

—平成18年度 岐阜薬科大学特別研究費（奨励）—

プレコンディショニングによる神経細胞保護作用の分子機構の解明と 医薬品開発への応用

原 宏和

1. 緒言

中高年で発症頻度が増す虚血性神経障害やアルツハイマー病などの神経変性疾患の原因解明と治療法の開発は、高齢化を迎えた現代社会において人々が豊かな生活を送るための重要な課題である。神経細胞は、活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) などにより惹起される酸化ストレスに対して脆弱であり、上記疾患における神経機能障害の発症や進展には酸化ストレスが関与していると考えられている。亜鉛イオン (Zn^{2+}) は脳内に豊富に存在する金属イオンであり、メタロチオネインなどの金属結合タンパクに結合して細胞内に存在しているが、近年、虚血により神経細胞内でフリー Zn^{2+} が蓄積することが報告された¹⁾。虚血時に産生される ROS が、細胞内フリー Zn^{2+} の蓄積、それに続く神経細胞死に関与していると考えられており、酸化ストレスによる Zn^{2+} の恒常性の破綻と神経細胞死の関連が注目されている。

In vivo の実験から心臓や脳に対して致死的とならないストレス (軽い虚血など) を負荷させることで、その後の強いストレス (虚血、酸化ストレスなど) による細胞障害が軽減されることが報告されている²⁾。この現象はプレコンディショニング (preconditioning, PC) として知られており、軽い虚血などにより細胞のストレスに対する抵抗性が増したことで PC 作用が発現したと考えられているが、PC のメカニズムは完全には解明されていない。また、薬剤で神経細胞を処理することで、虚血による PC と同様の効果が認められることも報告されている³⁾。

アポモルフィン (Apo) はドパミン D_1/D_2 受容体アゴニストであり、欧米でパーキンソン病の治療薬として用いられている。一方で、Apo はラジカル消去作用を有しており、酸化ストレスにより惹起される神経細胞障害は Apo 共存下で抑制されることが報告されている^{4,5)}。また、我々は、Apo で細胞を前処理することで Apo の酸化ストレスによる細胞障害に対する保護作用がさらに増強されることから、Apo が酸化ストレスによる神経細胞障害に対して PC 作用を示すことを明らかにしている⁶⁾。本研究では、 Zn^{2+}

による惹起される神経細胞障害に対しても Apo が PC 作用を示すかどうかについて検討し、そのメカニズムについて解析を試みた。

2. 実験

神経細胞培養：ラット胎児 (E17) から大脳皮質を分離し、トリプシンで分散させた神経細胞をポリオルニチンでコートしたディッシュあるいは 24 穴プレートに播種した。2 日後にシトシンアラビノシドを加え、さらに 2 日間培養した後、B27 を含む *Neruobasal Medium* に置換し、2 日おきに培地交換を行った。DIV6-9 の神経細胞を実験に用いた。

細胞障害性の測定：24 穴プレートで培養した神経細胞 (DIV6-9) を種々の濃度の $ZnSO_4$ (minimal essential medium (MEM) で希釈) に 1 時間曝露した後、血清を含まない MEM に置換し、さらに 20 時間培養した。細胞障害性は乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) 活性を測定し評価した。Apo による前処理は、 $ZnSO_4$ を加える前に種々の濃度の Apo で 1 時間インキュベーションすることで行った。その後、Apo を含む培地を完全に除き、神経細胞に $ZnSO_4$ を曝露させた。

RT-PCR：培養神経細胞から総 RNA を抽出した後、cDNA を作製した。PCR は、94°C, 2 分, 1 サイクル; 94°C, 40 秒, 58°C, 40 秒, 72°C, 1 分, 32 サイクル (PUMA) または 30 サイクル (GAPDH) の条件で行った。プライマーとして、rat PUMA (sense: TCCTCAGCCCTCGCTGTCAC, antisense: CCATTCTGGGGCTCCAGGA)、rat GAPDH (sense: ACCA CAGTCCATGCCATCAC, antisense: TCCACCACCCTGTTG CTGTA) を用いた。

3. 結果・考察

Zn^{2+} による神経細胞障害の誘導：初代培養した神経細胞

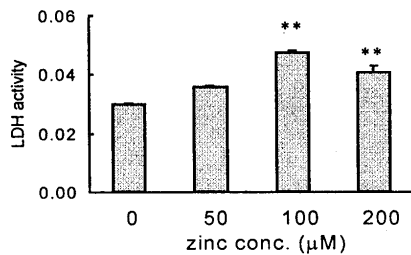


Fig.1 Zinc toxicity in cortical neurons. **, $P < 0.01$ (vs untreated neurons).

(DIV6-9) に種々の濃度の Zn^{2+} を 1 時間曝露させた後、20 時間後の神経細胞障害を測定した。その結果、図 1 に示すように、 Zn^{2+} 濃度依存的に神経細胞障害が認められた。

Zn^{2+} による神経細胞障害に対する Apo の保護効果：初代培養した神経細胞に種々の濃度の Apo を 1 時間作用させた。Apo を完全に除き、 Zn^{2+} を 1 時間曝露させた後、20 時間後の細胞障害を測定した。その結果、Fig.2A に示すように、Apo 濃度依存的に Zn^{2+} による神経細胞障害が抑制された。Apo で 2、4、8 時間前処理した時の Apo の保護作用についても検討したが、全ての処理時間において Apo は Zn^{2+} による神経細胞障害に対して保護作用を示した。

Apo の細胞保護作用に及ぼすドパミン受容体アンタゴニストの影響：Apo はドパミン受容体 D_1/D_2 のアゴニストであることから、 Zn^{2+} による神経細胞障害に対する Apo の保護作用がドパミン受容体を介したものであるかどうかをドパミン D_1 受容体アンタゴニストである SCH23390 と、

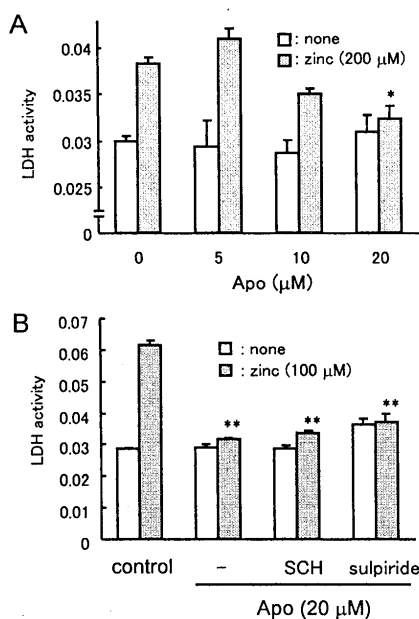


Fig.2 A, Effect of pretreatment with Apo on zinc-induced neurotoxicity. *, $P < 0.05$ (vs zinc alone). B, Effect of dopamine receptor antagonists on neuroprotection by Apo. SCH: SCH23390. **, $P < 0.01$ (vs zinc alone).

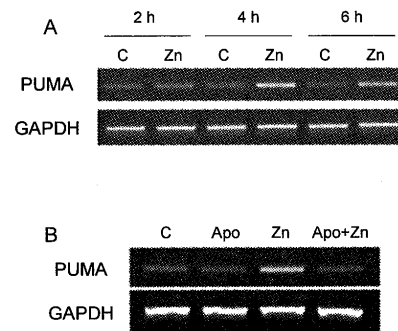


Fig.3 A, Induction of PUMA mRNA expression by zinc. B, Suppression of zinc-induced PUMA mRNA expression by Apo.

ドパミン D_2 受容体アンタゴニストであるスルピリドを用いて検討した。その結果、Fig.2B に示すように、これらのアンタゴニスト存在下でも Apo の保護作用は阻害されなかった。このことから、Apo の保護作用はドパミン受容体を介した作用ではないことが明らかとなった。

Zn^{2+} による BH3-only タンパク質発現誘導に対する Apo の影響：アポトーシスによる細胞死は、BH3-only タンパク質により促進されることが報告されている。 Zn^{2+} による神経細胞死に BH3-only タンパク質が関与しているかどうかを明らかにするため、BH3-only タンパク質の一つである PUMA の発現について RT-PCR 法を用いて検討した。その結果、Fig.3A に示すように、 Zn^{2+} により時間依存的に PUMA の発現が誘導されることが明らかとなった。この発現は、 Zn^{2+} 曝露後、4 時間後から認められた。今回の実験で Apo により Zn^{2+} による神経細胞死が抑制されたことから、Apo の前処理により Zn^{2+} による PUMA の発現誘導が抑制されるかどうかについて検討した。その結果、Fig.3B に示すように、 Zn^{2+} により亢進する PUMA の発現が、Apo の前処理により抑制されることが明らかとなった。現在、 Zn^{2+} による神経細胞障害に対する Apo の保護作用の分子機構や Zn^{2+} による BH3-only タンパク質の発現誘導機構について解析を進めている。

4. 引用文献

- 1) Aizenman E, Stout AK, Hartnett KA et al. (2000) *J Neurochem* **75**, 1878-1888.
- 2) Dirnagl U, Simon RP, Hallenbeck JM (2003) *Trends Neurosci* **26**, 248-254.
- 3) Hara H, Ohta M, Ohta K et al. (2003) *Mol Brain Res* **119**, 125-131.
- 4) Gassen M, Gross A, Youdim MB (1998) *Mov Disord* **13**, 242-248.
- 5) Hara H, Ohta M, Ohta K et al. (2003) *Redox Rep* **8**, 193-197.
- 6) Hara H, Ohta M, Adachi T (2006) *J Neurosci Res* **84**, 860-866.