

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月18日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究C

研究期間：2009～2011

課題番号：21500348

研究課題名（和文）新規グリア細胞由来神経栄養因子産生促進物質の生体内における有効性と作用機構の解明

研究課題名（英文）Up-regulation of glial cell line-derived neurotrophic factor by newly synthesized cyclopentenone derivatives: Studies on cellular mechanisms *in vitro* and effectiveness *in vivo*

研究代表者

平田 洋子 (Hirata Yoko)

岐阜大学・工学部・准教授

研究者番号：50271523

研究成果の概要（和文）：

申請者らが独自に開発したフェニルチオシクロペンテノン誘導体(GIF-0642, GIF-0643)はC6細胞でグリア細胞由来神経栄養因子など種々の神経栄養因子の発現を転写依存的に増加させ、MAPキナーゼ経路の種々のキナーゼのリン酸化を亢進した。ビオチン化 GIF-0642 を合成し pull-down アッセイ法により GIF-0642 が MAP キナーゼ経路のシグナル分子に結合するかどうかを検討した結果、化合物が Raf に直接結合することが示唆された。一方、フェニルチオシクロペンテノン化合物の *in vivo* における有効性について GIF-0642 をマウスの腹腔内に投与し、RT-PCR 法により種々の神経栄養因子発現に及ぼす影響を検討したが、GIF-0642 は効果を示さなかった。今後、化合物の投与量、溶剤の種類、投与方法などの検討を要する。

研究成果の概要(英文): Newly synthesized (arylthio)cyclopentenone derivatives (GIF-0642, GIF-0643) suppressed manganese-induced apoptosis in PC12 cells by inhibiting caspase activation and cytochrome c release from mitochondria. GIF-0642 and GIF-0643 were also neuroprotective against oxidative stress-induced cell death in mouse hippocampal HT22 cells and C6 glioma cells. GIF-0642 and GIF-0643 bound to peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ) and activated PPAR γ -RXR heterodimers. Furthermore, these compounds induced gene expression of GDNF, BDNF and nerve growth factor (NGF) in C6 glioma cells. GIF-0642 and GIF-0643 stimulated phosphorylation of various signaling molecules in the MAP kinase pathway. We synthesized biotinylated (arylthio)cyclopentenones to study direct interaction between various signaling molecules in the MAP kinase pathway and chemical compounds using a pull-down assay. The results suggest that (arylthio)cyclopentenones directly bind to Raf molecule. On the other hand, intraperitoneal administration of GIF-0642 in mice failed to stimulate neurotrophic factors such as GDNF, BDNF, and NGF in the brain. Further study is required to determine the effects of (arylthio)cyclopentenones on the expression of neurotrophic factors *in vivo*. These include dosage of chemical compounds, solvents for dissolving chemical compounds to use, and the method of administration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：グリア細胞株由来神経栄養因子；脳由来神経栄養因子；神経成長因子；C6 グリオーマ細胞

1. 研究開始当初の背景

グリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)はドーパミンニューロンの生存と軸索伸長に作用する因子であることが示されて以来、パーキンソン病治療への応用が模索されてきた。パーキンソン病疾患モデルのマウス、サルでは、脳内へ GDNF を直接投与すると運動機能が改善され基底核ドーパミンニューロンの変性進行が抑制される (Gash et al., Nature, 1996)。Gill らは第1相臨床試験において、5人のパーキンソン病患者を対象に被殻内に直接カテーテルを介して GDNF の持続注入を行い、その有効性を初めて示した (Nat Med, 2003)。米 Amgen 社は 2004 年にパーキンソン病を対象とした GDNF の第2相臨床試験で主要エンドポイントが達成できなかったことを理由に開発を中止している。しかし、その後 Love らは、パーキンソン病患者の脳の被殻内に投与された GDNF が、臨床的な改善に合わせて、実際に脳のドーパミン神経繊維を伸長させていることを見いだした (Nat Med, 2005)。このように GDNF がパーキンソン病患者のドーパミン神経繊維に有効であることが示されている一方、GDNF の濃度を患部で増加させる方法については確立されていない。脳における GDNF 産生促進には、脳内投与の他に、GDNF 遺伝子を注入する遺伝子治療、GDNF に脳移行性の機能を付加した脳移行型 GDNF の開発などが試みられているがいずれも実用化には至っていないのが実情である。従来の GDNF 産生促進化合物、例えばコンカナマイシンなどは毒性も強く薬としての可能性が低かった。また、他の疾患の治療薬として認可されているアマンタジン、アミトリプチリン、リルゾールなどの GDNF mRNA 産生促進作用はせいぜい対照の 2~3 倍程度で *in vivo*での有効性の報告はない。薬物により脳内の GDNF の産生が促進できればパーキンソン病治療薬ばかりでなく ALS (筋萎縮性側索硬化症) 治療薬としても有望である。

2. 研究の目的

パーキンソン病で死滅するドーパミン神経の生存・維持には GDNF が重要な役割を果たしている。GDNF はペプチド性の神経栄養因子であり、通常の末梢投与では脳への移行性は著しく低くその投与方法は脳内投与に限定される。このため血液脳関門を通過しやすく GDNF 産生促進効果の高い低分子化合物の開発が望まれている。申請者らは、独自に開発したフェニルチオシクロペンテノン誘導体

(GIF-0642, GIF-0643)がグリア細胞において GDNF 産生を著しく亢進することを見いだした。本研究では、この先行研究を進展させ、GIF-0642, GIF-0643 による細胞保護機構および GDNF 産生機構を解明するとともに、これらの化合物が生体内でも GDNF の産生を亢進させ、病態モデル動物に有効であることを明らかにし、新規の治療薬および予防薬開発の基盤となる知見を得ることを目的とする

3. 研究の方法

(1) フェニルチオシクロペンテノン誘導体による細胞保護機構および GDNF の発現誘導機構の解明

① GIF-0642, GIF-0643 の細胞内標的を解明するためにビオチン化誘導体を合成し、pull-down 法によりこれらの化合物が結合するタンパク質を見出す。

② GIF-0642, GIF-0643 による GDNF mRNA 発現誘導に及ぼす各種阻害剤の影響を RT-PCR 法で解析し、MAP キナーゼ経路(阻害剤 U0126)、JNK 経路(阻害剤 SP600125)、プロテインキナーゼ C 経路(阻害剤 rottlerin, Ro-31-8220)などの関与について検討する。

また、GIF-0642, GIF-0643 による生存シグナル活性化について、MAP キナーゼ経路、Akt キナーゼ経路の種々のシグナル分子のリン酸化をウェスタンブロット法により解析する。

③ GIF-0642, GIF-0643 の GDNF 転写調節に対する影響の解析：ラット GDNF プロモーター約 10 kb を pGL3 Basic プラスミドにサブクローニングし、一過性に遺伝子導入する。ルシフェラーゼ活性を測定し、GIF-0642 および GIF-0643 のプロモーター活性に対する影響を調べ GIF-0642, GIF-0643 の作用する領域を明らかにする。

(2) フェニルチオシクロペンテノン誘導体を腹腔内投与し、マウス脳内における GDNF の発現を RT-PCR 法により解析する。また、フェニルチオシクロペンテノン誘導体のパーキンソン病モデルマウスにおける有効性を調べる。ドーパミン神経に及ぼす影響はチロシン水酸化酵素、生存シグナルの活性化に及ぼす影響はリン酸化型 p44/42 MAP キナーゼおよびリン酸化型 Akt キナーゼをウェスタンブロット法により解析する。

4. 研究成果

(1) フェニルチオシクロペンテノン誘導体 (GIF-0642, GIF-0643) は PC12 細胞におけるマンガン誘導性のアポトーシスおよび HT22 細胞、C6 細胞における酸化ストレス誘導性細胞死を抑制した。ビオチン化フェニルチオシクロペンテノン誘導体を合成し pull-down 法により解析した結果、GIF-0643 は peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ) に結合し PPAR γ 経路を介して遺伝子発現を調節することが示唆された (図 1)。C6 細胞を用いて MAP キナーゼなど生存に係るシグナル分子のリン酸化を解析した結果、フェニルチオシクロペンテノン誘導体 (GIF-0642, GIF-0643) は MAP キナーゼ経路の種々のキナーゼのリン酸化を亢進した。GIF-0642 の標的分子を明らかにする目的で、ビオチン化 GIF-0642 用いた pull-down アッセイ法により GIF-0642 が MAP キナーゼ経路のシグナル分子に結合するかを検討した結果、Raf に化合物が直接結合することが示唆された。今後、Raf の細胞内局在をビオチン化化合物の細胞免疫染色法により検討する予定である。

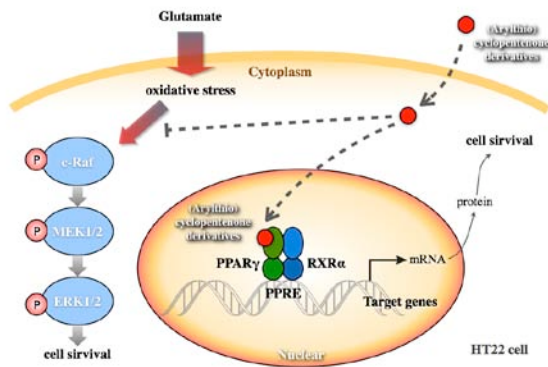


図 1. フェニルチオシクロペンテノン誘導体の PPAR γ 経路を介する遺伝子発現調節機構

また、GIF-0642 などのシクロチオシクロペンテノン誘導体は C6 細胞で GDNF、脳由来神経栄養因子 (BDNF)、神経成長因子 (NGF) など種々の神経栄養因子の発現を転写依存的に増加させた (図 2)。プロモーター活性に対する影響はプロモーター (約 10 kb) の deletion construct を作製しシクロペンテノン誘導体の影響を解析中である。

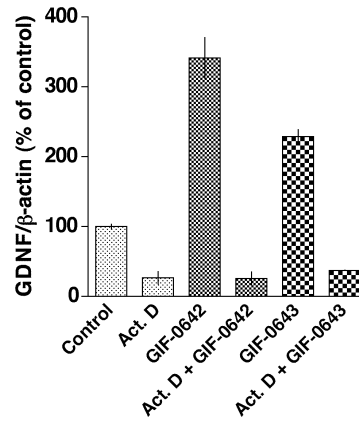


図 2. シクロチオシクロペンテノン誘導体による GDNF mRNA 発現の誘導

(2) GIF-0642 をマウスの腹腔内に投与し、RT-PCR 法により GDNF、BDNF 並びに NGF の発現に及ぼす影響を検討したが、腹腔内投与では GIF-0642 は脳におけるこれら神経栄養因子の発現に影響しなかった。今後、化合物の投与量、溶剤の種類、投与方法などを最適化し、パーキンソン病モデルマウスにおける有効性を検討する予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Shibata S., Maeda M., Furuta K., Suzuki M., Oh-Hashi K., Kiuchi K. and Hirata Y., Neuroprotective effects of (arylthio)cyclopentenone derivatives on manganese-induced apoptosis in PC12 cells, Brain Res, 査読有, Vol. 1294, 2009, pp218-225.
- ② Shibata S., Furuta K., Maeda M., Suzuki M., Oh-Hashi K., Kiuchi K. and Hirata Y., (Arylthio)cyclopentenones derivatives prevent glutamate-induced HT22 cell death through a PPAR gamma-dependent pathway, Brain Res, 査読有, Vol. 1296, 2009, pp196-202.

[学会発表] (計 3 件)

- ① Hirata Y., Shibata S., Furuta K., Suzuki M., Oh-Hashi K., Kiuchi K., (Arylthio)cyclopentenones derivatives prevent glutamate-induced HT22 cell death through a PPAR γ -dependent pathway, Society for Neuroscience (San Diego), 2010.11.16
- ② 岡田文陽、古田享史、鈴木正昭、大橋憲太郎、木内一壽、平田洋子、C6 細胞におけるシクロペンテノン型プロスタグランジン類縁体 NEPP11 による神経栄養因子の誘導、日本生化学会大会 (神戸)、2009 年 10 月 24 日

[その他]
ホームページ等
[http://biomol.gifu-u.ac.jp/~bioinfo1/Bioinfo1/Research_\(2\).html](http://biomol.gifu-u.ac.jp/~bioinfo1/Bioinfo1/Research_(2).html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平田 洋子 (Hirata Yoko)
岐阜大学・工学部・准教授
研究者番号：50271523

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

古田 享史 (Furuta Kyoji)
岐阜大学・医学研究科・准教授
研究者番号：40173538