

酸化ストレスに対して神経細胞保護作用を有する化合物の作用機序の解明

原 宏和

Molecular Mechanism of Neuroprotective Drugs against Oxidative Stress-Induced Neuronal Cell Death

Hirokazu HARA

*Laboratory of Clinical Pharmaceutics, Gifu Pharmaceutical University,
5-6-1 Mitahora-higashi, Gifu City 502-8585, Japan*

(Received April 12, 2007)

NF-E2-related factor-2 (Nrf2), a basic leucine zipper transcription factor, is involved in the expression of numerous detoxifying and antioxidant genes via the antioxidant response element (ARE). Keap1, a cytoplasmic protein, sequesters Nrf2 in the cytoplasm under normal conditions. Various stimuli, including electrophiles and oxidative stress, liberate Nrf2 from Keap1, allowing Nrf2 to translocate into the nucleus and to bind to the ARE. Recently, there is increasing evidence that compounds that stimulate the activation of the Nrf2-ARE pathway may become useful therapeutic drugs for neurodegenerative diseases associated with oxidative stress. Apomorphine (Apo), a dopamine D₁/D₂ receptor agonist, is used for clinical therapy of Parkinson's disease. On the other hand, Apo is a potent radical scavenger and has protective effects on oxidative stress-induced cell death. We previously reported that pretreatment of human neuroblastoma SH-SY5Y cells with Apo enhanced the protective effects. In addition, we have recently demonstrated that Apo stimulates the translocation of Nrf2 into the nucleus and the transactivation of the ARE. Our findings suggest that not only the function as a radical scavenger, but also the function as an Nrf2-ARE pathway activator may be involved in the neuroprotective effects of Apo on oxidative stress-induced neuronal cell death. In this review, our recent studies on the mechanism underlying Apo-induced neuroprotection are summarized.

Key words—apomorphine; oxidative stress; neuroprotection; neuronal cell death; transcription factor

1. はじめに

高齢化社会を迎えた現代において、老化に伴いその発症頻度が増すアルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患の原因解明と治療法の開発は重要な課題である。酸素を利用しエネルギーを得る生物の体内では、常に活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) が産生されている。ROSはその高い反応性からタンパク質、脂質、DNAなどの機能分子を修飾することで、細胞機能の障害を引き起こす。細胞はROSに対する防御機構を備えているが、細胞の内外で過剰に産生されるROSを十分に処理できないときに酸化ストレスが生じる。神経変性疾患の発症や症状の進展にROSの関与が指摘さ

れており、神経細胞の酸化ストレスに対する脆弱性が問題となっている。しかし、薬剤などにより細胞に本来備わっているROSに対する防御機構を増強させることで、酸化ストレスに対する神経細胞の脆弱性を改善することができれば、上述の神経変性疾患の治療につながると考えられる。

異物代謝や酸化ストレス応答において重要な転写因子であるNF-E2 related factor 2 (Nrf2)は、薬物代謝第2相酵素や抗酸化タンパク質などの遺伝子の upstream に存在する抗酸化剤応答配列 (antioxidant response element; ARE) に結合することで、これらの遺伝子の発現を調節している。¹⁻³⁾ Nrf2の活性化は一群の抗酸化タンパク質の発現を亢進させることから、Nrf2-ARE経路は酸化ストレスに対する生体防御機構において中心的な役割を担っていると考えられている。近年、筆者は、酸化ストレスにより惹起される神経細胞障害に対して神経細胞保護作用を有する低分子医薬品の開発を最終目標として研究

岐阜薬科大学医療薬剤学大講座臨床薬剤学研究室
(〒502-8585 岐阜市三田洞東 5-6-1)

e-mail: harah@gifu-pu.ac.jp

本総説は、平成18年度日本薬学会東海支部学術奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

を進めてきた。ドパミン D_1/D_2 受容体アゴニストであるアポモルフィン (Apo) は酸化ストレスに対する細胞保護作用を有していることが報告されているが,⁴⁻⁶⁾ 最近, 筆者らは, Apo のこの保護作用に Nrf2-ARE 経路が関与していることを明らかにした。⁷⁾ 本稿では Nrf2-ARE 経路を介した酸化ストレスに対する神経細胞保護作用について, 筆者らの研究成果を中心に紹介する。

2. Keap1-Nrf2 システム

Nrf2 は, NAD(P)H: キノンオキシドレダクターゼ 1 (NQO1) などの薬物代謝第 2 相酵素やヘムオキシゲナーゼ 1 (HO-1) などの抗酸化タンパク質の誘導に關与する塩基性ロイシンジッパー型の転写因子である。¹⁻³⁾ Nrf2 は刺激のない状態では細胞質に存在するシステインに富むタンパク質 Keap1 と結合し細胞質内に局在している。しかし, Keap1 に内在するシステイン残基が親電子性物質や ROS などにより酸化的修飾を受けたとき, Keap1 のコンフォメーション変化が起こり, Nrf2 は Keap1 から解離し, 核内に移行する。^{8,9)} また, 近年, Nrf2 の活性化機構にユビキチン-プロテアソームによるタンパク質分解系が関与していることも明らかとなった。¹⁰⁾ Keap1 はユビキチン化に關与するユビキチンリガーゼ Cullin3 と結合しており, 定常状態で Cullin3 は Nrf2 をユビキチン化し, Nrf2 の分解を促進している。しかし, 親電子性物質などの刺激により Keap1 と Nrf2 が解離することで, Nrf2 の分解は抑制され, Nrf2 の核への移行・蓄積が促進される。核内に移行した Nrf2 は, 小 Maf 因子とヘテロダイマーを形成し ARE に結合することで, NQO1, グルタチオン-S-トランスフェラーゼ, HO-1 などの抗酸化タンパク質の発現を亢進させる (Fig. 1)。ARE は TGACNNNGCA というコンセンサス配列であることが報告されている。¹¹⁾

3. tert-ブチルヒドロキノン (tBHQ) の神経細胞保護作用

Nrf2 は抗酸化タンパク質の発現調節において重要な役割を担っていることから, Nrf2-ARE 経路を活性化する薬物は, 酸化ストレスに対する神経細胞の適応性を亢進させることで, 酸化ストレスによる神経細胞障害を抑制できるのではないかと考えられている。tBHQ は, 海外において抗酸化剤として使用されている食品添加物であり, また, 薬物代謝第

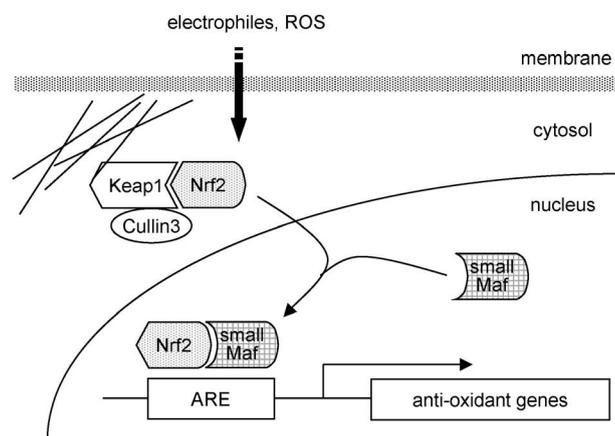


Fig. 1. Mechanism of Activation of Keap1-Nrf2 System
ARE: antioxidant response element.

2 相酵素や HO-1 の誘導剤としても知られている。tBHQ によるこれらの酵素の発現には Nrf2 を介した ARE の活性化が関与していることも報告されている。^{12,13)} そこで, 筆者らは, tBHQ をモデル化合物として, Nrf2-ARE 経路を活性化する薬物が酸化ストレスによる細胞障害を抑制するかどうかをヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞を用いて検討した。¹⁴⁾ 細胞に酸化ストレスを惹起させる試薬として, パーキンソン病のモデル動物の作成に用いられる 6-ヒドロキシドパミン (6-OHDA) を使用した。6-OHDA を SH-SY5Y 細胞に曝露させると, 濃度依存的に SH-SY5Y 細胞の細胞障害が惹起されるが, tBHQ で細胞を 24 時間前処置することにより, 6-OHDA による細胞障害は tBHQ 濃度依存的に抑制された。6-OHDA による細胞障害はグルタチオンや N-アセチルシステイン (NAC) などの抗酸化剤により抑制されることから, 6-OHDA による神経細胞障害には ROS が関与していることが示唆されている。しかし, tBHQ で前処置した細胞では 6-OHDA による ROS の産生が抑制された。これらの結果は, tBHQ の前処置は 6-OHDA により生じる酸化ストレスを抑制することで, tBHQ の神経細胞保護作用が発現していることを示している。

4. tBHQ による Nrf2-ARE 経路の活性化は細胞の抗酸化能を亢進させる

次に, tBHQ 前処置による保護作用は SH-SY5Y 細胞の抗酸化能が亢進した結果ではないかと考え, NQO1 や HO-1 の発現量や細胞内の抗酸化物質であるグルタチオン量を測定した。その結果, tBHQ

濃度依存的に NQO1 や HO-1 の発現が誘導されること、tBHQ 濃度依存的に細胞内グルタチオン量が増加することが明らかとなった。また、SH-SY5Y 細胞においても tBHQ により Nrf2-ARE 経路が活性化されているかどうかを NQO1 遺伝子の ARE 領域を組み込んだレポーター遺伝子を用いて検討した。その結果、tBHQ は濃度依存的に ARE を活性化することが示された。以上のことから、tBHQ により Nrf2 を介して抗酸化遺伝子の発現が誘導され、酸化ストレスに対する適応性が亢進した結果、SH-SY5Y 細胞の酸化ストレスに対する脆弱性が改善されたと考えられる。また、過酸化水素による神経細胞障害も tBHQ の前処置により抑制されることが他の研究グループから報告されている。^{15,16} 以上の結果から、Nrf2-ARE 経路を活性化する化合物は、酸化ストレスによる神経細胞障害を抑制することから新規な神経保護薬になり得るのではないかと

考えられた。

5. Apo の神経保護作用の分子機構

5-1. 酸化ストレスに対する Apo の神経保護作用
 ドパミン D₁/D₂ 受容体アゴニストである Apo は、進行期パーキンソン病における運動症状の改善に有効であることが報告され、^{17,18} 欧米ではパーキンソン病の治療薬として用いられている。一方で、Apo はラジカル消去作用を有していることが知られており、酸化ストレスに対する Apo の細胞保護効果が検討されてきた。筆者らも、Apo が 6-OHDA により惹起される酸化ストレスによる神経細胞死を抑制するかどうかを検討し、Apo 存在下で 6-OHDA を SH-SY5Y 細胞に曝露させたとき、Apo 濃度依存的に 6-OHDA による細胞障害が抑制されること (Fig. 2(A))、6-OHDA による細胞内 ROS の産生が Apo 存在下で抑制されることなどを明らかにしている。⁶ Apo は過酸化水素による神経

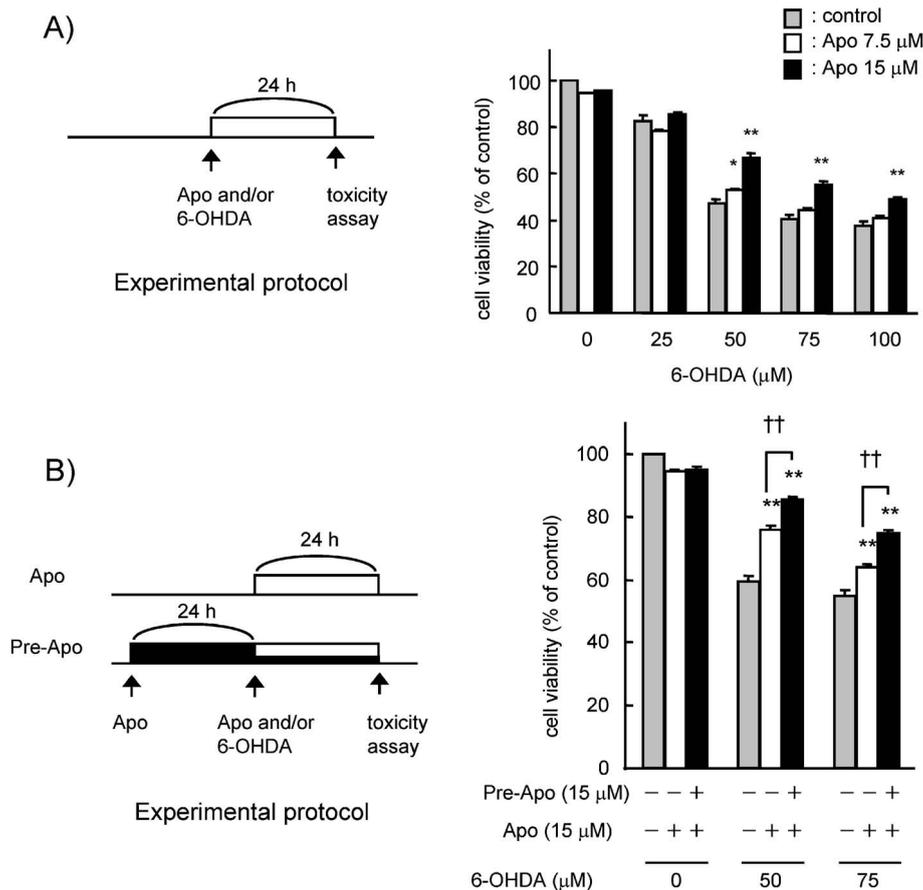


Fig. 2. Apo Protects against 6-OHDA-induced Cell Death

A: SH-SY5Y cells were exposed to various concentrations of 6-OHDA for 24 h in the presence or the absence of Apo. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (vs. cells treated with 6-OHDA alone). B: SH-SY5Y cells were pretreated with and without Apo for 24 h. After the medium was removed, the cells were exposed to 6-OHDA or vehicle for 24 h in the presence or the absence of Apo. ** $p < 0.01$ (vs. cells treated with 6-OHDA alone) and †† $p < 0.01$.

細胞障害も抑制することが報告されているが、この保護作用は Apo の光学異性体で薬理活性を有していない S 体を用いたときにも同様の効果があったことから、Apo のこの保護作用はドパミン受容体を介したのではないと考えられている。⁹⁾ また、神経細胞以外の細胞でも Apo の保護作用は検討されており、ラット心臓を用いた実験で虚血再還流による心筋細胞障害が Apo の投与より抑制されることが報告されている。¹⁹⁾ これらの結果は Apo 自身の強い抗酸化作用による効果と考えられることから、Apo のこの作用は酸化ストレスに対する細胞保護作用の発現にとって重要である。

5-2. Apo によるプレコンディショニング効果
In vivo の実験から心臓や脳に対して致死的とならないストレス(軽い虚血など)を負荷させることで、その後の強いストレス(虚血、酸化ストレスなど)による細胞障害が軽減されることが報告されている。²⁰⁾ このような現象はプレコンディショニング(preconditioning, PC)として知られており、軽い虚血などにより細胞のストレスに対する抵抗性が亢進したためではないかと考えられているが、PC 作用発現のメカニズムは現在でもまだ完全には解明されていない。また、薬剤により細胞を処置することで、虚血性 PC と同様の保護効果が認められることも報告されている。^{21,22)} それゆえ、酸化ストレスに

対する抵抗性を亢進させるような PC 作用を有する化合物は、酸化ストレスが関与する神経変性疾患の予防薬や治療薬となる可能性がある。

筆者らは、6-OHDA を曝露させる前に Apo で SH-SY5Y 細胞を 24 時間前処置したのち、Apo 存在下で 6-OHDA を細胞に曝露させたとき、Apo で 24 時間前処置した細胞では、前処置しない細胞に比べ、Apo の細胞保護作用が亢進していることを明らかにしている (Fig. 2(B))。この結果は、Apo で SH-SY5Y 細胞を前処置することにより細胞が酸化ストレスに対する抵抗性を獲得したことを示しており、Apo の前処置により PC 効果が発現している可能性が考えられた。そこで、Apo で細胞を前処置するだけでも Apo が 6-OHDA による細胞障害に対して保護作用を示すかどうかを検討した。Apo で SH-SY5Y 細胞を 24 時間前処置したのち、Apo を完全に培地から除き、続いて 6-OHDA を細胞に曝露させた。その結果、Fig. 3(A)に示すように、Apo は濃度依存的に 6-OHDA による SH-SY5Y 細胞障害を抑制することが明らかとなり、Apo が PC 作用を有する化合物であることが示された。

次に、Apo はドパミン D₁/D₂ 受容体アゴニストであることから、Apo の PC 作用発現にドパミン受容体が関与しているかどうかをドパミン D₁ 受容体アンタゴニストである SCH23390 とドパミン D₂

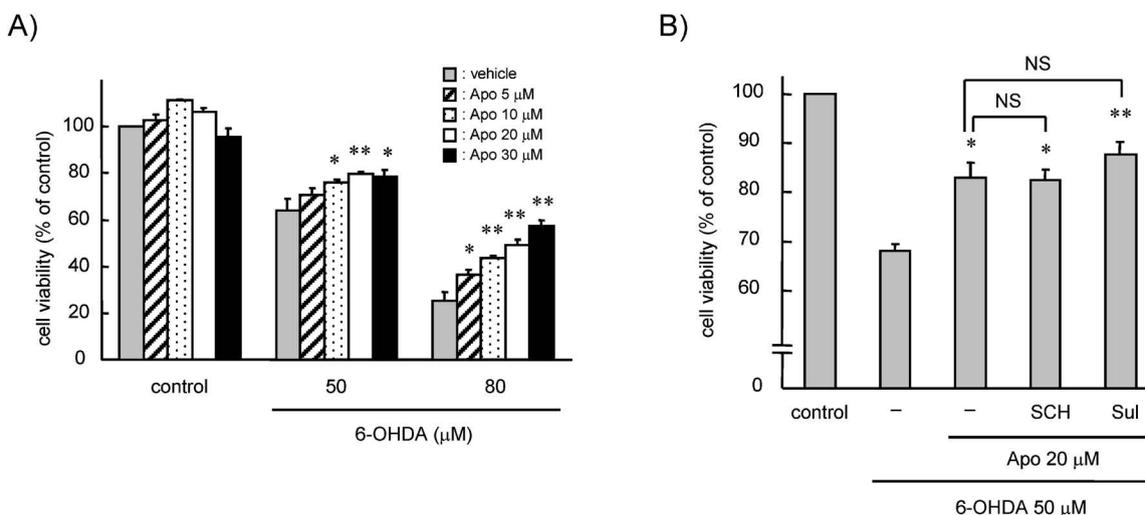


Fig. 3. Preconditioning Effect of Apo on 6-OHDA-induced Cell Death

A: SH-SY5Y cells were pretreated with various concentrations of Apo. After the medium containing Apo was completely removed, the pretreated cells were exposed to 6-OHDA for 24 h in the absence of Apo. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (vs. cells treated with 6-OHDA alone). B: Effect of dopamine receptor antagonists on neuroprotection by Apo. SH-SY5Y cells were pretreated for 30 min with either SCH23390 (SCH: 10 μM) or sulpiride (Sul: 10 μM), and then Apo was added. Twenty-four hours later, the medium containing the reagents was completely removed, and the cells were exposed to 6-OHDA for 24 h in the absence of Apo. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (vs. cells treated with 6-OHDA alone). NS: not significant.

受容体アンタゴニストであるスルピリドを用いて検討した。Figure 3 (B)に示すように、どちらのアンタゴニスト存在下においても Apo の 6-OHDA 細胞障害に対する保護作用は影響を受けなかった。この結果から、Apo の PC 作用はドパミン受容体を介したものではないことが示唆された。

5-3. Apo は Nrf2-ARE 経路を活性化する 上述したように、SH-SY5Y 細胞が tBHQ 前処置により酸化ストレスに対する適応性を獲得する上で、Nrf2-ARE 経路は重要な役割を担っている。また、興味深いことに、カテコールが ARE を活性化することも報告されている。⁸⁾ それゆえ、筆者らは、カテコール骨格を有する Apo の PC 作用発現にも Nrf2-ARE 経路を介したメカニズムが関与しているのではないかと考え、Apo が Nrf2-ARE 経路を活性化するかどうかを検討した。ARE の活性化には、

Nrf2 の核移行が重要なステップとなることから、Apo により Nrf2 の核移行が促進されるかどうかをウエスタンブロット法を用いて検討したところ、Apo による Nrf2 の核内への移行が確認できた (Fig. 4 (A))。また、Nrf2 の活性化を ARE のレポーター遺伝子を用いたレポーターアッセイにより検討したところ、Apo 濃度依存的にレポーター活性が上昇した。これらの結果から、Apo が Nrf2-ARE 経路を活性化することが示された。また、この経路の活性化は HO-1 などの抗酸化タンパク質の発現を誘導することから、Apo が HO-1 の発現を誘導するかどうかを検討したところ、Apo により濃度依存的に HO-1 の発現は亢進した。以上のことから、Apo で SH-SY5Y 細胞を前処置することにより Nrf2-ARE 経路が活性化された結果、細胞の酸化ストレスに対する抵抗性が亢進したことで Apo

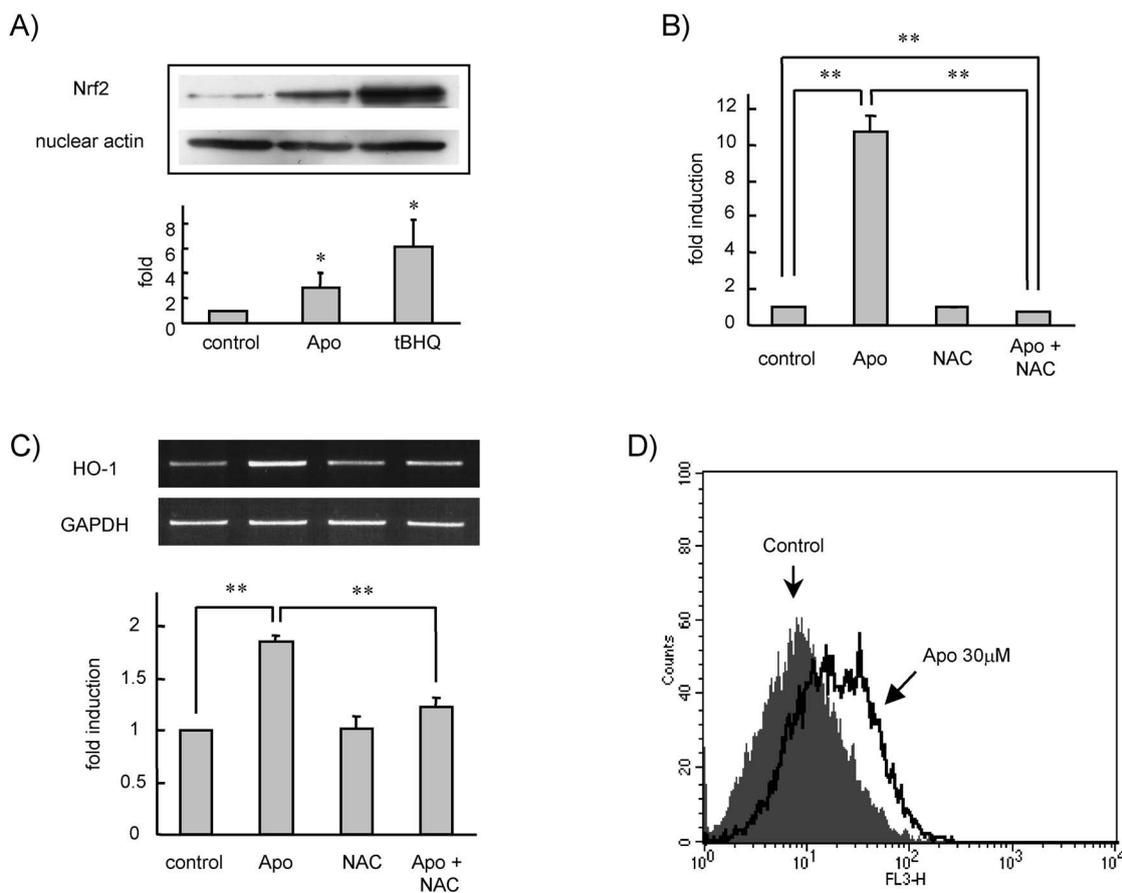


Fig. 4. Activation of Nrf2-ARE Pathway by Apo

A: Translocation of Nrf2 into the nucleus. Nuclear extracts were prepared from SH-SY5Y cells treated with Apo (30 μM) and tBHQ (50 μM) for 3.5 h. Western blot analysis was performed using anti-Nrf2 and anti-actin antibodies. * $p < 0.05$ (vs. control). B: Involvement of ROS in the activation of the ARE by Apo. SH-SY5Y cells were transiently transfected with the ARE-reporter plasmid, then treated with Apo (30 μM) for 4.5 h in the presence or the absence of NAC (2 mM). ** $p < 0.01$. C: Involvement of ROS in the induction of HO-1 mRNA by Apo. SH-SY5Y cells were treated with Apo (30 μM) for 24 h in the presence or the absence of NAC (1 mM). ** $p < 0.01$. D: Production of ROS by Apo. Serum-starved SH-SY5Y cells were treated with Apo for 2 h. The cells were analyzed for DHE fluorescence by a FACSscan.

のPC作用が発現していると考えられた。近年、モノアミノオキシダーゼ阻害剤であるデプレニル,²³⁾ プロスタサイクリンの誘導体である NEPP11,²⁴⁾ オーストラリア産の植物から単離されたトリテルペノイド²⁵⁾などの多くの化合物に Nrf2-ARE 経路を介した細胞保護作用があることが報告されている。

5-4. ApoによるNrf2-ARE経路の活性化におけるROSの関与 次に、Apoがどのような機構によりNrf2-ARE経路を活性化しているかを検討した。ROSによりNrf2-ARE経路が活性化されること、¹²⁾ 高濃度のApoの曝露により生じるROSが細胞死を誘発すること²⁶⁾などから、ApoによるNrf2-ARE経路の活性化にROSが関与しているのではないかと考えられた。そこで、ApoによるAREの活性化やHO-1の発現誘導にROSが関与しているかどうかを抗酸化剤NACを用いて検討した。その結果、Figs. 4(B), (C)に示すように、ApoによるAREの活性化やHO-1の発現誘導が、NAC存在下で抑制されることが示された。次に、ApoによりSH-SY5Y細胞内で実際にROSが産生されているかどうかをフローサイトメトリーにより検討した。ApoでSH-SY5Y細胞を2時間処置したのち、ROS感受性蛍光プローブを用いてROSの産生を測定した。Figure 4(D)に示すように、Apoの処置により細胞内の蛍光強度が増加したことから、Apoにより細胞内にROSが産生されていることが示された。以上の結果から、ApoによるNrf2-ARE経路の活性化には、ROSが重要なシグナル分子として作用していることが明らかとなった。また、最近、虚血再還流による細胞障害に対する虚血性PCの細胞保護作用にNrf2-ARE経路が関与していること、この経路の活性化にROSが重要な因子として作用していることが報告された。²⁷⁾ これらの事実から、細胞の防御機構の発現においてROSは重要なシグナル伝達分子として作用すること、細胞障害を生じさせない程度の弱い酸化ストレスは細胞にとって保護的に作用していることが示唆された。

6. おわりに

パーキンソン治療薬の中には本来の薬理作用と異なる機序により神経保護作用を示す医薬品がいくつか報告されている。本研究で筆者らは、パーキンソン治療薬のApoの酸化ストレスに対する神経細胞保護作用の発現には、Apo自身のラジカル消去作

用に加え、Nrf2-ARE経路の活性化剤としての作用が重要な役割を担っていることを明らかにした。以上のことから、ApoのようにKeap1-Nrf2-AREシステムを活性化する薬剤やPC作用を有する薬剤は、神経変性疾患や虚血性脳血管障害の予防や病態の改善の有効な治療薬になることが期待される。

謝辞 本研究の遂行に当たりご指導とご鞭撻を賜りました岐阜薬科大学教授足立哲夫先生に心より感謝いたします。この研究の一部は、日本学術振興会科学研究費補助金(基盤研究)及び岐阜県脳医学研究振興補助金により実施されたことを付記します。

REFERENCES

- 1) Venugopal R., Jaiswal A. K., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**, 14960–14965 (1996).
- 2) Itoh K., Chiba T., Takahashi S., Ishii T., Igarashi K., Katoh Y., Oyake T., Hayashi N., Satoh K., Hatayama I., Yamamoto M., Nabeshima Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **236**, 313–322 (1997).
- 3) Alam J., Stewart D., Touchard C., Boinapally S., Choi A. M., Cook J. L., *J. Biol. Chem.*, **274**, 26071–26078 (1999).
- 4) Gassen M., Glinka Y., Pinchasi B., Youdim M. B., *Eur. J. Pharmacol.*, **308**, 219–225 (1996).
- 5) Gassen M., Gross A., Youdim M. B. H., *Mov. Disord.*, **13**, 661–667 (1998).
- 6) Hara H., Ohta M., Ohta K., Kuno S., Adachi T., *Redox Rep.*, **8**, 193–197 (2003).
- 7) Hara H., Ohta M., Adachi T., *J. Neurosci. Res.*, **84**, 860–866 (2006).
- 8) Itoh K., Wakabayashi N., Katoh Y., Ishii T., Igarashi K., Engel J.D., Yamamoto M., *Genes Dev.*, **13**, 76–86 (1999).
- 9) Dinkova-Kostova A. T., Holtzclaw W. D., Cole R. N., Itoh K., Wakabayashi N., Katoh Y., Yamamoto M., Talalay P., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**, 11908–11913 (2002).
- 10) Kobayashi A., Kang M. I., Okawa H., Ohtsuji M., Zenke Y., Chiba T., Igarashi K., Yamamoto M., *Mol. Cell. Biol.*, **24**, 7130–7139 (2004).
- 11) Rushmore T. H., Morton M. R., Pickett C. B., *J. Biol. Chem.*, **266**, 11632–11639 (1991).
- 12) Lee J. M., Moehlenkamp J. D., Hanson J.

- M., Johnson J. A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **280**, 286–292 (2001).
- 13) Kang K. W., Lee S. J., Park J. W., Kim S. G., *Mol. Pharmacol.*, **62**, 1001–1010 (2002).
- 14) Hara H., Ohta M., Ohta K., Kuno S., Adachi T., *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **119**, 125–131 (2003).
- 15) Murphy T. H., De Long M. J., Coyle J. T., *J. Neurochem.*, **56**, 990–995 (1991).
- 16) Li J., Lee J. M., Johnson J. A., *J. Biol. Chem.*, **277**, 388–394 (2002).
- 17) Hughes A. J., Bishop S., Kleedorfer B., Turjanski N., Fernandez W., Lees A. J., Stern G. M., *Mov. Disord.*, **8**, 165–170 (1993).
- 18) Lees A. J., *Fundam. Clin. Pharmacol.*, **7**, 121–128 (1993).
- 19) Khaliulin I., Schneider A., Houminer E., Borman J. B., Schwalb H., *Free Radic. Biol. Med.*, **40**, 1713–1720 (2006).
- 20) Dirnagl U., Simon R. P., Hallenbeck J. M., *Trends Neurosci.*, **26**, 248–254 (2003).
- 21) McLaughlin B., Hartnett K. A., Erhardt J. A., Legos J. J., White R. F., Barone F. C., Aizenman E., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **100**, 715–720 (2003).
- 22) Soriano F. X., Papadia S., Hofmann F., Hardingham N. R., Bading H., Hardingham G. E., *J. Neurosci.*, **26**, 4509–4518 (2006).
- 23) Nakaso K., Nakamura C., Sato H., Imamura K., Takeshima T., Nakashima K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **339**, 915–922 (2006).
- 24) Satoh T., Okamoto S. I., Cui J., Watanabe Y., Furuta K., Suzuki M., Tohyama K., Lipton S. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **103**, 768–773 (2006).
- 25) Haridas V., Hanausek M., Nishimura G., Soehnge H., Gaikwad A., Narog M., Spears E., Zoltaszek R., Walaszek Z., Gutterman J. U., *J. Clin. Invest.*, **113**, 65–73 (2004).
- 26) El-Bacha R. S., Daval J., Koziel V., Netter P., Minn A., *Biochem. Pharmacol.*, **61**, 73–85 (2001).
- 27) Leonard M. O., Kieran N. E., Howell K., Burne M. J., Varadarajan R., Dhakshinamoorthy S., Porter A. G., O’Farrelly C., Rabb H., Taylor C. T., *FASEB J.*, **20**, 2624–2626 (2006).