

アミロイド β による神経細胞障害機構に及ぼすエストロゲンの効果

西 田 昌 司

The Effect of Estrogen on Neuronal Cell Disorders Elicited by Amyloid β

NISHIDA Masashi

要 旨

高齢化の進行に伴うアルツハイマー型認知症の増加は、社会全体で取り組む喫緊の課題となっているが、その病因や治療法は確立されていない。

本研究では、アルツハイマー型認知症の病因としてのアミロイド仮説と疫学的な性差を細胞モデル検討するため、培養神経細胞 PC-12 のアミロイド負荷モデルを用いて、(1) アミロイド β が神経細胞内に取り込まれるか、(2) アミロイド β が細胞内で活性酸素を産生するか、(3) 女性ホルモンのエストロゲンがアミロイド β による活性酸素産生を抑制するかを検討した。

その結果、神経細胞はアミロイド β の単量体、凝集体を細胞内に取り込み、細胞内に取り込まれたアミロイド β 凝集体は活性酸素を産生した。女性ホルモンの 17β -エストラジオールはアミロイド β の取り込みには影響を与えないが、取り込んだアミロイド β 凝集体による活性酸素産生を抑制した。かかるエストロゲンの作用は、エストロゲン受容体を介していなかった。

以上の結果より、アミロイド β は細胞内の酸化ストレス亢進によって神経細胞死を惹起し、女性ホルモンが抗酸化性を発揮することにより、アルツハイマー病の性差がもたらされ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、神経細胞、アミロイド β 、エストロゲン、酸化ストレス

Abstract

The morbidity of Alzheimer type dementia (AD) is increasing as the aging of society is progressing. Although the prevention of AD is becoming an urgent issue to be addressed by the society, its etiology and treatment have not been established yet.

We investigated three research questions regarding the relationship between the amyloid hypothesis as an etiology of AD and the epidemiological gender difference, using cultured PC-12 neuronal cells loaded with amyloid β : (1) whether PC-12 cells uptake amyloid β , (2) whether incorporated amyloid β produces active oxygen species in PC-12, and (3) whether female hormones suppress the production of reactive oxygen by amyloid β .

PC-12 incorporated monomers and aggregates of amyloid β into cells, and only amyloid β aggregates produced reactive oxygen species in the cells. A female hormone, 17β -estradiol, did not reduce the uptake of amyloid β in PC-12, but suppressed the reactive oxygen production by incorporated amyloid β aggregates. The action of 17β -estradiol was not mediated by estrogen receptors.

These results suggest that amyloid β induces neuronal cell death by the intracellular production of reactive oxygen and that female hormones exert antioxidative properties to protect neurons from oxidative stress.

Keywords: Alzheimer type dementia, neuron, amyloid β , estrogen, oxidative stress

人口の高齢化が進むに連れて、加齢に伴う認知症の増加が、個人のみならず社会にとっても喫緊の課題となっている。認知症の中で最も頻度が高いアルツハイマー型認知症は発症のメカニズムが未だ確立されておらず、従って有効な治療法の開発もなされていない¹⁾。従来、アルツハイマー型認知症に特徴的な病変として大脳皮質の神経細胞の脱落とともに老人斑と神経原線維性変化が報告され、病態形成との関係が注目されていた。近年、老人斑がアミロイド β と呼ばれる蛋白質からできていることが明らかとなり、アルツハイマー型認知症発症とアミロイド β との関係が検討されている。アミロイド β は、神経細胞膜に存在するアミロイド前駆蛋白質が切断酵素によって切断されて生成する。通常、前駆蛋白質の切断は可溶性部位を含むように α 位で生じるが、 β 位で切断された場合は可溶性部位を含まない蛋白質として切り出される。このようなアミロイド前駆蛋白質の異常な切断による不溶性蛋白質が、アミロイド β である。アミロイド β は重合し、さらに凝集して大きな塊をつくり、これが組織学的な老人斑となる。アミロイド β の凝集体は神経細胞内のタウと呼ばれる蛋白質の凝集を惹起し、これが神経細胞の障害である神経原線維性変化をもたらす²⁾。従って、神経細胞脱落の原因はアミロイド β の形成であると考えられる「アミロイド仮説」が有力視されている。

アミロイド前駆蛋白質の β 位での異常切断を起こす原因としては、アミロイド前駆蛋白質自体の構造異常やアミロイド切断酵素の異常が知られており、これらの蛋白質の異常は蛋白質をコードする遺伝子の異常として、アルツハイマー型認知症の5~10%を占める家族性アルツハイマー型認知症の原因となっている。一方、家族性のない孤発性アルツハイマー型認知症では、疫学的に頭部外傷や糖尿病、高血圧、脂質異常症などの生活習慣病が発症のリスクを上げ、低カロリー、低脂肪、魚・野菜食や抗酸化性の栄養素がリスクを下げる事が報告されている。また炎症とアルツハイマー型認知症発症との間にも相関が認められており、抗炎症薬の服薬歴がリスクを下げるとされている。また、孤発性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おり、男性と比べて女性での発症率が高く、特に閉経期以降で発症率が上昇する³⁾。そのため、女性ホルモンとアルツハイマー型認知症との関係が注目され、エストロゲン服用が認知症発症に及ぼす影響を検討する疫学調査がなされてきたが、服薬対象やプロトコルの違いから一定の結果を見るに至っていない⁴⁾。

私の研究室では、アルツハイマー型認知症発症と性差の関係をより直接的に検証するため、培養神経細胞のアミロイド β 負荷モデルを作成し、エストロゲンの影響を検討してきた。その過程で、アミロイド β 負荷はアルツハイマー型認知症の神経細胞脱落と同様のアポトーシスによる細胞死を神経細胞に誘導すること⁵⁾、細胞死は神経細胞の小胞体ストレスによってもたらされ、エストロゲンが小胞体ストレスの軽減によって細胞死を抑制すること⁶⁾、エストロゲンの効果がエストロゲン受容体との結合を介した小胞体ストレス応答の亢進によってもたらされること⁷⁾を見出した。不溶性のアミロイド β は神経細胞に取り込まれると分解系である小胞体に蓄積して小胞体ストレス⁸⁾を亢進し、エストロゲンは結合して転写因子として働き、小胞体ストレスに応答する蛋白質を誘導して細胞障害を軽減すると考えられる。一方アミロイド

β は単量体から多量体化する際に22位付近において「毒性ターン」を形成して凝集が進行するが、持続的に産生されるカルボキシルラジカルが水と反応することで活性酸素を産生することが知られている⁹⁾。そのため、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は、 β 単量体から多量体、凝集体へと変化する際に産生される活性酸素が神経細胞を傷害する機構も提唱されている。

本研究では、アミロイド β による神経細胞内での活性酸素産生が細胞障害に関与し、女性ホルモンが活性酸素産生を阻害することによって神経保護効果を発揮するかを検討するため、(1)アミロイド β が神経細胞内に取り込まれるか、(2)アミロイド β が細胞内で活性酸素を産生するか、(3)女性ホルモンのエストロゲンがアミロイド β による活性酸素産生を抑制するかの三点を、培養神経細胞のアミロイド負荷モデルを用いて検討した。

方 法

使用細胞

神経細胞として、理化学研究所セルバンクより供与されたラットの副腎髄質褐色細胞腫由来のPC-12を用いた。

アミロイドの調整

蛍光アミロイド β TAMRA- β -amyloid (コスモ・バイオ) をヘキサフルオロプロパノールに溶解したのち、アスピレーターを用いて乾燥させてフィルム状の単量体を作成した。単量体はDMSOに溶解し、さらに培養液で希釈して細胞に添加した。単量体を培養液で25倍に希釈し、4℃で24時間インキュベーションすることにより凝集体を作成した。凝集体も同様に培養液で希釈し、細胞に添加した。

蛍光顕微鏡を用いた観察

培養細胞に TAMRA- β -amyloid 単量体または凝集体を最終濃度5 μ Mになるように添加し、24時間培養した後にリン酸緩衝生理食塩水で洗浄した。蛍光顕微鏡 EVOS FL Auto (Thermo Fisher Scientific) を用いて、励起波長547 nm、蛍光波長574 nm でアミロイド β 取り込みを観察した。

フローサイトメトリーによる定量

蛍光アミロイド β の単量体または凝集体を取り込ませた細胞をトリプシンで剥離し、細胞濃度を 1×10^6 個/mlになるように調製した後、FACS Calibur (BD Bioscience) を用いてフローサイトメトリーによる単一細胞解析を行った。

活性酸素産生の検出

細胞に5 μ MのCellROX Orange (Thermo Fisher Scientific) を添加し、30分間CO₂インキュベーターで培養した後に、545 nmの励起光で生じる565 nmの蛍光を蛍光顕微鏡、または蛍光

プレートリーダー Fluoroskan FL (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。蛍光顕微鏡の観察では核を対比染色するために $1\ \mu\text{g/ml}$ の Hoechst 33342 (同仁化学研究所) を添加した。

17 β -エストラジオールの調整

17 β -エストラジオール (Sigma) にジメチルスルホキシドを添加して溶解し、さらに培養液でワーキング濃度に希釈して細胞に添加した。エストロゲンの阻害実験では、17 β -エストラジオールの100倍濃度の ICI182,780 (Abcam) で1時間前処理を行った。

統 計

統計解析ソフトウェア JMP (SAS) を使い、分散分析を行ったのちに、Tukey の HSD 検定で平均値を比較した。

結 果

アミロイド β の神経細胞への取り込み

神経細胞から細胞外に切り出されたアミロイド β が、神経細胞に取り込まれるかを検討するため、培養神経細胞 PC-12 に蛍光標識アミロイド β 単量体、または凝集体 $5\ \mu\text{M}$ を添加し、24時間後に蛍光顕微鏡で観察した。Figure 1 に示すように、細胞培養液に添加したアミロイド β 単量体、凝集体の蛍光 (矢頭) は、細胞表面に接着 (星印) するとともに、細胞内にも顆粒状に存在 (矢印) した。従って神経細胞は、アミロイド β の単量体、凝集体のいずれも細胞内に取り込むことが確認された。

また、アミロイド β 添加直後から48時間にかけて培養神経細胞を回収し、フローサイトメトリーを用いて蛍光を発する細胞を計数することにより、アミロイド β の取り込みを定量した。全細胞数で蛍光細胞数を割ることによってアミロイド β 取り込み率を計算すると、アミロイド β 単量体、凝集体のいずれにおいても PC-12 のアミロイド β 取り込み率は時間依存的に増加した。添加3時間後から48時間後のいずれの時間においても、アミロイド β を負荷していないコントロール細胞と比較して、有意にアミロイド β の取り込み率が増加した (Figure 2)。

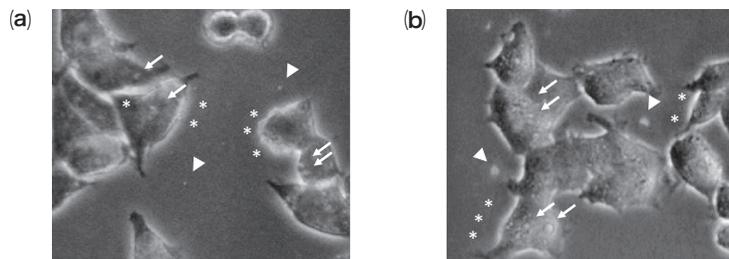


Figure 1 PC-12によるアミロイド β の取り込み

(a)単量体 (b)凝集体

矢頭：細胞外アミロイド β 星印：細胞表面アミロイド β 矢印：細胞内アミロイド β

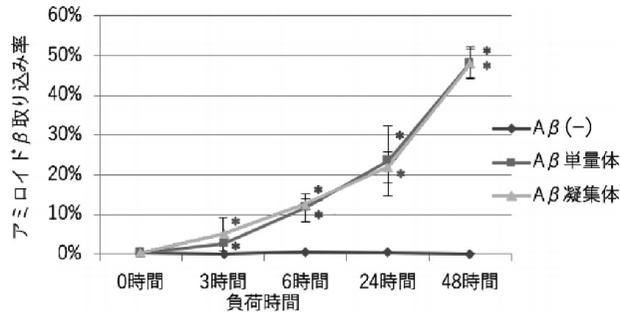


Figure 2 PC-12によるアミロイドβ (Aβ) の取り込み

* : $p < 0.05$ vs Aβ(-)

私の研究室では、培養神経細胞へのアミロイドβ負荷が神経細胞の小胞体ストレスを亢進することを報告してきた。以上の結果より、アミロイドβが実際に神経細胞内に入り、細胞の変性蛋白処理系の小胞体に取り込まれることによって小胞体ストレスを亢進させる可能性が示唆される。

アミロイドβ取り込みに及ぼす17β-エストラジオールの影響

次に、女性ホルモンがアミロイドβによる神経障害を抑制する機構に、今回確認された神経細胞へのアミロイドβ取り込みの阻害が関与するかを検討した。培養神経細胞を17β-エストラジオール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単量体、または凝集体5μMを添加し、48時間後のアミロイドβ取り込み率を測定した。48時間のアミロイドβ負荷によって、アミロイドβ単量体、凝集体ともに約50%の神経細胞に取り込まれたが、17β-エストラジオールはいずれのアミロイドβの取り込み率も減少させなかった (Figure 3)。従って、女性ホルモンは神経細胞へのアミロイドβの取り込み段階には影響を及ぼさないと考えられる。

アミロイドβによる活性酸素の産生

凝集により活性酸素を産生することが報告されているアミロイドβが、神経細胞に取り込

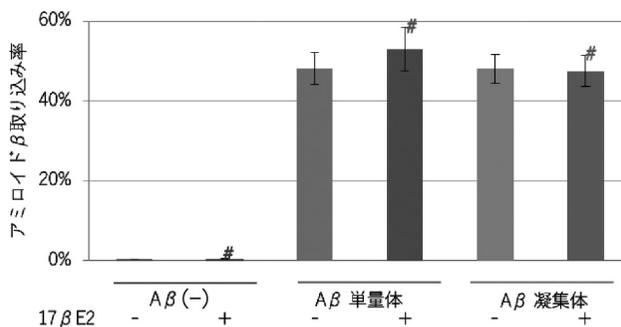


Figure 3 PC-12によるアミロイドβの取り込みに及ぼす17β-エストラジオール (17βE2) の影響

: n.s. vs 17βE2-

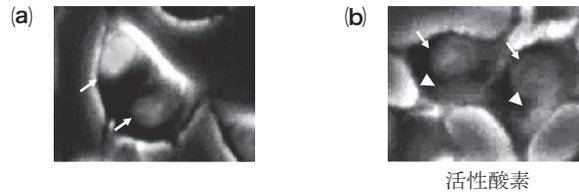


Figure 4 アミロイドβによる活性酸素の産生

(a) Aβ(-) (b) Aβ凝集体

矢印：Hoechst33342による核の蛍光

矢頭：CellROX Orange による細胞質の蛍光

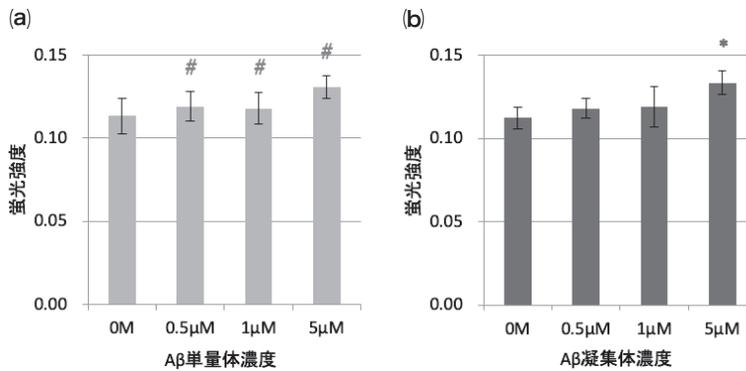


Figure 5 アミロイドβによる活性酸素の産生

(a) Aβ単量体 (b) Aβ凝集体

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

まれた後に活性酸素を産生するかを検討した。活性酸素産生は、活性酸素種と反応する蛍光試薬 CellROX Orange の蛍光強度を指標として定量した。PC-12を培養し、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。添加24時間後に CellROX Orange を用いて蛍光染色を行った。蛍光顕微鏡による観察を行うと、アミロイドβを添加しなかったコントロールでは、Hoechst33342で対比染色を行った核(矢印)以外には、細胞質では蛍光を認めなかった。一方、アミロイドβ凝集体を負荷した細胞では、核の蛍光(矢印)以外に、細胞質にも CellROX Orange 由来の蛍光(矢頭)が認められ、活性酸素が産生されていることが確認できた(Figure 4)。

アミロイドβによる活性酸素産生は単量体から凝集体を形成する時の立体構造変化が原因とされていることから、神経細胞へのアミロイドβ負荷による活性酸素産生を、アミロイドβ単量体と凝集体とで比較した。産生量の比較には、蛍光プレートリーダーによる蛍光強度の定量を用いた。同様にアミロイドβ単量体、または凝集体を負荷した後、CellROX Orange を添加して活性酸素量を測定すると、アミロイドβ単量体を添加した神経細胞では、0~5μMの範囲では活性酸素の有意な増加を認めなかった。一方、凝集体を負荷した細胞では、5μMの添加でアミロイドβを添加しないコントロールと比較して有意な増加を認めた(Figure 5)。

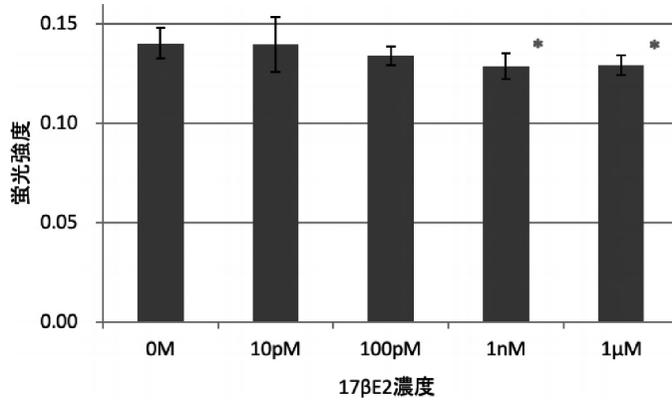


Figure 6 アミロイドβ凝集体が産生する活性酸素に及ぼす17β-エストラジオールの影響

* : p < 0.05 vs 0 M

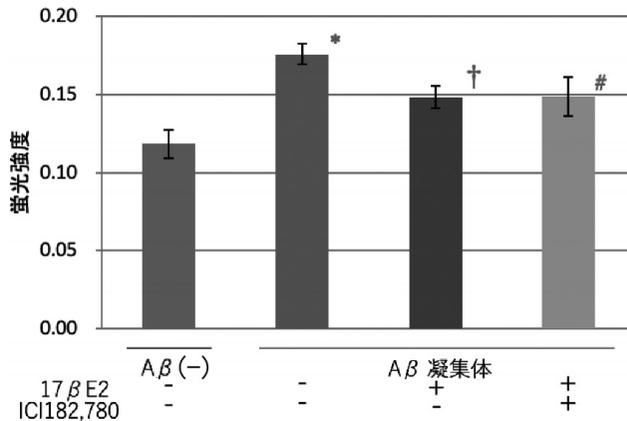


Figure 7 アミロイドβ凝集体が産生する活性酸素に及ぼす17β-エストラジオールと受容体阻害下での影響

* : p < 0.05 vs Aβ(-) † : p < 0.05 vs 17βE2(-) # : n.s. vs ICI182,780(-)

活性酸素に及ぼす17β-エストラジオールの影響

最後に、女性ホルモンがアミロイドβによる神経障害を抑制する機構に、神経細胞に取り込まれたアミロイドβによる活性酸素産生の抑制が関与するかを検討した。培養神経細胞を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、CellROX Orangeを用いて活性酸素産生を測定した。17β-エストラジオールはアミロイドβ凝集体の活性酸素産生を抑制し、1nMと1μMでは活性酸素産生を有意に減少させた (Figure 6)。

エストロゲンがアミロイドβ凝集体による活性酸素産生を抑制したメカニズムを検討するために、エストロゲン受容体を阻害するICI182,780を用いて実験を行った。PC-12を播種し、24時間後に100μMのICI182,780で1時間処理した後、上記と同様の方法で17β-エストラジオール1μM、アミロイドβ凝集体5μMを負荷し、活性酸素産生をCellROX Orangeを用い

て測定した。アミロイド β 凝集体添加によって無添加のコントロールと比較して有意に活性酸素産生が増加したが、 17β -エストラジオールによって約50%抑制された。しかし、ICI182,780による前処理を行っても、 17β -エストラジオールのみを添加した細胞と活性酸素産生量に変化しなかったことから、エストラジオールがアミロイド β による活性酸素産生を抑制する作用は、エストロゲン受容体を介して起こるものではないことが示された (Figure 7)。

考 察

本研究では、アルツハイマー型認知症の病因としてのアミロイド仮説と疫学的な性差を細胞モデル検討するため、培養神経細胞 PC-12 のアミロイド負荷モデルを用いて、(1) アミロイド β が神経細胞内に取り込まれるか、(2) アミロイド β が細胞内で活性酸素を産生するか、(3) 女性ホルモンのエストロゲンがアミロイド β による活性酸素産生を抑制するかの三点を検討した。その結果、神経細胞はアミロイド β の単量体、凝集体を細胞内に取り込むこと、細胞内に取り込まれたアミロイド β のうち、凝集体は活性酸素を産生すること、さらに女性ホルモンの 17β -エストラジオールはアミロイド β の取り込みには影響を与えないが、取り込んだアミロイド β 凝集体による活性酸素産生を抑制することが明らかとなった。また、エストロゲンによる活性酸素産生の抑制は、エストロゲン受容体を介していないことが示された。

アミロイド β による神経細胞障害

私の研究室では、培養細胞モデルにおいてアミロイド β 負荷がネクローシス、アポトーシスの両方による細胞死を増加させることを報告した⁵⁾。従来のアミロイド仮説では、アミロイド β による細胞障害は、細胞外に蓄積して老人斑を形成したアミロイド β 凝集体が、細胞外から神経細胞やシナプス構造を障害することによって起こる¹⁰⁾とされてきた。ネクローシスによる細胞膜障害はこのメカニズムによって説明しうるが、アポトーシスに至る経路をどうやってアミロイド β が活性化するかは不明であった。アミロイド β 負荷が小胞体ストレスを増加させることから小胞体ストレスの過剰がアポトーシスを惹起するメカニズムが考えられるが、今回、蛍光アミロイド β を用いてアミロイド β が実際に神経細胞内に取り込まれることを確認できたため、変性蛋白質を処理する小胞体にアミロイド β が蓄積し、小胞体ストレスの増大からアポトーシスに至ったことが示唆される。

アミロイド β が不溶性の凝集体を形成すると活性酸素を産生することも報告されている⁹⁾。この過程は細胞外からのアミロイド β による神経細胞障害機構として捉えられてきたが、今回、細胞内に取り込まれたアミロイド β 凝集体が、細胞内で活性酸素を産生することも明らかにできた。細胞内で産生された活性酸素は細胞内の蛋白質や膜系の脂質、核酸の酸化障害を起こし、ネクローシスによる細胞死の原因となる¹¹⁾。また、細胞内の酸化ストレス亢進はアポトーシスに至る情報伝達系を活性化¹²⁾することも知られており、細胞に取り込まれたアミロイド β 凝集体は活性酸素を産生することにより、ネクローシスとアポトーシスの両方による神経細胞死を惹起する可能性がある。

エストロゲンの作用機構

私の研究室では、女性ホルモンのエストロゲンがアミロイド β による神経細胞のアポトーシスを抑制することも報告した⁶⁾。その際、エストロゲンは小胞体ストレス応答の一環としてシャペロンの GRP78 の誘導を亢進し、小胞体ストレスを軽減した。これらの反応はエストロゲン受容体拮抗薬によって阻害⁷⁾されたことから、エストロゲンがエストロゲン受容体と複合体を形成し、転写因子として作用したことを示している。

一方、エストロゲンは構造上の特徴から抗酸化作用を持つことも知られている¹³⁾。今回、細胞内に取り込まれたアミロイド β 凝集体が産生した活性酸素をエストロゲンが減少させたことから、エストロゲン自体が抗酸化作用を発揮して、アミロイド β 凝集体による細胞障害を減少する可能性も考えられる。エストロゲン受容体拮抗薬がエストロゲンによる活性酸素抑制を阻害しなかったことから、受容体を介さない直接的な作用でエストロゲンが作用していることが示唆される。今回用いたエストロゲン拮抗薬の ICI182,780 はエストロゲンと類似した構造も持つことから、ICI182,780 自体が抗酸化作用を発揮した可能性もあるが、大過剰の ICI182,780 添加によってもエストロゲン以上の抗酸化作用を発揮しなかったことから、今回の実験系では、両者の抗酸化機能は競合していない。

アルツハイマー型認知症の病原論としてのアミロイド仮説は、様々な臨床研究や動物実験系で検討¹⁴⁾され、その有用性が確認されてきた。今回の培養細胞を用いたアミロイド β 負荷モデルでの一連の検討で、アミロイド β の神経細胞障害メカニズムと疫学的な性差の関係を明らかにすることができた。今後、エストロゲンと類似の構造を持つ植物エストロゲン¹⁵⁾がどのような作用を発揮するかを検討することで、植物エストロゲンを含む大豆などの食習慣によって、アルツハイマー型認知症の予防が可能になると期待される。

本研究の一部は、2018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) 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, 第5版. メディカル・サイエンス・インターナショナル; 2014 : 1302-1320.
- 2) Kumar V, Abbas AK, Aster JC. In: Robbins Basic Pathology, 10ed. ELSEVIER; 2018: 874-877.
- 3) 矢崎義雄. 内科学 第11版. 朝倉書店; 2017 : 2132-2135.
- 4) Irvine K, Laws KR, Gale TM, Kondel TK. Greater cognitive deterioration in women than men with Alzheimer's disease: A meta analysis. J. Clin. Exp. Neuropsychol. 2012; 34: 989-998.
- 5) 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 : 129-140.
- 6) 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 : 141-152.
- 7) 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Ⅲ. 神戸女学院大学論集. 2018 ; 65 : 45-56.

- 8) 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.
- 9) 村上一馬. Amyloid 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.
- 10) 玉岡晃. アルツハイマー病の分子病態. 日医大医学会誌. 2012 ; 8 : 285-290.
- 11) Kumar V, Abbas AK, Aster JC. In: Robbins Basic Pathology, 10ed. ELSEVIER; 2018: 41-48.
- 12) Kumar V, Abbas AK, Aster JC. In: Robbins Basic Pathology, 10ed. ELSEVIER; 2018: 33-41.
- 13) 中川恵彰, 芳野恭士, 井上範江, 幸村定昭, 野口昌良, 石原実, 八木國夫. 卵巣摘出マウスの過酸化脂質レベルとエストロゲンおよびカテコールエストロゲン投与の影響. 日本産科婦人科学會雑誌. 1989 ; 41 : S241.
- 14) 高橋秀樹. アルツハイマー病動物モデルの特性. 日薬理誌. 2010 ; 136 : 6-10.
- 15) 鈴木秋悦, 宮川男生, 久保春海, 神埼秀陽. 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 : 148-153.

(原稿受理日 2019年2月12日)