

機能的食品由来物質がアルツハイマー病発症関連分子に与える影響

山本直樹

立命館大学薬学部薬学科 助教
(現 北陸大学薬学部薬学科 講師)

緒言

認知症高齢者数が200万人を越す状況において、アルツハイマー病(AD)は特に高齢化社会において治療薬開発ならびに早期診断法の確立が最も急がれている疾患である。AD発症の物質的基盤であるA β の重合体や線維体が神経細胞死を誘導するというアミロイド説が提唱されており¹⁾、これまで多くの研究者により様々な研究結果が報告されている。しかし、現在までの日本におけるADの薬物療法は、アセチルコリン分解酵素阻害薬の塩酸ドネペジル等の認知改善薬が用いられているだけであり、根本的治療薬は開発されておらず、しかも困難を極めている。しかし、患者数は年々増加の一途を辿っており、食物摂取による予防が期待されている。これまで、機能的食品由来物質によるアミロイド β 蛋白(A β)線維体形成抑制効果の検討²⁾がなされてきたが、その効果は未解決である。このような状況下で、初期AD脳内において同定されたGM1に結合したA β (GA β)が、A β 重合を促進する「種」として働いていることが明らかにされた³⁾。この報告を契機として、以後、研究代表者を含めた国内外の研究者により老化やAD脳内におけるGM1の発現様式、ならびにA β 重合体の形成に対するGM1の関与について報告がなされ、GM1の発現分布(特に集積度)状況が、AD脳内におけるA β 重合体形成に重要な役割を担っていることが示唆された^{4,5)}。

A β の分解酵素は様々報告されているが、脳内の定常レベルを調整する主要なものに、ネプリライシン(NEP)およびインスリン分解酵素(IDE)がある。両酵素とも可溶性A β を分解することで、A β の神経毒性を軽減すると考えられている。また、NEPは神経毒性体と考えられているA β オリゴマーも分解することができる唯一のA β 分解酵素である⁶⁾。このNEPの脳内発現が加齢とともに低下することやADの前段階から大脳皮質および辺縁系において選択的に低下することから、NEP発現および活性低下がAD病態の進行と深く関

わっていることから、NEPは治療薬開発において最も注目されている⁷⁾。

本研究では、機能的食品由来物質に着目し、神経系細胞のAD発症関連分子(NEP、IDE、GM1など)発現に及ぼす影響を検討することにより、AD発症予防成分を見出すことを目的とする。

実験方法・結果

1. イソフラボン混合物およびカテキン混合物処理によるNEPおよびIDE発現量変化に対する濃度依存性検討

NEPおよびIDE発現量に対する濃度依存的な影響を調べるために、初代培養アストロサイトにイソフラボン混合物およびカテキン混合物を投与し48時間培養した。このとき使用したイソフラボン混合物は、大豆イソフラボン粗抽出物である。またカテキン混合物については、緑茶由来のエピカテキン、エピガロカテキン、没食子酸エピカテキン、没食子酸エピガロカテキン(EGCG)を含む混合物である。NEPおよびIDEタンパク発現量変化をWestern blotting法により解析したところ、カテキン混合物の濃度に依存してNEP発現が有意に減少していた(図1)。一方、IDE発現はカテキン混合物濃度に依存した有意な変化は確認できなかった(図1)。また、イソフラボン混合物処理においては、NEPおよびIDEの両タンパク発現に変化が認められなかった(図1)。

2. カテキン混合物の内容物処理によるNEPおよびIDE発現量変化に対する濃度依存性検討

カテキン混合物の内容物であるエピカテキン、エピガロカテキン、没食子酸エピカテキン、EGCGを初代培養アストロサイトに投与し、NEPおよびIDE発現量に対する濃度依存的な影響を調べた。NEPおよびIDEタンパク発現量変化をWestern blotting法により解析したところ、EGCGは濃度に依存してNEP発現量を有意に

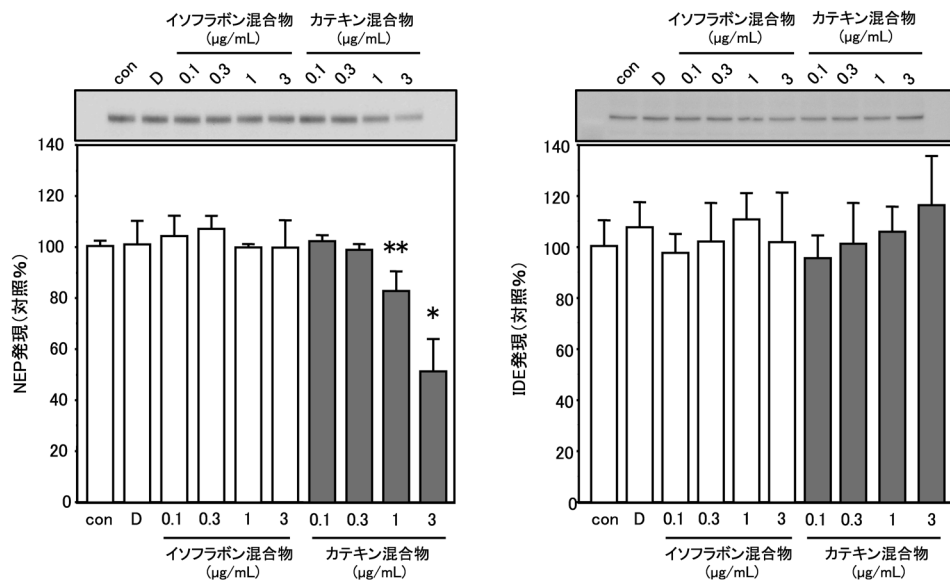


図1 アストロサイト発現NEPおよびIDE発現に対するイソフラボン混合物とカテキン混合物の影響

イソフラボン混合物とカテキン混合物をアストロサイトに投与後、48時間後に回収しウエスタンブロット法で解析 Mean±SD, $n=5$, * $p<0.0001$, ** $p<0.05$.

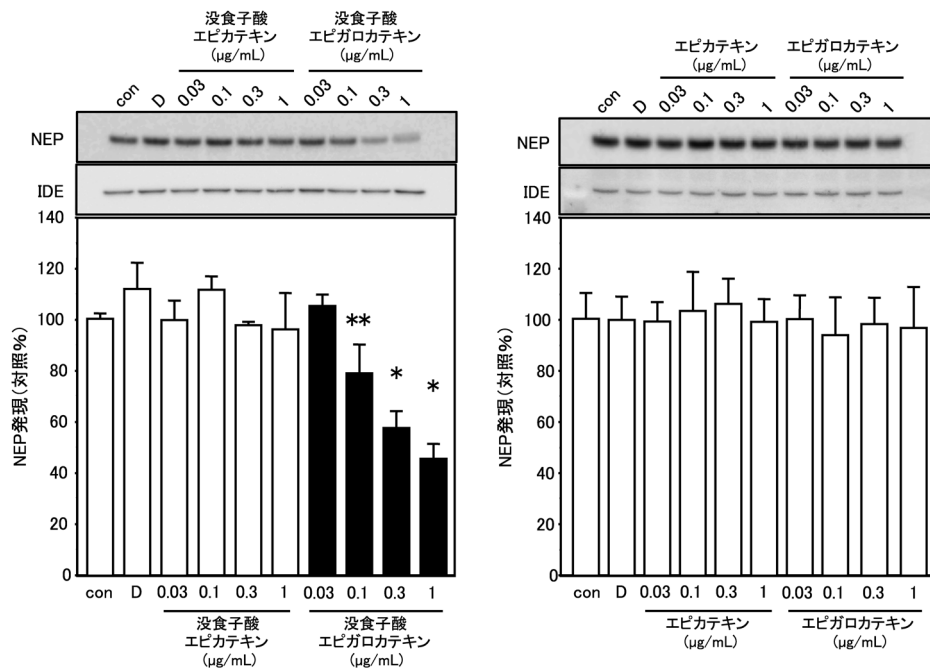


図2 アストロサイト発現NEPおよびIDE発現に対するカテキン混合物内に含まれる内容物のそれぞれの影響

カテキン混合物に含まれている内容物をそれぞれアストロサイトに投与後、48時間後に回収しウエスタンブロット法で解析 Mean±SD, $n=5$, * $p<0.0001$, ** $p<0.01$.

減少させた (図2)。一方、その他の内容物においては、NEPの発現量に変化はなかった。またIDE発現については、どの内容物においても濃度に依存した有意な変化は確認できなかった (図2)。

3. EGCG処理によるNEPおよびIDE発現量変化の時間依存性

EGCGを初代培養アストロサイトに投与し、NEPおよびIDE発現量の時間経過に対する影響を調べた。アストロサイトにEGCG (0.5 µg/mL) で処理し、2、8、

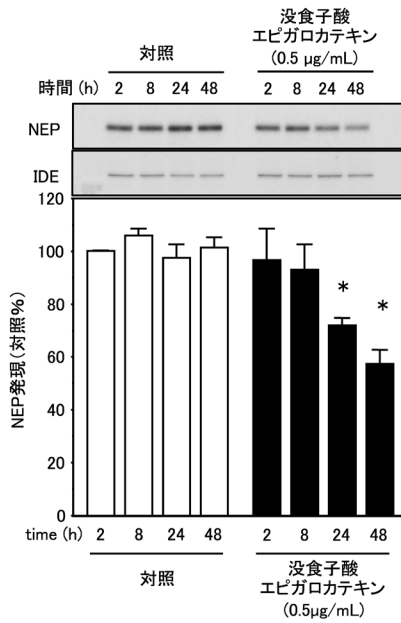


図3 アストロサイト発現NEPおよびIDE発現に対する没食子酸エピガロカテキンの時間的な影響

没食子酸エピガロカテキンをアストロサイトに投与後、48時間示した時間で回収しウエスタンブロット法で解析 Mean±SD, n=5, * $p < 0.0001$.

24、48時間後回収した。Western blotting法により解析したところ、NEP発現量は、EGCG処理後、時間に依存して減少していた(図3)。一方、IDE発現量においては、どの時間においても有意な減少は確認できなかった(図3)。

4. NEP発現量の低下に対するシグナル伝達経路の関与

NEP発現低下につながるシグナル伝達経路 Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) および Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) の関与を調べるために、アストロサイトにEGCG (0.5 μg/mL) を投与後0.5、2、24時間で回収し、Akt (PI3K下流タンパク) および Erk1/2 (MAPK下流タンパク) のリン酸化(活性化)をWestern blotting法により解析した。Aktおよび Erk1/2のリン酸化は、EGCG処理後24時間で有意に上昇していることが確認できた(図4a)。次に、これらのシグナル伝達経路を抑制するために、それぞれの阻害剤であるLY294002 (PI3K阻害剤) とU0126 (MAPK阻害剤) をEGCG処理(48時間)の1時間前に投与した。Western blotting法により解析したところ、EGCGによって誘導されたNEPの発現量の低下は、LY294002前

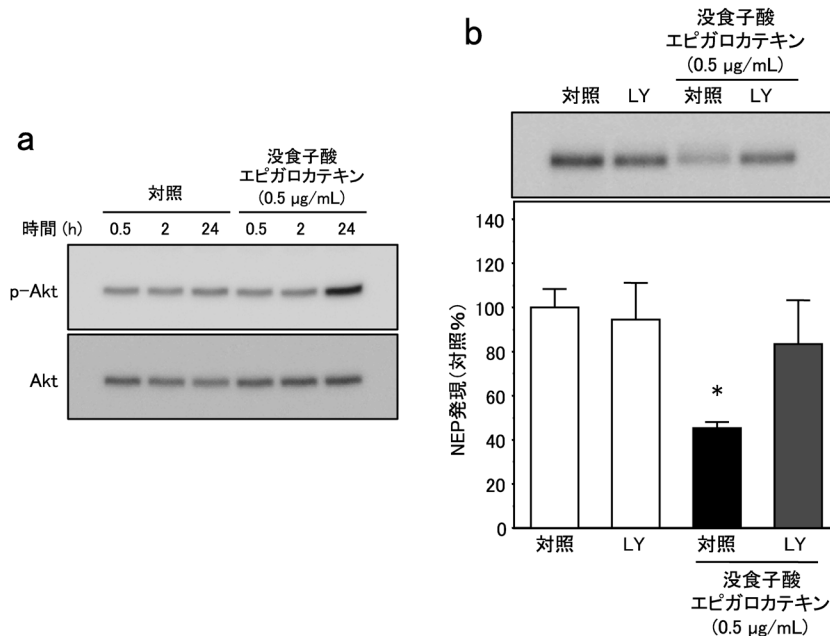


図4 アストロサイトにおける没食子酸エピガロカテキン誘導NEP発現低下に対する細胞内シグナル伝達系 (PI3K) の関与

- 没食子酸エピガロカテキンをアストロサイトに投与後、24時間示した時間で回収しウエスタンブロット法によってAktのリン酸化によってPI3K活性化を解析
- LY294002 (LY) を前処理後、没食子酸エピガロカテキンをアストロサイトに48時間投与後、ウエスタンブロット法によってNEP発現量を解析 Mean±SD, n=5, * $p < 0.0001$.

処理によって阻害されたことが確認できた (図4b)。しかしながら、U0126前処理によっては、EGCGによる影響を抑制することはできなかった。

考 察

本研究においては、アストロサイト発現NEPおよびIDE発現に対するカテキン類とイソフラボン類の影響を検討した。その中で、お茶の成分であるカテキン類の中のEGCGが、 $A\beta$ 単量体のみならず神経毒性を示す $A\beta$ オリゴマーの分解に大きく関与しているNEPのアストロサイトにおける発現を減少させた。このとき、興味深いことにIDEの発現には影響はなかった。EGCGによるNEP発現の減少は、濃度および時間依存的なものであった。さらに、細胞内シグナル伝達系のPI3Kの活性化を介して誘導されることを示すことができた。現時点での結果は、AD発症に対してマイナスの効果となっているが、最近の我々の研究ではNEPが細胞外に放出されることによって今回のようにアストロサイト内のNEP発現量が低下するデータが他の研究で得られている。また、アストロサイト内での局在等も検討しなければならないと考えている。今後の研究課題として発展させていくつもりである。

要 約

ADの病理学的特徴の一つとして、 $A\beta$ が脳内に蓄積することによる老人斑の形成があげられる。 $A\beta$ の脳内での代謝にはNEPやIDEが主に関与している。一方、AD予防および治療に向けての機能性食品の開発は非常に注目されている。今回、機能性食品としてよく取り上げられている大豆とお茶の由来物質がアストロサイトに発現しているNEPおよびIDEの発現調節にどのような

影響を与えているのかを検討した。イソフラボン混合物およびカテキン混合物を投与した初代培養アストロサイトのNEPおよびIDE発現変化についてウエスタンブロット法を用いて検討した結果、カテキン混合物中のEGCGが、アストロサイトのNEPの発現を減少させた。しかしながら、イソフラボン混合物およびその他のカテキン混合物の内容物ではNEP発現には影響はなかった。またIDE発現は、どの混合物も発現変化を誘導しなかった。EGCGによるNEPの発現変化は、濃度依存的かつ時間依存的なものであった。さらに、細胞内シグナル伝達系のPI3kinaseを介してNEPの発現を抑制していた。以上より、EGCGはシグナル伝達系のPI3kinaseの活性化を介して脳内のアストロサイトにおけるNEP発現を抑制することで $A\beta$ 分解能を減少させることが示唆されたが、今後も細胞外液中のNEPタンパク量を検討する必要があると思われる。

謝 辞

本研究は、平成25年度三島海雲記念財団学術研究奨励金により行われました。本研究を遂行するにあたりご支援賜りました公益財団法人三島海雲記念財団ならびに関係者各位に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) DJ. Selkoe: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 11039–11041, 2001.
- 2) H. Amijee, et al.: *Biochemistry*, **51**, 8338–8352, 2012.
- 3) K. Yanagisawa, et al.: *Nat. Med.*, **1**, 1062–1066, 1995.
- 4) K. Yanagisawa, et al.: *Int. J. Alzheimer's Dis.*, **2011**, 286536, 2011.
- 5) N. Yamamoto: *J. Neurochem.*, **121**, 619–628, 2012.
- 6) H. Kanemitsu, et al.: *Neurosci. Lett.*, **350**, 113–116, 2003.
- 7) T. Lu, et al.: *Nature*, **429**, 883–891, 2004.