

【総説】

酸化ストレスによる神経突起変性の誘因

福井 浩二

芝浦工業大学 システム理工学部 生命科学科分子細胞生物学研究室

要約

我々は、加齢に伴う認知機能の低下には、脳神経細胞での酸化傷害が関与していると想定し、そのメカニズムの解明に取り組んでいる。既知の様に、生体では加齢に伴い過酸化脂質が増加、培養細胞では酸化傷害により細胞死が起きる。よってこれらを防ぐためには、酸化傷害による神経細胞死が起きる前の早期変化が何であるかを見出すことが重要と考えている。我々の実験から、培養細胞では細胞が死なない低濃度の過酸化水素の添加により、神経細胞の突起上に数珠状の凝集物形成が生じていることが明らかとなった。また、この形態的变化は、初代培養系や老齢マウス、ビタミンE欠乏マウスの脳でも生じていた。更に、細胞膜酸化や微小管変性、カルシウムホメオスタシスの崩壊の可能性が、我々のものを含め多数報告されている。以上より、加齢に伴う認知機能障害の一因には、脳神経細胞内での酸化傷害に起因する神経突起障害が関与している可能性が考えられる。

キーワード：Oxidative stress, Aging, Cognition, Axonal degeneration, Microtubules

1. 加齢及び酸化ストレスによる神経突起障害の誘因

既知のように、老化とは不可避でかつ退行的な生理機能の低下現象を指す。加齢に伴い減衰する生体機能には、運動機能や内分泌機能など様々あるが、その中の一つに認知機能がある。脳老化の原因と称されるものは多数存在するが、我々はこれまで1950年代にD. Harmanによって提唱された「老化のフリーラジカル説」[1]に基づいて、そのメカニズムの解明に取り組んで来た。その結果、老齢ラットやマウスを使った実験からは、モーリス水迷路や放射状迷路課題などの行動実験において認知機能の有意な低下を確認し [2]、その後の生化学的解析では、脳内で過酸化脂質量の増加と抗酸化酵素活性の有意な低下 [3]、更には海馬領域にてアポトーシスが多数起きていることを明らかにした [4]。我々は更に、高濃度酸素に48時間暴露させた若齢ラットの認知機能についてもモーリス水迷路試験により検討した。その結果、酸素を暴露させた若齢群では、通常飼育の老齢群と同程度まで認知機能は有意に低下していた [2]。この際、遊泳速度に酸素暴露群と対照群では有意な差はなかった。

また、ビタミンEを欠乏させ、個体内での酸化を促進させたマウスやラットでも認知機能の有意な低下を確認した [2]。これより、加齢に伴う認知機能の低下の一因には、酸化傷害が関与している可能性が強く伺えた。しかし、これらの実験は全て、すでに酸化がある程度亢進し、認知機能が大きく低下したラットやマウスにおける解剖後の試料を実験に使用していることから、加齢に伴う酸化傷害に起因する認知機能不全に陥るのを防ぐためには、脳内の神経細胞で生じる変化を可能な限り早く明らかにすることが重要と考えるに至った。そこで、我々は神経細胞内の神経突起部に着目した。なぜならば、神経突起部は進展や縮退がダイナミックに起きていること、また、必要な物質の少なくとも一部を、細胞体からの軸索輸送による供給に頼っているからである。これより我々は、神経突起部が核や小胞体が存在する細胞体部より、外部からの刺激に対してより脆弱なのではないかと考えるに至った。よって、初めに培養細胞にて神経突起を進展させたモデルを用いて、酸化傷害時の神経突起の変化を検討した。培養細胞には、神経芽細胞腫であるNeuro2aやN1E-115細胞を用いた。数日間培養して神経突起を十分に伸長させたのち、培養細胞に酸化傷害を誘引させる目的で過酸化水素を添加すると、濃度・時間に依存して細胞死が生じた。そこで、細胞死が起きない低濃度の投与時における神経突起部を注意深く観察したところ、神経突起に形態的な変性が起きていることを明らかとした(図1) [5, 6]。この際、神経突起は対照群

連絡先：福井浩二 〒337-8570
埼玉県さいたま市見沼区深作 307
TEL：048-720-6033
FAX：048-720-6011
E-mail：koji@shibaura-it.ac.jp

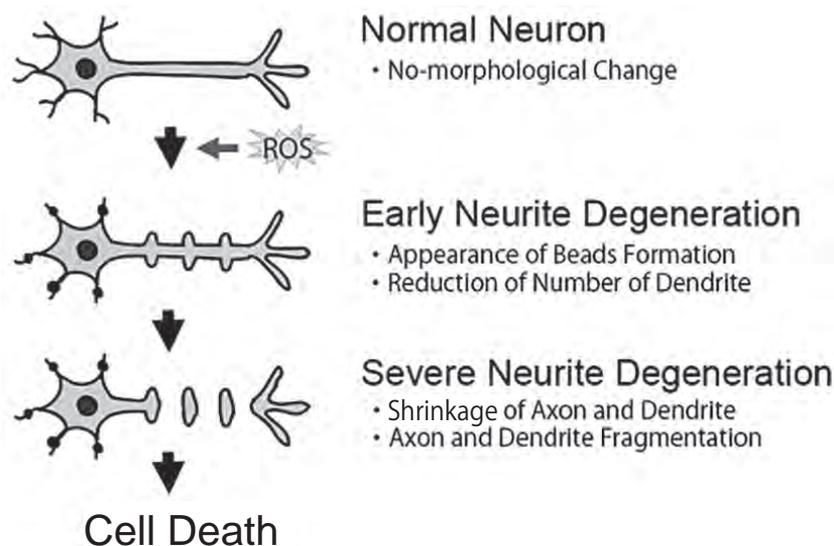


図1 培養細胞への低濃度のROSの暴露は神経突起障害を誘因する [6]。

細胞が死なない低濃度の過酸化水素やラジカル開始剤の添加は、神経突起や樹状突起部に数珠状の凝集物形成を誘因する。さらに高濃度での添加や添加時間の延長は、神経突起の断片化を経て、細胞死を誘引する。

と比べ非常に細くなり、また、数珠状の凝集物が多数形成されていることを確認した。また、この現象は Green fluorescent protein: GFP を遺伝子導入して可視化した初代培養系でも確認された [7] ことから、酸化傷害による神経細胞死が起きる前の初期段階では、神経突起に障害が起きる可能性を明らかとした。さらに我々は、行動実験にて有意な認知機能の低下を示した老齢やビタミン E 欠乏マウスを還流固定してパラフィン切片を作成し銀染色したところ、海馬領 CA1 領域において軸索部に培養細胞時と同様の凝集物が多数形成されていることを確認した [8]。以上のことから、加齢に伴い脳神経細胞では神経突起に障害が起きている可能性があり、また、その原因の一つとして酸化傷害が関係する可能性が考えられた。通常飼育においても加齢に伴い、徐々に酸化傷害が蓄積していく可能性を示しており、非常に興味深い。

2. 酸化傷害に起因する神経突起障害のメカニズムの解明

神経突起障害はアルツハイマー病 [9]、パーキンソン病 [10]、ハンチントン病 [11] などの、様々な神経退行性疾患との関連が取りざたされている。これらの疾患の多くは、その発症や進展に酸化傷害が深く関与することが明らかにされている。このことから、酸化に伴う神経突起障害が、これらの疾患の発症や進展に関係する可能性は容易に想像できる。では、加齢に伴う認知機能障害に脳酸化が関連し、酸化により生じる神経突起障害が、細胞死が起きる前の一つの大きなイベントであるとして、そのメカニズムには何が考えられるのか。ここでは、3つの仮説について述べる。

まず、第一は細胞膜酸化である。既知のように細胞膜

はその主成分がドコサヘキサエン酸やエイコサペンタエン酸などの高度不飽和脂肪酸を多く含むリン脂質で構成されているため酸化を受けやすい。特に、ヒトの場合、体重に占める脳重量は約13分の1であるにもかかわらず、酸素消費量は約20%と非常に高い [12]。その為、脳は常に酸化の危険にさらされている。膜酸化に関する研究はこれまでも非常に多く行われており、酸化を防ぐ物質としてビタミンEをはじめとした抗酸化物質の有効性が多くの論文から立証されている [13]。事実、我々も培養細胞への過酸化水素の投与により、神経突起障害を確認 [5, 7] するとともに、有意な脂質ヒドロペルオキシドの産生を確認した [7]。しかし、過酸化水素は小さい分子量であるが故に、一部は細胞膜を通過する。よって、細胞膜の酸化が神経突起障害を誘引していることを更に確認するために水溶性のラジカル開始剤である 2,2'-Azobis (2-methylpropionamide) Dihydrochloride: AAPH を培養液中に添加したところ、過酸化水素の添加時と同様に濃度依存的に細胞死を誘引し、また低濃度の添加においては、多数の神経突起障害を確認したことから、細胞膜の酸化が神経突起障害の誘因に関連している可能性が考えられる。

第二は細胞骨格タンパク質である微小管崩壊の可能性である。微小管は通常、 α -tubulin と β -tubulin の二量体が重合と脱重合を繰り返すことで動的安定性を保ち、突起形態の維持を行っている。また、この際の微小管は kinesin や dynein などのモータープロテインが物質輸送を行う際のレールの役割も担っている。よって、仮に微小管に何らかの変性が生じれば軸索輸送にも障害が生じると考えられる。そこで、我々は微小管関連タンパク質の一つである collapsin response mediator protein

(CRMP)-2に着目して、そのタンパク質と mRNA 発現について検討した。CRMP-2は同じ微小管関連タンパク質である Tau とそのはたらきが類似しており、tubulin と結合することで、微小管の安定性向上に寄与する。また、CRMP-2はリン酸化することで tubulin との結合能を失うことから、アルツハイマー病において神経原繊維変化として知られる Tau 同様に、発症や病態の亢進、または早期発見のマーカーとしての可能性が多く報告されている [14, 15]。我々の実験では、加齢に伴い脳内での CRMP-2 mRNA 発現は有意に低下し、またビタミン E 欠乏マウスでは、同月齢の対照群との比較でリン酸化の割合が有意に増加していた [16] (図 2)。また、これらの上流に位置する glycogen synthase kinase (GSK) -3 β もリン酸化の割合が大きく変動していた。培養細胞での免疫染色では、過酸化水素由来の神経突起変性時に生じる数珠状の凝集部位にリン酸化 CRMP-2 (pCRMP-2) が強く呈色していることも確認しており、pCRMP-2 の割合の増加による tubulin の重合能の低下が微小管の安定性を低下させ、加齢やビタミン E 欠乏時 (つまり酸化が亢進していると考えられる状態) に生じる神経突起変性を誘因する一因となっている可能性が考えられる。しかし、これらの反応が直接的な細胞内外で発生した活性酸素によるものか、また二次的な傷害の結果として生じたものであるかは不明であり、我々は現在も継続して検討を重ねている。

第三は細胞内カルシウムイオン流入を引き金とした小胞体 (endoplasmic reticulum: ER) やミトコンドリアの機能不全である。前述した細胞膜の酸化は同時に様々なイオンチャネルの酸化・変性も引き起こして

いることが予想される。特に、N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体や、 α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic-acid (AMPA) 受容体は、膜が酸化される際に同時にダメージを受け、細胞内へカルシウムやナトリウムイオンなどの過剰流入を引き起こす [17, 18]。これらの中でもカルシウムイオンの細胞内への過剰流入は、カルシウム誘発性カルシウム放出 (calcium-induced calcium release: CICR) により、ER ではリアノジン受容体を介して、細胞内へカルシウムイオンを放出する。ミトコンドリアでは、細胞内へのカルシウムイオンの流入により、ミトコンドリア内でのカルシウムイオンの蓄積が起こり、ミトコンドリア膜透過性遷移孔 (mitochondrial membrane transition pore: mPTP) を介したシトクロム C の放出や膜電位の低下、活性酸素の一種であるスーパーオキシドの産生、またスーパーオキシドを消去する Mn-superoxide dismutase (SOD) の活性低下を介した酸化亢進が起こる。このミトコンドリアでの酸化傷害が、二次的にモータータンパク質や微小管に作用し、結果として神経突起障害を誘引している可能性がある。事実、我々の検討においても、神経突起部にミトコンドリアが細胞体部よりは少ないが、存在していることを確認している [16]。また、システインプロテアーゼファミリーのカルパインはカルシウムイオン存在下で活性化し、CRMP-2 の断片化を誘引して神経突起変性を引き起こすことも知られている [19]。細胞内でのカルシウム代謝異常は、カルシウム毒性としてこれまでも知られてはいるが、ミトコンドリアのみならず細胞内で更なる活性酸素の産生増加を導くことが考えられ、これにより酸化反応が連鎖反動的に生じ酸化傷害が増悪することも考えられる。

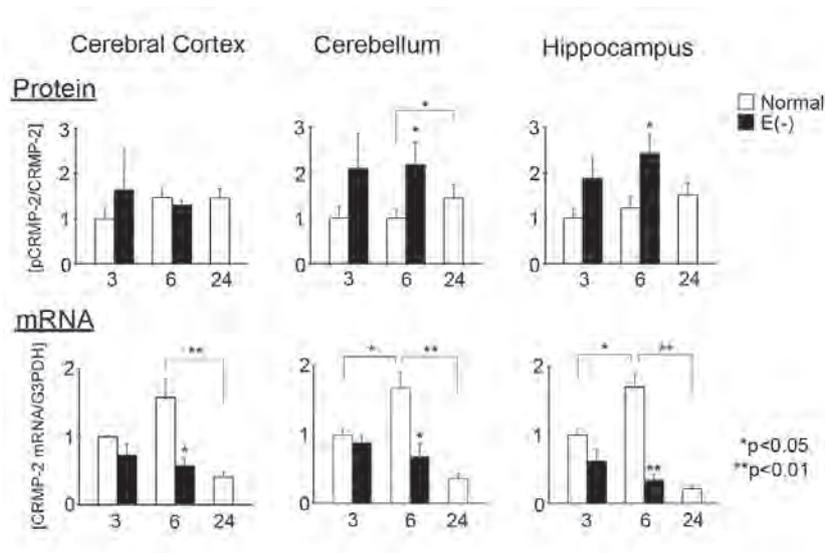


図2 加齢及びビタミン E 欠乏に伴う pCRMP-2 タンパク質および CRMP-2 mRNA 発現の変化 [16 一部改]。

マウス脳を 1 月齢よりビタミン E 欠乏食にて飼育し、3 月齢に達したものを 3 月齢ビタミン E 欠乏群、6 月齢に達したものを 6 月齢ビタミン E 欠乏群として実験に使用。大脳、小脳、海馬領域に分け Western blot にて pCRMP-2、CRMP-2 を、PCR にて CRMP-2 と G3PDH の mRNA 発現を検討した。

3. 最後に

加齢やビタミン E 欠乏に伴う認知機能障害の原因の一つには、脳神経細胞での酸化傷害に伴う神経突起変性に関連している可能性があり、そのメカニズムには膜酸化による微小管変性やミトコンドリア機能不全が関与している可能性がある。神経細胞死が起きていなくとも神経突起障害時、神経伝達機能はおそらく破たんしている。その根拠として、我々は単離したシナプス小胞の脂肪酸組成の変化 [20]、シナプトタグミンやシンタキシンなどの SNARE タンパク質の変性 [21] に起因する膜融合不全やオートファジー：microtubule-associated protein light chain (MAP LC) 3-II の活性低下 [16] を確認している。1 月齢より 2 か月間ビタミン E 欠乏食で飼育した短期ビタミン E 欠乏マウスの海馬領では MAP LC3-II が高発現しており、このマウスの海馬領に切片の免疫染色からは、軸索変性は見られなかった。しかし、1 月齢より 5 か月間ビタミン E 欠乏食で飼育し、脳内での酸化が亢進しているであろう長期ビタミン E 欠乏マウスの海馬領では、MAP LC3-II はほとんど発現しておらず、切片の免疫染色では軸索変性が起きていた。しかし、多方面で研究はなされているが、まだ、酸化傷害に起因する神経突起変性のメカニズムには不明な点が多い。当然のことながら、上述したいくつかの反応も複数と同時に起きているであろう。我々の究極的な目標は、脳内で起きている神経突起変性を含む初期の神経細胞の変化を外部から非侵襲的な手段により判断できないかというものである。この変性・変化に我々は酸化傷害が深く関与していると考えている。将来、事前診断が可能となり、様々な神経退行疾患発症へのリスクが少しでも軽減できれば幸いである。

参考文献

1. Harman D. Aging a theory based on free radical and radiation theory of aging. *J Gerontol* 11: 298-300, 1956.
2. Fukui K, Onodera K, Shinkai T, *et al.* Impairment of learning and memory in rats caused by oxidative stress and aging, and changes in antioxidative defense systems. *Ann NY Acad Sci* 928: 169-176, 2001.
3. Onodera K, Omoi NO, Fukui K, *et al.* Oxidative damage of rat cerebral cortex and hippocampus and changes in antioxidative defense systems caused by hyperoxia. *Free Radic Res* 37: 367-372, 2003.
4. Fukui K, Takatsu H, Shinkai T, *et al.* Appearance of β -amyloid-like substances and delayed-type apoptosis in rat hippocampus CA1 region through aging and oxidative stress. *J Alzheimers Dis* 8: 299-309, 2005.
5. Fukui K, Takatsu H, Urano S. Hydrogen peroxide induces neurite degeneration: Prevention by tocotrienols. *Free Radic Res* 45: 681-691, 2011.
6. Fukui K. Reactive oxygen species induce neurite degeneration before induction of cell death. *J Clin Biochem Nutri* doi: 10.3164/jcfn.16-34, 2016.
7. Fukui K, Ushiki K, Takatsu H, *et al.* Tocotrienols prevent hydrogen peroxide-induced axon and dendrite degeneration in cerebellar granule cells. *Free Radic Res* 46: 184-193, 2012.
8. Fukui K, Kawakami H, Honjo T, *et al.* Vitamin E deficiency induces axonal degeneration in mouse hippocampal neurons. *J Nutri Sci Vitaminol* 58: 377-383, 2012.
9. Petratos S, Li QX, George AJ, *et al.* The beta-amyloid protein of Alzheimer's disease increases neuronal CRMP-2 phosphorylation by a Rho-GTP mechanism. *Brain* 131 (Pt 1): 90-108, 2008.
10. Cappelletti G, Surrey T, Maci R. The parkinsonism producing neurotoxin MPP+ affects microtubule dynamics by acting as a destabilising factor. *FEBS Lett* 579: 4781-4786, 2005.
11. Li H, Li SH, Yu ZX, *et al.* Huntingtin aggregate-associated axonal degeneration is an early pathological event in Huntington's disease mice. *J Neurosci* 21: 8473-8481, 2001.
12. Reiter RJ. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. *Prog Neurobiol* 56: 359-384, 1998.
13. Niki E. Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects. *Free Radic Biol Med* 47: 469-484, 2009.
14. Gu Y, Hamajima N, Ihara Y. Neurofibrillary tangle-associated collapsing response mediator protein-2 (CRMP-2) is highly phosphorylated on Th-509, Ser-518, and Ser-522. *Biochemistry*, 39: 4267-4275, 2000.
15. Good PF, Alapat D, Hsu A, *et al.* A role for semaphoring 3A signaling in the degeneration of hippocampal neurons during Alzheimer's disease. *J Neurochem* 91: 716-736, 2004.
16. Fukui K, Masuda A, Hosono A, *et al.* Changes in microtubule-related proteins and autophagy in long-term vitamin E-deficient mice. *Free Radic Res* 48: 649-658, 2014.
17. Sensi SL, Yin HZ, Carriedo SG, *et al.* Preferential Zn^{2+} influx through Ca^{2+} -permeable AMPA/kainate channels triggers prolonged mitochondrial superoxide production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 2414-2419, 1999.
18. Lee YS, Lee SJ, Seo KW, *et al.* Homocysteine induces COS-2 expression in macrophages through ROS generated by NMDA receptor-calcium signaling pathways. *Free Radic Res* 47: 422-431, 2013.
19. Touma E, Kato S, Fukui K, *et al.* Calpain-mediated

- cleavage of collapsing response mediator protein (CRMP) -2 during neurite degeneration in mice. Eur J Neurosci 26: 3368-3381, 2007.
20. Omoi NO, Arai M, Saito M, *et al.* Influence of oxidative stress on fusion of pre-synaptic plasma membranes of the rats brain with phosphatidyl choline liposome, and protective effect of vitamin E. J Nutri Sci Vitaminol 52: 248-255, 2006.
21. Kaneai N, Arai M, Takatsu H, *et al.* Vitamin E inhibits oxidative stress-induced denaturation of nerve terminal proteins involved in neurotransmission. J Alzheimers Dis 28: 183-189, 2012.

Oxidative stress induces neurite degeneration

Koji Fukui

Molecular Cell Biology Laboratory, Division of Bioscience and Engineering,
Shibaura Institute of Technology

Abstract

In order to verify the mechanism of cognitive dysfunction during aging, we are studying the relationship between cognitive dysfunction and brain oxidation. It is well known that lipid peroxidative products increase in living tissues, and cultured cell death is occurred by oxidative injury. Our final goal is to determine events prior to reactive oxygen species (ROS) -derived cell death. Treatment with a low concentration of hydrogen peroxide induced neurite degeneration such as appearance of beads formation. We also found these morphological changes in primary cell culture and aged- and vitamin E-deficient mice brains. Several kinds of evidence including our recent data have indicated the possibilities of membrane oxidation, destabilization of microtubules, and calcium homeostasis alteration. These results show that one reason of cognitive dysfunction during aging is related to ROS-induced neurite degeneration.

Keywords : Oxidative stress, Aging, Cognition, Axonal degeneration, Microtubules