

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：34428

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870943

研究課題名(和文) 新規パーキンソン病治療薬としての  $\beta_3$  受容体アゴニストの有用性に関する研究研究課題名(英文) The utility of adrenaline  $\beta_3$  receptor agonist as a new drug for Parkinson's disease

研究代表者

吉岡 靖啓 (Yoshioka, Yasuhiro)

摂南大学・薬学部・准教授

研究者番号：40330360

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：パーキンソン病の進行を抑制する新規治療薬としてのアドレナリン  $\beta_3$  受容体作用薬が有用であるか否かについて、MPTP誘発マウスパーキンソン病モデルを用いて検討した。マウスへの  $\beta_3$  受容体作用薬の投与により、抗酸化物質であるグルタチオンの脳内での量が増加し、MPTPにより誘発されるドパミン神経細胞死が著明に抑制されることを示した。

研究成果の概要(英文)：I investigated that adrenaline  $\beta_3$  receptor agonist could be a new drug for Parkinson's disease using MPTP-induced mouse Parkinson's disease model.  $\beta_3$  receptor agonist increased glutathione levels in mouse brain and inhibited MPTP-induced death of dopaminergic neurons.

研究分野：神経薬理学

キーワード：パーキンソン病  $\beta_3$  受容体作用薬 神経保護作用

### 1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病は、黒質のドパミン神経細胞が変性・脱落することにより生じる運動機能障害を主症状とする進行性の神経変性疾患である。原因不明、治療方法未確立であり、特定疾患に指定されている。発症は 50~60 歳台の年齢層に多く、特定疾患医療受給者証からみる患者数は、平成 20 年度 98,356 名、平成 21 年度 104,400 名であり、高齢化が進むわが国では今後も患者数が増加すると考えられている。発症初期には薬物による対症療法が非常に有効であるが、疾患は進行し、経過とともに薬物による症状のコントロールは不良となる。発症から 5~15 年で自立した生活が困難となり、患者本人および介護者の肉体的・精神的負担は激しく増加し、QOL は著しく低下する。このため、疾患の進行を抑制する薬物の開発が切望されている。

パーキンソン病患者の脳では、神経細胞内に Lewy 小体と呼ばれる高度にユビキチン化されたタンパク質封入体が見られる。申請者は、酸化ストレスにより、ドパミン神経細胞内にユビキチン化タンパク質が蓄積することを報告し、本疾患の病理学的特徴が酸化ストレスにより再現されることを示してきた。また、患者脳ではグルタチオン量が著明に減少し、過酸化脂質の増加が見られることなどから、本疾患における神経細胞の変性・脱落の根底には酸化ストレスが存在することが世界共通の認識となっている。これらのことから、ビタミン E などの抗酸化剤が、酸化ストレスを抑制し、疾患の進行を抑制する可能性が実験動物モデルにおいて示されており、臨床試験も行なわれてきた。しかしながら、いずれの抗酸化剤もヒトの脳内では抗酸化能を上昇させることが出来ず、臨床応用には至っていない。

グルタチオンは、その酸化還元サイクルにより活性酸素種や過酸化脂質を消去し酸化ストレスを抑制する。このことから、細胞内グルタチオン量は、細胞の抗酸化能の指標として認識されている。アストロサイトは、グリア細胞の一種であり、脳内では神経細胞を取り巻く様に存在している。アストロサイトは様々な物質を神経細胞に供給することにより神経細胞の生存維持を助けているが、特に神経細胞へのグルタチオンの供給は、その抗酸化能の維持に非常に重要である。

申請者は、アストロサイトのグルタチオン合成を促進させる生体内機構が、グルタチオンの供給を介して神経細胞の酸化ストレスに対する抵抗性を増加させ、パーキンソン病でのドパミン神経細胞の変性・脱落を抑制する新規パーキンソン病治療標的となる可能性が高いと考え、その探索を行ってきた。その結果、マウス初代培養細胞ならびにヒトの細胞株を用いた検討から、パーキンソン病初期に中脳黒質での含量が減少するノルアドレナリンが、 $\gamma$ -受容体を介して、アストロサイトのグルタチオン量を著明に増加さ

せ、神経細胞へのグルタチオンの供給を介して酸化ストレスによるドパミン神経細胞死を抑制することを見出した。

### 2. 研究の目的

(1)  $\gamma$ 受容体アゴニストの実験動物での神経保護作用を検討し、パーキンソン病の進行を抑制する薬物としての  $\gamma$ 受容体アゴニストの有用性を明らかにする。

(2) 培養細胞を用いて神経保護作用の詳細な機構を検討し、その作用機序を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) GFP 導入ヒトニューロブラストーマ SH-SY5Y 細胞の樹立

SH-SY5Y 細胞に pGFP-C1 vector を Fugene 6 を用いてトランスフェクションした後、G418 を含む DMEM (G418 含有 DMEM) に置換し、遺伝子導入細胞の選択を行った。48 時間ごとに、G418 含有 DMEM で培養液を置換し、1 週間培養した。その後、シングルコロニーを単離、培養し実験に用いた。

(2) SH-SY5Y 細胞とヒトアストロサイトーマ U-251 MG 細胞との共培養系の作製

U-251 MG 細胞の播種 24 時間後に、U-251 MG 細胞の培養上清を除去し、GFP 導入 SH-SY5Y 細胞を U-251 MG 細胞上に播種することにより調製した。

(3) siRNA の導入

U-251 MG 細胞播種 24 時間後に培養上清を除去し、Opti MEM に置換した (500  $\mu$ L/well/24 well plate, 1.5 mL/dish/35 mm dish)。Lipofectamine RNAiMAX を用いて、Control siRNA あるいは下記の MRP1-targeted siRNA (MRP1 siRNA) を、Invitrogen 社の推奨方法に従い導入した。100 pmol の Control siRNA または MRP1 siRNA と 30  $\mu$ L の Lipofectamine RNAiMAX を 1 mL の Opti MEM 中で混合し、室温で 5 分間インキュベートした。その溶液を 24 well plate には 100  $\mu$ L/well、35 mm dish には 300  $\mu$ L/dish 培養上清に添加することにより、Control siRNA または MRP1 siRNA を U-251 MG 細胞に導入した。導入 6 時間後に、培養上清を 10% FBS/DMEM に置換し、さらに培養した。Real-time RT-PCR 法には 1 回、Western blot 法及び混合培養系の調製には 48 時間後に再度 siRNA を導入した。Western blot 法では、2 回目の導入 48 時間後に、ノルアドレナリンを 24 時間処置した。

MRP1 siRNA

sense 鎖:

5' -GAG UGG AAU UCC GGA ACU ATT-3'

antisense 鎖:

5' -UAG UUC CGG AAU UCC ACU UCG G-3'

#### (4) 混合培養系における SH-SY5Y 細胞の細胞内グルタチオン量の測定

GFP 導入 SH-SY5Y 細胞の混合培養系における GFP 導入 SH-SY5Y 細胞の細胞内グルタチオン量は、Cellomics array scan (Thermo Scientific, San Jose, CA, U.S.A) を用いて測定した。薬物処置後、培養液にグルタチオンと反応して青色蛍光を示す monochlorobimane (MCB) を終濃度が 50  $\mu\text{M}$  となるように添加し、15 分間反応させた。Cellomics array scan で GFP 蛍光を示す範囲を設定し、その範囲における MCB の面積あたりの平均蛍光強度を測定した。GFP 導入 SH-SY5Y 細胞の細胞内グルタチオン量は、BSO (3 mM) を 24 時間処置した GFP 導入 SH-SY5Y 細胞での MCB の蛍光強度を background とし、無処置の GFP 導入 SH-SY5Y 細胞での MCB の蛍光強度を 100% とし、% で表した。

#### (5) Western blot 法

サンプルの等量の蛋白質 (20  $\mu\text{g}$ ) を 8% または 10% の SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動により分離した後、immobilon-P transfer membrane に転写した。その後、一次抗体として抗 MRP1 抗体 (1:1,000)、抗  $\beta$  受容体抗体 (1:1,000) あるいは抗 GCLc 抗体 (1:1,000) を用いて、蛋白質のバンドを X 線フィルムに検出した。

#### (6) Real-time RT-PCR 法

逆転写反応産物に下記のプライマーと SYBR Green を含む酵素溶液を加え、下記の条件で real-time RT-PCR を行った。MRP1 遺伝子発現量は、 $\beta$ -actin の遺伝子発現量で補正することによりグラフ化した。

#### Real-time RT-PCR 条件

MRP1: 95 °C 10 秒、60 °C 20 秒、72 °C 20 秒を 40 サイクル

$\beta$ -actin: 95 °C 10 秒、55 °C 20 秒、72 °C 20 秒を 40 サイクル

#### プライマーデザイン

MRP1

forward:

5' -ACT CAT TCA GCT CGT CTT GTC C-3'

reverse:

5' -TCA ACC CTG TGA TCC ACC AGA-3'

$\beta$ -actin

forward:

5' -ATG GGT CAG AAG GAC TCC TAC-3'

reverse:

5' -ACG CTC GGT CAG GAT CTT CAT-3'

#### (7) 実験動物及び薬物投与

実験に供した 8-10 週齢の C57BL/6 マウスは透明ケージで飼育し、室温: 22  $\pm$  1 °C、照明時間: 1 日 12 時間の条件下で、餌と水

を自由に摂取させた。動物実験の飼育、実験等はすべて日本薬理学会の動物実験に関する指針に基づき、摂南大学の動物実験に関する規定に従い実施した。SR58611A は、DMSO に溶解した後、生理食塩水で DMSO の終濃度が 10% になるように希釈し、腹腔内に投与した。SR58611A は、組織内グルタチオン量及び GCLc の発現量の検討には 1 回、MPTP 誘発ドパミン神経細胞死の検討では、1 日 1 回、計 8 回投与した。MPTP は、SR58611A の最終投与 2 時間後から、マウス腹腔内に MPTP (25 mg/kg) を 2 時間毎に 4 回投与した。

#### (8) 組織内グルタチオン量の測定

脳組織内グルタチオン量は、脳組織試料を用いて、DTNB リサイクリング法により測定した。脳組織内グルタチオン量は、脳組織 1 mg あたりのグルタチオン量として表した。

#### (9) 免疫組織染色

薬物投与後、マウスを抱水クロラル麻酔下にて、右心房を切開し、左心室から体重量と同量 (w/v) の PBS (-) を灌流することにより脱血した後、さらに、体重量と同量 (w/v) の 4% パラホルムアルデヒド溶液を灌流し、固定した。脳を摘出後、4% パラホルムアルデヒド溶液で後固定した後 (4 °C、overnight)、30% スクロースを含む PBS (-) に 24 時間浸漬した。OCT コンパウンドを用いて -80 °C で脳を急速凍結した後、クライオスタットを用いて 30  $\mu\text{m}$  の厚さの切片を作製した。切片を PBS (-) で洗浄した後、0.09% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を含む PBS (-) 溶液で 20 分間インキュベートすることにより内因性 peroxidase を不活性化した。PBS (-) で洗浄後、1% FBS、0.5% Triton-X を含む TBS でブロッキングを行い (室温、30 分)、1% FBS、0.5% Triton-X を含む TBS で希釈した抗 TH 抗体 (1:300) と 4 °C で一晩反応させた。切片を PBS (-) で洗浄した後、1% FBS、0.5% Triton-X を含む TBS で希釈した HRP 標識抗 rabbit IgG 抗体 (1:200) と室温で 1 時間反応させた。切片を 0.1% Triton-X 100 を含む TBS で洗浄した後、Impact<sup>TM</sup> DAB (Vector Laboratories, CA, USA) を用いて発色させた。Hematoxylin により対比染色を行い、ethanol による脱水及び xylene による透徹後、マウントクイック (Daido Sangyo, Tokyo, Japan) により封入し、光学顕微鏡で観察した。TH 陽性細胞数は、作製した黒質の連続切片のうちの三分の一の枚数を計測後、黒質あたりの数を算出しグラフ化した。

#### (10) データ解析

実験結果は、3-4 例の平均値  $\pm$  S.E.M.、あるいは、3-4 例の代表例として表した。有意差検定は ANOVA を行い、post-hoc test として Scheffe's test または Dunnett's test を行った。

#### 4. 研究成果

(1) ノルアドレナリンによるアストロサイトからのグルタチオン供給を介した神経保護作用における MRP1 の関与

ノルアドレナリン (1-30  $\mu\text{M}$ ) の 24 時間処置は、その濃度依存的に MRP1 蛋白質の発現量を増加させた (Fig. 1A)。また、この増加は  $\beta_3$  受容体選択的遮断薬の SR59230A (30  $\mu\text{M}$ ) により有意に阻害された (Fig. 1B)。これらの結果から、U-251 MG 細胞において、ノルアドレナリンは、 $\beta_3$  受容体を介して MRP1 蛋白質を発現誘導することが示唆された。

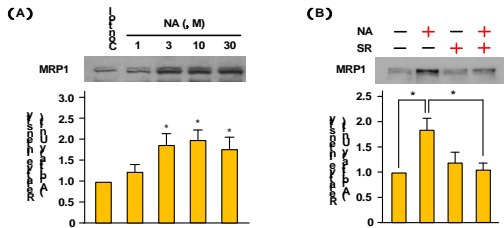


Fig.1 NA induced MRP1 protein expression via  $\beta_3$ -adrenoreceptor stimulation in U-251 MG cells.

次に、U-251 MG 細胞におけるノルアドレナリンによる MRP1 の発現誘導に対する MRP1 siRNA 導入の影響について検討した。

MRP1 mRNA の発現量を real-time RT-PCR 法により検討した結果、MRP1 siRNA 導入により MRP1 mRNA の発現量は有意に減少した (Fig. 2A)。また、MRP1 siRNA の導入により、MRP1 蛋白質の発現量は有意に減少した (Fig. 2B)。ノルアドレナリン (10  $\mu\text{M}$ ) の 24 時間処置による MRP1 蛋白質の発現量の増加は、MRP1 siRNA 導入により完全に阻害された。

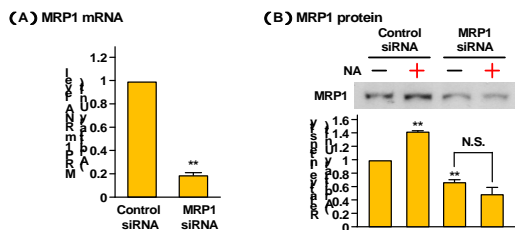


Fig. 2 Effect of MRP1-targeted siRNA transfection on MRP1 mRNA and protein expression in U-251 MG cells.

次に、混合培養系におけるノルアドレナリンによる SH-SY5Y 細胞の  $\text{H}_2\text{O}_2$  誘発細胞死抑制作用に対する U-251 MG 細胞への MRP1 siRNA 導入の影響について検討した。

混合培養系において、ノルアドレナリン (10  $\mu\text{M}$ ) 前処置による SH-SY5Y 細胞の  $\text{H}_2\text{O}_2$  誘発細胞死抑制作用は、U-251 MG 細胞への MRP1 siRNA 導入により阻害された (Fig. 3)。

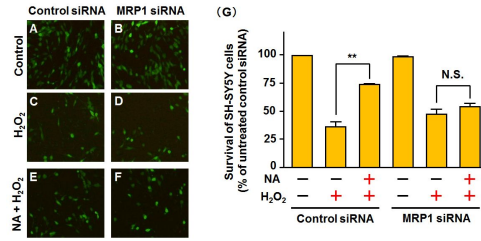


Fig. 3 Effect of MRP1-targeted siRNA transfection in U-251 MG cells on the neuroprotective effect of NA in the co-culture.

次に、混合培養系におけるノルアドレナリンによる SH-SY5Y 細胞の細胞内グルタチオン量の増加に対する U-251 MG 細胞への MRP1 siRNA 導入の影響について検討した。

混合培養系において、ノルアドレナリン (10  $\mu\text{M}$ ) による SH-SY5Y 細胞の細胞内グルタチオン量の増加は、U-251 MG 細胞への MRP1 siRNA 導入により抑制された (Fig. 4)。

これらの結果から、ノルアドレナリンは U-251 MG 細胞の  $\beta_3$  受容体を介して MRP1 を発現誘導することによりグルタチオンの放出を促進し、SH-SY5Y 細胞へのシステイン供給を増加させることにより、SHSY-5Y 細胞の細胞内グルタチオン量を増加させ、SH-SY5Y 細胞の  $\text{H}_2\text{O}_2$  誘発細胞死を抑制することが示唆された。

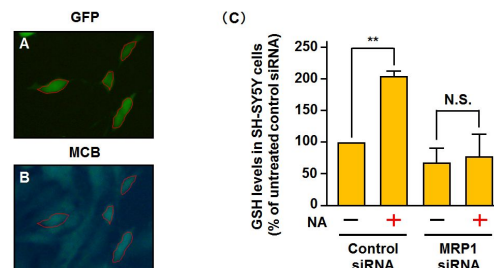


Fig. 4 Effect of MRP1-targeted siRNA transfection in U-251 MG cells on the NA-induced increase of GSH in SH-SY5Y cells in the co-culture.

(2) 脳内グルタチオン量に対する  $\beta_3$  受容体選択的作用薬 SR58611A 投与の影響

脳内グルタチオン量に対する  $\beta_3$  受容体選択的作用薬投与の影響を明らかにする目的で、マウスの脳における  $\beta_3$  受容体の発現を Western blot 法により検討した。その結果、嗅球、前頭葉、大脳皮質、海馬、線条体、視床、視床下部、中脳背側部、中脳腹側部、小脳、橋・延髄の検討した全ての脳組織において、 $\beta_3$  受容体蛋白質の発現が認められた (Fig. 5)。

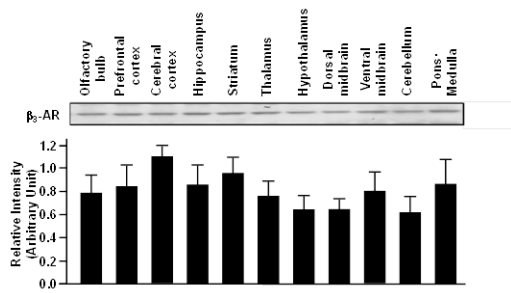


Fig. 5 The expression of  $\beta_3$ -adrenoceptor in the mouse brain.

次に、各脳組織での組織内 グルタチオン量に対する  $\beta_3$  受容体選択的作用薬投与の影響について検討した。

マウスに SR58611A (5 mg/kg, 10 mg/kg) を腹腔内投与することにより、24 時間後の嗅球、前頭葉、大脳皮質、海馬、線条体、視床下部、中脳腹側部での組織内 グルタチオン量は有意に増加した (Fig. 6)。

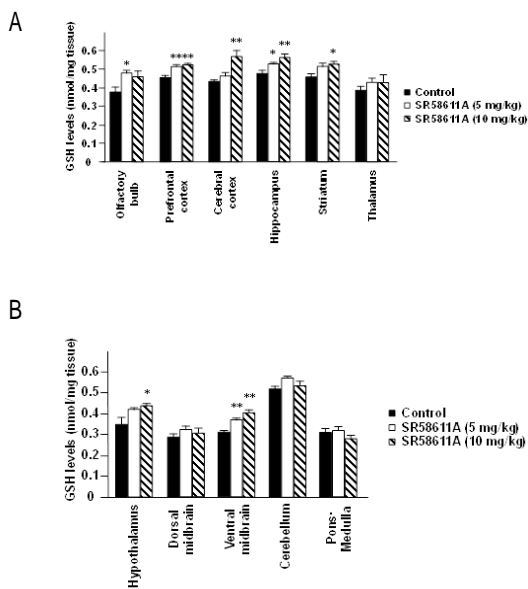


Fig.6 Effect of SR58611A on the GSH concentration in mouse brain.

次に、各脳組織での GCLc の発現量に対する SR58611A 投与の影響について Western blot 法により検討した。

マウスに SR58611A (5 mg/kg, 10 mg/kg) を腹腔内投与することにより、24 時間後の嗅球、前頭葉、大脳皮質、線条体、視床下部、中脳腹側部での GCLc の発現量は有意に増加した (Fig. 7)。また、海馬での GCLc の発現量も SR58611A 投与により増加する傾向を示した。

これらの結果から、嗅球、前頭葉、大脳皮質、海馬、線条体、視床下部、中脳腹側部で

は、SR58611A の投与により、アストロサイトの 3 受容体が刺激されることで GCLc が発現誘導され、組織内グルタチオン量が増加することが示唆された。

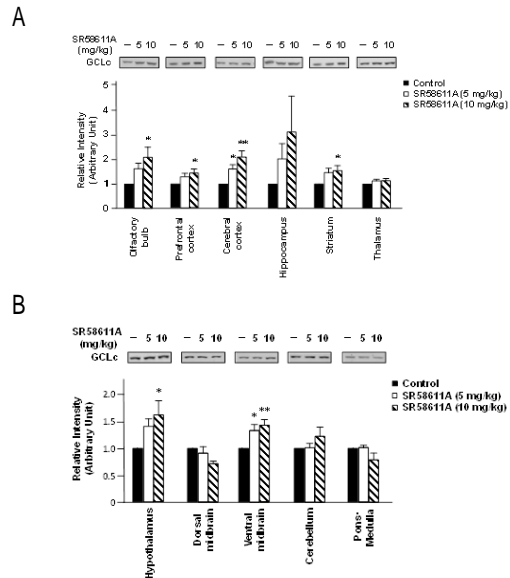


Fig.7 Effect of SR58611A on the expression of GCLc protein in mouse brain.

### (3) MPTP 誘発ドパミン神経細胞死に対する SR58611A 投与の影響

マウスにおける MPTP 誘発ドパミン神経細胞死が SR58611A の投与により抑制されるか否かを明らかにする目的で、MPTP 投与後の中脳黒室のドパミン神経細胞数を免疫組織化学的手法により検討した。

MPTP (25 mg × 4) の投与により、3 日後の黒質の TH 陽性細胞数は、対照群と比較して有意に減少していた (Fig. 8)。この減少は、SR58611A (5 mg/kg) 投与群において有意に抑制された。

これらの結果から、SR58611A は、ドパミン神経細胞内のグルタチオン量を増加させ、MPTP による細胞死を抑制することが示唆された。

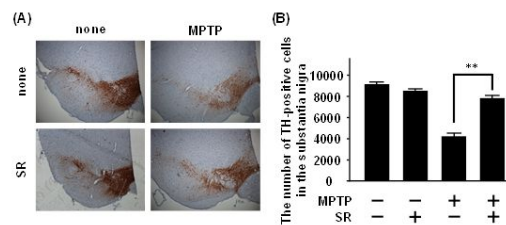


Fig. 8 Effect of SR58611A on MPTP-induced loss of dopamine neuron.

以上、本研究の結果から、 $\beta_3$  受容体選択的作用薬は、パーキンソン病患者の脳で減少したグルタチオン量を回復することにより酸化ストレスによるドパミン神経細胞死を

抑制し、疾患の進行を抑制する治療薬となる可能性が考えられた。今後、臨床研究により、パーキンソン病の進行を抑制する治療薬としての  $\alpha_3$  受容体選択的作用薬の有用性が明らかにされ、その治療に貢献することが期待される。

摂南大学・薬学部・准教授  
研究者番号：40330360

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Yoshioka Y, Kadoi H, Yamamuro A, Ishimaru Y, Maeda S, Noradrenaline increases intracellular glutathione in human astrocytoma U-251 MG cells by inducing glutamate-cysteine ligase protein via  $\alpha_3$ -adrenoceptor stimulation., Eur J Pharmacol., 査読有, 772 巻, 51-61 頁, 2016 年, DOI : 10.1016/j.ejphar.2015.12.041.

〔学会発表〕(計 7 件)

平野優、吉岡靖啓、他、脳内グルタチオン量に対するアドレナリン  $\alpha_3$  受容体アゴニスト投与の影響、第 65 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2015 年 10 月 17 日、大阪大谷大学

根来亮介、吉岡靖啓、他、初代培養神経細胞におけるノルアドレナリンの過酸化水素誘発神経細胞死抑制作用、日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月 27 日、兵庫医療大学

吉岡靖啓、他、Noradrenaline protects primary cortical neurons against  $H_2O_2$ -induce cell death by increasing the supply of glutathione from astrocytes., 第 88 回日本薬理学会年会、2015 年 3 月 19 日、名古屋国際会議場

吉岡靖啓、他、ノルアドレナリンによるアストロサイトからのグルタチオン供給を介した神経保護作用における MRP1 の関与、日本薬学会大 134 年会、2014 年 3 月 28 日、熊本市総合体育館

吉岡靖啓、他、Involvement of MRP1 in noradrenaline-induced astrocyte-mediated neuroprotection., 第 87 回日本薬理学会年会、2014 年 3 月 21 日、仙台国際センター

生田恵梨子、吉岡靖啓、他、ノルアドレナリンによるアストロサイトを介した神経保護作用における MRP1 の関与、第 63 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2013 年 10 月 12 日、同志社女子大学京田辺キャンパス

吉岡靖啓、他、ノルアドレナリンによるアストロサイトを介した神経保護作用に対する MRP1 siRNA の影響、第 123 回日本薬理学会近畿部会、2013 年 7 月 12 日、ウインクあいち

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉岡 靖啓 (Yoshioka Yasuhiro)