

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 20 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24406004

研究課題名(和文) 熱帯地域特異的神経変性疾患の現地調査と病因に基づく新規モデル動物作製

研究課題名(英文) Investigation and model preparation of tropical area-specific endemic neurodegenerative diseases

研究代表者

古武 弥一郎 (Kotake, Yaichiro)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・准教授

研究者番号：20335649

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、熱帯植物摂取の食習慣と疾患の因果関係を調査し、その原因に迫ることである。グアム島を中心に、バンレイシ科植物の分布、摂取状況、PD関連疾患患者の食習慣を調査したところ、疾患と植物摂取状況の間には弱い相関が認められた。また、バンレイシ科植物中から単離同定した物質の中で0,0-dimethylcoclaurine (DMC) およびその誘導体の毒性を調べたところ、DMCはP糖タンパク質を阻害し、またその基質となることが明らかとなり、疾患と関係のある物質のひとつである可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study is aimed to investigate the relationship between tropical area-specific endemic neurodegenerative diseases and their dietary habits. We performed a field survey about the distribution of Annona Muricata, the occurrence of the disease, and their dietary habits, especially in Guam. We clarified that 0,0-dimethylcoclaurine (DMC) involved in the Annona Muricata inhibits P-glycoprotein (P-gp) and is also a substrate of P-gp. DMC exerted weak neurotoxicity in in vivo. Taken together, it is suggested that DMC might be one of the candidate substances related to the disease.

研究分野：神経毒性学

キーワード：国際研究者交流 神経変性疾患 熱帯地域 パーキンソン病 P糖タンパク質

1. 研究開始当初の背景

カリブ諸島を中心として発生したパーキンソン病 (PD) 関連疾患、あるいはグアム島で発生した筋萎縮性側索硬化症パーキンソン痴呆複合症 (ALS/PDC) (これらをまとめて PD 関連疾患と呼ぶ) は、特定地域で非常に発生率が高く、風土病に分類される疾患である。PD 関連疾患は、PD と比較してより広範な脳部位の神経細胞が傷害されることを特徴とするが、PD との共通点が多く、その原因も類似していると考えられている。しかし、発症地域が限局され奨励も多くはないため、体系的な研究がなされていないのが現状である。

ところが今から約 15 年前に、「地域特異的 PD 関連疾患患者 87 名全員が、カリブ地域をはじめとする熱帯地方において、ごく一部の住民しか食用としないバンレイシ科植物サワーソップを摂取している」という疫学調査が報告された。果実の成分が本疾患と何らかの関係がある可能性があり、原因物質の同定と治療薬の開発が望まれている。

一方、PD 患者では血液脳関門の機能不全が報告されており P 糖タンパク質 (P-gp) による脳内から毒物の排出が充分に行われていないという報告も存在する。熱帯地域特異的 PD 関連疾患における明確な報告はないが、同様に P-gp 活性が低下している可能性がある。これを PD 発症仮説のひとつである神経毒説と関連付けて考えると、「P-gp 機能不全のため、P-gp の基質となる毒性物質が排出されずに脳に蓄積することにより、地域特異的 PD 関連疾患が発症する」という仮説が考えられる。

2. 研究の目的

上記背景を踏まえて本研究の目的は、熱帯植物摂取の食習慣と疾患の因果関係を調査するとともに、当該地域における果実に含まれる神経毒性物質を用いて毒性研究を行い、

毒性メカニズムに迫ることである。

3. 研究の方法

1) 疾患と植物摂取に関する現地調査

日本からのアクセスが便利なグアム島を中心に、バンレイシ科植物の分布、摂取状況、PD 関連疾患患者の食習慣を調査し、PD 関連疾患とバンレイシ科植物摂取の関係を継続的に調べた。

2) 細胞死評価

ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y に、*O,O*-dimethylcoclaurine (DMC) およびその誘導体を様々な濃度で添加し、24 および 48 時間後にミトコンドリア還元能を指標とする WST-1 法により細胞死を評価した。

3) ラット P-gp 阻害活性および P-gp 基質評価

In vitro 反転小腸法を用いて DMC およびその誘導体の P-gp 阻害活性を調べた。SD ラットより小腸下部の回腸を摘出し、反転小腸を作製した。反転小腸内に P-gp 基質である Rho123 を、外液に DMC およびその誘導体を加え、Rho123 の反転小腸外への輸送活性を HPLC 蛍光検出器により測定した。

また、同様の方法により DMC およびその誘導体自身が基質となるか否かを調べた。

4) ヒト P-gp 基質評価

DMC およびその誘導体がヒト P-gp の基質となるか否かを、ヒト P-gp 発現メンブレンを用いて ATPase 活性を測定することにより調べた。

5) *In vivo* 神経毒性評価

DMC を C57BL マウスに腹腔内投与し、脳移行性を HPLC により調べた。また、投与マウスの自発的運動量を調査したり、げっ歯類においてパーキンソン病様症状を調べるた

めのポールテストを行い、DMC の神経毒性を主として行動薬理的に評価した。

4 . 研究成果

1) 疾患と植物摂取に関する現地調査

研究協力者と協力して行った調査により、バンレイシ科植物の分布、PD 関連疾患患者の植物摂取状況に関して、僅かではあるものの新たな知見が得られた。また、疾患と植物摂取状況の間には弱い相関が認められた。

2) 細胞死評価

バンレイシ科植物トゲバンレイシより単離 同定した物質の中で、*O,O*-dimethylcoclaurine (DMC) はベンジリソキノリン誘導体であり、神経毒性が予想される。そこで、DMC およびその誘導体の神経細胞死を評価したところ、いずれも強力な神経細胞毒性は認められなかった。評価した化合物の中では DMC の細胞毒性が最も強く、200 μ M で 48 時間後に細胞生存率が約 50% になった。

3) ラット P-gp 阻害活性および P-gp 基質評価

我々は、一部のテトラヒドロイソキノリン誘導体が P-gp 阻害活性を有することや、P-gp の基質となることを明らかにしている。そこで、DMC およびその誘導体がラット P-gp 活性を阻害するか調べたところ、DMC は P-gp 活性を阻害した。また、ラット P-gp の基質となるか否かについても調べたところ、DMC が細胞外液から検出され、この輸送は P-gp 阻害剤ベラパミルにより阻害された。これらの結果より、DMC はラット P-gp を阻害し、かつ基質となることが示唆された。

4) ヒト P-gp 基質評価

DMC およびその誘導体がヒト P-gp の基質になるか否かを調べたところ、DMC により

ATPase 活性が認められたことから、DMC はヒト P-gp の基質になることが示唆された。

5) *In vivo* 神経毒性評価

DMC を 100 mg/kg, 5 日間腹腔内投与すると、ポールテストによる行動遅延が認められた。更に投与量を下げて、検討を行う予定である。

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 12 件)

1. Yamada S, Kotake Y, Nakano M, Sekino Y, Kanda Y. Tributyltin induces mitochondrial fission through NAD-IDH dependent mitofusin degradation in human embryonic carcinoma cells. *Metallomics*, in press. (査読有)

2. Sanoh S, Naritomi Y, Fujimoto M, Sato K, Kawamura A, Horiguchi A, Sugihara K, Kotake Y, Ohshita H, Tateno C, Horie T, Kitamura S, Ohta S. Predictability of plasma concentration-time curves in humans using single-species allometric scaling of chimeric mice with humanized liver. *Xenobiotica* **2015**, 1-10. (査読有)

3. Kotake Y*, Sekiya Y, Okuda K, Ohta S. Detection of a novel neurotoxic metabolite of Parkinson's disease-related neurotoxin, 1-benzyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline. *J. Toxicol. Sci.* **39**, 749-754 (2014). (査読有)

4. Yamada S, Kotake Y, Demizu Y, Kurihara M, Sekino Y, Kanda Y. NAD-dependent isocitrate dehydrogenase as a novel target of tributyltin in human

embryonic carcinoma cells. *Scientific Reports* **4**, 5952 (2014). (査読有)

5. Sanoh S, Santoh M, Takagi M, Kanayama T, Sugihara K, Kotake Y, Ejiri Y, Horie T, Kitamura S, Ohta S. Fluorometric assessment of acetaminophen-induced toxicity in rat hepatocyte spheroids seeded on micro-space cell culture plates. *Toxicol. In Vitro* **28**, 1176-1182 (2014). (査読有)

6. Contu VR, Kotake Y*, Toyama T, Okuda K, Miyara M, Sakamoto S, Samizo S, Sanoh S, Kumagai Y, Ohta S. Endogenous neurotoxic dopamine derivative covalently binds to Parkinson's disease-associated ubiquitin C-terminal hydrolase L1 and alters its structure and function. *J. Neurochem.* **130**, 826-838 (2014). (査読有)

7. Isomura M, Kotake Y*, Masuda K, Miyara M, Okuda K, Samizo S, Sanoh S, Hosoi T, Ozawa K, Ohta S. Tributyltin-induced endoplasmic reticulum stress and its Ca²⁺-mediated mechanism. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **272**, 137-146 (2013). (査読有)

8. Ishida K, Kotake Y, Miyara M, Aoki K, Sanoh S, Kanda Y, Ohta S. Involvement of decreased glutamate receptor subunit GluR2 expression in lead-induced neuronal cell death. *J. Toxicol. Sci.* **38**, 513-521 (2013). (査読有)

9. Yamada S, Kotake Y, Sekino Y, Kanda Y. AMP-activated protein kinase-mediated glucose transport as a novel target of tributyltin in human embryonic carcinoma

cells. *Metallomics* **5**, 484-491 (2013). (査読有)

10. Kotake Y*. Molecular mechanisms of environmental organotin toxicity in mammals. *Biol. Pharm. Bull.* **35**, 1876-1880 (2012). (review) (査読有)

11. Klionsky DJ, . . . , Kotake Y et al., (1270人中548番目) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* **8**, 445-544 (2012). (査読有)

12. Sanoh S, Horiguchi A, Sugihara K, Kotake Y, Tayama Y, Uramaru N, Ohshita H, Tateno C, Horie T, Kitamura S, Ohta S. Predictability of metabolism of ibuprofen and naproxen using chimeric mice with human hepatocytes. *Drug Metab. Dispos.* **40**, 2267-2272 (2012). (査読有)

13. Matsushige A, Matsunami K, Kotake Y, Otsuka H, Ohta S. Three new egastigmanes from the leaves of *Annona muricata*. *J. Nat. Med.* **66**, 284-291 (2012). (査読有)

[学会発表](計12件)

1. 増田恭一、古武弥一郎、磯村 緑、岡村知香、太田 茂 「翻訳開始因子 eIF2 を介した有機スズ誘導性細胞ストレス経路の解明」 第53回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会 2014年11月8日 広島

2. 梅田香苗、古武弥一郎、杉山千尋、石田慶士、太田 茂 「GluR2 発現減少を惹起する環境化学物質の探索」 第53回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会 2014年11月9日 広島

3. 杉山千尋、古武弥一郎、山口雅史、津山由美、奥田勝博、太田 茂 「GluR2 発現減少を指標とした in vitro 神経毒性評価系の構築」 第 53 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会 2014 年 11 月 9 日 広島

4. 足立 暁、古武弥一郎、山本智美、菅田和子、太田 茂 「ミトコンドリア呼吸鎖阻害剤による細胞外グルタミン酸上昇とその細胞応答」 第 53 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会 2014 年 11 月 9 日 広島

5. 古武弥一郎、神野麻美、奥田勝博、田中早紀、石田慶士、阿南弥寿美、小椋康光、太田 茂 「有機スズ投与ラットにおける BDNF 発現減少とうつ病様症状」 第 25 回日本微量元素学会学術集会 2014 年 7 月 4 日 岡山

6. Yaichiro Kotake, Tomomi Yamamoto, Satoshi Adachi, Kouta Kouno, Shigeru Ohta. Increased expression of glutamate transporter EAAT3 by rotenone. Eurotox 2014 2014 年 9 月 8 日 エディンバラ (スコットランド)

7. 杉山千尋、古武弥一郎、津山由美、奥田勝博、太田 茂 「神経脆弱化の指標となる GluR2 発現簡便評価系の開発」 フォーラム 2013 衛生薬学・環境トキシコロジー 2013 年 9 月 13 日 福岡

8. 石田慶士、古武弥一郎、宮良政嗣、青木香織、佐能正剛、諫田泰成、太田 茂 「グルタミン酸が関与する鉛の神経毒性メカニズムの解明」 フォーラム 2013 衛生薬学・環境トキシコロジー 2013 年 9 月 13 日 福岡

9. 神野麻美、古武弥一郎、田中早紀、奥田勝博、阿南弥寿美、小椋康光、太田 茂 「有機スズ投与動物の脳内における BDNF 発現減少とうつ病様症状の関連」 フォーラム 2013 衛生薬学・環境トキシコロジー 2013 年 9 月 13 日 福岡

10. Yaichiro Kotake, Midori Isomura, Kyoichi Masuda, Masatsugu Miyara, Katsuhiko Okuda, Shigeyoshi Samizo, Seigo Sanoh, Toru Hosoi, Koichiro Ozawa, Shigeru Ohta. Tributyltin-induced endoplasmic reticulum stress and its mechanism. Eurotox 2013 2013 年 9 月 3 日 インターラーケン (スイス)

11. Contu Raluca、古武弥一郎、佐溝茂良、外山喬士、新開泰弘、熊谷嘉人、太田 茂 「パーキンソン病関連カテコールは UCH-L1 に共有結合し、活性低下及び蓄積を引き起こす」 第 51 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会 2012 年 11 月 10 日 松江

12. 神野麻美、古武弥一郎、増田恭一、奥田勝博、太田 茂 「トリブチルスズによる BDNF の発現減少」 第 51 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会 2012 年 11 月 10 日 松江

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古武弥一郎 (KOTAKE YAICHIRO)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・准教授

研究者番号：20335649

(2)研究分担者

太田 茂 (OHTA SHIGERU)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号：60160503

村田美穂 (MURATA MIHO)

国立精神神経センター・病院 (神経内科診療部)・部長

研究者番号：30282643