

テトラヒドロイソキノリン誘導体のパーキンソン病発症物質としての可能性

古武弥一郎

Tetrahydroisoquinoline Derivatives as Possible Parkinson's Disease-Inducing Substances

Yaichiro KOTAKE

Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, 1-2-3 Kasumi,
Minami-ku, Hiroshima 734-8551, Japan

(Received July 1, 2002)

Parkinson's disease (PD) is believed to be induced by the interaction of genetic predisposition and environmental factors, and a type of neurotoxin is proposed to be one of the environmental factors. We designed and synthesized a molecule, 1-benzyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (1BnTIQ) as a possible PD-eliciting neurotoxin and evaluated its characteristics relevant to PD. 1BnTIQ is an endogenous amine in the brain and the 1BnTIQ content increases in the patients with PD. Repeated administration of 1BnTIQ induced PD-like symptoms in monkeys and mice. 1BnTIQ was biosynthesized from 2-phenylethylamine and phenylacetaldehyde, which is a metabolite of 2-phenylethylamine, and used in *in vivo* and *in vitro* studies. 1BnTIQ inhibited [³H] dopamine uptake in HEK293 cells which stably express dopamine transporter. 1BnTIQ also inhibited NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I) in the mitochondrial respiratory chain. Next, we assessed 1BnTIQ neurotoxicity in the organotypic coculture of the ventromedial portion of the mesencephalon and striatum. 1BnTIQ decreased the dopamine content in the mesencephalon in both dose- and time-dependent manners and it irreversibly reduced the dopamine content. Furthermore, it caused morphological changes in tyrosine hydroxylase-positive cells in the mesencephalon and reduced the number of cells. 1-(3',4'-Dihydroxybenzyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (3'4'DHBnTIQ) is also an endogenous parkinsonism-inducing 1BnTIQ derivative. *In vivo* and *in vitro* studies revealed that 3'4'DHBnTIQ was *O*-methylated by soluble catechol-*O*-methyltransferase (COMT). The result that COMT inhibitor suppressed 3'4'DHBnTIQ neurotoxicity suggests that 3'4'DHBnTIQ is metabolically activated by COMT to exert toxic effects.

Key words—neurotoxin; tetrahydroisoquinoline; Parkinson's disease; endogenous amine; dopaminergic neuron; cell death

1. はじめに

パーキンソン病は振戦、固縮、無動症、姿勢反射障害を主症状とする老年期に発症する運動性神経変性疾患であり、主に非遺伝性の神経変性疾患として認識されている。本疾患は線条体に投射する黒質ドパミン神経細胞の選択的脱落を最大の特徴とする。現在までに様々な研究がなされているが、まず始めにパーキンソン病における黒質ドパミン神経細胞死の原因ではないかと提唱されているメカニズムを示す (Fig. 1).¹⁾ このように遺伝的素因と環境因子の

相互作用が、酸化ストレスとそれに伴う脂質過酸化、ミトコンドリア電子伝達系異常、細胞内カルシウムイオン濃度上昇、ユビキチンプロテアソーム系に代表されるタンパク分解系の異常とそれに伴う異常タンパク蓄積等を複合的に引き起こし、最終的にドパミン神経を死に至らしめると考えられている。近年、完全な遺伝性疾患である家族性パーキンソン病について責任遺伝子が同定され、急速にその病因メカニズムが解明されつつある。^{2,3)} しかし、家族性パーキンソン病は全体の数%に過ぎず、残り九十数%の孤発性パーキンソン病に関しては未だに原因は謎のままである。遺伝的素因つまりパーキンソン病になりやすい体質はあるものの、その原因の大部分は環境因子が担っていると考えられている。この仮説を有力にしたのが、摂取するとパーキンソン病に

広島大学大学院医歯薬学総合研究科 (〒734-8551 広島市南区霞 1-2-3)

e-mail: yaichiro@hiroshima-u.ac.jp

*本総説は、平成13年度日本薬学会中国四国支部奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

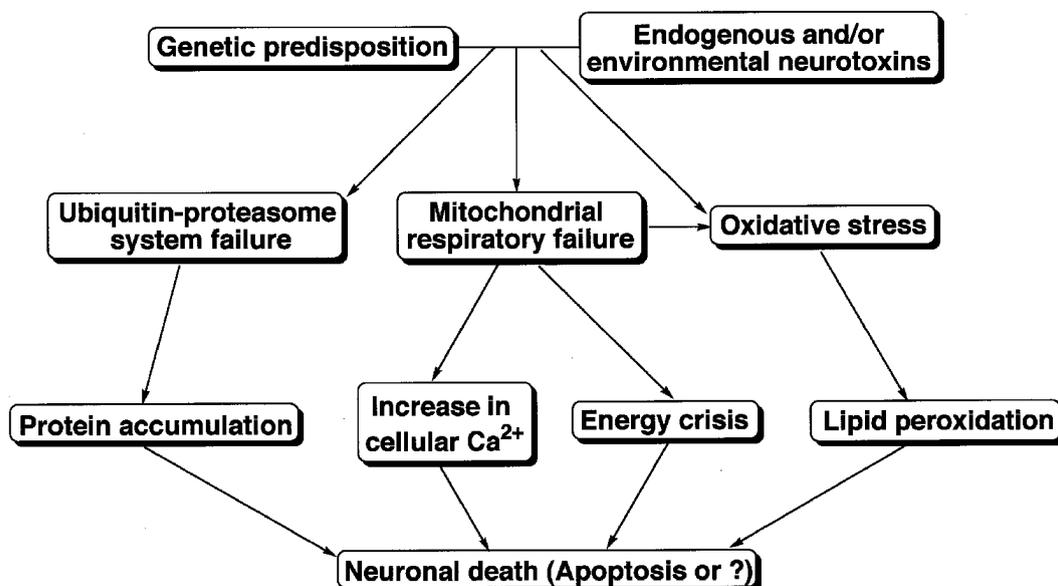


Fig. 1. Proposed Scheme of Nigrostriatal Dopaminergic Neuronal Death in PD

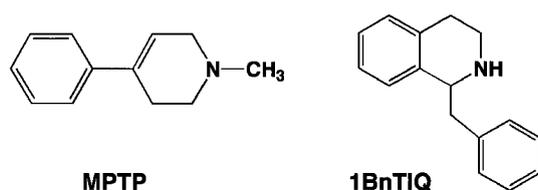


Fig. 2. Chemical Structures of MPTP and 1BnTIQ

酷似した症状，病学的所見を示す 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) の発見である (Fig. 2).⁴⁾ しながら MPTP は合成麻薬の副産物であり，通常ヒト脳内には決して入ることのない物質であるため，MPTP に化学構造の似た化合物がパーキンソン病を発症し得る神経毒として探索されるようになった。Figure 3 に示すような低分子化合物が現在までにパーキンソン病発症候補物質として見出されているが，そのうち多くは tetrahydroisoquinoline (TIQ) 骨格を有する。

Pfeiffer らはパーキンソン病患者の脳脊髄液から分子量 1 万以下の分画を集め，中脳初代培養系に加えてみたところ細胞毒性を示すことを報告している。⁵⁾ この毒性はパーキンソン病治療薬デプレニルにより軽減されるため，⁶⁾ パーキンソン病発症物質がパーキンソン病患者の脳脊髄液中に存在する可能性が示唆された。

これらの報告をふまえて，

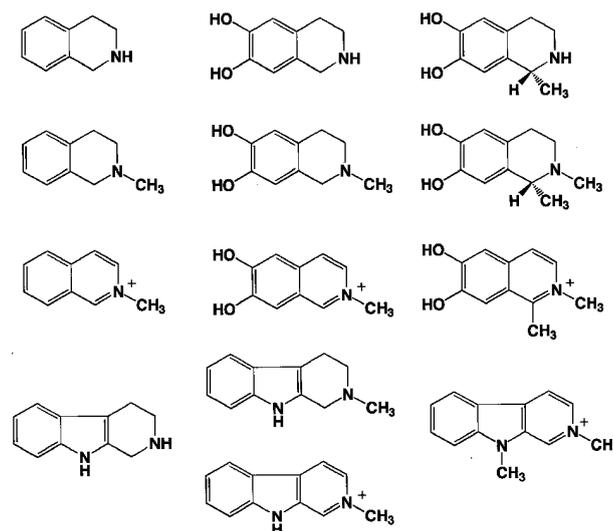


Fig. 3. Chemical Structures of PD-Related Neurotoxins

1. ヒト脳内在性物質であること
 2. パーキンソン病患者の脳あるいは脳脊髄液中で濃度上昇がみられること
 3. 神経細胞において毒性が認められる，あるいはできれば実験動物の個体レベルにおいてパーキンソニズム（パーキンソン病様症状）を発症させ得る物質である
 4. ドパミン神経選択的に毒性が認められる
 5. 弱毒性である
- 以上 5 つがパーキンソン病発症物質が備えている

べき条件であると考えた。パーキンソン病は老年期に発症する疾患であり、脳内に存在する濃度を培養細胞に添加して数日以内に細胞が死滅するような強力な神経毒は発症物質になり得ないため、5の条件は特に重要であると私は考えている。

また、西インド諸島には特徴的なパーキンソニズムを呈する患者が存在している。この地方では sour sop とカスタードアップルの果実あるいはそれらから抽出された茶を摂取していた。これらの果実には神経毒性を有するベンジルイソキノリンアルカロイドが含まれており、^{7,8)} このことからパーキンソン病あるいはパーキンソニズムにおいて内因性あるいは環境中から摂取される神経毒が原因の一部を担っている可能性が示唆される。

そこで私は新規 TIQ 誘導体として 1-benzyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (1BnTIQ) (Fig. 2) という化合物を分子設計し、標品を化学合成した。またこの化合物が生体内に存在しパーキンソン病発症と関係している可能性を考え、1BnTIQ が上記 1-5 の条件を満たしているか否かを検討するべく以下の研究を行った。

2. 脳内在性及びパーキンソン病態における量的変動

マウス脳、ヒト脳脊髄液を除タンパク後、塩基性画分を抽出し、GC-SIM 法により 1BnTIQ の検出を試みたところ、 m/z 359, 379, 399 に標品と同じ保持時間を持つピークが得られ、それらのピーク面積比が標品と一致したことから、マウス脳、ヒト脳

脊髄液には 1BnTIQ が存在することを明らかにした (Fig. 4).⁹⁾

次に、パーキンソン病患者とそれ以外の神経疾患患者のヒト脳脊髄液を除タンパク後、内部標準物質としてジベンジルアミンを添加し、同様の操作で 1BnTIQ を定量した。脳脊髄液中 1BnTIQ 量は、パーキンソン病患者で 1.17 ± 0.35 ng/ml (mean \pm SEM)、他の神経疾患患者で 0.40 ± 0.10 ng/ml と平均でパーキンソン病患者が他の神経疾患の約 3 倍と高い傾向がみられた (Fig. 5).⁹⁾ この結果から脳脊髄液中 1BnTIQ 量の上昇はパーキンソン病に特有の現象であると考えられる。1 位に置換基を持たない TIQ はパーキンソン病患者死後脳において量に変化しないことが報告されており、1BnTIQ はパーキンソン病態において増加していることが初めて示された TIQ 誘導体である。

3. *In Vivo* におけるパーキンソン病様症状誘発作用

パーキンソン病患者の脳脊髄液で増加傾向にあった 1BnTIQ の神経毒性を調べるため、C57BL マウスを用いてパーキンソニズムの症状に特徴的な運動緩除の指標となるポールテストを行った。ポールテストはマウスのような小動物におけるパーキンソン病様症状を評価するために開発され、マウスを棒の最上部に上向きに掴ませ、回転して下に向くまでの時間を T_{turn} 、最初から下に降りるまでの時間を T_{LA} とし、時間が長くなるほど運動緩除が強く現れているとする行動薬理試験である。¹⁰⁾ 1BnTIQ を

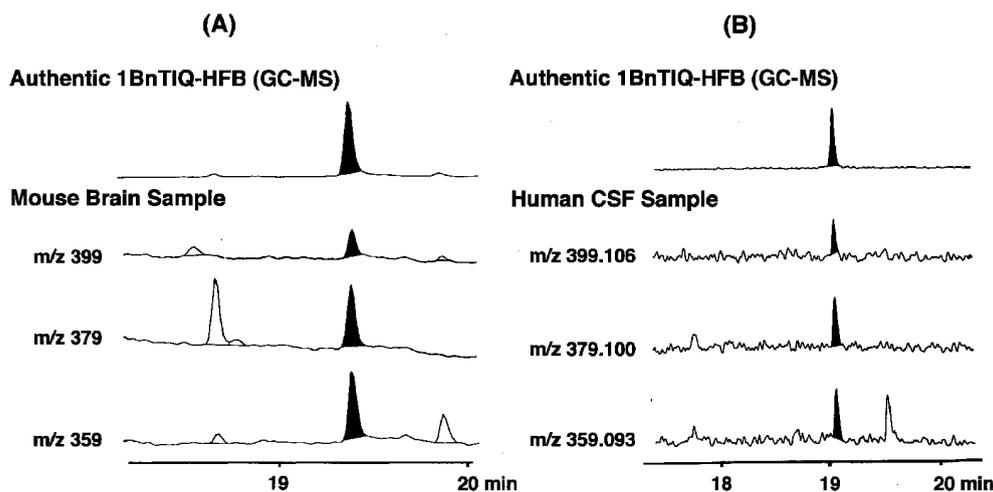


Fig. 4. GC-SIM Chromatogram of the Mouse Brain and the Human Cerebrospinal Fluid Samples for Characterization (A) Low resolution GC-SIM chromatogram of mouse brain sample. (B) High resolution GC-SIM chromatogram of human cerebrospinal fluid sample.

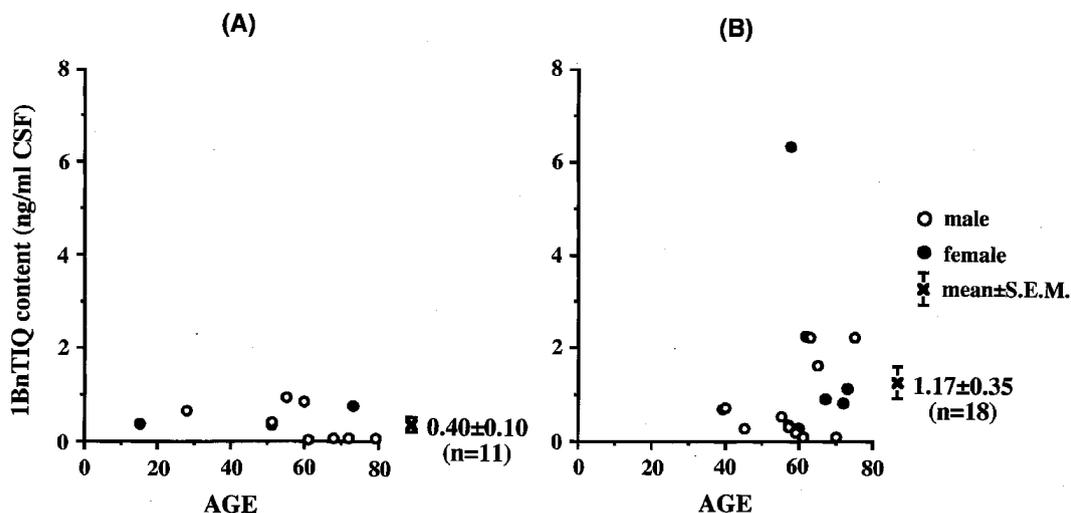


Fig. 5. 1BnTIQ Content in Parkinsonian Cerebrospinal Fluid (A) Neurological controls and (B) PD patients.

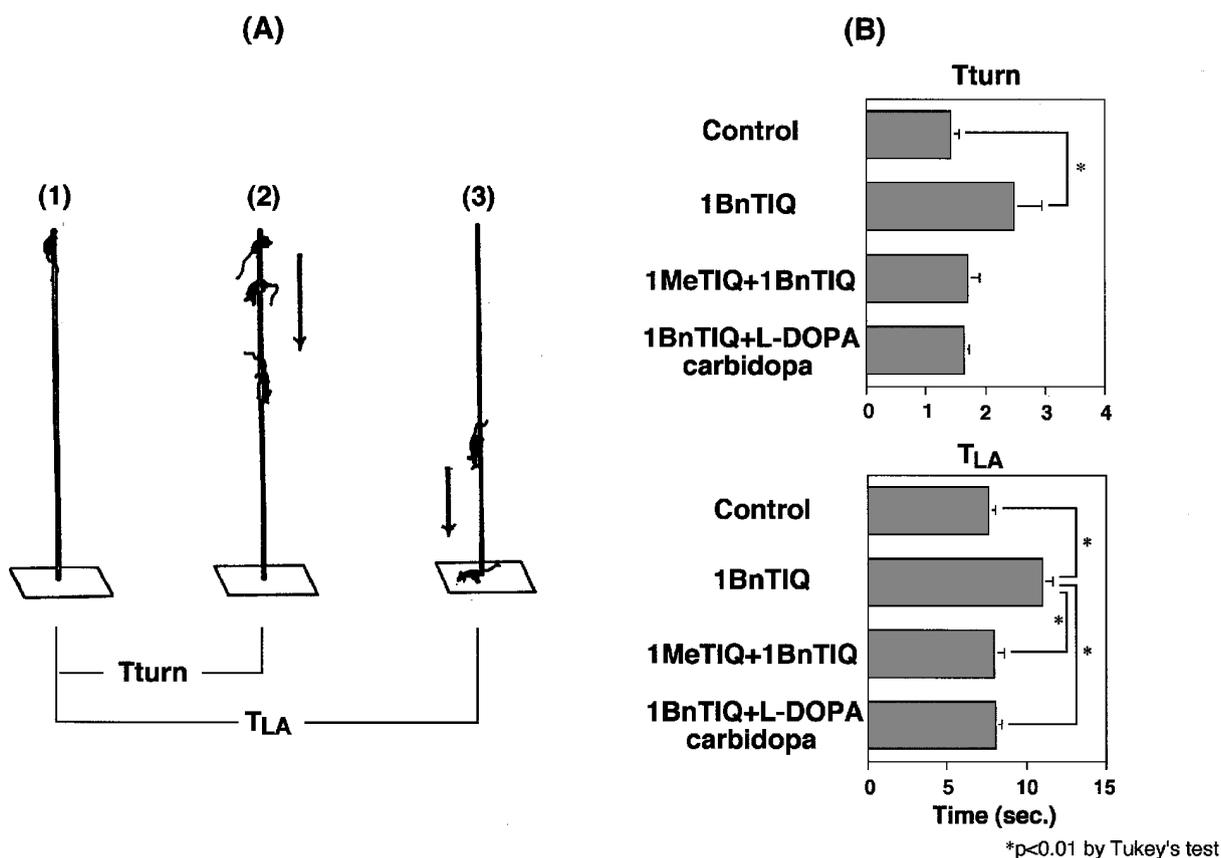


Fig. 6. PD-Like Symptoms Induced by 1BnTIQ (A) Procedure of pole test and (B) Results.

連続投与すると Tturn, T_{LA} は有意に延長され、運動緩除を引き起こした (Fig. 6).⁹⁾ この行動異常は、我々が別途発見している抗パーキンソニズム作用を

有する脳内在性 TIQ 誘導体である 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (1MeTIQ)¹¹⁻¹⁴⁾ の前投与、あるいは L-DOPA と末梢性 L-芳香族アミノ

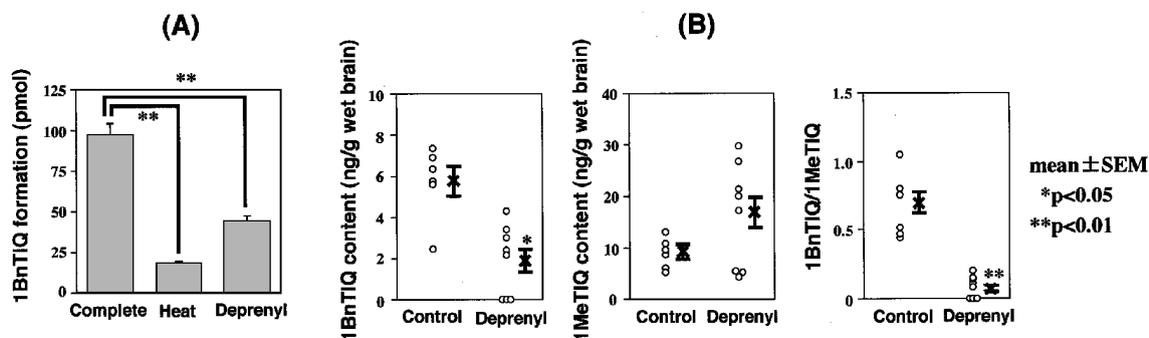


Fig. 7. Fluctuation of 1BnTIQ and 1MeTIQ Contents by Deprenyl

(A) *In vitro* biosynthesis of 1BnTIQ and (B) 1BnTIQ and 1MeTIQ contents in the brain of deprenyl-treated mice.

酸脱炭酸酵素阻害薬カルビドパの併用により抑制された。⁹⁾

また自治医科大学故吉田充男先生らとの共同研究で、カニクイサルに 1BnTIQ を 66 日間連続投与し、行動に関して 9 項目のスコアをつけたところ、カニクイサルにパーキンソン病様症状が観察された。¹⁵⁾ この結果から、齧歯類のみならずヒトと同じ霊長類においても 1BnTIQ はパーキンソン病様症状を呈することが明らかとなった。

4. 生合成過程

1BnTIQ の生合成過程について *in vitro* で検討を行ったところ、1BnTIQ は 2-フェニルエチルアミンと脳ホモジネートから生成し、パーキンソン病治療薬である B 型モノアミン酸化酵素 (MAO) 阻害剤デプレニルを添加することにより抑制された (Fig. 7A).¹⁶⁾ また *in vivo* でデプレニルをマウスに連続投与したところ、脳内の 1BnTIQ 量は減少した。反対に 1MeTIQ 量は増加し、その結果 1MeTIQ に対する 1BnTIQ の量比は非常に小さくなった (Fig. 7B).¹⁶⁾ これらの実験結果をスキームに示した (Fig. 8)。つまり 2-フェニルエチルアミンは MAO によりフェニルアセトアルデヒドに代謝され、その代謝をデプレニルが阻害するため 1BnTIQ 生成量は少なくなる。一方その代謝阻害により 2-フェニルエチルアミン量は増えるから、それを基質として生成される 1MeTIQ 生成量は増加すると考えられる。パーキンソン病は発症物質と防御物質の量的バランスが崩れるために発症するという考え方がある。デプレニルには神経保護作用がありパーキンソン病治療薬として用いられているが、そのメカニズムのひとつとして 1MeTIQ に対する 1BnTIQ の量

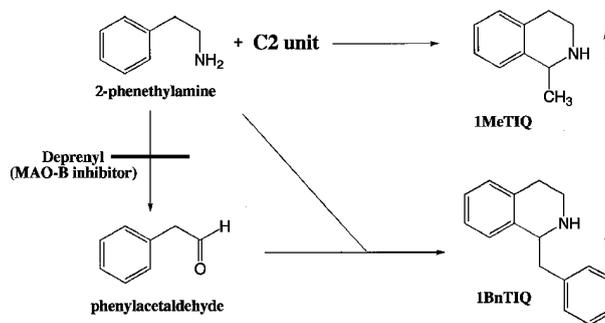


Fig. 8. Effect of Deprenyl on Biosynthesis of 1BnTIQ and 1MeTIQ

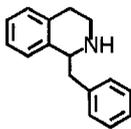
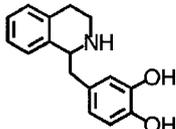
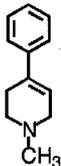
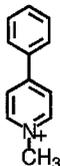
比を変化させることが挙げられるかもしれない。このように 1BnTIQ は 2-フェニルエチルアミンと、その MAO 代謝物と予想されるフェニルアセトアルデヒドが環化縮合して生合成されると考えられる。

5. パーキンソン病関連 *In Vitro* 薬理活性

HEK293 細胞にドパミントランスポーター (DAT) を強制発現させ、³H]ドパミンの細胞内取り込みに対する影響を調べたところ、1BnTIQ は濃度依存的にドパミン取り込みを阻害した。¹⁷⁾ この結果から 1BnTIQ は DAT により認識されることが明らかとなり、細胞外に存在する 1BnTIQ が DAT により細胞内に取り込まれる可能性が考えられる。

次にミトコンドリア呼吸鎖 Complex I 阻害活性を調べたところ、1BnTIQ は濃度依存的に Complex I を阻害し、IC₅₀ 値は 52.6 μM であった。また後述する 3'4'DHBnTIQ の IC₅₀ 値は 80.0 μM であった (Table 1).¹⁸⁾ これは MPTP やその活性代謝物である MPP⁺ の阻害活性と比較しても遥かに強力である。¹⁹⁾ 脳内に存在する 1BnTIQ のような神経毒が Complex I を弱く阻害することにより漏出する活性

Table 1. Inhibitory Effect of 1BnTIQ and 3'4'DHBnTIQ on Complex I in the Mitochondrial Respiratory Chain

	IC₅₀			
				
	1BnTIQ	3'4'DHBnTIQ	MPTP	MPP⁺
State 3 respiration (malate + glutamate as substrates) using nonfrozen mitochondria	1.66 mM	2.90 mM	—	50 μM
Complex I using freeze-thawed mitochondria	52.6 μM	80.0 μM	0.76 mM	3.2 mM

Mizuno Y. *et al.*, *J. Neurochem.* **48**, 1787-1793 (1987)

酸素種、あるいはそこから発生するシグナルがパーキンソン病における細胞死の原因になっているのではないかと考えている。

6. 中脳線条体切片共培養系を用いた神経毒性の詳細な検討

パーキンソン病は黒質線条体のドパミン神経選択的に細胞死が起きることが最大の特徴である。そこで *in vivo* に最も近い培養系と考えられる中脳線条体切片共培養系を用いて、1BnTIQ の神経毒性を神経伝達物質ドパミンの定量、チロシン水酸化酵素の免疫組織化学により調べたところ、100 μM 1BnTIQ はまず中脳ドパミン量を減少させ、細胞体の萎縮を経てドパミン神経を細胞死に至らしめた。毒性発現の第1段階であると考えられるドパミン減少は不可逆的であり、低濃度でも長時間1BnTIQ を添加することによりドパミン量は減少した。実際に脳内に存在する濃度は実験に用いた濃度の数百分の1から数千分の1であるが、低濃度でも長時間細胞に作用させると毒性の第1段階と考えられるドパミン減少が観察されることから、正常より高濃度の1BnTIQ が脳内に長時間存在することがパーキンソン病発症と関係している可能性が考えられる。

7. 1BnTIQ 誘導体の脳内代謝物とその神経毒性

我々のグループでは既にカテコール骨格を有する1BnTIQ 誘導体として 1-(3',4'-dihydroxybenzyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (3'4'DHBnTIQ) を脳内から見出している。^{20,21)} 3'4'DHBnTIQ の脳ホ

モジネートによる代謝を調べたところ、3'位がメチル化された代謝物 1-(3'-methoxy-4'-hydroxybenzyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (3'4'MHBnTIQ) が検出され、3'位のメチル化は細胞質に存在するカテコール-O-メチル転移酵素 (COMT) が担っていることを明らかにした。²²⁾ ドパミンの部分構造を持つ3'4'DHBnTIQ は DAT により細胞内に取り込まれるが、3'4'MHBnTIQ は取り込まれない。そのため、中脳初代分散培養細胞における神経毒性を調べたところ、前者は数十 μM で細胞死を引き起こしたが後者に神経細胞毒性は認められなかった。ところが、3'4'DHBnTIQ による細胞死は COMT 阻害剤を同時添加することにより抑制された。²²⁾ この結果、3'4'DHBnTIQ は DAT によりドパミン神経に取り込まれた後、COMT により代謝活性化を受け、強い神経毒性を発現している可能性が示唆される (Fig. 9)。COMT は一般的に脳内アミンや神経毒の不活性化を担う酵素と考えられているが、基質によっては代謝活性化を行っていることが示された。COMT はドパミン代謝における重要な酵素であり、パーキンソン病との関連が注目される。

8. まとめ

以上、我々は1BnTIQ が脳内在性であり、パーキンソン病態と深い関係があることを明らかにした。また培養神経細胞を用いることにより1BnTIQ 及びその誘導体が神経毒性を有することを示し、それらの毒性発現メカニズムの一部を明らかにした。

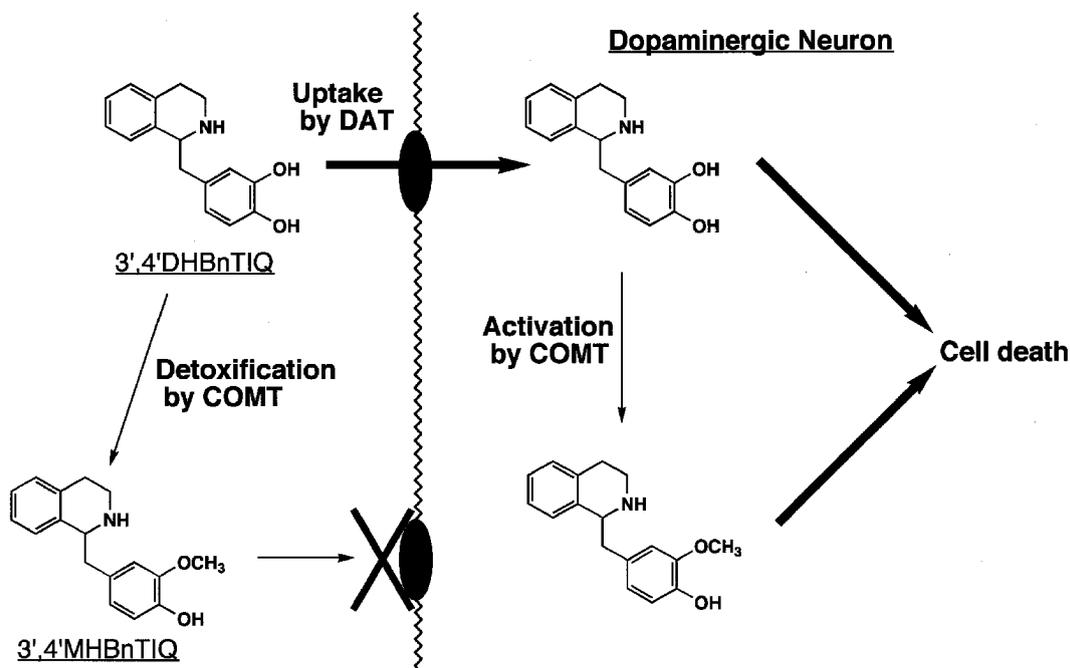


Fig. 9. Proposed Action of 3',4'-DHBnTIQ in Dopaminergic Neurons

現在でもパーキンソン病原因遺伝子の探索や疫学調査が続けられているが、未だ有力な原因は見出されていない。このことはすなわち、最初にも述べた「弧発性パーキンソン病が単一因子により発症する疾患ではなく、多くの因子が複合的に絡み合って発症する疾患である」という説を支持している。環境中から摂取されたあるいは生体内で生合成された1BnTIQ誘導体に代表される内在性神経毒が、DATあるいはその脂溶性によりドパミン神経に取り込まれ、ミトコンドリア呼吸鎖 Complex I を阻害したりその他の正常な細胞機能を妨害することがパーキンソン病におけるドパミン神経細胞死の一因となっている可能性が考えられる (Fig. 10)。

謝辞 本研究は東京大学大学院薬学系研究科、広島大学医学部総合薬学科において遂行されたものであり、終始御指導を賜りました広島大学大学院医歯薬学総合研究科教授太田茂先生に深謝致します。また、大学院の指導教官であり、数々の御助言をいただきました東京大学名誉教授（現静岡県立大学学長）廣部雅昭先生、東京大学大学院薬学系研究科教授長野哲雄先生、共同研究者である広島大学医学部総合薬学科生体機能分子動態学講座の大学院生、学部学生の皆様に感謝致します。なお本研究の一部は

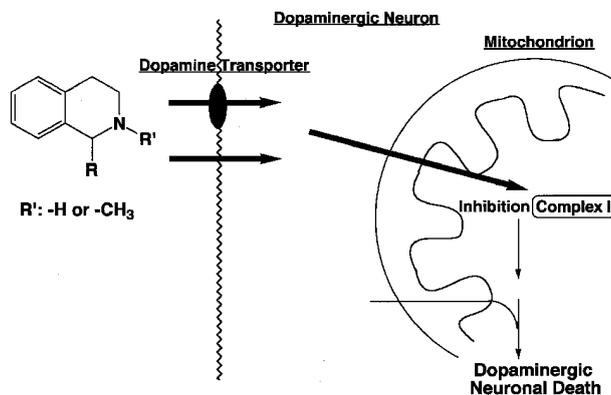


Fig. 10. Proposed Scheme of Dopaminergic Neuronal Death by PD-Related Neurotoxins

日本科学協会笹川科学研究助成金により行われたものであり併せて感謝致します。

REFERENCES

- 1) Mizuno Y., Yoshino H., Ikebe S., Hattori N., Kobayashi T., Shimoda-Matsubayashi S., Matsumine H., Kondo T., *Ann. Neurol.*, **44**, S99-S109 (1998).
- 2) Imai Y., Soda M., Inoue H., Hattori N., Mizuno Y., Takahashi R., *Cell*, **105**, 891-902 (2001).
- 3) Shimura H., Schlossmacher M. G., Hattori

- N., Frosch M. P., Trockenbacher A., Schneider R., Mizuno Y., Kosik K. S., Selkoe D. J., *Science*, **293**, 263–269 (2001).
- 4) Langston J. W., Ballard P., Tetrud J. W., Irwin I., *Science*, **219**, 979–980 (1983).
 - 5) Hao R., Norgren R. B. Jr., Lau Y., Pfeiffer R. F., *Neurology*, **45**, 138–142 (1995).
 - 6) Hao R., Ebadi M., Pfeiffer R. F., *Neurosci. Lett.*, **200**, 77–80 (1995).
 - 7) Caparros-Lefebvre D., Elbaz A., the Caribbean Parkinsonism Study Group, *Lancet*, **354**, 281–286 (1998).
 - 8) Lannuzel A., Michel P. P., Caparros-Lefebvre D., Abaul J., Hocquemiller R., Ruberg M., *Mov. Disord.*, **17**, 84–90 (2002).
 - 9) Kotake Y., Tasaki Y., Makino Y., Ohta S., Hirobe M., *J. Neurochem.*, **65**, 2633–2638 (1995).
 - 10) Ogawa N., Hirose Y., Ohara S., Ono T., Watanabe Y., *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **50**, 435–441 (1985).
 - 11) Kohno M., Ohta S., Hirobe M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **140**, 448–454 (1986).
 - 12) Ohta S., Kohno M., Makino Y., Tachikawa O., Hirobe M., *Biomed. Res.*, **8**, 453–456 (1987).
 - 13) Tasaki Y., Makino Y., Ohta S., Hirobe M., *J. Neurochem.*, **57**, 1940–1943 (1991).
 - 14) Yamakawa T., Kotake Y., Fujitani M., Shintani H., Makino Y., Ohta S., *Neurosci. Lett.*, **276**, 68–70 (1999).
 - 15) Kotake Y., Yoshida M., Ogawa M., Tasaki Y., Hirobe M., Ohta S., *Neurosci. Lett.*, **217**, 69–71 (1996).
 - 16) Kotake Y., Tasaki Y., Hirobe M., Ohta S., *Brain Res.*, **787**, 341–343 (1998).
 - 17) Okada T., Shimada S., Sato K., Kotake Y., Kawai H., Ohta S., Tohyama M., Nishimura T., *Neurosci. Res.*, **30**, 87–90 (1998).
 - 18) Morikawa N., Naoi M., Maruyama W., Ohta S., Kotake Y., Kawai H., Niwa T., Dostert P., Mizuno Y., *J. Neural. Transm.*, **105**, 677–688 (1998).
 - 19) Mizuno Y., Sone N., Saitoh T., *J. Neurochem.*, **48**, 1787–1793 (1987).
 - 20) Kawai H., Makino Y., Hirobe M., Ohta S., *J. Neurochem.*, **70**, 745–751 (1998).
 - 21) Kawai H., Kotake Y., Ohta S., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **10**, 1669–1771 (2000).
 - 22) Kawai H., Kotake Y., Ohta S., *Chem. Res. Toxicol.*, **13**, 1294–1301 (2000).