

アルツハイマー病脳に蓄積する
アミロイド β 蛋白の生成に関わる
セクレターゼと酸化ストレスの関連に
ついての研究

2010

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

織田 彰子

筑波大学

博士（医学）学位論文

目次

論文概要	1
1. 研究の背景	3
1-1. AD 脳に蓄積する A β の生成	3
1-2. A β と酸化ストレスの関連	4
1-3. A β と脂質ラフトの関連	5
2. 研究の目的	6
3. 対象と方法	7
3-1. 細胞培養および薬剤処理	7
3-2. 抗体および薬剤	8
3-3. ウェスタンブロット解析	8
3-4. 脂質ラフトの分離	9
3-5. 半定量的および定量的逆転写(RT)-PCR	10
3-6. A β 測定	11
3-7. 統計学的解析	11
4. 結果	12
4-1. EA は PS1 蛋白発現を増加させる	12
4-2. γ セクレターゼ複合体因子と成熟型 BACE1 は主に脂質ラフトに分布する	13
4-3. EA は脂質ラフトにおいて PS1 蛋白を増加させる	13
4-4. NAC は EA による PS1 蛋白の増加を抑制する	14
4-5. EA は PS1 mRNA 発現を増加させる	15
4-6. EA は A β 産生を増加させる	15

5. 考察	16
5-1. 酸化ストレスにより PS1 の発現が増加する	16
5-2. 酸化ストレスにより脂質ラフト内の PS1 蛋白が増加する	19
5-3. 酸化ストレスと A β は悪性サイクルを形成する	20
6. 結論	21
7. 謝辞	22
8. 引用文献	23
9. 図表	36

論文概要

目的：アルツハイマー病 (Alzheimer's disease (AD)) は慢性進行性の記憶力障害を特徴とする最も頻度の高い認知症疾患である。AD は人口の高齢化に伴って近年増加しており、その病態を治療への展望を持って解明することは非常に重要である。AD の病理学的特徴の一つである老人斑には、amyloid- β 蛋白 ($A\beta$) が凝集、蓄積しているが、現在のところ、この $A\beta$ が AD の病態の中心的因子であると考えられている。 $A\beta$ はアミロイド前駆体蛋白 (amyloid precursor protein (APP)) が β セクレターゼ (β -site APP cleaving enzyme 1 (BACE1)) と γ セクレターゼにより段階的に切断されて生成する。 γ セクレターゼは presenilin 1 (PS1) を活性中心として少なくとも他の 3 つの蛋白質である nicastrin, anterior pharynx-defective 1 (APH-1), presenilin enhancer 2 (PEN-2) が結合した複合体である。これまでに、 $A\beta$ を増加させる因子として酸化ストレスやコレステロールが報告されてきた。さらに、脂質ラフトと呼ばれるコレステロールに富む膜微小領域が $A\beta$ の産生、蓄積に重要な役割を持っていることが示唆されてきた。また近年、酸化ストレスによりセクレターゼが変化する可能性も指摘されてきているが、現在のところ詳細は明らかでない。本研究では、酸化ストレスによる脂質ラフト内の BACE1, γ セクレターゼの変化および $A\beta$ 産生の変化について明らかにするため、ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞に、酸化ストレス物質である Ethacrynic acid (EA) を負荷した培養系を用いた検討を行った。

対象と方法：SH-SY5Y 細胞に、EA (10~30 μ M) を 20 時間負荷し、細胞内蛋白質をウエスタンブロット法で検討した。次に、EA (30 μ M) を 20 時間負荷後、細胞を 1%CHAPS を含むバッファーで処理し、蔗糖密度勾配遠心法により分画し、脂質ラフト画分と非ラフト画分をウエスタンブロット解析した。さらに、RT-PCR 法により PS1 mRNA のレベルの解析を行った。EA による $A\beta$ 産生の変化を検討するため、スウェーデン変異型 APP を発現する SH-SY5Y 細胞 (SH-swAPP 細胞) に EA (30 μ M) を 24 時間負荷後、培養上清中の $A\beta_{40,42}$ レベルをサンドイッチ ELISA 法で測定した。また、抗酸化物質である N-Acetylcystein (NAC) の効果を調べるため、細胞を NAC (2 mM) で 8 時間前処理した後、EA (30 μ M) と NAC を共負荷し、細胞内および脂質ラフト画分の PS1 蛋白レベル、PS1 mRNA、培養上清中の $A\beta_{40,42}$ レベルを同様に解析した。

結果：細胞内蛋白質のウェスタンブロット解析の結果，EA (30 μ M) 負荷時に酸化ストレスマーカーである Heme-Oxygenase-1 (HO-1) 蛋白質の明らかな増加が確認された。EA 負荷により，細胞内の PS1 蛋白質レベルは対照の約 1.4 倍へと有意に増加したが，他の γ セクレターゼ複合体因子である nicastrin, APH-1, PEN-2 および，BACE1, APP の蛋白質レベルには著変を認めなかった。蔗糖密度勾配遠心法による分画では，PS1 を含めた γ セクレターゼ複合体因子と成熟型 BACE1 は脂質ラフト画分に主に分布していた。EA 処理した細胞の脂質ラフト画分において，PS1 蛋白質レベルは対照の約 1.4 倍へと有意に増加したが，他の γ セクレターゼ複合体因子および，BACE1, APP の蛋白質レベルには著変を認めなかった。半定量的 RT-PCR 法による検討では，PS1 mRNA レベルは EA 負荷時に対照の約 1.4 倍へと有意に増加した。real-time PCR 法でも同様の結果を得た。SH-swAPP 細胞に EA (30 μ M) を負荷した場合，培養上清中の A β 40, A β 42 のレベルが，それぞれ対照の約 2 倍，約 1.4 倍へと有意に増加した。同時に細胞内 PS1 蛋白質レベルは対照の約 1.3 倍へと有意に増加した。NAC (2 mM) を EA と共処理した際には，上述の EA 負荷による HO-1 蛋白質の増加が抑制されると共に，PS1 蛋白質，PS1 mRNA, A β レベルの増加も抑制された。

考察：本研究では，SH-SY5Y 細胞に EA を用いて酸化ストレスを負荷した際に，PS1 発現の増加を認め，脂質ラフトにおける PS1 蛋白質レベルの増加を認めた。さらに SH-swAPP 細胞において EA 処理は A β 分泌を増加させた。脂質ラフトにおける PS1 蛋白質レベルの増加は， γ セクレターゼ活性の増加につながり，その結果 A β 産生が増加する可能性が考えられる。A β はまた，酸化ストレスを誘導することが報告されており，上述のように酸化ストレスにより増加した A β がまた，酸化ストレスを誘導して悪性サイクルを形成し，病態を進行させると考えられる。従って，抗酸化物質などによりこのサイクルを阻止することは AD の治療の一助になる可能性があり，さらに脂質ラフトにおける A β 産生を標的とする治療も有効になりうると考えられる。本研究では比較的強い刺激での急性期反応を検討したが，より弱い刺激で慢性的な処理による検討も病態および治療を検討する上で有用と考えられる。

結論：酸化ストレスは，PS1 発現を増加させ，脂質ラフトの PS1 増加を介して A β 産生を促進する可能性が考えられた。本研究の結果は，酸化ストレスと A β 増加の関連，および A β 産生における脂質ラフトの重要性を支持するものであり，抗酸化物質による酸化ストレスの抑制や脂質ラフトにおける A β 産生を標的とする治療が AD 治療に有効である可能性が示唆される。

1. 研究の背景

1-1. AD 脳に蓄積する A β の生成

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease (AD)) は最も一般的な認知症の原因疾患であり、慢性進行性の記憶力障害をきたす。65 歳以上の人口の 10% 以上が罹患しており、また人口の高齢化に伴い近年増加している (1)。そのため、AD の病態を治療への展望を持って解明することは非常に重要である。

AD の神経病理学的特徴は、細胞外に見られる amyloid- β 蛋白 (A β) を含む老人斑と、細胞内に見られる過リン酸化タウ蛋白を含む神経原線維変化である。現在のところ、A β の凝集、蓄積により老人斑が形成され、その後神経原線維変化が誘導され神経細胞死を導くと考えられており (アミロイド仮説)、A β が疾患の発生、進行に重要な役割を担っていると考えられている (2,3)。A β は、膜貫通蛋白であるアミロイド前駆体蛋白 (amyloid precursor protein (APP)) が 2 つの膜結合プロテアーゼである β セクレターゼ (β -site APP cleaving enzyme 1 (BACE1)) と γ セクレターゼに切断されて生成される (4,5)。図 1 に示すように、BACE1 は APP を A β 領域の N 末で切断し、それにより生成する C 末断片を、続いて γ セクレターゼが切断して A β が遊離される (5)。 γ セクレターゼは、presenilin 1 (PS1) を活性中心として少なくとも他の 3 つの蛋白質である nicastrin, anterior pharynx-defective 1 (APH-1), presenilin enhancer 2 (PEN-2) が結合した複合体である (4)。

1-2. A β と酸化ストレスの関連

A β がどのように増加・蓄積し、疾患が進行するかについてはまだ不明な点が多いが、A β を増加させる因子として、酸化ストレスやコレステロールが報告されてきている。これまで、AD 脳で酸化ストレスマーカーの増加が観察されたことから、酸化ストレスが AD 病態に関与していると考えられてきた(6-9)。さらに、酸化ストレスマーカーが AD の病初期より観察されることが報告され、酸化ストレスが病初期より重要な役割を果たしていることが示唆されてきた(10,11)。以前の報告により、A β が酸化ストレスを誘導し(12-14)、また反対に酸化ストレスが A β を誘導する(13-20)ことが示され、酸化ストレスと A β が互いに増加させ合うことが分かってきた。また、抗酸化物質が A β の毒性から神経細胞を保護したり(12,13,23)、A β レベルを減少させる(24)ことも報告され、酸化ストレスと A β が密接に関連していることが明らかになってきた。酸化ストレスが A β を増加させるメカニズムとして、近年、酸化ストレスによる BACE1 や γ セクレターゼの発現や活性の増加が報告されてきている(17,19,20,22)が、まだ詳細は明らかになっていない。

1-3. A β と脂質ラフトの関連

遺伝学，疫学，生化学の研究から，AD とコレステロールとの関連も指摘されてきた．中年期の高コレステロールが後年におけるアミロイド沈着や AD 発達のリスクと強く関連することや (25-28)，コレステロール低下薬であるスタチンを内服していた患者では，一般人よりも AD 発症率が低いことなどが報告されてきた (29)．動物実験や培養細胞の研究では，高コレステロールと A β 産生増加の関連が示されてきた．高コレステロール食で栄養された動物は A β 蓄積が増加し (30-33)，一方コレステロール低下薬の投与は A β レベルを低下させた (34,35)．培養細胞でもコレステロールの除去や追加によって同様の結果が示されてきた (34,36,37)．

コレステロールと AD との関連は 10 年以上前から報告されているが，その詳細な機序はまだ分かっていない．最近その一つの仮説として，脂質ラフトとの関連が提唱されてきている．脂質ラフトはコレステロール，スフィンゴ脂質，飽和リン脂質に富む膜微小領域で，蛋白質が選択的に出入りし，特定の蛋白質が群集する (1,38,39)．脂質ラフトは膜ソーティングや輸送，シグナル伝達などの過程において重要な役割をもっていると考えられている (40)．これまでの研究で，脂質ラフトに BACE1 や γ セクレターゼが局在し，そこで活性を發揮していることや (41-47)，A β が AD 脳や AD モデルマウス脳の中で脂質ラフトに蓄積している (48,49) ことが報告され，脂質ラフトが A β の産生・蓄積に重要な場である可能性が指摘されてきた．

以上より，酸化ストレスや脂質ラフトは A β の産生に影響を及ぼしていると考えられ，その詳細を解明していくことは AD の治療的展望に寄与すると考えられる．

2. 研究の目的

上述のように、AD 病態には病初期より酸化ストレスが深く関わっていることや、コレステロールが AD の発症や進行に関与していることが明らかになってきている。さらに、AD の病因の中心的役割を持つ A β の増加に酸化ストレスとコレステロールが関与していることが分かってきた。また、コレステロールと関連して、脂質ラフトと呼ばれる膜微小領域が A β の産生、蓄積に重要な役割を持っていることが示唆されてきた。そして近年、酸化ストレスと A β の関係に関連して、酸化ストレスによりセクレターゼが変化する可能性が指摘されてきたが、現在のところその詳細は明らかになっていない。そこで本研究では、酸化ストレスによる脂質ラフト内の BACE1, γ セクレターゼの変化および A β 産生の変化を検討することを主な目的とした。そのための実験系として、ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞あるいは A β を過剰産生する SH-SY5Y 細胞に、酸化ストレス物質である Ethacrynic acid (EA) を負荷した培養系を用いた。EA は、細胞内の主要な抗酸化物質であるグルタチオンを欠乏させることにより酸化ストレスを誘導する物質である (50)。

3. 対象と方法

3-1. 細胞培養および薬剤処理

ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞を、以前の報告を参照して (51), DMEM/F12 に 10% 胎児ウシ血清を加えた培養液で、5% 二酸化炭素/95% 空気的环境下で培養した。細胞は 60 mm または 145 mm-dish に、それぞれ 1.7×10^6 または 8.5×10^6 個の濃度でまいた。翌日、EA を加えた培養液に交換し、~24 時間反応させた。EA は、エタノールに EA 50 mM を溶解した溶液を、適宜培養液で希釈した。対照細胞は、溶媒（エタノール）のみを溶解した培養液に交換した。N-acetylcystein (NAC) の効果を評価するため、細胞を NAC (2 mM) で 8 時間前処理し、その後 EA (30 μ M) + NAC (2 mM), または NAC (2 mM) のみを ~24 時間投与した。NAC は培養液に直接溶解した。A β 分泌に対する EA の効果を評価するために、スウェーデン変異型 APP を過発現し、A β を十分量産生する SH-SY5Y 細胞 (SH-swAPP 細胞) を用いた (51)。スウェーデン変異は、家族性アルツハイマー病の遺伝子異常の一つであり、APP の β 切断部位近傍の 595, 596 位のアミノ酸が KM \rightarrow NL に置換され、 β 切断が起こりやすくなるため A β 産生が増加する (52)。

3-2. 抗体および薬剤

PS1 に対するポリクローナル抗体 (CX, AB444) は, 荒木亘博士より供与して頂いた (53,54). nicastrin と APH-1aL に対するポリクローナル抗体は, それぞれ Sigma (St. Louis, MO) と Covans (Berkely, CA) より購入した. APP (R37) と PEN-2 (PNT2) に対するポリクローナル抗体はそれぞれ亀谷富由樹博士 (55) と Dr. Thinakaran (56) より供与して頂いた. heme oxygenase-1 (HO-1), BACE1, flotillin-1 に対する抗体はそれぞれ Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), Chemicon (Temecula, CA), IBL (Gunma, Japan) より購入した.

3-3. ウェスタンブロット解析

細胞を, 蛋白分解酵素阻害剤を含むRIPAバッファー (10 mM Tris, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 5 mM EDTA) に溶解し, bicinchoninic acid assayを用いて蛋白量を測定した. サンプルはそれぞれ等量の蛋白量ずつ, 8%または12%ゲルで泳動, 分離し, PVDF膜に転写した. 0.05% Tween-20と5%スキムミルクを含むphosphate- buffered saline (PBS) でブロッキングした後, 1%ウシ血清アルブミンと0.05% Tween-20を含むPBS中に溶解した一次抗体と室温で2時間反応させた. 続いてペルオキシダーゼで標識された二次抗体 (抗ラビットまたは抗マウスIgG) と室温で2時間反応させ, chemiluminescence試薬 (Parkin-Elmer, Boston, MA, USA) を用いて蛋白発現を検出した. 蛋白質のバンドはイメージアナライザー (LAS-1000, Fuji Film, Tokyo, Japan) を用いて定量した. 各蛋白質の定量値は β -actinの定量値で補正した.

3-4. 脂質ラフトの分離

脂質ラフトの分離は、以前に報告された方法を参照して蔗糖密度勾配遠心法により行った (41,57). 具体的には、145 mm-dish 1 枚の細胞を冷却した PBS で洗浄し、スクレーパーではがした後、低速遠心によりペレットにした。ペレットは、蛋白分解酵素阻害剤を含む 0.25 ml TNE バッファー (25 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA) 中で、25G 針を用いて粉砕した。そして 2% CHAPS を含む等量の TNE バッファーを加え、30 分氷上でインキュベートした。次に、その抽出液に 90% 蔗糖を含む TNE バッファーを等量加えて蔗糖濃度を 45% にし、1 ml を超遠心管に入れた。35% 蔗糖を含む TNE バッファー (1 ml) をその上に入れ、さらに 5% 蔗糖を含む TNE バッファー (1 ml) をその上に入れた。SW 60 ローター (Beckmann, Fullerton, CA) を用い、190,000g, 4°C, 16 時間超遠心した後、上面から 0.3 ml ずつ全 10 画分を採取した。脂質ラフトは、35% と 5% 蔗糖の界面に、白い帯状に浮遊していた。各画分を等量ずつ用い、ウエスタンブロット解析を行った。

3-5. 半定量的および定量的逆転写 (RT) - PCR

Gene Elute Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma) を用い、細胞から全 RNA を抽出した。全 RNA 1 μg に 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ oligo (dT) を 15 μl 加え、全量を 20 μl とし、Improm II Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI) を用いて逆転写反応 (RT) を行った。半定量的 RT - PCR では、RT 産物 (cDNA) 1 μl を 200 μM dNTPs, 0.5 μM primers, 1 μM Advantage 2 Polymerase mix (Stratagene, La Jolla, CA) に加えて全量を 50 μl とし、PCR 反応を行った。Primer は、PS1 に は 5'-AGGAAGAAGATGAGGAGCTGA-3' と 5'-ACTCAGGTGTAGAGCGATGAG-3' を , vimentin に は 5'-GCAGGAGCTGAATGACCGCT-3' と 5'-CCGTGAGGTCAGGCTTGGAA-3' を用いた。vimentin は、EA 処理で変化しない対照遺伝子として使用した。PCR 反応は、PS1 は変性 95°C1 分、アニーリング 62°C1 分、伸長 72°C2 分を 27 サイクル、vimentin は変性 95°C1 分、アニーリング 64°C1 分、伸長 72°C2 分を 23 サイクル施行した。増幅産物は 0.9%アガロースゲルで分離し、ethidium bromide で染色した後、イメージアナライザー (LAS-1000, Fuji Film) を用いて検出、定量した。上記 PCR 条件において、増幅産物の定量値は使用した cDNA 量に比例することを確認し、実験の定量性を確認した。

定量的 RT-PCR には、LightCycler 1.5 Instrument (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) を用いて real-time RT-PCR を行った。Primer は、PS1 には 5'-ACTGTTGCACTCCTGATCTGG-3' と 5'-ACTCAGGTGTAGAGCGATGAG-3' を、vimentin には上記と同じものを使用した。PCR 反応は LightCycler-DNA Master SYBR Green I (Roche Molecular Biochemicals) を用いて、標準的なプロトコールで行った。最初の変性を 95°C10 分行い、次に変性 95°C10 秒、アニーリング 58°C (PS1) または 60°C (vimentin) 10 秒、伸長 72°C20 秒を、40 サイ

クル施行した。PS1 mRNA 量は, vimentin mRNA 量で標準化して評価した。

3-6. A β 測定

SH-swAPP 細胞を 12-well plate に 5×10^5 cells/well の濃度でまき, 翌日, 新しい培養液に交換し, EA (30 μ M) を 24 時間負荷した。負荷後, 培養液を回収し, 以前の報告を参照し (51,58), sandwich ELISA kits (Wako, Osaka, Japan) を用いて A β 40 と A β 42 の濃度を測定した。具体的には, A β の capture 抗体として BNT77 抗体が塗布された 96-well plate に, サンプルと A β のスタンダード溶液を 0.1 ml ずつ入れ, 4°C で一晩反応させた。洗浄後, ペルオキシダーゼで標識された BA27 抗体 (A β 40 特異的) または BC05 抗体 (A β 42 特異的) と 4°C で 3 時間反応させた。洗浄後, TMB Microwell Peroxidase Substrate System (Kirkegaard & Perry Laboratory, Gaithersburg, MD, USA) を用いて酵素活性を測定した。スタンダード用の A β 40, A β 42 は Bachem (Bubendorf, Switzerland) より購入した。

3-7. 統計学的解析

全ての結果は平均 \pm SEM で表した。有意差検定は, one-way ANOVA と続いて Bonferroni multiple comparison test, または Student's *t*-test を行い, $p < 0.05$ を有意とした。

4. 結 果

4-1. EA は PS1 蛋白発現を増加させる

BACE1 と γ セクレターゼ複合体因子に対する EA の効果を検討するため、SH-SY5Y 細胞を EA で 20 時間処理し、細胞内蛋白質の変化をウエスタンブロット法で解析した。酸化ストレスマーカーである HO-1 が、EA 20 μ M でわずかに増加し、EA 30 μ M で著明に増加したことより (図 2A), EA 20 μ M 以上の濃度で酸化ストレスが誘導されることが確認された。PS1 蛋白レベルは、EA 30 μ M 負荷で対照より約 40% 増加した (図 2A,B)。しかし、nicastrin, APH-1, PEN-2, BACE1, APP の蛋白レベルには有意な変化を認めなかった (図 2A,B,C)。次に、HO-1 と PS1 蛋白レベルの経時変化を検討したところ、HO-1 は EA 30 μ M 負荷後 12 時間で著明に増加し、その後減少した (図 3A)。PS1 は 12 時間後より増加し、24 時間後にはさらに増加して、0 時間と比べ約 1.4 倍に増加した (図 3A,B)。以上の結果より、SH-SY5Y 細胞において、EA が PS1 蛋白レベルの増加を誘導することが示された。

4-2. γ セクレターゼ複合体因子と成熟型 BACE1 は主に脂質ラフトに分布する

BACE1 と γ セクレターゼ複合体の、脂質ラフトおよび非脂質ラフトへの分布と EA 処理による分布への影響を検討するため、SH-SY5Y 細胞に EA 30 μ M を 20 時間負荷し、蔗糖密度勾配遠心法を用いて分画した。各分画のウエスタンブロット解析の結果を図 4A に示した。脂質ラフトマーカーである flotillin-1 が fraction 4 に主に分布していた。EA によって誘導された HO-1 蛋白の多くは fraction 4 と 8-10 に分布していた。 γ セクレターゼ複合体因子のほとんどは fraction 4 に分布し、BACE1 は成熟型が主に fraction 4、未熟型が主に fraction 8-10 に分布していた。APP は fraction 4 と 8-10 の両方に分布していた。これらの分布には、EA 処理による変化を認めなかった。

4-3. EA は脂質ラフトにおいて PS1 蛋白を増加させる

次に、脂質ラフト内の γ セクレターゼ複合体因子と BACE1 に対する EA の効果を定量的に検討するため、対照と EA 処理サンプルの脂質ラフト画分 (fraction 4) と非脂質ラフト画分 (fraction 8-10 の混合物) をウエスタンブロット解析した。PS1 の N 末断片 (NTF) と C 末断片 (CTF) の蛋白レベルがいずれも対照の約 1.4 倍に有意に増加した (図 4B,C)。その他の γ セクレターゼ複合体因子である nicastrin, APH-1, PEN-2 の蛋白レベルには変化を認めず (図 4B,C)、BACE1, APP, flotillin-1 の蛋白レベルにも変化を認めなかった (図 4B,D)。以上の結果より、EA により増加した PS1 蛋白の多くは脂質ラフトに存在していると考えられた。

4-4. NAC は EA による PS1 蛋白の増加を抑制する

NAC は、細胞の主要な抗酸化物質であるグルタチオンの前駆物質であり、細胞内のグルタチオンを増加させて抗酸化作用を発揮する (59)。EA による酸化ストレスを NAC により抑制することで、PS1 蛋白の増加を防ぐことができるかどうかを検討した。細胞を EA と共に NAC (2 mM) で処理し、細胞内蛋白をウエスタンブロット解析したところ、EA による HO-1 の誘導はほぼ完全に抑制され、NAC の共処理が EA による酸化ストレスの誘導を抑制することが確認された (図 5A)。また PS1 蛋白の増加も有意に抑制された (図 5A,B)。NAC のみの処理では PS1 蛋白レベルを変化させなかった。次に、脂質ラフト画分における NAC の効果を検討するため、EA と NAC で共処理した後、蔗糖密度勾配遠心法で分画した。脂質ラフト画分をウエスタンブロット解析したところ、脂質ラフト画分においても NAC の添加が EA による PS1 蛋白レベルの増加を抑制することを確認した (図 5C,D)。以上より、NAC は EA による酸化ストレスを抑制し、PS1 蛋白レベルの増加を抑制すると考えられた。

4-5. EA は PS1 mRNA 発現を増加させる

EA による PS1 蛋白増加の機序を検討するため、RT-PCR 法を用いて PS1 mRNA を測定した。細胞を EA 30 μ M で処理したところ、PS1 mRNA レベルは 12 時間より増加し、24 時間で未処理の細胞と比べ約 1.4 倍に増加した。対照として用いた vimentin の mRNA レベルには著変を認めなかった (図 6A,B)。そして NAC 2 mM の添加により、EA による PS1 mRNA の増加が有意に抑制された (図 6D,E)。real-time RT-PCR 法においても、PS1 mRNA/vimentin mRNA 比が EA 負荷後 12 時間および 24 時間で有意に増加し、その増加は NAC の添加により抑制された (図 6C,F)。以上の結果より、EA が PS1 mRNA 発現を誘導し、NAC によりその誘導が妨げられることが示された。

4-6. EA は A β 産生を増加させる

次に、EA の A β 産生への影響を検討した。SH-SY5Y 細胞は A β の産生量が少なく検出が困難であるため、スウェーデン変異型 APP を過発現する SH-SY5Y 細胞 (SH-swAPP 細胞) を用いた。SH-swAPP 細胞に EA 30 μ M を 24 時間負荷し、培養上清中の A β 40 と A β 42 レベルをサンドイッチ ELISA 法で検討した。A β 40 は対照の約 2 倍、A β 42 は約 1.4 倍に増加した (図 7A)。ウエスタンブロット法で細胞内蛋白を検討したところ、EA 処理により HO-1 蛋白が誘導され、また PS1 蛋白レベルが約 1.3 倍に増加した (図 7B,C)。BACE1 や APP 蛋白レベルは著変なかった。NAC 2 mM を添加したところ、A β レベルの増加と細胞内 PS1 蛋白レベルの増加は抑制された (図 7D,E,F)。以上の結果より、EA は A β 産生を増加させ、NAC によりその増加が抑制されることが示された。

5. 考 察

5-1. 酸化ストレスにより PS1 の発現が増加する

本研究では、酸化ストレス刺激が神経系細胞の BACE1 および γ セクレターゼ複合体に及ぼす影響について検討した。細胞内のグルタチオンを欠乏させて酸化ストレスを誘導する EA を、神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞に負荷し、PS1 の mRNA、蛋白レベルが有意に増加することを示した。そして PS1 蛋白レベルの増加は脂質ラフト画分においても観察された。また、SH-swAPP 細胞において、EA 処理が A β 分泌を増加させた。これらの EA による PS1 mRNA、蛋白レベルの増加や A β 分泌の増加は、抗酸化作用を有するグルタチオンの前駆体である NAC を添加することにより抑制された。以上より、酸化ストレスは PS1 蛋白発現を増加させ、脂質ラフトの PS1 蛋白の増加を導き、それが A β 産生増加に寄与している可能性が考えられる。

EA 20 μ M 処理により酸化ストレスマーカーである HO-1 はわずかに増加し、30 μ M で HO-1 は著明に増加した。以前の報告で EA 濃度とグルタチオン枯渇の程度が直線的ではないことが示されており (50)、そのため HO-1 誘導も直線的でない可能性が考えられる。HO-1 と PS1 蛋白レベルの経時的变化の検討では、HO-1 蛋白レベルは 12 時間で最高となったが、PS1 蛋白レベルは 24 時間まで増加した。PS1 は、転写後に presenilinase と呼ばれる酵素により切断されて安定型の NTF と CTF になる。HO-1 蛋白と PS1 蛋白の経時变化の違いは、PS1 蛋白が上記の転写後切断を受けるためである可能性がある。

これまでに、酸化ストレスと γ セクレターゼおよび BACE1 の関連についていくつか報告されている (表 1)。神経細胞や非神経細胞において、過酸化水素や 4-hydroxynonenal (HNE) を負荷して酸化ストレスを誘導した場合、BACE1

や γ セクレターゼの活性が増加することなどが報告されているが、必ずしも結果が一致していない。この原因として、細胞種の違いの他、使用薬剤の違いや濃度および処理時間の違いの影響が考えられ、全ての酸化ストレスが同じ結果を生むわけではないことが示唆される。酸化ストレスと PS1 に関する報告としては、神経芽細胞腫 SK-N-BE 細胞に過酸化水素や HNE を負荷した際に、PS1, PEN-2, BACE1 の mRNA レベルが増加し、BACE1 および γ セクレターゼの活性が増加したという報告がある(19)。本研究では、EA 刺激により PS1 の mRNA, 蛋白レベルは増加したが、他の γ セクレターゼ複合体因子は変化しなかった。この相違は刺激薬剤の違いによって生じた可能性が考えられる。酸化ストレスによる PS1 mRNA の増加の機序は現時点ではまだ不明である。PS1 の発現を調節する転写因子には、cAMP response element-binding protein (CREB) や Ets related molecule (ERM) の報告があり(60,61)、CREB の一つである activating transcription factor 4 (ATF4) は、小胞体ストレスやアミノ酸枯渇などで誘導されるが、神経細胞において酸化ストレスにより誘導されたという報告もある(62)。以前、必須アミノ酸欠乏により ATF4 が PS1 の発現を増加させるという報告(63)もあるため、本研究においても ATF4 の関与を疑い、ATF4 の蛋白レベルをウェスタンブロット法で検討した。しかし ATF4 蛋白レベルは少なくとも 6~24 時間の範囲においては EA 処理で変化しなかった。今回観察された EA による PS1 mRNA レベルの増加については、ATF4 以外の転写因子が関与する可能性も考えられる。最近、酸化ストレスで活性化される転写因子 nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) が EA によって活性化されることが報告され(64)、本研究の系でも Nrf2 が活性化している可能性がある。Nrf2 は antioxidant response element (ARE) に結合するが、PS1 における ARE についてはこれまでに報告されていない。Wasserman らにより ARE consensus sequence として

(T^A/cAnn^A/gTGA^C/TnnnGC^A/G^A/T^A/T^A/T^A/T) という配列が提唱されており (65), PS1 の転写開始部位の-2171~-2152 にある (CCACCGTGACCAGGCGTTCA) が部分的に ARE に合致する. しかしその位置は ARE の確認されている NAD(P)H:quinine oxidoreductase 1 (NQO1) や glutamate-cysteine ligase modulatory subunit (GCLM) (ARE は-300~-440 程度) に比較して大きく異なっているため, PS1 の転写が Nrf2 により直接制御されるかについては不明である (66,67).

以前の報告で, 過酸化水素, HNE, Ascorbate/FeSO₄, H₂O₂/FeSO₄により酸化ストレスを誘導した際に, BACE1 の mRNA や蛋白レベル, 活性の増加が指摘された (17,19,20). しかし今回の実験では, EA による BACE1 蛋白の変化は認めなかった. この差は, 酸化ストレス刺激に用いた薬剤や細胞種の違いによって生じる可能性が考えられる. また別の報告では過酸化水素処理によっても BACE1 活性が変化せず, その著者らは, 以前の報告との解離の原因を過酸化水素の濃度と処理時間の違いから生じたものと推察している (22). このように, 全ての酸化ストレスが BACE1 レベルや活性を変化させるわけではないと考えられる.

5-2. 酸化ストレスにより脂質ラフト内の PS1 蛋白が増加する

これまで、脂質ラフトはアミロイド産生性 APP 切断の主要な場であることが示唆されてきた (1,39,41-47)。本研究で行った CHAPS を用いた蔗糖密度勾配遠心法による分画でも、PS1 をはじめとする γ セクレターゼ複合体因子や成熟型 BACE1 は主に脂質ラフト画分に局在しており、上記を支持する結果であった。さらに EA 刺激によって、脂質ラフト画分における PS1 蛋白が増加した。増加した PS1 蛋白は、 γ セクレターゼ複合体を形成していない nicastrin, APH-1, PEN-2 と結合して新たに γ セクレターゼ複合体を形成し、 γ セクレターゼ活性を増加させる可能性がある。そしてそれはアミロイド産生性 APP 切断の増加を介し、 $A\beta$ 産生の増加を導く可能性が考えられる。この仮説を支持する所見として、本研究で SH-swAPP 細胞に EA を負荷した際に、 $A\beta_{40}$ 、 $A\beta_{42}$ の分泌の増加が観察された。また、他の報告でも、SK-N-BE 細胞に過酸化水素や HNE を用いて酸化ストレスを負荷した際に PS1 と PEN-2 の mRNA 増加と共に γ セクレターゼ活性の増加が観察されたり (19)、SH-SY5Y 細胞や HEK293T 細胞に過酸化水素を用いて酸化ストレスを負荷した際に、 γ セクレターゼ活性の増加が観察されている (22)。

5-3. 酸化ストレスと A β は悪性サイクルを形成する

本研究の結果とこれまでの報告を基に、酸化ストレスと A β の関係を悪性サイクル仮説として図 8 にまとめた。A β や他の因子により誘導された酸化ストレスが、何らかのメカニズムを介して PS1 の mRNA を増加させ、脂質ラフトにおける PS1 蛋白レベルが増加する。この脂質ラフトの PS1 の増加は、おそらく γ セクレターゼによる APP 切断を増加させ、A β を増加させる可能性がある。また、他の報告では酸化ストレスによる BACE1 蛋白発現の増加、活性の増加を指摘しており、それによって A β が増加する可能性もある (17,19,20)。このようにして増加した A β がまた、酸化ストレスを誘導して悪性サイクルを形成し、AD 病態を進行させていくことが考えられる。

アミロイド仮説によると、A β は疾患発症の主要な原因物質であり (2,3)、そのため A β が治療の標的になってきた。ワクチンによる A β の除去や、 β セクレターゼ、 γ セクレターゼの阻害剤による A β 産生の抑制などが検討されてきているが (68)、これらはまだ成功していない。酸化ストレスが早期より AD 病態へ関与している可能性を受け、ビタミン E などの抗酸化物質による治療も試みられてきたが、現在のところ有効と無効の報告が混在している (69)。本研究の結果は、酸化ストレスと A β の悪循環を支持し、さらに A β 産生における脂質ラフトの重要性を支持するものである。従って、抗酸化物質により酸化ストレスと A β の悪循環を阻止することや、脂質ラフトにおける A β 産生を標的とする治療は、抗 A β 療法の有効性を高める可能性があると考えられる。本研究では、比較的強い刺激での急性期反応を検討したが、より弱い刺激での慢性的な処理による検討も病態の解明や治療法の検討において有用であると考えられる。

6. 結 論

本実験系において、EA 負荷により PS1 mRNA の増加、脂質ラフトの PS1 蛋白の増加、A β 分泌の増加が観察された。以上の結果より、酸化ストレスが PS1 発現を増加させ、脂質ラフトの PS1 増加を介して A β 産生を促進する可能性が考えられた。本研究の結果は、酸化ストレスと A β 増加の関係および A β 産生における脂質ラフトの重要性を支持するものであり、抗酸化物質による酸化ストレスの抑制や脂質ラフトにおける A β 産生を標的とする治療が AD の治療の一助になる可能性があると考えられた。

7. 謝 辞

本研究において、御指導および御高閲を賜った筑波大学人間総合科学研究科、玉岡晃教授に深い謝意を表します。

日常の研究の場において直接の御指導を頂いた国立精神・神経医療研究センター神経研究所第6部、荒木亘室長に深い謝意を表します。また、同研究室において日頃より御協力、御助言を頂いた村山紀代子博士、久米秀明博士、本木和美博士、篠崎綾子修士、山崎礼奈学士にも深謝いたします。

8. 引用文献

1. Cordy JM, Hooper NM, Turner AJ. 2006. The involvement of lipid rafts in Alzheimer's disease. *Mol Membr Biol* 23:111-122.
2. Hardy JA, Higgins GA. 1992. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256:184-185.
3. Hardy J, Selkoe DJ. 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297:353-356.
4. Laudon H, Winblad B, Näslund J. 2007. The Alzheimer's disease-associated gamma-secretase complex: functional domains in the presenilin 1 protein. *Physiol Behav* 92:115-120.
5. Cole SL, Vassar R. 2008. The role of amyloid precursor protein processing by BACE1, the beta-secretase, in Alzheimer disease pathophysiology. *J Biol Chem* 283:29621-29625.
6. Lovell MA, Ehmman WD, Butler SM, Markesbery WR. 1995. Elevated thiobarbituric acid-reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in Alzheimer's disease. *Neurology* 45:1594-1601.

7. Smith MA, Rottkamp CA, Nunomura A, Raina AK, Perry G. 2000. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1502:139-144.
8. Butterfield DA, Reed T, Newman SF, Sultana R. 2007. Roles of amyloid beta-peptide-associated oxidative stress and brain protein modifications in the pathogenesis of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Free Radic Biol Med* 43:658-677.
9. Petersen RB, Nunomura A, Lee HG, Casadesus G, Perry G, Smith MA, Zhu X. 2007. Signal transduction cascades associated with oxidative stress in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 11:143-152.
10. Nunomura A, Perry G, Aliev G, Hirai K, Takeda A, Balraj EK, Jones PK, Ghanbari H, Wataya T, Shimohama S, Chiba S, Atwood CS, Petersen RB, Smith MA. 2001. Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 60:759-767.
11. Lovell MA, Markesbery WR. 2007. Oxidative DNA damage in mild cognitive impairment and late-stage Alzheimer's disease. *Nucleic Acids Res* 35:7497-7504.
12. Cutler RG, Kelly J, Storie K, Pedersen WA, Tammara A, Hatanpaa K, Troncoso JC, Mattson MP. 2004. Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:2070-2075.

13. Jhoo JH, Kim HC, Nabeshima T, Yamada K, Shin EJ, Jhoo WK, Kim W, Kang KS, Jo SA, Woo JI. 2004. Beta-amyloid (1-42)-induced learning and memory deficits in mice: involvement of oxidative burdens in the hippocampus and cerebral cortex. *Behav Brain Res* 155:185-196.
14. Tabner BJ, El-Agnaf OM, Turnbull S, German MJ, Paleologou KE, Hayashi Y, Cooper LJ, Fullwood NJ, Allsop D. 2005. Hydrogen peroxide is generated during the very early stages of aggregation of the amyloid peptides implicated in Alzheimer disease and familial British dementia. *J Biol Chem* 280:35789-35792.
15. Misonou H, Morishima-Kawashima M, Ihara Y. 2000. Oxidative stress induces intracellular accumulation of amyloid beta-protein (A β) in human neuroblastoma cells. *Biochemistry* 39:6951-6959.
16. Paola D, Domenicotti C, Nitti M, Vitali A, Borghi R, Cottalasso D, Zaccheo D, Odetti P, Strocchi P, Marinari UM, Tabaton M, Pronzato MA. 2000. Oxidative stress induces increase in intracellular amyloid beta-protein production and selective activation of betaI and betaII PKCs in NT2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 268:642-646.
17. Tamagno E, Bardini P, Obbili A, Vitali A, Borghi R, Zaccheo D, Pronzato MA, Danni O, Smith MA, Perry G, Tabaton M. 2002. Oxidative stress increases expression and activity of BACE in NT2 neurons. *Neurobiol Dis* 10:279-288.

18. Tamagno E, Parola M, Bardini P, Piccini A, Borghi R, Guglielmotto M, Santoro G, Davit A, Danni O, Smith MA, Perry G, Tabaton M. 2005. Beta-site APP cleaving enzyme up-regulation induced by 4-hydroxynonenal is mediated by stress-activated protein kinases pathways. *J Neurochem* 92:628-636.
19. Tamagno E, Guglielmotto M, Aragno M, Borghi R, Autelli R, Giliberto L, Muraca G, Danni O, Zhu X, Smith MA, Perry G, Jo DG, Mattson MP, Tabaton M. 2008. Oxidative stress activates a positive feedback between the gamma- and beta-secretase cleavages of the beta-amyloid precursor protein. *J Neurochem* 104:683-95.
20. Tong Y, Zhou W, Fung V, Christensen MA, Qing H, Sun X, Song W. 2005. Oxidative stress potentiates BACE1 gene expression and Abeta generation. *J Neural Transm* 112:455-469.
21. Goldsbury C, Whiteman IT, Jeong EV, Lim YA. 2008. Oxidative stress increases levels of endogenous amyloid-beta peptides secreted from primary chick brain neurons. *Aging Cell* 7:771-775.
22. Shen C, Chen Y, Liu H, Zhang K, Zhang T, Lin A, Jing N. 2008. Hydrogen peroxide promotes Abeta production through JNK-dependent activation of gamma-secretase. *J Biol Chem* 283:17721-17730.

23. Ono K, Hamaguchi T, Naiki H, Yamada M. 2006. Anti-amyloidogenic effects of antioxidants: implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1762:575-586.
24. Sung S, Yao Y, Uryu K, Yang H, Lee VM, Trojanowski JQ, Praticò D. 2004. Early vitamin E supplementation in young but not aged mice reduces Abeta levels and amyloid deposition in a transgenic model of Alzheimer's disease. *FASEB J* 18:323-325.
25. Kivipelto M, Helkala EL, Laakso MP, Hänninen T, Hallikainen M, Alhainen K, Soininen H, Tuomilehto J, Nissinen A. 2001. Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: longitudinal, population based study. *BMJ* 322:1447-1451.
26. Kivipelto M, Helkala EL, Laakso MP, Hänninen T, Hallikainen M, Alhainen K, Iivonen S, Mannermaa A, Tuomilehto J, Nissinen A, Soininen H. 2002. Apolipoprotein E epsilon4 allele, elevated midlife total cholesterol level, and high midlife systolic blood pressure are independent risk factors for late-life Alzheimer disease. *Ann Intern Med* 137:149-155.
27. Notkola IL, Sulkava R, Pekkanen J, Erkinjuntti T, Ehnholm C, Kivinen P, Tuomilehto J, Nissinen A. 1998. Serum total cholesterol, apolipoprotein E epsilon 4 allele, and Alzheimer's disease. *Neuroepidemiology* 17:14-20.

28. Pappolla MA, Bryant-Thomas TK, Herbert D, Pacheco J, Fabra Garcia M, Manjon M, Girones X, Henry TL, Matsubara E, Zambon D, Wolozin B, Sano M, Cruz-Sanchez FF, Thal LJ, Petanceska SS, Refolo LM. 2003. Mild hypercholesterolemia is an early risk factor for the development of Alzheimer amyloid pathology. *Neurology* 61:199-205.
29. Wolozin B, Kellman W, Ruosseau P, Celesia GG, Siegel G. 2000. Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arch Neurol* 57:1439-1443.
30. Li L, Cao D, Garber DW, Kim H, Fukuchi K. 2003. Association of aortic atherosclerosis with cerebral beta-amyloidosis and learning deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 163:2155-2164.
31. Refolo LM, Malester B, LaFrancois J, Bryant-Thomas T, Wang R, Tint GS, Sambamurti K, Duff K, Pappolla MA. 2000. Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. *Neurobiol Dis* 7:321-331.
32. Shie FS, Jin LW, Cook DG, Leverenz JB, LeBoeuf RC. 2002. Diet-induced hypercholesterolemia enhances brain A beta accumulation in transgenic mice. *Neuroreport* 13:455-459.

33. Sparks DL, Scheff SW, Hunsaker JC 3rd, Liu H, Landers T, Gross DR. 1994. Induction of Alzheimer-like beta-amyloid immunoreactivity in the brains of rabbits with dietary cholesterol. *Exp Neurol* 126:88-94.
34. Fassbender K, Simons M, Bergmann C, Stroick M, Lutjohann D, Keller P, Runz H, Kuhl S, Bertsch T, von Bergmann K, Hennerici M, Beyreuther K, Hartmann T. 2001. Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease beta -amyloid peptides Abeta 42 and Abeta 40 in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:5856-5861.
35. Refolo LM, Pappolla MA, LaFrancois J, Malester B, Schmidt SD, Thomas-Bryant T, Tint GS, Wang R, Mercken M, Petanceska SS, Duff KE. 2001. A cholesterol-lowering drug reduces beta-amyloid pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 8:890-899.
36. Frears ER, Stephens DJ, Walters CE, Davies H, Austen BM. 1999. The role of cholesterol in the biosynthesis of beta-amyloid. *Neuroreport* 10:1699-1705.
37. Simons M, Keller P, De Strooper B, Beyreuther K, Dotti CG, Simons K. 1998. Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:6460-6464.
38. Laude AJ, Prior IA. 2004. Plasma membrane microdomains: organization, function and trafficking. *Mol Membr Biol* 21:193-205.

39. Reid PC, Urano Y, Kodama T, Hamakubo T. 2007. Alzheimer's disease: cholesterol, membrane rafts, isoprenoids and statins. *J Cell Mol Med* 11:383-392.
40. Simons K, Toomre D. 2000. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:31-39.
41. Riddell DR, Christie G, Hussain I, Dingwall C. 2001. Compartmentalization of beta-secretase (Asp2) into low-buoyant density, noncaveolar lipid rafts. *Curr Biol* 11:1288-1293.
42. Wahrle S, Das P, Nyborg AC, McLendon C, Shoji M, Kawarabayashi T, Younkin LH, Younkin SG, Golde TE. 2002. Cholesterol-dependent gamma-secretase activity in buoyant cholesterol-rich membrane microdomains. *Neurobiol Dis* 9:11-23.
43. Cordy JM, Hussain I, Dingwall C, Hooper NM, Turner AJ. 2003. Exclusively targeting beta-secretase to lipid rafts by GPI-anchor addition up-regulates beta-site processing of the amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:11735-11740.
44. Eehalt R, Keller P, Haass C, Thiele C, Simons K. 2003. Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J Cell Biol* 160:113-123.

45. Vetrivel KS, Cheng H, Lin W, Sakurai T, Li T, Nukina N, Wong PC, Xu H, Thinakaran G. 2004. Association of gamma-secretase with lipid rafts in post-Golgi and endosome membranes. *J Biol Chem* 279:44945-44954.
46. Urano Y, Hayashi I, Isoo N, Reid PC, Shibasaki Y, Noguchi N, Tomita T, Iwatsubo T, Hamakubo T, Kodama T. 2005. Association of active gamma-secretase complex with lipid rafts. *J Lipid Res* 46:904-912.
47. Hur JY, Welander H, Behbahani H, Aoki M, Frånberg J, Winblad B, Frykman S, Tjernberg LO. 2008. Active gamma-secretase is localized to detergent-resistant membranes in human brain. *FEBS J* 275:1174-1187.
48. Oshima N, Morishima-Kawashima M, Yamaguchi H, Yoshimura M, Sugihara S, Khan K, Games D, Schenk D, Ihara Y. 2001. Accumulation of amyloid beta-protein in the low-density membrane domain accurately reflects the extent of beta-amyloid deposition in the brain. *Am J Pathol* 158:2209-2218.
49. Kawarabayashi T, Shoji M, Younkin LH, Wen-Lang L, Dickson DW, Murakami T, Matsubara E, Abe K, Ashe KH, Younkin SG. 2004. Dimeric amyloid beta protein rapidly accumulates in lipid rafts followed by apolipoprotein E and phosphorylated tau accumulation in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 24:3801-3809.

50. Chi L, Ke Y, Luo C, Gozal D, Liu R. 2007. Depletion of reduced glutathione enhances motor neuron degeneration in vitro and in vivo. *Neuroscience* 144:991-1003.
51. Takeda K, Araki W, Tabira T. 2004. Enhanced generation of intracellular Abeta42 amyloid peptide by mutation of presenilins PS1 and PS2. *Eur J Neurosci* 19:258-264.
52. Citron M, Teplow DB, Selkoe DJ. 1995. Generation of amyloid beta protein from its precursor is sequence specific. *Neuron* 14:661-670.
53. Chui DH, Shirotani K, Tanahashi H, Akiyama H, Ozawa K, Kunishita T, Takahashi K, Makifuchi T, Tabira T. 1998. Both N-terminal and C-terminal fragments of presenilin 1 colocalize with neurofibrillary tangles in neurons and dystrophic neurites of senile plaques in Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 53:99-106.
54. Araki W, Takahashi-Sasaki N, Chui DH, Saito S, Takeda K, Shirotani K, Takahashi K, Murayama KS, Kametani F, Shiraishi H, Komano H, Tabira T. 2008. A family of membrane proteins associated with presenilin expression and gamma-secretase function. *FASEB J* 22:819-827.
55. Kametani F, Tanaka K, Ishii T, Ikeda S, Kennedy HE, Allsop D. 1993. Secretory form of Alzheimer amyloid precursor protein 695 in human brain lacks beta/A4 amyloid immunoreactivity. *Biochem Biophys Res Commun* 191:392-398.

56. Luo WJ, Wang H, Li H, Kim BS, Shah S, Lee HJ, Thinakaran G, Kim TW, Yu G, Xu H. 2003. PEN-2 and APH-1 coordinately regulate proteolytic processing of presenilin 1. *J Biol Chem* 278:7850-7854.
57. Yoon IS, Chen E, Busse T, Repetto E, Lakshmana MK, Koo EH, Kang DE. 2007. Low-density lipoprotein receptor-related protein promotes amyloid precursor protein trafficking to lipid rafts in the endocytic pathway. *FASEB J* 21:2742-2752.
58. Araki W, Yuasa K, Takeda S, Takeda K, Shirotani K, Takahashi K, Tabira T. 2001. Pro-apoptotic effect of presenilin 2 (PS2) overexpression is associated with down-regulation of Bcl-2 in cultured neurons. *J Neurochem* 79:1161-1168.
59. Arakawa M, Ishimura A, Arai Y, Kawabe K, Suzuki S, Ishige K, Ito Y. 2007. N-Acetylcysteine and ebselen but not nifedipine protected cerebellar granule neurons against 4-hydroxynonenal-induced neuronal death. *Neurosci Res* 57:220-229.
60. Watanabe H, Smith MJ, Heilig E, Beglopoulos V, Kelleher RJ 3rd, Shen J. 2009. Indirect regulation of presenilins in CREB-mediated transcription. *J Biol Chem* 284:13705-13713.
61. Pastorcic M, Das HK. 2007. Analysis of transcriptional modulation of the presenilin 1 gene promoter by ZNF237, a candidate binding partner of the Ets transcription factor ERM. *Brain Res* 1128:21-32.

62. Lange PS, Chavez JC, Pinto JT, Coppola G, Sun CW, Townes TM, Geschwind DH, Ratan RR. 2008. ATF4 is an oxidative stress-inducible, prodeath transcription factor in neurons in vitro and in vivo. *J Exp Med* 205:1227-1242.
63. Mitsuda T, Hayakawa Y, Itoh M, Ohta K, Nakagawa T. Mitsuda T, Hayakawa Y, Itoh M, Ohta K, Nakagawa T. 2007. ATF4 regulates gamma-secretase activity during amino acid imbalance. *Biochem Biophys Res Commun* 352:722-727.
64. Wu RP, Hayashi T, Cottam HB, Jin G, Yao S, Wu CC, Rosenbach MD, Corr M, Schwab RB, Carson DA. 2010. Nrf2 responses and the therapeutic selectivity of electrophilic compounds in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:7479-7484.
65. Wasserman WW, Fahl WE. 1997. Functional antioxidant responsive elements. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:5361-5366.
66. Nioi P, McMahon M, Itoh K, Yamamoto M, Hayes JD. 2003. Identification of a novel Nrf2-regulated antioxidant response element (ARE) in the mouse NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene: reassessment of the ARE consensus sequence. *Biochem J* 374:337-348.

67. Erickson AM, Nevarea Z, Gipp JJ, Mulcahy RT. 2002. Identification of a variant antioxidant response element in the promoter of the human glutamate-cysteine ligase modifier subunit gene. Revision of the ARE consensus sequence. *J Biol Chem* 277:30730-30737.
68. Barten DM, Albright CF. 2008. Therapeutic strategies for Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol* 37:171-186.
69. Praticò D. 2008. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease: a reappraisal. *Trends Pharmacol Sci* 29:609-615.

9. 図 表

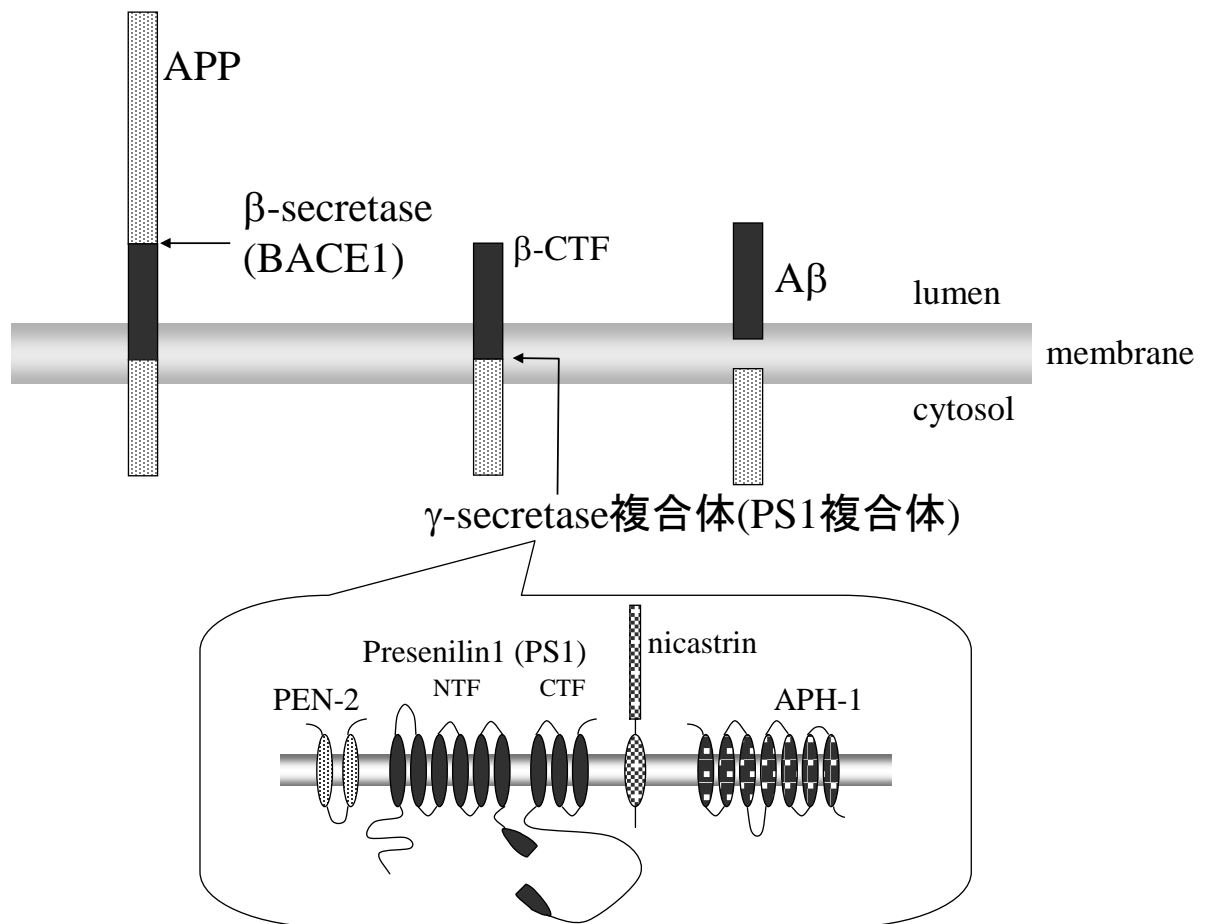


図 1. Aβの生成. APP は BACE1 によって切断されてβ-CTF を生じる. 続いてβ-CTF がγ-secretase により切断されて Aβが生成される. γ-secretase は PS1, nicastrin, APH-1, PEN-2 から成る複合体である. PS1 は, N 末断片 (NTF) と C 末断片 (CTF) に別れて存在している.

(図の一部は Laudon et al., 2007 より引用 (4))

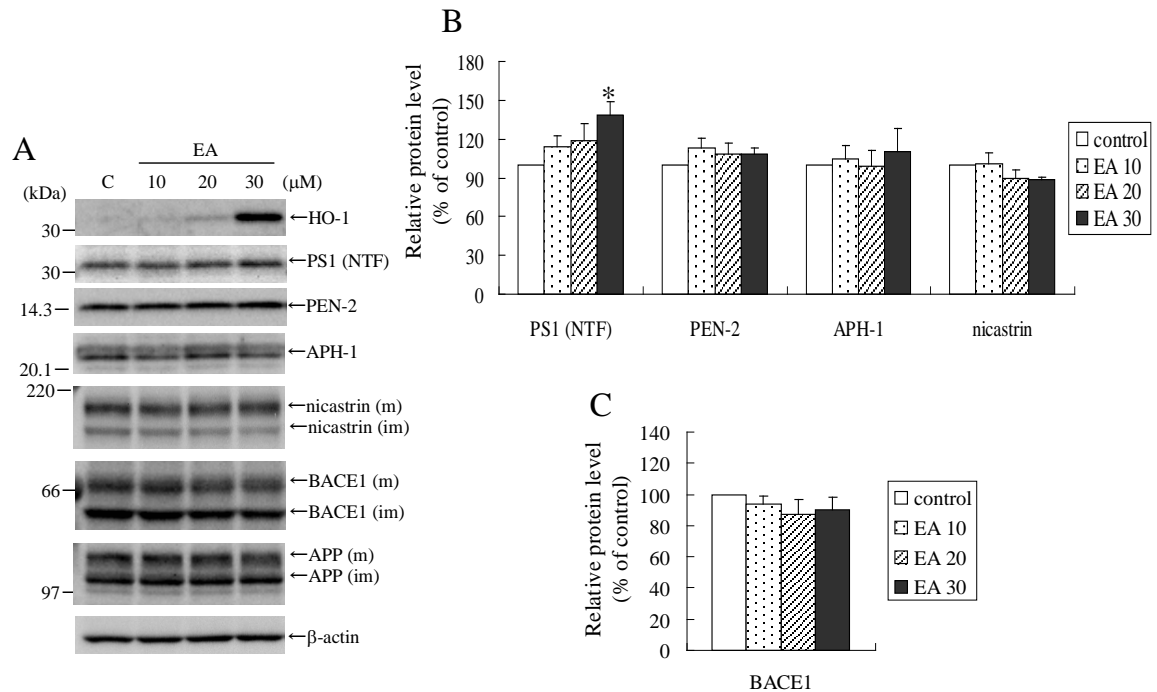


図 2. EA による γ セクレターゼ複合体因子および BACE1 蛋白レベルの変化. (A) SH-SY5Y 細胞を EA 10-30 μ M で 20 時間処理し, ウェスタンブロット解析を行った. EA 30 μ M 処理で HO-1 蛋白レベルが著明に増加した. EA 30 μ M 処理で PS1 蛋白レベルの増加を認めたが, その他の γ セクレターゼ複合体因子や BACE1 蛋白は著変なかった. (B,C) (A) における γ セクレターゼ複合体因子 (B) および BACE1 (C) のバンドを定量し, control に対する相対値を示した. EA 30 μ M 処理で PS1 蛋白レベルが control より約 40%増加した. 結果は 3 回の実験の平均値 \pm SEM で表した. * p <0.05 (control との比較) C : control, NTF : N-terminal fragment, m : mature, i : immature. (図は参考論文 Oda et al., 2010 より引用)

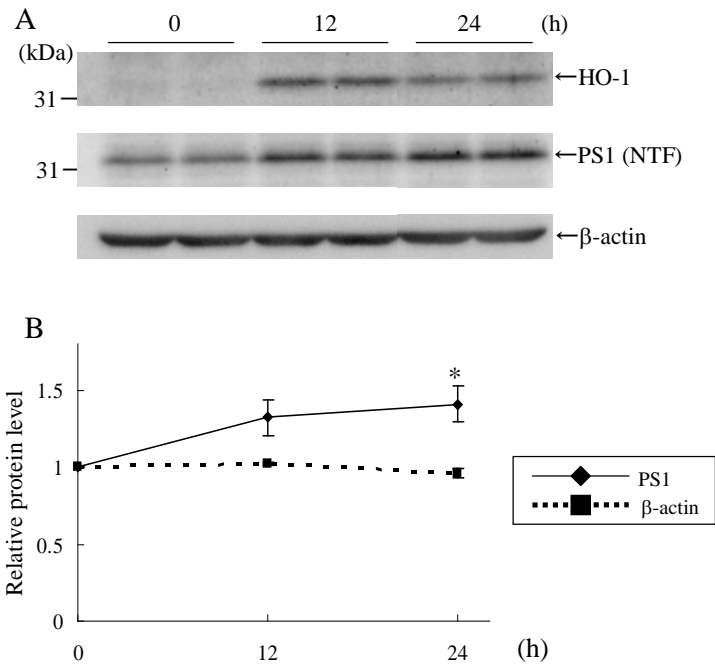


図 3. EA 処理後の PS1 蛋白レベルの経時変化. (A) SH-SY5Y 細胞に EA 30 μ M を 12 時間および 24 時間処理し, HO-1, PS1, β -actin の細胞内蛋白レベルをウエスタンブロット解析した. HO-1 蛋白は 12 時間で著明に増加し, その後 24 時間でやや減少した. PS1 蛋白は 12 時間で増加し, 24 時間後さらに増加した. (B) (A) における HO-1 と PS1 のバンドの定量. PS1 は 24 時間後に 0 時間の約 1.4 倍に増加した. 結果は 4 回の実験の平均値 \pm SEM で表した. * p <0.05 (0 時間との比較).

(図は参考論文 Oda et al., 2010 より引用)

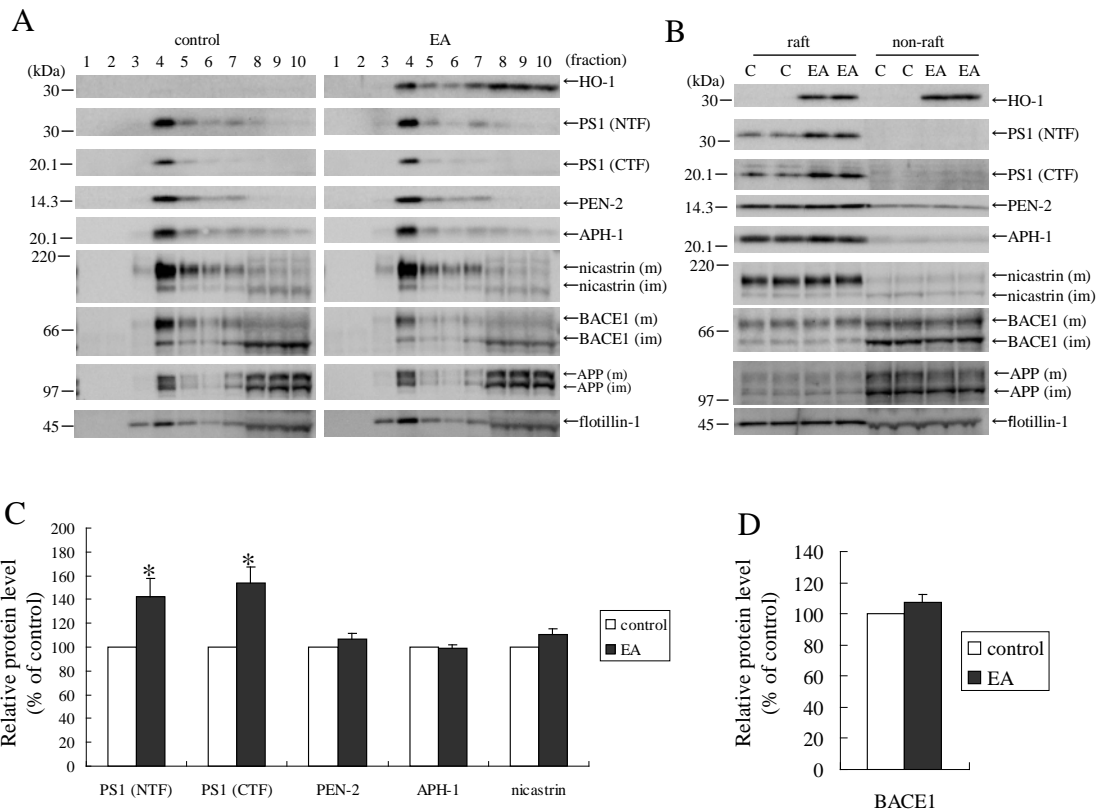


図 4. 脂質ラフトの γ セクレターゼ複合体因子および BACE1 蛋白への EA の効果. (A) SH-SY5Y 細胞に EA 30 μ M を 20 時間負荷し, 1% CHAPS を含むバッファーで溶解した. control および EA 負荷サンプルをそれぞれ等量の蛋白量ずつ蔗糖密度勾配遠心法で分画し, ウェスタンブロット解析した. flotillin-1 が主に fraction 4 に分布していた. HO-1 は主に fraction 4, 8-10 に分布し, EA 処理により増加を認めた. γ セクレターゼ複合体因子および成熟型 BACE1 は主に fraction 4 に分布していた. (B) control と EA 負荷サンプルのそれぞれ fraction 4 (脂質ラフト画分) と fraction 8-10 の混合物 (非脂質ラフト画分) をウェスタンブロット解析で比較した. PS1 蛋白レベルが NTF, CTF 共に有意に増加した. その他の γ セクレターゼ複合体因子や BACE1, APP, flotillin-1 蛋白レベルには著変なかった. (C,D) (B) における脂質ラフト画分の γ セクレターゼ複合体因子 (C) と BACE1 (D) のバンドを定量した. PS1 蛋白レベルが NTF, CTF 共に control の約 1.4 倍に増加した. 結果は 3 回以上の実験の平均値 \pm SEM で表した. * p <0.05 (control との比較) C: control, NTF: N-terminal fragment, CTF: C-terminal fragment. (図は参考論文 Oda et al., 2010 より引用)

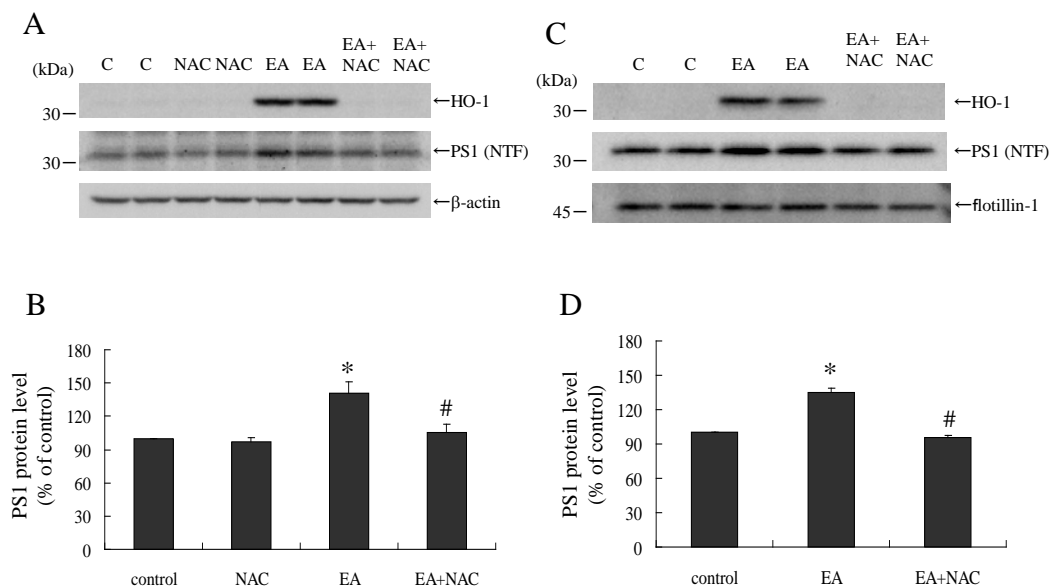


図5. EAによるPS1蛋白増加に対するNACの効果。(A) SH-SY5Y細胞にEA 30 μ Mを20時間,またはNAC 2 mM, 8時間の前処理後にEA+NACまたはNACのみで20時間処理し,細胞内のHO-1およびPS1蛋白レベルをウエスタンブロット解析した. EAと共にNACを加えると,EAでみられたHO-1蛋白の誘導が抑制されると共に,PS1蛋白レベルの増加も抑制された.(B) (A)におけるPS1蛋白のバンドを定量した.EAによりPS1蛋白がcontrolの約1.4倍に増加したが,NACの添加によりその増加は抑制された.結果は3回の実験の平均値 \pm SEMで表した.* p <0.05 (controlとの比較),# p <0.05 (EA処理との比較).(C) (A)と同様に薬剤処理した後,蔗糖密度勾配遠心法で分画し,脂質ラフト画分をウエスタンブロット解析した.脂質ラフト画分においても,EAによるHO-1の誘導およびPS1蛋白の増加がNACの添加により抑制された.(D) (C)におけるPS1蛋白のバンドを定量した.EAによりPS1蛋白がcontrolの約1.4倍に増加したが,NACの添加によりその増加は抑制された.結果は3回の実験の平均値 \pm SEMで表した.* p <0.05 (controlとの比較),# p <0.05 (EA処理との比較).
C : control.

(図は参考論文 Oda et al., 2010 より引用)

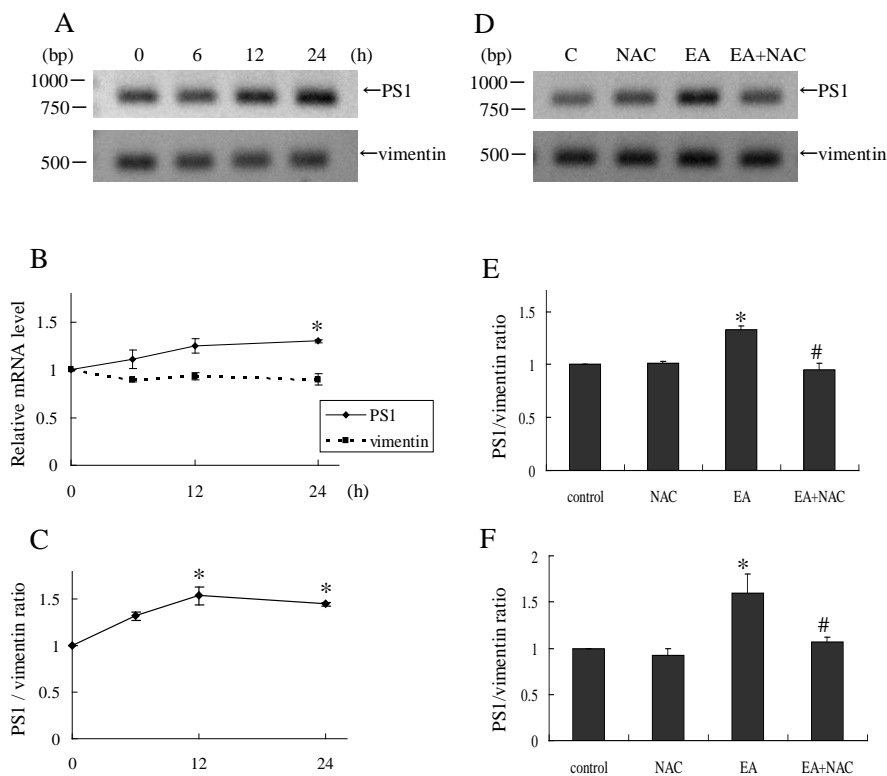


図 6. EA および NAC の PS1 mRNA レベルに対する効果. (A) SH-SY5Y 細胞に EA 30 μ M を図に示した時間負荷し, 細胞より全 RNA を抽出した. RT-PCR 法により PS1 mRNA レベルを検討した. control として vimentin mRNA レベルを測定した. EA 負荷後 12 時間より徐々に PS1 mRNA レベルが増加した. (B) (A) のバンドを定量し, 0 時間の値に対する相対値をグラフに示した. EA 負荷後 24 時間で PS1 mRNA レベルが 0 時間の約 1.4 倍に増加した. (C) (A) で抽出された細胞の全 RNA を用い, real-time RT-PCR 法で PS1 と vimentin の mRNA レベルを測定し, PS1/vimentin 比の 0 時間に対する相対値をグラフに示した. EA 負荷後 6 時間より徐々に増加し, 12 時間および 24 時間で 0 時間の約 1.5 倍に増加した. 結果は 3 回の実験の平均値 \pm SEM で表した. * p <0.05 (0 時間との比較). (D) 細胞に EA 30 μ M を 16 時間, または NAC 2 mM, 8 時間の前処理後に EA + NAC または NAC のみで 16 時間処理し, 細胞より全 RNA を抽出した. RT-PCR 法により PS1 および vimentin の mRNA レベルを検討した. EA による PS1 mRNA レベルの増加が NAC により抑制された. (E) (D) のバンドを定量し, PS1/vimentin 比の相対値をグラフに示した. EA により PS1 mRNA レベルが control の約 1.4 倍に増加したが, NAC により抑制された. (F) (D) で抽出された細胞の全 RNA を用い, real-time RT-PCR 法で PS1 と vimentin の mRNA レベルを測定し, PS1/vimentin 比の相対値をグラフに示した. EA により PS1 mRNA レベルが control の約 1.6 倍に増

加したが, NAC により抑制された. 結果は 3 回の実験の平均値 \pm SEM で表した. * $p < 0.05$
(control との比較), # $p < 0.05$ (EA 処理との比較). C : control.
(図の A, B, D, E は参考論文 Oda et al., 2010 より引用)

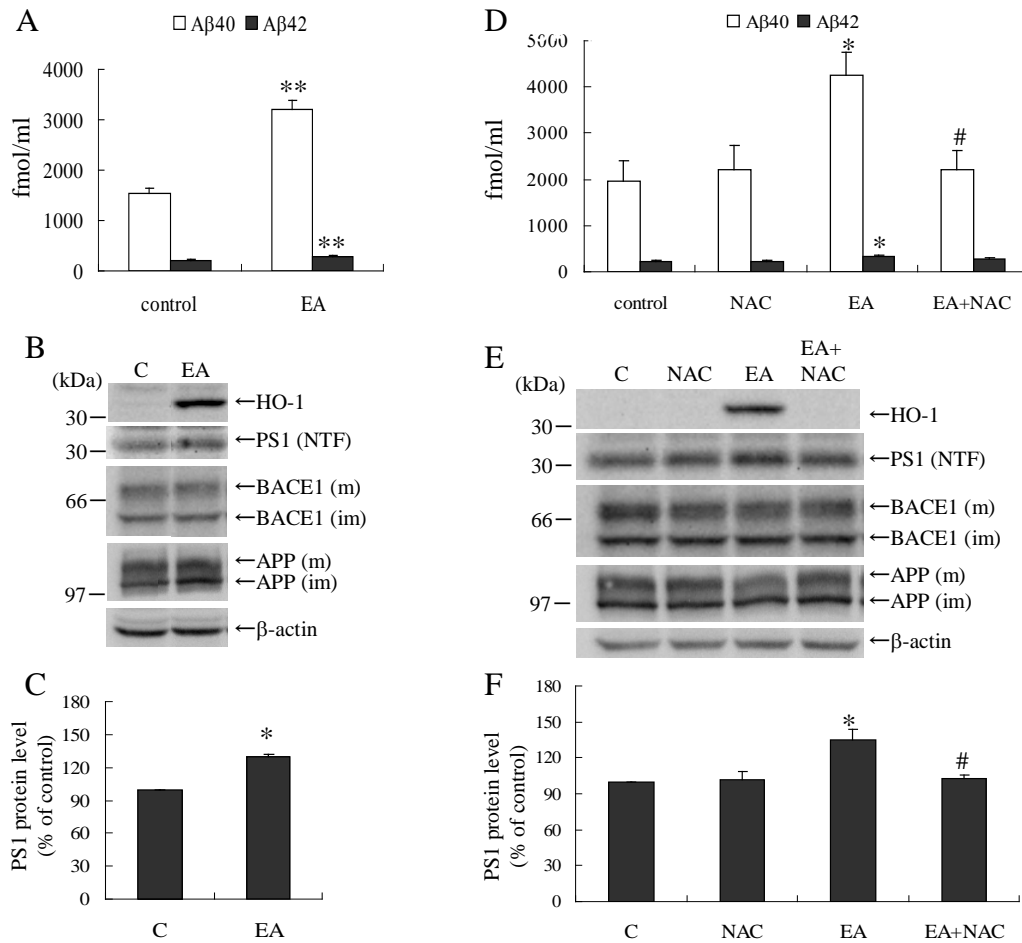


図7. EA および NAC の Aβ 分泌に対する効果. (A) スウェーデン変異型 APP を過発現する SH-SY5Y 細胞 (SH-swAPP) に EA 30 μM を 24 時間負荷した. 培養液中の Aβ40, Aβ42 レベルをサンドイッチ ELISA 法で測定した. EA 負荷により, Aβ40 が control の約 2 倍, Aβ42 が約 1.4 倍に増加した. (B) (A) で処理した細胞の cell lysate をウエスタンブロット解析した. EA により HO-1 が著明に増加し, PS1 蛋白レベルも増加した. (C) (B) における PS1 のバンドを定量し, control に対する相対値をグラフに示した. EA により PS1 蛋白レベルが control より約 30% 増加した. 結果は 3 回の実験の平均値 ± SEM で表した. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (control との比較). (D) 細胞に EA 30 μM を 24 時間, または NAC 2 mM, 8 時間の前処理後に EA+NAC または NAC のみで 24 時間処理し, 培養液中の Aβ40, Aβ42 レベルをサンドイッチ ELISA 法で測定した. NAC の添加により, EA による Aβ レベルの増加が抑制された. (E) (D) で処理した細胞の cell lysate をウエスタンブロット解析した. EA による HO-1 蛋白の増加が抑制されると共に, PS1 蛋白の増加も NAC の添加により抑制された. (F) (E) における PS1 のバンドを定量し, control に対する相対値をグラフに示した. EA により PS1 蛋白レベルが約 30% 増加したが, NAC の添加により抑制された. 結果は 3 回の実験の平

均値±SEM で表した. * $p < 0.05$ (control との比較), # $p < 0.05$ (EA 処理との比較). C : control.

(図の A, B, C は参考論文 Oda et al., 2010 より引用)

報告者 (年)	対 象	酸化ストレス物質	結 果
Tamagno, et al. (2002)	NT2 neuron	Ascorbate/FeSO ₄ H ₂ O ₂ /FeSO ₄ , HNE	BACE1蛋白増加 BACE1の活性増加
Tong, et al. (2005)	HEK293 cell	H ₂ O ₂	BACE1の発現増加 BACE1の活性増加
Tamagno, et al. (2008)	SK-N-BE cell	H ₂ O ₂ , HNE	PS1, PEN-2の発現増加 γ-secretaseの活性増加 BACE1の発現増加 BACE1の活性増加
Shen, et al. (2008)	SH-SY5Y cell HEK293 cell	H ₂ O ₂	γ-secretaseの活性増加

表 1. 酸化ストレスと BACE1, γ-secretase に関する過去の報告

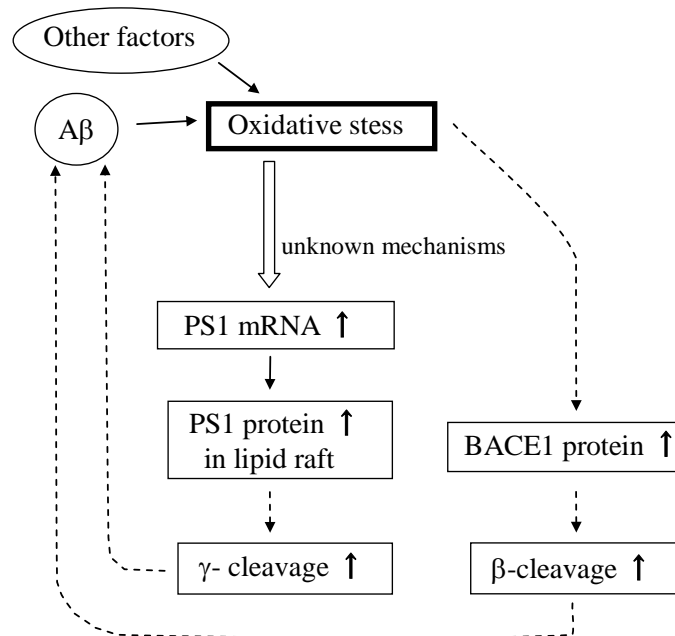


図 8. 酸化ストレスと Aβの悪性サイクル仮説. Aβや他の因子によって誘導された酸化ストレスは、何らかの機序を介して PS1 mRNA 発現を増加させる. それにより脂質ラフトでの PS1 蛋白レベルが増加し、それは APP の γ 切断を増加させ、Aβ産生を増加させる可能性がある. また、酸化ストレスが BACE1 蛋白を増加させるという報告もあり、それにより APP の β 切断が増加して Aβが増加する可能性もある. このように増加した Aβはまた、酸化ストレスを誘導し、悪性サイクルを形成する.

(図は参考論文 Oda et al., 2010 より引用)