

熊本大学学位論文

中枢神経系のグルタチオン生合成を介する  
ドパミンニューロン保護機構の解析

2018

熊本大学大学院薬学教育部 創薬・生命薬科学専攻

バイオフィーマコース 薬物活性学分野

高橋 周平

**Analysis of the protective mechanisms of dopaminergic neurons  
via glutathione biosynthesis in the central nervous system**

Department of Chemico-Pharmacological Sciences,  
Graduate School of Pharmaceutical Science, Kumamoto University

Shuhei Takahashi



# **Analysis of the protective mechanisms of dopaminergic neurons via glutathione biosynthesis in the central nervous system**

Department of Chemico-Pharmacological Sciences,  
Graduate School of Pharmaceutical Science, Kumamoto University  
Shuhei Takahashi

Parkinson disease (PD) is a progressive neurodegenerative disorder and is characterized by loss of dopaminergic neurons in the midbrain substantia nigra pars compacta. Aging is the major risk of PD, and the population of PD patients is considered to increase in the future. Because existing treatments of PD cannot control progression of pathology, establishment of treatment strategies for inhibition of loss of dopaminergic neurons is required. Although the primary cause of loss of dopaminergic neurons has not been elucidated, environmental, genetic factors and neuroinflammation are considered to promote loss of dopaminergic neurons. Reactive oxygen species (ROS) are commonly involved in those factors. In the central nervous system (CNS), glutathione is the major endogenous system for attenuating tissue injury by oxidative stress. A significant reduction in glutathione has been found in the substantia nigra of brain tissue from PD patients. Thus, elucidation of the mechanisms of glutathione regulation may contribute to the establishment of strategies of treatment for inhibiting progression of PD pathology. In this study, I addressed the following two issues to elucidate the mechanisms of glutathione regulation in CNS and to explore the target of treatment strategies inhibiting loss of dopaminergic neurons.

## **1. Elucidation of the effect of insulin and IGF-I on glutathione biosynthesis in CNS.**

Although insulin and insulin like growth factor-I (IGF-I) have been known to exert neuroprotective and neurotrophic actions, their roles in management of oxidative stress in the CNS have long been neglected. Thus, I focused on the effect of insulin and IGF-I on glutathione biosynthesis in neuronal cells and glial cells. In neuronal cells, but not in glial cells, insulin and IGF-I induced up-regulation of mRNA expression of glutamate cysteine ligase (GCL) modifier subunit (GCLM), one of the GCL subunits considered to comprise the rate-limiting enzyme of glutathione biosynthesis. Because IGF-I was more potent than insulin in stimulating GCLM mRNA expression, I focused on

examining the effect of IGF-I. In neuronal cells, IGF-I induced up-regulation of expression of GCLM protein and tissue total glutathione level. I also found that IGF-I induced up-regulation of GCLM mRNA level was mediated by PI3K/Akt signaling pathway that recruited a transcription factor, nuclear factor erythroid 2-related factor 2 into the nucleus. Next, I addressed contribution of IGF-I-induced up-regulation of glutathione biosynthesis to the neuroprotective effect of IGF-I. In MPP<sup>+</sup> (1-methyl-4-phenyl pyridinium)-induced PD model of organotypic midbrain slice culture prepared from rat brain, IGF-I prevented loss of dopaminergic neurons via glutathione biosynthesis. Overall, insulin and IGF-I induce up-regulation of glutathione biosynthesis and prevent loss of dopaminergic neurons via glutathione biosynthesis.

## **2. Exploring the effect of polysulfide on loss of dopaminergic neurons in midbrain.**

Polysulfides (RSS<sub>n</sub>H, RSS<sub>n</sub>SR), an endogenous sulfur-containing species have been receiving increasing attention as regulator of various cell functions. I focused on the neuroprotective effect of polysulfides using brain tissue. I found that polysulfides with three or more sulfurs showed potent neuroprotective effects than H<sub>2</sub>S in MPP<sup>+</sup>-induced PD model of midbrain slice culture. In addition, polysulfide attenuated MPP<sup>+</sup>-induced oxidative stress. The neuroprotective effect of polysulfide was mediated by glutathione biosynthesis and polysulfide induced strongly up-regulation of glutathione biosynthesis in neuronal cells than in glial cells. These results suggest that polysulfides contribute to the development of treatment strategies of PD.

In this study, I revealed the roles of insulin and IGF-I in promotion of glutathione biosynthesis, which has long been neglected. Although insulin and IGF-I can be produced in brain, previous reports suggested that insulin or IGF-I resistance occurs in PD patient's brain. Therefore, improvement of the resistance or enhancement of insulin or IGF-I signaling may be relevant to the novel target of treatment strategies of PD. In addition, I revealed polysulfides protected dopaminergic neurons via enhancement of glutathione biosynthesis. Moreover, I revealed that insulin, IGF-I and polysulfides were efficient neuroprotective factors that could enhance glutathione-dependent antioxidant capacity, especially in neuronal cells. The present results may contribute to elucidation of regulatory mechanism of glutathione in the CNS and to the development of therapeutic strategies to inhibit loss of dopaminergic neurons.

# 中枢神経系のグルタチオン生合成を介する ドパミンニューロン保護機構の解析

創薬・生命薬科学専攻 薬物活性学分野 高橋 周平

パーキンソン病は中脳黒質から線条体に投射するドパミンニューロンの脱落を特徴とする進行性の神経変性疾患であり、加齢が重要なリスクファクターであることから、今後さらに患者数が増加すると見込まれる疾患の一つである。現行の治療では病状の進行を根本的に抑制することができない為、ドパミンニューロン脱落を抑制する新規治療戦略の開発が望まれる。ドパミンニューロン脱落の根本的な原因は未だ明らかでないが、環境要因や遺伝的要因、または神経炎症など種々の要因が絡みあうとされる。これらの要因に共通してドパミンニューロンの脱落を促進するのが活性酸素種 (ROS) の産生である。中枢神経系において、グルタチオンは ROS による組織障害を軽減する寄与度が高いと考えられているが、パーキンソン病患者の死後脳において中脳黒質領域でのグルタチオンレベルが有意に低下していることから、グルタチオン産生の調節メカニズムの理解がパーキンソン病における病態の進行を抑制する新規治療法の確立に寄与できると考えられる。そこで脳内グルタチオンの制御機構の解明とドパミンニューロン脱落を抑制する新規治療標的の探索を目的として以下の 2 点について検討を行った。

## 1. 中枢神経系におけるインスリン及び IGF-I のグルタチオン産生系に対する効果の解明

脳内において、神経保護や神経栄養因子として知られるインスリン及び insulin like growth factor-I (IGF-I) の酸化ストレス調節因子としての役割は明らかとされていない。そこで、中枢神経系の細胞種である神経様細胞やグリア様細胞におけるインスリン及び IGF-I のグルタチオン生合成に対する効果を検討したところ、神経系の細胞においてのみインスリン及び IGF-I はグルタチオン合成の律速酵素である glutamate cysteine ligase (GCL) サブユニットのうち GCL modifier subunits (GCLM) mRNA の産生増大を行うことが明らかとなった。GCLM mRNA の産生増大についてより顕著な作用が見られた IGF-I に注目した検討を進めた結果、神経系の細胞において IGF-I は GCLM のタンパク質レベル及び細胞内総グルタチオンレベルの増大を行うことが明らかとなった。その機序として、IGF-I は PI3K/Akt 経路の活性化を介した Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 の核内

移行を誘導することで GCLM の産生増大を行っていることを明らかとした。さらに、新生仔ラットから作成した中脳組織培養切片を用いた MPP<sup>+</sup> (1-methyl-4-phenyl pyridinium) 誘発性ドパミンニューロン変性モデルに対して IGF-I は神経保護的な効果を示すが、その効果にはグルタチオン生合成が寄与していることが明らかとなった。これらの結果から、インスリン及び IGF-I は神経系細胞においてグルタチオン生合成を促進すること及び中脳でグルタチオン生合成を介したドパミンニューロンの保護効果を示すことが明らかとなった。

## 2. 中脳領域でのグルタチオン生合成を介したポリスルフィドの作用解析

内因的に存在する硫黄含有分子のポリスルフィド類 (RSS<sub>n</sub>H, RSS<sub>n</sub>SR) は、様々な細胞機能を調節し得る分子として近年注目されている。そこで、ポリスルフィドが中脳組織において神経保護効果を発揮するか検討を行った。中脳組織培養切片を用いた MPP<sup>+</sup>誘発性ドパミンニューロン変性モデルにおいて、3つ以上連なった硫黄分子を持つポリスルフィド (Na<sub>2</sub>S<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>S<sub>4</sub>) が硫化水素より優れた神経保護作用を示すことを見出した。また、ポリスルフィドは中脳組織において MPP<sup>+</sup>による酸化ストレスレベルを減弱し、グルタチオンの生合成を介してドパミンニューロンを保護していることが明らかとなった。さらにポリスルフィドはグリア細胞よりも神経系細胞において顕著にグルタチオン生合成を促進することを見出した。中脳組織でグルタチオン生合成を中心として神経保護効果を示したポリスルフィドは、ドパミンニューロン保護の新規治療標的創出に寄与することが考えられる。

上述の様に、本研究ではまず、インスリン及び IGF-I がグルタチオン生合成を促進するといった、従来注目されてこなかった酸化ストレス制御因子としての役割を担うことを見出した。脳内でインスリン及び IGF-I は産生され得るが、パーキンソン病患者の脳内ではインスリン及び IGF-I シグナルの抵抗性が生じていることが示唆されている。今後この抵抗性を改善すること、及びシグナルの増強を行うことが、パーキンソン病の新規治療戦略創出の手がかりとなる可能性が考えられる。また、中脳組織においてグルタチオン生合成を中心とした神経保護作用をポリスルフィドが持つことを見出した。さらに、インスリン、IGF-I 及びポリスルフィドは特に神経様細胞でグルタチオン依存的な抗酸化能を増強できる効率的な神経保護因子であることも示唆された。本研究で得られた知見は脳内グルタチオン制御機構の解明及びドパミンニューロンの脱落を抑制する新規治療戦略の創出に寄与し得る重要な基礎的知見であると考えられる。

## 略語表

本論文では以下の略号を使用する

3MST	: 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase
6-OHDA	: 6-hydroxydopamine
Akt	: protein kinase B
ARE	: antioxidant-response element
BCA	: bicinchoninate
BSO	: <i>l</i> -buthionine sulfoximine
CAT	: cysteine aminotransferase
CBS	: cystathionine $\beta$ -synthase
CNS	: central nervous system
CREB	: cyclic AMP response element-binding protein
CSE	: cystathionine $\gamma$ -lyase
DCF	: 2',7'-dichlorofluorescein
DCFH-DA	: 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate
DMEM	: dulbecco's modified eagle medium
DMSO	: dimethyl sulfoxide
DNA	: deoxyribonucleic acid
FBS	: fetal bovine serum
GAPDH	: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GCL	: glutamate cysteine ligase
GCLC	: GCL catalytic subunit
GCLM	: GCL modifier subunit
GS	: glutathione synthase
GSH	: glutathione
H <sub>2</sub> S	: hydrogen sulfide

HBSS	: hanks' balanced salt solution
HRP	: horseradish peroxidase
IFN- $\gamma$	: interferon- $\gamma$
IGF-I	: insulin like growth factor-I
IL-4	: interleukin 4
iNOS	: inducible nitric oxide synthase
IRS	: insulin receptor substrate
Keap1	: kelch-like ECH-associated protein 1
LPS	: lipopolysaccharide
MAPKs	: mitogen-activated protein kinases
MEM	: minimum essential medium
MPP <sup>+</sup>	: 1-methyl-4-phenyl pyridinium
MPTP	: 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
Na <sub>2</sub> S	: Sodium sulfide
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	: sodium disulfide
Na <sub>2</sub> S <sub>3</sub>	: sodium trisulfide
Na <sub>2</sub> S <sub>4</sub>	: sodium tetrasulfide
Nrf2	: nuclear factor erythroid 2-related factor 2
PBS	: phosphate buffer saline
PD	: parkinson disease
PFA	: paraformaldehyde, powder
PMSF	: phenylmethylsulfonyl fluoride
PI3K	: phosphoinositide 3-kinase
RNA	: ribboneic acid
ROS	: reactive oxygen species
RT-qPCR	: real-time quantitative polymerase chain reaction
SDS	: sodium lauryl sulfate



SIRT6	: sirtuin 6
SNpc	: substantia nigra pars compacta
tBHQ	: tert-butylhydroquinone
TBS	: tris buffered saline
TH	: tyrosine hydroxylase
TNF- $\alpha$	: tumor necrosis factor- $\alpha$
TRPA1	: transient receptor potential ankyrin 1

本論文は、学術雑誌に掲載された以下の論文を基礎とするものである。

1. Insulin-like growth factor I specifically up-regulates expression of modifier subunit of glutamate-cysteine ligase and enhances glutathione synthesis in SH-SY5Y cells

*European Journal of Pharmacology* **771**:99–106 (2016)

**Shuhei Takahashi**, Akinori Hisatsune, Yuki Kurauchi, Takahiro Seki, Hiroshi Katsuki.

2. Polysulfide protects midbrain dopaminergic neurons from MPP<sup>+</sup>-induced degeneration via enhancement of glutathione biosynthesis

*Journal of Pharmacological Sciences*, submitted

**Shuhei Takahashi**, Akinori Hisatsune, Yuki Kurauchi, Takahiro Seki, Hiroshi Katsuki.

## 目次

第 1 章	緒論 .....	1
第 2 章	中枢神経系におけるインスリン及び IGF-I のグルタチオン産生系に対する効果とそのメカニズムの解明.....	7
第 1 節	背景 .....	7
第 2 節	目的 .....	8
第 3 節	実験成績.....	9
第 1 項	SH-SY5Y 細胞と C6 細胞におけるインスリン受容体及び IGF-I 受容体の発現確認.....	9
第 2 項	インスリン及び IGF-I による GCLC 及び GCLM mRNA の発現変化.....	11
第 3 項	IGF-I による GCLC 及び GCLM タンパク質の発現変化.....	14
第 4 項	IGF-I による細胞内総グルタチオンレベルの変化.....	16
第 5 項	IGF-I による GCLM mRNA の発現増加における Nrf2 の関与 .....	17
第 6 項	IGF-I による GCLM mRNA の発現増加と Nrf2 の核内移行における PI3K 及び ERK の関与 .....	20
第 7 項	ラット中脳スライス培養系での MPP <sup>+</sup> 誘発性ドパミンニューロン変性モデルにおける IGF-I の保護効果とグルタチオンの関与.....	23
第 8 項	ラット中脳スライス培養系での MPP <sup>+</sup> 誘発性ドパミンニューロン変性モデルにおける IL-4 の保護効果についての検討.....	26
第 9 項	SIRT6 のノックダウンによる IGF-I 受容体発現亢進への関与.....	28
第 4 節	考察 .....	30

<b>第 3 章</b>	<b>中脳切片培養系を用いた PD モデルにおける ポリスルフィドドナーの効果とその作用メカニズム の解明.....</b>	<b>35</b>
<b>第 1 節</b>	<b>背景 .....</b>	<b>35</b>
<b>第 2 節</b>	<b>目的 .....</b>	<b>36</b>
<b>第 3 節</b>	<b>実験成績.....</b>	<b>37</b>
第 1 項	MPP <sup>+</sup> 誘発性ドパミンニューロン変性に対する ポリスルフィドドナーの効果.....	37
第 2 項	MPP <sup>+</sup> による ROS 産生に対するポリスルフィドドナー の効果.....	40
第 3 項	ポリスルフィドドナーのドパミンニューロン保護効果 におけるグルタチオンの関与.....	42
第 4 項	GCL サブユニットをコードする mRNA の発現に対する ポリスルフィドドナーの効果.....	44
第 5 項	ポリスルフィドドナーによる細胞内 総グルタチオンレベルの変化.....	46
第 6 項	IFN- $\gamma$ / LPS 誘発性ドパミンニューロン変性モデル におけるポリスルフィドドナーの効果.....	49
<b>第 4 節</b>	<b>考察 .....</b>	<b>52</b>
<b>第 4 章</b>	<b>総括.....</b>	<b>58</b>
<b>第 5 章</b>	<b>実験の部.....</b>	<b>58</b>
<b>第 1 節</b>	<b>実験材料.....</b>	<b>61</b>
第 1 項	試薬.....	61
第 2 項	抗体.....	63
<b>第 2 節</b>	<b>細胞株の培養 .....</b>	<b>64</b>
第 1 項	SH-SY5Y 細胞及び C6 細胞の培養.....	64
第 2 項	SH-SY5Y 細胞及び C6 細胞の薬物処置.....	64

第3項	siRNA の導入.....	65
<b>第3節</b>	<b>中脳切片培養 .....</b>	<b>66</b>
第1項	中脳組織切片の作成及び維持.....	66
第2項	中脳組織切片の薬物処置.....	67
<b>第4節</b>	<b>Western blotting .....</b>	<b>68</b>
第1項	SH-SY5Y 細胞及び C6 細胞の細胞溶解液の調整.....	68
第2項	SH-SY5Y 細胞の核抽出物と核外抽出物の調整 .....	68
第3項	中脳組織切片の細胞溶解液の調整.....	69
第4項	中脳組織切片の核抽出物と核外抽出物の調整.....	69
第5項	Western blotting 法 .....	69
<b>第5節</b>	<b>Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR).....</b>	<b>71</b>
第1項	SH-SY5Y 細胞及び C6 細胞の RNA サンプルの調整 .....	71
第2項	中脳組織切片の RNA サンプルの調整 .....	71
第3項	RT-qPCR.....	71
<b>第6節</b>	<b>グルタチオン量測定 .....</b>	<b>73</b>
第1項	SH-SY5Y 細胞及び C6 細胞のグルタチオン量測定.....	73
第2項	中脳組織切片のグルタチオン量測定.....	74
<b>第7節</b>	<b>酵素抗体法による免疫組織化学染色法 .....</b>	<b>75</b>
<b>第8節</b>	<b>細胞内 ROS レベルの評価 .....</b>	<b>76</b>
<b>第9節</b>	<b>統計処理 .....</b>	<b>77</b>
<b>謝辞 .....</b>		<b>78</b>
<b>参考文献.....</b>		<b>79</b>



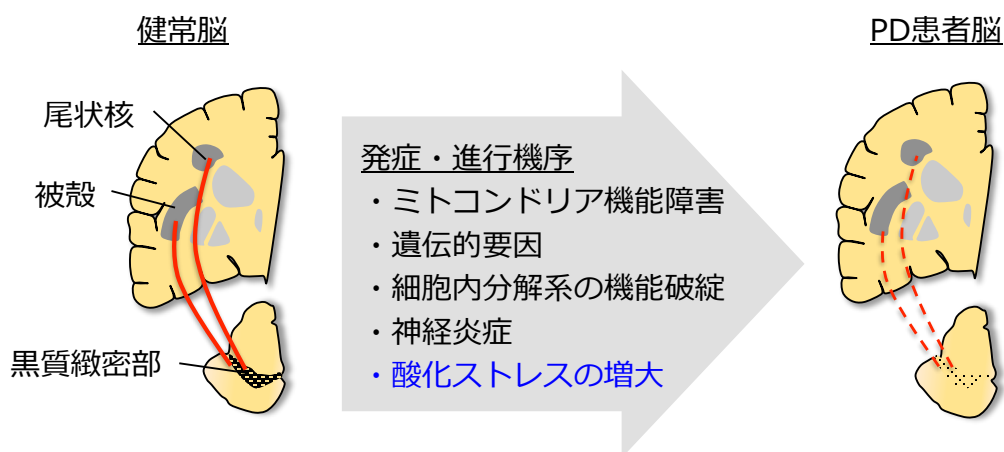
## 第1章 緒論

パーキンソン病 (PD) は進行性の神経変性疾患で、わが国の有病率は 10 万人当たり 100~150 人である。これはアルツハイマー病に次いで神経変性疾患のうち 2 番目に多い。加齢は PD において重要なリスクファクターであると考えられており<sup>1</sup>、わが国では 60 歳以上の 1%が PD を発症している。現在わが国は世界でもっとも高齢化が進んでおり、高齢化に伴う神経変性疾患患者の増加は深刻な社会問題として挙げられている。2016 年現在、総人口に占める 65 歳以上の割合は 27.7%であり、2065 年には 38.4%にのぼると推察され (厚生労働省, 平成 29 年度版高齢社会白書), PD の患者数は今後もさらに増えていくと考えられる。

PD の病理組織学的特徴として中脳黒質領域のドパミンニューロンの脱落がみられる (Figure 1)<sup>2</sup>。PD の主症状は振戦, 筋固縮, 動作緩慢, または姿勢保持障害といった運動症状である。中脳黒質におけるドパミンニューロンは線条体へとドパミンを供給するが、それが不足することで相対的なコリン作動性神経の緊張が増加し、PD の運動症状を呈すると考えられている。生命予後は悪くなく、平均余命は一般より 2~3 年短いだけだが、病状の進行とともに臥床生活となることで誤嚥性肺炎などの合併症が直接の死因となる。治療はドパミンとアセチルコリンのバランスを整え、運動症状を改善するための対症療法が中心である。原則としてドパミンアゴニスト, またはレボドパ製剤を用いて症状の改善を図るが、治療が長期に及ぶと wearing-off や on-off 現象, または薬剤誘発性ジスキネジアといった問題が生じる。これらの問題を改善していく薬剤も開発はされているものの治療満足度は決して高くなく、病状の進行を根本的に抑制する治療法開発が望まれる。

ドパミンニューロンの脱落において根本的な原因は未だ明らかでないが、最も重要な要因の一つとされているのがミトコンドリアの機能障害である<sup>3</sup>。PD

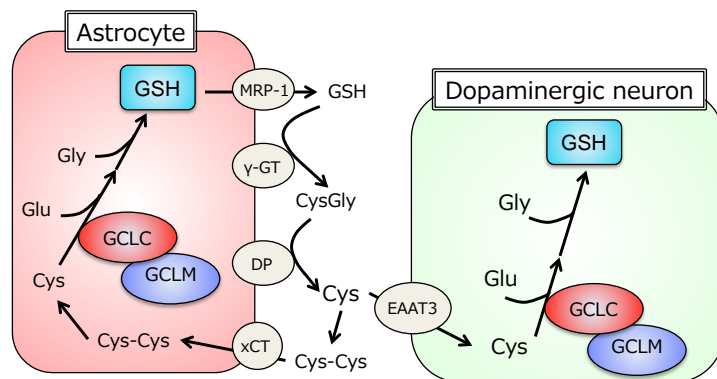
モデル作成にあたり 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) といった薬剤を投与したものが特に使用されている。MPTP は脳内のアストロサイトで 1-methyl-4-phenyl pyridinium (MPP<sup>+</sup>) に代謝される<sup>2</sup>。MPP<sup>+</sup>はドパミンニューロン選択的に取り込まれてミトコンドリアの呼吸鎖において複合体 I を阻害するため<sup>2</sup>、活性酸素種 (ROS) が産生され、それがドパミンニューロンの変性・脱落に寄与する<sup>4,5</sup>。また、PD のリスクファクターである加齢によっても黒質領域でのミトコンドリアの機能が低下し、ROS が産生され得ることが知られている<sup>5-7</sup>。さらには、家族性 PD の原因遺伝子である PINK1 や DJ-1 もミトコンドリア機能に関与し、ROS の産生に関わる<sup>3</sup>。その他、中脳黒質では他の脳領域よりミクログリアが多く存在しており<sup>8,9</sup>、ドパミンニューロン脱落を促進する二次的な要因としてミクログリアの集積による神経炎症も挙げられるが、ROS の産生増大が神経炎症増悪につながるとされている<sup>10</sup>。上述の様に種々の原因における ROS のコントロールは PD の根本的なドパミンニューロン脱落の抑制に重要であると考えられる。



**Fig. 1. Schematic image of neuropathology of PD**  
Modified from Dauer, W *et al.*, *Neuron* **39**, 889–909 (2003).



グルタチオン (GSH) は、ROS による組織傷害を軽減する内因性機構の一部として機能するが、特に中枢神経系では組織保護への貢献度が高いと考えられている<sup>4</sup>。グルタチオンは *l*-glutamate, *l*-cysteine 及び glycine からなるトリペプチドである。



**Fig. 2. Schematic image of glutathione biosynthesis.**  
 MRP-1: multidrug resistance protein 1,  $\gamma$ -GT:  $\gamma$ -glutamyltransferase, DP: dipeptidase, EAAT3: excitatory amino acid transporter, xCT: cystine/glutamic acid transporter

グルタチオンはそれら単独，またはグルタチオンペルオキシダーゼといった酵素を介して ROS である superoxide radical anion ( $O_2^{\cdot-}$ ) や hydroxyl radical ( $\cdot OH$ )，または peroxynitrite ( $ONO_2^-$ ) などと反応し酸化ストレスの消去を行う<sup>4</sup>。細胞内でのグルタチオン合成は2段階の反応で行われる (Figure 2)。1段階目の反応では，glutamate cysteine ligase (GCL) が *l*-glutamate と *l*-cysteine を反応させ， $\gamma$ -glutamylcysteine を産生する。また，2段階目の反応では，glutathione synthase (GS) が  $\gamma$ -glutamylcysteine と glycine を反応させグルタチオンを産生する<sup>11</sup>。これら2段階の反応は脳内において神経細胞とアストロサイトで行われる<sup>12</sup>。GS が活性化している状態で GCL を介した生成物である  $\gamma$ -glutamylcysteine の産生量が少なくなることから，細胞内グルタチオンの生合成においては，GCL が律速酵素であると考えられている<sup>13</sup>。つまり，GCL の発現の増大，または GCL 活性の増大が細胞内グルタチオンレベルの産生増大を促し，その細胞における酸化ストレス傷害に対する抵抗性の増大につながると考えられる。

GCL は，基質サブユニットである GCL catalytic subunit (GCLC) と酵素活性調節サブユニットである GCL modifier subunit (GCLM) の2つで2量体を形成しているホロ酵素である<sup>11</sup>。過去の報告において，GCL サブユニットの遺伝子

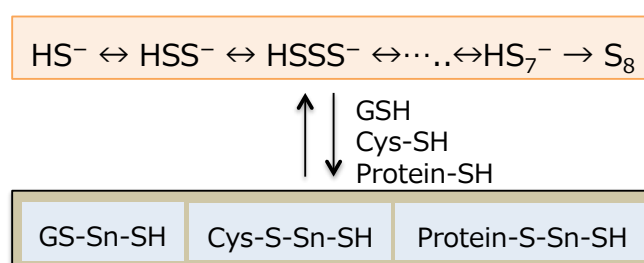
の発現は antioxidant-response element (ARE) によって調節されていることが示されている<sup>14,15</sup>. ARE を活性化するのが転写因子の nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) である. 細胞質に存在する Nrf2 は核内移行し ARE に結合することで, ARE に認識される遺伝子群の転写活性化が行われる. 通常, Nrf2 はユビキチンリガーゼのアダプタータンパク質である Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) と複合体を形成しており, ユビキチン-プロテアソーム系によって細胞質内で分解を受ける<sup>16</sup>. Nrf2 と Keap1 の複合体は酸化ストレス, または親電子性物質により解離し, それらにより遊離した Nrf2 は核内へ移行する<sup>17</sup>. これら酸化ストレス関連機構に加え, mitogen-activated protein kinases (MAPKs)<sup>18</sup> や phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt)<sup>15</sup>, または protein kinase C<sup>14</sup> といった細胞内シグナル経路を担うキナーゼ類が Nrf2 の核内移行を誘導することが知られている. MPTP 投与マウスにおいて, GCL の非可逆的な阻害薬である *l*-buthionine sulfoximine (BSO) によるグルタチオン産生の阻害や Nrf2 のノックダウンがドパミン神経の脱落を促進することが報告されている<sup>19-21</sup>. また, PD 患者の中脳黒質領域において, 組織内グルタチオンレベルの有意な減少が確認されている<sup>22,23</sup>. つまり, グルタチオン産生の調節メカニズムを解明することは, PD などの神経変性疾患の新規治療法の確立に寄与できると考えられる.

これまで, いくつかの報告でインスリンまたは insulin like growth factor-I (IGF-I) が非神経系細胞でグルタチオン合成を促進することが報告されてきた. 例えば, インスリンはラット肝細胞で GCLC 及び GCLM のうち, GCLC のみの転写活性を促す<sup>24</sup> こと, また *in vivo* において肝臓でのグルタチオン量を増加させる<sup>25</sup> ことが報告されている. またそれらの報告に加え, IGF-I はヒト冠状動脈内皮細胞において, GCLC mRNA 発現を増加することが報告されている<sup>26</sup>. インスリンや IGF-I はチロシンキナーゼ型受容体であるインスリン受容体及び IGF-I 受容体とそれぞれ結合し, その下流で MAPKs や PI3K/Akt などの細胞内シグナル分子

を活性化する<sup>27</sup>。これまでに、インスリンや IGF-I は脳内において、糖鎖の脱シアル化を介する神経突起の伸長促進因子 (H25 年度 高橋周平 修士論文)、神経栄養因子、または神経保護因子として認識されてきた<sup>28,29</sup> が、中枢神経系における酸化ストレス調節因子としての役割は議論されてこなかった。そこで中枢神経系の細胞でのインスリン及び IGF-I のグルタチオン生合成に対する影響の検討を行うことで、脳内グルタチオン産生の制御機構の理解につながるの考えに至った。

また近年では、硫化水素 (H<sub>2</sub>S) などの硫黄含有化合物が細胞内の抗酸化に関わるとの報告がいくつかなされている<sup>30-33</sup> ことから、硫黄含有化合物の中脳領域における薬理作用解明にも着手した。H<sub>2</sub>S は哺乳類の組織内においても内因的に産生されており<sup>34-36</sup>、一酸化窒素や一酸化炭素に続く第 3 のガス状シグナル伝達分子として注目されている<sup>37,38</sup>。哺乳類の組織内では cystathionine β-synthase (CBS)<sup>39</sup>、cystathionine γ-lyase (CSE)<sup>40</sup>、そして 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (3MST) と cysteine aminotransferase (CAT)<sup>41</sup> といった酵素を介して cysteine から産生される。近年の報告に基づくと、H<sub>2</sub>S は生体内でパーサルフィド (RSSH) やポリサルフィド (RSS<sub>n</sub>H, RSS<sub>n</sub>SR) といった形で存在している (Figure 3)<sup>34,42</sup>。

パーサルフィドやポリサルフィドは、酸素存在下で H<sub>2</sub>S から生成される<sup>43,44</sup> ことや、L-cysteine を基質として CBS や CSE による酵素反応を介して生成されること<sup>45</sup> が報告されている。これらの異なる分子種が存在するということは、H<sub>2</sub>S の生物学的作用が実際はポリサルフィドなどの他の分子種を介した作用である可能性を提起する。H<sub>2</sub>S の薬理作用については、酸化ストレス誘導性の神経変性モデルにおいて保護的な効果をもたらす<sup>30-32</sup> ことや、動



**Fig. 3. Persulfide or polysulfide species in vivo.**  
Modified from Dojindo WEB site.

脈の弛緩を誘導する<sup>46</sup>, また細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  恒常性の維持に関わる<sup>47</sup> ことや, transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) チャネルの機能調節を行う<sup>48</sup> といったことなどが報告されている. 近年では, ラットアストロサイトを用いた研究において, 組織内にポリスルフィド体を産生するポリスルフィドドナーが,  $\text{H}_2\text{S}$  ドナーに比べてより強く TRP チャネルの機能を調節することが示された<sup>49</sup>. しかし, ポリスルフィドが  $\text{H}_2\text{S}$  に比べ, 優れた神経保護作用を持つかどうかについては不明である. そこで, 中脳ドパミン神経変性におけるポリスルフィドドナーの作用解析とそのメカニズム解析を行うことで, PD の新規治療標的創出の手がかりを得ることを期待した.

以上の背景を踏まえ, 第 2 章では神経様細胞及びアストロサイト様細胞を用いてインスリン及び IGF-I がグルタチオンの生合成に影響するか検討した. その結果, 他の細胞種におけるメカニズムとは一部異なるグルタチオンの生合成経路の活性化作用が神経様細胞においてみられた. また, 中脳組織を用いた検討で IGF-I によるドパミンニューロン保護効果にグルタチオンの産生が関与することを見出した. 第 3 章では, ドパミンニューロン変性を抑制しうる分子としてポリスルフィドに着目して検討を進め, ポリスルフィドドナーが中脳組織においてドパミンニューロン保護効果を持つこと, 及びその保護効果の発現にグルタチオン産生が関与することを見出した.

## 第2章 中枢神経系におけるインスリン及び IGF-I のグルタチオン産生系に対する効果とそのメカニズムの解明

### 第1節 背景

グルタチオンは SH 基を持つトリペプチドである。グルタチオンは、すべての哺乳類において活性酸素種 (ROS) を介したダメージを軽減し、組織での酸化バランスを制御しており、特に中枢神経系では組織保護への貢献度が高い<sup>4</sup>。グルタチオンはパーキンソン病 (PD) 患者において脳黒質領域での発現量低下がみられる<sup>22,23</sup> ことから、グルタチオンの制御メカニズムの解明が PD の新規治療法の確立に寄与すると考えられる。グルタチオン合成において、glutamate cysteine ligase (GCL) が第一段階の反応として利用される。GCL は、基質サブユニットである GCL catalytic subunit (GCLC) と酵素活性調節サブユニットである GCL modifier subunit (GCLM) の2つで2量体を形成して酵素としての機能を果たしている<sup>11</sup>。GCL は GSH 合成の律速酵素である<sup>13</sup> ことが知られており、GCL の発現量の増加、または酵素活性の増加が GSH の発現量の増加につながると考えられる。

過去の研究では、インスリンまたは insulin like growth factor-I (IGF-I) が非神経系細胞において GCL の発現を調節すること<sup>24-26</sup> が報告されてきた。これまで、インスリンや IGF-I は神経栄養因子として、また神経保護因子として広く認識されてきた<sup>28,29</sup> が、中枢神経系における酸化ストレス調節因子としての役割は議論されてこなかった。本章では中枢神経系の細胞でインスリン及び IGF-I はグルタチオン生合成に対し促進的に働くのではないかと仮定した。

また、IGF-I は酸化ストレス誘導性の神経細胞死を抑制することが報告されている<sup>28,29</sup> が、この神経保護効果におけるグルタチオンの関与は不明である。インスリン及び IGF-I にグルタチオン生合成促進作用があるのであれば、神経保護作用にグルタチオン産生が関わるのではないかと推測される。

## 第2節 目的

インスリン及び IGF-I がグルタチオン生合成経路を活性化するかについて、神経系の細胞としてヒト神経芽細胞腫である SH-SY5Y 細胞を、またアストロサイト様の細胞としてラットグリオーマである C6 細胞を用いて検討することとした。また、ラット中脳切片培養系を用いた MPP<sup>+</sup>誘発性のドパミンニューロン変性モデルにおいて、IGF-I がグルタチオン産生に依存して保護効果を示すか検討することとした。

### 第3節 実験成績

#### 第1項 SH-SY5Y 細胞と C6 細胞におけるインスリン受容体及び IGF-I 受容体の発現確認

インスリン及び IGF-I はラット肝細胞やヒト冠状動脈内皮細胞といった神経細胞以外のいくつかの細胞種において GCLC の発現量を増大させることが報告されている<sup>24,26</sup>。また、脳内でのグルタチオン生合成は主に神経細胞とアストロサイトで行われている<sup>12</sup>。そこで、神経系の細胞としてヒト神経芽細胞腫である SH-SY5Y 細胞と、アストロサイト様の細胞としてラットグリオーマの C6 細胞を用いてインスリンまたは IGF-I が GCLC 及び GCLM の mRNA 発現を増加させるか調べた。それにあたり、まず SH-SY5Y 細胞と C6 細胞におけるインスリン受容体及び IGF-I 受容体の発現を確認した。インスリン受容体及び IGF-I 受容体は二つの  $\alpha$  サブユニットと二つの  $\beta$  サブユニットから構成されており、細胞膜上に露出しインスリンや IGF-I が結合する為の  $\alpha$  サブユニットと、細胞膜を貫通して細胞質内にチロシンキナーゼ活性を持つ  $\beta$  サブユニットがジスルフィド結合した構造を持つ。そこでインスリン受容体及び IGF-I 受容体の  $\beta$  サブユニットに対する抗体を用いてウエスタンブロッティング法を行い、それら受容体の発現の有無を検討した。その結果、SH-SY5Y 細胞及び C6 細胞の両方でインスリン受容体及び IGF-I 受容体の発現が確認できた (Figure 4)。



**Fig. 4. Insulin receptor  $\beta$  and IGF-I receptor  $\beta$  are expressed in SH-SY5Y cells and C6 cells.**

Western blot analysis of the expression of insulin receptor  $\beta$  and IGF-I receptor  $\beta$ .

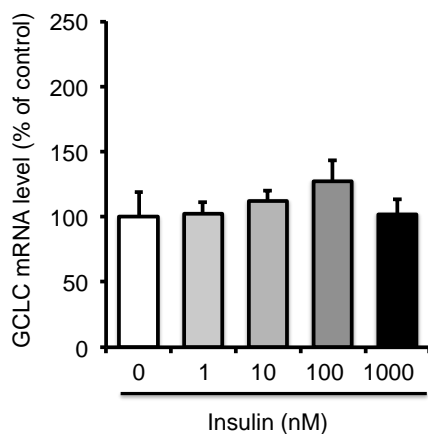


## 第2項 インスリン及び IGF-I による GCLC 及び GCLM mRNA の発現変化

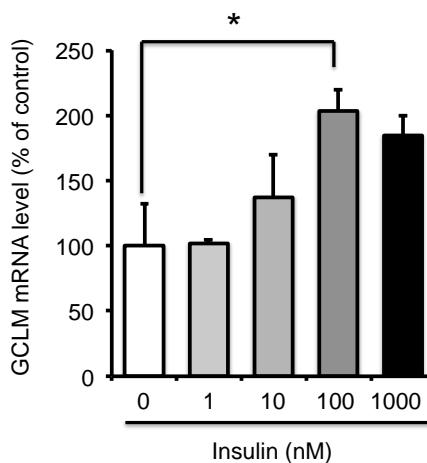
前項の検討により, SH-SY5Y 細胞と C6 細胞においてインスリン及び IGF-I 受容体の発現が確認できた. そこで次に, インスリン及び IGF-I による GCLC 及び GCLM mRNA の発現の変化を RT-qPCR 法で検討した. SH-SY5Y 細胞においてインスリン (1-1000 nM) と IGF-I (0.1-100 nM) のどちらも GCLC mRNA の発現を変化させなかった (Figure 5A, C, E). 一方, インスリンと IGF-I は処置後 12 時間で濃度依存的に GCLM mRNA の発現を増加した (Figure 5B, D). また, 10 nM の IGF-I は処置時間依存的に GCLM mRNA の発現を増加した (Figure 5F). C6 細胞においても同様の検討を行ったところ, GCLC 及び GCLM mRNA の発現はポジティブコントロールである tert-butylhydroquinone (tBHQ) の処置により増加がみられたものの, インスリン及び IGF-I の処置では変化しなかった (Figure 5G-J). これらの結果から, インスリン及び IGF-I は特に SH-SY5Y 細胞で GCLM mRNA の発現を増加させることが示された.

**A**

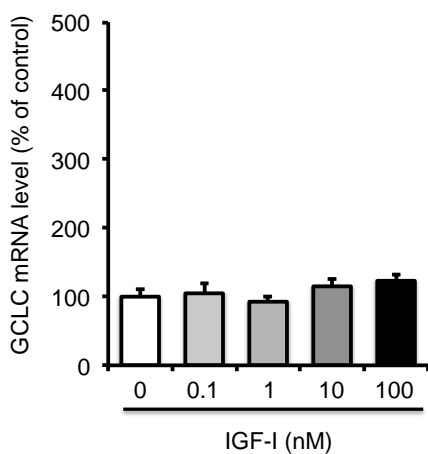
SH-SY5Y

**B**

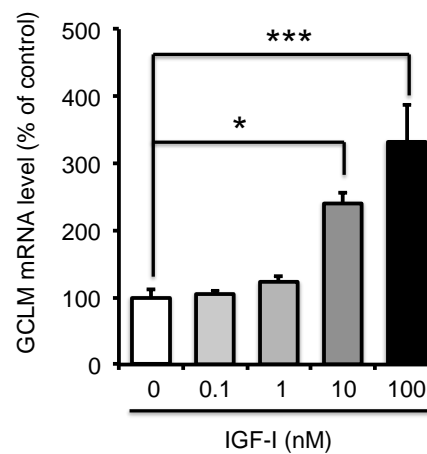
SH-SY5Y

**C**

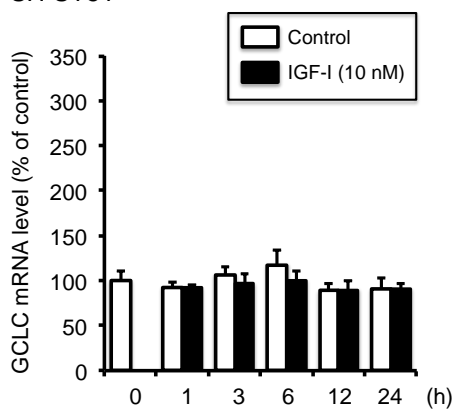
SH-SY5Y

**D**

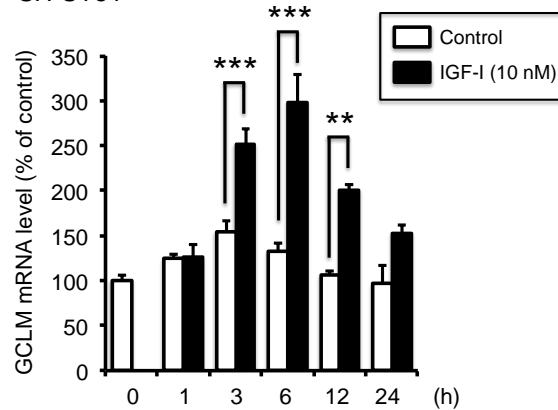
SH-SY5Y

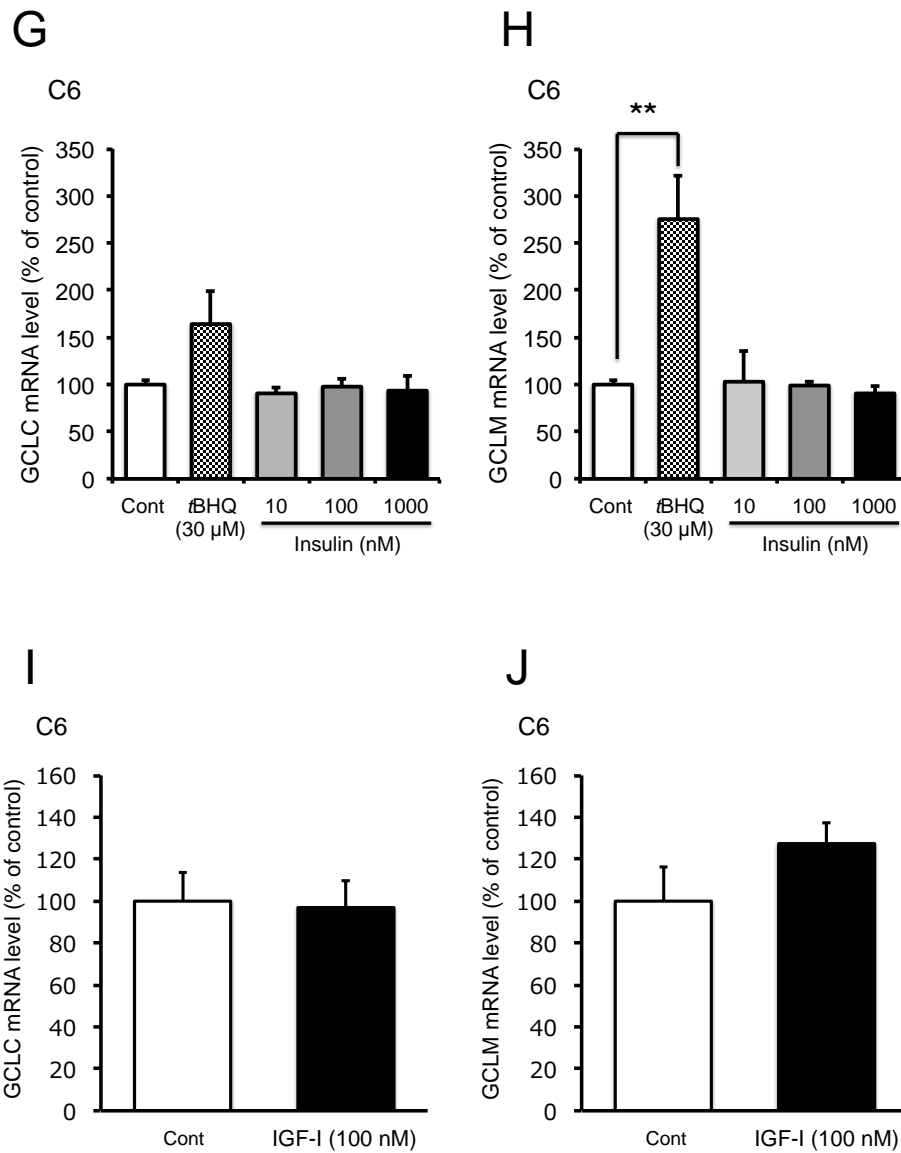
**E**

SH-SY5Y

**F**

SH-SY5Y



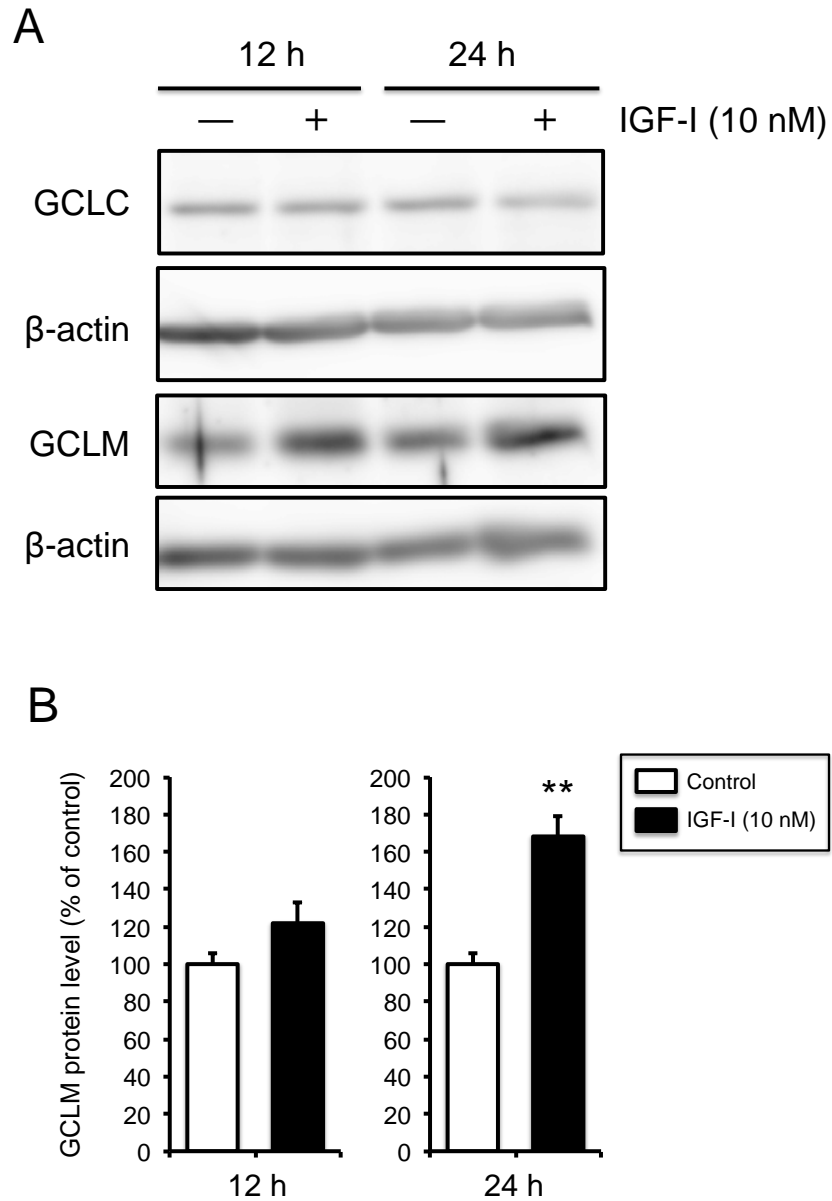


**Fig. 5. Insulin and IGF-I increase expression of GCLM but not GCLC in SH-SY5Y cells.**

(A-J) RT-PCR analysis of the effect of insulin and IGF-I on expression levels of GCLC and GCLM mRNAs. (A~D) SH-SY5Y cells were treated with insulin or IGF-I at indicated concentrations for 12 h. (E, F) SH-SY5Y cells were treated with 10 nM IGF-I for indicated periods. (G~J) C6 cells were treated with insulin, tBHQ, or IGF-I at indicated concentrations for 12 h. n = 3-6. \*P < 0.05 \*\*, P < 0.01, \*\*\* P < 0.001.

### 第3項 IGF-Iによる GCLC 及び GCLM タンパク質の発現変化

前項の結果からインスリン及び IGF-I は SH-SY5Y 細胞において GCLM mRNA の発現を増加することが示されたので、次にタンパク質レベルにおける検討を行った。前項までの結果において、IGF-Iの方がインスリンより顕著な効果を示したため、以降は IGF-I を用いて検討を行った。IGF-I (10 nM) 処置後 12 時間及び 24 時間でウエスタンブロッティング法を行い GCLC 及び GCLM タンパク質の発現レベルを検討したところ、mRNA での結果と同様に IGF-I は GCLC タンパク質の発現レベルを変化させなかった (Figure 6A)。一方、IGF-I (10 nM) は処置後 24 時間で GCLM タンパク質の発現レベルを有意に増加させた (Figure 6A, B)。したがって IGF-I は mRNA レベルでの結果と同様に GCLM のみのタンパク質発現レベルを増加させることが示された。

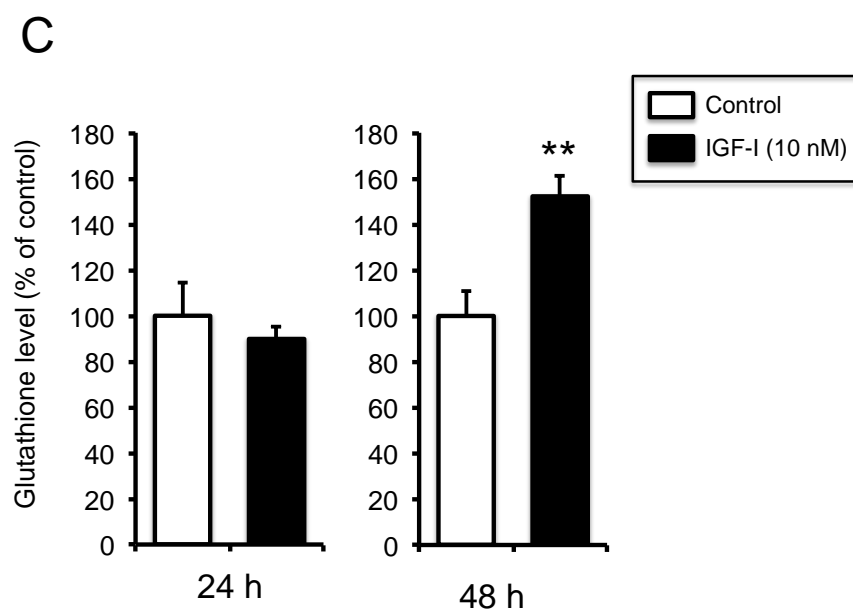


**Fig. 6. IGF-I increases GCLM protein in SH-SY5Y cells.**

(A, B) Western blot analysis of the effect of IGF-I on expression levels of GCLC and GCLM proteins. SH-SY5Y cells were treated with IGF-I (10 nM) for 12 or 24 h. n = 6-7. \*\* P < 0.05 vs. control.

#### 第4項 IGF-Iによる細胞内総グルタチオンレベルの変化

GCLはGSHの生合成において律速酵素であることが知られている<sup>13</sup>。前項までの結果から、IGF-IはGCLM mRNA及びタンパク質の発現を増加させることが示された。そこで次に、グルタチオン定量法を用いて細胞内総グルタチオン量の変化についての検討を行った。IGF-Iの処置後48時間において細胞内の総グルタチオン量は有意に増加した (Figure 7)。



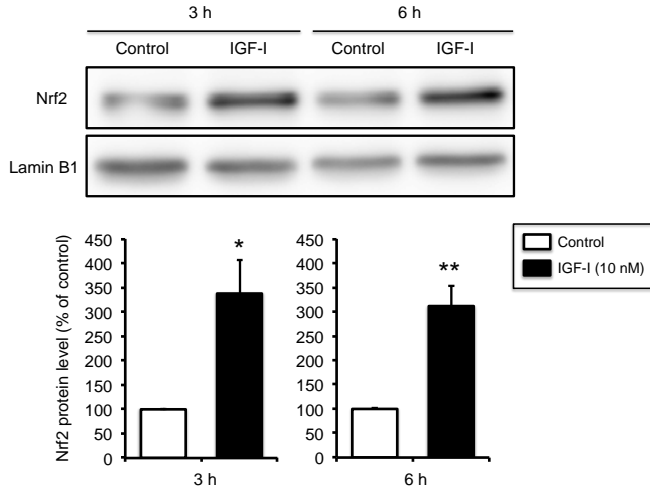
**Fig. 7. IGF-I increases cellular glutathione content in SH-SY5Y cells.**

Effect of IGF-I on cellular total glutathione level. SH-SY5Y cells were treated with IGF-I (10 nM) for 24 or 48 h. n = 6-7. \*\* P < 0.05 vs. control.

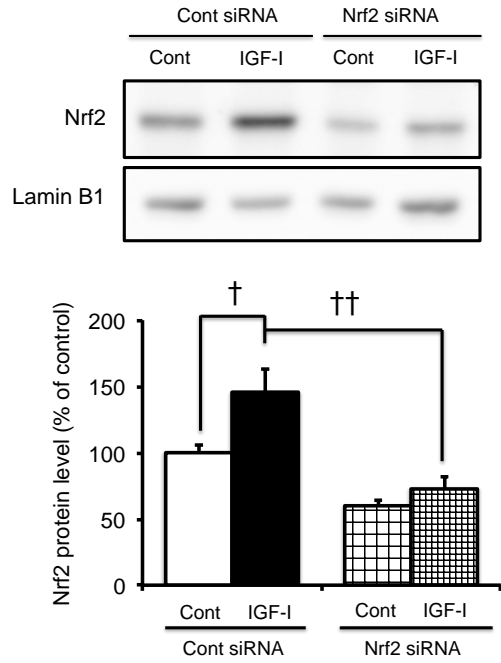
## 第5項 IGF-I による GCLM mRNA の発現増加における Nrf2 の関与

前項までの結果から IGF-I は SH-SY5Y 細胞において GCLM mRNA 及び GCLM タンパク質の発現レベルを増加させ、さらに細胞内総グルタチオン量も増加させることがわかった。そこで次に、IGF-I による GCLM mRNA の発現増加のメカニズムを検討することとした。GCLC や GCLM の発現は antioxidant-response element (ARE) 配列を介した転写調節によって制御されている<sup>14,15</sup>。また、転写因子である nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) は ARE に結合し、ARE により調節される遺伝子群の転写活性化を誘導する<sup>16</sup>。そこでまず、IGF-I が Nrf2 の核内移行を誘導するかについての検討を行った。IGF-I (10 nM) 処置後 3 時間及び 6 時間の SH-SY5Y 細胞からタンパク質を回収し、その核抽出画分を用いてウエスタンブロッティングを行なったところ、核内の Nrf2 タンパク質レベルの増加がみられた (Figure 8A)。次に Nrf2 が IGF-I による GCLM mRNA の発現増加に関与するかについて siRNA を用いた検討を行った。SH-SY5Y 細胞に Nrf2 の siRNA を導入したところ、IGF-I (10 nM) の処置後 6 時間でみられた核内の Nrf2 タンパク質レベルの増加はみられなくなった (Figure 8B)。この条件において、IGF-I (10 nM) による GCLM mRNA の発現増加は Nrf2 の siRNA を導入することで、そのほとんどがみられなくなった (Figure 8C)。以上の結果から、IGF-I は Nrf2 の核内への動員を介して GCLM mRNA の発現増大を誘導することが示唆された。

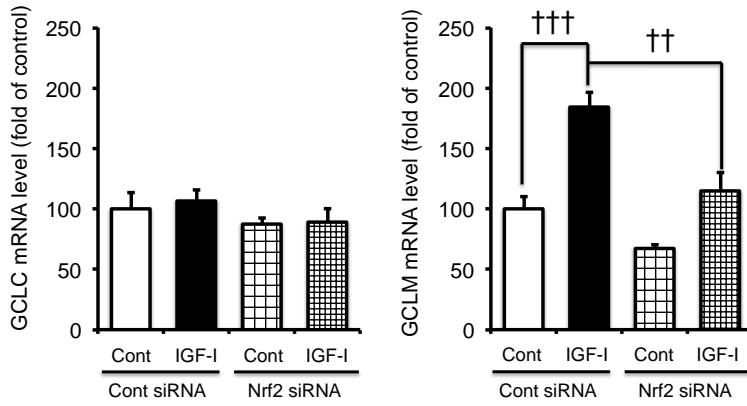
**A**



**B**



**C**





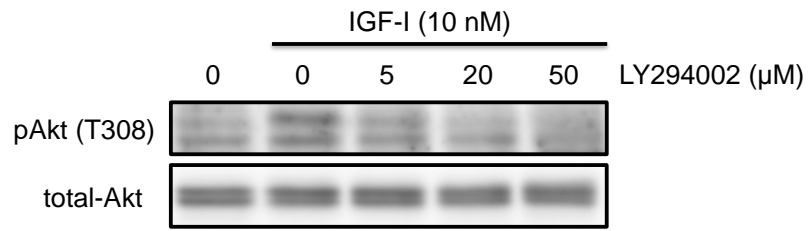
**Fig. 8. Nrf2 mediates IGF-I-induced GCLM expression in SH-SY5Y cells.**

(A, B) Western blot analysis of the effect of IGF-I on nuclear translocation of Nrf2. (A) SH-SY5Y cells were treated with IGF-I (10 nM) for 3 or 6 h, and the level of Nrf2 protein in nuclear fraction was examined. (B) SH-SY5Y cells were transfected with control siRNA or Nrf2 siRNA. After 48 h of transfection, cells were treated with IGF-I (10 nM) for 6 h, and the level of Nrf2 protein in nuclear fraction was examined. (C) RT-PCR analysis of the effect of Nrf2 siRNA on expression levels of GCLC and GCLM mRNAs. SH-SY5Y cells were transfected with control siRNA or Nrf2 siRNA. After 48 h of transfection, cells were treated with IGF-I (10 nM) for 6 h, and the levels of GCLC and GCLM mRNAs were examined. n = 4 (A, B), n = 6 (C). \* P < 0.05, \*\* P < 0.01 vs. control, † P < 0.05, †† P < 0.01, ††† P < 0.001.

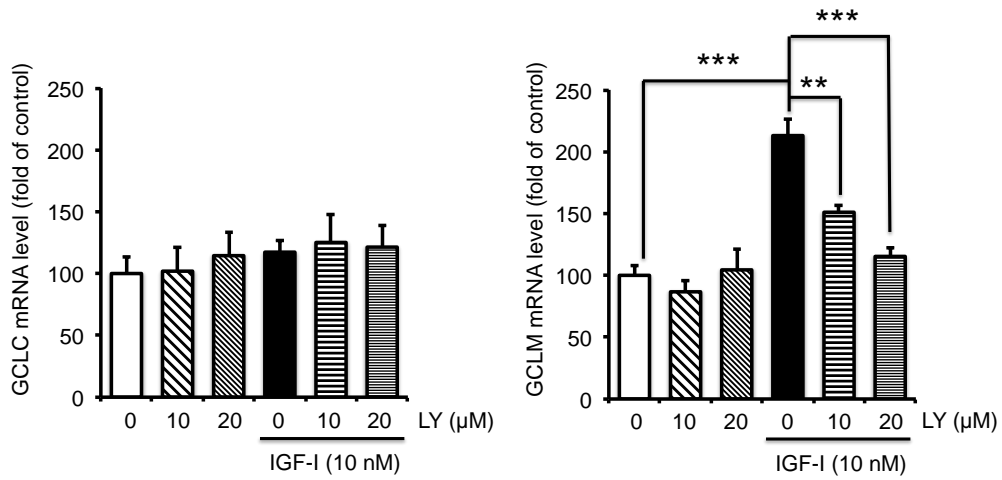
## 第6項 IGF-I による GCLM mRNA の発現増加と Nrf2 の核内移行における PI3K 及び ERK の関与

インスリン受容体及び IGF-I 受容体はチロシンキナーゼ型の受容体であり、これらが刺激されると mitogen-activated protein kinases (MAPKs) 経路や phosphoinositide 3-kinase (PI3K) /protein kinase B (Akt)<sup>15</sup> 経路といった細胞内シグナル経路が活性化することが知られている<sup>27</sup>。そこで、IGF-I による GCLM mRNA の発現増加及び Nrf2 の核内移行にこれらシグナル経路が関与しているか検討した。それぞれの経路の阻害薬として、PI3K 特異的阻害薬である LY294002 と、MEK/ERK 阻害薬である PD98059 を用いた。まず PI3K 経路の阻害薬である LY294002 が実際に IGF-I によるシグナルを抑制できるか確認した。SH-SY5Y 細胞において、IGF-I (10 nM) の処置後 15 分で Akt のリン酸化がみられた。これに対し、5-20  $\mu$ M の LY294002 を 1 時間前処置しておくことでそのリン酸化がみられなくなることが確認できた (Figure 9A)。また、10  $\mu$ M または 20  $\mu$ M の LY294002 を IGF-I (10 nM) 処置の 1 時間前に処置することで、IGF-I (10 nM) による GCLM mRNA の発現増加は抑制された (Figure 9B)。同様に、20  $\mu$ M の LY294002 を IGF-I (10 nM) 処置の 1 時間前に処置しておくことで、IGF-I による核内の Nrf2 タンパク質レベルの増加は抑制された (Figure 9C)。次に、MEK/ERK 経路の阻害薬である PD98059 が実際に IGF-I によるシグナルを抑制できるか確認した。SH-SY5Y 細胞において、IGF-I (10 nM) の処置後 15 分で ERK1/2 のリン酸化がみられた。これに対し、20  $\mu$ M の PD98059 を 1 時間前処置しておくことで、そのリン酸化はみられなくなることが確認できた (Figure 9D)。しかし、20  $\mu$ M の PD98059 を IGF-I (10 nM) 処置の 1 時間前に処置しても、IGF-I (10 nM) による GCLM mRNA の発現増加は抑制されなかった (Figure 9E)。以上の結果から、IGF-I は MEK/ERK 経路ではなく、PI3K 経路を介して Nrf2 の核内移行の増大と GCLM mRNA の発現増加を誘導していることが示唆された。

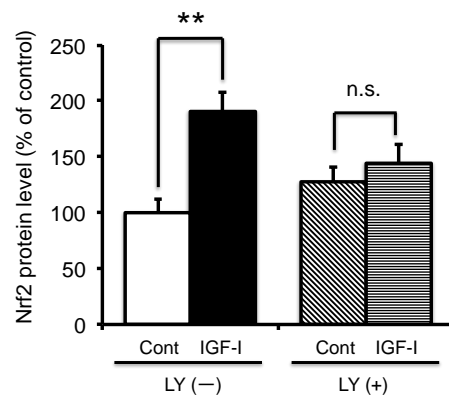
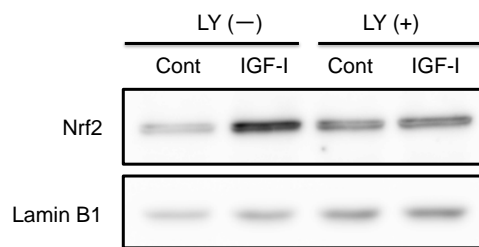
**A**

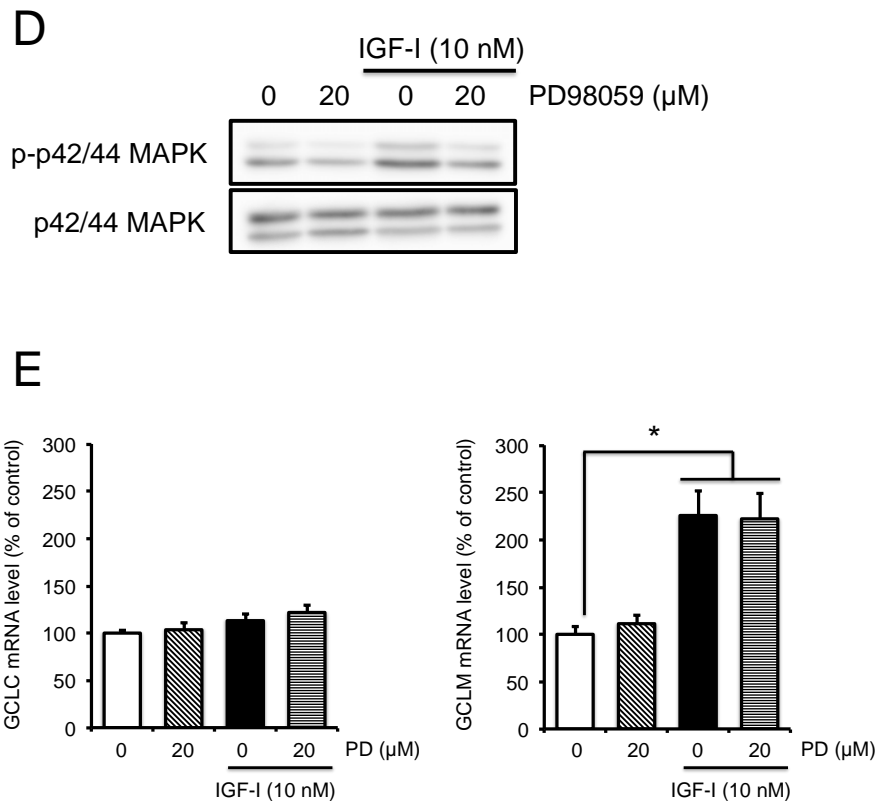


**B**



**C**





**Fig. 9 PI3K/Akt but not MEK/ERK pathway mediates IGF-I-induced Nrf2 recruitment and GCLM up-regulation.**

(A) Effect of LY294002 on IGF-I induced phosphorylation of Akt (T308). LY294002 was applied at indicated concentrations 1 h before and 15 min during treatment with 10 nM IGF-I. (B) Effect of LY294002 on expression levels of GCLC or GCLM mRNAs. LY294002 (20  $\mu$ M) was applied 1 h before and 12 h during treatment with 10 nM IGF-I. (C) Effect of LY294002 on IGF-I-induced nuclear translocation of Nrf2. LY294002 (20  $\mu$ M) was applied 1 h before and 6 h during treatment with 10 nM IGF-I. (D) Effect of PD98059 on IGF-I induced phosphorylation of p42/44 MAPKs. PD98059 (20  $\mu$ M) was applied 1 h before and 6 h during treatment with 10 nM IGF-I. (E) Effect of PD98059 on expression levels of GCLC or GCLM mRNAs. PD98059 (20  $\mu$ M) was applied 1 h before and 6 h during treatment with 10 nM IGF-I. n = 6 (B, E) or 7 (C). \* P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001, n.s. not significant.

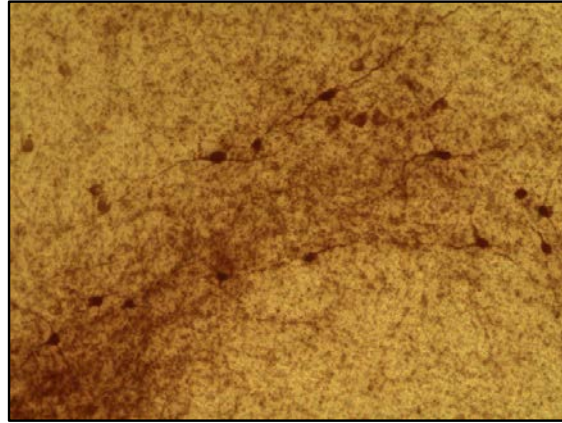
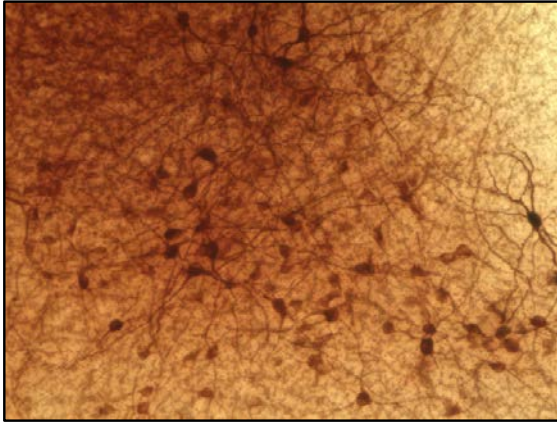
## 第7項 ラット中脳スライス培養系での MPP<sup>+</sup>誘発性ドパミンニューロン変性モデルにおける IGF-I の保護効果とグルタチオンの関与

前項までに得られた結果より，神経系細胞において GSH 生合成を促進するという IGF-I の新規薬理作用を見出すことができた．過去の報告において IGF-I はラットにおける 6-hydroxydopamine (6-OHDA) 誘導性のドパミンニューロン細胞死を抑制することが報告されている<sup>28</sup>．しかし，IGF-I のドパミンニューロン保護効果にグルタチオンの生合成が関与するかは定かではない．そこで，ラット中脳スライス培養系での MPP<sup>+</sup>誘発性ドパミンニューロン変性モデルを用いて，IGF-I が 1-methyl-4-phenyl pyridinium (MPP<sup>+</sup>) によるドパミンニューロン変性を抑制するか，またそこにグルタチオンの産生が関与するかについて検討した．MPP<sup>+</sup>はドパミントランスポーターを介して細胞内に取り込まれてミトコンドリア呼吸鎖における複合体 I を阻害し，細胞内に ROS を産生させ，ドパミンニューロンの変性を誘導する<sup>2</sup>．過去の報告より，ラット中脳切片培養系において 30  $\mu$ M の MPP<sup>+</sup>を処置することでドパミン神経の変性・脱落が生じることが分かっている<sup>50</sup>．過去の結果と同様に，MPP<sup>+</sup> (30  $\mu$ M) の処置後 48 時間において，チロシンヒドロキシラーゼ (TH) 免疫反応性によって同定される中脳組織内ドパミン神経の顕著な減少が観察された (Figure 10A, B)．これに対し，IGF-I (100 nM) を MPP<sup>+</sup>と共処置した場合，有意な TH 陽性細胞数の減少抑制効果が得られた (Figure 10A, B)．この保護効果にグルタチオンの産生が関与しているかを調べるため，GCL 阻害薬である BSO を用いた検討を行なった．BSO (10  $\mu$ M) を IGF-I (100 nM) と共処置することで IGF-I (100 nM) によるドパミンニューロン保護効果はみられなくなった (Figure 10A, B)．なお，BSO (10  $\mu$ M) 単独で TH 陽性細胞数に影響がなかった (data not shown)．以上の結果から，IGF-I はグルタチオンの産生を介して MPP<sup>+</sup>によるドパミン神経変性を抑制することが示された．

A

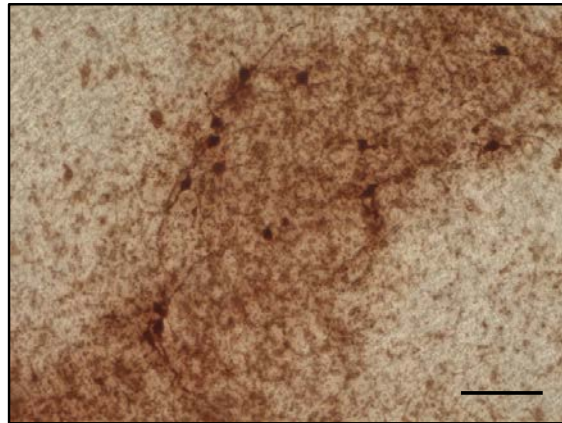
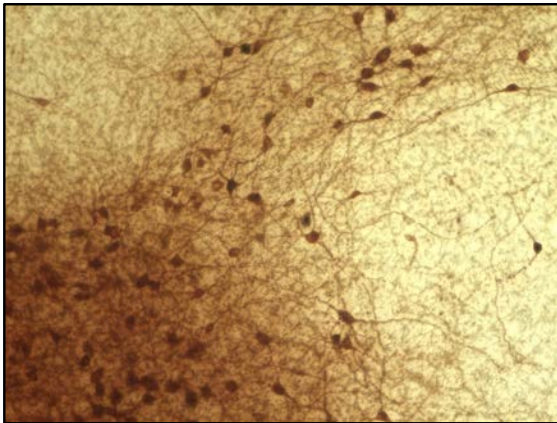
Control

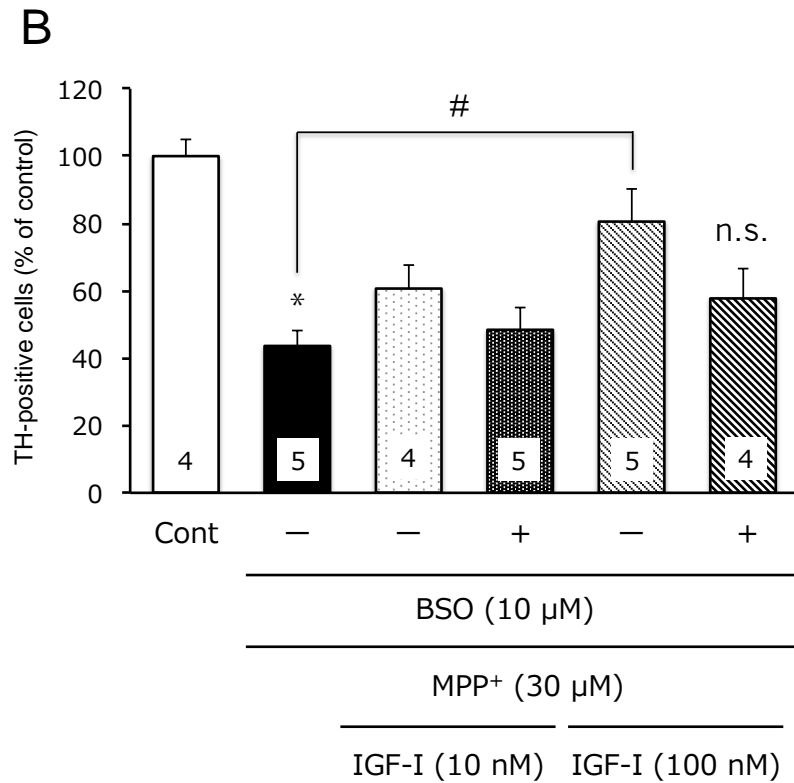
MPP<sup>+</sup> (30  $\mu$ M)



MPP<sup>+</sup> (30  $\mu$ M) + IGF-I (100 nM)

MPP<sup>+</sup> (30  $\mu$ M) + IGF-I (100 nM) + BSO (10  $\mu$ M)





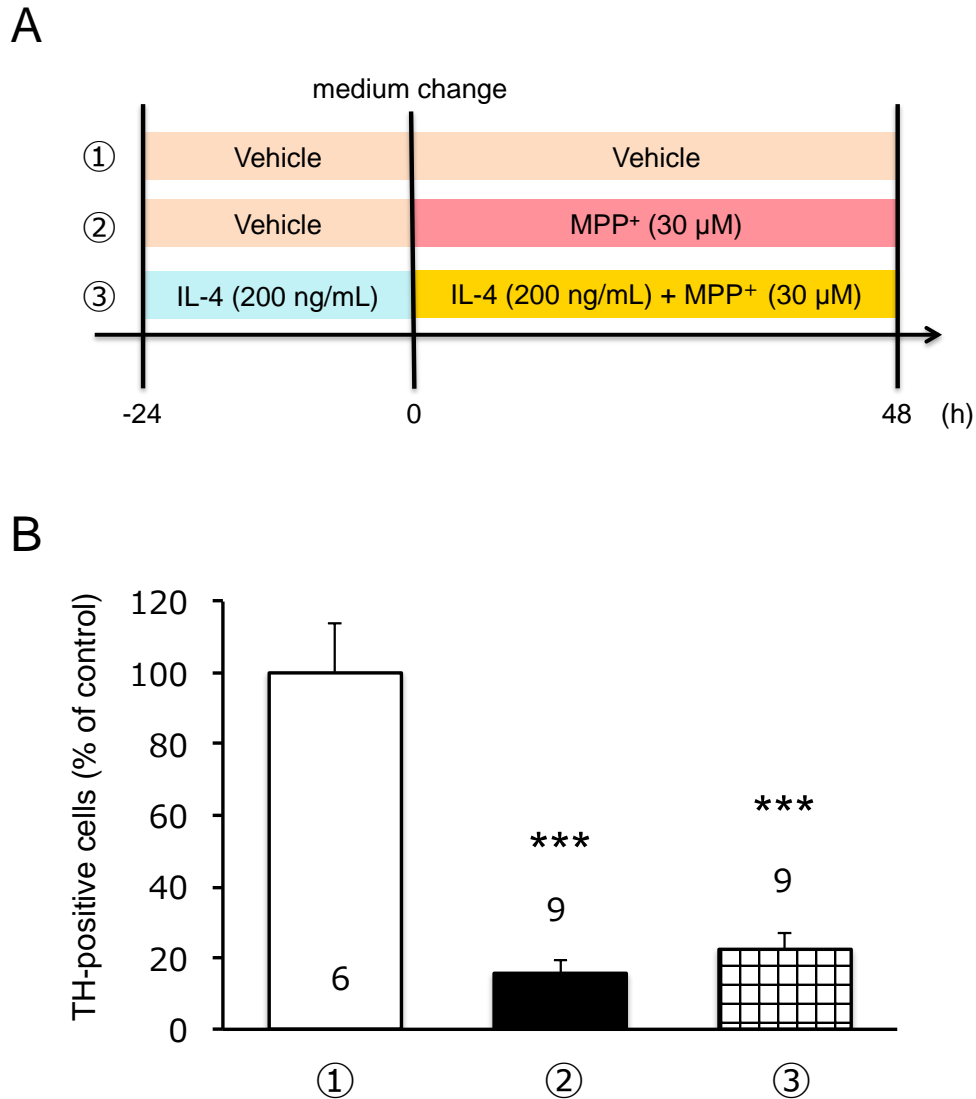
**Fig. 10. IGF-I protects dopaminergic neurons from MPP<sup>+</sup>-induced degeneration via glutathione biosynthesis.**

(A) Representative photomicrographs showing the results of immunohistochemistry for TH on midbrain slice cultures. Slices were cultured under control conditions, or treated with 30 μM MPP<sup>+</sup> for 48 h in the absence or the presence of IGF-I (10 or 100 nM) or 10 μM BSO. Scale bar, 100 μm. (B) Effect of 10 or 100 nM IGF-I and 10 μM BSO on MPP<sup>+</sup>-induced changes in the number of viable dopaminergic neurons is shown. Number of slices examined for each condition is indicated in each column in (B). \**P*<0.05 vs. control, #*P*<0.05, n.s.; not significant vs. treatment of MPP<sup>+</sup> (30 μM) alone.

## 第8項 ラット中脳スライス培養系での MPP<sup>+</sup>誘発性ドパミンニューロン変性モデルにおける IL-4 の保護効果についての検討

前項までの結果から、IGF-Iはグルタチオンの産生を介してドパミン神経変性を抑制することが示された。次に、内因的なIGF-Iに着目した検討を行った。全身におけるIGF-Iは主に肝臓で産生されるが、IGF-Iは血中においてIGF結合タンパク質と結合しており、血液脳関門を通過しにくいことが知られている<sup>51</sup>。そこで脳組織におけるIGF-Iの産生を調節することで、神経保護効果が得られるのではないかと考えた。脳内では主にミクログリアがIGF-Iの産生源となっている<sup>52</sup>ことや、interleukin-4 (IL-4)がマウスやラット初代培養ミクログリアでIGF-Iの産生を促進する<sup>53,54</sup>ことが知られている。そこで、IL-4が脳組織においてIGF-Iの産生を介して神経保護的に働くことを期待し、ラット中脳切片培養系でのMPP<sup>+</sup>誘発性ドパミンニューロン変性モデルにおけるIL-4の保護効果について検討した。Figure 11Aに示すように、IL-4によるIGF-Iの産生と、それによる細胞内グルタチオンの増加を企図してIL-4 (200 µg/ml)を24時間前処置し、その後MPP<sup>+</sup> (30 µM)とIL-4 (200 µg/ml)を共処置したが、この条件においてはIL-4によるドパミンニューロン保護効果はみられなかった (Figure 11B)。すなわち、中脳組織におけるIL-4処置のみではドパミンニューロンの保護に不十分であることが示唆された。



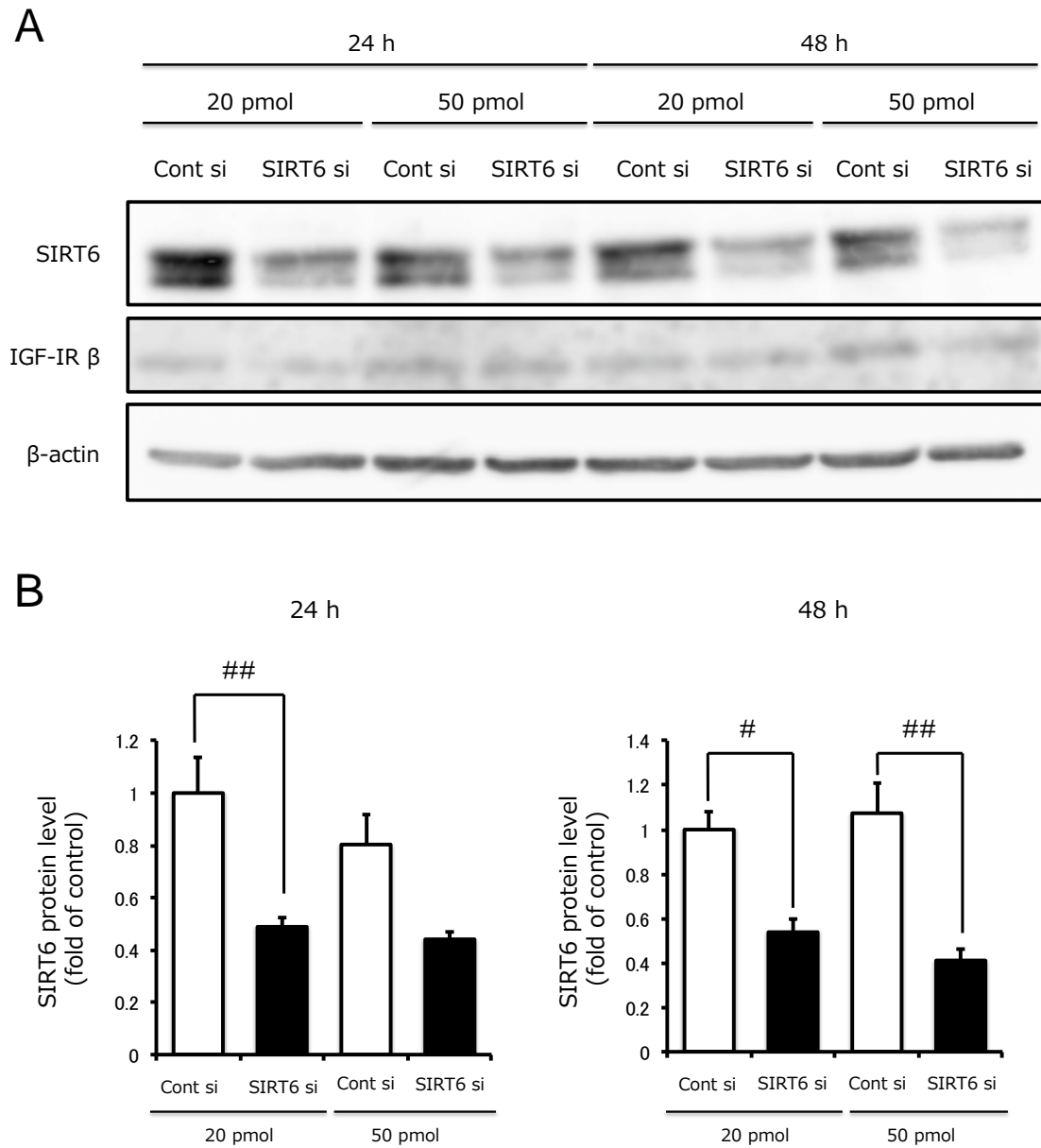


**Fig. 11. IL-4 does not protect dopaminergic neurons from MPP<sup>+</sup>-induced degeneration.**

(A) Schematic image of treatment of IL-4 and MPP<sup>+</sup>. (B) Effect of IL-4 (200 μg/ml) on MPP<sup>+</sup>-induced changes in the number of viable dopaminergic neurons is shown. IL-4 and MPP<sup>+</sup> were concomitantly applied according to the pattern of schematic protocol. Number of slices examined for each condition is indicated in each column. \*\*\* $P < 0.001$  vs. vehicle.

## 第9項 SIRT6 のノックダウンによる IGF-I 受容体発現亢進への関与

前項の結果から、内因的な IGF-I の産生を促すのみでは十分な保護効果が得られない可能性が示唆された。そこで IGF-I のシグナルを増強することを考え、IGF-I 受容体の発現亢進を促す分子の探索を試みた。ヒストン脱アセチル化酵素の 1 つである sirtuin 6 (SIRT6)<sup>55</sup> をノックアウトしたマウスの心臓組織において IGF-I 受容体の発現量が増加し、IGF-I シグナルが亢進することが報告されている<sup>56</sup>。また、SIRT6 は脳組織内で多く発現しており<sup>57</sup>、その中でも特に神経細胞において発現し、アストロサイトや内皮細胞ではあまり発現がみられない<sup>58</sup>。そこで、SH-SY5Y 細胞を用いて SIRT6 をノックダウンした際に IGF-I 受容体の発現量に変化があるか検討した。SIRT6 siRNA を導入し、その 24 時間後及び 48 時間後に細胞を回収し、ウエスタンブロッティング法を行い SIRT6 のタンパク質がノックダウンできていることを確認した (Figure 12A, B)。同様のタイミングで IGF-I 受容体のタンパク質発現レベルをウエスタンブロッティング法で確認した。SIRT6 siRNA を導入後 24 時間及び 48 時間において IGF-I 受容体のタンパク質発現レベルの増加はみられなかった (Figure 12A)。したがって、神経系細胞において、SIRT6 のノックダウンで IGF-I 受容体の発現亢進ができない可能性が示唆された。



**Fig. 12. Knockdown of SIRT6 does not affect expression of IGF-I receptor  $\beta$  (IGF-IR  $\beta$ ).**

Western blot analysis of the effect of SIRT6 siRNA on expression of IGF-IR is shown. SH-SY5Y cells were transfected with control siRNA or SIRT6 siRNA (20 or 50 pmol). After 48 h of transfection, the levels of SIRT6 and IGF-IR protein were examined.  $n = 4$ . # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ .

## 第4節 考察

本章では、神経系の細胞である SH-SY5Y 細胞でインスリン及び IGF-I がグルタチオンの生合成経路を活性化することを示した。また、その分子メカニズムは他の細胞種と異なることを見出した (Figure 5)。まず、本研究では神経系細胞において GCLM mRNA の発現増加はみられたものの、GCLC mRNA の発現増加はみられなかった。一方で、それとは対照的にラット肝細胞やヒト冠状動脈内皮細胞においてインスリンや IGF-I は GCLC の発現レベルを特異的に増加させる<sup>24,26</sup>。

また本章では、SH-SY5Y 細胞において IGF-I による GCLM タンパク質の発現増加を確認した。それに加えて、IGF-I による細胞内総グルタチオンレベルの増加も確認できた。これらの結果から、細胞内グルタチオン生合成の活性化には GCL サブユニットのうちの一つである GCLM の発現増加のみで十分であることが示唆された。これに関連して、GCLM 欠損マウスにおける線条体のグルタチオンレベルは野生型マウスに比べ低いことが知られている<sup>59</sup>。このような報告を鑑みても GCLM 単独で十分にグルタチオンレベルは調節されることが考えられる。

さらに本章ではインスリン及び IGF-I は C6 細胞において GCLC と GCLM の発現に影響しないことを確認した。つまりインスリン及び IGF-I は細胞種によって GCL 発現に対する影響が変わり得ることが考えられる。

Nrf2 は転写因子であり、抗酸化ストレス分子やフェーズ II 酵素の発現増加を担っている<sup>16</sup>。本章では SH-SY5Y 細胞において IGF-I が核内の Nrf2 レベルを増加させることを見出した。この結果は、IGF-I によって Nrf2 依存的な遺伝子の転写活性が誘導されることを示唆している。これに加え、Nrf2 をノックダウンした検討において、Nrf2 は IGF-I による GCLM mRNA の発現増加を担っている

ことが確認できた。いくつかの報告で GCLM 遺伝子の転写活性は Nrf2/ARE によって制御されていることが示されている<sup>11</sup>。また本章において特筆すべきこととしては、GCLC 遺伝子の転写活性についても Nrf2/ARE によって制御されている<sup>11</sup> 報告はあるものの、SH-SY5Y 細胞において Nrf2 は GCLC の転写活性を制御していなかった点である。このような過去の報告と本章の結果との相違の原因について現時点では論理的な説明は困難であるが、今後 GCL サブユニットの発現調節機構について細胞種特異的なメカニズムの関与を念頭に置くべきである。例えば、cyclic AMP response element-binding protein (CREB) が Nrf2 よりも HepG2 細胞における GCLC の発現調節に重要であることが報告されている<sup>60</sup>。このような報告と同様に、SH-SY5Y 細胞における GCLC の発現調節は Nrf2 以外の転写因子が優位に調節を行っている可能性が考えられる。

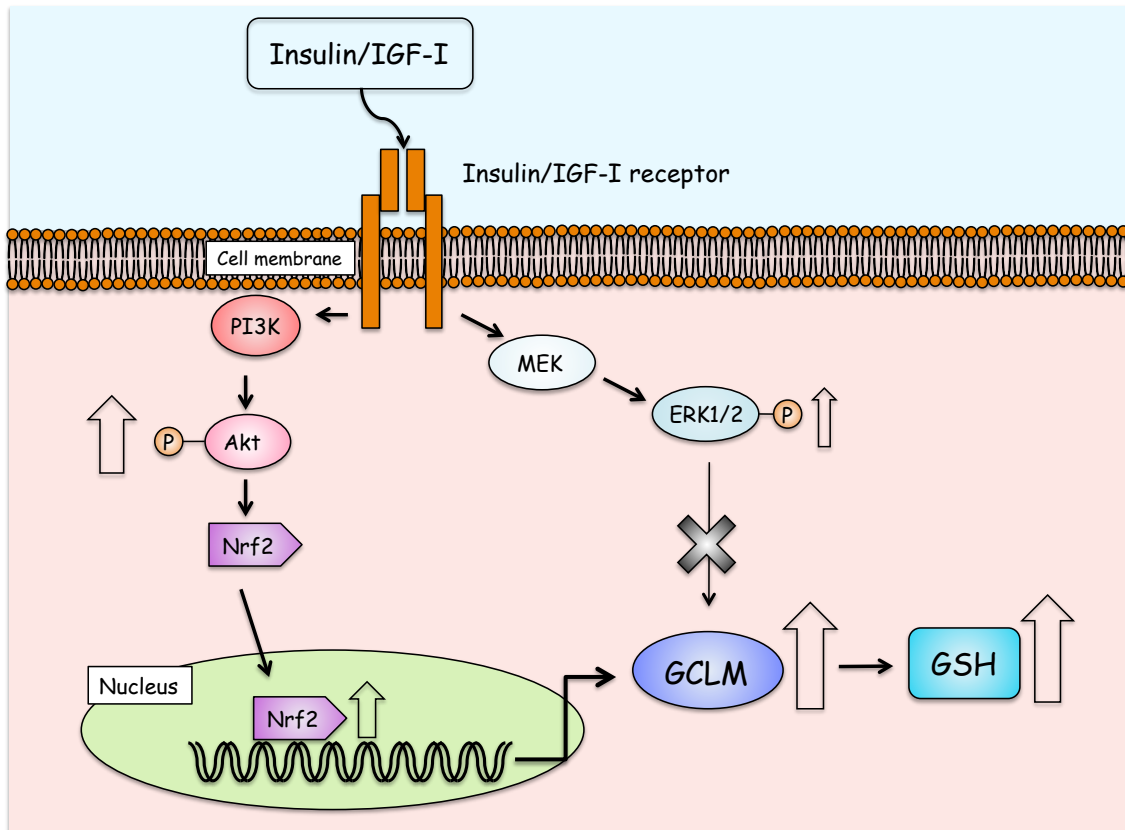
酸化ストレスは細胞質における Nrf2-Keap1 複合体を解離させることが知られており、解離した Nrf2 は核内へ移行する。このメカニズムに加え、いくつかの細胞内シグナル経路が Nrf2 の核内への移行を誘導し、Nrf2 依存的な遺伝子の転写活性を調節することが知られている。そのような細胞内シグナル経路として PI3K/Akt 経路<sup>15</sup> や MAPK 経路<sup>18</sup> が挙げられる。本章では PI3K 特異的な阻害薬として LY294002 を用いた検討を行い、PI3K/Akt 経路が IGF-I による Nrf2 核内移行に寄与していることを示した。また、LY294002 は IGF-I による GCLM の発現増加も抑制したことから、SH-SY5Y 細胞において IGF-I によるグルタチオンの生合成には PI3K/Akt 経路が重要なシグナル経路であることが示唆された。過去に、IGF-I のスプライシングバリエントである C-terminal mechano growth factor が SH-SY5Y 細胞において Nrf2 の核内移行を誘導することが報告されている。しかしこの報告では、LY294002 は mechano growth factor による Nrf2 の核内移行を抑制しなかった<sup>61</sup>。これまでの報告を鑑みても、神経系細胞において IGF-I が PI3K 経路を介して Nrf2 の核内移行を誘導するといった現象は本研究で初めて得られた知見であるといえる。

グルタチオンの生合成を促進することで、神経変性疾患において保護的な効果が得られることが考えられる<sup>62</sup>。また SH-SY5Y 細胞において、酸化ストレスを受けた状況下では細胞内グルタチオン含量がその生存を決定づけることが知られている<sup>63</sup>。さらに、IGF-I は酸化ストレス誘導性の神経変性に対し、保護的に働くことが報告されている<sup>28,29</sup>。本章ではラット中脳切片培養系を用いて IGF-I がドパミン神経毒である MPP<sup>+</sup>による変性からドパミンニューロンを保護すること、また BSO を用いてグルタチオン産生を抑制するとその保護効果がみられなくなることを見出した。つまり IGF-I によるグルタチオン生合成の促進は酸化ストレス誘導性の神経変性に対し重要な役割を担っていると考えられる。

IL-4 を用いて脳組織での内因的な IGF-I 産生が酸化ストレス誘導性の神経変性に対し保護的に働くか検討を行ってみたものの、期待する結果は得られなかった。最近、IL-4 はマウス中脳由来の初代培養神経細胞と初代培養ミクログリアを共培養した *in vitro* の条件で MPP<sup>+</sup>により誘発される神経変性に対し保護的に働くものの、MPTP 誘導性のマウス *in vivo* 神経変性モデルにおいては保護的な作用を持たないことが報告されている<sup>64</sup>。脳組織の三次元構築を維持した中脳組織を用いた本章での結果はこれを支持する結果と考えている。実際に IL-4 による IGF-I 産生の促進がどの程度達成されているかについては、IL-4 の保護効果が確認できなかったためそれ以上の解析に至らなかったが、上述のように IGF-I は神経保護効果を持つことは明確であり、IGF-I シグナルを今回の条件よりさらに強く活性化することが今後の課題であると考えられる。IGF-I 受容体は脳内では黒質領域のドパミン神経細胞及びアストロサイトでも発現している<sup>65</sup>。しかし、PD 患者の黒質領域ではインスリン受容体の発現が低下している<sup>66</sup>ことや、皮質の初代培養神経細胞において H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>による酸化ストレスで IGF-I 受容体が分解される<sup>67</sup>ことが報告されている。また、インスリン及び IGF-I シグナルは insulin receptor substrate (IRS) のチロシン残基をリン酸化することでシグナル

伝達を行うが、IRS のセリン残基がリン酸化されると本来のシグナル伝達は行われなくなる。6-OHDA 誘発性の PD モデルマウスでは脳内の線条体領域において IRS2 のセリン残基のリン酸化が誘導されることや IRS の発現自体が減少する<sup>68</sup>ことから、この PD モデルにおいてはインスリン及び IGF-I シグナル不全が生じることが示唆されている。これらの過去の知見のように酸化ストレスが生じている脳内では、インスリン及び IGF-I の受容体の減少かつそれら受容体以降のシグナル伝達不全といったインスリン及び IGF-I の抵抗性が生じていることが考えられる。そこで、IGF-I シグナルを亢進するための手がかりとなるものを探索しようと SIRT6 に着目し、IGF-I 受容体の発現増加を目的とした検討を行ったが、期待した結果は得られなかった。また近年、SIRT6 は間葉系細胞において Nrf2 と協働してその転写活性を亢進する働きがあることが報告され<sup>69</sup>、SIRT6 自体が抗酸化的に働く可能性が示唆されてきた。そこで SIRT6 に注目した検討は中断せざるを得なくなった。脳内インスリンや IGF-I を標的とした創薬には依然としてこれらの抵抗性の改善が課題となると考えられ、今後取り組むべき問題であると考えている。

上述のように、SH-SY5Y 細胞においてインスリン及び IGF-I はグルタチオン生合成を細胞種特異的なメカニズムで促進することが示された。細胞種特異的に IGF-I は GCLM の発現を増加し、特に PI3K/Akt シグナル依存的に核内 Nrf2 レベルを増加させることが示された。同様のシグナル伝達機構が中枢神経系のニューロンにおいても寄与しているかについては今後さらなる検討を行うべきである。さらに IGF-I は中脳組織において酸化ストレス誘導性の神経変性に対し保護的に働くこと、またその保護効果にはグルタチオンの生合成が必要であることが示された。本章で示した結果は、中枢神経系における神経栄養因子または神経保護因子としてのインスリン及び IGF-I の新規作用機序の一端を明らかにした重要な知見であると考えられる。



**Fig. 13. Proposed signaling mechanisms involved in insulin/IGF-I-induced up-regulation of glutathione biosynthesis in SH-SY5Y cells.**

Insulin/IGF-I induces up-regulation of GCLM (but not GCLC) expression that leads to increased synthesis of cellular glutathione. Up-regulation of GCLM expression is mediated by PI3K/Akt signaling pathway that recruits a transcription factor Nrf2 into the nucleus. MEK/ERK pathway is also activated in response to IGF-I receptor stimulation, but it does not contribute to GCLM up-regulation.



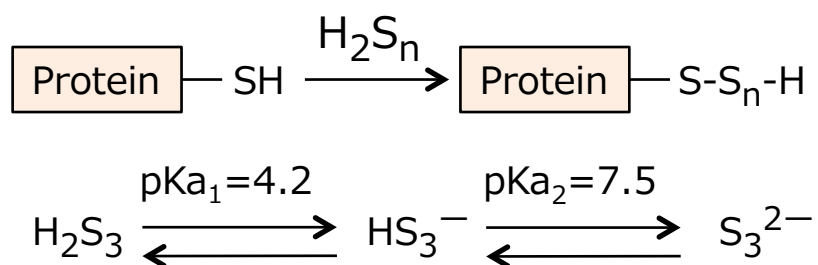
### 第3章 中脳切片培養系を用いた PD モデルにおけるポリスルフィドドナーの効果とその作用メカニズムの解明

#### 第1節 背景

前章では中枢神経系においてインスリン及び IGF-I がグルタチオン生合成を促進するという新規薬理作用を見出し、そのメカニズムの解明も行った。本章では、治療標的となりうる新規ターゲットの可能性を探ることとした。近年、硫化水素 ( $\text{H}_2\text{S}$ ) などの硫黄含有化合物が細胞内の抗酸化に関わる報告がいくつかなされている<sup>30-33</sup>ことから、本章では硫黄含有化合物の中脳組織における薬理作用に注目した。 $\text{H}_2\text{S}$  は哺乳類の組織内においても内因的に産生されており<sup>34-36</sup>、一酸化窒素や一酸化炭素に続く第3のガス状シグナル伝達分子として注目される<sup>37,38</sup>。 $\text{H}_2\text{S}$  は生体内でパースルフィド(RSSH)やポリスルフィド( $\text{RSS}_n\text{H}$ ,  $\text{RSS}_n\text{SR}$ )の形で存在している<sup>34,42</sup>。パースルフィドやポリスルフィドは酸素存在下で  $\text{H}_2\text{S}$  から生成される<sup>43,44</sup>ことや、*l*-cysteine を基質として cystathionine  $\beta$ -synthase (CBS) や cystathionine  $\gamma$ -lyase (CSE) による酵素反応を介して生成されること<sup>45</sup>が報告されている。このように異なる分子種が存在するということから、 $\text{H}_2\text{S}$  の生物学的作用が実際にはポリスルフィドなどの他の分子種を介した作用である可能性が考えられる。 $\text{H}_2\text{S}$  は酸化ストレス誘導性の神経変性モデルにおいて保護的な効果をもたらす<sup>30-32</sup>ことを始め、シグナル分子としての機能がいくつか報告されてきた<sup>46-48</sup>。過去の報告で、ラットアストロサイトにおいてポリスルフィドドナーが  $\text{H}_2\text{S}$  ドナーに比べ、より強く TRP チャネルの機能を調節することが示された<sup>49</sup>。しかし、 $\text{H}_2\text{S}$  と比べ、ポリスルフィドがより優れた神経保護作用を示すかは不明である。本章では、中脳組織におけるポリスルフィドドナーの神経保護効果とその作用機序の解析を行った。

## 第2節 目的

本章においてはポリスルフィドに着目し，中脳組織培養切片を用いて  $MPP^+$  誘発性ドパミン変性に対して，ポリスルフィドドナー (Figure 14) が保護的に作用するか検討することとした．また，その作用におけるグルタチオン産生系の関与についても検討することとした．

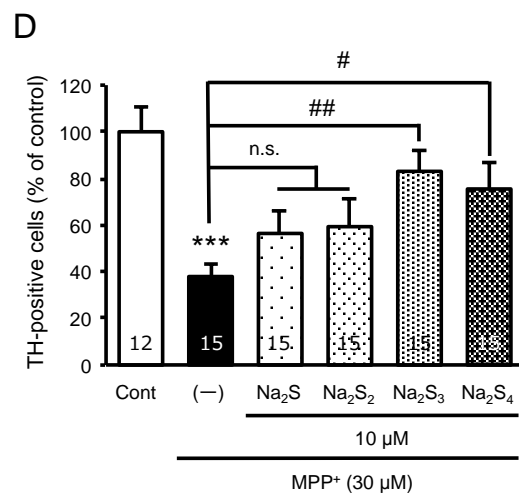
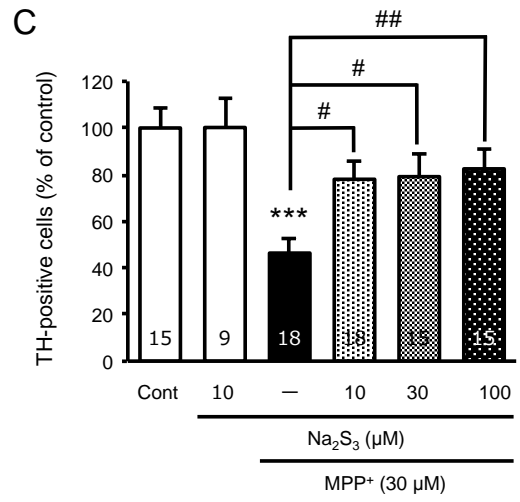
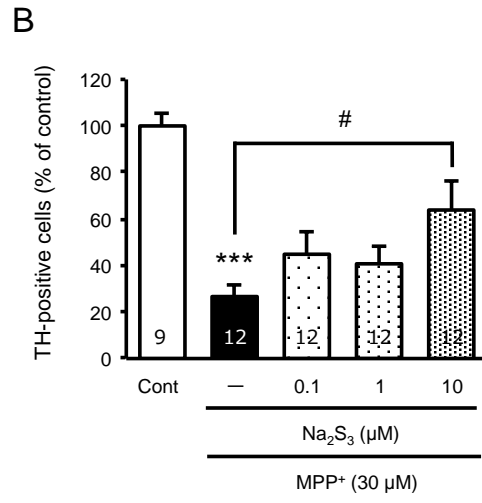
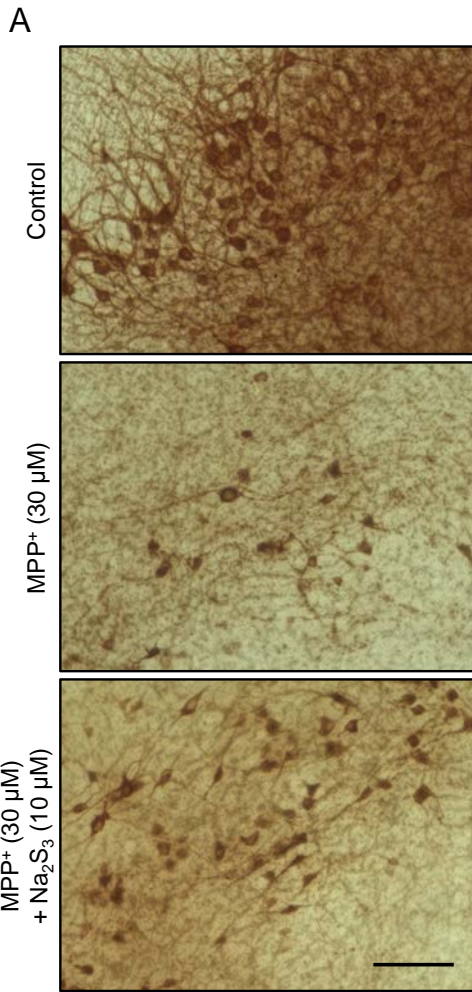


**Fig. 14. Polysulfide donor produces polysulfide species.**  
Modified from Dojindo WEB site.

### 第3節 実験成績

#### 第1項 MPP<sup>+</sup>誘発性ドパミンニューロン変性に対するポリスルフィドドナーの効果

ポリスルフィドドナーである Na<sub>2</sub>S<sub>3</sub> や Na<sub>2</sub>S<sub>4</sub> は細胞内でポリスルフィド類を生成することが知られている<sup>33,49</sup>。まず、ポリスルフィドドナーが生体組織においても神経保護的な作用を示すか、ラット新生仔脳から作成した中脳切片培養系を用いた検討を行った。MPP<sup>+</sup> (30 μM) の処置後 48 時間で顕著な TH 陽性細胞の減少がみられ、Na<sub>2</sub>S<sub>3</sub> (0.1-100 μM) を共処置することで濃度依存的にその減少は抑制された (Figure 15A~C)。Na<sub>2</sub>S<sub>3</sub> による TH 陽性細胞の保護効果は 10 μM 以上で統計学的に有意なレベルに達し、10, 30, 100 μM でほぼ同等の効果が得られた。次に、H<sub>2</sub>S ドナーとして知られる Na<sub>2</sub>S<sup>70</sup> と各種ポリスルフィドドナー (Na<sub>2</sub>S<sub>2~4</sub>) の効果を同一の濃度 (10 μM) において比較検討した。すると、Na<sub>2</sub>S と Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub> はいずれも MPP<sup>+</sup> (30 μM) との共処置において有意な TH 陽性細胞に対する保護効果を示さなかった (Figure 15D)。一方、Na<sub>2</sub>S<sub>3</sub> と Na<sub>2</sub>S<sub>4</sub> はいずれも MPP<sup>+</sup> (30 μM) との共処置において有意な TH 陽性細胞の保護効果を示した。つまり、中脳組織切片培養系において S を 3 つ以上持つポリスルフィドのドナーはドパミンニューロン保護効果を持つことが示された。

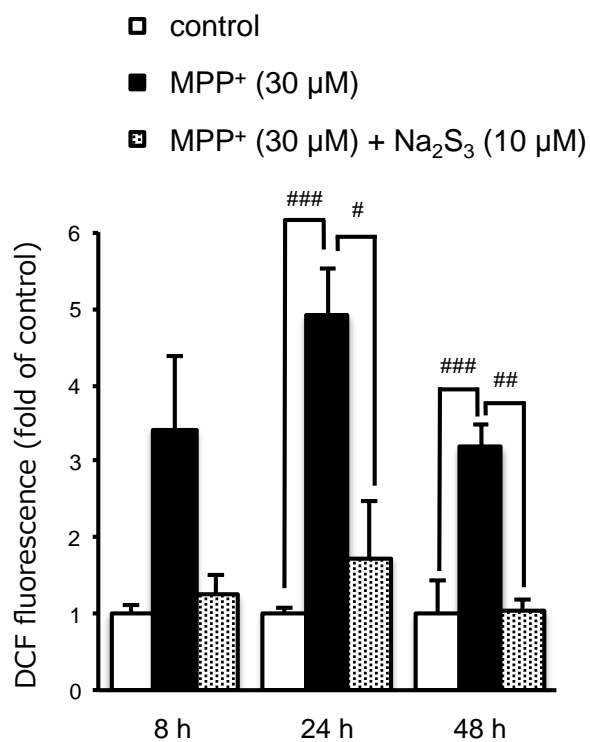


**Fig. 15. Polysulfide donors protect dopaminergic neurons from MPP<sup>+</sup>-induced degeneration.**

(A) Representative photomicrographs showing the results of immunohistochemistry for TH on midbrain slice cultures. Slices were cultured under control conditions, or treated with 30  $\mu\text{M}$  MPP<sup>+</sup> for 48 h in the absence or the presence of 10  $\mu\text{M}$  Na<sub>2</sub>S<sub>3</sub>. Scale bar, 100  $\mu\text{m}$ . (B, C) Effects of 0.1 - 10  $\mu\text{M}$  Na<sub>2</sub>S<sub>3</sub> (B) or 10 - 100  $\mu\text{M}$  Na<sub>2</sub>S<sub>3</sub> (C) on MPP<sup>+</sup>-induced changes in the number of viable dopaminergic neurons are shown. (D) Effects of 10  $\mu\text{M}$  Na<sub>2</sub>S or Na<sub>2</sub>S<sub>2-4</sub> on MPP<sup>+</sup>-induced changes in the number of viable dopaminergic neurons are shown. Number of slices examined for each condition is indicated in each column in (B - D). \*\*\*  $P < 0.001$  vs. control; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.001$ ; n.s., not significant.

## 第2項 MPP<sup>+</sup>による ROS 産生に対するポリスルフィドドナーの効果

ドパミン神経において MPP<sup>+</sup>はミトコンドリア呼吸鎖の複合体 I を阻害し、ROS の産生を促し、結果的にドパミンニューロンの脱落を誘導する<sup>2</sup>。前項の結果から、ポリスルフィドドナーである Na<sub>2</sub>S<sub>3</sub>は MPP<sup>+</sup>により誘発される TH 陽性細胞の減少を抑制することが示された。そこで次に Na<sub>2</sub>S<sub>3</sub>が ROS の消去を行っているか、蛍光プローブである 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) を用いて検討することとした。DCFH-DA は細胞内でエステラーゼにより代謝され、その後 ROS により酸化されると蛍光を発する 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) となる<sup>50</sup>。このように産生された DCF の蛍光強度を測定することで組織内 ROS レベルの評価を行った。MPP<sup>+</sup> (30 μM) の処置後 8 時間で DCF の蛍光強度が増加する傾向があり、処置後 24 時間または 48 時間で有意な DCF の蛍光強度の増加がみられた。この増加は、Na<sub>2</sub>S<sub>3</sub> (10 μM) を共処置することで抑制された (Figure 16)。つまり、Na<sub>2</sub>S<sub>3</sub>は MPP<sup>+</sup>による酸化ストレスを減弱することが示された。



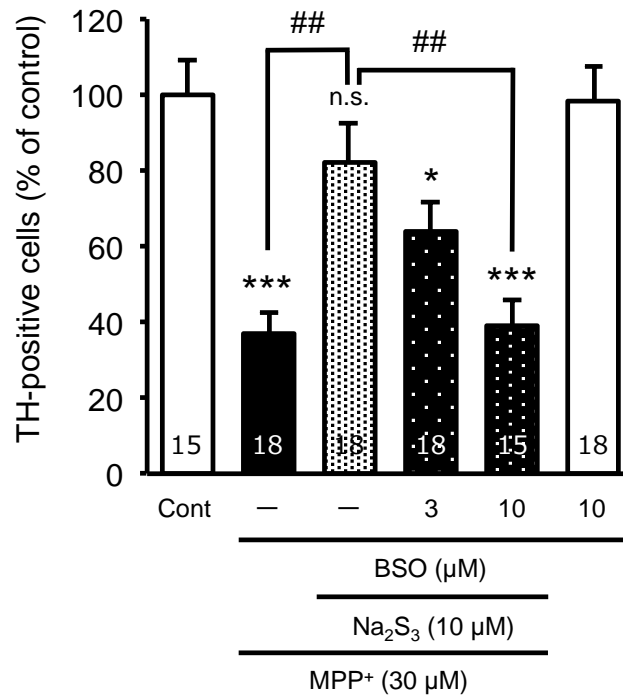
**Fig. 16. Na<sub>2</sub>S<sub>3</sub> has antioxidative properties against MPP<sup>+</sup>-induced oxidative stress.**

Effect of Na<sub>2</sub>S<sub>3</sub> on MPP<sup>+</sup>-induced increase in DCF fluorescence in midbrain slice cultures is shown. Na<sub>2</sub>S<sub>3</sub> was applied concomitantly with 30 μM MPP<sup>+</sup> for indicated periods. Number of slices examined for each condition is 3. # *P* < 0.05, ## *P* < 0.01, ### *P* < 0.001.

### 第3項 ポリスルフィドドナーのドパミンニューロン保護効果におけるグルタチオンの関与

前項の結果から、ポリスルフィドは中脳組織の抗酸化能を増加させることが示された。マウス神経芽細胞腫である Neuro2A 細胞を用いた過去の報告で、 $\text{Na}_2\text{S}_4$  により細胞内グルタチオンレベルが増加することが知られている<sup>33</sup>。グルタチオンは脳内の ROS を消去するにあたり重要であることは上述の通りである。 $\text{Na}_2\text{S}_3$  によるドパミン神経の保護にグルタチオン産生が関与するか、グルタチオン産生の阻害薬である BSO を用いて検討した。3  $\mu\text{M}$  及び 10  $\mu\text{M}$  の BSO と  $\text{MPP}^+$  (30  $\mu\text{M}$ ) 及び  $\text{Na}_2\text{S}_3$  (10  $\mu\text{M}$ ) を共処置したところ、BSO は濃度依存的に  $\text{Na}_2\text{S}_3$  の TH 陽性細胞保護効果を抑制した (Figure 17)。また、BSO (10  $\mu\text{M}$ ) 単独を 48 時間処置しても、TH 陽性細胞数には影響がないことが確認された (Figure 17)。したがって、 $\text{Na}_2\text{S}_3$  のドパミンニューロン保護効果の発現には中脳組織内でのグルタチオン産生が必要であることが示唆された。



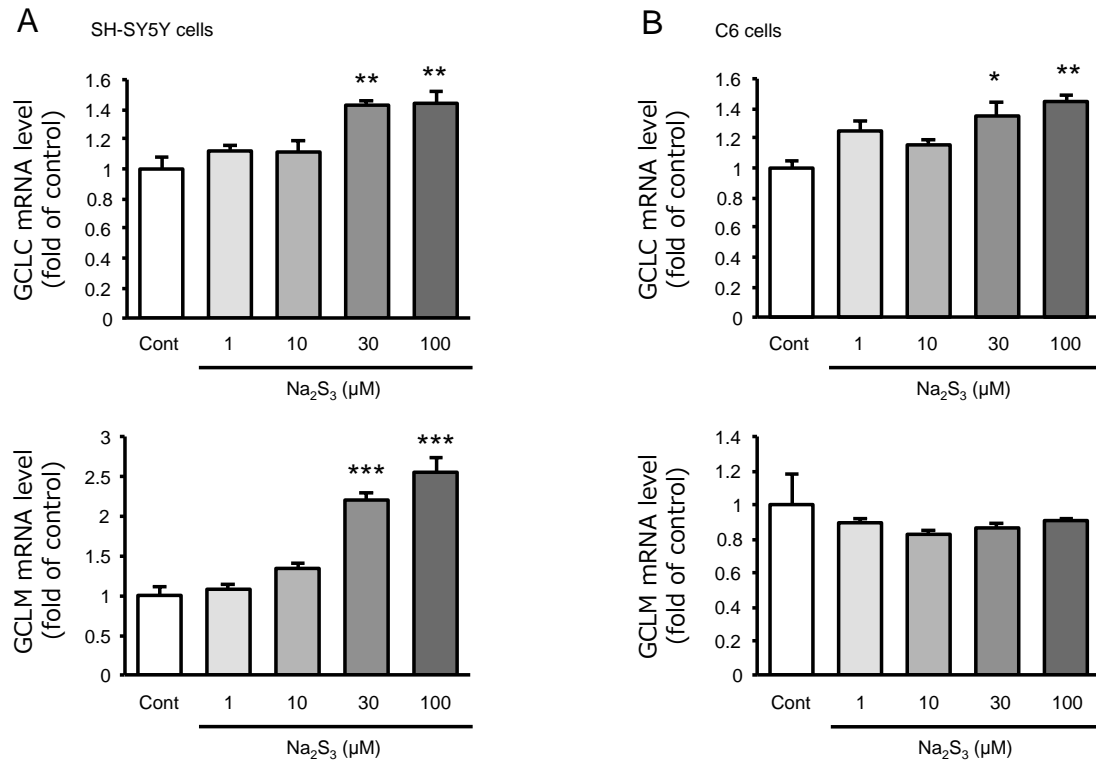


**Fig. 17. GSH biosynthesis is involved in the neuroprotective effect of Na<sub>2</sub>S<sub>3</sub>.**

Effect of BSO on the protective effect Na<sub>2</sub>S<sub>3</sub> on dopaminergic neurons is shown. BSO at indicated concentrations and Na<sub>2</sub>S<sub>3</sub> (10 μM) were concomitantly applied with 30 μM MPP<sup>+</sup> for 48 h. Number of slices examined for each condition is indicated in each column. \*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.001$  vs. control; ##  $P < 0.01$ ; n.s., not significant.

#### 第4項 GCL サブユニットをコードする mRNA の発現に対するポリスルフィドドナーの効果

前項の結果より，MPP<sup>+</sup>誘発性ドパミンニューロン変性モデルにおいて Na<sub>2</sub>S<sub>3</sub> によるドパミンニューロンの保護にはグルタチオンの生合成が必要であることが示唆された．ポリスルフィドドナーは，細胞株での検討においてグルタチオン産生を増大するとの報告がある<sup>33,71</sup>ものの，GCL の発現調節については報告がない．グルタチオン生合成は神経細胞及びアストロサイトで行われる<sup>12</sup>ため，SH-SY5Y 細胞と C6 細胞を用いて Na<sub>2</sub>S<sub>3</sub> がグルタチオン合成の律速酵素である GCL の発現を調節するか検討することとした．SH-SY5Y 細胞においては Na<sub>2</sub>S<sub>3</sub> (1-100 μM) の処置後 6 時間で，濃度依存的に GCLC 及び GCLM mRNA の発現増大がみられた (Figure 18A)．C6 細胞においては Na<sub>2</sub>S<sub>3</sub> の処置後 6 時間で GCLC mRNA の発現は有意に増加したものの，GCLM mRNA の発現は変化がなかった (Figure 18B)．以上の結果から，Na<sub>2</sub>S<sub>3</sub> は特に SH-SY5Y 細胞において GCL サブユニット mRNA の発現を増大することが示された．

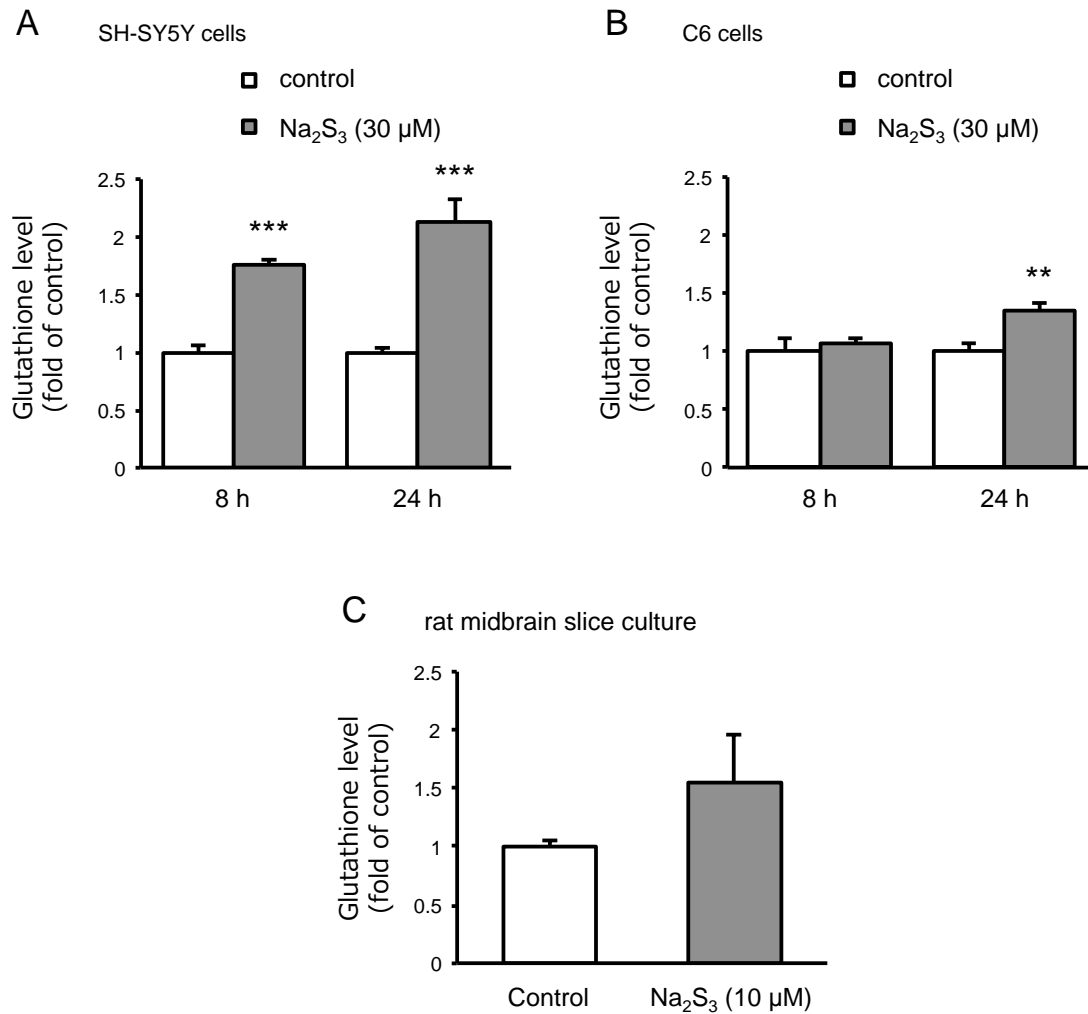


**Fig. 18. Na<sub>2</sub>S<sub>3</sub> increases expression of GCLC and GCLM mRNA in SH-SY5Y cells and increases expression of GCLC but not GCLM mRNA in C6 cells.**

(A, B) Results of RT-PCR analysis of the effect of Na<sub>2</sub>S<sub>3</sub> on expression levels of GCLC and GCLM mRNAs are shown. SH-SY5Y cells (A) and C6 cells (B) were treated with Na<sub>2</sub>S<sub>3</sub> at indicated concentrations for 6 h. n = 3-6. \**P*<0.05, \*\**P*<0.01, \*\*\**P*<0.001 vs. control.

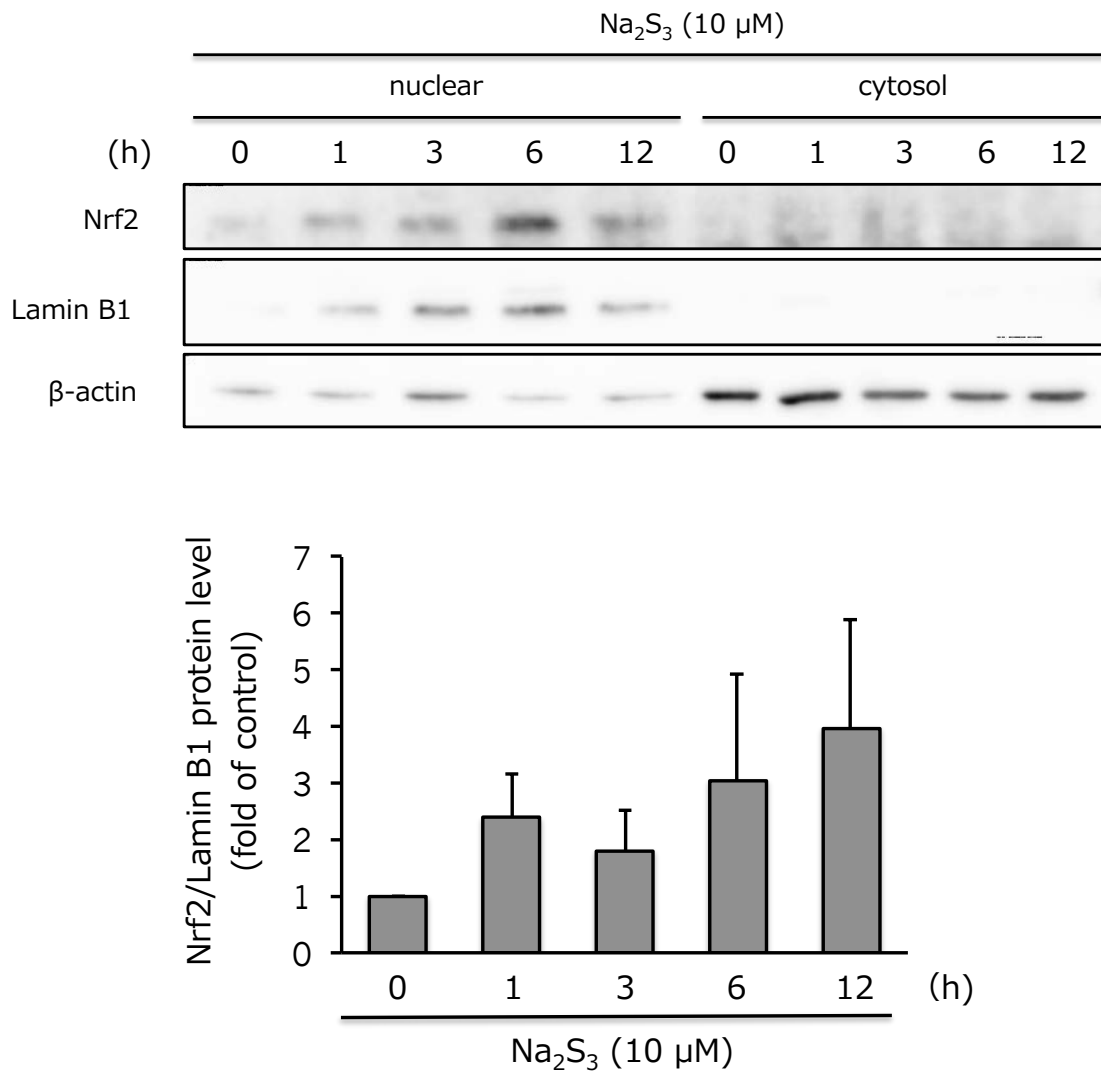
## 第5項 ポリスルフィドドナーによる細胞内総グルタチオンレベルの変化

前項の結果より, SH-SY5Y 細胞及び C6 細胞において  $\text{Na}_2\text{S}_3$  の処置後 6 時間で GCL サブユニット mRNA の発現が増大していたので, グルタチオンレベルも増大していることが考えられる. そこで SH-SY5Y 細胞と C6 細胞を用いて細胞内総グルタチオンレベルが増大するか検討したところ,  $\text{Na}_2\text{S}_3$  (30  $\mu\text{M}$ ) の処置後 8 時間または 24 時間で細胞内総グルタチオンレベルの増大がみられた. (Figure 19A). また, C6 細胞において  $\text{Na}_2\text{S}_3$  (30  $\mu\text{M}$ ) の処置後 24 時間において細胞内総グルタチオンレベルの増大がみられた (Figure 19B). さらに, 細胞株での検討に加えて中脳切片培養系を用いて  $\text{Na}_2\text{S}_3$  により組織内総グルタチオンレベルが変化するか検討した.  $\text{Na}_2\text{S}_3$  (10  $\mu\text{M}$ ) の処置後 8 時間において有意な差とはならなかったが, 組織内総グルタチオンレベルの増大傾向がみられた (Figure 19C). さらに, GCL の発現は転写因子である Nrf2 により調節されることが報告されているので, 中脳切片培養系において  $\text{Na}_2\text{S}_3$  が Nrf2 の核内タンパク質の増大に寄与するか検討した. すると,  $\text{Na}_2\text{S}_3$  (10  $\mu\text{M}$ ) の処置後 1 時間以降において有意ではないが核内 Nrf2 のタンパク質の増大傾向がみられた. (Figure 20). 前項及び本項の結果より,  $\text{Na}_2\text{S}_3$  はグルタチオン生合成を促進することが示された.



**Fig. 19. Na<sub>2</sub>S<sub>3</sub> increases cellular GSH content in SH-SY5Y cells, C6 cells and rat midbrain slice culture.**

(A-C) Effects of Na<sub>2</sub>S<sub>3</sub> on cellular total GSH levels are shown. SH-SY5Y cells (A) and C6 cells (B) were treated with Na<sub>2</sub>S<sub>3</sub> (30 μM) for indicated time periods. Rat midbrain slice cultures were treated with Na<sub>2</sub>S<sub>3</sub> (10 μM) for 8 h (C). n = 3-6 (A, B), n = 10 (C). \*\**P*<0.01, \*\*\**P*<0.001 vs. control.

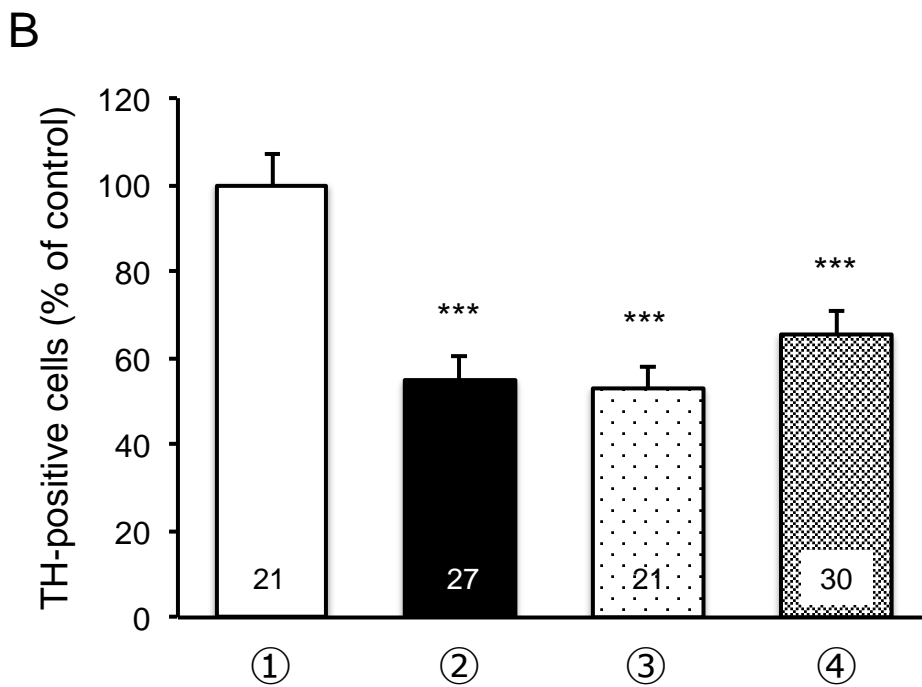
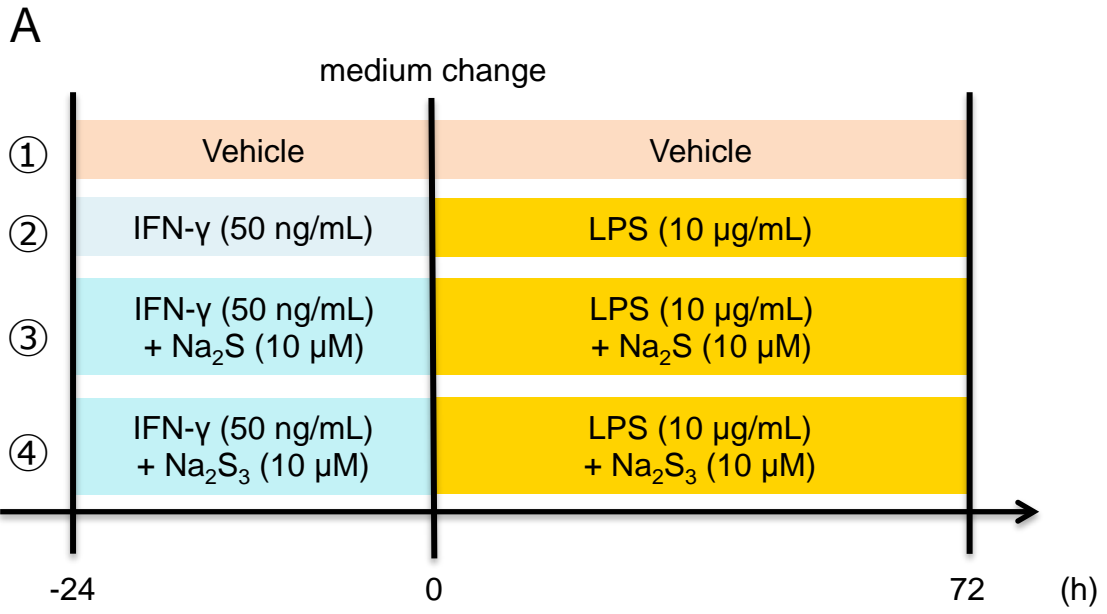


**Fig. 20.  $\text{Na}_2\text{S}_3$  increases nuclear translocation of Nrf2 in rat midbrain slice culture.**

Western blot analysis of the effect of  $\text{Na}_2\text{S}_3$  (10  $\mu\text{M}$ ) on nuclear translocation of Nrf2. Rat midbrain slice cultures were treated with  $\text{Na}_2\text{S}_3$  (10  $\mu\text{M}$ ) for indicated periods, and the level of Nrf2 protein in nuclear fraction was examined. n = 4.

## 第6項 IFN- $\gamma$ / LPS 誘発性ドパミンニューロン変性モデルにおけるポリスルフィドドナーの効果

ドパミンニューロン脱落を促進する要因の一つとして神経炎症が挙げられる<sup>10</sup>。H<sub>2</sub>S ドナーは初代培養ミクログリアにおいて tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) や inducible nitric oxide synthase (iNOS) の産生を抑制することが報告されている<sup>72</sup>。そこで、中脳切片培養系を用いた interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) /lipopolysaccharide (LPS) 誘発性ドパミンニューロン変性モデルにおいて、ポリスルフィドドナー及び H<sub>2</sub>S ドナーが抗炎症的に働きドパミンニューロン変性を抑制するか、Figure 21A に示した試薬処置プロトコールで検討した。中脳切片培養系において IFN- $\gamma$  (50 ng/ml) を 24 時間処置後、LPS (10  $\mu$ g/ml) を含む培地に交換して 72 時間後にドパミンニューロン変性が誘導されることは本研究室の過去の報告において確かめられている<sup>73</sup>。本検討においても IFN- $\gamma$ /LPS の処置で有意な TH 陽性細胞数の減少が確認できた (Figure 21)。一方、10  $\mu$ M の Na<sub>2</sub>S あるいは Na<sub>2</sub>S<sub>3</sub> を共処置しても IFN- $\gamma$ /LPS により誘導された TH 陽性細胞数の減少を抑制できなかった (Figure 21)。ポリスルフィドは本実験条件下では顕著な作用を示さないことが示唆された。





**Fig. 21. Na<sub>2</sub>S and Na<sub>2</sub>S<sub>3</sub> do not protect dopaminergic neurons from IFN- $\gamma$ /LPS-induced degeneration.**

(A) Schematic image of treatment of Na<sub>2</sub>S (10  $\mu$ M), Na<sub>2</sub>S<sub>3</sub> (10  $\mu$ M), and IFN- $\gamma$  (50 ng/ml)/ LPS (10  $\mu$ g/ml). (B) Effect of Na<sub>2</sub>S (10  $\mu$ M) and Na<sub>2</sub>S<sub>3</sub> (10  $\mu$ M) on IFN- $\gamma$  (50 ng/ml)/ LPS (10  $\mu$ g/ml)-induced changes in the number of viable dopaminergic neurons is shown. Na<sub>2</sub>S (10  $\mu$ M), Na<sub>2</sub>S<sub>3</sub> (10  $\mu$ M) and IFN- $\gamma$  (50 ng/ml)/ LPS (10  $\mu$ g/ml) were concomitantly applied according to the pattern of schematic protocol. Number of slices examined for each condition is indicated in each column. \*\*\* $P < 0.001$  vs. vehicle.

## 第4節 考察

本章では、ラット中脳切片培養系を用いて、 $\text{Na}_2\text{S}_3$ 及び $\text{Na}_2\text{S}_4$ が $\text{MPP}^+$ 誘発性ドパミンニューロン変性に対し保護効果を持つか検討を行った。その結果、同じモル濃度において $\text{H}_2\text{S}$ ドナーに比べ $\text{S}_3$ あるいは $\text{S}_4$ 型のポリスルフィドは優れたドパミンニューロン保護効果を示した。また、外因的なポリスルフィドが $\text{MPP}^+$ による細胞内酸化ストレスレベルを減弱した。さらに、ポリスルフィドによるドパミンニューロン保護効果においてグルタチオン生合成の促進が主要な役割を果たすことを見出した (Figure 22)。

神経保護効果の濃度依存性の検討において、 $\text{MPP}^+$ 誘発性ドパミンニューロン変性に対し、 $\text{Na}_2\text{S}_3$ や $\text{Na}_2\text{S}_4$ は $10\ \mu\text{M}$ で有意な神経保護効果を示した。一方で、 $\text{H}_2\text{S}$ は有意な効果を示さなかった。 $\text{Na}_2\text{S}_3$ の $\text{pK}_{\text{a}1}$ 及び $\text{pK}_{\text{a}2}$ はそれぞれ4.2と7.5であることが示されている<sup>74</sup>ので、生理的な $\text{pH}$ 下において $\text{Na}_2\text{S}_3$ は主に $\text{HS}_3^-$ と $\text{S}_3^{2-}$ に解離していると考えられる。これら $\text{HS}_3^-$ や $\text{S}_3^{2-}$ の細胞膜透過経路は同定されていないが、これら分子は細胞内に移行する可能性がある。というのも、実際に過去の報告において外因的なポリスルフィドドナーの処置によりNeuro2A細胞において細胞内パースルフィドやポリスルフィドの量が増加していた<sup>33</sup>。一方、生理的な $\text{pH}$ 下で $\text{Na}_2\text{S}$ は $\text{HS}^-$ に解離しており、DMEM/F-12培地中でパースルフィドやポリスルフィドを産生する<sup>75</sup>。もし、パースルフィドやポリスルフィドが $\text{HS}^-$ よりも直接的に神経保護効果に関与する分子種であるとする (後述参照)、 $\text{Na}_2\text{S}$ と比較して $\text{Na}_2\text{S}_3$ 及び $\text{Na}_2\text{S}_4$ が優れた神経保護効果を示したのは、 $\text{HS}^-$ により生じたパースルフィドやポリスルフィドの絶対的濃度に比べ、 $\text{HS}_3^-$ と $\text{S}_3^{2-}$ 及び $\text{HS}_4^-$ と $\text{S}_4^{2-}$ によって産生された細胞内外のパースルフィドやポリスルフィドの絶対的濃度が高いことに起因するものと考えられる。

$\text{MPP}^+$ による細胞内ROSレベルの増大が、外因的な $\text{Na}_2\text{S}_3$ の処置によりほぼ完全

に抑制されたことからポリスルフィドが細胞内でその生物学的作用を示していることが示唆された。ROSの消去メカニズムとして細胞内でポリスルフィドが直接的にROSを捕捉している可能性が考えられる。しかし、細胞内でのポリスルフィドの絶対濃度はROSを完全に捕捉するには十分な濃度ではないと推定されるので、ポリスルフィドによる直接的なROSの消去は本章で得られた神経保護効果の主要なメカニズムではないことが考えられる。というのも、Neuro2A細胞を用いた検討において、25  $\mu\text{M}$ の $\text{Na}_2\text{S}_4$ を処置した時の細胞内でのパースルフィド及びポリスルフィドはおよそ2.8 nmol/protein mgとされている<sup>33</sup>。一方で、主要な抗酸化分子であるグルタチオンは組織内においてmMオーダーで存在しているとされているため<sup>4</sup>、細胞内のパースルフィド及びポリスルフィドは圧倒的に少ない濃度で存在していることが考えられる。つまり、ポリスルフィドなどによる直接的なROSの消去より、グルタチオンの供給を維持する方が抗酸化能を高めるのにより効果的な手段であるといえる。

したがって、ポリスルフィドによるROSの消去にはグルタチオン生合成の促進が関与していることが考えられ、本章においてはそれを示唆する結果をいくつか示してきた。まず、グルタチオン生合成の阻害薬であるBSOを用いることで、 $\text{Na}_2\text{S}_3$ によるドパミン神経保護効果はみられなくなった。この時検討した濃度においてBSO単独の処置ではドパミンニューロンの生存に影響を与えていないので、 $\text{MPP}^+$ 誘発性ドパミンニューロン変性に対する $\text{Na}_2\text{S}_3$ の神経保護効果はグルタチオン生合成の促進によって得られたことが示唆される。また、細胞株を用いた検討で $\text{Na}_2\text{S}_3$ がGCLサブユニットをコードするmRNA発現を増加させたことから、グルタチオン生合成が促進されていることが示唆される。さらに、 $\text{Na}_2\text{S}_3$ は細胞株と中脳切片培養系において実際に細胞内グルタチオン量を増加させた。

これらの知見において、本章で見られたポリスルフィドによるGCLサブユニ

ットをコードするmRNA発現の増加は、ポリスルフィドによる神経保護効果の詳細なメカニズムを理解するのに重要な点である。GCLは、触媒サブユニットであるGCLCと酵素活性を調節するGCLMの2種類のサブユニットで2量体を形成して酵素としての機能を果たしており<sup>11</sup>、それらサブユニット遺伝子の発現はプロモーター領域のARE配列で調節されている<sup>14,15</sup>。転写因子であるNrf2は細胞質内から核内へと移行し、AREに結合してGCLサブユニットをコードするmRNAの発現を増加させる<sup>16</sup>。Nrf2はPI3K/Akt経路<sup>15</sup>を含む種々の細胞内シグナルによって、または細胞質でNrf2を捕捉しているKeap1の酸化還元による修飾によって核内移行が誘導される<sup>17</sup>。最近の報告で、システインパースルフィド及びシステインポリスルフィドはSH-SY5Y細胞においてNrf2の核内移行を誘導することが示された<sup>75</sup>。さらに、ポリスルフィドドナーはNeuro2A細胞においてKeap1の修飾とAktのリン酸化をもたらし、Nrf2の核内移行を誘導することが示された。本章における結果で特筆すべきこととして、Na<sub>2</sub>S<sub>3</sub>は細胞種特異的なGCLサブユニットの発現増加効果をもたらすことが明らかとなった。SH-SY5Y細胞において、Na<sub>2</sub>S<sub>3</sub>はGCLM mRNAの発現増加を誘導した一方で、C6細胞においてはGCLM mRNAの発現を増加させなかった。つまり、Na<sub>2</sub>S<sub>3</sub>の効果が主にNrf2の活性化を介していたとしても、GCLサブユニットの発現は細胞の種類及び刺激依存的に働く調節機構によって支配されている可能性がある。例えば、前章の結果では、SH-SY5Y細胞においてインスリン及びIGF-IはGCLMのmRNA発現を増加させたが、GCLCのmRNA発現を増加させなかった。しかもこの時のインスリン及びIGF-IはPI3K/Akt経路依存的なNrf2の活性化を誘導していたにも関わらず、このようなサブユニット特異的な現象がみられた<sup>76</sup>。さらに、インスリン及びIGF-IはC6細胞においてGCLC及びGCLMのmRNA発現に影響を及ぼさなかった<sup>76</sup>。

Na<sub>2</sub>S<sub>3</sub>によるGCLサブユニットをコードするmRNAの発現増加はC6細胞に比べSH-SY5Y細胞でより顕著な結果が得られた。この結果はC6細胞に比べSH-SY5Y細胞でより顕著にグルタチオン量が増加するといった結果に反映され

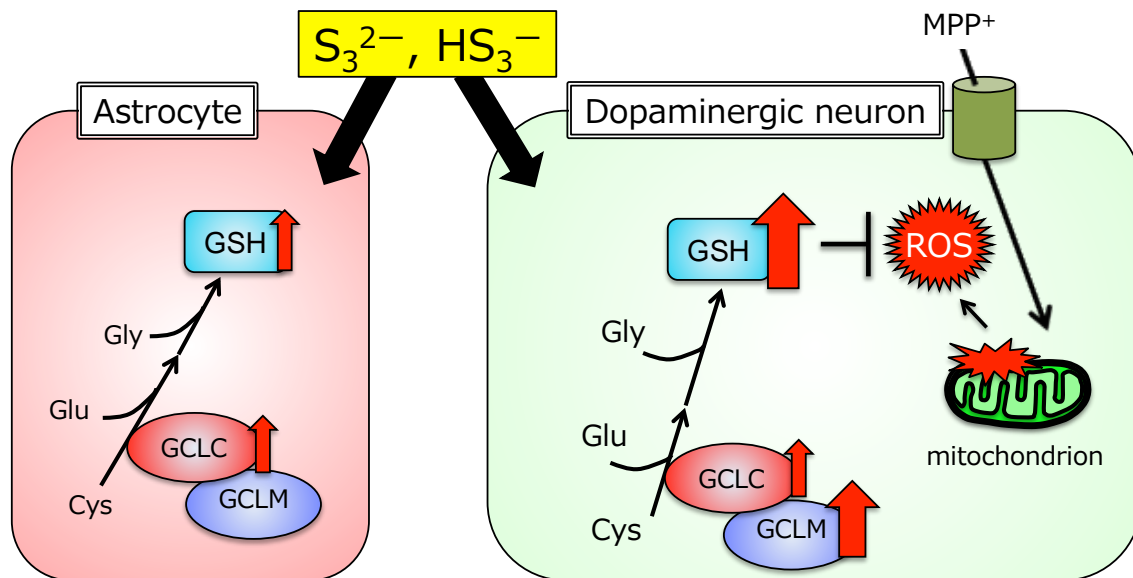
た. SH-SY5Y細胞で得られた結果が神経様細胞の反応を, またC6細胞で得られた結果がアストロサイト様細胞の反応を反映しているとすれば, ポリスルフィドは神経細胞においてグルタチオン依存的な抗酸化能を増強することのできる効率的な神経保護因子であることが示唆される. 中脳切片培養系において,  $\text{Na}_2\text{S}_3$  はグルタチオン量を増加させる傾向を示したもののその効果は有意なレベルではなかった. この原因として, 中脳切片培養系においては神経細胞に比べアストロサイトやミクログリアといったグリア系の細胞が圧倒的に多く存在している<sup>77</sup>ことが挙げられる. つまり, グルタチオンを含有する神経細胞以外の細胞種の存在により, 中脳切片培養系においては神経細胞に対する $\text{Na}_2\text{S}_3$ の効果は明確に反映されにくいことが考えられる.

本章で得られた結果では $\text{Na}_2\text{S}_3$ の中脳組織グルタチオン量に対する効果は顕著ではなかったが, MPTPを投与したラットにおける検討では, 1.5-2倍程度のグルタチオン量の増加がドパミンニューロンを保護する<sup>78</sup>ことが報告されており, 本章でみられたグルタチオン量の増加の程度は十分大きいものと考えられる. また, 最近の報告で, MPTPを投与したマウスの線条体及びドパミン毒性を持つ6-OHDAを投与したラットの黒質領域で $\text{H}_2\text{S}$ 合成酵素の一つであるCBSの発現が低下すること, 及び両モデルにおいてCBSの過剰発現が病態を改善することが示された<sup>79,80</sup>. これらの報告ではポリスルフィドの生成については触れられていないが, 内因的な $\text{H}_2\text{S}$ の産生を促進することでPD病態が改善される可能性を示している.

過去の報告では, Neuro2A細胞において外因的なポリスルフィドドナーの処置により細胞内パースルフィドやポリスルフィドの量が増加していた<sup>33</sup>ことから,  $\text{HS}_3^-$ と $\text{S}_3^{2-}$ も細胞内に移行する可能性があるが, その移行機構はよくわかっていない. 細胞膜上に発現しているカチオン透過性のチャネルはその選択性が高いことが知られている一方で, クロライドチャネルは無機陰イオンや $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SCN}^-$

及び $\text{HCO}_3^-$ など、種々の陰イオンを透過し得る<sup>81</sup>。過去に、単離したラット腸間膜細動脈を用いた検討で、 $\text{H}_2\text{S}$ ドナーによる血管拡張作用はクロライドチャンネル阻害薬の4,4'-diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonic acidを用いることで抑制されることが報告されている<sup>82</sup>。これらの報告から推察すると、 $\text{Na}_2\text{S}_3$ から生じた $\text{HS}_3^-$ 及び $\text{S}_3^{2-}$ は細胞内に移行する機序の一つとしてクロライドチャンネルを介している可能性が考えられるが、これについては検討の余地がある。

グルタチオン生合成の調節は、PDにおけるドパミン神経脱落に対抗する手段として特に重要である。本章で得られた結果において、外因的なポリスルフィドの処置がドパミンニューロンの脱落を抑制することが示された。ポリスルフィドは細胞内で産生される内因的な分子であり、特に酸化還元反応を基軸とした細胞内分子の修飾を行うことで細胞機能を変化させ得ることから、その重要性は認識されつつある。本章では、PDモデルに着目した検討を行ってきたが、酸化ストレスの生成及び防御状態の変化は、他の神経変性疾患でも見られる<sup>83,84</sup>ことから、ポリスルフィドの生理・薬理作用の解明は種々の神経変性疾患に関連している複雑な病態機序理解の一助となることが考えられる。また、本章で得られた結果は、ポリスルフィドの調節が特にドパミンニューロンの脱落を抑制する新規PD治療戦略構築の一助になることを示唆する重要な基礎的知見であると考えている。



**Fig. 22. Proposed neuroprotective mechanisms involved in  $Na_2S_3$ -induced up-regulation of glutathione biosynthesis in midbrain.**

$S_3^{2-}/HS_3^-$  protects midbrain dopaminergic neurons from  $MPP^+$ -induced degeneration via enhancement of glutathione biosynthesis.  $S_3^{2-}/HS_3^-$  induces up-regulation of both GCLC and GCLM expression that leads to increased synthesis of cellular glutathione in neuronal cells.  $S_3^{2-}/HS_3^-$  induces up-regulation of GCLC (but not GCLM) expression that leads to increased synthesis of cellular glutathione in glial cells. The cellular content of total glutathione was increased by  $S_3^{2-}/HS_3^-$ , and the effect was more prominent in neuronal cells than in glial cells.

## 第4章 総括

パーキンソン病は進行性の神経変性疾患であり、振戦、筋固縮、動作緩慢、または姿勢保持障害といった運動機能障害を主徴とする。わが国では60歳以上の1%が発症している。加齢がパーキンソン病において重要なリスクファクターであると考えられており、高齢化の進むわが国で今後さらに患者数が増加すると見込まれている。病理組織学的特徴として、中脳黒質領域から線条体に投射しているドパミンニューロンの脱落がみられるが、根本的な原因は未だ明らかでない。脳内ドパミンとアセチルコリンのバランスを整え、運動症状を改善する治療が行われているものの、病状の進行を根本的に抑制することはできない。そこでドパミンニューロンの脱落を抑制する新規治療戦略の開発が望まれる。ドパミンニューロンの脱落には環境要因や遺伝的要因、または神経炎症など種々の要因が絡みあっているが、これらに共通してドパミンニューロンの脱落を促進するとされているのがROSの産生である。中枢神経系において、ROSによる組織障害を軽減する寄与度が高いと考えられているのがグルタチオンであるが、パーキンソン病患者の死後脳において中脳黒質領域のグルタチオンレベルが有意に低下している。つまり、グルタチオン産生の調節メカニズムの理解がパーキンソン病における病態の進行を抑制する新規治療法の確立に寄与できると考えられる。そこで脳内グルタチオンの制御機構の解明とドパミンニューロン脱落を抑制する新規治療標的の探索を目的として以下の検討を行った。

まず、第2章では非神経系細胞でグルタチオン生合成を促進するとされているインスリンやIGF-Iに着目した。インスリンやIGF-Iの脳内での酸化ストレス調節因子としての役割は議論されていなかったことから、脳内グルタチオン生合成機構の理解を行うために中枢神経系の細胞でのインスリン及びIGF-Iのグルタチオン生合成に対する効果を検討した。すると、神経系細胞とグリア系細胞のうち神経系細胞においてのみグルタチオン生合成を促進することが明らか



となった。また本検討では、IGF-I はグルタチオン合成律速酵素である GCL サブユニットのうち GCLM のみの発現増大に寄与するといった、非神経系細胞とは異なる、神経系細胞に特有な作用を見出した。この機序として、IGF-I は PI3K/Akt 経路の活性化を介した Nrf2 の核内移行を誘導することで GCLM の産生増大を行っていることも明らかにした。さらに、新生仔ラットから作成した中脳組織培養切片を用いた MPP<sup>+</sup>誘発性ドパミンニューロン変性モデルに対し、IGF-I は神経保護的な効果を示すが、その効果にはグルタチオン生合成が寄与していることが明らかとなった。これらの結果は、インスリン及び IGF-I が中枢神経系におけるグルタチオン生合成を促進するという新規グルタチオン制御メカニズムの一端を明らかにした有用な知見であると考えている。

加えて、新規治療標的の探索を目的として細胞内の抗酸化に関わるとされる硫黄含有化合物に注目したところ、中脳組織培養切片を用いた MPP<sup>+</sup>誘発性ドパミンニューロン変性モデルにおいて、ポリスルフィドが硫化水素より優れた神経保護作用を示すことを見出した。またポリスルフィドは中脳組織において MPP<sup>+</sup>による酸化ストレスレベルを減弱し、グルタチオンの生合成を介してドパミンニューロンを保護していることが明らかとなった。さらに神経系細胞及びグリア系細胞を用いた検討により、ポリスルフィドは特に神経系細胞でより顕著にグルタチオン生合成を促進することを見出した。グルタチオン生合成を中心として神経保護効果を示したポリスルフィドは、ドパミンニューロンの脱落を抑制する新規 PD 治療戦略構築の手がかりになり得ることが予想される。

以上、本研究ではインスリン及び IGF-I がグルタチオン生合成を促進するといった、従来注目されてこなかった酸化ストレス制御因子としての役割を担うことを見出した。脳内において、インスリン及び IGF-I は産生され得るが、パーキンソン病患者の脳内ではインスリン及び IGF-I の抵抗性が生じていることが示唆されている。今後この抵抗性を改善すること、及びシグナルの増強を行うこ

とでパーキンソン病の新規治療戦略となる可能性が考えられる。また、中脳の組織においてグルタチオン生合成を中心とした神経保護作用をポリスルフィドが持つことを見出した。さらに、インスリン、IGF-I 及びポリスルフィドは特に神経様細胞でグルタチオン依存的な抗酸化能を増強できる効率的な神経保護因子であることも示唆された。グルタチオンの生合成を調節することはドパミンニューロンの脱落抑制に重要であり、その制御メカニズム解明が新規治療標的の創出に必要であると考えられる。本研究で得られた知見は今後の病態理解及び病態の根本的な治療法確立に対する有用な知見を提供するものであると考えている。

## 第5章 実験の部

### 第1節 実験材料

#### 第1項 試薬

本研究に際し、使用した試薬を Table 1 に示す。

**Table 1. Reagent used in this study**

Reagent	Company
PD98059	Cayman chemicall
Sodium sulfide (Na <sub>2</sub> S)	Dojindo
sodium disulfide (Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> )	Dojindo
sodium trisulfide (Na <sub>2</sub> S <sub>3</sub> )	Dojindo
sodium tetrasulfide (Na <sub>2</sub> S <sub>4</sub> )	Dojindo
5,5'-dithiobis-(2-nitro-benzoic acid)	Dojindo
ECL Prime Western Blotting Detection kit	GE Healthcare
LY294002	Millipore
Phenylmethylsulfonyl Fluoride (PMSF)	Nacalai Tesque, Inc.
Nonidet (R) P-40	Nacalai Tesque, Inc.
Sodium Lauryl Sulfate (SDS)	Nacalai Tesque, Inc.
2-mercaptoethanol	Nacalai Tesque, Inc.
Glycerol	Nacalai Tesque, Inc.
Tween 20	Nacalai Tesque, Inc.
5-Sulfosalicylic Acid Dihydrate	Nacalai Tesque, Inc.
β-Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Sodium Salt	Nacalai Tesque, Inc.
Glutathione (Reduced Form), free acid	Nacalai Tesque, Inc.
Paraformaldehyde, powder (PFA)	Nacalai Tesque, Inc.

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Nissui
Recombinant Human IGF-I	PeptoTech
Recombinant Rat IL-4	PeptoTech
Recombinant Murine IFN- $\gamma$	PeptoTech
Nrf2 siRNA (h)	Santa Cruz Biotechnology Inc.
SIRT6 siRNA (h)	Santa Cruz Biotechnology Inc.
Fetal Bovine Serum (FBS)	Sigma-Aldrich Co.LLC.
PD98059	Sigma-Aldrich Co.LLC.
Lypopolysaccharides from <i>Escherichia coli</i> O111:B4	Sigma-Aldrich Co.LLC
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich Co.LLC
RNA iso Plus	Takara Bio Inc.
PrimeScript <sup>TM</sup> RT Master Mix	Takara Bio Inc.
SYBR <sup>®</sup> Prime Ex Taq <sup>TM</sup>	Takara Bio Inc.
Penicillin-G/Streptomycin	Thermo Fisher Scientific Inc.
Lipofectamine <sup>TM</sup> RNAiMAX	Thermo Fisher Scientific Inc.
Opti-MEM	Thermo Fisher Scientific Inc.
Hanks's balanced salt solution (HBSS)	Thermo Fisher Scientific Inc.
Minimum Essential Medium (MEM)	Thermo Fisher Scientific Inc.
Hanks' balanced salt solution (HBSS)	Thermo Fisher Scientific Inc.
Horse Serum	Thermo Fisher Scientific Inc.
2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA)	Thermo Fisher Scientific Inc.
VECTASTAIN ABC standard kit	Vector Laboratories, Inc.
tert-butylhydroquinone (tBHQ)	Waco Pure Chemical Industries, Ltd
Dimethyl Sulfoxide (DMSO)	Waco Pure Chemical Industries, Ltd
L-Buthionine-sulfoximine (BSO)	Waco Pure Chemical Industries, Ltd

その他の試薬及び無機塩類は市販の特級品を使用した。

## 第2項 抗体

本研究に際し，使用した抗体を Table 2 に示す．

**Table 2. Antibodies used in this study**

	Antibody	Company
Primary antibody	Mouse anti-GCLC (clone: 3H1)	Abnova
	Rabbit anti-LMNB1	Abnova
	Rabbit anti-phospho-ERK1/2 [phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204)]	Cell signaling Technology, Inc.
	Rabbit anti-ERK1/2 (p44/42 MAP kinase)	Cell signaling Technology, Inc.
	Rabbit anti-phospho-Akt (Thr308)	Cell signaling Technology, Inc.
	Rabbit anti-Akt	Cell signaling Technology, Inc.
	Rabbit anti-Insulin Receptor $\beta$	Cell signaling Technology, Inc.
	Rabbit anti-Sirt6	Cell signaling Technology, Inc.
	Rabbit anti-Tyrosine Hydroxylase (TH)	Millipore
	Mouse anti-IGF-IR $\beta$	Santa Cruz Biotechnology Inc.
	Rabbit anti-GCLM ( $\gamma$ -GCSm)	Santa Cruz Biotechnology Inc.
	Rabbit anti-Nrf2	Santa Cruz Biotechnology Inc.
	Mouse anti- $\beta$ -actin	Sigma-Aldrich Co.LLC.
Secondary antibody	HRP-conjugated donkey anti-rabbit IgG	Jacson Laboratories
	HRP-conjugated goat anti-mouse IgG	Waco Pure Chemical Industries, Ltd
	Biotinylated anti-rabbit IgG	Vector Laboratories

## 第2節 細胞株の培養

### 第1項 SH-SY5Y 細胞及び C6 細胞の培養

ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞とラットグリオーマ C6 細胞は American Type Culture Collection より入手した (それぞれ CRL-2266, CCL-107). SH-SY5Y 細胞の培養には DMEM/F12 (1 : 1) (10% fetal bovine serum, 100 units/ml Penicillin G, 100µg/ml streptomycin, 2 mM *l*-glutamine を含む) を用いた. C6 細胞の培養には DMEM (10% fetal bovine serum, 100 units/ml Penicillin G, 100µg/ml streptomycin, 2 mM *l*-glutamine を含む) を用いた. 100 mm dish に細胞を播種し, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 下で静地培養した.

### 第2項 SH-SY5Y 細胞及び C6 細胞の薬物処置

試薬処置の前に 35 mm dish に播種された 70-80% の密度の SH-SY5Y 細胞と C6 細胞を, 血清不含の DMEM-F12 (100 units/ml Penicillin G, 100µg/ml streptomycin, 2 mM *l*-glutamine を含む) と DMEM (100 units/ml Penicillin G, 100µg/ml streptomycin, 2 mM *l*-glutamine を含む) にそれぞれ置換し, 30 分間培養後に各試薬を処置した.

#### 1. インスリン, IGF-I 及び Na<sub>2</sub>S<sub>3</sub>

培養した SH-SY5Y 細胞及び C6 細胞を血清不含培地に置換後 30 分でインスリン, IGF-I 及び Na<sub>2</sub>S<sub>3</sub> を処置した. インスリン, IGF-I 及び Na<sub>2</sub>S<sub>3</sub> は滅菌した超純水を溶媒として溶解し, 2 ml の血清不含培地に 20 µl ずつ添加し 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 下で細胞を維持した. インスリン, IGF-I 及び Na<sub>2</sub>S<sub>3</sub> は試薬添加後の最終濃度がそれぞれ, 1-1000 nM, 0.1-100 nM 及び 1-100 µM となるよう調製した.

## 2. tBHQ (tert-butylhydroquinone)

培養した SH-SY5Y 細胞及び C6 細胞を血清不含培地に置換後 30 分で tBHQ を処置した。tBHQ は dimethyl sulfoxide (DMSO) を溶媒として溶解し、2 ml の血清不含培地に 2  $\mu$ l ずつ添加し 37°C、5% CO<sub>2</sub> 下で細胞を維持した。tBHQ は試薬添加後の最終濃度が 30  $\mu$ M となるよう調製した。

## 3. LY294002, PD98059

培養した SH-SY5Y 細胞及び C6 細胞を血清不含培地に置換後 30 分で LY294002 及び PD98059 を処置した。LY294002 及び PD98059 は DMSO を溶媒として溶解し、2 ml の血清不含培地に 2  $\mu$ l ずつ添加し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 下で細胞を維持した。LY294002 及び PD98059 は試薬添加後の最終濃度がそれぞれ 5-50  $\mu$ M 及び 20  $\mu$ M となるよう調製した。LY294002 及び PD98059 の添加後 1 時間において IGF-I を処置し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 下で細胞を維持した後に各実験に用いた。

## 第3項 siRNA の導入

培養細胞への siRNA の導入は Lipofectamine<sup>TM</sup> RNAiMAX を用い、製品プロトコールに従って行った。まず、試薬処置後の細胞の培地を無血清の DMEM-F12 (100 units/ml Penicillin G, 100  $\mu$ g/ml streptomycin, 2 mM *l*-glutamine を含む) に置換した。次に 20 pmol の Nrf2 siRNA と 20 pmol または 50 pmol の SIRT6 siRNA を 250  $\mu$ l の Opti-MEM に希釈した。また、10  $\mu$ l または 25  $\mu$ l の Lipofectamine<sup>TM</sup> RNAiMAX を 250  $\mu$ l の Opti-MEM に希釈した。その後、20 pmol の siRNA を含む Opti-MEM と 10  $\mu$ l の Lipofectamine<sup>TM</sup> RNAiMAX を含む Opti-MEM を、または 50 pmol の siRNA を含む Opti-MEM と 25  $\mu$ l の Lipofectamine<sup>TM</sup> RNAiMAX を含む Opti-MEM をそれぞれ混合して室温で 20 分間反応させた後に細胞に添加した。添加後 24 時間または 48 時間、37°C、5% CO<sub>2</sub> 下で細胞を維持し、各種実験に用いた。

### 第3節 中脳切片培養

#### 第1項 中脳組織切片の作製および維持

生後 2-3 日齢の Wistar 系ラット（日本 SLC）を 2-3 分間水中で冷やすことで低温麻酔をかけ、70% ethanol で全身を消毒した後にクリーンベンチへ入れた。以降の操作は滅菌環境下で行った。ハサミで断頭後、脳を傷つけない様に頭蓋骨に切れ目を入れ、鼻曲がりピンセットで頭蓋内より全脳を摘出し、氷冷したハンクス液（Hanks' balanced salt solution, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> 及び MgSO<sub>4</sub> 不含）に浸して 1 分間氷冷した。次に、全脳をハンクス液で湿らせた濾紙上に置き、滅菌済みのフェザーカミソリで半球に切断した。脳半球をスパーテルですくい、切断面を下に向け両脳半球の脳底を向かい合わせる様に Tissue slice chopper（Narishige）の土台に設置したアクリル板の上に置いた。両脳半球を置いた後に滅菌したキムワイプを用いて余分な水分を拭き取った。Tissue slice chopper により厚さ 350 μm の中脳冠状切片を作成した後、Horse serum 含有培地（50% minimum essential medium (MEM) /HEPES (GIBCO) , 25% Hanks' balanced salt solution (HBSS), 25% 非働化 Horse serum となる様にこれらを混合し、6.5 mg/ml *d*-glucose, 2 mM *l*-glutamine, 100 U/ml penicillin-G/100 μg/ml streptomycin を添加したものを 60 mm dish に流し込み、実体顕微鏡下で平匙により中脳黒質及び腹側被蓋野を含む切片を剥がし分けた。あらかじめ 6 well-plate の 1 well につき 1 ml の Horse serum 含有培地を入れ、直径 30 mm の Millicell-CM insert membrane（孔径 0.4 μm, polytetrafluoroethylene 製）を浸し、34°C, 5% CO<sub>2</sub> 環境下で 30 分以上維持しておいた membrane 上に 1 inner dish 当たり 6 枚の切片を並べて置き 34°C, 5% CO<sub>2</sub> 環境下で静置界面培養を行った。培地交換は別の 6 well-plate に 0.7 ml のウマ血清含有培地を入れ、34°C, 5% CO<sub>2</sub> 環境下で 30 分以上維持した後、inner dish ごと移すことにより行い、切片作成の翌日から、その後 2-3 日置きに行った。



## 第2項 中脳組織切片の薬物処置

薬物処置は、IFN- $\gamma$ /LPS を用いた実験は培養 16-17 日後に、他の実験においては培養 19-20 日後に、薬物が添加された 0.7 ml の血清不含培地 (75% MEM/HEPES, 25% HBSS となる様にこれらを混合し、6.5 mg/ml *d*-glucose, 2 mM *l*-glutamine, 100 U/ml penicillin-G/100  $\mu$ g/ml streptomycin を添加したもの) の入った別の 6-well plate に inner dish を移すことにより行った。各試薬は全て滅菌した超純水を溶媒として溶解し、34°C に温めた血清不含培地に添加した。IFN- $\gamma$  は血清不含培地に添加時、400 倍希釈して最終濃度となるように、その他の試薬は血清不含培地に添加時、100 倍希釈して最終濃度となるように超純水を用いて溶解した。

## 第4節 Western blotting

### 第1項 SH-SY5Y 細胞及び C6 細胞の細胞溶解液の調整

試薬処置後の培養細胞上の培地を除き、細胞を氷冷した phosphate buffer saline (PBS) で2回洗浄した。冷 lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM EDTA-4Na (pH 8.0), 1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% sodium orthovanadate, 1 mM PMSF, 50 mM NaF, 1% protease inhibitor cocktail) を加え、セルスクレイパーにて細胞を回収し、回収した細胞溶液を懸濁後、氷上にて20分間静置した。その後遠心 (12,000 g, 4°C, 10分) し、得られた上清を細胞溶解液とした。

### 第2項 SH-SY5Y 細胞の核抽出物と核外抽出物の調整

試薬処置後の培養細胞上の培地を除き、細胞を氷冷した PBS で2回洗浄した。氷冷した PBS を1ml 添加し、セルスクレイパーにて細胞を回収し、遠心 (12,000 g, 4°C, 4分) した。得られた細胞ペレットに氷冷した Buffer A (10 mM HEPES-KOH (pH 7.9), 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA-4Na (pH 8.0), 0.1 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol, 0.5 mM PMSF, 1% protease inhibitor cocktail) を150 µl 入れて懸濁し氷上で15分間静置した。その後、10% NP-40 を含む Buffer A を10 µl 添加し、ボルテックスミキサーで10秒間強く振盪混和した。その後遠心機で遠心 (12,000 g, 4°C, 4分) し、得られた上清を核外抽出物として回収した。核分画残渣は Buffer A で懸濁し、遠心 (12,000 g, 4°C, 4分) することで2回洗浄した後、Buffer B (20 mM HEPES-KOH (pH 7.9), 1 mM EDTA-4Na (pH 8.0), 1 mM EGTA, 40 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol, 1 mM PMSF, 1% protease inhibitor cocktail) を30 µl 添加し4°C下で30分間振盪混和した。その後遠心機にて遠心 (12,000 g, 4°C, 10分) し、上清を核抽出物として回収した。

### 第3項 中脳組織切片の細胞溶解液の調整

1 つの inner dish に培養された試薬処置後の 6 枚の中脳切片をメンブレンから剥離し、1 mL の冷 lysis buffer を入れた 1.5 ml チューブに回収した。眼科バサミを用いて切片を細切し、氷上で 30 分間静置した。その後遠心 (14,000 g, 4°C, 30 分) し、上清を細胞溶解液とした。

### 第4項 中脳組織切片の核抽出物と核外抽出物の調整

1 つの inner dish に培養された試薬処置後の 6 枚の中脳切片をメンブレンから剥離し、氷冷した Buffer A を 150 µl 入れて懸濁し氷上で 30 分間静置した。その後の作業は第 2 項と同様の手順にて行った。

### 第5項 Western blotting 法

Bicinchoninate (BCA) 法 (細胞溶解液及び核外抽出物) あるいは, Bradford 法 (核抽出物) により各サンプルのタンパク質濃度を測定し, 泳動するタンパク質量をそろえた後, sample buffer (0.5 M Tris-HCl (pH 6.8), 10% sodium dodecyl sulfate, 2-mercaptoethanol, glycerol, 1% bromophenol blue) と混合し, 100°C で 10 分間維持した。各サンプルに対し 5.4% の stacking gel 及び 10% の separating gel を用いた SDS-PAGE を行った後, PVDF 膜に転写 (100V, 1h, 4°C) した。転写した PVDF 膜をブロッキング液に浸し, 室温で 30 分間振盪することによりマスキングした後, 一次抗体反応 (室温, overnight) を行った。翌日, 0.1% Tween 20/TBS で洗浄 (5min, 3 回) した後, 二次抗体反応 (室温 1 h) を行った。二次抗体には Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-mouse IgG あるいは HRP-conjugated donkey anti-rabbit IgG を用いた。二次抗体反応後, PVDF 膜を 0.1% Tween 20/TBS で洗浄し, ECL Prime Western Blotting Detection kit により抗体反応を検出した。ECL 反応の検出には, ImageQuant LAS 4000 mini (GE healthcare)

を用いた。バンドの強度は Imagegene software (Fuji Film) を用いて解析した。  
 なお、各一次抗体のプロット条件および希釈倍率を Table 3 に示す。

**Table 3. The conditions of antibody reaction for western blotting**

Primary antibody	Blocking solution	Dilution	Antibody Dilution soluteon
Mouse anti-GCLC (clone: 3H1)	Blocking one	1:1000	5% Blocking one
Rabbit anti-LMNB1	Blocking one	1:5000	5% Blocking one
Rabbit anti-phospho-ERK1/2 [phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204)]	Blocking one-P	1:1000	5% Blocking one-P
Rabbit anti-ERK1/2 (p44/42 MAP kinase)	Blocking one	1:1000	5% Blocking one
Rabbit anti-phospho-Akt (Thr308)	Blocking one-P	1:1000	5% Blocking one-P
Rabbit anti-Akt	Blocking one	1:1000	5% Blocking one
Rabbit anti-Insulin Receptor $\beta$	Blocking one	1:1000	5% Blocking one
Rabbit anti-Sirt6	Blocking one	1:1000	5% Blocking one
Mouse anti-IGF-IR $\beta$	Blocking one	1:1000	5% Blocking one
Rabbit anti-GCLM ( $\gamma$ -GCSm)	Blocking one	1:1000	5% Blocking one
Rabbit anti-Nrf2	Blocking one	1:1000	5% Blocking one
Mouse anti- $\beta$ -actin	Blocking one	1:5000	5% Blocking one

## 第5節 Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)

### 第1項 SH-SY5Y 細胞及び C6 細胞の RNA サンプルの調整

試薬処置後の培養細胞上の培地を除き, 細胞を PBS で 2 回洗浄し, RNAiso Plus を 1 mL 添加し細胞をはがしながら 1.5 ml チューブに全量を回収した. 以降は製品プロトコールに従い total RNA を抽出した.

### 第2項 中脳組織切片の RNA サンプルの調整

1 つの inner dish に培養された試薬処置後の 6 枚の中脳切片をメンブレンから剥離し, 1 mL の RNAiso Plus を入れた 1.5 ml チューブに回収した. その後氷冷下でガラス製のダウンス型ホモジナイザー (WEATON) を用いて組織を破碎した. 以降は製品プロトコールに従い total RNA を抽出した.

### 第3項 RT-qPCR 法

培養細胞及びラットの中脳組織から抽出した total RNA 0.5  $\mu$ g を鋳型とし, PrimeScript<sup>TM</sup> RT Master Mix を用いて RT 反応を行い (1 cycle at 37°C for 15 min, 85°C for 5 sec), その産物の 2  $\mu$ l を鋳型として real-time PCR 法に用いた. Real-time PCR 反応は SYBR<sup>®</sup> Prime Ex Taq<sup>TM</sup> を用いて CFX connect<sup>TM</sup> Real-time system (Bio-Rad) にて行った (1 cycle at 95°C for 30 sec, 40 cycle at 95°C for 15 sec, 60°C for 45 sec, 72°C for 30 sec). また反応の定量化は, 目的 PCR 産物が検出される最初の PCR cycle [threshold cycle (Ct)] を選択し, comparative Ct method にて定量解析した.

なお, 各反応に用いた primer の配列を Table 4 に示す.

Comparative Ct method

$$\text{Fold Change} = 2^{-[(\text{Ct},\text{X} - \text{Ct},\text{R})_{\text{TEST}} - (\text{Ct},\text{X} - \text{Ct},\text{R})_{\text{CONTROL}}]}$$

Ct,X : Ct of the interest gene

Ct,R : Ct of the reference gene (GAPDH)

**Table 4. Primer sequences used for RT-qPCR**

Gene	Forward primer
GAPDH-Fw	5'-ACCATCTTCCAGGAGCGAGA-3'
GAPDH-Rv	5'-CAGTCTTCTGGGTGGCAGTG-3'
human GCLC-Fw	5'-TGAGATTTAAGCCCCCTCCT-3'
human GCLC-Rv	5'-TTGGGATCAGTCCAGGAAAC-3'
human GCLM Fw	5'-TTTGGTCAGGGAGTTTCCAG-3'
human GCLM-Rv	5'-ACACAGCAGGAGGCAAGATT-3'
rat GCLC-Fw	5'-TTACCGAGGCTACGTGTCAGAC-3'
rat GCLC-Rv	5'-TGTCGATGGTCAGGTCGATGTC-3'
rat GCLM Fw	5'-GGGCACAGGTAAAACCCAATA-3'
rat GCLM-Rv	5'-TTCAATGTCAGGGATGCTTTC-3'

## 第6節 グルタチオン量測定

### 第1項 SH-SY5Y 細胞及び C6 細胞のグルタチオン量測定

試薬処置後の培養細胞上の培地を除き、氷冷した PBS で 2 回洗浄した。その後、氷冷した PBS を 1 ml 添加し、セルスクレイパーにて細胞を回収した。

IGF-I 処置後の SH-SY5Y 細胞から回収した細胞懸濁液においてのみ、その一部を用いて Countess<sup>®</sup>自動セルカウンター (invitrogen) の製品プロトコールに従って生細胞数を計測した。残りの細胞懸濁液は遠心 (1,500 g, 4°C, 5 分) 後にペレットとした。

Na<sub>2</sub>S<sub>3</sub> 処置後の SH-SY5Y 細胞及び C6 細胞から回収した細胞懸濁液は、そのまま遠心 (1,500 g, 4°C, 5 分) 後ペレットとした。

得られたペレットに PBS を 45 µl 加え、氷冷しながら BIORUPTOR UCD-300 (COSMO BIO Co., LTD.) で超音波破碎を行った。その後サンプルを遠心 (15,000 g, 4°C, 20 分) し、上清を回収した。

Na<sub>2</sub>S<sub>3</sub> 処置後の SH-SY5Y 細胞及び C6 細胞においてのみ、回収した上清のうち 5 µl を用いて BCA 法により各サンプルのタンパク質定量を行なった。

タンパク質の除去を目的として、それぞれ回収した上清 35 µl に対し 35 µl の 4% sulfosalicylic acid を加え、氷上で 10 分間静置した。その後サンプルを遠心 (17,610 g, 4°C, 30 分) し、上清を回収した。得られた上清を 96 well plate に 30 µl ずつ入れた。次に、0.5 mM EDTA となるように調整した 133 µl の 0.2M PBS (pH7.0) と 16.5 µl の 4 mM NADPH 及び 0.5 µl の 5 mg/ml glutathione reductase を添加し常温で 15 分間振盪しながら反応させた。そして、20 µl の 10 mM 5,5'-dithiobis-(2-nitro-benzoic acid) を添加し常温で 10 分間振盪しながら反応させた。この反応により生成した 5-mercapto-2-nitrobenzoic acid の吸光度をマイクロプレートリーダー-Infini<sup>TM</sup> M1000 (TECAN) を用いて、波長 450 nm の条件で測定した。

なお、各サンプルのグルタチオン量は Glutathione (Reduced Form) を用いて検量線を作成することにより求めた。具体的には Glutathione (Reduced Form) を 2% sulfosalicylic acid に溶解させたもの (5, 10, 20, 40, 80, 160, 320 µM) を用意し、96 well plate に 30 µl ずつ入れ、上述と同じ手順で吸光度を測定し、検量線を求めた。検量線より各サンプルのグルタチオン量を求めた。IGF-I 処置後の SH-SY5Y 細

胞を用いた検討においては回収時に得られた細胞数で、また、 $\text{Na}_2\text{S}_3$  処置後の SH-SY5Y 細胞及び C6 細胞を用いた検討においては、BCA 法で算出したタンパク質量でそれぞれのグルタチオン量を補正した。

## 第2項 中脳組織切片のグルタチオン量測定

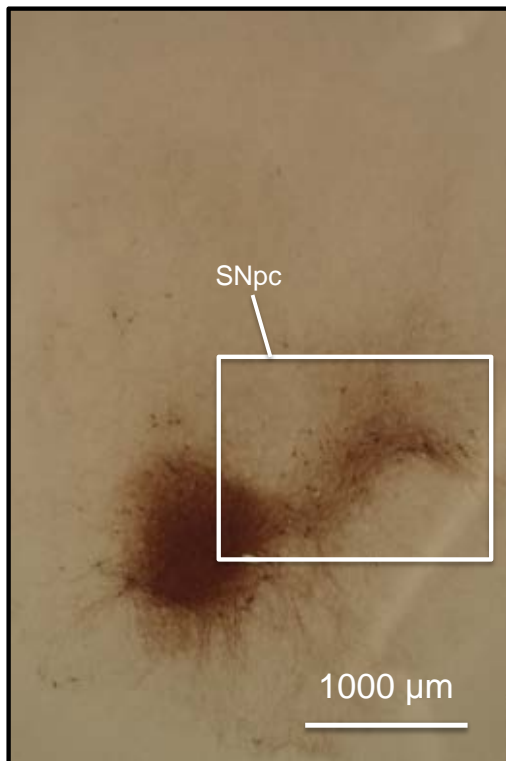
1 つの inner dish に培養された試薬処置後の 6 枚の中脳切片をメンブレンから剥離し、氷冷した 200  $\mu\text{l}$  の PBS が入った 1.5 ml チューブに回収した。氷上にて眼科バサミで切片を細切した後に、氷冷しながら BIORUPTOR UCD-300 (COSMO BIO Co., LTD.) で超音波破砕を行った。その後サンプルを遠心 (15,000 g, 4°C, 20 分) し、上清を回収した。回収した上清のうち 5  $\mu\text{l}$  を用いて BCA 法により各サンプルのタンパク質定量を行なった。その後の作業は第 1 項と同様の手順にて行った。得られたグルタチオン量は BCA 法で算出した各タンパク質量で補正した。



## 第7節 酵素抗体法による免疫組織化学染色法

薬物処置後の中脳切片を、メンブレンに付着した状態で固定液（4% paraformaldehyde (PFA), 4% sucrose, 0.1 M phosphate buffer) に 4°C 下で 2 時間浸し固定を行なった。固定後、10 mM PBS で洗浄（5 分, 3 回）し、0.02% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を含む methanol 溶液でメンブレンを 30 分間処理することで内因性のペルオキシダーゼを失活させた。次に、Triton X-100 を 0.5% 含む PBS 溶液にメンブレンを 15 分間浸すことで細胞膜の可溶化を行い、その後 FBS を 10% 含む PBS 溶液をメンブレンに添加することで、常温で 30 分間のブロッキングを行った。ブロッキング後に一次抗体として 10% FBS を含む PBS 溶液で 500 倍希釈した rabbit anti-Tyrosine Hydroxylase (TH) antibody をメンブレンに添加し、メンブレンに付着した中脳切片と 4°C 下で一晩反応させた。一晩反応後に PBS でメンブレンを洗浄（5 分, 3 回）し、二次抗体として 10% FBS を含む PBS 溶液で 200 倍希釈した biotinylated anti-rabbit IgG をメンブレンに添加し、メンブレンに付着した中脳切片と室温で 1 時間反応させた。その後 PBS でメンブレンを洗浄（5 分, 3 回）し、VECTASTAIN ABC standard kit を用いてアビジンビオチン複合体とメンブレンに付着した中脳切片を室温で 1 時間半反応させた。反応後に 50 mM tris buffered saline (TBS) で洗浄（5 分, 3 回）し、0.07% 3',3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride を 0.005% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/TBS 溶液に溶解したものとメンブレンに付着した中脳切片を反応させ、抗原を可視化させた。TBS で反応を停止させ、メンブレンを 70%, 90%, 及び 100% ethanol にそれぞれ 3 分間、順次浸すことにより中脳組織から水分を除去した。その後、glycerol にメンブレンを浸し、スライドガラス (MATSUNAMI) に封入した。

抗 TH 抗体で標識される細胞をドパミンニューロンと同定した。TH 陽性細胞は Figure 23 に示すように可視化される。Figure 23 において白枠で囲った四角の中に示した領域を黒質緻密部と判断した。TH 陽性細胞のうち、明瞭な輪郭を持ち、丸または楕円形の細胞体で細胞体径の 2 倍以上の突起を有する細胞を生存細胞と判断した。黒質緻密部を BIOREVO (KEYENCE) で観察し、TH 陽性の生存細胞が最も多い範囲 (570 μm × 750 μm) を撮像し、NIH Image J software を用いてその数を計測することで各薬物の作用を評価した。



**Fig. 23. Image of TH immunohistochemistry in midbrain slice culture.**

A representative photomicrograph showing the immunohistochemistry for TH on midbrain slice cultures. Square area outlined in white indicates substantia nigra pars compacta (SNpc).

## 第8節 組織内 ROS レベルの評価

薬物処置後の中脳切片を、 $30\ \mu\text{M}$  の 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) が添加された  $0.7\ \text{ml}$  の血清不含培地の入った別の 6-well plate に inner dish ごと移し、 $34^{\circ}\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$  環境下で 30 分間培養した。その後  $0.7\ \text{ml}$  の血清不含培地の入った  $35\ \text{mm}$  dish に inner dish ごと移し、その後すぐに BIOREVO を用いて 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) の蛍光画像及び明視野で観察される切片の画像を撮像した。その後、NIH Image J software を用いて切片当たりの蛍光強度を算出した。1つの inner dish に培養した 6 枚のうち、切片当たりの蛍光強度が強い 3 枚を定量化に用いた。

## 第9節 統計処理

データは全て、平均値±標準誤差で表した。対応のない2群間の比較は unpaired t-test にて評価した (Figure 6, 7, 8A, 19)。3群以上の比較は one-way ANOVA 後の Tukey's multiple comparison test (Figure 5, 8B, 8C, 9B, 9C, 10B, 11B, 12, 16, 17, 18, 21B), あるいは Sidack's multiple comparison test (Figure 15C, 15D) にて評価した。パラメトリックな統計処理に適合しない場合には, Kruskal-Wallis test 後の Dunn's multiple comparison test (Figure 9E, 15B) によって評価した。全ての実験において危険率 5%未満で統計学的な有意差があると判定した。

## 謝辞

稿を終えるにあたり，終始惜しめない御指導，御鞭撻及び及び御校閲を賜りました熊本大学大学院生命科学研究部 香月 博志 教授に深甚なる感謝の意を表します。

本論文の審査にあたり，有益なる御助言と御校閲を賜りました熊本大学大学院生命科学研究部 杉本 幸彦 教授，三隅 将吾 教授ならびに渡邊 博志 准教授に厚く御礼申し上げます。

本研究に際し，多大なる御指導と御鞭撻を賜りました熊本大学大学院生命科学研究部 関 貴弘 准教授，熊本大学大学院先導機構 久恒 昭哲 特任准教授ならびに熊本大学大学院生命科学研究部 倉内 祐樹 助教に深謝致します。

本研究及び研究室生活に際し，御協力と御助言を頂きました薬物活性学分野の諸先輩方に心から感謝致します。特に多くの御指導を頂きました東京理科大学薬学部 堀江 一郎 助教，大阪大谷大学薬学部 道永 昌太郎 助教，坂本 唯真 博士，松下 英明 博士，立命館大学薬学部 肱岡 雅宣 助教に感謝致します。

本研究及び研究室生活に際し，御支援を頂きました薬物活性学分野の諸氏に心から感謝致します。

2018年3月 高橋 周平

## 参考文献

1. Lees, A. J., Hardy, J. & Revesz, T. Parkinson's disease. *Lancet (London, England)* **373**, 2055–2066 (2009).
2. Dauer, W. & Przedborski, S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* **39**, 889–909 (2003).
3. Abou-Sleiman, P. M., Muqit, M. M. K. & Wood, N. W. Expanding insights of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **7**, 207–219 (2006).
4. Smeyne, M. & Smeyne, R. J. Glutathione metabolism and Parkinson's disease. *Free Radic. Biol. Med.* **62**, 13–25 (2013).
5. Dias, V., Junn, E. & Mouradian, M. M. The role of oxidative stress in parkinson's disease. *J. Parkinsons. Dis.* **3**, 461–491 (2013).
6. Bender, A. *et al.* High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease. *Nat. Genet.* **38**, 515–517 (2006).
7. Kraytsberg, Y. *et al.* Mitochondrial DNA deletions are abundant and cause functional impairment in aged human substantia nigra neurons. *Nat. Genet.* **38**, 518–520 (2006).
8. Kim, W. G. *et al.* Regional difference in susceptibility to lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in the rat brain: role of microglia. *J Neurosci* **20**, 6309–6316 (2000).
9. Qian, L., Flood, P. M. & Hong, J. S. Neuroinflammation is a key player in Parkinson's disease and a prime target for therapy. *J. Neural Transm.* **117**, 971–979 (2010).
10. Rojo, A. I. *et al.* Nrf2 regulates microglial dynamics and neuroinflammation in experimental Parkinson's disease. *Glia* **58**, 588–598 (2010).
11. Lu, S. C. Glutathione synthesis. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1830**, 3143–3153 (2012).
12. Dringen, R. & Hirrlinger, J. Glutathione pathways in the brain. *Biol. Chem.* **384**, 505–516 (2003).
13. Dalton, T. P., Chen, Y., Schneider, S. N., Nebert, D. W. & Shertzer, H. G. Genetically altered mice to evaluate glutathione homeostasis in health and

- disease. *Free Radic. Biol. Med.* **37**, 1511–1526 (2004).
14. Jaiswal, A. K. Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radic. Biol. Med.* **36**, 1199–1207 (2004).
  15. Lu, C. Y. *et al.* Andrographolide inhibits TNF $\alpha$ -induced ICAM-1 expression via suppression of NADPH oxidase activation and induction of HO-1 and GCLM expression through the PI3K/Akt/Nrf2 and PI3K/Akt/AP-1 pathways in human endothelial cells. *Biochem. Pharmacol.* **91**, 40–50 (2014).
  16. Chapple, S. J., Siow, R. C. M. & Mann, G. E. Crosstalk between Nrf2 and the proteasome: Therapeutic potential of Nrf2 inducers in vascular disease and aging. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **44**, 1315–1320 (2012).
  17. Yan, D., Dong, J., Sulik, K. K. & Chen, S. Induction of the Nrf2-driven antioxidant response by tert-butylhydroquinone prevents ethanol-induced apoptosis in cranial neural crest cells. *Biochem. Pharmacol.* **80**, 144–1449 (2010).
  18. Gong, P., Hu, B. & Cederbaum, A. I. Diallyl sulfide induces heme oxygenase-1 through MAPK pathway. *Arch. Biochem. Biophys.* **432**, 252–260 (2004).
  19. Toffa, S., Kunikowska, G. M., Zeng, B. Y., Jenner, P. & Marsden, C. D. Glutathione depletion in rat brain does not cause nigrostriatal pathway degeneration. *J. Neural Transm.* **104**, 67–75 (1997).
  20. Wüllner U. Glutathione depletion potentiates MPTP and MPP<sup>+</sup> toxicity in nigral dopaminergic neurones. 921–923 (1996).
  21. Chen, P.-C. *et al.* Nrf2-mediated neuroprotection in the MPTP mouse model of Parkinson's disease: Critical role for the astrocyte. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 2933–2938 (2009).
  22. Sian, J. *et al.* Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. *Ann. Neurol.* **36**, 348–355 (1994).
  23. Sian, J. *et al.* Glutathione-related enzymes in brain in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* **36**, 356–361 (1994).
  24. Cai, J., Huang, Z. Z. & Lu, S. C. Differential regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase heavy and light subunit gene expression. *Biochem. J.* **326** ( Pt 1, 167–172 (1997).
  25. Lu, S. C., Ge, J. L., Kuhlenkamp, J. & Kaplowitz, N. Insulin and glucocorticoid

- dependence of hepatic  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase and glutathione synthesis in the rat. Studies in cultured hepatocytes and in vivo. *J. Clin. Invest.* **90**, 524–532 (1992).
26. Bailey-Downs, L. C. *et al.* Liver-specific knockdown of IGF-1 decreases vascular oxidative stress resistance by impairing the Nrf2-dependent antioxidant response: A novel model of vascular aging. *Journals Gerontol. - Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.* **67 A**, 313–329 (2012).
  27. Bassil, F., Fernagut, P. O., Bezard, E. & Meissner, W. G. Insulin, IGF-1 and GLP-1 signaling in neurodegenerative disorders: Targets for disease modification? *Prog. Neurobiol.* **118**, 1–18 (2014).
  28. Quesada, A., Lee, B. Y. & Micevych, P. E. PI3 kinase/Akt activation mediates estrogen and IGF-1 nigral DA neuronal neuroprotection against a unilateral rat model of Parkinson's disease. *Dev. Neurobiol.* **68**, 632–644 (2008).
  29. Sun, X., Huang, L., Zhang, M., Sun, S. & Wu, Y. Insulin like growth factor-1 prevents 1-mentyl-4-phenylpyridinium-induced apoptosis in PC12 cells through activation of glycogen synthase kinase-3beta. *Toxicology* **271**, 5–12 (2010).
  30. Kimura, Y. & Kimura, H. Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress. *FASEB J.* **18**, 1165–1167 (2004).
  31. Kida, K. *et al.* Inhaled hydrogen sulfide prevents neurodegeneration and movement disorder in a mouse model of Parkinson's disease. *Antioxid. Redox Signal.* **15**, 343–352 (2011).
  32. Lu, M. *et al.* The neuroprotection of hydrogen sulfide against MPTP-induced dopaminergic neuron degeneration involves uncoupling protein 2 rather than ATP-sensitive potassium channels. *Antioxid. Redox Signal.* **17**, 849–859 (2012).
  33. Koike, S., Ogasawara, Y., Shibuya, N., Kimura, H. & Ishii, K. Polysulfide exerts a protective effect against cytotoxicity caused by t-butylhydroperoxide through Nrf2 signaling in neuroblastoma cells. *FEBS Lett.* **587**, 3548–3555 (2013).
  34. Ishigami, M. *et al.* A source of hydrogen sulfide and a mechanism of its release in the brain. *Antioxid. Redox Signal.* **11**, 205–214 (2009).
  35. Stipanuk, M. H. & Beck, P. W. Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat. *Biochem. J.* **206**, 267–277 (1982).
  36. Shibuya, N. *et al.* A novel pathway for the production of hydrogen sulfide from

- D-cysteine in mammalian cells. *Nat. Commun.* **4**, 1366 (2013).
37. Nagai, Y., Tsugane, M., Oka, J. I. & Kimura, H. Hydrogen sulfide induces calcium waves in astrocytes. *FASEB J.* **18**, 557–559 (2004).
  38. Hughes, M. N., Centelles, M. N. & Moore, K. P. Making and working with hydrogen sulfide: The chemistry and generation of hydrogen sulfide in vitro and its measurement in vivo: a review. *Free Radic. Biol. Med.* **47**, 1346–1353 (2009).
  39. Abe, K. & Kimura, H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *J. Neurosci.* **16**, 1066–1071 (1996).
  40. Zhao, W., Zhang, J., Lu, Y. & Wang, R. The vasorelaxant effect of H<sub>2</sub>S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. *EMBO J.* **20**, 6008–6016 (2001).
  41. Yadav, P. K., Yamada, K., Chiku, T., Koutmos, M. & Banerjee, R. Structure and kinetic analysis of H<sub>2</sub>S production by human mercaptopyruvate sulfurtransferase. *J. Biol. Chem.* **288**, 20002–20013 (2013).
  42. Kimura, H. Hydrogen sulfide and polysulfides as biological mediators. *Molecules* **19**, 16146–16157 (2014).
  43. Nagy, P. & Winterbourn, C. C. Rapid reaction of hydrogen sulfide with the neutrophil oxidant hypochlorous acid to generate polysulfides. *Chem. Res. Toxicol.* **23**, 1541–1543 (2010).
  44. Kimura, H. The physiological role of hydrogen sulfide and beyond. *Nitric oxide Biol. Chem.* **41**, 4–10 (2014).
  45. Ida, T. *et al.* Reactive cysteine persulfides and S-polythiolation regulate oxidative stress and redox signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 7606–7611 (2014).
  46. Siebert, N., Cantré, D., Eipel, C. & Vollmar, B. H<sub>2</sub>S contributes to the hepatic arterial buffer response and mediates vasorelaxation of the hepatic artery via activation of K(ATP) channels. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **295**, G1266-1273 (2008).
  47. Moustafa, A. & Habara, Y. Reciprocal interaction among gasotransmitters in isolated pancreatic  $\beta$ -cells. *Free Radic. Biol. Med.* **90**, 47–58 (2016).
  48. Ogawa, H. *et al.* H<sub>2</sub>S functions as a nociceptive messenger through transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) activation. *Neuroscience* **218**, 335–343 (2012).
  49. Kimura, Y. *et al.* Polysulfides are possible H<sub>2</sub>S-derived signaling molecules in



- rat brain. *FASEB J.* **27**, 2451–2457 (2013).
50. Okawara, M. *et al.* Resveratrol protects dopaminergic neurons in midbrain slice culture from multiple insults. *Biochem. Pharmacol.* **73**, 550–560 (2007).
  51. Nishijima, T. *et al.* Neuronal Activity Drives Localized Blood-Brain-Barrier Transport of Serum Insulin-like Growth Factor-I into the CNS. *Neuron* **67**, 834–846 (2010).
  52. Suh, H.-S., Zhao, M.-L., Derico, L., Choi, N. & Lee, S. C. Insulin-like growth factor 1 and 2 (IGF1, IGF2) expression in human microglia: differential regulation by inflammatory mediators. *J. Neuroinflammation* **10**, 37 (2013).
  53. Butovsky, O. *et al.* Microglia activated by IL-4 or IFN- $\gamma$  differentially induce neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells. *Mol. Cell. Neurosci.* **31**, 149–160 (2006).
  54. Butovsky, O. *et al.* Induction and blockage of oligodendrogenesis by differently activated microglia in an animal model of multiple sclerosis. *J. Clin. Invest.* **116**, 905–915 (2006).
  55. Morris, K. C., Lin, H. W., Thompson, J. W. & Perez-Pinzon, M. a. Pathways for ischemic cytoprotection: role of sirtuins in caloric restriction, resveratrol, and ischemic preconditioning. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **31**, 1003–1019 (2011).
  56. Sundaresan, N. R. *et al.* The sirtuin SIRT6 blocks IGF-Akt signaling and development of cardiac hypertrophy by targeting c-Jun. *Nat. Med.* **18**, 1643–1650 (2012).
  57. Liszt, G., Ford, E., Kurtev, M. & Guarente, L. Mouse Sir2 homolog SIRT6 is a nuclear ADP-ribosyltransferase. *J. Biol. Chem.* **280**, 21313–21320 (2005).
  58. Lee, O. H. *et al.* Decreased expression of sirtuin 6 is associated with release of high mobility group box-1 after cerebral ischemia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **438**, 388–394 (2013).
  59. Liang, L. P., Kavanagh, T. J. & Patel, M. Glutathione deficiency in Gclm null mice results in complex I inhibition and dopamine depletion following paraquat administration. *Toxicol. Sci.* **134**, 366–373 (2013).
  60. Zhu, W., Jia, Q., Wang, Y., Zhang, Y. & Xia, M. The anthocyanin cyanidin-3-O- $\beta$ -glucoside, a flavonoid, increases hepatic glutathione synthesis and protects hepatocytes against reactive oxygen species during hyperglycemia: Involvement of a cAMP-PKA-dependent signaling pathway. *Free Radic. Biol.*

- Med.* **52**, 314–327 (2012).
61. Quesada, A., Ogi, J., Schultz, J. & Handforth, A. C-terminal mechano-growth factor induces heme oxygenase-1-mediated neuroprotection of SH-SY5Y cells via the protein kinase C $\epsilon$ /Nrf2 pathway. *J. Neurosci. Res.* **89**, 394–405 (2011).
  62. Aoyama, K. & Nakaki, T. Inhibition of GTRAP3-18 may increase neuroprotective glutathione (GSH) synthesis. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 12017–12035 (2012).
  63. Chen, J. H. *et al.* Carnosic acid prevents 6-hydroxydopamine-induced cell death in SH-SY5Y cells via mediation of glutathione synthesis. *Chem. Res. Toxicol.* **25**, 1893–1901 (2012).
  64. Hühner, L. *et al.* Interleukin-4 Protects Dopaminergic Neurons In vitro but Is Dispensable for MPTP-Induced Neurodegeneration In vivo. *Front. Mol. Neurosci.* **10**, 62 (2017).
  65. Quesada, A., Romeo, H. E. & Micevych, P. Distribution and localization patterns of estrogen receptor-beta and insulin-like growth factor-1 receptors in neurons and glial cells of the female rat substantia nigra: localization of ERbeta and IGF-1R in substantia nigra. *J. Comp. Neurol.* **503**, 198–208 (2007).
  66. Moroo, I. *et al.* Loss of insulin receptor immunoreactivity from the substantia nigra pars compacta neurons in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol.* **87**, 343–348 (1994).
  67. Kwak, Y.-D. *et al.* Upregulation of the E3 ligase NEDD4-1 by Oxidative Stress Degrades IGF-1 Receptor Protein in Neurodegeneration. *J. Neurosci.* **32**, 10971–10981 (2012).
  68. Morris, J. K. *et al.* Measures of striatal insulin resistance in a 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Brain Res.* **1240**, 185–195 (2008).
  69. Pan, H. *et al.* SIRT6 safeguards human mesenchymal stem cells from oxidative stress by coactivating NRF2. *Nat. Publ. Gr.* **26**, 190–205 (2016).
  70. Szabo, C. & Papapetropoulos, A. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CII: Pharmacological Modulation of H<sub>2</sub>S Levels: H<sub>2</sub>S Donors and H<sub>2</sub>S Biosynthesis Inhibitors. *Pharmacol. Rev.* **69**, 497–564 (2017).
  71. Koike, S. *et al.* Polysulfides protect SH-SY5Y cells from methylglyoxal-induced toxicity by suppressing protein carbonylation: A possible physiological scavenger for carbonyl stress in the brain. *Neurotoxicology* **55**, 13–19 (2016).

72. Du, C. *et al.* Downregulation of cystathionine  $\beta$ -synthase/hydrogen sulfide contributes to rotenone-induced microglia polarization toward M1 type. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **451**, 239–245 (2014).
73. Kiyofuji, K. *et al.* A natural compound macelignan protects midbrain dopaminergic neurons from inflammatory degeneration via microglial arginase-1 expression. *Eur. J. Pharmacol.* **760**, 129–135 (2015).
74. Gun, J. *et al.* Electrospray Ionization Mass Spectrometric Analysis of Aqueous Polysulfide Solutions. *Microchim. Acta* **146**, 229–237 (2004).
75. Koike, S., Nishimoto, S. & Ogasawara, Y. Cysteine persulfides and polysulfides produced by exchange reactions with H<sub>2</sub>S protect SH-SY5Y cells from methylglyoxal-induced toxicity through Nrf2 activation. *Redox Biol.* **12**, 530–539 (2017).
76. Takahashi, S., Hisatsune, A., Kurauchi, Y., Seki, T. & Katsuki, H. Insulin-like growth factor 1 specifically up-regulates expression of modifier subunit of glutamate-cysteine ligase and enhances glutathione synthesis in SH-SY5Y cells. *Eur. J. Pharmacol.* **771**, 99–106 (2016).
77. Hashemian, S., O'Rourke, C., Phillips, J. B., Strömberg, I. & Af Bjerkén, S. Embryonic and mature astrocytes exert different effects on neuronal growth in rat ventral mesencephalic slice cultures. *Springerplus* **4**, 558 (2015).
78. Lu, C. *et al.* Neuroprotective effects of tetramethylpyrazine against dopaminergic neuron injury in a rat model of parkinson's disease induced by MPTP. *Int. J. Biol. Sci.* **10**, 350–357 (2014).
79. Weilan, Y., Weiguo, Y., Baisheng, H. & Lixiang, W. Neuroprotective effects of lentivirus-mediated cystathionine-beta-synthase overexpression against 6-OHDA-induced parkinson's disease rats. *Neurosci. Lett.* **657**, 45–52 (2017).
80. Yuan, Y.-Q. *et al.* Impaired CBS-H<sub>2</sub>S signaling axis contributes to MPTP-induced neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease. *Brain. Behav. Immun.* (2017). doi:10.1016/j.bbi.2017.07.159
81. Verkman, A. S. & Galletta, L. J. V. Chloride channels as drug targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* **8**, 153–171 (2009).
82. White, B. J. O., Smith, P. A. & Dunn, W. R. Hydrogen sulphide mediated vasodilatation involves the release of neurotransmitters from sensory nerves in pressurized mesenteric small arteries isolated from rats. *Br. J. Pharmacol.* **168**,

- 785–793 (2013).
83. Matsuzawa, D. *et al.* Negative correlation between brain glutathione level and negative symptoms in schizophrenia: a 3T 1H-MRS study. *PLoS One* **3**, e1944 (2008).
  84. Kanninen, K. *et al.* Intrahippocampal injection of a lentiviral vector expressing Nrf2 improves spatial learning in a mouse model of Alzheimer’s disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 16505–16510 (2009).