

200400336A

厚生労働科学研究費補助金

痴呆・骨折臨床研究事業

霊長類を用いたアルツハイマー病に対する経口治療薬
の開発とその臨床応用の試み
(H16-痴呆・骨折-001)

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 丸山和佳子

平成17（2005）年3月

目次

I. 総括研究報告書

霊長類を用いたアルツハイマー病に対する経口治療薬の開発とその臨床応用の
試み 1

丸山和佳子

II. 分担研究報告書

1. ニホンザルに対する propargylamine 化合物、rasagiline 投与による脳脊髄液中
神経栄養因子とアミロイド β -蛋白の変化 6

丸山和佳子

2. 行動等を指標としたニホンザルにおける rasagiline 投与時の副作用に関する
研究 13

鈴木樹理

3. 神経保護薬の作用点（ターゲットプロテイン）の解明に関する研究 14
辻本賀英

4. アミロイド前駆体蛋白および酸化ストレスによる神経細胞死の機序に関する
研究 21

直井信

5. アミロイド β -蛋白産生の分子機構 30

駒野宏人

6. 神経保護作用を有する疎水性ジペプチド Leu-Ile の結合蛋白の同定 34

新田淳美

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 47

IV. 研究成果の刊行物・別刷 55

厚生労働科学研究費補助金（痴呆・骨折臨床研究事業）
総括研究報告書

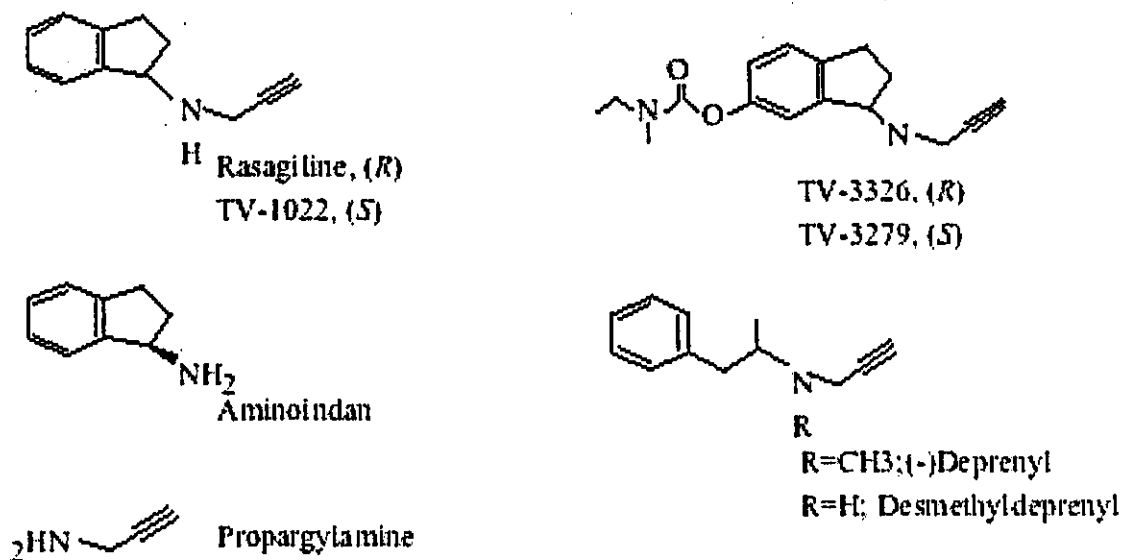
霊長類を用いたアルツハイマー病に対する経口治療薬の開発と
その臨床応用の試み

主任研究者 丸山和佳子 国立長寿医療センター研究所 部長

研究要旨

老年者に痴呆症（認知症）を引き起こす代表的な疾患であるアルツハイマー病の進行を遅延させ、できれば治癒させることができる治療法の開発は、高齢化社会を迎える日本において緊急の課題である。主任研究者らは脳内移行が良好で経口投与が可能である propargylamine 化合物の神経保護薬としての臨床応用に向けた研究を行ってきた。in vitro、in vivo の研究でミトコンドリア依存性細胞死シグナルを制御し、神経保護にはたらくことを証明した。本研究課題においては、これまでに得られた基礎的結果を発展させ、1) propargylamine 化合物の中による神経保護効果について霊長類を用いて検討するとともに、その効果の客観的評価法を確立する。2) propargylamine 化合物の作用部位、すなわち標的蛋白を同定する。この蛋白の少なくとも一部はミトコンドリアに存在することが示唆されているため、あわせてミトコンドリアにおける細胞死シグナルに関わる分子について明らかとする。ことを目的として研究を行った。その結果、1) については、オスニホンザルに対し、propargylamine 化合物である rasagiline を投与した。2mg/day、8 週間の投与を行いその安全性について確認するとともに（鈴木）、神経保護作用をもつ蛋白、特に神経栄養因子の増加効果（新田）と A β 生成低下効果（丸山）について、脳脊髄液の分析を行うことにより検討を行った。その結果、rasagiline は全身性の副作用を引き起こさず、行動学的にも大きな変化をきたさなかった。また、神経栄養因子と A β のレベルに関しては個体間のばらつきが大きかったが、rasagiline 投与後に神経栄養因子の増加傾向と、A β 1-42の低下傾向が認められた。今後、薬剤の効果を得るための至適量および投与方法を確立する必要があると考えられた。また、rasagiline 以外の低分子化合物として疎水性ジペプチド Leu-Ile にも神経栄養因子誘導作用が存在することが示され、その標的はシャペロンであることが証明された（新田）。一方

Propargylamine 化合物の標的分子はミトコンドリアに存在することが示唆されており、両化合物によるシグナル活性化がどこで収束し、同様な作用（神経保護蛋白の増加）を引き起こすのかを解明することが必要と考えられた。2) に関しては、ミトコンドリアにおける膜透過性に関わる因子、特に cyclophilin D が酸化ストレスあるいはCa負荷による細胞死に決定的な役割を果たすことが証明された（辻本）。これらの刺激はまさにアルツハイマー病における神経細胞死において、主要な役割を果たしていることが報告されている。さらに、アミロイド前駆蛋白（APP）を過剰発現した細胞株では、酸化ストレスに対して脆弱となっており、その原因の一つとして Bcl-2 などの細胞死シグナル抑制蛋白の低下が認められた（直井）。今後、propargylamine 化合物の作用部位とともに酸化ストレスによる細胞死シグナルの起動分子を解明することが必要と考えられた。また、APP から A β の生成を制御する γ -secretase 複合体についてその活性調節機構を検討した。さらに propargylamine 化合物は A β の生成を阻害することが in vitro で証明された（駒野）。



propargylamine 化合物の化学構造式

○丸山和佳子 国立長寿医療センター 部長； 鈴木樹理 京都大学霊長類研究所 助教授； 辻本賀英 大阪大学大学院 教授； 直井信 岐阜県国際バイオ研究所 部長； 駒野宏人 国立長寿医療センター 室長； 新田淳美 名古屋大学大学院 助教授

A. 研究目的

Propargylamine 化合物である selegiline、rasagiline、TV3324 は B 型モノアミン酸化酵素阻害薬として開発され、selegiline および rasagiline はパーキンソン病患者に対し酵素阻害により脳内カテコラミンを増加させることを目的として臨床使用がなされている（日本では selegiline のみが認可）。一方、主任研究者らの研究を中心とする世界各国の研究グループより、propargylamine 化合物は酵素阻害作用と独立した神経保護作用をもつことが報告されている。しかしながらその標的分子は未だ不明であった。さらに、これら propargylamine 化合物による神経保護効果を症状や進行速度にばらつきの多い神経変成疾患患者において臨床的に証明するためには、治療効果の客観的指標が必要である。主任研究者らのグループは propargylamine 化合物である rasagiline および selegiline が転写因子である NF- κ B の活性化を介して神経栄養因

子である glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) brain-derived neurotrophic factor (BDNF) や抗アポトーシス分子、BCL-2 を増加させ、同時にアルツハイマー病における神経細胞死に関与すると想定されているアミロイド β -蛋白 (A β) を低下させる作用を in vitro で見いだした。本年度の研究としては、1) 霊長類に薬剤を投与し、脳内から脳脊髄液中に漏出した神経栄養因子、および A β を測定することにより薬剤が in vitro のみならず生体の脳内で作用することを証明すること。2) propargylamine 化合物が最も顕著に抑制作用を示す酸化ストレスによる神経細胞死の機序について研究を行い、薬剤の標的分子を明らかとすること、を目的とし研究を行った。

B. 研究方法

オスニホンザル 8 頭を各々 4 頭の rasagiline 投与群、および非投与群に分け rasagiline (2mg/day) または生理食塩水を筋肉内投与した。投与前、投与後 1, 2, 4, 8 週後、および投与終了後 4 週後に腰椎穿刺により脳脊髄液を採取した。ELISA 法にて A β 1-40、1-42、GDNF、BDNF を測定した。動物の全身状態および行動を観察することにより、薬剤の全身性副作用について検討した（丸山、鈴木、新田）。さ

らに、propargylamine 化合物以外の低分子化合物で神経栄養因子増加作用をもつ疎水性ジペプチド Leu-Ile の結合蛋白の同定を行った(新田)。ミトコンドリアにおいて、膜透過性を制御する分子である cyclophilin D の欠損マウス系統を作成し、cyclophilin D の細胞死シグナルに及ぼす影響について検討した(辻本)。ヒト由来の神経芽細胞腫である SH-SY5Y 細胞に Human wild type と 684 番目の His から Arg への変異を持つ APP を発現させた。遺伝子導入細胞におけるラジカルレベル、酸化ストレスに対する脆弱性等を検討した。ラジカル、細胞死(アポトーシスとネクロトーシス)、ミトコンドリア膜電位 $\Delta\Psi_m$ は蛍光色素と fluorescence-activated cell sorter (FACS) を用い定量した。mRNA および蛋白の同定と定量は RT-PCR、immunoblotting によった(直井)。プレセニン(PS)複合体構成因子、PEN-2、APH-1、nicastirin は、PCR 法によって単離した。レトロウイルスベクターを用いて、PS 複合体構成因子の遺伝子を線維芽細胞に導入し、細胞の A β 産生に及ぼすこれら遺伝子の影響を解析した。A β の測定は、ELISA 法で定量した。遺伝子発現解析は、イムノプロット法により行った。Rasagiline や TV3324 の効果は、マウス由来の培養細胞株 Neuro 2a 細胞を、薬剤で、1 日あるいは 3 日処理後、A β

の測定により解析した(駒野)。

(倫理面への配慮)

ニホンザルを用いた実験については京都大学霊長類研究所実験倫理委員会で審査され許可を受けた。遺伝子導入マウスの実験は大阪大学医学部の動物実験安全委員会の許可の下に行った。

C. 研究成果

ニホンザルには rasagiline による全身性の副作用は認められなかった。投与群では A β 値の変動が認められ、1-40 には個体間のばらつきが大きかったものの、1-42 では 1 週間後増加の後低下する傾向が認められた。神経栄養因子については薬剤投与群で増加傾向が認められ、GDNF、BDNF とともに投与後 7 日目で有意な増加が認められた。Leu-Ile は、シャペロン蛋白である Hsc70 および Hsp70 と結合することが明らかとなった。

cyclophilin D 遺伝子欠損マウスは正常に出産、発育した。本マウス肝臓から単離したミトコンドリア、および心臓虚血モデルマウスを用いた実験で、cyclophilin D は酸化ストレスやカルシウム負荷による細胞死に陥りやすいことが証明された。APP 過剰発現細胞は酸化ストレスに対し脆弱であった。その原因の一つは本細胞においてミトコンドリア外膜において膜透過

性を維持する BCL-2 が減少していることであることが示唆された。PS 複合体の構成因子のうち、PEN-2 が活性に促進的に APH-1 が抑制的に作用した。

D. 考察

Rasagiline のヒトに対する投与量は 0.5 mg/day とされており、今回のニホンザルへの投与量は過量であった可能性が高い。それにも関わらず大きな副作用が認められなかったことは、本薬剤がきわめて安全性の高いものであることを示している。さらに、今回の研究で、rasagiline が脳内の神経栄養因子や A β のレベルに影響を及ぼすことが証明された。個体間でのばらつきが大きかったことの理由として、細胞実験における proparagylamine 化合物による効果は Bell-shaped であるため、至適濃度の投与がなされていなかった可能性がある。また、疎水性ジペプチド Leu-Ile を用いた実験で、proparagylamine 化合物以外の神経栄養因子を増加させる低分子化合物の中には、ミトコンドリア以外の標的蛋白をもつものが存在する可能性が示唆された。今後、これらに共通のシグナル伝達系を明らかとすることが必要である。アルツハイマー病における神経細胞死には最終的に酸化ストレスが重要な役割を

果たしていると考えられる。しかしながらその詳細は明らかではなかった。本研究により、アルツハイマー病の発症に関わる遺伝子である APP が酸化ストレスへの脆弱性を増加させ、ミトコンドリアにおける cyclophilin D が酸化ストレスによる細胞死シグナルを起動することが示された。この場合、APP の増加による細胞死は必ずしも A β の増加を必要としないため、アルツハイマー病における細胞死のどの局面を反映しているかは不明ではあるが、重要な知見と考えられた。

E. 結論

Propargylamine 化合物は霊長類においても脳内の神経保護蛋白を増加させる可能性があり、ヒトへの応用が期待できる。今後、薬剤の至適投与量を決定するための詳細な研究が必要である。

F. 健康危険情報

特になし

H. 知的財産の出願・登録

分担研究報告書を参照

厚生労働科学研究費補助金（痴呆・骨折臨床研究事業）
分担研究報告書

ニホンザルに対する propargylamine 化合物、rasagiline 投与による
脳脊髄液中神経栄養因子とアミロイドβ-蛋白の変化

主任研究者 丸山和佳子 国立長寿医療センター研究所 部長

研究要旨

propargylamine 化合物の中でも研究者らの検討で、最も神経保護活性の高かった rasagiline について、ヒト臨床治験を行う前段階の研究として必須な霊長類に対する投与を行い、その有効性および安全性を検討した。propargylamine 化合物の神経保護作用の機序として、神経栄養因子や抗酸化酵素など神経保護に働く蛋白の発現を増加させること、および特にアルツハイマー病における神経細胞死の原因となっているアミロイドβ-蛋白(Aβ)の生成を低下させることが細胞実験で確かめられた。一方神経栄養因子およびアミロイドβ蛋白 (Aβ) は分泌蛋白であり、神経細胞外に分泌される。これら蛋白の脳脊髄液中濃度は脳内濃度と一定の相関をもつと考えられる。8頭のオスニホンザルに対して、56日（8週間）連続で2 mg/day の rasagiline あるいは生理食塩水を筋肉内投与した。一定間隔で rasagiline 投与前、投与中、投与後の脳脊髄液を採取し、神経栄養因子および Aβ に及ぼす影響を検討した。その結果、rasagiline 投与後2週間で神経栄養因子である glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) および brain derived-neurotrophic factor (BDNF) の増加と Aβ₁₋₄₂ の低下が一過性に認められた。本研究は細胞実験で認められた rasagiline の神経保護作用を支持するものと考えられるとともに、霊長類の脳脊髄液、将来的には患者の脳脊髄液の分析が神経保護薬の効果判定に有用である可能性を示唆している。今後更なる研究の推進が必要である。

A. 研究目的

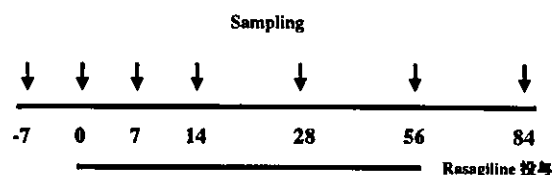
selegiline、rasagiline、TV3324 は、propargylamine 基を共通に持つ B 型モノアミン酸化酵素の阻害剤であるが、酵素阻害作用とは独立した神経保護作用をもつことが *in vitro*、*in vivo* の実験で証明されている。これらは脳内移行が良好な経口投与可能な薬剤であり、selegiline および rasagiline は既にパーキンソン病患者に対する治療薬として認可され、患者への安全性も確認されている。Rasagiline の神経保護作用の機序として、神経保護蛋白、特に BCL-2 や神経栄養因子を増加させる一方、神経毒性のある A β 生成を低下させることが培養細胞実験で示された。神経栄養因子およびアミロイド β 蛋白 (A β) は分泌蛋白であり、神経細胞外に分泌される。これら蛋白の脳脊髄液中濃度は脳内濃度と一定の相関をもつと考えられる。Rasagiline による神経保護作用をヒトで定量的に評価するための前実験として本薬剤が脳脊髄液中の神経栄養因子、および A β のレベルに及ぼす影響についてニホンザルを用いて検討した。

B. 研究方法

オスニホンザル 8 頭を各々 4 頭 rasagiline 投与群、および非投与群に分け rasagiline (2mg/day) または

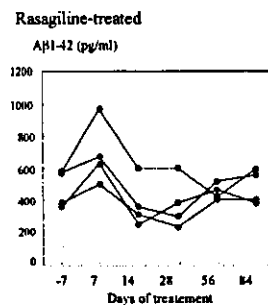
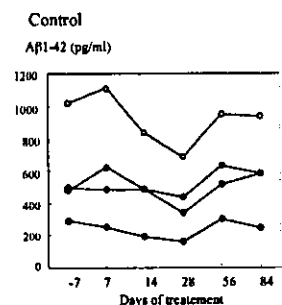
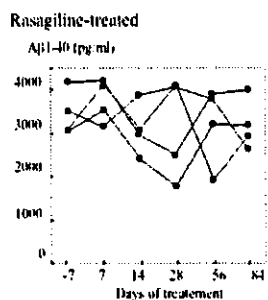
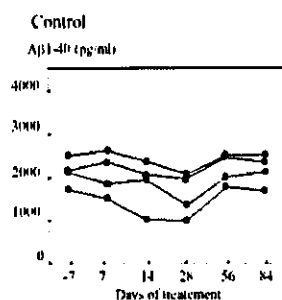
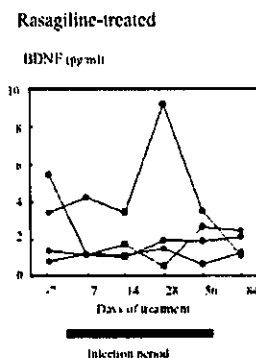
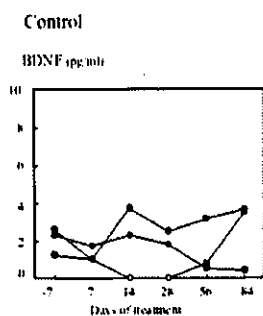
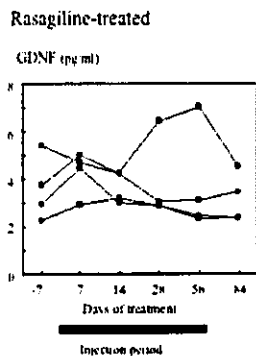
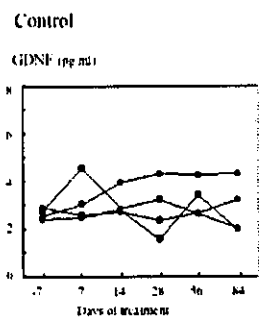
生理食塩水を筋肉内投与した。投与前、投与後 1, 2, 4, 8 週後、および投与終了後 4 週後に腰椎穿刺により脳脊髄液を採取した(下図)。動物の苦痛除去のためにはケタミン (5mg/kgBW) ・キシラジン (1mg/kgBW) の筋肉内投与による麻酔を行った。採取した脳脊髄液は分注後-80°Cに凍結保存した。ELISA 法にて A β 1-40、1-42、GDNF、BDNF を測定した。

(倫理面への配慮) 京都大学霊長類研究所の実験倫理委員会の許可の基に実験は行われた。



C. 研究成果

ニホンザルには rasagiline による全身性の副作用は認められなかった(次項の鈴木 of 報告書参照)。投与群では A β 値の変動が認められ、1-40 には個体間のばらつきが大きかったものの、1-42 では 1 週後増加の後低下する傾向が認められた。神経栄養因子については薬剤投与群で増加傾向が認められ、投与後 1 週間で有意な BDNF、GDNF の増加がみられた(下図)。



D. 考察

rasagiline は脳内の神経栄養因子や

Aβのレベルに影響を及ぼす可能性が示唆された。個体間でのばらつきが大きかったことの原因として、細胞実験における proparagylamine 化合物による効果は Bell-shaped であるため、至適濃度の投与がなされていなかった可能性がある。

E. 結論

本研究は細胞実験で認められた rasagiline の神経保護作用を支持するものと考えられるとともに、霊長類の脳脊髄液、将来的には患者の脳脊髄液の分析が神経保護薬の効果判定に有用である可能性を示唆している。今後更なる研究の推進が必要である。

G. 研究発表

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Maruyama W, Akao Y, Nitta A, Naoi M. (2005) 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, Packer L. (eds.) Marcel Dekker, New York, in press.
- 2) Naoi M, Maruyama W, Shamoto-Nagai M, Kato Y, Tanaka M.

- (2005) Oxidative stress in mitochondrial: The involvement in neurodegenerative diseases. In: Oxidative Stress, Inflammation and Health, Surh Y-J, Packer L. (eds.) Oxidative Stress, Inflammation and Health, Marcel Dekker, New York, in press.
- 3) Youdim MBH, Bar Am O, Yogev-Falach M, Weinreb O, Maruyama W, Naoi M, Amit T. (2005) Rasagiline: Neurodegeneration, neuroprotection, and mitochondrial permeability transition. *J. Neurosci. Res.* 79: 172-179.
- 4) 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.
- 5) Maruyama W, Nitta A, Shamoto-Nagai M, Hirata Y, Akao Y, Youdim M, Furukawa S, Nabeshima T, Naoi M. (2004) 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.* 44: 393-400.
- 6) 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.* 75: 107-117.
- 7) Shamoto-Nagai M, Maruyama W, Akao Y, Osawa T, Tribl F, Gerlach M, Zucca FA, Zecca L, Riederer P, Naoi M. (2004) Neuromelanin inhibits enzymatic activity of 26S proteasome in human dopaminergic SH-SY5Y cells. *J. Neural Transm.* 111: 1253- 1265.
- 8) Akao Y, Seki N, Nakagawa Y, Yi H, Matsumoto K, Ito Y, Ito K, Funaoka M, Maruyama W, Naoi M, Nozawa Y. (2004) A highly bioactive lignophenol derivative from bamboo lignin exhibits a potent activity to suppress apoptosis induced by oxidative stress in human neuroblastoma

- SH-SY5Y cells. *Bioorg. Med. Chem.* 12: 4791- 4801.
- 9) Naoi M, Maruyama W. (2004) Monoamine oxidase and the inhibitors: Involvement in cell death and survival of neurons. In: *Mono- amine Oxidase inhibitors and their role in neurotransmission (drug development)* Török TL, Klebovich I. (eds.), Medicina Publishing House, Budapest, 177-193.
- 10) 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.
- 11) 丸山和佳子、直井信 (2004) 神経保護薬、*内科* 93: 709-712
- 12) 丸山和佳子、直井信 (2004) Parkinson 病の発症機序-Update, *医学のあゆみ*, 208: 477-481
- 13) 丸山和佳子、永井雅代、直井信(2004) 弧発性パーキンソン病におけるドパミン神経選択的細胞死の機序：酸化ストレスとプロテアソーム機能障害を結ぶもの *Prog. Med.* 24: 3054-3058
2. 学会発表
- 1) Maruyama W, Shamoto-Nagai M, Naoi M. Role of mitochondrial dysfunction and oxidative modification of protein in neurodegeneration of Parkinson's disease. 34th Annual Meeting, Society for Neuroscience, October 23, 2004, San Diego, USA
- 2) Naoi M, Maruyama W, Yi H, Shih JC, Chen K. Monoamine oxidase type A is the site to decide cell death and survival. 34th Annual Meeting, Society for Neuroscience, October 24, 2004, San Diego, USA
- 3) Naoi M, Maruyama W, Yi H, Akao Y, Chen K, Shih JC Type A monoamine oxidase determines cell death and survival, 11th Amine Oxidase Workshop, "Amine Oxidases: Function and Dysfunction", July 25-29, 2004, St. Andrews, Scotland
- 4) Maruyama W, Shamoto-Nagai M, Youdim MBH, Naoi M. Propargylamines protect neuronal cell death through induction of neuroprotective proteins, 11th Amine Oxidase Workshop, "Amine Oxidases:

- Function and Dysfunction”, July 25-29, 2004, St. Andrews, Scotland
- 5) 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.
 - 6) 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.
 - 7) . Maruyama W, Nitta A, Nagai-Shamoto M, Naoi M. Mechanism behind neuroprotection by propargylamines. Neuro 2004, September 21-23, 2004, 大阪
 - 8) Naoi M, Maruyama W, Nagai-Shamoto M. Involvement of neuromelanin in selective vulnerability of dopamine neurons in Parkinson’s disease. Neuro 2004, September 21-23, 2004, Osaka
 - 9) Shamoto-Nagai M, Maruyama W, Isobe K, Akao Y, Osawa T, Naoi M. neuromelanin inhibits enzymatic activity of 26S proteasome in dopaminergic SH-SY5Y cells; Involvement in Parkinson’s disease. 第 77 回 日本生化学会大会 2004 年 10 月 13-16 日、横浜
 - 10) Maruyama W, Nagai M, Nitta A, Naoi M. Intracellular mechanism of neuroprotection by rasagiline an anti-Parkinson drug 第 77 回 日本生化学会大会、2004 年 10 月 13-16 日、横浜
 - 11) 丸山和佳子、直井信 パーキンソン病のプロテアソーム障害における酸化修飾タンパクの関与 第 45 回日本神経学会総会、平成 16 年 5 月 11-14 日、東京
 - 12) 直井信、丸山和佳子 経口投与可能な神経保護薬 rasagiline の作用機序の検討 第 45 回日本神経学会総会、平成 16 年 5 月 11-14 日、東京
 - 13) 丸山和佳子、永井雅代、直井信 弧発性パーキンソン病におけるドパミン神経選択

的細胞死の機序：酸化ストレスとプロテアソーム機能障害を結ぶもの 第12回
カテコールアミンと神経疾患研究会、平成17年4月
17日、東京

- 14) 丸山和佳子 ミトコンドリア障害によるプロテアソーム不活化と酸化修飾タンパク蓄積の機序：孤発性パーキンソン病との関連 Parkinson Disease Forum 平成17年8月25日、東京

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
なし

厚生労働科学研究費補助金（痴呆・骨折臨床研究事業）
（分担）研究報告書

行動等を指標としたニホンザルにおけるrasagiline投与時の副作用に関する研究

（分担）研究者 鈴木 樹理 京都大学霊長類研究所助教授

研究要旨 非侵襲的手法および指標によってrasagiline投与時のニホンザル健康状態変化を検討した結果、概ね副作用は認められないことが推察された。

A. 研究目的

アルツハイマー病に対する経口治療薬としてrasagilineに着目し、霊長類の行動等を指標とする非侵襲的手法によって投薬時の副作用を明らかにする。

B. 研究方法

ニホンザルのオス成獣（6～19歳）8頭を2群に分け、1群にはrasagilineを、他の1群はコントロール群としてsalineを、54日間連続投与し、投与開始から80日間の体重、行動、飼料摂取量、排泄物の量および性状を観察しその変化を分析した。

（倫理面への配慮）

実験は事前に京都大学霊長類研究所の実験倫理委員会で審査され許可を受けた。

C. 研究結果

体重変動はグループ間の差は認められず全個体ともに10%以内で、投与初期は8頭中6頭暫減したが、投与後14日または28日には増加に転じ実験終了時には回復した。常同行動や躁状態や鬱状態は観察されなかった。飼料摂取量にも変化は認められなかった。排泄物の量および性状もほとんど変化が無かった。

D. 考察

体重減少は、コントロール群でも見られたことから、薬物の影響ではなく投与行為による物理的・心理的なストレスの影響によるものと考えられる。行動や他の指標に関して変化は認められず、これらの健康指標からは、概ね副作用が認められないことが推察される。

E. 結論

体重、行動、飼料摂取量、排泄物の量および性状等を指標としてrasagiline投与時のニホンザル健康状態変化を分析した結果、概ね副作用は認められないことが推察された。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

実験用霊長類の心理的ストレスを評価する免疫学的指標と飼育環境のエンリッチメント評価. 実験動物技術39, 97-104, 2004.
Malignant NK/T-cell lymphoma associated with simian Epstein-Barr virus infection in a Japanese macaque (*Macaca fuscata*) Exp. Anim., 54, 101-105, 2005.

2. 学会発表

マカク病理解剖例における心臓病変の病理組織学的検索 霊長類研究20 supplement, 50, 2004.

H. 知的財産権の出願・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

厚生労働科学研究費補助金（痴呆・骨折臨床研究事業）
分担研究報告書

神経保護薬の作用点(ターゲットプロテイン)の解明に関する研究

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

神経変性疾患発症のメカニズムを解明し、治療薬開発のストラテジを提唱する目的で、また神経保護薬のターゲットの解明の一環として、細胞の持つ種々の細胞死メカニズムの解析を行ってきた。本年度の研究においては特に、アポトーシスとネクローシスに關与することが示唆されているミトコンドリア膜透過性亢進現象 (mitochondria membrane permeability transition: MPT) に焦点を合わせ、その分子メカニズムの解明と細胞死における役割を明らかにするために、MPT の構成成分であり、その制御分子と考えられている cyclophilin D 遺伝子のターゲッティングを行い、詳細な解析を行った。cyclophilin D 欠損マウスは正常に生まれ、顕著な異常は示さなかったが、予想通り、肝臓由来のミトコンドリアは、MPT を起こさず、cyclophilin D は MPT に必須の分子であることが明らかになった。また、cyclophilin D 欠損ミトコンドリアは大量のカルシウムを取り込む能力を獲得していた。cyclophilin D 欠損マウスと対照マウス由来の種々の細胞を用いて、細胞死に対する cyclophilin D 欠損の影響を検討した結果、種々の刺激で誘導されるアポトーシスは cyclophilin D 遺伝子の有無に影響されず同様に進行したが、cyclophilin D 欠損細胞 (MEF や hepatocytes) は、酸化ストレスや過剰なカルシウムストレスによるネクローシスに有意な耐性を示した。また、cyclophilin D 欠損マウスは、虚血・再灌流障害に抵抗性を示し、心筋梗塞モデルにおいて強い耐性を示した。

A. 研究目的

神経変性疾患の治療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。本年度の研究の目的は、特に複数の細胞死メカニズムに関与することが示唆されている MPT のメカニズムを解明し、細胞死における役割を検討することである。

B. 研究方法

マウス cyclophilin 遺伝子を欠失させるようなターゲ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 Southern 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 遺伝子を germline 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 D 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。

ミトコンドリアは肝臓より、常法に従い単離した。

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(特定遺伝子の生体内での機能解析のためにジーンターゲット法を利用できるのはマウスかラットに限られている)、(2) 苦痛を回避する手段を講じている(たとえば、臓器の摘出は過剰麻酔による安楽死ののちに行う)。

C. 研究結果

研究方法に記載の手順により、cyclophilin D 遺伝子欠損マウスを得た。メンデル率で出生し、今までのところ特に異常は認められなかった。肝臓より単離したミトコンドリアに Ca^{2+} (50 μM) を添加することにより、MPT を誘導するとコントロールマウス由来のミトコンドリアは、MPT (膜電位の喪失とミトコンドリアの膨化) を起こしたのに対し、cyclophilin D 欠損マウス由来のミトコンドリアは、MPT を起こさなかった。cyclophilin D 欠損ミトコンドリアが、どの程度 MPT に耐性を示すかを調べるために、 Ca^{2+} (50 μM) づつを連続的に添加していくと 7-10 回程度まで、MPT を起こさなかった。このときのミトコンドリア外の Ca^{2+} 濃度を測定することにより、添加した Ca^{2+} はミトコンドリア内に

取り込まれていることが分かった。さらに、他の MPT 誘導剤 (H_2O_2 や atractyloside など) も用いたが、cyclophilin D 欠損ミトコンドリアは、これらの試薬により誘導される MPT にも耐性を示した。これらの結果から、cyclophilin D は MPT に必須の分子であると結論した。

次に、cyclophilin D 依存的な MPT がアポトーシスにどの程度関与するかを検討するために、cyclophilin D 欠損マウスとコントロールマウスより種々の細胞を調整した。用いた細胞は、Embryonic fibroblasts (MEFs)、hepatocytes、thymocytes などである。これらの細胞に種々のアポトーシス刺激(エトポシド、スタウロスポリン、抗 Fas 抗体や Bax、tBid DNA 導入など)を加えた。その結果、cyclophilin D の有無に関わらず、アポトーシスが同程度に誘導されることが分かった。この事は、cyclophilin D 依存的 MPT がアポトーシスには有意に関与していないことを示している。

次に、ミトコンドリアに MPT を誘導出来る刺激を細胞に加えた。cyclophilin D 欠損 MEFs は、 H_2O_2 処理により誘導される細胞死に有意な耐性を示した。同様に、カルシウムイオンフォアにより誘導される細胞死に対しても有意な耐性を示した。これらの刺激で誘導される細胞死は、アポト

ーシスの特徴づけるカスパーシスに依存せず、細胞膜の破綻が比較的早期に起こることからネクローシス様細胞死と判定した。これらの結果は、cyclophilin D 依存的 MPT が過剰なカルシウムや酸化ストレスにより誘導されるネクローシス様の細胞死の制御に関わることを示している。

酸化ストレスや過剰なカルシウム動態が関与する疾患として心筋梗塞や脳梗塞などが知られているので、これら疾患に対する cyclophilin D 欠損マウスの抵抗性を検討した。マウスをメカニカルベンチレーション下に、左心室の冠動脈を 30 分結紮し、その後、2 時間再灌流を行った。その後、心臓を摘出し梗塞領域を調べた。その結果、コントロールマウスでは、心臓の虚血領域の約 30% に相当する領域が梗塞により壊死を起こしていたのに対し、cyclophilin D 欠損マウスでは、梗塞領域がほとんど検出されなかった。この事は、cyclophilin D 欠損により、虚血再灌流障害が有効に軽減されていることを示している。

D. 考察

我々は、細胞死メカニズムの解析の一環として、アポトーシスとネクローシスへの関与が示唆されてきたミトコンドリア膜透過性亢進現 MPT の解析を cyclophilin D 遺伝子欠損マウスを作

成することで行った。今回、MPT 現象が酸化ストレスや過剰なカルシウムにより誘導されるネクローシスの惹起に必須であり、マウス心筋梗塞モデルにおいても、cyclophilin D 遺伝子欠損はマウスに強い耐性を与えた。このことは、心筋梗塞や脳梗塞の治療の標的として、cyclophilin D や MPT に関与する分子が有効であることを示しており、これら疾患の治療薬開発に重要な方向性を与えた。また、このマウスを用いることで、種々の神経変性疾患においてこの種の細胞死メカニズムが関与するか否かを明確に検討できる系が開発されたことになり、アルツハイマー病の病態解析にも重要な研究材料となると思われる。

E. 結論

MPT 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 のターゲットングを行い、解析を行った。cyclophilin D 依存的な MPT は、アポトーシスには一般的なメカニズムとしては関与せず、一方、酸化ストレスや過剰なカルシウムにより誘導されるネクローシスの惹起に必須であることが明らかになった。また、cyclophilin D 依存的な MPT の欠如に

より、心筋梗塞を強く抑制できることが判明した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表 (欧文)

1. Tsuruta, F., Sunayama, J., Mori, Y., Hattori S., Shimizu, S., Tsujimoto, T., Yoshioka, K. and Gotoh, Y. JNK promotes Bax translocation to mitochondria through phosphorylation of 14-3-3 proteins. *EMBO J.* 23: 1889-1899, 2004
2. Hitomi, J., Katayama, T., Eguchi, Y., Kudo, T., Taniguchi, M., Koyama, Y., Manabe, T., Yamagishi, S., Bando, Y., Imaizumi, K., Tsujimoto, Y. and Tohyama M. Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Ab-induced cell death. *J. Cell Biol.* 165: 347-356, 2004
3. Zhang, L., Shimizu, S., Sakamaki, K., Yonehara, S., and Tsujimoto, Y. A

- caspase-8-independent signalling pathway activated by Fas ligation leads to exposure of Bax N-terminus. *J. Biol. Chem.* 279: 33865-33874, 2004
4. Lee, J.-H., Jeon M.-H., Seo Y.-J., Lee, Y.-J., Ko J. H., Tsujimoto, Y. and Lee, J.-H. CA repeats in the 3' UTR of bcl-2 mRNA mediate constitutive decay of bcl-2 mRNA. *J. Biol. Chem.* 279: 42758-42764, 2004
5. Shigeomi Shimizu, S., Kanaseki, T., Mizushima, N., Mizuta, K., Arakawa-Kobayashi, S., Thompson, C. B., and Tsujimoto, Y. A role of Bcl-2 family of proteins in non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nature Cell Biol.* 6:1221-1228, 2004
6. Sugioka, R., Shimizu, S. and Tsujimoto, Y. Fzo1, a protein involved in mitochondrial fusion, inhibits apoptosis. *J. Biol. Chem.* 279: 52726-52734, 2004
7. Kanamori, D., Okamura, T., Yamamoto, H., Shimizu, S., Tsujimoto, Y., and Ueyama, N. Structure of the small-molecule Bcl-2 inhibitor (BH3I-2) and its related simple model in protonated and deprotonated forms. *Bull Chem. Soc. Jap.* 77: 2057-2064, 2004
8. Kamada, S., Kikkawa, U., Tsujimoto, Y., Hunter, T. Nuclear Translocation of Caspase-3 Is Dependent on Its Proteolytic Activation and Recognition of a Substrate-like Protein(s). *J. Biol. Chem.*, 280: 857-860, 2005
9. Cadden, IS., Johnston, BT., Connolly, R., Gates, D., Tsujimoto, Y., Eguchi, Y., McGinty, A. An investigation into the role of Bcl-2 in neuroendocrine differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 326: 442-448, 2005
10. Ono, M., Sawa, Y., Ryugo, M., Alechine, A.N., Shimizu, S.,