、神経保護タンパクの発現増加を引き起こし、さらに APP からの A $\beta$ 生成を抑制した。propargylamine 化合物である selegiline は神経変性疾患患者の脳脊髄液、そして、おそらくは脳内の神経栄養因子を増加させることが示唆された。propargylamine 化合物は経口投与が可能であり、selegiline および rasagiline は大きな副作用なく患者に投与されている。今後、これらの薬剤の神経保護作用を臨床的に検証することにより、老化に伴う神経変性、特にアルツハイマー病の治療が可能となることが期待される。

### E. 健康被害情報

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

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 長寿医療センター 室長

研究要旨 N-propargyl-1(R)-aminoindane (rasagiline) は mother drug であり B 型モノアミン酸化酵素の阻害剤として現在我が国で臨床使用されている selegiline と異なりアンフェタミン構造をもたない propargylamine 化合物である。さらに rasagiline に carbamyl 基を付加した TV3326 はコリンエステラーゼ阻害作用をもち、アルツハイマー病におけるコリン作動性神経伝達を改善する作用が期待される。本年度の研究では、rasagiline による神経保護タンパク誘導の機序についてその分子メカニズムを解明するための研究を行うとともに、propargylamine 化合物の神経保護薬としての患者への使用を目的とした臨床研究を行った。

A. 研究目的

propargylamine 化合物である selegiline、rasagiline、TV3324 は当初、B 型モノアミン酸化酵素の阻害剤として開発されたが、酵素阻害作用とは独立した神経保護作用をもつことが *in vitro* および *in vivo* の実験で証明された。しかし、その神経保護作用の分子メカニズムや作用点は明らかではなかった。本薬剤の作用機序／作用点を解明することにより将来に向けてより強力で副作用の少ない新規薬剤の開発のためのハ

イスループットのアッセイシステムが可能となるため、研究を行った。また、作用機序が明らかとなることによりアルツハイマー病患者に対して本薬剤を使用する際、薬効を評価するためのバイオマーカーが見い出される可能性がある。本年度は現在我が国で唯一臨床使用が可能であり、パーキンソン病患者治療に関する保健適応が認められている propargylamine 化合物である selegiline を投与前後で、神経保護タンパクの誘導が脳脊髄液の分析に

よりモニター可能であるか否か検討を行った。

## B. 研究方法

ヒト由来の神経芽細胞腫である SH-SY5Y 細胞に 100 nM rasagiline を添加し 6-24 時間培養を行い、経時的に mRNA を精製分離した。Takara 社の開発した gene array system にてアポトーシス関連遺伝子の発現解析を行った。

2002年までに報告した rasagiline による BCL-2 glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) brain-derived neurotrophic factor (BDNF) などの神経保護に働くタンパクおよび mRNA の増加作用と、mitogen activated protein kinase (MAPK) の活性化作用、さらにアルツハイマー病における神経細胞死に密接に関わる amyloid beta protein (A $\beta$ ) の生成抑制作用の 3 つに関して共通する上流シグナルを明らかとするため細胞実験を行った。

さらに、propargylamine 化合物による神経保護タンパクの誘導や Abeta 生成抑制作用が患者脳脊髄液の分析によりモニター可能であるか否か少数例の患者で検討を行った。

GDNF BDNF A $\beta$  の定量は ELISA 法によって行った。BCL-2 タンパクの定量、MAPK の活性化の測定は Western

blotting によった。これらの mRNA 定量は RT-PCR を用いた。

(倫理面への配慮)

厚生労働省の指針に基づき、ヒトサンプルの採取および分析に関しては、各施設の倫理委員会の承認のもとに行った。患者からは書面によるインフォームドコンセントを得た。

## C. 研究結果

gene array による分析では、rasagiline を SH-SY5Y 細胞に添加培養 6 時間後より bcl-2、ubiquitin-proteasome 関連遺伝子の増加が認められ、12 時間後からは cell cycle 関連遺伝子、ミトコンドリア関連遺伝子の発現上昇が起こった。rasagiline によって発現が誘導された遺伝子の多くはストレス反応遺伝子であり、これに関わる転写因子の活性化が引き起こされていることが考えられた。SH-SY5Y 細胞に対して rasagiline が BCL-2、GDNF、BDNF の mRNA およびタンパク量の増加を引き起こすことが RT-PCR、Western blotting、ELISA による定量的な分析によっても確かめられた。これらに共通する転写因子の解析を行ったところ、ストレス反応性転写因子である NFkappaB の活性化が認められるとともに、阻害剤である sulfasalazine の前処理によってこれら mRNA およびタンパクの増加

が抑制された。その他の転写因子として、MAPK (Erk1/2)の下流に存在する Elk-1 の活性化が示唆され、これが BDNF の増加の原因の一部であると考えられた。やはりストレスに関わる転写因子であり、寿命に関与する可能性が報告されている FOX の活性化が認められた。

NFkappaB と MAPK の活性化の上流にあるシグナルについて検討を行ったところ、ミトコンドリアの膜透過性を制御する permeability transition (PT) pore の開閉に関わる分子である voltage-dependent anion channel (VDAC) 、 acidic nucleotide translocator (ANT) 、 cyclophilin (Cyc) に結合する Bcl-2、bonkreic acid、cyclosporin A のいずれも MAPK の活性化を抑制することが見い出され、ミトコンドリア PT から MAPK へのシグナル伝達が存在することが示された。一方、2001 年度の本研究課題による研究で、rasagiline もミトコンドリアに直接作用し、PT を制御することが証明されている。従って rasagiline - ミトコンドリア PT pore - MAPK の経路が存在することが示唆された。

2002 年度の本研究課題において、rasagiline および TV3324 は、SH-SY5Y 細胞における A $\beta$ 産生を抑制することが示された。この分子メカニズムを

検討したところ、MAPK の下流に存在する tyrosine リン酸化酵素が活性化され、APP を切断する alpha-secretase 活性が増加し、相対的に beta-secretion が減少することにより A $\beta$  生成が低下することが示された。

パーキンソン病患者 8 例について、selegiline 5 mg/day 投与前後の脳脊髄液中の神経栄養因子と A $\beta$ を測定したところ、selegiline 投与により神経栄養因子の有意な増加が認められた。このことは、propargylamine 化合物の経口投与によりヒト脳内に神経保護タンパクが増加したことを示していると考えられた。

#### D. 考察

ストレス関連性転写因子は虚血、薬物等のストレス刺激に対し、生体を防御するための一群の遺伝子発現を誘導することが知られている。本研究課題においては propargylamine 化合物がまさにこれらの転写因子の活性化を介し、神経保護活性を示すことが証明された。propargylamine 化合物の中枢外作用として、寿命延長作用、悪性新生物の発症抑制作用が報告されており、これらの作用についても同様な機序が働いている可能性が示唆された。

さらに、rasagiline の作用点について PT pore 制御分子が関わっている

こと、およびミトコンドリア - MAPK のシグナル経路が示唆されたことは基礎科学的に重要な意味を持つと同時に、今後の薬剤開発に重要な知見と考えられた。

propargylamine 化合物の中で、現在の日本で臨床使用が認められている唯一のものである selegiline が神経変性疾患であるパーキンソン患者脳脊髄液中の神経栄養因子を増加させたことは本薬剤が臨床的に神経保護作用をもつ可能性を支持している。今後、今回得られた結果に基づいた神経保護効果の評価システムの構築が待たれる。

#### E. 結論

proargylamine 化合物の中でも selegiline は既に酵素阻害剤としての臨床使用が安全に行われている。一方 rasagiline は米国で既に phase III study が終了しており、大きな副作用の報告はない。本研究課題ではこれらの薬剤の作用機序を解明し、さらに臨床における評価システムを提唱した。今後これらの結果をふまえ、新薬開発を行っていく予定である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

W. Maruyama, A. Nitta, M. Shamoto-Nagai, Y. Hirata, Y. Akao, S. Furukawa, T. Nabeshima, M. Naoi: *N*-Propargyl-1(*R*)-aminoindan, rasagiline, increases glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in neuroblastoma SH-SY5Y cells through activation of NF- $\kappa$ B transcription factor. *Neurochem. Int.* 44: 393-400, 2004.

M. Shamoto-Nagai, W. Maruyama, Y. Kato, K. Isobe, M. Tanaka, M. Naoi, T. Osawa: An inhibitor of mitochondrial complex I, rotenone, inactivates proteasome by oxidative modification and induces aggregation of oxidized proteins in SH-SY5Y cells. *J. Neurosci. Res.* 74:589-97, 2003.

MB H. Youdim, T Amit, M. Falach-Yogev, OB. Am, W. Maruyama, M. Naoi: The Essentiality of bcl-2, PKC and proteasome-ubiquitin complex activations in the neuroprotective-antiapoptotic action of the anti-Parkinson drug, rasagiline. *Biochem. Pharmacol.* 66:1635-41, 2003.

W. Maruyama, M. Weinstock, MBH  
Youdim, M. Nagai, M. Naoi :

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. 341 (3) 233-236, 2003

M. Naoi, W. Maruyama, G.M. Nagy:  
Dopamine-derived salsolinol derivatives  
as endogenous monoamine oxidase  
inhibitors: occurrence, metabolism and  
function in human brains.

Neurotoxicology. 1-2: 193-204, 2004.

M. Naoi, W. Maruyama, M.B.H. Youdim,  
P. Yu, A. A. Boulton:

Anti-apoptotic function of  
propargylamine inhibitors of type-B  
monoamine oxidase.

Inflammopharmacology VSP Press Vol  
11 (2) 175-181, 2003.

丸山和佳子、直井信

Parkinson 病の発症機序

医学のあゆみ 208(6): 477-481, 2004

丸山和佳子、直井信

孤発性パーキンソン病の病因：ミト  
コンドリアを中心に

遺伝子医学 メディカル ドウ

23(suppl), 7(1): 64-67 2003

2. 学会発表

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

Oxidative stress in mitochondrial:  
Decision to survival and death of neurons  
in neurodegeneration.

ISN Satellite Meeting, "Oxidative Stress  
in Neurodegenerative Disorders",  
February 7-11, 2004, Guilin, China, p.  
28-29.

H. Yi, W. Maruyama, Y. Akao, M. Naoi:  
Induction of cell death by peroxynitrite:  
the intracellular mechanism and  
regulation.

ISN Satellite Meeting, "Oxidative Stress  
in Neurodegenerative Disorders",  
February 7-11, 2004, Guilin, China. p.  
62-64.

W. Maruyama, M. Nagai, M. Naoi:  
Involvement of mitochondrial  
dysfunction and proteasome inactivation  
in the pathogenesis of Parkinson's  
disease

33th Neuroscience Meeting, November  
8-12, 2003, New Orleans, Louisiana,  
USA, p. 42.

M. Naoi, W. Maruyama, A. Nitta, Y.  
Hirata:

Molecular mechanism underlying the induction of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and Bcl-2 through the activation of NF- $\kappa$ B transcription factor by *N*-propargyl-1(*R*)aminoindan, rasagiline, in neuroblastoma SH-SY5Y cells.

33th Neuroscience Meeting, November 8-12, 2003, New Orleans, Louisiana, USA, p. 60.

W. Maruyama, M. Naoi, M.B.H. Youdim:  
Intracellular mechanism of neuroprotection by rasagiline, an anti-Parkinson drug.

8th International Symposium on Parkinson Research, November 6-8, 2003, New Orleans, Louisiana, USA, p. 2.

M. Naoi, W. Maruyama:  
Oxidative stress in mitochondria: the role in neurodegenerative disorders.

Inflammatory and Oxidative Cell Death and Tissue Damage: Molecular mechanisms, Biomarkers, and Chemoprevention.

May 28-29, 2003, Seoul, South Korea, p. 80.

W. Maruyama, M. Naoi:  
Regulation of mitochondrial death signal by neuroprotective propargylamines.

Inflammatory and Oxidative Cell Death and Tissue Damage: Molecular mechanisms, Biomarkers, and Chemoprevention.

May 28-29, 2003, Seoul, South Korea, p. 84.

直井信、丸山和佳子、  
rasagiline によるドパミン神経保護作用の分子メカニズムの検討」第 44 回 日本神経学会総会、平成 15 年 5 月 15 -17 日、横浜

丸山和佳子、直井信  
Complex I 阻害剤であるロテノンとはたんぱく酸化修飾を介してプロテアゾーム阻害によりドパミン神経細胞死を惹起する

第 46 回 日本神経化学会、平成 15 年 9 月 24 -26 日、新潟、

直井信、丸山和佳子  
ラサジリンは NF- $\kappa$ B の活性化を介して SH-SY5Y 細胞に GDNF および BCL-2 を誘導する  
第 46 回 日本神経化学会、平成 15 年 9 月 24 -26 日、新潟、

W. Maruyama, A. Nitta, M. Shamoto-Nagai, Y. Hirata, Y. Akao, M. Naoi M.  
*N*-Propargylamine-1(*R*)-aminoindan, rasagiline, increases BCL-2 and glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)

in neuroblastoma SH-SY5Y cells through activation of NF- $\kappa$ B transcription factor.

第76回日本生化学会大会 平成15年10月15-18日、横浜

M. Nagai-Shamoto, W. Maruyama, M. Kozuka, Y. Kato, K. Isobe, M. Tanaka, M. Naoi, T. Osawa

An inhibitor of mitochondrial complex I, rotenone, induced apoptosis in dopamine cells by inactivation of proteasome through oxidative modification of proteins.

第76回日本生化学会大会 平成15年10月15-18日、横浜

丸山和佳子、直井信  
パーキンソン病におけるドパミン細胞死への酸化修飾蛋白の関与

第11回カテコールアミンと神経疾患研究会、平成15年4月19日、東京

丸山和佳子、永井雅代、直井信  
ミトコンドリア障害によるプロテアゾーム不活化と酸化修飾タンパク蓄積の機序：弧発性パーキンソン病との関連

Parkinson's Disease Forum 2003 平成15年8月30日、浦安

H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

厚生科学研究費補助金（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。今年度は以下の成果を得た。(1) 我々のモデルの検証とミトコンドリア膜透過性の制御機構の全貌を解明することを目的とし、ミトコンドリア外膜成分を免疫原として多数のモノクローナル抗体を作成し、その中から、アポトーシス時のミトコンドリア膜透過性亢進に影響を与えるクローンを複数を得た。現在それぞれの抗体の認識分子の同定を行なっている。(2) 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、これらヘテロマウスのかけ合わせにより cyclophilin D 欠損マウス系統を得た。現在、これらのマウスについて詳細を解析中である。(3) アルツハイマー病などの神経変性疾患の原因の一つとして小胞体ストレス (ER stress) 誘導性アポトーシスの関与が提唱されているが、ER stress と神経細胞死との関連、およびその分子メカニズムは未だ不明である。我々は、ER stress により ER 上で caspase が活性化され、アポトーシスが誘導されるというモデルを念頭に、ヒト細胞において ER に局在し、かつ ER stress により活性化される caspase として caspase-4 を同定した。さらに、caspase-4 が ER stress による細胞死に関与することを RNAi 法により証明し、また caspase-4 が A $\beta$ による細胞死にも関与することを示した。

## A. 研究目的

神経変性疾患の治療や予防のための有用なアプローチの一つは、神経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) ミトコンドリア膜透過性亢進に影響を与えるモノクローナル抗体の作成

ラット肝臓からミトコンドリアを精製し、外膜成分を抽出した。この膜成分およびミトコンドリア全体を免疫原としてマウスを免疫し、常法により多数（～3,000種類）のモノクローナル抗体を得た。各モノクローナル抗体

をラット肝臓から単離したミトコンドリアに加え、その後、リコンビナント蛋白 tBid を加え、シトクロム c 漏出（アポトーシス時の変化を再現している）を誘導した。遠心により上清を得、ミトコンドリアから遊離したシトクロム c をウエスタン法により測定することにより、tBid によるシトクロム c 漏出に影響を与えたモノクローナル抗体を選別した。

(2) 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、さらに相同組換えによる遺伝子置換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。これらヘテロマウスを交配し、cyclophilin D 欠損マウス系統を得た。

(3) 小胞体ストレス誘導性アポトーシスにおける caspase-4 の関与  
ヒト神経芽腫由来細胞株を用い、多数

の caspase の中から、免疫染色法により小胞体局在を示す caspase を同定し、その caspase が小胞体ストレスにより活性化されるかいないかを、ウエスタン法により検討した。また小胞体ストレス誘導性アポトーシスにおける関与を RNAi 法により検討した。

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) 代替手段がないこと (in vitro 系でのアポトーシスの解析に適したミトコンドリアを得るためには、これまでの知識の蓄積からラットまたはマウスに頼らざるをえない、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ティング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 (たとえば、肝摘出は過剰麻酔による安楽死ののちに行う)。

### C. 研究結果

(1) ミトコンドリア膜透過性亢進に影響を与えるモノクローナル抗体の作成

ラット肝臓ミトコンドリアの外膜成分を免疫原としてマウスから得られた多数 (~3,000 種類) のモノクローナル抗体の中から、リコンビナント蛋白 tBid によるシトクロム c 漏出に影響を与えるモノクローナル抗体を選別した。アッセイを数回繰り返すことによ

り、リコンビナント蛋白 tBid によるシトクロム c 漏出を促進するモノクローナル抗体と抑制する抗体を各々複数種類得ることに成功した。

(2) 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、ホモログ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。ホモログ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。さらにヘテロマウスの交配により cyclophilin D 欠損マウス系統を得た。現在のところホモ欠損マウスにも異常は認められていないが、詳細な病理解析と細胞死誘導ストレスを加えた時の応答等をマウスレベルおよび単離細胞レベルで詳細な解析を行なっている。

(3) 小胞体ストレス誘導性アポトーシスにおける caspase-4 の関与

ヒトは約 13 種類の caspase を有しているが、その中から、小胞体局在を示す caspase を選び、その caspase が小

胞体ストレスにより活性化されるか否かを、ヒト神経芽腫細胞株 (SK-N-SH) を用い検討した。その結果、caspase-4 が特異的に小胞体に局在することを、免疫染色法や細胞分画法などにより示した。この局在は免疫電子顕微鏡法によっても確認した。また、caspase-4 は、小胞体ストレス誘導性アポトーシス時に切断されること (活性化を反映していると考えられる) また、小胞体ストレス誘導性アポトーシスを惹起しない刺激では、切断されないことをウエスタン法により示した。この事実は、caspase-4 が小胞体ストレス誘導性アポトーシスに関与することを強く示唆している。さらに siRNA により caspase-4 を silencing させると、小胞体ストレス誘導性アポトーシスに対し、有意に耐性になることを示した。同 siRNA 処理した細胞は、アルツハイマー病の原因物質の一つと考えられている A $\beta$ 40 や A $\beta$ 42 ペプチドの添加により誘導されるアポトーシスにも有意な抵抗性を示した。

#### D. 考察

我々は、Bcl-2 ファミリーたんぱくは、ミトコンドリア外膜に存在するチャネル 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が、このモデル検証の一環として、さらに、アポトーシス時に起こるミトコンドリア膜透過性亢進現象

の全貌解明を目指し、ミトコンドリア外膜の成分を認識する多数のモノクローナル抗体の中から、膜透過性制御に影響を与える抗体を選別することに成功した。これらモノクローナル抗体のターゲットは、アポトーシス時のミトコンドリア膜透過性亢進プロセスまたはその制御に関与する分子と考えられ、これら分子の同定は、ミトコンドリア膜透過性制御の理解に極めて重要なものと考えられる。

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 遺伝子に欠損したマウス系統は、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。

また、caspase-4 が小胞体ストレス誘導性アポトーシスに関与するという知見は、小胞体ストレス誘導性アポトーシスがアルツハイマー病などの神経変性疾患に関与する可能性が示唆されていることを考えると、これら疾患の病態の理解や治療法の開発に重要な示唆を与えるものと思われる。

#### E. 結論

(1) ミトコンドリア膜透過性現象の全貌の理解に向け、ミトコンドリア外膜成分を免疫原として得た多数のモノクローナル抗体の中から、アポトーシス時のミトコンドリア膜透過性亢進を抑制または促進するクローンを複数得

た。(2) 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、cyclophilin D 欠損マウス系統を得た。(3) アルツハイマー病などの神経変性疾患の原因の一つとして考えられている小胞体ストレス (ER stress) 誘導性アポトーシスに関わる caspase として小胞体レジデントである caspase-4 を同定し、caspase-4 がアルツハイマー病の原因物質の一つと考えられている A $\beta$ 40 (42) ペプチドによる細胞死にも関与することを示した。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表 (欧文)

1. Tsujimoto, Y. Cell death regulation by the Bcl-2 protein family in the mitochondria. *J Cell. Physiol.* 195: 158-167, 2003
2. Konishi, A., Shimizu, S., Hirota, J., Takao, T., Fan, Y., Matsuoka, Y., Zhang, L., Yoneda, Y., Fujii, Y., Skoultchi, A. I., and Tsujimoto Y. Involvement of histone H1.2 in apoptosis induced by DNA double-strand breaks. *Cell* 114: 673-688, 2003

3. Sugioka, R., Shimizu S., Funatsu, T., Tamagawa, K., Sawa Y., Kawakami, T and Tsujimoto, Y. BH4-domain peptide from Bcl-xL exerts anti-apoptotic activity in vivo. *Oncogene*, 22: 8432-8440, 2003
4. Shinzawa, K. and Tsujimoto, Y. PLA<sub>2</sub> activity is required for nuclear shrinkage in caspase-independent cell death. *J. Cell Biol.*, 163, 1219-1230, 2003

##### 2. 学会発表

(外国学会)

Tsujimoto, Y.  
Regulation of cell death by Bcl-2 family of proteins  
Cold Spring Harbor meeting  
"Programmed Cell Death"  
9/17~9/21, 2003  
New York, USA

Tsujimoto, Y.  
A role of mitochondria in cell death  
Keystone Symposium "Apoptosis in Biochemistry and Structural Biology"  
2/3~2/8, 2004  
Colorado, USA

(国内学会)

辻本 賀英  
Bcl-2 ファミリーたんぱくによる細胞

死制御  
日本薬学会第123年会 特別講演  
平成15年3月28日  
長崎

コンドリア膜透過性亢進因子の同定  
第26回日本分子生物学会年会  
平成15年12月11日  
横浜

辻本 賀英  
放射線とアポトーシス  
第46回日本放射線影響学会  
平成15年10月7日  
京都

H.知的財産権の出願・登録状況  
特になし

辻本 賀英  
Regulation of mitochondrial  
membrane permeability during cell  
death  
第76回日本生化学会大会  
平成15年10月17日  
横浜

辻本 賀英  
DNA damage-induced cell death for  
cancer therapy  
第18回日仏がんワークショップ  
平成15年10月30日  
大阪

清水 重臣、辻本 賀英  
Bcl-2 ファミリー蛋白による細胞死制  
御機構の解析  
第26回日本分子生物学会年会  
平成15年12月11日  
神戸

小西 充昭、清水 重臣、辻本賀英  
X線誘導性アポトーシスにおけるミト

厚生科学研究費補助金（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作用の構造活性相関の解析

直井 信 岐阜県国際バイオ研究所  
客員研究部門（脳神経研究分野）部長

研究要旨 アルツハイマー病(AD)における主な症状はコリン細胞の変性と神経伝達物質アセチルコリン(AcC)の減少による痴呆である。AcCの分解酵素 Cholinesterase 阻害剤の投与により痴呆症状の改善が報告されたが、神経細胞の死を阻止する原因治療には至っていない。AD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薬剤を開発することが本研究の最終目的である。神経細胞の保護には細胞死を予防または阻止することと、細胞の増殖または活性化により機能を維持することが求められている。このために細胞死のシグナル伝達の細胞内機構を解明し、その介入を試みる必要がある。我々は既に神経毒や酸化ストレスによる細胞死の機序に関する研究から、ミトコンドリア (Mit) に存在する膜透過性に関与する permeability transition pore (PTP)の開口により細胞死が誘導される事を報告した。この細胞死の機構は抗アポトーシス活性を有する Bcl-2, Bcl-xl とアポトーシス誘発活性を有する Bax, Bad により調節されている。細胞死に際して先ず Mit 膜電位,  $\Delta\Psi_m$ , の低下が起り、cytochrome C の Mit より細胞質への流出、caspase の活性化、glyceraldehyde dehydrogenase (GAPDH) の核への移行と蓄積、最終的な核 DNA の断片化が段階的に起りアポトーシスに至る。

我々は *N*-propargyl-1(*R*)-aminoindan (Rasagiline), *N*-(2-heptyl)-*N*-methyl-propargylamin, selegiline (FP) 等の propargylamine 誘導体が Mit の PTP に作用し細胞死を抑制することを見出した。これらの propargylamine 等は内在性神経毒 *N*-methyl-*R*-salsolinol (NMRSal), 6-hydroxydopamine また peroxynitrite により誘導される細胞死を完全に阻止した。昨年までの研究でこの細胞死機構のどの段階に神経保護薬剤が作用し細胞死を抑制するかを明らかにしてきた。Propargylamine 誘導体は Mit の PTP に直接作用しその開口を阻止し細胞死を抑制することを培養神経細胞モデル