

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

今 井 徹

2014

目次

第1章 諸言.....	2
第2章 培養海馬切片における A β による小胞体ストレス誘発海馬神経細胞死 増強機構.....	8
2-1 序論.....	9
2-2 方法.....	11
2-3 結果.....	15
2-4 考察.....	24
2-5 小括.....	28
第3章 小胞体ストレス誘発海馬神経細胞死における calpain に対する SAC の 作用.....	30
2-1 序論.....	31
3-2 方法.....	33
3-3 結果.....	35
3-4 考察.....	41
3-5 小括.....	45
第4章 総括.....	47
参考文献.....	50
謝辞.....	60

第 1 章

諸言

アルツハイマー病 (AD)は、認知症の1つに分類される神経変性疾患で、現在の我が国における認知症の代表的な疾患である。最大の危険因子が「加齢」であるADは、超高齢化社会を迎えている我が国において、患者数が増加の一途をたどり、厚生労働省の患者調査の概況によると、平成20年度は24万人と推定された患者数(1)が、平成23年度には36万人と1.5倍に増加しており(2)、社会的にも大きな問題となっている。ADの病理学的特徴としては、早期病変として老人斑が認められ、その後、神経原線維変化が生じ、最終的には神経細胞の変性・脱落などを生ずることが明かとなっている(3)。老人斑は主として神経細胞外に沈着する amyloid β -peptide ($A\beta$)により形成され、神経原線維変化は神経細胞内に蓄積する線維状のタンパク質よりなり、tau タンパク質が過剰にリン酸化されて形成される。ADの原因については諸説あるものの、家族性ADの原因遺伝子として同定された amyloid precursor protein (APP)、presenilin 1 (PS1)、presenilin 2 (PS2)などの変異のすべてが $A\beta$ の産生量を増加させること(4)、神経原線維変化がADだけではなく、多くの神経変性疾患で認められるのに対して、ADにおいては $A\beta$ の蓄積と神経毒性発症との間の関連性が高いこと(5)から、 $A\beta$ がAD発症に重要な役割を演ずるという β -アミロイド仮説が広く受け入れられている。しかし、近年の画像診断技術の進歩により、 $A\beta$ の蓄積を可視化することが可能になると(6)、 $A\beta$ の蓄積と認知障害発症が相関しないという例も報告されるようになる(7)とともに、変異APPのトランスジェニックマウス脳では $A\beta$ の沈着が多数観察されるが、神経細胞死が認められないことも報告されている(8)。これらのことから、 $A\beta$ の蓄積だけではAD発症は説明できず、長期間にわたる $A\beta$ の蓄積と神経細胞に障害を引き起こす様々な要因が関連してADを発症するという新たな説が提唱されるようになり、 $A\beta$ の細胞毒性に関連する要因の検証が盛んに行われている。海馬は、大脳皮質側頭葉の内側面に位置し、記憶、学習に重要な脳部位で、ADにおいて障害を受けやすく、海馬の神経細胞死が認知障害発症に関与することが知られており(9)、ADの予防法や治療法

に関する実験的研究に多用されている。当研究室では、ラット海馬切片培養系において、AD 発症に関連すると考えられるグルタミン酸受容体のサブタイプである *N*-methyl-D-aspartate (NMDA)受容体の異常な活性化により誘発される神経細胞死を、 $A\beta$ が増強することを明らかにしており、興奮毒性がその要因の一つであることを明らかにした (10)。

近年、AD 発症に小胞体の機能不全によって生じる小胞体ストレスが関与していることが示され (11)、 $A\beta$ の毒性との関連性が注目されている。小胞体は、膜タンパク質や分泌タンパク質などの合成と修飾、細胞内 Ca^{2+} ストアとしての機能や脂質代謝などを担う重要な細胞内小器官である。この小胞体機能が感染、炎症、遺伝子変異、加齢、虚血等の刺激により妨げられ、構造異常タンパク質が蓄積すると小胞体ストレスと呼ばれる状態が生じる (12)。小胞体ストレスが発生すると、inositol-requiring enzyme (IRE1)、PKR-like endoplasmic reticulum kinase (PERK)、activating transcription factor 6 (ATF6)などのストレスセンサーにより unfolded protein response (UPR)と呼ばれる機構が駆動され、構造異常タンパク質の折りたたみを促進する glucose-regulated protein (GRP)94、GRP78 などの分子シャペロンを誘導することで、タンパク質の合成や分解を制御し、ストレスを回避する (12)。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時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核の断片化や凝集を起こし、細胞死を誘発することが明かとなっている (11)。AD の危険因子である加齢や神経炎症は、UPR を低下させ、構造異常タンパク質の蓄積により、小胞体ストレス誘発細胞死を引き起こすこと (13, 14)、および $A\beta$ 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が報告されている (15)。当研究室においても、初代培養海馬神経細胞において、 $A\beta$ 誘発細胞死に caspase-12 の活性化を介した小胞体ストレスが関与していることを報告している (16)。また、長期間 (6~7 週間)培養したラット海馬切片培養系において、 $A\beta$ が 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 (17)。このように、 $A\beta$ が小胞体ストレスに関与していることが強く示唆されるが、加齢などにより誘発される小胞体ストレスによる細胞毒性に対して、 $A\beta$ が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。

AD では発症の初期からマイネルトの基底核や海馬においてコリン作動性神経が変性・脱落し、これらにより記憶障害を発症することが明らかにされたことから (18)、アセチルコリン量を維持することを目的として中枢指向性のアセチルコリンエステラーゼ阻害薬が開発され、**donepezil** (19)、**galantamine** (20)、**rivastigmine** (21)が上市に至っている。また、AD の進行期では NMDA 受容体の異常興奮が認められ、神経伝達におけるノイズが増大すること、および NMDA 受容体拮抗薬である **memantine** が、その異常状態を抑制し認知機能を改善することが明らかにされ (22)、治療薬として上市された。しかし、これらの薬物は、いずれも病態の進行を緩徐にする対症療法薬であり、根本治療は不可能である。また、無効な症例や副作用のために使用できない症例も報告されており (22, 23)、現在も新たな治療薬の開発が待たれている。

ニンニクは滋養強壮、疲労回復などの様々な健康効果を期待して、民間薬として広く用いられている。生ニンニクをエタノール水溶液中で熟成させた熟成ニンニクエキス中に含まれる水溶性低分子チオアリル化合物である **S-allyl-L-cysteine** (SAC) (Fig. 1)は、抗酸化作用 (24-26)、抗がん作用 (27)、抗肝毒性作用 (28)、神経栄養因子作用 (29)など様々な生理活性を持つことが報告されている。SAC は高い水溶性と安定性を有し、経口摂取により消化管から吸収されるが、重篤な副作用を示さないことがすでに明らかとなっている (30)。さらに、SAC の経口投与により老化促進マウスで認められる加齢に伴う学習障害を改善すること (31)や、ラット海馬内への $A\beta$ 投与により引き起こされる学習障害を、SAC の腹腔内投

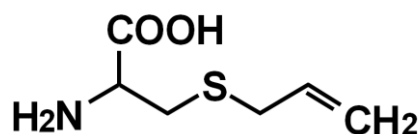


Fig. 1. Chemical structure of *S*-allyl-L-cysteine

与が抑制すること (32)が報告されており、末梢投与により中枢神経へ移行し、中枢保護作用を有することが示唆されている。当研究室は、SAC の薬理作用に注目しており、SAC が PC12 細胞において A β 誘発細胞死を抑制すること (33)、初代培養海馬神経細胞において A β により誘発された小胞体ストレス誘発細胞死や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 (16)。このように SAC は、小胞体ストレス誘発細胞死に対して抑制作用を示すことが明らかにされたものの、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詳細に検討した。

本論文は以下の論文を基礎とするものである。

1. Toru Imai, Yasuhiro Kosuge, Kaori Endo-Umeda, Hiroko Miyagishi, Kumiko Ishige, Makoto Makishima, Yoshihisa Ito.

Protective effect of *S*-allyl-L-cysteine against endoplasmic reticulum stress-induced neuronal death is mediated by inhibition of calpain.

Amino Acids, 46, 385-393, 2014.

2. Toru Imai, Yasuhiro Kosuge, Kumiko Ishige, Yoshihisa Ito.

Amyloid β -protein potentiates tunicamycin-induced neuronal death in organotypic hippocampal slice cultures.

Neuroscience, 147, 639-651, 2007.

第2章

培養海馬切片における $A\beta$ による 小胞体ストレス誘発海馬神経細胞死増強機構

2-1 序論

A β は、膜貫通タンパク質である APP を細胞外で切断する β -セクレターゼと膜貫通領域の細胞質側で切断する γ -セクレターゼによって段階的に切断されて生成する。 γ -セクレターゼは、APP を膜貫通部位内において、40 もしくは 42 番目のアミノ酸で切断し、A β_{1-40} または A β_{1-42} を産生させる (34)。また、この A β_{1-40} または A β_{1-42} の 25~35 番目にある 11 残基が、細胞毒性を発揮するのに必要なコア領域として知られている (35)。A β は、様々な細胞において、酸化ストレス (36, 37) や NMDA 受容体活性化 (22)、c-Jun N-terminal kinase (JNK) の活性化 (38) などを介して神経細胞死を誘発することが報告されている。しかし、前述したように AD の発症メカニズムは、A β が持つ細胞毒性だけでは説明できず、様々な要因が A β と関連して AD を引き起こすと考えられるようになりつつある。事実、A β は酸化ストレスと関連し、p53 のアポトーシス経路を介した細胞死を増強することが報告されている (39)。また、当研究室においても、3 週間の培養により成熟した培養海馬切片に対しては毒性を示さない濃度の A β が、長期間 (6~7 週間) 培養した培養海馬切片においては、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 (17)。したがって、AD の病因解明のためには、A β 単独による細胞毒性の研究だけではなく、AD 発症に関与する要因をふまえて、A β の細胞死誘発メカニズムを検討する必要がある。

前述した小胞体ストレスが引き起こすアポトーシス経路として、JNK 経路 (38, 40)、C/EBP-homologous protein (CHOP) 経路 (41, 42)、小胞体関連 caspase 経路 (15) が報告されている。JNK 経路は小胞体ストレスにより apoptosis signal-regulating kinase 1 が IRE1 と複合体を形成することにより、JNK をリン酸化し、アポトーシスを誘導する (38, 40)。また、CHOP は C/EBP ファミリーの転写因子として機能し、小胞体ストレスにより ATF6 および PERK の経路によって転写誘導され、Bax のミトコンドリア移行を介してアポトーシスを誘導することが報告されている (41)。一方、小胞体ストレス特異的に活性化する

caspase 経路として、caspase-12 が齧歯類において同定されている (15)。Caspase-12 は、他の caspase ファミリーと同様に前駆体である pro-caspase-12 (60 kDa)が合成され、小胞体膜の細胞質側に局在し、小胞体ストレス負荷時に切断されて活性化体の caspase-12 (42 kDa)として作用し細胞死を引き起こす (15)。Caspase-12 の活性化機構については、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇により活性化される Ca^{2+} 依存性システインプロテアーゼである calpain (43)および IRE1 と tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 の複合体が関与しているという報告がある (44, 45)。活性化された caspase-12 は、cytochrome c や apoptotic protease-activating factor 1 とは関係せず、caspase-9、caspase-3 を活性化する経路が示されており、従来まで知られていたミトコンドリア経路の活性化による細胞死実行カスケードと異なる経路が報告されている (44, 46, 47)。しかし、 $\text{A}\beta$ が、このような小胞体ストレス誘発細胞死に対して、どのような影響を及ぼすのかは不明である。

海馬は間脳の背側を走る三日月様構造をなし、錐体細胞が占めるアンモン角 (cornu ammonis : CA)と顆粒細胞が占める歯状回 (dentate gyrus : DG)により構成される。さらに、海馬の錐体細胞は、細胞の大きさにより小細胞性の CA1 と大細胞性の CA3 領域に分類される。海馬切片培養系は細胞の位置関係や神経回路が *in vivo* と同じ状態を保持しており、長期にわたる薬物の処置が可能などの利点から、神経細胞死のメカニズムの解明のために積極的に用いられている (48, 49)。

そこで、本章では、 $\text{A}\beta$ の細胞死誘発メカニズムを明らかにする目的で、海馬切片培養系において、 $\text{A}\beta$ が小胞体ストレス誘発細胞死に及ぼす影響について検討した。また、SAC の小胞体ストレス誘発細胞死に対する保護作用についても併せて検討した。

2-2 実験方法

1. 使用薬物

本研究で使用した薬品は以下の会社から購入したものをを用いた。A β ₂₅₋₃₅ は株式会社ペプチド研究所より、anti-caspase-12 monoclonal antibody、Hanks' balanced salts (HBSS)、protease inhibitor cocktail、tunicamycin、anti-caspase-12 polyclonal antibody は Sigma-Aldrich より、sodium hydrogen carbonate、D (+)-glucose、bovine serum albumin (BSA) は和光純薬工業株式会社より、Minimum Essential Medium (MEM) は Invitrogen より、結晶ペニシリン G、硫酸ストレプトマイシンは明治製菓株式会社より、ウマ血清は TRACE より、propidium iodide (PI) は Molecular Probes より、caspase-12 inhibitor は Biovision より、HEPES、BAPTA-AM は同仁化学研究所より、Tween 20 は National Diagnostics より、anti- α -spectrin monoclonal antibody は CHEMICOM より、anti-caspase-3 monoclonal antibody は Cell Signaling Technology, Inc より、anti-KDEL monoclonal antibody は stressgen より、anti-GADD153/CHOP polyclonal antibody、anti-rat-IgG-horseradish peroxidase (HRP)、anti-rabbit-IgG-horseradish peroxidase、anti-mouse-IgG-HRP は Santa Cruz Biotechnology, Inc より、ECL は Amersham Biosciences より購入した。また、その他の薬品は試薬特級を使用した。

2. 培養海馬切片の調製

培養海馬切片の調製は Ito らの報告 (10) に従った。動物実験は、日本大学薬学部動物実験指針に基づいて行った。Wistar 系雌雄ラットは、三協ラボサービス株式会社より購入し、日本大学薬学部実験動物センターで飼育・交配し、妊娠ラットを得た。実験には妊娠ラットの出産により得られた 6~7 日齢の新生ラットを用いた。生後 6~7 日齢の Wistar 系ラットから麻酔下、無菌的に海馬を摘出し、McIlwain 型 tissue chopper (The Mickle Laboratory Engineering) を用いて、厚さ 400 μ m に薄切し、6-well culture plate (IWAKI) に挿入した Millicell-CM

(Millipore)の膜上で培養した。メディウムは MEM 50%、HBSS 25%、ウマ血清 25%となるように混合し、ここにペニシリンとストレプトマイシンをそれぞれ 100 units/mL、0.1 mg/mL となるように添加したものをを用いた。海馬切片は、5% CO₂/ 95% air、32 °C、加湿条件下のインキュベーター内で一定期間培養した。培養期間中はメディウムの全量交換を 2~3 日毎に行った。

3. 培養海馬切片に対する薬物の暴露

薬物の暴露直前に培養用のメディウムを無血清メディウムに置換した。暴露は Bruce らの報告 (36)に従い、薬物を溶解した無血清メディウム 100 μL を切片に直接滴下した。

4. 細胞死の評価

細胞死の評価には、PI 染色または Lactate dehydrogenase (LDH) release 法を用いた。

(1) PI 染色

一定時間の薬物暴露後、メディウムを PI (50 μg/mL)を含む Locke 液 [154.0 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 2.3 mM CaCl₂, 3.6 mM NaHCO₃, 5.0 mM HEPES-NaOH, pH 7.4]に置換し、30 分間のインキュベート後、倒立式位相差顕微鏡を用い、340 nm の励起光を照射して蛍光像を観察し、写真撮影を行った。PI の蛍光強度は Sion image software を用いて解析した。定量法は Abdel らの報告 (50)に従い、蛍光が最大でプラトーになる TM 320 μg/mL で処置した切片の PI 蛍光強度を最大蛍光強度 (F_{max})、各薬物処置による蛍光強度を (F_i)、バックグラウンドを (F_0)とし、以下の式により細胞死の割合を算出した。

$$\text{Cell death (\%)} = (F_i - F_0) / (F_{max} - F_0) \times 100$$

(2) LDH release 法

メディアウム中への LDH の遊離量の測定は、LDH-Cytotoxic Test Wako (和光純薬工業株式会社)を用いて行った。一定時間の薬物暴露後、well 中のメディアウム 50 μ L を 96-well culture plate に移し、発色試薬を 50 μ L ずつ加え、室温で 45 分間反応させた後、反応停止液を 100 μ L ずつ加えた。反応停止から 10 分後にマイクロプレートリーダー (BIO-RAD)を用いて 570 nm の吸光度を測定した。

5. Nissl 染色

培養海馬切片に対して、toluidine blue (1 mg/mL)を 15 分間処置し、精製水とエタノールで洗浄した。さらに、toluidine blue (1 mg/mL)を 15 分間処置し、エタノールで洗浄した。染色した切片を倒立式位相差顕微鏡を用いて、写真撮影を行った。

6. タンパク質発現の評価

タンパク質発現の評価には、Western blot 法を用いた。一定時間の薬物暴露後にメディアウムを除去し、phosphate buffered saline (PBS) [137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM Na_2HPO_4 , 8.1 mM KH_2PO_4]で洗浄した後、lysis buffer [25 mM HEPES-NaOH, pH 7.4, 10 mM EGTA, 10 mM EDTA, 50 mM NaCl, 1% TritonX-100, 0.5% SDS, 1% sodium deoxycholate, 20 mM 2-mercaptoethanol, Complete protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics), phosphatase inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich)]中に回収した。タンパク定量を行い、一定の濃度になるように sample buffer [125 mM Tris-HCl (pH 6.0), 3% SDS, 10% glycerol, 5% 2-mercaptoethanol, 0.2% bromophenol blue]を加えて SDS 化したものをサンプルとし、電気泳動した。泳動終了後に Immobilon™-P Transfer Membrane (Millipore)に転写し、membrane を blocking buffer [5% skim milk in Tris buffered saline (TBS) [20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 137 mM NaCl]]中に移し、穏やかに攪拌しながら室温で 1 時間

ブロッキングした。ブロッキング終了後、0.05% Tween 20 を含む Tris buffered saline (TTBS) で洗浄し、目的タンパク質の一次抗体を 4 °C で一晩反応させた。TTBS で洗浄後、HRP で標識された二次抗体を室温で穏やかに攪拌しながら 1 時間反応させ、洗浄後に ECL により発色させた。内部標準として β -actin を用いた。バンドは Scion image software を用いて解析した。バンドの定量は、 β -actin のバンド強度に対する各タンパク質のバンド強度の割合で表した。

7. 統計学的処理

すべての値は平均値 \pm 標準誤差で示した。有意差検定は一元配置分散分析法 (one-way ANOVA) で解析後、Tukey's multiple test を用いた。

2-3 結果

1. A β ₂₅₋₃₅、TM およびその併用が培養海馬切片の生存に及ぼす影響

培養海馬切片の生存に及ぼす A β および TM の影響について検討した。実験には、A β ₁₋₄₀ および A β ₁₋₄₂ のコア配列部分で、A β ₁₋₄₀、A β ₁₋₄₂ とほぼ同等の細胞毒性を示すことが明らかにされている A β ₂₅₋₃₅ を用いた。培養 3 週間後の成熟ラット海馬切片に、2-2 で示した方法で A β ₂₅₋₃₅ 25 μ M、50 μ M を 48 時間単独暴露したところ、死細胞を示す PI 陽性細胞は認められなかった (Fig. 2A, B)。一方、TM 20、40、80 μ g/mL を単独で 48 時間暴露したところ、濃度依存的な PI 陽性細胞の増加が認められた (Fig. 2A, B)。TM は、20 μ g/mL の暴露により、DG 領域においてのみ PI 陽性細胞を増加させたが、40 μ g/mL では、DG 領域だけではなく CA1 領域においても PI 陽性細胞を増加させ、80 μ g/mL の暴露により、海馬の全領域で PI 陽性細胞を増加させた (Fig. 2D)。次に、細胞死を誘発しなかった A β ₂₅₋₃₅ 25 μ M が TM 誘発細胞死に及ぼす影響について検討した。A β ₂₅₋₃₅ 25 μ M と TM 20 μ g/mL の併用暴露は、TM 20 μ g/mL 単独に比べ PI 陽性細胞を増加させた (Fig. 2A, B)。さらに、A β ₂₅₋₃₅ 25 μ M と TM 40 μ g/mL の併用暴露においても、TM 40 μ g/mL 単独に比べ PI 陽性細胞の顕著な増加が認められた (Fig. 2A, B)。培養海馬切片からの LDH の遊離量の変化についても検討したところ、A β ₂₅₋₃₅ 25 μ M の単独暴露では、LDH 遊離量に変化は認められなかったが、TM 暴露により濃度依存的な LDH 遊離量の増加が認められた (Fig. 2C)。また、A β ₂₅₋₃₅ 25 μ M と TM 20 μ g/mL および TM 40 μ g/mL の併用暴露は、TM 単独暴露と比較し有意な LDH 遊離量の増加が認められた (Fig. 2C)。そこで、A β ₂₅₋₃₅ による TM 誘発細胞死増強作用について、領域別に解析を行ったところ、TM 20 μ g/mL との併用暴露の場合には、TM 単独と比較して、CA1、DG 領域において顕著な PI 陽性細胞の増加が認められたが、CA3 領域には有意な変化が認められなかった。一方、TM 40 μ g/mL との併用暴露の場合は、TM 単独と比較して、CA3 領域において顕著な PI 陽性細胞の増加が起り、CA1、DG 領域では有意

な変化が認められなかった (Fig. 2D)。

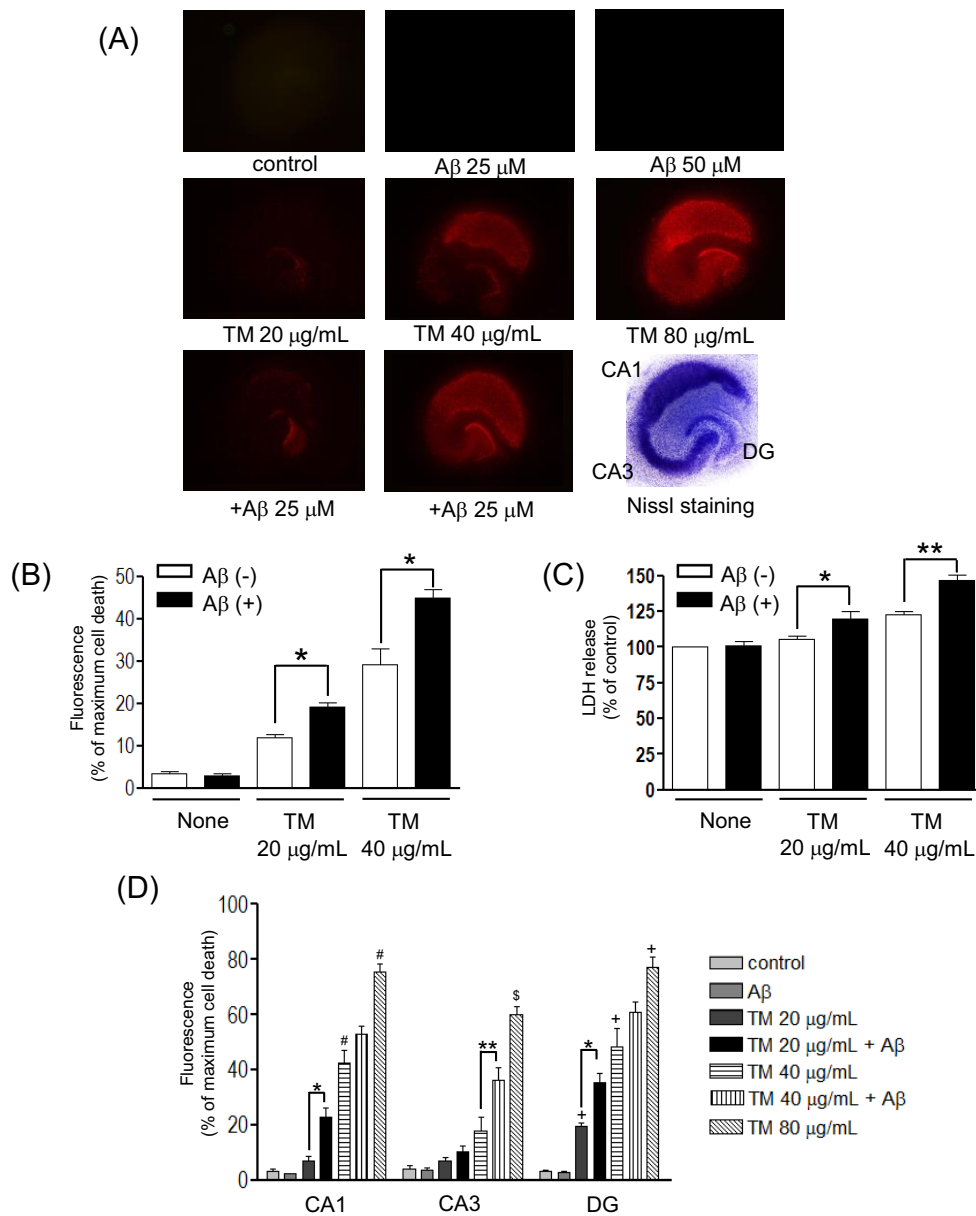


Fig. 2. Effects of Aβ₂₅₋₃₅, TM and Aβ₂₅₋₃₅ in combination with TM (Aβ+TM) on PI fluorescence and LDH release in rat organotypic hippocampal slice cultures (OHCs). The OHCs were prepared as described in Materials and Methods. (A) Representative photomicrographs of neuronal death assessed by PI fluorescence in OHCs treated with Aβ₂₅₋₃₅, TM or Aβ+TM. Aliquots (100 μL) containing Aβ₂₅₋₃₅, TM or Aβ+TM were applied directly to the top of each slice. PI fluorescence was measured 48 h after addition of each drug solution. Nissl-stained sections of 3-week-old OHC. (B) Quantitative analysis of Aβ₂₅₋₃₅-, TM- and Aβ+TM-induced neuronal death in OHCs. (C) After exposure, the amount of LDH released into the medium was assayed as described in Materials and Methods. (D) Quantitative analysis of Aβ₂₅₋₃₅-, TM- and Aβ+TM-induced neuronal death in areas CA1, CA3 and the DG. Fluorescence intensity (data shown in Fig. 2A) was analyzed quantitatively using the Scion image software package. Each value represents the mean ± S.E.M. for four (B and D) and five (C) different experiments. #P < 0.001, \$P < 0.001, +P < 0.001 when compared with each control. *P < 0.05, **P < 0.01.

2. A β ₂₅₋₃₅、TM およびその併用が培養海馬切片の小胞体ストレス関連タンパク質 GRP94、GRP78 および CHOP の発現に及ぼす影響

A β ₂₅₋₃₅ による TM 誘発細胞死の増強メカニズムを明らかにするために、A β ₂₅₋₃₅、TM および顕著な細胞死増強が認められた A β ₂₅₋₃₅ 25 μ M と TM 40 μ g/mL の併用暴露が、小胞体ストレス関連タンパク質 GRP94 (94 kDa)、GRP78 (78 kDa) および CHOP (26 kDa) の発現に及ぼす影響について検討した。A β ₂₅₋₃₅ 25 μ M 単独暴露では、GRP94、GRP78 および CHOP の発現レベルに変化は認められなかったが、TM 単独暴露によりこれらの発現レベルの有意な上昇が認められた (Fig. 3)。しかし、A β ₂₅₋₃₅ は TM によるこれらのタンパク質発現上昇に対して影響を及ぼさなかった (Fig. 3)。

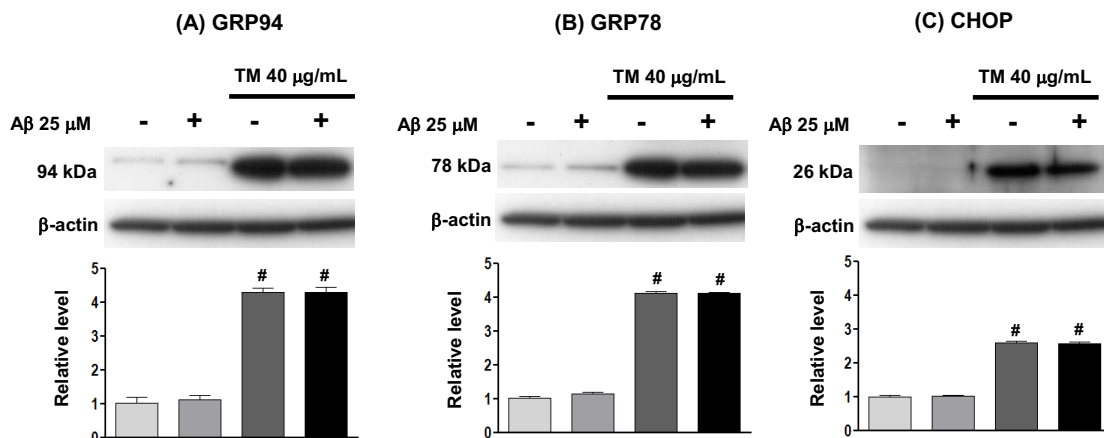


Fig. 3. Effects of A β ₂₅₋₃₅, TM and A β +TM on ER chaperone induction and CHOP expression in OHCs. (A) The expression of GRP94 (A), GRP78 (B) and CHOP (C) was investigated by Western blotting after exposure to A β ₂₅₋₃₅, TM or A β +TM for 48 h. Amounts of GRP94 (94 kDa), GRP78 (78 kDa) and CHOP (26 kDa) were assessed by densitometric analysis, and the relative level of each band was calculated as described in Materials and Methods. Each value represents the mean \pm S.E.M. for four different experiments. #P < 0.05 as compared with the control.

3. A β ₂₅₋₃₅、TM およびその併用が培養海馬切片の calpain 活性および caspase-12 と caspase-3 の活性化体の発現に及ぼす影響

A β ₂₅₋₃₅、TM およびその併用が calpain 活性および caspase-12、caspase-3 の活性化体の発現に及ぼす影響について検討した。Calpain 活性は、calpain の活性化

により分解を受ける神経特異的細胞骨格タンパク質の full-length α -spectrin (240 kDa)の分解産物の発現レベルを指標とした。 $A\beta_{25-35}$ 25 μ M 単独暴露は、 α -spectrin 分解産物 (145 kDa)および caspase-12 の活性化体 (42 kDa)、caspase-3 の活性化体 (29 kDa)の発現レベルに影響を及ぼさなかったが、TM 単独暴露はそれらすべての発現レベルを有意に上昇させた (Fig. 4)。また、 $A\beta_{25-35}$ を TM と併用暴露すると、GRP94、GRP78 および CHOP の場合とは異なり、TM 単独と比較して、有意な α -spectrin 分解産物および caspase-12、caspase-3 の活性化体の発現上昇が認められた (Fig. 4)。TM および $A\beta_{25-35}$ と TM 併用 ($A\beta$ +TM)が誘発する細胞死における caspase-12 の活性化の関与をさらに明らかにするため、caspase-12 の特異的阻害薬である z-ATAN-fmk (ATAN)前処置が TM および $A\beta$ +TM 誘発細胞死に及ぼす影響を検討した。ATAN 50 μ M は TM および $A\beta$ +TM 暴露 1 時間前に処置したところ、TM および $A\beta$ +TM 誘発細胞死を海馬の全領域において顕著に抑制した (Fig. 5)。

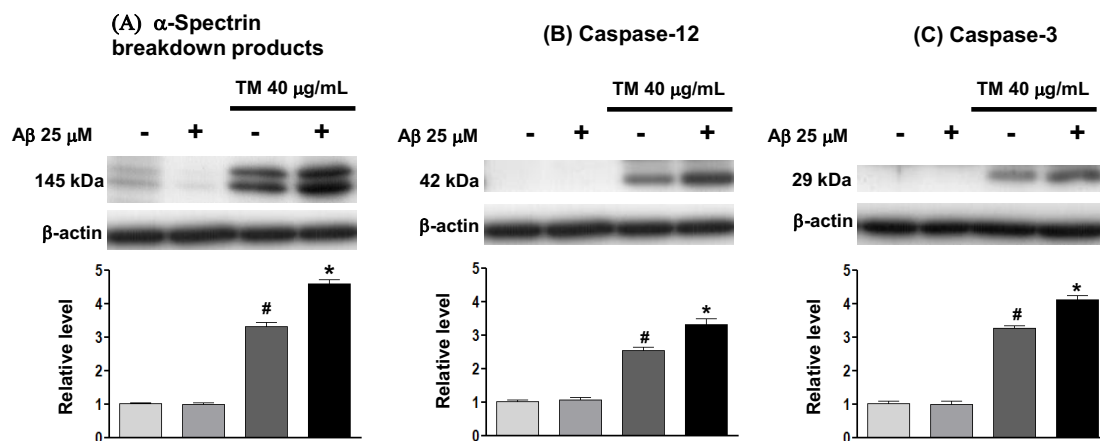


Fig. 4. Effects of $A\beta_{25-35}$, TM and $A\beta$ +TM on calpain activity and levels of the cleaved forms of caspase-12 and caspase-3 in OHCs. Calpain activity was assessed by the amount of α -spectrin breakdown products. α -Spectrin breakdown products (A), and levels of the cleaved forms of caspase-12 (B) and caspase-3 (C), were investigated by Western blotting after exposure to $A\beta_{25-35}$, TM or $A\beta$ +TM for 48 h. Amounts of α -spectrin breakdown products (145 kDa), caspase-12 (42 kDa) and caspase-3 (29 kDa) were assessed by densitometric analysis. Each value represents the mean \pm S.E.M. for three or four different experiments. # $P < 0.05$ as compared with the control. * $P < 0.05$ as compared with TM alone.

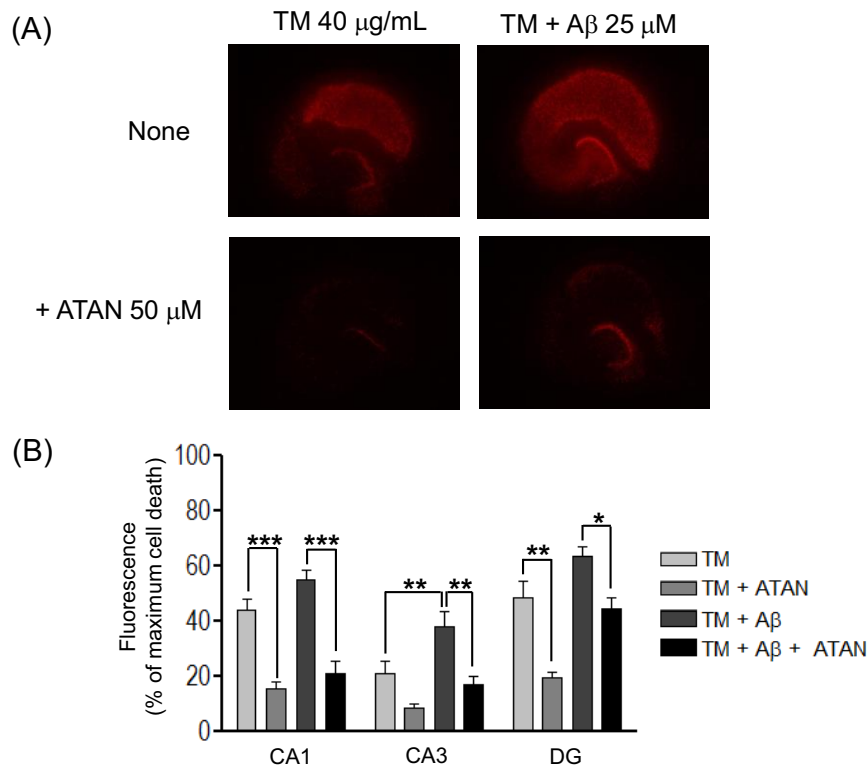


Fig. 5. Effects of the caspase-12-specific inhibitor, z-ATAN-fmk (ATAN), on TM- and Aβ+TM-induced neuronal death in OHCs. Cells were exposed to TM (40 μg/mL) in the absence or presence of ATAN (50 μM). (A) Representative photomicrographs of neuronal death assessed by PI fluorescence in OHCs. PI fluorescence images of OHCs were examined 48 h after the treatment. (B) Quantitative analysis of neuronal death in areas CA1, CA3 and the DG. Fluorescence intensity (data shown in Fig. 5A) was analyzed quantitatively using the Scion image software package. Each value represents the mean ± S.E.M. for four different experiments. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001.

4. Aβ₂₅₋₃₅ のTM誘発細胞死増強に及ぼす BAPTA-AM および nifedipine の影響

Fig. 4 で示したように、Aβ₂₅₋₃₅ と TM の併用は TM 単独よりも calpain 活性のレベルを上昇させたことから、この 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、細胞内 Ca²⁺キレート薬の BAPTA-AM および L 型 Ca²⁺チャネル遮断薬の nifedipine が TM および Aβ₂₅₋₃₅ と TM 併用 (Aβ+TM) 誘発細胞死に及ぼす影響により検討した。BAPTA-AM 10 μM を TM および Aβ+TM 暴露 1 時間前に処置したところ、TM 誘発細胞死には影響を及ぼさなかったが、CA3 領域において認められる Aβ₂₅₋₃₅ の TM 誘発細胞死増強を顕著に抑制した (Fig.

6A, B)。BAPTA-AM 処置の影響について LDH release 法を用いて検討したところ、BAPTA-AM 10 μ M は、 $A\beta$ +TM による LDH 遊離量の増加を有意に抑制した (Fig. 6C)。Nifedipine 前処置の影響についても検討したところ、nifedipine 10 μ M は、CA3 領域において認められる $A\beta$ +TM による細胞死の増強を顕著に抑制し (Fig. 6A, B)、 $A\beta$ +TM による LDH 遊離量の増加を有意に抑制した (Fig. 6C)。

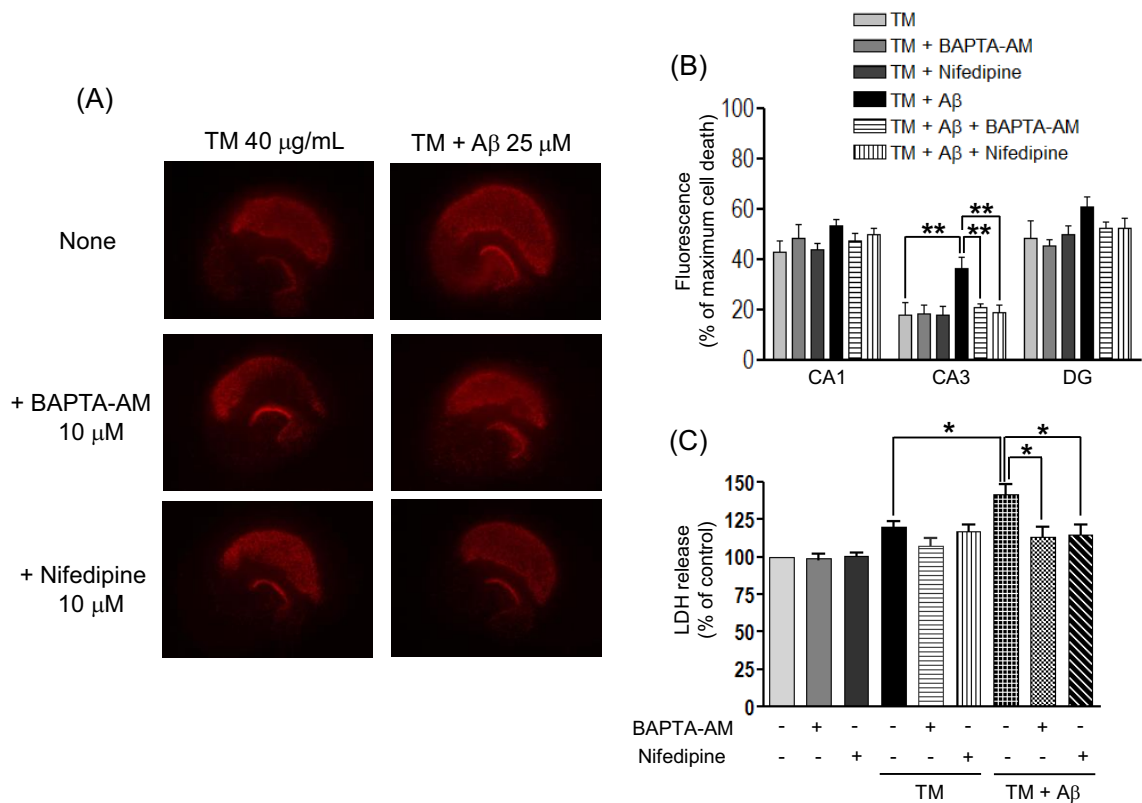


Fig. 6. Effects of BAPTA-AM and nifedipine on TM- and $A\beta$ +TM-induced neuronal death in OHCs. (A) Aliquots (100 μ L) containing TM or $A\beta$ +TM with or without BAPTA-AM and nifedipine were applied directly to the top of each slice. PI fluorescence was measured 48 h after addition of each drug solution. (B) Quantitative analysis of the effects of BAPTA-AM and nifedipine on TM- and $A\beta$ +TM-induced neuronal death in areas CA1, CA3 and the DG. Fluorescence intensity (data shown in Fig. 6A) was analyzed quantitatively using the Scion image software package. (C) After exposure, the amount of LDH released into the medium was assayed as described in Materials and Methods. Each value represents the mean \pm S.E.M. for four different experiments. * P < 0.05, ** P < 0.01.

5. 培養海馬切片における A β ₂₅₋₃₅ の TM 誘発細胞死増強に及ぼす SAC の影響

培養 3 週間後の海馬切片における TM および A β ₂₅₋₃₅ と TM 併用 (A β +TM) 誘発細胞死に及ぼす SAC の影響について検討した。培養海馬切片の DG 領域において、SAC は TM 誘発 PI 陽性細胞数を有意に減少させた (Fig. 7A, B)。また、A β +TM 誘発細胞死に対して CA3、DG 領域において、有意に PI 陽性細胞を減少させた。TM および A β +TM 誘発細胞死に対する SAC の細胞保護作用を評価するため、LDH 遊離量の変化を調べたところ、SAC は TM による LDH 遊離量の増加に対して抑制傾向を示し、A β +TM による LDH 遊離量の増加を有意に抑制した (Fig. 7C)。

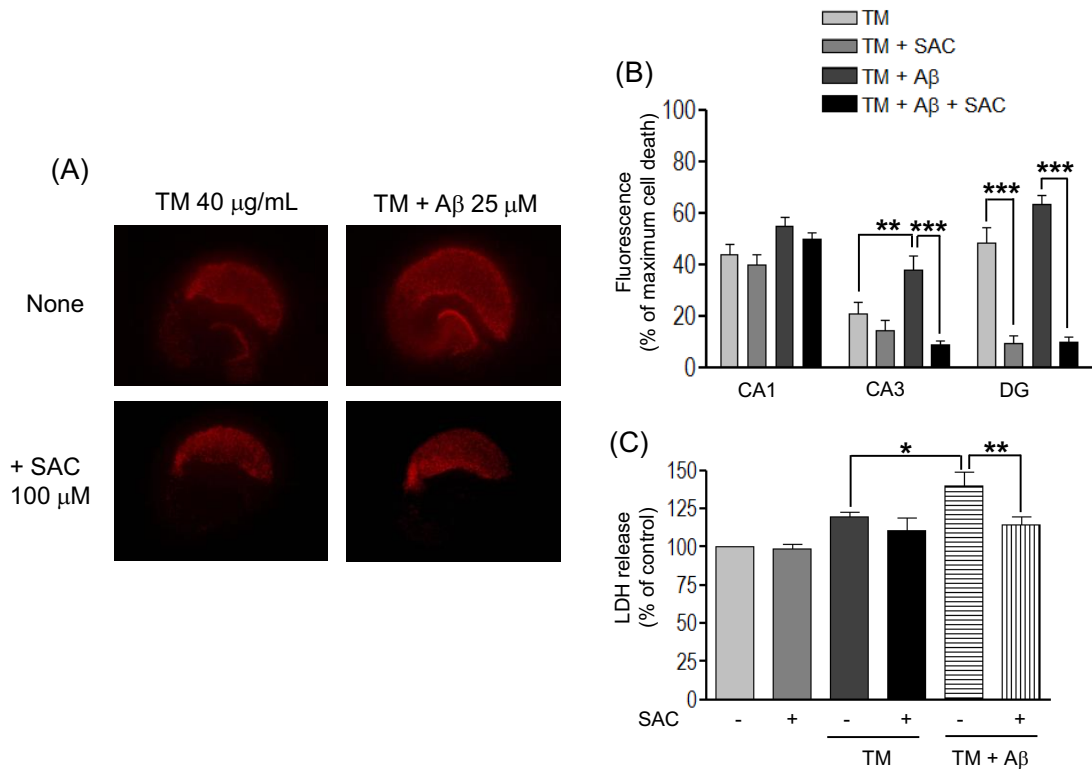


Fig. 7. Effects of SAC on TM- and A β +TM-induced neuronal death in OHCs. (A) Aliquots (100 μ L) containing TM or A β +TM with or without SAC were applied directly to the top of each slice. PI fluorescence was measured 48 h after addition of each drug solution. (B) Quantitative analysis of the effects of SAC on TM- and A β +TM-induced neuronal death in areas CA1, CA3 and the DG. Fluorescence intensity (data shown in Fig. 7A) was analyzed quantitatively using the Scion image software package. (C) After exposure, the amount of LDH released into the medium was assayed as described in Materials and Methods. Each value represents the mean \pm S.E.M. for four different experiments. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001.

6. 培養海馬切片における小胞体ストレス関連タンパク質の発現に及ぼす SAC の影響

A β ₂₅₋₃₅によるTM誘発細胞死増強に対するSACの抑制作用のメカニズムを明らかにする目的で、小胞体ストレス関連タンパク質の発現レベルの上昇に及ぼすSACの影響について検討した。Fig. 8に示したように、SACはTMおよびA β ₂₅₋₃₅とTM併用(A β +TM)暴露により上昇したGRP94、GRP78、CHOPの発現レベルには影響を及ぼさなかった。一方、SACはTM暴露により上昇した α -spectrin分解産物およびcaspase-12の活性化体の発現を有意に抑制し、A β +TM暴露により上昇した α -spectrin分解産物およびcaspase-12、caspase-3の活性化体の発現も有意に抑制した (Fig. 9)。

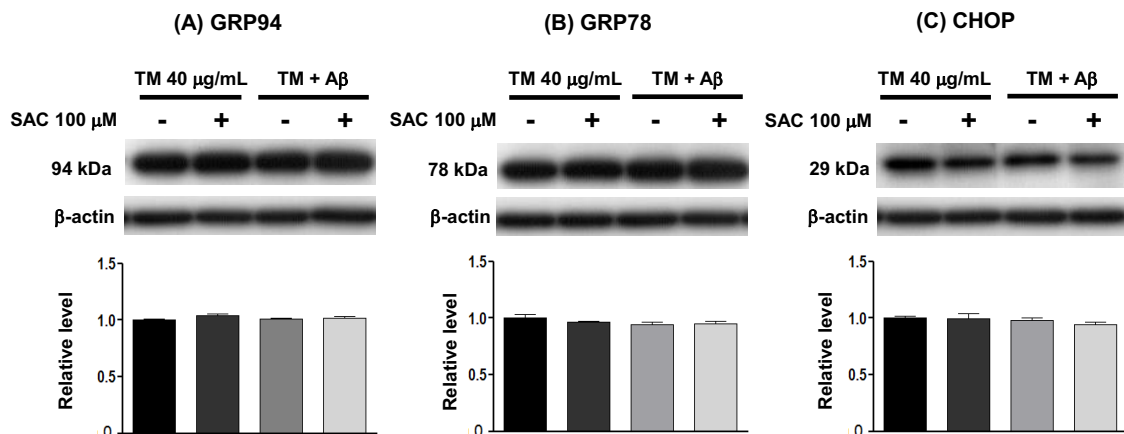


Fig. 8. Effects of SAC on ER chaperone induction and CHOP expression in OHCs. The expression of GRP94 (A), GRP78 (B) and CHOP (C) was measured after exposure to TM, A β +TM or SAC for 48 h. Relative amounts of GRP94 (94 kDa), GRP78 (78 kDa) and CHOP (26 kDa) were assessed by densitometric analysis. Each value represents the mean \pm S.E.M. for four different experiments.

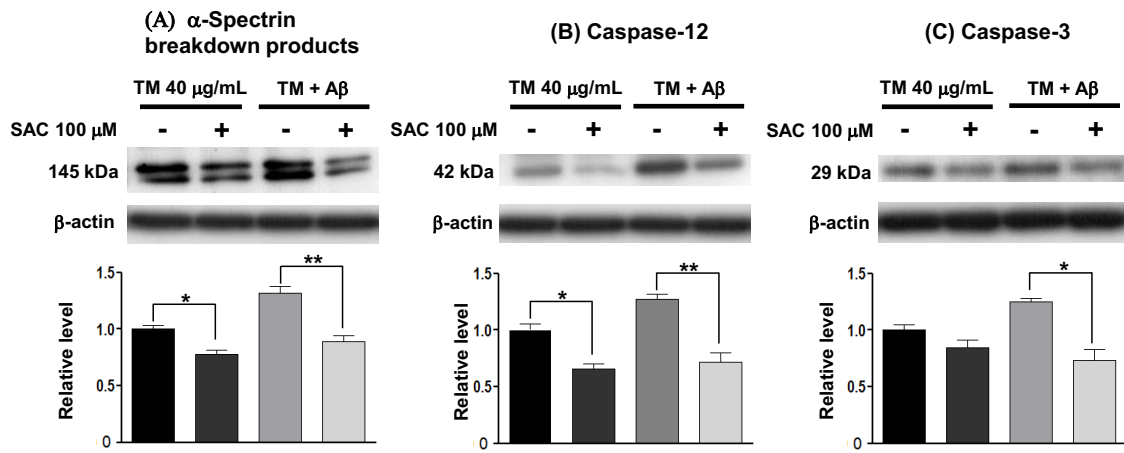


Fig. 9. Effects of SAC on ER stress-induced calpain activity and levels of the cleaved forms of caspase-12 and caspase-3 in OHCs. Calpain activity was assessed by the amount of α -spectrin breakdown products. α -Spectrin breakdown products (A) and levels of the cleaved forms caspase-12 (B) and caspase-3 (C) were measured after exposure to TM or A β +TM with or without SAC for 48 h. Relative amounts of α -spectrin breakdown products (145 kDa), caspase-12 (42 kDa) and caspase-3 (29 kDa) were assessed by densitometric analysis, and the relative levels were calculated as described in Materials and Methods. Each value represents the mean \pm S.E.M. for three or four different experiments. *P < 0.05, **P < 0.01.

2-4 考察

老人斑の主要成分である $A\beta$ は、神経細胞で毒性を示すことが報告されている (18)。一方、小胞体ストレスが AD 発症において重要な役割を担っていることが、当研究室を含めた数多くの研究者によって報告されている (11, 15, 16, 35, 51)。また、小胞体ストレスは、AD 発症の危険因子となる神経炎症や老化などにも密接に関係することが報告されている (13, 14)。しかし、 $A\beta$ が小胞体ストレス誘発細胞死にどのような影響を及ぼすのかについては不明な点が多い。そこで本章では、 $A\beta$ のコア配列である $A\beta_{25-35}$ が小胞体ストレス誘発海馬神経細胞死に対してどのような影響を及ぼすのか、海馬の神経構造を保持した海馬切片培養系を用いて検討を行った。 $A\beta_{25-35}$ は、初代培養海馬神経細胞や 7 週間培養した海馬切片において神経毒性を示すことが報告されているが (16, 17)、3 週間培養した海馬切片では、 $A\beta_{25-35}$ 25 μM 、50 μM の 48 時間暴露による細胞死は認められなかった (Fig. 2)。一方、小胞体の N-glycosylation 阻害により小胞体ストレスを惹起する TM (52) 単独暴露では、濃度依存的な細胞死が誘発された (Fig. 2)。当研究室においては以前に、初代培養海馬神経細胞において TM 暴露により濃度依存的な神経細胞死が起こることを報告しているが (16)、本研究における海馬切片培養系においても TM は細胞死を誘発することを明らかにした。また、Fig. 2 に示したように細胞死を誘発しない濃度の $A\beta_{25-35}$ 25 μM と TM の併用暴露により、TM 誘発細胞死の増強が認められた。 $A\beta_{25-35}$ と TM 併用による細胞死増強作用を海馬の領域 (CA1、CA3、DG) 別に解析したところ、 $A\beta_{25-35}$ と TM 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の併用は DG および CA1 領域の、TM 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ との併用は CA3 領域の細胞死を増強させることが明らかとなった (Fig. 2D)。これらの結果は、 $A\beta_{25-35}$ の TM 誘発細胞死増強作用には海馬の領域特異性が認められることを示唆している。当研究室では、内在性の pro-caspase-12 の発現量が、海馬の各領域で異なり、CA3 における発現量は CA1 や DG と比較すると顕著に低いことを報告している (53)。このことが TM 誘発細胞死に対する感受性の領域特異性と

少なくとも一部関連するものと考えられる。また、本研究で認められた $A\beta_{25-35}$ による TM 誘発細胞死の増強は、**pro-caspase-12** の発現レベルの高い DG または CA1 領域で早期に認められていることから、 $A\beta_{25-35}$ による細胞死増強は、**pro-caspase-12** の活性化が関与するアポトーシス経路を介していることが示唆された。

$A\beta_{25-35}$ による TM 誘発細胞死増強機構をさらに明らかにするため、小胞体ストレス関連タンパク質の挙動について Western blot 法を用いて検討した。分子シャペロンである **GRP94**、**GRP78** および転写因子である **CHOP** の発現は、TM 単独暴露により発現レベルが著しく上昇したが、 $A\beta_{25-35}$ を併用しても TM 単独との間に有意な差は認められず、増強効果を示さなかった (Fig. 3)。**CHOP** ノックアウト細胞では、TM により誘導されるアポトーシスが抑制されることから (54)、**CHOP** は TM による小胞体ストレス誘発細胞死に深く関与することが示唆されている。本研究においても、TM 暴露により **CHOP** が誘導されたことから、細胞死に深く関与する可能性が示唆された。しかし、 $A\beta_{25-35}$ の併用が、TM 単独暴露による **CHOP** 発現上昇に影響を及ぼさなかったことから、 $A\beta_{25-35}$ の TM 誘発細胞死増強機構には、分子シャペロンおよび **CHOP** は関与しないことが示唆された。**Caspase-12** 欠損胚性線維芽細胞は、TM 誘発細胞死や $A\beta$ 誘発細胞死に抵抗性を示すこと (15)、培養海馬神経細胞において、 $A\beta$ 誘発細胞死に **caspase-12** が関与していることが報告されている (16)。そこで、 $A\beta_{25-35}$ による TM 誘発細胞死増強機構への **calpain**、**caspase-12** および実行 caspase である **caspase-3** の関与について検討を行った。TM 暴露により誘発された α -spectrin 分解産物の産生 (**calpain** 活性) および **caspase-12**、**caspase-3** の活性化体の発現は、 $A\beta_{25-35}$ との併用により有意に増加した (Fig. 4)。また、**caspase-12** 特異的阻害剤である **ATAN** は、海馬全領域において TM および $A\beta$ +TM により引き起こされる細胞死に対して、顕著な抑制作用を示した (Fig. 5)。これまでに、変異 **PS1** を過剰発現させた PC12 細胞は、**calpain** と **caspase-12** の活性増大により TM 誘

発細胞死が増強すること (55)や、変異 PS1 をノックインした初代培養大脳皮質神経細胞では、caspase-12 の活性化の増大を介して TM 誘発細胞死が増強することが報告されている (56)。これらの報告と本研究の結果から、A β ₂₅₋₃₅ は TM 誘発細胞死に対して、calpain の活性の亢進を介して下流の caspase-12 の活性化を増強し、その結果、細胞死実行因子である caspase-3 の活性化の増大を引き起こすことにより細胞死を増強することが示唆された。A β ₂₅₋₃₅ による細胞死増強機構に calpain の関与が示唆されたことから、calpain の活性の亢進に細胞内 Ca²⁺ 濃度の上昇が関与するか否かを明らかにするため、BAPTA-AM と nifedipine 前処置の効果を検討した。BAPTA-AM は、TM 誘発細胞死に対して影響を及ぼさなかったが、A β ₂₅₋₃₅ による CA3 領域の細胞死増強を顕著に抑制した (Fig. 6)。また、nifedipine は、BAPTA-AM と同様に A β ₂₅₋₃₅ による CA3 領域の細胞死増強を顕著に抑制した (Fig. 6)。AD 患者脳 (57)や APP トランスジェニックマウス脳 (58)において、calpain 活性の亢進が認められることが報告されている。また、A β はイオンチャネルの形成 (59)や電位依存性 Ca²⁺チャネル (60)および小胞体のリアノジン受容体やイノシトール三リン酸受容体 (61)に作用して細胞内 Ca²⁺濃度を上昇させ細胞死を引き起こすことが報告されている。これらの知見と本研究の結果より、A β ₂₅₋₃₅ は L 型 Ca²⁺チャネルから Ca²⁺の流入を促進させて細胞内 Ca²⁺濃度の上昇を引き起こし、小胞体ストレスで活性化される calpain 活性を増強することが示された。本実験系において、BAPTA-AM が A β ₂₅₋₃₅ による TM 誘発細胞死増強を CA3 領域でのみ抑制し、CA1 および DG 領域では抑制しなかった。このことから、CA1 および DG 領域は BAPTA-AM ではキレートできない量の細胞内 Ca²⁺が関与して細胞死を引き起こしていることが示唆されるが、海馬の領域特異性については今後さらなる検討が必要と考える。

次に、TM および A β ₂₅₋₃₅ の TM 誘発細胞死増強に対する SAC の保護作用について検討した。その結果、SAC は TM 単独では DG 領域、A β +TM では CA3 領域および DG 領域において、顕著な細胞死抑制作用を示した (Fig. 7A, B)。当研

研究室では、これまでに初代培養海馬神経細胞において、SAC は TM 誘発細胞死を抑制することを報告している (16)が、本研究により、SAC は海馬切片培養系においても TM 誘発細胞死および A β ₂₅₋₃₅ による細胞死増強を領域特異的に抑制することが明らかとなった。次に、SAC が示す TM および A β +TM 誘発細胞死抑制作用のメカニズムを明らかにするために、小胞体ストレス関連タンパク質の発現変化について検討を行った。SAC は TM および A β +TM の暴露により上昇した GRP94、GRP78、CHOP の発現上昇には影響を及ぼさなかったが (Fig. 8)、 α -spectrin 分解産物および caspase-12 の活性化体の発現を有意に抑制した (Fig. 9)。以上の結果より、SAC の小胞体ストレス誘発細胞死に対する神経細胞保護作用には、calpain 活性の阻害を介した caspase-12 の抑制が関与していることが示唆された。

2-5 小括

3 週間培養した海馬切片において、

1. $A\beta_{25-35}$ 25 μ M、50 μ M は、細胞死を誘発しなかったが、TM 20、40、80 μ g/mL は濃度依存的に細胞死を誘発した。また、 $A\beta_{25-35}$ 25 μ M は TM 誘発細胞死を顕著に増強した。
2. $A\beta_{25-35}$ は、TM による GRP94、GRP78、CHOP の発現上昇に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著しく上昇させた。
3. Caspase-12 特異的阻害薬 ATAN は、TM および $A\beta_{25-35}$ と TM 併用により誘発される細胞死を海馬の全領域において顕著に抑制した。
4. BAPTA-AM と nifedipine は、 $A\beta_{25-35}$ による TM 誘発細胞死増強を CA3 領域で顕著に抑制した。
5. SAC は、 $A\beta_{25-35}$ の TM 誘発細胞死増強を顕著に抑制した。また、SAC は、TM および $A\beta_{25-35}$ と TM 併用による 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、caspase-12 および caspase-3 の活性化体の発現を抑制した。

以上の結果より、 $A\beta_{25-35}$ 単独では細胞死を誘発しない培養 3 週間後の成熟海馬切片において、 $A\beta_{25-35}$ が TM により誘発される小胞体ストレス誘発細胞死を増強することが明らかとなった。その細胞死増強機構には、L 型 Ca^{2+} チャンネルを介した細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇による calpain の活性化により、下流の caspase-12 および caspase-3 の活性をさらに亢進する機構が関与することが示唆

された。また、SAC の小胞体ストレス誘発細胞死に対する保護作用は calpain 活性の抑制が関与することが示唆された。

第 3 章

小胞体ストレス誘発海馬神経細胞死における calpain に対する SAC の作用

3-1 序論

前章の結果より、海馬切片培養系において、SAC は $A\beta_{25-35}$ による TM 誘発細胞死増強を顕著に抑制し、その保護作用には calpain 活性の抑制が関与することが示唆された。Calpain は細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇により活性化され、基質分子の構造や機能を変化させ、細胞骨格の維持、細胞増殖や細胞周期の制御等の様々な生理現象に関与している (62)。組織普遍的に発現している calpain には 2 種のアイソザイムが存在し、*in vitro* での活性化に必要な Ca^{2+} 濃度が μM レベルの μ -calpain と mM レベルの m-calpain に区別される (62)。通常、生体内では、内在性 calpain 阻害タンパク質である calpastatin が存在しており、生理的条件下の細胞内では、 μ -および m-calpain は calpastatin により活性が調節され、過剰な活性化が起きないように制御されている (62)。しかし、AD の患者においては calpastatin の発現が低下していることが報告されており (63)、AD 患者脳 (57) や APP トランスジェニックマウス (58) において、calpain 活性が亢進していることが報告されている。また、calpain は tau のリン酸化を亢進して神経細胞の変性・脱落を引き起こすことも報告されており (64)、AD の病因において重要な役割を演じるタンパク質であると考えられている。また、小胞体ストレス負荷時においては、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が起こり、過剰な μ -および m-calpain の活性化が引き起こされ、caspase-12、caspase-3 を介した神経細胞死を誘発することが報告されている (43)。さらに、calpain 欠損マウスから作成した胚性線維芽細胞は、caspase-12 の活性化の抑制や小胞体ストレス誘発細胞死に抵抗性を示すことが報告されており (65)、calpain は小胞体ストレス誘発細胞死における caspase-12 の活性化に重要な役割を果たすと考えられる。このように、小胞体ストレス誘発細胞死において calpain の関与が示唆されているものの、SAC が calpain の活性化に及ぼす影響や細胞保護作用の詳細については不明な点が多い。

そこで本章では、SAC の小胞体ストレス誘発細胞死に対する保護作用の機序

を明らかにする目的で、海馬初代培養系および *in vitro* の calpain 活性測定系を用いて、calpain に対する SAC の作用について検討した。

3-2 実験方法

1. 使用薬物

本研究で使用した薬品は以下の会社から購入したものをを用いた。N-Acetyl-Leu-Leu-Nle-CHO (ALLN)、protease inhibitor cocktail、tunicamycin、L-cysteine、N-acetylcysteine、[3-(4,5)-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium (MTT)、Hanks' balanced salts (HBSS)はSigma-Aldrichより、bovine serum albumin (BSA)は和光純薬工業株式会社より、TrypLE ExpressTM、Neurobasal medium、FBS、B27 supplementはInvitrogenより、HEPESは同仁化学研究所より、Tween 20はNational Diagnosticsより、calpeptin、anti- α -spectrin monoclonal antibody、calpastatin、purified μ -calpain、purified m-calpain、3-(4-iodophenyl)-2-mercapto-(Z)-2-propenoic acid (PD150606)はCHEMICOMより、anti-mouse-IgG-horseradish peroxidaseはSanta Cruz Biotechnology, Incより、ECLはAmersham Biosciencesより購入した。また、その他の薬品は試薬特級を購入して使用した。

2. 初代培養海馬神経細胞の調製

海馬神経細胞の初代培養法は、以前の報告 (16)に従った。動物実験は、日本大学動物実験運営内規に基づいて行った (承認番号 AP13P002)。Wistar系雌雄ラットは、三協ラボサービス株式会社より購入し、日本大学薬学部実験動物センターで飼育・交配し、妊娠ラットを得た。実験には妊娠18日目の胎児 (胎生18日齢)を用いた。胎生18日齢のWistar系ラットより海馬を摘出し、TrypLE ExpressTMおよび0.01% deoxyribonucleaseにより酵素処理した後、等量のFBSを添加し反応を停止し、1000 rpm、10分間遠心分離した。上清を除去した後、予めpoly-L-lysine処理済みのculture plate (ASAHI GLASS)に 5.0×10^5 個/cm²の密度で細胞を播種した。播種後48時間まではB27 supplementを含むDMEM/F12で、その後はB27 supplementを含むNeurobasal mediumで、5% CO₂/95% air、37°C、加湿条件下のインキュベーター内で5~6日 (合計7~8日)間培養した。培

養期間中は2~3日毎にmediumの交換を行った。

3. 細胞死の評価法

神経細胞の細胞死の評価には、MTT法を用いた。MTT法は、以前の報告(16)に従った。MTT溶液(60 µg/mL)で2時間処置した後、マイクロプレートリーダー(BIO-RAD)により吸光度(Test 570 nm、Reference 640 nm)を測定した。

4. タンパク質発現の評価

タンパク質発現の評価には、Western blot法を用いた。各薬物処置後の初代培養海馬神経細胞からsampleを調製し、Western blotを行った。方法については、第2章に準じて行った。

5. Calpain 活性の測定

Calpain活性の測定は、スクシニル化 calpain 基質を使用した Calpain-Glo™ Protease Assay kit (Promega)を用いて測定した。Calpain-Glo™ Reagent 50 µL とシステイン関連化合物、calpain 阻害薬および Ca²⁺の終濃度がµ-calpain は 1µM、m-calpain は 1mM になるように CaCl₂を加えたサンプル 50 µL を混合した。10分後に、ルミノメーター (FlexStation3, Molecular Devices)により発光強度を測定した。各薬物処置による測定値から薬物無処置の測定値を引いた値を用い、溶媒を control として、control に対する割合で表した。Curve fitting は、GraphPad Prism の sigmoidal dose-response (variable slope)を使用し、酵素活性を 50%阻害するのに必要な濃度 (IC₅₀)を計算した。

6. 統計学的処理

すべての値は平均値 ± 標準誤差で示した。有意差検定は一元配置分散分析法 (one-way ANOVA)で解析後、Tukey's multiple test を用いた。

3-3 結果

1. 初代培養海馬神経細胞における小胞体ストレス誘発細胞死に対する SAC およびシステイン関連化合物の効果

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のメカニズム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. 10A) が TM 誘発細胞死に及ぼす影響について比較検討した。CYS および NAC は 1 mM の濃度において、peroxynitrite (66) や 4-hydroxynonenal (67) による酸化ストレス誘発障害から、神経保護作用を示すことが報告されている。そこで、本研究においても、1 mM の SAC、CYS、NAC を用いて検討を行ったところ、SAC は有意な TM 誘発細胞死抑制作用を示し、TM 暴露により 47% にまで低下した生存率を 76% まで回復したが、CYS および NAC は、細胞死抑制作用を示さなかった (Fig. 10B)。

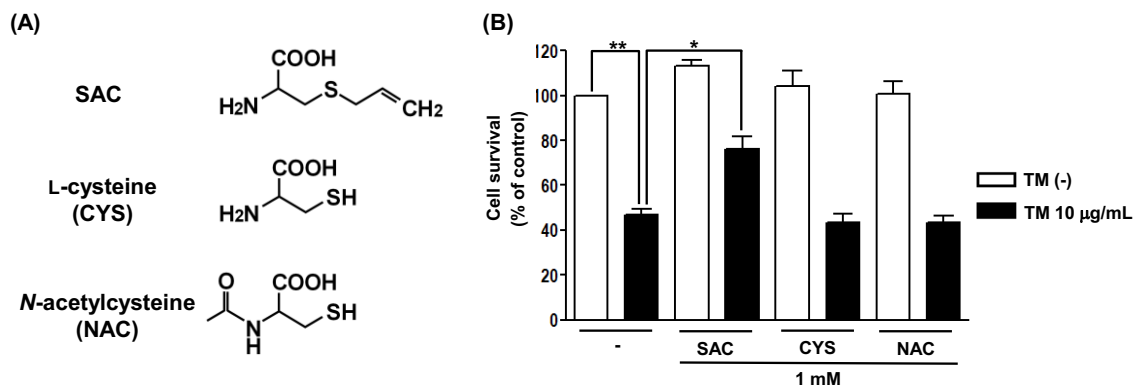


Fig. 10. Effects of cysteine derivatives on TM-induced neuronal cell death in cultured rat hippocampal neurons (HPNs). (A) Chemical structure of SAC and cysteine derivatives. (B) SAC (1 mM), CYS (1 mM), and NAC (1 mM) were added simultaneously with 10 µg/mL TM for 24 h. The viability of HPNs was assessed by the MTT reduction assay. Values are expressed as the relative percentages of surviving cells. Each value represents the mean ± S.E.M. for four different experiments. *P < 0.01, **P < 0.001.

2. 初代培養海馬神経細胞における TM 誘発 calpain 活性に対する SAC およびシステイン関連化合物の効果

初代培養海馬神経細胞の TM 暴露後の calpain 活性に対する SAC およびシス

テイン関連化合物の効果を検討した。Calpain の活性化の指標として、calpain により分解され減少する full-length α -spectrin (240 kDa)を定量的に解析した。初代培養海馬神経細胞に 24 時間 TM 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を暴露したところ、full-length α -spectrin の発現は 63%に減少したが、SAC 1 mM の併用処置により、その減少は有意に抑制され、発現レベルは 90%まで回復した (Fig. 11)。しかし、CYS と NAC は、SAC のような full-length α -spectrin の発現減少の抑制を示さなかった (Fig. 11)。

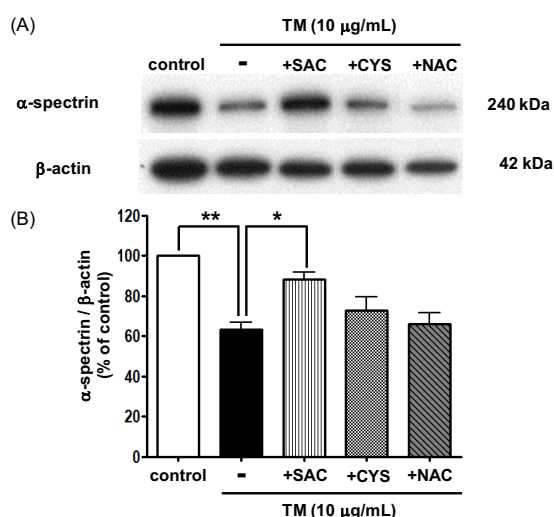


Fig. 11. Effects of cysteine derivatives on TM-induced α -spectrin degradation in HPNs. (A) The expression levels of full-length α -spectrin (240 kDa) were investigated by Western blotting after exposure to TM (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in the absence or presence of SAC (1 mM), CYS (1 mM), and NAC (1 mM) for 24 h. Anti- β -actin antibody was used as an internal control. (B) Amounts of full-length α -spectrin were assessed by densitometric analysis, and the relative level of each band was calculated as described in Materials and Methods. Each value represents the mean \pm S.E.M. for four different experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$.

3. Calpeptin およびシステイン関連化合物の μ -calpain、m-calpain に対する効果

SAC が初代培養海馬神経細胞において TM により誘発される calpain の活性化を抑制することが示されたことから、*in vitro* の calpain 活性測定系を用いて SAC およびシステイン関連化合物が直接 calpain 活性に作用を及ぼすか否かについて検討した。はじめに、既知の calpain 阻害薬である calpeptin (68)と calpain の合成基質 (Suc-LLVY-Glo)を使用して、*in vitro* におけるリコンビナントの μ -calpain と m-calpain に対する calpain 活性測定系の確立を行った。その結果、calpeptin は μ -calpain 活性および m-calpain 活性を濃度依存的に阻害し、それらの IC_{50} 値 ($\text{IC}_{50} = 0.064 \text{ nM}$ および $\text{IC}_{50} = 0.422 \mu\text{M}$)は、既報の IC_{50} 値 (69)と同程度

の値を示した (Fig. 12A, B)。また、calpeptin は μ -calpain を 10 nM で、m-calpain を 10 μ M で完全に抑制した (Fig. 12A, B)。次に、本測定系を用いて、SAC およびシステイン関連化合物が calpain 活性に及ぼす影響について検討を行った。その結果、SAC は μ -calpain と m-calpain 活性をともに濃度依存的に阻害した (Fig. 12C, D)。 μ -Calpain 活性に対する SAC の阻害は、m-calpain の活性阻害よりも低濃度側において認められ、 μ -calpain では 10 nM 以上、m-calpain では 1 mM 以上の濃度で有意な阻害効果を示した (Fig. 12C, D)。また、SAC は calpeptin とは異なり、高濃度においても μ -calpain、m-calpain 活性を完全には抑制せず、使用した濃度範囲において、 μ -calpain 活性は 45%、m-calpain は 63%に低下させるに留まった。CYS と NAC は細胞死抑制作用と同様に μ -calpain と m-calpain 活性に影響を及ぼさなかった (Fig. 12C, D)。

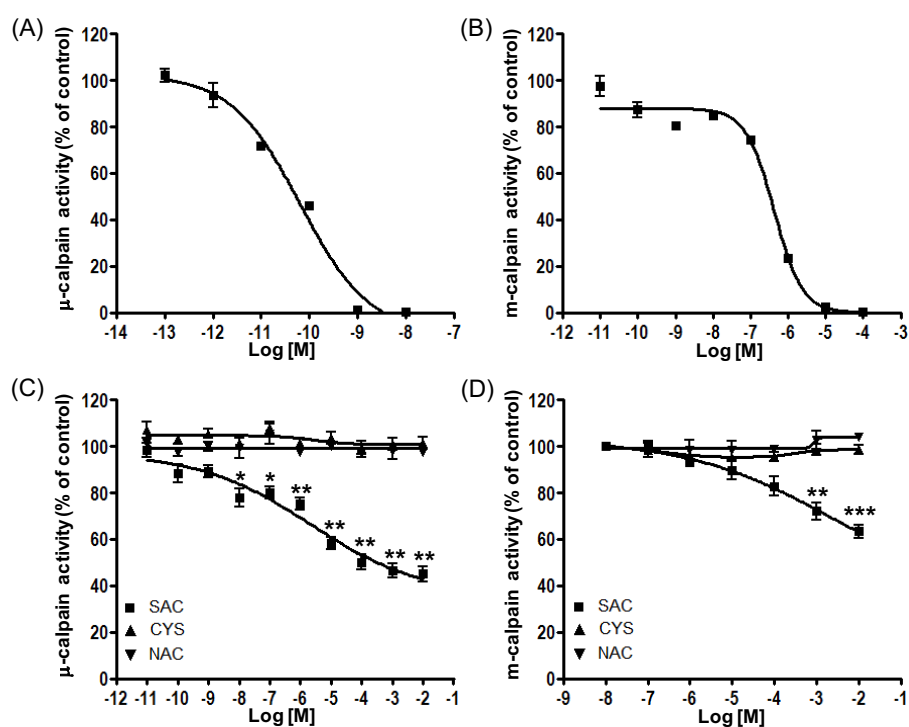


Fig. 12. Effects of calpeptin and cysteine derivatives on μ -calpain and m-calpain activity. Inhibition curves of μ -calpain (A) and m-calpain (B) with varying concentrations of calpeptin were created by curve fitting as described in Materials and Methods. Similarly, inhibition curves of μ -calpain (C) and m-calpain (D) with varying concentrations of SAC, CYS and NAC were also created. Each value represents mean \pm S.E.M. for three (A, B) and four (C, D) different experiments. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 as compared with control (vehicle).

4. μ -Calpain に対する SAC と ALLN および PD150606 の併用による効果

SAC が *in vitro* の測定系において calpain に対し直接阻害効果を示すことから、分子内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 (68) および Ca^{2+} 結合部位に作用する阻害薬である PD150606 (70) の作用を SAC の存否において比較検討した。ALLN は、 μ -calpain 活性を濃度依存的に阻害し ($\text{IC}_{50} = 0.01 \text{ nM}$)、 1 nM において μ -calpain 活性を完全に阻害した (Fig. 13A)。最初に低濃度の ALLN が示す μ -calpain 阻害作用に対する SAC の併用による影響を検討した。 μ -Calpain 活性は、ALLN 単独 (5 pM) では 75%、SAC 単独 ($1 \text{ }\mu\text{M}$) では 76% を示し、ALLN (5 pM) と SAC ($1 \text{ }\mu\text{M}$) の併用では 57% に低下し、 μ -calpain 阻害作用の増強が認められた (Fig. 13B)。さらに、高濃度の SAC (1 mM) と ALLN (5 pM) の併用においても、併用による μ -calpain 阻害作用の増強が認められた (Fig. 13B)。また、 μ -calpain を最大に阻害する濃度の ALLN (1 nM) は、 μ -calpain 活性を 6% に低下させたが、SAC (1 mM) との併用では、ALLN 単独と比較して μ -calpain 阻害作用に変化は認められなかった (Fig. 13C)。PD150606 は、 μ -calpain 活性を濃度依存的に阻害し ($\text{IC}_{50} = 20.85 \text{ }\mu\text{M}$)、 $100 \text{ }\mu\text{M}$ において μ -calpain 活性を完全に阻害した (Fig. 14A)。最初に低濃度の PD150606 が示す μ -calpain 阻害作用に対する SAC の併用による影響を検討した。 μ -Calpain 活性は、PD150606 単独 ($25 \text{ }\mu\text{M}$) では 73%、SAC 単独 ($1 \text{ }\mu\text{M}$) では 82% を示したが、ALLN とは異なり、PD150606 ($25 \text{ }\mu\text{M}$) と SAC ($1 \text{ }\mu\text{M}$) の併用では 80% を示し、併用による阻害作用の変化は認められなかった。また、高濃度の SAC (1 mM) と PD150606 ($25 \text{ }\mu\text{M}$) との併用でも、 μ -calpain 阻害作用に変化は認められなかった (Fig. 14B)。 μ -Calpain を最大に阻害する濃度の PD150606 ($100 \text{ }\mu\text{M}$) は、 μ -calpain 活性を 9% に低下させた。PD150606 ($100 \text{ }\mu\text{M}$) と SAC (1 mM) の併用は、 μ -calpain 活性を 28% まで回復させ、PD150606 単独の μ -calpain 阻害作用を有意に抑制した (Fig. 14C)。

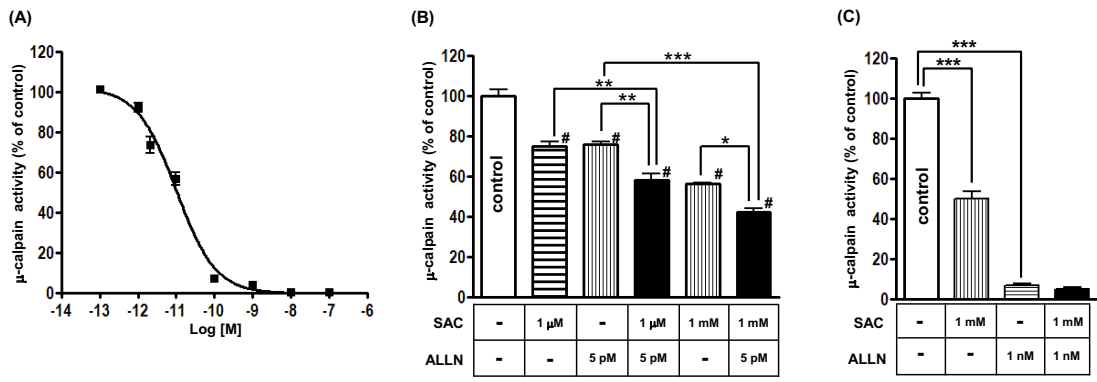


Fig. 13. Effects of SAC on inhibition of μ -calpain by ALLN. (A) Inhibition curve for μ -calpain with varying concentrations of ALLN was created by curve fitting as described in Materials and Methods. (B) ALLN (5 pM) with or without SAC (1 μ M or 1 mM) incubated with 100 nM μ -calpain. (C) ALLN (1 nM) with or without SAC (1 mM) incubated with 100 nM μ -calpain. The calpain activity was examined using an *in vitro* assay system as described in Materials and Methods. Each value represents the mean \pm S.E.M. for three (A) or four (B, C) different experiments. #P < 0.001 as compared with control (vehicle), *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001.

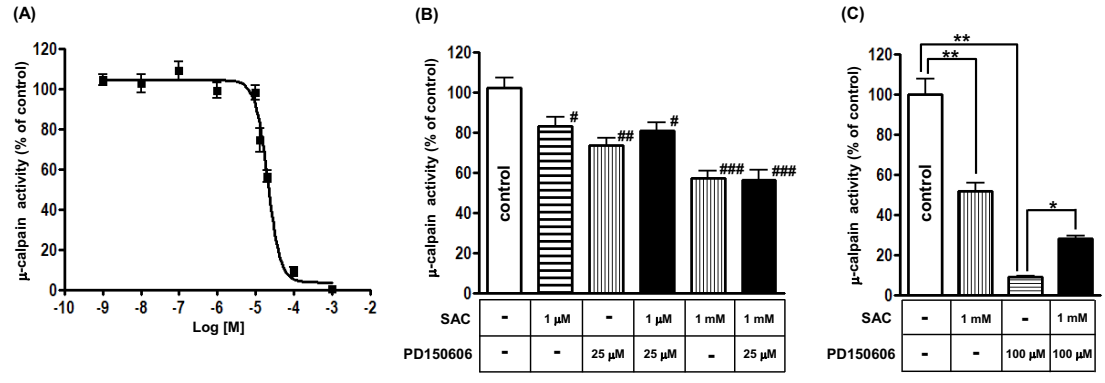


Fig. 14. Effects of SAC on inhibition of μ -calpain by PD150606. (A) Inhibition curve of μ -calpain with varying concentrations of PD150606 was created by curve fitting as described in Materials and Methods. (B) PD150606 (25 μ M) with or without SAC (1 μ M or 1 mM) incubated with 100 nM μ -calpain. (C) PD150606 (100 μ M) with or without SAC (1 mM) incubated with 100 nM μ -calpain. The calpain activity was examined using an *in vitro* assay system as described in Materials and Methods. Each value represents the mean \pm S.E.M. for four different experiments. #P < 0.05, ###P < 0.01, ####P < 0.001 as compared with control (vehicle), *P < 0.05, **P < 0.001.

5. μ -Calpain に対する SAC と calpastatin の併用による効果

生体内には、過剰な calpain の活性化が起きた場合の調節因子として calpastatin が存在している。しかし、AD においては calpastatin の発現が減少す

ること、calpain の過剰な活性化が誘発され、この活性化が障害発生の一因となっていることが報告されている (63)。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。Calpastatin は、 μ -calpain 活性を用量依存的に阻害し (Fig. 15A)、SAC と同様に、高濃度においても μ -calpain 活性を完全には阻害せず、最大で 85% の阻害作用を示した (Fig. 15A)。次に、低濃度の calpastatin が示す μ -calpain 阻害作用に対する SAC の併用による影響を検討した。 μ -Calpain 活性は、calpastatin 単独 (100 pM) では 76%、SAC 単独 (1 μ M) では 77% を示し、calpastatin (100 pM) と SAC (1 μ M) の併用では 59% に低下し、calpastatin 単独と比較して阻害作用の増強が認められた (Fig. 15B)。さらに、高濃度の SAC (1 mM) と calpastatin (100 pM) の併用では、 μ -calpain 活性が 44% に低下し、阻害作用の増強が認められた (Fig. 15B)。また、 μ -calpain を最大に阻害する濃度の calpastatin (100 nM) は、 μ -calpain 活性を 15% に低下させたが、SAC (1 mM) と併用しても calpastatin 単独と比較して阻害作用に変化は認められなかった (Fig. 15C)。

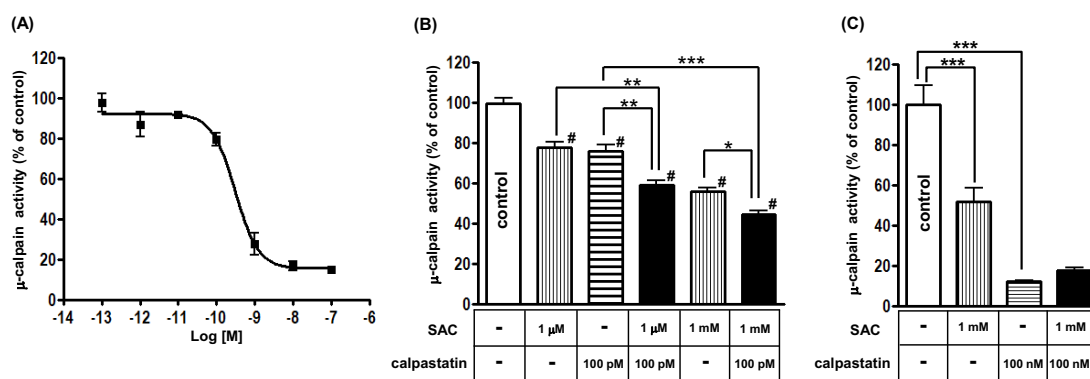


Fig. 15. Effects of SAC on inhibition of μ -calpain by calpastatin. (A) Inhibition curve of μ -calpain with varying concentrations of calpastatin was created by curve fitting as described in Materials and Methods. (B) Calpastatin (100 pM) with or without SAC (1 μ M or 1 mM) incubated with 100 nM μ -calpain. (C) Calpastatin (100 nM) with or without SAC (1 mM) incubated with 100 nM μ -calpain. The calpain activity was examined using an *in vitro* assay system as described in Materials and Methods. Each value represents the mean \pm S.E.M. for three (A), four (C) and five (B) different experiments. #P < 0.001 as compared with control (vehicle), *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001.

3-4 考察

本章では、海馬初代培養系および *in vitro* の calpain 活性測定系を用いて、calpain に対する SAC の作用を中心に検討を行った。近年、独立した神経細胞死誘発機構と考えられていた小胞体とミトコンドリアの間に密接な関係があることが示され (71)、小胞体ストレス誘導薬である thapsigargin や baflofin A はマウス海馬神経細胞由来の HT22 細胞において、活性酸素種の上昇を引き起こし、細胞死を誘発することが報告されている (72)。これらの結果より、TM 誘発細胞死における SAC の神経保護作用の一つとして、SAC の抗酸化作用が関与する可能性も残されている。そこで、SAC の小胞体ストレス誘発細胞死抑制作用をさらに明らかにするため、初代培養海馬神経細胞において、SAC と構造的に類似性が高い CYS および NAC が TM 誘発細胞死に及ぼす影響について検討した。CYS や NAC は抗酸化作用を有するため、peroxynitrite (66) や 4-hydroxynonenal (67) による酸化ストレス誘発神経細胞死から神経保護作用を示すことが報告されている。しかしながら、CYS および NAC は TM 誘発細胞死に対して保護作用を示さなかった (Fig. 10B)。本研究で使用した TM は、小胞体の N-glycosylation 阻害により直接構造異常タンパク質を蓄積することで小胞体ストレスを引き起こして細胞死を誘発するため、酸化ストレスの関与が少ないことが報告されており (73)、このため CYS、NAC による保護作用は認められなかったものと考えられる。また、TM 誘発細胞死抑制作用が SAC のみで認められたことより、海馬神経細胞における SAC の神経保護作用は、酸化ストレスに対してではなく、小胞体ストレスに関連したカスケードを抑制することに起因している可能性が示された。

近年、 μ -calpain は AD 患者脳 (57) や APP トランスジェニックマウス脳 (58) において、活性が亢進していることが報告されている。さらに、ヒト神経芽腫細胞 SH-SY5Y 細胞における A β 誘発細胞死に対して、 μ -calpain に選択性の高い阻害薬 conjugated linoleic acid の有用性が報告されている (74)。また、PD150606

は近位尿細管上皮細胞 LLC-PK1 細胞 (75)、ALLN はマウス線維芽細胞 NIH3T3 細胞 (76)において、TM 誘発細胞死を抑制することが報告されており、TM 誘発細胞死には calpain の活性化が関与し、calpain 活性の阻害は細胞保護作用を示すことが示唆されている。本研究においても培養海馬切片の TM 暴露により、calpain の活性化を誘発し、SAC はその活性化を抑制した (Fig. 9A)。そこで、初代培養海馬神経細胞において、SAC が TM 暴露による calpain の活性化に及ぼす影響について検討したところ、TM 暴露により full-length α -spectrin の発現減少が認められ、SAC はこの full-length α -spectrin の発現減少を抑制したが、細胞死に対する場合と同様に CYS および NAC は影響を及ぼさなかった (Fig. 11)。以上の結果より、初代培養海馬神経細胞においても、SAC が calpain の活性化を抑制することが示唆された。そこで、SAC が calpain 活性に及ぼす作用について、*in vitro* の calpain 活性測定系を用いて検討した。SAC は濃度依存的に μ -calpain および m-calpain 活性を阻害したが、calpeptin の強力な阻害効果とは異なり、高濃度でも阻害の程度は弱く、穏やかな阻害作用を示した (Fig. 12C, D)。一方、CYS や NAC は μ -calpain、m-calpain 活性に影響を及ぼさなかった (Fig. 12C, D)。これらの結果より、SAC は μ -および m-calpain 活性を直接阻害することで小胞体ストレス誘発細胞死を抑制する可能性が示唆された。また、CYS および NAC が、 μ -calpain、m-calpain に影響を及ぼさなかったことより、calpain 阻害作用には、SH 基は関与しないことが示唆された。

次に、SAC の μ -calpain 阻害作用が calpain のどの部位に作用しているのか検討するために、calpain の活性中心に作用する ALLN (68)または Ca^{2+} 結合部位に作用する PD150606 (70)と SAC との併用が μ -calpain 活性に及ぼす影響について検討を行った。低濃度の各阻害薬と SAC との併用による影響を検討した結果、ALLN の μ -calpain 阻害作用は、SAC の併用により有意に増強されたが (Fig. 13B)、PD150606 の阻害作用は、SAC の影響を受けなかった (Fig. 14B)。また、最大阻害作用を示す濃度の各阻害薬と SAC との併用による影響を検討したところ、

ALLN の阻害作用には影響を及ぼさなかったが (Fig. 13C)、PD150606 の μ -calpain 阻害作用を有意に抑制した (Fig. 14C)。以上の結果から、SAC は calpain の Ca^{2+} 結合部位に作用し、calpain 阻害作用を示す可能性が示唆された。これまでに、calpeptin のような活性中心に作用する calpain 阻害薬は calpain アイソフォーム間の選択性に欠くものの (69)、 Ca^{2+} 結合部位に作用する PD151746 は m-calpain と比較し、 μ -calpain に選択性の高い阻害薬であることが報告されている (70)。本研究において、SAC の μ -calpain 活性に対する有意な阻害作用は 10 nM 以上で認められたのに対して、m-calpain に対する阻害作用は 1 mM 以上で認められ、SAC は m-calpain と比較して μ -calpain に高い選択性を示したが (Fig. 12C, D)、このことも SAC が Ca^{2+} 結合部位に作用する可能性を強く支持していると考えられる。

近年、AD 患者脳 (63) や AD 病態モデルマウス脳 (58) では、calpastatin の発現レベルが減少していることが報告されている。Calpastatin は、 Ca^{2+} によって活性化された calpain に結合することが示されており (77)、calpain の領域 I、II の間にある活性中心近傍 (77) と Ca^{2+} 結合部位 (78) の両方に作用して calpain を阻害することが報告されているが、現在まで、calpastatin による calpain 阻害機構の詳細は不明なままである。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 (Fig. 15B, C)。したがって、SAC は calpastatin の作用が十分ではない時には増強するが、calpastatin が十分に機能している場合には影響しないことが示唆された。

Calpain の活性化異常は、AD だけでなく、脳虚血や白内障など様々な疾患に深く関与していることが示唆されている (62)。そのため、calpain を標的とした治療薬の開発が進められているものの、これまで実用化には至った例は皆無である。その一因として、calpain は生命維持に必須な酵素であるため、必要以上に抑制すると重大な副作用を生む可能性が挙げられる。例えば、不可逆的

calpain 阻害薬である benzyloxycarbonyl-Leu-Leu-Tyr diazomethyl ketone は、ヒト食道上皮細胞の TE2 細胞やヒト子宮癌由来の C-33A 細胞において、細胞増殖阻害を引き起こすことが報告されている (79)。これらと異なり、可逆的な calpain 阻害作用を示す calpain 阻害薬 XI は、短時間の投与において網膜変性マウスから作成した網膜外植片における光受容体細胞死に対して、保護効果を示すことが報告されている (80)。しかし、calpain 阻害薬 XI の数日間の連続投与は、TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL)陽性細胞の著しい増加を引き起こす [80]。これに対して、内在性 calpain 阻害タンパク質である calpastatin は短期間および長期間の投与においても、網膜変性マウスの網膜外植片における光受容体細胞死を保護することが示されている (80)。これらの報告から、calpain 阻害が細胞の生存に及ぼす影響は、細胞の種類や阻害持続時間により変化し、calpain の長期および過剰な阻害は、細胞の生存に悪影響を及ぼすことが示唆され、治療薬としては緩和な作用のものが良いと考えられる。本 calpain 活性測定系において、高濃度の ALLN、PD150606 は、 μ -calpain を完全に阻害したが、SAC は、calpastatin と同様に、高濃度においても μ -calpain 活性を完全には阻害しなかった。したがって、SAC は、強力な合成 calpain 阻害薬と異なり、calpastatin が十分に機能していない場合には、その機能を補うことのできる 緩徐な calpain 阻害作用を示すと考えられ、AD 治療薬としても有用であると考えられた。また、これらの作用が小胞体ストレス誘発海馬神経細胞死に保護作用を示すと考えられる。しかし、SAC による calpastatin の増強作用については、まだ不明な点が残っており、今後さらなる検討が必要であると考えられる。

3-5 小括

1. 初代培養海馬神経細胞において、SAC は TM 誘発細胞死を抑制した。しかし、CYS および NAC には抑制作用は認められなかった。
2. 初代培養海馬神経細胞において、SAC は TM 処置による full-length α -spectrin の発現量の減少を抑制したが、CYS および NAC に抑制作用は認められなかった。
3. *In vitro* の calpain 活性測定系において、SAC は μ -calpain および m-calpain の活性化を濃度依存的に阻害した。その作用は calpeptin と比較して弱く、高濃度においても calpain 活性を完全には阻害しなかった。
4. ALLN と SAC の併用において、SAC は低濃度の ALLN が示す μ -calpain 阻害作用を増強した。また、 μ -calpain の最大阻害作用を示す濃度の ALLN の阻害作用に影響を及ぼさなかった。
5. PD150606 と SAC の併用において、SAC は低濃度の PD150606 が示す μ -calpain 阻害作用に影響を及ぼさなかった。しかし、 μ -calpain の最大阻害作用を示す濃度の PD150606 の阻害作用に対しては抑制作用を示した。
6. Calpastatin と SAC の併用において、SAC は低濃度の calpastatin が示す μ -calpain 阻害作用を増強した。また、 μ -calpain の最大阻害作用を示す濃度の calpastatin の阻害作用に影響を及ぼさなかった。

以上の結果より、初代培養海馬神経細胞において、SAC は小胞体ストレス誘発細胞死を顕著に抑制した。その神経保護作用には抗酸化作用は関与せず、

calpain の Ca^{2+} 結合部位との相互作用を引き起こし、calpain 活性を直接的かつ緩やかに阻害することが、少なくとも一部関与することが示唆された。

第 4 章

総括

本研究においては、まず前半において、海馬神経細胞における amyloid β -peptide (A β)の細胞死誘発メカニズムを明らかにするため、A β が小胞体ストレス誘発細胞死に及ぼす影響とその機序を培養海馬切片において検討した。A β_{25-35} は、tunicamycin (TM)による小胞体ストレス誘発細胞死を顕著に増強すること、また、その細胞死増強には海馬の領域特異性があり、L型 Ca^{2+} チャンネルを介した細胞内 Ca^{2+} 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、神経細胞死を増強することを明らかにした。本研究により、A β の蓄積とともに、老化等により小胞体ストレスが増加するような条件において、A β が小胞体ストレスによる神経細胞死を増強する機構が、少なくとも一部、アルツハイマー病 (AD)を発症させる原因である可能性を示した。また、S-allyl-L-cysteine (SAC)の神経保護作用を検討し、A β_{25-35} の TM 誘発細胞死増強を顕著に抑制すること、および、その細胞保護作用には SAC の calpain 活性阻害作用が関与することを示した。

後半においては、前半の培養海馬切片における知見をもとに、SAC の小胞体ストレス誘発細胞死に対する保護作用の機序を明らかにする目的で、海馬神経細胞の初代培養系および *in vitro* の calpain 活性測定系を用いて、calpain に対する SAC の作用について詳細に検討した。初代培養海馬神経細胞において、SAC は小胞体ストレス誘発細胞死を顕著に抑制し、その神経保護作用には抗酸化作用は関与せず、小胞体ストレスで亢進した calpain 活性の抑制が関与することを明らかにした。また、*in vitro* の calpain 活性測定系において、SAC は calpain の Ca^{2+} 結合部位との相互作用により μ -calpain 活性を緩やかに阻害し、この緩和な阻害作用が小胞体ストレス誘発細胞死に対する保護作用に関与することを示した。これらの知見の概略を Fig. 16 に示した。SAC は calpain を標的として神経保護作用を示すことから、新規 AD 治療薬としての可能性を有していると考えられた。

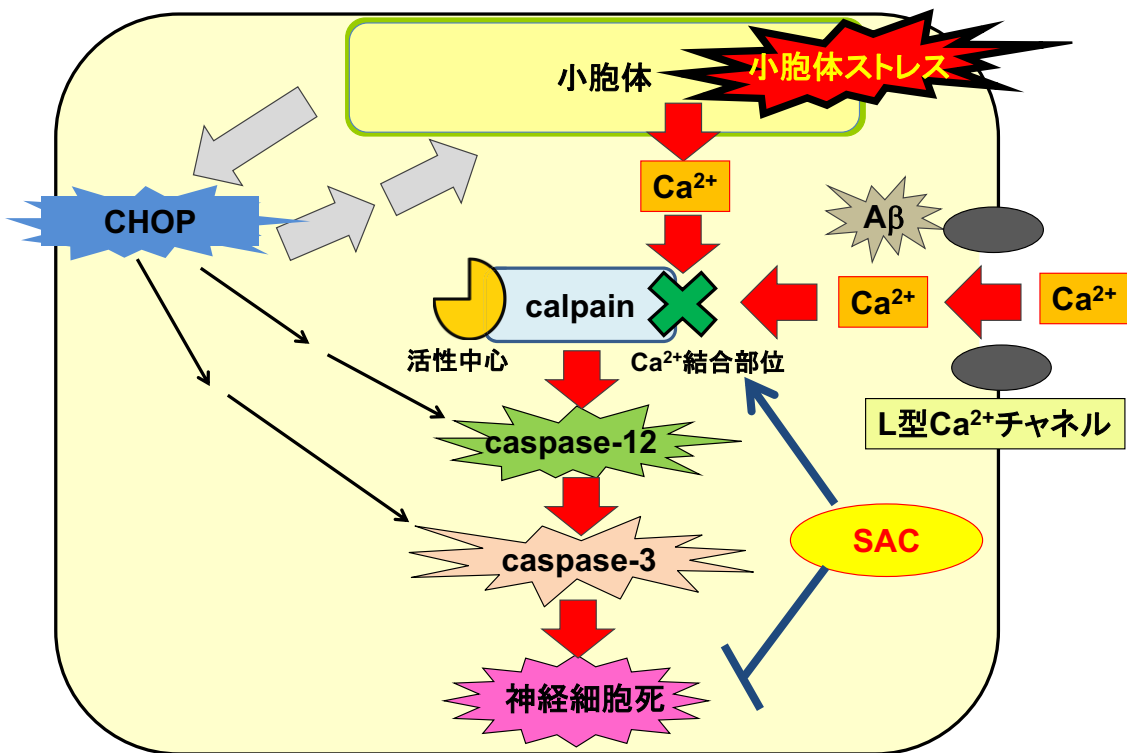


Fig. 16. A schematic diagram showing the mechanisms of $A\beta$ potentiates ER stress-induced neuronal cell death and neuroprotective effect of SAC in hippocampus neuron.

参考文献

1. 厚生労働省. 平成 20 年 患者調査の概要.
2. 厚生労働省. 平成 23 年 患者調査の概要.
3. Selkoe DJ. Biochemistry of altered brain proteins in Alzheimer's disease. *Annu Rev Neurosci.* 1989;12:463-490.
4. De Strooper B, Annaert W. Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *J Cell Sci.* 2000;113:1857-1870.
5. Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science.* 2002;297:353-356.
6. Sperling RA, Laviolette PS, O'Keefe K, O'Brien J, Rentz DM, Pihlajamaki M, et al. Amyloid deposition is associated with impaired default network function in older persons without dementia. *Neuron.* 2009;63:178-188.
7. Vlassenko AG, Mintun MA, Xiong C, Sheline YI, Goate AM, Benzinger TL, et al. Amyloid-beta plaque growth in cognitively normal adults: longitudinal PIB data. *Ann Neurol.* 2011;70:857-861.
8. Neve RL, Robakis NK. Alzheimer's disease: a re-examination of the amyloid hypothesis. *Trends Neurosci.* 1998;21:15-19.
9. Hyman BT, Van Hoesen GW, Damasio AR, Barnes CL. Alzheimer's disease: cell-specific pathology isolates the hippocampal formation. *Science.* 1984;225:1168-1170.
10. Ito Y, Ito M, Takagi N, Saito H, Ishige K. Neurotoxicity induced by amyloid β -peptide and ibotenic acid in organotypic hippocampal cultures: protection by S-allyl-L-cysteine, a garlic compound. *Brain Res.* 2003;985:98-107.
11. Imaizumi K, Miyoshi K, Katayama T, Yoneda T, Taniguchi M, Kudo T, et al. The unfolded protein response and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta.* 2001;1536:85-96.

12. Kaufman RJ. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev.* 1999;13:1211-1233.
13. Ogawa S, Kitao Y, Hori O. Ischemia-induced neuronal cell death and stress response. *Antioxid Redox Signal.* 2007;9:573-587.
14. Brown MK, Naidoo N. The endoplasmic reticulum stress response in aging and age-related diseases. *Front Physiol.* 2012;3:263.
15. Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, et al. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid- β . *Nature.* 2000;403:98-103.
16. Kosuge Y, Koen Y, Ishige K, Minami K, Urasawa H, Saito H, et al. *S*-allyl-L-cysteine selectively protects cultured rat hippocampal neurons from amyloid β -protein- and tunicamycin-induced neuronal death. *Neuroscience.* 2003;122:885-895.
17. Ishige K, Takagi N, Imai T, Rausch WD, Kosuge Y, Kihara T, et al. Role of caspase-12 in amyloid β -peptide-induced toxicity in organotypic hippocampal slices cultured for long periods. *J Pharmacol Sci.* 2007;104:46-55.
18. Yamada K, Nabeshima T. Animal models of Alzheimer's disease and evaluation of anti-dementia drugs. *Pharmacol Ther.* 2000;88:93-113.
19. Rogers SL, Farlow MR, Doody RS, Mohs R, Friedhoff LT. A 24-week, double-blind, placebo-controlled trial of donepezil in patients with Alzheimer's disease. Donepezil Study Group. *Neurology.* 1998;50:136-145.
20. Rockwood K, Mintzer J, Truyen L, Wessel T, Wilkinson D. Effects of a flexible galantamine dose in Alzheimer's disease: a randomised, controlled trial. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2001;71:589-595.
21. Rosler M, Anand R, Cicin-Sain A, Gauthier S, Agid Y, Dal-Bianco P, et al.

- Efficacy and safety of rivastigmine in patients with Alzheimer's disease: international randomised controlled trial. *Bmj*. 1999;318:633-638.
22. Nakamura S, Murayama N, Noshita T, Katsuragi R, Ohno T. Cognitive dysfunction induced by sequential injection of amyloid- β and ibotenate into the bilateral hippocampus; protection by memantine and MK-801. *Eur J Pharmacol*. 2006;548:115-122.
 23. Davis KL, Thal LJ, Gamzu ER, Davis CS, Woolson RF, Gracon SI, et al. A double-blind, placebo-controlled multicenter study of tacrine for Alzheimer's disease. The Tacrine Collaborative Study Group. *N Engl J Med*. 1992;327:1253-1259.
 24. Geng Z, Rong Y, Lau BH. *S*-allyl cysteine inhibits activation of nuclear factor kappa B in human T cells. *Free Radic Biol Med*. 1997;23:345-350.
 25. Ide N, Lau BH. Garlic compounds minimize intracellular oxidative stress and inhibit nuclear factor- κ B activation. *J Nutr*. 2001;131:1020S-1026S.
 26. Ray B, Chauhan NB, Lahiri DK. Oxidative insults to neurons and synapse are prevented by aged garlic extract and *S*-allyl-L-cysteine treatment in the neuronal culture and APP-Tg mouse model. *J Neurochem*. 2011;117:388-402.
 27. Thomson M, Ali M. Garlic [*Allium sativum*]: a review of its potential use as an anti-cancer agent. *Curr Cancer Drug Targets*. 2003;3:67-81.
 28. Kodai S, Takemura S, Minamiyama Y, Hai S, Yamamoto S, Kubo S, et al. *S*-allyl cysteine prevents CCl₄-induced acute liver injury in rats. *Free Radic Res*. 2007;41:489-497.
 29. Moriguchi T, Matsuura H, Koderia Y, Itakura Y, Katsuki H, Saito H, et al. Neurotrophic activity of organosulfur compounds having a thioallyl group on cultured rat hippocampal neurons. *Neurochem Res*. 1997;22:1449-1452.
 30. Ried K, Frank OR, Stocks NP. Aged garlic extract lowers blood pressure in

- patients with treated but uncontrolled hypertension: a randomised controlled trial. *Maturitas*. 2010;67:144-150.
31. Nishiyama N, Moriguchi T, Morihara N, Saito H. Ameliorative effect of *S*-allylcysteine, a major thioallyl constituent in aged garlic extract, on learning deficits in senescence-accelerated mice. *J Nutr*. 2001;131:1093S-1095S.
 32. Perez-Severiano F, Salvatierra-Sanchez R, Rodriguez-Perez M, Cuevas-Martinez EY, Guevara J, Limon J, et al. *S*-Allylcysteine prevents amyloid- β peptide-induced oxidative stress in rat hippocampus and ameliorates learning deficits. *Eur J Pharmacol*. 2004;489:197-202.
 33. Ito Y, Kosuge Y, Sakikubo T, Horie K, Ishikawa N, Obokata N, et al. Protective effect of *S*-allyl-L-cysteine, a garlic compound, on amyloid β -protein-induced cell death in nerve growth factor-differentiated PC12 cells. *Neurosci Res*. 2003;46:119-125.
 34. Strooper BD, Annaert W. Presenilins and the intramembrane proteolysis of proteins: facts and fiction. *Nat Cell Biol*. 2001;3:E221-225.
 35. Yankner BA, Dawes LR, Fisher S, Villa-komaroff L, Oster-Granite ML, Neve RL, et al. Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with Alzheimer's disease. *Science*. 1989;245:417-420.
 36. Bruce AJ, Malfroy B, Baudry M. β -Amyloid toxicity in organotypic hippocampal cultures: protection by EUK-8, a synthetic catalytic free radical scavenger. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:2312-2316.
 37. Miranda S, Opazo C, Larrondo LF, Munoz FJ, Ruiz F, Leighton F, et al. The role of oxidative stress in the toxicity induced by amyloid β -peptide in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol*. 2000;62:633-648.
 38. Kadowaki H, Nishitoh H, Urano F, Sadamitsu C, Matsuzawa A, Takeda K, et al. Amyloid β induces neuronal cell death through ROS-mediated ASK1 activation.

- Cell Death Differ. 2005;12:19-24.
39. Ohyagi Y, Asahara H, Chui DH, Tsuruta Y, Sakae N, Miyoshi K, et al. Intracellular A β 42 activates p53 promoter: a pathway to neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Faseb J.* 2005;19:255-257.
 40. Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding HP, et al. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science.* 2000;287:664-666.
 41. Gotoh T, Terada K, Oyadomari S, Mori M. hsp70-DnaJ chaperone pair prevents nitric oxide- and CHOP-induced apoptosis by inhibiting translocation of Bax to mitochondria. *Cell Death Differ.* 2004;11:390-402.
 42. Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ.* 2004;11:381-389.
 43. Nakagawa T, Yuan J. Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol.* 2000;150:887-894.
 44. Rao RV, Hermel E, Castro-Obregon S, de la Rica G, Ellerby LM, Ellerby HM, et al. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation. *J Biol Chem.* 2001;276:33869-33874.
 45. Yoneda T, Imaizumi K, Oono K, Yui D, Gomi F, Katayama T, et al. Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. *J Biol Chem.* 2001;276:13935-13940.
 46. Blomgren K, Zhu C, Wang X, Karisson JO, Leverin AL, Bahr BA, et al. Synergistic activation of caspase-3 by m-calpain after neonatal hypoxia-ischemia: a mechanism of "pathological apoptosis"? *J Biol Chem.* 2001;276:10191-10198.

47. Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, Shibata T, Yasuhiko Y. An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J Biol Chem.* 2002;277:34287-34294.
48. Stoppini L, Buchs PA, Muller D. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods.* 1991;37:173-182.
49. Norberg J, Kristensen BW, Zimmer J. Markers for neuronal degeneration in organotypic slice cultures. *Brain Res Brain Res Protoc.* 1999;3:278-290.
50. Abdel-Hamid KM, Tymianski M. Mechanisms and effects of intracellular calcium buffering on neuronal survival in organotypic hippocampal cultures exposed to anoxia/aglycemia or to excitotoxins. *J Neurosci.* 1997;17:3538-3553.
51. Pereira C, Ferreiro E, Cardoso SM, de Oliveira CR. Cell degeneration induced by amyloid- β peptides: implications for Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci.* 2004;23:97-104.
52. Lin TY, Wang SM, Fu WM, Chen YH, Yin HS. Toxicity of tunicamycin to cultured brain neurons: ultrastructure of the degenerating neurons. *J Cell Biochem.* 1999;74:638-647.
53. Kosuge Y, Imai T, Kawaguchi M, Kihara T, Ishige T, Ito Y, et al. Subregion-specific vulnerability to endoplasmic reticulum stress-induced neurotoxicity in rat hippocampal neurons. *Neurochem Int.* 2008;52:1204-1211.
54. Zinszner H, Kuroda M, Wang X, Batchvarova N, Lightfoot RT, Remotti H, et al. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* 1998;12:982-995.
55. Chan SL, Culmsee C, Haughey N, Klapper W, Mattson MP. Presenilin-1 mutations sensitize neurons to DNA damage-induced death by a mechanism

- involving perturbed calcium homeostasis and activation of calpains and caspase-12. *Neurobiol Dis.* 2002;11:2-19.
56. Siman R, Flood DG, Thinakaran G, Neumar RW. Endoplasmic reticulum stress-induced cysteine protease activation in cortical neurons: effect of an Alzheimer's disease-linked presenilin-1 knock-in mutation. *J Biol Chem.* 2001;276:44736-44743.
 57. Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Oda Y, Tomizawa K, Gong CX, et al. Truncation and activation of calcineurin A by calpain I in Alzheimer disease brain. *J Biol Chem.* 2005;280:37755-37762.
 58. Vaisid T, Kosower NS, Katzav A, Chapman J, Barnoy S. Calpastatin levels affect calpain activation and calpain proteolytic activity in APP transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurochem Int.* 2007;51:391-397.
 59. Kagan BL, Hirakura Y, Azimov R, Azimova R, Lin MC. The channel hypothesis of Alzheimer's disease: current status. *Peptides.* 2002;23:1311-1315.
 60. Ueda K, Shinohara S, Yagami T, Asakura K, Kawasaki K. Amyloid beta protein potentiates Ca^{2+} influx through L-type voltage-sensitive Ca^{2+} channels: a possible involvement of free radicals. *J Neurochem.* 1997;68:265-271.
 61. Ferreiro E, Oliveira CR, Pereira C. Involvement of endoplasmic reticulum Ca^{2+} release through ryanodine and inositol 1,4,5-triphosphate receptors in the neurotoxic effects induced by the amyloid- β peptide. *J Neurosci Res.* 2004;76:872-880.
 62. Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J. The calpain system. *Physiol Rev.* 2003;83:731-801.
 63. Rao MV, Mohan PS, Peterhoff CM, Yang DS, Schmidt SD, Stavrides PH, et al. Marked calpastatin (CAST) depletion in Alzheimer's disease accelerates cytoskeleton disruption and neurodegeneration: neuroprotection by CAST

- overexpression. *J Neurosci*. 2008;28:12241-12254.
64. Li G, Faibushevich A, Turunen BJ, Yoon SO, Georg G, Michaelis ML, et al. Stabilization of the cyclin-dependent kinase 5 activator, p35, by paclitaxel decreases beta-amyloid toxicity in cortical neurons. *J Neurochem*. 2003;84:347-362.
 65. Tan Y, Dourdin N, Wu C, De Veyra T, Elce JS, Greer PA, et al. Ubiquitous calpains promote caspase-12 and JNK activation during endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 2006;281:16016-16024.
 66. Lu S, Fan Z, Xu W, Han Y, Zhang G, Liu W, et al. L-cysteine attenuates peroxynitrite-elicited cytotoxicity to spiral ganglion neurons: possible relation to hearing loss. *Neurol Res*. 2011;33:935-941.
 67. Arakawa M, Ishimura A, Arai Y, Kawabe K, Suzuki S, Ishige K, et al. *N*-Acetylcysteine and ebselen but not nifedipine protected cerebellar granule neurons against 4-hydroxynonenal-induced neuronal death. *Neurosci Res*. 2007;57:220-229.
 68. Carragher NO. Calpain inhibition: a therapeutic strategy targeting multiple disease states. *Curr Pharm Des*. 2006;12:615-638.
 69. Tsujinaka T, Kajiwara Y, Kambayashi J, Sakon M, Higuchi N, Tanaka T, et al. Synthesis of a new cell penetrating calpain inhibitor (calpeptin). *Biochem Biophys Res Commun*. 1988;153:1201-1208.
 70. Wang KK, Nath R, Posner A, Raser KJ, Buroker-kilgore M, Hajimohammadreza I, et al. An alpha-mercaptoacrylic acid derivative is a selective nonpeptide cell-permeable calpain inhibitor and is neuroprotective. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:6687-6692.
 71. Lindholm D, Wootz H, Korhonen L. ER stress and neurodegenerative diseases. *Cell Death Differ*. 2006;13:385-392.

72. Choi JH, Choi AY, Yoon H, Choe W, Yoon KS, Ha J, et al. Baicalein protects HT22 murine hippocampal neuronal cells against endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis through inhibition of reactive oxygen species production and CHOP induction. *Exp Mol Med*. 2010;42:811-822.
73. Harding HP, Zhang Y, Zeng H, Novoa I, Lu PD, Calton M, et al. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell*. 2003;11:619-633.
74. Lee E, Eom JE, Kim HL, Baek KH, Jun KY, Kim HJ, et al. Effect of conjugated linoleic acid, μ -calpain inhibitor, on pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1831:709-718.
75. Muruganandan S, Cribb AE. Calpain-induced endoplasmic reticulum stress and cell death following cytotoxic damage to renal cells. *Toxicol Sci*. 2006;94:118-128.
76. Sanges D, Marigo V. Cross-talk between two apoptotic pathways activated by endoplasmic reticulum stress: differential contribution of caspase-12 and AIF. *Apoptosis*. 2006;11:1629-1641.
77. Hanna RA, Campbell RL, Davies PL. Calcium-bound structure of calpain and its mechanism of inhibition by calpastatin. *Nature*. 2008;456:409-412.
78. Todd B, Moore D, Deivanayagam CC, Lin GD, Chattopadhyay D, Maki M, et al. A structural model for the inhibition of calpain by calpastatin: crystal structures of the native domain VI of calpain and its complexes with calpastatin peptide and a small molecule inhibitor. *J Mol Biol*. 2003;328:131-146.
79. Mellgren RL, Shaw E, Mericle MT. Inhibition of growth of human TE2 and C-33A cells by the cell-permeant calpain inhibitor benzyloxycarbonyl-Leu-Leu-Tyr diazomethyl ketone. *Exp Cell Res*. 1994;215:164-171.

80. Paquet-Durand F, Sanges D, McCall J, Silva J, van Veen T, Marigo V, et al. Photoreceptor rescue and toxicity induced by different calpain inhibitors. *J Neurochem.* 2010;115:930-940.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始寛容な御指導、御鞭撻を賜りました日本大学薬学部薬理学研究室 伊藤芳久 教授に心より深謝致します。また、本研究に際して、数々の有益な御助言を頂きました日本大学薬学部薬理学研究室 石毛久美子 教授に深く感謝致します。これまでの研究において、様々な御助言を賜り、研究者としての思考と姿勢を御教授頂きました日本大学薬学部薬理学研究室 小菅康弘 助教には心より感謝致します。

本研究の審査にあたり、有益な御助言を頂きました日本大学薬学部臨床医学研究室 小野真一 教授に深く感謝致します。また、本研究を行うに際して、実験機器を使用させて頂き、使用方法について御教授頂きました日本大学医学部生体機能医学系生化学分野 榎島誠 教授、梅田香織 助手に深く感謝致します。研究方法やデータ解析等において有益な御助言を頂きました国際医療福祉大学薬学部 宮岸寛子 助教に深く感謝致します。

さらに、多大な御支援と御激励を賜りました日本大学医学部附属板橋病院長 丹正勝久 先生ならびに日本大学医学部附属板橋病院薬剤部長 吉田善一 先生を始め、日本大学医学部附属板橋病院薬剤部の各位に心より感謝致します。

最後に、大学院での生活を送るにあたり常に暖かく応援をしてくれ、心の支えになってくれた妻・美加と息子・孝輔に心より感謝致します。