

氏 名	ほん だ かず ひろ 本 田 和 弘
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 2435 号
学位授与の日付	平成 14 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	医学研究科脳統御医科学系専攻
学位論文題目	Nongenomic antiapoptotic signal transduction by estrogen in cultured cortical neurons (培養大脳皮質ニューロンでのエストロゲンによる遺伝子発現を介さない抗アポトーシスシグナル伝達に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教授 金子武嗣 教授 橋本信夫 教授 柴崎 浩

### 論 文 内 容 の 要 旨

アルツハイマー病 (AD) に関する疫学的研究より以下のことが報告されている。1) AD の発症率は女性が男性のおよそ 2 倍高い。2) 閉経後女性にエストロゲン補充療法を施行すると投与群は非投与群に比べ AD 発症率が有意に低い。3) AD 発症女性患者にエストロゲン補充療法を施行すると非投与群に比べて認知機能低下が有意に抑制された。これらの疫学的研究結果からエストロゲンは AD の進行に対し抑制的に作用していると考えられ、AD における神経変性に対して細胞保護効果を持つことが示唆される。しかしエストロゲンの神経細胞保護効果及びその分子機構に関しては未だ不明な点が多い。本研究では、エストロゲンの持つ神経細胞保護機構について phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K)/Akt シグナル伝達系に着目して検討した。

ラット胎仔 (胎生 19-20 日) より摘出・単離した初代培養大脳皮質神経細胞を用いた。薬物を含む培養液で培養後、免疫染色法にて神経細胞を同定・計数し生存率を評価した。AD での神経細胞死の一形態としてアポトーシスが示唆されていることから、神経細胞死誘発にアポトーシス誘発薬であるスタウロスポリン (STS) を使用した。アポトーシス細胞の同定・計数には TUNEL 法および核染色を用いた。STS は初代培養大脳皮質神経細胞に対して濃度および時間依存的に神経細胞死を誘発し、この細胞死は主にアポトーシスであることを確認した。エストロゲンとして、生体内で生理活性を持ち、閉経期に減少する代表的な女性ホルモンである  $17\beta$ -エストラジオール (E2) を用いた。30 nM STS により  $43.9 \pm 7.6\%$  に低下した神経細胞生存率は、生理的濃度範囲である 10 nM E2 の 30 分前投与により  $72.7 \pm 4.3\%$  まで上昇した。またアポトーシス率は  $45.2 \pm 4.7\%$  から  $15.1 \pm 2.8\%$  まで低下した。この E2 による抗アポトーシス作用は選択的エストロゲンレセプター拮抗薬である ICI182780 および PI3-K の選択的阻害薬である LY294002 の前投与により抑制された。以上の結果より、E2 による抗アポトーシス作用はエストロゲンレセプターおよび PI3-K を介していると考えられた。

次に PI3-K 以下のシグナル伝達系を解析した。PI3-K の下流標的の一つであり、細胞生存に促進的に作用すると報告されている Akt は 10 nM E2 投与 5 分以内にリン酸化された。Akt の下流標的であり、抗アポトーシス作用を持つタンパク質 Bcl-2 の転写因子の一つである CREB は E2 投与により 15 分以内にリン酸化された。また E2 投与により Bcl-2 は増加し STS による Bcl-2 減少を抑制した。以上の Akt リン酸化、CREB リン酸化そして Bcl-2 の増加はいずれも選択的エストロゲンレセプター拮抗薬および選択的 PI3-K 阻害薬にて抑制された。

以上の結果より、E2 による抗アポトーシス作用のシグナル伝達には小なくともエストロゲンレセプター  $\Rightarrow$  PI3-K  $\Rightarrow$  Akt  $\Rightarrow$  CREB  $\Rightarrow$  Bcl-2 という系が関与していることが示唆された。また E2 投与による Akt リン酸化は投与後 5 分以内と非常に早い時間経過で惹起されていることから、エストロゲンレセプターが転写因子として遺伝子発現を介して作用しているのではなく、遺伝子発現を介さない機構で PI3-K を活性化していると考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

疫学的研究からアルツハイマー病（AD）に対しエストロゲンの有効性が示されているので、その神経細胞保護機構を解明することを目的とした。特に本研究では、フォスファチジルイノシトール3キナーゼ（PI3K）カスケードに着目し検討した。

ラット胎仔大脳皮質初代分散培養を用い、スタウロスポリン（STS）によって細胞死を誘発し、閉経期に減少する代表的な女性ホルモンの $17\beta$  エストラジオール（E2）の効果を検討した。アポトーシス細胞の同定・計数には TUNEL 法と核染色法を用い、免疫染色法にて神経細胞を同定・計数し、その生存率を評価した。

その結果、生理的濃度の 10 nM E2 は STS に対し抗アポトーシス作用を示した。E2 の抗アポトーシス作用は PI3K 及びエストロゲン受容体（ER）拮抗薬で阻害され、ER 及び PI3K を介していた。E2 により PI3K 標的の Akt, Akt 標的の CREB がリン酸化を受け、CREB が転写促進する Bcl-2 は増加し、STS による Bcl-2 減少を抑制した。PI3K 及び ER 拮抗薬は E2 の Akt, CREB リン酸化, Bcl-2 増加応答のいずれをも阻害した。

以上から、E2 の抗アポトーシスシグナルには ER/PI3K/Akt/CREB/Bcl-2 の関与が示唆された。また、E2 の Akt リン酸化は非常に早い時間経過で惹起されており、ER は遺伝子発現を介さずに PI3K を活性化していると考えられた。

以上の研究は Alzheimer 病に対するエストロゲンの保護効果機序の解明に貢献し、その機構を応用した新しい治療法の開発に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成13年11月30日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。