

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

神経栄養因子産生促進物質 Leu-Ile の抗うつ作用について

分担研究者：名古屋大学大学院医学系研究科・医療薬学・医学部附属病院・薬剤部
准教授 副薬剤部長 新田淳美

研究協力者：日比陽子^{1、2}、山田清文¹、鍋島俊隆^{1、3、4}

¹名古屋大学大学院医学系研究科・医療薬学・医学部附属病院・薬剤部、²財団法人 長寿科学振興財団、³名城大学大学院薬学研究科臨床薬学専攻病態解析学コース薬品作用学教室、

⁴特定非営利活動法人 医薬品適正使用推進機構

[研究要旨]

アルツハイマー型認知症患者ではうつ様症状も観察されることが多く、この症状を緩和することが治療効果の促進および患者のQOLを高めることにもつながる。当研究室で神経保護薬として研究を進めているジペプチドLeu-Ileが様々な精神神経疾患に対する薬理効果を示すことからうつ様症状についても有効なのではないかと考え、今回Leu-Ileの抗うつ効果について検討した。強制水泳試験を2週間連続して行ったマウスは水泳時の無動時間が著しく延長しうつ様症状の誘導が確認されたが、毎水泳後にLeu-Ileを経口投与したマウスでは無動時間の延長が抑制されたことから、Leu-Ileが抗うつ作用を持つ可能性が示された。また、強制水泳によりマウス海馬歯状回で減少したBrdU陽性細胞数がLeu-Ile投与により回復し、BDNFの産生促進も見られたことから、BDNFを介した神経細胞増殖促進がLeu-Ileによる抗うつ作用のメカニズムに関与していると考えられる。

A. 研究目的

アルツハイマー型認知症患者では、うつ様症状も観察されることも多く、治療を困難にする一因となっている。うつ様症状の予防や改善を目的として、安全性の高い物質を、経口など容易に摂取できる形で供給することは社会への貢献度が高いと考えられる。Leu-Ile は培養神経細胞において神経栄養因子の産生を誘導し、神経保護作用を示すことが分かっており (Nitta et al. 2004)、これまでも様々な精神疾患に対して有効であることが示されている (Niwa et al 2007)。そこで、今回我々は Leu-Ile の抗うつ効果について検討した。

B. 研究方法

1. 実験動物

実験には、7週齢 ICR 雄性マウス (日本 SLC、静岡) を使用した。なお、本研究は名古屋大学医学部動物実験指針および Principles of Laboratory Animal Care (National Institutes of Health Publication 85-23, 1985) に基づいて行った。

2. 試薬

Leu-Ile は国産化学 (東京、日本) から購入した。BrdU 染色検出キットは Roche Applied Science (Mannheim Germany) から購入した。Total RNA 抽出キットは QIAGEN (東京、日本) から購入した。逆転写酵素および real time RT-PCR 試薬は invitrogen (Carlsbad CA, USA) から購入した。そ

の他の試薬は研究用特級グレードの物を使用した。

3. 強制水泳試験

25°Cの水を 15cm の水深で張った円筒形の水槽にマウスを投入し 6 分間の強制水泳を行い、後半 5 分間における無動時間を赤外線装置により測定した。本実験では 2 週間の連続強制水泳試験を用いて Leu-Ile の抗うつ作用について検討し、Leu-Ile は毎水泳後に経口ゾンデを用いて 0, 150 および 750mmol/kg を経口投与した。

4. 海馬における増殖細胞数の検討

2 週間の連続強制水泳および Leu-Ile 投与を行ったマウスについて最終投与日に BrdU 75mg/kg を 2 時間毎に 3 回腹腔内投与し、その 24 時間後に脳を固定した。固定脳の凍結後、30mm スライスを作成し抗 BrdU 抗体により染色した。そして主要な細胞新生部位として報告されている海馬歯状回について BrdU 取り込み細胞を数えた。

5. Real time RT-PCR

連続強制水泳および Leu-Ile の投与を 5 日間行ったマウスの海馬を採取し、total RNA を調整した。これを用いて cDNA を合成し、Real Time RT-PCR により BDNF の mRNA 量を測定した。Real time PCR の primer は forward 5' -GCAAACATGTCTAT GAGGGTTCG-3' reverse 5' -ACTCGCTAATACT GTCACACACG-3' FAM-TAMRA ラベル probe 5' -ACTCCGACCCTGCCCGCCGT-3' を用いた。

C. 研究結果

1. うつ様症状に対する Leu-Ile の効果

毎日 6 分間の強制水泳を 2 週間続けたところ、マウスの無動時間が著しく延長し、うつ様症状の誘導が観察された。一方、毎水泳後に Leu-Ile を経口投与した群では、1 週間目からコントロール動物に比べ無動時間の減少が見られた (Figure 1)。

2. Leu-Ile は海馬における細胞増殖を促進する

2 週間の強制水泳を行ったマウス海馬では、強制水泳をしていないマウスと比較して著しく BrdU 陽性細胞数が減少していたにも関わらず、強制水泳と共に Leu-Ile を投与したマウスでは、BrdU 陽性細胞の減少が抑制されていた (Figure 2)。

3. Leu-Ile は BDNF 産生を誘導する

細胞新生を回復させる要因のひとつとして、brain derived neurotrophic factor (BDNF) の関与が考えられた。連続強制水泳 5 日目の海馬における BDNF の mRNA 量を real Time RT-PCR により測定したところ、非ストレス群と差がなかったが、連続強制水泳と同時に Leu-Ile 投与を行ったマウスについて、海馬 BDNF mRNA 量が増大していた (Figure 3)。

D. 考察

強制水泳試験は、抗うつ薬のスクリーニングに汎用されている方法である。マウスを水槽に投入すると、直後は逃

れることを試みて泳ぐが、次第に無動状態となる (絶望の無動)。この無動時間の長短がうつ状態の指標となる。さらに強制水泳試験を連日行うことでうつ様症状が誘導 (無動時間の延長) されることが報告されている (Hitoshi et al 2007)。本実験においては毎日 6 分間の強制水泳を 2 週間続けることでうつ様症状を誘導し、Leu-Ile の影響を検討したところ、毎水泳後に Leu-Ile を経口投与した群では、1 週間目からコントロール動物に比べ無動時間の減少が観察された。Leu-Ile の慢性投与により自発行動量にコントロール動物との差異は観察されなかった (data not shown) ことより、Leu-Ile による無動時間の減少は、運動機能の亢進でなく、抗うつ様作用によるものであると考えられた。

次に、Leu-Ile が抗うつ様作用を示すメカニズムについて検討した。うつ病の患者は海馬が縮小していることが知られている (Czeh et al 2007)。海馬歯状回は脳において細胞増殖が盛んに起こる部位であることから、海馬における細胞のダメージや細胞増殖の抑制がその原因ではないかと考えられるが、詳細なメカニズムについての報告はなされていない。今回用いた連続強制水泳試験に類似した実験条件下のマウス歯状回で細胞増殖抑制が観察されていることから (Hitoshi et al 2007)、本研究でも Leu-Ile が海馬の細胞増殖に及ぼす影響について検討した。2 週間の連続強制水泳試験後およ

び Leu-Ile 投与の最終日に BrdU を腹腔内投与し、その 24 時間後に固定した脳のスライス of 海馬歯状回において BrdU を取り込んでいた細胞を増殖細胞として数えた。その結果、2 週間の強制水泳ストレスは海馬歯状回における BrdU 陽性細胞数を著しく減少させたが、Leu-Ile の投与はその減少を抑制していた (Figure 2)。

細胞新生を回復させる要因のひとつとして、brain derived neurotrophic factor (BDNF) の関与が考えられた。BDNF は神経栄養因子であり、細胞死の抑制や細胞増殖に重要な役割を持つ。うつ病患者や病態モデル動物脳では BDNF 量が低下していることが報告されており、モデルラットの脳内に BDNF を投与することによってうつ症状が改善されることが示されている (Shirayama et al 2002)。また、イミプラミンおよびアマンタジンなどの抗うつ薬はラット海馬において BDNF 産生を増大させることも報告されている (Rogoz et al 2007)。そこで Leu-Ile が BDNF 転写レベルに影響を及ぼすかどうか検討を行うために連続強制水泳および Leu-Ile の投与を 5 日間行ったマウスの海馬を採取し、real Time RT-PCR により BDNF の mRNA 量を測定したところ、連続強制水泳と同時に Leu-Ile 投与を行ったマウスにおいて海馬 BDNF mRNA 量が増大していた (Figure 3)。この増大は強制水泳および Leu-Ile の投与を 14 日間行ったマウスにおいても同様に認められたこと

から、Leu-Ile は継続的に BDNF の産生誘導をしていることが示唆された。

これらの結果から、Leu-Ile は海馬 BDNF 転写を促進することによって歯状回の細胞を保護し、強制水泳ストレスによる細胞新生抑制を阻害している可能性が考えられた。

E. 結論

以上の研究成果から、Leu-Ile は経口投与によって抗うつ様作用を示すことが明らかとなり、この作用には BDNF の産生誘導や細胞新生が関与していることが示唆された。Leu-Ile は食品に含まれていることから安全性が高いと考えられ、サプリメントとして日常的に摂取することでうつ症状が悪化する前に早期に回復させることが期待できるのではないかと考えている。

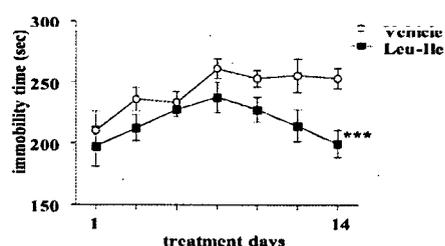


Figure 1. Leu-Ile inhibited the increase of immobility time. Mice swam 6min per day for 14days and Leu-Ile (750 μ mol/kg) p.o. treated after every swimming. Immobility time was measured in last 5min of swimming time. Values indicate the mean \pm SE (n=6). ***P<0.0001 vs vehicle

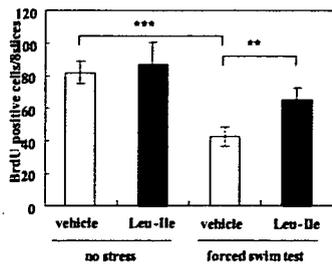


Figure 2. Effect of Leu-Ile treatment on BrdU uptake to the dentate gyrus After 2 weeks of chronic forced swim test and Leu-Ile (750 μ mol/kg) treatment. BrdU 75mg/kg was injected for 3 times every 2 hours. 24 hours later, brain was fixed by 4% paraformaldehyde and 30 mm-thick coronal brain sections were cut on a cryostat and mounted on slices. BrdU-positive cells in the dentate gyrus were detected by BrdU labeling and detection kit 2. Total number of BrdU-positive cells are expressed as the sum of the 8-slices. Values indicate the mean \pm SE (n=4). ***P<0.001 vs no stress control, **P<0.05 vs vehicle of forced swim test

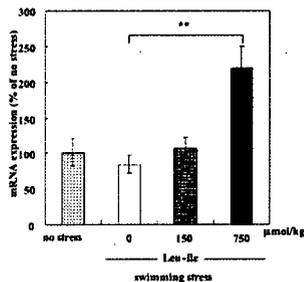


Figure 3. Leu-Ile induced BDNF transcription in hippocampus of stressed mice Total RNAs were prepared from hippocampus of chronic forced swim test and Leu-Ile p.o. treated mice for 5days. Values indicate the mean \pm SE (n=4). **P<0.01 vs 0 μ mol/kg

[参考文献]

Nitta, A, Nishioka, H, Fukumitsu, H, Furukawa, Y, Sugiura, H, Shen, L, and Furukawa, S: Hydrophobic dipeptide Leu-Ile proteins against neuronal death by inducing brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factors synthesis. *J. Neurosci. Res.* 78:250-258 (2004)

Niwa, M, Nitta, A, Shen, L, Noda, Y, and Nabeshima, T: Involvement of glial cell line-derived neurotrophic factor in inhibitory effects of a hydrophobic dipeptide Leu-Ile on morphine-induced sensitization and rewarding effects. *Behav. Brain Res.* 179 (2007) 167-171

Hitoshi, S, Maruta, N, Higashi, M, Kumar, A, Kato, N, and Ikenaka, K: Antidepressant drugs reverse the loss of adult neuronal stem cells following chronic stress. *J. Neurosci. Res.* 85: 3574-3585 (2007)

Czeh, B, and Lucassen, PJ: What causes the hippocampal volume decrease in depression? Are neurogenesis, glial changes and apoptosis implicated? *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 257: 250-260 (2007)

Shirayama, Y, Chen, ACH, Nakagawa, S, Russell, DS., and Duman, RS: Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. *J. Neurosci.* 22(8): 3251-3261 (2002)

Rogoz, Z, Skuza, G, Legutko B: Repeated co-treatment with

imipramine and amantadine induces hippocampal brain-derived neurotrophic factor gene expression in rats. *J. Physiol. Pharm.* 58: 219-234 (2007)

F. 研究発表

1. 論文発表

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.*, 179, 167-171 (2007)

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 β 25-35. *Behav. Brain Res.*, 180, 139-145 (2007)

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-CaMK II signaling. *Behav. Brain Res.*, 180, 152-160 (2007)

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- α protects against methamphetamine-induced rewarding effects and sensitization. *Biol. Psychiatry*, 61, 890-901 (2007)

Niwa, M., Nitta, A., Yamada, Y., Nakajima, A., Saito, K., Seishima, M., Noda, Y. and Nabeshima, T.: Tumor necrosis factor- α and its inducer inhibit morphine-induced rewarding effects and sensitization. *Biol. Psychiatry*, 62, 658-668 (2007)

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.*, 21, 1994-2004 (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)

Mizoguchi, H., Yamada, K., Mouri, A., Niwa, M., Mizuno, T., Noda, Y., Nitta, A., Itohara, S., Banno, Y. and Nabeshima, T.: Role of matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of MMP in methamphetamine-induced behavioral sensitization and Reward: implications for dopamine receptor down-regulation and

dopamine release. *J. Neurochem.*, 102, 1548-1560 (2007)

Niwa, M., Nitta, A., Mizoguchi, H., Ito, Y., Noda, Y., Nagai, T. and Nabeshima, T.: A novel molecule 'shati' is involved in methamphetamine-induced hyperlocomotion, sensitization, and conditioned place preference. *J. Neurosci.*, 27, 7604-7615 (2007)

Amioka, K., Kuzuya, T., Kushiara, H., Ejiri, M., Nitta, A. and Nabeshima, T.: Carvedilol increases ciclosporin bioavailability by inhibiting P-glycoprotein-mediated transport. *J. Pharm. Pharmacol.*, 59, 1383-1387 (2007)

Wang, D., Noda, Y., Tsunekawa, H., Zhou, Y., Miyazaki, M., Senzaki, K., Nitta, A. and Nabeshima, T.: Role of NMDA receptors in antidepressant-like effects of sigma receptor agonist SA-4503 in olfactory bulbectomized rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 322, 1305-1314 (2007)

Niwa, M., Nitta, A., Yamada, K. and Nabeshima, T.: The roles of glial cell line-derived neurotrophic factor, Tumor Necrosis Factor- α , and an inducer of these factors in drug dependence. *J. Pharmacol. Sci.*, 104, 116-121 (2007)

Mouri, A., Noda, Y., Noda, A., Nakamura, T., Tokura, T., Yura, Y., Nitta, A., Furukawa, H. and Nabeshima, T.: Involvement of a dysfunctional dopamine-D1/NMDA-NR1 and CaMK II pathway in the impairment of latent

learning in a model of schizophrenia induced by phencyclidine. *Mol. Pharmacol.*, 71, 1598-1609 (2007)

Wang, D., Noda, Y., Zhou, Y., Nitta, A., Furukawa H. and Nabeshima, T.: Synergistic effect of combined treatment with risperidone and galantamine on phencyclidine-induced impairment of latent visuospatial learning and memory: role of nAChR activation-dependent increase of dopamine D1 receptor-mediated neurotransmission. *Neuropharmacology*, 53, 379-389 (2007)

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 amyloid25-35 i.c.v.-injected mice: involvement of dopaminergic systems. *Neuropsychopharmacology*, 32, 1261-1271 (2007)

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*, 146, 50-59 (2007)

Cen, X., Nitta, A., Ibi, D., Zhao, Y., Niwa, M., Taguchi, K., Hamada, M., Ito, Y., Ito, Y., Wang, L. and Nabeshima, T.: Identification of piccolo as a regulator of behavioral plasticity and dopamine transporter internalization. *Mol.*

Psychiatry, in press.

Alkam, T., Nitta, A., Mizoguchi, H., Saito, K., Seshima, M., Itoh, A., Yamada, K. and Nabeshima, T.: Restraining tumor necrosis factor- α by thalidomide prevents the Abeta-induced impairment of recognition memory in mice. *Behav. Brain Res.*, in press.

Kawanokuchi, J., Shimizu, K., Nitta, A., Yamada, K., Mizuno, T., Takeuchi, H. and Suzumura, A.: Production and functions of IL-17 in microglia. *J. Neuroimmunol.*, in press.

2. 学会発表

Nitta, A., Cen, X., Niwa, M., Ohya, Y., Yamada, Y., Nakajima, A., Saito, K., Seishima, M., Shen, L., Suzuki, M., Saito, K., Noda, Y., Furukawa, S. and Nabeshima, T.: The blocking mechanisms of Leu-1 le against methamphetamine and morphine dependence in mice. 69th Annual Meeting of College on Problems of Drug Dependence (Quebec City, Canada, June 16-21, 2007)

Nabeshima, T., Niwa, M., Yamada, K., Saito, K., Seishima, M., Noda, Y. and Nitta, A.: Tumor necrosis factor- α and its inducer inhibit drug-induced dependence. 69th Annual Meeting of College on Problems of Drug Dependence (Quebec City, Canada, June 16-21, 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, but not cognitive impairment, in matrix metalloproteinase-2 and -9 deficient mice. 37th Annual Meeting of Society for Neuroscience (Neuroscience 2007), San Diego, California, U.S.A. (November 3-7, 2007)

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. 37th Annual Meeting of Society for Neuroscience (Neuroscience 2007), San Diego, California, U.S.A. (November 3-7, 2007)

Nitta, A., Ishikawa, K., Mizoguchi, H., Mouri, 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. 37th Annual Meeting of Society for Neuroscience (Neuroscience 2007), San Diego, California, U.S.A. (November 3-7, 2007)

Kushida, S., Hori, N., Kimoto, K., Nitta, A., Nabeshima, T. and Onozuka, M.: Changes of masticatory activity influenced the dopamine release levels in the hippocampus. 37th Annual Meeting of Society for Neuroscience (Neuroscience 2007), San Diego, California, U.S.A. (November 3-7, 2007)

Alkam, T., Nitta, A., Mizoguchi, H., Itoh, A. and Nabeshima, T.: A natural scavenger of peroxynitrite, rosmarinic acid, protects against impairment of memory induced by Abeta(25-35). 37th Annual Meeting of Society for Neuroscience (Neuroscience 2007), San Diego, California, U. S. A. (November 3-7, 2007)

Furukawa-Hibi, Y., Ito, Y., Matsumoto, M., Iemura, S.-I., Natsume, T., Watanabe, K., Nitta, A. and Motoyama, N.: Oxidative stress induces the FOXO activation by dephosphorylation. 37th Annual Meeting of Society for Neuroscience (Neuroscience 2007), San Diego, California, U. S. A. (November 3-7, 2007)

Niwa, M., Nitta, A., Yamada, Y., Saito, K., Seishima, M., Shen, L., Noda, Y. and Nabeshima, T.: Inhibitory effects of TNF- α and its inducer on morphine-induced rewarding effects and behavioral sensitization. 37th Annual Meeting of Society for Neuroscience (Neuroscience 2007), San Diego, California, U. S. A. (November 3-7, 2007)

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. 第111回日本薬理学会近畿部会 (名古屋, 2007.6.15)

Wang, D., Noda, Y., Nitta, A. and

Nabeshima, T.: Allosteric potentiation of nicotinic acetylcholine receptors by galantamine ameliorates the cognitive dysfunction in beta amyloid25-35 i. c. v.-injected mice: involvement of dopaminergic systems. 第111回日本薬理学会近畿部会 (名古屋, 2007.6.15)

新田淳美, 曾南, 毛利彰宏, 奥野友香, 丹羽美苗, 宮崎雅之, Li-Bo ZOU, 伊東亜紀雄, 鍋島俊隆, 野田幸裕, 岩田修永, 西道隆臣, 馬場章吾, 渡邊美菜子, 三輪将也, 鬼塚文子, 平松正行, 小島良二: 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 - うつ病およびアルツハイマー病モデル動物におけるニコチンの効果およびニコチン性アセチルコリン受容体の機能変化 -. 喫煙科学研究財団第22回平成18年度助成研究発表会 (東京, 2007.7.12)

新田淳美, 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 (II) - 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もとにして神経保護作用のある低分子化合物の開発 -. 喫煙科学研究財団第22回平成18年度助成研究発表会 (東京, 2007.7.12)

串田祥生, 堀紀雄, 木本克彦, 豊田實, 新田淳美, 鍋島俊隆, 小野塚実: 軟性食餌飼育がドパミン遊離量に及ぼす影響. (Effect of Semi-fluid diet breeding on the hippocampal dopamine release.) 第30回日本神経科学大会, 第50回日本神経化学学会大会, 第17回日本神経回路学会大会合同学会 (横浜, 2007.9.10-12)

Alkam, T., Nitta, A., Mizoguchi, H., Itoh, A., Nabeshima, T.: A natural scavenger of peroxynitrites, rosmarinic acid, protects against impairment of memory induced by Abeta (25-35). 第30回日本神経科学大会, 第50回日本神経化学会大会, 第17回日本神経回路学会大会合同学会 (横浜, 2007. 9. 10-12)

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42回日本アルコール・薬物医学会, 第19回日本アルコール精神医学会, 第10回ニコチン・薬物依存研究フォーラム平成19年度合同学術総会 (大津, 2007. 9. 28-29)

新田淳美, 奥野友香, 曾南, 丹羽美苗, 宮崎雅之, 野田幸裕, 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42回日本アルコール・薬物医学会, 第19回日本アルコール精神医学会, 第10回ニコチン・薬物依存研究フォーラム平成19年度合同学術総会 (大津, 2007. 9. 28-29)

宮川泰宏, 鍋島俊隆, 葛谷孝文, 新田淳美, 江尻将之: 整形外科領域の術後嘔気・嘔吐に対するメチルプレドニゾロンの予防効果. 第17回日本医療薬学会年会 (前橋, 2007. 9. 29-30)

新田淳美, 伊東亜紀雄, 村岡勲, 玉置紀子, 太田小織, 梅村雅之, 石川和宏, 鍋島俊隆: 薬剤部における医学部生の臨床実習について - 2年目を迎えて. 第17回日本医療薬学会年会 (前橋, 2007. 9. 29-30)

新田淳美, 古川昭栄, 山田清文, 鍋島俊隆: 疎水性ジペプチドによる神経栄

養因子誘導と精神・神経疾患治療薬への可能性. 第35回薬物活性シンポジウム (広島, 2007. 11. 29-30)

新田淳美: 覚せい剤依存モデルマウス脳から単離した2つの遺伝子について. 第27回21世紀COEプログレスレポート会議<神経疾患病態機能分子> (名古屋, 2007. 12. 12)

新田淳美, 日比陽子, 池田武史, 森下幸治, 山田清文, 鍋島俊隆: 神経栄養因子関連化合物の抗うつ作用について. 名城大学学術フロンティア推進事業「脳とこころの発達における神経科学的・心理学的アプローチ」第1回研究成果報告会 (名古屋, 2008. 1. 30)

新田淳美, 丹羽美苗, CEN Xiabo, 衣斐大祐, 日比陽子, 山田清文, 鍋島俊隆: 乱用薬物に共通の治療薬の開発ならびに新規標的遺伝子の検討. 厚生労働科学研究費補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)「乱用薬物による神経毒性・依存症に対する診断・予防及び治療法に関する研究」平成19年度研究成果報告会 (名古屋, 2008. 1. 31)

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許取得

1) 発明の名称: Akt 活性化剤
(2006年8月31日国際公開)
2007年8月7日国内移行 (特願2007-504648)

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) 発明の名称: 精神障害関連遺伝子及びその利用

(2006年9月8日国際公開)
2007年8月16日国内移行 (特願2007-505883)

2007年9月4日米国移行(番号未定)
出願人: 国立大学法人名古屋大学
発明者: 新田淳美, 丹羽美苗, 鍋島俊隆

3) 発明の名称: 脳内酸化抑制剤およびその使用

2007年10月23日国際出願
(PCT/JP2007/070628)

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

4) 発明の名称: 抗うつ・抗不安剤

2008年1月24日出願(特願

2008-013630)

出願人: 協和醗酵工業株式会社, 国立大学法人名古屋大学

発明者: 新田淳美, 日比陽子, 鍋島俊隆, 森下幸治, 池田武史

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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 propargylamine-結合タンパクの同定と酸化還元状態の調節を介した作用機序

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）

研究要旨：

我々は rasagiline, (-)deprenyl (selegiline,)等の propargylamine 誘導体が細胞死機構を制御することで老化に伴う神経細胞の死を予防または遅延する可能性を報告して来た。その機序はミトコンドリア(Mit)の細胞死機構を直接制御することと、神経栄養因子等の神経保護タンパクを誘導するによる。これら神経保護薬の標的タンパクを同定し神経保護シグナルの機構を明らかにすることを目的とし、Mit 外膜のモノアミン酸化酵素(MAO)をその候補として検討した。A型 MAO (MAO-A)のみが発現している SH-SY5Y 細胞で small interfering RNA (siRNA)を用い MAO-A の発現を抑制し、また B型 MAO (MAO-B)を過剰発現した細胞を用い、rasagiline により誘導される神経保護タンパク Bcl-2 の誘導と関連する転写因子の活性化を指標とした。siRNA により MAO-A タンパクの発現は 1/10 に減少し、rasagiline 濃度に依存する Bcl-2 発現の感度も 1/10 以下に低下した。MAO-B を強制発現した細胞では rasagiline による Bcl-2 タンパクの増加は認められなかった。rasagiline が Mit 外膜の MAO-A に結合し、上流の kinase, 転写因子を活性化し神経保護タンパクを増加することを示している。また従来提唱されていた MAO-B の神経保護への関与は否定された。此の結果から MAO-A との結合能を指標とした構造活性相関を検討し、新たな神経保護薬を開発する可能性が示された。

ヒト黒質から精製した Neuromelanin (NM)を用い検討したところ、Mit の酸化還元状態の変化を介し細胞死が誘導された。Rasagiline とカテキン、クルクミン等の抗酸化物質により、此の酸化還元状態は維持され NM による細胞死が抑制された。これらの結果から神経保護薬の新たな機序が明らかとなった。

A 研究目的

老化に伴う認知機能の低下は主にコリン細胞の変性によ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。このため認知症患者の quality of life (QOL)の維持の為に、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、興奮性アミノ酸の細胞毒性、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る異常タンパクの蓄積などが原因とされている。

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,) 等の 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。その機序が Mit 細胞死機構を直接制御することと、神経栄養因子等の細胞を保護するタンパクを誘導する為であることを報告してきた。これら propargylamine 神経保護薬が元々 Mit 外膜に存在する B 型のモノアミン酸化酵素 (monoamine oxidase, MAO-B)の基質と拮抗する阻害剤であったことから、MAO が神経保護薬の標的タンパクである事が示唆されていた。一方、我々は内在性神経毒 *N*-methyl(*R*)salsolinol による細胞死において、A 型 MAO (MAO-A)がこの神経毒の結合タンパクである事を証明した (6)。さらに MAO-A のみが発現して

いる培養神経細胞でも rasagiline による保護活性が認められたことから、従来 MAO-B との関連のみが注目されて来た propargylamine 誘導体による神経保護作用で、MAO-A が関与しているかを検討することとした。本年度においては MAO-A に対する small interfering RNA (siRNA)を用い MAO-A の発現を抑制した細胞モデルを作製、また MAO-B を過剰発現した細胞をも用い MAO-A, MAO-B の関与を検討した。propargylamine 誘導体で最も保護活性の高い rasagiline により誘導される神経保護タンパク Bcl-2 のレベルと関連する転写因子の活性化を指標とした。

またパーキンソン病ではニューロメラニン (neuromelanin, NM)を含有する黒質ドパミン細胞が選択的に変性する。この為ヒト黒質より調製した NM を用いた細胞死モデルを作成した。このモデルにおいて Mit の酸化還元状態、特に還元型/酸化型グルタチオン GSH/GSSG 間の平衡状態が細胞死の誘導に関与しているかを検討した。更に、propargylamine 誘導体や天然抗酸化物質 (カテキン、クルクミン等)がこの酸化還元状態の調節を介して保護活性を示すかを検討した。

B 研究方法

以下の遺伝子操作をした培養細胞等を用い、propargylamine 系の神経保護薬の作用を検討した。

- 1) MAO-A のみを発現しているヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞 (wild 細胞)、これに抗 MAO-A siRNA を投与し MAO-A の発現を減少させた si-MAO-A 細胞、MAO-B

を過剰に発現させた MAO-B 細胞、MAO-B のみを発現しているヒト大腸癌由来の Caco-2 細胞を用いた。

- 2) 神経保護活性を持つ Bcl-2 のタンパク、mRNA の発現量とその上流である転写因子の活性化を指標として保護活性を検討した。
- 3) ヒト黒質から調製したニューロメラニン (neuromelanin, NM) により惹起されるアポトーシスでの Mit 酸化還元状態の関与を検討した。

抗 MAO siRNA の細胞内導入は既報によった (6)。MAO の定量と Bcl-2 タンパクの rasagiline による誘導は Western 法によった。Calcein と Ethidium homodimer-1 を用い細胞死を定量した。細胞内遊離 SH 基の定量は Measure-it™ Thiol Assay Kit を用い蛍光法で、GSH、GSH の定量は enzyme-recycling による比色法で行った。また Mit の GSH 化タンパクの分析には Western 法と抗 GSH 抗体を用いた。

C 研究結果

- 1) siRNA による MAO-A 減少と神経保護薬 rasagiline による Bcl-2 発現への影響
siRNA 細胞では MAO-A タンパクは対照の約 1/10 に減少していた (図 1)。Bcl-2 タンパクは Rasagiline 濃度に依存し増加し、対照細胞では 1 nM で最大に増加したが、siRNA 細胞では 10 nM にピークが移行した。
- 2) MAO-B の rasagiline による Bcl-2 誘導への関与。

MAO-B を SH-SY5Y 細胞に強制発現した MAO-B 細胞で同様に rasagiline による Bcl-

2 タンパクの誘導を検討したが、図 2 に示す様に Bcl-2 タンパク量は変化しなかった。また MAO-B のみが発現している Caco 細胞でも rasagiline による誘導は認められなかった。

これらの結果は rasagiline が Mit 外膜の MAO-A に結合し、上流の kinase、転写因子を活性化し神経保護に関与するタンパクを増加し、保護活性を示していることを示唆している。また従来提唱されていた MAO-B の神経保護への関与はこれらの結果からは否定された。

- 3) Neuromelanin (NM) による Mit 酸化還元状態の攪乱を介した細胞死と神経保護薬の介入

細胞死モデルとしてヒト黒質から精製した NM を用いた細胞死を検討した。NM は SH-SY5Y 細胞にアポトーシスを惹起する。其の機序を検討した所、Mit タンパクのチステン SH 基と結合している GSH-タンパク複合体 (glutathinylated protein, Pr-S-SG) から GSH が遊離した為であった。此の時 NM により Mit 電子伝達系の Complex I の高次構造が解離した。この Mit の Pro-S-SG 結合体の形成と解離は GSH-GSSG 比で決定される酸化還元状態により調節されていた。此の酸化還元状態は rasagiline とカテキン、クルクミン等の抗酸化物質により調節され最終的に細胞死が抑制される事が明らかとなった。これらの結果から神経保護薬の新たな作用機序が見出された。

D. 結論

Propargylamine 誘導体の標的タンパク

は MAO-A であり、此の発現量が神経保護と関与する遺伝子発現を決定していた。一方 MAO-B の関与は証明出来なかった。

GSH レベルにより調節されるミトコンドリアの酸化還元状態がアポトーシスの惹起に関与し、タンパクに結合している GSH が電子伝達系の高次構造と更に機能を調節することが明らかとされた。

神経保護活性を示す抗酸化物質と rasagiline 等の propargylamine 剤がミトコンドリア酸化還元状態の調節を介して神経

細胞を保護していることを見いだした。

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。今回ミトコンドリア高次構造と機能が細胞内酸化還元状態により調節され GSH-タンパク複合体の形成と乖離することを証明した。このことから、Redox state を制御することで広く神経細胞を保護する可能性が示唆された。

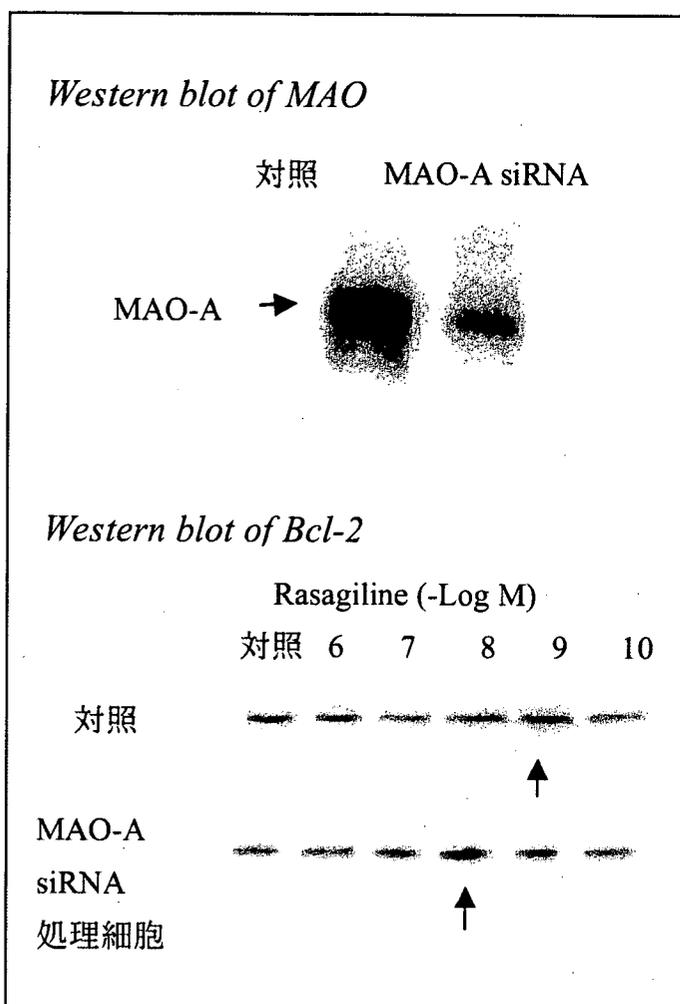


図 1。抗 MAO-A siRNA による MAO と rasagiline による Bcl-2 発現量の変化

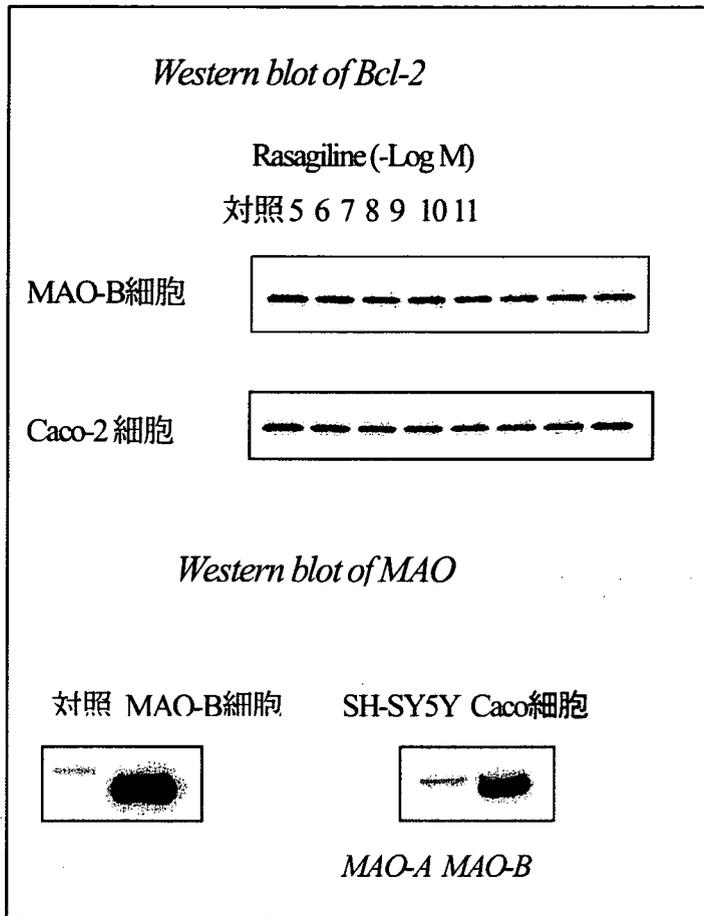


図 2。MAO-B 過剰発現 SH-SY5Y 細胞
と MAO-B のみを発現している Caco 細胞
における rasagiline による Bcl-2 発現。

論文発表

- 1) Naoi M, Maruyama W, Yi H, Yamaoka Y, Shamoto-Nagai M, Akao Y, Gerlach M, Tanaka M, Riederer P. (2008) Neuromelanin selectively induces apoptosis in dopaminergic SH-SY5Y cells by deglutathionylation in mitochondria: Involvement of the protein and melanin component. *J. Neurochem* in press.
- 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 Suppl.* 72: 121-131.
- 3) Miron T, Wilchek M, Sharp A, Nakagawa Y, Naoi M, Nozawa Y, Akako Y (2007) Allicin inhibits cell growth and induces apoptosis through the mitochondrial pathway in HL60 and U937 cells. *J Nutr Biochem* 2007 Dec 20.
- 4) Shamoto-Nagai M, Maruyama W, Hashizume Y, Yoshida M, Osawa T, Riederer P, Naoi M (2007) In parkinsonian substantia nigra, alpha-synuclein is modified by acrolein, a lipid-peroxidation products, and accumulates in the dopamine neurons with inhibition of proteasome activity. *J Neural Transm* 114(12) 1559-1567.
- 5) 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.
- 6) 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.

2. 学会発表

- 1) Naoi M, Maruyama W. "Mitochondria and survival and death of dopamine neurons" In: Dopamine 50 Year. May 30-June 2, 2007, Göteborg, Sweden
- 2) Naoi M. "Neuromelanin, a black box in Parkinson's disease" In "3/4 Phase-in-one's-life symposium for Peter Riederer: a life dedicated to Neuropsychiatry and its Pharmacotherapy" 27th April 2007, Würzburg, Germany
- 3) Maruyama w, Ando F, Nagai M, Naoi M, Osawa T. "Oxidation of fish oil-derived polyunsaturated fatty acid may initiate abnormal protein oligomerization and

neuronal death in Parkinson's disease”

In: International Conference on Food
Factors for Health Promotion.

November 27-December 1, 2007,

Kyoto, Japan

- 4) 直井信、丸山和佳子 「ニューロ
メラニンによる神経細胞死」 第
48回 日本神経学総会 20
07年5月16-18日、名古屋
- 5) 丸山和佳子、直井信 「B型モノア
ミン酸化酵素阻害剤、ラサジリ
ンによる神経保護作用の分子メ
カニズム」 第48回 日本神経
学総会 2007年5月16-1
8日、名古屋
- 6) 永井雅代、丸山和佳子、橋詰良夫、
Peter Riederer、直井信 「B老化
に伴う脂質過酸化はパーキンソ
ン病の発症に関与するか」 第80
回 日本生化学大会 2007年12
月11-15日 横浜

5

- G. 知的所有権の取得状況
 1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし

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分子メカニズムの解明と治療薬開発のストラテジ提案を目的として、また神経細胞保護薬の機能ターゲット解明への貢献として、哺乳動物細胞が持つ細胞死メカニズムの解析を行ってきた。本年度は特に、アポトーシスとネクローシスに關与することが示唆されているミトコンドリア膜透過性遷移現象 (mitochondria membrane permeability transition: MPT) 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) Cyclophilin D・阻害剤シクロスポリンA複合体の構造解析、(3) Cyclophilin D の生理機能を明らかにする目的で、Cyclophilin D 欠損マウスの解析などを行った。

その結果、以下のような成果を得た。(1) 酸化ストレスによる細胞死誘導時に特異的に Cyclophilin D と相互作用する複数の分子を確認した。(2) Cyclophilin D・シクロスポリンA複合体の結晶化およびその詳細な構造解析に成功した。(3) 行動解析の結果、Cyclophilin D 欠損マウスは、記憶障害や情動反応に異常を呈することが明らかになり、Cyclophilin D の生理機能の一つを明らかにすることが出来た。