

endotoxin, has been shown to reduce total CYP as well as CYP subfamilies such as CYP1A, CYP3A, and CYP2E (Monshouwer et al., 1996; Sewer and Morgan, 1997). However, the precise roles of these cytokines in the expression of CYP isoforms remain unclear. Among CYP isoforms, CYP3A2 and CYP2C11 were selected for this study, since they are major CYP isoforms in rats (Souček and Gut, 1992), are enzymes metabolizing antipyrine (Engel et al., 1996), and are sensitive to TNF- α (Morgan, 1997). Secondly, we examined the role of TNF- α in the endotoxin-induced down-regulation of these two CYP isoforms. Endotoxin significantly reduced the protein levels of CYP3A2 and CYP2C11 in livers of both wild-type mice and TNF- $\alpha^{-/-}$ mice, with the degree of down-regulation being more marked in the latter than in former. These results suggest the possibility that TNF- α may play a protective role in the down-regulation of hepatic CYP3A2 and CYP2C11 by endotoxin. We assume that the reduced activity of both CYP3A2 and CYP2C11 by endotoxin is, at least, caused by TNF- α -independent mediators besides TNF- α . Most recently, we reported that antipyrine clearance obviously reflects the activity of hepatic CYP3A2 and CYP2C11 (Ueyama et al., 2004). We then measured the plasma concentrations of antipyrine 3 h after intravenous injection in wild-type and TNF- $\alpha^{-/-}$ mice treated with or without endotoxin. The endotoxin-induced delay of CYP-mediated antipyrine metabolism was more pronounced in TNF- $\alpha^{-/-}$ than in wild-type mice, a finding that was in agreement with the results of Western blot analysis.

NO is one of the important inflammatory mediators regulating the contents and activities of CYP isoforms (Gergel et al., 1997; Khatsenko and Kikkawa, 1997; Kitaichi et al., 1999; Minamiyama et al., 1997; Morgan, 1997; Wink et al., 1993). NO is synthesized by both continuously expressed endothelial NO synthase and inducible NO synthase. It is well known that inducible NO plays an important role in the elevation of plasma NO_x by endotoxin. Finally, in the present study, we measured plasma concentrations of NO_x in wild-type and TNF- $\alpha^{-/-}$ mice 24 h after the injection of endotoxin or saline, and found that the plasma NO_x elevated by endotoxin was approximately fourfold higher in wild-type than TNF- $\alpha^{-/-}$ mice, although endotoxin significantly elevated the plasma NO_x in both types. There is evidence that inflammatory cytokines, including TNF- α , are important inducers of NO generation in macrophages and other cells (Kolios et al., 1995; Saito and Nakano, 1996). Considering that the slight elevation in plasma NO_x in TNF- $\alpha^{-/-}$ mice was induced by NO derived from endothelial NO synthase, inducible NO synthase, and other mediators besides TNF- α , it is likely that the contribution of TNF- α -mediated NO to the elevation of plasma NO_x is a significant one. Based on result from the present study, it is unlikely that the down-regulation of CYP3A2 and CYP2C11 by endotoxin is due to the overproduction of NO in plasma. This speculation is supported by a report, which demonstrates that the

inactivation of hepatic CYP observed 24 h after the injection of endotoxin is not induced by NO (Takemura et al., 1999). However, results from the present study cannot provide irrefutable evidence that NO is not involved in the endotoxin-induced suppression of the expression of CYP isoforms.

In conclusion, our results show for the first time that TNF- α is a key mediator in the down-regulation of hepatic P-glycoprotein by endotoxin, but not in the down-regulation of hepatic CYP3A2 and CYP2C11. However, the role of TNF- α is still unclear, although it appears to play a protective role in regulating the hepatic expression of CYP3A2 and CYP2C11 in endotoxemic mice.

Acknowledgements

This work was supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research (15590484) and a Grant-in-Aid for Scientific Frontier Research Project of Meijo University from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan.

References

- Ando, H., Nishio, Y., Ito, K., Nakao, A., Wang, L., Zhao, Y.L., Kitaichi, K., Takagi, K., Hasegawa, T., 2001. Effect of endotoxin on P-glycoprotein-mediated biliary and renal excretion of rhodamine-123 in rats. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 3462–3467.
- Balani, S.K., Zhu, T., Yang, J., Liu, Z., He, B., Lee, F.W., 2002. Effective dosing regimen of 1-aminobenzotriazole for inhibition of antipyrine clearance in rats, dogs, and monkeys. *Drug Metab. Dispos.* 30, 1059–1062.
- Bredt, D.S., Snyder, S.H., 1994. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu. Rev. Biochem.* 63, 175–195.
- Chapekar, M.S., Huggett, A.C., Cheng, C., 1991. Dexamethasone prevents the growth inhibitory effects of recombinant tumor necrosis factor in a rat hepatoma cell line Reuber-RC-3: an association with the changes in the messenger RNA levels for multidrug resistance gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181, 1524–1531.
- Chen, Y.L., Florentin, I., Batt, A.M., Ferrari, L., Giroud, J.P., Chauvelot-Moachon, L., 1992. Effects of interleukin-6 on cytochrome P450-dependent mixed-function oxidases in the rat. *Biochem. Pharmacol.* 44, 137–148.
- Cordon-Cardo, C., O'Brien, J.P., Casals, D., Rittman-Grauer, L., Biedler, J.L., Melamed, M.R., Bertino, J.R., 1989. Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood–brain barrier sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 695–698.
- Engel, G., Hofmann, U., Heidemann, H., Cosme, J., Eichelbaum, M., 1996. Antipyrine as a probe for human oxidative drug metabolism: identification of the cytochrome P450 enzymes catalyzing 4-hydroxyantipyrine, 3-hydroxymethylantipyrine, and norantipyrine formation. *Clin. Pharmacol. Ther.* 59, 613–623.
- Foster, G.H., Armstrong, C.S., Sakiri, R., Tesh, V.L., 2000. Shiga toxin-induced tumor necrosis factor alpha expression: requirement for toxin enzymatic activity and monocytes protein kinase C and protein tyrosine kinases. *Infect. Immun.* 68, 5183–5189.
- Gergel, D., Misik, V., Riesz, P., Cederbaum, A.I., 1997. Inhibition of rat and human cytochrome P4502E1 catalytic activity and reactive oxygen radical formation by nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.* 337, 239–250.

- Green, R.M., Beier, D., Gollan, J.L., 1996. Regulation of hepatocyte bile salt transporters by endotoxin and inflammatory cytokines in rodents. *Gastroenterology* 111, 193–198.
- Haghighi, S., Hasegawa, T., Nadai, M., Wang, L., Nabeshima, T., Kato, N., 1995. Effects of a bacterial lipopolysaccharide on biliary excretion of a β -lactam antibiotic, cefoperazone, in rats. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 2258–2261.
- Hidemura, K., Zhao, Y.L., Ito, K., Nakao, A., Kanazawa, H., Takagi, K., Ohta, M., Hasegawa, T., 2003. Shiga-like toxin II impairs hepatobiliary transport of doxorubicin in rats by down-regulation of hepatic P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein Mrp2. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 1636–1642.
- Hirsch-Ernst, K.I., Ziemann, C., Foth, H., Kozian, D., Schmitz-Salue, C., Kahl, G.F., 1998. Induction of *mdr1b* mRNA and P-glycoprotein expression by tumor necrosis factor alpha in primary rat hepatocyte cultures. *J. Cell. Physiol.* 176, 506–515.
- Khatsenko, O., Kikkawa, Y., 1997. Nitric oxide differentially affects constitutive cytochrome P450 isoforms in rat liver. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 280, 1463–1470.
- Khatsenko, O.G., Gross, S.S., Rifkind, A.B., Vane, J.R., 1993. Nitric oxide is a mediator of the decrease in cytochrome P450-dependent metabolism caused by immunostimulants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 11147–11151.
- Kitaichi, K., Wang, L., Takagi, K., Iwase, M., Shibata, E., Nadai, M., Takagi, K., Hasegawa, T., 1999. Decreased antipyrine clearance following endotoxin administration: in vivo evidence of the role of nitric oxide. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 2697–2701.
- Kitaichi, K., Nakayama, H., Ueyama, J., Nadai, M., Baba, K., Takagi, K., Takagi, K., Ohta, M., Hasegawa, T., 2004. Down-regulation of cytochrome P450 proteins and its activities by Shiga-like toxin II from *Escherichia coli* O157:H7. *Biochem. Pharmacol.* 67, 1427–1435.
- Kolios, G., Brown, Z., Robson, R.L., Robertson, D.A., Westwick, J., 1995. Inducible nitric oxide synthase activity and expression in a human colonic epithelial cell line, HT-29. *Br. J. Pharmacol.* 116, 2866–2872.
- Manuel, P., 1996. The CYP3A family. In: Ioannides, C. (Ed.), *Cytochrome P450: Metabolic and Toxicological Aspects*, Chapter 10. Stern, London, UK, pp. 241–270.
- Mayer, R., Kartenbeck, J., Buchler, M., Jedlitschky, G., Leier, I., Kuppler, D., 1995. Expression of the *MRP* gene-encoded conjugate export pump in liver and its selective absence from the canalicular membrane in transport-deficient mutant hepatocytes. *J. Cell Biol.* 131, 137–150.
- Minamiyama, Y., Takemura, S., Imaoka, S., Funae, Y., Tanimoto, Y., Inoue, M., 1997. Irreversible inhibition of cytochrome P450 by nitric oxide. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 283, 1479–1485.
- Moncada, S., Palmer, R.M., Higgs, E.A., 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43, 109–142.
- Monshouwer, M., McLellan, R.A., Delaporte, E., Witkamp, R.F., van Miert, A.S., Renton, K.W., 1996. Differential effect of pentoxifylline on lipopolysaccharide-induced downregulation of cytochrome P450. *Biochem. Pharmacol.* 52, 1195–1200.
- Morgan, E.T., 1997. Regulation of cytochromes P450 during inflammation and infection. *Drug Metab. Rev.* 29, 1129–1188.
- Nadai, M., Matsuda, I., Wang, L., Itoh, A., Naruhashi, K., Nabeshima, T., Asai, M., Hasegawa, T., 1998. Granulocyte colony-stimulating factor enhances endotoxin-induced decrease in biliary excretion of the antibiotic cefoperazone in rats. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 2178–2183.
- Nakamura, J., Nishida, T., Hayashi, K., Kawada, N., Ueshima, S., Sugiyama, Y., Ito, T., Sobue, K., Matsuda, H., 1999. Kupffer cell-mediated down regulation of rat hepatic *CMOAT/MRP2* gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 255, 143–149.
- Omura, T., Sato, R., 1964. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.* 239, 2370–2378.
- Oude Elferink, R.P., Meijer, D.K., Kuipers, F., Jansen, P.L., Groen, A.K., Groothuis, G.M., 1995. Hepatobiliary secretion of organic compounds; molecular mechanisms of membrane transport. *Biochim. Biophys. Acta* 1241, 215–268.
- Saito, S., Nakano, M., 1996. Nitric oxide production by peritoneal macrophages of *Mycobacterium bovis* BCG-infected or non-infected mice: regulatory role of T lymphocytes and cytokines. *J. Leukoc. Biol.* 59, 908–915.
- Schinkel, A.H., Wagenaar, E., Mol, C.A., van Deemter, L., 1996. P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. *J. Clin. Invest.* 97, 2517–2524.
- Sewer, M.B., Morgan, E.T., 1997. Nitric oxide-independent suppression of P450 2C11 expression by interleukin-1beta and endotoxin in primary rat hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* 54, 729–737.
- Sewer, M.B., Morgan, E.T., 1998. Down-regulation of the expression of three major rat liver cytochrome P450s by endotoxin in vivo occurs independently of nitric oxide production. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 287, 352–358.
- Shedlofsky, S.I., Israel, B.C., McClain, C.J., Hill, D.B., Blouin, R.A., 1994. Endotoxin administration to humans inhibits hepatic cytochrome P450-mediated drug metabolism. *J. Clin. Invest.* 94, 2209–2214.
- Simpson, A.E., Tomkins, P.T., Cooper, K.L., 1997. An investigation of the temporal induction of cytokine mRNAs in LPS-challenged thioglycollate-elicited murine peritoneal macrophages using the reverse transcription polymerase chain reaction. *Inflamm. Res.* 46, 65–71.
- Souček, P., Gut, I., 1992. Cytochromes P-450 in rats: structures, functions, properties and relevant human forms. *Xenobiotica* 22, 83–103.
- Stein, U., Walther, W., Laurencot, C.M., Scheffer, G.L., Scheper, R.J., Shoemaker, R.H., 1997. Tumor necrosis factor-alpha and expression of the multidrug resistance-associated genes LRP and MRP. *J. Natl. Cancer Inst.* 89, 807–813.
- Sukhai, M., Yong, A., Kalitsky, J., Piquette-Miller, M., 2000. Inflammation and interleukin-6 mediate reductions in the hepatic expression and transcription of the *mdr1a* and *mdr1b* genes. *Mol. Cell. Biol. Res. Commun.* 4, 248–256.
- Takahashi, J., Furuhashi, Y., Ikeda, A., Takahashi, M., Iwata, H., Kazusaka, A., Fujita, S., 1999. Characterization of hepatic cytochrome P450 isozyme composition in the transgenic rat expressing low level human growth hormone. *Xenobiotica* 12, 1203–1212.
- Takemura, S., Minamiyama, Y., Imaoka, S., Fumie, Y., Hirohashi, K., Inoue, M., Kinoshita, H., 1999. Hepatic cytochrome P450 is directly inactivated by nitric oxide, not by inflammatory cytokines, in the early phase of endotoxemia. *J. Hepatol.* 30, 1035–1044.
- Taniguchi, T., Takata, M., Ikeda, A., Momotani, E., Sekikawa, K., 1997. Failure of germinal center formation and impairment of response to endotoxin in tumor necrosis factor alpha-deficient mice. *Lab. Invest.* 77, 647–658.
- Thiebaut, F., Tsuruo, T., Hamada, H., Gottesman, M.M., Pastan, I., Willingham, M.C., 1987. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 7735–7738.
- Trauner, M., Arrese, M., Soroka, C.J., Ananthanarayanan, M., Koepffel, T.A., Schlosser, S.F., Suchy, F.J., Keppler, D., Boyer, J.L., 1997. The rat canalicular conjugate export pump (Mrp2) is down-regulated in intrahepatic and obstructive cholestasis. *Gastroenterology* 113, 255–264.
- Ueyama, J., Kitaichi, K., Nadai, M., Iwase, M., Tomyo, N., Kanazawa, H., Suzuki, R., Takagi, K., Takagi, K., Hasegawa, T., 2004. Effect of pioglitazone on endotoxin-induced decreases in hepatic drug-metabolizing enzyme activity and expression of CYP3A2 and CYP2C11. *Eur. J. Pharmacol.* 498, 257–265.
- Wacher, V.J., Wu, C.-Y., Benet, L.Z., 1995. Overlapping substrate specificities and tissue distribution of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein: implications for drug delivery and activity in cancer chemotherapy. *Mol. Carcinog.* 13, 129–134.
- Walther, W., Stein, U., 1994. Influence of cytokines on *mdr1* expression in human colon carcinoma cell lines: increased cytotoxicity of MDR relevant drugs. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 120, 471–478.
- Warren, G.W., Poloyac, S.M., Gary, D.S., Mattson, M.P., Blouin, R.A., 1999. Hepatic cytochrome P-450 expression in tumor necrosis factor-

- alpha receptor (p55/p75) knockout mice after endotoxin administration. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 288, 945–950.
- Wink, D.A., Osawa, Y., Darbyshire, J.F., Jones, C.R., Eshenaur, S.C., Nims, R.W., 1993. Inhibition of cytochrome *P*450 by nitric oxide and a nitric oxide-releasing agent. *Arch. Biochem. Biophys.* 300, 115–123.
- Zhao, Y.L., Du, J., Kanazawa, H., Sugawara, K., Takagi, K., Kitaichi, K., Tatsumi, Y., Takagi, K., Hasegawa, T., 2002. Effect of endotoxin on doxorubicin transport across blood–brain barrier and P-glycoprotein function in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 445, 115–123.

Inflammation-induced GDNF improves locomotor function after spinal cord injury

Manabu Hashimoto, Atsumi Nitta,¹ Hidefumi Fukumitsu, Hiroshi Nomoto, Liya Shen² and Shoei Furukawa^{CA}

Laboratory of Molecular Biology, Gifu Pharmaceutical University, 5-6-1, Mitahora-higashi, Gifu 502-8585; ¹Department of Neuropsychopharmacology and Hospital Pharmacy, Nagoya University Graduate School of Medicine, Tsuruma-cho, Showa-ku, Nagoya 466-8560, Japan; ²Laboratory of Mammalian Genes and Development, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20983, USA

^{CA}Corresponding Author: furukawa@gifu-pu.ac.jp

Received 23 November 2004; accepted 29 November 2004

Activation of microglia/macrophages after injury occurs limitedly in the CNS, which finding may explain unsuccessful axonal regeneration. Therefore, the relationship between lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation and recovery of locomotor function of rats after spinal cord injury was examined. High-dose LPS improved locomotor function greater than low-dose LPS, being consistent with the expression of neurotrophic factor (GDNF) in microglia/macrophages. Experiments using GDNF gene

mutant mice confirmed that the increase in the GDNF mRNA level, rather than the reduction in the mRNA level of inducible NO synthase, could be correlated with the restoration activity of locomotor function. These results suggest that a higher degree of inflammation leads to a higher degree of repair of CNS injuries through GDNF produced by activated microglia/macrophages. *NeuroReport* 16:99-102 © 2005 Lippincott Williams & Wilkins.

Key words: Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF); Inducible NO synthase (iNOS); Lipopolysaccharide (LPS); Inflammation; Microglia/macrophages; Spinal cord injury

INTRODUCTION

Axonal regeneration fails to succeed in the CNS, unlike in the peripheral nervous system (PNS). This failure is thought to result from molecules inhibitory toward axonal growth [1], from the lack of neurotrophic factors [2], and/or from inflammatory reactions [3]. Inflammation is a response that occurs after CNS injury, and it causes secondary injury and facilitates neuronal dysfunction. This inflammatory response is characterized by the invasion of leucocytes into the injury site and the activation of resident glial cells, the activities of which are regulated by chemokines [4,5]. Microglia/macrophages infiltrating the injury site are thought to be involved in the secondary injury through the production of nitric oxide (NO), reactive oxygen species, and certain cytokines [6-8]. However, the activation of microglia/macrophages occurs rather more limitedly in the CNS than in the PNS [9,10]; and thus the facilitating effects of these cells on nerve regeneration and/or the inhibitory effects on secondary injury would be less in the CNS. Inflammation is also thought to contribute to the supply of neurotrophic factors: glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), a neurotrophic factor for motoneurons [11,12], is expressed in activated microglia/macrophages of the injured CNS [2,13,14]. These facts suggest that the quality of activation determines if microglia/macrophages produce molecules harmful or trophic for neurons. Optimal inflammation induced by properly-activated microglia/macrophages may thus favor CNS nerve regeneration.

In the current study, we found that high-dose lipopolysaccharide (LPS) improved locomotor function to a greater degree than low-dose LPS in rats with spinal cord injury. This improvement was correlated with GDNF mRNA level in the activated microglia/macrophages, which was confirmed by experiments using GDNF gene mutant mice. Our data thus suggest that a higher degree of inflammation results in a higher amelioration of spinal cord injury through facilitated production of GDNF.

MATERIALS AND METHODS

Surgery and evaluation of locomotor function: Male Wistar rats (7-8 weeks old) or GDNF gene-deficient mice were cared for according to the Guidelines of Experimental Animal Care issued from the Office of the Prime Minister of Japan. Animals were anesthetized with pentobarbital (30 mg/kg), and the left side of the spinal cord was hemitranssected at the level of the 9th thoracic vertebra. Then, LPS (1, 10 or 100 µg) in 10 µl phosphate-buffered saline (PBS) for rats or 2 µg LPS in 2 µl PBS for mice was injected into the injury site. Locomotor function of the left hind limb was evaluated according to the BBB locomotor rating scale [15]. For the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) experiment, the spinal cords were dissected out; and the segments just rostral or caudal to the injury site (5 mm length each) were collected. The generation of GDNF gene-deficient mice was described elsewhere [16].

Reverse transcription-polymerase chain reaction: RT-PCR was performed as described [17]. The specific primers used for GDNF, inducible NO synthase (iNOS), and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) were as follows: up-primer 5'-GAGAGGAATCGGCAGGCTGCA-GCTG-3' and down-primer 5'-CAGATACATCCACATC-GTTAGCGG-3' for GDNF (product size: 337 bases); up-primer 5'-CAGAGGACCCAGAGACAAGC-3' and down-primer 5'-ACTGGGTGAACTCCAAGGTG-3' for iNOS (product size: 488 bases); and up-primer 5'-CGGAGT-CAACGGATTTGGTCGTAT-3' and down-primer 5'-AGCC-TTCTCCATGGTGGTGAAGAC-3' for GAPDH (product size: 309 bases). The GAPDH gene was used as an internal control.

Immunohistochemical study: Immunohistochemical detection of GDNF and CD11b was performed as described earlier [17].

RESULTS

Effects of LPS on locomotor function: Recovery of locomotor score was significantly facilitated by administration of 10 or 100 μ g LPS into the injury site of the rat spinal cord (Fig. 1a). Administration of 10 μ g LPS effectively promoted the recovery of locomotor function on and after day 10 (Fig. 1b). These results suggest that the sufficiently activated microglia/macrophages play a stimulatory role in nerve regeneration after spinal cord injury.

Induction of GDNF or iNOS mRNA in the spinal cord: Earlier we observed that GDNF synthesis is upregulated in cultured macrophages by LPS [17]. Therefore, after LPS administration we examined the time-dependent change in mRNA expression of GDNF and of iNOS, a key enzyme for the generation of the neurotoxin NO, in the segment next to the transaction site (Fig. 2a). The expression of GDNF mRNA was significantly enhanced at day 0.5 or 1 and returned to the control level by day 3 after the LPS injection. An increase in the iNOS mRNA was found only at day 0.5 after the injury. Namely, the LPS administration caused an increase in mRNA expression that lasted much longer for GDNF than for iNOS, suggesting that the neurotrophic effects of GDNF would exceed the neurotoxic ones of iNOS. We propose that these conditions would favor recovery of locomotor function.

Cells expressing LPS-induced GDNF-immunoreactivity: Most of the cells bearing CD11b (a specific protein of microglia/macrophages) were positive for GDNF-immunoreactivity (ir) irrespective of LPS stimulation (Fig. 2b). As the difference between vehicle- and LPS-treated expression of GDNF or iNOS mRNA was greatest 12 h after the spinal cord injury, as was shown in Fig. 2a, we evaluated the effect of LPS on the cell number at that time. The cell number was counted in serial sagittal sections prepared from the rostral and caudal areas (500 μ m each) adjacent to the injury site. The number of CD11b-positive cells was 290.3 ± 23.8 (vehicle, $n=4$) and 376.8 ± 24.4 (LPS, $n=4$), and the difference was significant (Student's *t*-test, $p < 0.05$). The number of GDNF-positive cells was 278.3 ± 20.1 (vehicle, $n=4$) and 360.0 ± 19.9 (LPS, $n=4$), and this difference was also significant (Student's *t*-test, $p < 0.05$, $n=4$). Cells expressing

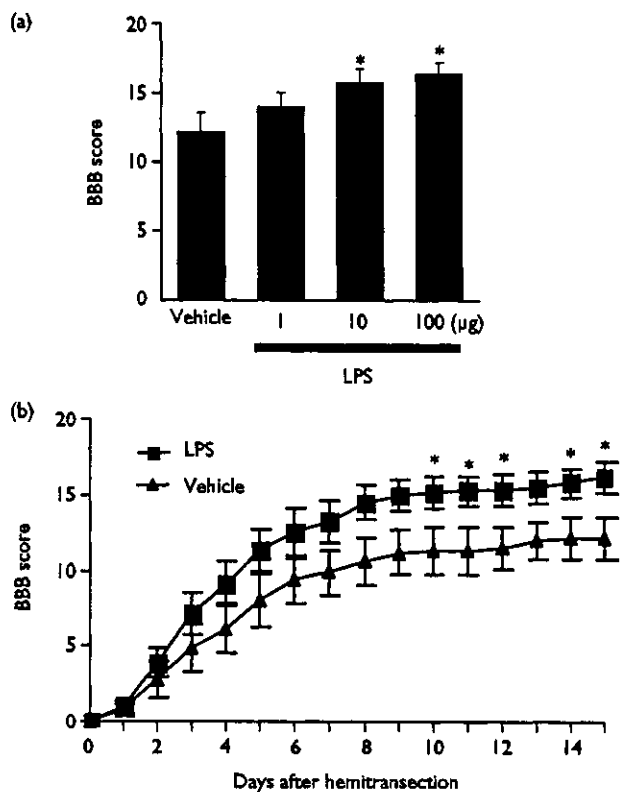


Fig. 1. Effect of LPS on locomotor function of rats with spinal cord injury. The left hemisphere of the spinal cord was transected, and a single injection (10 μ l) of 1, 10 or 100 μ g LPS or vehicle (PBS) was then administered to the injury site. (a) Locomotor function of the hind limb on the injured side was evaluated 14 days after the injury. The values are expressed as the means \pm s.e. ($n=4-9$). Significant differences from the value of the vehicle group were determined using ANOVA with Newman-Keuls post hoc test. * $p < 0.05$. (b) Locomotor function of the hind limb was evaluated daily after a single injection of LPS (10 μ g; squares) or vehicle (triangles). The values are expressed as means \pm s.e. ($n=6$ or 9). Significant differences from the value of the vehicle group on the same days were determined using Student's *t*-test. * $p < 0.05$.

CD11b antigen or GDNF-ir were thus significantly increased in number after LPS administration.

Effects of LPS on locomotor function of GDNF gene-deficient mice: Homozygous mice ($-/-$) could not be used because they died immediately after birth [16]. LPS facilitated the recovery of locomotor function of the $+/+$ mice, but showed no effects on that of $+/-$ mice. The $+/-$ mice recovered at a much slower rate than the $+/+$ ones irrespective of LPS administration (Fig. 3a), suggesting the GDNF expression level to be critical for the recovery rate and the degree of locomotor function.

The GDNF mRNA level in the intact spinal cord of the $+/-$ mice was about half of that of the $+/+$ animals. Spinal cord injury upregulated GDNF mRNA expression around the injury site, and LPS injection into the injury site facilitated GDNF mRNA expression much more than vehicle administration in both genetic types of mice (Fig. 3ba). On the other hand, although iNOS mRNA expression was also enhanced by the spinal cord injury or LPS administration (Fig. 3bb), similarly as for GDNF mRNA expression, there was no

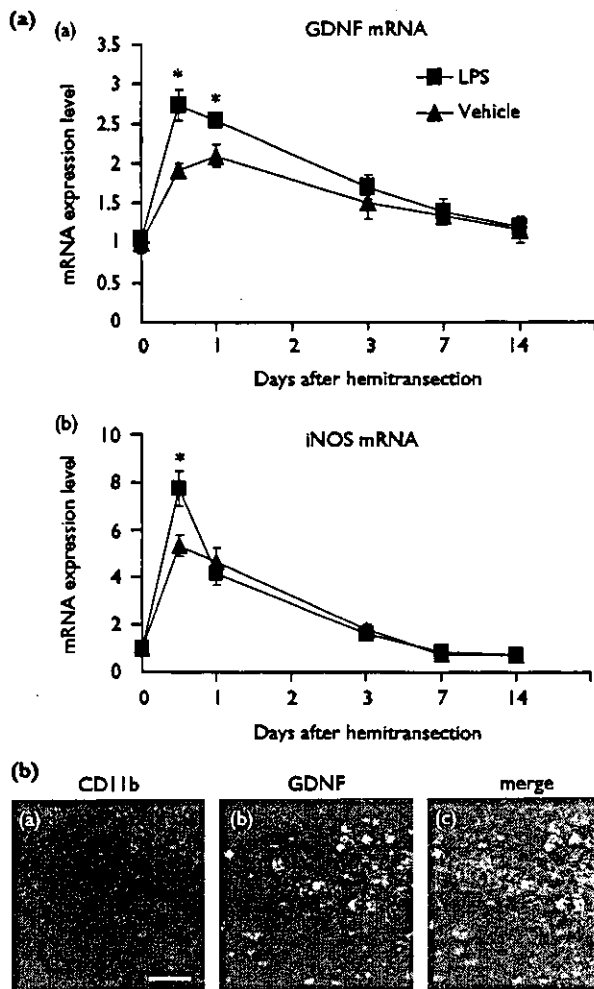


Fig. 2. Expression of GDNF and iNOS mRNAs (a) and colocalization of GDNF-ir in the CD11b-positive cells (b) in the injured rat spinal cord to which LPS or vehicle was administered. (a) LPS (10 μ g, squares) or vehicle (triangles) was injected into the hemitransection site (at the level of the 9th thoracic vertebra) of the spinal cord immediately after the operation, and the spinal cord was removed. Total RNA was prepared from combined tissues of both rostral and caudal areas (5 mm length) just adjacent to the injury site, and subjected to RT-PCR for mRNA of GDNF (a) and iNOS (b). The ratio of the band intensity of GDNF or iNOS cDNA products to that of GAPDH cDNA products was calculated. The values are expressed as the means \pm s.e. ($n=3$) of the fold-increase over the value of the control group in which total RNA samples were prepared immediately after the administration of LPS or vehicle. Significant differences from the value of the corresponding vehicle group were determined by means of Student's *t*-test. * $p < 0.05$. (b) LPS (10 μ g) was injected into the hemitransection site of spinal cord immediately after the operation. At 12 h post injection, the spinal cord was removed from the fixed animal and processed. Sagittal sections were double stained with mouse antibody against CD11b and rabbit antibody against GDNF and visualized with rhodamine-conjugated anti-mouse IgG for CD11b (a) and FITC-conjugated anti-rabbit IgG for GDNF (b). a and b are merged in (c). Bar=50 μ m.

difference in iNOS mRNA level between the mice of both genetic types. The combined action of these two types of regulators, i.e., GDNF and iNOS, with the former predominating, restored the locomotor function damaged by the spinal cord injury, suggesting that GDNF is involved in restoration processes via properly activated microglia/macrophages, i.e., via optimal inflammation reactions.

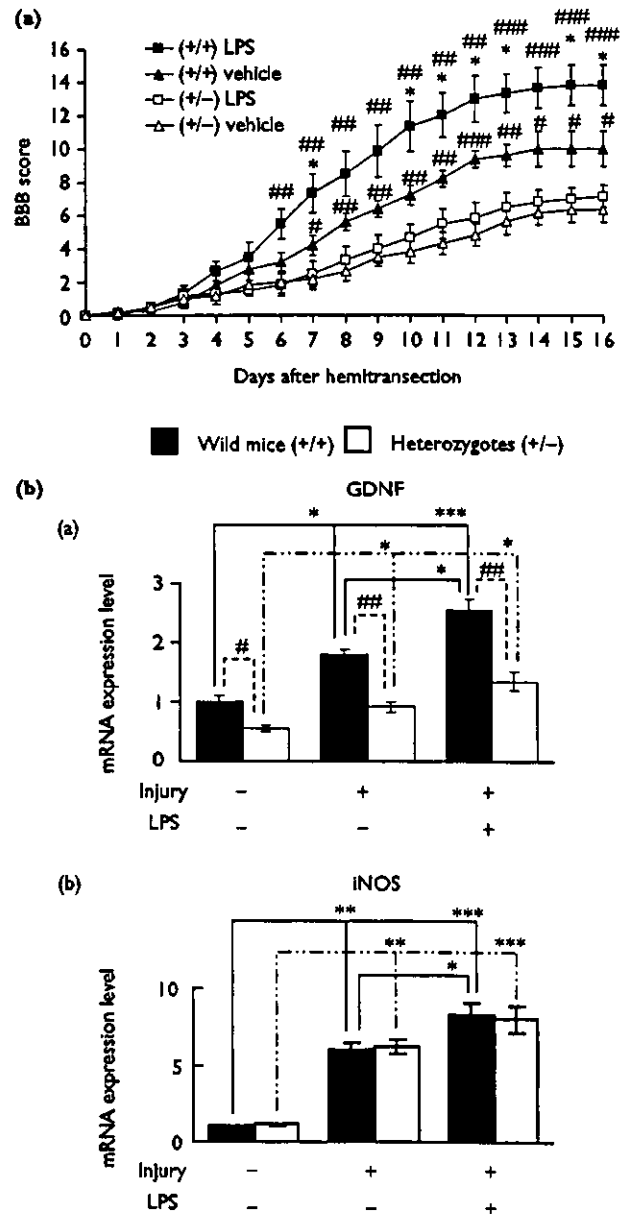


Fig. 3. Effects of LPS on locomotor function after spinal cord injury (a) and effects of LPS and/or spinal cord injury on the expression of GDNF and iNOS mRNAs (b) of wild-type mice (+/+) and GDNF-gene heterozygous mutant mice (+/-). The left side of the spinal cord was transected or not at the level of the 9th thoracic vertebra, and LPS (2 μ g) or vehicle was injected into the injury site immediately after the operation. (a) Locomotor function of the hind limb after injection of LPS (squares) or vehicle (triangles) was evaluated for +/+ (solid) and +/- (open) mice daily after injection of LPS (squares) or vehicle (triangles). The values are expressed as the means \pm s.e. ($n=6$). Significance, * $p < 0.05$ vs the value of the vehicle group of the corresponding genotype, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs the value of similarly treated +/+ mice (Student's *t*-test). (b) mRNA expression of GDNF (a) and iNOS (b) in the injury site of the spinal cord of +/+ (closed columns) and +/- (open columns) mice was examined by RT-PCR 12 h after the injection of LPS (2 μ g) or vehicle into the hemitransection site. The ratio of the intensity of GDNF or iNOS cDNA products to that of GAPDH cDNA products was calculated. The values are expressed as the means \pm s.e. ($n=3$) of the fold-increase over the value of vehicle-administered +/+ mice. Statistically significant differences between groups are indicated by brackets: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (ANOVA with Newman-Keuls post hoc test); # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ (Student's *t*-test).

DISCUSSION

Inflammatory reactions have opposing roles via production of neurotoxic or neurotrophic molecules. Previous reports described the activation or increase in the number of macrophages by LPS and inhibition of secondary injury after spinal cord injury by daily LPS injection [18,19]. Our present results demonstrate that high-dose LPS led to functional recovery of locomotion (Fig. 1), which we interpreted to be due to the increase in GDNF expression by macrophages activated and increased in number in the injury site (Fig. 2). Moreover, although the optimal dose of LPS enhanced iNOS mRNA expression, the GDNF mRNA level was sustained higher than normal for a much longer time (Fig. 2a), suggesting that properly-controlled inflammatory reactions favor neurotrophic influences by GDNF rather than neurotoxic ones due to iNOS. As exogenous GDNF exerts neuroprotection after spinal cord injury [20], LPS-induced GDNF would seem to contribute positively to nerve regeneration.

As GDNF enhances the phagocytic activity of cultured macrophages [17], GDNF synthesized by macrophages would activate macrophages in an autocrine manner. Therefore, not only neuroprotection but also activation of macrophages would result from macrophage-secreted GDNF in the injured spinal cord. Such GDNF might further upregulate GDNF synthesis in the macrophages, which would promote more and more restorative macrophage function. GDNF may be involved in an activation loop to form an adequate neurotrophic environment for nerve regeneration. Inflammatory reactions are sometimes harmful because of the production of NO, reactive oxygen species, and cytokines [6–8]; and therefore anti-inflammatory therapies are effective for spinal cord injury [21,22]. However, such therapies may simultaneously reduce the level of neurotrophic factors. Thus a proper balance is critical for establishing circumstances favorable for nerve regeneration.

Functional recovery of the GDNF-gene deficient heterozygous mice (+/–) was inferior to that of the wild-type mice (+/+) irrespective of LPS administration (Fig. 3). GDNF mRNA expression of the +/– mutant mice was about a half of that of the +/+ ones regardless of the treatment, whereas there was no difference in iNOS mRNA expression between both genetic mice. That is, GDNF produced by microglia/macrophages after spinal cord injury was important for recovery of locomotor function, except in the following case: Namely, LPS administration to the +/– mice enhanced their GDNF mRNA expression, but did not facilitate their functional recovery. This may have been due to insufficient expression of GDNF to elicit neurotrophic effects.

CONCLUSIONS

Properly activated microglia/macrophages in the injured spinal cord synthesize and secrete the neurotrophic factor GDNF, which is involved in restoring locomotor function damaged by a spinal cord injury.

Acknowledgements: This work was supported in part by a grant-in-aid (grant no. 14658252) from the Ministry of Education, Science, and Culture of Japan.

REFERENCES

1. Fawcett JW and Asher RA. The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res Bull* 1999; 49:377–391.
2. Widenfalk J, Lundströmer K, Jubran M, Brené S and Olson L. Neurotrophic factors and receptors in the immature and adult spinal cord after mechanical injury or kainic acid. *J Neurosci* 2001; 21:3457–3475.
3. Franzen R, Schoenen J, Leprince P, Joosten E, Moonen G and Martin D. Effects of macrophage transplantation in the injured adult rat spinal cord: a combined immunocytochemical and biochemical study. *J Neurosci Res* 1998; 51:316–327.
4. Adams DH and Lloyd AR. Chemokines: leucocyte recruitment and activation of cytokines. *Lancet* 1997; 349:490–495.
5. Rollins BJ. Chemokines. *Blood* 1997; 90:909–928.
6. Blight AR. Delayed demyelination and macrophage invasion: a candidate for secondary cell damage in spinal cord injury. *CNS Trauma* 1985; 2:299–315.
7. Zhang Z, Krebs CJ and Guth L. Experimental analysis of progressive necrosis after spinal cord trauma in the rat: etiological role of the inflammatory response. *Exp Neurol* 1997; 14:141–152.
8. Martiney JA, Cuff C, Litwak M, Berman J and Brosnan CF. Cytokine-induced inflammation in the central nervous system revisited. *Neurochem Res* 1998; 23:349–359.
9. Perry VH, Brown MC and Anderson PB. Macrophage responses to central and peripheral nerve injuries. *Adv Neurol* 1993; 59:309–314.
10. Zeev-Brann AB, Lazarov-Spiegler O, Brenner T and Schwartz M. Differential effects of central and peripheral nerves on macrophages and microglia. *Glia* 1998; 23:181–190.
11. Lin LF, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S and Collins F. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* 1993; 260:1130–1132.
12. Henderson CE, Phillips HS, Pollock RA, Davies AM and Lemeulle C. GDNF: a potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle. *Science* 1994; 266:1062–1064.
13. Satake K, Matsuyama Y, Kamiya M, Kawakami H and Iwata H. Up-regulation of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) following traumatic spinal cord injury. *Neuroreport* 2000; 11:3877–3881.
14. Wei GW, Wu GC and Cao XD. Dynamic expression of glial cell line-derived neurotrophic factor after cerebral ischemia. *Neuroreport* 2000; 11:1177–1183.
15. Basso DM, Beattie MS and Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma* 1995; 12:1–21.
16. Picher JG, Shen L, Sheng HZ, Granholm AC and Drago J. Defects in enteric innervation and kidney development in mice lacking GDNF. *Nature* 1996; 382:73–76.
17. Hashimoto M, Nitta A, Fukumitsu H, Nomoto H, Shen L and Furukawa S. Involvement of glial cell line-derived neurotrophic factor in activation processes of rodent macrophages. *J Neurosci Res* 2004; in press.
18. Guth L, Zhang Z, DiProspero NA, Joubin K and Fitch MT. Spinal cord injury in the rat: treatment with bacterial lipopolysaccharide and indomethacin enhances cellular repair and locomotor function. *Exp Neurol* 1994; 126:76–87.
19. Lazar DA, Ellegala DB, Avellino AM, Dailey AT and Andrus K. Modulation of macrophage and microglial responses to axonal injury in the peripheral and central nervous systems. *Neurosurgery* 1999; 45: 593–600.
20. Cheng H, Wu JP and Tzeng SF. Neuroprotection of glial cell line-derived neurotrophic factor in damaged spinal cords following contusive injury. *J Neurosci Res* 2002; 69:397–405.
21. Labombarda F, Gonzales SL, Gonzales DM, Guennoun R and Schumacher M. Cellular basis for progesterone neuroprotection in the injured spinal cord. *J Neurotrauma* 2002; 19:343–355.
22. Bao F, Chen Y, Dekaban GA and Weaver LC. Early anti-inflammatory treatment reduces lipid peroxidation and protein nitration after spinal cord injury in rats. *J Neurochem* 2004; 88:1335–1344.

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

直井 信*, 丸山 和佳子**

抄録 パーキンソン病は環境および遺伝要因により加齢とともに黒質のドパミン細胞の変性をもたらす疾患である。その病因に関する仮説の1つとして神経毒があり、6-hydroxydopamine (6-OHDA) と 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) を用いた動物と細胞モデルが本疾患の病態の解明に多くの寄与をしてきた。我々はドパミンよりヒト脳内で生成される *N*-methyl(*R*)salsolinol がドパミン神経に対する選択的な神経毒であることを動物および細胞モデルの作成と、臨床サンプルの分析から証明してきた。神経毒によるモデル系はドパミン神経の選択的な細胞死の機序の研究有用な手段であった。最近内在性神経毒による細胞モデルを用いて神経細胞の変性を阻止する神経保護薬の開発とその作用機序の研究が進められている。本稿では細胞死と保護の機序に関する我々の研究成果を紹介する。

脳の科学 (2004年増刊号) 157-164, 2004

Key words : neurotoxin, apoptosis, neuroprotection, *N*-methyl(*R*)salsolinol, mitochondria

はじめに

孤発性パーキンソン病 (Parkinson's disease, PD) はアルツハイマー病に次いで頻度の高い高齢者の神経変性疾患であり、黒質ドパミン神経細胞の選択的な細胞死と特異な封入体 Lewy 小体の存在が病理像の特徴である。しかしその原因は未だに解明されておらず、複数の環境および遺伝要因が関与する多因子疾患であると考えられている。

PD 患者のほとんどを占める孤発性患者に関して疾病発症に関与する遺伝因子は見出されていない。従って PD の原因を解明するためには疾患の病態を理解することが必須であり、そのための疾患モデルが動物、細胞レベルで報告されている。特に 1979 年 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) がヒトに PD 様症状を発症させるとの報告以来、MPTP モデルを用いたドパミン神経の細胞死の研究が急速に発展することとなった。現在 MPTP はヒト脳内には存在しない合成化合物で孤発性 PD の原因ではないと考えられている。しかし、MPTP 類似のドパミン神経に選択性と毒性を持つ低分子化合物が存在し PD の細胞死に関与する可能性がある。

筆者らはドパミンより脳内で酵素的に生成される *N*-methyl(*R*)salsolinol [*NM*(*R*)Sal] が内在性の MPTP 様の神経毒であることを動物、細胞モデルを用いて証明し、さらに臨床サンプルの

Models of Parkinson's disease induced by neurotoxins: its application for the studies on intracellular mechanism of cell death and development of neuroprotective agents.

*岐阜県神岡市立研究所脳神経研究部門

〒501-8503 岐阜県各務原市郡加不動丘 1-1]

Makoto Naito : Department of Neurosciences, Gifu International Institute of Biotechnology, 1-1 Naka-Fudogaoka, Kalamigahara, Gifu, 504-0838, Japan.

**長寿科学研究所・老化機構研究部生化学・代謝研究室

Wakuhito Mizushima : Department of Basic Gerontology, National Institute of Longevity Sciences.

表1 ドパミン神経細胞死に関与するとされる神経毒

神経毒	動物、細胞モデルの特徴	細胞死とその機序
ドパミン由来の内在性化合物		
6-OHDA	行動、薬理、病理もPDに類似、封入体は認められない	選択的、necrosis/apoptosis、酸化ストレス
NM(R)Sal	行動、薬理、病理もPDに類似、封入体は認められない	選択的、apoptosis、Mitの細胞死機構の活性化
内在/環境由来の化合物		
β -Carboline	行動、薬理、病理もPDに類似、封入体は認められない	選択的、細胞死、機序は未定 (Mit 障害?)
TaClo	行動、薬理、病理もPDに類似、封入体は認められない	選択的、細胞死、機序は未定 (Mit 障害?)
環境由来の神経毒		
農薬		
Rotenone	行動、薬理、病理もPDに類似、封入体を認める	非選択的necrosis/apoptosis、Mit障害、酸化ストレス
Paraquat	PDとの類似性は低い、封入体は認められない	非選択的、necrosis/apoptosis、酸化ストレス
Dieldrin	PDとの類似性は低い、封入体は認められない	非選択的、necrosis/apoptosis、酸化ストレス
合成神経毒		
MPTP	行動、薬理、病理もPDに類似、封入体は認められない	選択的、necrosis/apoptosis、酸化ストレスとMit障害
金属イオン		
鉄	PDとの類似性は低い、封入体は認められない	非選択的、necrosis/apoptosis、酸化ストレス
マンガン		

解析によりPD病因への関与を証明してきた。現在神経毒の研究はドパミン神経細胞に選択的な細胞死の機序に関する研究と新たなPDの治療法、特に神経保護法の開発に向かっていている。このため、本稿においてはNM(R)Salを用いたPDの病因に関する従来の結果とあわせ、細胞死の細胞内機序と神経保護薬剤の開発に関する最近の我々の研究を述べる。

I. 神経毒を用いた疾患モデル： PD 病因との関連

6-hydroxydopamine (6-OHDA) と MPTP による動物モデルは既に各々40、25年の歴史があり、病理、行動、薬物への反応性もPDに類似のものとして一般に用いられている⁶⁾。しかし、Lewy body 様の封入体は認められず、老化とともに進行するPDの完璧なモデルとはなりえない。このため、最近ミトコンドリア (Mit) 呼吸鎖の複合体1の阻害剤 rotenone による封入体形成を伴うモデルが報告された³⁾。表1に現在報告されているドパミン神経の選択的な細胞死を起こす神経毒を示す。

MPTP はヒト脳内でB型モノアミン酸化酵素 (monoamine oxidase, MAO) により酸化され、

1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺) に変換される。MPP⁺はドパミン神経に存在するドパミン再取り込み機構により取り込まれ、Mit内に蓄積する。最終的にMPP⁺はMit呼吸鎖酵素 complex I と α -ketoglutarate dehydrogenase を阻害することによりATP産生の阻害と酸化ストレスにより細胞死を惹起する。6-OHDAはドパミン細胞への選択的な取込みの後、自動酸化による superoxide の産生と c-Jun N-terminal kinase の活性化により主にアポトーシスを惹起する⁵⁾。動物モデルの作成にはMPTPは末梢からの投与が可能であるが、6-OHDAでは脳内注入が必要となる。これら動物モデルの作成は動物種、投与方法と量により結果が異なり、詳細は文献を参考にされたい^{8,10)}。

MPP⁺とは異なり、paraquat等のdipyridinium殺虫剤でN-メチル化されているものは特定の輸送タンパクと結合して脳内に移行し酸化ストレスを介し神経細胞の変性を引き起こす。最近疫学的な結果からも農薬がPDの原因物質として再び注目されている。従来 paraquat や rotenone はドパミン細胞に対する選択性がないため、PDの病因物質にはなりえないと考えられていた。しかし最近 rotenone の濃度と投与方法を配慮した動

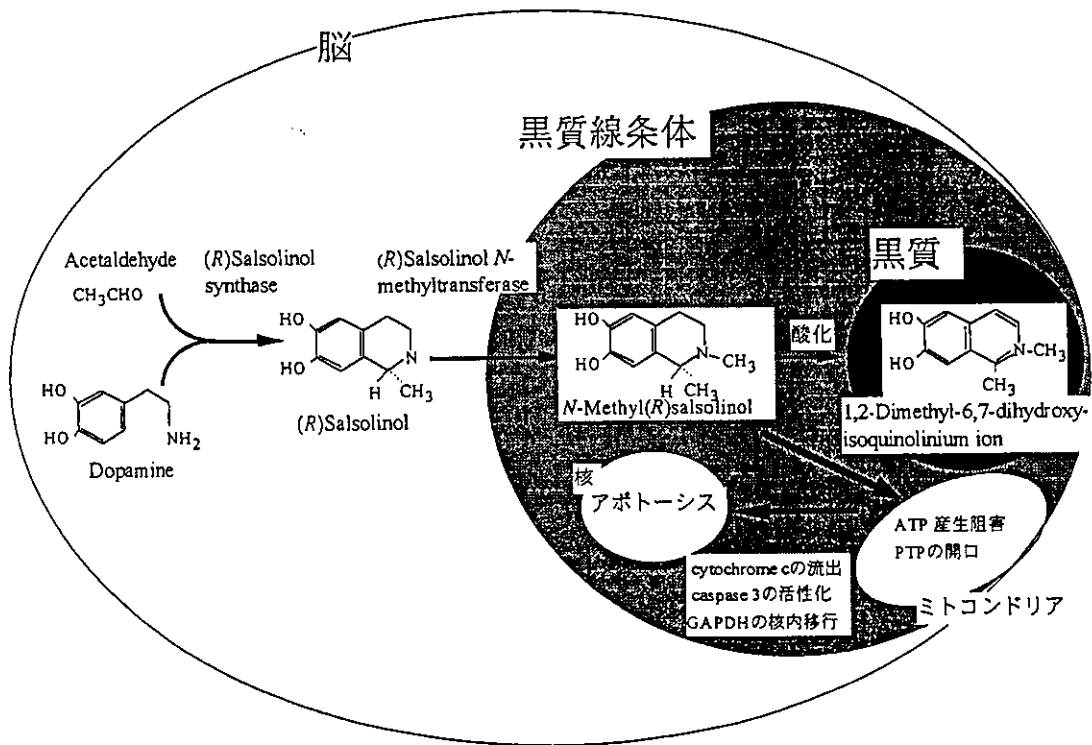


図1 ドパミン由来の神経毒 *N*-methyl(*R*)salsolinol のヒト脳内代謝と分布
 ドパミンとアセトアルデヒドから (*R*)サルソリノールシンターゼにより生成される (*R*)サルソリノールは脳内に広く分布する。*(R)*サルソリノール *N*-メチル転位酵素により *N*-メチル体となり、黒質線条体に極在して存在する。さらに酵素的または非酵素的に酸化され MPP⁺ 類似のイオン体となり黒質にのみ蓄積する。NM(*R*)Salのみがミトコンドリアの膜透過性を亢進してアポトーシスを誘発する。

物モデルで黒質線条体のドパミン細胞に細胞死と Lewy body 類似の封入体が認められた³⁾。この部位でのドパミン細胞が rotenone に対し脆弱であることから選択的な毒性が生ずることが示唆された。Rotenone を用いたモデルは封入体生成の研究には有用と考えられる。最近我々は rotenone による細胞死モデルで、proteasome 20Sβタンパクが酸化修飾され活性が低下し、構造の変化した酸化修飾タンパクが細胞内で分解されず蓄積凝集される機構を証明した¹⁹⁾。他の塩素系農薬である dieldrin も PD 脳内で増加し⁷⁾、酸化ストレスを介しドパミン細胞に細胞毒性を示すことが報告されているが、今のところ上記のモデル程一般的には用いられておらず PD の病因物質としても認められてはいない。

内在性の PD と関連した神経毒としてドパミン

由来のカテコールイソキノリン (salsolinol, 1-methyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline)、フネチルアミン由来のイソキノリン (1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline)、インドールアミン由来の β-carboline が報告されている。我々はドパミンから脳内で酵素的に生成される salsolinol 類の研究から NM(*R*)Sal [1(*R*)-methyl-*N*-methy-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline] が PD 病因と関連する内在性神経毒であることを証明してきた。この結果を以下にまとめる。

- 1) ドパミンから2段階の酵素反応、即ちアルデヒドとの縮合反応により (*R*)-salsolinol が、次に (*R*)salsolinol に選択的な *N*-メチル転位酵素により、MPTP と化学構造の類似したイソキノ

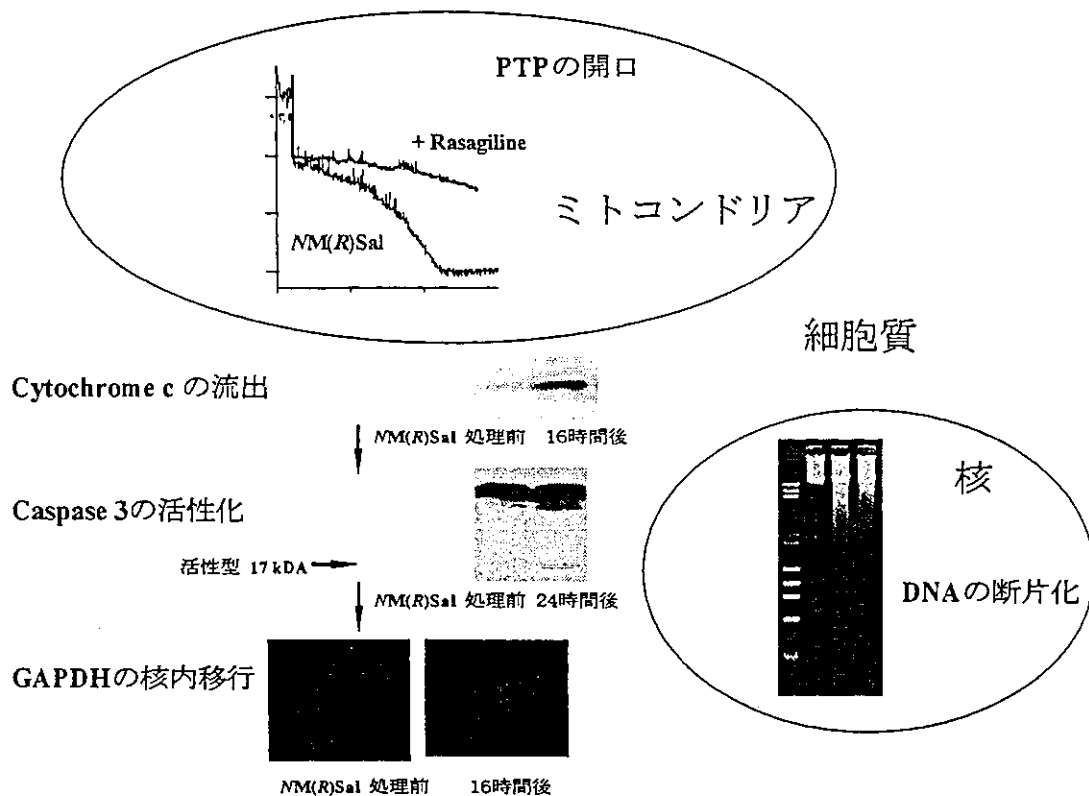


図2 NM(R)Salによる細胞死シグナル

NM(R)Salはミトコンドリア (Mit) のメガチャンネル permeability transition pore (PTP) を開口し膨張させる (図は単離 Mit の光分散の測定値)。その結果チトクローム C が細胞質に流出し、カスパーゼ群が活性化する。Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) は細胞質より核内に移行し、最終的に核 DNA の断片化が起りいわゆる ladder 形成が見られる。また rasagiline (図3、4を参照) は、Mit の PTP の開口を阻んでいる。

ノリン NM (R)Sal が生成される¹⁶⁾。NM (R)Sal のラットへの持続投与により黒質ドパミン神経細胞に選択的な細胞死とパーキンソン症状が惹起された。一方他の光学異性体 (S)Sal は脳内に認められず、NM(S)Sal は神経毒性を示さなかった¹⁶⁾。

2) ヒト脳部位での分布を検討すると、NM (R)Sal は線条体に、その酸化生成物で MPP⁺ と構造の類似した 1,2-dimethyl-6,7-dihydroxy-isoquinolinium ion は黒質にニューロメラニンと結合して選択的に蓄積していた¹⁶⁾。図1に脳内の代謝と分布の関連を示す。

3) NM(R)Sal 濃度は未治療 PD 患者の脳脊髄液中で増加しており⁹⁾、その機序は PD 患者リン

パ球で証明したように、N-メチル化反応を触媒する (R)salsolinol N-メチル転位酵素活性が著明に増加する為と考えられる¹⁷⁾。

(R)体のみがヒト脳内で生成され N-メチル化によりドパミン細胞への選択的な神経毒性を持つことから、NM(R)Sal の代謝に関与する酵素系が PD の原因となっている可能性が考えられる。同様の結果は β -carboline においても認められ、2,9-N-N-dimethyl-norharman と 2,9-N, N-dimethylated harman cation が PD の CSF で増加しており、 β -carboline N-メチル転位酵素の活性が PD の脳内で高いとの報告がある¹⁵⁾。またドパミンから MAO による酸化により生成する

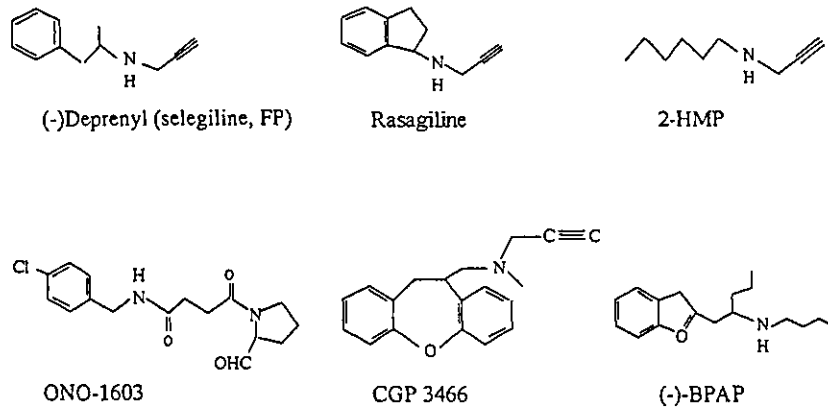


図3 神経保護活性が認められている薬剤の化学構造
多くの薬剤は propargyl 基 $-\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$ を持ち、Mit 膜の安定化に働く。

ドパアルデヒドとドパミンが縮合して tetrahydropapaveroline (THP) となる。THP は sal-solinol と異なり (S) 体のみがヒト脳で内在し、酸化体がアポトーシスを、還元体がネクローシスを起こす¹⁹⁾。THP は L-dopa 療法を受けている PD 患者でドパミン細胞の細胞死を増加させる可能性が指摘されたが、証明はされていない。

またトリプタミンとクロラルの縮合で生成する trichloromethyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline (TaCl₀) がクロラルを使用した患者で存在し、ドパミン神経に対する細胞毒性が認められた。しかし PD の病因に関与する可能性は低いと考えられている。またガソリンに添加されているマンガンのカボニル体が、可逆的なパーキンソン症候を惹起することが報告されている。しかし鉄、マンガンともに最近の疫学調査では PD の危険因子ではないとされている。

II. 内在性神経毒 NM(R)Sal を用いた細胞死機序の解明

PD におけるドパミン神経の細胞死がアポトーシスによるのかネクローシスによるのかとの議論は未だ最終的な決着を見ていない。しかし、最近の PD 患者脳の実験結果によるとアポトーシスに関与する細胞死シグナルの活性化が認められている²⁰⁾。我々は内在性神経毒 NM(R)Sal がアポトーシスを惹起することを見出し、その機構をヒト

ドパミン系神経芽細胞腫 SH-SY 5 Y 細胞を用い検討した。NM(R)Sal による細胞死の機序に関する我々の結果を図 2 に示し概説する。

1) *N*-Methylsalsolinol [NMSal] には *R*; *S* 体の光学異性体があるが、*R* 体のみが SH-SY 5 Y 細胞にアポトーシスを惹起する。ネクローシスは殆ど認められない。

2) 細胞死は Mit 依存性の細胞死シグナルにより引き起こされる。即ち Mit 膜に存在するメガチャンネル permeability transition pore (PTP) の開口により、膜電位 ($\Delta\Psi_m$) の低下、cytochrome c の細胞質への流出、caspase 3 の活性化、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の細胞質から核への移行と段階的にアポトーシスシグナルが活性化し DNA の断片化に至る^{1,12,13)}。

3) 単離 Mit を用いた研究から *R* 体の NMSal のみが PTP を開口する¹⁾。これは SH-SY 5 Y 細胞において *R* 体のみが $\Delta\Psi_m$ を低下させることと一致し¹³⁾、この神経毒が Mit に直接し細胞死カスケードを活性化することを示している。

4) Bcl-2 を過剰発現させた SH-SY 5 Y 細胞¹³⁾ と単離 Mit を¹⁾を用いた実験で、Mit 膜に存在する Bcl-2 タンパクがこの PTP 開口を抑制し下流の細胞死シグナルを制御していることを証明

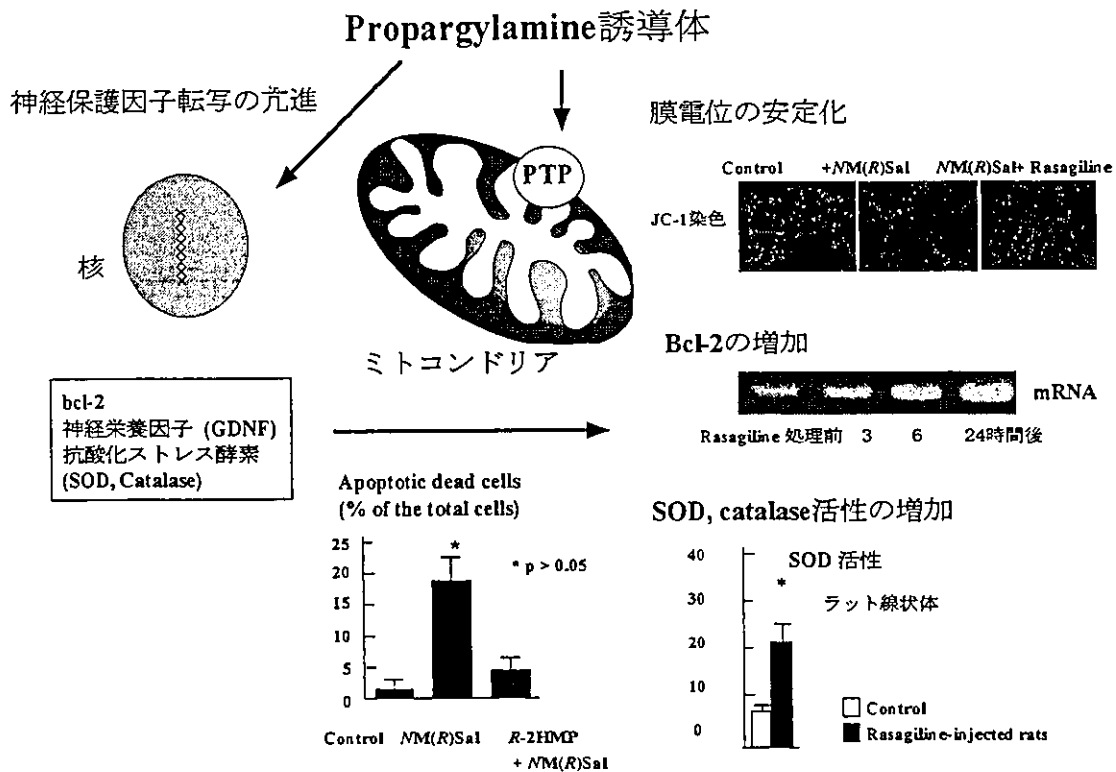


図4 Rasagiline 等のプロパルギルアミン誘導體の神経保護作用の機序
Rasagiline, *N*-(2-heptyl)-*N*-methylpropargylamine (2-HMP) などの propargylamine 誘導體は SH-SY 5 Y 細胞において Mit 膜の PTP を直接, または Bcl-2 を介して安定化する。Mit の膜電位を JC-1 染色により観察すると, NM(R)Sal による蛍光の低下を rasagiline は阻止する。細胞内の転写因子を活性化し, Bcl-2, GDNF, superoxide dismutase (SOD), catalase を誘導し細胞をアポトーシスから保護する。

した。

NM(R)Sal によるアポトーシスにおける細胞内シグナルに関する DNA array を用いた結果では, Tumor necrosis factor (TNF), TNF-receptor 等の cytokine と, mitogen-activated protein (MAP) kinase 等の kinase に関連する遺伝子が著明に増加している。これは従来 PD 脳の分析結果とも一致した。ドパミン神経の細胞死に関与する細胞内シグナル機構の研究に神経毒による細胞モデルが今後活用されるであろう。

III. 神経保護剤の細胞内作用機序

最近神経細胞の変性を阻止または再生を促進

する療法が注目されてきている。これは B 型 MAO の阻害剤 (-)deprenyl (selegiline, FP) が MPTP による PD モデルにおいて発症を阻止した報告による。その後 (-)deprenyl が MAO 活性の阻害を介さず神経細胞を保護する活性を持つことが明らかとなった。我々は NM(R)Sal, 6-OHDA または peroxynitrite による細胞死モデルで (-)deprenyl に関連した化合物の保護作用の分子機構を明らかにした。図3に現在臨床で使用されるか, 近日導入される予定の薬剤の構造をしめす。

我々は抗アポトーシス活性の最も高い *N*-propargyl-1(R)aminindan (rasagiline) を用い図4に示すような神経保護作用の機序を明らかにした。

1) RasagilineはMitのPTPに作用し $\Delta\Psi_m$ の低下を防ぎ、それに引き続くアポトーシスシグナルの活性化を阻止する^{1,12)}。単離MitとSH-SY5Y細胞で証明した結果を図2, 4に示す。構造活性相関の検討からMit膜の安定化にはPropargyl基が必要であった¹⁴⁾。

2) Rasagilineは抗アポトーシス活性を持つBcl-2, Bcl-xLを誘導する^{1,2,12)}。一方細胞死を誘導するBAX, BADには影響しない。

3) ドパミン細胞に選択的な保護活性を持つglia cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)を誘導する [Maruyama, Neurochem. Int., 印刷中]。

4) 抗酸化活性を持つsuperoxide dismutase, catalaseの活性をドパミン細胞の存在する脳の部位で増加させる⁹⁾。

これらの結果はrasagilineが神経細胞の保護活性を持つタンパクを広く誘導することを示している。ではrasagilineは細胞内の如何なる機構を用いて保護作用を示しているのでしょうか。我々はrasagilineによる遺伝子の発現をSH-SY5Y細胞とDNA array法を用い検討した。SH-SY5Y細胞においてrasagilineの投与12時間から多くの転位因子のmRNAの増加が認められた。この結果は細胞の生存に必要な遺伝子の発現が薬剤により誘導される可能性を示しており、現在その機構の研究が進められている。

IV. 結 語

現在6-OHDA, MPTP, 等の神経毒による疾患モデルはPDの病態を反映するものとして一般に用いられている。今後はParkin, α -synuclein等の家族性PDでの病因遺伝子を導入した動物、細胞モデルと神経毒との組み合わせで研究が進むこととなろう。我々の内在性神経毒NM(R)Salを用いた結果は細胞死とその保護に関する細胞内シグナルが存在すること、その制御がMitに内在するBcl-2を介した機構によることを示している。神経変性に関する細胞内機構の研究に神経

毒を用いたモデルは今後も有効な手段であろう。ただし、モデル系を用いた結果は最終的には患者サンプルでの結果が求められる。このため新たなPDの診断および治療マーカーの確立が求められる。

文 献

- 1) Akao, Y., Maruyama, W., Shimizu, S.: Mitochondrial permeability transition mediates apoptosis induced by *N*-methyl(*R*)salsolinol, an endogenous neurotoxin, and is inhibited by Bcl-2 and rasagiline, *N*-propargyl-1(*R*)-aminoindan. *J. Neurochem.*, 82 : 913-923, 2002.
- 2) Akao, Y., Maruyama, W., Yi, H. et al.: An anti-Parkinson's disease drug, *N*-propargyl-1(*R*)-aminoindan (rasagiline), enhances expression of anti-apoptotic Bcl-2 in human dopaminergic SH-SY5Y cells. *Neurosci. Lett.*, 326 : 105-108, 2002.
- 3) Betarbet, R., Sherer, T. B., MacKenzie, G. et al.: Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat. Neurosci.*, 3 : 1301-1306, 2000.
- 4) Carrillo, M. C., Minami, C., Kitani, K. et al.: Enhancing effect of rasagiline on superoxide dismutase and catalase activities in the dopaminergic system in the rat. *Life Sci.*, 67 : 577-585, 2000.
- 5) Choi, W-S., Yoon, S-Y., Oh, T-H, et al.: Two distinct mechanisms are involved in 6-hydroxydopamine - and MPP+ : - induced dopaminergic neuronal cell death: Role of caspases, ROS and JNK. *J. Neuro-sci. Res.*, 57 : 86-94, 1999.
- 6) Collins, M. A., Jeafsey, E. J.: Potential neurotoxic "agents provocateurs" in Parkinson's disease. *Neurotoxicol. Teratol.*, 24 : 571-577, 2002.
- 7) Corringan, F. M., Murray, L., Wyatt, C. L., et al.: Diortho substituted polychlorinated biophenyls in caudate nucleus in Parkinson's disease. *Exper. Neurol.*, 150 : 339-342, 1998.
- 8) Gerlach, M., Riederer, P.: Animal models of Parkinson's disease : an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. *J. Neural Transm.*, 103 : 987-1041, 1996.
- 9) Maruyama, W., Abe, T., Tohgi, H. et al.: A dopaminergic neurotoxin, (*R*)-*N*-methyl-salsolinol, increases in parkinsonian cerebrospinal fluid. *Ann. Neurol.*, 40 : 119-122, 1996.
- 10) Maruyama, W., Sobue, G., Matsubara, K. et al.: A

- dopaminergic neurotoxin, 1 (*R*), 2(*N*)-dimethyl-6, 7-dihydroxy-1, 2, 3, 4-tetrahydroisoquinoline, *N*-methyl(*R*)-salsolinol, and its oxidation product, 1, 2(*N*)-dimethyl-6, 7-dihydroxyisoquinolinium ion, accumulates in the nigro-striatal system of the human brain. *Neurosci. Lett.*, 223 : 61-64, 1997.
- 11) Maruyama, W., Sangò, W., Iwasa, K. et al. : Dopaminergic neurotoxins, 6, 7-dihydroxy-1- (3', 4'-dihydroxybenzyl) -isoquinolines, cause different types of cell death in SH-SY 5 Y cells : apoptosis was induced by oxidized papaverolines and necrosis by reduced tetrahydropapaverolines. *Neurosci. Lett.*, 291 : 89-92, 2000.
 - 12) Maruyama, W., Akao, Y., Youdim, M. B. H. et al. : Transfection-enforced Bcl-2 overexpression and an anti-Parkinson drug, rasagiline, prevent nuclear accumulation of glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase induced by an endogenous dopaminergic neurotoxin, *N*-methyl(*R*)salsolinol. *J. Neurochem.*, 78 : 727-735, 2001.
 - 13) Maruyama, W., Boulton, A. A., Davis B. A. et al. : Enantio-specific induction of apoptosis by an endogenous neurotoxin, *N*-methyl(*R*)salsolinol, in dopaminergic SH-SY 5 Y cells : suppression of apoptosis by *N*-(2-heptyl)-*N*-methyl-propargylamine. *J. Neural Transm.*, 108 : 11-24, 2001.
 - 14) Maruyama, W., Weinstock, M., Youdim, M. B. H. et al. : Anti-apoptotic action of anti-Alzheimer drug, TV 3326 [(*N*-propargyl)-(3*R*)-aminoindan-5-yl]-ethyl methyl carbamate, a novel cholinesterase-monoamine oxidase inhibitor. *Neurosci. Lett.*, 341 : 233-236, 2003.
 - 15) Matsubara, K., Kobayashi, S., Kobayashi, K. et al. : β -Carbolinium cations, endogenous MPP⁺ analogs, in the lumbar cerebrospinal fluid of parkinsonian patients. *Neurology*, 45 : 2240-2245, 1995.
 - 16) Naoi, M., Maruyama, W., Dostert, P. et al. : Dopamine-derived endogenous 1(*R*), 2(*N*)-dimethyl-6, 7-dihydroxy-1, 2, 3, 4-tetrahydroisoquinoline, *N*-methyl-(*R*)-salsolinol, induced parkinsonism in rat: biochemical, pathological and behavioral studies. *Brain Res.*, 709 : 285-295, 1996.
 - 17) Naoi, M., Maruyama, W., Nakao, N. et al. : (*R*) Salsolinol *N*-methyltransferase activity increases in parkinsonian lymphocytes. *Ann. Neurol.*, 43 : 212-216, 1998.
 - 18) Naoi, M., Parvez, H., Maruyama, W. et al. : Milestones in Research on Neurotoxins and Neuroprotection : A Tribute to Professor Toshiharu Nagatsu, *Neurotoxicol. Tetratol.* (特集号) Vol. 24, Nr. 5, 2002 に本稿の課題に関する最新の総説が纏められている。
 - 19) Shamoto-Nagai, M., Maruyama, W., Kato, Y. et al. : An inhibitor of mitochondrial complex I, rotenone, inactivates proteasome by oxidative modification and induces aggregation of oxidized proteins in SH-SY 5 Y cells. *J. Neurosci. Res.*, in press, 2003.
 - 20) Tatton, N.A. : Increased caspase 3 and Bax immunoreactivity accompany nuclear GAPDH translocation and neuronal apoptosis in Parkinson's disease. *Exp. Neurol.*, 166 : 29-43, 2000.

《今後の展開が期待される治療法》

神経保護薬

丸山和佳子 直井 信

特集 パーキンソン病 — 治療の問題点と今後の展開

臨床雑誌「内 科」第93巻 第4号〔2004年4月号〕別 刷

南 江 堂

《今後の展開が期待される治療法》 神経保護薬

丸山和佳子 直井 信*

はじめに●

パーキンソン病(PD)をはじめとする神経変性疾患の治療として、現在もっとも期待されているのは神経変性を抑制あるいは遅延させる神経保護薬の開発である。現在までにいくつかの神経保護薬候補が提唱され、欧米では大規模多施設臨床研究がなされている。しかし、残念ながらこれまでのところ神経保護作用が証明された薬剤はない。一方、多くの細胞あるいは動物モデルを用いた実験では、ドパミンアゴニスト、神経栄養因子、興奮性アミノ酸受容体阻害薬、抗酸化薬、抗アポトーシス分子作用薬など多くの薬剤が神経保護作用を示す。このような患者とモデル系における結果の解離の原因としては、

- ① 薬剤の投与量あるいは投与のタイミングが適切でない：PD患者で症状が発現する時期にはすでに2/3以上のドパミン神経細胞が変性しており、残存している神経細胞も死のプロセスが進行している。そのため薬剤の効果が認められない可能性がある。
- ② 薬剤の効果判定法が適切でない：現在、神経保護薬の効果判定には画像診断(PET, SPECTなど)によるドパミン神経終末の機能と、臨床症状の半定量的評価(UPDRS (Unified Parkinson's Disease Rating Scale)など)が、用いられている。しかしながらこれらの指標は定量性に乏しく、また、疾

患の進行速度には患者間のばらつきが大きいため有意差を証明するのは容易ではない。さらに、PDの症状を緩和する治療薬(L-dopaなど)の影響も無視できない。

- ③ PDモデルにおける細胞死プロセスが実際の患者と同一でない：PDモデルとしては、6-hydroxydopamine, 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP), rotenoneなど薬剤による細胞死モデルや、 α -synuclein, parkinのトランスジェニック、ノックアウトによる遺伝子改変モデルが存在する。しかし、孤発性PDの原因や細胞死の機序はいまだ明らかとなっておらず、モデルと同様な細胞死経路がPDで関与しているとは限らない。したがって、モデルで有効な作用点が必ずしも患者で有効であるとは保証されていない。

などが考えられる。

はたして、PDに対する神経保護薬開発は可能であろうか。本稿では現在研究が進んでいる神経保護薬候補物質とその作用機序、さらにこれらの臨床応用の可能性について概説する。最後に、筆者らが最近研究を進めているpropargylamine化合物について、最新の成果を報告する。

神経保護薬候補とその作用機序●

神経保護薬候補は、細胞死に関わる特定の標的分子に作用することによりその後の細胞死プロセスの活性化を抑制する。薬剤の作用機序により神経保護薬を分類する。

* W. Maruyama (室長)：国立療養所中部病院長野医療研究センター老化機構研究部生化学・代謝研究室(☎474-8522 愛知県大府市森岡町源吾36-3)；M. Naoi：(財)岐阜国際バイオ研究所客員研究部門脳神経研究分野。

1. ドパミンアゴニスト

ドパミンの受容体に結合し、PDで欠乏するドパミン依存性の神経伝達を活性化するのみならず、ドパミンアゴニストの一部には *in vivo* で神経保護作用が認められる。その作用機序としてはドパミン代謝回転の低下による酸化ストレスの抑制、シグナル伝達を介する神経保護作用、ラジカル消去作用、神経栄養因子増加作用、などが報告されている¹⁾。PD患者に対する神経保護作用については、SPECTあるいはPETによる評価でドパミン変性が有意に抑えられたとの報告もある²⁾。ドパミンアゴニストは現在PD患者に使用されている薬剤であり、短期的に運動症状を改善させることもできるため、倫理的にも問題なく使用可能であることは大きな利点である。また、少なくとも長期L-dopa使用による不随意運動などの副作用の発生頻度を減少させることができる。しかし、現在使用されている薬剤については臨床的にその神経保護作用はあまり強くはないと考えられる。

2. 神経栄養因子

神経栄養因子は神経の分化、シナプス形成、生存維持に関わる重要な分子であり神経細胞だけでなくグリア細胞からも分泌される。これらの中でもドパミン神経細胞に対してもっとも神経保護活性の高いのはGDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor)である。GDNFはMPTPによるサルPDモデルで神経細胞死を抑制しただけでなく、近年PD患者の線条体に投与することにより臨床症状とPET所見が改善したとの報告がなされ、注目を集めている³⁾。これがGDNFによるドパミン神経終末のシナプス増加によるものなのか、あるいは本当に神経細胞死が防御されたのかについては興味のもたれるところである。

一方、神経栄養因子使用上の問題点としては、本薬剤はタンパクであるため血液脳関門を通過せず、脳内への直接注入あるいは遺伝子導入など侵襲的な手技が必要とされることがあげられる。神経栄養因子の受容体刺激薬あるいは脳内で神経栄養因子を増加させる脳内移行が良好な薬剤の開発

が期待される。

3. 興奮性アミノ酸受容体阻害薬

興奮性アミノ酸であるグルタミン酸は、神経傷害をきたすような病態で細胞外レベルが増加し、神経細胞に存在する受容体を刺激する。その結果、細胞内にCa²⁺の流入が引き起こされ、細胞内Ca²⁺依存性のキナーゼ活性化、NO合成酵素の誘導などにより細胞死が引き起こされる。興奮性アミノ酸受容体阻害薬は虚血、MPTPなどによる神経細胞死を抑制することが実験的に報告されている。興奮性アミノ酸受容体阻害薬として開発されたriluzoleは、筋萎縮性側索硬化症に使用され、神経変性の進行を抑制する一定の効果が認められている⁴⁾。しかし、riluzoleがPDにおける神経変性を抑制できるか否かについては確定的な証拠はない。

4. 抗酸化薬

PDをはじめとする神経変性疾患や、虚血性神経傷害の病因には酸化ストレスが重要な役割を果たしていると考えられている。

1990年代に行われたDeprenyl and Tocopherol Anti-oxidant Therapy of Parkinson's disease (DATATOP) studyは、B型モノアミン酸化酵素(MAO-B)阻害薬である(-)deprenyl (selegiline)によるドパミンの酵素的酸化による過酸化水素の生成抑制と、 α -tocopherolによる脂質過酸化抑制により未治療PDの進行を防御しようとした試みである。この研究ではtocopherolによる神経保護作用は認められず、selegilineはMAO-B阻害による脳内ドパミン増加に起因するsymptomaticな作用は証明されたものの、神経保護作用については明確な結果は得られなかった⁵⁾。

抗酸化薬は多くの *in vivo*, *in vitro* の神経細胞死モデルで有効であり、大きな副作用もない。しかし、これらの薬剤の臨床的効果は弱く、現在のところ補助的な薬剤としての域を出ていない。なお、selegilineには抗酸化作用とは独立した神経保護作用がある可能性があり、現在、類似化合物

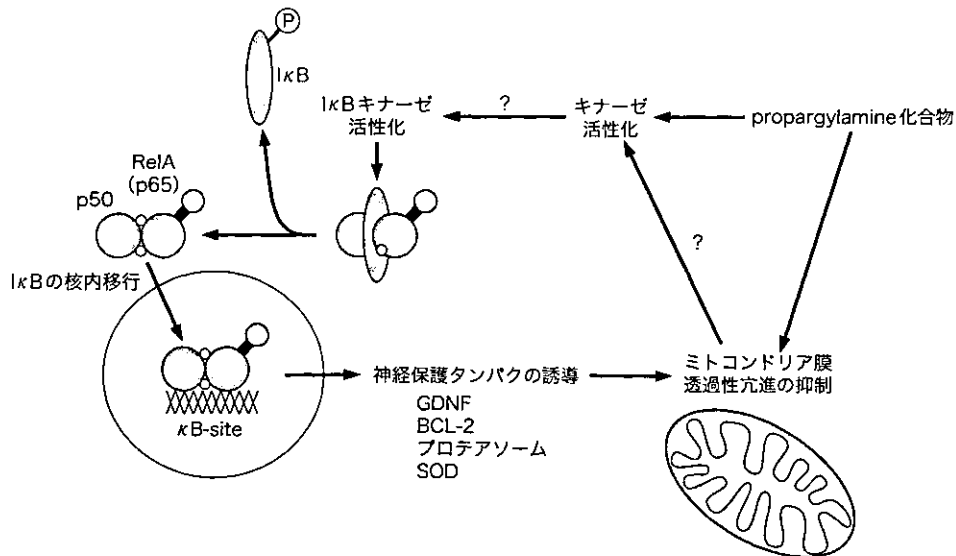


Fig. 1. Propargylamine 化合物による神経保護作用の分子メカニズム

propargylamine 化合物はミトコンドリア膜に存在する分子に働き、膜透過性を制御して急性の細胞死を防御する。それとともに、細胞内キナーゼの活性化あるいは転写因子の活性化を介して神経保護作用をもつタンパクを誘導する。

である propargylamine 化合物の研究が筆者らによって進められている。その詳細については次に述べる。

5. Coenzyme Q

PDの黒質ドパミン神経細胞では細胞死に先立ってミトコンドリアの機能障害、とくに complex I を中心とするミトコンドリア呼吸鎖の機能低下が起こっているとの報告がなされている。また、complex I 阻害薬である rotenone や MPTP は *in vivo* 動物モデルでドパミン神経選択的な細胞死と封入体の形成を引き起こす。Coenzyme Q はミトコンドリア呼吸鎖における complex I および II から III への電子の受け渡しに関わる分子である。

ミトコンドリアの機能を賦活することにより PD の進行を抑制する試みとして、米国で PD に対する Coenzyme Q-10 の投与が行われ⁶⁾、その後、例数が増やされているものの明確な効果は得られなかった。

ミトコンドリアの賦活というアイデアは面白い

のであるが、細胞死を防御するためにはより強力で脳移行性の良好な薬剤が必要かもしれない。

6. 抗炎症薬

PD を含む多くの神経変性疾患の病因には炎症、とくにミクログリアの活性化が関与していることが示されている。ミノサイクリンは MPTP による PD モデルでミクログリアの活性化を抑制する。しかし、PD 患者に対する有効性はいまだ確かめられていない。

Propargylamine 化合物による神経保護作用の分子機構——経口薬による神経保護は可能か、そしてその評価はいかにあるべきか ●

rasagiline (*N*-propargyl-1(*R*) aminoindane) および (*R*)-*N*-(2-heptyl) methyl-propargylamine などは selegiline と同様に propargylamine 基を共通にもつ MAO-B 阻害薬である。これら propargylamine 化合物は MAO-B 阻害作用とは独立した神経保護作用をもつことが *in vivo*, *in vitro* の実験で示唆されてきたが、その分

子メカニズムは明らかにされていなかった。

筆者らは propargylamine 化合物がミトコンドリアに直接作用し、ミトコンドリアからの細胞死誘導分子の放出を抑制することによって細胞死シグナルの活性化を制御することを報告した⁷⁾。さらに、propargylamine 化合物は細胞内キナーゼを活性化させ、転写因子である NF- κ B を介して神経保護に関わるタンパク、とくに BCL 2 や GDNF の生成を増加させることが見出された⁸⁻¹⁰⁾(Fig. 1)。

propargylamine 化合物は経口投与可能で脳内移行が良好な低分子化合物であり、selegiline と rasagiline に関してはすでに MAO-B 阻害薬として欧米で PD への使用が認可されている。とくに rasagiline に関しては単剤での短期的かつ symptomatic な治療効果が証明され、現在、長期効果の追跡が行われている¹¹⁾。しかし、これら薬剤の神経保護作用を臨床的に評価するには、新しいシステムの構築が必要である。そのためには、① PD の活動度あるいは進行度を反映する生化学的マーカー、あるいは② 薬剤特異的な作用(たとえばこの場合、神経保護タンパクレベルの増加など)を評価しうる生化学的マーカーを開発することが必須であると考えられ、研究が進められている。

おわりに●

PD あるいはアルツハイマー病などの老化に伴う神経変性疾患に対する従来の治療法は、神経伝達物質であるドパミンやアセチルコリンを補充する対症療法であり、神経細胞の変性を抑制するものではない。そのため治療効果は一過性であり、患者の障害は確実に進行する。この問題を解決するためには、多数の患者に簡便に施行できる、安全性の高い神経保護療法が必須であると考えられる。それとともに、神経保護薬開発には神経保護作用を臨床的に評価するシステムの構築が急務で

ある。いっそうの臨床/基礎にまたがるトランスレーショナルスタディの進展が望まれる。

文 献●

- 1) Ohta K et al : Effects of dopamine agonists bromocriptine, pergolide, cabergoline, and SKF 38393 on GDNF, NGF, and BDNF synthesis in cultured mouse astrocytes. *Life Sci* **73** : 617, 2003
- 2) Reichmann II : Neuroprotection in idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol* **249** [Suppl 3] : III/21, 2002
- 3) Gill SS et al : Direct brain infusion of glial cell line derived neurotrophic factor in Parkinson disease. *Nat Med* **9** : 589, 2003
- 4) Lacomblez L et al : Dose-ranging study of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis : Amyotrophic Lateral Sclerosis/Riluzole Study Group II. *Lancet* **347** : 1425, 1996
- 5) Shoulson I : DATATOP : a decade of neuroprotective inquiry : Parkinson Study Group. Deprenyl And Tocopherol Antioxidative Therapy Of Parkinsonism. *Ann Neurol* **44** [3 Suppl 1] : S 160, 1998
- 6) Beal MF : Approaches for neuroprotection in Parkinson's disease. *Ann Neurol* **53** [Suppl 3] : S 39, 2003
- 7) Akao Y et al : Mitochondrial permeability transition mediates apoptosis induced by N-methyl(R) salsolinol, an endogenous neurotoxin, and is inhibited by Bcl-2 and rasagiline, N-propargyl-1(R)-aminoindan. *J Neurochem* **82** : 913, 2002
- 8) Maruyama W et al : N-Propargyl-1(R)-aminoindan, rasagiline, increases glial cell line-derived neurotrophic factor(GDNF) in neuroblastoma SH-SY 5 Y cells through activation of NF- κ B transcription factor. *Neurochem Int* **44** : 393, 2004
- 9) Akao Y et al : An anti-Parkinson's disease drug, N-propargyl-1(R)-aminoindan(rasagiline), enhances expression of anti-apoptotic bcl-2 in human dopaminergic SH-SY 5 Y cells. *Neurosci Lett* **326** : 105, 2002
- 10) Youdim MB et al : 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, 2003
- 11) Parkinson Study Group : A controlled trial of rasagiline in early Parkinson disease : the TEMPO study. *Arch Neurol* **59** : 1937, 2002