

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790083

研究課題名(和文) ドパミンニューロン死における Nrf2-ARE 経路の役割解明と新規活性化物質の探索

研究課題名(英文) Role of Nrf2-ARE pathway in dopaminergic neuronal death: identification of a novel activator

研究代表者

泉 安彦 (IZUMI YASUHIKO)

京都大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：60456837

研究成果の概要(和文)：生体内防御機構である Nrf2-ARE 経路は抗酸化酵素を誘導することで酸化ストレスを抑制する。青ジソ由来 Nrf2-ARE 経路活性化物質 2',3'-dihydroxy-4',6'-dimethoxychalcone (DDC) は、中脳初代培養細胞においてアストロサイトで抗酸化酵素を誘導した。DDC はドパミンニューロンでは抗酸化酵素を誘導しなかったが、ドパミンニューロンはアストロサイトから抗酸化物質の供給を受けることで酸化ストレスからの抵抗性を獲得した。

研究成果の概要(英文)：The Nrf2-ARE pathway is a cellular defense system against oxidative stress. Activation of this pathway increases expression of antioxidant enzymes. In mesencephalic cultures, 2',3'-dihydroxy-4',6'-dimethoxychalcone (DDC), a green perilla-derived activator of the pathway, elevated expression of antioxidant enzymes in astrocytes. Although DDC failed to induce the expression of antioxidant enzymes in dopaminergic neurons, dopaminergic neurons gained resistance to oxidative stress by receiving the supply of antioxidants from astrocytes.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：酸化ストレス、Nrf2-ARE 経路

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病は中脳黒質ドパミンニューロンの選択的脱落を特徴とする神経変性疾患である。酸化ストレスはパーキンソン病の病態と密接に関わっており、酸化ストレスの防御は有望な治療法として期待される。酸化ストレスに対する生体応答において重要な機能を担っているのが、Nuclear erythroid 2 p45-related factor 2 (Nrf2)-antioxidant response element (ARE) 経路である。細胞が酸化ストレスにさらされると、通常細胞質に留められている転写因子 Nrf2 が核へ移行し、抗酸化応答配列 (ARE) に結合して抗酸化遺伝子の発現を誘導する。近年、パーキンソン病

剖検脳において残存するドパミンニューロンで Nrf2 の核内移行が起こっているという報告がなされており (J. Neuropathol. Exp. Neurol. 66:75-85, 2007)、その病態形成における Nrf2-ARE 経路の関与が示唆される。

2. 研究の目的

Nrf2-ARE 経路活性化による神経保護作用を追求した過去の研究では、in vivo においてアストロサイトに Nrf2 を過剰発現させることで MPTP や 6-hydroxydopamine 誘発パーキンソン病モデル動物に対する有効性が報告されている (Brain Res. 1144:192-201, 2007; Proc Natl Acad Sci U S A. 106:2933-8,

2009)。本研究では、Nrf2-ARE 経路の活性化物質がニューロン-グリア混合培養系である中脳初代培養細胞においてどのようなメカニズムでドパミン神経保護作用を示すのかを明らかにすることで Nrf2-ARE 経路の活性化によるパーキンソン病の薬物治療法確立のための基礎的知見を提供することを旨とした。

3. 研究の方法

胎生 16 日齢のラット胎仔から中脳腹側部を単離し、中脳初代培養細胞を作製した。抗チロシンヒドロキシラーゼ抗体を用いた免疫染色によりドパミンニューロンを同定し計数することで、その生存率を算出した。一部の実験では、ラット副腎髄質褐色細胞腫由来 PC12 細胞を用いた。その生存率の評価には MTT アッセイおよび LDH 放出アッセイを用いた。

4. 研究成果

(1) 我々は以前に、青ジソのジエチルエーテル抽出物から Nrf2-ARE 経路活性化成分として 2',3'-dihydroxy-4',6'-dimethoxy chalcone (DDC) を単離・同定した。PC12 細胞に DDC を処置すると γ -glutamylcysteine synthetase (γ -GCS)、NAD(P)H:quinone oxidoreductase-1 (NQO1) や hemeoxygenase-1 (HO-1) の発現量および細胞内グルタチオン量が上昇した。Nrf2-ARE 経路の活性化にはキナーゼによるリン酸化が重要な役割を果たしている。DDC により p38 MAPK および Akt のリン酸化が惹起され、p38 MAPK および PI3K-Akt 経路の阻害は DDC による ARE 活性化を相加的に抑制した。DDC の処置により増大した γ -GCS および NQO1 は p38 MAPK 経路の阻害により抑制されたが、HO-1 の増大は p38 MAPK および PI3K-Akt の両経路の阻害によってのみ抑制された。DDC を前処置することで 6-hydroxydopamine (6-OHDA) による細胞死は抑制されたが、この細胞保護作用は p38 MAPK 経路の阻害により抑制された。以上の結果より、PC12 細胞における DDC による細胞保護作用には、 γ -GCS および NQO1 の関与が大きく、HO-1 の関与は小さいことが示唆された。

(2) 一方、中脳初代培養細胞への DDC の処置により、HO-1 の発現量が上昇したが、細胞内グルタチオン量に変化はなかった。HO-1 発現量の増加は、主にアストロサイト、一部はミクログリアにおいて観察され、ドパミンニューロンを含めニューロンでの発現はほとんどなかった。6-OHDA による中脳由来ドパミンニューロン死は DDC の前処置により抑制され、それは HO-1 阻害薬により消失した。以上の結果より、中脳初代培養細胞における DDC によるドパミンニューロン保護作用に、アストロサイトで発現増大した HO-1 の寄与

が大きいことが示唆された。

本研究により、我々が青ジソより同定した DDC は Nrf2-ARE 経路活性化物質としてドパミンニューロン保護に有用であることが明らかとなり、その保護作用メカニズムに関しては PC12 細胞とは異なる抗酸化酵素が関与することが示唆された。ニューロン-グリア混合培養系である中脳初代培養細胞において、通常条件では、アストロサイトで優先的に Nrf2-ARE 経路が活性化し、抗酸化物質を遊離するためドパミンニューロンでの Nrf2-ARE 経路活性化は必要ではなかったと考えられる。したがって、パーキンソン病剖検脳で観察されたドパミンニューロンにおける Nrf2 の核内移行は、アストロサイトによる補償機構が失われた病的な環境を反映しているものと考えられる。

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 10 件)

- ① Nazari, Q. A., Kume, T., Takada-Takatori, Y., Izumi, Y., Akaike, A. Protective Effect of Luteolin on an Oxidative-Stress Model Induced by Microinjection of Sodium Nitroprusside in Mice. *J Pharmacol Sci.* 査読有、in press. DOI: <http://dx.doi.org/10.1254/jphs.13019FP>
- ② Izuo, N., Kume, T., Sato, M., Murakami, K., Irie, K., Izumi, Y., Akaike, A. Toxicity in Rat Primary Neurons through the Cellular Oxidative Stress Induced by the Turn Formation at Positions 22 and 23 of A β 42. *ACS Chem Neurosci.* 査読有、3:674-681, 2012. DOI: 10.1021/cn300033k
- ③ Nazari, QA., Mizuno, K., Kume, T., Takada-Takatori, Y., Izumi, Y., and Akaike, A. In Vivo Brain Oxidative Stress Model Induced by Microinjection of Sodium Nitroprusside in Mice. *J Pharmacol Sci.* 査読有、120:105-111, 2012. DOI: 10.1254/jphs.12143FP
- ④ Hongo, H., Kihara, T., Kume, T., Izumi, Y., Niidome, T., Sugimoto, H., and Akaike, A. Glycogen synthase kinase-3 β activation mediates rotenone-induced cytotoxicity with the involvement of microtubule

- destabilization. *Biochem Biophys Res Commun.* 査読有、426:94-99, 2012.
DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.08.042
- ⑤ Izumi, Y., Matsumura, A., Wakita, S., Akagi, K., Fukuda, H., Kume, T., Irie, K., Takada-Takatori, Y., Sugimoto, H., Hashimoto, T., and Akaike, A. Isolation, identification, and biological evaluation of Nrf2-ARE activator from the leaves of green perilla (*Perilla frutescens* var. *crispa* f. *viridis*). *Free Radic Biol Med.* 査読有、53:669-679, 2012.
DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2012.06.021
- ⑥ Unemura, K., Kume, T., Kondo, M., Maeda, Y., Izumi, Y., and Akaike, A. Glucocorticoids Decrease Astrocyte Numbers by Reducing Glucocorticoid Receptor Expression In Vitro and In Vivo. *J Pharmacol Sci.* 査読有、119:30-39, 2012.
DOI:10.1254/jphs.12047FP
- ⑦ Ohnishi M., Katsuki H., Fukutomi C., Takahashi M., Motomura M., Fukunaga M., Matsuoka Y., Isohama Y., Izumi Y., Kume T., Inoue A., and Akaike A. HMGB1 inhibitor glycyrrhizin attenuates intracerebral hemorrhage-induced injury in rats. *Neuropharmacology.* 査読有、61:975-980, 2011.
DOI:
10.1016/j.neuropharm.2011.06.026,
- ⑧ Oda, T., Kume, T., Izumi, Y., Ishihara, K., Sugimoto, H., Akaike, A. Na⁺/Ca²⁺ exchanger inhibitors inhibit neurite outgrowth in PC12 cells. *J. Pharmacol. Sci.* 査読有、116:128-131, 2011.
DOI: 10.1254/jphs.11011SC
- ⑨ Mizuno, K., Kume, T., Muto, C., Takada-Takatori, Y., Izumi, Y., Sugimoto, H., Akaike, A. Glutathione biosynthesis via activation of the nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2)-antioxidant response element (ARE) pathway is essential for neuroprotective effects of sulforaphane and 6-(methylsulfinyl) hexyl isothiocyanate. *J Pharmacol Sci.* 査読有、115:320-328, 2011.
DOI: 10.1254/jphs.10257FP
- ⑩ Izumi, Y., Kume, T., Akaike, A. Regulation of dopaminergic neuronal death by endogenous dopamine and proteasome activity. *Yakugaku Zasshi.* 査読有、131:21-27, 2011.
DOI:
<http://dx.doi.org/10.1248/yakushi.131.21>
- [学会発表] (計 19 件)
- ① 泉安彦, 江角将之, 久米利明, 赤池昭紀 内在性ドパミンによるパラコート誘発細胞死の制御
日本薬学会第 133 年会 2013 年 3 月 28 日 パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ② 久米利明, 澤幡雅仁, 田口和哉, 泉安彦, 赤池昭紀 脳血管障害の克服を目指した新たなアプローチ
第 86 回日本薬理学会年会 2013 年 3 月 21 日 福岡国際会議場 (福岡県)
- ③ 江角将之, 泉安彦, 久米利明, 赤池昭紀 パラコート誘発細胞死における細胞内ドパミンの関与
第 122 回日本薬理学会近畿部会 2012 年 11 月 16 日 千里ライフサイエンスセンター (大阪府)
- ④ 泉尾直孝, 久米利明, 佐藤瑞穂, 村上一馬, 入江一, 泉安彦, 赤池昭紀 Aβ42 “毒性コンホマー” の形成による細胞内酸化ストレスの誘導
第 31 回日本認知症学会学術集会 2012 年 10 月 27 日 つくば国際会議場 (茨城県)
- ⑤ 泉安彦, 松村敦子, 久米利明, 赤池昭紀 青ジソ由来 Nrf2-ARE 経路活性化物質の細胞保護作用機序の解析
第 62 回日本薬学会近畿支部総会・大会 2012 年 10 月 20 日 武庫川女子大学・薬学部 (兵庫県)
- ⑥ Sawahata, M., Kume, T., Taguchi, K., Iida, A., Sehara-Fujisawa, A., Izumi, Y. and Akaike, A. Live imaging of cerebrovascular dysfunction under hypoxic condition in zebrafish. 18th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting, Kyoto, Japan. 2012 年 9 月 22 日 芝蘭会館 (京都府)
- ⑦ 泉尾直孝, 久米利明, 佐藤瑞穂, 村上一馬, 入江一浩, 泉安彦, 赤池昭紀 Aβ42 “毒性

- コンホマー”の形成は細胞内酸化ストレスを誘導する
次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2012 2012年9月1日 神戸学院大学
ポートアイランドキャンパス (兵庫県)
- ⑧ 久米利明, 泉安彦, 高鳥悠記, 赤池昭紀
ニューロン保護・新生におけるニコチン受容体シグナル役割の解明
喫煙科学研究財団研究発表会 2012年7月18日 2012年7月18日 京王プラザホテル (東京都)
- ⑨ 脇田誓子, 泉安彦, 中井利恵, 久米利明, 赤池昭紀
スタウロスポリンはAMPK/mTOR経路を介してドパミンニューロンの突起伸長を促進する
第121回日本薬理学会近畿部会 2012年6月29日あわぎんホール (徳島県)
- ⑩ 泉安彦, 松村敦子, 脇田誓子, 福田宏之, 赤木謙一, 久米利明, 入江一浩, 橋本正, 赤池昭紀
青ジソ抽出物からのNrf2-ARE経路活性化成分の単離および同定
日本薬学会第132年会 2012.3.31 北海道大学 (北海道)
- ⑪ 泉尾直孝, 久米利明, 佐藤瑞穂, 村上一馬, 入江一浩, 泉安彦, 赤池昭紀
アミロイドβ誘発神経毒性における22,23位のターン構造の重要性
第85回日本薬理学会年会 2012.3.14 国立京都国際会館 (京都府)
- ⑫ Qand Agha Nazari, 泉安彦, 久米利明, 赤池昭紀
Protective effects of luteolin on oxidative stress model induced by microinjection of sodium nitroprusside in mice.
第85回日本薬理学会年会 2012.3.14 国立京都国際会館 (京都府)
- ⑬ 川畑伊知郎, 森田淳一, 田淵明子, 津田正明, 一瀬宏, 泉安彦, 久米利明, 赤池昭紀, 山國徹
V-1はアクチン重合を介したSRF依存的経路によりチロシン水酸化酵素遺伝子発現を制御する
第85回日本薬理学会年会 2012.3.14 国立京都国際会館 (京都府)
- ⑭ 松村敦子, 泉安彦, 脇田誓子, 赤木謙一, 入江一浩, 久米利明, 橋本正, 赤池昭紀
Nrf2-ARE経路活性化作用を有する食品由来成分の探索
第120回日本薬理学会近畿部会 2011.11.11 ホテルグランビア京都 (京都府)
- ⑮ 大西正俊, 香月博志, 福富千温, 高橋円香, 本村美怜, 福永瑞季, 松岡康裕, 磯濱洋一郎, 泉安彦, 久米利明, 井上敦子, 赤池昭紀
グリチルリチンによるHMGB1活性阻害を介した脳出血誘発トロンビン毒性の制御
第120回日本薬理学会近畿部会 2011.11.11 ホテルグランビア京都 (京都府)
- ⑯ Yasuhiko Izumi, Takamori Yamamoto, Toshiaki Kume, Akinori Akaike
Role of intracellular heme in paraquat-induced cytotoxicity
第34回日本神経科学大会 2011.9.17 パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ⑰ Seiko Wakita, Yasuhiko Izumi, Toshiaki Kume, Akinori Akaike
Dopaminergic innervation of the striatal neurons through integrin $\alpha 5 \beta 1$
第34回日本神経科学大会 2011.9.15 パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ⑱ 泉安彦, 脇田誓子, 久米利明, 赤池昭紀
ドパミンニューロンによる線条体神経支配のin vitro再構築とその機序解明
生体機能と創薬シンポジウム 2011 2011.9.2 日本薬学会長井記念ホール (東京都)
- ⑲ 五百蔵忠明, 赤尾昌治, 久米利明, 井口守丈, 泉安彦, 赤池昭紀
In vivo心筋虚血再灌流モデルにおけるセロフェンド酸の心筋保護作用
次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2011 2011.8.31 北里大学薬学部コンベンションホール (東京都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

泉安彦 (IZUMI YASUHIKO)
京都大学・大学院薬学研究科・助教
研究者番号：60456837

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし