

態となる(絶望の無動)。この無動時間の長短をうつ状態の指標としている。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)。前年度は、2週間の連日強制水泳試験により誘導したうつ様症状(無動時間の延長)が、毎水泳後のLeu-Ile投与により抑制することを見だしLeu-Ileが抗うつ様作用を持つことを示した(Figure 1)。

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 and Lucassen, 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。本研究でも、2週間の連日強制水泳試験および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の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週間の強制水泳試験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、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。うつ病患者やうつ様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日強制水泳および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、連日強制水泳試験のみを行ったLeu-Ile非投与群と比較して海馬BDNF mRNA量が増大していた(Figure 3)。この増大は連日強制水泳試験および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。興味深いことに、連日強制水泳試験を行わずにLeu-Ileの反復投与のみをしたマウスではBDNF mRNAの上昇は観察されなかった。次に、転写増大したBDNFのシグナルがBDNF受容体のTrkBシグナル伝達系を活性化させているかどうかを確認するために、このシグナル伝達系で活性化される因子であるAktおよびERKのリン酸化について検討した。すると連日強制水泳およびLeu-Ile投与を行ったマウスでは、連日強制水泳試験のみのLeu-Ile非投与群と比較してこれらのリン酸化が亢進しており、Leu-IleによりBDNF/TrkBシグナル伝達系が活性化していることが示された(Figure 4)。さらに、Leu-Ileの抗うつ様作用におけるBDNFの重要性を確認

するために、BDNF(+/-)マウスにおいて検討した。BDNF ホモノックアウトマウスは生後まもなく死亡するため、実験にはヘテロノックアウトマウスを使用した。このマウスは通常状態で海馬 BDNF mRNA 量が野生型の半分である (data not shown)。BDNF(+/-)マウスは、連日強制水泳によって野生型と同様に無動時間が増加した。一方、毎水泳後の Leu-Ile 投与により無動時間の短縮は見られず (Figure 5) 海馬における BDNF mRNA 量も増加しなかった (data not shown)。従って、Leu-Ile の抗うつ様効果には BDNF の転写上昇が必要であることが示唆された。

次に、Leu-Ile がアミノ酸に分解されて脳に移行し、抗うつ様効果を示している可能性の有無を明らかにするために、Leu と Ile を等量 (750 μ mol/kg/10mL) 混合したものを毎水泳後に投与し、効果を調べたところ、無動時間の短縮および BDNF mRNA の増大は見られなかったことから、Leu-Ile がジペプチドの状態で機能していることが示唆された (Figure 6)。

これらの結果から、Leu-Ile は海馬 BDNF 転写を促進し、TrkB シグナル伝達系の活性化を介した海馬歯状回の細胞の保護または増殖の促進をすることによって、強制水泳ストレスによる細胞新生抑制からの回復を誘導している可能性が考えられた (Figure 7)。しかしその作用機序には未だ不明な点も多く、さらなる追究が重要である。

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った (Figure 7)。Leu-Ile は BDNF の転写を促進し、BDNF / TrkB シグナル伝達系下流の ERK および Akt のリン酸化を促進する。この経路を介して海馬歯状回の細胞新生を促進し抗うつ様作用を発現しているのではないかと考えられる。また、Leu-Ile は、BDNF 誘導剤として他にも様々な神経変性疾患治療薬としての応用が期待できる。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出来る。これによってうつ様症状の悪化を抑制するのみならず、老化に伴う神経変性疾患においても治療効果をもたらすことが出来れば高齢者医療に多大な貢献が出来る。このジペプチドについて更なる薬効の検討が行われることを望んでいる。

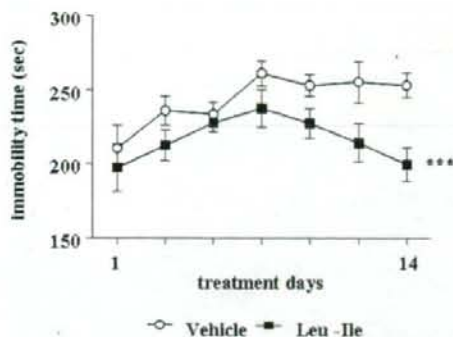


Figure 1. Leu-Ile inhibited the increase of immobility time induced by chronic forced swim test. Mice swam 6min per day for 14days and Leu-Ile (750 μ mol/kg) *p.o.* treated after daily swimming. Immobility time was measured in last 5min of swimming time. Values indicate the mean \pm SE (n=6). ***P<0.0001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

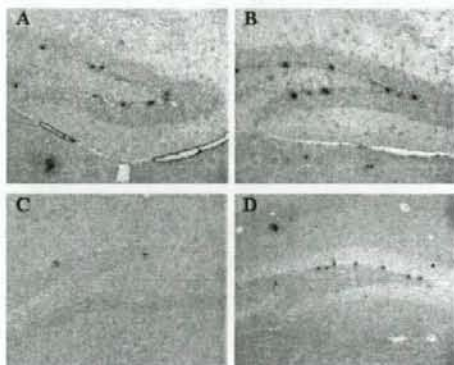


Figure 2. Effect of Leu-Ile treatment on BrdU uptake to the dentate gyrus. After 2 weeks of chronic forced swim test (C,D) and vehicle (A,C) or Leu-Ile (750 μ mol/kg) (B,D) treatment, BrdU 75mg/kg was injected for 3 times every 2 hours after the last swimming. Twenty-four hours later, brain was fixed by 4% paraformaldehyde and 30 μ m-thick coronal brain sections were cut on a cryostat and mounted on slides. BrdU-positive cells in the dentate gyrus were detected by BrdU labeling and detection kit 2. A and B are dentate gyrus of no swim mice.

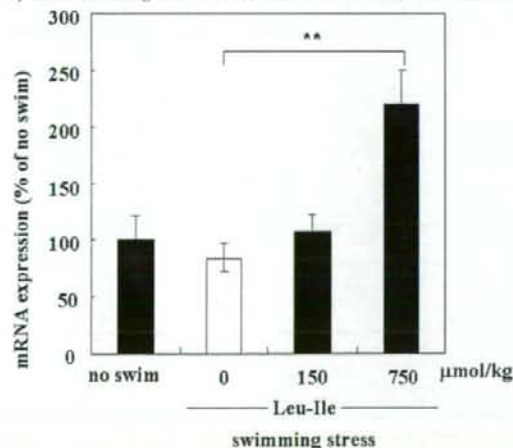


Figure 3. Leu-Ile induced BDNF transcription in the hippocampus of mice received 2-weeks of forced swimming test. Total RNAs were prepared from hippocampus of chronic forced swim test and Leu-Ile *p.o.* treated mice for 5days. Values indicate the mean \pm SE (n=4). **P<0.01 vs 0 μ mol/kg.

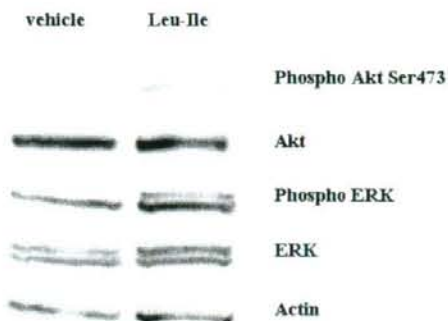


Figure 4. Leu-Ile induced phosphorylation of ERK and Akt in the hippocampus of stressed mice Cell lysate were prepared by RIPA buffer from hippocampus of chronic forced swim test and Leu-Ile *p.o.* treated mice for 5days.

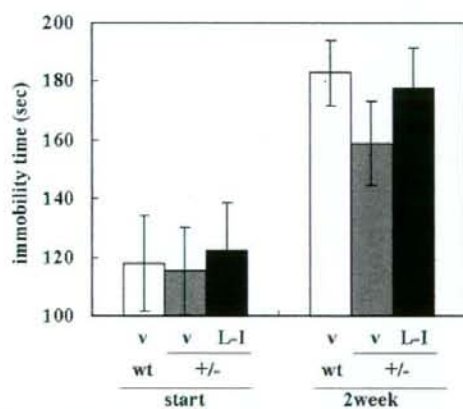


Figure 5. Leu-Ile did not inhibit the increase of immobility time of BDNF(+/-) mice. Mice swam 6min per day for 14days and Leu-Ile (750 μ mol/kg) *p.o.* treated after every swimming. Immobility time was measured in the last 5min of swimming time. Values indicate the mean \pm SE (n=6). ***P<0.0001 vs vehicle. V: vehicle, L: Leucine, I: Isoleucine

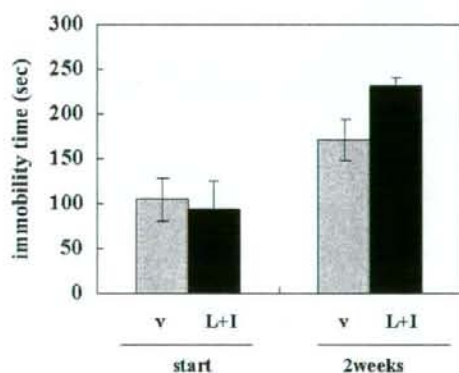


Figure 6. Mixture of Leucine and Isoleucine inhibited the increase of immobility time Mice swam 6min per day for 14days and mixture of Leucine and Isoleucine (750 μ mol/kg) *p.o.* treated after daily swimming. Immobility time was measured in the last 5min of swimming time. V: vehicle, L: Leucine, I: Isoleucine

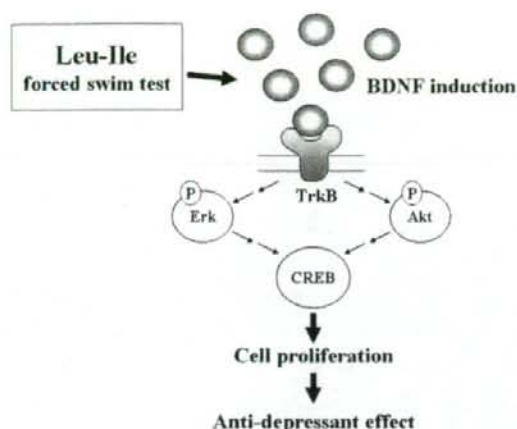


Figure 7 Schematic showing of pathways affected by Leu-Ile

[参考文献]

- Czeh B and Lucassen PJ (2007) What causes the hippocampal volume decrease in depression? Are neurogenesis, glial changes and apoptosis implicated? *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 257:250-260.
- Hitoshi S, Maruta N, Higashi M, Kumar A, Kato N and Ikenaka K (2007) Antidepressant drugs reverse the loss of adult neural stem cells following chronic stress. *J Neurosci Res* 85:3574-3585.
- Lin LF, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S and Collins F (1993) GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* 260:1130-1132.
- Nitta A, Nishioka H, Fukumitsu H, Furukawa Y, Sugiura H, Shen L and Furukawa S (2004) 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.
- Niwa M, Nitta A, Shen L, Noda Y and Nabeshima T (2007) 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* 179:167-171.
- Rogoz Z, Skuza G and Legutko B (2007) Repeated co-treatment with imipramine and amantadine induces hippocampal brain-derived neurotrophic factor gene expression in rats. *J Physiol Pharmacol* 58:219-234.
- Shirayama Y, Chen AC, Nakagawa S, Russell DS and Duman RS (2002) Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. *J Neurosci* 22:3251-3261.

F 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.*, 189, 100-106 (2008)
- 2) Niwa, M., Nitta, A., Cen, X., Kitaichi, K., Ozaki, N., Yamada, K. and Nabeshima, T.: A novel molecule 'shati' increases dopamine uptake via the induction of tumor necrosis factor- α in pheochromocytoma-12 cells. *J. Neurochem.*, 107, 1697-1708 (2008)
- 3) 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.*, 194, 54-61 (2008)
- 4) Alkam, T., Nitta, A., Mizoguchi, H., Itoh, A., Murai, R., Nagai, T., Yamada, K. and Nabeshima, T.: The extensive nitration of neurofilament light chain in the hippocampus is associated with the cognitive impairment induced by amyloid β in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 327, 137-147 (2008)
- 5) 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*, 13, 451-463 (2008)
- 6) Villard, V., Espallergues, U., Keller, E., Alkam, T., Nitta, A., Yamada, K., Nabeshima, T., Vamvakides, A. and Maurice, T.: Anti-amnesic and neuroprotective effects of the aminotetrahydrofuran derivative ANAVEX1-41 against amyloid β ₂₅₋₃₅-induced toxicity in mice. *Neuropsychopharmacology*, in press.
- 7) Nitta, A.: The state of drug dependence. In "Technology at a Glance 2007", Ed. by Nagoya University, Nagoya, Japan (2008)
- 8) 日比陽子, 新田淳美, 鍋島俊隆, 山田清文: 脳由来神経栄養因子およびグリア細胞由来神経栄養因子と神経精神疾患との関係. *日本神経精神薬理学雑誌* 29, 印刷中.
- 9) 新田淳美: 精神・神経変性疾患治療薬と精神疾患関連遺伝子の発見. *unite* 2008 (和文シーズ集), 名古屋大学編, 名古屋, 27-28 (2008)

2. 学会発表

- 1) 山田清文, Yijin YAN, 永井拓, 溝口博之, 新田淳美, 鍋島俊隆: 遺伝子変異マウスを用いた薬物依存モデルの行動解析. (シンポジウム「精神疾患とその病態モデル小動物の表現型解析」) 第55回日本実験動物学会総会, 第42回日本実験動物技術者協会総会合同大会 (日本実験動物科学技術2008) (仙台, 2008.5.15-17)
- 2) 丹羽美苗, 新田淳美, 溝口博之, 伊藤康友, 野田幸裕, 永井拓, 尾崎紀夫, 鍋島俊隆: メタンフェタミン依存関連分子 'Shati' の生理機能の解明. 第13回日本行動薬理研究会 (千葉, 2008.6.6)
- 3) 日比 (古川) 陽子, 新田淳美, 池田武

- 史, 森下幸治, 鍋島俊隆, 山田清文: ジペプチド Leu-Ile は強制水泳によって誘導されるうつ様症状を改善する. 第13回日本行動薬理研究会(千葉, 2008.6.6)
- 4) Tursun ALKAM, Atsumi NITTA, Hiroyuki MIZOGUCHI, Kuniaki SAITO, Mitsuru SESHIMA, Akio ITOH, Kiyofumi YAMADA, Toshitaka NABESHIMA: Restraining tumor necrosis factor-alpha by thalidomide prevents the Amyloid beta-induced impairment of recognition memory in mice. 第113回日本薬理学会近畿部会(岡山, 2008.6.20)
- 5) 小原雅美, 山下直也, 内田穰, ALKAM Tursun, 新田淳美, 中村史雄, 鍋島俊隆, 五嶋良郎: A β (25-35) 脳室内投与による記憶障害マウスにおけるリン酸化 CRMP2 の役割. 第31回日本神経科学大会(東京, 2008.7.9-11)
- 6) 丹羽美苗, 新田淳美, 溝口博之, 伊藤康友, 野田幸裕, 永井拓, 尾崎紀夫, 鍋島俊隆: メタンフェタミン依存における“shati”の生理機能の解明. 第31回日本神経科学大会(東京, 2008.7.9-11)
- 7) 宮川泰宏, 石黒陽子, 新田淳美, 石黒直樹, 山田清文: 閥節破壊の進んだ重症リウマチ患者におけるレミケードの効果. 医療薬学フォーラム2008(東京, 2008.7.12-13)
- 8) 新田淳美, CEN Xiaobo, 本田裕之, 鍋島俊隆, 古川美子, 古川昭栄: タバコ煙およびタバコ葉成分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のある遺伝子群をもととする神経保護剤の開発 -. 財団法人喫煙科学研究財団第23回平成19年度助成研究発表会(東京, 2008.7.24)
- 9) 鍋島俊隆, 間宮隆吉, 毛利彰宏, 野田幸裕, 新田淳美, 溝口博之: ニコチン性コリン受容体の細胞内情報伝達系を介する認知機能の調節機構. 財団法人喫煙科学研究財団第23回平成19年度助成研究発表会(東京, 2008.7.24)
- 10) 新田淳美: GDNF-AVVを用いたマウス薬物依存再燃に対する効果と新たに見出した分子“shati”の生理機能. (招待講演)自治医科大学内科学講座神経内科講演会(下野, 2008.9.4)
- 11) 新田淳美, 丹羽美苗, 山田裕一郎, 山田清文, 鍋島俊隆: グリア細胞株由来神経栄養因子および腫瘍壊死因子産生誘導を誘導するジペプチド Leu-Ile の薬物依存治療薬としての可能性. (シンポジウム2「慢性・難治性疾患治療を目指した最新のトランスレーショナル・リサーチ」)生体機能と創薬シンポジウム2008(東京, 2008.9.5-6)
- 12) 新田淳美: 新規タンパク血中濃度測定による精神疾患早期診断キットの開発. 第6回次世代医療システム産業化フォーラム2008(大阪, 2008.9.10)
- 13) 日比陽子, 新田淳美, 池田武史, 森下幸治, 鍋島俊隆, 山田清文: ジペプチド Leu-Ile は連続強制水泳によって誘導されるうつ様症状を抑制する. 第51回日本神経化学会(富山, 2008.9.11-13)
- 14) 新田淳美, Xiaobo CEN, 衣斐大祐, 丹羽美苗, 山田清文, 鍋島俊隆: ピッコロはメタンフェタミンによるドパミントランスポーターの内在化を抑制する. 第51回日本神経化学会(富山, 2008.9.11-13)
- 15) 丹羽美苗, 新田淳美, Xiaobo CEN, 尾崎紀夫, 鍋島俊隆: 新規機能分子“shati”はメタンフェタミン誘発ドパミン取り込み機能低下を抑制する. 第51回日本神経化学会(富山, 2008.9.11-13)

- 16) ALKAM Tursun, 新田淳美, 溝口博之, 伊東亜紀雄, 山田清文, 鍋島俊隆: A β 処置マウス海馬でのニューロフィラメント L が過剰にニトロ化されると認知障害が誘導される. 第 51 回日本神経化学会 (富山, 2008. 9. 11-13)
- 17) 石黒陽子, 宮川泰宏, 新田淳美, 山田清文: ベンゾジアゼピン系, 非ベンゾジアゼピン系薬物の術後せん妄に対する影響調査; Propensity Score を用いた解析. 第 18 回日本医療薬学会年会 (札幌, 2008. 9. 20-21)
- 18) Alkam, T., Nitta, A., Mizoguchi, H., Itoh, A., Murai, R., Nagai, T., Yamada, K. and Nabeshima, T.: The extensive nitration of neurofilament light chain in the hippocampus is associated with the cognitive impairment induced by amyloid β in mice. International Symposium on Brain Development and Neuropsychiatric Disorders (Nagoya, Japan, September 24, 2008)
- 19) Hibi, Y., Nitta, A., Ikeda, T., Morishita, K., Nabeshima, T. and Yamada, K.: Dipeptide Leu-Ile has an anti-depressant like effect in a chronic forced swim test. International Symposium on Brain Development and Neuropsychiatric Disorders (Nagoya, Japan, September 24, 2008)
- 20) Ibi, D., Nagai, T., Mizoguchi, H., Nitta, A., Takuma K. and Yamada, K.: Development of schizophrenia-like behaviors and susceptibility gene expression in a viral infection model during perinatal stage. International Symposium on Brain Development and Neuropsychiatric Disorders (Nagoya, Japan, September 24, 2008)
- 21) Niwa, M., Nitta, A., Cen, X., Ozaki, N. and Nabeshima, T.: Methamphetamine dependence-related molecule 'shati' increases dopamine uptake via the induction of tumor necrosis factor- α in PC-12 Cells. International Symposium on Brain Development and Neuropsychiatric Disorders (Nagoya, Japan, September 24, 2008)
- 22) 新田淳美, Xiabo CEN, 衣斐大祐, 日比陽子, 丹羽美苗, 伊藤友康, 山田清文, 鍋島俊隆: 覚せい剤精神病から単離・同定した piccolo 分子の生理機能について研究. 第 18 回日本臨床精神神経薬理学会・第 38 回日本神経精神薬理学会合同年会 (東京, 2008. 10. 1-3)
- 23) 日比 (古川) 陽子, 新田淳美, 池田武史, 森下幸治, 衣斐大祐, 鍋島俊隆, 山田清文: ジペプチド leu-Ile は連続強制水泳によるうつ様症状の誘導を抑制する. 第 18 回日本臨床精神神経薬理学会・第 38 回日本神経精神薬理学会合同年会 (東京, 2008. 10. 1-3)
- 24) 衣斐大祐, 永井拓, 溝口博之, 田熊一敞, 北原裕子, 小池宏幸, 日比 (古川) 陽子, 新田淳美, 米田幸雄, 山田清文: 周産期におけるウィルス感染が精神機能発達および統合失調症関連遺伝子発現に及ぼす影響. 第 18 回日本臨床精神神経薬理学会・第 38 回日本神経精神薬理学会合同年会 (東京, 2008. 10. 1-3)
- 25) 水上将典, 安田隆宏, 根本清光, 関本征史, 西川秋佳, 吉田緑, 日比 (古川) 陽子, 新田淳美, 山田清文, 出川雅邦: メタボリックシンドロームマーカーの候補である脳由来神経栄養因子のクロフィブレート誘発ラット肥大肝での遺伝子発現亢進. フォーラム 2008 衛生薬学・環境トキシコロジー (熊本, 2008. 10. 17-18)
- 26) 北原裕子, 永井拓, 衣斐大祐, 新田淳

- 美, 山田清文: 周産期における免疫応答異常が精神機能発達およびグルタミン酸作動性神経系に及ぼす影響. 第114回日本薬理学会近畿部会(神戸, 2008.11.14)
- 27) Niwa, M., Nitta, A., Mizoguchi, H., Itoh, Y., Noda, Y., Nagai, T., Ozaki, N. and Nabeshima, T.: A novel molecule "shati" inhibits methamphetamine-induced hyperlocomotion, sensitization, and conditioned place preference via tumor necrosis factor- α . 38th Annual Meeting of Society for Neuroscience (Neuroscience 2008) (Washington, D. C., U. S. A., November 15-19, 2008)
- 28) Alkam, T., Nitta, A., Mizoguchi, H., Itoh, A., Yamada, K. and Nabeshima, T.: The extensive nitration of neurofilament light chain in the hippocampus contributes to the cognitive impairment in mice. 38th Annual Meeting of Society for Neuroscience (Neuroscience 2008) (Washington, D. C., U. S. A., November 15-19, 2008)
- 29) 新田淳美: 精神障害関連遺伝子及びその利用. 名古屋大学医学・バイオ系特許フェア (名古屋, 2008.11.21)
- 30) 新田淳美, 日比陽子, 劉文亭, 山田清文, 鍋島俊隆: 脳神経発達過程におけるピッコロ C2A ドメインの過剰発現が成長後の社会性行動などに及ぼす影響. 第13回神経科学領域における分子モニタリングシンポジウム (第1部: 第2回学術フロンティア推進事業研究報告会) (名古屋, 2009.1.9-10)
- 31) 山田清文, Jaesuk YUN, 衣斐大祐, 日比陽子, 新田淳美, 永井拓: 長期隔離飼育および覚せい剤による脳特異的転写調節因子 Npas4 の発現変化. 第13回神経科学領域における分子モニタリングシンポジウム (第1部: 第2回学術フロンティア推進事業研究報告会) (名古屋, 2009.1.9-10)
- 32) Nitta, A.: Two novel genes-related neuronal degeneration and psychiatric disease. The Next Generation Japanese Technology Showcase (New York, NY, U. S. A., January 14, 2009)
- 33) Yun, J., Nagai, T., Hibi, Y., Koike, H., Nitta, A. and Yamada, K.: Methamphetamine-induced increase in the expression of neuronal PAS domain 4 (NPAS4): a potential role in synaptic plasticity. 1st Global COE International Symposium "Signaling of Cancer Cell" (Nagoya, Japan, January 23, 2009)
- 34) Ibi, D., Nagai, T., Kitahara, Y., Mizoguchi, H., Nitta, A. and Yamada, K.: Development of behavioral and neurochemical abnormalities and the changes in the expression level of schizophrenia-related genes in a perinatal viral infection model. 1st Global COE International Symposium "Signaling of Cancer Cell" (Nagoya, Japan, January 23, 2009)
- 35) Ibi, D., Nagai, T., Nitta, A., Sawa, A. and Yamada, K.: A novel neurodevelopmental mouse model of schizophrenia with gene-environment interactions. NAGOYA グローバルリトリート (愛知県知多郡, 2009.2.20-21)
- 36) Yun, J., Nagai, T., Hibi, Y., Koike, H., Nitta, A. and Yamada, K.: Methamphetamine-induced increase in the expression of neuronal PAS domain 4 (NPAS4): a potential role in synaptic plasticity. NAGOYA グローバルリトリート (愛知県知多郡, 2009.2.20-21)
- 37) 日比陽子, 新田淳美, 池田武史, 森下

- 幸治, 山田清文, 鍋島俊隆: ジペプチド Leu-Ile の抗うつ様効果. NAGOYA グローバルリトリート(愛知県知多郡, 2009. 2. 20-21)
- 38) 山崎太, 安田公夫, 土屋照雄, 新田淳美, 吉村知哲, 岡安伸二: ラウンドテーブルディスカッション「薬剤師の医療マネジメント教育に求めること」岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科特別講演会「医療専門職のための医療マネジメント教育発展のために」(岐阜, 2009. 2. 21)
- 39) 衣斐大祐, 永井拓, 溝口博之, 北原裕子, 小池宏幸, 新田淳美, 米田幸雄, 澤明, 鍋島俊隆, 山田清文: 新生児期 polyI:C 投与がドミナントネガティブ型 DISC1 トランスジェニックマウスの情動・認知機能に及ぼす影響. 第82回日本薬理学会年会(横浜, 2009. 3. 16-18)
- 40) 久保田亜希, 富田章裕, 満間綾子, 島田和之, 林亜希子, 仲井麻記, 柿本美彩子, 新田淳美, 葛谷孝文, 木下朝博, 直江知樹, 山田清文: R-CHOP パス入院における病棟薬剤師の役割～内服アドヒアランス向上を目指して～. 第7回日本臨床腫瘍学会学術集会(名古屋, 2009. 3. 20-21)
- 41) 日比(古川)陽子, 新田淳美, 池田武史, 森下幸治, 鍋島俊隆, 山田清文: ジペプチド Leu-Ile は抗うつ様効果を示す. 日本薬学会第129年会(京都, 2009. 3. 26-28)
- 42) 水上将典, 根本清光, 安田隆宏, 関本征史, 西川秋佳, 吉田緑, 日比(古川)陽子, 新田淳美, 山田清文, 下位香代子, 小林章夫, 出川雅邦: 薬剤誘発性ラット肥大肝と脳由来神経栄養因子遺伝子の発現亢進との関連性について. 日本薬学会第129年会(京都, 2009. 3. 26-28)
- G 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
- 1) 発明の名称: 脳内酸化抑制剤およびその使用
2008年5月2日国際公開
(W02008/050754A1)
出願人: 国立大学法人名古屋大学, 協和発酵バイオ株式会社(米国を除くすべての指定国), 新田淳美, 鍋島俊隆(米国のみ)
発明者: 新田淳美, 鍋島俊隆
- 2) 発明の名称: 抗うつ・抗不安剤
2009年1月23日国際出願
(PCT/JP2009/051027)
出願人: 協和発酵バイオ株式会社, 国立大学法人名古屋大学(米国を除くすべての指定国), 新田淳美, 日比陽子, 鍋島俊隆, 森下幸治, 池田武史(米国のみ)
発明者: 新田淳美, 日比陽子, 鍋島俊隆, 森下幸治, 池田武史
- 3) 発明の名称: 眼科用薬剤
2008年8月11日出願(特願2008-206491)
出願人: 株式会社ニデック, 国立大学法人名古屋大学
発明者: 中谷正義, 篠原結子, 平林美紀, 鈴森千智, 西村茂, 新田淳美, 日比陽子
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標的タンパクを介した遺伝子誘導

直井 信 （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

研究目的

老化に伴う認知機能の低下には主にアセチルコリン細胞の細胞死による記憶の傷害と、ドパミン、ノルアドレナリン等の他の神経系の機能低下が関与している。この為認知能力を維持する為には神経細胞を変性より保護し、残存する神経系の活動を活性化し、更に神経細胞を再生させる事が求められる。現在可能な予防法として神経細胞の保護と神経栄養因子による神経系の再構築がある。神経保護薬の開発には老化に伴う細胞死の機序を解明し、細胞死シグナルに介入することを求められる。また神経栄養因子は細胞死を抑制し、記憶の保持に必要なシナプスの再構築を促進する。しかし、神経栄養因子を脳内の特定の神経細胞に投与することは現在不可能であり、低分子で脳血管関門を通過可能な神経保護薬の開発が期待されている。

神経細胞死は現在プログラムされた細胞死と壊死により引き起こされる。

前者は更にアポトーシスとオートファジーに分類され、加齢による神経変性は主にアポトーシスによる。その機序としてミトコンドリアに依存する系と、細胞膜の受容体を介する系とがある。我々は培養細胞モデルを用い、ミトコンドリアの細胞死シグナルを活性化する内因性アポトーシスの機序を明らかとして来た。またB型モノアミン酸化酵素 (type B monoamine oxidase, MAO-B)の阻害剤がアポトーシスを抑制し神経保護活性を示すことを報告して来た。これらの研究から神経保護薬はミトコンドリアで細胞死機構に直接作用することと、間接的に細胞保護に関与する遺伝子の転写を促進する活性を持つ事を明らかにした。特に神経栄養因子である glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF), brain-derived neurotrophic factor, nerve growth factor 等が MAO-B 阻害剤で誘導されたことから、栄養因子の誘導を介した認知能力の改善を目指すことが期待

された。

これらの MAO-B 阻害剤で活性に必要な化学構造を検討した所、生体膜において立体構造を認識する受容体が存在する事が示唆された。このため今年度においては、神経保護活性の機序と構造活性相関を更に検討し、細胞保護薬の受容体を同定する事を目標とした。これらの結果から更に有効な神経保護薬を開発する事が最終の目的となる。

研究方法

A 型モノアミン酸化酵素 (MAO-A) のみを発現しているヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞から、MAO-A にたいする siRNA を用い MAO-A の発現を低下させた細胞 (siRNA-MAO-A 細胞)、Bcl-2 と MAO-B を夫々過剰に強制発現した細胞 (Bcl-2 細胞, MAO-B 細胞)を作成した。また比較の為、MAO-B のみを発現している Caco-2 細胞を用いた。

細胞死モデルとして以下の系を用い、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 [NM(*R*)Sal]によるアポトーシス
- 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

神経保護活性はミトコンドリアにより誘発される細胞死シグナルと細胞死の抑制と、神経保護機能を持つ Bcl-2 と神経栄養因子の発現を mRNA とタンパクのレベルで測定することで検討した。

神経保護活性薬として Rasagiline, (-)Deprenyl (selegiline) などの propargylamine 誘導体である不可逆的 MAO-B 阻害剤を用いた。また比較のために MAO-A の非可逆的阻害剤 clorgyline と可逆的阻害剤 belfoxatone の作用を検討した。

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、また 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'-dihexyloxycarbocyanine iodide [DiOC₆(3)]と FACS を用い定量した。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。

研究結果

- 1) ミトコンドリアに始まる内因性アポトーシスと神経保護の機序
細胞死シグナルはミトコンドリアの膜透過性の亢進 (mitochondrial

permeability transition, MPT)によりメガチャンネルが開口し、cytochrome c (Cyt c)、Apoptosis Inducing Factor (AIF)が細胞質に流出することで活性化する。細胞質では caspase が活性化され核の分断と凝縮と進行し、核と細胞膜で特徴的な形態の変化を示すアポトーシスに至る。現在このMPTに関与するチャンネルとして、内膜に存在する膜透過性チャンネル(permeability transition pore, PTP)と外膜に存在するミトコンドリアアポトーシス誘導チャンネル (mitochondrial apoptosis-induced channel, MAC)とがある。

PTP は外膜の voltage-dependent anion channel (VDAC)、内膜の adenine nucleotide translocator (ANT)とその他のタンパクにより構成される。この系の開口は Bcl-2 の過剰発現と ANT を阻害する cyclosporin A, bongkerkic acid により阻止される。また外膜に存在する MAO-A と PBR とが PTP の開口に関与している。我々は、SH-SY5Y 細胞、siRNA-MAO-A 細胞、MAO-B 細胞を用い MAO-A が内在性神経毒 NM(R)Sal の標的タンパクであることを証明した。PTP の開口によりミトコンドリアの膜電位 $\Delta\Psi_m$ の低下と膨張が起こり、膜間隙に存在する Cyt c, Endonuclease G, SMAC/Diablo が細胞質に流出する。また PBR のリガンドである PK11195 も PBR と結合しこの系により細胞死を惹起した。

MAC は Bcl-2 タンパクにより直接調節されている。従来細胞質に存在するアポトーシス誘導活性をしめす Bax, Bak が活性化されミトコンドリア膜に移動し重

合する事でチャンネルを形成する。MAC は Cyt c を選択的に膜間隙から細胞質に流出させる。この系でも細胞保護活性を持つ Bcl-2, Bcl-xL は Bax とヘテロダイマーを作り開口を阻止する。ドパミンの自動酸化により生成したスーパーオキシド O_2^- は p53, JNK 系を介して Bim を活性化し、Bax をミトコンドリアへの移行させ MAC を形成する。またドパミンメラニンもドパミンと同様に MAC を介し細胞死を惹起する。ANT の阻害剤は $\Delta\Psi_m$ の低下を阻止せず、内膜の ANT と独立した系 MAC を介しているが示唆された。

これら2系で rasagiline 等の MAO-B 阻害剤は共にアポトーシスを阻止した。しかし PPT 系では膜間隙を安定化して、 $\Delta\Psi_m$ の低下、ミトコンドリアの膨張を防ぎ、Bcl-2 の過剰発現と同様に、AIF 流出後の細胞死機構の活性化、即ちキャスプーの活性化、GAPDH の核内移行、核の分裂等を阻止した。一方 MAC の系では rasagiline は $\Delta\Psi_m$ の低下を阻止出来ず、Cyt c の流出より下流の細胞死機構を調節して細胞を保護している。

2) MAO-A を介した神経保護作用

神経保護活性が認められる MAO-B 阻害剤の構造には芳香族部分 (aminoindan, aliphatic ring)、MAO との結合部 (propargylamine)、その間の疎水部 (aliphatic chain)とがある。立体構造としては R 異性体が S 異性体より神経保護活性が遥かに高い。また propargylamine 部では末端の NH_2 が修飾されると神経保護活性を失う。これらのことから rasagiline,

selegiline 等の propargylamine 誘導体の立体構造を認識する機構が生体膜には存在する事が示唆された。また MAO-A しか発現していない SH-SY5Y 細胞で保護活性が認められ、MAO-B しか発現していない Caco-2 細胞では活性が認められなかった。一方 MAO-B の阻害活性を持たない propargylamine 誘導体と MAO-A の可逆的阻害剤 befloxatone でも Bcl-2 の誘導等の活性が認められた。これらの結果は MAO-B 以外に rasagiline, selegiline の結合部位があることを示している。

此の為 MAO-A を発現している SH-SY5Y 細胞で MAO-A に対する siRNA を用い MAO-A の発現を阻害した siRNA-MAO-A 細胞を作成し、rasagiline による Bcl-2 の誘導を検討した。MAO-A のタンパクと活性は有意に減少させ、rasagiline による Bcl-2 誘導に必要な濃度は 10 倍以上に増加した (図 1)。

また MAO-B を強制発現させた MAO-B 細胞モデルを作成し、MAO-A, MAO-B の関与を明らかにした。MAO-A が発現している SH-SY5Y 細胞では rasagiline は 1 nM~10 fM と 10 μ M の 2 相性に Bcl-2 を有意に増加した (図 2)。一方 MAO-B 細胞では rasagiline に対する反応性が低下し Bcl-2 の誘導は MAO 活性を阻害する高濃度でのみ認められた。また(-)deprenyl は MAO-A, MAO-B 共に 1 μ M~10 nM でのみ 1 相性に Bcl-2 を誘導した。rasagiline は MAO-A に親和性の高い結合部位を持ち抗アポトーシスタンパクを誘導するのに対し、MAO-B に対しては基質結合部位に結合するにも拘らず

低い誘導活性を示した。また非可逆性 MAO-A 阻害剤 befloxatone は rasagiline と同様の Bcl-2 誘導能を示したが、非可逆的阻害剤 clorgyline は細胞死を惹起した。

しかし MAO-A には Peripheral Benzodiazepine Receptor (PBR) リガンドの結合部位と Imidazoline binding site (IBS)等があることから、MAO-A の基質結合部位以外に rasagiline が結合する可能性がある。また MAO 以外にも semicarbazide-sensitive amine oxidase 等も可能性がる事から、rasagiline の結合タンパクの同定を更に検討する必要がある。

Rasagiline は核転写因子 NF- κ B を介して神経保護活性を持つ Bcl-2, GDNF の転写を増加する事が証明されている。しかし rasagiline が細胞膜上に受容体を活性化し、どの細胞内シグナル系を介して最終的に遺伝子産物を増加させているのかは今後の課題である。

結論

1) ミトコンドリアの膜透過の増加 (MPT) と細胞死シグナルの活性化は異なる 2 系のチャンネル PTT と MAC の形成による。Rasagiline (MPT) はこのチャンネルの系により異なった機序により MTP を制御する。

2) Rasagiline は上流のシグナルの如何に拘らず caspase 3 の活性化以下のアポトーシス機構を制御する。

3) Propargylamine 誘導体の標的タンパ

クの一つが MAO-A であり、MAO-B の関与は否定的である。

4) Propargylamine 誘導体以外の

MAO 阻害剤でも神経保護活性が認められ、更に広範なスクリーニングを行い強力な神経保護剤を開発出来ることが示唆された。

RasagilineのBcl-2誘導はMAO-Aを介する

siRNAによるMAO-Aの発現抑制はrasagilineに対する感受性を低下させる

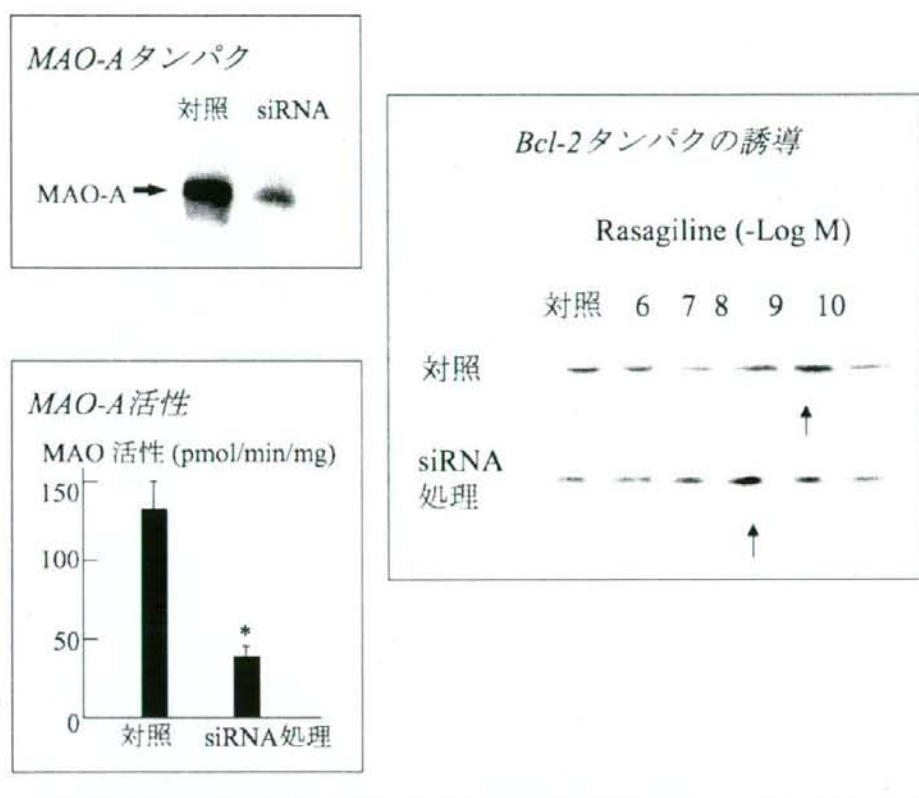


図 1。Rasagiline の遺伝子誘導機能に対する MAO-A 発現量の関与。SH-SY5Y 細胞を MAO-A に対する siRNA で処理し発現を減少させた細胞を作成し、rasagiline 濃度と誘導される抗アポトーシスタンパク Bcl-2 量との関連を検討した。siRNA 処理により MAO-A のタンパクと活性は有意に減少し、同時に Bcl-2 誘導に必要な rasagiline 濃度は増加した。

Rasagiline と (-)deprenyl による Bcl-2 誘導

MAOタンパク (Western blot)

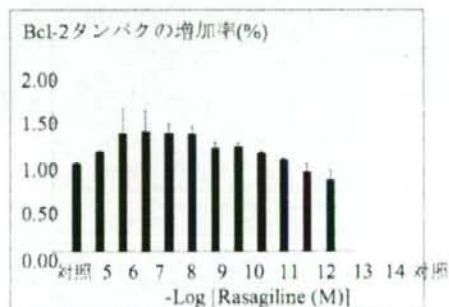
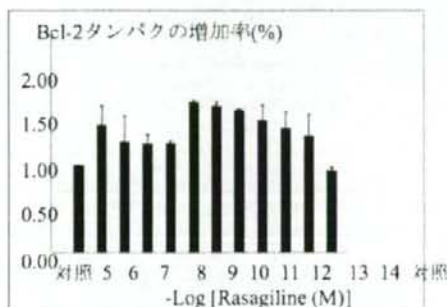
MAO-A MAO-B細胞



Rasagiline

(-)Deprenyl

MAO-A細胞



MAO-B細胞

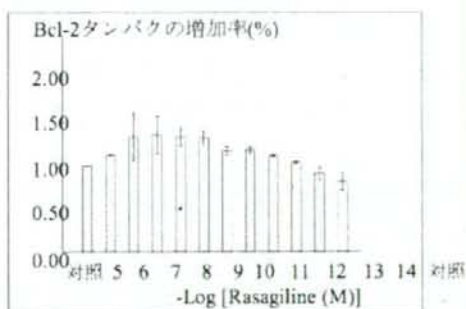
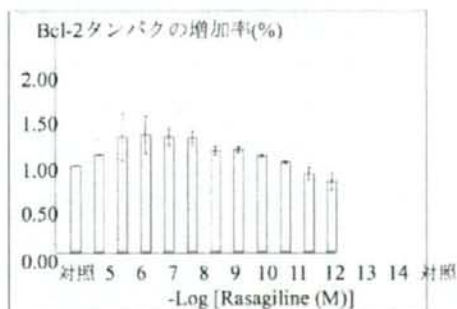


図 2。過剰発現した MAO-B の rasagiline による遺伝子誘導能への影響。

SH-SY5Y 細胞に MAO-B を過剰発現した細胞で rasagiline による Bcl-2 タンパク量の増加を検討した。Bcl-2 タンパクは Western 法で同定し、デンストメトリーで定量した。値は3回の実験での平均値と標準偏差。MAO-B の過剰な発現は Bcl-2 タンパク誘導を低下させる。

1.

2. 論文発表

- 1) Naoi M, Maruyama W. (2009) Functional mechanism of neuroprotection by inhibitors of type B monoamine oxidase in Parkinson's disease. *Expert Opinion Neuro-therapeutics*, in press.
- 2) Naoi M, Maruyama W, Yi H, Inaba K, Akao Y, Shamoto-Nagai M. (2009) Mitochondria in neurodegenerative disorders: a regulator for oxidative stress, neuronal death and regulator. *J Neural Transm*, in press.
- 3) 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* 105(6) 2489-2500.
- 4) Miron T, Wickek M, Sharp A, Nakagawa Y, Naoi M, Nozawa Y, Akao Y. (2008) Allicin inhibits cell growth and induces apoptosis through the mitochondrial pathway in HL60 and U937 cells. *J Nutr Biochem* 19(8) 524-535.
- 5) 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
- 6) 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 peroxide product and accumulates in the dopamine neurons with inhibition of protease activity. *J Neural Transm* 114(12) 1559-1567.
3. 直井信、丸山和佳子 (2009) 細胞内酸化還元状態と神経細胞死制御 「脳内老化制御とバイオマーカー」

2 学会発表

- 1) Naoi M, Maruyama W, Riederer
Cellular and animal models
of Parkinson's disease: A
novel role of neuromelanin
in degeneration of nigral
dopamine neurons and finding
of markers for
neuroprotection. XXVI
Colloquium International
Neuro- psychopharmacologium.
July 13-17, 2008 Munich,
Germany
- 2) Naoi M, Maruyama W,
Nagai-Shamoto M.
Neuromelanin induces
apoptosis through
deglutathionylation of
mitochondria. 第51回 日本
神経化学大会、2008年9月
11日-13日、富山
- 3) 永井雅代、丸山和佳子、日阪
真輔、直井信、大澤俊彦 老
化に伴う膜脂質過酸化はパー
キンソン病の発症に関与する
か(2) 第81回日本生化学会
大会 2008年12月9-12日 神
戸
- 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

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、アポトーシス時に起こるミトコドリア外膜透過性亢進のメカニズムと複数の細胞死機構に参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) に焦点を合わせた解析を行った。具体的には、(1) アポトーシス時のミトコドリア外膜透過性亢進を引き起こす Bcl-2 ファミリーメンバーの一つである Bax たんぱくの機能解析と (2) MPT に必須の分子である Cyclophilin D に結合する分子の探索、(3) Cyclophilin D の生理機能解明を目指した Cyclophilin D 欠損マウスの解析である。

その結果、以下のような成果を得た。(1) Bax のアポトーシス誘導活性の発揮に、ミトコンドリア外膜のたんぱくの一つである VDAC2 (voltage-dependent anion channel) が重要であることを明らかにした。(2) Cyclophilin D と相互作用する複数の分子を同定した。(3) 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を示してきたが、特に海馬での解析から、Cyclophilin D 欠損によりニューロトランスミッターの遊離が有意に抑制されていることを見出し、Cyclophilin D の神経細胞における生理機能の一つを明らかにした。