

女性ホルモンとアルツハイマー型認知症Ⅲ

— アミロイド β 負荷による神経細胞の細胞障害に対する 17β -エストラジオールの作用機序の検討 —

山本智美^{*1} 西田昌司^{*2}

Female Hormones and Alzheimer's Disease III

— The Mechanism of Protective Effects of 17β -Estradiol on the Cellular Injury 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 mnishida@mail.kobe-c.ac.jp

要 旨

アルツハイマー型認知症の発症には性差が存在し、その原因として女性ホルモンのエストロゲンが神経細胞の保護効果を発揮することが示唆されている。本研究では神経細胞にアミロイド β を負荷したアルツハイマー型認知症の細胞モデルを用い、エストロゲンがエストロゲン受容体との結合を介して小胞体ストレスを修飾し、神経細胞を保護しているか否かを検討した。

ラット神経系由来のPC-12細胞に、アミロイド β 、または小胞体ストレス誘発剤のツニカマイシンを負荷すると、小胞体が増大するとともにUnfolded Protein Response (UPR)が活性化され、シャペロン蛋白GRP78が誘導された。さらに過剰な小胞体ストレスはアポトーシスによる神経細胞死を惹起した。女性ホルモンの 17β -エストラジオールは、アミロイド β やツニカマイシンによる小胞体ストレスを抑制し、神経細胞死を減少させた。エストロゲン受容体阻害剤ICI182,780は、このような 17β -エストラジオールの小胞体量、GRP78誘導に対する効果を完全に抑制するとともに、アポトーシスに対する抑制効果も部分的に抑制した。

以上より、エストロゲンはアミロイド負荷による神経細胞の小胞体ストレスに対し、エストロゲン受容体を介したストレス応答によって適応することが示唆された。過剰なストレスによる神経細胞死に対しても、部分的には神経細胞内のエストロゲン受容体を介したメカニズムにより対応する可能性が示唆された。

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、 17β -エストラジオール、アポトーシス、エストロゲン受容体

Abstract

Female hormones are supposed to play a pivotal role in the sex difference of Alzheimer's disease by exerting protective effects on neurons. We investigated whether estrogen, a kind of female hormones, reduces the damage of neural cells through binding to intracellular estrogen receptors using a cellular model of Alzheimer's disease.

When amyloid β ($5 \mu\text{M}$), a proposed pathogen of Alzheimer's disease, or tunicamycin ($1 \mu\text{M}$), an inducer of endoplasmic reticulum (ER) stress, were applied to cultured PC-12 neural cells, the size of ER, a measure of ER stress and the expression of GRP78, an indicative protein of unfolded protein response (UPR), were both increased.

In this model, 17β -estradiol ($1 \mu\text{M}$), the most potent estrogen, increased the GRP78 expression together with the decrease in ER size and the cell death by apoptosis, suggesting that 17β -estradiol augments the stress response of neural cells to amyloid β by activating UPR. When cells were pretreated with a competitive inhibitor of estrogen receptors, ICI182,780 ($100 \mu\text{M}$), the increase in GRP78 expression and the decrease in ER size by 17β -estradiol were completely abolished. The effect of 17β -estradiol on the number of apoptotic cells was partially inhibited by ICI182,780.

These results indicate that the female hormone estrogen enhances the stress response of neurons to amyloid β by activating UPR via the binding to estrogen receptors. Estrogen may exhibit a protective effect against cell death caused by amyloid β partly through the receptor mediated mechanism because the effect 17β -estradiol on apoptotic cell death was partially inhibited by ICI182,780.

Keywords: Alzheimer's disease, amyloid β , unfolded protein responses, 17β -estradiol, apoptosis, estrogen receptor

1 背景

1.1 アルツハイマー型認知症とアミロイドβ

アルツハイマー型認知症は、大脳皮質の萎縮に伴う認知機能の低下を主病像とし、加齢とともに進行する。高齢化が進行する先進国では共通の社会的問題となっていることから、予防法や治療法の確立が重要となっている。しかしその病態は完全には明らかになっておらず、病態解明のための研究や治療薬の開発が盛んに行われている^{1),2)}。

アルツハイマー型認知症における大脳の萎縮は、組織学的に観察される老人斑と神経原線維変化による神経細胞脱落が原因と考えられている。老人斑はアミロイドβ蛋白質から出来ていること、神経原線維変化は老人斑の形成に続発して起こること、家族性アルツハイマー型認知症ではアミロイドβの代謝異常が病因となっていることから、アミロイドβが一般的なアルツハイマー型認知症の原因であるとする「アミロイド仮説」が、多くの研究者に支持されている^{2),3),4)}。

アミロイドβは神経細胞に取り込まれ、異物を処理する小胞体に運ばれる。小胞体に蓄積した異物は「小胞体ストレス」を生じ、異物の処理を促進させる⁵⁾。しかし、過剰な小胞体ストレスはアポトーシス経路を活性化して細胞死を誘導することから、分解されにくいアミロイドβの蓄積は神経細胞死をもたらす可能性が示唆される^{6),7)}。実際、パーキンソン病やポリグルタミン病などの神経変性疾患の病態には、異常蛋白質の蓄積による小胞体ストレスの亢進が関与しているとの報告が相次いでいる^{8),9),10)}。

我々は、培養神経細胞にアミロイドβを添加することによりアルツハイマー型認知症の細胞モデルを作成した。このモデルでは、神経細胞の小胞体ストレスが増加し、さらにネクローシス及びアポトーシスによる細胞死が誘発された。このことはアミロイドβが神経細胞に小胞体ストレスを惹起するとともに、神経細胞の内外から細胞を障害したことを示している¹¹⁾。

1.2 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の発症には性差があることが知られている。認知症全体の有病率は男性が女性の1.6倍であり、特に脳血管性痴呆では男性が2.5倍となっている。しかしアルツハイマー型認知症に限ると女性が男性の1.4倍となっており、平均寿命が長いために加齢とともに増加するアルツハイマー型認知症は、女性での発症率が高いと考えられている。患者数が少ないためもあるが、若年者でのアルツハイマー型認知症の発症には男女差が認められず、女性での増加は65歳以降において認められるようになる¹²⁾。従って加齢に伴う女性の発症率増加は、閉経による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ではないかと考えられる。

実際、女性ホルモンの補充療法を行った閉経女性における後ろ向き研究ではアルツハイマー型認知症の発症が減少していたことから、女性ホルモンが認知症の発症を予防する可能性が示

唆される。しかし、アルツハイマー型認知症発症をエンドポイントとした閉経女性に対する女性ホルモン投与の前向き研究は確定的な結果を出すことが出来ず、副作用の問題から2002年に中止された。その後、エストロゲンを投与するタイミングが重要であるとする「臨界期仮説」が提唱され、現在ではヒトにおけるホルモン補充療法のプロトコルの見直しが考えられているが、女性ホルモンとアルツハイマー型認知症発症との関係は未だ明らかでない¹³⁾。

我々のアルツハイマー型認知症の神経細胞モデルで女性ホルモンの効果を検討したところ、女性ホルモンの17 β -エストラジオールはアミロイド β および小胞体ストレス誘導剤であるツニカマイシンを負荷した細胞において、ストレス応答を活性化させることにより小胞体ストレスを抑制した。さらに17 β -エストラジオールは、アミロイド β やツニカマイシンによる神経細胞のアポトーシスを抑制した。従って、17 β -エストラジオールはアミロイド β による小胞体ストレス応答を亢進することにより小胞体ストレスを軽減し、その下流にあるアポトーシス経路の活性化を抑制する可能性が示唆された^{11),14)}。

1.3 エストロゲン受容体の作用

女性ホルモンの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、標的臓器は女性生殖器である。子宮内膜や乳腺組織の増殖作用を持ち、閉経にともなう分泌低下は、これらの臓器の機能や形態に変化をもたらす。近年、皮膚や骨、血管などの非生殖器に対してもエストロゲンが作用し、抗酸化作用、抗炎症作用、抗アポトーシス作用など、保護ホルモンとしての様々な作用を発揮することが確認された¹⁵⁾。

神経系に対してもエストロゲンが作用し、脳機能の維持に有効的に働くことが明らかとなっている。その機序として、シナプス形成の誘導、糖代謝の促進、グリア細胞の賦活化、活性酸素などの神経毒素からの保護作用などが報告されている。アルツハイマー型認知症に関しても、アセチルコリン作動性ニューロンの賦活化作用やアミロイド β 産生を抑制する α セクレターゼ活性の亢進作用が知られている¹⁶⁾。

このようなエストロゲン作用は、核内に局在する特異的な受容体であるエストロゲン受容体を介した標的遺伝子の発現制御により発揮されると考えられている。エストロゲン受容体は12個の α -ヘリックス構造を有しており、分子量90 kDの熱ショック蛋白質などと非共有結合して不活性な状態で存在している。脂溶性で低分子量のエストロゲンは細胞膜の脂質二重層を自由に通過でき、単純拡散などによって細胞質から核内に移行する。核内でエストロゲンが受容体であるエストロゲン受容体に結合すると、エストロゲン受容体は高リン酸化されて高次構造を変化させ、熱ショック蛋白質を解離する。その結果、エストロゲン-エストロゲン受容体複合体は二量体を形成して活性化される。

二量体化したエストロゲン-エストロゲン受容体複合体は転写制御因子として機能し、転写調節領域にエストロゲン応答配列を持つ遺伝子を標的として結合する。その結果として転写・翻訳される遺伝子産物が、生体におけるエストロゲン作用を担うと考えられている^{17),18)}。エストロゲンが女性ホルモンであることからエストロゲン受容体は女性生殖器の多くに発現がみられるが、男女両性において、脳神経系、循環器系、骨組織などの非生殖器官でも発現してお

り、様々な器官における性的二型とエストロゲン、エストロゲン受容体との関係が検討されている¹⁹⁾。

2 目的

本研究では、女性ホルモンがエストロゲン受容体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 、または小胞体ストレス誘導剤としてのツニカマイシンを負荷し、2) 小胞体ストレスが生じているかを小胞体染色、シャペロン蛋白質の誘導、アポトーシスによる細胞死で確認し、3) これらに対するエストロゲンの作用をエストロゲン受容体阻害剤が抑制するかを検討した。

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²⁰⁾。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の 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 96 穴プレートに播種し、24 時間後にツニカマイシン ($1 \mu\text{M}$) 及び、アミロイド β 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 時間後に蛍光色素を添加し、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 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。細胞がアポトーシスによる細胞死を起こすと 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 を特異的に結合し、染色された核を蛍光顕微鏡で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 ($1 \mu\text{M}$) 及び、アミロイド β 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、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 (EVOS® FL Auto: Thermo Scientific) 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。

3.4 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 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。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、HRP 標識抗 GRP78抗体 (StressMarq Biosciences Inc) を反応させた。発光基質として EzWestLumi plus (ATTO) を添加して GRP78を検出し、ImageJ (Wayne Rasband) を用いて定量した。

3.5 エストロゲンの添加

17 β -エストラジオール (SIGMA) を DMSO に溶解した後、DMEM を用いて1 μ 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。

3.6 エストロゲン受容体阻害剤の添加

エストロゲン受容体阻害剤である ICI182,780 (SIGMA) を DMSO に溶解した後、DMEM を用いて100 μ M に希釈して培養細胞に添加した。1時間前処理した後に17 β -エストラジオールを添加し、細胞障害に対するエストロゲンの効果が受容体を介しているかを検討した。

4 結果

4.1 小胞体ストレスによる小胞体量増加に及ぼす17 β -エストラジオールとエストロゲン受容体阻害剤の影響

女性ホルモンの小胞体ストレスへの作用がエストロゲン受容体を介しているか否かを、エストロゲン受容体阻害剤を用い、小胞体量を指標として検討した。PC-12を 2×10^6 個/mL で播種し、100 μ M のエストロゲン受容体阻害剤 ICI182,780で1時間処理した。その後、1 μ M の17 β -エストラジオールで24時間前処理した後、小胞体ストレスを惹起するためのポジティブコントロールとしての1 μ M のツニカマイシン、または5 μ M のアミロイド β 凝集体を添加した。負荷48時間で蛍光染色を行い、小胞体ストレスの指標としての小胞体量を測定した。

ツニカマイシンを負荷した神経細胞では、ツニカマイシンを負荷しないコントロール群と比較して小胞体量の有意な増加を認めた。17 β -エストラジオールはツニカマイシンによる小胞体量の増加を有意に抑制した。ICI182,780は、17 β -エストラジオールによる小胞体量の減少を有意に抑制した (図1)。さらにアミロイド β 凝集体を負荷した神経細胞においても、コン

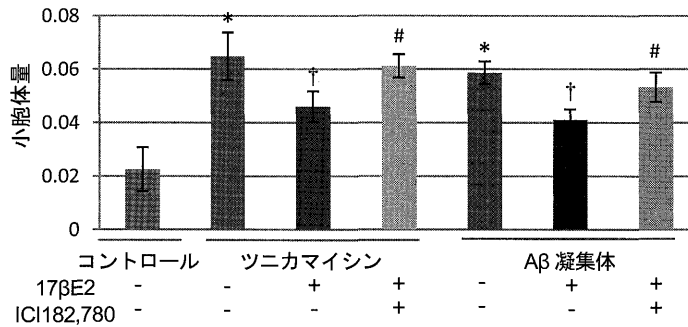


図1 PC-12の小胞体ストレスに及ぼす17β-エストラジオールと受容体阻害下での影響

* : $p < 0.05$ vs コントロール
 † : $p < 0.05$ vs without 17βE2
 # : $p < 0.05$ vs without ICI182,780

コントロールと比較して有意な小胞体ストレスの増加を認めた。17β-エストラジオールはアミロイドβ凝集体による小胞体ストレスも有意に減少した。さらにICI182,780は17β-エストラジオールによる小胞体ストレスの減少を有意に抑制した(図1)。

従って、ツニカマイシン、アミロイドβ負荷は培養神経細胞の小胞体ストレスを惹起し、女性ホルモンのエストラジオールが小胞体ストレスを減少したが、エストラジオールの作用はエストロゲン受容体を介したものであることが示された。

4.2 小胞体ストレスによるGRP78誘導に及ぼす17β-エストラジオールとエストロゲン受容体阻害剤の影響

次に、女性ホルモンの小胞体ストレスへの作用がエストロゲン受容体を介しているか否かを、ストレス応答としてのシャペロン蛋白GRP78発現に対するエストロゲン受容体阻害剤の効果を指標として検討した。PC-12を35 mm培養ディッシュにコンフルエントになるまで培養し、100μMのICI182,780で1時間処理した。その後、1μMの17β-エストラジオールで24時間前処理した後、小胞体ストレスを誘導するポジティブコントロールとしての1μMのツニカマイシン、または5μMのアミロイドβ単量体及び凝集体を添加した。負荷48時間で細胞から蛋白質を回収し、SDS-PAGE後にウェスタンブロッティングを行い、免疫染色によりGRP78の発現を検討した。

ツニカマイシンを負荷した細胞では、ツニカマイシンを負荷しない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。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を添加した神経細胞と比較して、有意にGRP78の発現が増加した。ICI182,780は17β-エストラジオールのみ処理を行った細胞と比較して、有意にGRP78の発現を減少させた(図2)。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GRP78発現の増加を認めた。17β-エストラジオールを添加した細胞では、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の発現が増加した。ICI182,780で前処理すると、17β-エストラジオール処理を行った細胞における

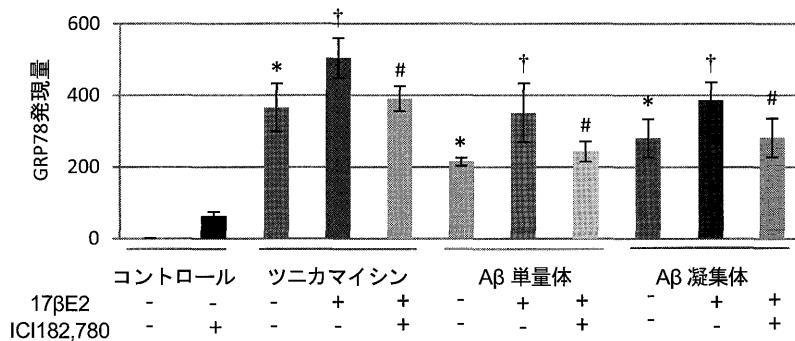


図2 PC-12のGRP78発現に及ぼす17β-エストラジオールと受容体阻害下での影響

* : p < 0.05 vs コントロール
 † : p < 0.05 vs without 17βE2
 # : p < 0.05 vs without ICI182,780

GRP78発現の増加が、有意に減少した (図2)。

従って、ツニカマイシン、アミロイドβが惹起する小胞体ストレスに対する応答としてのGRP78誘導は、女性ホルモンのエストロゲンによって活性化されたが、その効果はエストロゲン受容体を介したものであることが示された。

4.3 小胞体ストレスによる細胞死に及ぼす17β-エストラジオールとエストロゲン受容体阻害剤の影響

最後に、女性ホルモンの小胞体ストレスへの作用がエストロゲン受容体を介しているか否かを、ストレス応答の破綻として生じる細胞死、アポトーシスに対するエストロゲン受容体阻害剤の効果を指標として検討した。PC-12を 2×10^6 個/mL で播種し、24時間後に100 μM のICI182,780で1時間処理した。その後、1 μM の17β-エストラジオールで24時間前処理した後、1 μM のツニカマイシン、または5 μM のアミロイドβ凝集体を添加し、負荷48時間でTUNEL法を用いてアポトーシスを起こしている細胞数を測定した。

ツニカマイシンを負荷した神経細胞では、ツニカマイシンを負荷しないコントロール群と比較して有意なアポトーシスの増加を認めた。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を有意に抑制した。それに対し、ICI182,780処理を行った細胞は、17β-エストラジオールのみ処理を行った細胞と比較してアポトーシス細胞数が有意に増加した (図3)。さらにアミロイドβ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アポトーシスの増加を認めた。17β-エストラジオールはアミロイドβ凝集体によるアポトーシスに対し、有意な抑制を示した。ICI182,780処理を行った細胞では、17β-エストラジオールのみ処理を行った細胞と比較してアポトーシス細胞数が増加傾向にあったが、有意ではなかった (図3)。

従って、ツニカマイシン、アミロイドβが惹起する小胞体ストレスの結果としてのアポトーシスは、女性ホルモンのエストロゲンによって抑制されたが、その効果のすべてがエストロゲン受容体を介した作用ではないということが示された。

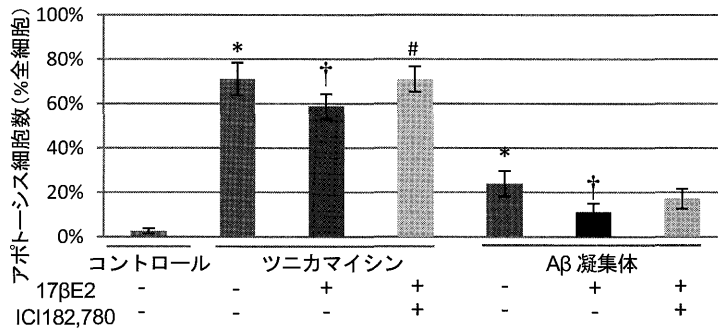


図3 PC-12のアポトーシスに及ぼす17β-エストラジオールと受容体阻害下での影響

* : p < 0.05 vs コントロール

† : p < 0.05 vs without 17βE2

: p < 0.05 vs without ICI182,780

5 考察

本研究では、女性ホルモンがエストロゲン受容体を介して小胞体ストレスに対する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した。その結果、

1) 小胞体ストレス誘導剤のツニカマイシンとアルツハイマー型認知症の原因物質とされるアミロイドβは、小胞体量増加、シャペロン蛋白質誘導、アポトーシスによる細胞死を惹起したことにより、PC-12培養神経細胞の小胞体ストレスを増加させた。2) 女性ホルモンの17β-エストラジオールは、シャペロン蛋白質誘導を増加させるとともに小胞体量の増加を抑制し、アポトーシスによる細胞死を減少させた。3) これらのエストロゲンの効果のうち、小胞体量増加の抑制とシャペロン蛋白質誘導の増加は、エストロゲン受容体阻害剤 ICI182,780 によって有意に抑制され、アポトーシス細胞の減少は部分的に抑制された。

5.1 エストロゲンのエストロゲン受容体を介した小胞体ストレス応答への影響

異常蛋白質を細胞外から取り込んだり、細胞内で異常蛋白質が産生されたりすると、細胞は小胞体に蓄積して処理する。このような異常蛋白質により小胞体に負荷がかかった状態を小胞体ストレスと呼ぶ。小胞体膜に存在するストレスセンサー蛋白質が小胞体ストレスを察知すると、小胞体から核へ至るシグナル伝達経路である Unfolded Protein Response (UPR) が活性化される。その結果、小胞体局在性の分子シャペロン GRP78などのストレス蛋白質が転写レベルで誘導され、異常蛋白質を処理することによって小胞体の恒常性を維持しようとする。この現象は全ての真核細胞で認められ、細胞を危機的な状況から回避させる重要な応答システムである。これらのストレス応答によって回避できないような多量の異常蛋白質が蓄積した場合には、アポトーシスによる細胞死が誘導され、異常蛋白質を蓄積した細胞を排除する²¹⁾。このような細胞死経路の活性化は、αシヌクレインが関与するパーキンソン病や、SOD1が関与する筋萎縮性側索硬化症などの神経変性疾患、さらに糖尿病など多くの疾患の発症に関わっている

ことから、近年、小胞体ストレスが注目されている^{22),23)}。

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、アミロイド β が小胞体ストレスを惹起し、GRP78 誘導による UPR を活性化するが、過剰な小胞体ストレスはアポトーシスによる神経細胞除去を生じた。従って、アミロイド β による小胞体ストレスがアルツハイマー型認知症の原因となる可能性を細胞モデルから確認できた。またこのモデルにおいて、女性ホルモンの 17β -エストラジオールは UPR を増強させることによって過剰な小胞体ストレスを抑制し、アポトーシスによる細胞死を減少したことより、神経細胞に対する保護効果を発揮することも確認できた。そのメカニズムを検討するため、本研究ではエストロゲン受容体阻害剤である ICI182,780 を使用した。

エストロゲン受容体阻害剤はエストロゲンと構造が類似しており、受容体に対してエストロゲンと競合的に結合することによって作用する。従来用いられていたタモキシフェンなどの非ステロイド性のエストロゲン受容体阻害剤は、エストロゲンと競合して受容体に結合するが、受容体を活性化するアゴニスト機能を部分的に持っているために阻害効果が制限される。一方、ICI182,780 はアゴニスト活性を持たないため、既存のエストロゲン受容体阻害剤よりも強い抗エストロゲン作用を示す。従って ICI182,780 は、抗エストロゲン剤としてエストロゲン感受性乳癌の治療薬としても用いられている^{24),25)}。

ICI182,780 は 17β -エストラジオールによる小胞体ストレスの減少とシャペロン蛋白 GRP78 の発現量増加を抑制した。この結果は、 17β -エストラジオールの小胞体ストレス制御による神経保護効果はエストロゲン受容体を介することを示している。 17β -エストラジオール-エストロゲン受容体複合体は転写制御因子として働くことから、エストロゲンによる GRP78 発現の促進が、神経保護効果の発揮には重要であることが示唆される。

5.2 エストロゲンのエストロゲン受容体を介さないアポトーシスへの影響

17β -エストラジオールは、アミロイド β やツシカマイシンを負荷した神経細胞のアポトーシスによる神経細胞死も抑制した。しかし ICI182,780 は、エストロゲンの細胞死に対する効果を阻害したものの部分的であり、有意な抑制は示さなかった。従って、 17β -エストラジオールのアポトーシス抑制作用には、エストロゲン受容体を介さない経路があることが示唆される。エストロゲン受容体を介さない 17β -エストラジオールの作用としては、抗酸化作用があげられる。ポリフェノールやフラボノイドと同様に、エストロゲンの持つフェノール性水酸基はフリーラジカルを一電子還元することにより消去し、抗酸化物質として機能する可能性が考えられている²⁶⁾。

一方、アミロイド β は、2 または 3 量体を基本単位として多量体化する。その際、アミロイド β の 22 位付近において「毒性ターン」を形成する。その結果、アミロイド β のラジカル化に重要とされる 10 位のチロシンと 35 位のメチオニンが近接化し、メチオニンの硫黄原子がラジカル化される。それによって C 末端コアを核としてアミロイド β の凝集が進行する一方で、部分解離したカルボキシルラジカルが持続的に産生され、細胞毒性を示す²⁷⁾。従って、エストロゲンはアミロイド β が凝集する過程で産生されるフリーラジカルを消去することにより、神経細

胞に対する保護効果を発揮していることが示唆される。

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 β -エストラジオールはアミロイド β による小胞体ストレスを介したアポトーシスによる細胞死を抑制するが、その作用機構にはエストロゲン受容体を介した転写制御によるUPR活性化と、エストロゲン受容体を介さない抗酸化物質としての作用の二つが存在する。エストロゲンは前者では神経細胞内で作用し、後者では神経細胞外で保護効果を発揮すると考えられる。このようなエストロゲンの二つの作用が、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、2017年度神戸女学院大学研究所研究助成、神戸女学院大学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. Ingram J. (著), 桐谷知未 (翻訳). 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. 2015 ; 223-243.
2. Kandel ER, Schwartz JH, Siegelbaum SA, Jessell TM, Hudspeth AJ. (監修), 金澤一郎, 宮下保司 (翻訳). 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. 2014 ; 1302-1320.
3. Kumar V, Abul K, Aster JC. Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease, 9ed. ELSEVIER SAUNDERS. 2014; 811-849.
4. Turner PR, O'Connor K, Tate WP, Abraham WC. Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. Prog. Neurobiol. 2003; 70: 1-32.
5. Albert B, Dennis B, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Robert K, Walter P (著), 中村桂子, 松原謙一 (監訳). Essential 細胞生物学 (原書第3版). 南江堂. 2011 ; 514-515.
6. Imai T, Endo K, Miyagishi H, Ishige K, Makishima M, Ito Y. Protective effect of S-allyl-L-cysteine against endoplasmic reticulum stress-induced neuronal death is mediated by inhibition of calpain. Amino Acids. 2014; 46: 385-393.
7. 工藤喬. 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. 2010 ; 30 : 163-168.
8. 工藤喬. 小胞体ストレスと精神神経疾患. 日本精神神経学雑誌. 2012 ; 114 : 115-123.
9. 永田和宏. タンパク質の一生—生命活動の舞台裏. 岩波書籍. 2008 ; 57-145.
10. 森和俊. 細胞の中の分子生物学. 講談社. 2016 ; 146-175.
11. 山本智美, 西田昌司. 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. 2016 ; 63 : 131-140.
12. 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/?page_id=806, 2017年9月7日閲覧.
13. Ingram J. (著), 桐谷知未 (翻訳). 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. 2015 ; 244-258.
14. 山本智美, 西田昌司. 女性ホルモンとアルツハイマー型認知症 II. 神戸女学院大学論集. 2017 ; 64 : 143-152.
15. 鈴木秋悦, 宮川勇生, 久保春海, 神崎秀陽. 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. 1999 ; 10-48.
16. 鈴木秋悦, 宮川勇生, 久保春海, 神崎秀陽. 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. 1999; 130-139.

17. 天野恵子. 性差医療. 真興交易株式会社医療出版部. 2005; 38-53.
18. 松本俊夫, 加藤茂明. 選択的エストロゲン受容体モジュレーター: SERM, 医薬ジャーナル社. 2001; 15-29.
19. 松本俊夫, 加藤茂明. 選択的エストロゲン受容体モジュレーター: SERM, 医薬ジャーナル社. 2001; 30-40.
20. Dahlgren KN, Manelli AM, Stine WB, Baker LK, Krafft GA, Jo LaDu M. Oligomeric and Fibrillar Species of Amyloid-beta Peptides Differentially Affect Neuronal Viability. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 32046-32053.
21. 上原考. 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*. 2014; 32: 2194-2200.
22. 永田和宏. タンパク質の一生—生命活動の舞台裏. 岩波書籍. 2008; 175-214.
23. 森和俊. 細胞の中の分子生物学. 講談社. 2016; 206-229.
24. 岩瀬弘敬, 山本豊. アロマトーゼ阻害薬耐性例に対する内分泌療法. *内分泌甲状腺外会誌*. 2012; 29: 284-288.
25. 矢野誠一, 鎌野世民, 佐藤稔康, 陳嵐. 閉経後進行・再発乳がん治療薬フルベストラント (フェソロデックス[®]) の薬理学的特徴および臨床試験成績. *日薬理誌*. 2012; 139: 75-82.
26. 中村成夫. 活性酸素と抗酸化物質の化学. *日医大医学会誌*. 2013; 9: 164-169.
27. 村上一馬. A β 毒性コンホマーの細胞内標的タンパク質. 上原記念生命科学財団研究報告書. 2015; 29: 1-6.

(原稿受理日 2018年2月9日)