

論文の内容の要旨

氏名：今 井 徹

博士の専攻分野の名称：博士（薬学）

論文題名：Amyloid β -peptide による小胞体ストレス誘発海馬神経細胞死増強機構と S-allyl-L-cysteine の神経保護作用に関する研究

【背景・目的】

アルツハイマー病 (AD)は、認知障害を主徴とする神経変性疾患であり、早期病変として老人斑が認められ、その後、神経原線維変化を生じ、最終的に神経細胞の変性・脱落などを生ずることが明かとなっている。これまで AD の発症機構として、老人斑の主要成分である amyloid β -peptide (A β)による神経細胞障害が原因であるという β -アミロイド仮説が広く受け入れられていた。しかし、A β の蓄積と AD 発症が関連しない知見も報告されるようになり、神経細胞死を誘発する様々なファクターが A β と関連しながら、AD を引き起こすと考えられるようになりつつある。近年、AD 発症に神経炎症や老化に関わる小胞体の機能不全によって生じるストレス (小胞体ストレス)が関与していることが示され、A β の毒性との関連性が注目されている。当研究室においても、長期間培養したラット海馬切片培養系において、A β が小胞体ストレス特異的なシステインプロテアーゼである caspase-12 の活性化を介して細胞死を誘発することを見出している。しかし、A β が小胞体ストレスによる細胞毒性に対して、どのような影響を及ぼすのかについては不明のままである。また、当研究室では、以前より成熟ニンクエキス中に含まれるチオアリル化合物である S-allyl-L-cysteine (SAC)が、初代培養海馬神経細胞において、A β および小胞体ストレス誘導薬である tunicamycin (TM)誘発細胞死を顕著に抑制することを報告している。しかし、SAC が海馬神経細胞において、どのようなメカニズムで小胞体ストレス誘発細胞死抑制作用を示すのかについては不明のままである。

そこで本研究では、A β の細胞死誘発メカニズムを明らかにする一環として、海馬特有の神経回路およびその機能が保持されている切片培養系において、A β が小胞体ストレス誘発細胞死に及ぼす影響について精査した。また、SAC の神経保護作用の機序について、切片培養系、初代培養系および *in vitro* の calpain 活性測定系で詳細に検討した。

【方法】

海馬切片は、6~7 日齢の Wistar 系ラットの海馬を 400 μ m に薄切し、得られた切片を Millicell-CM 膜上に 3 週間培養し実験に供した。また、初代培養海馬神経細胞は、妊娠 18 日齢の Wistar 系ラットから摘出した胎児の海馬より調製し、5~6 日間培養後に実験に供した。細胞死の評価は、propidium iodide (PI)染色、3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)法で行い、小胞体ストレス関連タンパク質の挙動は、Western blot 法により検討した。Calpain 活性 (*in vitro*)は、Calpain-GloTM Protease Assay kit (Promega)およびリコンビナントの calpain を用いて測定した。

【結果および考察】

1. A β による小胞体ストレス誘発海馬細胞死増強機構

培養 3 週間後のラット海馬切片に、A β ₁₋₄₀および A β ₁₋₄₂のコア配列部分である A β ₂₅₋₃₅ 25 μ M を 48 時間単独暴露しても、死細胞である PI 陽性細胞は認められなかったが、TM 20, 40, 80 μ g/mL の暴露は、CA1, CA3, 歯状回の全領域において、濃度依存的な細胞死が認められた。次に、A β ₂₅₋₃₅ 25 μ M と TM 40 μ g/mL 併用暴露 (A β +TM)による影響を検討したところ、A β ₂₅₋₃₅による TM 誘発細胞死の増強作用が認められた。この A β ₂₅₋₃₅による TM 誘発細胞死増強機構を明らかにするため、小胞体ストレス関連タンパク質の挙動について検討した。TM 単独暴露により、分子シャペロンの glucose-regulated protein (GRP)94, GRP78 および転写因子の C/EBP homologous protein (CHOP)の発現レベルが著しく上昇したが、A β ₂₅₋₃₅の併用による発現の上昇は認められなかった (Fig. 1A, B, C)。一方、calpain の活性化を示す α -spectrin 分解産物および caspase-12, caspase-3 の活性化体は、TM 暴露により有意な増加が認められ、A β ₂₅₋₃₅との併用によりさらに増加した (Fig. 1D, E, F)。次に、TM および A β +TM が誘発する細胞死に caspase-12 が関与しているか否かについて、caspase-12 特異的阻害薬である z-ATAN-fmk (ATAN)を用いて検討したところ、ATAN は海馬全領域において TM および A β +TM 誘発細胞死を顕著に抑制した。さらに、calpain の活性化の亢進に細胞内 Ca²⁺濃度の上昇

が関与するか否かを明らかにするため、細胞内 Ca^{2+} キレート薬の BAPTA-AM を処置したところ、TM 単独による細胞死に対しては影響を及ぼさなかったが、 $\text{A}\beta_{25-35}$ による TM 誘発細胞死増強作用を CA3 領域においては、ほぼ完全に消失させた。以上の結果より、培養海馬切片において、 $\text{A}\beta_{25-35}$ は細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇により calpain を活性化し、caspase-12 および caspase-3 の活性化を増強することにより、細胞死を増強することが示された。

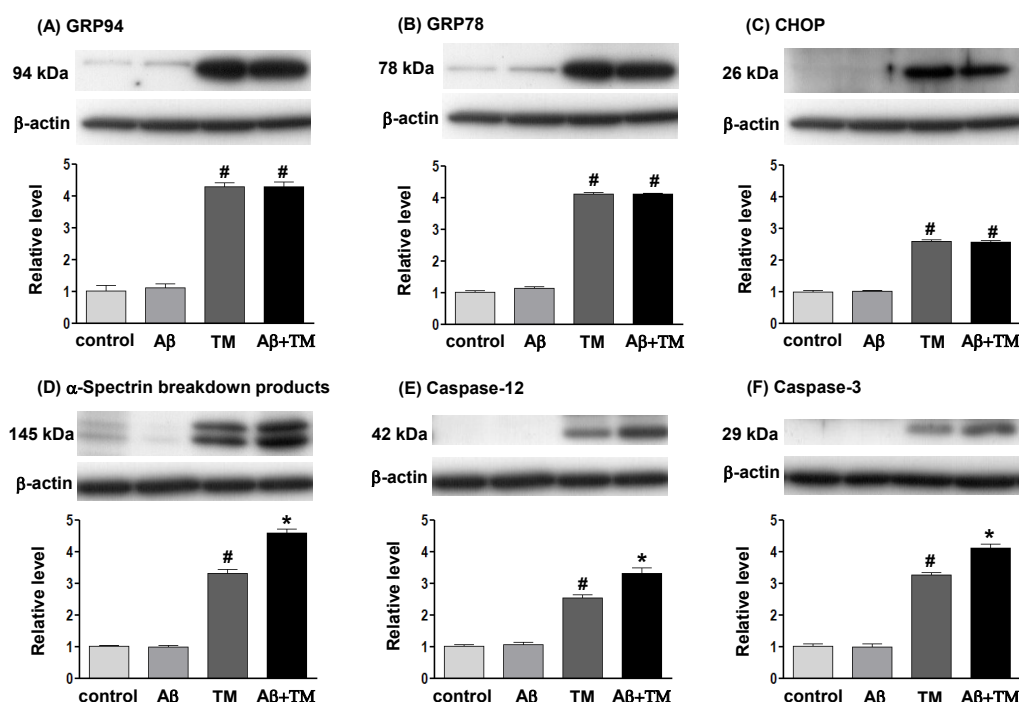


Fig. 1. Effects of $\text{A}\beta_{25-35}$, TM and $\text{A}\beta$ +TM on endoplasmic reticulum stress-related proteins in organotypic hippocampal slice cultures.

#P < 0.05 as compared with the control, *P < 0.05 as compared with TM alone.

2. 小胞体ストレス誘発細胞死に対する SAC の神経細胞保護作用

培養 3 週間後の海馬切片において、TM および $\text{A}\beta$ +TM 誘発細胞死に及ぼす SAC (100 μM)の影響を調べたところ、TM 単独では歯状回、 $\text{A}\beta$ +TM では CA3 領域および歯状回において、顕著な細胞死抑制作用を示した。そこで、小胞体ストレス関連タンパク質の発現について検討したところ、SAC は TM および $\text{A}\beta$ +TM の暴露による GRP94, GRP78, CHOP の発現上昇には影響を及ぼさなかったが、 α -spectrin 分解産物および caspase-12, caspase-3 の活性化体の発現を抑制した。以上の結果より、SAC の海馬神経細胞保護作用には、caspase-12 を制御している calpain 活性の阻害が関与することが考えられた。

3. 小胞体ストレス誘発海馬細胞死における calpain に対する SAC の作用

SAC の神経保護作用を明らかにするために、SAC と構造的に類似性が高い L-cysteine (CYS) および N-acetylcysteine (NAC) (Fig. 2) が TM 誘発細胞死に及ぼす影響について、初代培養海馬神経細胞を用いて MTT 法により比較検討した。SAC は有意な TM 誘発細胞死抑制作用を示したが、CYS および NAC は細胞死抑制作用を示さなかった。そこで、calpain 活性に及ぼすシステイン関連化合物の影響について検討するため、*in vitro* の calpain 活性測定系において、まず既知の calpain 阻害薬である calpeptin の阻害効果を調べたところ、 μ -calpain および m-calpain 活性に対して濃度依存的な阻害を認め、 IC_{50} 値も既報と同程度の値が得られた (Fig. 3A, B)。SAC は μ -calpain および m-calpain の活性を濃度依存的に阻害したが、calpeptin と比較して緩やかな阻害作用を示し、高濃度においても完全には阻害しなかった。また、SAC の μ -calpain 阻害作用は、m-calpain よりも低濃度側において認められた (Fig. 3C, D)。

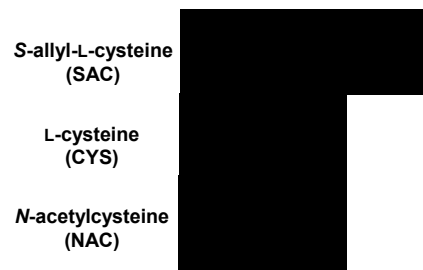


Fig. 2. Chemical structure of cysteine derivatives.

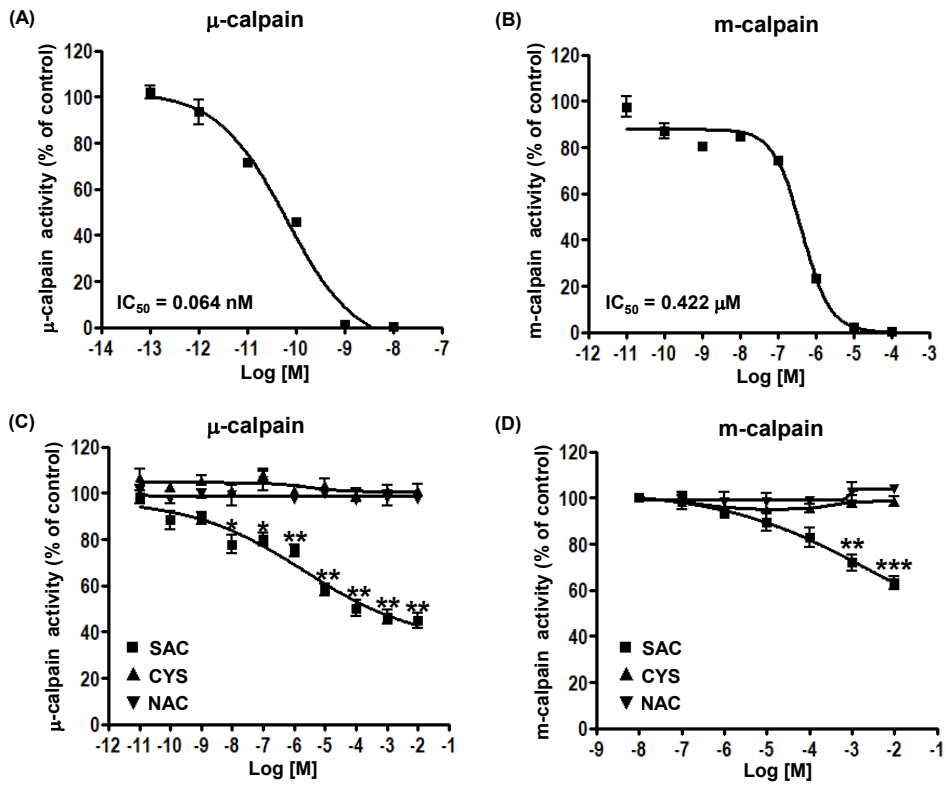


Fig. 3. Effects of calpeptin (A, B) and cysteine derivatives (C, D) on μ -calpain and m-calpain activity. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ as compared with control (vehicle).

内在性の calpain 阻害タンパク質である calpastatin は、calpain の活性を調節しているが、AD においては、calpastatin の発現が減少することで、calpain の過剰な活性化が誘発され、障害発生の一因となっているとの報告がある。そこで、calpastatin の μ -calpain 阻害作用に及ぼす SAC の影響について検討したところ、SAC は低濃度の calpastatin が示す μ -calpain 阻害作用を増強したが、高濃度の calpastatin による最大の μ -calpain 阻害作用に対しては影響を及ぼさなかった。次に、SAC が calpain のどの領域を作用点としているかを明らかにするために、calpain の活性中心に作用する阻害薬である ALLN および Ca^{2+} 結合部位に作用する阻害薬である PD150606 の作用を SAC の存否において検討した。両阻害薬が μ -calpain を最大に阻害する濃度において、SAC は ALLN の阻害作用に対しては影響を及ぼさなかったが、PD150606 の阻害作用を有意に抑制した (Fig. 4A, B)。以上の結果より、SAC は calpain の Ca^{2+} 結合部位との相互作用により、 $\text{A}\beta$ の細胞死増強作用を抑制する可能性が示唆された。

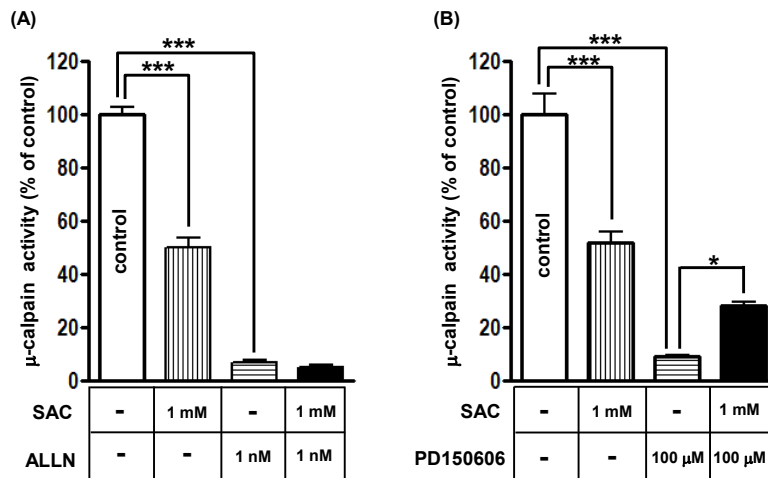


Fig. 4. Effects of SAC on inhibition of μ -calpain by ALLN (A) or PD150606 (B). * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

【結論】

A β ₂₅₋₃₅ 単独では細胞死を誘発しない培養 3 週間後の海馬切片において, A β ₂₅₋₃₅ は GRP94, GRP78 や CHOP の発現に影響を及ぼさず, 細胞内 Ca²⁺濃度の上昇により, calpain の活性化を引き起こし, caspase-12 を介して, 小胞体ストレス誘発細胞死を増強することを示した。また, SAC は培養海馬切片においては, 特に A β ₂₅₋₃₅ により増強された小胞体ストレス誘発細胞死に対して顕著な保護作用を示すことが明らかとなった。その保護作用には, SAC が calpain の Ca²⁺結合部位との相互作用を介して, calpain 活性を緩徐に阻害することが少なくとも一部関与することが示唆された。