

## 論文の内容の要旨

論文題目 ラット褐色腫由来細胞 PC12 における植物ステロイドホルモン/

ギンセノシド Rb1 による性ホルモン受容体を介した

抗アポトーシス機構の解析

氏名 橋本 亮

*ginseng* (botanical name: *Panax ginseng* C.A.Meyer) は古来より頻用されてきた *herbal remedies* であり、その根抽出物は健康を保持・増強するとされている。近年、*ginseng* 投与にて *Alzheimer* 病患者の認知能改善や若年健常者の認知能向上、健常者における *psychomotor performance/ function* の向上等が報告されている。*Panax ginseng* の *active component* である *ginsenoside* はステロイド骨格を有する。*ginsenoside* にてドパミン作動性ニューロンの退行変性や変性に伴う諸症状が改善されるとする報告が *in vitro*, *in vivo* 共になされている。*ginseng* の *major active component* である *Rb1 ginsenoside* では神経保護作用を有するとする報告が近年なされているが、細胞内シグナル伝達経路の詳細は明らかになっていない。

*Alzheimer* や *Parkinson*、*Huntington* 病において、ミトコンドリア内膜に存在する呼吸鎖複合体 I、II、IV の欠損が指摘されている。1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>) は 81-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) の代謝産物であり、ドパミン作動性ニューロンのミトコンドリアに選択的に集積する。MPP<sup>+</sup> はミトコンドリア内膜の呼吸鎖 (電子伝達系) を阻害、ミトコンドリア膜電位を減少、また  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis を破綻させ

ることにより神経細胞死を惹起するとされている。

PC12 はラット褐色腫由来細胞であり、ドパミンの合成や代謝・輸送能を保持している性質により、MPP<sup>+</sup>神経毒性の検討や Parkinson 病の model として用いられている。

本論文では PC12 における Rb1 の神経保護作用の評価と細胞内シグナル伝達経路、更には核内受容体との関連について検討を加えた。

1. MPP<sup>+</sup>処理 PC12 において、Rb1 は cell viability (resazurin reduction assay) を改善し、DNA 断片化 (photometric enzyme-immunoassay) を抑制した。この作用は estrogen receptor (ER) alpha, beta small interfering RNA (siRNA) transfection により抑制された。また MPP<sup>+</sup> 処理 PC12 において、Rb1 は caspase-3 蛋白発現量を減少、Bcl-xL 蛋白発現量を増加させた。
2. MPP<sup>+</sup> 処理 PC12 において Rb1 は phosphorylated(p-) p38, p- stress-activated protein kinase/Jun amino-terminal kinase (SAPK/JNK)を減少、p-Akt, p- extracellular signal - regulated kinases 1 and 2 (ERK1/2)を増加させ、これらは ER alpha, beta siRNA transfection により抑制された。
3. DNA 断片化は phosphoinositide 3 kinase (PI3K), mitogen-activated protein kinase (MAPK) / ERK kinase (MEK) 1 阻害剤により促進し、p38, JNK 阻害剤にて抑制した。
4. Rb1 の ER alpha と beta に対する ligand-binding affinity は 17beta estradiol よりも低く、特に ER alpha では control や testosterone とほぼ同程度であった。

以上より Parkinsonian neurotoxin である MPP<sup>+</sup>を添加したラット褐色腫由来 PC12 細胞において、Rb1 が抗アポトーシス作用を有していることを明らかにした。MPP<sup>+</sup>処理 PC12 に

において、Rb1 は caspase-3 蛋白発現量と DNA 断片化を抑制し、Bcl-xL 蛋白発現量を増加させた。ginsenoside のうち Rb1 や Rg1, Rg3, Re, Rh1 は種々の細胞において phytoestrogen とする報告がされている。今回の ER siRNA による検討の結果、Rb1 は PC12 に於いても estrogenic property を有していることが判明した。Rb1 は COS monkey kidney cells において dose-dependent に ER alpha, beta 共に活性化すると報告されている。今回の検討により PC12 において Rb1 の抗アポトーシス作用発現には ER alpha と beta が共に関与していることが示唆された。ER を含む核内受容体には組織間分布や機能の相違に関与する activation function domain-1 (AF-1) 領域、DNA 結合領域および AF-2 領域 (ligand dependent) が存在している。estrogen は ER alpha と beta の ligand であるが、相同性は DNA 結合領域が 97% に対し AF-2 では 59%、AF-1 では 18% である。AF-1 は ligand 非依存性に生理活性を発揮し得る領域である。これまでに growth factor や neurotransmitter, cyclic AMP(cAMP) 等により ER は ligand 非依存性に活性化すると報告されている。MPP<sup>+</sup>処理 PC12 における Rb1 の ER alpha を介したシグナル伝達経路は、今回の検討により抗アポトーシス作用発現に関与することが示唆されたが、前述した receptor binding affinity を考慮すると ligand 非依存性に ER を活性化している可能性も否定はできない。Steroid hormone は特定の受容体と特異的に結合して核内へ移行することにより種々の転写制御に関与することがその主たる生理的な役割とされてきたが、近年膜受容体と結合し cyclic AMP や MAPK 等を介する non-genomic action の存在も明らかにされている。brain-derived neurotrophic factor (BDNF), vascular endothelial growth factor (VEGF)等はエストロゲン応答遺伝子として知られている。一般に genomic action はエフェクタータンパク質の調節が介在することにより

作用発現まで少なくとも数時間以上を要するが、non-genomic action では急速なシグナル伝達により早期の作用発現が誘発される。Rb1 による MAPK family (SAPK/JNK, p38, ERK1/2), Akt phosphorylation は 10-15 分以内に生じており、現時点において転写阻害剤である actinomycin D 等による証左はないものの抗アポトーシス作用の発現には non-genomic action の関与が示唆された。p-SAPK/JNK, p-p38 は pro-apoptotic factor, p-ERK1/2, p-Akt は cell survival factor とされる。PC12 におけるシグナル伝達経路として、estrogen(E2)は membrane ER を介して  $Ca^{2+}$  mobilization→PI3K activation→Akt phosphorylation→Nitric Oxide Synthase (NOS) activation の経路により神経保護作用を発現する、或いは柑橘系フラボノイドである hesperetin は ER と tyrosine kinase receptors (Trk) A を介して Akt, ERK activation→cAMP response element-binding protein (CREB) activation→transcriptional effect→ BDNF の経路により anti-oxidative stress, cell survival response を発現する等報告されている。今回の検討により MPP<sup>+</sup>処理 PC12 において、Rb1 は ER を介し p-SAPK/JNK, p-p38 蛋白発現量を減少、p-Akt, p-ERK1/2 蛋白発現量を増加させることにより抗アポトーシス作用を発現することが示唆された。

本論文により、ラット褐色腫由来細胞 PC12 において ginseng の major active component である Rb1 ginsenoside は estrogen receptor を介し抗アポトーシス作用を示し、その作用発現には Akt, ERK1/2, SAPK/JNK, p38 が関与することが示唆された。以前より ginseng の中枢神経疾患に対する有用性は指摘されてきたが、シグナル伝達経路や核内受容体との関連について全容は把握されていない。本論文は ginseng の中枢神経疾患における薬理作用解明の一助をなすものと思われる。