

## 女性ホルモンとアルツハイマー型認知症

— アミロイド $\beta$ 負荷による神経細胞障害に対する $17\beta$ -エストラジオールの保護効果 —

山本 智美<sup>\*1</sup> 西田 昌司<sup>\*2</sup>

Female Hormones and Alzheimer's Disease

— The Protective Effect of  $17\beta$ -Estradiol Against Neural Cell Injuries Caused by the Exposure to Amyloid  $\beta$  —

YAMAMOTO Tomomi<sup>\*1</sup> NISHIDA Masashi<sup>\*2</sup>

---

\*1 神戸女学院大学大学院 人間科学研究科 人間科学専攻 博士前期課程

\*2 神戸女学院大学 人間科学部 環境・バイオサイエンス学科 教授

連絡先：西田昌司 〒662-8505 西宮市岡田山4-1 神戸女学院大学人間科学部環境・バイオサイエンス学科  
mnishida@mail.kobe-c.ac.jp

## 要 旨

加齢と共に発症する認知症は高齢化が進行する先進国に共通の社会問題となっており、中でもアルツハイマー型認知症患者の増加が問題視されている。アルツハイマー型認知症では大脳萎縮により認知機能が低下するが、その原因は老人斑として知られている大脳へのアミロイド $\beta$ の沈着による神経細胞脱落と考えられている。一方、アルツハイマー型認知症の発症には性差があることも知られている。閉経前の女性は男性より発症が少なく、閉経後に男性より多く発症することより、女性ホルモンが神経細胞を保護し、閉経によりエストロゲンが低下すると、神経細胞死を顕在化させると考えられる。本研究では、女性ホルモンのエストロゲンが神経保護効果を発揮するか否かを、培養神経細胞のアミロイド $\beta$ 負荷モデルを用いて検討した。

神経由来株細胞のPC-12にアミロイド $\beta$ 凝集体 ( $5\mu\text{M}$ ) を負荷すると、LDH アッセイで定量したネクロシス、及びTUNEL法で定量したアポトーシスともに増加し、アルツハイマー型認知症におけるアミロイド蛋白による神経細胞死を模擬することができた。アミロイド $\beta$ 負荷は小胞体特異的な蛍光色素を用いて測定した小胞体ストレスも増加させた。PC-12を $17\beta$ -エストラジオール ( $0\sim 1\mu\text{M}$ ) で前処理すると、アミロイド負荷による小胞体ストレスが減少し、同時にアポトーシスによる細胞死も減少した。

以上の結果より、女性ホルモンのエストロゲンは小胞体ストレスを軽減することにより細胞死を抑制し、神経保護効果を発揮することにより閉経前の女性におけるアルツハイマー型認知症発症を抑制している可能性が示唆される。

**キーワード：**アルツハイマー型認知症、アミロイド $\beta$ 、神経細胞、 $17\beta$ -エストラジオール、アポトーシス、小胞体ストレス

## Summary

Alzheimer's disease, which advances with aging, is a common social problem in developed countries experiencing a rapid increase in aged population. Amyloid  $\beta$  aggregates are specifically observed in cerebral cortex of Alzheimer's disease together with neuronal degeneration. Therefore, amyloid  $\beta$  is supposed to be the cause of cognitive disorders by inducing brain atrophy. Morbidity of Alzheimer's disease shows sex difference. Pre-menopause women have the low morbidity compared to age-matched men and the morbidity of post-menopause women surpass male counterparts, suggesting that female hormones protect neurons from degeneration. We investigated whether a female hormone, estrogen, evokes neuro-protective effects in cultured neuronal cells exposed to amyloid  $\beta$  to mimic Alzheimer's disease.

Rat neuronal cells (PC-12) were exposed to amyloid  $\beta$  aggregates ( $0\sim 5\mu\text{M}$ ) and two types of cell death, necrosis and apoptosis, were assessed by LDH assay and TUNEL method 24 hours after exposure, respectively. Amyloid  $\beta$  aggregates induced both necrosis and apoptosis dose-dependently. We also examined endoplasmic reticulum (ER) stress, which is augmented when cells process denatured proteins, with an ER specific fluorescent dye. Amyloid  $\beta$  aggregates also increased ER stress time-dependently compared to control cells without amyloid exposure. Pretreatment with  $17\beta$ -estradiol decreased ER stress of amyloid  $\beta$  treated cells, which coincided with the decrease in apoptosis of the cells.

These results suggest that amyloid  $\beta$  aggregates induce neural cell death by augmenting ER stress in the cells and a female hormone, estrogen, protects neurons from degeneration by reducing ER stress. Therefore, supplementation of estrogen may decrease the morbidity of Alzheimer's disease in post-menopause women.

**Keywords:** Alzheimer's disease, amyloid  $\beta$ , neuron,  $17\beta$ -estradiol, apoptosis, endoplasmic reticulum stress

# 1 背景

## 1.1 アルツハイマー型認知症

認知症は空間・時間の認識や判断、記憶、言語運用などの能力が低下する後天性の認知機能障害である。加齢とともに進行し、社会生活や日常生活にも支障をきたすことから、高齢化が進行する先進国が共通に抱える深刻な社会問題となっている<sup>1),2)</sup>。認知症には脳血管障害により発症する脳血管性認知症や、変異蛋白質であるレビー小体が脳に蓄積して発症するレビー小体型認知症があるが、中でもアルツハイマー型認知症は認知症の半数以上を占めている<sup>2)</sup>。

認知機能は脳によって担われるため、大脳病変と認知症の関連が検討されてきた。アルツハイマー型認知症の大脳では、肉眼的な所見として著しい脳委縮が認められ、顕微鏡的には老人斑と神経原線維変化の二つの特徴的な構造物が認められる。老人斑は神経細胞外の沈着物で神経細胞の変性を伴うことから、細胞間の情報伝達を阻害したり神経細胞死を惹起したりすることにより認知機能を低下させると考えられている。一方、神経原線維変化は細胞内に見られる変化で、神経細胞の構造蛋白の異常による神経細胞死を引き起こす<sup>2),3)</sup>。

アルツハイマー型認知症における認知症状の主な原因は、老人斑、神経原線維変化による神経細胞の著しい脱落にあると考えられているが、その病態は依然として明らかでなく、根本的な予防法と治療法は確立されていない<sup>2),3)</sup>。近年、老人斑を形成するアミロイド蛋白質の代謝と家族性アルツハイマー型認知症との関係が強く示されたこと<sup>4)</sup>、神経原線維変化は老人斑の形成に続発して引き起こされること<sup>4)</sup>から、孤発性アルツハイマー型認知症を含む全てのアルツハイマー型認知症の原因として、老人斑を形成するアミロイド $\beta$ の代謝異常が一義的に重要な役割を果たすと考えるアミロイド仮説<sup>4)</sup>が広く受け入れられるようになった。

## 1.2 アミロイド仮説

アミロイド $\beta$ の前駆体となる膜貫通型のアミロイド前駆蛋白質は、レセプター蛋白質として働いて細胞接着に関与することが分かってきた。加齢と共にアミロイド前駆蛋白質は蓄積するが、蛋白質分解酵素の $\beta$ セクレターゼと $\gamma$ セクレターゼが作用することによって断片化され、細胞外ドメインが細胞から切り離されてアミロイド $\beta$ となる<sup>5)</sup>。

アミロイド前駆蛋白質から切り出されたアミロイド $\beta$ は単量体であるが、細胞外で重合し、多量体を形成する。さらに凝集して不溶性のアミロイド線維を形成すると、大脳組織内に老人斑として沈着する<sup>3)</sup>。老人斑はアルツハイマー型認知症患者の脳に特異的に見られ、神経原線維化などの他の病理的变化に先行して出現する。また、アミロイド $\beta$ 凝集体は、実験モデルにおいて神経細胞障害を惹起することも明らかとなった。これらより、アミロイド $\beta$ の凝集と沈着、さらにそれによる神経細胞障害がアルツハイマー型認知症発症において重要な役割を果たすと考えるのが「アミロイド仮説」であり、多くの研究者に支持されている<sup>6),7)</sup>。

アミロイド $\beta$ が神経細胞障害を起こすメカニズムとしては、沈着したアミロイド線維が細胞

外からシナプス機能や神経細胞自体の障害を起こす機構と、アミロイドβが神経細胞に取り込まれ、神経細胞内に蓄積することによって細胞死を惹起する機構の二つが考えられる<sup>8),9)</sup>。特に後者では神経細胞はアミロイドβをエンドサイトーシスによって取り込み、分解することも明らかとなってきた。取り込まれた蛋白質は細胞内の小胞体系によって修復または分解されるが、アミロイドβは修復・分解することが困難なために小胞体に蓄積する。その結果生じた「小胞体ストレス」は、分子シャペロンを誘導することで蛋白質の合成や分解を促進し、ストレスに対処する。しかし、小胞体ストレスを引き起こす刺激が過剰な場合やストレスが長期間持続し回避できなかった場合には、アポトーシス経路を活性化して細胞死に至る<sup>10),11)</sup>。

### 1.3 アルツハイマー型認知症の性差

一方、アルツハイマー型認知症には性差があることも知られている<sup>4)</sup>。64歳までの若年者では有病率は0.5%以下と低いが<sup>12),13)</sup>、男性の方が女性よりも有病率が高い傾向にあるが<sup>8)</sup>、65歳以上では有病率が上昇するとともに女性の有病率が高くなり、75歳以上においては女性の有病率が男性よりも5%以上高い<sup>12),14)</sup>。このような65歳以後における女性のアルツハイマー型認知症の増加は、閉経に伴う女性ホルモンのエストロゲンの低下が<sup>8)</sup>、時間経過と共に様々な身体的変化となって現れてくる一環と考えられる<sup>15),16)</sup>。実際にアルツハイマー型認知症女性のエストロゲン量を測定すると、健常者と比較して低値であった<sup>18)</sup>。これらのことから女性ホルモンのエストロゲンとアルツハイマー型認知症発症には関連があることが推測できる。

エストロゲンは主として卵巣で産生・分泌される低分子の脂溶性ホルモンで、細胞膜を通過して細胞質受容体と結合し、核に移行して遺伝子の転写活性を亢進する。主な作用器官は女性生殖器官であり、子宮機能の制御や乳腺機能の維持を担うホルモンである<sup>16)</sup>。近年、非生殖系の体細胞でもエストロゲン受容体の存在が明らかになり、エストロゲンが心筋、肝臓、骨、血管、皮膚等で抗酸化作用、抗炎症作用、抗アポトーシス作用を発揮して保護ホルモンとして働くことが確認された。これより更年期以降の女性におけるエストロゲンの減少は、骨粗鬆症や心筋梗塞、高脂血症等を惹き起こすと推測されている<sup>16),17)</sup>。

神経系に関しても、エストロゲンによるアセチルコリン作動性ニューロンの活性化、樹状突起密度の増加によるシナプス形成の誘導、脳におけるグルコース利用の促進が実験的に確認されており、認知症における脳機能の低下にもエストロゲンが関与するという報告もみられる。さらにエストロゲンとアミロイドβ産生の関連や抗酸化作用による神経保護作用の可能性も示唆されている<sup>18)</sup>。以上のように、エストロゲンは神経細胞障害の抑制を介してアルツハイマー型認知症の性差の原因となっている可能性が考えられる。しかし、エストロゲン投与が閉経女性のアルツハイマー型認知症発症を抑制したとの報告はあるものの、大規模治験では確定的な結果が得られておらず、未だエビデンスに乏しい<sup>4),18)</sup>。

## 2 目的

アルツハイマー型認知症発症とエストロゲン減少との関連が明らかになれば、エストロゲン補充療法やイソフラボン等の植物エストロゲン摂取によって閉経女性の認知機能に関する Quality of Life を向上させるとともに、社会全体としても医療経済の改善が期待される。

本研究では、女性ホルモンが神経保護効果を発揮することによりアルツハイマー型認知症発症を抑制しているか否かを、培養神経細胞モデルを用いて検討する。そのため、1) 神経細胞のアミロイドβ負荷によるアルツハイマー型認知症モデルを作成し、2) 神経細胞障害の指標として細胞死（ネクロシス及びアポトーシス）を定量するとともに、3) そのメカニズムとしての小胞体ストレスの有無を測定し、さらに4) これらに対するエストロゲンの効果を検討した。

## 3 方法

### 3.1 アルツハイマー型認知症モデルの作成

アミロイドβ単量体 (AnyGen) を DMSO (SIGMA) に溶解し、さらに凝集体を作成するために4℃で24時間インキュベーションした。

神経細胞としては、ラット褐色腫由来細胞 PC-12 (理研 Cell Bank) を用い、アミロイドβ単量体、または凝集体を細胞培養培地 DMEM (SIGMA) で0~5μMに希釈して添加した。

### 3.2 ネクロシスの定量

ネクロシスの測定には LDH 法を用いた。細胞膜障害によるネクロシスで細胞が死ぬと、細胞内に存在する乳酸脱水素酵素 (LDH) が培養液中に遊出する。遊出した LDH の活性を乳酸からピルビン酸への酸化反応、NAD から NADH の還元反応、ニトロブルーテトラゾリウムからホルマザンへの酸化反応と共役させ、ホルマザン色素の生成量を定量することにより、ネクロシスによる細胞死を検討した。

PC-12を  $2 \times 10^6$ 個/mL で24穴プレートに播種し、24時間後にアミロイドβの単量体または凝集体 (0~5μM)、ポジティブコントロールとして、界面活性剤の Tween0.1%を添加した。アミロイドβ負荷の6時間後に上清を回収し、LDH 試薬 (極東製薬工業) を添加した後に45分反応させ、560nm の吸光度を測定してネクロシスを定量した。

### 3.3 アポトーシスの定量

アポトーシスの測定には TUNEL 法を用いた。アポトーシスによって細胞が死ぬと DNA が断片化し、分解産物の3'末端に OH 基が生成する。ターミナルトランスフェラーゼ (TdT) を用いて断片化 DNA の遊離3'-OH 末端に、蛍光色素のフルオレセイン-dUTP を特異的に結合させる。蛍光標識した細胞を蛍光顕微鏡 (EVOS® FL Auto : Thermo Scientific) で観察し、可視化した核を計測することにより、アポトーシスによる細胞死を検討する。

PC-12を  $2 \times 10^6$ 個/mL で24穴プレートに播種し、24時間後にアミロイドβの単量体または

凝集体 (0~5  $\mu$ M) を添加した。アミロイド  $\beta$  負荷24時間に、In situ Apoptosis Detection Kit (TaKaRa) を用いてアポトーシス細胞の断片化した DNA の 3'-OH 末端を標識し、蛍光顕微鏡で観察した可視化した核を計数してアポトーシス細胞数を定量した。

### 3.4 小胞体ストレスの定量

小胞体ストレスの測定には蛍光色素である Organelle-ID RGB Reagent III Solutions (ENZO) を用いた。Organelle-ID RGB Reagent III Solutions は核を青色、小胞体を赤色、ゴルジ体を緑色に染色する。

PC-12を $2 \times 10^6$ 個/mLで35mm 培養 dish および96穴プレートに播種し、24時間後にアミロイド  $\beta$  の単量体または凝集体 (5  $\mu$ M) を添加した。アミロイド  $\beta$  負荷0~48時間で蛍光色素を添加し、蛍光顕微鏡 (EVOS FL Auto : Thermo Scientific) を用いて小胞体染色を確認すると共に、蛍光プレートリーダー (Fluoroskan Ascent FL : Thermo Scientific) を用いて励起波長518 nm、蛍光波長620 nm で小胞体の蛍光強度を測定し、小胞体ストレスを定量した。

### 3.5 エストロゲンの添加

17 $\beta$ -エストラジオール (SIGMA) を DMSO (SIGMA) を用いて溶解した後、DMEM (SIGMA) を用いて0~1  $\mu$ M に希釈して培養細胞に添加し、24時間培養することで前処理して細胞障害に対するエストロゲンの効果を検討した。

## 4 結果

### 4.1 アミロイド $\beta$ による神経細胞のネクローシスとエストロゲンの影響

アミロイド  $\beta$  が神経細胞のネクローシスを惹起するか否かを検討するため、PC-12を $2 \times 10^6$ 個/mLで播種し、24時間後にアミロイド  $\beta$  の単量体または凝集体を添加した。6時間後に上清を回収してLDH活性を定量すると、ポジティブコントロールの Tween はPC-12細胞のネクローシスを生じたが、アミロイド  $\beta$  単量体は0~5  $\mu$ M の範囲ではネクローシスを生じなかった (図1a)。一方、アミロイド  $\beta$  凝集体は、濃度依存的にネクローシスを惹起し、5  $\mu$ M では全細胞の67%がネクローシスにより細胞死した ( $p < 0.05$ ) (図1b)。

アミロイド  $\beta$  凝集体によるPC-12のネクローシスをエストロゲンが抑制するか否かを検討するため、17 $\beta$ -エストラジオール (0~1  $\mu$ M) で24時間前処理した後、上記と同様の方法でアミロイド  $\beta$  凝集体5  $\mu$ M を負荷し、ネクローシスを測定した。その結果、17 $\beta$ -エストラジオールは濃度依存的に細胞膜断裂による細胞死を減少させる傾向にあったが、有意ではなかった (図2)。

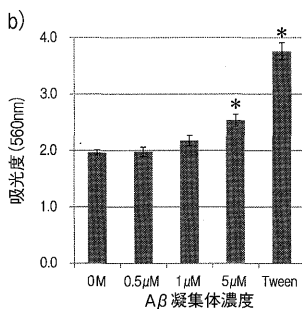
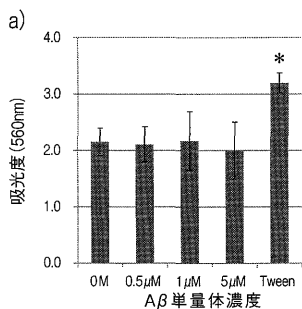


図1 PC-12のネクローシスに及ぼすアミロイドβの影響

a) 単量体の影響 b) 凝集体の影響

\* :  $p < 0.05$  vs 0M

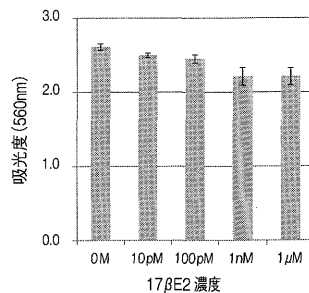


図2 PC-12のネクローシスに及ぼす17β-エストラジオールの影響

## 4.2 アミロイドβによる神経細胞のアポトーシスとエストロゲンの効果

アミロイドβが神経細胞のアポトーシスを惹起するか否かを検討するために、PC-12を $2 \times 10^6$ 個/mLで播種し、24時間後にアミロイドβの単量体または凝集体を添加した。負荷24時間でTdTを用いてアポトーシスを起こしている細胞数を測定すると、アミロイドβ単量体は、0~5μMの範囲ではアポトーシスを生じなかった(図3a)。一方、アミロイドβ凝集体は濃度依存的にアポトーシスを惹起し、アミロイドβを添加しない細胞と比べて5μMでは、死細胞数が10%から17%へと有意に増加した(図3b)。

アミロイドβ凝集体によるPC-12のアポトーシスをエストロゲンが抑制するか否かを検討するため、17β-エストラジオール(0~1μM)で24時間前処理した後、上記と同様の方法でアミロイドβ凝集体5μMを負荷し、アポトーシスを測定した。その結果、17β-エストラジオールは濃度依存的にアポトーシスを減少させ、1μMではエストラジオールを添加しない群と比較して有意な細胞死の抑制を示した(図4)。

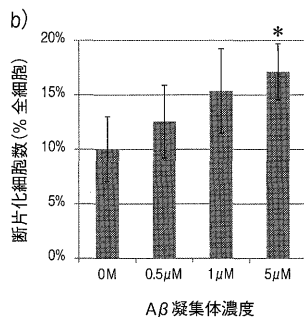
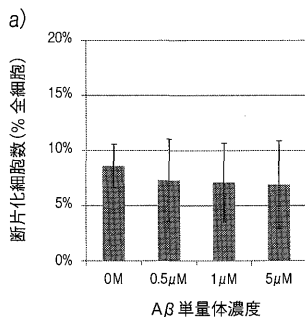


図3 PC-12のアポトーシスに及ぼすアミロイドβの影響

a) 単量体の影響 b) 凝集体の影響

\* :  $p < 0.05$  vs 0M

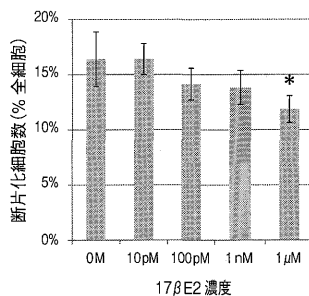


図4 PC-12のアポトーシスに及ぼす17β-エストラジオールの影響

\* :  $p < 0.05$  vs 0M

### 4.3 小胞体ストレスの検討

アミロイドβ負荷が神経細胞の小胞体ストレスを惹起するか否かを検討するため、PC-12を $2 \times 10^6$ 個/mLで播種し、24時間後に5μMのアミロイドβ単量体または凝集体を添加した。負荷0～48時間で蛍光染色を行い、小胞体ストレスを測定した。

蛍光顕微鏡で小胞体染色を観察すると、アミロイドβ単量体及び凝集体を48時間負荷した細胞は何も添加していないネガティブコントロールの細胞と比較して、小胞体を示す染色強度が増加した(図5)。さらに蛍光プレートリーダーで蛍光強度を定量すると、ネガティブコントロール群では小胞体ストレスの増加を認めなかったが、アミロイドβ単量体及び凝集体添加群では時間依存的に小胞体ストレスが増加し、凝集体では48時間目にネガティブコントロールと比較して有意な増加を認めた(図6)。

アミロイドβ凝集体による小胞体ストレスの増加をエストロゲンが抑制するか否かを検討するため、17β-エストラジオールで24時間前処理した後、上記と同様の方法でアミロイドβ凝集体5μMを負荷し、小胞体ストレスを測定した。その結果、17β-エストラジオールはアミロイドβ負荷48時間目に濃度依存的に小胞体ストレスを減少させ、100pM以上では有意な細胞死抑制を示した(図7)。

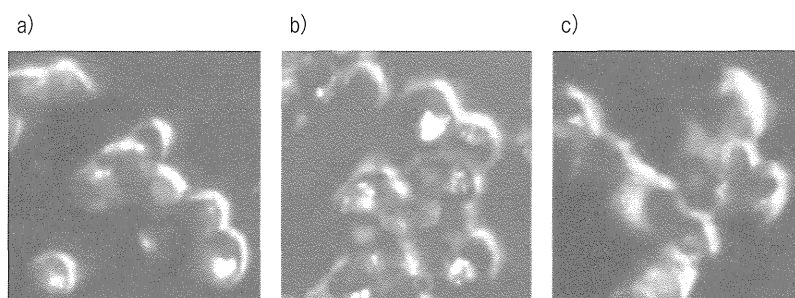


図5 PC-12の小胞体ストレスに及ぼすアミロイドβの影響

a) ネガティブコントロール b) 単量体の影響 c) 凝集体の影響

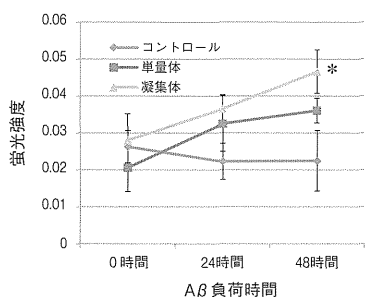


図6 PC-12の小胞体ストレスに及ぼすアミロイドβの影響

\* :  $p < 0.05$  vs 0M

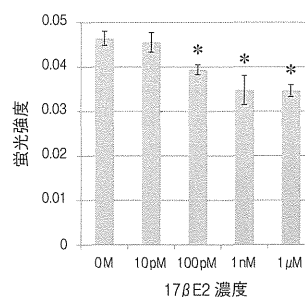


図7 PC-12の小胞体ストレスに及ぼす17β-エストラジオールの影響

\* :  $p < 0.05$  vs 0M



## 5 考察

### 5.1 アルツハイマー型認知症モデルの作成

従来、アルツハイマー型認知症の動物実験モデルとしては、正常なマウスやラットに人為的に脳損傷を誘発するモデルと、遺伝子改変処置を施したモデルが使用されてきた。前者はアルツハイマー型認知症で脳内病変が顕著な領域に神経毒等を注入し、病態を人工的に作り出したモデルである。後者は家族性アルツハイマー型認知症の原因とされる遺伝子変異に基づくモデルが代表的であり、遺伝子改変によりアルツハイマー型認知症に特徴的なアミロイド $\beta$ 凝集による老人斑等の脳内変化が再現できる<sup>19)</sup>。一方細胞を用いたモデルとしては、アミロイド仮説に基づき、アミロイド $\beta$ を神経細胞に曝露することでアルツハイマー型認知症細胞モデルが作成されている<sup>20),21),22),23)</sup>。また、アルツハイマー型認知症脳においては脂質、蛋白、核酸の酸化障害が認められることから、酸化障害を与えることも多い<sup>24)</sup>。

アミロイド $\beta$ 負荷モデルにおいては、細胞障害の指標としてMTT試験による細胞生存率の測定や、LDH法を用いたネクロシスによる細胞死の検出、TUNEL法を用いたアポトーシスによる細胞死の検出が行われてきた。アミロイド $\beta$ を負荷した神経細胞では、細胞生存率が低下し、ネクロシスおよびアポトーシスによる細胞死が共に増加することが報告されている<sup>20),21),22),23)</sup>。

これらの *in vitro* での研究において、アミロイド $\beta$ は0.1~100  $\mu\text{M}$  の範囲で実験に用いられ、本実験で細胞障害に用いた0.5~5  $\mu\text{M}$  の濃度は妥当な範囲である<sup>20),21),22),23)</sup>。また、この範囲内のアミロイド $\beta$ 負荷により、PC-12のネクロシスとアポトーシスによる細胞死が生じたこと、特に単量体ではなくアミロイド $\beta$ 凝集体が神経細胞の障害を惹起したことから、アルツハイマー型認知症の細胞モデルが作成出来たと考えられる。

### 5.2 アミロイド $\beta$ の障害機構

アミロイド仮説では、細胞外に産生されたアミロイド $\beta$ が神経細胞を障害すると考えられている。神経細胞障害のメカニズムとしては、細胞外に沈着したアミロイド線維が神経細胞自体の障害を起こす機構と、アミロイド $\beta$ が神経細胞に取り込まれ、神経細胞内に蓄積することによって細胞死を惹起する機構の二つが考えられる<sup>8),10),11)</sup>。細胞外での障害のメカニズムには、アミロイド線維が神経細胞間のシナプスを直接障害し、神経情報伝達を途絶することで神経細胞が障害されるとするものと、アミロイド $\beta$ が処理される過程で産生される反応性の高い酸素ラジカルが神経細胞を障害し、ネクロシスによる細胞死を惹起するものがある<sup>8),24)</sup>。

後者の細胞内でのアミロイド $\beta$ による障害のメカニズムには、上述のアミロイド $\beta$ が処理される過程で生成する酸素ラジカルのほかに、細胞内に蓄積したアミロイド $\beta$ が惹起する小胞体ストレスが関与する可能性もある。エンドサイトーシスによって神経細胞に取り込まれたアミロイド $\beta$ は、修復・分解されるために細胞内の小胞体に輸送されるが、アミロイド $\beta$ は修復・分解することが困難なために「小胞体ストレス」が生じる。小胞体ストレスが生じると、細胞内のストレスセンサーが働き、構造異常蛋白質の折り畳みを促進するシャペロン蛋白質を誘導

することで異常蛋白質を処理してストレスを回避する。しかし、過剰な変性蛋白質負荷によって小胞体ストレスを回避できなかった場合には、アポトーシス経路を活性化して核の断片化や凝集を引き起こし、神経細胞は死に至る<sup>10),11)</sup>。

本実験では、培養神経細胞にアミロイド $\beta$ を添加すると、神経細胞はネクローシスおよびアポトーシスによる細胞死を誘発し、さらに小胞体ストレスを増加させた。このことはアミロイド $\beta$ が酸素ラジカルを生じることにより細胞外、細胞内から神経細胞を障害したことを示すとともに、過剰な小胞体ストレスによってアポトーシス経路が活性化された可能性を示唆している。

### 5.3 アミロイド $\beta$ に対するエストロゲンの保護作用

女性ホルモンであるエストロゲンは主に女性生殖機能の制御を行うホルモンであるが、非生殖器にもエストロゲン受容体が存在し、抗酸化作用、抗炎症作用、抗アポトーシス作用を発揮して保護ホルモンとして働くことが明らかとなってきた。神経系に対してはニューロンの活性化や、シナプス形成の誘導、グルコース利用の促進が確認されている<sup>17),18)</sup>。

本実験において、 $17\beta$ -エストラジオールはアミロイド $\beta$ 負荷による細胞死と小胞体ストレスを抑制した。アミロイド $\beta$ が酸素ラジカルの生成に関与しており、酸素ラジカルによって細胞死が誘発されたとすれば、 $17\beta$ -エストラジオールはその抗酸化性によって細胞死を減少させたことが考えられる。また、アミロイド $\beta$ 負荷によって神経細胞は小胞体ストレスを生じたが、 $17\beta$ -エストラジオールが過剰な小胞体ストレスを抑制したことより、小胞体ストレスの制御によって、 $17\beta$ -エストラジオールが細胞死を抑制した可能性も考えられる。癌細胞において、 $17\beta$ -エストラジオールは小胞体ストレス応答を亢進することで細胞死を阻害するという報告がある<sup>25)</sup>。小胞体ストレス応答とは、小胞体ストレスが生じた時にストレスセンサーがそれを感知して、変異蛋白質の折り畳み直しを助けるシャペロン蛋白質を増加させる反応のことである。このことから、神経細胞においても、 $17\beta$ -エストラジオールは小胞体ストレス応答を促進させ、シャペロン蛋白質を増加させることでアミロイド $\beta$ による過剰な小胞体ストレスを回避し、細胞死を抑制する可能性が示唆される。

以上のように、本研究で用いたアルツハイマー型認知症モデルにおいて、女性ホルモンである $17\beta$ -エストラジオールは小胞体ストレスの結果として生じるストレス応答を活性化することで、過剰な小胞体ストレスとそれに続発する細胞死経路の活性化を抑制したと考えられる。従って、 $17\beta$ -エストラジオールは神経保護効果を発揮することにより閉経前の女性におけるアルツハイマー型認知症発症を抑制しており、閉経後の女性におけるアルツハイマー型認知症発症の増加には $17\beta$ -エストラジオールが関与している可能性が示された。

本研究の一部は、2016年度神戸女学院大学研究助成、総合研究助成の交付を受けて行われた。

## 参考文献

- 1) Eric R. Kandel, James H. Schwartz, Steven A. Siegelbaum, Thomas M. Jessell, A. J. Hudspeth (監修), 金澤一郎, 宮下保司 (翻訳). (2014). カンデル神経科学, 5ed. メディカル・サイエンス・インターナショナル. 5-304.
- 2) Eric R. Kandel, James H. Schwartz, Steven A. Siegelbaum, Thomas M. Jessell, A. J. Hudspeth (監修), 金澤一郎, 宮下保司 (翻訳). (2014). カンデル神経科学, 5ed. メディカル・サイエンス・インターナショナル. 1302-1320.
- 3) Vinay Kumar MBBS MD FRCPath, Abul K. Abbas MBBS, Jon C. Aster MD PhD (2014). Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease, 9ed. ELSEVIER SAUNDERS. 811-849.
- 4) Jay Ingram (著), 桐谷知未 (翻訳). (2015). 記憶が消えるとき—老いとアルツハイマー病の過去、現在、未来—, 図書刊行会. 223-258.
- 5) Turner PR, O'Connor K, Tate WP, Abraham WC. (2003). Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Progress in Neurobiology*, 70(1), 1-32.
- 6) 矢崎正英, 池田修一. (2014). アミロイドとは. *BRAIN and NERVE*. 66(7), 723-730.
- 7) 富田泰輔, 岩坪威. (2001). アルツハイマー病—アミロイド $\beta$ ペプチドの産生機構から治療戦略まで. *細胞工学*, 20(11), 1489-1494.
- 8) 長谷川一浩, 山口格, 内木宏延. (2001). アミロイド繊維形成の分子機構と細胞毒性. *細胞工学*, 20(11), 1495-1501.
- 9) 東海林幹夫. (2014). 脳アミロイドーシスとしてのアルツハイマー病. *BRAIN and NERVE*, 66(7), 837-847.
- 10) 上原考. (2014). 小胞体ストレスによる生と死—細胞応答の新たな役割—. *実験医学*, 32(14), 2194-2200.
- 11) Imai T, Endo K, Miyagishi H, Ishige K, Makishima M, Ito Y, Kosuge. (2014). Protective effect of S-allyl-l-cysteine against endoplasmic reticulum stress-induced neuronal death is mediated by inhibition of calpain. *Amino Acids*, 46(2), 385-393.
- 12) Karen Irvine, Keith R. Laws, Tim M. Gale, Tejinder K. Kondel. (2012). Greater cognitive deterioration in women than men with Alzheimer's disease: A meta analysis. *Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology*, 34(9), 989-998.
- 13) 朝田隆. (2009). 「若年性認知症の実態と対応の基盤整備に関する研究」の調査結果の概要. 総括・分担研究報告書, 厚生労働科学研究費補助金 (長寿科学総合研究事業). 厚生労働省老健局. <http://www.mhlw.go.jp/houdou/2009/03/h0319-2.html>, 2016年9月12日閲覧.
- 14) 朝田隆. (2013). 都市部における認知症有病率と認知症の生活機能障害への対応. 総合研究報告書, 厚生労働科学研究費補助金 (認知症対策総合研究事業). 厚生労働省老健局. [http://www.tsukuba-psychiatry.com/wp-content/uploads/2013/06/H24Report\\_Part3.pdf](http://www.tsukuba-psychiatry.com/wp-content/uploads/2013/06/H24Report_Part3.pdf), 2016年9月12日閲覧.
- 15) P. Reed Larsen, Henry M. Kronenberg, Shlomo Melmed, Kenneth S. Polonsky, Henry. (2002). *Williams Textbook of Endocrinology* 10ed. SAUNDERS. 1287-1301.
- 16) 鈴木秋悦, 宮川勇生, 久保春海, 神埼秀陽. (1999). エストロゲン—新しい視点から見た作用と臨床. *メディカルビュー*. 10-48.
- 17) 鈴木秋悦, 宮川勇生, 久保春海, 神埼秀陽. (1999). エストロゲン—新しい視点から見た作用と臨床. *メディカルビュー*. 68-83.
- 18) 鈴木秋悦, 宮川勇生, 久保春海, 神埼秀陽. (1999). エストロゲン—新しい視点から見た作用と臨床. *メディカルビュー*. 130-139.
- 19) 高橋秀樹. (2010). アルツハイマー病動物モデルの特性. *日薬理誌*, 136(1), 6-10.
- 20) Ayumi Takamura, Takeshi Kawarabayashi, Tatsuki Yokoseki, etc. (2011). Extracellular and intraneuronal HMW-A $\beta$ Os represent a molecular basis of memory loss in Alzheimer's disease model mouse. *Molecular*

- Neurodegeneration, 6(20), 6-20.
- 21) Changchun, Jilin, P. R. (2015). The neuroprotective effects of  $\beta$ -hydroxybutyrate on  $A\beta$ -injected rat hippocampus in vivo and in  $A\beta$ -treated PC-12 cells in vitro. *Free Radic Research*, 49(2), 139-150.
  - 22) Sasaki H, Kitoh Y, Tsukada M, Miki K, Koyama K, Juliawaty LD, Hakim EH, Takahashi K, Kinoshita K. (2015). Inhibitory activities of biflavonoids against amyloid- $\beta$  peptide 42 cytotoxicity in PC-12 cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 25(14), 2831-2833.
  - 23) Liang ZH, Ruan ZG, Wang H, Li SS, Liu J, Li GY, Tian SMCheng. (2015). Protective effects of components of the Chinese herb grassleaf sweetflag rhizome on PC12 cells incubated with amyloid-beta42. *Neural Regen Research*, 10(8), 1292-1297.
  - 24) 玉岡晃. (2012). アルツハイマー病の分子病態. *日医大医学会誌*, 8(4), 285-290.
  - 25) Andruska NX, Yang X, Helferich WG, Shapiro DJ, Zheng. (2015). Anticipatory estrogen activation of the unfolded protein response is linked to cell proliferation and poor survival in estrogen receptor  $\alpha$ -positive breast cancer. *Oncogene*, 34(29), 3760-3769.

(原稿受理日 2016年9月12日)