

小胞外過剰ドパミンによるドパミン神経障害における 共通因子としてのキノン体生成

宮崎 育子*, 浅沼 幹人, Francisco J. Diaz-Corrales, 三好 耕, 小川 紀雄

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 神経情報学

キーワード：ドパミンキノン, パーキンソン病, メタンフェタミン, キノン還元酵素, チロシナーゼ

はじめに

覚醒剤メタンフェタミン (METH) 誘発急性ドパミン (DA) 神経障害およびパーキンソン病 (PD) における過剰 L-DOPA 投与による DA 神経障害には, DA の自動酸化に伴う活性酸素種 (ROS) やそれに伴う活性窒素種 (RNS) の生成および興奮性アミノ酸の放出が関与していると考えられてきた。しかし, ROS, RNS の生成のみでは, なぜ DA 神経細胞だけが選択的・特異的に障害されるかの機序を十分には説明できない。われわれはこれまでに, ROS/RNS 以外に小胞外で過剰になった遊離 DA が DA キノン生成を経て DA 神経障害を惹起する可能性を提唱し, 一連の研究を行ってきた。ここでは, METH による急性 DA 神経細胞死のみならず, PD モデルでの L-DOPA 連続投与におけるキノン体生成の関与についても紹介する。

小胞外過剰ドパミンによるドパミン神経障害

DA 神経における酸化ストレスの発生系は, モノア

ミンオキシダーゼあるいは自動酸化により DA が酸化されて一般的な ROS (O_2^- , H_2O_2) が発生する系と, 細胞質の小胞外遊離 DA が自動酸化によって, あるいは酵素反応 (シクロオキシゲナーゼ (COX), キサンチンオキシダーゼ, チロシナーゼ) によってセミキノンを経て DA キノンが発生する系の 2 系統に大別できる。通常 DA はシナプス小胞内では安定だが, METH 投与や PD など DA 神経が障害されると小胞で保持されず遊離し, さらに L-DOPA の長期投与により小胞外の遊離 DA は過剰となる。このような小胞外の過剰 DA は容易に自動酸化あるいは酵素反応によってセミキノンを経て DA/DOPA キノンに変換され細胞毒性を発揮する¹⁾。DA/DOPA キノンは小胞外の遊離の DA および DOPA 自体から発生するものであり²⁾, 障害は DA 神経およびその周囲に限局することになる。DA キノンはチロシン水酸化酵素や DA トランスポーター (DAT) をはじめとするさまざまな機能蛋白のシステイン残基に結合し, キノプロテイン (キノン結合蛋白) を形成し, その蛋白の機能を障害し, 細胞毒性を発揮する^{3,4)}。さらに, 最近になって DA キノンが家族性 PD 原因遺伝子産物であるパーキンと共有結合し, パーキンのユビキチンリガーゼ活性を阻害することが報告された⁵⁾。このように, DA キノン毒性は DA 神経特異的酸化ストレスとして注目すべき

平成19年9月受理

*〒700-8558 岡山市鹿田町2-5-1

電話：086-235-7410 FAX：086-235-7412

E-mail：miyazaki@cc.okayama-u.ac.jp

プロフィール



宮崎 育子

平成9年岡山大学薬学部製薬化学科卒業。4月より岡山大学医学部神経情報学に技術補佐員として研究に従事する。小川紀雄教授の指導の下, パーキンソン病をはじめとする神経疾患病態における金属結合蛋白メタロチオネインの発現動態について研究を行い, 平成15年メタロチオネイン研究会研究奨励賞を受賞。平成12年より同教室の助手となる。本研究は, 浅沼幹人准教授の指導の下, ドパミン神経変性過程における特異的酸化ストレスとしてキノン体に着目して研究を行ったもので, 平成17年第32回日本脳科学会奨励賞を受賞, 研究成果を FASEB J. に発表した。平成18年, 医学博士の学位を取得。現在, パーキンソン病をはじめドパミン神経障害におけるグリア細胞の役割に注目し, ドパミン神経保護薬の開発につながる研究を行っている。

因子である。

METH 誘発急性ドパミン神経障害におけるキノン体毒性

METH の DA 神経終末に対する急性毒性には、内因性 DA の役割が重要とされている。METH はシナプス小胞に局在する DA を細胞質へ駆出し、DA の自動酸化を引き起こし、ROS やそれに伴う RNS を生成し、神経毒性を惹起するという仮説が提唱されている⁶⁾。今回われわれは、METH による DA 神経細胞死におけるキノン体生成の関与について、METH 添加培養 DA 系神経細胞 CATH.a ならびに METH 投与マウスを用いて検討した⁷⁾。

DA 神経細胞 CATH.a に METH を添加すると、METH による細胞毒性に平行して、濃度依存的なキノプロテイン量の増加が認められた。また、BALB/c マウスに METH (4 mg/kg, i.p.×4, 2 時間毎) を投与すると、3, 14 日後のマウス線条体において、DAT の脱落と一致してキノプロテインの有意な増加がみられた。さらに、キノン体還元によりキノン毒性を抑制するキノン還元酵素 (NADPH quinoneoxidoreductase : NQO-1 = DT diaphorase) の誘導剤である BHA 前処置により、CATH.a 細胞での METH 神経毒性ならびにキノプロテイン量の増加が有意に濃度依存的に抑制された (図 1)。この METH 添加によるキノプロテイン増加は、DA 枯渇薬 レセルピンあるいは α -methyl-*p*-

tyrosine 前処置により有意に抑制された。

脳内のチロシナーゼは過剰の細胞質内 DA を速やかにメラニンに酸化させることから、チロシナーゼの METH 毒性への関与について検討した。チロシナーゼ阻害剤 phenylthiourea 処置により、CATH.a 細胞での METH による細胞毒性は濃度依存的に有意に増悪した。また、チロシナーゼ欠損 C57BL/6J-Tyr^{C-2J}/Tyr^{C-2J} マウスを用いて METH (4 mg/kg, i.p.×4, 2 時間毎) 投与を行ったところ、野生型 C57BL/6J マウスと比べて、チロシナーゼ欠損マウスでは著明な DAT の脱落がみられた。さらに、チロシナーゼ欠損マウスの線条体では定常状態でさえも野生型と比べてより多くのキノプロテインが生成されており、METH 投与後の線条体のキノプロテイン量は野生型よりも高値であった (図 2)。

以上の結果より、METH による急性 DA 神経毒性において、DA キノン生成が DA 神経特異的酸化ストレスとして神経障害性に働いていること、さらに METH 毒性はキノン体生成関連分子により調節されていることを明らかにした (図 3)。

L-DOPA 連日投与パーキンソン病モデルにおけるキノン体毒性

われわれは PD の病態形成、とくに過量の L-DOPA 投与によるドパミン神経障害へのキノン体の関与についても研究を行ってきた。われわれは、PD 病態モデ

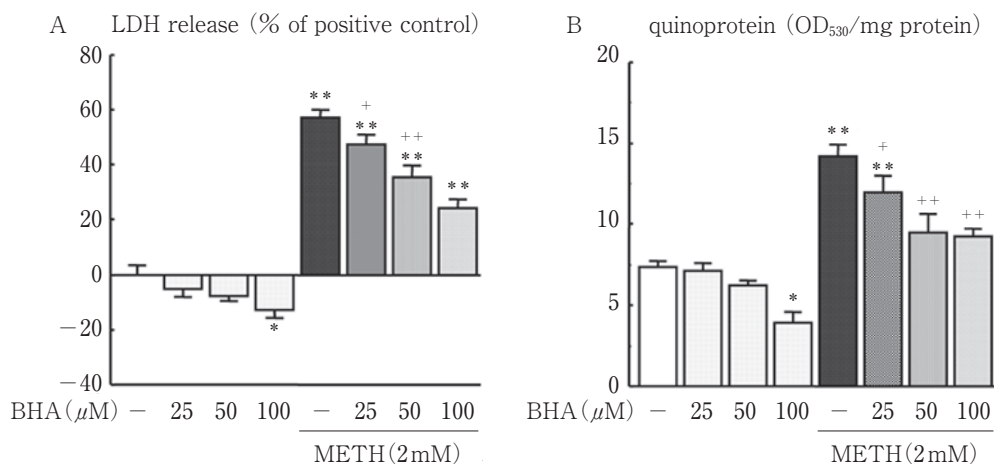


図1 CATH.a 細胞での METH による神経毒性およびキノプロテイン生成に対するキノン還元酵素誘導剤の影響
CATH.a 細胞をキノン還元酵素誘導剤 BHA (25-100 μM) で 6 時間前処置し、METH (2 mM) を添加し 24 時間後の LDH 放出量 (A) とキノプロテイン生成量 (B) を測定した。LDH 放出量のデータは 1% Tween-20 で処置した細胞をポジティブコントロールとした mean±SEM を示す。**P*<0.05, ***P*<0.001 vs. 対照群, +*P*<0.05, ++*P*<0.001 vs. METH 処置群。キノプロテイン生成量のデータは 530nm の吸光度/蛋白質量を mean±SEM を示す。**P*<0.01, ***P*<0.001 vs. 対照群, +*P*<0.05, ++*P*<0.001 vs. METH 処置群。(文献 7 より引用)

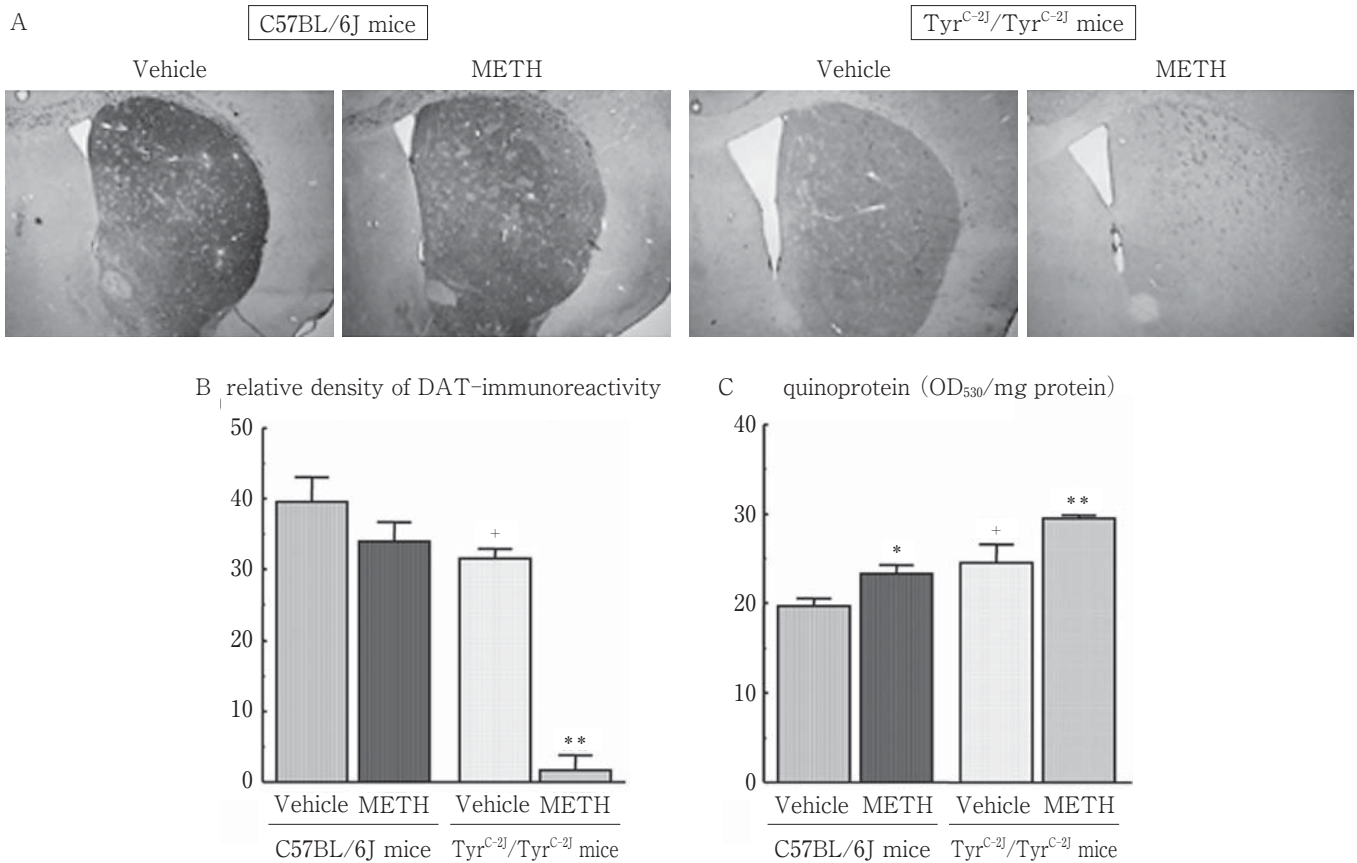


図2 マウス線条体での METH によるドパミン神経毒性およびキノプロテイン生成におけるチロシナーゼの関与。C57BL/6J マウス（野生型）およびチロシナーゼ欠損マウス C57BL/6J-Tyr^{C-2J}/Tyr^{C-2J} に METH（4 mg/kg を 2 時間おきに 4 回腹腔内投与）投与し 3 日後の線条体における DAT の免疫染色（A, B）およびキノプロテイン生成量（C）を測定した。DAT シグナルのデータは mean±SEM を示す。 ***P*<0.001 vs. 溶媒投与対照群, +*P*<0.05 vs. 野生型マウスの溶媒投与対照群。キノプロテイン生成量のデータは 530nm の吸光度/蛋白量を mean±SEM を示す。 **P*<0.05, ***P*<0.01 vs. 溶媒投与対照群, +*P*<0.05 vs. 野生型マウスの溶媒投与対照群。（文献 7 より引用）

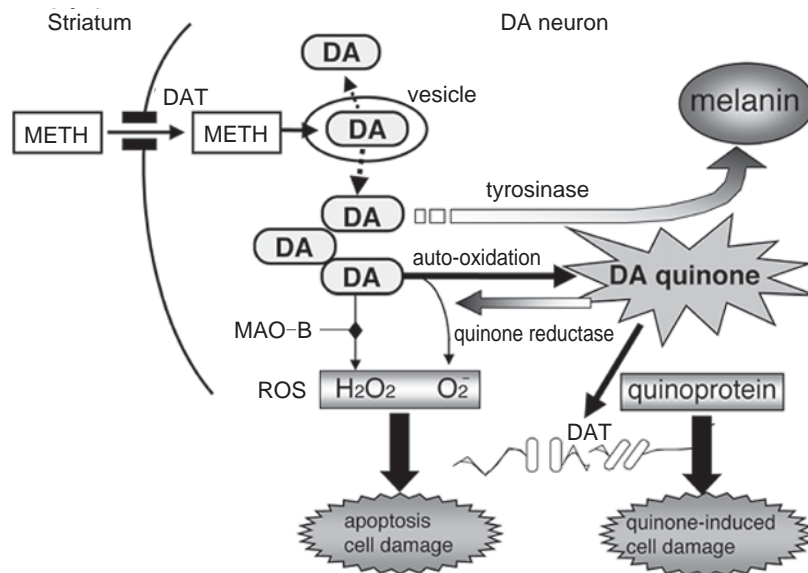


図3 METH によるドパミン神経細胞死におけるキノン体生成の関与とキノン還元酵素およびチロシナーゼの神経保護効果（文献 7 より引用）

ルへの L-DOPA 慢性投与により、キノン体生成（キノプロテイン）ならびに DA 代謝回転が著明に増加することを見出した^{8,9)}。さらに、DA アゴニストとくに pergolide, pramipexole, bromocriptine が DA キノン を消去する活性を有しており、なかでも pergolide の併用投与によりこの L-DOPA 連日投与によるキノン体生成の亢進をほぼ完全に阻止することを明らかにした⁹⁾。このような DA キノンに対する直接消去作用は、PD への L-DOPA 長期投与でのキノン体生成による神経毒性に対して有効であり、DA アゴニストの神経保護薬としての側面を示すものである。

ドパミンキノン毒性に対する防御機構と保護療法

脳組織には DA/DOPA キノンなどのキノン体による神経毒性に対して、それらの障害性を消去する防御機構も備わっている。われわれは DA, DOPA の自動酸化による DA/DOPA キノン生成およびそれらによる神経細胞死が、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD), グルタチオン (GSH) によって抑制されるが、カタラーゼは無効であることを見出した¹⁰⁾。SOD はキノン体を無害なヒドロキノン体に還元するキノンオキシドレダクターゼ活性を有しており、GSH はそれ自身のシステイン残基で機能蛋白と競合してキノン体に結合し、キノン体毒性を消去すると考えられる^{1,10,11)}。DA による細胞死は GSH や GSH の前駆体 N-アセチルシステイン, dithiothreitol (チオール薬剤) で阻止できるが、強力な抗酸化剤であるビタミン E (α -tocopherol) では阻止できないことから¹²⁾、DA による酸化ストレスが一般的な ROS/RNS の発生のみに基づくとは考えにくい。このように、GSH は H₂O₂ の無毒化だけでなく、キノン体による神経毒性に対する内在性の抗酸化防御機構としても重要である。

本研究では、チロシナーゼが細胞質内の遊離 DA あるいは DA キノンを減少させることにより、METH 神経毒性に対して保護的に働いていることを明らかにした⁷⁾。チロシナーゼは、脳内においてチロシンから L-DOPA を生成するとともに、DA あるいは DA キノンを酸化し、メラニンに変換する酵素である。チロシナーゼ様のメラニン変換能を有する分子・薬剤は、細胞質内で過剰となった遊離 DA の自動酸化や DA キノンへの長時間曝露を回避し、細胞毒性を防ぐことから、DA 神経保護薬の候補となりうるであろう。

また前述したように、DA アゴニストは ROS/RNS

消去能、GSH 増強作用のみならず、DA/DOPA キノン消去・生成抑制能を有している。このような DA アゴニストの DA キノン消去作用は、L-DOPA 投与量の節減効果、L-DOPA 長期投与での DA 代謝回転の異常亢進に対する抑制効果とともに、PD での神経保護効果の発現機構のなかで重要な位置を占めていると考えられる。

おわりに

これまで PD の個々の病因仮説と DA キノンとの関連については国内外からの報告が散見されたが、METH 急性毒性などの PD 以外の小胞外遊離過剰 DA により惹起される神経障害における DA キノン生成の関与についての報告は、本研究が初めてである。われわれは、DA キノン生成が METH による急性神経毒性のみならず、PD での L-DOPA 長期投与の神経障害をはじめ、広く小胞外遊離過剰 DA により惹起される DA 神経障害に共通の障害機構となることを明らかにした。今後、キノン体毒性に対する保護・阻止に関わる分子機構をさらに明らかにすれば、全く新しい観点からの治療方策の開発に寄与できると考えられる。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、北市清幸先生（長崎国際大学薬学部薬学科薬理学教室）のご協力を頂きました。心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) Asanuma M, Miyazaki I and Ogawa N : Dopamine- or L-DOPA-induced neurotoxicity : the role of dopamine quinone formation and tyrosinase in a model of Parkinson's disease. *Neurotox Res* (2003) **5**, 165-176.
- 2) Sulzer D, Bogulavsky J, Larsen KE, Behr G, Karatekin E, Kleinman MH, Turro N, Krantz D, Edwards RH, Greene LA and Zecca L : Neuromelanin biosynthesis is driven by excess cytosolic catecholamines not accumulated by synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci USA* (2000) **97**, 11869-11874.
- 3) Whitehead RE, Ferrer JV, Javitch JA and Justice JB : Reaction of oxidized dopamine with endogenous cysteine residues in the human dopamine transporter. *J Neurochem* (2001) **76**, 1242-1251.
- 4) Kuhn DM, Arthur RE Jr, Thomas DM and Elferink LA : Tyrosine hydroxylase is inactivated by catechol-quinones and converted to a redox-cycling quinoprotein : possible relevance to Parkinson's disease. *J Neurochem* (1999) **73**,

- 1309-1317.
- 5) LaVoie MJ, Ostaszewski BL, Weihofen A, Schlossmacher MG and Selkoe DJ : Dopamine covalently modifies and functionally inactivates parkin. *Nat Med* (2005) **11**, 1214-1221.
 - 6) Cadet JL and Brannock C : Free radicals and the pathobiology of brain dopamine systems. *Neurochem Int* (1998) **32**, 117-131.
 - 7) Miyazaki I, Asanuma M, Diaz-Corrales FJ, Fukuda M, Kitaichi K, Miyoshi K and Ogawa N : Methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity is regulated by quinone formation-related molecules. *FASEB J* (2006) **20**, 571-573.
 - 8) Ogawa N, Tanaka K and Asanuma M : Bromocriptine markedly suppresses levodopa-induced abnormal increase of dopamine turnover in the parkinsonian striatum. *Neurochem Res* (2000) **25**, 755-758.
 - 9) Miyazaki I, Asanuma M, Diaz-Corrales FJ, Miyoshi K and Ogawa N : Dopamine agonist pergolide prevents levodopa-induced quinoprotein formation in parkinsonian striatum and shows quenching effects on dopamine-semiquinone generated in vitro. *Clin Neuropharmacol* (2005) **28**, 155-160.
 - 10) Haque ME, Asanuma M, Higashi Y, Miyazaki I, Tanaka K and Ogawa N : Apoptosis-inducing neurotoxicity of dopamine and its metabolites via reactive quinone generation in neuroblastoma cells. *Biochim Biophys Acta* (2003) **1619**, 39-52.
 - 11) LaVoie MJ and Hastings TG : Peroxynitrite- and nitrite-induced oxidation of dopamine : implications for nitric oxide in dopaminergic cell loss. *J Neurochem* (1999) **73**, 2546-2554.
 - 12) Offen D, Ziv I, Sternin H, Melamed E and Hochman A : Prevention of dopamine-induced cell death by thiol antioxidants : possible implications for treatment of Parkinson's disease. *Exp Neurol* (1996) **141**, 32-39.