

いるが、これらは「病は気から」の経験則を科学的に実証したここ10数年の研究結果が背景となっている。実験動物を含む大半の動物は変化する外部環境に対応して体内環境を一定に維持するための恒常性維持機構を備えている。生体の恒常性を維持するために様々な機構が存在するが、中でも神経系、内分泌系、免疫系は全身に機能的ネットワークを形成しているとともに、三者の密接な相互作用が恒常性維持に重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。神経・内分泌・免疫相関(クロス・トーク)である。なかでも、恒常性の維持を外界からの防御機構としてとらえた場合には、神経系と免疫系のネットワークは最も重要なシステムとなる。しかしながら、神経系、免疫系ともにそれぞれが非常に複雑なシステムであり、両者の相互作用を科学的に解明するためには、優れた実験モデルや実験系の開発が必須である。恒常性維持に関わる二つのシステムの相互作用を解析する方法としては、恒常性を攪乱することにより変化する因子を明らかにする戦略が合理的である。神経・免疫相関を攪乱する要因として最もよく知られているのが心理的、社会的ストレスである。ストレスという言葉は複雑化する現代社会を象徴するキーワードとして日常的に用いられているが、「ストレス」を生体の恒常性維持に有害な刺激(ストレッサー)または有害刺激に対する生体反応(ストレス反応)と定義すれば、心理的、社会的ストレスの負荷実験は神経・免疫相関を解析する有用な実験系

となる。我々は、実験用サル類の特性を利用してこれまで心理的、社会的ストレス負荷に伴う行動、内分泌、免疫系の変化を解析してきた。サル類をモデルとした神経・免疫相関解析についてはすでに報告しているので、本稿ではこれまでの成果を概説し、心理的、社会的ストレス負荷にともない変化する免疫系、内分泌系、行動のそれぞれの指標を用いて実験用サル類の環境エンリッチメントまたは心理学的安寧を評価する試みを紹介する。

1. 心理的、社会的ストレス環境における生体反応

集団での生活が中心となる多くのサル類ではヒトと同様に他個体との関係調節が個体にとって必須の社会的行為であり、近親個体との離別や未知の他個体との遭遇は、著しい心理的、社会的ストレスとなる。このようなサル類の心理、行動学的特性を神経、免疫相関の解析に応用する試みとして、母子分離、同胞分離、社会的隔離、群形成、群導入、社会的順位、優劣関係、社会的競合等の様々な手続きが試みられている。なかでも、母子分離はいずれのサル種においても仔ザルに典型的なストレス反応を生じさせ、分離直後には異常な興奮状態を反映するとみられる種々のステレオタイプ行動が多発し、続いて極端な抑鬱状態におちいる。図1は母子分離(離乳)後のカニクイザル仔ザルの行動(抑鬱行動)、内分泌系(コーチゾル)、免疫系(NK細胞、U5陽性細胞)の変化を要約したものである。生後5～

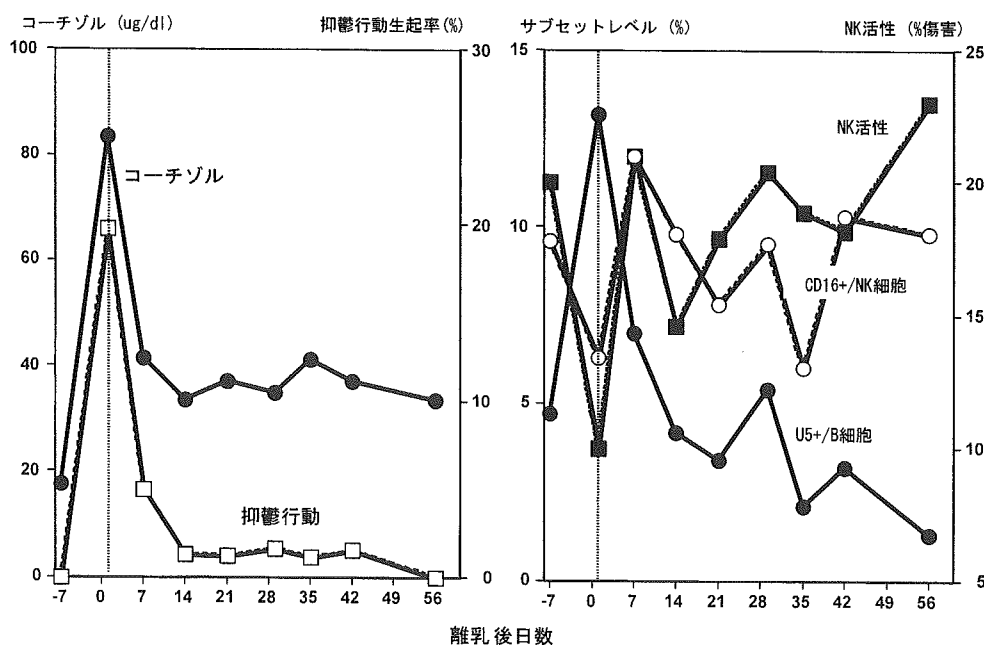


図1 離乳のストレスがカニクイザル仔ザルの行動、内分泌、免疫系に及ぼす影響

6ヶ月間実母により保育された仔ザルは、離乳後数頭の仔ザルと群飼育される。当然、離乳後1日目のストレスは大きく、抑鬱行動および血中コーチゾルレベルが著しく増加するとともに、CD16陽性のナチュラルキラー(NK)細胞が低下し、同時にNK活性が著しく低下する。これに対して、U5陽性のB細胞(U5+/B)レベルは著しく上昇する。詳述は避けるがU5+/B細胞は我々が新たに見いだしたストレス関連リンパ球であり、マカクザルおよびヒトで心理的ストレス負荷後に上昇することを明らかにしている。図1に示すようにすべての指標は分離後一日目に著しい変化を示すが、一週後にはほぼ離乳前の値に回復する。すなわち、カニクイザルにおいては母子分離のストレスは高レベルではあるが一過性のストレスであり、離乳仔ザルは一週間程度で新しい環境に順応する。図1に示す項目はいずれもカニクイザルのストレス反応を評価する有用な指標であることが明らかとなった。これらのストレス評価指標は神経・内分泌・免疫相関を解析するマーカーであると同時に、実験用霊長類の飼育管理において要求される環境エンリッチメントや心理的安寧の実態を評価する指標として用いることも可能である。そこで、これらの指標を用いて飼育下にあるカニクイザルのストレスを評価し、ストレスを指標としてカニクイザルの飼育形態のありかたを検討してみた。

2. 複数飼育により実験用霊長類の飼育環境エンリッチメントと心理的安寧は保証されるか？

近年、欧米を中心にして動物実験における動物福祉、動物の権利に関する社会的関心が高まり、実験動物の飼育環境の適正化への対応が求められるようになってきた。特に大型で知能の発達しているサル類は実験動物の中でも特殊な動物であり、その飼育管理には特殊な施設、設備管理技術に加えて、動物福祉の立場から環境エンリッチメントや心理的安寧への配慮が要求される。欧米のガイドラインでは社会的動物であるサル類の行動特性に配慮して個別飼育を避け、複数での飼育環境が推奨されている。しかしながら、完全隔離されたサル類では異常行動や発達異常が生じることは周知の事実であるが、実験動物としてのサル類を管理する立場からすれば、集団飼育に比べ個別飼育の方が個体管理や感染症防御等の点で優れている。また、個体関係の調整という観点からは、限られたスペースでのケージ内飼育と野外での集団生活では著しく状況が異なっている。さらに、社会的動物であるサル類では集団飼育が推奨される一方で、個別飼育と集

団飼育で心理的ストレスの影響を比較した報告は少ない。個別飼育に順応したカニクイザルを集団飼育した場合のストレスを評価することは、飼育環境下における集団飼育の是非を議論する一助ともなる。そこで、筑波霊長類センターで個別飼育されてきた20歳以上の老齢カニクイザルと4~5歳の若齢カニクイザルとを同一のケージに同居させ、同居後のストレスを評価することにより集団飼育の必要性を評価してみた。幅120cm、高さ60cm、奥行き60cmの連結ケージにそれぞれ個別ケージで飼育されていた老齢雌ザルと若齢雌ザルをそれぞれ一頭ずつ同居させ、同居前、同居直後、1日、7日、14日後に先に示したストレス評価指標(行動、コーチゾル、CD16+/NK細胞、U5+/B細胞)の変化を調査した。

図2は同居前後での6種類の行動の生起率を老齢ザル、若齢ザルそれぞれ8頭で調査した結果を平均値で示す。ここに示す行動の中では「接触行動」だけが個体間で生じる行動であるが、同居直後に若齢ザルから老齢ザルに対する「接触行動」が増加しているのがわかる。図3は個体間の関係調節に関連する3種類の行動(グルーミング、威嚇行動、恐れ/回避行動)の生起率を示したものである。図2でみられた同居直後の「接触行動」はその大半が若齢ザルから老齢ザルへの「グルーミング(毛繕い)」であることがわかる。一方、老齢ザルは同居日数の増加に伴い大変奇妙な行動を示す。同居直後に若齢ザルからの「グルーミング」を受けながらも「恐れ/回避行動」がみられ、同居後7日目には「威嚇行動」が現れる。これに反応して若齢ザルでは同居7日後に「恐れ/回避行動」が増加するが、老齢ザルに対する「グルーミング」はみられない。同居後14日目では老齢ザルの「威嚇行動」がみられるものの、若齢ザルは「グルーミング」も「恐れ/回避行動」も示さない。逆に老齢ザルではふたたび「恐れ/回避行動」の生起率が増加する。同居14日目での老齢ザルは、若齢ザルを威嚇しながら恐れるという大変矛盾した(Ambivalent)な心理状態に陥ることが推測され、若齢ザルとの同居期間が長引くにつれて、次第に同居に伴う心理的負荷が増加してゆくことが示唆される。この状態を内分泌および免疫系の変化で見ると(図4)、老齢ザルが受けるストレスの大きさが反映されている。すなわち、若齢ザルでは同居後7日目まではコーチゾルレベルが上昇するが、14日目には低下を始めている。NK細胞レベルも同居直後に一過性に上昇するが14日目には同居前のレベルまでに低下する。若齢ザルでは同居後14日で同居の慣れが生じているのかもしれない。これに対して、老齢ザ

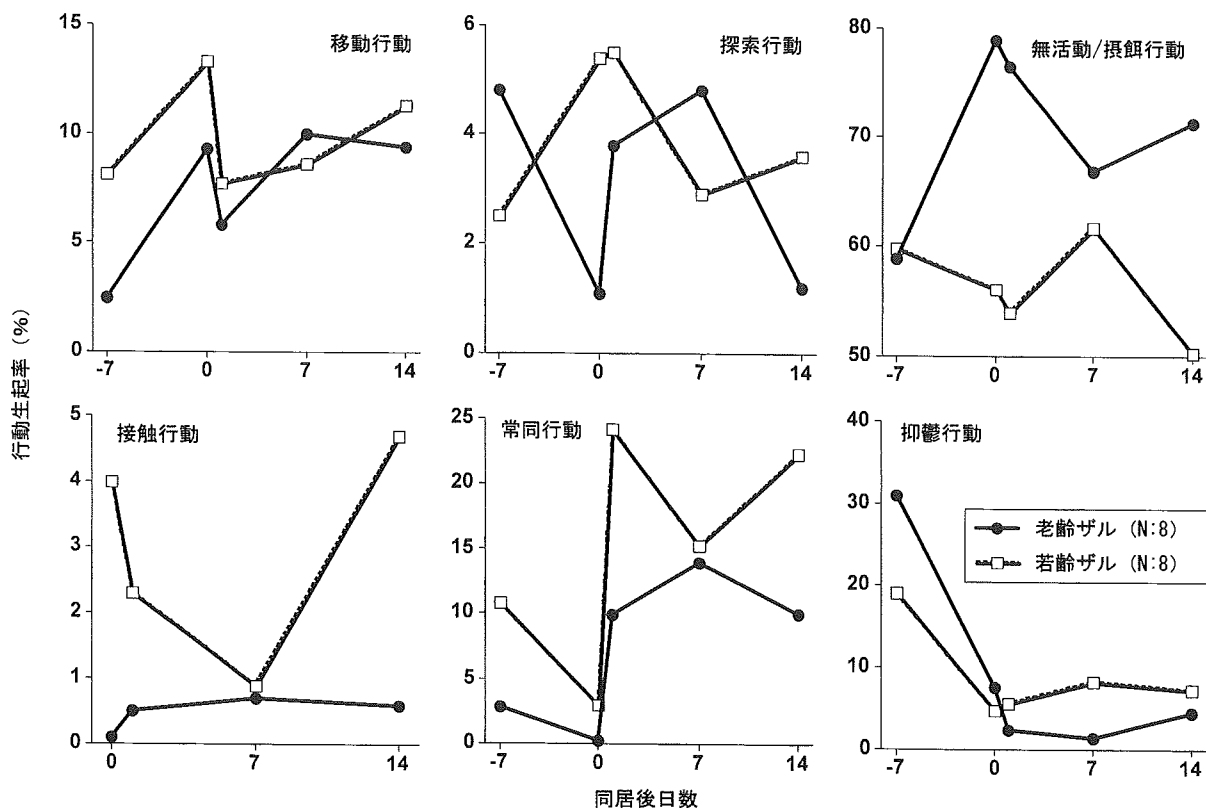


図2 同居のストレスが老齡ザルと若齡ザルの行動に及ぼす影響- 1

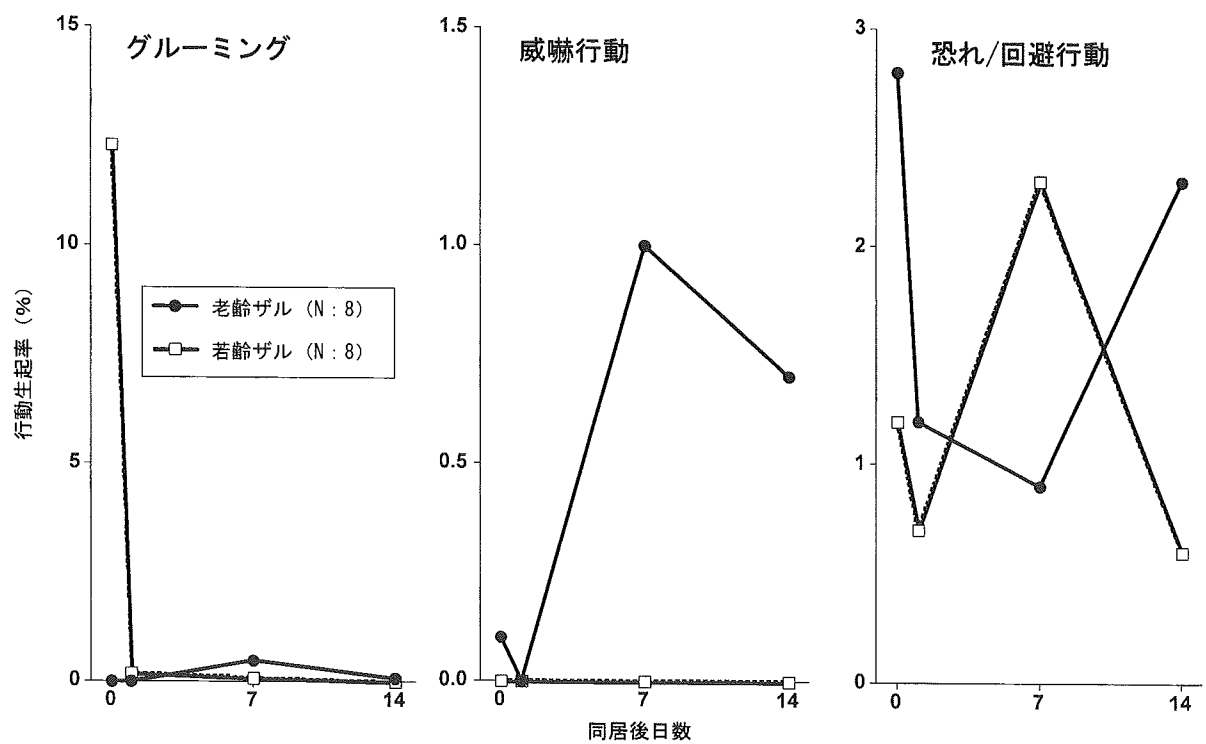


図3 同居のストレスが老齡ザルと若齡ザルの行動に及ぼす影響- 2

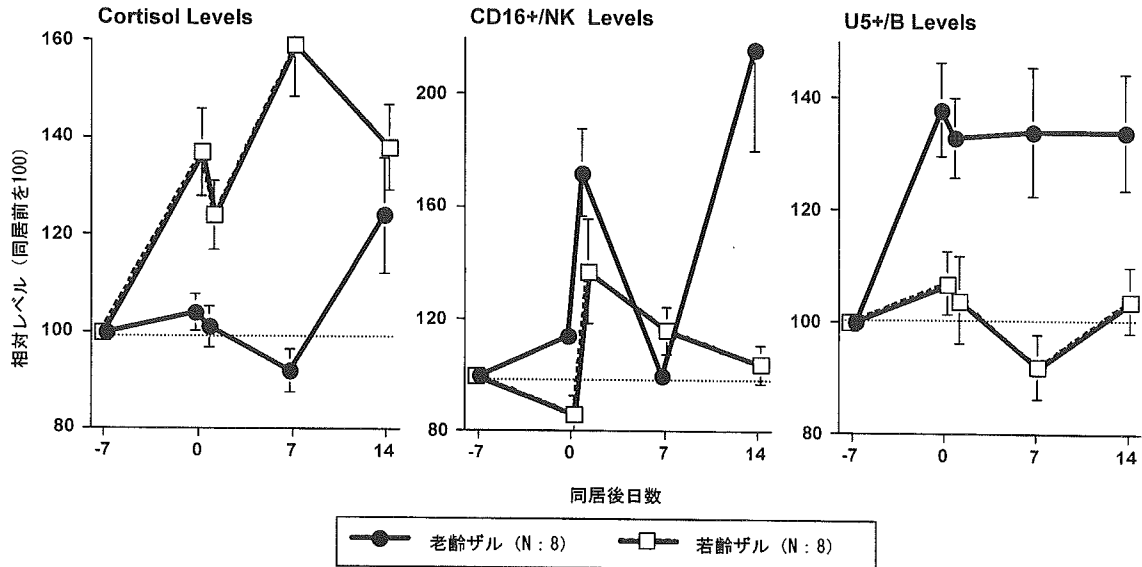


図4 同居のストレスが老齢ザルと若齢ザルのコーチゾルおよびリンパ球サブセットレベルに及ぼす影響

ルでは図3で示した同居後14日目のAmbivalentな心理状態を反映して、コーチゾルレベルもNK細胞レベルも急激に上昇している。これらの結果は、老齢ザルでは同居直後よりもむしろ同居期間が長引くにつれて個体関係の調整からくる心理的ストレスが増加していることを示唆している。興味あることは、老齢ザルの場合のみU5+/B細胞のレベルが同居直後に急増し同居期間中を通じて高いレベルを維持していることである。腎移植患者での調査結果からU5+/B細胞の増加は一過性のストレスよりも長期慢性ストレスを反映している可能性が考えられていたが、図4の結果から老齢ザルでは未知の他個体との同居が低レベルではあるが持続する慢性ストレスとなり、同居後に個体関係の調整に様々な努力をするものの、14日目に限界に近い状態になる可能性を示している。サル類が社会的動物であるが故に、突然の無差別な同居は特に高齢ザルにおいて持続する慢性ストレスとなる可能性が高い。ここに示す結果は、実験用サル類における飼育環境への環境エンリッチメントおよび心理的安寧の配慮では、無差別な集団飼育がもたらす負の影響について慎重な配慮が必要であることを示している。

3. 心理的ストレスを評価する二つの免疫学的指標は同一の神経支配を受けているか？

これまでに、ヒトを含めた霊長類の心理的、社会的ストレスを評価する免疫学的指標としてCD16+/NK細胞とU5+/B細胞の二種類のマーカーが有用である

ことを示してきた。一般にストレスに対する反応は、間脳-下垂体-副腎皮質を介した系と、自律神経-副腎髄質を介した系が存在することが知られている。二つの免疫学的指標、CD16+/NK細胞とU5+/B細胞がどちらのシステムに支配されているかは興味ある課題であるが、サル類で実証するためには様々な侵襲的処置が必要となり、実験処置そのものがストレスとなる可能性が高い。直接的証明はともかく、少なくとも両者が同一のシステムに支配されているか否かを明らかにしておく必要がある。我々は非侵襲的方法により両者の関係を解析する方法として、日内変動に着目して解析を行った。ストレス実験で最も問題になるのは採血時のストレスをどう回避するかであるが、末梢リンパ球サブセットレベルの日内変動調査では、無拘束連続採血装置(チター装置)による採血が必要である。図5は、7頭のアカゲザルと4頭のニホンザル、計11頭にチター装置を装着し、午後4時(16:00)から翌日の午後4時までの24時間で4時間置きに7回採血した。照明は午後7時消灯、翌日の午前7時点灯の12時間照明である。図5はスタート時のレベルを1としたコーチゾル、CD16+/NK細胞およびU5+/B細胞の相対的变化を11頭の平均値と標準誤差で示したものである。結果は省略するが、末梢血中のリンパ球数と顆粒球数には典型的な日内変動が認められ、夜間にリンパ球は上昇し顆粒球は減少する。また主要リンパ球サブセット(CD4+/T細胞、CD8+/T細胞、CD20+/B細胞、CD16+/NK)のレベルでは、図5に示すように

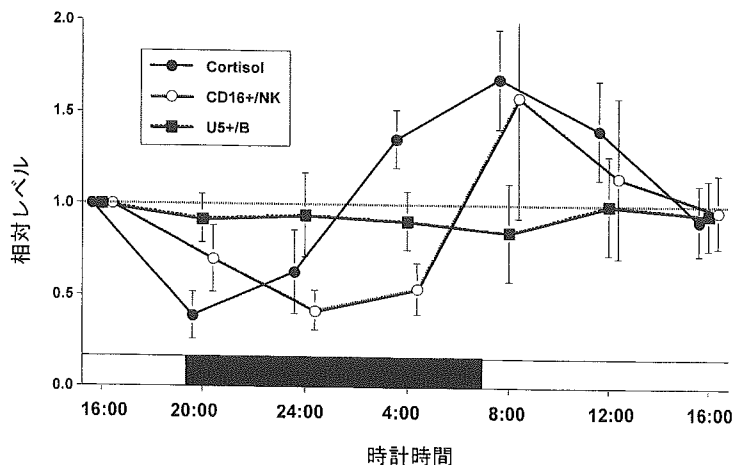


図5 ストレス関連指標の日内変動

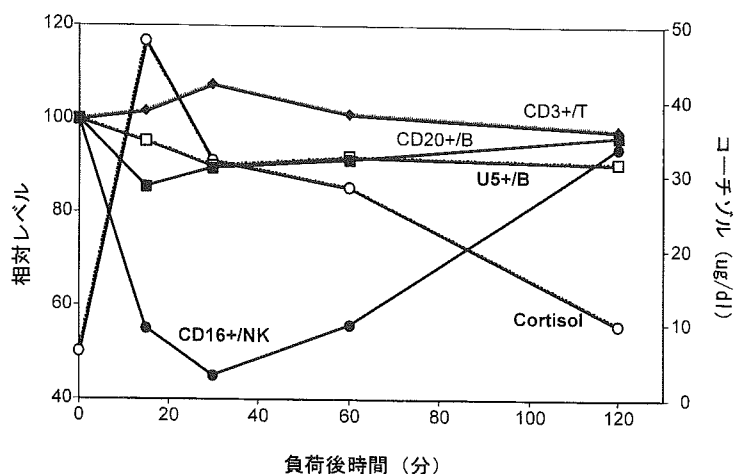


図6 コーチゾル負荷に伴う末梢リンパ球サブセットレベルの変化

CD16+/NK細胞だけが典型的な日内変動を示したが他の3種のサブセットレベルにはほとんど変化がみられなかった。図5に示すように、コーチゾルとCD16+/NK細胞レベルには典型的な日内リズムがあり、両者ともに消灯後に低下し、点灯前から翌朝にかけて増加する。この結果は、ヒトで報告されているコーチゾル及びリンパ球サブセットの日内変動とほぼ一致し、翌朝の活動開始に備えコーチゾルの増加とNK細胞の末梢血中への回帰が始まると考えられる。血中コーチゾルとCD16+/NK細胞の変化を比較すると、両者とも同一のパターンを描くが、CD16+/NK細胞の増加に先だってコーチゾルが増加していることがわかる。このことは、CD16+/NK細胞の増加は血中コーチゾルの増加により誘導される可能性を示している。すなわち、コーチゾルレベルがNK細胞レベルに影響を与えている可能性である。一方、U5+/B細胞

のレベルには24時間を通じてほとんど変化がみられないことから、CD16+/NK細胞とは異なる支配を受けていることが予想された。そこで、この仮説を証明するため、チター装置を用いてコーチゾル負荷実験を行った。3頭のニホンザルにチター装置を装着し、300ug/kgのコーチゾルもしくは生理食塩水を無拘束状態で静注し、投与前、投与後15、30、60、120分に採血し、コーチゾル負荷に伴う主要リンパ球サブセットレベルの変化を調査した。図6はその一例を示したものであるが、コーチゾル静注直後からCD16+/NK細胞のみが著しく低下するが、コーチゾルレベルの低下に伴い120分後には負荷前の値に回復した。一方、U5+/B細胞レベルはCD3+/T細胞、CD20+/B細胞レベルと同様に血中コーチゾルの増加の影響をほとんど受けなかった。このことから、主要リンパ球サブセットではCD16+/NK細胞のみがコーチゾルの影響を受けるこ

とが明らかとなったが、NK細胞の変化がコーチゾルの直接的影響によるものか、より高次の神経内分泌機構がCD16+/NK細胞レベルとコーチゾルレベルの両者を支配しているかはこの結果だけでは確言し得ない。

CD16+/NK細胞レベルの変化を図5と図6で比較すると、図5の結果ではコーチゾルレベルの上昇に伴いCD16+/NK細胞レベルも増加しているが、図6の結果ではコーチゾルレベルの増加に伴いCD16+/NK細胞レベルは低下している。図1の母子分離の結果では、図6と同様に分離一日目にコーチゾルレベルが上昇するとともにCD16+/NK細胞レベルは低下している。これまでの我々の調査結果ではストレス負荷後にコーチゾルは常に増加するが、CD16+/NK細胞レベルは増加する場合と低下する場合があることが明らかになっている。前者(NK細胞レベルの上昇)は群形成やケージ交換などの比較的低レベルの持続性ストレス負荷時にみられ、後者は母子分離などの一過性の比較的高レベルのストレス反応時でみられる。これまでの結果を総合して、ストレス負荷後のNK細胞レベルの変化に関して次のような仮説を立てている。すなわち、ストレス反応として生じるコーチゾルレベルの増加の程度、換言すればストレスの程度により、CD16+/NK細胞レベルは少なくとも増加と、減少という全く異なった変化を示す。増加と減少のいずれかを決定するコーチゾルレベルの閾値が存在する可能性が高いが、閾値は個体によって異なる。この仮説を実証するため、コーチゾル濃度を変えて負荷試験を行ったが、低濃度のコーチゾル負荷ではNK細胞レベルは変化しないことから、CD16+/NK細胞レベルの増加は血中コーチゾルレベルの上昇が一定期間持続する必要があるのかもしれない。

おわりに

サル類の特性を利用してこれまでに取り組んできた神経・内分泌・免疫相関を解析するストレスモデルと、ストレスを評価する免疫学的指標について概説した。ここに示した結果はすべて複数の個体の平均値である。サル類を用いたこの種の実験では、平均値で傾向を示すよりも、個体毎のデータを比較しストレス反応の個体差を解析する方が有意義であるという気持ちをいつも持っている。個体レベルでのトータルな表現型の変化を解析する必要性である。ストレスで誘導される恒常性の攪乱は1対1の対応で判断できる単純なものではなく、いくつかの経路が複雑に関連している総

合的な制御系の変化であることから、従来の還元的解析法ではなく複雑系を解析する知恵が必要となる。その意味では、個体の特性を日常的に観察している実験動物技術者の21世紀の生命科学に果たす役割は大きい。ここで紹介したストレスモデルの実験結果は、動物福祉の観点から日常的にストレス軽減に頭を悩まされている技術者の方々が動物の反応性の多様性を認識される良いきっかけにもなる。単純系から複雑系解析に移行しつつある生命科学の分野において、個体の反応性がいくつかの制御系で統御されていることを身を持って体験されている実験動物技術者のセンスが21世紀の生命科学を支える基本であるという意を強くしている。

文 献

- 1) Koyama T and Terao K.: Psychological stress of maternal separation in cynomolgus monkeys. The effects of housing with a nurse females. pp.101-113, in N.Itoigawa, Y.Sugiyama, G.P. Sackett and R.K.R.Thompson [eds], Topics in Primatology, Vol. 2 : Behavior, Ecology and Conservation. Tokyo University Press, Tokyo, 1992.
- 2) Terao K, Murayama Y and Koyama T.: Psychological stress of maternal separation in cynomolgus monkeys. Effects on natural killer cells. pp.115-125, in N.Itoigawa, Y.Sugiyama, G.P. Sackett and R.K.R.Thompson [eds], Topics in Primatology, Vol.2 : Behavior, Ecology and Conservation. Tokyo University Press, Tokyo, 1992.
- 3) 寺尾恵治: ストレス関連リンパ球としてのU5陽性細胞. 平成3年度ヒューマンサイエンス基礎研究事業, 官民共同プロジェクト第3分野研究成果報告, ヒューマンサイエンス振興財団, pp.299-316, 1993.
- 4) Nakamichi M, Kanazawa T and Terao K.: Behavior and serum cortisol in infant Japanese monkeys following maternal separation and grouping of infants. pp.257-263, in JJ Roeder, B Thierry, JR Anderson, and N Herrenschildt. [eds], Current Primatology (Selected Proceedings of the XIVth Congress of the International Primatological Society), Vol.II : Social Development, Learning and Behaviour. Universite Louis Pasteur, Strasbourg ; 1994.

- 5) Terao K, Hamano A and Koyama T. : The repeated procedure of weaning and peer group formation causes accumulation of stress and changes of plasma cortisol levels and natural killer activity in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). *Primates*, 1995, 36 : 121-127.
- 6) Ikura S, Terao K, Takenaka O, Noguchi A and Murayama Y. : Distribution of U5 antigen on lymphocyte subset in human and nonhuman primates. *Primates*, 1995, 38 : 185-192.
- 7) Terao K, Murayama Y and Koyama T. : Non-human primate model in new field of immunology, psychoneuroimmunology. -Significance for assessment of environment enrichment and psychological well-being-. *Laboratory Animals and Environment*, 1997, 5 : 113-121.
- 8) 寺尾恵治：サル類のストレスモデルと神経・免疫・内分泌相関, pp.36-48, in 日本実験動物協会編「教育セミナーフォーラム'97脳・神経系疾患と動物実験-臨床からのメッセージを踏まえて」, 1998
- 9) 小山高正, 寺尾恵治：老齢ザルの心理・社会的ストレスに対する反応特性, 霊長類研究, 1998, 14 : 109-114.
- 10) Terao K, Suzuki J and Ohkura S. : Circadian rhythm in circulating CD16-positive natural killer (NK) cells in macaque monkeys. Implication of plasma cortisol levels. *Primates*, 2002, 43 : 329-338.

Oxidative Stress, Inflammation, and Health

edited by

Young-Joon Surh
Lester Packer



Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

Boca Raton London New York Singapore

A CRC title, part of the Taylor & Francis imprint, a member of the
Taylor & Francis Group, the academic division of T&F Informa plc.

**Neuroprotection by Rasagiline
and Related Propargylamines
Is Mediated by Suppression
of Mitochondrial
Death Signal
and Induction of
Antiapoptotic Genes**

WAKAKO MARUYAMA

Laboratory of Biochemistry
and Metabolism, Department of
Basic Gerontology, National Institute
for Longevity Sciences,
Aichi, Japan

**YUKIHIRO AKAO and
MAKOTO NAOI**

Gifu International Institute
of Biotechnology,
Gifu, Japan

ATSUMI NITTA

Department of Pharmacy, Nagoya
University School of Medicine,
Nagoya, Japan

ABSTRACT

In neurodegenerative disorders, such as Parkinson's and Alzheimer's diseases, apoptosis is a major type of neuronal cell death, and the apoptotic cascade has been proposed to be a target of "neuroprotection" through preventing and delaying cell death.

A series of propargylamine derivatives have been confirmed to protect neurons against cell death induced by various insults. The mechanism underlying the neuroprotection has been clarified by use of rasagiline [*N*-propargyl-1(*R*) aminoindan], the most potent propargylamine, and human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells.

Rasagiline stabilizes the mitochondrial membrane potential, $\Delta\Psi_m$, prevents permeability transition, and suppresses the activation of following apoptotic signal transduction; release of cytochrome *c*, activation of caspase 3, nuclear translocation of glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and fragmentation of nuclear DNA. In addition, rasagiline induces antiapoptotic Bcl-2 and glial cell-line-derived neurotrophic factor (GDNF) in SH-SY5Y cells.

In this review, we summarize our recent advances in understanding the mechanism behind the neuroprotection by rasagiline. Rasagiline was found to activate NF- κ B, a nuclear transcription factor playing a critical role in determining cell death/survival pathway. Rasagiline activated I κ B kinase, and active NF- κ B p65 subunit was translocated into nuclei. In addition, gene array analysis revealed that rasagiline increased the expression of the genes coding mitochondrial energy synthesis, apoptosis, transcription, kinases, and ubiquitin-proteasome system, the involvement of which has been proposed in neuronal cell death and accumulation of inclusion bodies in various neurodegenerative disorders. These results are discussed as they concern the possibility of neuroprotection by propargylamines in Parkinson's and Alzheimer's diseases.

I. NEUROPROTECTION BY PROPARGYLAMINES: INTRACELLULAR MECHANISM

The development of "neuroprotective drugs" is now gathering attention in order to slow down the disease progress and improve quality of life of the patients with neurodegenerative disorders, such as Parkinson's disease (PD), Alzheimer's disease (AD), and amyotrophic lateral sclerosis. On the other hand, activation of mitochondria-dependent apoptotic signal is considered to account for cell death in neurodegenerative disorders (1,2) and well-conserved and -regulated apoptotic cascade has been proposed to be a target of neuroprotection (3,4). Using the cellular and animal models of neurodegenerative disorders, several candidates of neuroprotective agents have been proposed: antioxidants, inhibitors of monoamine oxidase [MAO, monoamine: oxygen oxidoreductase (deaminating), EC 1.4.3.4], anti-inflammatory drugs, drugs interfering glutamate excitotoxicity, and growth factors (5–8). These candidates are expected to intervene the death signal transduction and protect neurons from degeneration.

N-Propargyl-1(*R*)-aminoindan (rasagiline) is an inhibitor of type B MAO (MAO-B) (9,10), and has been developed as an anti-Parkinson drug (11–13). The phase III clinical trial of rasagiline was now finished for the treatment of parkinsonian patients. The neuroprotective potency of rasagiline has been proved in vivo using animal models induced by neurotoxins, excitotoxicity toxins, ischemic, and closed brain injury (14–16). However, in clinical studies, it requires further results to prove the neuroprotective potency, in addition to the previously confirmed symptomatic effects (17).

Also in vitro rasagiline has been shown to reduce glutamate toxicity in cultured hippocampal neurons (13) and to prolong survival of cultured, serum-derived rat fetal mesencephalic cells (18). The structure–activity relationship suggested that the neuroprotective effect of rasagiline and related compounds did not depend on the MAO inhibitory property, as shown by neuroprotection by the enantiomer of rasagiline, *N*-propargyl-1(*S*)-aminoindan (TVP-1022), which

was 100-fold less active as MAO inhibitor (14). We studied the mechanism behind neuroprotection of rasagiline against cell death induced in human neuroblastoma SH-SY5Y cells by peroxynitrite and neurotoxins, *N*-methyl(*R*)salsolinol [*NM(R)*Sal] and 6-hydroxydopamine, as a cellular PD model (19,20).

Apoptosis is a death process observed in neurons after exposure to neurotoxins, increased oxidative stress, excitotoxins, and withdrawal of neurotrophic factors. The intracellular process of apoptosis induced by *NM(R)*Sal in SH-SY5Y cells was elucidated as follows. Binding of *NM(R)*Sal to mitochondrial outer membrane initiates mitochondrial permeability transition (mPT), opening a megachannel called mPT pore, which induces rapid reduction of mitochondrial membrane potential, $\Delta\Psi_m$, and swelling of mitochondria. Then the following apoptotic cascade is activated: release of cytochrome *C* and other apoptosis-inducing factors from mitochondria to cytoplasm, activation of caspase 3, an executor of apoptosis, and translocation of glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase [GAPDH, D-glyceraldehydes-3-phosphate:NAD; oxidoreductase (phosphorylating), EC 1.2.1.12] from cytoplasm to nuclei. In the final, fragmentation and condensation of nuclear DNA are induced, as shown by nuclei with condensed chromatin and fragmented DNA, and ladder formation of fragmented oligonucleosomal DNA by agarose gel electrophoresis (21,22). Figure 1 summarizes the activation of apoptotic cascade induced by *NM(R)*Sal and other stimuli.

A series of propargylamines, including rasagiline, (–) deprenyl, and aliphatic (*R*)*N*-(2-heptyl)-*N*-methylpropargyl-amine (*R*-2HMP) inhibits the activation of apoptotic cascade and protects SH-SY5Y cells against apoptosis. The chemical structures of propargylamines with antiapoptotic potency are shown in Fig. 2. As summarized in Fig. 3, these propargylamines prevent collapse in $\Delta\Psi_m$, in isolated mitochondria (23), and SH-SY5Y cells (19), and following activation of apoptotic cascade. These results are quite similar to those observed in SH-SY5Y cells with overexpression of antiapoptotic Bcl-2 protein family, suggesting the involvement of Bcl-2 and related prosurvival protein. Based on these results, we examined whether rasagiline could induce genes coding antiapoptotic protein in neurons.

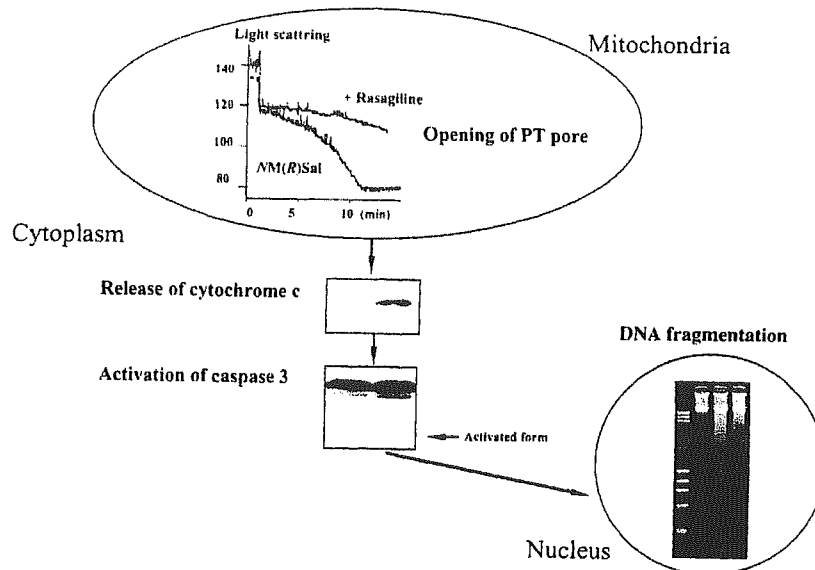
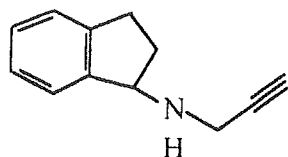


Figure 1 Mitochondria-dependent apoptosis cascade activated by an endogenous neurotoxin, NM(R)Sal in Sh-SY5Y cells.

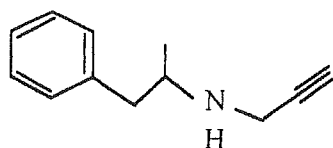
II. INDUCTION OF NEUROPROTECTIVE PROTEIN

As mentioned above, some kinds of proteins have been proposed to alleviate neuronal loss through suppression of oxidative stress, prevention of apoptotic signal transduction, and promotion of cell survival. Rasagiline, (-) deprenyl, and aliphatic propargylamines were found to increase the activity of antioxidative enzymes, superoxide dismutase (SOD), and catalase, in the rat brain after the continuous injection (24,25). (-) Deprenyl and desmethyldeprenyl were reported to increase mRNA level of SOD 1 and 2, Bcl-2 and Bcl-xL, nitric oxide synthase, c-JUN, and nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase in PC12 cells (26).

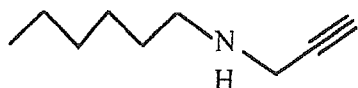
Bcl-2 and related proteins are known to prevent mPT induction and activation of apoptotic cascade in a variety of physiological and pathological contexts (27,28). The family of Bcl-2-related proteins constitutes one of most relevant regulatory gene



N-Propargyl-1(*R*)-aminoindan
(Rasagiline)



(-)-Deprenyl (selegiline)



N-(2-Heptyl)-*N*-methylpropargylamine
(2-HMP)

Figure 2 Chemical structures of propargylamines with neuroprotective potency. Rasagiline contains a cyclic benzylamine structure,

products against apoptosis. We found that rasagiline increased mRNA and protein levels of *bcl-2* and *bcl-xL* in SH-SY5Y cells.

Neurotrophic factors, such as nerve growth factor, glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), and ciliary neurotrophic factor (CNTF), have been proposed as agents preventing neuronal loss (29,29a). Recently, we found that rasagiline induced mRNA and protein of GDNF, which protects or promotes survival of dopamine neurons selectively.

These results suggest that rasagiline may activate an intracellular signal transduction common for induction of genes coding these antiapoptotic proteins, antioxidative enzymes, antiapoptotic Bcl-2 family protein, and GDNF.

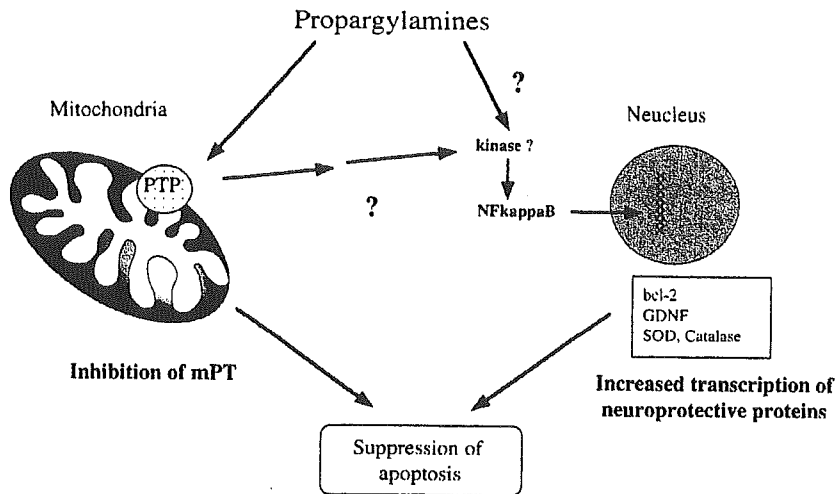


Figure 3 The summary of the mechanism underlying neuroprotection by propargylamines.

II.A. Induction of Bcl-2 by Rasagiline

Bcl-2 family proteins play key roles in regulating apoptosis (28) and they may be either death antagonists (Bcl-2, Bcl-xL, Bfl-1, A1, and Mcl-1) or agonists (Bax, Bak, Bad, Bid, Bik, and Hrk). The proteins form homo- or heterodimers between anti- and proapoptotic members and determine cellular sensitivity to apoptotic stimuli by titrating one another's function. Bcl-2 is mainly localized in the mitochondrial inner membrane and it can promote survival in neurons and other cells undergoing apoptosis (27). Overexpression of Bcl-2 protects various neuron paradigms in vivo and in vitro from death induced by neurotoxins and other insults. Bcl-2 regulates apoptosis induced by *NM(R)Sal*, as proved by preventing apoptosis in Bcl-2-overexpressed SH-SY5Y cells (19) and also $\Delta\Psi_m$ decline in isolated mitochondria prepared from liver of Bcl-2 overexpressed mice (23). These results suggest that Bcl-2 protein in mitochondria may mediate the neuroprotection by rasagiline. The induction of mRNA and protein of antiapoptotic Bcl-2 family proteins was examined in

SH-SY5Y cells either by reverse transcription (RT)-PCR or Western blot analysis.

Rasagiline was prepared as reported previously (9) and kindly donated by Teva Pharmaceutical (Netanya, Israel). SH-SY5Y cells were cultured in the presence of various concentrations (10 μ M–1 pM) of rasagiline for 24 hr or for a various incubation time with 100 nM rasagiline. The whole cells were gathered and the total RNA was extracted by the phenol/guanidinium thiocyanate method. cDNA was generated by reverse transcription of the total RNA, and the cDNA fragments were amplified using the PCR primers. PCR products were analyzed by electrophoresis on 3% agarose gels, and β -actin cDNA was used as an internal standard. The mRNA levels of *bcl-2* and *bcl-xL* were quantified by computer-assisted image analysis using NIH imaging software.

Rasagiline was confirmed to enhance expression of *bcl-2* and related genes. Reverse transcription-PCR analyses revealed increased levels of *bcl-2* mRNA after treatment with 100 nM rasagiline in a time-dependent way (Fig. 4A). The *bcl-2* mRNA levels began to increase after 3 hr of the treatment with rasagiline and the increase continued further to about threefold at 24 hr. Western blot analyses showed that Bcl-2 protein level increased from 6 to 24 hr of the treatment. Figure 4B shows that rasagiline increases *bcl-2* mRNA level, but not *bax* mRNA at 100–1 nM. Figure 5A shows the quantitative analyses of *bcl-2* mRNA levels increased by rasagiline treatment, and the relative value of *bcl-2* mRNA to β -actin mRNA increased to about 150% of control after incubation with rasagiline. Among *bcl-x* isoforms, a 337 base pair fragment corresponding to the *bcl-xL* also increased by 100 nM rasagiline treatment, whereas the mRNA levels of *mcl-2* and *bax* were not affected (Fig. 5B). Other MAO-A and -B inhibitors, clorgyline, and pargyline, did not affect the mRNA level at the concentrations examined (10 μ M–1 pM). These results clearly indicate that rasagiline induced prosurvival Bcl-2 protein family, but not apoptosis-promoting Bax family.

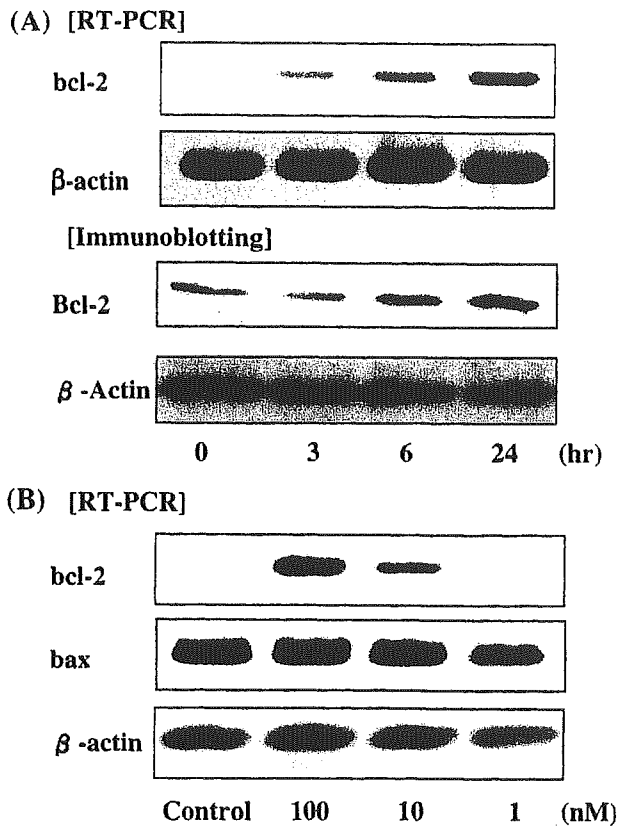


Figure 4 Effect of rasagiline on levels of mRNA and protein of *bcl-2* family. (A) SH-SY5Y cells treated with 100 nM rasagiline for 3, 6, and 24 hr and the mRNA levels were assayed by RT-PCR and the protein levels by immunoblot analysis using antibody against Bcl-2 protein. (B) The cells were treated with 100, 10, and 1 nM rasagiline for 24 hr and the *bcl-2* and *bax* mRNA were assayed by RT-PCR.

II.B. Induction of Glial Cell-Line-Derived Neurotrophic Factor

Glial cell-line-derived neurotrophic factor is a member of the transforming growth factor- β superfamily and effectively protects dopaminergic neurons against cell death in various animal models of PD prepared with 6-hydroxydopamine and

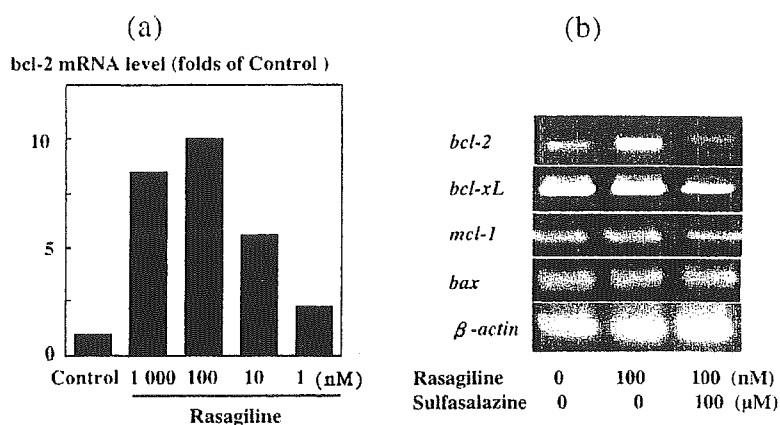


Figure 5 The effects of rasagiline and sulfasalazine on *bcl-2* and related genes. SH-SY5Y cells were incubated with rasagiline for 24 hr and mRNA was extracted and applied for RT-PCR. (A) The level of *bcl-2* mRNA in the cells treated with various concentration of rasagiline was quantified by NIH imaging software and compared to control cells without the treatment of rasagiline. (B) The effect of rasagiline and the pretreatment with sulfasalazine. Rasagiline at 100 nM increased mRNA of *bcl-2* and *bcl-xL* but did not affect

1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) (30,31). Since GDNF and other neurotrophic factors cannot penetrate into the brain through the blood-brain barrier, several trials have been reported to deliver GDNF in the substantia nigra by direct administration (32,33), gene therapy (34,35), and cell implant (36,37). There were several controversial results about the effectiveness of GDNF supplement therapy in parkinsonian patients, mostly because of the technical difficulties to deliver GDNF to nigral dopamine neurons. However, recently GDNF injected directly to the putamen improved the symptoms in a part of parkinsonian patients (38). We confirmed that rasagiline induced GDNF in SH-SY5Y cells and the mechanism was also clarified.

The effect of rasagiline on levels of GDNF mRNA was studied by RT-PCR, and on those of GDNF protein was quantified using the enzyme immunoassay (EIA), as reported previously (39,40). Glial cell-line-derived neurotrophic factor

Table 1 Effect of Rasagiline and Sulfasalazine on GDNF Protein Level in SH-SY5Y Cells

SH-SY5Y cells treated with		
Rasagiline (μM)	Sulfasalazine (mM)	GDNF (pg/mL)
0	0	0.446 ± 0.213
0	0.1	4.83 ± 2.26
1	0	2.02 ± 1.82
0.1	0	100.6 ± 27.3^a
0.01	0	3.84 ± 2.50
0.1	0.1	4.46 ± 2.37^b

SH-SY5Y cells were incubated with rasagiline with or without pretreatment of 0.1 mM sulfasalazine for 3 hr and GDNF was measured by EIA as described in "Materials and Methods".

^aThe difference was significant from the cells without treatment.

^bThe difference was significant from the cells treated with 0.1 μM of rasagiline alone.

mRNA was virtually not detectable in SH-SY5Y cells, but after the treatment with 0.1 μM of rasagiline for 3 hr considerable amount of GDNF mRNA was detected. As summarized in Table 1, the amount of GDNF protein in the cells increased most markedly after being treated with 0.1 μM of rasagiline. The GDNF protein was less than 1 pg/mL before rasagiline treatment, but it increased more than 100 pg/mL after the treatment for 3 hr (Table 1).

II.C. Activation of NF- κ B Transcription Factor by Rasagiline

NF- κ B is the common transcription factor to induce antiapoptotic *bcl-2*, neurotrophic GDNF, and antioxidative SOD, all of which were increased by rasagiline (24,40,41). As shown in Fig. 6, NF- κ B consists of two subunits of 65 kDa (p65: RelA) and 50 kDa (p50) or 52 kDa (p52), and is sequestered in the cytoplasm as an inactive complex with NF- κ B inhibitory subunit (I κ B). Upon stimulation, I κ B is phosphorylated, dissociated from the complex, and degraded by the ubiquitin-proteasome system. This reaction allows translocation of free, active NF- κ B complex into nuclei, where it binds to specific DNA

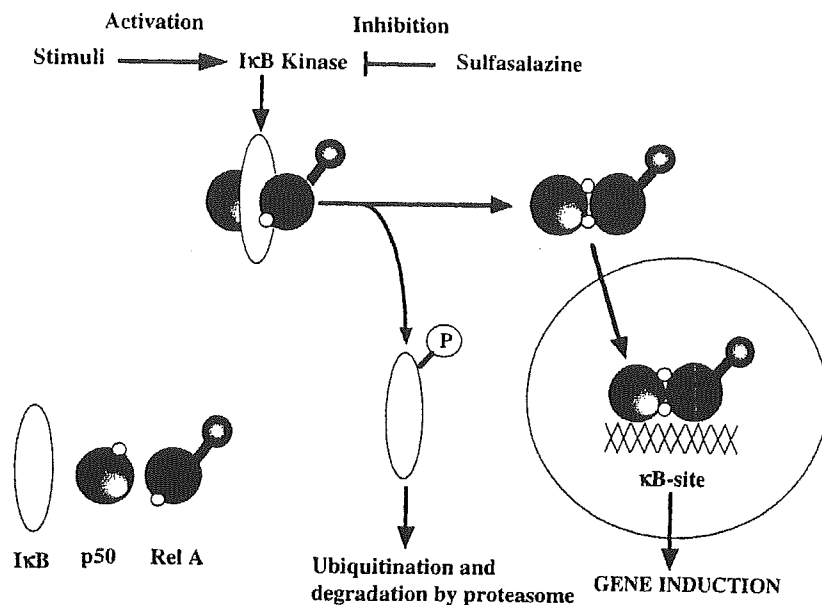


Figure 6 The mechanism behind the activation of NF- κ B. By the various exogenous and endogenous stimuli, I κ B kinase is activated and it phosphorylates I κ B in the inactive NF- κ B complex. Phosphorylated I κ B is degraded by ubiquitin-proteasome system and active NF- κ B dimer consists of 65 kDa (p65:RelA) and 50 kDa (p50) or 52 kDa (p52) translocates into the nuclei to bind κ B sites.

motifs in the promoter/enhancer regions of target genes and activates transcription.

The translocation of activated p65 subunit was studied by Western blot analysis of the subcellular fractions of SH-SY5Y cells after treatment with 1 and 0.1 μ M of rasagiline for 30 and 60 min. Rasagiline treatment increased p65 subunit in the nuclear fraction in a time- and dose-dependent way, whereas that in the cytoplasmic fraction decreased. The translocation of activated NF- κ B was also examined by immunohistochemistry using the p65 antibody (Fig. 7B), and nuclear staining with Hoechst 33342 (Fig. 7A). After 3 hr treatment with rasagiline, nuclear translocation of p65 was confirmed by merging the two figures (Fig. 7C).