

ダイズ由来リン脂質の小胞体ストレス予防効果に基づく神経変性 および糖尿病予防効作用に関する基礎的解析

長井 薫*・伊藤康貴

山梨大学大学院医学工学総合研究部

Protective Effects of Dilinoleoylphosphatidylethanolamine on Endoplasmic Reticulum Stress Induced Neuronal and Pancreatic β -cell Death

Kaoru NAGAI and Koki ITO

Interdisciplinary graduate school of Medicine and Engineering,
University of Yamanashi, Chuo-shi 409-3898

ABSTRACT

In many neurodegenerative diseases, neuronal cell death is caused by endoplasmic reticulum (ER) stress. ER stress is mainly induced by the accumulation of unfolded or misfolded proteins. We have reported that a phospholipid, dilinoleoylphosphatidylethanolamine (DLPE) protected neuronal cells from endoplasmic reticulum (ER) stress induced cell death. In this study, we examined the protective mechanisms of DLPE. First, we evaluated the effects of DLPE on up-regulation of an ER chaperone Grp78 which prevents protein misfolding in the ER, and Chop which was mainly reported to contribute to the cell death. ER stressors tunicamycin (TM) and thapsigargin (TG) increased both Grp78 and Chop. DLPE stimulated Grp78 expression in TM treated cells. However, unexpectedly, DLPE stimulated Chop expression, as well. Recently, autophagy which is one of the intracellular degradation mechanisms was reported to attenuate ER stress in neuronal cells. And phosphatidylethanolamine (PE), such as DLPE is a component of autophagy. Thus, DLPE might protect neuronal cells by stimulating autophagy. By western blot analysis of LC3, we found that DLPE stimulated LC3 conversion which indicates formation of autophagosome membrane. Our data suggests that DLPE protected the neuronal cells by stimulating autophagy. Next, we studied if DLPE is protective to other cells from ER stress. ER stress in pancreas was reported to cause diabetes. Hence, we examined the protective effect of DLPE on ER stress induced pancreatic β -cell line Min6 cell death. DLPE protected Min6 cells from TM and TG toxicity. In addition, DLPE attenuated saturated fatty acid palmitate

toxicity which is known to be a model of type-2 diabetes. Our data suggests that consumption of phospholipids, such as DLPE, may reduce the risk of diabetes as well as neurodegenerative diseases. *Soy Protein Research, Japan* **12**, 153-157, 2009.

Key words : Neurodegenerative disease, ER stress, autophagy phospholipid, diabetes

アルツハイマー病やパーキンソン病に代表される神経変性疾患は、何らかの原因により神経細胞が脱落することが原因となり発症する。現在、神経細胞の脱落・発症後の治療は不可能であることから、食品成分などによる進行前の予防が重要だと考えられる。多くの神経変性疾患における神経細胞死に共通の機構として小胞体ストレスがある。小胞体ストレスは、何らかの原因で小胞体内に異常なたん白質の凝集・沈着が起こることで誘発されるストレスで、ストレス初期にはGrp78などのシャペロンたん白質の発現上昇やたん白質の翻訳抑制などの保護機構が働くが、一定の閾値を越えるとChopの発現上昇などを伴い細胞死が誘導される (Fig. 1)。近年、小胞体ストレスは神経変性疾患だけでなく、糖尿病や心不全など様々な疾患においても誘発されていることが次々と報告されてきている。小胞体ストレスモデルとして、小胞体内糖たん白質糖鎖生成阻害剤であるツニカマイシン (TM) や小胞体内カルシウム枯渇作用を有するタブシガルギン (TG) が知られており、本研究においても神経系の細胞をTMやTGで処理したものを神経変性モデルとし、インシュリン分泌細胞モデルであるMin6細胞を処理したものを糖尿病モデルとした。

ホスファチジルセリンなどのリン脂質が認知機能の低下を抑制することが知られており¹⁾、リン脂質による脳神経系の保護効果については興味を持たれてきた

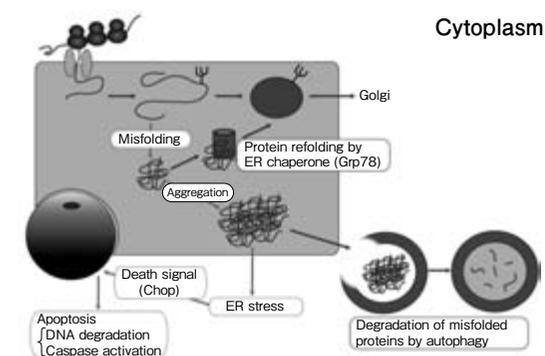


Fig. 1. Schematic diagram of ER stress associated signaling.

が、その作用機序に関しては明らかにされていない。我々は、これまでにリン脂質の一種であるジリノレオイルホスファチジルエタノールアミン (DLPE) が神経系細胞の小胞体ストレスによる細胞死誘導から保護する効果を有することを見出してきた。このことから、神経細胞に対する小胞体ストレス毒性低減作用がリン脂質の脳機能への有効性の一つの機構であることが示唆された。リン脂質の関与する細胞内分解機構としてオートファジーが知られており、近年、このオートファジーが神経変性を抑制するという報告もなされている²⁾。オートファジー機構は、DLPEの様なホスファチジルエタノールアミン (PE) がLC-3たん白質と結合しオートファゴソーム膜を形成することにより開始される。よってDLPEの保護作用は、オートファジーの促進による異常たん白質の分解によるものである可能性も考えられる。

本研究では、DLPEによる神経細胞保護効果の分子機構の解析、ならびに他疾患への有効性の有無の例として、糖尿病の原因となり得るすい臓β細胞の小胞体ストレスおよび飽和脂肪酸毒性に対するDLPEの保護効果に関する解析を行った。

方 法

小胞体ストレス誘導細胞死抑制効果の解析

Neuro2a細胞またはMin6細胞に、TMまたはTGを添加することで小胞体ストレスによる細胞死誘導を行った。Min6細胞はパルミチン酸による飽和脂肪酸毒性処理も行った。そこにリン脂質 (DLPE) を添加することで、細胞死抑制効果の判定を行った。細胞生存率の判定は、3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 法を用い、570 nmの吸光度による比色定量により評価を行った。細胞死抑制効果の確認は、Calcein-AM / Propidium iodide (PI) を用いた生細胞染色法により行った。

細胞死シグナルのWestern blotting解析

小胞体ストレス関連シグナルである、Grp78, Chopの発現上昇、そしてオートファゴソーム膜構成分子であるLC-3の構造変換はWestern blot法により解析を

行った。簡単に述べると、処理細胞の抽出液をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) によりたん白質の分離を行いPVDF膜に転写後、抗体染色、発色を行うことで評価を行った。

結 果

Neuro2a細胞の小胞体ストレスシグナルに対するDLPE処理の影響

Neuro2a細胞に対するTMまたはTG処理による小胞体ストレスシグナルに対するDLPE添加の影響について解析を行った。小胞体ストレスに曝露したNeuro2a細胞に100 μ M DLPEを添加し、4、8、12、24時間後に細胞を集め、Grp78とChopの発現変化をWestern blot法により解析を行った。その結果、Grp78の発現量はTM処理においては促進する傾向が見られ、TG処理においては変化が無かった。細胞死誘導シグナルに伴い発現上昇すると言われているChopの発現への影響については、予想に反しTM、TGどちらの処理の場合においても発現を促進する作用が見られた (Fig. 2)。

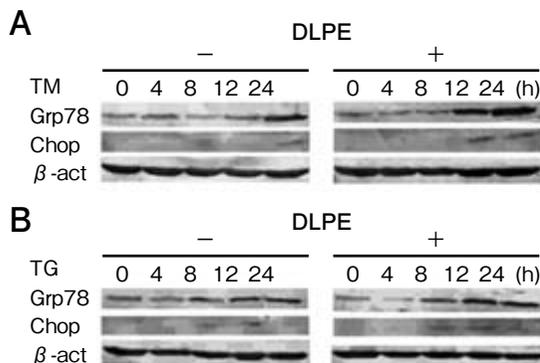


Fig. 2. Effects of DLPE on ER stress induced Grp78 and Chop expression. Neuro2a cells were treated with 100 μ M DLPE in the presence or absence of (A) tunicamycin (TM) or (B) thapsigargin (TG). The cell lysates were subjected to western blot analysis.

DLPEによるオートファジー促進効果の解析

オートファゴソームは、LC-3たん白質が限定分解を受けると同時にPEと結合することで膜形成が開始される (Fig. 3)。従って、LC-3-I (PEと結合前) からLC-3-II (結合後) への構造変換の度合いをWestern blot法により解析を行った。小胞体ストレスに曝露したNeuro2a細胞に100 μ M DLPEを添加し、4、8、12、24時間後に細胞を集め、LC-3の構造変化を解析したところ、DLPEにオートファゴソーム形成を早める効果が観察された (Fig. 4)。

Min6細胞への小胞体ストレスおよび不飽和脂肪酸毒性に対するDLPEの保護効果の解析

Min6細胞に小胞体ストレスであるTM、TGで処理することで誘導した細胞死にDLPEを添加すると、TM、TG双方のストレスに対し100 μ Mで有意な保護効果が観察された (Fig. 5A)。さらに、2型糖尿病モデルとなる、不飽和脂肪酸であるパルミチン酸毒性に対する効果でも、同様に100 μ Mで有意な保護効果が観察された (Fig. 5B)。

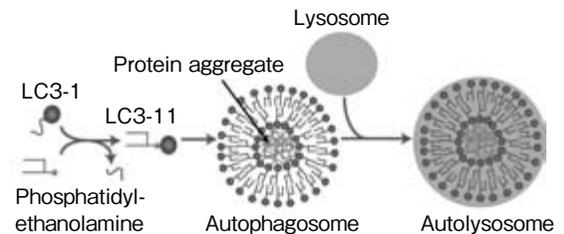


Fig. 3. Schematic diagram of autophagosome formation.

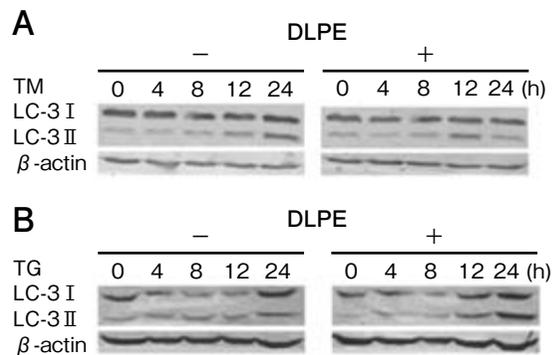


Fig. 4. Effects of DLPE on ER stress induced autophagy associated LC-3 conversion. Neuro2a cells were treated with 100 μ M DLPE in the presence or absence of (A) tunicamycin (TM) or (B) thapsigargin (TG). The cell lysates were subjected to western blot analysis.

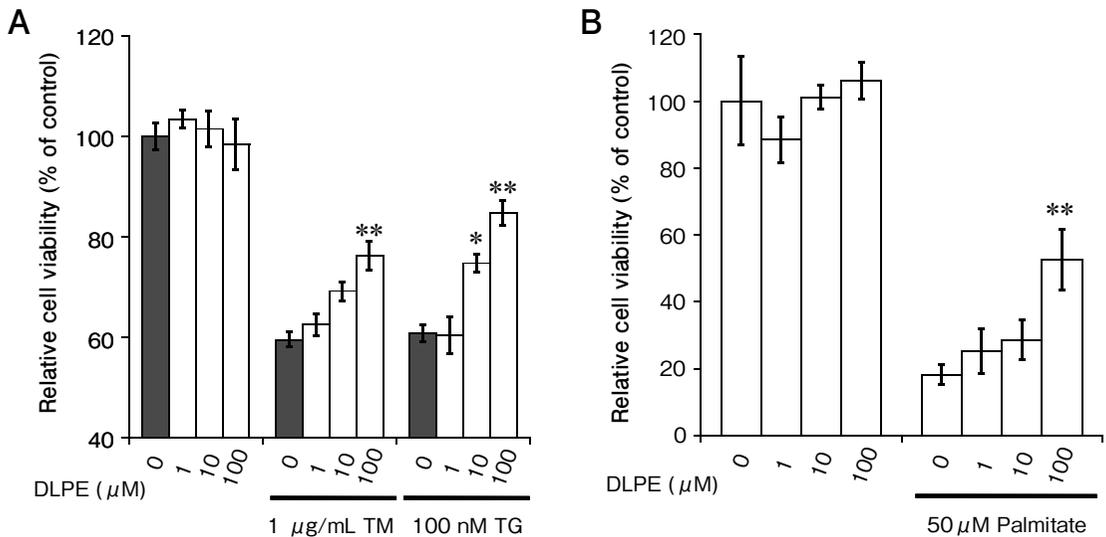


Fig. 5. Effects of DLPE on ER stress or palmitate induced Min6 cell death. Min6 cells were incubated with DLPE in the presence or absence of (A) ER stressors (TM and TG) or (B) palmitate. The cell viability was analyzed by MTT assay. The values are represented as the mean \pm SD of the relative percentage of surviving cells. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

考 察

本研究では、大豆などの植物に多く含まれるリン脂質の一種であるDLPEが神経系細胞の小胞体ストレス誘導細胞死を抑制するという我々のこれまでの発見を基礎として、まず、その作用メカニズムの解析を試みた。小胞体ストレスは小胞体内での異常たん白質の凝集が引き金となるので、Grp78などの小胞体シャペロンたん白質のような小胞体内でのたん白質凝集を抑える分子の発現上昇が保護機構として誘導される。DLPEはTM処理に対してはGrp78の発現促進傾向が認められたが、TG処理のほうでは認められなかった (Fig. 2)。従って、Grp78の発現誘導がDLPEの保護機能であるとは考えにくい。次に、ERストレスが原因となるアポトーシス反応に先立って発現上昇する転写調節因子であるChopに関して検討を行った。DLPEの作用がアポトーシスシグナルの抑制であればChopの発現上昇を抑制することが期待されるが、予想に反してDLPEが発現を促進するという結果が得られた (Fig. 2)。しかし、Chopシグナルはアポトーシス抑制に働くという報告もあることから³⁾、DLPEのChop発現促進効果がアポトーシス抑制作用の方に働いている可能性も考えられる。次に、細胞内分解経路の一つであるオートファジーに対する作用について検討を行っ

た。LC-3の構造変換はPEと結合するのと同時に起こることから、DLPE投与による細胞内 (DL) PE濃度上昇はオートファジー促進に働く可能性が高い。実際に、DLPE投与によりLC-3の構造変換が促進されたことから (Fig. 4)、DLPEはオートファジーを促進する効果を有するといえる。オートファジーは神経変性を抑制するという報告がなされていることから²⁾、DLPEの保護作用はオートファジーの促進効果に基づく可能性が示唆された。

DLPEが小胞体ストレスの関与する他の疾患に対しても有効であるか否かについて検討するため、すい臓 β -細胞モデルであるMin6細胞に対する小胞体ストレスへの効果について検討したところ、DLPEが神経系の細胞同様細胞保護効果を示した (Fig. 5A)。また、生活習慣等が原因となる2型糖尿病モデルとなるパルミチン酸毒性についても検討を行ったところ、DLPEには保護効果が認められた (Fig. 5B)。これらの結果は、DLPEの摂取が2型糖尿病についても予防効果を有することを示唆している。

今回、DLPEの保護作用がオートファジーの促進効果によること、神経細胞だけでなく糖尿病の原因となるすい臓 β -細胞の障害に対してもDLPEが有効であることを明らかにした。しかし、より詳細な細胞保護分子機構や、小胞体ストレスが関与する心不全などその他の疾患への作用については今後の課題である。

要 約

本研究では、DLPEによる小胞体ストレス誘導神経細胞死抑制効果に関して、その作用機構の解析を行った。さらに、DLPEの小胞体ストレスによる他の疾患への有効性として、2型糖尿病のモデルとなるすい臓 β -細胞系Min6細胞への小胞体ストレス誘導細胞障害に対するDLPEの作用について検討を行った。DLPEの保護機構としてオートファジーの開始を表すLC-3の構造変換の促進が認められたことから、オートファジーの促進が神経細胞の保護作用に関わることが示唆された。Min6細胞への作用に関しては、神経系細胞と同様に、DLPEが小胞体ストレス誘導細胞死を抑制したが、それだけでなく2型糖尿病モデルである飽和脂肪酸誘導細胞死に対しても保護効果を示すことが分かった。今回の結果から、DLPEは神経変性のみならず、糖尿病など小胞体ストレスが関わる他の疾患に対しても有効であることが示唆された。

文 献

- 1) Kataoka-Kato A, Ukai M, Sakai M, Kudo S and Kameyama T (2005): Enhanced learning of normal adult rodents by repeated oral administration of soybean transphosphatidylated phosphatidylserine. *J Pharmacol Sci*, **98**, 307-314.
- 2) Todde V, Veenhuis M and van der Klei IJ (2009): Autophagy: Principles and significance in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta*, **1792**, 3-13.
- 3) Southwood CM, Garbern J, Jiang W and Gow A (2002): The unfolded protein response modulates disease severity in Pelizaeus-Merzbacher disease. *Neuron*, **36**, 585-596.