

<令和元年度助成>

プリン体による神経保護効果のメカニズムの解明

松村 暢子・木下 千智・青山 晃治
(帝京大学 医学部 薬理学講座)

研究概要

本研究は尿酸 (UA) とカフェイン (CA) などのプリン誘導体が持つ神経保護効果のメカニズムを解明することを目的とした。我々は、UA と CA に神経細胞へのシステイン (Cys) 取り込み促進作用があり、それにより合成される細胞内抗酸化物質のグルタチオン (GSH) が神経保護効果を引き起こすことを報告してきた。本研究では CA の主代謝物であるパラキサンチン (PX) に、Cys 取り込み促進作用と神経保護作用があることを見出し、CA や UA と同様に PX の作用にもアミノ酸トランスポーターの EAAC1 が関与することを明らかにした。現在はこれらのプリン代謝物に共通する作用点に焦点を当て、さらに神経保護効果の詳細なメカニズムの解明を進めている。プリン誘導体による Cys 取り込み促進作用は神経変性疾患の治療のための新たな標的として期待される。

1. 研究の背景

プリン体の最終代謝物である尿酸 (UA) は痛風関節炎だけでなく炎症促進物質として心臓や腎臓の機能を障害するという有害な側面に焦点が当てられてきた。しかし近年の疫学調査では、血中尿酸値が低いとアルツハイマー病や血管性認知症のリスクが上がり、血中尿酸値が高いとパーキンソン病発症リスクが下がることが示され、プリン代謝と UA の神経保護作用が注目されている。同様にプリン誘導体の 1 つであるカフェイン (CA) の摂取もアルツハイマー病やパーキンソン病発症リスクの低下と関連付

けられている。

細胞は抗酸化物質であるグルタチオン (GSH) を産生することにより細胞内外の酸化ストレスから細胞を守っている。神経細胞の GSH の産生にはアミノ酸トランスポーターの EAAC1 を介したシステイン (Cys) の取り込みが必須であり、神経生存に重要な役割を担うことが分かっている¹⁾。実際、プロトン磁気共鳴分光法を用いた臨床研究では、AD 患者の脳の GSH 量が減少していると報告されている。UA と CA の神経保護効果のメカニズムについてはこれまで UA が持つ抗酸化作用と CA が持つアデノシン受容体阻害作用の関与が報告されている。一方で我々は UA と CA がともに神経細胞において Cys の取り込みを促進することを見出し、細胞内の Cys の上昇が抗酸化物質の GSH を産生して神経細胞保護効果を示すことを報告してきた (図 1)²⁾。UA と CA の構造の共通性から CA の代謝物の中にも同じ神経保護メカニズムを持つものと予想され、新たな活性代謝物の発見は神経保護メカニズムの解明の重要な手がかりとなる。このような背景から、本研究では、プリン誘導体の UA と CA が持つ神経保護作用の共通のメカニズムとして、Cys 取り込み活性化に着目し、CA 代謝物の構造活性相関を調べるとともに、UA と CA の神経保護効果における共通のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

2. 研究方法

2-1 マウス海馬スライス培養を用いた Cys 取り込み活性の検出: C57BL/6J マウス (オス 4 週齢) から摘出した海馬を氷冷した人工脳脊髄液 (aCSF) 中

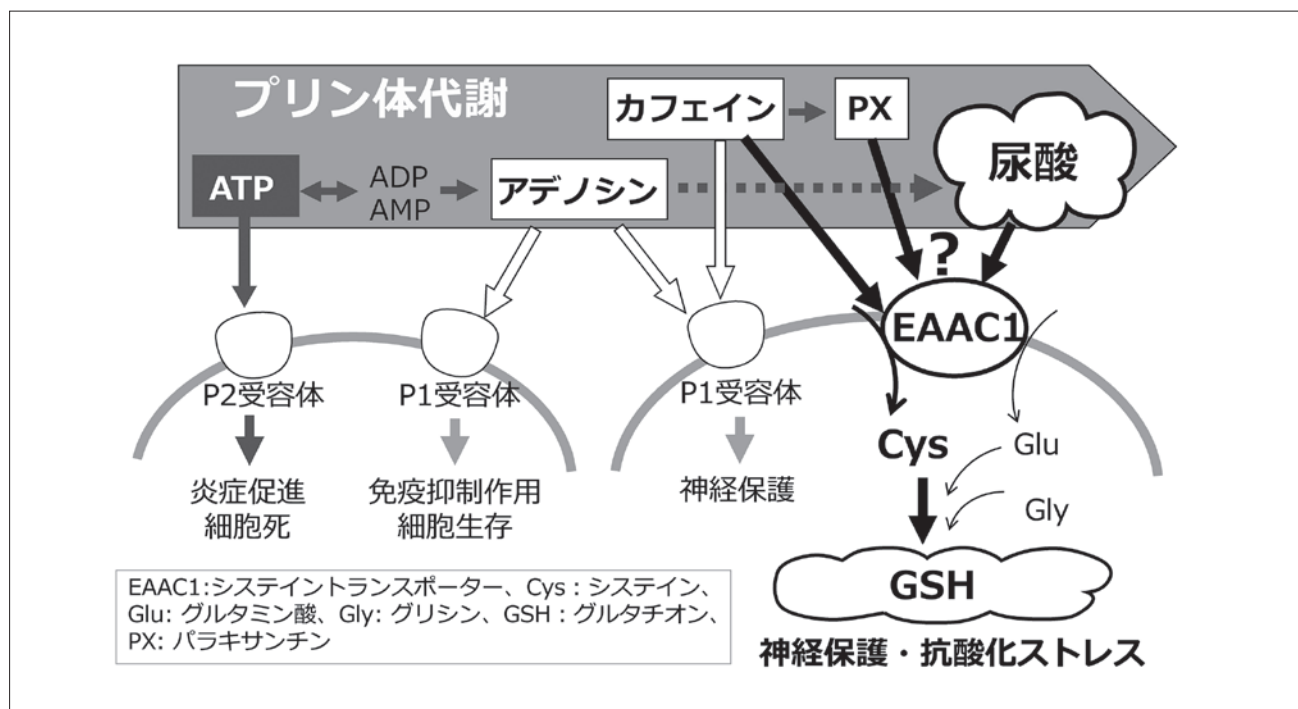


図1 プリン体代謝物の受容体・トランスポーター作用と細胞保護

で 300 μm 幅にスライスした。その後プリン誘導体 7 種、テオフィリン、PX (1,7- dimethylxanthine)、テオブロミン、1-methylxanthine (1-MX)、3-MX、7-MX、1,7-dimethyluric acid (1,7-MUA) それぞれ 0, 10, 100 μM を添加し、Cys 100 μM と還元剤を加えた aCSF 中に 30 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分間培養した。aCSF は常に 95 % O_2 /5 % CO_2 混合ガスでエアレーションし、薬物処理後の海馬スライスが氷冷した aCSF で洗浄後 0.1 M 過塩素酸中でホモジナイズし、遠心後の試料の Cys 量を測定した。

2-2 培養細胞を用いた Cys の取り込み活性の検出：HEK293 細胞を UA (0, 10, 100 μM) または PX (0, 10, 100 μM) を含有するシスチン不含培養液^{*1} 中で 30 分間前培養したのち、Cys (100 μM) を添加して 30 分間培養した。SH-SY5Y 細胞は阻害薬存在下で前培養したのち、UA (0, 10 μM) を添加し、30 分後に Cys (50 μM) を添加してさらに 30 分間培養した。それぞれの培養液を 0.1 M 過塩素酸処理し、細胞外液の Cys の減少を検出した (^{*1} アミノ酸不含 DMEM にシスチン以外のアミノ酸を補充したもの)。

2-3 細胞内 GSH の蛍光顕微鏡観察：薬物処理後の HEK293 細胞を 10 μM CMFDA 含有無血清培養液中で 30 分間培養し、細胞内 GSH を CMFDA 染色した。染色後の細胞を 4 % パラホルムアルデヒドで固定し、蛍光顕微鏡で写真撮影した。ImageJ ソフトウェアを用いて細胞領域当たりの平均蛍光強度を算出し細胞内 GSH 量とした。

2-4 HPLC による細胞内 Cys の定量：過塩素酸抽出した試料を中和し、ABD-F 試薬で Cys を蛍光標識した。試料 50 μl を Inertsil ODS-2 カラムに投入し、Cys 溶出ピークを励起光 380 nm、蛍光 510 nm で検出し定量した。分析には島津 Nexera X2 Ultra HPLC システムを用いた。

2-5 免疫細胞染色およびウエスタンブロッティング：免疫細胞染色では薬物処理後の HEK293 細胞を Nrf2 抗体を用いて染色し、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。薬物処理後の SH-SY5Y 細胞の xCT 総タンパク量は xCT 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより解析した。

2-6 細胞障害性および神経保護効果の検出：PX の細胞障害性および神経保護効果の評価は、SH-SY5Y 細胞を PX (0, 10, 100 μ M) で 1 時間前処理したのち、それぞれ無処理および 150 μ M H_2O_2 処理を加え、20 時間後の培養液中の乳酸脱水素酵素 (LDH) の活性を測定した。LDH 活性の測定には LDH Assay Kit-WST (Dojindo) を使用した。

3. 結果及び考察

3-1 プリン誘導体の Cys 取り込み促進作用における構造活性相関³⁾

UA と CA の構造の類似性に着目し、CA 代謝物の Cys 取り込み促進作用をマウス海馬スライス培養を用いて調べた。その結果 CA の主要な代謝物である PX に Cys 取り込み促進作用がみられた。(図 2) PX の代謝物である 1-MX には Cys 取り込みを促進する傾向がみられたが有意な変化ではなかった。もう一つの PX 代謝物でキサンチン構造が尿酸型に代謝された 1,7-MUA には活性はなかった。緑茶に含まれるテオフィリンやカカオに含まれるテオブロミン、その他のモノメチルキサンチンにも活性はな

かった。

これまで報告されたプリン誘導体の神経保護作用のメカニズムには、CA のアデノシン A_{2A} 受容体拮抗作用や、PX のリアノジン受容体活性化作用、UA 自身の抗酸化作用が挙げられる。しかし、 A_{2A} 受容体拮抗薬には Cys 取り込み促進作用はなく、テオフィリンは強力なアデノシン受容体阻害効果を持つが、図 2 の結果に示す通り Cys 取り込み促進作用はなかった。CA と PX のリアノジン受容体活性化には 800 ~ 1000 μ M を必要とし、Cys 取り込み促進作用が現れる 10 ~ 100 μ M を大きく超える。このように Cys 取り込み促進作用はアデノシン受容体阻害やリアノジン受容体活性化とは別の神経保護機構であると考えられた⁴⁾。

PX に Cys 取り込み促進活性があり、1-MX と 1,7-MUA がないことから、1 位と 7 位のメチル基だけでなく、キサンチン骨格も活性に必要ということになり、CA-PX と UA との間の造活性相関は連続的ではなかった。このことから CA と PX が持つ作用メカニズムに対し UA の作用メカニズムは同じでない可能性も視野に入れる必要があると分かった。これを踏まえて、CA と PX の作用と UA の作用を比較し

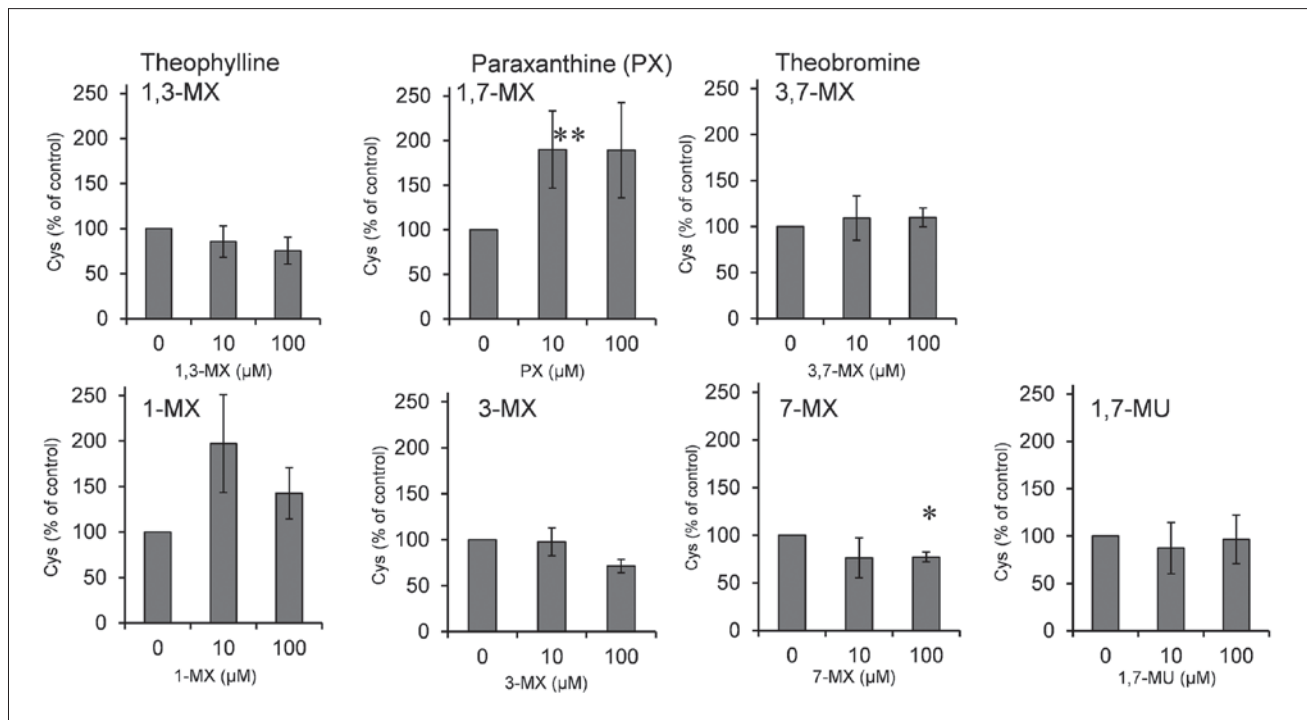


図2 マウス海馬スライス培養における CA 代謝物の Cys 取り込み促進作用
カフェイン代謝物のパラキサンチン (PX) 10 μ M においてシステイン取り込み促進作用がみられた。n=8/group、** P < 0.01

ながら、Cys 取り込み促進作用のメカニズムの調査することにした。

3-2 培養細胞における UA と PX の Cys 取り込み促進作用および GSH 産生促進作用

HEK293 細胞を用いて UA と PX による Cys 取り込み活性と GSH 産生を調べた。UA を添加すると細胞外 Cys の濃度は減少し (図 3a)、細胞外に Cys がある条件下で細胞内の GSH レベルが上昇した (図 3bc)。PX にも同じ作用が観察された (図 4abc)³⁾。このことから UA と PX は同じように HEK293 細胞において細胞外の Cys の取り込みを促進し、細胞内の GSH の産生を促進することが明らかになった。

3-3 PX の神経保護効果³⁾

CA と UA において既に明らかになっている神経保護効果が PX にもあることを明らかにした。PX 自身には細胞毒性はみられず (図 5a)、SH-SY5Y 細胞を H₂O₂ で 20 時間処理する神経細胞障害モデルにおいて、10 μ M PX の前処置は抑制効果を示した (図 5b)。このことから PX が Cys 取り込み促進作用を持つ濃度で神経保護効果を持つことが分かった。

3-4 UA と PX の Cys 取り込み促進機構への Cys トランスポーター EAAC1 の関与

Cys 取り込み促進作用が EAAC1 阻害薬の LA β HA により阻害されるかどうかを調べた。PX の Cys 取

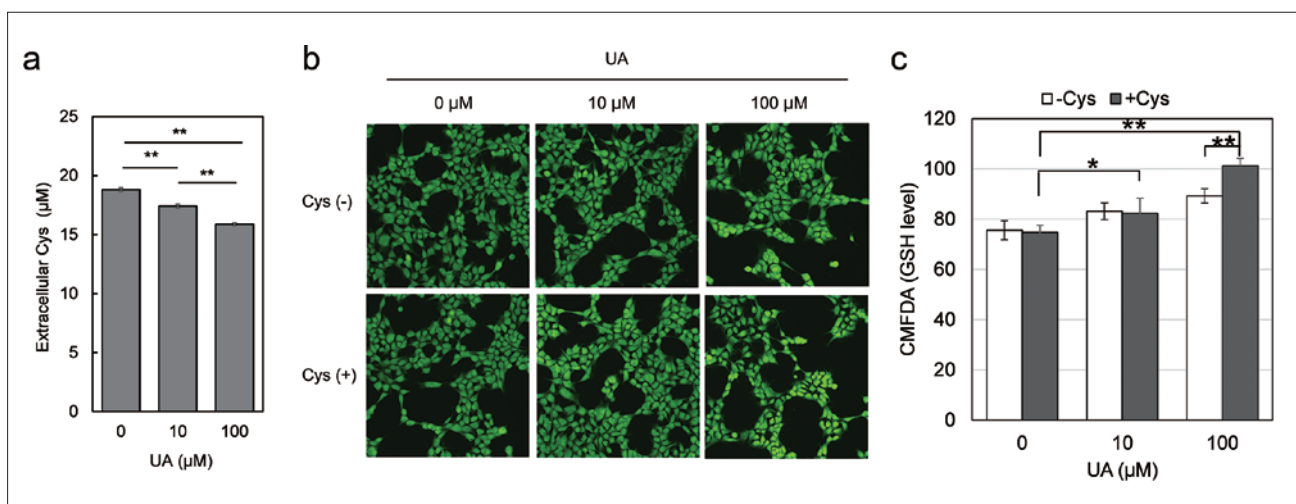


図3 HEK293 細胞における尿酸 (UA) による Cys 取り込み促進と GSH 産生促進作用

(a) HEK293 細胞を UA (0, 10, 100 μ M) で 30 分間前処理した後、Cys を加えて 30 分後の細胞外 Cys レベルを HPLC 法により検出した。
(b, c) 同条件による細胞内 GSH レベルを CMFDA 染色法により検出した。細胞外 Cys は UA 10 ~ 100 μ M 処理群で減少し、細胞内 GSH は Cys 存在下、UA 10 ~ 100 μ M 処理群で上昇した。

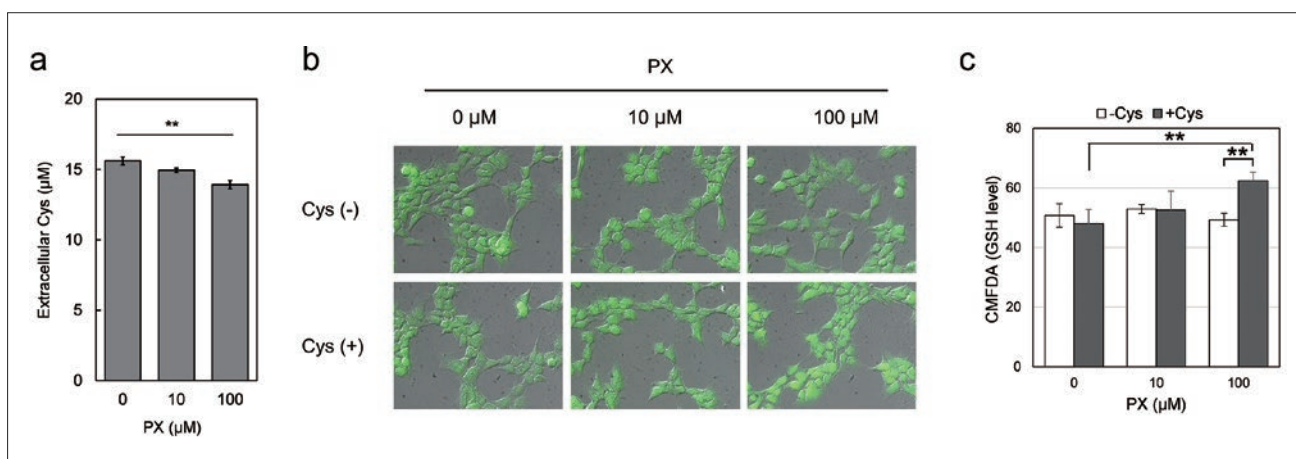


図4 HEK293 細胞における PX による Cys 取り込み促進と GSH 産生促進作用

(a) HEK293 細胞を PX (0, 10, 100 μ M) で 30 分間前処理した後、Cys を加えて 30 分後の細胞外 Cys レベルを HPLC 法により検出した。
(b, c) 同条件による細胞内 GSH レベルを CMFDA 染色法により検出した。細胞外 Cys は PX 100 μ M 処理群で減少し、細胞内 GSH は Cys 存在下、PX 100 μ M 処理群で上昇した。

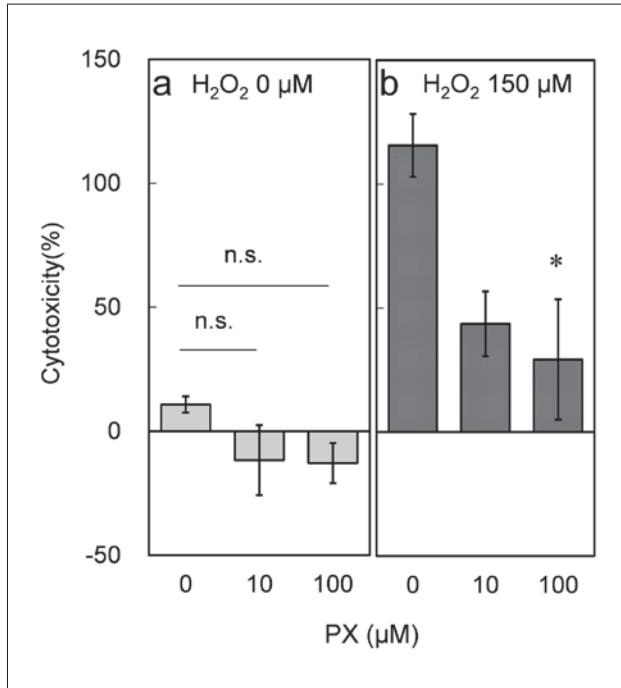


図5 PXによる神経保護効果

SH-SY5Y細胞をPX (0, 10, 100 μM) で30分前処理した後、細胞にH₂O₂を150 μM添加し、20時間後の細胞障害を調べた。(a) PX自身には細胞障害性はなかった。(b) PX 100 μMはH₂O₂の細胞障害性を抑制した。

り込み促進作用はLAβHAにより阻害され(図6a)³⁾、UAの作用も一部阻害された(図6b)。このことから、PXとUAによるCys取り込み促進作用は主にEAAC1

を介することが明らかとなった。一方、UAの作用にはEAAC1を介したものだけでなく、別のメカニズムも関与している可能性が考えられた。

3-5 UAとPXによるNrf2およびシスチントランスポーター(xCT)発現への影響

UAはアストロサイトで転写因子Nrf2の核移行を引き起こし、Nrf2はEAAC1とxCTの発現上昇に関与するという報告がある。そこでNrf2発現量の変化をCA、PXおよびUAで処理したHEK293細胞で比較したところ、CAでNrf2の増加がみられたが、PXとUAでは発現量の変化や核移行の増加はみられなかった(図7a)。このことからNrf2を介したシグナルはCA、PX、UAの共通の作用ではないことが分かった。一方、SH-SY5Y細胞におけるUAのCys取り込み促進作用はxCT阻害薬のErastinにより阻害されなかった(図7b)。UA処理後のxCTタンパク質発現量をウェスタンブロッティングで調べたが、総蛋白量に変化はなかった(図7c)。このことから、UAのCys取り込み促進作用にxCTの作用は関与しないことが分かった。

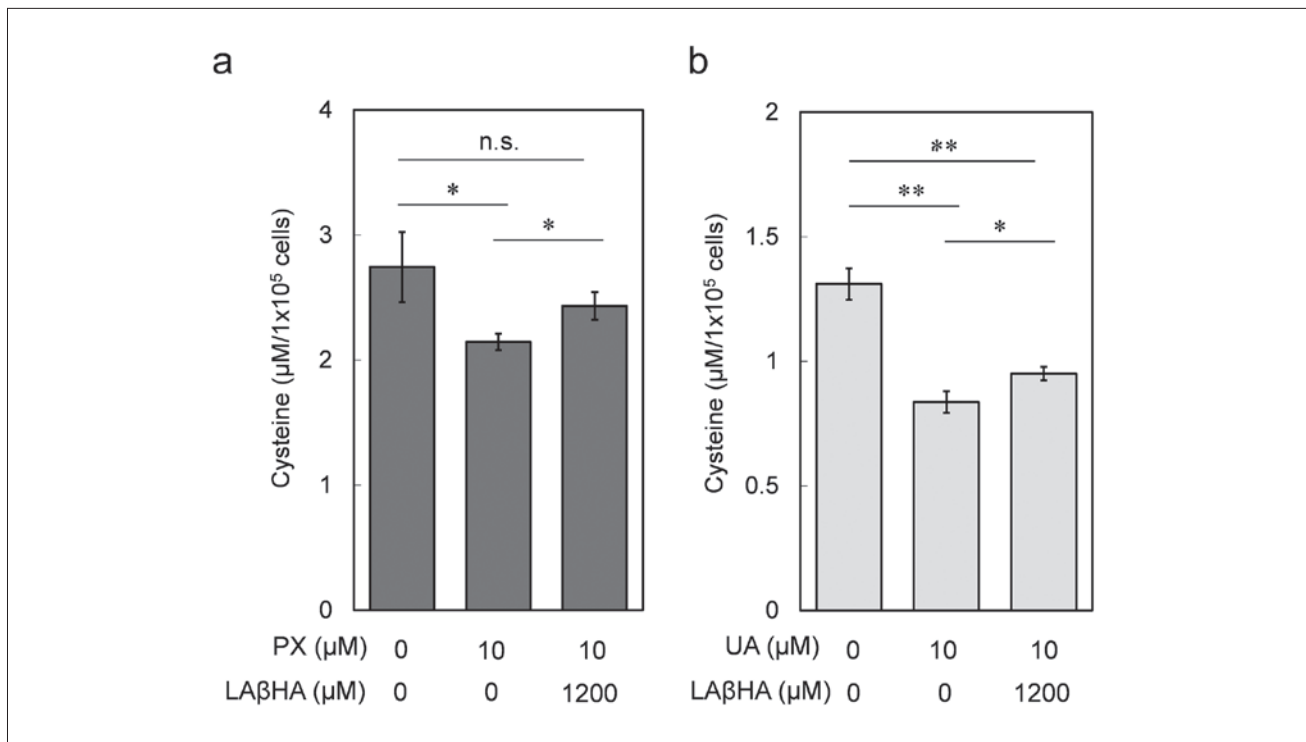


図6 PXとUAのCys取り込み促進作用へのEAAC1阻害薬(LAβHA)の影響

LAβHAで前処理したSH-SY5Y細胞にPXまたはUAを添加し30分培養し、その後Cys 50 μMを添加して30分皿に培養しCysの取り込みを測定した。(a) PX 10 μMによる細胞外Cysの減少促進はLAβHAにより阻害された。(b) UA 10 μMによる細胞外Cysの減少促進はLAβHAにより一部が阻害された。

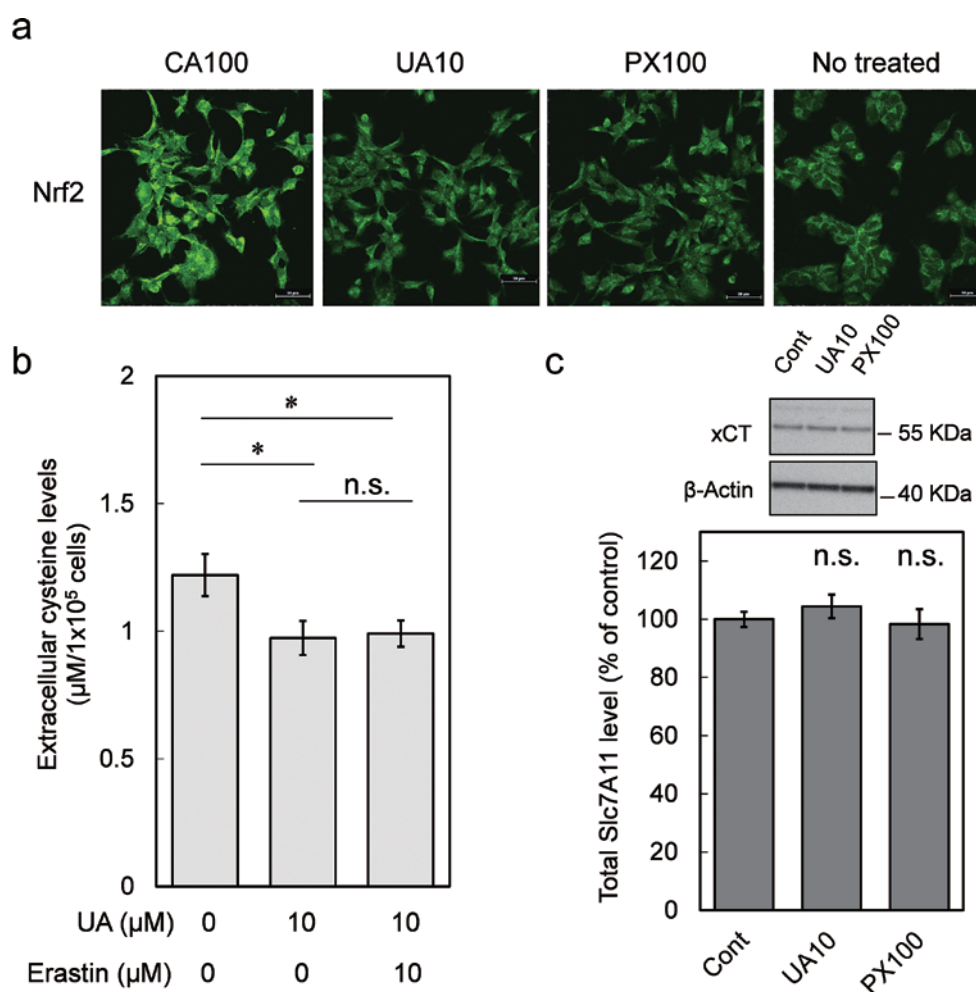


図7 CA、PXおよびUAのNrf2発現への影響とUAのCys取り込み促進作用へのシスチントランスポーターの関与
(a) HEK293細胞においてCAはNrf2発現を上昇したが、PXとUAは上昇しなかった。(b) SH-SY5Y細胞におけるUA 10 μM の細胞外Cysの減少促進作用はシスチントランスポーター阻害薬のErastinにより阻害されなかった。(c) UA 10 μM およびPX 100 μM 添加によるシスチントランスポーター(xCT)の発現量は変化しなかった。

4. まとめ

CAの主要な代謝物であるPXにEAAC1を介したCys取り込み促進作用があること、PXにはCAやUAと同じ神経保護効果があることを明らかにした。CAは転写因子Nrf2発現増加がCys取り込み促進作用に関与し得るが、PXおよびUAにはその関与はないと考えられた。また、PXとUAのCys取り込み促進作用にはシスチントランスポーターの関与はないことが分かった。今後はCys取り込みに関わるEAAC1の活性化メカニズムについてCA、PXおよびUAの作用を比較しながら網羅的に解析を進めて行く予定である。

本研究で探究するプリン誘導体によるCys取り込み促進作用のメカニズムは、アルツハイマー病やパーキンソン病などのGSHの減少を伴う様々な神経変性疾患の治療や予防のための新たな治療標的となることが期待される。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、多大なご支援を賜りました公益財団法人 浦上食品・食文化振興財団に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) 松村暢子、木下千智、青山晃治 日本薬理学雑誌
156(1) 26-30 2021 年 1 月
- 2) Aoyama K, Matsumura N, et al. *Neuroscience* 2011;
181: 206-215.
- 3) Matsumura N. et al. *J. Pharmacol. Sci.* 2023; 151:
37-45.
- 4) Matsumura N. and Aoyama K. *Int. J. Mol. Sci.* 2023;
24: 13067.

Neuroprotective effects and mechanisms of action of purine derivatives

Nobuko MATSUMURA, Chisato KINOSHITA, and Koji AOYAMA

Department of Pharmacology, Teikyo University School of Medicine

Purine derivatives such as caffeine (CA) and uric acid (UA) have an action of reducing the risk of several neurodegenerative diseases, including Alzheimer's disease and Parkinson's disease. Previously, we reported that CA and UA promote cysteine (Cys) uptake and enhance the formation of an antioxidant molecule, glutathione (GSH), in hippocampal slice cultures. Most neuronal Cys uptake for GSH synthesis is mediated through excitatory amino acid carrier 1 (EAAC1). However, it is still unclear how CA and UA promote Cys uptake. In this study, we found that paraxanthine (PX), a major metabolite of CA, also promotes Cys uptake in hippocampal slices. Therefore, we focused on PX in addition to CA and UA. Both PX and UA promote Cys uptake and increase GSH in HEK293 cells. The neuroprotective activity of PX was also observed in oxidative damage in SH-SY5Y cells. Both PX-induced and UA-induced Cys uptake activities are reduced by EAAC1 inhibitors. On the other hand, other possible regulators such as Nrf2, a transcription factor and xCT, a cystine transporter have little or no activity in promoting the Cys uptake induced by PX or UA. These results suggest that both PX and UA promote Cys uptake via EAAC1 and increase GSH production, leading to their neuroprotective activities. The promotion of Cys uptake based on these purine derivatives could be an attractive therapeutic target for use in the treatment of neurodegenerative diseases.