

女性ホルモンとアルツハイマー型認知症 II

—アミロイド β 負荷による神経細胞の小胞体ストレスに対する17 β -エストラジオールの影響—

山本 智美^{*1} 西田 昌司^{*2}

Female Hormones and Alzheimer's Disease II

—The Effect of 17 β -Estradiol on ER Stress of Neurons Induced by Amyloid β —

YAMAMOTO Tomomi^{*1} NISHIDA Masashi^{*2}

*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

大脳皮質でのアミロイド β 沈着は、アルツハイマー型認知症(AD)の病態と密接に関連している。神経細胞は、異常蛋白質を修復する小胞体にアミロイド β 沈着物を取り込む。異常蛋白質の蓄積によって小胞体ストレスが増加すると、細胞はシャペロン蛋白の誘導などの小胞体ストレス応答(UPR)を惹起して小胞体ストレスに対処する。しかしUPRの惹起が十分でない場合は、アポトーシスによる細胞死に至る。今回我々は、アミロイド β 負荷による神経細胞のUPRがERストレスの対処には不十分であり、AD発症率を低下させる女性ホルモンがUPRを増強して細胞死を抑制するかを、培養細胞モデルを用いて検討した。

ラット神経系由来のPC-12細胞に、小胞体ストレス誘発剤であるツニカマイシン、アミロイド β 単量体、または凝集体を負荷すると、小胞体ストレスが増加するとともに、UPRで誘導されるシャペロン蛋白GRP78も増加させた。女性ホルモンの17 β -エストラジオールによる前処理は、ツニカマイシン、アミロイド β によるGRP78発現を増強するとともにすると、神経細胞における小胞体ストレスを減少した。また、アポトーシスが誘導されたことより、ツニカマイシンによるUPRは小胞体ストレスの凌駕には不十分であることがわかる。17 β -エストラジオールによる前処理は、ツニカマイシンによるアポトーシスも減少させた。

以上より、大脳皮質におけるアミロイド β 沈着は神経細胞の小胞体ストレスを惹起するが、誘導されるUPRが不十分な場合にはアポトーシスによる細胞死が生じた。女性ホルモンのエストロゲンは、UPRを増強することによってアミロイド β 負荷による小胞体ストレスを軽減し、アポトーシスを抑制する可能性が示された。女性ホルモンは、アミロイド β による神経細胞の小胞体ストレスを修飾することによって、ADの発症率を低下させていることが示唆された。

キーワード: アルツハイマー型認知症、アミロイド β 、小胞体ストレス応答、17 β -エストラジオール、アポトーシス、小胞体ストレス

Summary

Amyloid β deposits in the cerebral cortex are closely related to the pathogenesis of Alzheimer's disease (AD). Neurons uptake amyloid β deposits into endoplasmic reticulum (ER) where abnormal proteins are repaired. As ER stress caused by the accumulation of abnormal proteins in ER increases, cells respond to the stress by evoking unfolded protein responses (UPR), such as the induction of chaperone proteins. If cells cannot adapt to the stress by UPR, they initiate apoptosis pathway leading to cell death. Therefore, we investigated whether amyloid β elicits ER stress unable to be coped with UPR, and whether female hormones, which reduce morbidity of AD in women, prevent neuronal cell death by enhancing UPR in a cell culture model of AD.

PC-12 cells, derived from rat neuronal tissue, were exposed to an ER stress inducer, tunicamycin (1 μ M), amyloid β monomers (5 μ M) or aggregates (5 μ M). These treatments increased ER stress together with the upregulation of GRP78, a chaperone protein induced by UPR. Pretreatment with a female hormone, 17 β -estradiol (0~1 μ M), enhanced GRP78 expression dose dependently in tunicamycin or amyloid β treated cells, which coincided with the decrease of ER stress in the cells. Because tunicamycin evoked apoptosis in PC-12, UPR induced by tunicamycin was not sufficient to overcome ER stress. When the cells were pretreated with 17 β -estradiol, it also decreased the apoptosis induced by tunicamycin significantly.

These results indicate that amyloid β deposition in the cerebral cortex increases the ER stress of neuronal cells. If UPR induced by ER stress is insufficient, neuronal cell death by apoptosis increases. A female hormone, estrogen, augments UPR and reduces the ER stress caused by amyloid β , and may prevent cell death by apoptosis. Therefore, female hormones may reduce the morbidity of AD through the modulation of ER stress in neurons caused by amyloid β deposits.

Keywords: Alzheimer's disease, amyloid β , unfolded protein responses, 17 β -estradiol, apoptosis, endoplasmic reticulum stress

1 背景

1.1 アルツハイマー型認知症とアミロイド仮説

人口の高齢化とともに発症率が増加するアルツハイマー型認知症は、先進国が共通に抱える深刻な社会問題となっている^{1),2)}が、その病態は依然として明らかでないため、根本的な予防法と治療法は未だ確立されていない^{2),3)}。アルツハイマー型認知症の脳では著しい脳委縮が認められ、組織学的に認められる老人斑と神経原線維変化がその原因であると考えられている。中でも老人斑を形成するアミロイド β の代謝異常が病態形成に一義的に重要な役割を果たすと考えるアミロイド仮説⁴⁾が、近年、広く受け入れられるようになった。

細胞外で産生されるアミロイド β 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凝集体を形成すると、大脳組織内に老人斑として沈着する^{3),5)}。アミロイド仮説では、アミロイド β が神経細胞傷害を起こすメカニズムとして、沈着したアミロイド凝集体が細胞外から細胞障害を起こす機構と、アミロイド β が神経細胞内から細胞障害を惹起する機構の二つが提唱されている^{6),7)}。後者では、神経細胞が、細胞外に生じた細胞障害性のアミロイド凝集体をエンドサイトーシスによって取り込み、処理しようとすることから始まると考えられている。

1.2 小胞体ストレス

小胞体は新規に合成されたり、細胞内で障害を受けたり、細胞外から取り込んだりした蛋白質を、正しく折り畳んで修飾し、機能を発揮する立体構造に整える場である^{8),9)}。そのため、小胞体では蛋白質への糖鎖付加や削除、ジスルフィド結合の形成、正常な立体構造への折り畳み (folding) などが行われる¹⁰⁾。一方、変異や変性によって正しい立体構造に折りたたむことができない異常な蛋白質 (unfolded protein) が生じると、加水分解酵素を多量に含む細胞小器官リソソームとの協働で分解される⁹⁾。しかしアミロイド凝集体は修復できないのみならず分解も困難であるため、処理の場である小胞体に過剰に蓄積する¹¹⁾。

この状態は小胞体ストレスと呼ばれ、アミロイド β だけではなく様々な異常蛋白質が小胞体ストレスを惹起することが明らかとなった。そのため、糖尿病、虚血性疾患、ウイルス感染などの病態が、小胞体ストレスの関与という視点から説明されつつある¹²⁾。神経変性疾患においても、アルツハイマー病、パーキンソン病、ポリグルタミン病などの病理過程に小胞体ストレスが関与しているとの報告が相次いでおり^{12),13)}、我々が作成したアルツハイマー型認知症神経細胞モデルにおいても、アミロイド β 凝集体は神経細胞に小胞体ストレスをもたらした¹⁴⁾。

1.3 小胞体ストレス応答

このように異常蛋白質は細胞に小胞体ストレスを惹起するが、細胞はその解消のために小胞体ストレス応答 (unfolded protein response : UPR) を発動して対応する。UPR では、異常な蛋

白質をこれ以上産生させないために蛋白質の翻訳を抑制する。また、蓄積した異常蛋白質の折り畳みを促進・是正するために、折り畳みを助ける介在蛋白のシャペロンを誘導する。それでも異常蛋白質が処理しきれない場合には、蛋白質分解系のプロテアソームに輸送して小胞体関連分解を行う^{15),16)}。

UPRは、小胞体膜に存在するストレスセンサーが小胞体内の異常蛋白質を感知することから始動する。ストレスセンサーには現在ではPERK、ATF6、IRE1が知られている。UPRを最初に駆動するのはPERKで、異常蛋白質を感知して活性化されると蛋白質の翻訳に必須な翻訳開始因子のひとつを不活性化する。ATF6は転写因子で、活性化されると核へ移行し、何種類もの小胞体シャペロン蛋白の転写を活性化させる。IRE1も転写因子のXBP1を活性化することで、シャペロン蛋白を誘導する。これらの応答で異常蛋白質を処理しきれない場合は、異常蛋白質はユビキチン化されてプロテアソームに運ばれ、分解される。

しかしUPRにもかかわらず小胞体ストレスが解消されない場合には、細胞はアポトーシス経路を活性化させる。アポトーシスによる細胞死は、不可逆的なストレスの加わった細胞を自ら除去してストレスを解消する手段であるが、結果として組織から細胞が脱落することにより、様々な病態を惹起することとなる^{15),16)}。

1.4 アルツハイマー型認知症の性差とエストロゲンの神経保護効果

一方、アルツハイマー型認知症には性差があることが知られており⁴⁾、65歳以後においては女性のアルツハイマー型認知症が増加する¹⁷⁾。これは閉経に伴う女性ホルモンの低下が、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、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有ることが推測できる。我々は培養神経細胞にアミロイドβを負荷することでアルツハイマー型認知症モデルを作成し、ネクローシスとアポトーシスによる細胞死が生じること、女性ホルモンの17β-エストラジオールがアミロイドβ負荷による細胞死を抑制することを見出し、17β-エストラジオールが神経保護効果を発揮することによっ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を示唆した¹⁴⁾。

このモデルでは、アミロイドβ負荷が神経細胞に小胞体ストレスを引き起こし、17β-エストラジオールが小胞体ストレスを減少させたことも確認できた¹⁴⁾。従って、女性ホルモンは小胞体ストレス応答の制御によって小胞体ストレスを減弱させ、細胞死を抑制した可能性も考えられる。実際、癌細胞においては、17β-エストラジオールはシャペロン蛋白の誘導等のUPRを亢進することで細胞死を阻害するという報告がある¹⁸⁾。以上より、神経細胞においても、17β-エストラジオールは小胞体ストレス応答を促進させ、シャペロン蛋白を増加させることでアミロイドβ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。

2 目的

本研究では、女性ホルモンが小胞体ストレス応答を介して神経保護効果を発揮し、アルツハイマー型認知症の発症を抑制しているか否かを、細胞モデルを用いて検討する。そのため、1) 培養神経細胞にアミロイド β 、並びに小胞体ストレスを惹起するポジティブコントロールとしてのツニカマイシンを負荷し、2) 実際に小胞体ストレスが生じているかを小胞体染色、シャペロン蛋白の誘導、アポトーシスによる細胞死で確認し、3) これらに対する女性ホルモンであ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¹⁹⁾。神経細胞としては、ラット褐色腫由来細胞 PC-12 (理研 Cell Bank) を使い、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 0~5 μ M に希釈して添加した。また、神経細胞に小胞体ストレスを惹起するポジティブコントロールとして、ツニカマイシン (SIGMA) を用いた。

3.2 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 2×10^6 個/mL で 35 mm 培養 dish および 96 穴プレートに播種し、24 時間後にツニカマイシン (1 μ M) 及び、アミロイド β の単量体または凝集体 (5 μ M) を添加した。ツニカマイシン及び、アミロイド β 負荷 48 時間後に蛍光色素を添加し、蛍光顕微鏡 (EVOS® FL Auto: Thermo Scientific) を用いて小胞体ストレスを確認すると共に、蛍光プレートリーダー (Fluoroskan Ascent FL: Thermo Scientific) を用いて小胞体ストレスを定量した (励起波長 518 nm、蛍光波長 620 nm)。

3.3 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する。

PC-12 を 2×10^6 個/mL で 24 穴プレートに播種し、24 時間後にツニカマイシン (0~5 μ M) と、ポジティブコントロールとして界面活性剤の Tween 0.1% を添加した。ツニカマイシン負荷の 24 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、

560 nm の吸光度を測定してネクローシスを定量した。

3.4 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、蛍光色素フルオレセインで標識した 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) で観察して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 2×10^6 個/mL で 24 穴プレートに播種し、24 時間後にツニカマイシン ($0 \sim 5 \mu\text{M}$) を添加した。ツニカマイシン負荷 48 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。

3.5 シャペロン蛋白 GRP78 の定量

GRP78 の検出にはウェスタンブロッティング法及び免疫染色法を用いた。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で蛋白質を分子量ごとに分け、ウェスタンブロッティング法により蛋白質をメンブレンに転写する。蛋白質が転写されたメンブレンに特異抗体を結合させ、化学発光法 (EzWestLumi plus: ATTO) により蛋白質を検出する。

PC-12 を 35 mm 培養ディッシュ (Falcon) に播種してコンフルエントになるまで培養し、ツニカマイシン ($1 \mu\text{M}$) 及び、アミロイド β の単量体または凝集体 ($5 \mu\text{M}$) を添加した。ツニカマイシン及び、アミロイド β 負荷 48 時間後に細胞を回収し、SDS-PAGE とウェスタンブロッティング法により蛋白質をメンブレンに転写し、GRP78 抗体 (StressMarq Biosciences Inc) を反応させて GRP78 を検出、ImageJ (Wayne Rasband) を用いて定量した。

3.6 エストロゲンの添加

17β -エストラジオール (SIGMA) を DMSO (SIGMA) を用いて溶解した後、DMEM を用いて $0 \sim 1 \mu\text{M}$ に希釈して培養細胞に添加し、24 時間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 17β -エストラジオールが小胞体ストレスに及ぼす影響の検討

女性ホルモンが小胞体ストレスの修飾を介してアルツハイマー病の性差に関係しているか否かを検討した。まず神経細胞に小胞体ストレスを惹起するため、PC-12 を 2×10^6 個/mL で播種し、24 時間後に $1 \mu\text{M}$ のツニカマイシン、または $5 \mu\text{M}$ のアミロイド β 単量体か凝集体を添加した。負荷 48 時間で蛍光染色を行い、小胞体量を指標に小胞体ストレスを測定した。

ツニカマイシンを負荷した神経細胞では、何も負荷しないネガティブコントロール群と比較して有意な増加を認めた。さらにアミロイド β 単量体を負荷した神経細胞においては小胞体ス

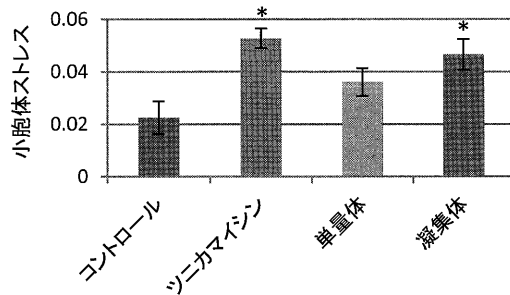


図1 PC-12の小胞体ストレスに及ぼすツニカマイシンとアミロイドβの影響

* : $p < 0.05$ vs コントロール

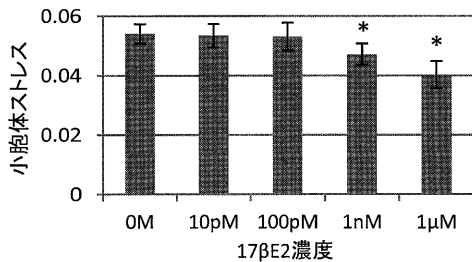


図2 ツニカマイシンによる小胞体ストレスに及ぼす17β-エストラジオール (17βE2) の影響

* : $p < 0.05$ vs 0M

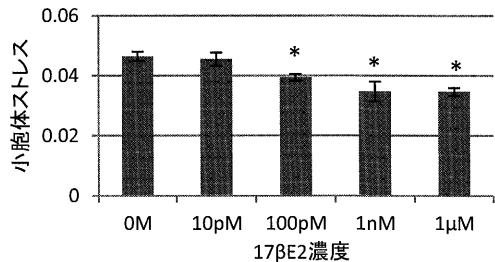


図3 アミロイドβ凝集体による小胞体ストレスに及ぼす17β-エストラジオールの影響

* : $p < 0.05$ vs 0M

トレスが増加する傾向がみられ、凝集体ではコントロールと比較して有意な増加を認めた (図1)。従って、ツニカマイシン、アミロイドβは、小胞体ストレスを惹起したことが確認できた。

小胞体ストレスの増加をエストロゲンが抑制するかどうかを検討するため、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ツニカマイシン1μM及び、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ツニカマイシンによる小胞体ストレスに対し、1nMと1μMで有意な小胞体ストレスの減少を示した (図2)。アミロイドβ凝集体による小胞体ストレスに対しては、濃度依存的に小胞体ストレスを減少させ、100pM、1nM、1μMでは有意な小胞体ストレスの減少を示した (図3)。従って、女性ホルモンのエストロゲンは、ツニカマイシン、アミロイドβいずれによる小胞体ストレスも減少させることが示された。

4.2 17β-エストラジオールが小胞体ストレス応答に及ぼす影響の検討

次に、女性ホルモンによる小胞体ストレスの減少が、神経細胞の小胞体ストレス応答を活性化により生じているかどうかを、シャペロン蛋白 GRP78の発現を指標として検討した。PC-12を35mm培養ディッシュにコンフルエントになるまで培養し、24時間後にポジティブコントロールとして1μMのツニカマイシン、または5μMのアミロイドβ単量体か凝集体を添加し



図4 ウェスタンブロットングによる GRP78発現の検出
(アミロイドβ凝集体負荷時)

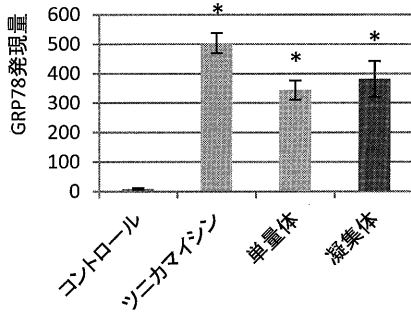


図5 PC-12の GRP78発現に及ぼすツニカマイシンとアミロイドβの影響

* : $p < 0.05$ vs コントロール

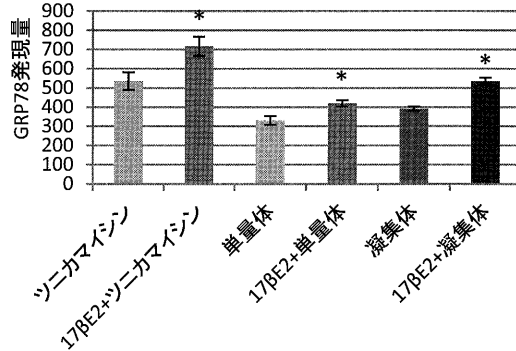


図6 PC-12の GRP78発現に及ぼす17β-エストラジオールの影響

* : $p < 0.05$ vs 17βE2無添加群

た。負荷48時間で蛋白質の回収を行い、ウェスタンブロットング法により GRP78の発現を検討した(図4)。

何も添加しないネガティブコントロール群では GRP78の増加を認めなかったが、ツニカマイシンを負荷した細胞では、ネガティブコントロール群と比較して有意な GRP78発現の増加を認めた。さらにアミロイドβ単量体、凝集体を負荷した神経細胞においても、コントロールと比較して有意な増加を認めた(図5)。従って、ツニカマイシン、アミロイドβによる小胞体ストレスは、神経細胞の小胞体ストレス応答を惹起することが確認できた。

エストロゲンが、小胞体ストレスを生じた神経細胞の小胞体ストレス応答に影響するかを、ツニカマイシン及び、アミロイドβ単量体または凝集体による PC-12細胞の GRP78の増加にエストロゲンが影響するかを検討した。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ツニカマイシン1μM及び、アミロイドβ単量体または凝集体5μMを負荷し、GRP78を測定した。その結果、17β-エストラジオールを添加した細胞では、ツニカマイシンのみ、アミロイドβ単量体のみ、凝集体のみを添加した神経細胞と比較して、有意に GRP78の発現を増加させた(図6)。従って、女性ホルモンのエストロゲンは、小胞体ストレスを生じた神経細胞の小胞体ストレス応答をさらに活性化していることが示された。

4.3 小胞体ストレスによる細胞死の検討

最後に、女性ホルモンによる神経細胞死の抑制が、小胞体ストレスへのストレス応答の破綻による細胞死の抑制によるか否かを検討した。

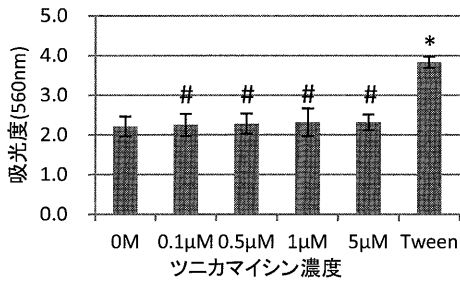


図7 PC-12のネクローシスに及ぼすツニカマイシンの影響

* : $p < 0.05$ vs 0M # : n.s. vs 0M

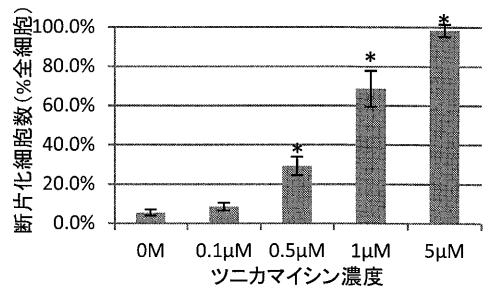


図8 PC-12のアポトーシスに及ぼすツニカマイシンの影響

* : $p < 0.05$ vs 0M

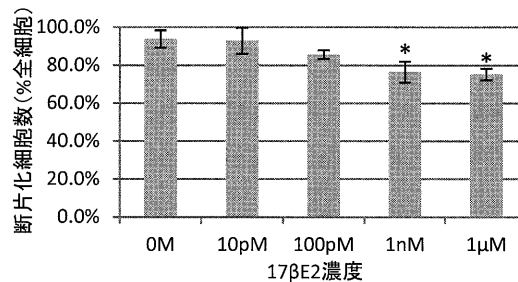


図9 ツニカマイシンによるアポトーシスに及ぼす17β-エストラジオールの影響

* : $p < 0.05$ vs 0M

ネクローシスの測定は、PC-12を 2×10^6 個/mLで播種し、24時間後に小胞体ストレスのポジティブコントロールであるツニカマイシンを $1 \mu\text{M}$ で添加した。24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、ツニカマイシンはネクローシスを生じなかった(図7)。

アポトーシスの測定は、PC-12を 2×10^6 個/mLで播種し、24時間後に0~ $5 \mu\text{M}$ のツニカマイシンを添加した。負荷48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、ツニカマイシン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 $5 \mu\text{M}$ では、死細胞数が5%から98%へと有意に増加した(図8)。

小胞体ストレスによる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-エストラジオールで24時間前処理した後、上記と同様の方法でツニカマイシン $5 \mu\text{M}$ 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ツニカマイシンによるアポトーシスに対し、100pMからアポトーシスの減少傾向がみられ、1nMと $1 \mu\text{M}$ で有意な減少を示した(図9)。

従って、神経細胞への小胞体ストレスの負荷は、ストレス応答の破綻としてアポトーシスによる細胞死を誘導し、女性ホルモンはアポトーシスを抑制することにより神経細胞死を回避していることが示された。

5 考察

5.1 アミロイド仮説と小胞体ストレス

異常蛋白質が小胞体に蓄積すると細胞に小胞体ストレスがかかる。そのストレスに対して細胞は蛋白質の翻訳抑制やシャペロン蛋白質の誘導、そして小胞体関連分解の3つのUPRによって対応するが、それらのUPRによっても小胞体ストレスが回避できない場合には、最後の手段として、細胞はアポトーシスによる細胞死の経路を活性化させる^{15),16)}。

我々が作成したPC-12細胞のアミロイド β 負荷モデルでは、ネクローシス及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。今回、アミロイド負荷と小胞体ストレス関係をさらに検討するため、小胞体ストレス誘発剤であるツニカマイシンを用いた。ツニカマイシンは放線菌から酸性される抗生物質で、N-グリコシド糖鎖生合成の初反応であるドリコールリン酸-N-アセチル-D-グルコサミンの形成を阻害することにより、蛋白質のN-グリコシド結合の形成を阻害する。複合糖質の生合成を特異的に阻害することで正常な蛋白質合成が阻害され、異常蛋白質が小胞体に蓄積して小胞体ストレスが誘導される。in vitroの研究でツニカマイシンは0.5~10 μ Mの範囲で用いられており、本実験でも0.1~5 μ Mの濃度で、神経細胞の小胞体ストレス、小胞体ストレス応答としてのGRP78誘導が生じたことから、ツニカマイシンはPC-12に小胞体ストレスを誘発できたといえる。

アミロイド β を用いて小胞体ストレスを誘導すると、UPRとしてのシャペロン蛋白GRP78の発現を、アミロイド β 単量体、凝集体ともに増加させた。この結果は、小胞体ストレスの誘導剤であるツニカマイシンと同様に、アミロイド β 単量体、凝集体は小胞体ストレス応答を起動させることを示している。さらに、GRP78発現量は、小胞体ストレスの強さと比例しており、最も強い小胞体ストレスを惹起したツニカマイシンはGRP78の発現量が最も多く、最も弱い小胞体ストレスを惹起したアミロイド β 単量体はGRP78の発現量が最も少なかった。従って、より強い小胞体ストレスは、より多くの小胞体ストレス応答を働かせることを示している。

5.2 小胞体ストレスによる神経細胞死

PC-12に細胞外からアミロイド β を負荷モデルでは、アポトーシスとネクローシスの2つの神経細胞死が誘導された。今回、細胞に取り込まれたアミロイドが小胞体ストレスを介して神経細胞死を起こす際、どちらの細胞死が誘導されるかを検討するため、小胞体ストレス誘導剤のツニカマイシンをPC-12に添加すると、PC-12はアポトーシスによる細胞死が誘導されたが、ネクローシスは起こさなかった。このことは、小胞体ストレスはアポトーシスによる細胞死の経路を活性化させることを示しており、アミロイド β 負荷によるPC-12のアポトーシスは、細胞内に取り込まれたアミロイド β による小胞体ストレスの増大が原因であると考えられる。

一方、ツニカマイシンとアミロイド β 凝集体はアポトーシスを誘発したのに対し、アミロイド β 単量体はアポトーシスを誘導しなかった。アミロイド β 単量体の負荷では誘導されるシャ

ペロン蛋白は少量であるが、溶解性が高いために小胞体内に不溶物が蓄積せず、生じる小胞体ストレスも小さいため、小胞体ストレス応答によってアミロイド蛋白単量体のストレスは回避され、アポトーシスの経路は活性化されないものと考えられる。これに対し、ツニカマイシンとアミロイド β 凝集体による小胞体ストレスは多くの GRP78 を誘導して強力な小胞体ストレス応答を行うが、ツニカマイシンの薬理効果やアミロイド β 凝集体の不溶性のために小胞体ストレスが解消されず、アポトーシス経路が活性化されて細胞死が生じる可能性が示唆される。

5.3 エストロゲンと神経細胞の小胞体ストレス

65歳以後の閉経期をすぎると女性のアルツハイマー型認知症が増加すると推測されており、女性ホルモンは神経保護効果を発揮することで閉経前の女性の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ている⁴⁾。主に女性生殖機能の制御を行うホルモンであるエストロゲンは、非生殖細胞にもエストロゲン受容体が存在することから、保護ホルモンとして働くことが明らかとなっており、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^{20),21)}。

我々のアルツハイマー型認知症モデルにおいても、17 β -エストラジオールはアミロイド β 負荷によるアポトーシスを抑制するとともに、アポトーシス経路の上流にある小胞体ストレスの抑制を確認した¹⁴⁾。本研究においては、17 β -エストラジオールは小胞体ストレス誘発剤のツニカマイシンによるアポトーシスを抑制した。さらに17 β -エストラジオールはツニカマイシンによる小胞体ストレス応答を活性化することにより、小胞体ストレスを軽減した。従って、17 β -エストラジオールは、アミロイド β による神経細胞障害のみならず、一般的な小胞体ストレスに関連した細胞死を抑制し、そのメカニズムとしては小胞体ストレスによるシャペロン蛋白の誘導をさらに促進し、小胞体内に蓄積した異常蛋白質の処理を亢進することで小胞体ストレスを軽減し、アポトーシス経路の活性化を抑制してい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、アミロイド β は小胞体ストレスを介したアポトーシスによる細胞死を惹起し、それに対して女性ホルモンである17 β -エストラジオールは小胞体ストレス応答としてのシャペロン蛋白の誘導を亢進することで、過剰な小胞体ストレスとそれに続発するアポトーシス経路の活性化を抑制したと考えられる。従って、17 β -エストラジオールは小胞体ストレス応答に関連した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の性差をもたら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所研究助成、総合研究助成、人間科学部教育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, Abul K, Jon C. Aster (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) 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.
- 7) 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.
- 8) 永田和宏. (2008). タンパク質の一生—生命活動の舞台裏. 岩波書籍, 57-145.
- 9) 森和俊. (2016). 細胞の中の分子生物学. 講談社, 146-175.
- 10) Albert Bruce, Bray Dennis, Hopkin Karen, Johnson Alexander, Lewis Julian, Raff Martin, Robert Keith, Walter Peter (著), 中村桂子, 松原謙一 (監訳). (2011). *Essential 細胞生物学* (原書第3版). 南江堂, 514-515.
- 11) Imai T, Endo K, Miyagishi H, Ishige K, Makishima M, Ito YKosuge. (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) 工藤喬. (2012). 小胞体ストレスと精神神経疾患. *日本精神神経学雑誌*, 114(2), 115-123.
- 13) 工藤喬. (2010). 小胞体ストレスとアルツハイマー病創薬. *日本神経精神薬理学雑誌*, 30(4), 163-168.
- 14) 山本智美, 西田昌司. (2016). 女性ホルモンとアルツハイマー型認知症. *神戸女学院大学論集*, 63(2), 131-140.
- 15) 永田和宏. (2008). タンパク質の一生—生命活動の舞台裏. 岩波書籍, 175-214.
- 16) 森和俊. (2016). 細胞の中の分子生物学. 講談社, 178-203.
- 17) 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-psychoiatry.com/?page_id=806, 2016年9月8日閲覧.
- 18) 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 α -positive breast cancer. *Oncogene*, 34(29) 3760-3769.
- 19) Dahlgren, Karie N, Arlene M Manelli, W Blaine Stine, Lorinda K Baker, Grant a Krafft, and Mary Jo LaDu. (2002). Oligomeric and Fibrillar Species of Amyloid-beta Peptides Differentially Affect Neuronal Viability. *The Journal of biological chemistry*, 277 (2002), 32046-32053.
- 20) 鈴木秋悦, 宮川勇生, 久保春海, 神崎秀陽. (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.
- 21) 鈴木秋悦, 宮川勇生, 久保春海, 神崎秀陽. (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.

(原稿受理日 2017年2月19日)