

学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	脳神経科学領域脳血管病態学教育研究分野 氏名 孟 鵬飛
<p>(論文題目)</p> <p>Carnosic acid suppresses the production of amyloid-β 1-42 by inducing the metalloprotease gene TACE/ADAM17 in SH-SY5Y human neuroblastoma cells</p> <p>(カルノシン酸は SH-SY5Y ヒト神経芽腫細胞においてメタロプロテアーゼ遺伝子 TACE/ADAM17 の誘導によりアミロイド β (1-42) の産生を抑制する)</p>	
<p>(内容の要旨)</p> <p>【背景・目的】</p> <p>アルツハイマー病の根本病態はアミロイド β ペプチド ($A\beta$) の異常蓄積やオリゴマー形成であるとする $A\beta$ カスケード仮説や $A\beta$ オリゴマー仮説が有力視されている。細胞膜を貫通しているアミロイド前駆体タンパク質 (APP) が β 及び γ セクレターゼにより切断 (β 切断) されると $A\beta$ が生成される。一方、α セクレターゼによる APP 切断 (α 切断) が先行すると $A\beta$ が形成されない。したがって、セクレターゼの発現バランスが $A\beta$ の生成量を左右する。$A\beta$ はアミノ酸残基数の違いにより $A\beta$ 1-40 ($A\beta$ 40) と $A\beta$ 42 の 2 種類が主に存在する。$A\beta$ 42 は $A\beta$ 40 に比べて凝集性が高く、重合体を形成して神経毒性を持つ。そこで、神経細胞における $A\beta$ 42 の産生制御に着目した。</p> <p>ローズマリー精油に含まれるカルノシン酸 (CA) は、広範な酸化ストレス応答を制御する転写因子 Nrf2 の活性化を介して神経成長因子様作用 (神経細胞の増殖、分化、突起伸長、生存維持等) を発揮することが知られている。しかし、これまで CA の $A\beta$ 42 制御に関する知見はない。</p> <p>本研究の目的は、培養ヒト神経系細胞の $A\beta$ 42 分泌に対する CA の影響を明らかにすることである。同時に、関連する APP 代謝フラグメント分泌やセクレターゼ発現バランスに対する CA の影響を検討し、その機構を解明することである。</p> <p>【方法】</p> <p>培養細胞は、SH-SY5Y ヒト neuroblastoma 細胞を用いた。終濃度 5-30 μM の CA を培地に添加し、24 h まで処理した。タンパク質合成やタンパク質リン酸化酵素 MAP キナーゼ等の特異的阻害剤による前処理は、CA 処理の 1 h 前から行った。APP や各セクレターゼの mRNA 及びタンパク質発現は定量 RT-PCR 法及びウェスタンブロット法で解析し、培養上清中に分泌された soluble APP α (sAPP α) や sAPP β、$A\beta$ 40、$A\beta$ 42 は酵素抗体 (ELISA) 法で測定した。セクレターゼや Nrf2、$A\beta$ 分解酵素の関与を確認するために、それぞれの遺伝子を RNA 干渉法でノックダウンして検討した。</p> <p>【結果】</p> <p>1. CA は APP の β 切断を抑え α 切断を高める: CA は SH-SY5Y 細胞の $A\beta$ 42 及び $A\beta$ 40 分泌レベルを濃度依存的に抑制した。$A\beta$ 42 分泌の抑制率は CA 濃度 30 μM で 61% であった。$A\beta$ 40 に対する $A\beta$ 42 の比率は CA 濃度によらずほぼ一定で</p>	

- あった。さらに、 β 切断の同時産物であるsAPP β の分泌もCA濃度依存的に減少した。一方、sAPP α 分泌はCA濃度依存的に増加した。
2. セクレターゼ発現に対するCAの影響： α セクレターゼのひとつであるTACEのmRNA発現は、CA刺激により時間・濃度依存的にセクレターゼ中で最も増加した。この発現はタンパク質合成やMAPキナーゼ等の阻害剤の前処理で低下しなかった。一方、 β セクレターゼBACE 1とAPPのmRNAはほぼ一定のままであった。 γ セクレターゼPS1 mRNAの発現は低下しなかった。細胞内のTACEタンパク質もmRNAと同様に増加し、全長APPタンパク質はほぼ一定であった。
 3. TACEノックダウンの影響： siRNAを用いたTACEのノックダウンにより、CA刺激で増加したsAPP α が抑制されたことから、CAはTACEの活性化を介してAPPの α 切断を促進することが示された。同時に、A β 42分泌がコントロール siRNAに比べてわずかながら有意に増加したことから、TACEの α 切断活性はCA刺激によるA β 42分泌抑制に少なくとも一部関与していることがわかった。
 4. ADAM10ノックダウンの影響： もうひとつの α セクレターゼADAM10をノックダウンすると、sAPP α 分泌はCA刺激の有無によらず減少した。このことは、 α 切断においてADAM10がconstitutiveに作用していることを示す。しかし、CAによるA β 42分泌抑制はADAM10ノックダウンで軽減されず、ここでのADAM10の関与は認められなかった。
 5. Nrf2ノックダウンの影響： CAは転写因子Nrf2の核への蓄積を介して様々な遺伝子発現に影響していることが知られている。Nrf2の標的遺伝子・ヘムオキシゲナーゼ (HO-1) は、カルノシン酸で高発現し、Nrf2ノックダウンにより抑制された。しかし、このときA β 42分泌はコントロールsiRNAに比べて増加しなかった。つまり、CAが誘導する転写因子Nrf2は、今回のA β 42分泌抑制には介在していなかった。
 6. A β 分解酵素の検討： CA刺激によりA β 分解酵素の一つであるインスリン分解酵素 (IDE) だけが増加した。しかし、IDEノックダウン実験では、CAによるA β 42分泌抑制に対するIDEの関与は認められなかった。

【考察】

以上の結果から、培養SH-SY5Yヒト神経芽腫細胞において、CAはAPPの β 切断ではなく α 切断を促進することにより、A β 42の産生を抑制することが示された。このAPPの α 切断の促進機構の少なくとも一部は、CAが α セクレターゼの一つであるTACEの発現を誘導してsAPP α 分泌を促進することによる、ということが明らかになった。sAPP α は神経栄養・保護機能を有するとされている。また、各遺伝子のノックダウン実験では、ADAM10やNrf2、IDEなどのこの抑制への介在は認められなかった。これらのことから、CAによるA β 42分泌抑制にはTACEやADAM10、Nrf2、IDE以外の経路が介在することが示唆される。その解明は今後の検討課題である。

CAは抗酸化ストレス天然有機化合物として、記憶力を改善する作用、神経保護作用など多彩な生理活性を持つことが報告されている。今回、新たにCAのA β 42産生に対する抑制作用が明らかになり、CAはA β が介在するアルツハイマー病などの疾患の予防に有用である可能性が高まったといえる。