

Z00500355A

厚生労働科学研究研究費補助金

長寿科学総合研究事業

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17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 丸山 和佳子

平成18 (2006) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告	
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	
1. 霊長類（ニホンザル）を用いた神経保護薬の効果の臨床評価法確立に関する研究	4
丸山和佳子	
2. ニホンザルにおける脳内A β に対する性ホルモンの影響に関する研究	9
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	11
辻本賀英	
4. ミトコンドリア細胞死シグナル活性化の機序とその制御に関する研究	16
直井信	
5. アミロイド β 蛋白産生の分子機構	26
駒野宏人	
6. 疎水性ジペプチドのGDNF産生機構および神経保護作用について	30
新田淳美	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	38
IV. 研究成果の刊行物・別刷	43

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 老年病研究部長

研究要旨：超高齢化社会を迎える日本にとってアルツハイマー病を始めとする認知症は健康長寿を達成するための最も大きな問題点の一つである。本研究課題においては、安全で安価であり多くの認知症患者に対して治療を行うことのできる神経保護薬の開発を目指して研究を行った。その結果、神経保護薬候補であるpropargylamine化合物、あるいは疎水性ジペプチドによりミトコンドリア依存性の細胞死シグナルが制御をうけること、同時に転写因子活性化を介して神経保護に働くタンパク質が誘導される分子機序を明らかとすることができた。さらにニホンザルを用いた実験で、propargylamine化合物が脳脊髄液中、そしておそらくは脳内の神経栄養因子を増加させ、アルツハイマー病の原因となる $A\beta$ 産生を低下させることが示された

丸山和佳子・国立長寿医療センター

研究所 老年病研究部 部長

鈴木樹理・京都大学霊長類研究所

人類進化モデル研究センター 助
教授

辻本賀英・大阪大学大学院 医学系
研究科 教授

直井信・財団法人国際岐阜バイオ研
究所 脳科学研究部門 部長

駒野宏人・国立長寿医療センター

研究所 アルツハイマー研究部室長

新田淳美・名古屋大学大学院医学研
究科 附属病院薬剤部 助教授

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症状は確実に進行する。この問題を解決する為には多数の患者に簡便に施行でき、安全性の高い原因療法、特に神経保護薬開発が必須であると考えられる。

propargylamine化合物（PA）は申請者らが中心となって研究を進めてきた神経保護薬候補であり、*in vivo*、*in vitro*で神経栄養因子を誘導し、amyloid beta protein ($A\beta$)の生成を低下させる。神経栄養因子、特にGDNFやBDNFについては種々の神経細胞死モデルに対する神経保護作用とその有効性は確立している。現在、パーキンソン病患者に対するGDNFタンパクの脳内注入あるいは遺伝子導入による治療が臨床的に試みられており、短期的には有効との結果が報告されている。しかし、脳の広汎な部位に変性が起きるADでは脳内への直接

A. 研究目的

アルツハイマー病(AD)は最も患者数の多い神経変性疾患であり、65歳以上の高齢者の約100人に5人が罹患すると報告されている。ADに対する従来の治療法は神経伝達物質であるアセチルコリンの分解を抑制する対症療法であり、

注入法は技術的に困難である。また侵襲的な治療を多数の痴呆患者に施行するにあたっては安全性、コスト等の問題があると言わざるを得ない。経口投与可能な薬剤により脳内の神経栄養因子を誘導できれば、これらの問題点をすべて解決することができる。一方、脳内A β の蓄積はADにおける細胞死に直接関与していると考えられており、現在これをターゲットとした治療法の開発が全世界で進められている。A β 生成を抑制するためのbeta-あるいはgamma-secretase阻害剤、あるいは分解酵素であるneprilysin投与、A β の除去を亢進させるためのワクチン療法などが進められているが、副作用の問題もあり未だ臨床使用には時間が必要である。propargylamine化合物の一部は既に大きな副作用なくパーキンソン病患者への使用がなされ、AD脳内のA β を低下させることができるか否か臨床試験が可能である。本研究課題によりその神経保護作用の臨床評価システムを確立することは重要な意味をもつ。

本研究はAD患者の治療にむけたきわめて重要な試みであり、医療行政、薬剤開発など厚生労働行政に対して大きな貢献をなすことが期待される。本研究は神経保護を目的とする臨床応用可能な治療法の開発に向けたきわめて重要な臨床研究(トランスレーショナルスタディ)の試みであり、国立センター化がなされた長寿医療センターに求められているものと考えられる。

B. 研究方法および結果

本年度は2つの戦略により研究を進行させた。ミトコンドリア依存性の細胞死の機序を分子レベルで明らかとし、神経保護薬のターゲットとなる分子を決定すること(辻本、直井、新田)。一方、PAによるA β 低下のメカニズムを検討するため、生成系に関する研究を行う(駒野)。これらの基礎研究と並行し、神経保護薬のヒトに対する効果を判定するシステムを構築する(丸山、鈴木、新田)。具体的には霊長類であるニホンザルに対し薬剤を投与し、in vitroの実験で神経保護薬により誘導された神経栄養因子、生成が抑制されたA β を脳脊髄液で測定し、変化が認められることを確認することである。

前者の実験については神経系培養細胞、あるいはノックアウトマウスを用いてミトコンドリアの膜透過性(MPT)に関わる分子と薬剤の作用機序について種々の方法論を用いて研究した。免疫沈降にて薬剤と結合するミトコンドリア分子候補を同定した。PAは神経細胞、特にモノアミン系の神経細胞に多く発現するA型モノアミン酸化酵素(MAO)自体あるいはその近傍分子に作用することをsiRNAあるいはMAOの過剰発現によりMAO量を増減させた細胞系を用いて証明した。また、MPTに関わるcyclophilinの働きを明らかとし、MPT制御がいかんして神経細胞死を防御するのかについて新たな知見を得た。 γ

-secretaseに関わる分子の構成とその制御について基礎的なモデルを構築した。PAはA β の生成を抑制するもののその作用は10-20%程度と弱く、この作用が γ -secretaseによるものか否かは今後の課題として残された。

老齢ニホンザルの脳内にA β 沈着(老人斑)が認められることを病理学的に確認した。コントロールのサル(ニホンザル)の脳脊髄液(CSF)の分析をしたところ性周期によりA β の絶対値に変化が認められ、発情期にはA β 1-40、1-42ともに低下し、その比率は不変であることが見いだされた。一方、神経栄養因子(GDNF、BDNF、NT-3、NGF)にはこのような季節変動は認められなかった。PAであるrasagilineの皮下注射を4週間行い、1週間間隔でCSFを採取、A β と神経栄養因子をELISA法にて測定したところ、0.25mg/day投与群においてのみ、A β 1-42/1-40比の有意な低下と神経栄養因子の顕著な増加を認めた。

(倫理面への配慮)

本実験については各施設の動物実験委員会の許可をうけた。また、本実験は霊長類以外代替手段がなく、動物に苦痛を与えないため麻酔剤等の使用を行う等の動物愛護上の配慮を行なった。

C. 考察

本研究の課題であった経口投与可能な神経保護薬の作用機序として、急性作用としてのミトコンドリア(MPT)制御と、慢性作用としての神経保護タンパク質誘導作用をin vitroだけでなくin vivo(遺伝子改変マウスおよびニホンザル)で証明することができた。今後、この2つの作用の解明を目指した基礎研究は神経細胞死のメカニズムを明らかとするという意味で医学研究の中で重要な役割を果たすだけでなく、より強力で副作用の少ない薬剤開発のスクリーニングに必須の情報を与えるものと考えられる。また、ニホンザルを用いた実験により、本薬剤がヒト脳においても神経保護作用をもつタンパク質を誘導する可能性が強く示された。また、CSF中の神経栄養因子あるいはA β 1-42/1-40比は薬剤の効果、あるいは至適投与量および投与方法を決定するために有用な情報を与えるものと考えられた。

E. 結論

神経保護薬の作用機序が解明され、その霊長類に対する有用性を証明した。今後、ヒト認知症に対する小規模治験に向けて研究を発展させていく予定である。

F. 健康危険情報

なし

分担研究報告書

霊長類（ニホンザル）を用いた神経保護薬の効果の臨床評価法確立に関する研究

主任研究者 丸山 和佳子 国立長寿医療センター 研究所 老年病研究部長

研究要旨：

正常オスニホンザルに対し神経保護薬候補であるrasagilineを投与し、脳脊髄液(CSF)中の神経栄養因子および β -amyloidタンパク(A β)を測定した。これまでのin vitroの実験で、rasagilineは神経栄養因子を増加させ、A β 1-42/1-40比を低下させたが、CSFの分析でも同様な結果が得られた。しかしその有効域(therapeutic window)は狭いことが明らかとなった。今後、本薬剤を臨床的に使用するには薬剤濃度がクリティカルであるため、適切なバイオマーカー（神経栄養因子濃度など）を設定することが必要であると考えられた。

A. 研究目的

アルツハイマー病 (AD) を含む多くの老化に伴う神経変性疾患の治療として、薬剤による神経保護療法が試みられている。しかしながら現在のところ、神経変性の進行を臨床的に評価する方法論が確立していないため、神経保護薬の効果判定は「臨床症状」と「画像診断」をマーカーとして行われてきた。しかし、短期間の臨床試験の範囲内で、疾病の進行速度や上記判定のためのマーカーを用いるにあたり問題点が明らかとなった。すなわち、1) 薬剤の作用により見かけ上の症状、あるいは画像（特にPET、SPECTにおけるリガンドの結合）が影響をうけること。2) 軽微な神経保護作用を証明するためには数百人規模、5年～10年のfollow upが必要であること。3) 適切な薬剤の投与量、投与法を決定するために2)のような試験を何回も繰り返さなければならず、莫大な費用がかかること。などで

ある。本研究課題でその作用機序について研究を行ってきたpropargylamine化合物(PA)、特に N-propargyl-1(R)aminoin dane (rasagiline)について臨床試験を行うための最終的な実験として、短期(半年以内)に神経保護作用を定量的に評価するためのclinical end pointあるいはsurrogateを決定するため霊長類(ニホンザル)を用いた実験を行った。

B. 研究方法

オスニホンザル(体重8-12kg)に対し、PAの中で最もin vitroの神経保護活性が高かったrasagilineの生理食塩水溶解液を0、0.1mg/day、0.25mg/day、2mg/day(0.001mg/day～0.2mg/kg/day)と量を漸増させ筋肉注射にて毎日1回4週間投与した。投与前および投与後1週間毎にケタミン-麻酔下で脳脊髄液(CSF)および血清を採取し、神経栄養因子であるBDNFおよびGDNFとAbeta 1

-40、1-42をEIA法で測定した。

(倫理面への配慮)

本実験については京都大学霊長類研究所 人類進化モデル研究センター および 長寿医療センターの動物実験委員会の許可をうけた。また、本実験は霊長類以外代替手段がなく、動物に苦痛を与えないため麻酔剤等の使用を行う等の動物愛護上の配慮を行なった。

C. 研究結果

Rasagiline投与を受けたニホンザルでは、0.25mg/day投与群においてのみ基礎値5-10 pg/mlであったCSF中GDNF値が投与後一週間で100 pg/ml以上と顕著な増加を認めた。また、GDNFに比較すればその差は少なかったものの、BDNF NGF NT-3といった他の神経栄養因子も基礎値の2-5倍の有意な増加を認めた。さらにCSF中のAbeta 1-42/1-40比は15前後から10前後へと有意に低下した。血清中のAbeta 1-42/1-40比も低下し、臨床的に使用可能な薬剤効果のマーカーとして使用可能である可能性が示唆された。このような変化は、0.1 mg/dayあるいは2 mg/day のrasagiline投与サルでは認められず、rasagilineの神経栄養因子誘導作用、およびAbeta 1-42/1-40比低下作用は狭い治療域(therapeutic window)をもつことが示された。また、今回の実験で、rasagilineによるCSF中の神経栄養因子増加作用、およびAbeta1-42/1-40比低下作用は連続投

与後1週間で最高に達し、その後、4週後には低下傾向が認められた。このことから、rasagilineの神経保護作用は一定期間の後には低下する可能性が示唆された。

D. 考察

主任研究者らはこれまでの研究で、rasagilineは神経保護にはたらくタンパク質をストレス関連転写因子活性化を介して増加させることを示してきた。今回、本薬剤をヒトに臨床応用するための最終的な実験として霊長類のCSF、そしておそらくは脳内で神経栄養因子の増加が引き起こされることを確認した。さらに、CSF中の神経栄養因子やAbetaは臨床治験における治療効果判定のマーカーとなりうることを証明することができた。これは、神経変性疾患治療に関しては初めての生化学的、客観的なマーカーである。

E. 結論

rasagilineの治療域(therapeutic window)は狭いこと、また、連続投与にて効果の現弱が起る可能性が示された。今後、rasagiline、等のPAの長期投与を行い、最適な用量のみならず、用法(連続投与か間歇投与か)についても上記マーカーの変動を指標としてニホンザルで決定することが必要である。その後小規模治験をヒト神経変性疾患で行いたい。

F. 健康危険情報

なし

Maruyama W, Shamoto-Nagai M, Akao Y, Riederer P, Naoi M. (2006) The effect of neuromelanin on the proteasome activity in human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells. J. Neural Transm. (Suppl) in press

Yi H, Maruyama W, Akao Y, Takahashi T, Iwasa K, Youdim MBH, Naoi M. (2006) *N*-Propargylamine protects SH-SY5Y cells from apoptosis induced by an endogenous neurotoxin, *N*-methyl(*R*)salsolinol, through stabilization of mitochondrial membrane and induction of anti-apoptotic Bcl-2. J. Neural Transm. 113(1) 21-32

Yi H, Akao Y, Maruyama W, Chen K, Shih J, Naoi M. (2006) Type A monoamine oxidase is the target of an endogenous dopaminergic neurotoxin, *N*-methyl(*R*)salsolinol, leading to apoptosis in SH-SY5Y cells. J. Neurochem. 96 (2) 541-549

Naoi M, Maruyama W, Shamoto-Nagai M, Yi H, Akao Y, Tanaka M. (2005) Oxidative stress in mitochondria: Decision to survival and death of neurons in neurodegenerative disorders. Mol. Neurobiol. 31 (1-3) 81-93.

Shamoto-Nagai M, Maruyama W, Yi H, Akao Y, Tribl F, Gerlach M, Osawa T, Riederer p, Naoi M. (2006) Neuromelanin induces oxidative stress in mitochondria through release of iron: mechanism behind the

inhibition of 26S proteasome. J. Neural Transm. In press.

Matsumoto K, Akao Y, Hi Y, Shamoto-nagai M, Maruyama W, Naoi M. (2006) Overexpression of amyloid precursor protein induces susceptibility to oxidative stress in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. J. Neural Transm. In press.

Youdim MBH, Maruyama W, Naoi M. (2005) Neuropharmacological, neuroprotective and amyloid precursor processing properties of selective MAO-B inhibitor antiparkinsonian drug, rasagiline. Drugs of Today 41 (6) 369-391

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. and Packer L. (eds) MerceL Dekker, New York, 423-444

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. and Packer L. (eds) MerceL Dekker, New York, 609-630

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 (1-2) 172-179.

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 (1-2) 193-204.

1. 学会発表

Naoi M. Possible role of salsolinol and Parkinson's disease. "Dopamine Oxidation and Parkinson's disease" SFN Satellite Meeting, November 11, 2005, Washington DC, USA

Maruyama W, Shamoto-Nagai M, Yi H, Riederer P, Naoi M. Neuromelanin inhibits 6S proteasome in dopamine neurons via increased oxidative stress in mitochondria by released iron. 9th International Symposium on Parkinson Research, November 9-11, 2005, Washington DC, USA

Naoi M, Maruyama W, Yi H. Dopamine and dopamine quinone activate apoptotic signaling in mitochondria by different mechanisms. 35th Annual Meeting of Society for Neuroscience (SFN), November 12-16, 2005, Washington DC, USA

Maruyama W, Shamoto-Nagai M, Zecca L, Riederer P, Naoi M. Neuromelanin induces mitochondrial dysfunction and neuronal

cell death: relevance to the pathogenesis of Parkinson's disease. 35th Annual Meeting of Society for Neuroscience (SFN), November 12-16, 2005, Washington DC, USA

Naoi M, Maruyama W, Shamoto-Nagai M, Yi H, Zecca L. Mechanism underlying cytotoxicity of neuromelanin and dopamine-quinone: Involvement in pathogenesis of Parkinson's disease. 19th International Pigment Cell Conference, "A Focus on Human Pigmentary Disease", September 18-22, 2005, Reston, Virginia, USA

Naoi M, Maruyama W, Nitta M, Nagai-Shamoto M, Youdim M. Propargylamines increase neurotrophic factors, GDNF and BDNF: Analyses of the CSF from parkinsonian patients and studies on cellular and animal models. 16th International Congress on Parkinson's Disease and Related Disorders. June 5-9, 2005, Berlin, Germany

Maruyama W, Naoi M. The effect of neuromelanin on the proteasome activity in human dopaminergic SH-SY5Y cells. 6th International Congress on Parkinson's Disease and Related Disorders. June 5-9, 2005, Berlin, Germany

Yi H, Akao Y, Maruyama W, Nagai-Shamoto M, Naoi M. Dopamine induces apoptosis through generation of superoxide and

quinone. 6th International Congress on Parkinson's Disease and Related Disorders. June 5-9, 2005, Berlin, Germany

丸山和佳子 理事長企画オープンシンポジウム The role of mitochondrial dysfunction in selective degeneration of dopamine neurons in Parkinson's disease. 第48回神経化学会 2005年 9月28日～30日福岡

Nagai M, Maruyama W, Naoi M, Zecca L, Riederer P. Neuromelanin inhibits the proteasome activity through increased oxidative stress. 6th International Congress on Parkinson's Disease and Related Disorders. June 5-9, 2005, Berlin, Germany

Naoi M, Akao Y, Maruyama. Dopamine induces apoptosis through generation of superoxide and quinone. 78回日本生化学会大会 2005年 10月19-23日、神戸

Maruyama W, Shamoto-Nagai M, Naoi M. Neuromelanin induces mitochondrial dysfunction and neuronal cell death though oxidative stress by released iron.

78回日本生化学会大会 2005年 10月19-23日、神戸

丸山和佳子、直井信 ニューロメラニン は鉄の放出を介して26Sプロテアゾームを阻害する。第5回パーキンソン病フォーラム、2005年8月27日、浦安

丸山和佳子 直井信 蛋白質の酸化アルデヒド修飾はパーキンソン病の病因に関与する 第46回日本神経学総会、2005年5月25-27日、鹿児島

丸山和佳子、直井信 パーキンソン病における Propargylamine 化合物による神経保護療法：作用機序の解明と臨床応用の可能性 第13回カテコールアミンと神経疾患研究会、2005年4月23日、東京

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

分担研究報告書

ニホンザルにおける脳内A β に対する性ホルモンの影響に関する研究

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：CSF中A β 濃度の季節性の有無を明確な季節性を示す血中性ホルモン濃度との関連から検討した。その結果、ニホンザルでは、CSF中A β 濃度に季節性のある可能性が示唆された。

A. 研究目的

昨年度のrasagiline投与実験における脳脊髄液(CSF)中A β 濃度の変動に季節性のある可能性が示唆された。そこで季節性を与える物質として、季節変動が最も大きい性ホルモンに着目し、ニホンザルの繁殖時期と非繁殖時期におけるCSF中A β と性ホルモン変動との関連を明らかにする。

B. 研究方法

ニホンザルのオス成獣（7～9歳）5頭について、非繁殖期（6～7月）および繁殖期（10～12月）のCSF中A β および血中テストステロン濃度の変動を調べた。

（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

季節性がはっきり認められたのは血中テストステロン濃度の変化だった。非繁殖時期には100 ng/dl以下であるのに対し、繁殖期には150～750 ng/dlまで上昇した。CSF中A β 濃度の変化は、A β (1-42) A β (1-40)ともに非繁殖期がやや低く、A β (1-42)では非繁殖期4000 pg/ml、繁殖期5000 pg/ml、A β (1-40)では非繁殖期620 pg/ml、繁殖期750 pg/mlであった。両A β 間の比は差が認められなかった。

D. 考察

今回の研究によってCSF中A β 濃度に季節性がある可能性が示唆された。しかし、その変化は、性ホルモンより格段に小さいことが明らかになった。Rasagiline投与実験時には変化の程度が大きかったことから、性ホルモンなど季節性を示す生理活性物質がrasagilineの作用を限弱している可能性が

考えられる。今回の結果を確定するために年間を通したこれらの物質の変動を調べるとともに、rasagiline同時投与による変化を明かにする必要がある。

E. 結論

季節繁殖動物であるニホンザルでは、CSF中A β 濃度に季節性のある可能性が示唆された。季節性を与える生理活性物質がrasagilineの作用を限弱している可能性が推察された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Malignant NK/T-cell lymphoma associated with simian Epstein-Barr virus infection in a Japanese macaque (*Macaca fasciata*) Exp. Anim., 54, 101-105, 2005.

2. 学会発表

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他

厚生労働科学研究費補助金（痴呆・骨折研究事業）

（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関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）と神経変性疾患への関与も示唆されているオートファジー依存的細胞死機構の解析に焦点を合わせ、以下の研究を行った。（１）MPTに必須の分子であるCyclophilin Dに結合する分子の探索、（２）神経変性疾患モデルとして運動神経変性疾患モデルマウスである*mnd2*マウスを用い、疾患発症におけるMPTの関与の検討、（３）オートファジー依存的細胞死メカニズムの解明を目指した関連分子の探索、などを行った。

その結果、以下のような成果を得た。（１）免疫沈降法により、Cyclophilin Dと共沈する分子の存在を確認した。（２）*mnd2*変異を持ちCyclophilin Dを欠損したマウスを得た。病態へのMPTの関与に関しては、現在進行中である。（３）オートファジー依存的細胞死にJNKが関与することおよびJNKはATG5やATG6の下流で機能することを明らかにした。

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の分子メカニズムの解明と治療のための標的分子の同定のためにCyclophilin Dに結合する因子を同定することと、神経変性疾患モデルマウス(*mnd2*)を利用しその細胞死におけるMPTの関与を検討することである。さらに、神経変性疾患への関与も示唆されているオートファジー依存的細胞死機構の解析を行うことである。

B. 研究方法

(1) Cyclophilin Dに対する数種類の抗体を利用し、共沈する分子を同定する。

(2) *mnd2*変異ヘテロマウスとCyclophilin Dヘテロマウスの掛合わせを行い、*mnd2-cyclophilin D*欠損マウスを得、対照マウスと病態および神経組織を比較する。

(3) 我々がオートファジー依存的細胞死が起ることを示したBax/Bak欠損マウス胚繊維芽細胞株を利用し、シグナル伝達分子を分子・細胞生物学的手法により探索・解析する。

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) 代替え手段がないこと(特定遺伝子Cyclophilin Dや*mnd2*の生体内での機能解析のために利用できるのはマウスに限られている)、(2) 苦痛を回避

する手段を講じている(たとえば、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

Cyclophilin Dに結合し、MPTに関与する因子の候補を得るために、抗Cyclophilin D抗体を数種類作成し、免疫沈降実験に使用出来ることを確認した。Ca²⁺によりMPTを誘導したマウス肝由来のミトコンドリアに膜透過性のクロスリンカーを加え、ライセートを調整し、抗Cyclophilin D抗体によりCyclophilin Dを免疫沈降させた。その沈降物をクロスリンカーの解離の後、SDSポリアクリルアミドゲルで展開し、コントロール抗体によるサンプルと比較することで、Cyclophilin Dと共沈する因子が存在することを確認した。今後、これらのたんぱくを取り出し、その構造を明らかにする。

MPTが神経変性疾患に関わる細胞死に関与する可能性を検討するために、運動神経変性疾患モデルマウス(*mnd2*)を利用した。変異*mnd2*遺伝子をヘテロに持つマウスとCyclophilin D欠損ヘテロマウスの掛け合わせにより、*mnd2/mnd2*・Cyp D^{-/-}マウスを得た。現在、これらのマウスとコントロールマウスを種々のパラメータ(体重、運動能力など)で比較検討中である。

種々のアポトーシス刺激に反応しオートファジー依存的細胞死が起るBax/Bak欠損マウス胚繊維芽細胞株を用い、シグナル伝達の解析を行った結果、JNKが活性化されること、およびJNKを活性化を抑制するとオートファジー依存的細胞死が軽減されることを見出した。さらに、JNKの活性化はATG5や

ATG6のsilencingにより抑制されること、またJNKの抑制では、ATG5/6の蓄積には影響がなかったことなどから、JNKはATG5/6の下流で機能することが明らかになった。

D. 考察

少なくとも虚血性疾患の発症に関わることを示してきたCyclophilin D依存的ミトコンドリア膜透過性亢進現象に関しては、その分子機構は不明であり、疾患治療を考えた上でもその解明が急がれる。今回、我々は、免疫沈降法により、Cyclophilin Dと共沈する分子の存在を確認したがこの分子がCyclophilin Dの機能ターゲットである可能性があり、その同定はMPTのメカニズム解明に向け重要な情報を与えるものと考えられる。また、Cyclophilin Dは、構造が極似している多くのアイソフォームを有するため、Cyclophilin Dに特異的な薬剤の開発は容易でない可能性もある。この意味で、Cyclophilin Dの機能ターゲットは新たな治療標的になる可能性を秘めている。

Cyclophilin D欠損マウスの確立は、Cyclophilin D依存的ミトコンドリア膜透過性亢進現象が種々の疾患に関与するか否かを検討しうる有用な材料となっており、今回検討を加えているMND2変異による運動神経変性疾患に限らず、アルツハイマー病のモデルマウスやパーキンソン病のモデルマウス系への利用も検討すべきであり、今後の重要な課題である。

オートファジー依存的細胞死にJNKが関与することを明らかにした。飢餓条件下でもオートファジーは活性化されるが、この場合はJNKの活性化は見られないため、生きる

ために活性化されるオートファジーと細胞死のために活性化されるオートファジーの関連を調べるためにも有用な情報となった。

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、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の結合分子の探索を行い、免疫沈降法により、Cyclophilin Dと共沈する分子の存在を確認した。

*mnd2*変異を持ちCyclophilin Dを欠損したマウスを得た（病態へのMPTの関与に関しては、現在進行中である）

オートファジー依存的細胞死にJNKが関与することを明らかにし、ATG5やATG6の下流で機能することを示した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表（欧文）

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

Cadden, IS., Johnston, BT., Connolly, R., Gates, D., Tsujimoto, Y., Eguchi, Y., McGinty, A. An investigation into the role of Bcl-2 in neuroendocrine differentiat

- ion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 326: 442-448, 2005
- Ono, M., Sawa, Y., Ryugo, M., Alechine, A. N., Shimizu, S., Sugioka, R., Tsujimoto, Y., and Matsuda, H. BH4 peptide derivative from Bcl-xL attenuates ischemia/reperfusion injury thorough anti-apoptotic mechanism in rat hearts. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 27:117-121, 2005
- Zhang, L., Shimizu, S., and Tsujimoto, Y. Two distinct Fas-activated signaling pathways revealed by an anti-tumor drug D609. *Oncogene*, 24:2954-2962, 2005
- Nakagawa, T., Shimizu, S., Watanabe, T., Yamaguchi, O., Otsu, K., Yamagata, H., Inohara, H., Kubo, T., and Tsujimoto, Y. Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic death. *Nature* 434: 652-658, 2005
- Elinder, F., Akanda, N., Tofighi, R., Shimizu, S., Tsujimoto, Y., Orrenius, S. and Ceccatelli, S. Opening of plasma membrane voltage-dependent anion channels (VDAC) precedes caspase activation in neuronal apoptosis. *Cell Death Diff.* 12: 1134-1140, 2005
- Chen, C., Shimizu, S., Tsujimoto, Y. and Motoyama, N. Chk2 regulates transcription-independent 53-mediated apoptosis in response to DNA damage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 333: 427-431, 2005
- Kamada, S., Kikkawa, U., Tsujimoto, Y. and Hunter, T. A-kinase anchoring protein 95 functions as a potential carrier for the nuclear translocation of active caspase-3 through an enzyme-substrate like association. *Mol. Cell. Biol.* 25: 9469-9477, 2005
- Tsujimoto, Y. and Shimizu, S. Another way to die: autophagic programmed cell death. *Cell Death Diff.* 12: 1528-1534, 2005
2. 学会発表
(外国学会)
- Tsujimoto, Y.
Mitochondrial membrane permeabilization during cell death
Cold Spring Harbor Meeting on "Programmed Cell Death"
9/21~9/25, 2005
Cold Spring Harbor, USA
- Tsujimoto, Y.
Mitochondrial membrane permeabilization during cell death
Bari International Conference on Mitochondria
12/18~12/22, 2005
Bari, Italy

平成17年12月8日

福岡

(国内学会)

辻本 賀英

Multiple mechanisms of cell death and
their regulation by Bcl-2

第28回日本分子生物学会年会

平成17年12月8日

福岡

柳田 寛、恵口 豊、辻本賀英

in vitroブレッピング系を用いたアポトー
シスブレッピングに関わる因子の同定

第28回日本分子生物学会年会

平成17年12月8日

福岡

清水重臣、辻本賀英

JNKによるオートファジー様細胞死の制御

第28回日本分子生物学会年会

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

長寿科学総合研究事業
分担研究報告書

ミトコンドリア細胞死シグナル活性化の機序とその制御に関する研究

直井 信 岐阜県国際バイオ研究所
客員研究部門（脳神経研究分野）部長

共同研究者
赤尾幸博、伊紅
岐阜県国際バイオ研究所

研究要旨 Alzheimer 病 (AD) を初めとする神経変性疾患において、最終的に酸化ストレスとミトコンドリア(Mit)の機能不全が細胞死を惹起する。これらの要因が特定な脳部位で選択的に一定のニューロンに細胞死を惹起する機序を解明し、その制御から神経細胞を保護する療法を確立することが今回の課題である。この為 Amyloid β ($A\beta$) タンパクをSH-SY5Y細胞に過剰に発現させたAD細胞モデル系を確立した。この細胞では酸化ストレスが増加し、酸化ストレスに対する脆弱性が増加することが認められた。

我々は既に細胞と動物モデルを用いた広範なスクリーンから Rasagiline, (-)Deprenyl 等の propargylamine 誘導体が神経細胞を細胞死より保護する事を報告してきた。また最近 propargylamine 誘導体の構造活性相関を再検討し N-propargylamine そのものが神経細胞保護活性を持つ事を見出した。細胞モデル系を用い酸化ストレスによる細胞死の機序を検討したところ、活性酸素により Mit 呼吸鎖酵素系特に Complex I が酸化修飾され Mit 内膜の透過性が増大した。さらに膜電位の低下と共に cytochrome c 等のタンパクが細胞質に流失しカスパーゼが活性化され細胞死が惹起された。また内在性神経毒 N-methyl-R-salsolinol (NMRSal) は Mit 外膜に局在するモノアミン酸化酵素 (MAO) の A 型と結合する事により細胞死機構を活性化した。一方細胞保護活性を示す propargylamine は B 型 MAO と結合し Mit の透過性が亢進し膨張する段階を制御しアポトーシスシグナルの活性化を阻止した。これらの結果から propargylamine 誘導体は細胞死を誘導する刺激の種類に拘わらず、細胞死に至る共通の過程を制御する事で神経細胞を保護することを明らかとした。

A. 研究目的

アルツハイマー病(AD)の主症状である認知機能の低下はコリン細胞の変性によると考えられているが、細胞死の機序は未だ充分明らかにされていない。Amyloid β protein ($A\beta$)

が原因物質であるとする Amyloid 仮説が一般に受け入れられており、 $A\beta$ oligomer の細胞毒性、酸化ストレス、microglia, reactive astrocyte による炎症反応等の相互作用の結果細胞死が惹起されると現在考えられている。ADにお

ける神経細胞の変性を阻止し神経細胞を保護する薬剤の開発には細胞死の機序を検討することが必須である。従来我々は神経毒、活性酸素等が神経細胞にアポトーシスを惹起する機構を系統的に研究し、ミトコンドリア(mitochondria, Mit)で細胞死シグナルが段階的に活性化することを報告して来た。即ち種々の刺激によりMit 内膜の透過性が亢進し膨張すると、Mit膜電位の低下と共にcytochrome cが細胞質内に流出しcaspaseが活性化されアポトーシスが惹起する。これらの細胞モデルを用い我々はrasagiline, (-)deprenyl (selegiline, FK)などのpropargylamine誘導体が細胞死シグナル機構に作用し細胞死を抑制することを明らかにしてきた。

これらの成果から本研究課題においてはAmyloid precursor protein (APP)を過剰発現した細胞を作成し、APPの蓄積による酸化ストレスの惹起とMitにおける細胞死シグナルが活性化される機序を検討した。細胞死シグナルはMitのpermeability transition pore (mPTP)と総称されるチャンネルを介して伝達され、Mit外膜に存在するBcl-2タンパクと内膜のadenine nucleotide transporter (ATP)により調節される。

propargylamine誘導体等の神経保護薬がMit外膜に存在するB型モノアミン酸化酵素(monamine oxidase, MAO-B)の阻害剤であることから、MAOの細胞死シグナル活性化に対する関与が示唆された。MAOにはA型 (MAO-A)とB型 (MAO-B)があり、MAO-A, MAO-B各々の細胞死への関与を研究する為にMAO-Aのみを発現しているSH-SY5Y細胞にB型MAO (MAO-B)を強制発現した系を作成し、またMAO-Aに対するsiRNAを用い検討した。神

経毒または活性酸素と活性窒素 (reactive oxygen and nitrogen species, ROS, RNS) がMAOを介して細胞死を惹起する系を用い、神経保護薬がMAOに作用しmPTPを制御し下流の細胞死カスケイドの活性化を阻止する機序を検討した。

我々はpropargylamine誘導体が細胞死を制御するBcl-2, 神経栄養因子を誘導することを見出しており、propargylamineが広く神経細胞一般に保護活性を持つ可能性が示唆されている。今回の研究によりMitにおける細胞死の機構に対する神経保護薬の作用機序が更に解明された。今後更に強力で臨床に適応可能な薬剤を見出すことを目指す。

B. 研究方法

Human wild type APPと684番目のHisからArgへの変異を持つAPPを神経細胞のモデルであるSH-SY5Y細胞に発現させた。この変異はA β 1-40, A β 1-42のなかに存在する。発現APPのRNAはquantitative real time RT-PCRで、タンパクはELISA法により、APP, Bcl-2の定量はWestern blot 法によった。human MAO-B geneも同様にSH-SY5Y細胞に発現させ、MAO活性とタンパク量の測定により発現を確認した。MAO-A mRNAに対するsiRNAはSanta Cruz Biotechnologyより購入した。ROSは5-(and-6-)-chloromethyl-2,7-dichlorodihydro-fluorescein diacetate (CM-H2DCF-DA), hydroethidine (HE)とfluorescence-augmented cell sorter (FACS)を用い定量した。細胞死は propidium iodide (PI)染色後、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。Mit膜電位はMito-Tracker GreenとOrange, または3,3'-dihexyloxacarbo-cyanine iodide [DiO

C₆(3)]とFACSを用い定量した。

C. 結果

1) Wild, mutated APP過剰発現細胞の検討：

APP cDNAを導入したSH-SY5Y細胞でAPPのmRNA、分子量約110kDa、140kDaのタンパクがともに増加し、Aβ1-40はwild, mutated APP発現細胞の培地内での増加が認められ、Aβ1-42は変異APP発現細胞でのみ検出可能であった。Wild APPを発現した細胞では神経突起の伸展が見られず、シナプス形成の障害が示唆された。

Wild APPの発現によりH₂O₂、ONOO⁻等の酸化ストレスに対する細胞の感受性が増加し、抗酸化機能とプロテアソーム活性もAPP発現細胞で著明に低下していた。

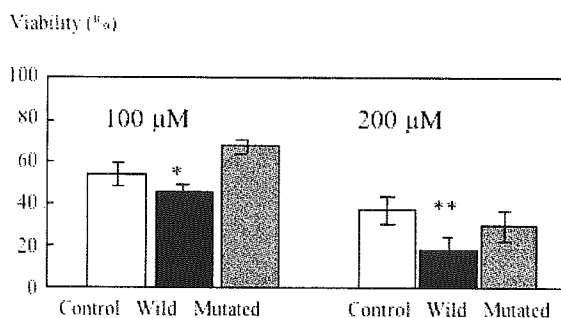


図 1。Aβの過剰発現はH₂O₂に対する脆弱性を増加する。H₂O₂ (100, 200 μM)の存在下、Control, wild Aβ, mutated Aβを発現させたSH-SY5Y細胞を24時間培養後、細胞死を定量した。

アポトーシスシグナルの調節に重要なBcl-2タンパクはwild APP発現細胞で低下し、APPの発現量とBcl-2量に負の相関が認められた。酸化ストレスにより活性化される細胞内シグナルとして extracellular signal-regulated kinase (ERK), p38, JNK などのmitogen- activate

d protein kinase (MAPK) のうち、リン酸化ERKが wild APPの発現により減少していた。

これらの結果からwild APPの細胞内で増加する事により酸化ストレスを誘発し、抗アポトーシス機能を持つBcl-2の低下から細胞の脆弱性が増加していると考えられた。

2) MAOによる細胞死シグナルの活性化

MAO-A, MAO-BによるMit膜電位の変化をSH-SY5Y細胞より単離したMitを用い検討した。内在性神経毒N-methyl-R-salsolinol (NMRSal)はMAO-Aの活性部位に結合し、Mit膜電位を低下し細胞死を惹起した。一方MAO-Bを過剰に発現させたSH-SY5Y細胞では、MAO-Bの活性とタンパクは著明に増加したにも拘わらず、NMRSalによるMit膜電位の低下と細胞死は認められなかった。またMAO-Aに対するsiRNAを細胞に発現した所、MAO-A活性タンパクと活性の低下とともにNMRSalの結合が減少した。

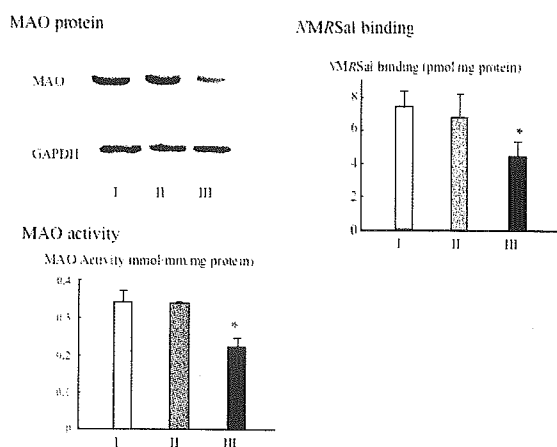


図 2。MAO siRNAによるMAO発現の抑制とMAO活性とNMRSal結合能に対する影響。SH-SY5Y細胞をMAOに対するsiRNA添加し24時間培養した。MAOタンパクはWestern法と抗MAO抗体で検出した。MAO活性はKynuramineを用いた蛍光法で、NMRSalのMitとの結合はHPLC-ECD法によった。I; 対照, II, vector処理, III: si