

## *In situ* 酵素組織化学法によるラット脳及び肝 Monoamine Oxidase 活性の検討

佐々木健郎\*, 伊東 宗一, 小瀧 豊司, 吉崎 文彦

### *In Situ* Quantitative Histochemical Analysis on Monoamine Oxidase Activity in Rat Brain and Liver

Kenroh SASAKI\*, So-ichi ITO, Toyoji KOTAKI, and Fumihiko YOSHIZAKI

(Received November 22, 2003)

*In situ* quantitative histochemical analysis on monoamine oxidase (MAO) activity in rat brain and liver was performed for its region specificity. Nitro blue tetrazolium was used for the formazan producing reductive reaction caused by enzymatic degradation product of tryptamine as MAO substrate. A linear relationship was observed between the integrated MAO activity and the absorbance analyzed by PC-associated image analysis. The MAO-A inhibitor, clorgylin, inhibited the MAO activity dose-dependently in brain region and liver tissue *in vitro* and *in situ* analyses with well correlation. These results suggested that this method could be useful for the quantitative analysis of MAO activity in tissue sections, especially in the rat locus coeruleus that plays an important role in noradrenergic neurons.

**Key words** — *in situ* histochemical analysis; monoamine oxidase; locus coeruleus; rat

モノミンオキシダーゼ (MAO) はミトコンドリア外膜に存在し, カテコールアミン類, セロトニン及び食餌由来のアミン類の代謝に関与するフラビン酵素である。<sup>1)</sup> MAO には MAO-A 及び MAO-B のサブタイプが存在し,<sup>2)</sup> 両サブタイプ共に脳のほとんどの部位に存在することが知られている。<sup>3)</sup> 両サブタイプの分類はその基質特異性あるいは選択的阻害剤に対する感受性及び遺伝子の塩基配列によってなされている。<sup>4)</sup> MAO-A はノルエピネフリンあるいはセロトニンの組織での濃度変化に関与し, 精神神経疾患において重要な機能を果しているが, MAO-B はパーキンソン病等に関与する。<sup>5)</sup> さらに, 通常 MAO はその代謝活性経路において, 過酸化水素 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) を産生する。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> は代表的なラジカル産生化合物であり, 脳あるいは生体における酸化ストレスにおいて神経細胞を始めとして様々な細胞に障害を起こし, その機能を低下させる。<sup>6)</sup> このことから生体内, 特に脳における MAO 活性の阻害は精神神経疾患及び酸化ストレスによる疾患の治療に有効であると考えられている。

しかし, 古典的な MAO 阻害薬は他の薬物あるいは食品含有成分と相互作用し, 細胞毒性,<sup>7)</sup> 異常高熱, 播腫性血管内凝固, 痙攣, 昏睡及び筋強剛等の有害反応を引き起こすこと<sup>8)</sup> から, 現在臨床に應用されている薬物は少ない。一方, 古くから漢方方剤を始めとする天然物及び天然由来薬物の中には抑うつ等の精神神経疾患の治療に適用され, 有効性が報告されているものも多い。それらの薬物にはこれまでとは異なる機序で阻害活性を発現する可能性のあることも推察されると共に, 新規 MAO 阻害化合物のシーズとしても興味深い。

MAO 阻害薬の有害反応の発現においては特に MAO の活性阻害により影響をうける神経系の特定が重要である。このことは MAO の基質となるノルエピネフリン, エピネフリン, セロトニン及びドーパミン神経系の脳内での経路がそれぞれ異なっていることも原因であると推察される。近年, 摂食障害トランスジェニックマウス (anorexia mutation mice)<sup>9)</sup> において脳幹部のモノアミン関連酵素及びタンパク質類である

MAO-A, セロトニントランスポーター (5HTT), ノルエピネフリントランスポーター (NET), チロシンヒドロキシラーゼ (TH) の mRNA の発現が部位により顕著に異なることが *in situ* hybridization 法により明らかにされた。<sup>10)</sup> 特に, MAO-A mRNA の発現がトランスジェニックマウスでは青班核 (locus coeruleus; LC) でのみ抑制されており, 縫線核 (raphe nuclei; RN) では正常マウスと変化がないこと等から, その部位特異性に言及することが重要になってきている。従って, MAO 阻害薬の開発においては, 従来の MAO 阻害活性の *in vitro* による測定あるいは *in vivo* での行動薬理学的手法に加え, 新しい実験手法の開発が望まれる。本報告では MAO 阻害薬である clorgyline のラット脳及び肝 MAO 活性に対する影響を, tryptamine の MAO による酸化生成物である indole-3-acetaldehyde の tetrazolium 塩還元作用<sup>10)</sup> を応用した *in situ* 組織化学法により検討した。

## 実験方法

1. **実験動物** 8週齢の Wistar 系雄性ラットを使用した。ラットは恒温恒湿 (25 ± 1 °C, 55 ± 5%) で明期 (7:00 ~ 19:00), 暗期 (19:00 ~ 7:00) の環境下, 固形飼料 (CE-2, 日本クレア) と水道水を自由に摂取させた。

2. ***In vitro* での MAO 阻害活性の測定**<sup>12)</sup> ラットを断頭後直ちに肝を摘出し, 1.15% KCl にて瀉血・還流を行い, 常法<sup>13)</sup> に従い 0.1M PBS (pH 7.4) にて肝ホモジネート 9000 × g 上清画分を得た。ホモジネートに clorgyline を添加し, 0.1M PBS buffer (pH7.4), 3.6mM sodium azide, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 7.5mM tyramine を含む 12mM HEPES buffer (pH7.4) 中で 37 °C, 20min インキュベーションした。その後 0.5M citrate buffer (pH 7.4), 2.0mM 2,2'-azinobis[3-ethylbenzthiazoline]sulfonic acid (ABTS) 及び 5U horseradish peroxidase にて発色させ, 1.0M HCl にて反応を停止した後 415nm における吸光度を測定した。

### 3. *In situ* MAO 酵素組織化学法

**脳及び肝組織切片の作製** ラットを断頭した後,

直ちに脳及び肝を摘出し, tissue object holder に tissue-Tek O.C.T Compound (Sakura Finetek USA Inc., Torrance, CA) にて固定し, 液体窒素で凍結固定後新鮮凍結組織を得た。凍結組織は -80 °C で保存した。新鮮凍結組織を cryostat microtome (MICROM HM505N, MICROM International GmbH, Walldorf, Germany) に 2h 以上静置 (-20 °C) した後に切片 (脳 16 μm, 肝 8 μm) を作製し, 3-amino-propyltriethoxy-silane (APS) コートされた micro slide glass (Matsunami Glass Ind., Ltd.) にマウントした。脳切片の作製は Paxinos and Watson の Atlas<sup>14)</sup> に従った。

***In situ* MAO 酵素組織化学法**<sup>11)</sup> -80 °C で保存した新鮮凍結切片を室温で 20min 乾燥後, 6.25mM tryptamine, 0.3mM nitro blue tetrazolium, 0.14mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1mM PBS (pH 7.6) を含む反応液に各濃度の clorgyline を添加して 37 °C, 30min インキュベーションした。組織切片を 0.1M PBS (pH 7.6) にて 2min, 2回洗浄した後, 0.5g/ml アラビアゴム液にて固定した。組織に沈着した青色色素 (formazan) はスキャナ (EPSON ES-2200) で PC (IBM NetVista) に取り込み, 画像解析ソフト (L Process V2.0 及び Image Gauge V4.0, FUJI PHOTOFILM Co, Ltd.) を用いて定量的に画像解析処理を行った。Tryptamine を基質とした formazan 生成の反応機構を Chart 1 に示す。定量的画像解析における検量線は, indole-3-acetaldehyde (31.77nM ~ 190nM) を基質として用い, 組織切片と同じ厚さのゼラチン (100mg/ml) 切片上で同様の反応を行い作製した。得られた検量線を Fig. 1 に示す。相関係数が 0.985 と良好な相関性を示したことから, Formazan (μM) = 1.43 × 10<sup>-5</sup> × Pixel + 0.00169 とした。

4. **統計処理** 実験は 3 回繰り返し, *in vitro* MAO 活性の測定においては, n = 36, *in situ* 酵素組織化学法においては n = 72 で測定値を得た。全ての値は平均値 ± 標準誤差で表示し, Thompson の棄却検定 ( $p < 0.01$ ), ANOVA ( $p < 0.05$ ) 及び Bonferroni 法 ( $p < 0.05$ ) により有意差を検討した。検量線作製時の回帰分析は

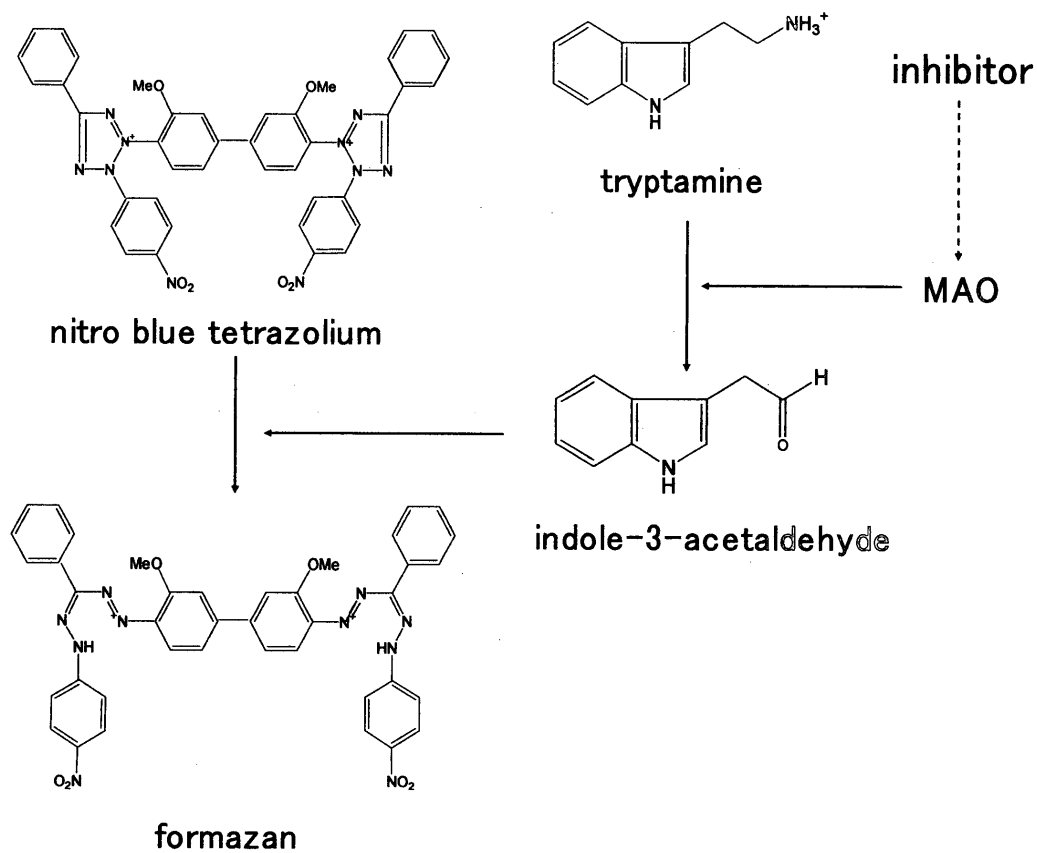


Chart 1. Determination of MAO Activity by Using Reduction of Nitro Blue Tetrazolium

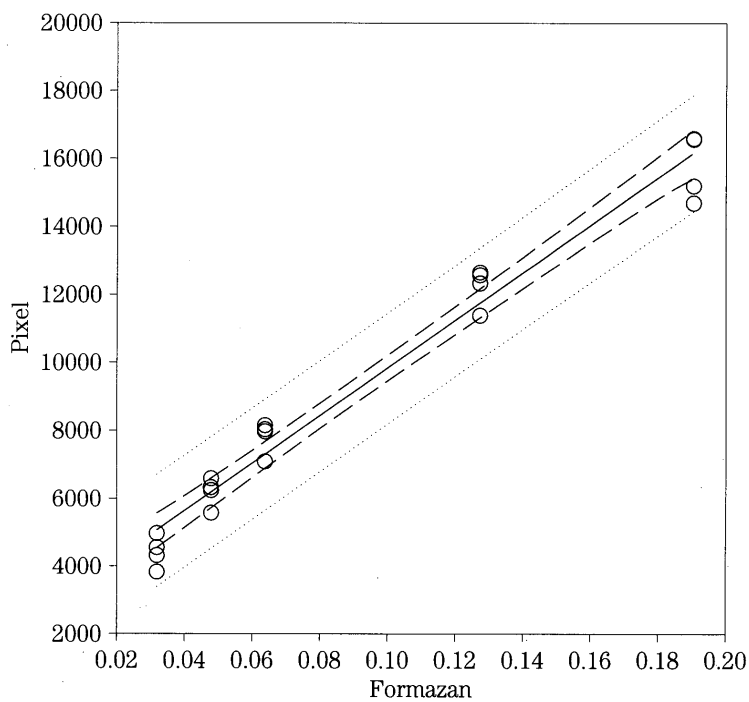


Fig. 1. Calibration Curve for Formazan by Quantitative Image Analysis

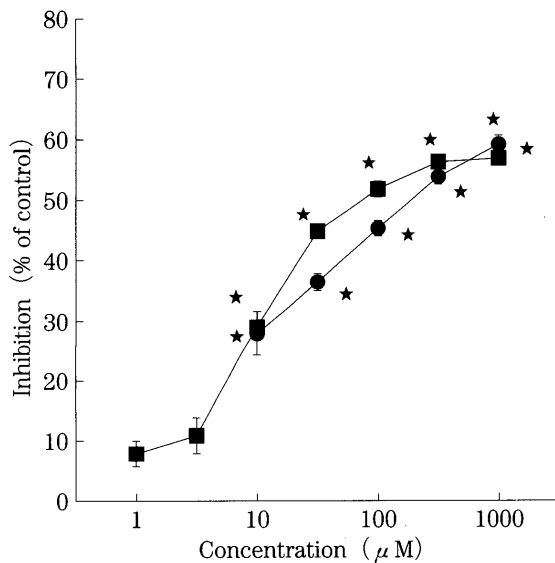


Fig. 2. *In Vitro* or *In Situ* Inhibition Assay of MAO Activity by Clorgyline in Rat Liver  
—●—, *in vitro*; —■—, *in situ*. The data represent the mean  $\pm$  S. E. ★, significantly different from control value,  $p < 0.05$ .

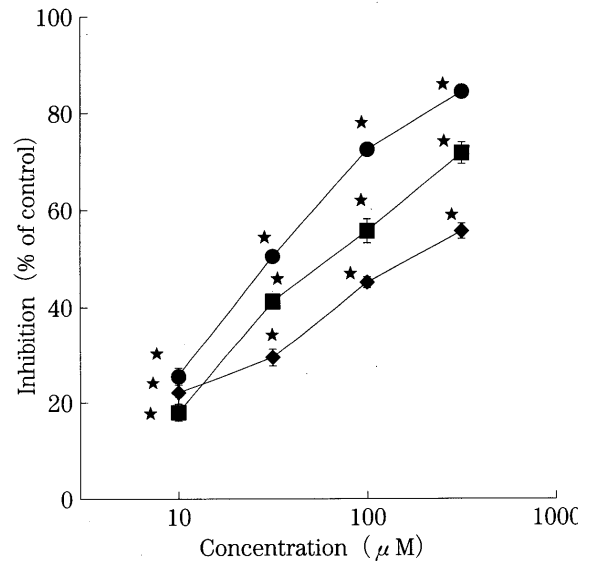


Fig. 3. Comparison of *In Situ* Inhibition Assay of MAO Activity by Clorgyline in Rat Brain Regions  
—●—, locus coeruleus; —■—, cerebellum; —◆—, pyramidal tract. The data represent the mean  $\pm$  S. E. ★, significantly different from control value,  $p < 0.05$ .

Simple Regression 法で, 肝ホモジネート及び肝組織切片における MAO 阻害活性の相関性の検討は Sperman Rank Order 法で行った。

## 結果及び考察

1. 肝ホモジネート及び肝組織切片の MAO 活性の阻害 clorgyline によるラット肝ホモジネート 9000  $\times$  g 上清画分の MAO 活性の阻害を測定したところ, 10  $\mu$ M で 28%, 1000  $\mu$ M で 60% と用量依存的に阻害された。 *In situ* 酵素組織化学法では 1.0  $\mu$ M で 7%, 1000  $\mu$ M で 56% の用量依存的な阻害活性を認めた。以上の結果を Fig. 2 に示す。 *In vitro* と *in situ* での MAO 阻害活性の間には, 相関係数が 0.901 と良好な相関性が認められた。

2. 脳組織切片における MAO 活性の阻害 *In situ* 酵素組織化学法により脳組織切片の MAO 活性の阻害を測定した結果を Fig. 3 に示す。1. の結果と同様に, clorgyline は 3.33 ~ 330  $\mu$ M において用量依存的に阻害した。しかし, その阻害は部位により異なっており, 青班核

Table 1.  $IC_{50}$  Value of *In Situ* MAO-inhibitory Activity by Clorgyline in Rat Brain Regions

	$IC_{50}$ ( $\mu$ M)
Locus coeruleus	35.03
Cerebellum	74.09
Pyramidal tract	189.09

(Locus coeruleus; LC) においては 3.33  $\mu$ M で 25%, 333  $\mu$ M で 84% であったが, 小脳 (cerebellum) 及び錐体路 (pyramidal tract; Py) においては 3.33  $\mu$ M でそれぞれ 17% と 21%, 333  $\mu$ M では 71% と 55% であった。各部位における MAO 活性阻害の  $IC_{50}$  値を Table 1 に示す。  $IC_{50}$  値は LC で 35.03  $\mu$ M, cerebellum で 74.09  $\mu$ M, Py で 189.09  $\mu$ M であり, LC において強い阻害を認めたが, Py での阻害は LC の約 1/5 であった。ほとんどの脳ノルエピネフリン神経系は LC を基核として投射しており, MAO-A の選択的阻害薬である clorgyline による阻害が LC において強く認められたことは興味深い。

脳 MAO は精神神経疾患において重要な機能

を果している<sup>5)</sup>が、遷移金属類の存在下で hydroxy radical (OH·) を産生する H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> をその代謝活性経路において産生する。Hydroxy radical は酸化ストレスにおいて極めて重要な活性酸素種 (reactive oxygen metabolites: ROMs) のひとつであり、タンパク質及び脂質の過酸化を引き起こし細胞に損傷を与える。<sup>15)</sup> ROMs の産生は主として細胞質における xanthin oxidase, ミクロソーム電子伝達系及びミトコンドリア電子伝達系で行われるが、ミトコンドリア電子伝達系は最も強力な ROMs の産生源である。<sup>16)</sup> 従って、ミトコンドリアは自ら産生した ROMs によって DNA の損傷を受け、これにはイントロンが存在しないことから非常に損傷を受けやすい。このことが動脈硬化等の加齢現象に関与するとも考えられており、<sup>17)</sup> アルツハイマー型痴呆症におけるミトコンドリア機能障害<sup>18)</sup> とあわせて興味深い。ヒト細胞では酸化ストレスが情報分子となり、AP-1, NF- $\kappa$ B 等の転写因子を活性化し、特定の遺伝子群の発現を誘導して ROMs の消去系や還元機構を作動させてレドックス制御を行っている。<sup>19)</sup> 天然物及び天然由来薬物は新規 MAO 阻害化合物のシーズとしても興味深く、すでに flavonoids,<sup>20)</sup> xanthones,<sup>21)</sup> coumarins,<sup>22,23)</sup> stilbenoids,<sup>24)</sup> chromones,<sup>25)</sup> alkaloids,<sup>26,27)</sup> 及び quinolones,<sup>28)</sup> が MAO 阻害活性を示すことが報告されている。また、漢方方剤の抗ストレス作用<sup>29)</sup> のメカニズムとして脳モノアミン神経系への影響が示唆されている<sup>30)</sup> が、その影響は方剤の MAO によるモノアミン類の代謝活性に対する影響に起因すると推察される。ここではラット脳及び肝の MAO 活性に対する影響を tryptamine の MAO による酸化生成物である indole-3-acetaldehyde の tetrazolium 塩還元作用<sup>11)</sup> を利用した *in situ* 組織化学法により検討し、脳におけるその部位特異的な阻害活性の評価に言及した。この手法により、MAO 阻害薬開発の新しい展開が期待できる。今後さらに、天然物からの MAO 阻害物質の検索のほか、漢方方剤の向精神作用等のメカニズムの解明にも応用してゆく予定である。

## REFERENCES

- 1) Tripton K. F., O'Carroll A. M., McCrodden J. M., *J. Neural Transm. Suppl.*, **25**, 25-35 (1987).
- 2) Bach A. W., Lan N. C., Johanson D. L., Abell C. W., Bembenek M. E., Kwan S. W., Seeburg P. H., Shih J. C., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 4934-4938 (1988).
- 3) Benedetti M. S., Dostert P., "Advances in Drug Research, Vol.23," ed. by Testa B., Academic Press, New York, 1992, pp.65-125.
- 4) Abell C. W., Kwan S. W., *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **65**, 129-156 (2001).
- 5) Gerlach M., Double K., Reichmann H., Riederer P., *J. Neural Transm. Suppl.*, **65**, 167-183 (2003).
- 6) Simonson S. G., Zhang J., Canada A. T. Jr., Su Y. F., Benveniste H., Piantadosi C. A., *J. Cereb. Blood Flow Methab.*, **13**, 125-134 (1993).
- 7) Kohda K., Noda Y., Aoyama S., Umeda M., Sumino T., Kaiya T., Maruyama W., Naoi M., *Chem. Res. Toxicol.*, **11**, 1249-1253 (1998).
- 8) Power B. M., Hackett L. P., Dusci L. J., Ilett K. F., *Clin. Pharmacokinet.*, **29**, 154-171 (1995).
- 9) Son J. H., Baker H., Park D. H., Joh T. H., *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **25**, 129-134 (1994).
- 10) Jang J. W., Houpt T. A., Joh T. H., Son J. H., *Develop. Brain Res.*, **107**, 241-246 (1998).
- 11) Frederiks W. M., Marx F., *Histochem. J.*, **17**, 707-715 (1985).
- 12) Szutowicz A., Kobes R. D., Orsulak P. J., *Anal. Biochem.*, **138**, 86-94 (1984).
- 13) Clark J. B., Nicklas W. J., *J. Biol. Chem.*, **245**, 4724-4731 (1970).
- 14) Paxinos G., Watson C., "The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, 4<sup>th</sup> edition," Academic Press, San Diego, 1998.
- 15) Sohal R. S., Weindrich R., *Science*, **273**, 59-63 (1996).
- 16) Raha S., Robinson B. H., *Trends Biochem. Sci.*, **10**, 502-508 (2000).
- 17) Lenaz G., *Biochim. Biophys. Acta*, **1366**, 53-67 (1998).

- 18) Castellani R., Hirai K., Aliev G., Drew K. L., Nunomura A., Cash A. D., Obrenovich M. E., Perry G., Smith M. A., *J. Neurosci. Res.*, **70**, 357-360 (2002).
- 19) Gius D., Botero A., Shah S., Curry H. A., *Toxicol. Lett.*, **106**, 93-106 (1999).
- 20) Sloley B. D., Urichuk L. J., Morley P., Durkin J., Shan J. J., Pang P. K. T., Coutts R. T., *J. Pharm. Pharmacol.*, **52**, 451-459 (2000).
- 21) Thull U., Kneubuler S., Testa B., Borges M. F. F. M., Pinto M. M. M., *Pharmaceutical Res.*, **10**, 1187-1190 (1993).
- 22) Gnerre C., Catto M., Leonetti F., Weber P., Carrupt P. A., Altomare C., Carotti A., Testa B., *J. Med. Chem.*, **43**, 4747-4758 (2000).
- 23) Yun B. S., Lee I. K., Ryoo I. J., Yoo I. D., *J. Nat. Prod.*, **64**, 1238-1240 (2001).
- 24) Zhou C. X., Kong L. D., Ye W. C., Cheng C. H. K., Tan. R. X., *Planta Medica*, **67**, 158-161 (2001).
- 25) Catagnoli K., Steyn S. J., Magnin G., Van Der Schyf C. J., Fourie I., Khalil A., Castagnoli N. Jr., *Neurotox. Res.*, **4**, 151-160 (2002).
- 26) Bembenek M. E., Abell C. W., Chrisey L. A., Rozwadowska M. D., Gessener W., Brossi A., *J. Med. Chem.*, **33**, 147-152 (1990).
- 27) Kong L. D., Cheng C. H. K., Tan R. X., *Planta Medica*, **67**, 74-76 (2001).
- 28) Lee M. K., Hwang B. Y., Lee S. A., Oh G. J., Choi W. H., Hong S. S., Lee K. S., Ro J. S., *Biol. Pharm. Bull.*, **51**, 409-411 (2003).
- 29) Sasaki K., Suzuki K., Yoshizaki F., Ando T., *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 563-565 (1995).
- 30) Sasaki K., Suzuki K., Ueno M., Takako K., Yoshizaki F., *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, **20**, 27-30 (1998).