

パーキンソン病動物モデルの作製とタクロリムスによるその実験的治療に関する研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9321

パーキンソン病動物モデルの作製とタクロリムスによる その実験的治療に関する研究

金沢大学医学部医学科神経内科学講座(主任:高守正治教授)

坂 尻 顕 一

パーキンソン病の新しい治療方法を開拓するため、C57Black/6N成熟マウスにおいて、黒質線条体系に対し神経毒性を有する1-メチル-4-フェニル-1,2,3,6-テトラヒドロピリジン(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP)にて誘導されるパーキンソン病類似の神経変性に対するタクロリムス(FK506)の抑制効果を検討した。FK506 10mg/kg体重を1日2回3日間皮下投与しても、ドーパミンおよびその代謝産物ジヒドロキシフェニル酢酸、ホモバニリン酸濃度は正常対照群と有意差がなかった。MPTP 20mg/kgを1日1回2日間皮下投与すると、第9日には線条体ドーパミン濃度は正常マウスの29.5%に減少した。しかし、FK506 2.5mg/kg体重を1日2回3日間腹腔内前投与すると、MPTPによる線条体ドーパミン、およびその代謝産物ジヒドロキシフェニル酢酸濃度の減少は有意に抑制された。また、これらの効果は、FK506 5あるいは10mg/kg体重の高濃度投与では減弱した。以上の結果から、FK506はC57Black/6N成熟マウスにおいてMPTPの黒質神経細胞毒性に対し至適濃度で神経保護効果を有すると推察される。その機序は、FK506がカルシニユリンの酵素活性を阻害することにより、MPTPによるグルタミン酸神経毒性を減弱させたものと推察した。

Key words 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, FK506, striatum, dopamine, mouse

パーキンソン病は、臨床的には振戦、筋固縮、寡動、姿勢反射障害を主徴とし、生化学的には黒質線条体系で神経伝達因子であるドーパミン(dopamine, DA)およびその代謝産物の3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸(3,4-dihydroxyphenylacetic acid, DOPAC)、およびホモバニリン酸(homovanillic acid, HVA)が減少することが知られる。また、病理学的には主に黒質、青斑核の神経細胞変性およびレヴィ小体の出現に特徴づけられる。

1979年にメペリジン類似物質の慢性薬物中毒によりパーキンソン病と酷似した症状を呈した症例が報告され¹⁾、1983年にその原因物質が1-メチル-4-フェニル-1,2,3,6-テトラヒドロピリジン(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP)であると同定された²⁾。その後、霊長類でMPTPによる実験的パーキンソンニズム作成が可能となり³⁾、同モデルにおいても黒質の変性に加えて、青斑核神経細胞の変性、レヴィ小体の出現が確認され⁴⁾、パーキンソン病とほぼ同様の生化学的、病理学的変化をきたすことが証明された。また、マウスでもMPTPの投与によりパーキンソンニズム類似の症状を呈することが証明された⁵⁻⁷⁾。中でもC57Blackマウスが特にMPTPに対する感受性が高く⁸⁾、老齢マウスでより感受性が高いことが示された⁹⁾。MPTPは、線条体内グリアに取り込まれモノアミン酸化酵素-Bにより1-メチル-4-フェニル-ピリジニウムイオン(1-methyl-4-phenyl-pyridinium ion, MPP⁺)に変化する¹⁰⁾。さらに、MPP⁺は黒質

神経細胞神経終末に取り込まれ¹¹⁾、ミトコンドリア内に蓄積し¹²⁾、主にミトコンドリア複合体Iの阻害¹³⁾¹⁴⁾によって神経細胞死を引き起こすと考えられている。また、MPP⁺投与により線条体のグルタミン酸の放出が促進され¹⁵⁾、N-メチル-D-アスパラギン酸(N-methyl-D-aspartate, NMDA)受容体阻害薬でMPP⁺投与による黒質神経細胞毒性が減弱されること¹⁶⁾などから、グルタミン酸神経毒性もMPP⁺による神経細胞死の一因と考えられる。

タクロリムス(FK506)は、免疫系に対しては、ヘルパー-T細胞がインターロイキン-2(interleukin-2, IL-2)などのサイトカインを作り出すのを阻害することにより免疫応答の進行を抑える作用を有することから¹⁷⁾、腎移植、骨髄移植時に使用されている¹⁸⁾。一方、近年Dawsonら¹⁹⁾によりFK506が、免疫抑制剤としての作用以外に、グルタミン酸による神経細胞死を抑制する作用をもつことが報告された。その作用機序は細胞内に存在するFK506結合蛋白(FK506-binding protein, FKBP)とFK506との複合体がCa-カルモジュリン依存性フォスファターゼであるカルシニユリンの酵素活性を阻害することによるとされる²⁰⁾。FKBPはカルシニユリンとともにリンパ系組織である胸腺組織の10-50倍の濃度で脳組織に存在しており²¹⁾²²⁾、FK506の神経細胞死抑制作用はカルシニユリンを介した神経型の一酸化窒素合成酵素(neuronal nitric oxide synthase, n-NOS)の活性化を阻

平成10年8月3日受付, 平成10年9月29日受理

Abbreviations: DA, dopamine; DOPAC, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid; DW, distilled water; FKBP, FK506-binding protein; HPLC, high performance liquid chromatography; HVA, homovanillic acid; IL-2, interleukin-2; MPP⁺, 1-methyl-4-phenyl-pyridinium ion; MPTP, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine; NMDA, N-methyl-D-aspartate; NO, nitric oxide; n-NOS, neuronal nitric oxide synthase; ONOO⁻, peroxynitrite; 生食, 生理食塩水

害することによると考えられている。これらの知見から、FK506は免疫系疾患のみならず神経系疾患の治療にも応用され、脳虚血モデル動物にてFK506による脳梗塞サイズの減少^{23,24}、海馬ニューロンの遅発性神経細胞壊死の抑制²⁵が同様に報告されている。

幼若マウスでMPTP投与による線条体DA, DOPACの減少を、FK506が抑制することが示されている²⁶ことをふまえ、本研究ではヒトパーキンソン病の好発年齢に近い成熟マウスを用い、MPTPで誘発される黒質神経細胞死をFK506がどのように修飾するかを検討した。

材料および方法

I. パーキンソニズム・モデルマウスの作製、薬物投与、線条体の摘出保存

パーキンソニズム・モデルマウス作製のためのMPTP塩酸 (RBI社, Massachusetts, USA) の投与量は、パーキンソン病患者では線条体DA濃度が30%以下に低下していることをもとに、予備実験にてその条件を満たす20mg/Kg体重を選択した (図1)。FK506の効果を検討するため、11週齢の雄性C57Black/6Nマウス (体重20-30g) (日本クレア, 東京) に生理食塩水 (生食) あるいはFK506 (藤沢, 東京) 0.2, 1.0, 2.5, 5, 10mg/Kg体重 (各群n=7) を第1, 2日の7:00 (MPTP投与12時間前), 18:00 (MPTP投与1時間前) に腹腔内投与し、第1, 2日の19:00に蒸留水あるいはMPTP 20mg/Kg体重を皮下注射し、第3日の7:00, 18:00に生食あるいはFK506を第1, 2日と同様に腹腔内投与した。第9日に、ネンブタール (ダイナボット, 大阪) 0.02mlを被検マウスの腹腔内に投与して麻酔した後断頭、氷冷したプレート上で速やかに両側線条体を摘出し脳重を測定後、ドライアイスにて急速凍結し、-80℃で凍結保存した (図2)。摘出した線条体組織には0.4N過塩素酸 250 μ l (和光純薬工業, 大阪), 0.1M EDTA-2Na (和光純薬工業) 100 μ l, 0.2M Tris-HCl (pH8.5) (和光純薬工業) 400 μ l, 100mM アスコルビン酸 (和光純薬工業) 85 μ l, 内部標準としてイソプレテレンール (RBI社) 100-200ngを加え、超音波ホモゲナイザー (ウルトラソニックジェネレーター モデル US-300) (日本精機, 東京) にてホモジネートした。その後、微量高速冷却遠心器 (トミー精工, 東京) により14,000rpm, 4℃で10分間遠心し、その上清800 μ lにクロロホルム (和光純薬工業) 300 μ lを加え10分間振盪脱脂した。その後、4℃で14,000rpm, 2分間遠心し、上清を0.22 μ mのミリポアフィルター (Millipore, Massachusetts, USA) で濾過後、-80℃で冷凍保存した。

II. 高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography, HPLC) によるDA, DOPAC, HVA濃度の測定

HPLC LC-6A (島津, 京都) に電気化学検出器 モデル 5011 (ESA, Massachusetts, USA), ガードセル MODEL 5020 (ESA) を組み合わせてDA, DOPAC, HVA濃度の測定を行った。液体クロマトグラフィーカラム (エイコムパック MA-5ODS) (エイコム, 京都) を用い、移動相として0.1M 酢酸ナトリウム (和光純薬工業) と0.1M クエン酸 (和光純薬工業) を混合しpH3.5の緩衝液を作製し、EDTA-2Na, 1-オクタンスルホン酸 (ナカライテスク, 京都) を加え0.22 μ mのミリポアフィルター (Millipore社) で濾過後、メタノール (和光純薬工業) を加え30

分間ガス抜きした。流速は0.8ml/分、検出器圧はD1=+0.4V, D2=-0.3V, ガードセル圧は+0.45Vとした。DA, DOPAC, HVAのピークをクロマトグラムデータ収録ソフト (マックラブ, チャート V3.3) (AD Instruments, Castlehill, Australia) にて測定後、クロマトグラムデータ解析ソフト (ピークス V1.3.4) (AD Instruments) にてピークエリアを解析し、内部標準イソプレテレンール量 \times [検体DA/検体イソプレテレンール] / [標準液DA/標準液イソプレテレンール] / 脳重 の計算式からDA濃度 (ng/mg脳重) を算出した。同様にDOPAC, HVA濃度 (ng/mg脳重) を測定した。また、標準品としてDA (Sigma, St.Louis, USA), DOPAC (Sigma), HVA (Sigma) をそれぞれ用いた。

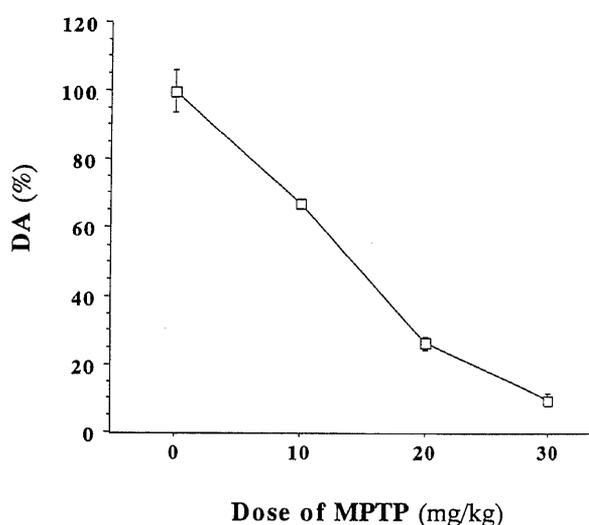


Fig. 1. Effect of MPTP treatment on the content of dopamine in the striatum of C57Black/6N mice. MPTP at the indicated doses was administered to C57Black/6N mice (s.c., once daily for 2 days). Nine days after the first administration of MPTP, the content of dopamine was measured by the HPLC-ECD system. Each point shows relative $\bar{x} \pm$ SEM of 3-5 mice percent that of control mice (without MPTP administration). The numbers of mice tested were 4, 3, 5 and 4 for control mice, mice injected with 10, 20 and 30mg/kg body weight of MPTP, respectively. DA, dopamine; MPTP, 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine.

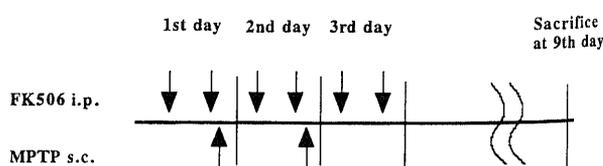


Fig. 2. The schedule of experiments in mice. Mice were pretreated with FK506 at various concentrations 12 h and 1 h before MPTP administration for 2 days, and posttreated with FK506 alone for 1 day. At the 9th day after the first administration of MPTP, mice were sacrificed. i.p., intraperitoneal; s.c., subcutaneous.

Ⅲ. 統計学的検定法

測定値はすべて平均±標準誤差 ($\bar{x} \pm SEM$) で示した. 各群間の比較には一元配置分散分析法 (one-way ANOVA) を用い, FisherのPLSDポストホク法にて検定した. 危険率0.05未満のとき有意差ありとした.

成 績

MPTP神経細胞毒性に対するFK506の効果 (表1, 図3)

線条体DA濃度は, 正常対照のDW-生食群で平均12.2 ± 0.7ng/mg脳重であり, DW-FK506 10mg/kg体重群 (FK506単独投与群) の平均11.9 ± 0.5ng/mg脳重との間に有意差はなかった. MPTP-生食群では3.6 ± 0.5ng/mg脳重であり, 正常対照の29.5%に低下した. これに対しMPTP-FK506 (2.5mg/Kg)群で

は5.2 ± 0.5ng/mg脳重で有意に高値を示した ($p < 0.05$). これより高濃度および低濃度のFK506投与ではMPTP-生食群に対してDA濃度の有意差はなかった.

DOPAC濃度は, 正常対照のDW-生食群で平均2.87 ± 0.10ng/mg脳重であり, DW-FK506 10mg/kg体重群の平均2.60 ± 0.29ng/mg脳重との間に有意差はなかった. MPTP-生食群では1.08 ± 0.11ng/mg脳重であり, 正常対照の37.6%に低下した. これに対しMPTP-FK506 (2.5mg/kg体重)群が1.76 ± 0.12ng/mg脳重で有意に高値を示した ($p < 0.002$). これより高濃度および低濃度のFK506投与ではMPTP-生食群に対してDA濃度の有意差はなかった.

HVA濃度は, 正常対照のDW-生食群で平均1.36 ± 0.04ng/mg脳重であり, DW-FK506 10mg/kg体重群の1.35 ±

Table 1. Effects of FK506 on DA, DOPAC and HVA contents in the striatum of MPTP-treated mice

Treatment	No. of mice	DA (ng/mg brain weight)	DOPAC (ng/mg brain weight)	HVA (ng/mg brain weight)
DW-saline	7	12.2 ± 0.7	2.87 ± 0.10	1.36 ± 0.04
DW- FK506 10mg/Kg	7	11.9 ± 0.5	2.60 ± 0.29	1.35 ± 0.06
MPTP-saline	7	3.6 ± 0.5	1.08 ± 0.11	0.76 ± 0.05
MPTP-FK506 0.2mg/Kg	7	3.5 ± 0.2	0.78 ± 0.04	0.77 ± 0.03
MPTP-FK506 1mg/Kg	7	4.8 ± 0.6	0.80 ± 0.07	0.77 ± 0.04
MPTP-FK506 2.5mg/Kg	7	5.2 ± 0.5*	1.76 ± 0.12#	0.86 ± 0.05
MPTP-FK506 5mg/Kg	7	4.2 ± 0.5	1.44 ± 0.10	0.81 ± 0.06
MPTP-FK506 10mg/KG	7	4.5 ± 0.5	1.39 ± 0.13	0.83 ± 0.04

Data are $\bar{X} \pm SEM$. DW, distilled water, DA, dopamine; DOPAC, 3, 4-dihydroxyphenylacetic acid; HVA, homovanillic acid; MPTP, 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine, * $p < 0.05$, # $p < 0.002$ as compared with MPTP-saline group using one-way ANOVA followed by Fisher's PLSD post hoc test.

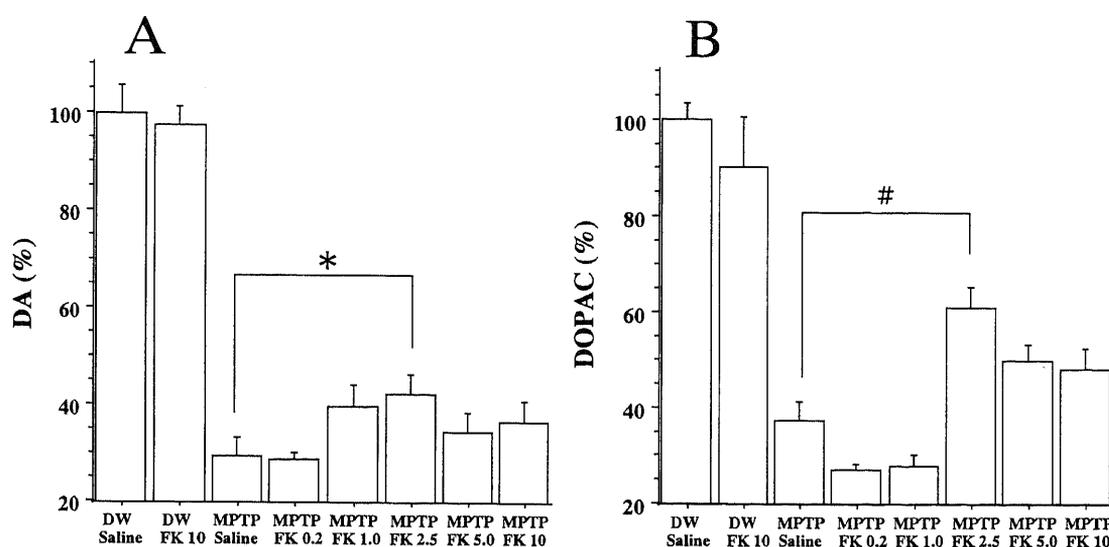


Fig. 3. Effects of FK506 on the contents of DA and DOPAC in the striatum of MPTP-treated mice. Mice were treated with DW or FK506 (0.2, 1.0, 2.5, 5 and 10 mg/kg body weight) followed by administration of saline or MPTP (20mg/kg body weight) according to the schedule shown in Fig.2. The contents of DA (A) and DOPAC (B) in the striatum of each group of mice were measured and expressed as relative $\bar{x} \pm SEM$ (n=7) percent that of the control group of mice (without MPTP or FK506). Statistical significances: * $P < 0.05$, # $P < 0.002$ as compared with the MPTP-saline group. DA, dopamine; DOPAC, 3, 4-dihydroxyphenylacetic acid; DW, distilled water; MPTP, 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine; FK, FK506.

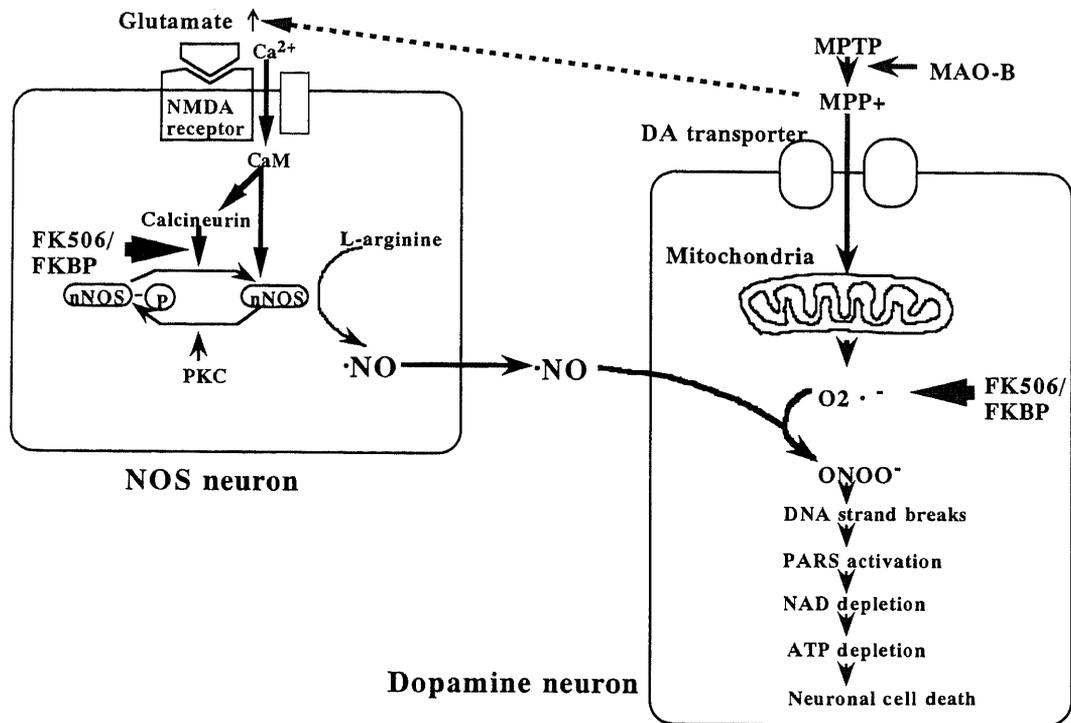


Fig. 4. Proposed schema for an effect of FK506 on selective MPTP-induced neurotoxicity (modified from ref.30). MPTP is converted to MPP⁺, which is transported into dopamine neurons and inhibits enzymes in the mitochondrial electron transport chain, resulting in increased leakage of O₂ radicals. On the other hand, MPP⁺ increases glutamate in the striatum and augments production of nitric oxide (NO) in nitric oxide synthase (NOS) neurons in the manner that calcineurin changes NOS to its active state by dephosphorylation. NO radical and O₂ radical then form a potent oxidant, peroxynitrite (ONOO⁻). FK506 protects dopamine neurons of the substantia nigra from MPTP neurotoxicity in C57Black/6N mature mice in the manner that FK506 inhibits glutamate-induced neurotoxicity through its inhibitory effect on calcineurin and subsequently reduces O₂ radicals. CaM, calmodulin; MAO-B, monoamine oxidase-B; NMDA, N-methyl-D-aspartate; NO, nitric oxide; NOS, nitric oxide synthase; ONOO⁻, peroxynitrite; PARS, poly (ADP-ribose) synthetase; PKC, protein kinase C.

0.06ng/mg脳重との間に有意差はなかった。MPTP-生食群では0.76±0.05ng/mg脳重であり、正常対照の56.3%に低下した。これに対しMPTP-FK506群はどの濃度のFK506投与でもMPTP-生食群に対してHVA濃度の有意な差はなかった。

考 察

MPTPの黒質神経細胞に対する神経毒性の機序に関して、主体はミトコンドリア複合体Iの阻害^{130,140}による、O₂ラジカルの産生によるとされている²⁷。加えて、MPP⁺投与により線条体のグルタミン酸の放出が促進されること¹⁵⁰、NMDA受容体阻害薬でMPP⁺投与による黒質神経細胞毒性が減弱されること¹⁴⁹、MPTP投与によりアストロサイトの胞体内へのグルタミン酸の取り込みが減少すること²⁸⁰などから、グルタミン酸過剰による神経細胞死もMPTPの神経毒性の一因とされている。すなわち、神経細胞は、グルタミン酸過剰の状態では、グルタミン酸がNMDA受容体に結合しカルシウムの過剰流入がおこる結果、カルモジュリンとカルシニューリンが結合し、カルシニューリンがフォスファターゼとしての機能を獲得して、不活性化型のリン酸化n-NOSを脱リン酸化し活性化型に導き、大量の一酸化窒素(nitric oxide, NO)が生じる¹⁷。また、MPTP投与によりミトコンドリア複合体Iの阻害により増加したO₂ラジカルとNOラジカルとが反応して細胞傷害性の強いペルオキシ亜硝酸

(peroxynitrite, ONOO⁻)を形成しヒドロキシラジカルを産生する²⁸⁹。n-NOS阻害薬である7-ニトロインダゾールはMPTPの神経毒性を阻止する作用を有し^{300,310}、また、スーパーオキシドジスムターゼ活性を増加させた遺伝子操作マウス³²⁰やn-NOS活性を欠いた遺伝子操作マウスは、MPTPに抵抗性を獲得するといわれる³³⁰。これらから、現在、MPTPの神経毒性の主体は、NOラジカルがO₂ラジカルと反応したONOO⁻によると考えられている(図4)。

このようなグルタミン酸神経毒性に対して、Dawsonら³⁴⁰はFK506はFKBPと結合しカルシウム-カルモジュリン依存性フォスファターゼであるカルシニューリンの酵素活性を阻害する作用があり、この作用がn-NOSの活性化を防ぎNO産生を抑制して、細胞障害を軽減すると報告した。Sharkeyら³⁵⁰は、ラット脳梗塞モデルにおいて脳神経細胞壊死がFK506で抑制され、ラバマイシンの前投与でFK506の効果が阻止されることを報告した。ラバマイシンは免疫抑制剤の1種で、FKBPと結合してカルシニューリンを介さずに、IL-2によるT細胞の増殖を抑制する働きがある³⁶⁰が、FKBPと競合結合することにより、FK506によるカルシニューリンの酵素活性阻害効果を減弱すると考えられる³⁵⁰。これらの結果から、脳虚血モデルにおけるFK506の効果は、カルシニューリンの酵素活性を阻害して神経細胞死を抑制することによるということが示唆される。

今回の実験は、パーキンソンニズム・モデルであるMPTP投与マウスにおいて、幼若マウス²⁹⁾のみでなく成熟マウスの場合でも一定の至適濃度のFK506前投与により、MPTPによる線条体のDAおよびその代謝産物DOPACの濃度の減少が抑制されることを示した。線条体のDA濃度は黒質神経細胞から投射する神経終末中のDA濃度を反映しており、FK506はMPTPによる黒質神経細胞への神経毒性に対し神経保護作用があると推察される。

これまでに、Kitamuraら²⁹⁾は、幼若マウス(C57Black/6Nマウス、5週齢)に対し、FK506またはサイクロフィリンと複合体を形成しFK506と同様にカルシニューリンの酵素活性を阻害するサイクロスポリンA²⁹⁾を投与し、両者ともMPTP投与による線条体DA濃度の減少を抑制することを示している。一方、Hagiharaら³⁰⁾は、成熟マウス(C57Black/6マウス、30週齢)に対し、サイクロスポリンAの投与が逆にMPTP投与による線条体DA濃度の減少を助長すると報告している。MPTPを投与した場合、幼若マウスと成熟マウスに対してFK506と類似的作用をもつサイクロスポリンAが異なる効果を示すことに関し、Kitamuraら²⁹⁾は、グリアの性質が幼若マウスと成熟マウスで異なることが原因の一つではないかと推察しているが、サイクロスポリンAの投与量、投与時期の違いが結果に影響を与えたとも考えられる。すなわち、Kitamuraら²⁹⁾がMPTP投与1時間前5日間および投与終了後5日間にわたり高容量のサイクロスポリンAを投与したのに対し、Hagiharaら³⁰⁾は低容量のサイクロスポリンAをMPTPと同時に8日間投与しMPTP投与終了後には投与していない。今回の実験は、Kitamuraら²⁹⁾の用いた幼若マウス(5週齢)のみでなく成熟マウス(11週齢)でもFK506の神経保護効果があることを示している。MPTP投与1時間前と投与終了後に高容量のFK506を1日2回投与したことによりFK506の神経保護効果もたらされたものと考えられる。

5あるいは10mg/Kg体重の高濃度のFK506を投与してもMPTPによる線条体DA、DOPAC濃度の減少を有意に抑制できなかったことに関しては、高濃度のFK506が、カルシニューリンの酵素活性を阻害してn-NOSの脱リン酸化を阻害する作用以外に、神経細胞の前、または後シナプスなど種々の部位に作用したり、あるいはグリア細胞を介して神経細胞保護作用を減弱させた可能性が考えられる。例えば、FK506には、細胞内カルシウムの放出を調節するリアノジン受容体やイノシトール3リン酸受容体に作用して小胞体内カルシウムの放出を促進する作用³¹⁾、脱分極時の線条体のシナプトゾームからのグルタミン酸の放出を促進する作用³²⁾、ラットの大脳皮質において4-アミノピリジンによりひきおこされる電位依存性のカルシウムの流入とグルタミン酸の放出を促進する作用³³⁾、カルシニューリンのNMDAチャンネルに対するネガティブフィードバックを阻害する作用³⁴⁾などがあり、その結果、高濃度のFK506投与によりMPTPによる神経毒性の抑制効果が減弱した可能性がある。

FK506にはカルシニューリンの酵素活性の阻害の他に、試験管内実験で神経成長因子の存在下でPC12細胞や後根神経節細胞の軸索の伸長を助長すること³⁵⁾、またラットの圧坐後の坐骨神経の軸索再生を促進すること³⁶⁾が知られている。さらに、FK506にはラジカスカベンジャーとしての作用³⁷⁾が知られる。また、脱分極時の線条体シナプトゾームからのドーパミンの放出を促進する作用³⁸⁾や、カルシウム流入によって引き起こされる分子量32K DaのドーパミンとcAMPに制御されたリン

脂質(dopamine and cAMP-regulated phosphoprotein-32)の脱リン酸化を抑制し、線条体のドーパミン受容体をもつ神経細胞に対しドーパミン様作用をおよぼす可能性が指摘されている⁴⁰⁾。FK506は、このような種々の作用を有しパーキンソン病治療の候補となるが、効果が軽度で効果発現には高容量を要し、また副作用が出現する可能性があり、このままでは臨床応用は困難と思われる。また、5-10mg/kgという高容量では逆に効果が減弱することから、至適容量のレンジの広い類似物質の開発が必要と考えられた。近年、FK506の副作用としての免疫抑制作用を持たない類似化合物が開発され、PC12細胞の軸索伸長作用⁴¹⁾、生体内で黒質神経細胞の保護作用⁴²⁾を有することが示された。本研究は成熟マウスにおいてもこのようなFK506類似化合物に神経保護作用を期待できることを示し、今後、さらなる薬剤の修飾、同効薬の開発によりパーキンソン病の発症予防、進行を抑制できる可能性を示唆している。

結 論

1. C57Black/6N成熟マウスに1日1回2日間MPTPを皮下投与し、パーキンソン病モデルマウスを作製した。HPLCで測定した線条体DA濃度はMPTP 20mg/Kg投与で正常マウスの29.5%に減少した。
2. タクロリムス(FK506)単独投与マウス(10mg/kg体重)の線条体DA、およびその代謝物濃度は正常マウスと有意差がなかった。
3. MPTP投与マウス線条体のDA濃度の減少をタクロリムス2.5mg/Kg腹腔内前投与により抑制することができた。同様にDOPAC濃度減少をタクロリムス2.5mg/Kg腹腔内前投与により抑制することができた。
4. タクロリムス5-10mg/kgという投与量では2.5mg/kgより効果が減じることを見出した。
5. タクロリムスは至適濃度でMPTPによる黒質神経細胞毒性を抑制する作用を有する。その機序は、FK506がカルシニューリンの酵素活性を阻害することにより、MPTPによるグルタミン酸神経毒性を減弱させたものと推察した。

謝 辞

稿を終えるにあたり、ご指導と御校閲を賜りました金沢大学医学部神経内科学講座高守正治教授、岐阜県国際バイオ研究所、小島久典先生に深謝いたします。また、統計学的処理について御指導を賜りました衛生学講座谷井秀治助教授に心から感謝の意を表わします。さらに、ご助言を賜りました駒井清暢先生に深謝いたします。技術的協力を賜りました白十字会引張病院、井手芳彦院長、金沢大学神経内科、水口一郎先生、石田千穂先生、吉田光宏先生に厚く御礼申し上げます。また、FK506の原末を御提供下さいました藤沢薬品工業に感謝いたします。本論文の要旨は第38回日本神経学会総会(東京、1997)にて発表した。

文 献

- 1) Davis GC, Williams AC, Markey SP, Ebert MH, Caine ED, Reichert CM, Kopin IJ. Chronic parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiatry Res* 1: 249-254, 1979
- 2) Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I. Chronic parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* 219: 979-980, 1983
- 3) Burns RS, Chiueh CC, Markey SP, Ebert MH, Jacobowitz DM, Kopin IJ. A primate model of parkinsonism: Selective

- destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by N-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 4546-4550, 1983
- 4) Forno LS, Langston JW, Delaney LE, Irwin I, Ricaurte GA. Locus ceruleus lesions and eosinophilic inclusions in MPTP-treated monkeys. *Ann Neurol* 20: 449-455, 1986
 - 5) Heikkila RE, Hess A, Duvoisin RC. Dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine in mice. *Science* 224: 1451-1453, 1984
 - 6) Hallman H, Lange J, Olson L, Strömberg I, Jonsson G. Neurochemical and histochemical characterization of neurotoxic effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine on brain catecholamine neurons in the mouse. *J Neurochem* 44: 117-127, 1985
 - 7) Willis GL, Donnan GA. Histochemical, biochemical and behavioural consequences of MPTP treatment in C-57 black mice. *Brain Res* 402: 269-274, 1987
 - 8) Sundström E, Strömberg I, Tsutsumi T, Olson L, Jonsson G. Studies on the effect of 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP) on central catecholamine neurons in C57BL/6 mice. Comparison with three other strains of mice. *Brain Res* 405: 26-38, 1987
 - 9) Ricaurte GA, Irwin I, Forno LS, DeLaney LE, Langston E, Langston JW. Aging and 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine-induced degeneration of dopaminergic neurons in the substantia nigra. *Brain Res* 403: 43-51, 1987
 - 10) Heikkila RE, Manzano L, Cabbat FS, Duvoisin RC. Protection against the dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 5, 6-tetrahydropyridine by monoamine oxidase inhibitors. *Nature* 311: 467-469, 1984
 - 11) Javitch JA, D' Amato RJ, Strittmatter SM, Snyder SH. Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: Uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by dopamine neurons explains selective toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 2173-2177, 1985
 - 12) Ramsay RR, Singer TP. Energy-dependent uptake of N-methyl-4-phenylpyridinium, the neurotoxic metabolite of 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine, by mitochondria. *J Biol Chem* 261: 7585-7587, 1986
 - 13) Mizuno Y, Sone N, Saitoh T. Effects of 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine and 1-methyl-4-phenylpyridinium ion on activities of the enzymes in the electron transport system in mouse brain. *J Neurochem* 48: 1787-1793, 1987
 - 14) Nicklas WJ, Youngster SK, Kindt MV, Heikkila RE. Molecular mechanisms of MPTP-induced toxicity. IV. MPTP, MPP⁺ and mitochondrial function. *Life Sci* 40: 721-729, 1987
 - 15) Carboni S, Melis F, Pani L, Hadjiconstantinou M, Rossetti ZL. The non-competitive NMDA-receptor antagonist MK-801 prevents the massive release of glutamate and aspartate from rat striatum induced by 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺). *Neurosci Lett* 117: 129-133, 1990
 - 16) Turski L, Bressler K, Rettig KJ, Löschnann PA, Wachtel H. Protection of substantia nigra from MPP⁺ neurotoxicity by N-methyl-D-aspartate antagonists. *Nature* 349: 414-418, 1991.
 - 17) Bierer BE, Mattila PS, Standaert RF, Herzenberg LA, Burakoff SJ, Crabtree G, Schreiber SL. Two distinct signal transmission pathways in T lymphocytes are inhibited by complexes formed between an immunophilin and either FK506 or rapamycin. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 9231-9235, 1990
 - 18) Starzl TE, Fung J, Jordan M, Shapiro R, Tzakis A, McCauley J, Johnston J, Iwaki Y, Jain A, Alessiani M, Todo S. Kidney transplantation under FK506. *JAMA* 264: 63-67, 1990
 - 19) Dawson TM, Steiner JP, Dawson VL, Dinerman JL, Uhl GR, Snyder SH. Immunosuppressant FK506 enhances phosphorylation of nitric oxide synthase and protects against glutamate neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 9808-9812, 1993
 - 20) Liu J, Farmer-Jr JD, Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 66: 807-815, 1991
 - 21) Steiner JP, Dawson TM, Fotuhi M, Glatt CE, Snowman AM, Cohen N, Snyder SH. High brain densities of the immunophilin FKBP colocalized with calcineurin. *Nature* 358: 584-587, 1992
 - 22) Dawson TM, Steiner JP, Lyons WE, Fotuhi M, Blue M, Snyder SH. The immunophilins, FK506 binding protein and cyclophilin, are discretely localized in the brain: Relationship to calcineurin. *Neuroscience* 62: 569-580, 1994
 - 23) Sharkey J, Butcher SP. Immunophilins mediate the neuroprotective effects of FK506 in focal cerebral ischemia. *Nature* 371, 336-339, 1994
 - 24) Kuroda S, Siesjö BK. Postischemic administration of FK506 reduces infarct volume following transient focal brain ischemia. *Neurosci Res Commun* 19: 83-90, 1996
 - 25) Ide T, Morikawa E, Kirino T. An immunosuppressant, FK506, protects hippocampal neurons from forebrain ischemia in the Mongolian gerbil. *Neurosci Lett* 204: 157-160, 1996
 - 26) Kitamura Y, Itano Y, Kubo T, Nomura Y. Suppressive effect of FK-506, a novel immunosuppressant, against MPTP-induced dopamine depletion in the striatum of young C57BL/6 mice. *J Neuroimmunol* 50: 221-224, 1994
 - 27) Hasegawa E, Takeshige K, Oishi T, Murai Y, Minakami S. 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) induces NADH-dependent superoxide formation and enhances NADH-dependent lipid peroxidation in bovine heart submitochondrial particles. *Biochem Biophys Res Commun* 170: 1049-1055, 1990
 - 28) Hazell AS, Itzhak Y, Liu H, Norenberg MD. 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP) decreases glutamate uptake in cultured astrocytes. *J Neurochem* 68: 2216-2219, 1997.
 - 29) Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 1620-1624, 1990
 - 30) Schulz JB, Matthews RT, Muqit MMK, Browne SE, Beal MF. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase by 7-nitroindazole protects against MPTP-induced neurotoxicity in mice. *J Neurochem* 64: 936-939, 1995
 - 31) Hantraye P, Brouillet E, Ferrante R, Palfi S, Dolan R,

- Matthews RT, Beal MF. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase prevents MPTP-induced parkinsonism in baboons. *Nature Med* 2: 1017-1021, 1996
- 32) Przedborski S, Jackson-Lewis V, Yokoyama R, Shibata T, Dawson VL, Dawson TM. Role of neuronal nitric oxide in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced dopaminergic neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 4565-4571, 1996
- 33) Przedborski S, Kostic V, Jackson-Lewis V, Naini AB, Simonetti S, Fahn S, Carlson E, Epstein CJ, Cadet JL. Transgenic mice with increased Cu/Zn-superoxide dismutase activity are resistant to N-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine-induced neurotoxicity. *J Neurosci* 12: 1658-1667, 1992
- 34) Bierer BE, Mattila PS, Standaert RF, Herzenberg LA, Burakoff SJ, Crabtree G, Schreiber SL. Two distinct signal transmission pathways in T lymphocytes are inhibited by complexes formed between an immunophilin and either FK506 or rapamycin. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 9231-9235, 1990
- 35) Dumont JF, Melino MR, Staruch MJ, Koprak SL, Fischer PA, Sigal NH. The immunosuppressive macrolides FK-506 and rapamycin act as reciprocal antagonists in murine T cells. *J Immunol* 144: 1418-1428, 1990.
- 36) Hagihara M, Fujishiro K, Takahashi A, Naoi M, Nagatsu T. Cyclosporin A, an immune suppressor, enhanced neurotoxicity of N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) to mice. *Neurochem Int* 15: 249-254, 1989.
- 37) Cameron AM, Steiner JP, Sabatini DM, Kaplin AI, Walensky LD, Snyder SH. Immunophilin FK506 binding protein associated with inositol 1, 4, 5-triphosphate receptor modulates calcium flux. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 1784-1788, 1995.
- 38) Steiner JP, Dawson TM, Fotuhi M, Snyder SH. Immunophilin regulation of neurotransmitter release. *Molecular Med* 2: 325-333, 1996.
- 39) Sihra TS, Nairn AC, Kloppenburg P, Lin Z, Pouzat C. A role for calcineurin (protein phosphatase-2B) in the regulation of glutamate release. *Biochem Biophys Res Commun* 212: 609-616, 1995.
- 40) Lieberman DN, Mody I. Regulation of NMDA channel function by endogenous Ca^{2+} -dependent phosphatase. *Nature* 369: 235-239, 1994.
- 41) Lyons WE, George EB, Dawson TM, Steiner JP, Snyder SH. Immunosuppressant FK506 promotes neurite outgrowth in cultures of PC12 cells and sensory ganglia. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 3191-3195, 1994
- 42) Gold BG, Katoh K, Storm-Dickerson T. The immunosuppressant FK506 increases the rate of axonal regeneration in rat sciatic nerve. *J Neurosci* 15: 7509-7516, 1995
- 43) Nishinaka Y, Sugiyama S, Yokota M, Saito H, Ozawa T. Protective effect of FK506 on ischemia/reperfusion-induced myocardial damage in canine heart. *J Cardiovasc Pharmacol* 21: 448-454, 1993
- 44) Wera S, Neyts J. Calcineurin as a possible new target for treatment of Parkinson's disease. *Med Hypotheses* 43: 132-134, 1994
- 45) Steiner JP, Connolly MA, Valentine HL, Hamilton GS, Dawson TM, Hester L, Snyder SH. Neurotrophic actions of nonimmunosuppressive analogues of immunosuppressive drugs FK506, rapamycin and cyclosporin A. *Nature Med* 3: 421-428, 1997
- 46) Steiner JP, Hamilton GS, Ross DT, Valentine HL, Guo H, Connolly MA, Liang S, Ramsey C, Li JH, Huang W, Howorth P, Soni R, Fuller M, Sauer H, Nowotnik AC, Suzdak PD. Neurotrophic immunophilin ligands stimulate structural and functional recovery in neurodegenerative animal models. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 2019-2024, 1997

Therapeutic Strategy by Tacrolimus in MPTP-induced Model of Mouse Parkinsonism Ken-ichi Sakajiri, Department of Neurology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 - J. Jusen Med Soc., **107**, 303-310 (1998)

Key words 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine, FK506, striatum, dopamine, mouse

Abstract

To help develop new therapeutic strategies for Parkinson's disease, we investigated the effect of tacrolimus (FK506) in protecting the nigrostriatal neurons of C57Black/6N mature mice against 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine(MPTP)-induced neurotoxicity. Mice in the group treated with FK506 (10 mg/kg i.p. given twice daily for 3 days) showed no significant changes in dopamine (DA), dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) and homovanillic acid levels in the striatum compared with the control group of untreated mice. For mice in the group treated with MPTP (20 mg/kg s.c. given daily for 2 days), at nine days after first treatment the DA level in the striatum was found to be reduced to 29.5 % that of the control group mice. Compared to this, mice in the group pretreated with FK506 (2.5 mg/kg i.p. given twice daily) showed significant reductions in MPTP-induced DA and DOPAC depletion in the striatum. However, for mice pretreated at higher dosages of FK506 (5 or 10mg/kg i.p. given twice daily), no such protective effect was observed. Based on these results, we propose that an optimal dose of FK506 protects the neurons of the substantia nigra from MPTP neurotoxicity in C57Black/6N mature mice. We feel that this protective effect derives from the suppressive effect of FK506 on calcineurin inhibiting the glutamate-induced neurotoxicity.