

科学研究費補助金研究成果報告書

平成24年 5月14日現在

機関番号：15401
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20406005
 研究課題名（和文） 熱帯風土病パーキンソン病関連疾患の病因に基づく新規モデル動物を利用した治療薬開発
 研究課題名（英文） Drug development using novel animal model based on the pathogenesis of Parkinson's disease-related disorders
 研究代表者
 太田 茂 (OHTA SHIGERU)
 広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
 研究者番号：60160503

研究成果の概要（和文）：熱帯地域で摂取され、パーキンソン病関連疾患の環境因子としての可能性が考えられるトゲバンレイシ植物より、テトラヒドロイソキノリン（TIQ）誘導体を含む10数種類の物質の構造を決定した。これらの1種は、神経細胞においてプロテアソーム阻害に伴う不要タンパク質の蓄積、小胞体ストレス応答の亢進を惹起した。

研究成果の概要（英文）：We identified the structures of about 10 compounds in *Annona muricata*, which is a candidate for environmental factors involved in the pathogenesis of Parkinson's disease-related disorders. Among them, a tetrahydroisoquinoline derivative induced an abnormal accumulation of some proteins and endoplasmic reticulum stress.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2009年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2010年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
総計	12,400,000	3,720,000	16,120,000

研究分野：創薬化学

科研費の分科・細目：創薬化学

キーワード：熱帯風土病、パーキンソン病関連疾患、イソキノリンアルカロイド、P糖タンパク質

1. 研究開始当初の背景

カリブ諸島グアドループにおいて、地域特異的なパーキンソン病（PD）類似疾患が高頻度で発生している。当地域では、トゲバンレイシ *Annona muricata*（バンレイシ科）を日常的に摂取しているが、本植物中からはPD発症に関与する可能性が考えられている神

経毒性化合物 tetrahydroisoquinoline (TIQ) 類が検出されている。また、本植物の摂取を中止することによって疾患の改善が認められることから、本疾患の原因が植物中に存在する可能性は極めて高く、TIQ類の関与が疑われる。しかし、本疾患と植物摂取の因果関係を示唆する臨床学的見地に基づいた報告

は数多く存在するものの、毒性発現メカニズムに関する報告は少なく、未だに不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究の目的は、トゲバンレイシ果実に含まれる毒性物質を用いた病態モデル動物の作製と、それを利用した創薬研究を展開することである。具体的にはまず現地の果実と患者の血液サンプルから患者に蓄積がみとめられる果実中の成分を徹底的に洗い出す。次に、我々が当該疾患の遺伝的素因のひとつであると想定している P-gp 欠損マウスに、P-gp の基質となる果実中の神経毒を少量投与することにより神経毒が脳内に蓄積し、パーキンソニズムを発症するマウスを作製する。次にこのマウスに、治療薬候補化合物を投与し神経毒の脳内濃度と神経細胞死を指標に本疾患治療薬の創製を目指す。

3. 研究の方法

1) 抽出・分離・精製・及び構造決定：トゲバンレイシ乾燥葉のメタノール抽出物を水に懸濁し、各種有機溶媒で順次分配を行った。そのうち Dragendorff 陽性であったクロロホルム、酢酸エチル、ブタノール層について、各種カラムクロマトグラフィーを用いて繰り返し分離・精製し、純粋な化合物を得た。得られた化合物の構造は、NMR を中心とした各種スペクトルデータを解析して決定した。

2) 細胞生存率測定：細胞はヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞を用いた。化合物を各濃度・各時間で曝露後、WST-1 を培養培地中に加え、生細胞の脱水素酵素による代謝を吸光度変化によって測定する WST-1 法を用いて評価した。

3) プロテアソーム活性測定：SH-SY5Y 細胞に各時間で毒物曝露後、細胞を回収し、可溶化させたサンプルと各種基質 (caspase/PGPH 様活性：Z-LLE-AMC, chymotrypsin 様活性：Z-LLVY-AMC, trypsin 様活性：Z-ARR-AMC) を 37°C、30 分間反応させ、切断された蛍光基質の強度を Ex. 355 nm/Em. 460 nm で測定した。

4) Western blotting：SH-SY5Y 細胞に各時間で毒物曝露後、細胞を回収し、可溶化・変性させたサンプルを SDS-PAGE にて分離した。PVDF 膜に転写し、ブロッキングした後、各種抗体と反応させ、目的タンパク質を検出した。

5) 神経毒を投与したP-gp欠損マウスの脳蓄積性評価：P-gp を欠損したマウスにこれら神経毒性物質を投与し、脳蓄積性や神経毒性を調べた。

4. 研究成果

1) 各種スペクトルデータの解析により、新規 TIQ として (*R*)-*N*-methylnornuciferine 及び既知 TIQ として (*S*)-norcorydine、(*R*)-anonaine、(*S*)-*O*,*O*-dimethylcoclaurine、(*S*)-4'-*O*-methylcoclaurine をはじめ、トゲバンレイシに含まれる 10 数種類の化学構造を決定した。

2) これらの細胞生存率を測定したところ、特別毒性の強い化合物は認められなかったが、数百 microM~数 mM で SH-SY5Y 細胞を死滅させた。

3) これらのうち *O*,*O*-dimethylcoclaurine (DMC) について標品合成を行い、更に詳

しい細胞毒性メカニズムを調べたところ、DMC はプロテアソーム活性を阻害し、これに伴って不要タンパク質が蓄積することによると思われる小胞体ストレスシグナルの誘導が認められた。

4) これらの物質を P 糖タンパク質欠損マウスに投与し、脳蓄積性、ドパミン減少、行動異常等を現在検討している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 20 件)

1. Matsushige A, Kotake Y, Matsunami K, Otsuka H, Ohta S, Takeda Y. Annonamine, a new aporphine alkaloid from the leaves of *Annona muricata*. *Chem Pharm Bull.* 60, 257-259 (2012). (査読有)
2. Matsushige A, Matsunami K, Kotake Y, Otsuka H, Ohta S. Three new megastigmanes from the leaves of *Annona muricata*. *J Nat Med.* 66, 284-291 (2012). (査読有)
3. Hashida T, Kotake Y, Ohta S. Protein disulfide isomerase knockdown-induced cell death is cell-line-dependent and involves apoptosis in MCF-7 cells. *J Toxicol Sci.* 36, 1-7 (2011). (査読有)
4. Tayama Y, Sugihara K, Sanoh S, Miyake K, Morita S, Kitamura S, Ohta S. Effect of tea beverages on aldehyde oxidase activity. *Drug Metab Pharmacokinet.* 26, 94-101 (2011). (査読有)
5. Uramaru N, Shigematsu H, Toda A, Eyanagi R, Kitamura S, Ohta S. Design, synthesis, and pharmacological activity of nonallergenic pyrazolone-type antipyretic analgesics. *J Med Chem.* 53, 8727-8733 (2010). (査読有)
6. Nurrochmad A, Ishii Y, Nakanoh H, Inoue T, Horie T, Sugihara K, Ohta S, Taketomi A, Maehara Y, Yamada H. Activation of morphine glucuronidation by fatty acyl-CoAs and its plasticity: a comparative study in humans and rodents including chimeric mice carrying human liver. *Drug Metab Pharmacokinet.* 25, 262-273 (2010). (査読有)
7. Goto T, Ohta K, Fujii S, Ohta S, Endo Y. Design and synthesis of androgen receptor full antagonists bearing a p-carborane cage: promising ligands for anti-androgen withdrawal syndrome. *J Med Chem.* 53, 4917-4926 (2010). (査読有)
8. Nakatsu Y, Kotake Y, Takai N, Ohta S. Involvement of autophagy via mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibition in tributyltin-induced neuronal cell death. *J Toxicol Sci.* 35, 245-251 (2010). (査読有)
9. Kohta R, Kotake Y, Hosoya T, Hiramatsu T, Otsubo Y, Koyama H, Hirokane Y, Yokoyama Y, Ikeshoji H, Oofusa K, Suzuki M, Ohta S. 1-Benzyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline binds with tubulin beta, a substrate of parkin, and reduces its polyubiquitination. *J Neurochem.* 114, 1291-1301 (2010). (査読有)

10. Yamazaki H, Kuribayashi S, Inoue T, Tateno C, Nishikura Y, Oofusa K, Harada D, Naito S, Horie T, Ohta S. Approach for in vivo protein binding of 5-n-butyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidine bioactivated in chimeric mice with humanized liver by two-dimensional electrophoresis with accelerator mass spectrometry. *Chem Res Toxicol*. 23, 152-158 (2010). (査読有)
11. Ohta K, Ogawa T, Suzuki T, Ohta S, Endo Y. Novel estrogen receptor (ER) modulators: carbamate and thiocarbamate derivatives with m-carborane bisphenol structure. *Bioorg Med Chem*. 17, 7958-7963 (2009). (査読有)
12. Nakatsu Y, Kotake Y, Takishita T, Ohta S. Long-term exposure to endogenous levels of tributyltin decreases GluR2 expression and increases neuronal vulnerability to glutamate. *Toxicol Appl Pharmacol*. 240, 292-298 (2009). (査読有)
13. Fujimoto N, Suzuki T, Ohta S, Kitamura S. Identification of rat prostatic secreted proteins using mass spectrometric analysis and androgen-dependent mRNA expression. *J Androl*. 30, 669-678 (2009). (査読有)
14. Inoue T, Sugihara K, Ohshita H, Horie T, Kitamura S, Ohta S. Prediction of human disposition toward S-3H-warfarin using chimeric mice with humanized liver. *Drug Metab Pharmacokinet*. 24, 153-160. (2009) (査読有)
15. Tayama Y, Miyake K, Kanazawa E, Kaneko T, Sugihara K, Toyomi A, Morita S, Kobayashi M, Ohta S. Current situation of drug information in the kindergarten and nursery teacher: a pilot study. *Yakugaku Zasshi*. 129, 617-622 (2009). (査読有)
16. Ogawa T, Ohta K, Iijima T, Suzuki T, Ohta S, Endo Y. Synthesis and biological evaluation of p-carborane bisphenols and their derivatives: structure-activity relationship for estrogenic activity. *Bioorg Med Chem*. 17, 1109-1117 (2009). (査読有)
17. Inoue T, Nitta K, Sugihara K, Horie T, Kitamura S, Ohta S. CYP2C9-catalyzed metabolism of S-warfarin to 7-hydroxy-warfarin in vivo and in vitro in chimeric mice with humanized liver. *Drug Metab Dispos*. 36, 2429-2433 (2008). (査読有)
18. Ohta K, Goto T, Fijii S, Suzuki T, Ohta S, Endo Y. Design and synthesis of carborane-containing androgen receptor (AR) antagonist bearing a pyridine ring. *Bioorg Med Chem*. 16, 8022-8028 (2008). (査読有)
19. Nakatsu Y, Kotake Y, Hino A, Ohta S. Activation of AMP-activated protein kinase by tributyltin induces neuronal cell death. *Toxicol Appl Pharmacol*. 230, 358-363 (2008). (査読有)
20. Kitamura S, Nitta K, Tayama Y, Tanoue C, Sugihara K, Inoue T, Horie T, Ohta S.

Aldehyde oxidase-catalyzed metabolism of N1-methylnicotinamide in vivo and in vitro in chimeric mice with humanized liver. Drug Metab Dispos. 36, 1202-1205 (2008).
(査読有)

[学会発表] (計 13 件)

1. 太田 茂 パーキンソン病発症原因について 筑波大学講演会 (招待講演) 2010 年 11 月 10 日 つくば
2. 廣兼裕司 他 パーキンソン病関連神経毒MPP+によるparkin活性阻害と基質タンパク質tubulinの蓄積 第49回日本薬学会中国四国支部学術大会 2010年11月6日 米子
3. 松重彩乃 他 トゲバンレイシ含有 tetrahydroisoquinoline 誘導体の神経細胞毒性 第 49 回日本薬学会中国四国支部学術大会 2010 年 11 月 6 日 米子
4. 佐溝茂良 他 カテコール骨格を有するパーキンソン病関連神経毒がユビキチン E3 リガーゼ parkin に与える影響 フォーラム 2010 衛生薬学・環境トキシコロジー 2010 年 9 月 9 日 東京
5. 佐溝茂良 他 パーキンソン病関連神経毒は Parkin に影響を与え、小胞体ストレスを誘発する 日本薬学会第 130 年会 2010 年 3 月 30 日 岡山
6. 廣兼裕司 他 家族性パーキンソン病原因タンパク Parkin に対する 1BnTIQ の影響 日本薬学会第 130 年会 2010 年 3 月 30 日 岡山

7. 松重彩乃 他 トゲバンレイシ葉部に含まれるアルカロイド成分の探索研究 日本薬学会第 130 年会 2010 年 3 月 29 日 岡山

8. 太田 茂 パーキンソン病発症機構の解明に向けて 平成 21 年度北陸大学学術フロンティア年次研究集会・総括集会 (招待講演) 2010 年 3 月 16 日 金沢

9. 山脇裕一郎 他 α -synuclein オリゴマー化に対するパーキンソン病関連神経毒の影響 第 48 回日本薬学会中国四国支部学術大会 2009 年 11 月 7 日 徳島

10. 佐溝茂良 他 パーキンソン病関連脳内性アミン TIQ 誘導体の小胞体ストレス誘発作用 フォーラム 2009 衛生薬学・環境トキシコロジー 2009 年 11 月 6 日 沖縄

11. 廣兼裕司 他 パーキンソン病関連神経毒による Parkin タンパク質の不溶化および不活性化 フォーラム 2009 衛生薬学・環境トキシコロジー 2009 年 11 月 6 日 沖縄

12. 山脇裕一郎 他 パーキンソン病関連神経毒による tubulin 結合タンパク質 α -synuclein のオリゴマー化 フォーラム 2009 衛生薬学・環境トキシコロジー 2009 年 11 月 6 日 沖縄

13. 太田 茂 パーキンソン病発症機構の分子メカニズム 鳥取パーキンソン病症例検討会 (招待講演) 2009 年 7 月 10 日 鳥取

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太田 茂 (OHTA SHIGERU)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：60160503

(2) 研究分担者

杉原 数美 (SUGIHARA KAZUMI)

広島国際大学・薬学部・准教授

研究者番号：20271067

(3) 連携研究者

()

研究者番号：