

SDS, 1 % NP-40, 1 % sodium deoxycholate, 20 ng/ml aprotinin, 20 ng/ml leupeptin, 20 ng/ml pepstatin, pH-7.4) でホモジナイズした。ホモジナイズしたサンプルは遠心分離 (13000 x g, 4 °C, 20 分) を行い、得られた上清の粗タンパク量を Lowry 法 (DC Protein Assay Kit II, BIO-RAD, CA, USA) により測定した。粗タンパク量 20  $\mu$ g/50  $\mu$ l を分取し、これと同量のサンプルバッファー (125 mM Tris-HCl, 10 % 2-mercaptoethanol, 4 % SDS, 10 % sucrose, 0.004 % bromophenol blue, pH-6.8) を加えた後、95 °C で 5 分間煮沸した。タンパク (20  $\mu$ g) を 10 % SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行い、Semi-dry transfer 法により polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜 (Millipore, Bedford, MA, USA) へタンパクを転写した後、膜をブロッキングバッファー (Detector Block; KPL, MD, USA) に入れ、緩やかに攪拌しながら 2 時間室温でブロッキングした。

次に、PVDF 膜を 1 次抗体 [rabbit anti-リン酸化-ERK (Thr202/Tyr204) またはマウスニトロチロシン抗体] (1: 2000; Cell Signaling, MA, USA) とブロッキングバッファー中で 4 °C 下に overnight 反応させた。反応後直ちにウォッシングバッファー (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 1.5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.1 % Tween-20) にて 4 回 (1 回につき 10 分間) 洗浄した後、2 次抗体 [anti-rabbit IgG HRP] (1: 2000; KPL, MD, USA) と 2 時間反応させた。その後ウォッシングバッファーで 4 回洗浄した。洗浄後、免疫複合体を enhanced chemiluminescence (ECL) Kit (Amersham Pharmacia Biotech Inc, Piscataway, NJ, USA) で検出し、X 線フィルムにより露光した。X 線フィルムの画像は CCD camera (ATTO, Tokyo, Japan) により取り込んだ。バンドの強度は ATTO Densitograph Software Library Lane Analyzer (ATTO) により定量分析した。ERK の活性化の検討には、同じ PVDF 膜を用いてリン酸化および総 ERK を検出するために、膜はストリッピングバッファー (100 mM 2-mercaptoethanol, 2 % SDS, 62.5 mM Tris-HCl, 0.1 % Tween-20, pH-6.7) 中で 50 °C、30 分間反応させ、1 次抗体 [rabbit anti-リン酸化-ERK (Thr202/Tyr204)] を

除去した後、rabbit anti-ERK 抗体 (1: 2000; Cell Signaling, MA, USA) と 4 °C で overnight 反応させ、同様の手順で総 ERK のタンパク量を定量した。得られたリン酸化 ERK のバンドを総 ERK のバンドで補正し、ERK の活性化の程度とした。

## 5. 統計処理

結果は全て平均値  $\pm$  標準誤差として示した。結果は、一元配置分散分析を行い、さらに各群間比較には、Bonferroni の多重比較検定法を用いた。なお、危険率 5 % 以下の場合を有意差ありと判定した。

## C. 結果

### 1. アルツハイマー病モデルマウスにおける蛋白ニトロ化への Leu-Ile 腹腔内投与の効果

我々は、A $\beta$  の神経機能障害には、蛋白ニトロ化が関与していることを見出している (Tran et al., 2001)。本マウスにおいても、A $\beta$  25-35 の注入 5 日目のマウス海馬において、蛋白のニトロ化が促進していた (Fig.2 の左から 2 本目のカラム)。A $\beta$  25-35 の注入による蛋白ニトロ化を Leu-Ile (1.5 および 15  $\mu$ moles / kg, *i.p.*) は、有意に抑制した (Fig.2 右 2 本のカラム)

### 2. アルツハイマー病モデルマウスにおける新奇物体認知試験での記憶学習障害に対する Leu-Ile の効果

コントロールのマウス (vehicle 注入群) では、物体への総接触時間に対する新奇物体に接触する時間は 70% であり、新奇物体を認知していることが示された。一方、A $\beta$  25-35 を注入したマウスでは、50% 前後であり、新奇物体を認知していないと考えられる。Leu-Ile (1.5 および 15  $\mu$ moles / kg, *i.p.* ならびに 7.5 および 75  $\mu$ moles / kg, *p.o.*) は、いずれの投与経路および今回実験を行ったいずれの投与方法でも、A $\beta$  25-35 の注入による新奇物体認知試験の学習・記憶障害を改善した。

### 3. アルツハイマー病モデルマウスにおける蛋白ニトロ化および学習記憶障害に対する Leu-Ile 経口投与の効果

Leu-Ile は、ジペプチドであることから、腸管吸収の際に分解される可能性が考えられ、上記2に記述したように経口投与で効果が観察されたことは、興味深い。そこで、Leu-Ile を経口投与した際の蛋白ニトロ化および学習記憶障害改善作用についても検討を行った。Fig. 3 に示すように、Leu-Ile を腹腔内投与した場合と同様の結果が得られた。即ち、Leu-Ile の経口投与は、 $A\beta$  25-35 によって誘導されるマウス海馬での蛋白ニトロ化および学習記憶障害を改善した (Fig. 3 B と C)。また、本モデルについて、神経栄養因子、Akt および CREB を含むシグナル伝達に関与している多くの因子の含量や活性化について、経時的に検討を行ったところ、 $A\beta$  25-35 の注入1日目のマウスでは、ERK の活性化が増強していた。Leu-Ile 経口投与は、 $A\beta$  25-35 による ERK の活性化を抑制した (Fig. 3 A)。

#### D. 考察

我々は、今までにLeu-Ileが神経栄養因子の産生を促進することによって神経保護作用を有することを報告している。また、そのメカニズムの少なくとも一部には、AktやCREBの活性化が関与していることも確認している。これらの知見から、Leu-Ileがパーキンソン病やアルツハイマー病のような神経変性疾患への治療薬となる可能性を模索してきた。本研究では、アルツハイマー病モデルマウスにおいて、Leu-Ileが神経機能障害を改善することを示すことが出来た。非常に興味深いことに、経口投与でもLeu-Ileの効果が観察されたことから、今後、臨床応用にむけて医薬品以外にも神経変性疾患予防を目的とするサプリメントとしての可能性も広がったと考えられる。しかし、今回、データは示さなかったが、本モデルにおけるLeu-Ileの効果は、我々が今までに報告してきたシグナルや蛋白を介していることを確認することが出来なかった。また、 $A\beta$  25-35によってERKの活性化がされることや、Leu-Ileがその活性化を抑制することの生理的意義について、さらなる検討が必要である。

#### E. 結論

疎水性ジペプチドの Leu-Ile はアルツハイマー病モデルマウスにおいて、神経機能障害を抑制した。また、Leu-Ile を経口投与した場合にも、効果が観察されたことから、臨床応用への可能性が高まったと考えられる。

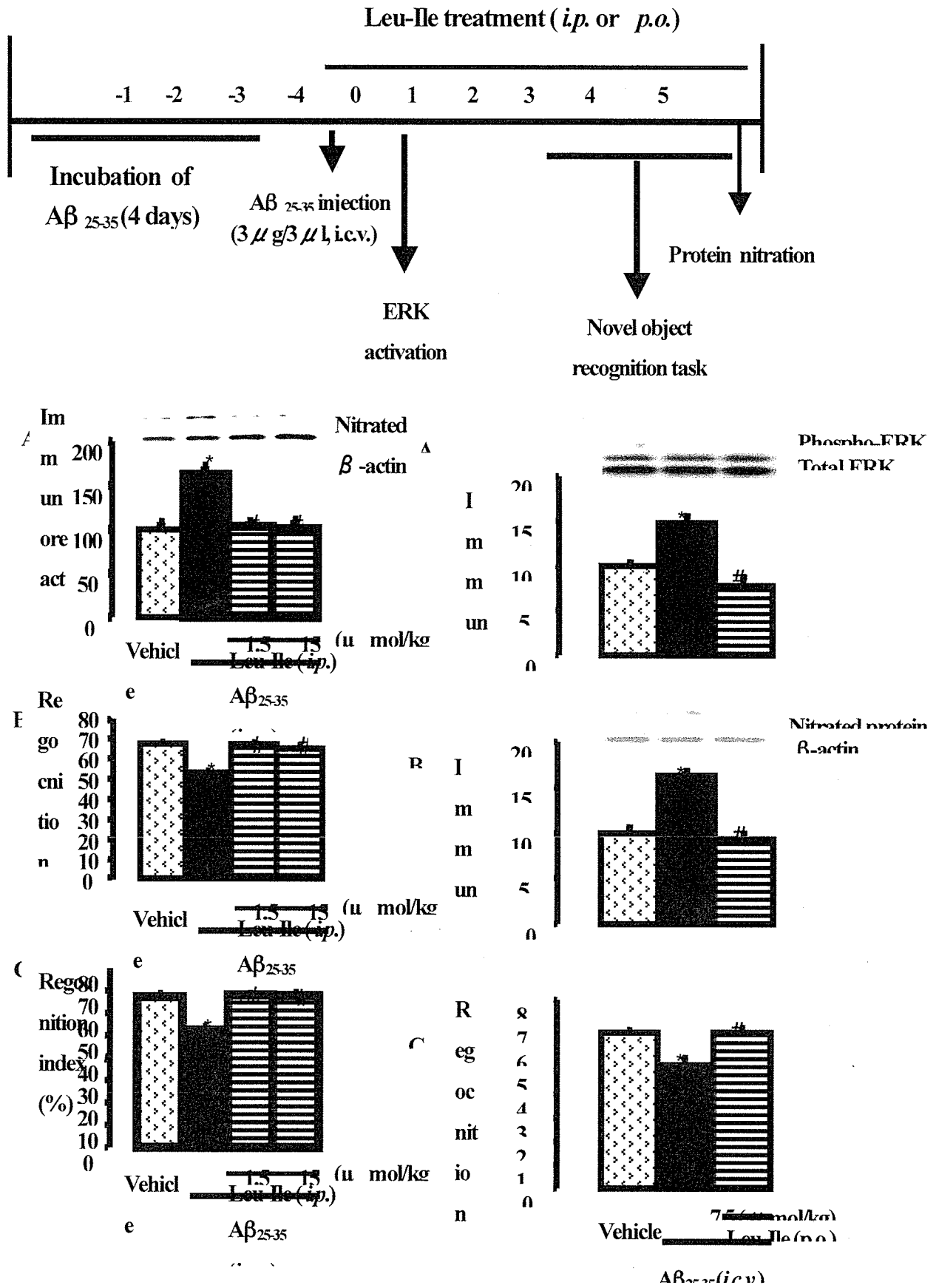


Fig. 3

(参考論文)

- Cen X., Nitta A., Ohya S., Zhao Y., Ozawa N., Mouri A., Ibi D., Wang L., Suzuki M., Saito K., Ito Y., Kawagoe T., Noda Y., Ito Y., Furukawa S., and Nabeshima T., An analogue of dipeptide-like structure of FK506 increases GDNF expression through CREB activated by Hsp90/Akt signaling pathway. *J. Neurosci.*, **26**: 3335-3344 (2006)
- Lin LF, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S, Collins F: GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science*, **260**: 1130-1132 (1993)
- Nitta A, Nishioka H, Fukumitsu H, Furukawa Y, Sugiura H, Shen L, Furukawa S: Hydrophobic dipeptide Leu-Ile protects against neuronal death by inducing brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor synthesis. *J Neurosci Res*, **78**: 250-258 (2004)
- Niwa, M., Nitta, A., Yamada, Y., Nakajima, A., Saito, K., Seishima, M., Shen, L., Noda, Y., Furukawa, S. and Nabeshima, T.: An inducer for glial cell line-derived neurotrophic factor and tumor necrosis factor- $\alpha$  protects against methamphetamine-induced rewarding effects and sensitization. *Biol. Psychiatry*, in press. a
- Niwa, M., Nitta, A., Yamada, Y., Nakajima, A., Saito, K., Seishima, M., Shen, L., Noda, Y. and Nabeshima, T.: Tumor necrosis factor- $\alpha$  and its inducer inhibit morphine-induced rewarding effects and sensitization. *Biol. Psychiatry*, in press. b
- Maurice T, Lockart BP, Private A. Amnesia induced by centrally administered A $\beta$  peptides involves cholinergic dysfunction. *Brain Res*, 1996; 706: 181-193.
- Tran MH, Yamada K, Nakajima A, Mizuno M, He J, Kamei H, Nabeshima T. Tyrosine nitration of a synaptic protein synaptophysin contributes to A $\beta$ -peptide-induced cholinergic dysfunction. *Mol Psychiatry*, 2003; 8: 407-412.
- Wang JM, Chao JR, Chen W, Kuo ML, Yen JJ, Yang-Yen HF: The antiapoptotic gene *mcl-1* is up-regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway through a transcription factor complex containing CREB. *Mol Cell Biol*, **197**: 6195-206 (1999)

F 研究発表

1. 論文発表

- Yan, Y., Nitta, A., Mizuno, T., Nakajima, A., Yamada, K. and Nabeshima, T.: Discriminative-stimulus effects of methamphetamine and morphine in rats are attenuated by cAMP-related compounds. *Behav. Brain Res.*, 173, 39-46 (2006)
- Kuno, R., Yoshida, Y., Nitta, A., Nabeshima, T., Wang, J., Sonobe, Y., Kawanokuchi, J., Takeuchi, H., Mizuno, T. and Suzumura, A.: The role of TNF-alpha

and its receptors in the production of NGF and GDNF by astrocytes. *Brain Res.*, 1116, 12-18 (2006)

Ishikawa, K., Nitta, A., Mizoguchi, H., Mohri, A., Murai, R., Miyamoto, Y., Noda, Y., Kitaichi, K., Yamada, K. and Nabeshima, T.: Effects of single and repeated administration of methamphetamine or morphine on neuroglycan C gene expression in the rat brain. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, 9, 407-415 (2006)

Yan, Y., Yamada, K., Nitta, A. and Nabeshima, T.: Transient drug-primed but persistent cue-induced reinstatement of extinguished methamphetamine-seeking behavior in mice. *Behav. Brain Res.*, 177, 261-268 (2007)

Mizoguchi, H., Yamada, K., Niwa, M., Mouri, A., Mizuno, T., Noda, Y., Nitta, A., Itohara, S., Banno, Y. and Nabeshima, T.: Reduction of methamphetamine-induced sensitization and reward in matrix metalloproteinase-2 and -9 deficient mice. *J. Neurochem.*, 100, 1579-1588 (2007)

Wang, D., Noda, Y., Zhou, Y., Nitta, A., Furukawa, H. and Nabeshima, T.: Synergistic effect of galantamine with risperidone on impairment of social interaction in phencyclidine-treated mice as a schizophrenic animal model. *Neuropharmacology*, 52, 1179-1187 (2007)

Niwa, M., Nitta, A., Shen, L., Noda, Y. and Nabeshima, T.: Involvement of glial cell-line derived neurotrophic factor inhibitory effects of a hydrophobic dipeptide Leu-Ile on morphine-induced sensitization and rewarding effects. *Behav. Brain Res.*, in press.

Alkam, T., Nitta, A., Mizoguchi, H., Itoh, A. and Nabeshima, T.: A natural scavenger of peroxynitrites, rosmarinic acid, protects against impairment of memory

induced by  $A\beta_{25-35}$ . *Behav. Brain Res.*, in press.

Murai, R., Noda, Y., Matsui, K., Kamei, H., Mouri, A., Matsuba, K., Nitta, A., Furukawa, H. and Nabeshima, T.: Hypofunctional glutamatergic neurotransmission in the prefrontal cortex is involved in the emotional deficit induced by repeated treatment with phencyclidine in mice: implications for abnormalities of glutamate release and NMDA-CaMKII signaling. *Behav. Brain Res.*, in press.

Niwa, M., Nitta, A., Yamada, Y., Nakajima, A., Saito, K., Seishima, M., Shen, L., Noda, Y., Furukawa, S. and Nabeshima, T.: An inducer for glial cell line-derived neurotrophic factor and tumor necrosis factor- $\alpha$  protects against methamphetamine-induced rewarding effects and sensitization. *Biol. Psychiatry*, in press.

Niwa, M., Nitta, A., Yamada, Y., Nakajima, A., Saito, K., Seishima, M., Shen, L., Noda, Y. and Nabeshima, T.: Tumor necrosis factor- $\alpha$  and its inducer inhibit morphine-induced rewarding effects and sensitization. *Biol. Psychiatry*, in press.

Yan, Y., Yamada, K., Niwa, M., Nagai, T., Nitta, A. and Nabeshima, T.: Enduring vulnerability to reinstatement of methamphetamine-seeking behavior in glial cell line-derived neurotrophic factor mutant mice. *FASEB J.*, in press.

Wang, D., Noda, Y., Zhou, Y., Mouri, A., Mizoguchi, H., Nitta, A., Chen, W. and Nabeshima, T.: The allosteric potentiation of nicotinic acetylcholine receptors by galantamine ameliorates the cognitive dysfunction in beta amyloid<sub>25-35</sub> i.c.v.-injected mice: involvement of dopaminergic systems. *Neuropsychopharmacology*, in press.

Yan, Y., Yamada, K., Mizoguchi, H., Noda, Y., Nagai, T., Nitta, A. and Nabeshima, T.: Reinforcing effects of morphine are reduced in tissue plasminogen activator (tPA)-knockout mice.  
Neuroscience, in press.

新田淳美, 鍋島俊隆: ニューロトロフィン.  
日本薬理学雑誌, 127, 503-505 (2006)

新田淳美: うつ病の病態生理と抗うつ薬の薬理の理解を深めるキーワード.  
薬局, 58, 369-373 (2007)

## 2. 学会発表

Alkam, T., Nitta, A., Mizoguchi, H., Saito, K., Seishima, M., Itoh, A. and Nabeshima, T.: TNF- $\alpha$  is required for protein nitration induced by A $\beta$ .  
6th annual meeting of the International College of Psychoneuropharmacology ; ICGP2006 (Hiroshima, Japan, October 3-6, 2006)

Niwa, M., Nitta, A., Yamada, Y., Saito, K., Seishima, M., Shen, L., Noda, Y. and Nabeshima, T.: An inducer for GDNF and TNF- $\alpha$  protects methamphetamine-induced rewarding effects and sensitization.  
36th Annual Meeting of Society for Neuroscience (Atlanta, U.S.A., October 14-18, 2006)

Maruyama, W., Nitta, A. and Naoi, M.: Rasagiline increases neuroprotective proteins in vitro and in vivo in limited concentration.  
36th Annual Meeting of Society for Neuroscience (Atlanta, U.S.A., October 14-18, 2006)

Nitta, A., Cen, X., Ohya, S., Mouri, A., Ibi, D., Noda, Y., Furukawa, S. and Nabeshima, T.: Neprilysin deficiency increases synapse-associated amyloid-beta oligomers and impairs hippocampal plasticity and cognitive

function.  
36th Annual Meeting of Society for Neuroscience (Atlanta, U.S.A., October 14-18, 2006)

新田淳美: 薬剤の適正使用を目指して - 遺伝子・動物・臨床研究すべての統合 - .  
第11回鶴舞公開セミナー (名古屋, 2006. 4. 20-21)

毛利彰宏, 野田幸裕, 新田淳美, 古川宏, 鍋島俊隆: 統合失調症モデル動物を用いた認知障害の分子機序の解明および抗精神病薬の効果.  
第4回21世紀COE若手研究フォーラム「名古屋大学発のブレイクスルーをめざして」(名古屋, 2006. 4. 28)

Yijin YAN, Atsumi NITTA, Kiyofumi YAMADA and Toshitaka NABESHIMA: Relapse of methamphetamine-seeking behavior in mice.  
第109回日本薬理学会近畿部会 (倉敷, 2006. 6. 16)

新田淳美, Xiabo CEN, 大谷晋, 小沢直哉, 野田幸裕, 古川昭栄, 鍋島俊隆: 疎水性ジペプチドLeu-IleのGDNF誘導作用メカニズム.  
第109回日本薬理学会近畿部会 (倉敷, 2006. 6. 16)

毛利彰宏, Li-Bo ZOU, 伊東亜紀雄, 新田淳美, 鍋島俊隆 (代表研究者), 野田幸裕, 岩田修永, 西道隆臣, 平松正行, 三輪将也, 鬼塚文子: 可塑的脳機能障害におけるニコチン性コリン作動性神経系の役割 (IV) - アミロイド $\beta$ タンパク分解酵素neprilysinによるラットの学習記憶能力およびニコチン受容体機能への影響 - .  
喫煙科学研究財団第21回平成17年度助成研究発表会 (東京, 2006. 7. 13)

新田淳美 (代表研究者), 鍋島俊隆, 本田裕之, 古川美子, 古川昭栄: タバコ煙およびタバコ葉成分中に含まれるカテコール骨格化合物の神経機能におよぼす影響 - 培養海馬神経細胞における4-メチルカテコールによる遺伝子発現変化: 発

現変化をうける遺伝子を基に - .  
喫煙科学研究財団第 21 回平成 17 年度助  
成研究発表会 (東京, 2006. 7. 13)

丹羽美苗, 新田淳美, 山田裕一郎, 斉藤  
邦明, 清島満, Liya SHEN, 野田幸裕, 鍋  
島俊隆: GDNF および TNF- $\alpha$  誘導剤はメタ  
ンフェタミン依存を抑制する - 覚せい剤  
依存症治療薬の開発を目指して - .  
第 17 回 21 世紀 COE プロGRESS レポート  
会議《神経再生・発生》(名古屋大学医学  
部 21 世紀 COE プログラム「神経疾患・腫  
瘍の統合分子医学の拠点形成」)(名古屋,  
2006. 7. 26)

村井里菜, 野田幸裕, 永井拓, 松井香奈  
枝, 亀井浩行, 新田淳美, 松葉和久, 鍋  
島俊隆: フェンシクリジン連続投与マウ  
スに認められる情動障害の発現過程にお  
ける神経 - グリア細胞の関与.  
第 12 回日本行動薬理研究会 (石川県羽咋  
郡, 2006. 9. 1-2)

松井香奈枝, 野田幸裕, 亀井浩行, 村井  
里菜, 毛利彰宏, 永井拓, 新田淳美, 松  
葉和久, 鍋島俊隆: フェンシクリジン連  
続投与マウスに認められる情動障害の発  
現過程における前頭前皮質 NMDA-CaMK II  
伝達系の関与.  
第 12 回日本行動薬理研究会 (石川県羽咋  
郡, 2006. 9. 1-2)

溝口博之, 山田清文, 丹羽美苗, 毛利彰  
宏, 野田幸裕, 新田淳美, 糸原重美, 坂  
野喜子, 鍋島俊隆: メタンフェタミン連  
続投与による異常行動とマトリクスメタ  
ロプロテアーゼの生理活性変化.  
第 12 回日本行動薬理研究会 (石川県羽咋  
郡, 2006. 9. 1-2)

Tursun ALKAM, Atsumi NITTA, Hiroyuki  
MIZOGUCHI, Kuniaki SAITO, Mitsuru  
SEISHIMA, Akio ITOH and Toshitaka  
NABESHIMA: A $\beta$  impairs memory in mice via  
tumor necrosis factor- $\alpha$ .  
第 12 回日本行動薬理研究会 (石川県羽咋  
郡, 2006. 9. 1-2)

Yijin YAN, Kiyofumi YAMADA, Minae NIWA,  
Atsumi NITTA, Toshitaka NABESHIMA:

Enduring vulnerability to reinstatement  
of methamphetamine-seeking behavior in  
GDNF mutant mice. (合同シンポジウム⑤  
「薬物依存形成の分子機構」)  
第 28 回日本生物学的精神医学会, 第 36  
回日本神経精神薬理学会, 第 49 回日本神  
経化学会大会合同年会 (名古屋,  
2006. 9. 14-16)

アルカムトルソン, 新田淳美, 溝口博之,  
斉藤邦明, 清島満, 伊藤亜紀雄, 鍋島俊  
隆: TNF- $\alpha$  is critically involved in the  
onset of A $\beta$ -induced memory impairment.  
(国際ミニシンポジウム③「認知症」)  
第 28 回日本生物学的精神医学会, 第 36  
回日本神経精神薬理学会, 第 49 回日本神  
経化学会大会合同年会 (名古屋,  
2006. 9. 14-16)

丸山和佳子, 新田淳美, 直井信:  
Rasagiline, a neuroprotective drug  
candidate, increases neurotrophic  
factors in vitro and in vivo.  
第 28 回日本生物学的精神医学会, 第 36  
回日本神経精神薬理学会, 第 49 回日本神  
経化学会大会合同年会 (名古屋,  
2006. 9. 14-16)

新田淳美, CEN Xiaobo, 大谷晋, 小沢直哉,  
丹羽美苗, 古川昭栄, 鍋島俊隆: Leu- I  
le increases GDNF through CREB activation  
by Hsp90/Akt signaling pathway.  
第 28 回日本生物学的精神医学会, 第 36  
回日本神経精神薬理学会, 第 49 回日本神  
経化学会大会合同年会 (名古屋,  
2006. 9. 14-16)

王大勇, 野田幸裕, 周園, 新田淳美, 鍋  
島俊隆: Role of Dopamine in synergistic  
effects of galantamine and risperidone on  
phencyclidine-treated mice.  
第 28 回日本生物学的精神医学会, 第 36  
回日本神経精神薬理学会, 第 49 回日本神  
経化学会大会合同年会 (名古屋,  
2006. 9. 14-16)

丹羽美苗, 新田淳美, 山田裕一郎, 斉藤  
邦明, 清島満, Liya SHEN, 野田幸裕, 鍋  
島俊隆: Involvement of GDNF and TNF- $\alpha$  in  
inhibitory effects of Leu- I le on

methamphetamine-induced dependence.  
第28回日本生物学的精神医学会, 第36回日本神経精神薬理学会, 第49回日本神経化学会大会合同年会 (名古屋, 2006. 9. 14-16)

毛利彰宏, 野田幸裕, 森瀬貴子, 江崎光剛, 新田淳美, 亀井浩行, 松葉和久, 鍋島俊隆: Involvement of glutamatergic-dopaminergic systems in MDMA-induced psychobehavioral deficits.

第28回日本生物学的精神医学会, 第36回日本神経精神薬理学会, 第49回日本神経化学会大会合同年会 (名古屋, 2006. 9. 14-16)

三輪将也, 田村洋明, 鍋島俊隆, 平松正行: Effects of nociceptin of  $\beta$ -amyloid peptide (25-35)-induced learning and memory impairment.  
第28回日本生物学的精神医学会, 第36回日本神経精神薬理学会, 第49回日本神経化学会大会合同年会 (名古屋, 2006. 9. 14-16)

丹羽美苗, 新田淳美, 鍋島俊隆: GDNF および TNF- $\alpha$  誘導剤のメタンフェタミン依存に対する抑制効果.  
第18回日本アルコール精神医学会・第9回ニコチン・薬物依存研究フォーラム平成18年度合同学術総会 (千葉, 2006. 9. 28-30)

新田淳美, 鍋島俊隆: 医学部生への薬剤業務実習の試み.  
第16回日本医療薬学会年会 (金沢, 2006. 9. 30-10. 1)

奥野友香, ZENG Nan, 丹羽美苗, 宮崎雅之, 野田幸裕, 新田淳美, 鍋島俊隆: ストレス誘発うつ病モデル動物におけるニコチン連続投与による抗うつ作用.  
第110回日本薬理学会近畿部会 (京都, 2006. 11. 10)

森瀬貴子, 野田幸裕, 毛利彰宏, 江崎光剛, 亀井浩行, 新田淳美, 松葉和久, 岩村樹憲, 鍋島俊隆: MDMA 連続投与マウスに認められる自発行動および認知行動障

害におけるミトコンドリアの関与.  
第110回日本薬理学会近畿部会 (京都, 2006. 11. 10)

新田淳美: ジペプチドによる神経保護作用と臨床応用の可能性.  
第26回基礎老化学会シンポジウム“食品による寿命制御の分子機構” (名古屋, 2006. 11. 11)

溝口博之, 山田清文, 丹羽美苗, 毛利彰宏, 野田幸裕, 新田淳美, 糸原重美, 坂野喜子, 鍋島俊隆: メタンフェタミン誘発性行動障害におけるマトリックスメタロプロテアーゼの動態変化.  
第17回マイクロダイアリシス研究会 (東京, 2006. 12. 2)

鍋島俊隆, 村井里菜, 新田淳美, 野田幸裕: 精神行動障害の発症過程における神経-グリア細胞の機能的役割.  
特定領域研究「グリア-ニューロン回路網による情報処理機構の解明」平成18年度成果報告会 (東京, 2007. 1. 11-12)

新田淳美, 古川昭栄, 鍋島俊隆: 疎水性ジペプチドによる神経栄養因子誘導と神経疾患治療薬への可能性. (シンポジウム⑧「中枢ニューロン死制御への若手研究者の挑戦」)  
日本薬学会第127年会 (富山, 2007. 3. 28-30)

## G 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

発明の名称: 脳内酸化抑制剤およびその使用

出願番号: 特願 2006-287639

出願日: 2006年10月23日

出願人: 国立大学法人名古屋大学

発明者: 新田淳美, 鍋島俊隆

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし



厚生労働科学研究費補助金  
(長寿科学総合研究事業)

分担研究報告書

神経保護薬による細胞死の制御：ミトコンドリアにおける結合タンパクの同定と  
作用機序

分担研究者 財) 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

## A 研究目的

老化に伴う認知機能の低下において主にコリン細胞の変性により記憶障害が惹起されると考えられている。しかし他の神経伝達物質、例えばドパミン、ノルアドレナリン等も意欲、感情、運動機能を介して総合的な認知能力に関与している。このため認知症の患者に置ける quality of life (QOL) の維持の為には、広く神経細胞の変性を防止または進行を遅延させる事が求められる。神経細胞の細胞死は老化に伴う酸化ストレスの増加、ミトコンドリア (Mit) の機能低下、神経栄養因子の欠如、興奮性アミノ酸による細胞毒性、また変性タンパクを除去するユビキチン-プロテアソーム系の活性低下により異常タンパクが蓄積することが原因とされる。神経細胞の細胞死はMitの細胞死シグナル機構により惹起される。Mit 膜透過性 (mitochondrial permeability transition, mPT) の亢進により mPT pore (MPTP) が開口し、cytochrome c 等の Apoptosis Inducing Factor (AIF) が細胞質に流出することで caspase が活性化されアポトーシスに至る。

我々は老化に伴う認知症における神経細胞の死を予防または遅延する薬物の研究を進めて来たが、Rasagiline, (-)Deprenyl (selegiline, FK) などの propargylamine 誘導体が細胞死機構を制御することで神経細胞を保護する結果を得た。さらに神経保護薬は直接 Mit の細胞死機構を制御することと、神経栄養因子等の細胞を保護するタンパクを誘導することにより神経細胞を保護することを報告した。Mit に対する機序として神経保護薬が

Mit 外膜に存在する A 型モノアミン酸化酵素 (monoamine oxidase, MAO-A) と結合し Mit 膜を安定化することにより、細胞死シグナルの活性化を阻止する事が明らかとなった。

認知症の大半をしめる Alzheimer disease (AD) においては Amyloid Precursor Protein (APP) から生成した  $\beta$ -amyloid が細胞死を誘発するとの Amyloid 仮説が提唱されている。昨年度はこの APP を過剰発現させた SH-SY5Y 細胞を用いたモデルにおいて、酸化ストレスに対する脆弱性が増加している事を報告した。神経細胞においては主に還元型グルチオン (Reduced glutathione, GSH) のレベルによって細胞内の酸化還元状態 (Redox state) が調節されている。此の APP 過剰発現モデルの研究においても細胞内の酸化還元状態が細胞の脆弱性を決定する事が示唆された。

本年度においては神経保護活性をもつ propargylamine 誘導体の MAO を介した細胞死シグナルの調節機序をさらに明らかとした。酸化ストレス、神経毒等によるアポトーシス細胞モデルをもちい、細胞の酸化還元状態により細胞死シグナルの活性化が調節されている事を明らかにした。Rasagiline, N-Propargylamine 等の神経保護薬はこの細胞内の酸化還元状態を安定化することにより、細胞死機構を制御する事を見いだした。この事から上記の酸化ストレス、Mit 機能障害、神経毒等が神経細胞に細胞死をもたらす共通の機序があり、これを制御する事で広く細胞保護出来る事が明らかとなった。今後更に細胞死の調節機序を解明し、新たな神経細胞保護薬を

開発するとともに、その保護活性マーカーと成りうる物質の発見を行う。

## B 研究方法

ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞を用い、以下の細胞死モデルにおける細胞死シグナルにたいする Propargylamine 神経保護薬の作用を検討した。

- 1) 内在性神経毒 *N*-methyl(*R*)salsolinol (MMSal)による A 型モノアミン酸化酵素 (MAO-A) を介したアポトーシス
- 2) Peripheral Benzodiazepine Receptor (PBR) を介するアポトーシス
- 3) MAO に存在する Imidazoline binding site (IBS) リガンドによる細胞死
- 4) ドパミンの自動酸化による生成する活性酸素種 (Reactive Oxygen Species, ROS) とドパミンキノン, ドパミンメラニンによる細胞死

細胞死は propidium iodide (PI)を用い FACS によりアポトーシスとネクローシスに分類して定量した。Calcein と Ethidium homodimer-1 を用いた Live/Death viability/Cytotoxicity Kit により細胞死を定量した。Mit 膜電位 $\Delta\Psi_m$ は Mito-Tracker Green と Orange, または 3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide [DiOC<sub>6</sub>(3)]と FACS を用い定量した。細胞内遊離 SH 基の定量は Measure-iT™ Thiol Assay Kit を用い蛍光法にて行った。ドパミンメラニンはドパミンの自動酸化により合成した。

## C 研究結果

### 1) MMSal による MAO-A を介した細胞死と神経保護薬の作用

MMSal は Mit 外膜に存在する MAO-A の活性部位に結合し 膜透過チャンネルである mPTP を開口し、AIF を Mit 外へ流出させ Caspase を活性化することによりアポトーシスを惹起した。MMSal によるアポトーシスは Bcl-2 の過剰発現と Cyclosporin A により阻止され、Voltage-dependent Anion Channel (VDAC), Adenine Nucleotide Translocator (ANT) により構成される mPTP を介している機序によった。此の細胞死シグナルの活性化に伴い Mit 内の遊離 SH 基 (遊離 GSH とタンパク SH 基) が減少した。神経保護活性を持つ Rasagiline は膜透過性の亢進による Mit 膜電位 (membrane potential,  $\Delta\Psi_m$ ) の低下と Mit の膨張を阻止し、その下流の細胞死シグナルの活性化を阻止した。此のとき SH 基の減少もまた阻止された。

### 2) PBR リガンドである PK11195, Protoporphyrin-IX (PP-IX) によるアポトーシスの機序と神経保護薬の作用

PK11195, PP-IX は Mit 外膜に存在する PBR に結合するが、MAO-A にも活性部位以外の部位で結合し活性を阻害する。SH-SY5Y 細胞は MAO-A のみを発現しているが、MAO の B 型 (MAO-B) を過剰発現させた細胞を作製し比較検討した。PP-IX は MAO-A の基質に対し非拮抗的に MAO-A 活性を阻害し阻害係数は 3.3  $\mu\text{M}$  で親和性が特に高かったが、他方 MAO-B には結合しなかった。更に PP-IX は低濃度でも MAO-A を発現している

SH-SY5Y 細胞の $\Delta\Psi_m$ を低下させ、AIFの流出と caspase の活性化を介してアポトーシスを起こした。しかし MAO-B の過剰発現した細胞では PP-IX にたいする感受性は増加しなかった。他の PBR リガンドである FGIN-1-27 は MAO-A, MAO-B を阻害せず、また細胞死も惹起しなかった。このことから PP-IX 等の PBR リガンドは MAO-A の基質結合部位とは異なる部位で結合し mPTP を開口することが示された。また Bcl-2 の過剰発現は細胞死を防ぎ、PBR リガンドによるアポトーシスは mPTP を介するものと考えられる。PP-IX は Mit の SH 基を著明に低下させた。Rasagiline は cytochrome c の Mit より細胞質への流出と SH 基の減少を防止した (図 1)。

### 3) MAO の Imidazoline binding site (IBS) を介した細胞死と Rasagiline による制御

MAO には生理活性が未だ不明な IBS domain があり IBS リガンドにより酵素活性が制御されているとの報告がある。今回 IBS リガンドによる MAO-A, MAO-B 活性への影響と細胞死への関与を検討した。Guanazenz, Harmine は MAO-A のみを、Idazoxan, Cirazoline は MAO-B より MAO-A をより低濃度で阻害した。また Amiloride は MAO-B のみを阻害した。阻害の形式はいずれも基質に対し非拮抗的であった。同時にこれらのリガンドは MAO-A, MAO-B 夫々を発現している細胞にアポトーシスを誘導したが、その細胞毒性は MAO-A, MAO-B に対する親和性と平行した。IBS リガンドとの結合により MAO-A の構造が変化し mPTP の構造と機能を変化させ開口状態とする。これを

Rasagiline, *N*-Propargylamine が阻止することで Mit 細胞死シグナルの活性化を止めていた。

### 4) ドパミンの酸化による細胞死に誘発と神経保護薬の作用

ドパミンは主に自動酸化により superoxide ( $O_2^{\cdot-}$ ) とドパミンキノンを生成する。後者は 1 水素還元を受け、細胞毒性の高いセミキノン体となる。ドパミンの濃度に依存してアポトーシスまたはネクローシスが誘発される。Mit 呼吸鎖酵素系の Complex I と III タンパクがドパミンセミキノンにより quinoprotein 化し ATP 産生機能が低下することでネクローシスが誘導された。ドパミンの酸化による細胞死は Bcl-2 の過剰発現と Cyclosporin A によつては阻止されず、VDAC, ANT に依存しない機序によることが明らかになった。しかし cytochrome c の流出と caspase の活性化は認められ、mPTP が他の機序により開口する事が示唆された。Mit 内の SH 基はドパミンにより反応時間と濃度依存的に減少し、タンパクに結合している SH 基と遊離 GSH が共に減少していた。さらに caspase 3 の活性化は細胞内酸化還元状態により決定され、アポトーシスに至る事を見いだした。GSH と選択的に結合する Allicin 誘導体の結果からも GSH の減少による細胞内酸化還元状態が mPTP の開口を制御することが明らかとなった。一方神経保護薬はドパミンとドパミンメラニンによる SH 基の減少を阻止しアポトーシスを減少させた。

### D. 結論

1) アポトーシスにおいて細胞内の GSH レベルにより調節される酸化還元状態が mPT に関与することが証明された。

2) Caspase 3 の活性化には細胞内が一定の還元状態であることが必須であった。

3) 神経保護薬は Mit の酸化還元状態を安定化することで、広く細胞死シグナルの活性化を阻止している。

4) Propargylamine 誘導体の標的タンパクの一つが MAO-A であり、mPTP の制御により広く多彩な原因により誘導される細胞死に

おいて保護活性を示す。

5) MAO が細胞内酸化還元状態を直接調節する機序は未だ解明されていない。

従来我々はアポトーシスシグナルの制御から神経細胞を保護することを検討してきた。ミトコンドリアにおける膜透過性が細胞内酸化還元状態により調節された今回の結果から、Redox state を制御することで広く神経細胞を保護することが可能となるであろう。

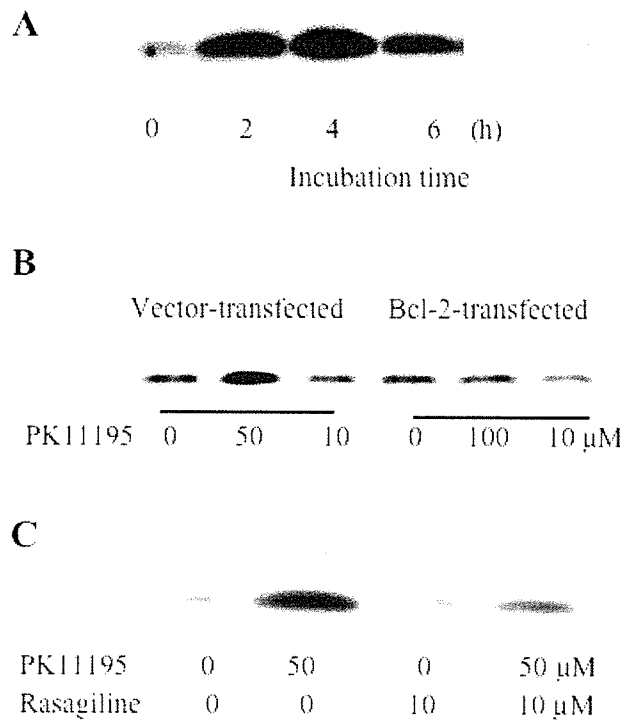


図 1。PBR リガンド PK11195 による cytochrome c の Mit からの流出と Rasagiline による抑制。 A: 反応時間に依存した cytochrome c の流出。 B. Bcl-2 過剰発現による cytochrome c 流出の阻害。 C: Rasagiline による cytochrome c 流出の防止。

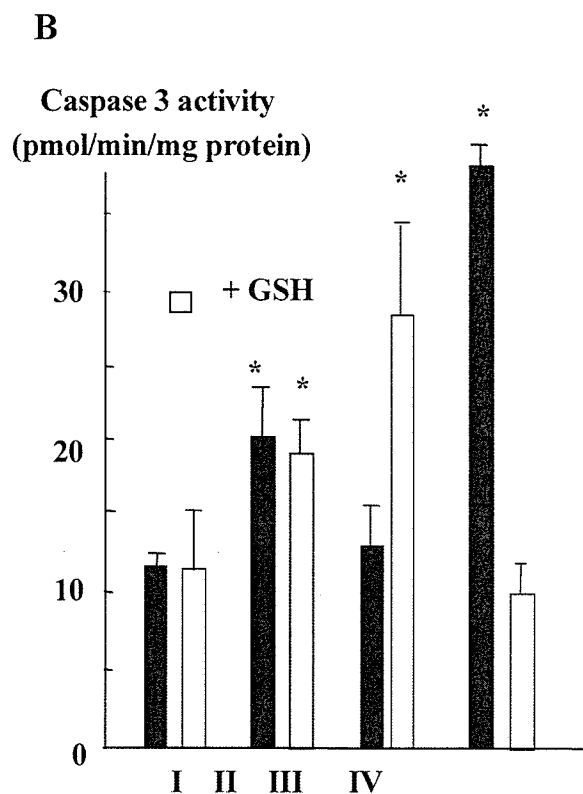
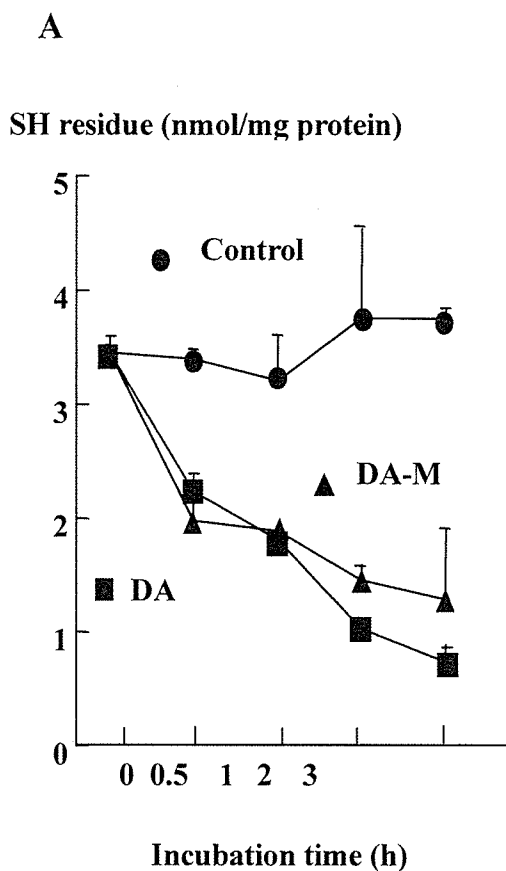


図 2。ドパミンとドパミンメラニンによるミトコンドリア SH 基の減少と Caspase-3 の活性化。A: SH-SY5Y 細胞から調製したミトコンドリアを 100  $\mu$ M ドパミン、10  $\mu$ g/ml のドパミンメラニンと 37°C で反応し、遊離 SH 基を測定した B: SH-SY5Y 細胞をヒトニューロメラニン (II, 10  $\mu$ g/ml), ドパミンメラニン (II $\mu$ g/ml), ドパミン (IV, 100  $\mu$ M) と 37°C、6 時間反応後 Caspase-3 活性を測定した。I, 対照。1 mM GSH の添加によりドパミンメラニンでは caspase 3 活性の増加、ドパミンでは低下が認められた。

## 論文発表

- 1) Naoi M, Maruyama W, Akao Y, Yi H, Yamaoka Y. (2006) Involvement of type A monoamine oxidase in neurodegeneration: regulation of mitochondrial signaling leading to cell death or neuroprotection. *J Neural Transm Suppl* 71: 67-77.
- 2) Naoi M, Maruyama W, Yi H, Akao Y, Yamaoka Y, Shamoto-Nagai M. (2007) Neuroprotection by propargylamines in Parkinson's disease; intracellular mechanism underlying the anti-apoptotic function and search for clinical markers. *J Neural Transm* 2007, in pres.
- 3) 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.
- 4) Yi H, Maruyama W, Akao Y, Takahashi T, Iwasa K, Youdim MB, 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.
- 5) Matsumoto K, Akao Y, Yi H, 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* 113(2): 125-135.
- 6) Maruyama W, Shamoto-Nagai M, Akao Y, Riederer P, Naoi M. (2006) The effect of neuromelanin on the proteasome activity in human dopaminergic SH-SY5Y cells. *J Neural Transm Suppl* 70: 125-132.
- 7) 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           なし  
Neural Transm 113(5): 633-644.

## 2. 学会発表

- 1) Naoi M. Neuroprotection in neurodegenerative disorders: From cellular mechanism to preclinical trials. First Japanese German Workshop Research in Neurodegenerative diseases. March 23-25, 2006 Tübingen, Germany
- 2) Maruyama W. The mechanism underlying the selective cell death of dopamine neurons in Parkinson's disease. First Japanese German Workshop Research in Neurodegenerative diseases. March 23-25, 2006 Tübingen, Germany
- 3) Maruyama W, Nitta A, Naoi M. Rasagiline, a neuroprotective drug candidate, increases neurotrophic factors in vitro and in vivo. 第49回 日本神経化学大会、J 2006年9月14日-16日、名古屋

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

厚生労働科学研究費補助金  
(長寿科学総合研究事業)

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案する目的で、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遷移現象 (mitochondria membrane permeability transition: MPT) と軸索変性を呈するヒト遺伝性の神経変性疾患のマウスモデル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) 運動神経変性疾患モデルマウスであり、その発症に MPT の関与が示唆されている *mnd2* マウスを用い、疾患発症における MPT の関与の検討、(3) 以前に虚血性細胞死に関与する因子として  $Ca^{2+}$ -independent phospholipase A2 (iPLA2 $\beta$ ) を同定したが、今回、iPLA2 $\beta$ 欠損マウスの作製し、解析を行った。

その結果、以下のような成果を得た。(1) Cyclophilin D と相互作用する分子の存在を確認した。(2) MPT の関与が示唆されていたマウス運動神経変性疾患モデル MND2 マウスとの掛合わせを行い検討したが、シクロフィリン D の疾患発症への有意な関与は見出せなかった。(3) iPLA2 $\beta$ 欠損マウスは軸索変性を伴う神経異常を呈することが明らかになった。最近、ヒトの神経変性を伴う遺伝病である INAD (infantile neuroaxonal dystrophy) や NBIA (Neuroaxonal degeneration with brain ion accumulation) において、iPLA2 $\beta$ に変異が見出されるという報告が出されたことから、我々の作製した iPLA2 $\beta$ 欠損マウスは、INAD や NBIA のマウスモデルとなることが分かった。

## 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、①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疾患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、②MPT の関与が示唆されている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、以前に虚血性細胞死に関与する因子として同定した  $\text{Ca}^{2+}$ -independent phospholipase A2 (*iPLA2\beta*) を欠損するマウスを作製し解析を行った結果、*iPLA2\beta* 欠損マウスは軸索変性を伴う神経異常を呈することが明らかになったので、その詳細な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、Cyclophilin D に結合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、対照マウスと発症時期やその重度を比較する。

(3) *iPLA2\beta* 欠損マウスの神経病理解

析を行う。

動物を用いる実験は、全て大阪大学医学部の動物実験安全委員会の許可を得ている。動物愛護上の配慮からの審査基準は以下の通りである。(1) 代替手段がないこと (特定遺伝子 Cyclophilin D、*mnd2* や *iPLA2\beta* 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た。 $\text{Ca}^{2+}$ により MPT を誘導したマウス肝由来のミトコンドリアと未処理コントロールのミトコンドリアのライゼートをゲル濾過カラムにかけ、各フラクションを抗 Cyclophilin D 抗体によるウエスタンブロット解析を行った結果、未処理コントロールのミトコンドリアの場合は、Cyclophilin D はモノマーとして回収されたが、MPT を誘導した場合は、Cyclophilin D はモノマーに加え、分子量の大きなフラクションに回収された。このことは、MPT 処理により Cyclophilin D が他の因子と相互作用していることを示唆して

いる。今後、このフラクションの部分精製を通して相互作用因子の同定をはかる。

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、MPTの関与が示唆されている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<sup>-/-</sup>マウスを得た。これらのマウスとコントロールマウスを、疾患発症をモニターできる種々のパラメータ (体重、運動能力など) で比較検討したが、*mnd2* 疾患の発症時期やその程度に Cyclophilin D 欠損は有意な影響を与えなかった。

以前に虚血性細胞死に関与する因子として Ca<sup>2+</sup>-independent phospholipase A2 (iPLA2 $\beta$ ) を同定したが、その解析の延長上で今回、iPLA2 $\beta$ 欠損マウスの作製し解析を行った。その結果、以下のような予想外の成果が得られた。iPLA2 $\beta$ 欠損マウスは1年半くらいになると顕著な運動異常 (尾を持ってつり上げた時の後脚の交差やフットプリントの異常など) を呈するようになった。神経病理的な解析により、中枢神経系 (脳と脊髄) において公汎にスフェロイド (軸索腫大) と液胞形成を特徴とした神経異常が認められ、iPLA2 $\beta$ 欠損マウスにみら

れる運動異常は軸索変性が原因であると結論できた。最近、ヒトの神経変性を伴う遺伝病である INAD (infantile neuroaxonal dystrophy) や NBIA (Neuroaxonal degeneration with brain ion accumulation) において、iPLA2 $\beta$ に変異が見出されるという報告がなされたことから、我々の作製した iPLA2 $\beta$ 欠損マウスは、INAD や NBIA のマウスモデルとなることが分かった。INAD も中枢神経系でのスフェロイド (軸索腫大) と液胞形成を特徴としている。INAD はさらに小脳萎縮や脾臓での不明な異常細胞の蓄積が知られているが、これらの異常も、iPLA2 $\beta$ 欠損マウスにおいて観察された。

#### D. 考察

今回、我々は Cyclophilin D と相互作用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り、この観点からも 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。