



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

マウス海馬由来HT22細胞における酸化ストレス誘発性傷害に対するブラジル産グリーンプロポリスの神経保護作用

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2020-07-21 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 高島, 麻都花 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/79054

マウス海馬由来 HT22 細胞における酸化ストレス誘発性傷害に
対するブラジル産グリーンプロポリスの神経保護作用

Neuroprotective effects of Brazilian green propolis on oxidative stress -
induced cell death in mouse hippocampal HT22 cells

2019

高島 麻都花

目 次

第1章 序論.....	- 2 -
1-1. 神経変性疾患.....	- 2 -
1-2. 酸化ストレスと細胞傷害.....	- 4 -
1-3. プロポリス.....	- 9 -
1-4. 本研究の目的.....	- 11 -
第2章 酸化ストレス誘発性オキシトーンシス/フェルトーンシス及びアポトーンシスに対するブラジル産グリーンプロポリスの作用.....	- 13 -
2-1. 緒言.....	- 13 -
2-2. 実験材料及び実験方法.....	- 14 -
2-3. 結果.....	- 17 -
2-4. 考察.....	- 22 -
第3章 細胞内グルタチオン、活性酸素種、遊離二価鉄及び Ca^{2+} の流入に対するブラジル産グリーンプロポリスの影響.....	- 24 -
3-1. 緒言.....	- 24 -
3-2. 実験材料及び実験方法.....	- 24 -
3-3. 結果.....	- 27 -
3-4. 考察.....	- 38 -
第4章 Nrf2-ARE 経路及び抗酸化関連酵素に対するブラジル産グリーンプロポリスの作用.....	- 42 -
4-1. 緒言.....	- 42 -
4-2. 実験材料及び実験方法.....	- 43 -
4-3. 結果.....	- 46 -
4-4. 考察.....	- 51 -
第5章 総括.....	- 53 -
謝辞.....	- 56 -
参考文献.....	- 57 -
略語一覧.....	- 64 -

第1章 序論

1-1. 神経変性疾患

神経変性疾患とは、中枢神経系における神経細胞の脱落や神経細胞内外における異常タンパク質の蓄積を特徴とし、進行性の認知・運動機能に障害が現れる疾患である。代表的な神経変性疾患として、アルツハイマー病や、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、脊髄小脳変性症、ハンチントン病などが挙げられる。

これら神経変性疾患のうち最も患者数が多いのはアルツハイマー病である。アルツハイマー病では、海馬をはじめとし大脳皮質などにおいてアミロイド β の蓄積やリン酸化 τ タンパク質の凝集による神経原線維変化、ニューロン間のシナプスの減少が見られ、高齢者の認知症の原因として過半数を占める (Grundke-Iqbal et al., 1986)。次いで患者数が多いのがパーキンソン病であり、中脳の黒質ドーパミン神経細胞の減少による振戦や筋固縮といった運動機能障害が見られるのが特徴である。筋萎縮性側索硬化症では運動ニューロンの変性により呼吸筋も含め全身の筋力低下や筋萎縮が進行する (Dauer and Przedborski, 2003)。脊髄小脳変性症では、ふらつきやうまく喋れなくなるなどの症状が現れ、ハンチントン病では舞踏運動などの自分の意思とは無関係に身体が動くような症状が見られる。このように、神経変性疾患では広範な神経系がどのように障害されるかにより、症状は異なり、いずれも症状が進行するにつれて日常生活に支障をきたすようになる。アルツハイマー病やパーキンソン病などの疾患は高齢者において有病率が高くなっており、加齢は発病における危険因子の一つであるとされる (朝田, 2018)。厚生労働省による患者調査によれば、パーキンソン病の患者数は平成2年から平成26年の間に約1.5倍、アルツハイマー病の患者数は約90倍となった (図1)。平成28年国民生活基礎調査によれば、これらの疾患で介護を必要とする人は約20%を占める (図2)。世界で見ても、2015年にアルツハイマー病の影響を受ける人口はおよそ4000万人と報告されていたが、2050年には1億350万人に増加すると予測されている (Alzheimer's association, 2018; Dobson, 2017; Christina, 2018)。先進国において平均寿命が長くなることに伴い、神経変性疾患の患者数は増加の一途をたどると予想され、財政への負担は確実に増加すると予想される。

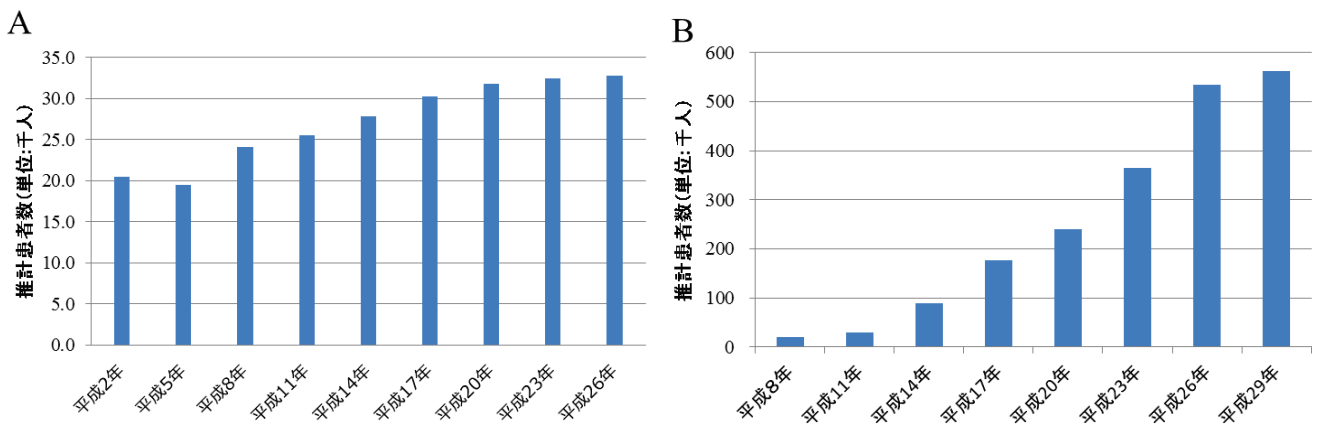


図1. パーキンソン病とアルツハイマー病の推計患者数の推移

A: パーキンソン病, B: アルツハイマー病

厚生労働省 患者調査 (A: 平成 26 年、B: 平成 29 年) より抜粋

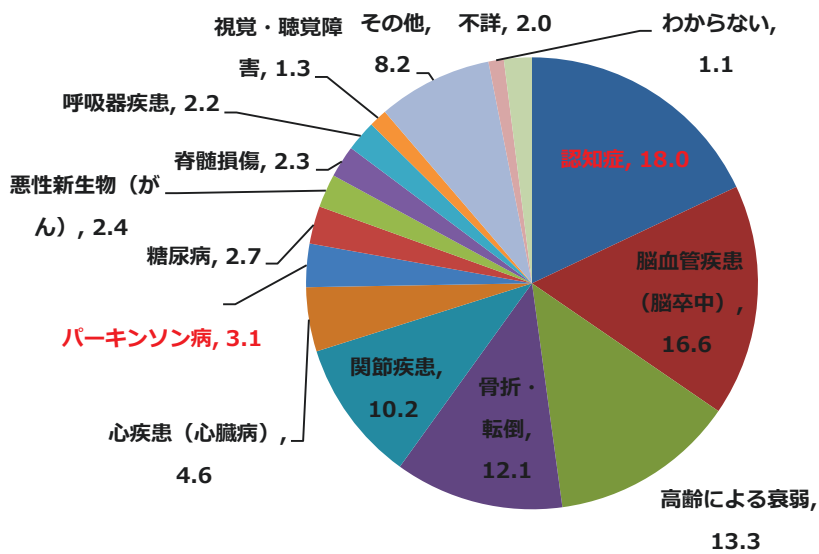


図2. 要支援者・要介護者の介護が必要となった主な原因の構成割合 (%)

平成 28 年国民生活基礎調査より

神経変性疾患の患者数増加が大きな問題となっている一方で、神経変性疾患は難治性であり、遺伝性病型を除いて発症の原因や機構については未だに十分には解明されておらず、根本的な治療法が確立されていない。従来の神経変性疾患の治療薬のほとんどは、神経伝達物質等の補充を目的としたものであり、症状の緩和には役立つが、病態過程そのものの抑止につながるものではない。また、神経細胞は一度傷害されると極めて再生し難いため、症状がはっきりと出現してからでは病態の進行阻止治療を施しても、神

経機能の回復は困難であることも治療法開発が難しい要因である。しかしながら、今後ますます患者数が増加することが予想される神経変性疾患の予防法及び治療法の開発は長寿社会を迎えた日本やその他先進国にとって大きな課題である。

1-2. 酸化ストレスと細胞傷害

神経変性疾患の発症機構の詳細については未だに明らかとなっていないことが多いが、主な特徴である神経細胞傷害には酸化ストレスが関わっていることが報告されている (Ebadi et al., 1996; Smith et al., 1995)。酸化ストレスとは生体内において酸化力が抗酸化力を上回り、体内の酸化・還元状態の維持が出来ていない状態を指し、その原因は生体内で発生する活性酸素種による酸化物質の蓄積である (図3)。好気性生物におけるエネルギー産生において酸素は必要不可欠であるが、酸素の一部は代謝の過程で活性酸素種に還元される。代表的な活性酸素種には、スーパーオキシドアニオン、ヒドロキシラジカル、過酸化水素、一重項酸素の4種がある。活性酸素種は反応性が高く、脂質を攻撃して動脈硬化や心筋梗塞などの原因となる過酸化脂質を発生させたり、タンパク質を攻撃することにより酵素や受容体の機能に影響を与えたりする。また、核酸と反応してDNA鎖の切断や核酸塩基の酸化的修飾による変異を引き起こしたりする。体内の臓器の中で最も酸素の消費量が多い脳では、活性酸素種が発生するリスクも高く、酸化ストレスを受けやすい組織といえる (Halliwell, 2006; Cheignon et al., 2018)。

通常、生体内には活性酸素種を消去するための機構すなわち抗酸化機構が備わっており、活性酸素種が過剰にならないように制御されている (図 3)。具体的には抗酸化酵素及び酸化物質による活性酸素種の消去が挙げられる。抗酸化酵素としてはスーパーオキシドアニオンを消去するスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) や過酸化水素を消去するカタラーゼ (CAT) などがある。また過酸化脂質を還元する酵素としてはグルタチオンペルオキシターゼ (GPx) が存在する (MatÉs et al., 1999)。酸化物質とは活性酸素を還元して無害なものにする物質であり、生体内に存在する最も一般的な酸化物質にはグルタチオンがある。グルタチオンはグルタミン酸、システイン、グリシンの3種類のアミノ酸から成るトリペプチドであり、 γ -グルタミルシステイン合成酵素及びグルタチオン合成酵素により合成される。グルタチオンは直接スーパーオキシドアニオンやヒドロキシラジカルを還元したり、グルタチオンペルオキシダーゼ 4 (GPx4) などの基質となり過酸化脂質や過酸化水素を還元したりする (Dringen, 2000)。

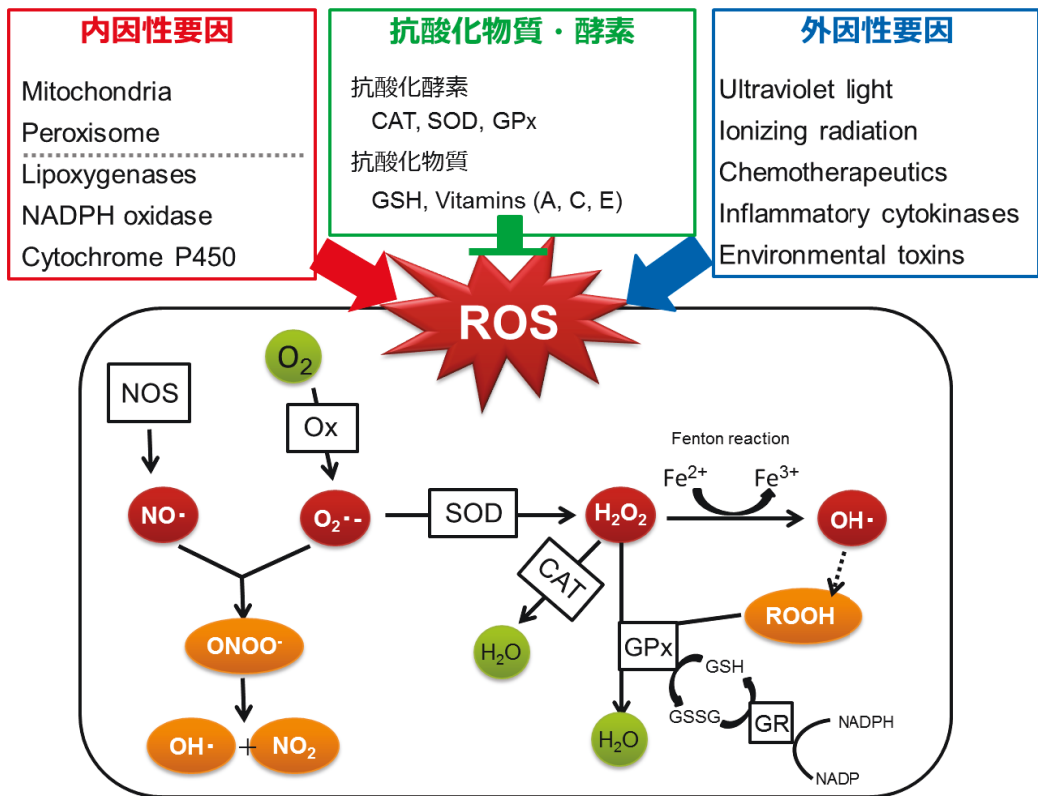


図 3. 活性酸素種の発生源と細胞内抗酸化システム

O₂: molecular oxygen, Ox: oxidase, O₂•⁻: superoxide anion, H₂O₂: hydrogen peroxide, SOD: superoxide dismutases, CAT: catalase, GPx: glutathione peroxidase, GSH: glutathione, GR: glutathione reductase, OH•: hydroxyl radical, NOS: nitric oxide synthase, ONOO⁻: peroxynitrite anion, ROOH: hydroperoxide (Finkel and Holbrook, 2000; Phaniendra et al., 2015 を改変)

生体内に備わる抗酸化機構では対応しきれない酸化ストレスが生じた場合、細胞ではプログラムされた細胞死が誘導される。その形態としてオキシトーシスとフェルトーシスが報告されている。これらの細胞死はカスパーゼ依存性のプログラムされた細胞死であるアポトーシスや、プログラムされていない細胞死であるネクローシスとは異なる (Dixon et al., 2012; Tan et al., 1998)。

オキシトーシスは細胞外の過剰なグルタミン酸によって誘導される細胞死である (図 4, Tan et al., 1998)。細胞表面上にはグルタミン酸とシスチンを対向輸送するアンチポーターであるシステム X_c⁻が存在するが、高濃度のグルタミン酸はこれを阻害する。システム X_c⁻は 12 回膜貫通型のトランスポータータンパク質である xCT (SLC7A11) とその機能を発現するために必要な 1 回膜貫通型レギュレータータンパク質である 4F2 heavy chain (SLC3A2) の 2 つから構成されている。xCT と 4F2 heavy chain はジスルフィド架橋による結合により、ヘテロダイマーを形成している。細胞はシステム X_c⁻を介してシ

スチンを細胞内に取り込んでおり、取り込まれたシスチンはシステインへと還元され、グルタチオンの前駆物質となる (Bannai and Kitamura, 1980; Sato et al., 1999)。高濃度のグルタミン酸によりシステム Xc^- が阻害されると細胞内のグルタチオンレベルは急激に低下し、枯渇する。細胞内グルタチオンの枯渇は脂質過酸化酵素 12/15-リポキシゲナーゼ (12/15-LOX) を活性化し、12-ヒドロキシエイコサテトラエン酸 (12-HETE) と 15-ヒドロキシエイコサテトラエン酸 (15-HETE) の産生が増加する (Seiler et al., 2008)。ミトコンドリアは産生されたエイコサノイドにより直接的な損傷を受け、ミトコンドリア膜における脱分極が誘導され、ミトコンドリア内の活性酸素種産生は増加する (Pallast et al., 2009)。さらに、グルタチオンの枯渇によって 12-リポキシゲナーゼの活性化が生じる (Li et al., 1997a)。その結果、可溶性グアニル酸シクラーゼが活性化し、細胞内のサイクリックグアノシン 1 リン酸 (cGMP) の濃度が上昇し、 Ca^{2+} が細胞内へと流入する (Li et al., 1997b)。細胞内 Ca^{2+} 濃度の恒常性の欠如による過剰な Ca^{2+} の蓄積や、活性酸素種の蓄積により、B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) ファミリーの BH3 interacting domain death agonist (Bid) がミトコンドリアに移行する。Bid が移行したミトコンドリアが核の周りに蓄積することにより、膜の統合性が失われ、apoptosis-inducing factor (Aif) がミトコンドリアから核へと移行し、カスパーゼ非依存性の細胞死が生じる (Landshamer et al., 2008)。

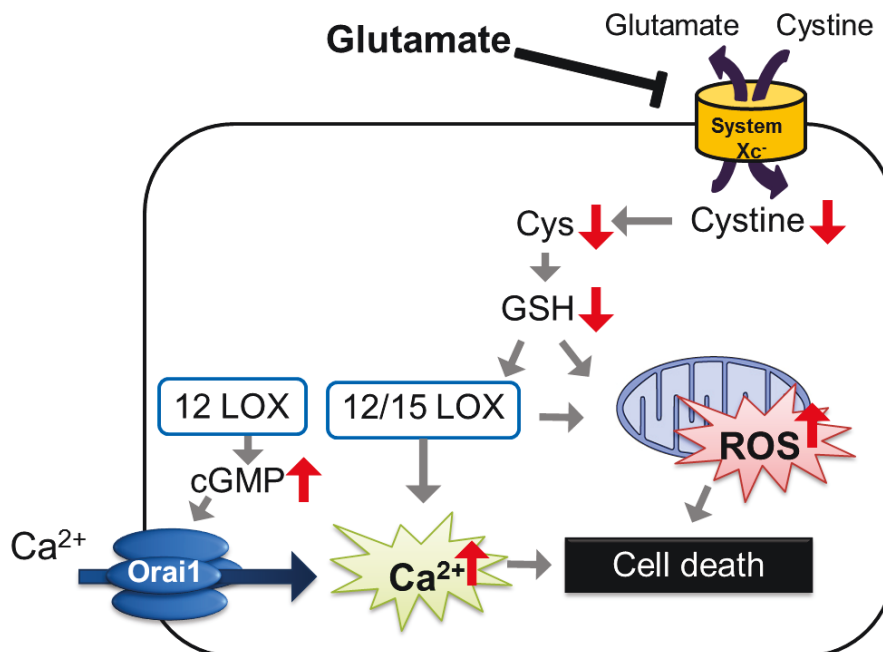


図 4. グルタミン酸誘発性細胞傷害の発生機構

もう一つの酸化ストレス誘発性細胞傷害の形態であるフェロトーシスはエラスチンにより誘導される (図 5)。エラスチンによる細胞傷害の誘導はフェロトーシスが定義される以前に、Ras 変異型ヒト包皮線維芽細胞 (BjeLR) を用いた研究で発見された (Yagoda et al., 2007)。

エラスチンを細胞外に添加すると、グルタミン酸と同様に細胞内グルタチオンが枯渇する。グルタミン酸が細胞内外の濃度差によってシステム Xc^- によるシスチン/グルタミン酸対向輸送を阻害するのに対し、エラスチンはトランスポータータンパク質 xCT との直接的な相互作用により、システム Xc^- の機能を阻害する。システム Xc^- の阻害による細胞内グルタチオンの枯渇によって、フェントン反応で発生した活性酸素種を原因とする脂質ラジカルが GPx4 により還元されず、細胞内に蓄積した結果、細胞死が誘導される (Yang et al., 2014)。

また、フェロトーシスでは細胞内の鉄依存的な過酸化脂質の蓄積が見られる。脳は活発なエネルギー産生やドーパミン、セロトニンといった神経伝達物質の生合成の為に鉄を多く必要とする。中枢神経系では血液や脳脊髄液を介して鉄を取り込む。血清中に存在するトランスフェリン (Tf) と結合した鉄は、トランスフェリン受容体-1 (TfR1) に結合するとエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれる。エンドソーム内で遊離した Fe^{3+} は還元酵素 (six-transmembrane epithelial antigen of prostate 3; STEAP3) の働きで Fe^{2+} に還元され、二価金属トランスポーター (divalent metal transporter-1; DMT1) により細胞質内に輸送される。取り込まれた Fe^{2+} は DNA 合成に必要な酵素の補因子やヘム合成に使われるが、一部の Fe^{2+} はフェントン反応の触媒となる。フェントン反応では Fe^{2+} を触媒として過酸化水素からヒドロキシラジカルが発生する。発生したヒドロキシラジカルは主に生体膜中の多価不飽和脂肪酸を酸化し、脂質ラジカルを生成する。酸化された多価不飽和脂肪酸による細胞膜脂質に対する酸化的ダメージは、細胞質の断片化及び細胞膜の透過性に影響を与え、最終的には細胞死を誘発する。デフェロキサミンやシクロピロクスオラミンなどの鉄キレート剤によりエラスチンによるフェロトーシスの誘発は阻害される (Dixon et al., 2012)。

エラスチンはシステム Xc^- のみならず、ミトコンドリア電位依存性アニオンチャネル (voltage-dependent anion-selective channel; VDAC) にも直接作用する。VDAC2 及び 3 のノックダウンによりエラスチン誘発性フェロトーシスは阻害されるとの報告から、VDAC もフェロトーシスによる細胞死に深く関与することが示唆される (Yagoda et al., 2007)。オキシトーシス及びフェロトーシスは共にシステム Xc^- の阻害により生じる酸化ストレス誘発性細胞死であるが、エラスチンの標的が複数存在することにより細胞

死に至るまでの過程には違いがあると考えられる。

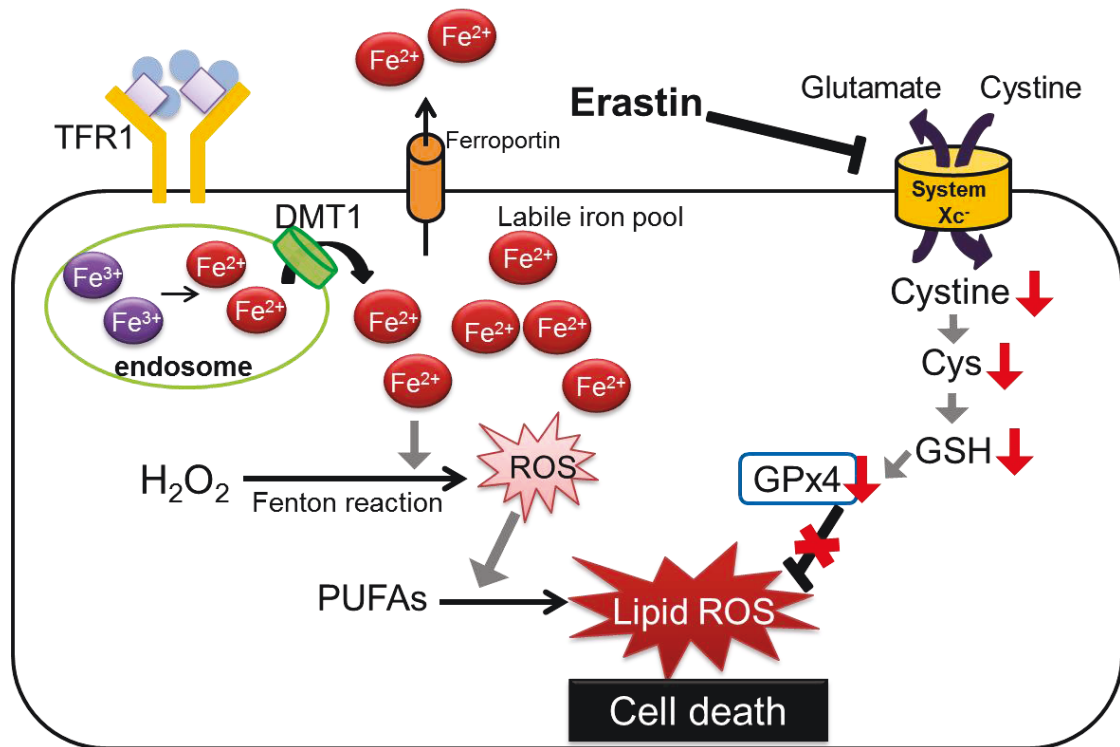


図 5. エラスチン誘発性細胞障害の発生機構

しかしながら、エラスチン誘発性フェロトーシスを抑制する鉄キレート剤やフェロスタチン-1 はグルタミン酸誘発性オキシトーシスも抑制することが報告されている (Maher and Kontoghiorghes, 2015; Kang et al., 2014)。さらに、ミトコンドリアにおける活性酸素種の消去や 12/15-リポキシゲナーゼの不活性化、Ca²⁺の流入抑制を介してグルタミン酸誘発性オキシトーシスを抑制する化合物はエラスチン誘発性フェロトーシスに対しても抑制作用を示したとの報告もある (Dixon et al., 2012; Maher et al., 2018)。これらのことから、フェロトーシス及びオキシトーシスはその発生機構に共通した特徴を有することが示唆されている (Lewerenz et al., 2018)。

HT22 細胞は、酸化ストレス誘発性細胞傷害の優れた培養細胞モデルで、酸化ストレス研究に広く用いられている。HT22 細胞はマウス海馬由来の細胞株であるが、N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体などのイオンチャネル型グルタミン酸受容体を発現していないという特徴を有している (Maher and Davis, 1996; Dargusch and Schubert, 2002)。グルタミン酸はイオンチャネル型グルタミン酸受容体を介して神経伝達物質として作用する一方で、過剰に存在する場合は興奮毒性による細胞死を引き起こす。ミリ

モーター以下の低濃度のグルタミン酸はイオンチャネル型グルタミン酸受容体を活性化させ、細胞内へ Ca^{2+} の異常な流入を引き起こす。従って、グルタミン酸受容体が発現する細胞の場合は、システム Xc^- の阻害による Ca^{2+} 流入に加え、グルタミン酸の興奮毒性による Ca^{2+} 流入の影響も受ける。しかし、HT22 細胞では、システム Xc^- の阻害による影響のみを調べることができる。これらの特徴から HT22 細胞は神経細胞における酸化ストレスに関する研究に適している。

1-3. プロポリス

高齢社会に突入した現代の日本において、医療費の高騰は大きな社会問題のひとつである。そこで、発病には至らないが、軽い症状がある状態を指す「未病」の段階で健康補助食品などを用いて病気を予防すること、進行を遅らせることへの期待が高まってきている。オキシトシスやフェロトシスの原因となる活性酸素を還元または捕捉して酸化ストレスを抑制する抗酸化物質には、ビタミン C、ビタミン E、アスタキサンチンやリコピン等のカロテノイド類、クルクミンやカテキンなどのポリフェノール類など多くの種類の化合物があり、健康補助食品として根強い人気がある。

健康補助食品の代表的なものの一つとして蜂産品がある。蜂産品とはミツバチの生産物であり、蜂蜜、ローヤルゼリー、花粉荷、プロポリスなどが含まれる。中でもプロポリスは古くから民間療法 (アピセラピー) として、1980 年代からは健康食品素材として世界中で広く使用されている (Burdock, 1998; Marcucci, 1995; Salatino et al., 2011)。プロポリスとは、ミツバチが種々の植物の新芽、樹脂や蕾を噛み砕いて得た物質に、ミツバチ自身の分泌物、蜜蝋などを混合して作り出す粘着性のある樹脂状の物質である。ミツバチはプロポリスを巣の壁や出入り口などに塗布して、巣内の補強や修理を行ったり、外気や水の侵入、外敵の侵入を防いだりするのに用いている (図 4)。また、雑菌の繁殖を防ぐなど巣内の衛生環境の保持にも役立っている。人類のプロポリス利用の歴史は古く、紀元前数百年の古代エジプト時代にミイラを作る際の防腐剤として使用されたという報告もある (Asis, 1989)。さらには、南アフリカで起こったボーア戦争 (1899-1902) においてプロポリスは創傷治療に使用され、以降、第二次世界大戦まで用いられていた。プロポリスに関する研究は 1980 年代から世界的に報告数が増えており、現在までに様々なプロポリスの多様な生理活性に関する研究が報告されている (Bankova et al., 1995; Bankova et al., 2000)。

プロポリスは採取された地域や起源植物により、含まれる成分や呈する色が異なる

(表 1, Bankova et al., 2000; Zhang et al., 2016)。プロポリスの起源植物としては、ヨーロッパ、北アメリカ、アジア北部などの温帯地域では *Populus* 属、ベネズエラ、チュニジアなどの熱帯地域では *Clusia* 属、ブラジルでは *Araucaria* 属、*Baccharis* 属などが報告されている (Bankova et al., 2000)。

表 1 *Baccharis* タイプと *Poplar* タイプのプロポリスの含有成分の違い

	Chemicals	Contents (mg/g)	
		<i>Baccharis</i> type	<i>Poplar</i> type
Phenylpropanoids (Cinnamic acid derivatives)	<i>p</i> -Coumaric acid	18.01	2.7
	Caffeic acid	1.47	13.35
	Chlorogenic acid	8.98	N. D.
	Caffeic acid phenethyl ester (CAPE)	N. D.	24.43
Prenylated phenylpropanoids	Artepillin C	107.7	N. D.
Flavonoids	Quercetin	N. D.	5.9
	Kaempferol	0.99	1.85
	Galangin	N. D.	22.23
	Kaempferide	11.18	N. D.
	Pinocembrin	1.13	44.55
	Chrysin	N. D.	66.89

(Zhang et al., 2016 より抜粋、一部改変)

N. D. は未検出または定量限界以下を示す。

本研究で使用しているプロポリスはブラジル産のもので、キク科の *Baccharis dracunculifolia* を起源植物とする。*Baccharis* タイプのプロポリスは暗緑色をしており (図 6)、含まれる主な成分は桂皮酸誘導体、フラボノイド類、カフェオイルキナ酸類である。その色の特徴から、グリーンプロポリスとも呼ばれる (Kumazawa et al., 2003)。ブラジル産のプロポリスを採取するミツバチは日本でもよくみられるセイヨウミツバチではなく、アフリカ蜂化ミツバチである (図 6)。これはアフリカミツバチとセイヨウミツバチの交雑種であり、高い防御本能を持つ。この高い防御本能ゆえにそれらの巣を防御するプロポリスには高い生理活性が期待される。また、アフリカのアマゾン近くでは有害菌が多く生息するため、それらから巣を保護するためにミツバチはプロポリスを大量生産している。そのため、ブラジル産プロポリスの収穫量は他の産地のプロポリスに比べ多い。これらがブラジル産プロポリスの流通量が多い理由である。

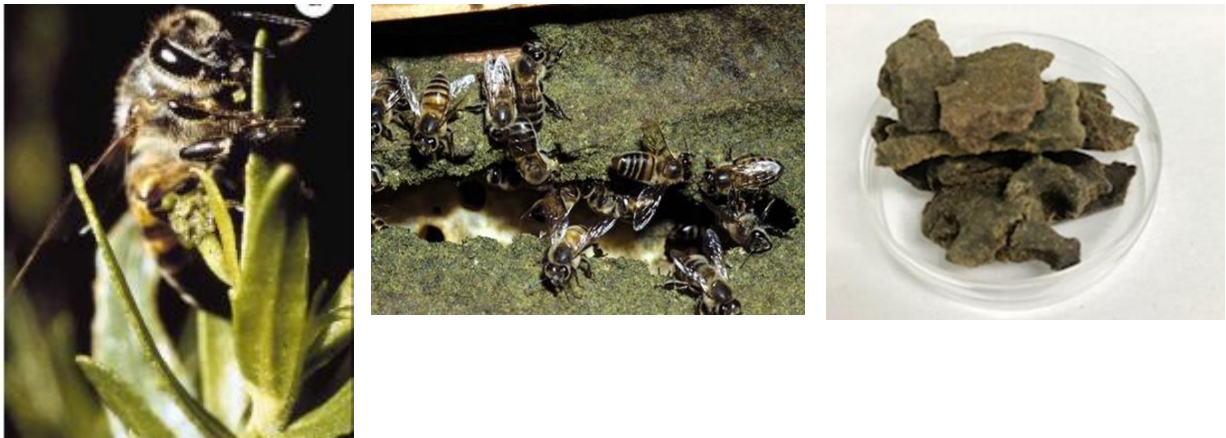


図 6. ブラジル産グリーンプロポリス

左:アフリカ蜂化ミツバチ, 中央: アフリカ蜂化ミツバチの巣の様子, 右: ブラジル産グリーンプロポリス原塊 (Kumazawa et al., 2003 より一部抜粋)

ブラジル産グリーンプロポリスは抽出方法によって構成成分が異なる (Nakajima et al., 2007; Izuta et al., 2009)。エタノールを抽出溶媒として用いた場合は桂皮酸誘導体が主要成分であり、水で抽出した場合はカフェオイルキナ酸類が主要成分として含まれている。これまでブラジル産グリーンプロポリスの抽出物は様々な生理活性を示すことが報告されている。例えば、抗菌作用 (Bankova et al., 1996)、抗炎症作用 (Machado et al., 2012)、抗酸化作用 (Nakajima et al., 2009a, b)、抗腫瘍作用 (Ishiai et al., 2014)などがあげられる。これらの作用に関与する成分として、桂皮酸誘導体は抗菌作用、抗酸化作用、抗炎症作用、抗腫瘍作用、カフェオイルキナ酸類は抗酸化作用、免疫賦活作用、血圧降下作用を有することが報告されている (Banskota et al., 2001; Maruyama et al., 2009)。

1-4. 本研究の目的

高齢化が進む我が国において、健康補助食品等を用いた神経変性疾患の発症予防により人々の健康寿命を伸ばし、財政圧迫を軽減することには大きな意義があると考えられる。健康補助食品の中でも古くから使用されているブラジル産プロポリスは様々な生理活性を有していることが報告されているが、脳、特に記憶・学習に重要な働きを担う海馬における酸化ストレスに対する効果及びメカニズムについての報告は少ない。また、健康補助食品は医薬品とは区別されているものの、高い効果を期待する消費者も多く、その効果に関して科学的根拠が求められている。

本研究では、マウス海馬由来神経細胞である HT22 細胞に対し、グルタミン酸または

エラスチンを処理して酸化ストレスを惹起させ、それに対するブラジル産グリーンプロポリス抽出物の効果を検討した。また、ブラジル産グリーンプロポリスに含まれる成分に関する評価を行い、ブラジル産グリーンプロポリスの酸化ストレス誘発性細胞傷害に対する保護効果に関与する成分の同定を行った。さらに、これらの神経保護作用機構について明らかにした。

本学位論文は下記の原著論文をもとに作成し、岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科に提出したものである。

Neuroprotective effects of Brazilian green propolis on oxytosis/ferroptosis in mouse hippocampal HT22 cells.

Food and Chemical Toxicology; Volume 132, October 2019, 110669.

Madoka Takashima, Kenji Ichihara, Yoko Hirata.

第2章 酸化ストレス誘発性オキシトーシス/フェルトーシス及びアポトーシスに対するブラジル産グリーンプロポリスの作用

2-1. 緒言

ブラジル産グリーンプロポリス抽出物の酸化ストレス誘発性細胞傷害に対する作用を評価した。グルタミン酸またはエラスチンとブラジル産グリーンプロポリスエタノール抽出物 (EEP) または水抽出物 (WEP) を同時に細胞に添加し、細胞生存率及び細胞死率を算出した。また、EEP の作用が酸化ストレスに対して特異性を有するかを調べるために、アポトーシスに対する EEP の作用を調べた。アポトーシスはプログラム細胞死と呼ばれ、タンパク質分解酵素であるカスパーゼファミリーの活性化を特徴とする細胞死である (Elmore, 2007)。アポトーシス誘導剤であるエトポシド、カンプトテシン、スタウロスポリンによって誘発される細胞傷害に対する EEP の作用を検証した。さらに、関与成分同定を目的として、EEP に含まれる主要成分の作用を調べた。試験に使用した主要成分は、Artepillin C (Art)、Baccharin (Bac)、Drupanin (Dru)、*p*-Coumaric acid (*p*CA)、Kaempferide、Kaempferol、Isosakuranetin である (図 7)。

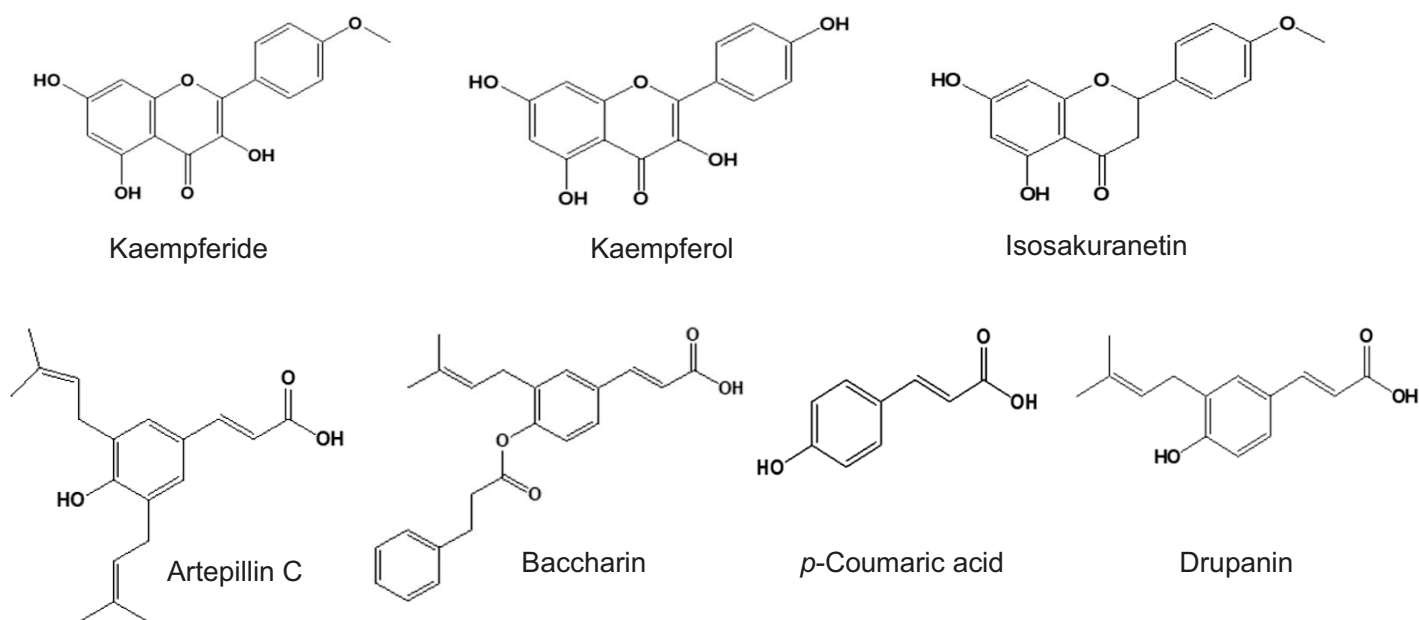


図 7. EEP 主要含有成分の構造式

2-2. 実験材料及び実験方法

2-2-1. 試薬

本研究に用いたグリーンプロポリスは、ブラジル産ミナスジェライス州にて採取されたものであり、*Baccharis dracunculifolia* を起源植物とする。プロポリスの原塊を 95%エタノールで抽出したものをエタノール抽出物 (EEP)、約 50°C の水で抽出したものを水抽出物 (WEP)とした。これら抽出物及び EEP 主要成分である artepillin C (Art)、baccharin (Bac)、drupanin (Dru) はアピ株式会社 (Gifu, Japan) より供与されたものを使用した。*p*-Coumaric acid (*p*-CA) 及び kaempferide、kaempferol は東京化成工業株式会社 (Tokyo, Japan)、isosakuranetin は Extrasynthese 社 (Cedex, France) より購入したものをを用いた。なお、EEP 中に含まれる主要成分の濃度は UPLC を用いて測定した (表 2, 図 8)。EEP 及び WEP はエバポレーターにて溶媒を除去した後、EEP は dimethyl sulfoxide (DMSO) 、WEP は MilliQ 水に溶解した。主要成分の化合物はそれぞれ DMSO に溶解した。EEP 及び WEP、各主要成分の溶液は、遮光下にて -20°C で保存した。

表 2. EEP 中の主要成分含有濃度

Main constituents	Amounts in EEP (mg/g solid)	Concentration in 25 µg/mL EEP (µM)
Artepillin C	162.0	13.5
Kaempferide	30.7	2.6
Baccharin	55.7	2.5
<i>p</i> -Coumaric acid	15.7	2.4
Drupanin	12.3	1.3
Dihydrokaempferide	16.1	1.3
Betuletol	16.6	1.3
Isosakuranetin	4.3	0.4
Kaempferol	1.0	0.1

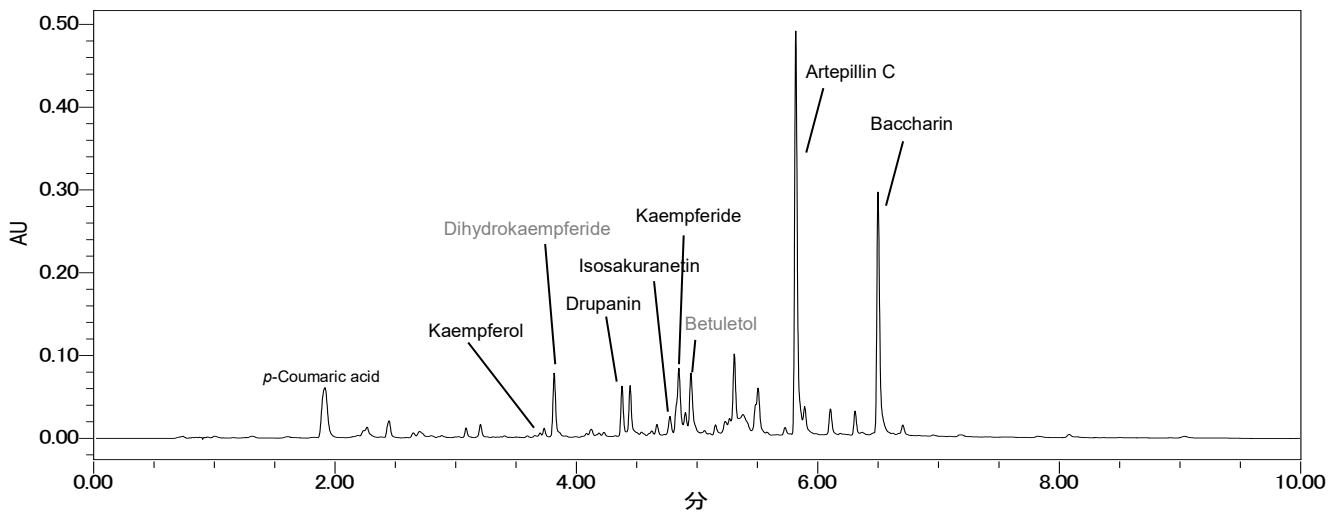


図 8. 本試験で使用した EEP 溶液の UPLC クロマトグラム (280 nm)

2-2-2. マウス海馬由来神経細胞株 (HT22) 細胞培養

HT22 細胞は David Schubert 博士 (The Salk Institute for Biological Studies, La Jolla, CA, USA) より恵与して頂いたものを用いた。HT22 細胞の培養は、5% fetal bovine serum (FBS, HyClone, Logan, UT, United States) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (Low glucose, DMEM, 富士フイルム和光純薬株式会社, Osaka, Japan) 中で、37°C、5% CO₂ の条件下で行った。

2-2-3. HT22 細胞に対するオキシトーシス/フェロトーシス/アポトーシスの誘導及びブラジル産グリーンプロポリス抽出物の抑制作用の評価

HT22 細胞を 2×10^4 cells/well になるように 48-well plate (Nunc, Roskilde, Denmark) に播種し、一晚培養した。グルタミン酸 (10 mM) またはエラスチン (0.5 μM)、カンプトテシン (10 μM)、エトポシド (10 μM)、スタウロスポリン (1 μM) と各被験物質を任意の濃度で添加し、24 時間培養した。この時の培地の総量は 400 μL/well になるようにした。24 時間経過後、細胞培地 50 μL を氷上で別のプレートに回収し、測定まで 4°C で保存した (experimental release)。元のプレートには 8% Triton-X-100 を 50 μL ずつ添加した。Triton-X-100 を添加後、400 rpm で 15 分間プレートを攪拌し、4°C で一晚静置した (total release)。

2-2-4. LDH assay による細胞死の評価

細胞死の評価は培地中に放出された乳酸脱水素酵素 (lactate dehydrogenase; LDH) を指標にした。通常、LDH は細胞質に存在しており、膜透過性を持たない。しかし、細胞に何らかのストレスがかかり細胞膜が傷害を受けた場合に細胞外すなわち培地中へと放出される。LDH assay は LDH Cytotoxicity Detection Kit (Roche Diagnostics Japan, Tokyo, Japan) を用いて、キットのプロトコールに従って実施した。回収後に 4°C で保存しておいた experimental release 測定用サンプルまたは total release 測定用サンプルを 10 μ L ずつ 96-well plate にとり、50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、Solution 1、Solution 2 を混合した測定用試薬溶液を 90 μ L 添加し、室温、遮光下にてシェーカーで攪拌しながら 30 分間反応させた。反応後、プレートリーダーで 492 nm と 620 nm の吸光度を測定した。以下の式を用いて、細胞死 (cell death (%)) を求めた。

$$\text{Cell death (\%)} = (\text{Abs}_{\text{experimental release}} - \text{Abs}_{\text{blank}}) / (\text{Abs}_{\text{total release}} - \text{Abs}_{\text{blank}}) \times 100$$

2-2-5. Crystal violet assay (CV assay) による細胞生存率の測定

生細胞の細胞膜を透過、染色するクリスタルバイオレットを用いて、細胞生存率を求めた。クリスタルバイオレットの溶液は、クリスタルバイオレット粉末 (キシダ化学, Osaka, Japan) 2.5 g をエタノールと MilliQ 水の混合液に溶解し 0.5% (w/v) 溶液を調製した。LDH assay と同様に、細胞をプレートに播種した後、培地を吸引除去し、各 well を 1×Phosphate buffered salts (PBS) で 1 回洗浄した。細胞を吸わないように注意しながら 1×PBS を吸引除去し、100%メタノールを 400 μ L 加え、15 分間、室温で静置した。メタノールを除去した後、0.5%クリスタルバイオレット溶液を 400 μ L 添加して室温で 15 分間静置した。クリスタルバイオレット溶液を除去した後、1×PBS で 3 回洗浄し、300 μ L の 1% sodium lauryl sulfate (SDS) 溶液を添加後、室温で 20 分間プレートを攪拌した。プレートリーダーで 580 nm の吸光度を測定した。

2-2-6. 統計処理

測定結果は平均値 \pm 標準偏差 (SD) で示した。統計処理は GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) を用いて、one-way ANOVA を実施した後、Dunnnett's multiple comparison test にて解析した。P<0.05 を統計的に有意であると判断した。

2-3. 結果

2-3-1. HT22 細胞におけるブラジル産グリーンプロポリスの酸化ストレス誘発性細胞傷害に対する保護作用

EEPのみを終濃度 1.25-50.0 $\mu\text{g/mL}$ (DMSO 0.01%)、WEPのみを 50.0-800 $\mu\text{g/mL}$ で細胞に処理し、24 時間経過後の細胞死 [cell death (%)] を測定した結果、EEP は 50.0 $\mu\text{g/mL}$ 、WEP は 800 $\mu\text{g/mL}$ で細胞死の有意な上昇が認められた。一方で、EEP 25.0 $\mu\text{g/mL}$ 、WEP 400 $\mu\text{g/mL}$ 以下の濃度においては、コントロール (化合物未処理) と同程度の細胞死 (約 5%以下) で細胞毒性は認められなかった。従って、以降の試験では EEP は 25.0 $\mu\text{g/mL}$ 以下、WEP は 400 $\mu\text{g/mL}$ 以下の濃度を用いた (data not shown)。

グルタミン酸 (終濃度 10 mM) と共に、EEP (終濃度 1.25-25.0 $\mu\text{g/mL}$)、WEP (終濃度 50.0-400 $\mu\text{g/mL}$) を添加し、24 時間培養後の細胞死を測定し、グルタミン酸を単独で処理した場合の細胞死と比較した (図 9-A)。その結果、グルタミン酸のみを処理した場合の細胞死は約 80%であったのに対し、EEP をグルタミン酸と同時に添加すると細胞死は 1.56 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で有意に低下した。6.25 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度における細胞死はコントロールの細胞の値とほぼ同程度の値を示した。WEP については、50.0 $\mu\text{g/mL}$ 以上で有意にグルタミン酸による細胞死を抑制した。WEP では最高濃度である 400 $\mu\text{g/mL}$ を処理した場合もコントロールの値と同程度までは抑制しなかった。EEP、WEP の作用は濃度依存的であった。測定結果を用いてそれぞれの IC_{50} 値を算出した結果、EEP は 2.43 $\mu\text{g/mL}$ に対し、WEP は 80.0 $\mu\text{g/mL}$ であり、EEP と WEP では EEP の方が低濃度で強い保護作用を示すことが分かった。これらの結果より、以降の実験は EEP の作用について調べることにした。エラスチン (0.5 μM) と EEP を共に処理した場合も、EEP はエラスチンによる細胞死を濃度依存的に抑制した (図 9-B)。これはグルタミン酸誘発性細胞傷害に対する作用と一致した。 IC_{50} 値を算出した結果、EEP の IC_{50} は 5.78 $\mu\text{g/mL}$ であり、グルタミン酸の場合に比べ 2 倍以上高い値であった。

さらにクリスタルバイオレットアッセイを用いて、細胞生存率に対する影響を調べた (図 9-C、図 9-D)。その結果、グルタミン酸またはエラスチンを処理した細胞の生存率はコントロールに比べ有意に低下した。EEP を共処理した細胞の生存率は、グルタミン酸またはエラスチンのみを処理した場合に比べ有意に高い値であり、約 70~80%を示すことが分かった。EEP の作用は濃度依存的であった。グルタミン酸またはエラスチンにより惹起される酸化ストレス誘発性細胞傷害に対する EEP の作用は、LDH assay による細胞死とクリスタルバイオレットによる細胞生存率の測定において、同様の傾

向を示した。

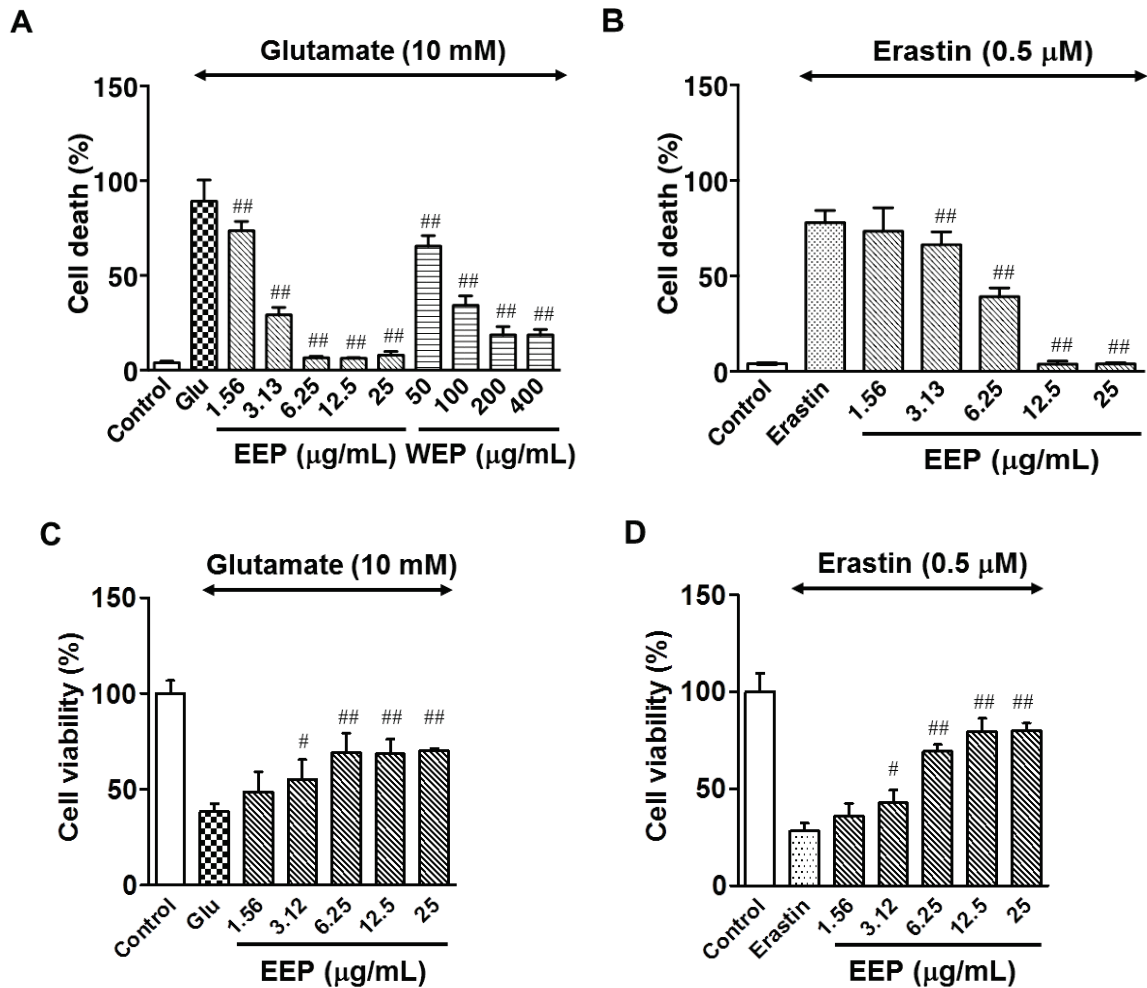


図 9. ブラジル産グリーンプロポリス抽出物の酸化ストレス誘発性細胞傷害に対する作用

HT22 細胞に 10 mM グルタミン酸 (A, C) または 0.5 μM エラスチン (B, D) と EEP または WEP を処理し 24 時間培養した。化合物を処理していない細胞群を control とした。細胞死は LDH 活性を測定することで評価した。生細胞は CV assay により評価した (平均値 ± SD, n=4, #P < 0.05 or ##P < 0.01, difference from glutamate or erastin alone)。

2-3-2. HT22 細胞における EEP のアポトーシスに対する保護作用

EEP が酸化ストレス誘発性細胞傷害に対して、保護作用を示すことが分かった。そこ

で、EEP の細胞保護作用が、異なる形態の細胞死に対しても効果を示すのか、酸化ストレス誘発性細胞傷害に対して特異的であるのかを検討するためにアポトーシスに対する作用を調べた。アポトーシスの誘導剤として、トポイソメラーゼ阻害剤のカンプトテシン及びエトポシド、キナーゼ阻害剤のスタウロスポリンを使用した。カンプトテシン、エトポシド、スタウロスポリンをそれぞれ単独で処理した場合の細胞死の程度はグルタミン酸によって誘発されるそれよりも軽度であった。一方で、それぞれのアポトーシス誘導剤のみを処理した場合と EEP を共処理した場合で細胞死の値に大差はなく、EEP による保護作用は認められなかった (図 10)。

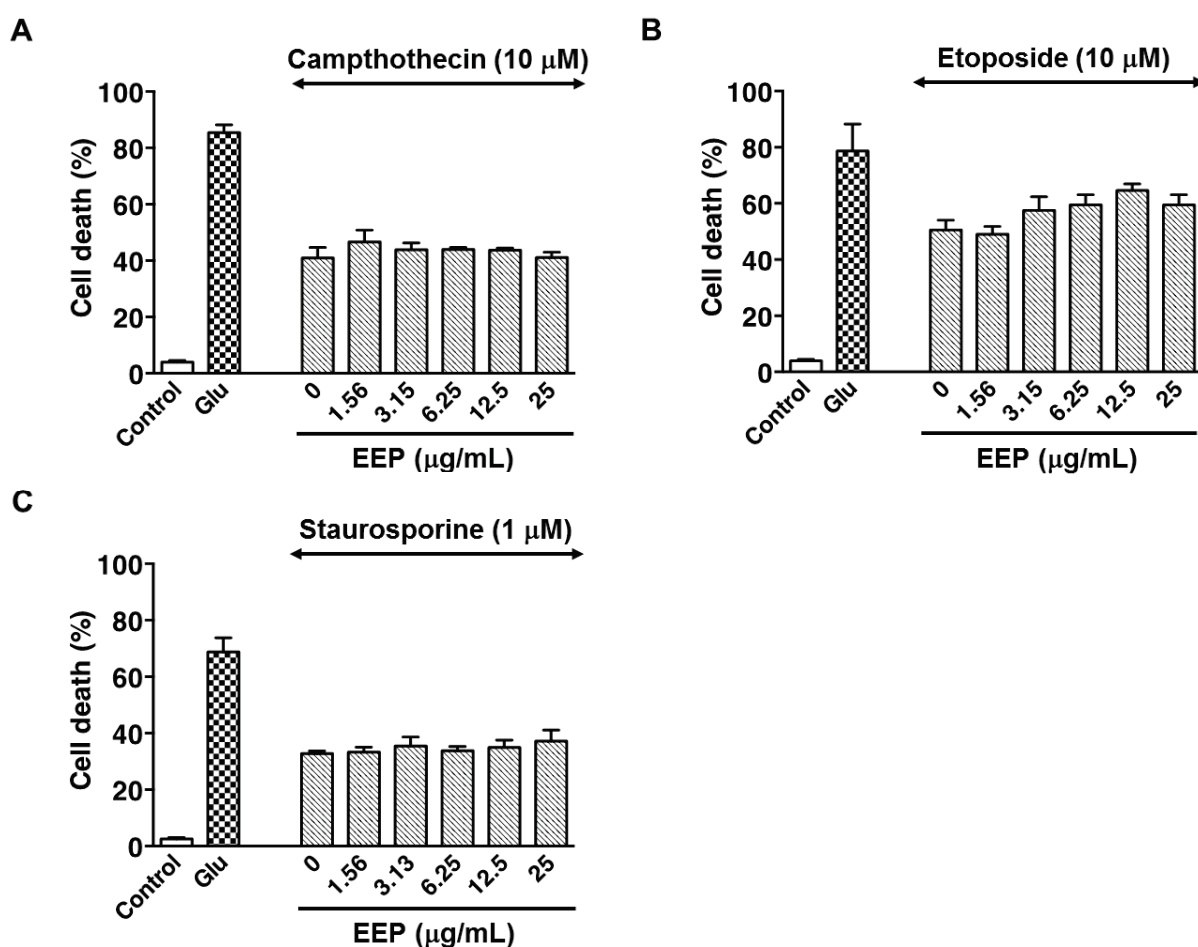


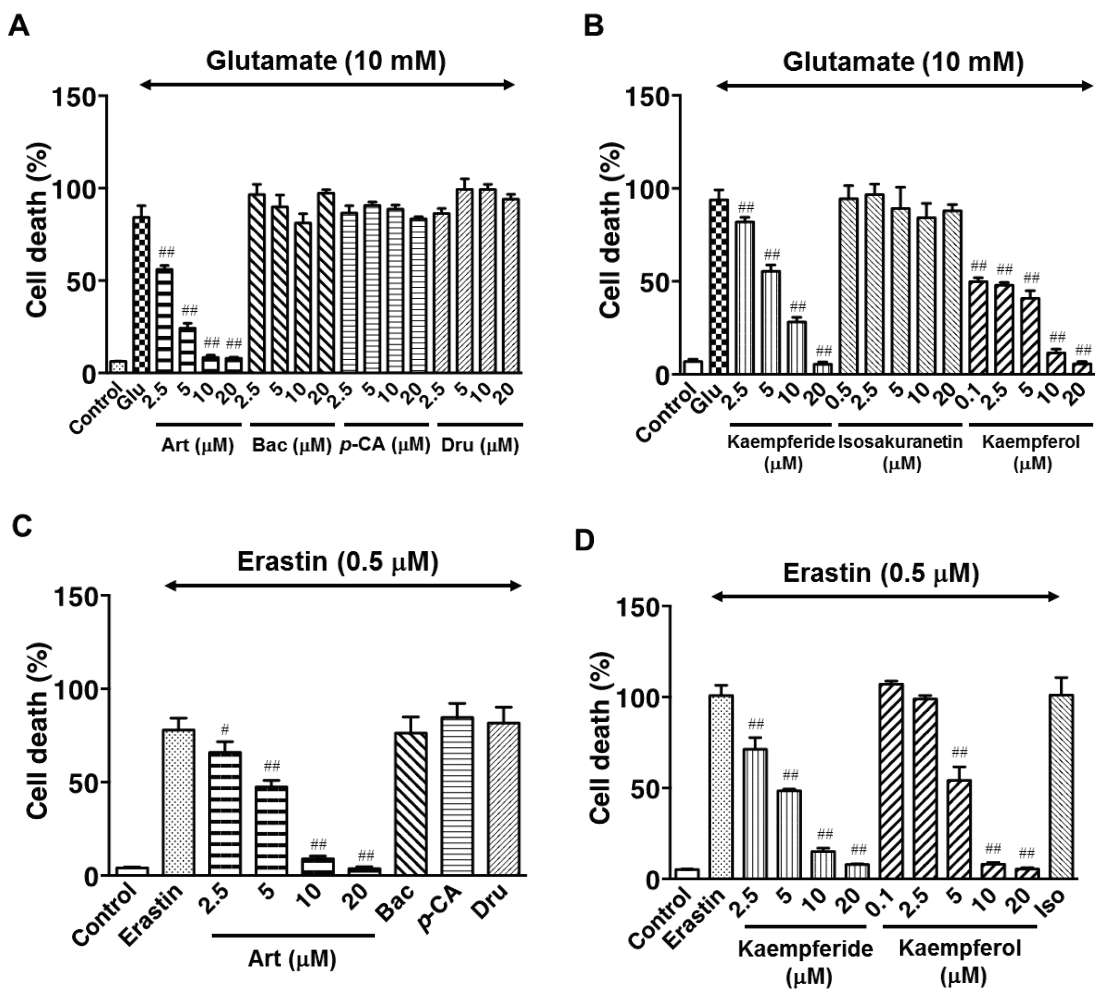
図 10. アポトーシスによる細胞傷害に対する EEP の作用

HT22 細胞に 10 µM camptothecin (A) 、10 µM etoposide (B) 、1 µM staurosporine (C) と EEP を処理し 24 時間培養した。(平均値 ± SD, n=4)

2-3-3. EEP 主要成分の酸化ストレス誘発性細胞傷害に対する保護作用

EEP の酸化ストレス保護作用に関与する成分の同定を目的として、主要成分をそれぞれ

れグルタミン酸またはエラスチンと共処理し、24 時間後の細胞死及び細胞生存に対する影響を調べた。各成分の酸化ストレス誘発性細胞傷害に対する作用を測定した結果、artepillin C、kaempferide、kaempferol が濃度依存的にグルタミン酸またはエラスチンによる細胞傷害に対する保護作用を示した。最も作用が強かったのは artepillin C であり、オキシトーシス及びフェロトーシスに対する IC₅₀ はそれぞれ 3.12 μM と 5.28 μM であった。しかし、baccharin (Bac)、drupanin (Dru)、*p*-coumaric acid (*p*-CA) 及び isosakuranetin に保護作用は認められなかった (図 11)。



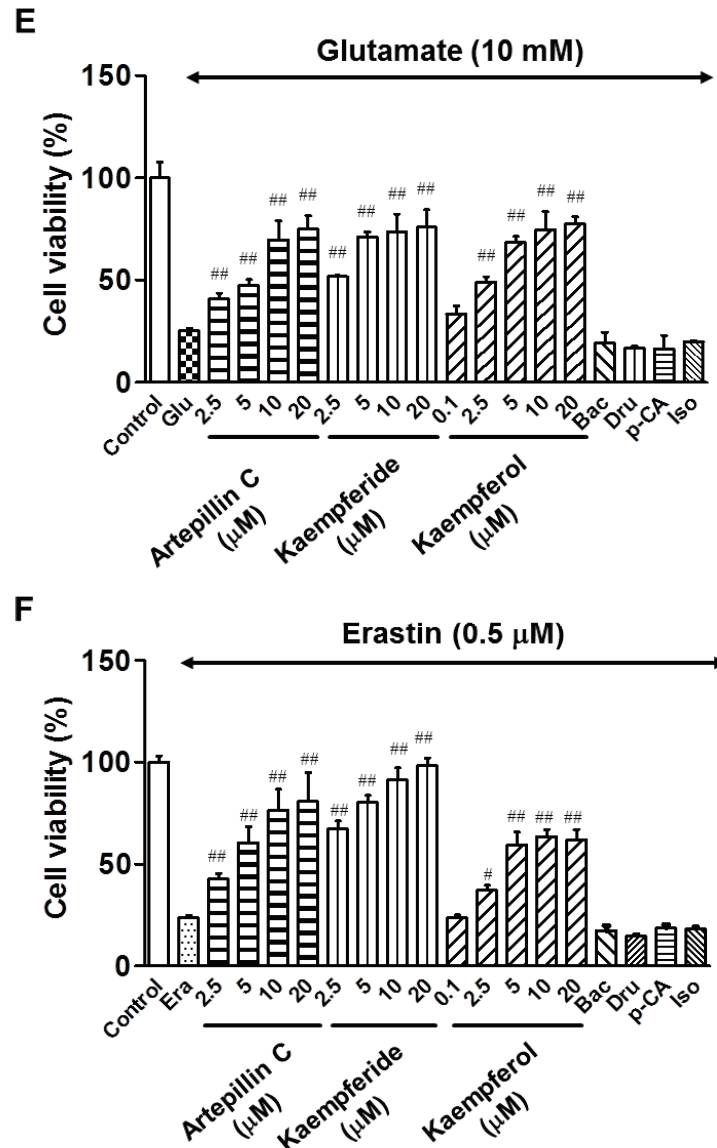


図 11. EEP 主要成分の酸化ストレス誘発性細胞傷害に対する作用

(A)(B)(E): Artepillin C、kaempferide、baccharin (Bac)、*p*-coumaric acid (*p*-CA)、drupanin (Dru)、isosakuranetin (Iso)、 kaempferol のグルタミン酸誘発性細胞傷害に対する作用

(C)(D)(F): Artepillin C、kaempferide、baccharin (Bac)、*p*-coumaric acid (*p*-CA)、drupanin (Dru)、isosakuranetin (Iso)、 kaempferol のエラスチン誘発性細胞傷害に対する作用

HT22 細胞に 10 mM グルタミン酸または 0.5 μM エラスチンと各濃度の artepillin C、kaempferide、baccharin (Bac)、*p*-coumaric acid (*p*-CA)、dorupanin (Dru)、isosakuranetin (Iso)、kaempferol を処理して 24 時間培養後の細胞死または細胞生存の割合を調べた。(平均値 ± SD, n=4, #P < 0.05 or ##P < 0.01, difference from glutamate or erastin alone)

2-4. 考察

生体における過剰な酸化ストレスは様々な疾患の発症や進行に大きく関わっている。特に、他臓器に比べ酸素の使用量が多い脳においては活性酸素種が発生しやすく、生体内の抗酸化機構によって処理できない活性酸素種の発生はアルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患の発症要因であることが報告されている (Gilgun-Sherki et al., 2001)。本研究では、イオンチャンネル型グルタミン酸を発現しないマウス海馬由来 HT22 細胞を用いて、グルタミン酸及びエラスチンにより惹起される酸化ストレス誘発性細胞傷害に対する、EEP 及び WEP の保護作用を調べた。その結果、WEP と EEP はどちらも濃度依存的に酸化ストレス誘発性細胞傷害に対する保護作用を示した。EEP のオキシトーシスに対する IC₅₀ は 2.43 µg/mL であり、フェロトーシスに対しては 5.78 µg/mL であった。一方、WEP のオキシトーシスに対する IC₅₀ は 80.0 µg/mL であった。このことから、EEP は WEP よりも酸化ストレスに対する保護作用が強いことが示唆された。これまでにラット由来網膜神経節細胞株 (RGC-5)、ヒト神経芽細胞腫 (SH-SY5Y)、マウス由来マクロファージ様細胞株 (RAW264.7) などを用いた様々な酸化ストレスモデルでブラジル産グリーンプロポリス抽出物が有効であることが報告されている (Nakajima et al., 2007; Nakajima et al., 2009a; Junjun et al., 2015; Zhang et al., 2016)。Nakajima らは、RGC-5 細胞に対しグルタチオン合成阻害剤である L-buthione-(S, R)-sulfoximine (BSO) とグルタミン酸の共処理による酸化ストレス誘発性細胞傷害に対し WEP が保護作用を示すことを報告した。本研究では、EEP に比べ保護作用の弱かった WEP が非常に低濃度で作用を示している。また含有成分のうちカフェオイルキナ酸類と *p*-coumaric acid が関与成分であることを報告している (Nakajima et al., 2009)。これらの知見から、酸化ストレスモデルの相違、すなわち、使用する細胞や酸化ストレス条件などの相違により、有効性を示す成分やその程度には一貫性が見られないことがわかる。本実験に用いた内因性酸化ストレスモデルは、酸化ストレスに対する保護効果を明確に再現性良く数値化することができるため、プロポリスの効能を評価する上で非常に有用である。

また、EEP の主要成分のうち、artepillin C、kaempferide、kaempferol がオキシトーシスとフェロトーシスに対して保護作用を示したことから、これら 3 つは EEP の主要な有効成分であると考えられる。特に、最も細胞保護作用が強かったのはブラジル産グリーンプロポリスに特有の成分である artepillin C であり、オキシトーシス及びフェロトーシスに対する IC₅₀ はそれぞれ 3.12 µM と 5.28 µM であった。25.0 µg/mL の EEP 中に含

まれる artemillin C の濃度は約 14 μM であることから、本試験で被験物質として用いた主要成分のうち最も寄与が高いと考えられる。Kaempferide や kaempferol はフラボノイドに分類され、プロポリス以外にも野菜や果物などに含まれる。これらの EEP 中に含まれる量は artemillin C と比べると少なく、kaempferide は 2.6 μM 、kaempferol は 0.1 μM であった (表 2)。LDH assay の結果より、kaempferide は EEP の細胞保護作用に関与すると考えられる。しかし、kaempferol については含有濃度が 0.1 μM と低いことから、単独では神経保護作用への関与の程度は低いと考えられる。

また、3 種のアポトーシス誘導剤により惹起される細胞傷害に対して EEP は作用を示さなかった。アポトーシスの誘導に使用したエトポシド及びカンプトテシンはトポイソメラーゼを阻害することにより、DNA 損傷によるアポトーシス様の細胞死を引き起こす (Hsiang et al., 1985; Nitiss, 2009)。また、スタウロスポリンはプロテインキナーゼの酵素活性を阻害することにより、ミトコンドリア経路を介したアポトーシス様細胞死を誘発する (Tamaoki et al., 1986)。EEP はアポトーシス誘発剤による細胞障害に対して作用を示さなかったことから、EEP の神経保護作用は酸化ストレスにより生じる細胞傷害に対して選択的である可能性が示唆された。

第3章 細胞内グルタチオン、活性酸素種、遊離二価鉄及び Ca^{2+} の流入に対するブラジル産グリーンプロポリスの影響

3-1. 緒言

第2章では、HT22細胞においてブラジル産グリーンプロポリスの抽出物が酸化ストレス誘発性細胞傷害保護作用を示すことを明らかにした。また、その有効成分は artemillin C、kaempferide、及び kaempferol であった。本章ではプロポリス抽出物のうち、作用が強かった EEP 及びその有効成分の作用機序解明を目的とする。

食物等から摂取する抗酸化物質の中には、酸化ストレス時に発生する活性酸素種や過酸化脂質を直接消去して抗酸化作用を示すものや、グルタチオンの枯渇から活性酸素の蓄積に至るまでの反応経路を阻害することで酸化ストレス誘発性細胞傷害を抑制するものもある。

ブラジル産グリーンプロポリスによる酸化ストレス誘発性細胞傷害に対する保護作用の機序解明のため、グルタミン酸やエラスチン処理時に生じるグルタチオンの枯渇、活性酸素種の増加、細胞内 Ca^{2+} の流入、細胞内遊離二価鉄に対する影響を調べた。また、EEP 及びその有効成分の *in vitro* でのスーパーオキシドアニオン消去活性を測定し、化合物自体の抗酸化活性について検討した。

3-2. 実験材料及び実験方法

3-2-1. 試薬

細胞内活性酸素種及びミトコンドリア由来のスーパーオキシドの標識にはそれぞれ CellROX™ Deep Red reagent (Thermo Fisher Scientific, Tokyo, Japan) と MitoSOX (Thermo Fisher Scientific, Tokyo, Japan) を用いた。細胞内 Ca^{2+} のイメージングには Fluo-4-AM 及び Pluronic™ F-127 (Thermo Fisher Scientific, Tokyo, Japan) を使用し、遊離 Fe^{2+} の標識は Ferro Orange (五稜化薬株式会社, Sapporo, Japan) を用いた。

3-2-2. 細胞内グルタチオンの定量

グルタチオンの定量は Hissin and Hilf (Hissin and Hilf, 1976) の方法を参考にして、次

の通り行った。HT22 細胞を 2.4×10^5 cells/well になるように 6-well plate に播種し、一晚培養した。グルタミン酸及び被験物質を任意の濃度で加えた。この時、培地の総量は 3 mL になるようにした。12 時間経過後、氷上で PBS を用いて細胞を回収した。回収した細胞のペレットに 0.1 M sodium phosphate (pH 8.0) - 5 mM EDTA buffer を加え、再懸濁した。その後、25% HPO₃ 溶液を 30 μ L 加えボルテックスし、溶液が白く濁るのを確認した。懸濁液を氷上に 15 分間静置した後に、4°C、13500 rpm で 10 分遠心分離を行い、上清を測定用サンプルとした。遠心分離後の細胞ペレットはタンパク質の定量に用いた。蛍光測定用 96-well black plate にサンプルまたは standard (グルタチオン: 0, 2.5, 5, 10, 20, 40 μ M) 5 μ L を移し、0.1 M NaPB /5 mM EDTA (pH8.0) 185 μ L、メタノールに溶解した *o*-phthalaldehyde 溶液 (1 mg/mL) 10 μ L を加え、遮光下、室温で 15 分間インキュベートし、Ex/Em = 350/420 nm における蛍光強度を測定した。細胞ペレットに 0.2 M NaOH を 75 μ L 添加することにより変性したタンパク質を溶解し、タンパク質定量用サンプルとした。タンパク質濃度は DC Protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Osaka, Japan) を用いて測定した。96-well plate に任意の濃度に希釈したサンプル 5 μ L または standard 5 μ L (γ -globulin: 0, 0.25, 0.5, 1 mg/ml) を入れ、A'液 25 μ L (キット付属の A 液と S 液の混合液)、B 液 200 μ L を加え、室温、遮光下にてシェーカーで攪拌しながら反応させた。15 分後に 690 nm における吸光度を測定した。

3-2-3. 細胞内活性酸素種、Ca²⁺、ミトコンドリア由来スーパーオキシドアニオンの測定

HT22 細胞を 7×10^4 cells/well になるように 12-well plate に播種して一晚培養した。グルタミン酸またはエラスチンと被験物質を任意の濃度で添加し、37°C、5% CO₂ の条件下で 12 時間または 8 時間培養した。培養後、蛍光試薬を添加し、Deep Red (終濃度: 5 μ M) は 30 分間、MitoSOX (終濃度: 5 μ M) 及び Fluo-4 (終濃度: 5 μ M) は 15 分間 37°C、5% CO₂ の条件下でインキュベートした。蛍光試薬で標識後、培地を吸引し、フェノールレッド不含の DMEM を 1 mL 添加して蛍光顕微鏡 (BZ-X700, Keyence, Osaka, Japan) で観察した。

3-2-4. 細胞内遊離二価鉄の測定

HT22 細胞を 1×10^5 cells/well になるように 12-well plate に播種して一晚培養した。培養後、被験物質を任意の濃度で添加し、37°C、5% CO₂ の条件下で 16 時間培養した。培

養後、培地を吸引除去し、フェノールレッド不含の DMEM に FerroOrange (終濃度: 1 μ M) を添加して調製した working solution を各 well に 500 μ L ずつ加え、30 分間、37°C、5% CO₂ の条件下でインキュベートした。インキュベート後、各 well から working solution を吸引しフェノールレッド不含の DMEM を 800 μ L 添加して蛍光顕微鏡 (BZ-X700, Keyence, Osaka, Japan) で観察した。

3-2-5. *In vitro* でのスーパーオキシドアニオン消去活性の測定

スーパーオキシドアニオン消去活性は SOD assay Kit-WST (同仁化学研究所, Kumamoto, Japan) を使用して測定した。化合物を任意の濃度に調製し、96 well プレートに表 3 のように試薬を加え、37°C で 20 分間インキュベートした。プレートリーダーで 450 nm の吸光度を測定し、以下の計算式に測定値を代入し反応阻害率、すなわちスーパーオキシドアニオン消去活性を算出した。

$$\text{スーパーオキシドアニオン消去活性} = [(A_{\text{blank1}} - A_{\text{blank3}}) - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank2}})] / (A_{\text{blank1}} - A_{\text{blank3}}) \times 100$$

表 3. スーパーオキシドアニオン消去活性測定用試薬

	sample	blank1	blank2	blank3
サンプル溶液	10 μ l		10 μ l	
純水		10 μ l		10 μ l
WST working solution	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l
Dilution buffer			10 μ l	10 μ l
Enzyme working solution	10 μ l	10 μ l		

3-2-6. 統計解析

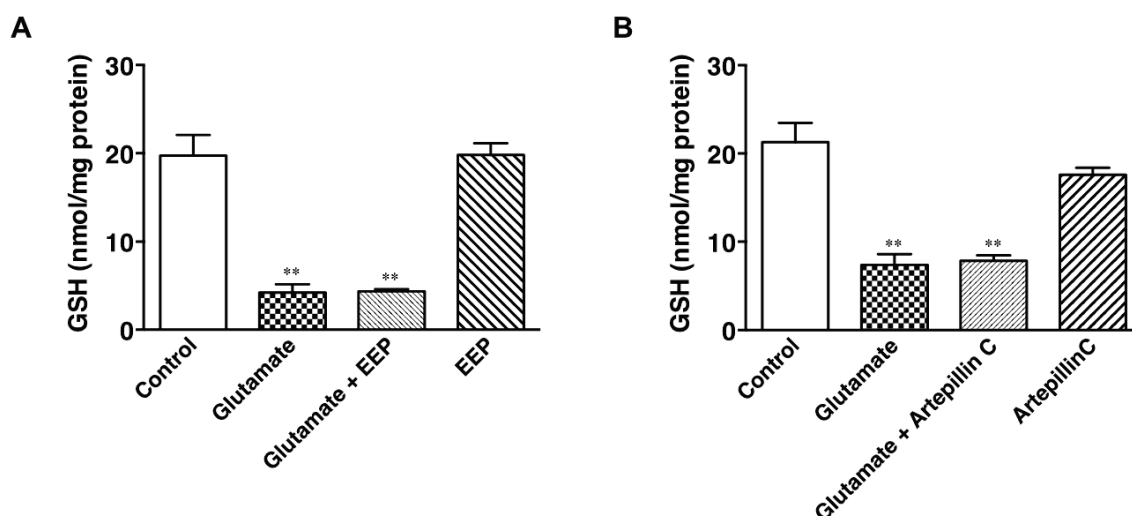
測定結果は平均値 \pm 標準偏差 (SD) で示した。統計処理は GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) を用いて、one-way ANOVA を実施した後、Dunnett's multiple comparison test にて解析した。P<0.05 を統計的に有意であると判断した。

3-3. 結果

3-3-1. 酸化ストレス誘発時の細胞内グルタチオン低下に対するブラジル産グリーンプロポリスの作用

HT22 細胞に対して高濃度のグルタミン酸を添加した場合、グルタミン酸/シスチンアンチporterであるシステム Xc⁻の機能が阻害され、シスチンの取り込みが阻害されるために、細胞内ではグルタチオンの量が低下する。ブラジル産グリーンプロポリスによる酸化ストレス抑制の作用機序を調べるため、まず初めに細胞内グルタチオン量の低下に対する影響を調べた。

HT22 細胞に終濃度 10 mM のグルタミン酸を添加し、8 時間経過後の細胞内グルタチオン量はコントロールでは約 20~30 nmol/mg protein であったのに対し、その 2 分の 1 程度まで有意に減少することが分かった。それに対し、グルタミン酸と EEP を共処理した場合のグルタチオン量はグルタミン酸のみを処理した場合とほぼ変化がなく、コントロールに対して有意に低い値のままであった (図 12-A)。また、EEP のみを HT22 細胞に添加した場合は、グルタチオン量の低下は見られず、コントロールと同程度の値であった。Artepillin C、kaempferide、kaempferol についても同様に測定した結果、いずれの化合物でもグルタミン酸処理によって生じる細胞内グルタチオン量の低下に対して抑制作用を示すものはなかった (図 12-B, C, D)。また、EEP 及び有効成分単独での細胞内グルタチオン量の低下も見られなかった。



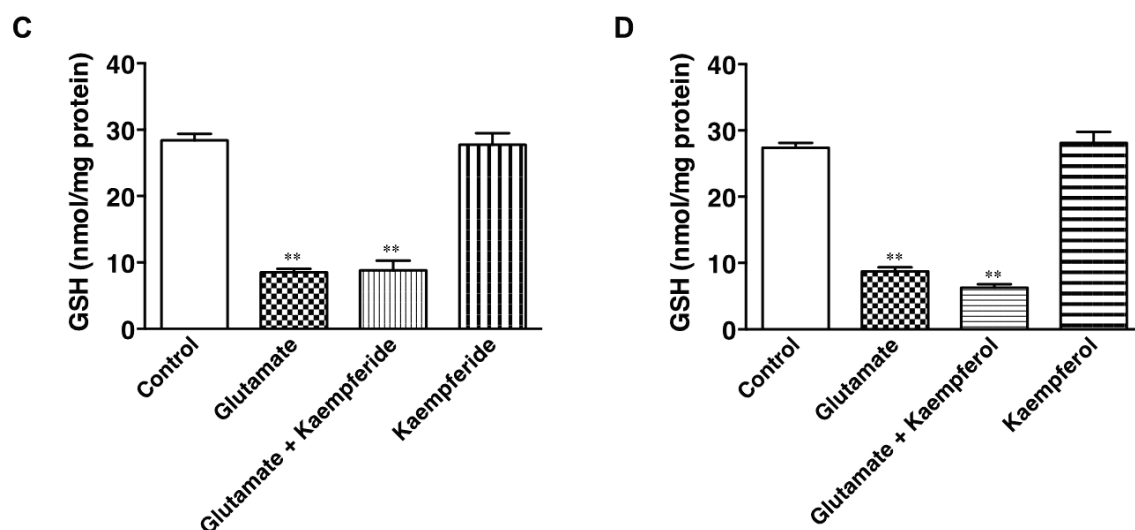


図 12. EEP 及び artepillin C、kaempferide、kaempferol の細胞内グルタチオンに対する作用

HT22 細胞に 10 mM グルタミン酸と 25.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EEP、20.0 μM artepillin C、20.0 μM kaempferide、20.0 μM kaempferol を処理して 12 時間培養した。(平均値 \pm SD, $n=3$ ** $P < 0.01$, difference from the control)

3-3-2. 細胞内活性酸素種、 Ca^{2+} 、ミトコンドリア由来スーパーオキシドアニオンの測定

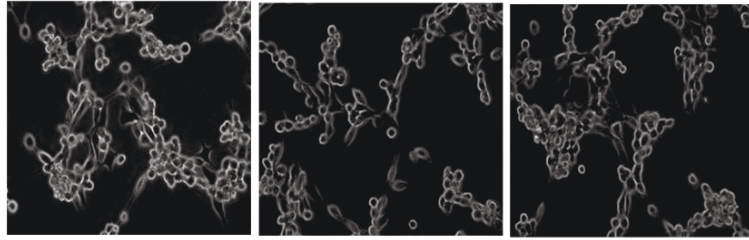
システム Xc^- の阻害によって、細胞内の抗酸化物質であるグルタチオンの量が低下すると、細胞は発生した活性酸素種の消去が徐々にできなくなり、最終的には細胞内に活性酸素種が蓄積する。これによって細胞は細胞傷害を引き起こす。細胞内で特に活性酸素種を発生させるのはミトコンドリアであり、adenosine triphosphate (ATP) の産生時に発生する。また、グルタチオンの枯渇により活性化する 12-リポキシゲナーゼの影響を受けて、細胞内への Ca^{2+} 流入が促進される。細胞内外の Ca^{2+} 濃度の恒常性損失は細胞死を誘発する。EEP や神経保護作用を示した EEP 含有成分の活性酸素種消去能及び Ca^{2+} の流入に対する影響について調べるために、活性酸素種や Ca^{2+} を検出する蛍光試薬を用いた評価を行った。

グルタミン酸を添加して 12 時間、エラスチンを添加して 8 時間経過後の細胞は、丸くなり形態が明らかに変化した。そこに細胞内の活性酸素種を検出する Deep Red を取り込ませ、蛍光を観察すると、強い赤色蛍光を確認した (図 13)。一方で、EEP (25.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) をグルタミン酸と共処理した細胞では形態の変化は見られず、Deep Red の蛍光強度にコントロールとの有意な差は見られなかった。同様に、ミトコンドリアのスーパー

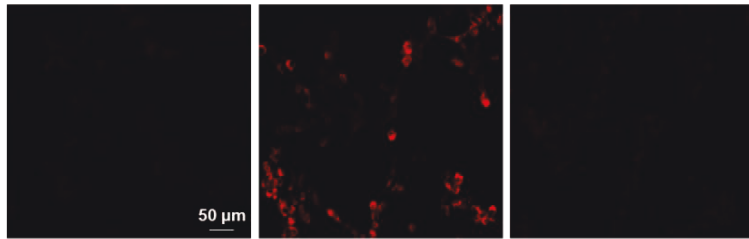
スーパーオキシドアニオンに特異性を持つ MitoSOX を取り込ませた場合も同じく、コントロールに対してグルタミン酸及びエラスチンを処理した細胞では赤色蛍光が認められたのに対し、EEP を添加した場合は蛍光強度の上昇は見られなかった (図 14)。Ca²⁺の標識に用いた Fluo-4 の観察結果も同様であった (図 15)。また、EEP の細胞保護作用有効成分である artemillin C、kaempferide、kaempferol の作用も評価した。いずれの化合物も DeepRed で標識される細胞内活性酸素種と Fluo-4 で標識される Ca²⁺については、EEP と同じく、グルタミン酸またはエラスチンの刺激によって見られた蛍光強度の上昇をコントロールと同程度まで抑えた (図 13、図 15)。MitoSOX の観察結果は、artemillin C と kaempferol による蛍光強度上昇の抑制は観察できたが (図 14)、kaempferide を添加した細胞では非常に強い細胞全体での蛍光が認められた (data not shown)。同様の観察結果が kaempferide のみを添加した細胞においても見られたことから、MitoSOX と kaempferide が反応した自家蛍光と考えられ、kaempferide のスーパーオキシドアニオンに対する影響は評価できなかった。

A

Phase-contrast



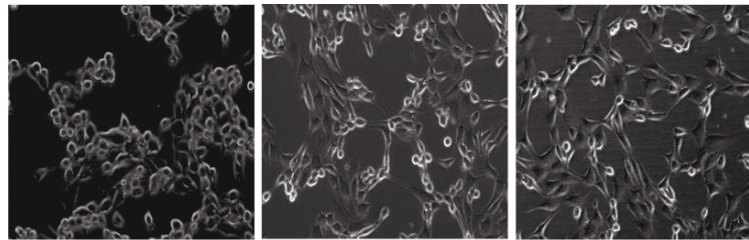
Deep Red



Control

Glutamate

Glutamate + EEP



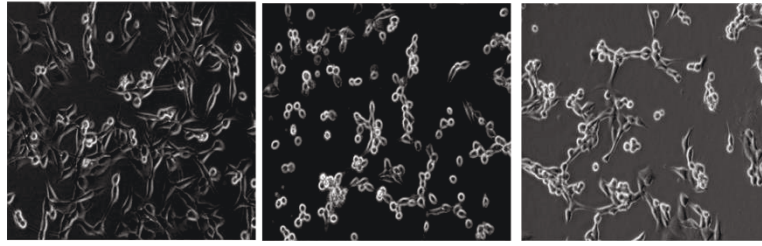
Glutamate + Artepillin

**Glutamate
+ Kaempferide**

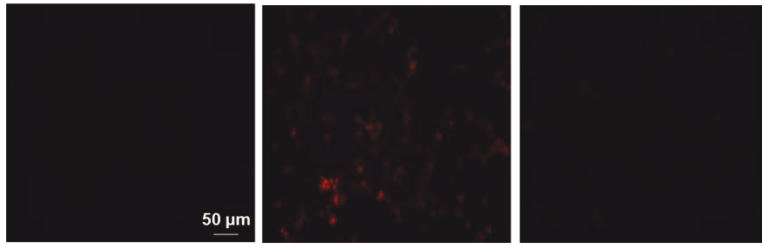
**Glutamate
+ Kaempferol**

B

Phase-contrast



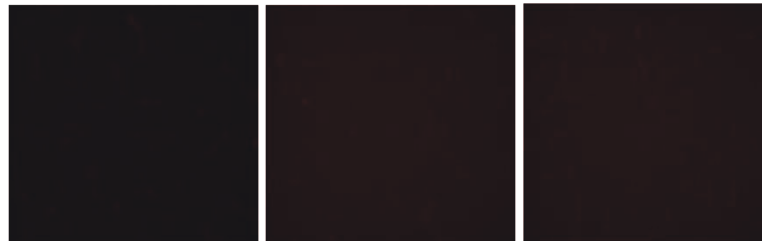
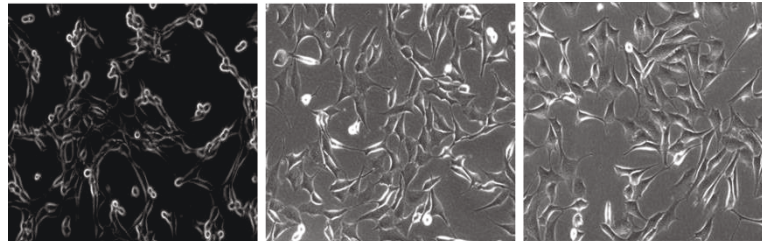
Deep Red



Control

Erastin

Erastin + EEP



Erastin + Artepillin

**Erastin
+ Kaempferide**

**Erastin
+ Kaempferol**

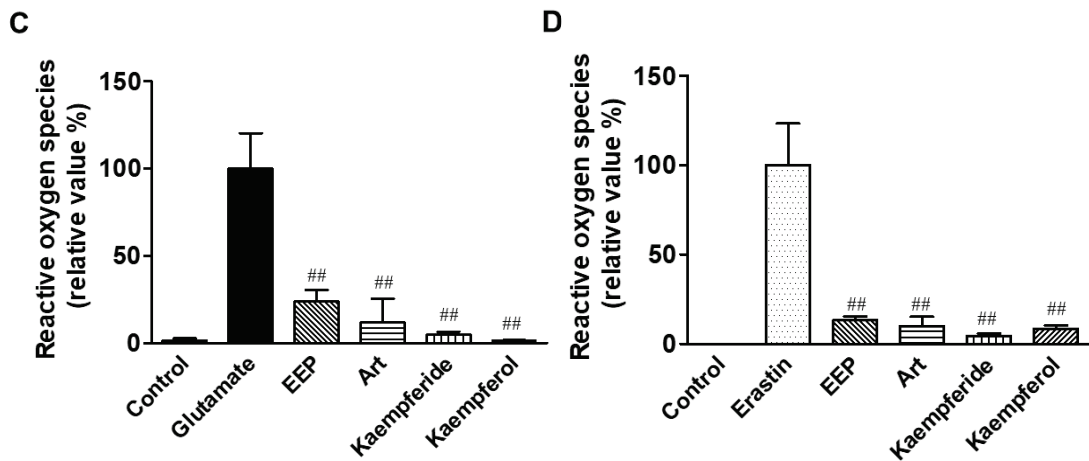


図 13. 酸化ストレスにより産生する細胞内活性酸素種に対する EEP 及び有効成分の作用

(A) (C): HT22 細胞に 10 mM グルタミン酸と 25.0 μg/mL EEP、20.0 μM artepillin C、20.0 μM kaempferide、20.0 μM kaempferol を処理して 12 時間培養後、蛍光を観察した。

(B) (D): HT22 細胞に 0.5 μM エラスチンと 25.0 μg/mL EEP、20.0 μM artepillin C、20.0 μM kaempferide、20.0 μM kaempferol を処理して 8 時間培養後、蛍光 (Deep Red (Ex/Em=644/655)) を観察した。(平均値 ± SD, n=4 **P < 0.01, difference from the glutamate or erastin alone)

A

Phase-contrast



MitoSOX



Control

Glutamate

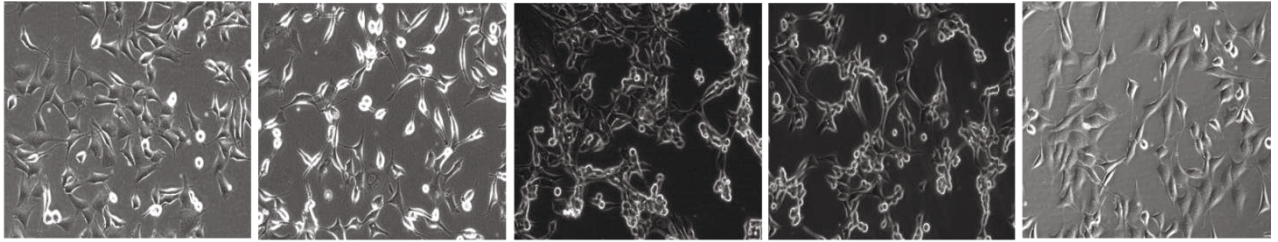
Glutamate + EEP

Glutamate + ArtepillinC

Glutamate + Kaempferol

B

Phase-contrast



MitoSOX



Control

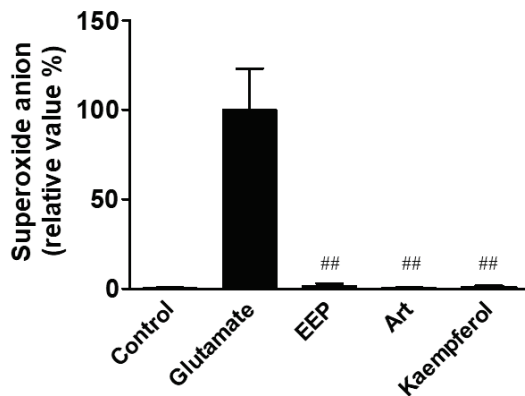
Erastin

Erastin + EEP

Erastin + ArtepillinC

Erastin + Kaempferol

C



D

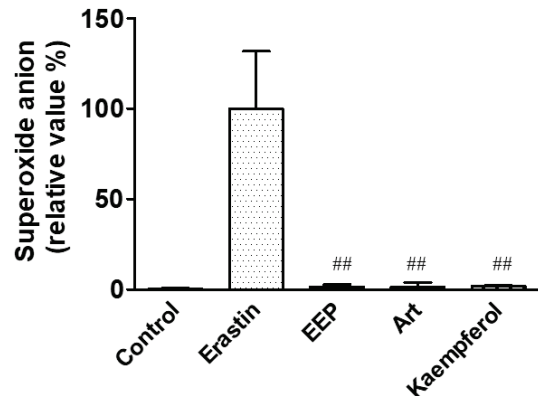


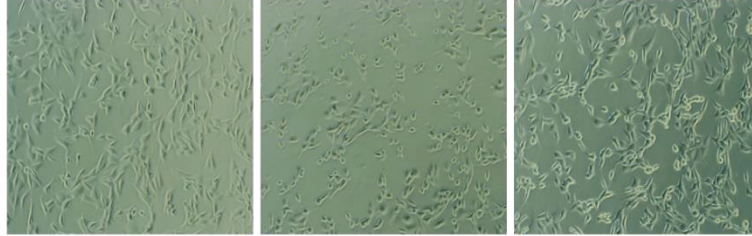
図 14. 酸化ストレスにより産生するスーパーオキシドアニオンに対する EEP 及び有効成分の作用

(A) (C): HT22 細胞に 10 mM グルタミン酸と 25.0 μg/mL EEP、20.0 μM artepillin C、20.0 μM kaempferide、20.0 μM kaempferol を処理して 12 時間培養後、蛍光を観察した。

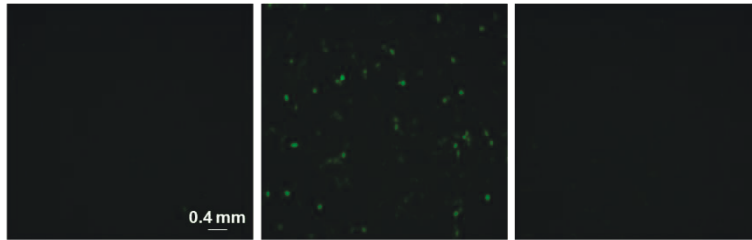
(B) (D): HT22 細胞に 0.5 μM エラスチンと 25.0 μg/mL EEP、20.0 μM artepillin C、20.0 μM kaempferide、20.0 μM kaempferol を処理して 8 時間培養後、蛍光 (MitoSOX (Ex/Em=510/580)) を観察した。(平均値 ± SD, n=4 **P < 0.01, difference from the glutamate or erastin alone)

A

Phase-contrast



Fluo-4



Control

Glutamate

Glutamate + EEP



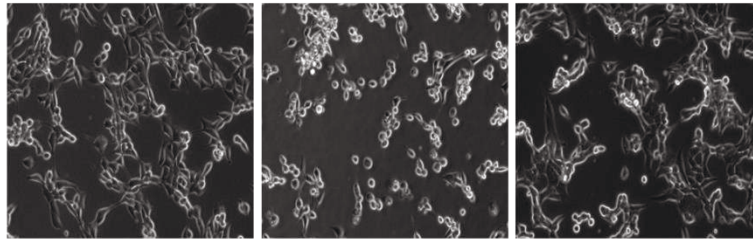
Glutamate + Artepillin

**Glutamate
+ Kaempferide**

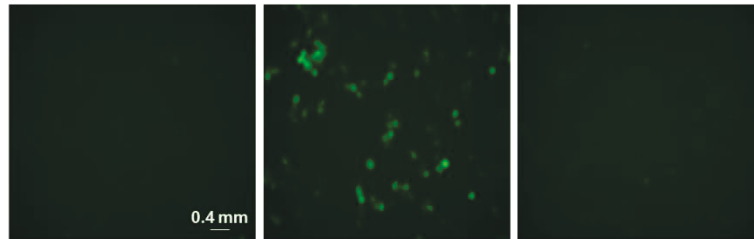
**Glutamate
+ Kaempferol**

B

Phase-contrast



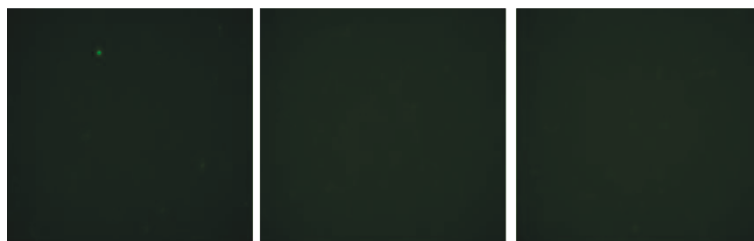
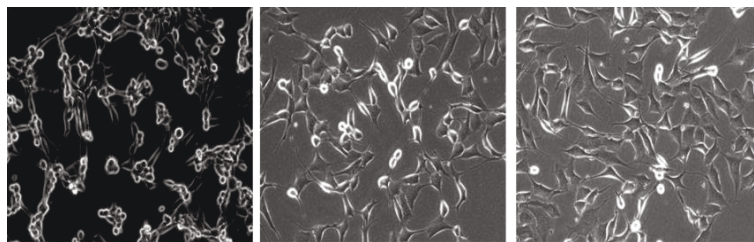
Fluo-4



Control

Erastin

Erastin + EEP



Erastin + Artepillin

**Erastin
+ Kaempferide**

**Erastin
+ Kaempferol**

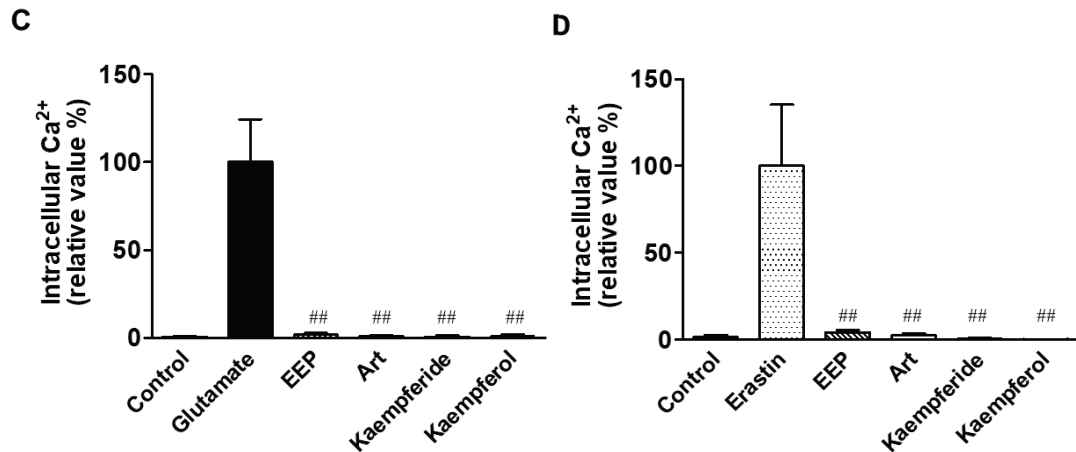
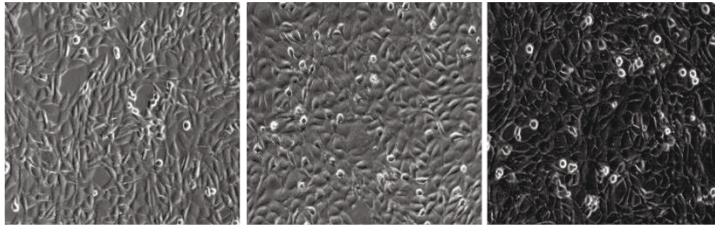


図 15. 酸化ストレスにより細胞内に流入する Ca^{2+} に対する EEP 及び有効成分の作用
 (A) (C): HT22 細胞に 10 mM グルタミン酸と 25.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EEP、20.0 μM artemisinin C、20.0 μM kaempferide、20.0 μM kaempferol を処理して 12 時間培養後、蛍光を観察した。
 (B) (D): HT22 細胞に 0.5 μM エラスチンと 25.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EEP、20.0 μM artemisinin C、20.0 μM kaempferide、20.0 μM kaempferol を処理して 8 時間培養後、蛍光 (Fluo-4 (Ex/Em=495/518)) を観察した。(平均値 \pm SD, n=4 **P < 0.01, difference from the glutamate or erastin alone)

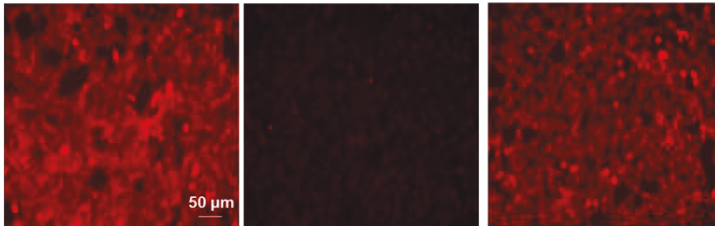
3-3-3. 細胞内遊離二価鉄 (Fe^{2+}) の測定

フェロトーシスでは、二価鉄依存的な過酸化脂質の蓄積がみられることが報告されている。また鉄キレート剤をフェロトーシス誘導剤やオキシトーシス誘導剤と共に処理することによりフェロトーシス及びオキシトーシスは抑制されることから、各細胞傷害に対する保護作用を示す化合物の性質として細胞内遊離二価鉄のキレート作用を有する可能性が考えられた。そこで、EEP が二価鉄キレート作用を示すかを調べた。EEP と鉄キレート剤であるデフェロキサミンの作用と比較することにより、EEP の作用の強さを検討した。HT22 細胞を 12-well plate に播種して 16 時間後の細胞内の Fe^{2+} を蛍光試薬の FerroOrange で標識し観察した。その結果、コントロールの細胞は、遊離二価鉄と FerroOrange と反応した結果生じる赤色蛍光を呈した。一方で、デフェロキサミンを処理した細胞では FerroOrange の赤色蛍光がほとんど見られなかった。また、EEP を処理した細胞では、コントロールよりは赤色蛍光強度が減少したが、有意な差は認められなかった (図 16)。

Phase-contrast



FerroOrange



Control

Deferoxamine

EEP

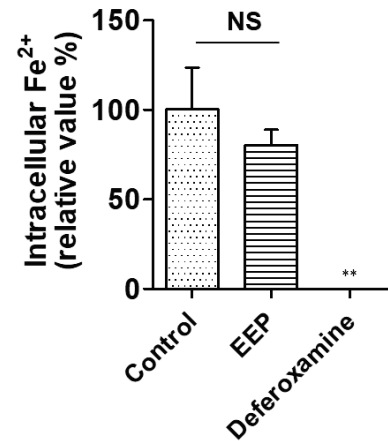


図 16. 細胞内遊離二価鉄に対する EEP の作用

HT22 細胞に 10 μ M デフェロキサミン、25.0 μ g/mL EEP を処理して 16 時間培養後、蛍光 (Ferro Orange (Ex/Em=543/580)) を観察した。(平均値 \pm SD, n=4 **P < 0.01, difference from the glutamate or erastin alone)

3-3-4. *In vitro* でのスーパーオキシドアニオン消去活性の測定

酸化ストレスに対する生体の防御反応として、抗酸化酵素による過剰な活性酸素の消去が挙げられる。スーパーオキシドディスムターゼ (SOD) は細胞質中やミトコンドリア内に存在し、スーパーオキシドアニオンを酸素と過酸化水素に分解する役割を持っている。抗酸化作用を持つ物質の中には、生体内の抗酸化酵素の活性を高めるものと、物質そのものが抗酸化酵素のように活性酸素の分解や補足を行っているものが考えられる。MitoSOX を用いたミトコンドリア由来のスーパーオキシドアニオンの観察において、EEP や有効成分はグルタミン酸処理によるスーパーオキシドアニオンの上昇を抑制した。そこで、EEP がスーパーオキシドアニオンを直接消去している可能性を調べるために、*in vitro* におけるスーパーオキシドアニオン消去活性測定を実施した。

その結果、EEP のスーパーオキシドアニオン消去活性は 25.0 μ g/mL において約 50% であった。また関与成分の中では kaempferide が EEP と同程度のスーパーオキシドアニオン消去活性を示した。次いで kaempferol、artepillin C の順であった (図 17)。Kaempferol

及び artemillin C は 2.5~20 μM において、いずれの濃度でもそれぞれ約 20%、約 35% のスーパーオキシドアニオン消去活性を示したが、濃度依存性は見られなかった。WEP の活性も測定を試みたが、WEP 溶液自体が WST-1 と反応し、Blank 溶液の吸光度が高くなった。そのため、WEP については、測定系への影響が大きく、正確な測定値を得ることができないと判断した (data not shown)。

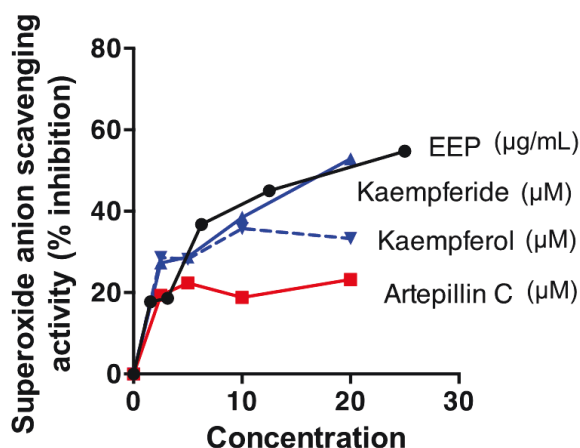


図 17. *In vitro* での EEP, artemillin C, kaempferide および kaempferol のスーパーオキシドアニオン消去活性
n=2 で測定した平均値を示す。測定は 2 回繰り返して実施し、同様の結果を得た。DMSO のみを添加した control に対しての阻害率を示した。

3-4. 考察

細胞に酸化ストレスが誘発される原因としては、細胞内抗酸化物質グルタチオンの低下とそれに伴う活性酸素種の増加が挙げられる。抗酸化作用を示す物質はこれらの原因の一つまたは複数に対して作用を示すことにより、生体内での酸化と抗酸化のバランスが崩れないように働いている。HT22 細胞において、17- β -Estradiol、vitamin E、polyphenolic bioflavonoids、melatonin は天然資源由来の抗酸化物質として細胞死を抑制することが報告されている (Behl, 2000; Herrera et al., 2007; Ishige et al., 2001)。このような天然物質由来の抗酸化物質のうち、体内で合成ができないビタミン類などは、食事からの補給が必要である。

EEP の酸化ストレス誘発性細胞傷害保護作用に関して、作用機序を明らかにするために細胞内グルタチオン量、活性酸素種、細胞内 Ca^{2+} に対する EEP と有効成分の影響について調べた。細胞内グルタチオン量は、グルタミン酸の添加による低下が認められた。これは、細胞外に高濃度のグルタミン酸を添加することにより、システム Xc^- の機能が阻害されたためであり、既報通りの結果であった。また、EEP のみを細胞に処理した場合には、コントロールとほぼ同程度の細胞内グルタチオン量であった。このことから、EEP は、細胞内グルタチオン量に影響しないことが示唆された。グルタミン酸と EEP

を同時に処理した場合は、グルタミン酸のみを処理した場合と同程度であり、EEP の添加による細胞内グルタチオン量への影響はみられなかった。EEP の有効成分について評価した結果も同様であった。これらのことから、EEP 及びその有効成分には細胞内グルタチオンに対する影響はないと考えられた。細胞内グルタチオン量の低下は、システム Xc^- の機能を阻害することによるオキシトーシスやフェロトーシスにおいて最初に現れる変化である。プロポリスの酸化ストレス誘発性細胞傷害に対する保護作用は細胞内グルタチオンの下流で起こると予想した。

プロポリスの抽出物及びその含有成分にはラジカル捕捉能があることが報告されている (Banskota et al., 2000; Marquale et al., 2005; Souza et al., 2007)。Izuta らの報告では、中国産レッドプロポリスやブラジル産グリーンプロポリスのエタノール及び水抽出物は 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカル消去活性を有しており、ブラジル産グリーンプロポリスについては、水抽出物に比べエタノール抽出物の活性の方が 2 倍程度高いことが明らかにされている (Izuta et al., 2009)。また、エタノール抽出物に含まれる成分のうち artepillin C と kaempferol は DPPH ラジカル消去活性を示すとの報告がある。一方で、本試験において細胞保護作用を示さなかった baccharin や drupanin、*p*-coumaric acid については活性が見られていない (Kumazawa et al., 2004; Izuta et al., 2009)。本試験において、蛍光試薬を用いて細胞質内の活性酸素種及びミトコンドリアにおけるスーパーオキシドアニオンの検出を行った結果、細胞保護作用を示した Artepillin C、kaempferide 及び kaempferol はいずれもグルタミン酸またはエラスチンの添加による活性酸素種の増加を抑制した。これらのことから、EEP 及び artepillin C、kaempferide、kaempferol には活性酸素種の増加を抑制する作用があることが示唆された。Simoes らのウサギ好中球を用いた化学発光法による活性酸素種測定では、kaempferide が活性酸素種の産生抑制作用を有することが報告されている (Simões et al., 2004)。今回の蛍光試薬を使用した試験では、EEP や有効成分の直接的な活性酸素種の捕捉または消去能が反映されているわけではないが、Izuta ら、Kumazawa ら、及び Simoes らの報告に鑑みると、EEP や artepillin C、kaempferide、kaempferol による活性酸素種の増加抑制は、活性酸素種の捕捉能 (直接消去能) によるものであると考えられる。また、本試験結果より活性酸素種の蓄積に伴って引き起こされる細胞内 Ca^{2+} の流入も EEP と有効成分により阻害されることが明らかとなった。これは、EEP や有効成分が細胞内における活性酸素種の増加を抑制した結果、 Ca^{2+} 流入が抑えられたと考えられる。ラジカル消去能を示すことが報告されているフラボノイド類やビタミン E は分子内の水酸基によってフリーラジカルに対する水素移動反応を引き起こし、抗酸化剤として作用すると考えられている。

本試験において、活性酸素種増加を抑制した EEP 中の有効成分も水酸基を有しており、それが抗酸化作用に寄与していると推察される。しかし、今回評価した EEP 含有成分には、分子内に水酸基を含み、構造が非常に似ているにも関わらず、強い作用を示すものと示さないものがあった (図 18)。Kaempferide、kaempferol、isosakuranetin の構造は非常に似ており、何れもフラボノイド骨格を有している。3 つのうち作用が見られた kaempferide、kaempferol と isosakuranetin の違いはフラボノイド骨格の 3 位に水酸基を有していることである。このことから、活性酸素種の消去にはフラボノイド骨格 3 位の水酸基が重要であると考えられる。また、artepillin C、baccharin、drupanin は 4 位に水酸基を有しているという共通点がある。Artepillin C と drupanin では、3 位のプレニル基の有無以外に違いはない。しかし、その活性酸素種抑制作用には大きな差異があることから、活性には 3 位と 5 位のプレニル基に挟まれる形で存在する水酸基が重要であると推察される。

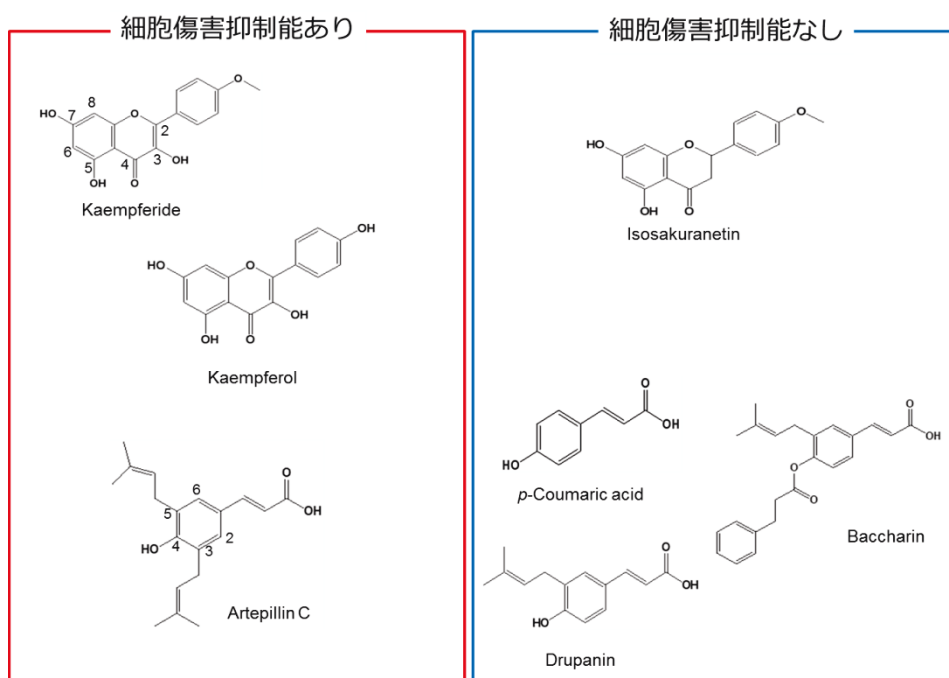


図 18. 細胞傷害抑制能を示した成分 (左)と示さない成分 (右) の構造式

EEP を処理した細胞における遊離二価鉄由来の蛍光の有意な減少は見られなかったことから、EEP には鉄のキレート作用はほとんどないものと考えられた。細胞において鉄は必須な元素であり、酸素の運搬や酸化還元反応などに利用される。造血系では特にその需要が大きく、欠乏した場合は貧血が生じる原因となる。しかし、鉄が過剰に存在し

た場合はフェントン反応による活性酸素の過剰産生により様々な疾患の発症リスクが高まる。従って、遊離二価鉄の量は厳密に制御されている。EEP を処理した細胞における鉄の濃度はコントロールに比べてわずかに減少したが、鉄キレート剤として知られるデフェロキサミンに比べるとその作用は非常に弱いものであった。また、artepillin C や kaempferide、kaempferol について調べた結果も同様で、有意な鉄キレート作用は認められなかった (data not shown)。このことから、EEP や有効成分による細胞保護作用は鉄によるフェントン反応の阻害によるものではないと考える。

SOD はスーパーオキシドを不均化して過酸化水素と酸素に変える働きを担っており、加齢とともに産生能力は低下すると考えられている (Reiss and Gerson, 1976)。従って、日々の食事から SOD と同様に活性酸素種を消去する物質を摂取することは、疾患予防に重要である。真核生物の細胞質には活性中心に銅と亜鉛を含む Cu/Zn SOD が存在する。Cu²⁺が活性に重要であり、Cu²⁺と Cu⁺の酸化還元サイクルによりスーパーオキシドの消去が行われる。また、ミトコンドリアには Mn SOD 存在し、活性中心に Mn を含んでいる。Mn SOD は呼吸にともなって発生するスーパーオキシドの消去を行っている。SOD 様活性は物質の抗酸化作用の指標の一つとされ、SOD 様活性が高い物質は抗酸化作用も強いと捉えられる。本試験では、EEP の細胞保護作用に SOD 様作用すなわち活性酸素種の直接消去が関わっている可能性を検討した。本試験で使用したキットでは、キサンチンオキシダーゼをスーパーオキシドアニオンの発生系として使用し、発色試薬の WST-1 のスーパーオキシドアニオンによる呈色反応を測定する。サンプル中に SOD 様物質が全くない場合を 100%とし、呈色反応を抑制した程度を調べることで被験物質のスーパーオキシドアニオン消去活性としている。測定の結果、EEP 25 µg/mL は約 50% の消去活性を示すことが分かり、その反応は濃度依存的であった。また、保護作用を有する artemillin C、kaempferide、kaempferol もスーパーオキシドアニオン消去活性を示した。これらの結果より、EEP 及び有効成分の細胞保護作用にはスーパーオキシドアニオン等の活性酸素種の直接消去が関わっていることが示唆された。ただし、ブラジル産プロポリスはキサンチンオキシダーゼの反応を阻害することが報告されている (Marquele et al., 2005) (100 µg/mL で阻害率約 20%、IC₅₀ は 250 µg/mL 以上)。今回使用した EEP の最高濃度は 25 µg/mL であり、報告されている濃度の 4 分の 1 の濃度であるため、測定系のスーパーオキシドアニオン発生にどの程度影響を与えたかは不明だが、EEP のキサンチンオキシダーゼ阻害の可能性は否定できない。他の方法による活性酸素種の直接消去作用も検討する必要がある。

第4章 Nrf2-ARE 経路及び抗酸化関連酵素に対するブラジル産グリーンプロポリスの作用

4-1. 緒言

生体内の抗酸化機構として、抗酸化酵素の発現を上昇させる仕組みがある。その仕組みの1つとしてNF-E2 related factor 2 - antioxidant response element (Nrf2-ARE) 経路が知られている (図 19, Itoh et al., 2004)。転写因子である NF-E2 related factor 2 (Nrf2) は 1994 年にグロビン遺伝子発現制御領域中の NF-E2 結合配列と呼ばれる遺伝子発現制御配列 (GRE) に結合する因子としてクローニングされた。通常、Nrf2 は Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) と結合した状態で細胞質内に存在するが、生体に酸化ストレスがかかると Nrf2 は Keap1 から解離、核内へと移行し、ARE 配列に結合する。ARE の下流には抗酸化作用を有する抗酸化/解毒代謝遺伝子群がコードされており、Nrf2-ARE 経路の活性化によってグルタチオンペルオキシダーゼ (GPX) やヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1)、NAD (P) H キノンオキシドレダクターゼ 1 (NQO-1)、 γ -グルタミルシステイン合成酵素 (γ -GCS) などの酵素の発現が誘導される (Motohashi et al., 2004)。

今回、EEP の酸化ストレス誘発性細胞傷害に対する保護作用の作用機序として、生体内の抗酸化システムである Nrf2-ARE 経路の活性化が関わっている可能性を調べるために HT22 細胞に ARE 配列を含むレポータープラスミド rQR-ARE-pGL4.27 を導入した HT22-ARE 安定発現株を用いて、ルシフェラーゼ活性を測定することにより、EEP 及び有効成分の ARE プロモーター活性化に対する作用を評価した。また、Nrf2-ARE 経路の活性化により発現が誘導される抗酸化に関わる酵素群の発現について、ウエスタンブロット法を用いて解析した。

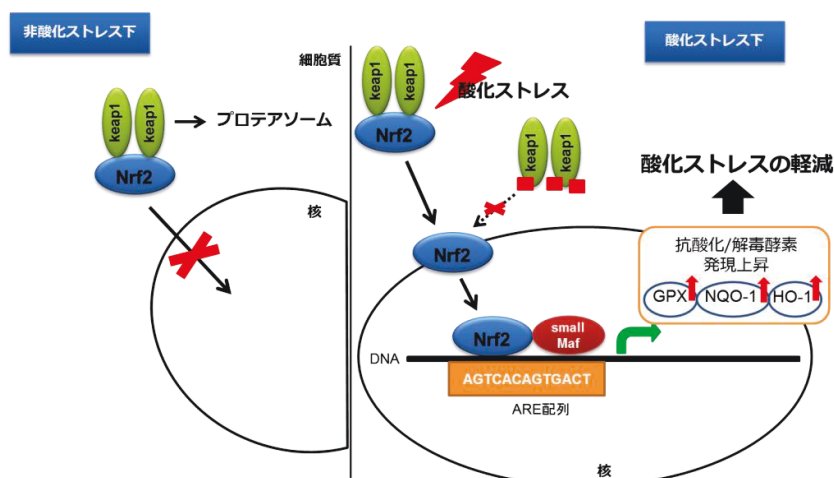


図 19. Nrf2-ARE 経路による抗酸化関連遺伝子の発現制御

4-2. 実験材料及び実験方法

4-2-1. 試薬

ウエスタンブロット法によるタンパク質の検出には、以下の表に示す抗体を用いた。

表 4 ウエスタンブロッティングに用いた抗体リスト

1次抗体	希釈倍率	2次抗体	希釈倍率
anti-heme oxygenase 1 (Enzo Life Science)	1: 2000	mouse IgG-HRP (Cell signaling)	1: 2000
anti-Mn superoxide dismutase (Enzo Life Science)	1: 5000	rabbit IgG-HRP (Cell signaling)	1: 2000
anti-Cu/Zn superoxide dismutase (Enzo Life Science)	1: 3000	rabbit IgG-HRP	1: 3000
anti- γ -glutamyl cysteine-synthase catalytic subunit (Santa Cruz Biotechnology)	1: 1000	mouse IgG-HRP	1: 3000
anti- γ -glutamyl cysteine-synthase regulatory subunit (Santa Cruz Biotechnology)	1: 1000	mouse IgG-HRP	1: 2000
anti-glutathione reductase (Santa Cruz Biotechnology)	1: 1000	rabbit IgG-HRP	1: 3000
anti-glutathione peroxidase 1 (GeneTex)	1: 2000	rabbit IgG-HRP	1: 2000
anti-glutathione peroxidase 4 (Abcam)	1: 1000	rabbit IgG-HRP	1: 2000
anti-thioredoxin (proteintech)	1: 1000	rabbit IgG-HRP	1: 2000
anti-NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (Abcam)	1: 1000	rabbit IgG-HRP	1: 2000
anti-glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase (Acris Antibodies, Inc.)	1: 2000	mouse IgG-HRP	1: 2000

4-2-2. ARE プロモーター活性の測定

ARE プロモーター活性の測定には、ラット NAD (P) H: quinone reductase (rQR) のプロモーター領域にある ARE 配列 5'-AGAGTCACAGTGAAGTTGGCAAATC-3'を組み込んだレポータープラスミド、rQR-ARE-pGL4.27 を導入した HT22-ARE 安定発現株を用いた。HT22-ARE 安定発現株を 2×10^4 cells/well になるように 48-well plate に播種し、被験物質を任意の濃度で添加した。37°C、5% CO₂ の条件下で 8 時間または 16 時間培養した。8 時間培養後に培養液を吸引除去し、各 well に 1×Passive Lysis Buffer (Promega, Tokyo, Japan) を 50 μL ずつ加えた。シェーカーを用いて 15 分間室温でプレートを攪拌した後、各 well の細胞抽出液を氷上にてエッペンチューブに回収し、13,500 rpm × 5 min、4°C で遠心した (cell lysate とした)。ルミノメーター用チューブに cell lysate を 5 μL 入れ、室温に戻した Luciferase Assay Reagent (Promega, Tokyo, Japan) を 25 μL 加えてボルテックスにて攪拌した後、ルミノメーターでルシフェラーゼ活性を測定した。

4-2-3. ウェスタンブロット法

T-25 フラスコに HT22 細胞を 6.02×10^5 cells になるように播種し、一晩培養した。培養後、グルタミン酸またはエラスチン及び被験物質を任意の濃度で添加し、37°C、5%CO₂ の条件下で培養した。

8 時間または 10 時間培養後、フラスコの培地を吸引し、トリプシン 500 μL を加えて処理した後、培地を加え穏やかにピペッティングしながら細胞を剥がした。1300 rpm で 3 分間遠心分離した後、上清を吸引した。氷冷した 1×PBS で 2 回洗浄し、再度 1300 rpm で 3 分間遠心分離を行った後、上清を吸引した。回収した細胞ペレットを任意の量の 2×Sample buffer (表 5) で再懸濁し、氷上で超音波破碎した。タンパク定量は DC Protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Osaka, Japan) を用いて行った。任意の濃度にサンプルを希釈し、希釈したサンプルの 5%にあたる量の 2-メルカプトエタノールを加え、ヒートブロックで 100°C、5 分間加熱した。

分離ゲル (running gel、表 6) 及び濃縮ゲル (stacking gel、表 7) を作製し、分子量マーカー、サンプルをアプライし、泳動槽を running buffer (表 8) で満たした後に 100 V の定電圧で 90 分泳動を行った。スポンジ、ろ紙、ポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜、ゲルを挟み込み、ブロッキング装置にセットし、transfer buffer (表 9) で満たした後、100 V の定電圧で 90 分間転写した。転写後、10 分間 PBS-T (0.05% Tween-20/1×PBS) で洗

浄し、PVDF 膜を blocking buffer (5% skim milk in PBS-T) で 60 分間室温にて振とうさせてブロッキングを行った。次にハイブリダイゼーションバックに PVDF 膜と blocking buffer で希釈した一次抗体を封入し、4°C で一晩反応させた。その後、PVDF 膜を PBS-T で 15 分間、3 回洗浄し、blocking buffer で希釈した二次抗体 を封入し、室温で 90 分間反応させた。反応終了後、PVDF 膜を PBS-T 溶液で 15 分間、3 回洗浄した。Enhanced chemiluminescence (GE Healthcare Bioscience) もしくは SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate 試薬 (Thermo Scientific) で検出を行った。その後、Image J を用いてバンドの数値化を行った。

表 5 2× Sample buffer の組成

1 M Tris-HCl (pH 6.8)	125 mM
Glycerol	20% (v/v)
SDS	8% (w/v)
Bromophenol blue	0.001% (w/v)
H ₂ O	proper quantity
Total	98 mL

表 6 Running gel の組成 (10%, 2 枚分)

30% Acrylamide containing 0.8% methylene-bis-acrylamide	4.0 mL
1.5 M Tris-HCl (pH 8.8) containing 0.4% SDS	3.0 mL
H ₂ O	5.0 mL
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	6.0 μL
10% Ammonium persulfate	60 μL

表 7 Stacking gel の組成 (6%, 2 枚分)

30% Acrylamide containing 0.8% methylene-bis-acrylamide	0.4 mL
0.5 M Tris-HCl (pH 6.8) containing 0.4% SDS	0.5 mL
H ₂ O	1.1 mL
TEMED	3.0 μL
10% Ammonium peroxodisulfate	13 μL

表 8 Running buffer の組成

Tris	25 mM
SDS	0.1% (w/v)
Glycine	192 mM
H ₂ O	proper quantity
Total	3000 mL

表 9 Transfer buffer の組成

Tris-Glycine	300 mL
MeOH	600 mL
H ₂ O	proper quantity
Total	3000mL

4-2-4. 統計解析

測定結果は平均値 ± 標準偏差 (SD)で示した。統計処理は GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) を用いて、one-way ANOVA を実施した後、Dunnett's multiple comparison test にて解析した。P<0.05 を統計的に有意であると判断した。

4-3. 結果

4-3-1. ARE プロモーター活性の測定

HT22-ARE 安定発現株を EEP で処理し、8 時間経過後の ARE プロモーター活性を測定した結果、EEP 1.56~25.0 µg/mL の処理により ARE プロモーター活性は濃度依存的に上昇し、コントロールに比べ有意に高い値を示した (図 20-A)。最大濃度である 25.0 µg/mL ではコントロールと比較して、ルシフェラーゼ活性は約 9 倍増加した。16 時間後の活性を測定した結果でも EEP 濃度依存的な活性の上昇が見られ、25.0 µg/mL でコントロールに比べ約 7 倍高い活性を示した (図 20-B)。同様に、EEP 有効成分についても 8 時間処理した後に測定した。その結果、baccharin、*p*-coumaric acid、drupanin のいずれもコントロールと同程度の値を示し、有意な活性の上昇は認められなかった。また、酸化ストレス誘発性細胞傷害に保護作用を示した artepillin C を添加した細胞においてもルシフェラーゼ活性の上昇は見られなかった。Isosakuranetin については、濃度依存的

に活性が高くなる傾向がみられたが、コントロールに対する有意差はなかった。一方で、kaempferide 及び kaempferol を 8 時間または 16 時間処理した細胞では、濃度依存的に活性が上昇することが分かった。特に kaempferol については、5.0 μM で EEP 25.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を処理した場合と同程度の活性を示すことが分かった。しかし、EEP 25.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 中に含まれる kaempferol の濃度である 0.1 μM ではコントロールに対して有意に高い活性は見られなかった。Kaempferide についても、EEP 25.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に含まれている濃度 (約 2.5 μM) では有意な活性の上昇は見られなかった (図 20)。本試験の測定結果が、ARE 配列に特異的であることを確認するために、ルシフェラーゼ活性の上昇がみられた化合物については ARE 配列を組み込んでいない空ベクター導入細胞における各化合物処理によるルシフェラーゼ活性を評価した (終濃度は EEP: 25.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 有効成分: 20.0 μM)。その結果、3 回の繰り返し実験において、いずれの化合物もコントロールに比べ最大で約 2 倍高い活性を示した (data not shown)。従って、HT22-ARE 安定発現株を用いた試験で得られた結果には ARE 配列非特異的な活性が含まれている可能性があるが、ARE 安定発現株における活性は非特異的な活性を加味しても顕著に高かった。

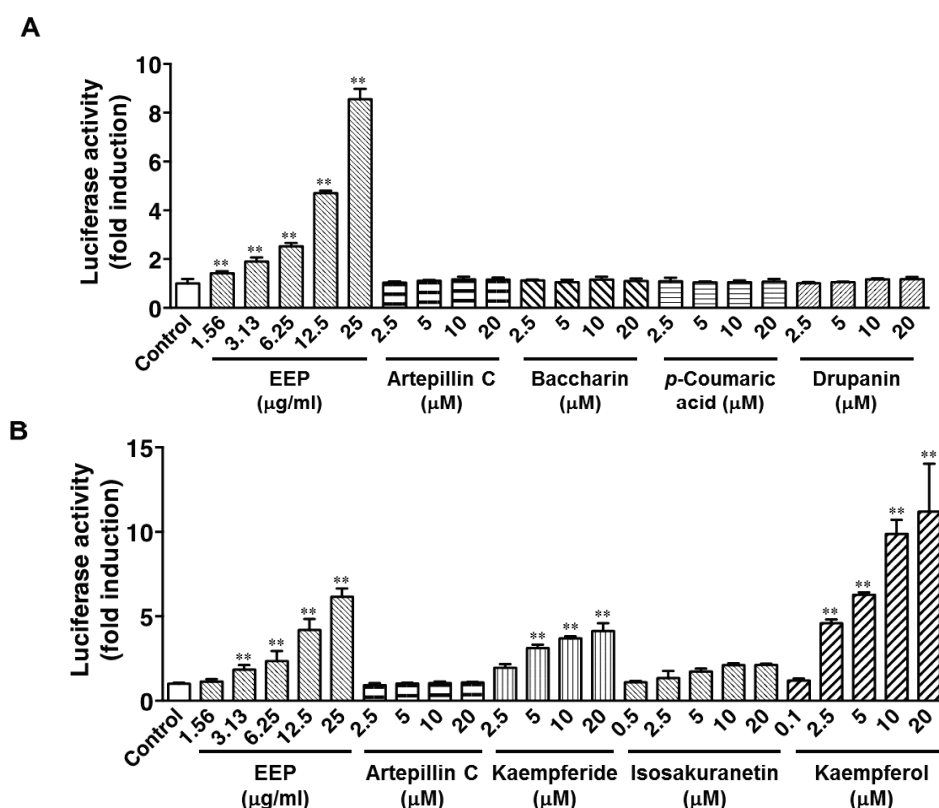


図 20. EEP 及び EEP 主要成分の ARE プロモーター活性

HT22-ARE 細胞に EEP と含有成分を各濃度で処理して 8 時間 (A) または 16 h (B) 処理した。(平均値 \pm SD, $n=4$, ** $P < 0.01$, difference from the control)

4-3-2. 抗酸化関連酵素の発現誘導に対する作用

ルシフェラーゼ活性測定による EEP 及び有効成分の Nrf2-ARE 経路活性化作用を評価した結果、EEP 及び kaempferide、kaempferol は Nrf2-ARE 経路活性化作用を有することが示された。しかし、二つの有効成分の EEP 含有濃度における有意な活性上昇は認められなかった。また、細胞保護作用を示した artemillin C の Nrf2-ARE 活性化作用は認められなかった。そこで、EEP が Nrf2-ARE 経路を活性化させることにより、同経路の下流にある抗酸化関連酵素群の遺伝子発現に与える影響を調べた。また、EEP 中の含有量が最大である artemillin C の抗酸化関連遺伝子群の発現に対する影響もウエスタンブロットティング法を用いて解析した。

解析の結果、EEP の添加によって抗酸化酵素である HO-1 の発現量が顕著に高くなることが分かった。HT22 細胞に対して EEP のみを処理した場合の発現量は、コントロール (図 21, 22 [control-none]) を 1 とした場合に約 7 倍程度高くなった。また、グルタミン酸またはエラスチンと共処理した場合の発現量は、これらを単独で処理した場合 (図 21, 22 [glutamate/erastin-none]) と比較して 3 倍以上、コントロールと比べると 10 倍以上高くなることが分かった。Artemillin C を処理した細胞においては、コントロールよりも約 2~3 倍の発現量の上昇が認められ、グルタミン酸またはエラスチンとの共処理を行った細胞においてもグルタミン酸やエラスチン単独の場合に比べて発現量が高くなる傾向が見られたが、有意差は認められなかった。また、解析を行った HO-1 以外の抗酸化酵素及び Nrf2-ARE 経路の下流にある酵素の中で、タンパク質レベルで有意な変化が見られたものはなかった。SOD については、グルタミン酸またはエラスチンの処理によって発現量の低下が見られたが、EEP 及び artemillin C の共処理による発現量の上昇は見られなかった。以上の結果から、EEP 及び artemillin C は HO-1 を除いて、細胞内抗酸化関連タンパク質の発現に顕著な影響を及ぼさないことが明らかとなった。

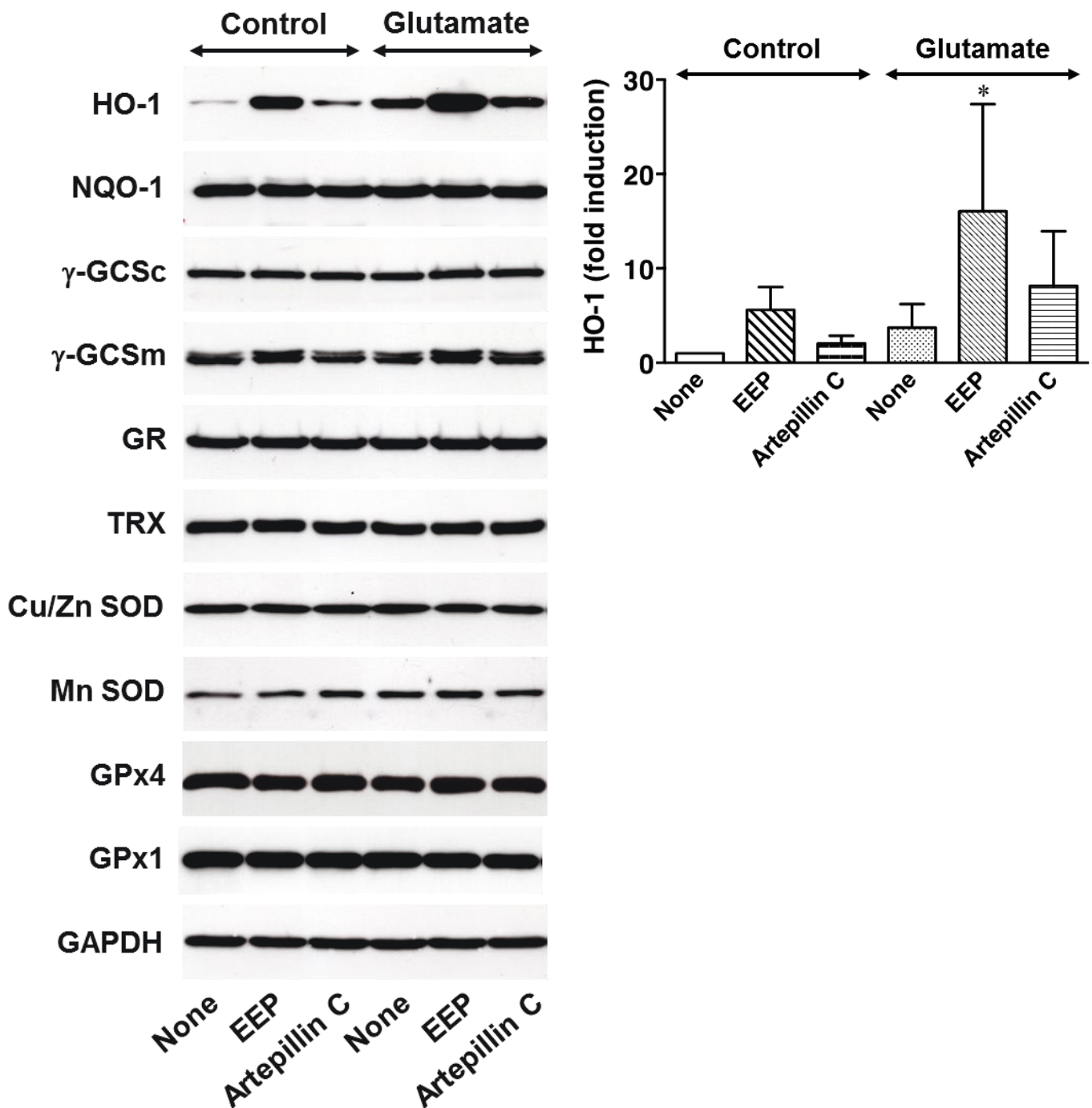


図 21. EEP 及び artepillin C の抗酸化関連タンパク質の発現に対する作用-1

HT22 細胞に EEP (25.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) または artepillin C (20.0 μM) をグルタミン酸存在下または非存在下で処理し、12 時間培養した。Whole cell lysates (20.0 μg protein) をウエスタンブロッティング解析に用いた。(左) 各タンパク質の検出結果 (右) HO-1 の検出結果を数値化した結果 (平均値 \pm SD, $n=4$, $**P < 0.01$, difference from the control)

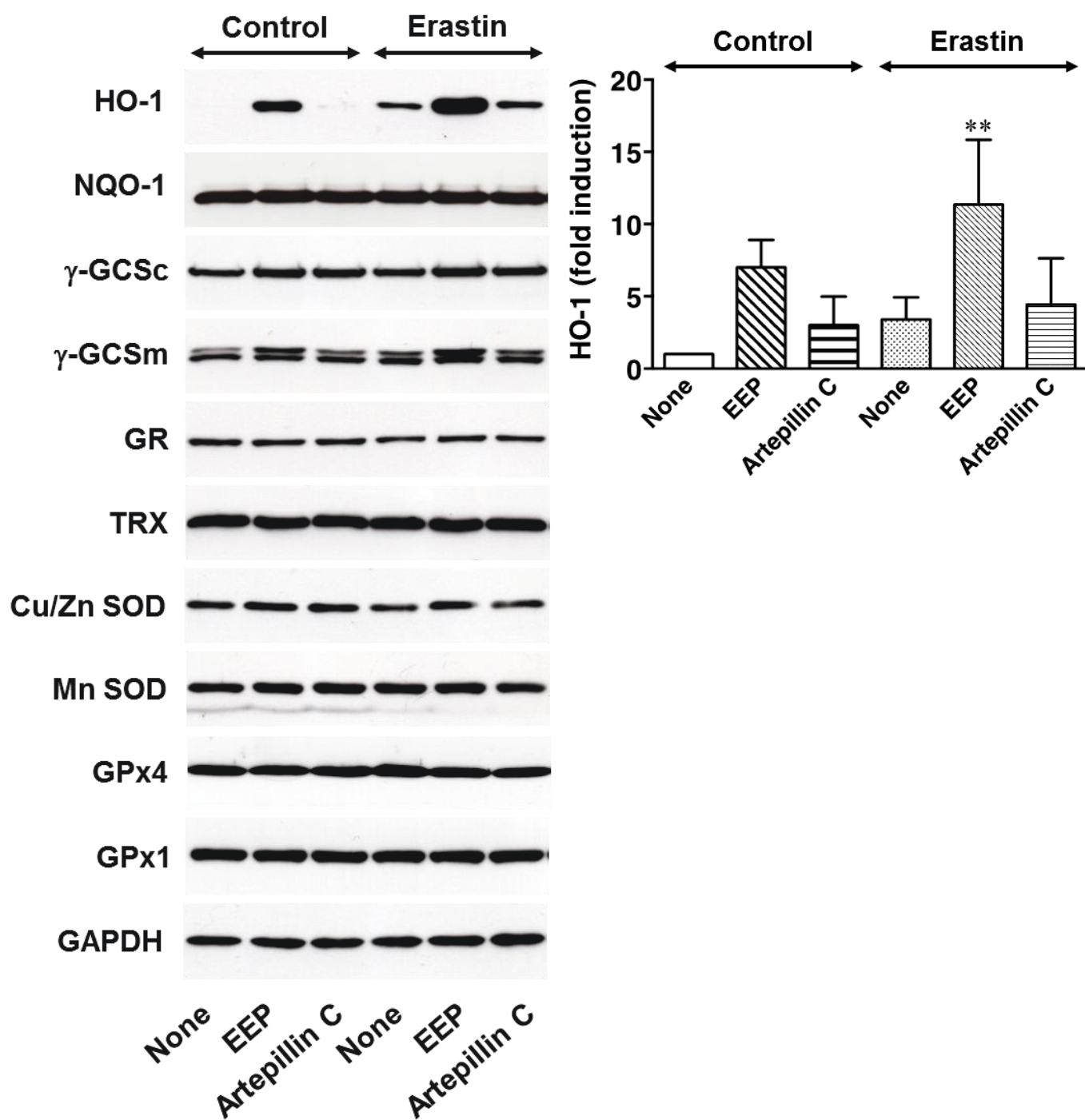


図 22. EEP 及び artepillin C の抗酸化関連タンパク質の発現に対する作用-2

HT22 細胞に EEP (25.0 μ g/mL) または artepillin C (20.0 μ M) をエラスチン存在下または非存在下で処理し、12 時間培養した。Whole cell lysates (20.0 μ g protein) をウエスタンブロッティング解析に用いた。(左) 各タンパク質の検出結果 (右) HO-1 の検出結果を数値化した結果 (平均値 \pm SD, n=4, **P < 0.01, difference from the control)

4-4. 考察

生体に酸化ストレスが負荷された場合に、酸化ストレスに対抗するシステムとしては、外因性または内因性の抗酸化物質により活性酸素種の消去を行い、体内の酸化・抗酸化のバランスを整える方法と、体内の抗酸化酵素の発現を活性化させる方法がある。EEP はグルタミン酸やエラスチンの添加による細胞内活性酸素種の上昇を抑制することを明らかにした (第 3 章)。EEP による活性酸素種濃度の上昇抑制では、EEP が直接活性酸素種を捕捉する場合と、細胞内の抗酸化酵素の発現を上昇させることによって活性酸素種の増加を抑制する場合が考えられる。そこで、EEP 及び保護作用の有効成分が細胞内の抗酸化システムを介して抗酸化酵素の発現を上昇させる可能性を調べた。

HT22-ARE 安定発現株を用いたルシフェラーゼアッセイでは、EEP を 8 時間または 16 時間処理した細胞において ARE プロモーターの活性化が認められた。8 時間と 16 時間で活性の程度に大差はなく、8 時間以降での経時的活性の上昇は見られないものと予想される。また、EEP の酸化ストレス誘発性細胞傷害に対する保護作用に最も寄与すると考えられる *artepillin C* を処理した細胞では、8 時間及び 16 時間のどちらの処理でも ARE プロモーター活性の上昇は認められなかった。このことから、*artepillin C* は ARE プロモーター活性を持たないことが示唆され、*artepillin C* の細胞保護作用の機序には、Nrf2-ARE 経路の活性化は関与していないと考えられた。一方、*artepillin C* と同じく、酸化ストレス誘発性細胞傷害に対する保護作用を示した *kaempferide* 及び *kaempferol* は濃度依存的に ARE プロモーター活性を有意に上昇させた。

以上の結果から、EEP の酸化ストレス誘発性細胞傷害保護作用には Nrf2-ARE 経路が関与することが明らかとなった。また、*artepillin C* の保護作用は、Nrf2-ARE 経路非依存的で、化合物自体が持つ抗酸化作用に起因すると考えられる。

プロポリスに含まれる成分は、起源植物に起因するものが多く、数百種類以上の化合物が含まれているとも報告されている (Huang et al., 2014)。本試験で被験物質とした化合物はそれらの中でも含有量が高いものだが、プロポリスの構成成分の全てが明らかになっているわけではない。そのため、未だ明らかになっていない成分や含有量が非常に少ない成分については、その生理活性は不明なままである。本試験の結果より、主要な含有成分である *artepillin C* や *kaempferide*、*kaempferol* の示す活性だけでは EEP の活性を説明することは難しい。このことから、これら有効成分は単独ではなく相互に働きかけることでその効果を高めている可能性や、未だ明らかにされていない成分の中に少量で非常に強い活性を示す化合物がある可能性が考えられる。また、今回被験物質には用

いていない dihydrokaempferide や betuletol は kaempferide や kaempferol と非常に似通った構造を有していることから、ARE プロモーター活性化作用を示すかもしれない。

Nrf2-ARE 経路の活性化に伴って発現が誘導される抗酸化酵素や第二相薬物代謝酵素について、EEP または artemisinin C を添加した細胞における発現量を調べた。その結果、EEP の添加により最も顕著に発現量の上昇が認められたのは HO-1 であった。HO-1 は抗酸化に関わる酵素として、様々な刺激によって引き起こされる酸化ストレスの制御に関わっていることが報告されているが (Nitti et al., 2018)、グルタミン酸誘発性オキシトキシスやエラスチン誘発性フェロトキシスに対する細胞保護作用における HO-1 の詳細な機能については、明らかにされていない。本試験における EEP の細胞保護作用は HO-1 の発現上昇が直接的に関わっているのかということも含めて、今後明らかにしていく必要がある。

本試験において、EEP の処理によって顕著な発現量の変化が認められたのは HO-1 のみであった。RAW264.7 細胞を用いて起源植物の異なるプロポリスの抗酸化作用を評価した Zhang らは、ブラジル産グリーンプロポリスの抽出物はラジカル消去能を有し、HO-1 に加えチオレドキシニンリダクターゼ-1 (TrxR1) や γ -グルタミルシステイン合成酵素 (γ -GCSm) の発現量を増加させることを報告した (Zhang et al., 2016)。HT22 細胞において HO-1 以外のタンパク質レベルでの発現量の上昇は認められなかったが、mRNA レベルでの変化が生じている可能性が考えられる。また、Zhang らの報告の中で TrxR1 や γ -GCSm の発現量の変化は、EEP の処理時間や濃度によって異なっている。このことから、HT22 細胞においても EEP の濃度や処理時間によって、HO-1 以外の抗酸化酵素の発現量に変化する可能性があると考えられる。EEP の酸化ストレス誘発性細胞傷害保護作用に関して、様々な条件下での遺伝子またはタンパク質レベルでの抗酸化関連酵素等の発現量に及ぼす影響を調べていくことで、より詳細な EEP の機能解析を行うことは今後の課題である。

第5章 総括

超高齢化社会に突入した我が国において、国民の健康寿命を少しでも長くし財政への負担を減らすことは大きな課題である。アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患は、その発症メカニズムの詳細が明確になっておらず根本的な治療法が確立されていない。しかしながら、その発症要因の一つには加齢や外的ストレスによる酸化ストレスの蓄積があると考えられている。本研究では、マウス海馬由来の神経細胞であるHT22細胞を用いて、ブラジル産グリーンプロポリスの内因性酸化ストレス誘発性細胞傷害に対する作用を検討した。

ブラジル産グリーンプロポリスの水抽出物 (WEP) 及びエタノール抽出物 (EEP)は、HT22細胞にグルタミン酸またはエラスチンを添加することによって生じる酸化ストレス誘発性細胞傷害 (オキシトーシス/フェロトーシス) に対し保護作用を示した。WEPとEEPの作用を比較するとEEPの方がWEPよりも低濃度で高い保護作用を示すことが明らかとなった。そのため、EEPの細胞保護作用に着目しすることとした。EEPは様々な生理活性を持つことが報告されていることから、酸化ストレスとは異なる細胞死の形態に対しても作用を示す可能性が考えられた。そこで、HT22細胞に対してスタウロスポリン、カンプトテシン、エトポシドを処理しアポトーシス様の細胞死を惹起させ、EEPの作用を調べた。その結果、EEPはアポトーシス様の細胞障害に対しては強い作用を示さないことが分かった。これらのことから、HT22細胞におけるEEPの細胞保護作用は酸化ストレスによって誘発されるオキシトーシスやフェロトーシスに対して特異的である可能性が示唆された。EEPの保護作用に関与する成分を調べるため、EEPに含まれる主要な成分である7種の化合物について、酸化ストレス誘発性細胞傷害に対する作用を評価した。被験物質として用いた7種の化合物のうちartepillin C、kaempferide、kaempferolが細胞保護作用を有することを明らかにした。保護作用を示した3つの化合物のうち、EEPに含まれる量が最も多いのはartepillin Cであり、EEPの保護作用への寄与は最も大きいことが予想された。

次に、EEP及び保護作用に関与するEEP含有成分の作用機序を明らかにするために、オキシトーシスやフェロトーシスの原因であるグルタチオンの低下や活性酸素種の蓄積、 Ca^{2+} の流入に対する各化合物の影響を調べた。その結果、EEP及び保護作用を示した成分は細胞内のグルタチオンの濃度変化には影響を示さないことが明らかとなり、細胞保護作用はグルタチオンの低下に伴って起きるさらに下流の経路に対する作用によるものであることが示唆された。グルタミン酸やエラスチンの添加に伴って生じる細胞

内の活性酸素種の蓄積やミトコンドリアにおけるスーパーオキシドアニオンの濃度上昇に対して、EEP や artemillin C、kaempferol は抑制作用を示した。Kaempferide については、細胞内活性酸素種の上昇抑制作用は見られたものの、ミトコンドリアに特異的なスーパーオキシドアニオンに対する影響については正確な評価ができなかった。EEP 及び artemillin C、kaempferide、kaempferol は細胞内の Ca^{2+} の流入に対して抑制作用を示した。さらに、EEP や含有成分は *in vitro* で SOD 様の活性を示した。これらのことから、EEP や保護作用を示した関与成分は直接的または間接的に細胞内の活性酸素種の上昇を抑制し、その結果、細胞内への Ca^{2+} 流入を阻害することにより細胞保護作用を示すと考えられる。

EEP 及び含有成分の保護作用の作用機序として、細胞内抗酸化酵素の発現制御が考えられる。そこで、細胞内の抗酸化システムのひとつである Nrf2-ARE 経路に対する EEP の作用を、HT22 細胞に ARE 配列を含むプラスミドを組み込んだ HT22-ARE 安定発現株を用いて評価した。EEP 及び kaempferide、kaempferol は濃度依存的な ARE プロモーター活性を示すことが明らかとなった。EEP の細胞保護作用に最も寄与が大きいと考えられる artemillin C による ARE プロモーター活性化は認められなかった。また、Nrf2-ARE 経路の活性化に伴い発現量が上昇する抗酸化酵素や第二相薬物代謝酵素のうち、EEP によって HO-1 の発現が顕著に上昇することが分かった。ARE プロモーターの活性が見られなかった artemillin C については、わずかな活性の上昇は見られたが統計的な有意性は認められなかった。その他 9 種の抗酸化関連酵素等の発現量変化についても検討したが、EEP や artemillin C の添加によってタンパク質レベルで発現量が変化するものはなかった。また、EEP の細胞保護作用には HO-1 の発現上昇が関わっている可能性が考えられた。

含有成分のうち、kaempferide 及び kaempferol も抑制作用を示したが、EEP に含まれる濃度を鑑みると、それらの寄与は大きくないことが示唆された。EEP には本試験で検討に用いた化合物を含め、非常にたくさんの起源植物由来の成分が含まれていることから、現在明らかになっていない化合物が少量で強い保護作用を示している可能性や、kaempferide や kaempferol の作用を増強している可能性が考えられる。プロポリスの抽出物に含まれる未知の化合物を調べ、その生理活性を明らかにすることは今後の課題である。また、本研究結果より EEP の細胞保護作用には Nrf2-ARE 経路が関与し、さらに HO-1 の発現上昇を誘発することによる可能性が示唆されたが、オキシトシスやフェロトシスに対する保護作用において HO-1 がどの程度重要であるかは明らかにされていない。オキシトシスやフェロトシスにおける HO-1 の機能について着目した研究

を行い、さらに詳細な EEP の作用解明を行う必要がある。

本研究では、EEP が選択的に内因性酸化ストレスを抑制することを示し、その有効成分を同定した。これらの作用機序を検討した結果、直接または間接的な活性酸素種の除去作用が関与することが明らかとなった。従って、EEP はアルツハイマーやパーキンソン病などの神経変性疾患をはじめ、酸化ストレスによって誘発される疾患の発症予防に役立つことが期待できる。実際に疾患の予防への応用を考えると、*in vivo* での評価は必須である。ブラジル産グリーンプロポリスの *in vivo* における抗酸化作用について、局所脳虚血マウスに対し腹腔内投与を行うことで、脳の酸化ストレスを軽減したことが Shimazawa らによって報告されている (Shimazawa et al., 2005)。本試験における *in vitro* の有効性を *in vivo* においても証明するために、動物疾患モデルの脳に対する EEP の作用について作用機序を含め明らかにしていくことは今後の課題である。

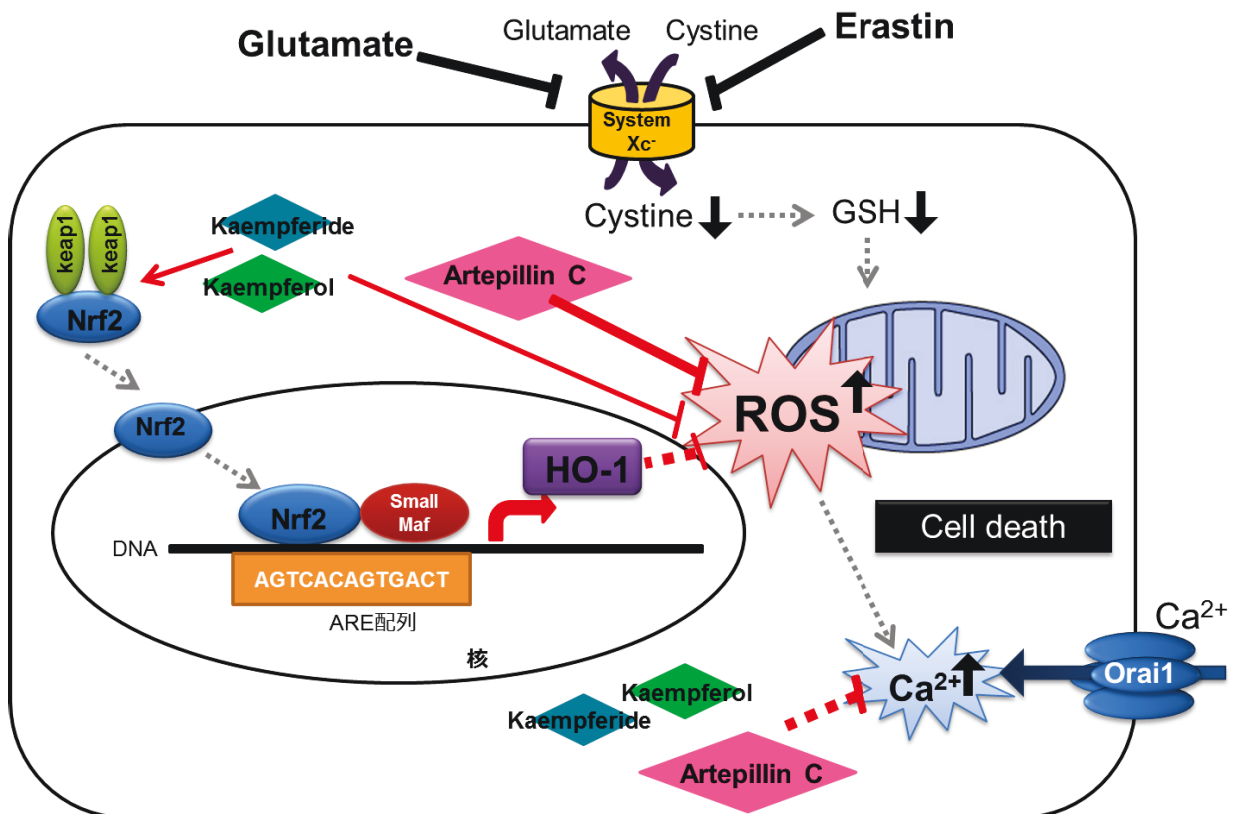


図 23. プロポリスの酸化ストレス誘発性細胞傷害保護作用機序

謝辞

本稿を終えるにあたり、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました連合創薬医療情報研究科 平田（森田）洋子教授に深甚なる謝意を表します。

本稿の作成にあたり御校閲を賜りました、連合創薬医療情報研究科 上田浩教授、竹森洋教授、田中香お里教授、大橋憲太郎准教授に深謝致します。

本研究の遂行にあたり、多くのご協力を賜りました森田研究室の皆様に深く感謝致します。

最後に、本研究の遂行並びに本稿作成の機会を与えてくださいましたアピ株式会社取締役会長 野々垣孝氏、代表取締役社長 野々垣孝彦氏、本研究遂行にあたり御指導、御助言を頂きました長良川リサーチセンター長 市原 賢二氏ならびに種々のご協力を賜りました所員諸氏に心より感謝致します。

参考文献

- Asis M (1989). “El oro púrpura de las abejas” (CIDA: Centro de Información y Documentación agropecuaria, ed.). La Habana Cuba, 11, 66.
- Alzheimer’s association (2018). 2018 Alzheimer’s disease facts and figures. *Alzheimer’s and Dementia*, 12 (4), 459–509.
- Bankova, V., Castro, S. De, and Marcucci, M. (2000). Propolis : recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, 31 (1), 3–15.
- Bankova, V., Christov, R., Kujumgiev, A., Marcucci, M. C., and Popov, S. (1995). Chemical Composition and Antibacterial Activity of Brazilian Propolis. *Z. Naturforsch*, 50c, 167 – 172.
- Bankova, V., Marcucci, M. C., Simova, S., Nikolova, N., Kujumgiev, A., and Popov, S. (1996). Antibacterial Diterpenic Acids from Brazilian Propolis. *Z. Naturforsch*, 51 c, 277–280.
- Bannai, S., and Kitamura, E. (1980). Transport interaction of L-cystine and L-glutamate in human diploid fibroblasts in culture. *The Journal of Biological Chemistry*, 265 (6), 2372–2376.
- Banskota, A. H., Tezuka, Y., Adnyana, I. K., Midorikawa, K., Matsushige, K., Message, D., and Kadota, S. (2000). Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. *Journal of Ethnopharmacology*, 72 (1–2), 239–246.
- Banskota, A. H., Tezuka, Y., and Kadota, S. (2001). Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytotherapy Research*, 15 (7), 561–571.
- Behl, C. (2000). Vitamin E protects neurons against oxidative cell death in vitro more effectively than 17- β estradiol and induces the activity of the transcription factor NF- κ B. *Journal of Neural Transmission*, 107 (4), 393–407.
- Burdock, G. A. (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and Chemical Toxicology*, 36(4), 347–363.
- Cheignon, C., Tomas, M., Bonnefont-Rousselot, D., Faller, P., Hureau, C., and Collin, F. (2018). Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer’s disease. *Redox Biology*, 14, 450–464.
- Christina, P. (2018). World Alzheimer’s report 2018. *Alzheimer’s Disease International*, 1–48.

- Dargusch, R., and Schubert, D. (2002). Specificity of resistance to oxidative stress. *Journal of Neurochemistry*, 81 (6), 1394–1400.
- Dixon, S. J., Lemberg, K. M., Lamprecht, M. R., Skouta, R., Zaitsev, E. M., Gleason, C. E., and Stockwell, B. R. (2012). Ferroptosis: An iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*, 149 (5), 1060–1072.
- Dobson, C. M. (2017). The amyloid phenomenon and its links with human disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 9 (6), 1–14.
- Dringen, R. (2000). Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progress in Neurobiology*, 62, 649–671.
- Ebadi, M., Srinivasan, S. K., and Baxi, M. D. (1996). Oxidative stress and antioxidant therapy in Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology*, 48(1), 1–19.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35 (4), 495–516.
- Finkel, T., and Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408, 239–247.
- Gilgun-Sherki, Y., Melamed, E., and Offen, D. (2001). Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology*, 40, 959–975.
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y. C., Quinlan, M., Wisniewski, H. M., and Binder, L. I. (1986). Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83 (13), 4913–4917.
- Herrera, Federico, Vanesa Martin, Guillermo García-Santos, Jezabel Rodriguez-Blanco, Isaac Antolín, and Carmen Rodriguez. (2007). Melatonin Prevents Glutamate-Induced Oxytosis in the HT22 Mouse Hippocampal Cell Line through an Antioxidant Effect Specifically Targeting Mitochondria. *Journal of Neurochemistry*, 100 (3): 736–46.
- Hissin, P. J., and Hilf, R. (1976). A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Analytical Biochemistry*, 74 (1), 214–226.
- Hsiang, Y. H., Hertzberg, R., Hecht, S., and Liu, L. F. (1985). Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *Journal of Biological Chemistry*, 260 (27), 14873–14878.

- Huang, S., Zhang, C. P., Wang, K., Li, G. Q., and Hu, F. L. (2014). Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules*, 2014, 19, 19610–19632.
- Ishiai, S., Tahara, W., Yamamoto, E., Yamamoto, R., and Nagai, K. (2014). Histone deacetylase inhibitory effect of Brazilian propolis and its association with the antitumor effect in Neuro2a cells. *Food Science and Nutrition*, 2 (5), 565–570.
- Ishige, K., D Schubert, and Y Sagara. 2001. “Flavonoids Protect Neuronal Cells from Oxidative Stress by Three Distinct Mechanisms.” *Free Radical Biology and Medicine*, 30 (4): 433–46.
- Itoh, K., Tong, K. I., and Yamamoto, M. (2004). MOLECULAR MECHANISM ACTIVATING Nrf2-Keap1 PATHWAY IN REGULATION OF ADAPTIVE RESPONSE TO ELECTROPHILES. *Free Radical Biology and Medicine*, 36 (10), 1208–1213.
- Izuta, H., Narahara, Y., Shimazawa, M., Mishima, S., Kondo, S., and Hara, H. (2009). 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity of bee products and their constituents determined by ESR. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 32 (12), 1947–1951.
- Junjun Ni, Zhu, A., Wu, Z., Meng, J., McGeer, P. L., Zhu, Y., Wu, S. (2015). The Neuroprotective Effects of Brazilian Green Propolis on Neurodegenerative Damage in Human Neuronal SH-SY5Y Cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, 1–10.
- Kang, Y., Tiziani, S., Park, G., Kaul, M., and Paternostro, G. (2014). Cellular protection using Flt3 and PI3Ka inhibitors demonstrates multiple mechanisms of oxidative glutamate toxicity. *Nature Communications*, 5, 1–12.
- Kumazawa, S., Hamasaka, T., and Nakayama, T. (2004). Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry*, 84(3), 329–339.
- Kumazawa, S., Yoneda, M., Shibata, I., Kanaeda, J., Hamasaka, T., and Nakayama, T. (2003). Direct Evidence for the Plant Origin of Brazilian Propolis by the Observation of Honeybee Behavior and Phytochemical Analysis. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 51 (6), 740–742.
- Landshamer, S., Hoehn, M., Barth, N., Duvezin-Caubet, S., Schwake, G., Tobaben, S., ... Culmsee, C. (2008). Bid-induced release of AIF from mitochondria causes immediate neuronal cell death. *Cell Death and Differentiation*, 15, 1553–1563.

- Lewerenz, J., Ates, G., Methner, A., Conrad, M., and Maher, P. (2018). Oxytosis/ferroptosis-(Re-) emerging roles for oxidative stress-dependent non-apoptotic cell death in diseases of the central nervous system. *Frontiers in Neuroscience*, 12,2014.
- Li, Y., Maher, P., and Schubert, D. (1997a). A role for 12-lipoxygenase in nerve cell death caused by glutathione depletion. *Neuron*, 19(2), 453–463.
- Li, Yonghong, Pamela Maher, and David Schubert. (1997b) Requirement for CGMP in Nerve Cell Death Caused by Glutathione Depletion.” *Journal of Cell Biology*, 139: 1317–24.
- MacHado, J. L., Assunção, A. K. M., Da Silva, M. C. P., Reis, A. S. Dos, Costa, G. C., Arruda, D. D. S., and Nascimento, F. R. F. Do. (2012). Brazilian green propolis: Anti-inflammatory property by an immunomodulatory activity. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012 (157652).
- Maher, P., and Davis, J. B. (1996). The role of monoamine metabolism in oxidative glutamate toxicity. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 16 (20), 6394–6401.
- Maher, P., and Kontoghiorghes, G. J. (2015). Characterization of the Neuroprotective Potential of Derivatives of the Iron Chelating Drug Deferiprone. *Neurochemical Research*, 40 (3), 609–620.
- Maher, P., van Leyen, K., Dey, P. N., Honrath, B., Dolga, A., and Methner, A. (2018). The role of Ca²⁺ in cell death caused by oxidative glutamate toxicity and ferroptosis. *Cell Calcium*, 70, 47–55.
- Marcucci, M. C. (1995). Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, 26 (2), 83–99.
- Marquele, F. D., Di Mambro, V. M., Georgetti, S. R., Casagrande, R., Valim, Y. M. L., and Fonseca, M. J. V. (2005). Assessment of the antioxidant activities of Brazilian extracts of propolis alone and in topical pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 39 (3–4), 455–462.
- MatÉs, J. M., Pérez-Gómez, C., and De Castro, I. N. (1999). Antioxidant Enzymes and Human Diseases. *Clinical Biochemistry*, 32 (8), 595–603.
- Motohashi, H., and Yamamoto, M. (2004). Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends in Molecular Medicine*, 10 (11), 549–557.

- Nakajima, Y., Shimazawa, M., Mishima, S., and Hara, H. (2007). Water extract of propolis and its main constituents, caffeoylquinic acid derivatives, exert neuroprotective effects via antioxidant actions. *Life Sciences*, 80 (4), 370–377.
- Nakajima, Y., Shimazawa, M., Mishima, S., and Hara, H. (2009a). Neuroprotective Effects of Brazilian Green Propolis and Its Main Constituents against Oxygen-Glucose Deprivation Stress, with a Gene-Expression Analysis. *Phytotherapy Research*, 23, 1431-1438.
- Nakajima, Y., Tsuruma, K., Shimazawa, M., Mishima, S., and Hara, H. (2009b). Comparison of bee products based on assays of antioxidant capacities. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 9, 1–9.
- Nitiss, J. L. (2009). Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 9 (5), 338–350.
- Nitti, M., Piras, S., Brondolo, L., Marinari, U. M., Pronzato, M. A., and Furfaro, A. L. (2018). Molecular Sciences Heme Oxygenase 1 in the Nervous System: Does It Favor Neuronal Cell Survival or Induce Neurodegeneration? *International Journal of Molecular Sciences*, 19, 2260–2280.
- Pallast, S., Arai, K., Wang, X., Lo, E. H., and Van Leyen, K. (2009). 12/15-Lipoxygenase targets neuronal mitochondria under oxidative stress. *Journal of Neurochemistry*, 111 (3), 882–889.
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B., and Periyasamy, L. (2015). Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 30 (1), 11–26.
- Reiss, U., and Gerson, D. (1976). COMPARISON OF CYTOPLASMIC SUPEROXIDE DISMUTASE IN LIVER, HEART AND BRAIN OF AGING RATS AND MICE. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 73 (2), 255–262.
- Salatino, A., Fernandes-Silva, C. C., Righi, A. A., and Salatino, M. L. F. (2011). Propolis research and the chemistry of plant products. *Natural Product Reports*, 28 (5), 925–936.
- Sato, H., Tamba, M., Ishii, T., Sato, H., Tamba, M., and Ishii, T. (1999). Membrane Cystine / Glutamate Exchange Proteins Cloning and Expression of a Plasma Membrane Cystine / Glutamate Exchange Transporter Composed of Two Distinct Proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 274 (17), 11455–11458.

- Seiler, A., Schneider, M., Förster, H., Roth, S., Wirth, E. K., Culmsee, C., and Conrad, M. (2008). Glutathione Peroxidase 4 Senses and Translates Oxidative Stress into 12/15-Lipoxygenase Dependent- and AIF-Mediated Cell Death. *Cell Metabolism*, 8 (3), 237–248.
- Shimazawa, M., Chikamatsu, S., Morimoto, N., Mishima, S., Nagai, H., and Hara, H. (2005). Neuroprotection by Brazilian green propolis against in vitro and in vivo ischemic neuronal damage. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2 (2), 201–207.
- Simões, L. M. C., Gregório, L. E., Da Silva Filho, A. A., De Souza, M. L., Azzolini, A. E. C. S., Bastos, J. K., and Lucisano-Valim, Y. M. (2004). Effect of Brazilian green propolis on the production of reactive oxygen species by stimulated neutrophils. *Journal of Ethnopharmacology*, 94 (1), 59–65.
- Smith, M. A., Sayre, L. M., Monnier, V. M., and Perry, G. (1995). Radical AGEing in Alzheimer's disease. *Trends in Neurosciences*, 18 (4), 172–176.
- Song, Y., Li, M., Li, J., and Wei, E. (2006). Edaravone protects PC12 cells from ischemic-like injury via attenuating the damage to mitochondria. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 7 (9), 749–756.
- Souza, R. M., de Souza, M. C., Patitucci, M. L., and Silva, J. F. M. (2007). Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Activities and Characterization of Bioactive Components of Two Brazilian Propolis Samples Using a pKa-Guided Fractionation. *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, 62 (11–12), 801–807.
- Tamaoki, T., Nomoto, H., Takahashi, I., Kato, Y., Morimoto, M., and Tomita, F. (1986). Staurosporine, a potent inhibitor of protein kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 135 (2), 397–402.
- Tan, S., Sagara, Y., Liu, Y., Maher, P., and Schubert, D. (1998). The regulation of reactive oxygen species production during programmed cell death. *The Journal of Cell Biology*, 141 (6), 1423–1432.
- Yagoda, N., Rechenberg, M. Von, Zaganjor, E., Bauer, A. J., Yang, S., Fridman, D. J., and Stockwell, R. (2007). RAS–RAF–MEK-dependent oxidative cell death involving voltage-dependent anion channels. *Nature*, 447 (7146), 864–868.
- Yang, W. S., Sriramaratnam, R., Welsch, M. E., Shimada, K., Skouta, R., Viswanathan, V. S., and Stockwell, B. R. (2014). Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4. *Cell*, 156 (1–2), 317–331.

- Zhang, J., Shen, X., Wang, K., Cao, X., Zhang, C., Zheng, H., and Hu, F. (2016). Antioxidant activities and molecular mechanisms of the ethanol extracts of *Baccharis propolis* and *Eucalyptus propolis* in RAW64.7 cells. *Pharmaceutical Biology*, 54 (10), 2220–2235.
- 朝田 隆 (2018) わが国の認知症の有病率調査 老年精神医学雑誌29 : 350–357

略語一覽

- Aif : apoptosis-inducing factor
- APS : ammonium peroxodisulfate
- ARE : antioxidant response element
- ATP : adenosine triphosphate
- Art : artemisinin
- BSO : L-buthione- (S, R) -sulfoximine
- Bac : baccharin
- Bcl : B-cell lymphoma
- Bid : BH3 interacting domain death agonist
- CAPE : caffeic acid phenethyl ester
- CAT : catalase
- cGMP : guanosine 3',5' -cyclic monophosphate
- CV : crystal violet
- DFX : deferoxamine
- DMEM : dulbecco's modified eagle's medium
- DMSO : dimethyl sulfoxide
- DMT : divalent metal transporter
- DNA : deoxyribonucleic acid
- DPPH : 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl
- Dru : drupanin
- EDTA : ethylene diamine tetra acetic acid
- EEP : ethanol extracts of Brazilian green propolis
- γ -GCS : gamma-glutamyl cysteine synthetase
- GAPDH: glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase
- GPX : glutathione peroxidase
- GR : glutathione reductase
- GSH : glutathione
- GSH : glutathione
- H₂O₂ : hydrogen peroxide
- HETE : hydroxyeicosatetraenoic acids
- HO-1 : Heme oxygenase-1

- HPO_3 : metaphosphoric acid
- IC_{50} : half maximal (50%) inhibitory concentration
- Keap1 : Kelch-like ECH-associated protein 1
- LDH : lactate dehydrogenase
- LOX : lipoxygenase
- NMDA : N-methyl-D-aspartate
- NQO-1 : NAD (P) H quinone dehydrogenase-1
- NaPB : sodium phosphate buffer
- Nrf2 : NF-E2 related factor 2
- $\text{O}_2 \cdot^-$: superoxide anion
- $\text{OH} \cdot$: hydroxyl radical
- *p*CA : *p*-coumaric acid
- PVDF : polyvinylidene difluoride
- ROS : reactive oxygen species
- SDS : sodium lauryl sulfate
- SOD : superoxide dismutases
- STEAP : six-transmembrane epithelial antigen of prostate
- TEMED: tetra methyl ethyl enediamine
- Tf : transferrin
- TfR : transferrin receptor
- Thx : thioredoxin
- ThxR : thioredoxin reductase
- VDAC : voltage-dependent anion-selective channel
- WEP : water extracts of Brazilian green propolis