

と単離 Mit を用い証明した。則ち、Rasagiline は MMRSal による膜電位の低下、蛍光色素 Rhodamine 123 の Mit からの流出と Mit の膨潤を阻止した。またこの Mit の PTP の制御は propargylamine の R 体により選択的に行われ、Mit 外膜に propargylamine の結合タンパクが存在することが示唆された。

Rasagiline による神経細胞保護活性の機序をさらに検討したところ、PTP にたいする直接的な作用以外に、Rasagiline が Bcl-2 のタンパクと mRNA レベルを増加させることを見いだした。Rasagiline による遺伝子の誘導は Bcl-2, Bcl-xL 等抗アポトーシス活性を持つものに限られ、細胞死を誘導する Bax, Bad 等のレベルには影響しなかった。我々は Rasagiline とその類似構造物質が catalase, superoxide dismutase (SOD) 等の抗酸化酵素の活性を増加することを報告したが[Carrillo et al., Life Sci. 67 (2000) 577-585]、最近神経細胞に選択的な栄養因子 glia cell line-derived nutrition factor (GDNF) が Rasagiline により誘導されることを見いだした。これらの結果から propargylamine が細胞に内在するシグナル機構を活性化し、神経細胞の保護活性を有するタンパクを広く誘導し、神経細胞一般を保護する可能性が示唆された。

本年度においては従来の結果も合わせ、神経細胞の保護活性に必要な構造活性相関を更に検討した。特に Mit PTP の安定化と細胞保護活性を持つ遺伝子、例えば Bcl-2、の発現に関与する化学構造につき、aminoindan 誘導体と benzofuran 誘導体 [1-(benzofuran-2-yl)-2-propylaminopentane]につき検討した。特に cholinesterase を阻害する carbamate 基をもつ Rasagiline 誘導体、TV3326 [(N-propargyl)-(3R)-aminoindan-5-yl]-ethyl methyl carbamate]につき検討した。

- 1) 神経細胞の保護に必要な propargylamine 誘導体の化学構造を検討した。図 1 に示すように aminoindan と benzofuran の疎水性構造を持つ化合物で、propargyl 基の有無、その光学活性と細胞保護活性との相関を検討した。神経細胞の保護作用は Mit 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 等の化学構造特に光学異性体の差が保護活性を決定することから、Mit 外膜に存在する結合タンパクを同定することを試み

た。我々は最近内在性神経毒 MMRsal が type A monoamine oxidase (MAO-A) と結合し、Mit PTP を開口し、アポトーシスシグナルを活性化することを明らかとした。この結果から Rasagiline と MAO-A との関連を検討した。

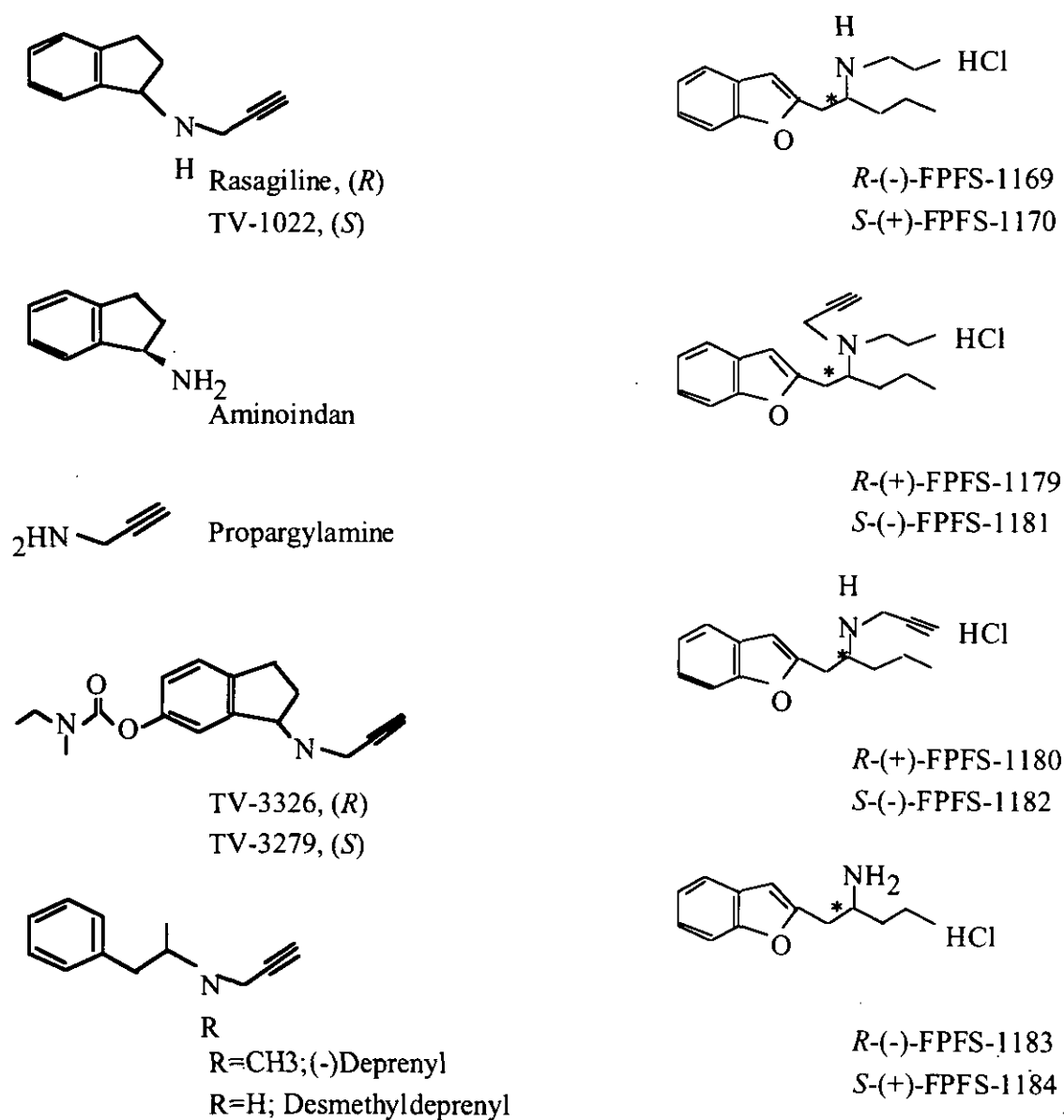


図 1。細胞保護活性を検討した Rasagiline と FPFS-1100 [*R*-(-)-1-(benzofuran-2-yl)-2-propylaminopentane] 関連化合物の構造。Rasagiline 誘導体では、aminoindan 構造との関連を、また FPFS-1100 誘導体では側鎖の構造と絶対化学構造との関連を、膜透過性亢進の抑制、Bcl-2 の誘導、細胞死に対する活性を検討した。

## A. 研究目的

神経変性疾患において酸化ストレス、Mit 機能不全, または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、AD 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が考えられる。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。その一つ(-)deprenyl (selegiline, FP)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。(-)deprenyl 以外にも Rasagiline [*N*-propargyl-1(*R*)aminoindan] 等の propargylamine 誘導体が内在性神経毒 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。Propargylamine 誘導体は Mit における膜透過性の変化を阻止し、下流の細胞死カスケイ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 *N*-(2-heptyl)-*N*-methyl-propargylamine (aliphatic amines)などが細胞保護活性を示した。その内で Rasagiline が最も強力に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た。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、全く化学構造の異なる FPFS-1100 誘導体も検討した。これらの結果から AD に対して現在行われている神経伝達物質 AcC 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目的とした。

## 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 Mit 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有する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、また FPFS1100 誘導体は藤本製薬から提供されてものを用いた。

$\Delta\Psi_m$  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。

Mit は SH-SY5Y 細胞、MAO-A, MAO-B を各々 Knockout したマウス肝臓 (USA, J. Shih 教授提供) から調製し、MAO 活性は kynuramine を用いた蛍光法、また NMRSal の結合を HPLC-ECD 法で測定した。

### C. 研究結果

1) Mit 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 Carbamyl 基 (TV3326)、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。

この結果はまた propargylamine を用い更に証明された。図 2 に示すように、NMRSal は  $\Delta\Psi_m$  を低下させるが、1 M-10 nM の propargylamine はその低下を阻止した。

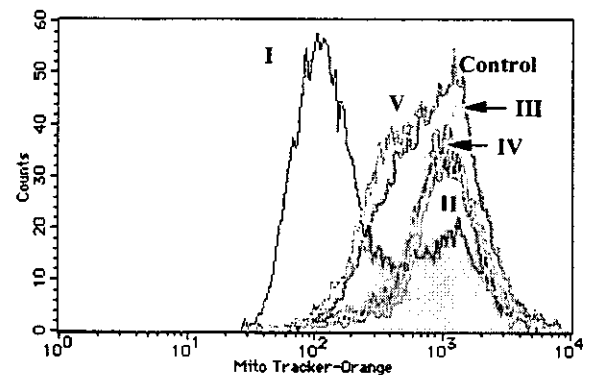


図 2。Propargylamine による  $\Delta\Psi_m$  の安定化。SH-SY5Y 細胞 (Control) に 500 nM NMRSal (I) を添加し 24 時間培養すると  $\Delta\Psi_m$  は著明に低下する。Propargylamine は 1 M (II), 100 nM (III), 10 nM (IV) の濃度で  $\Delta\Psi_m$  の低下を阻止する。V: 細胞に 1 M propargylamine を添加。

FPFS1100 誘導体では、propylamino-pentane 基の絶対化学構造が  $\Delta\Psi_m$  の安定を決定した。即ち右旋性のものが活性を持ったが、左旋性のもとには活性をしめさなかった。また propylamino-pentane 基を propargyl 基に置換したのも同様の活性を示した。

NMRSal による SH-SY5Y 細胞のアポトーシスにたいする保護活性と化学構造の関連を検討したが、細胞死を抑制する活性は PT 阻止能と同様であり、

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 M, 100-10 nM の 2 の濃度で bcl-2 の mRNA とタンパクレベルを有為に増加した。今回 aminoindan 構造を持たない propargylamine でも 100-1  $\mu$ M の濃度において Bcl-2 タンパクを増加させた (図 3)。Propargyl 基を持たない aminoindan も Bcl-2 誘導活性を示したが、あまり著明ではなかった。

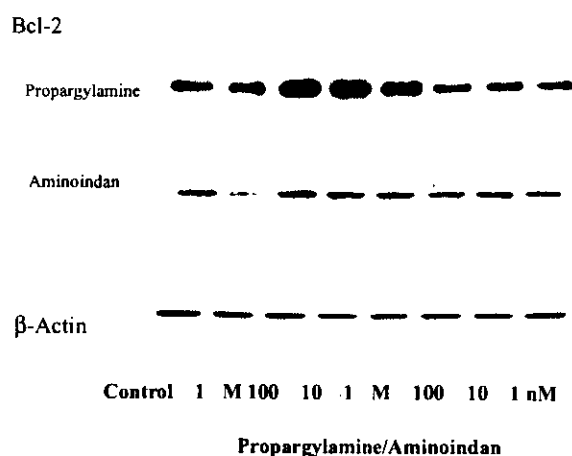


図 3. Propargylamine, aminoindan による Bcl-2 タンパクの誘導。SH-SY5Y 細胞に 1 M-1 nM の propargylamine, aminoindan を添加、24 時間培養後、Bcl-2 タンパクを Western blot により測定した。

FPDS-1100 誘導体でも propargylamine

基を持つ FPFS-1180 と propylamine 基を持つ FPFS-1169 が共に Bcl-2 誘導活性を示した。

これらの結果は propargylamine, または proylamino 基が  $\Delta\Psi_m$  の安定化と Bcl-2 の誘導に必須であることを示している。

3) Rasagiline による  $\Delta\Psi_m$  安定化の機序

NMRSal は Mit 外膜に存在する MAO-A を介し SH-SY5Y 細胞と単離 Mit において PTP の開口をもたらし、膜透過性を亢進させ、アポトシスを惹起する。MAO-A のみを発現している SH-SY5Y 細胞において、Type B MAO の阻害剤である Rasagiline は神経細胞保護活性を示す。事実 Rasagiline は NMRSal, PK11195 (ligand of peripheral benzodiazepine receptor) の Mit 外膜との結合は阻害しないのにも拘わらず、アポトーシスシグナルの活性化を阻止する。MAO-A, MAO-B との関連から Rasagiline の作用機序を検討するために、SH-SY5Y 細胞に MAO-B を遺伝子の導入により発現させた。MAO-B 活性は MAO-A 活性の約 10 倍発現したが、Rasagiline の神経保護活性は変化せず、MAO-A が神経毒 NMRSal による細胞死と Rasagiline による神経保護のシグナルを調節することが示された。事実 Rasagiline は精製した MAO-A の活性を非拮抗的に阻害し、MAO-A に構造変化をもたらすことが示唆された。

#### D. 考察

Rasagiline と類似の化学構造を持つ propargylamine 類が Mit 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、神経保護活性は主に propargyl 基が関与していることが propargylamine による結果からも証明された。

また MAO-A が Mit における細胞死シグナルの活性化に関与する可能性があり、神経細胞保護剤の多くが MAO-B に対し阻害活性を持つことから細胞内機序の研究に新たな発展が期待出来る。特に MAO-B 阻害剤の中から新たな神経保護剤が発見出来ると考えられ、新たな構造を持つ薬剤を検索したい。

従来の我々の研究から Rasagiline により細胞の生死に関与する遺伝子が有意に誘導された。Rasagiline kinase 系の活性化により、NF- $\kappa$ 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。この詳細な機序を今後明らかにしたい。

我々の結果は、経口投与可能な薬剤が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こと、また

そ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する薬剤の投与は神経変性疾患の原因治療として期待される。今後さらに神経保護薬の細胞保護活性を動物モデルで検討すると共に、臨床サンプルでこれら細胞保護に関与する活性物質を同定し神経細胞保護能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 Mit の膜電位の安定化と、細胞に内在する抗アポトーシス機構を活性化し細胞死を阻止することを明らかにした。Cholinesterase 阻害基をもつ、TV3326 でもこれら 2 の活性が認められたことから、TV3326 により神経伝達物質 AcC を増加させると共に神経細胞を保護することで、AD における病状の進行を阻止する効果が期待される。さらに MAO-A の阻害剤の中からも、構造活性相関を広く検討し、より有効な薬剤を開発すると共に、神経細胞内における生存への情報伝達系の活性化の機序を解明したい。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Naoi M, Maruyama W, Nagy GM (2004) Dopamine-derived salsolinol derivatives as endogenous monoamine oxidase inhibitors: Occurrence, metabolism and function in human brains. *NeuroToxicol.*, 25: 193-204.
- 2) Maruyama W, Yi H, Takahashi T, Shimazu S, Ohde H, Yoneda K, Iwasa K, Naoi M. (2004) Neuroprotective function of *R*-(-)-(benzofuran-2-yl)-2-propylamino-pentane, [*R*-(-)-BPAP], against apoptosis induced by *N*-methyl(*R*)salsolinol, an endogenous dopaminergic neurotoxin, in human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Life Sci.*, in press.
- 3) Maruyama W, Weinstock M, Youdim MBH, Nagai M, Naoi M. (2003) Anti-apoptotic action of anti-Alzheimer drug, TV3326 [(*N*-propargyl)-(3*R*)-aminoindan-5-yl]-ethyl methyl carbamate, a novel cholinesterase-monoamine oxidase inhibitor. *Neurosci. Lett.*, 341: 233-236.
- 4) Naoi M, Maruyama W, Youdim MBH, Yu P, Boulton AA (2003) Anti-apoptotic function of propargylamine inhibitors of type-B -monoamine oxidase. *Inflammopharmacol.*, 11: 175-181.
- 5) Shamoto-Nagai M, Maruyama W, Kato Y, Isobe K, Tanaka M, Naoi M, Osawa T. (2003) An inhibitor of mitochondrial complex I, rotenone, inactivates proteasome by aggregation of oxidized proteins in SH-SY5Y cells. *J. Neurosci. Res.* 74: 589-597.
- 6) Youdim MBH, Amit T, Falach-Yogev M, Am OB, Maruyama W, Naoi M. (2003) 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: 1635-1641.
- 7) Yamamoto T, Ohkuwa T, Itoh H, Sato Y, Naoi M. (2003) Relation between voluntary physical activity and oxidant/antioxidant status in rats. (2003) *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.*, 135: 163-168.
- 8) Naoi M, Maruyama W. (2004) Monoamine oxidase and the inhibitors: Involvement in cell death and survival of neurons. In: *Milestones in monoamine research.* Lörök TI (ed), Medicina Publishing House, Budapest, in press.
- 9) Naoi M, Maruyama W, Shamoto-Nagai M, Kato Y, Tanaka M. (2004) Oxidative stress in mitochondrial: The involvement in neurodegenerative diseases. In: *Oxidative Stress, Inflammation and Health*, Surh Y-J. (ed) Merceel Dekker, New York, in press.
- 10) Maruyama W, Akao Y, Nitta A, Naoi M. (2004) Neuroprotection by rasagiline, *N*-propargyl-1*R*(+)-aminoindan, and related propargylamines is mediated by suppression of mitochondrial death signal and induction of anti-apoptotic genes. In: *Oxidative Stress, Inflammation and Health*, Surh Y-J. (ed) Merceel Dekker, New York, in press.
- 11) 直井信、丸山和佳子 (2004) 神経毒によるパーキンソン病モデル:

細胞死機序の解明と神経保護薬の開発, 脳の科学 増刊「パーキンソン病のすべて」 26:157-164.

- 12) 丸山和佳子、直井信 (2004) 神経保護薬、内科 印刷中
- 13) 丸山和佳子、直井信 (2004) Parkinson 病の発症機序-Up date, 学術のあゆみ、208: 477-481
- 14) 丸山和佳子、直井信 (2003) 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、Prog. Med 23: 2724-2727.
- 15) 丸山和佳子、直井信 (2003) 弧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 7: 64-67

## 2. 学会発表

- 1) Naoi M, Maruyama W, Yi H, Shamoto-Nagai, Akao Y. 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.
- 2) Yi H, Maruyama W, Akao Y, Naoi M. "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.
- 3) Maruyama W, Nagai M, Naoi M. "Involvement of mitochondrial dysfunction and proteasome inactivation in the pathogenesis of Parkinson's disease" 33<sup>th</sup>

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

- 4) Naoi M, Maruyama W, Nitta A, Hirata Y. Molecular mechanism underlying the induction of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and Bcl-2 through the activation of NF-kB transcription factor by *N*-propargyl-1(*R*)aminoindan, rasagiline, in neuroblastoma SH-SY5Y cells . 33<sup>th</sup> Neuroscience Meeting, November 8-12, 2003, New Orleans, Louisiana, USA, p. 60.
- 5) Maruyama W, Naoi M, Youdim MBH "Intracellular mechanism of neuroprotection by rasagiline, an anti-Parkinson drug", 8<sup>th</sup> International Symposium on Parkinson Research, November 6-8, 2003, New Orleans, Louisiana, USA, p. 2.
- 6) Naoi M., Maruyama W. "Oxidative stress in mitochondria: the role in neurodegenerative disorders" "Inflammatory and Oxidative Cell Death and Tissue Damage: Molecular mechanisms, Biomarkers, and Chemo-prevention", May 28-29, 2003, Seoul, South Korea, p. 80.
- 7) Maruyama W., Naoi M. "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.



- 8) 丸山和佳子、直井信「弧発性パーキンソン病にけるミトコンドリア機能不全と酸化修飾タンパク増加の機序」第44回 日本神経学会総会、平成15年5月15-17日、横浜
- 9) 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
- 10) 丸山和佳子、直井信「Complex I 阻害剤であるロテノンとはたば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、p. 266
- 11) 直井信、丸山和佳子、「ラサジリンはNF-kappaB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、p. 266
- 12) Maruyama W, Nitta A, Shamoto-Nagai M, Hirata Y, Akao Y, Naoi M. *N*-Propargylamine-1(*R*)-aminoindam, rasagiline, increases BCL-2 and glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in neuroblastoma SH-SY5Y cells through activation of NF-kB transcription factor. 第76回日本生化学会大会 平成15年10月15-18日、横浜、p. 859
- 13) Nagai-Shamoto M, Maruyama W, Kozuka M, Kato Y, Isobe K, Tanaka M, Naoi M, Osawa T. 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、p. 860
- 14) 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
- 15) 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
- G. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得  
なし
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他

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 教授

**研究要旨** propargylamine 化合物である rasagiline の神経細胞保護作用を明らかにするために、活性化ミクログリアによる神経細胞障害モデルと、IFN- $\gamma$ 、A $\beta$ による神経細胞障害モデルを用いて検討した。Rasagiline には、活性化ミクログリアの産生する炎症性サイトカイン、活性酸素、NO を抑制する作用は認められず、活性化ミクログリアによる神経細胞障害は抑制できなかった。しかしながら、IFN- $\gamma$ 、A $\beta$ による神経細胞障害については抑制効果が認められた。さらに、神経細胞障害の初期に dendritic beading として認められる dendrite の障害に対しても抑制効果を示した。

#### A. 研究目的

近年、アルツハイマー病などの神経変性疾患において活性化ミクログリアの産生する炎症性サイトカイン、NO、活性酸素、興奮性アミノ酸などの分子が神経細胞障害に関与していることが明らかとなっている。また、IFN- $\gamma$ 、A $\beta$ は、direct に神経細胞を障害する。そこで、これらの神経細胞障害に対する rasagiline の保護作用について検討した。

#### B. 研究方法

C57B6J マウスから分離・培養したミクログリア、大脳皮質神経細胞の共

培養を用い、LPS、IFN- $\gamma$  でミクログリアを活性化し、神経細胞障害を誘導した。更に IFN- $\gamma$ 、A $\beta$  を直接、培養神経細胞に添加し、神経細胞障害を誘導した。これらの系に rasagiline を加え、その保護作用を検討した。dendrite の障害については、抗 MAP2 抗体で免疫染色し、その形態を検討した。

#### C. 研究結果

rasagiline には、活性化ミクログリアの産生する炎症性サイトカイン (TNF  $\alpha$ 、IL1  $\beta$ 、IL6)、NO、活性酸素を抑制する作用は認められず、活性化

ミクログリアを介した神経細胞障害は抑制されなかった。一方、IFN- $\gamma$ 、A $\beta$ による神経細胞障害については、rasagiline による抑制効果が認められた。また、rasagiline は dendrite の障害の初期変化による dendritic beading の形成も抑制した。

#### D. 考察

炎症性サイトカイン、NO、活性酸素、興奮性アミノ酸等の分子は、神経細胞に対して障害作用を示すことから、ミクログリアの活性化を制御することにより、神経細胞障害を軽減することが期待される。今回の検討では、rasagiline にはミクログリアの活性化を抑制する作用は認められなかった。しかしながら、rasagiline は IFN- $\gamma$ 、A $\beta$ による神経細胞障害を抑制することから、神経保護薬として有用と思われた。

#### E. 結論

rasagiline には IFN- $\gamma$ 、A $\beta$ による神経細胞障害を抑制する作用があり、アルツハイマー病の治療薬として期待される。

#### F. 健康危険情報

健康危険の危惧はなく、本年度の実験でも実験者の健康に問題はなかった。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. MIZUNO Tetsuya, KUROTANI Tohru, KOMATSU Yukio, KAWANOKUCHI Jun, KATO Hideki, MITSUMA Norimasa and SUZUMURA Akio: Neuroprotective role of phosphodiesterase inhibitor ibudilast on neuronal cell death induced by activated microglia. Neuropharmacology. 2003 in press.
2. KAWANOKUCHI Jun, MIZUNO Tetsuya, KATO Hideki, MITSUMA Norimasa and SUZUMURA Akio: Effects of interferon- $\beta$  on functions of microglia as inflammatory and antigen presenting cells in the central nervous system. Neuropharmacology. 2003 in press.
3. SUZUMURA Akio, ITO Atsusi and MIZUNO Tetsuya: Phosphodiesterase inhibitors suppress IL-12 production with microglia and T helper 1 development. Multiple Sclerosis.9:574-578, 2003.
4. MIZUNO Tetsuya, KAWANOKUCHI Jun, NUMATA Kenji and SUZUMURA Akio: Production and neuroprotective functions of fractalkine in the central nervous system. Brain Research. 979: 65-70, 2003.
5. 水野哲也、錫村明生. 免疫療法の新しい展開ーエフェクターフェイズの抑制, 神経免疫学, 11:215-219, 2003.

6. 加藤秀紀、錫村明生、脳病巣のサイトカイン動態、特集 多発性硬化症、日本臨床、61：1428-1434、2003.
7. 錫村明生、ミクログリアと脳内免疫能、特集；ミクログリアの機能と病態、脳21、6：256-261、2003.

## 2. 学会発表

1. 川ノ口潤，加藤秀紀，満間典雅，水野哲也，錫村明生：インターフェロンβのミクログリアに対する作用．第15回日本神経免疫学会学術集会，2003，3．（長崎）
2. 加藤秀紀，伊藤淳，川ノ口潤，満間典雅，水野哲也，錫村明生：免疫性脱髄における PACAP の効果．第15回日本神経免疫学会学術集会，2003，3．
3. 阪野正大，水野哲也，加藤秀紀，

川ノ口潤，錫村明生：ラジカル消去薬 Edaravone のミクログリアに対する効果．第15回日本神経免疫学会学術集会2003，3．（長崎）

4. MIZUNO Tetsuya, KAWANOKUCHI Jun, SUZUMURA Akio: Production and neuroprotective functions of fractalkine in the central nervous system. 55th Annual meeting, American Academy of Neurology, 2003, 3. (Honolulu, USA)

5. 水野哲也，川ノ口潤，加藤秀紀，満間典雅，錫村明生：ホスフォジエステラーゼ阻害薬による。神経細胞死の抑制効果．第44回日本神経学会総会2003，5．（横浜）

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

神経細胞死におけるミトコンドリアシグナルの関与

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、細胞外により多く放出される $\beta$ -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 蛋白を過剰発現させた、さらに、APP 蛋白の 684 番目のヒスチジンをアルギニンに変えた変異細胞株を作成した。APP-wild type 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伸長が悪く、シナプス連結は失われていた。さらに定常状態において他のトランスフェクタントに比べ、プロテアゾーム活性は低下し、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-wild type 過剰発現株では感受性が高く、活性酸素種の増大がみられアポトーシスに容易に誘導された。同じ現象がプロテアゾーム阻害剤処理においても観察された。以上のことから、アミロイド前駆蛋白、 $A\beta$ 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、 $A\beta$ 蛋白が細胞死に関与していることが示された。

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、老人斑であり、これらの病態は $\beta$ -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 $\beta$ -amyloid ( $A\beta$ )が真に神経細胞死に関係しているか、さらに  $A\beta$ 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、 $A\beta$  蛋白および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  $\mu$ 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。ミトコンドリア膜電位については MitoTracker プローブを用い、FACS により測定した。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、ウェ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 80%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。突起-突起のシナプス連結は失われていた。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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100  $\mu$ 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 1.5 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 発生物資) 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  $\mu$ M まではアポトーシス細胞は多く観察された。
- 6) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> に PSI を付加した系では、PSI 1  $\mu$ M に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50  $\mu$ 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  $\mu$ M + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50  $\mu$ M / PSI 1  $\mu$ 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 過剰発現細胞では定常状態で有意に低く、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 mRNA レベルに比べ、蛋白レベルで著明に低下していた。さらにその蛋白レベルは APP 発現と逆相関していた。

#### 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 wild type および mutant APP を安定して過剰発現させた細胞株を確立できた。
- 2) W-APP 過剰発現細胞では酸化ストレス (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、NO)、プロテアゾーム活性阻害剤に対して感受性が高く、細胞死 (アポトーシス) 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低下し、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 負荷により容易に ROS は増大した。ATP 産生は低下する傾向があった。
- 4) wild type-APP 過剰発現細胞は形態

の異常が観察され、シナプスの形成不全が推察された。

以上より、APP 過剰発現により、A $\beta$  (1-40) がより多く分泌される系が確立され、APP ミュウタントにおいても $\beta$ -secretase が影響を受けず、A $\beta$  が分泌されていた。今回の結果から、A $\beta$  が神経細胞死への感受性を亢進させていることが明らかになった。さらに APP 代謝が、プロテアゾーム活性、bcl-2 蛋白の修飾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処理能の低下、プロテアゾーム活性の低下は一連の結果と考えられる。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、その解明はアミロイド前駆蛋白代謝をより理解するうえで重要であり神経細胞保護薬の開発に寄与できると考えられる。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

(1) Mishima S, Matsumoto K, Futamura Y,

Araki Y, Ito T, Tanaka T, Iinuma M, Nozawa Y, Akao Y. Antitumor effect of stilbenoids from *Vateria indica* against allografted sarcoma S-180 in animal model. *J Exp Ther Oncol.* 2003; 3(5): 283-288.

(2) Maruyama W, Nitta A, Shamoto-Nagai M, Hirata Y, Akao Y, Yodim M, Furukawa S, Nabeshima T, Naoi M. N-Propargyl-1 (R)-aminoindan, rasagiline, increases glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in neuroblastoma SH-SY5Y cells through activation of NF-kappaB transcription factor. *Neurochem Int.* 2004; 44(6): 393-400.

(3) Matsui T, Hogetsu K, Akao Y, Tanaka M, Sato T, Kumasaka T, Tanaka N. Crystallization and X-ray analysis of the N-terminal core domain of a tumour-associated human DEAD-box RNA helicase, rck/p54. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2004; 60(Pt 1): 156-159.

(4) Ohguchi K, Banno Y, Akao Y, Nozawa Y. Involvement of phospholipase D1 in melanogenesis of mouse B16 melanoma cells. *J Biol Chem.* 2003, in press.

(5) Kito M, Matsumoto K, Wada N, Sera K, Futatsugawa S, Naoe T, Nozawa Y, Akao Y. Antitumor effect of arsenic trioxide in murine xenograft model. *Cancer Sci.* 2003; 94(11): 1010-1014.

(6) Matsumoto K, Akao Y, Kobayashi E, Ohguchi K, Ito T, Tanaka T, Iinuma M, Nozawa Y. Induction of Apoptosis by Xanthenes from Mangosteen in Human Leukemia Cell Lines. *J Nat Prod.* 2003; 66(8):1124-1127.

(7) Ohguchi K, Tanaka T, Kido T, Baba K, Iinuma M, Matsumoto K, Akao Y, Nozawa Y. Effects of hydroxystilbene derivatives on tyrosinase activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;307(4):861-3.

(8) Akao Y, Yoshida H, Matsumoto K, Matsui T, Hogetu K, Tanaka N, Usukura J. A tumour-associated DEAD-box protein, rck/p54 exhibits RNA unwinding activity toward c-myc RNAs in vitro.



Genes Cells. 2003;8(8):671-6.

(9) Ito T, Akao Y, Yi H, Ohguchi K, Matsumoto K, Tanaka T, Iinuma M, Nozawa Y.

Anti-tumor effect of resveratrol oligomers against human cancer cell lines and the molecular mechanism of apoptosis induced by vaticanol C.

Carcinogenesis. 2003;24(9):1489-1497.

(10) Ohguchi K, Tanaka T, Ito T, Iinuma M, Matsumoto K, Akao Y, Nozawa Y. Inhibitory effects of resveratrol derivatives from dipterocarpaceae plants on tyrosinase activity.

Biosci Biotechnol Biochem. 2003 ;67(7):1587-9.

(11) Akao Y, Maruyama H, Matsumoto K, Ohguchi K, Nishizawa K, Sakamoto T, Araki Y, Mishima S, Nozawa Y.

Cell growth inhibitory effect of cinnamic acid derivatives from propolis on human tumor cell lines.

Biol Pharm Bull. 2003;26(7):1057-9.

(12) Miyaji K, Nakagawa Y, Matsumoto K, Yoshida H, Morikawa H, Hongou Y, Arisaka Y, Kojima H, Inoue T, Hirata I, Katsu K, Akao Y.

Overexpression of a DEAD box/RNA helicase protein, rck/p54, in human hepatocytes from patients with hepatitis C virus-related chronic hepatitis and its implication in hepatocellular carcinogenesis.

J Viral Hepat. 2003;10(4):241-8.

(13) Ohguchi K, Tanaka T, Iliya I, Ito T, Iinuma M, Matsumoto K, Akao Y, Nozawa Y. Gnetol as a potent tyrosinase inhibitor from genus Gnetum.

Biosci Biotechnol Biochem. 2003;67(3):663-5.

(14) Matsumoto K, Akao Y, Kobayashi E, Ito T, Ohguchi K, Tanaka T, Iinuma M, Nozawa Y. Cytotoxic Benzophenone Derivatives from Garcinia Species Display a Strong Apoptosis-Inducing Effect against Human Leukemia Cell Lines.

Biol Pharm Bull. 2003;26(4):569-71.

(16) Yamada Y, Hamajima N, Kato T, Iwata H,

Yamamura Y, Shinoda M, Suyama M, Mitsudomi T, Tajima, Kusakabe S, Yoshida H, Banno Y, Akao Y, Tanaka M, Nozawa Y. Association of a polymorphism of the phospholipase D(2) gene with the prevalence of colorectal cancer.

J Mol Med. 2003;81(2):126-31.

(17) Luo JM, Yoshida H, Komura S, Ohishi N, Pan L, Shigeno K, Hanamura I, Miura K, Iida S, Ueda R, Naoe T, Akao Y, Ohno R, Ohnishi K. Possible dominant-negative mutation of the SHIP gene in acute myeloid leukemia.

Leukemia. 2003;17(1):1-8.

#### H. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

リグノフェノール系誘導体を含む哺乳動物細胞保護剤〔特願 2003-035647〕

##### 3. その他

なし

## 別紙 5

研究成果の刊行に関する一覧表  
書籍

著者氏名	論文タイトル 名	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社 名	出版地	出版年	ページ
直井信、 丸山和佳子	神経毒による パーキンソン 病モデル： 細胞死機序の 解明と神経保 護薬の開発		脳の科学 増刊「パーキ ンソン病のす べて」	脳の科 学社	東京	2004	26:157 -164
丸山和佳 子、 直井信	Parkinson 病の 発症機序-Up date		医学のあゆみ Parkinson 病 最新動向	医学の あゆみ	東京	2004	208:47 7-481
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	マデイ カル ドウ	東京	2003	7: 64- 67

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Naoi M, Maruyama W, Nagy GM.	Dopamine-derived salsolinol derivatives as endogenous monoamine oxidase inhibitors: Occurrence, metabolism and function in human brains.	Neuro-Toxicol.	25	193-204	2004
Maruyama W, Nitta A, Shamoto-Nagai M, Hirata Y, Akao Y, Youdim M, Furukawa S, Nabeshima T, Naoi M	<i>N</i> -Propargyl-1( <i>R</i> )-aminoindan, rasagiline, increases glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in neuroblastoma SH-SY5Y cells through activation of NF-kappaB transcription factor	Neurochem Int	44	393-400	2004
Maruyama W, Weinstock M, Youdim MBH, Nagai M, Naoi M	Anti-apoptotic action of anti-Alzheimer drug, TV3326 [( <i>N</i> -propargyl)-83R]-aminoindan-5-yl]-ethyl methyl carbamate, a novel cholinesterase-monoamine oxidase inhibitor	Neurosci Lett	341	233-236	2003
Shamoto-Nagai M, Maruyama W, Kato Y, Isobe K, Tanaka M, Naoi M, Osawa T	An inhibitor of complex I, rotenone, inactivates proteasome by aggregation of oxidized proteins in SH-SY5Y cells	J Neurochem Res	74	589-597	2003
Youdim MB, Amit T, Falach-Yogev M Am OB, Maruyama W, Naoi M	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	1635-1641	2003
Naoi M, Maruyama W, Youdim MBH, Yu P, Boulton AA.	Anti-apoptotic function of propargylamine inhibitors of type-B monoamine oxidase.	Inflammo-pharmacol	11	175-181	2003
Yamamoto T, Ohkuwa T, Itoh H, Sato Y, Naoi M	Relation between voluntary physical activity and oxidant antioxidant status in rats.	Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol	135	163-168	2003
Tsujimoto, Y.	Cell death regulation by the Bcl-2 protein family in the mitochondria	J. Cell. Physiol.	167	158-167	2003

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
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
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
Suzumura A., Ito A. and Mizuno T.	Phosphodiesterase inhibitors suppress IL-12 production with microglia and T helper 1 development.	Multiple Sclerosis	9	574-578	2003
Mizuno T., Kawanouchi J., Numata K. and Suzumura A.	Production and neuroprotective functions of fractalkine in the central nervous system.	Brain Research	979	65-70	2003
水野哲也、錫村明生.	免疫療法の新しい展開－エフェクターフェイズの抑制	神経免疫学	11	215-219	2003
加藤秀紀、錫村明生	脳病巣のサイトカイン動態	特集 多発性硬化症、日本臨床	61	1428-1434	2003
Mishima S, Matsumoto K, Futamura Y, Araki Y, Ito T, Tanaka T, Iinuma M, Nozawa Y, Akao Y.	Antitumor effect of stilbenoids from <i>Vateria indica</i> against allografted sarcoma S-180 in animal model.	J Exp Ther Oncol.	3	283-288.	2003
Ohguchi K., Bannno Y., Akao Y., Nozawa Y.	Involvement of Phosphatase D1 in Melanogenesis of Mouse B16 Melanoma cells	J. Biol. Chem.	279	3408-3412	2004