

図. HMSN-P 家系 (第8家系) における 3q13.1 領域の DNA ハプロタイプの検討

Locus	Family									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
D3S3652	159	159	159	159	151	151	151	151	151	151
D3S3632	140	140	140	140	146	146	146	144	140	146
D3S1591	242	242	242	242	246	248	240	242	242	246
D3S1291	188	188	188	188	188	188	188	188	188	186
A281WA5	252	252	252	252	252	252	252	264	252	264
D3S1563	223	223	223	223	223	223	227	223	223	223
D3S3654	160	160	160	160	160	160	160	160	160	160
D3S1281	119	119	119	119	129	119	115	133	129	129
D3S3638	152	152	152	152	160	152	152	150	164	160
症例数	6	6	3	2	2	3	3	5	2	3

表. 10家系 (35例) における疾患関連ハプロタイプの比較

Abstract

Hereditary motor and sensory neuropathy with proximal dominant involvement (HMSN-P) in Okinawa
: clinical, pathological and genetic linkage studies

by

Masanori Nakagawa, Hiroshi Takashima, Masahito Suehara**, Keiko Hirata**, Masahito Ayaori,
Toshio Matsuzaki, Mineki Saito, Shuji Izumo*, and Mitsuhiro Osame

from

Third Department of Internal Medicine, *Division of Molecular Pathology and Genetic
Epidemiology, Center for Chronic Viral Diseases, Kagoshima University School of Medicine,

**Department of Neurology, National Sanatorium Okinawa Hospital.

[Purpose] We have studied the clinical, pathological and genetic features of HMSN-P.

[Materials and methods] Forty-two patients with HMSN-P and 17 normal family members in 17 families and 2 autopsied patients were examined clinically, genetically and neuropathologically. The sizes of DNA markers were determined using an ABI PRISMTM 377 DNA sequencer. Linkage analysis was performed with (CA) repeat microsatellite DNA markers mapped to the 3p14.1-3q13 region. Two-point linkage analysis was performed with the Linkage package Ver 5.1. Likelihood ratio test (LRT) were performed using the program DISLAMB version 2.1, multipoint analysis of linkage disequilibrium was carried out using DISMULT version 2.1.

[Results] The characteristic clinical and pathological findings in HMSN-P were 1) autosomal dominant inheritance, 2) adult onset slowly progressive proximal dominant atrophy, 3) obvious sensory involvement and areflexia, 4) painful muscle cramp and fasciculations 5) high incidences of elevated creatine kinase levels, diabetes mellitus and hyperlipidemia, 6) reduced or not detected SNAP, CMAP, MNCV and SNCV, 7) decreased numbers of anterior horn cells, and marked loss of myelinated fibers in posterior funiculus, roots and peripheral nerves. The maximum lod scores for DNA markers D3S3652, D3S1591 and D3S1281 were 4.63, 3.13 and 3.09, respectively. Genetic cross-over events were detected in D3S1591, D3S3638 and D3S1281 in one family. Therefore, the HMSN-P gene was suspected in the 3.1 cM interval flanked by D3S1591 and D3S1281. LRT analysis in the 9 families demonstrated significant linkage disequilibrium at D3S3652, D3S1591, D3S1291, D3S3654 and D3S3638. When linkage disequilibrium analysis was performed with DISMULT, using all 9 marker loci jointly, a lod score of 4.93 was obtained ($p < 0.00000095$).

[Discussion and conclusion] Using the LRT analysis, we demonstrated significant allelic association with the disease at 5 of 9 DNA markers located in the 3q13.1 region bracketed by D3S3652 and D3S3638. Therefore, linkage disequilibrium between HMSN-P and these DNA markers in the 3q13.1 region should be considered. This region was also identical to that revealed by haplotype analysis based on obligate recombination events in HMSN-P families. In conclusion, the HMSN-P gene most likely lies within a region of 3.1cM on chromosome 3q13.1. HMSN-P has been reported only in Okinawa. However, we believe that cloning of the HMSN-P gene will contribute to resolution of the mechanisms of other forms of neurogenic muscular atrophy.

神経変性と α -synuclein 蓄積

岩坪 威 馬場美南 小山彰比古 藤原英雄

はじめに

α -synuclein は脳に豊富に存在し、シナプス前末端に局在する可溶性蛋白質である。1997年に常染色体性優性遺伝を示す家族性パーキンソン病で α -synuclein の点突然変異が見出され¹、昨年我々は α -synuclein が孤発性パーキンソン病(PD)やLewy小体型痴呆症(DLB)に出現するLewy小体(LB)に蓄積することを示した²。本年度は α -synuclein の神経変性における役割を明らかにすることを目的に、引き続き次のような検討を行った。

対象および方法

(1) PD, DLB 以外の様々な神経変性疾患の脳に出現するLB以外の異常蓄積物に α -synuclein が存在するかどうかを検討するため、多系統萎縮症(MSA)、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、Pick病などのホルマリン固定パラフィン包埋切片を抗 α -synuclein 抗体LB509で免疫染色し観察した。

(2) 家族性アルツハイマー病(FAD)の遺伝子変異が α -synuclein 蓄積を促進するかどうかを検討するため、PS1変異を有するFAD脳前頭葉、扁桃核の標本を(1)と同様に免疫組織化学的に検討した。

(3) COS細胞に野生型及びA53T変異 α -synuclein cDNAを発現し、 α -synuclein の局在、代謝を検討した。

(4) α -synuclein に対する2種類のモノクローナル抗体を組み合わせる2抗体法ELISAの樹立を試みた。

結果

(1) MSA のオリゴデンドロサイトに出現する glial cytoplasmic inclusion が α -synuclein 陽性を示した

東京大学大学院薬学系研究科臨床薬学教室

(図1)。Pick病のPick球やALS脊髄に出現するLB-like hyaline inclusionは α -synuclein 陰性であった。(2) presenilin 1変異を有するFADの約60%で扁桃核に α -synuclein 陽性のLB及びLewy neuriteを認めた。(3) COS細胞一過性発現系では、 α -synuclein は細胞質及び核に局在し、neuro2a, HEK293恒常発現細胞では主に細胞質に局在したが、核も陽性を示した。生化学的には α -synuclein の大部分は可溶性画分に、一部は不溶性画分に回収され、ともに18 kDaの1本のバンドを示した。(4) α -synuclein の最C末端部に対するモノクローナル抗体Syn102をcapture antibody、HRPに結合した抗 α -synuclein モノクローナル抗体Syn211をdetector antibodyとする2抗体法ELISAにより、5~10 ng/ml以上の濃度域で精製 α -synuclein を定量可能な系を確立した。

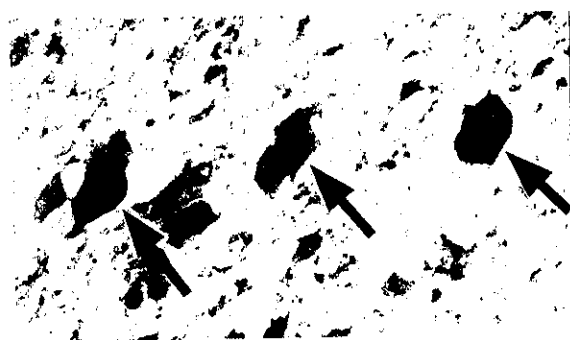


図 MSA 橋底部にみられたGCIの α -synuclein免疫染色像。 α -synuclein のN末端部分に対する抗血清#17によりGCI(矢印)が濃染している。

考察

GCIにおける α -synuclein の凝集は、LBと共に α -synuclein 蓄積の重要な一病態と考えられる。GCI

はLBと同様直径十数 nmの細線維からなる封入体であり、線維の直接の構成成分が α -synucleinか否かは今後の問題である。また従来オリゴデンドロサイトには α -synucleinの発現は確認されておらず、ニューロン変性と α -synucleinの発現・蓄積の関係についてさらに詳細な検討が必要である。

家族性ADを生じるpresenilin 1の変異は、従来A β 蓄積を促進する病的効果を有することが知られてきたが、LBにおける α -synuclein蓄積の遺伝的危険因子としても作用する可能性をはじめて指摘した。

α -synucleinを培養細胞に発現した場合、細胞質に分布すると同時に核にも局在がみられた。In vivoの脳内では α -synucleinはシナプス前末端に局在するとされ、初期に指摘された核への局在は疑問視されているが、核内に分布した分子の性質を含めて、 α -synucleinの不溶化が生じるメカニズム

をさらに追求したい。また α -synuclein定量系をさらに高感度化することにより、脳脊髄液を用いた診断への応用を試みる。

謝辞

本研究において使用したモノクローナル抗体Syn102,211を供与されたペンシルベニア大病理学教室John Trojanowski, Virginia Lee両教授に深謝します。

文献

- 1) Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy et al.: Mutation in the α -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276: 2045-2047, 1997
- 2) Baba M, Nakajo S, Tu P.-H. et al. Aggregation of α -synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy Bodies. *Am J Pathol* 152: 879-884, 1998

Abstract

α -synuclein and neurodegeneration

by

Takeshi Iwatsubo, Minami Baba, Akihiko Koyama and Hideo Fujiwara

from

Department of Neuropathology and Neuroscience,
Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo

To gain insights into the significance of α -synuclein deposition in neurodegeneration, we first examined whether α -synuclein aggregation is found in various neurodegenerative diseases other than Parkinson's disease or dementia with Lewy bodies, and showed that glial cytoplasmic inclusions found in oligodendrocytes of brains of patients with multiple system atrophy were α -synuclein-positive. We next found that α -synuclein-positive Lewy bodies are frequently present in the amygdala or other cortical areas in the brains of patients with familial Alzheimer's disease harboring mutations in presenilin genes. These findings suggest that deposition of α -synuclein occurs in wider ranges of conditions than previously expected. We then established cellular systems that transiently or stably express wild-type or A53T mutant human α -synuclein; α -synuclein was localized to cytoplasm as well as nuclei in transfected cells, and these proteins were recovered in relatively soluble fractions as a 18-kDa full-length molecule. Finally we developed a two-site ELISA system which detects 5~10 ng/ml of α -synuclein, which may serve as a powerful tool in the biochemical diagnosis of neurodegenerative disorders with α -synuclein deposition.

Alzheimer 病における A β アミロイド蓄積機構の研究

—診断・治療マーカーによる検討—

東海林幹夫, 針谷康夫, 松原悦朗, 池田将樹, 岡本幸市, 平井俊策*

はじめに

アルツハイマー病 (AD) の発症機序として, initial eventとしてのA β 42の生成亢進に始まる脳アミロイドーシスと secondary eventとしての神経原線維変化の出現 (secondary tauopathy) の重要性が明らかになりつつある。臨床的に AD の治療を考えた場合, 確実に診断し, 開発されつつある治療法を客観的に評価できる生物学的なマーカーの開発が急がれている。我々はこのために A β 40, A β 42, Tau という AD 脳に特徴的に蓄積する物質を脳脊髄液で定量する事により, 有用なマーカーとなりうることを示してきた。この結果は日本における大規模多施設共同追跡調査として発表された (GTT1)¹⁾。この GTT1 の結果はレーガン研究所の提案する厳格な基準 (Consensus Report, 1998²⁾) を満足する世界で最初にして唯一の調査である。その後, 新たな 102 例を追加して検討し, GTT1 と同様な有用性がえられたので GTT2 として報告する。

対象と方法

GTT2 では GTT1 に, さらに 102 検体を追加し, 合計 338 例の脳脊髄液を用いて検討した。その内訳は, AD 患者が 119 例,

正常対照 (tNC) が 73 例, AD 以外の痴呆疾患 (NA) が 49 例, その他の神経疾患 (ND) が 97 例であった。臨床診断は NINCDS-ADRDA 基準に基づき, MRI や SPECT 等の画像診断を併用して他の痴呆疾患を除外した。Mini-Mental State 試験 (MMSE) と Functional Assessment Staging Test (FAST) での臨床的重症度を評価した。119 例の AD 患者のうち 35 例については平均 20 ヶ月間の経過を追って検討した。AD 群と年齢相関を認める 48 歳以上の正常対照 (aNC) の平均 +2SD を用いて各マーカーのカットオフ値を設定した。tau は Innogenetics 社製 hTau EIA Kit を用いて測定した。A β 1-40 および A β 1-42 (43) は Suzuki らの方法による高感度 ELISA (BAN50 / BA27 or BC05) を用いた³⁾。統計処理には ANOVA を用いた。

結果

CSF tau

AD 群で 527.3 ± 285.6 pg/ml, aNC 群で 215.3 ± 121.3 pg/ml, NA 群で 328.6 ± 228.6 pg/ml, ND 群で 214.7 ± 133.2 pg/ml であった。AD で有意に上昇していた ($p < 0.01$)。カットオフ値は 458 pg/ml で診断感度 50%, 特異性 81% であった。tNC 群において加齢に伴う増加がみられた ($Y = 1.8X + 101$,

群馬大学医学部神経内科

* 都立神経病院

$r^2=0.11$, $p<0.01$). TauはMMSEと直線的に相関した。FASTの初期から中期にかけて増加した。tauはADの進行に伴い直線的に増加していた。

CSF A β 1-40とCSF A β 1-42(43)

A β 1-40はAD群で 1493 ± 1066 fmol/ml, aNC群で 1503 ± 949 fmol/ml, NA群で 2001 ± 1299 fmol/ml, ND群で 1458 ± 8507 fmol/mlであり, いずれの群においても有意な差をみとめなかった。A β 1-42(43)はAD群で 140.7 ± 107.9 fmol/ml, aNC群で 272.2 ± 201.4 fmol/ml, NA群で 302.0 ± 286.4 fmol/ml, ND群で 287.0 ± 203.8 fmol/mlであった。AD群では有意に低下していた($p<0.01$)。tNC群ではA β 1-40およびA β 1-42(43)のいずれも, 30歳以下の若年者群で上昇, 30歳から59歳の中年層で有意な低下を示し, 60歳以上の高齢者で再び増加した($p<0.01$, $p<0.05$)。A β 1-40とA β 1-42(43)は加齢によってU字型の生理的変動パターンを示した。A β 1-40とA β 1-42(43)の比(A β ratio; A β 1-40 / A β 1-42(43))を設定すると, AD群で 15.7 ± 8.1 , aNC群で 6.6 ± 3.2 , NA群で 8.6 ± 5.0 , ND群では 7.0 ± 5.0 であった。ADで有意な高値を示した($p<0.01$)。aNC群の平均+2SDから, 13.0をカットオフ値に設定し, 56%の診断感度, 75%の特異性をえた。またtNC群において加齢による変化はみられず, 正常では脳脊髄液中A β 1-40とA β 1-42(43)の比は一定に保たれていた。正常者ではA β 1-40とA β 1-42(43)の生成とクリアランスが厳密に制御されていると考えられた。経時的変化をみると, A β 1-40は一定の傾向を示さなかったが, A β 1-42(43)は経過を通して低い値に集中していた。

AD Index

マーカーの指標として, 脳脊髄液TauとA β ratioの積(AD Index)を用いると, AD群で 8326 ± 5944 , NC群で 1366 ± 977 , NA群で 2812 ± 2389 , ND群では 1514 ± 1973

であった。ADでは有意な上昇がみられた($p<0.01$)。カットオフ値として3320を設定すると, 診断感度77%, 特異性79%を得られ, 臨床的にも十分使用できるものと考えられた。経過を追うことにAD indexはさらなる増加を示し($Y=1632X+3089$, $r^2=0.22$, $p<0.01$), 診断感度は97%にまで改善した。

考察

脳脊髄液中におけるA β 1-40とA β 1-42(43)の比率は正常者で一定であるのに対し, ADではA β 1-42(43)の減少に伴いA β ratioの増加を認めた。この生理的な制御からの逸脱がAD発症に関係するものと考えられた。tauの増加はADでの最終段階における脳障害を反映しており, 病状の進展に伴い増加するマーカーであると考えられた。ここに示したAD Indexは最も有用であり, 現実の臨床場面で頻用されるものと考えられる。これらのマーカーによるevidence based medicineに基づいた新しいADの治療法が早急に確立されることが望まれる。

文献

1. Kanai M, Matsubara E, Isoe K et al.: Longitudinal study of cerebrospinal fluid levels of tau, A β 1-40, and A β 1-42(43) in Alzheimer's disease: a study in Japan, *Ann Neurol* 44: 17-26, 1998.
2. The Ronald and Nancy Reagan Research Institute of the Alzheimer's Association and the National Institute on Aging working group: Consensus report of the working group on: "Molecular and biochemical markers of Alzheimer's disease." *Neurobiol. Aging* 19: 109-115, 1998.
3. Shoji M, Matsubara E, Kanai M et al.: Combination assay of CSF tau, A β 1-40 and A β 1-42(43) as a biochemical marker of Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 158:134-40, 1998

Abstract

Study of A β amyloid deposits in the Alzheimer's disease.

by

Mikio Shoji, Yasuo Harigaya, Etsuro Matsubara, Masaki Ikeda,
Koichi Okamoto, Shunsaku Hirai*

From

Department of Neurology, Gunma University School of Medicine
Tokyo Metropolitan Neurological Hospital

To clarify the alterations of tau, amyloid β protein A β 1-40 and A β 1-42(43) in the cerebrospinal fluid (CSF) that accompany normal aging and the progression of Alzheimer's disease (AD), CSF samples of 119 AD patients, 35 longitudinal subjects among these 119 AD patients, 49 patients with non-AD dementia, 97 with other neurological diseases, and 73 normal control subjects from independent institutes were analyzed by sensitive enzyme-linked immunosorbent assays. Although the tau levels increased with aging, a significant elevation of tau and a correlation between the tau levels and the clinical progression were observed in the AD patients. A significant decrease of the A β 1-42(43) levels and a significant increase of the ratio of A β 1-40 to A β 1-42(43) were observed in the AD patients. The longitudinal AD study showed continuous low A β 1-42(43) levels and an increase of the ratio of A β 1-40 to A β 1-42(43) before the onset of AD. These findings suggest that CSF tau may increase with the clinical progression of dementia and that the alteration of the CSF level of A β 1-42(43) and the ratio of A β 1-40 to A β 1-42(43) may start at early stages in AD. The assays of CSF tau, A β 1-40, and A β 1-42(43) provided efficient diagnostic sensitivity (77%) and specificity (79%) by using the production of tau levels and the ratio of A β 1-40 to A β 1-42(43), and an improvement in sensitivity (to 97%) was obtained in the longitudinal evaluation.

アミロイド前駆体 APP に見い出された

神経特異的細胞死の調節性誘導機能

西本育夫

はじめに

アルツハイマー病 (A病) の病理学的特徴は、進行性の神経細胞死、神経原線維変化、細胞外老人斑沈着である。老人斑の主要成分は、 $A\beta$ である。 $A\beta$ は、APP と呼ばれる膜貫通型前駆体から産生される。少なくとも 10 の APP 分子種が確認され、それらはすべて一つの遺伝子から作られる。APP の点変異は家族性 A 病の原因であることが判明しているが、APP の点変異がどのような機構で A 病の病態を誘導するのかは不明である。

我々は、3つの A 病態のうち進行性の神経細胞死にのみ焦点を絞って、その基盤となる機構を調査してきた。その中で、家族性 A 病変異である V642I/F/G を持つ APP が、神経細胞株でアポトーシス型細胞死を誘導することを世界に先駆けて発表した (1)。又、その細胞死機構は、APP から分泌される $A\beta$ による中毒死的なものではなく、三量体 G 蛋白によって伝達される制御可能なものであることも発見し、この型の家族性 A 病における神経細胞死治療という目標が実現可能なものであることを明らかにした。

しかし、一方で、A 病の大部分を占めるのは、APP に変異を持たない弧発性 A 病であり、弧発性 A 病における神経細胞死治療こそ究極の目標となるべき課題である。そして、この課題解明の為に、弧発性 A 病において神経細胞死が惹起される機構を解決することが必要不可欠である。しかし、弧発性 A 病の中心的病因が明らかでない為、弧発性 A 病における神経細胞死の分子機構も何をどのように調べればよいのか見当がつかないのが現状である。しかし、弧発性 A 病で明確なことはいくつか存在する。

第一に、APP には変異がない。第 2 に、APP に異常が生じている。これは $A\beta$ を異常産生する APP 代謝異常という形で顕在化しているが、必ずしも APP 代謝異常が神経細胞死の原因であると考えなければならない根拠がない。従って我々は、非変異型 APP、すなわち野生型 APP の機能、とりわけ神経細胞死との関係を改めて検討することとした。

非変異型 APP の機能は、これまでほとんど解析されていない。わずかな情報の大部分は、全長の APP ではなく、APP より遊離される $A\beta$ や細胞外ドメインに相当する可溶性 APP に限られてきた。しかし、APP ノックアウトマウス (2, 3)、あるいは APP と APLP2 のダブルノックアウトマウス (4) が中枢神経系の発生障害を起こす結果が示すように、APP は、 $A\beta$ の前駆体としての病理学的な役割とは別に、正常の神経細胞機能にかかわっている可能性が高い。今回、我々は、非変異型 APP が持つ正常機能として細胞死誘導性を検討した。

材料および方法

使用した細胞、遺伝子、TUNEL 等の方法は以前に記載した (1)。細胞死は特別の記載のない限りトリパンプルー排斥法を用いて測定した。F11/APP 細胞は、ピューロマイシン耐性遺伝子 pBabe/puro と APP695 cDNA との共導入を LipofectAMINE を用いて行い、ピューロマイシンで選別し、最終的に限界希釈法を用いて樹立した。発現は APP の免疫ブロットにてモニターした。細胞死を誘導する際の抗体の処理は、血清非存在下に行った。

結果

非変異型 APP の機能を明らかにする最初のステップ

* 慶應義塾大学医学部薬理学教室

として、F11細胞にAPP695が安定的発現されているF11/APP細胞を樹立した。F11細胞は、胎生13日のラットより分離した初代培養神経細胞を神経芽細胞腫N18TG2との融合で不死化した神経細胞クローンであり、活動電位の発生を含む神経特異的機能を営む初代培養神経細胞のモデル系である(5)。F11/APP細胞に、APP1-591に対して作成されたモノクローナル抗体 α 1680で処理すると、細胞の80-90%は、抗体処理後72時間で死滅した。これとは対照的に、非特異的IgG処理ではF11/APPの細胞死はおこらず、 α 1680も親株F11では細胞死を誘発しなかった。

次に、グルタチオンビーズに、APP1-591/GST融合蛋白を固相化したビーズを用いて吸収した α 1680標品と空のグルタチオンビーズで吸収した α 1680標品を作成し、細胞に処理したところ、前者は、ほとんど細胞死を誘導できないのに対し、後者は、手を加えない α 1680と同等に細胞死を誘導した。従って、 α 1680標品の中でF11/APP細胞に働いて細胞死を誘導している成分は抗APP抗体成分である。ここでは又、細胞外ドメインに対する他の抗体であるAlz90抗体の作用、ならびに、細胞内ドメインに対する抗体であるJonas抗体の作用を検討した。Alz90抗体は α 1680の約1/2の力価でF11/APPに細胞死をもたらした。Jonas抗体は、高濃度でも無効であった。Alz90抗体は、 α 1680同様、親株F11細胞を殺せなかった。以上の結果は、抗APP抗体が、APPの細胞外領域に働くことにより細胞死を誘導することを示唆する。特に、Alz90抗体はAPPに特異的で、APPファミリーの他のメンバーを認識しない為、抗体が細胞死を誘導する分子標的はAPPである。

ここで重要なことは、抗体がAPPの細胞外ドメインに作用するのは細胞表面においてか培養液中かという問いである。最も単純な考えは、抗体が、細胞表面に発現したAPP695の細胞外領域に結合することにより細胞を殺す可能性Aである。しかし、別のより複雑な可能性Bもある。F11/APP細胞から可溶性APP (sAPP) が分泌され、分泌されたsAPPにF11/APP細胞死を防御する働きがあれば、添加された抗APP抗体によってsAPPが吸収不活化され、結果として防御因子不足による細胞死が誘導される可能性である。いずれの可能性でも抗体依存性の細胞死が誘導されるが、可能性Aの場合、APPは細胞死誘導分子であり、可能性Bの場合、APPは細胞死防御分子の前駆体として機能することになるので、この区別は極めて重要である。

いくつかの状況証拠から後者の可能性は少ないと考えられたが、厳密に区別する実験を行った。まず、

培養液の洗浄による可溶性因子除去の効果を調べた。一時間に一回の培養液洗浄を、12時間繰り返しても、細胞はほとんど死ななかった。12時間のAlz90抗体処理は、72時間の処理と同等の細胞死を引き起こすので、洗浄は抗体の効果を再現できないことになる。第2に、sAPPの抑制ペプチドの効果を検討した。二宮ら(6)はAPPの細胞外領域330-333に相当するRMSQがsAPPの神経防御作用を抑制すると報告している。もし抗体がsAPPを不活性化することにより細胞死を誘導するのであれば、RMSQの添加は、抗体と同様の効果をもたらすはずである。しかし、RMSQは細胞死を誘発しなかった。これらの結果は、抗体の細胞死作用はsAPPの不活化を介しては起こらないことを示す。

細胞表面APPへの抗体の作用を確認する為、F11/APP細胞を培養したウェルに、プロテインGビーズと予め混合したAlz90抗体を詰めたインサートを挿入する実験を行った。インサートの底面には径3 μ mのフィルターが張られている。この状態で、72時間、F11/APP細胞を培養した結果、細胞死はほとんど起こらなかった。これに対して、F11/APP細胞をグルタチオンビーズと予め混合したAlz90抗体を詰めたインサートを置いて培養したところ、ビーズなしに抗APP抗体のみをインサート上に添加した場合と同等に高い率の細胞死が起こった。他方、ビーズのみ、或いはIgGのみをインサートに添加するだけでは、細胞死は誘導されなかった。この条件では、細胞から分泌された可溶性蛋白は抗APP抗体の結合したビーズにアクセスできる。一方、ビーズはフィルターを通過できない為、ビーズに結合した抗APP抗体は、底面の細胞に直接働くことができない。Alz90抗体をビーズに結合しておくと、F11/APP細胞死が誘導されなくなる結果は、抗体が細胞死を誘導する為には、細胞表面に直接働くことが必要であることを示している。これらの証拠から、抗体は、細胞表面のAPP細胞外ドメインにアゴニストとして作用し神経細胞死を誘導していると結論できる。

最後に、抗APP抗体によって引き起こされるF11/APP細胞死の特徴を解析した。F11/APP細胞にコントロールのIgGを処理しても、核にTUNEL陽性を示す細胞はほとんどなかった。これに対して、紫外線照射はほぼ全ての細胞がDNA断片化を惹起した。この条件で、 α 1680を処理すると、80から90%の細胞が、24時間後に核DNA断片化を起した。10 μ M Ac-DEVD-CHOを α 1680と共に処理すると、20-30%の細胞にのみDNA断片化が誘導された。これらのことは、抗APP抗体が、カスパーゼ依存性DNAaseを含む遺伝的に規定されたアポトーシス誘導性プログラムを活性化することを示唆する。

180bpのDNAラダー形成の結果もTUNELの結果と全く同様であった。Ac-DEVD-CHOは、抗APP抗体による最終的な細胞死滅率をも劇的に抑制したが、細胞非透過性Ac-DEVDは無効であった。これらの結果は、抗体が細胞内装置を介してアポトーシスを誘導することを示す。抗APP抗体による細胞死を、APP695遺伝子を導入したグリオーマ細胞株Bu695(7)で検討した。Bu695細胞はF11/APP細胞とほぼ匹敵する量のAPP695を発現している。コントロールIgGと比較して、抗APP抗体は、細胞死のいずれの指標でも、Bu695細胞を全く殺せなかった。紫外線照射のBu695はアポトーシスを誘導するので、アポトーシス実行機構は備えている。つまり、APPが引き金を引くアポトーシスは、神経系細胞では活性で、グリア系細胞では非活性な細胞内シグナル伝達プログラムによって介在されることを示唆している。

考察

我々は、抗APP抗体が細胞表面APPに作用し、神経細胞特異的なアポトーシス型細胞死を引き起こすことを見出した。このことは、膜貫通型APPが神経細胞表面で機能する細胞死制御分子としての機能を持つことを意味している。家族性A病の原因であるV642変異がAPPの細胞死誘導機能を亢進状態に変えるので、APPの細胞死誘導能がA病発症機構において役割を演じている可能性が高い。ほとんどのA病がAPPに変異のない弧発性なので、神経細胞死についての野生型APPの研究は弧発性A病の分子機構の解明に不可欠である。にもかかわらず、変異を伴わない膜貫通型APPの機能に関する情報は限られてきた。最近、神経細胞に限って、APPが細胞表面に発現している事実が明らかとなり(8)、又、いくつかのグループが、*in vitro*のAPPの能力に基づき、APPを神経細胞表面で機能する受容体と推定するに及んでいる。我々は、無細胞系を用いて、野生型APP695が抗体によって調節されるシグナル伝達機能を持つこと(9)、家族性A病で発見された3つのV642変異が、これを恒常的に活性化することを世界に先駆けて、報告した(10)。又、ウイルスを用いてAPP695を初代培養神経細胞に強発現すると変性が誘導されること(11)や、野生型APPを安定的に発現したPC12細胞では、血清除去でのアポトーシスが、わずかだが有意に亢進すること(12)が報告されている。今回の結果は、これらの以前の報告の発展として、野生型APPが、神経細胞表面で機能する、リガンド調節的細胞死制御分子としての機能を持つことを証明する初めてのものである。

この研究は又、抗APP抗体によって引き起こされ

る細胞死が細胞内のアポトーシス誘導プログラムを介して起こるという直接の証拠を提示する。細胞表面Fasが特異抗体の結合に反応して、免疫細胞の細胞死を引き起こすことが確立している。Fasシステムには3つの特徴(i)抗体の誘導する細胞死はアポトーシスであること；(ii)抗体は膜貫通型分子に作用する；(iii)抗体誘導性細胞死は組織特異的]がある。抗APP抗体誘導性細胞死システムはこれらすべての特徴を満たし、膜貫通型APPが、免疫細胞におけるFasの役割と相同な役割を神経細胞において果たしていることを示唆している。APPとFasの間の細胞内領域の構造類似性の欠如は、それらが異なった細胞内機構を活性化することによってアポトーシスを誘導するという考えを支持する。この考えは、APPの家族性A病変異体がアポトーシスを誘導するのに三量体型G蛋白の $\beta\gamma$ サブユニットを活用する(13)が、このメカニズムはFasには当てはまらないという事実と符牒している。外傷や炎症がない場合、FasやTNF受容体の神経発現がない(14、15)という事実を考慮すると、今回の結論は、膜貫通型APPが、外傷や炎症がない時に観察される神経アポトーシス、例えば、中枢神経系における発生学的に制御されたアポトーシスに参与している可能性を示唆する。いづれにせよ、野生型APPが細胞死におけるFas様制御分子として機能するという結論は、A病、特に、弧発性A病の分子機構に新たな視点を提示するものである。

文献

- 1) Yamatsuji T et al. *Science* 272, 1349-1352, 1996
- 2) Muler U et al. *Cell* 79, 755-765, 1994
- 3) Zheng H et al. *Cell* 81, 525-531, 1995
- 4) von Koch CS et al. *Neurobiol Aging* 18, 661-9, 1997
- 5) Platika D et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 3499-3503, 1985
- 6) Ninomiya H et al. *J. Cell. Biol.* 121, 879-86, 1993
- 7) Hayashi Y et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187, 1249-1255, 1992
- 8) Jung SS et al. *J. Neurosci. Res.* 46, 336-48, 1996
- 9) Okamoto T et al. *J. Biol. Chem.* 270, 4205-4208, 1995
- 10) Okamoto T et al. *EMBO J.* 15, 3769-3777, 1996
- 11) Nishimura I et al. *J. Neurosci.* 18, 2387-98, 1998
- 12) Zhao B et al. *J. Neurosci. Res.* 47, 253-263, 1997
- 13) Giambarella U et al. *EMBO J.* 16, 4897-4907, 1997
- 14) Matsuyama T et al. *Brain Res.* 657, 342-6, 1994
- 15) Botchkina G et al. *Mol. Med.* 3, 765-81, 1997

Abstract

A novel function in non-mutated APP to cell-surface regulatory neuronal death

by

Ikuo Nishimoto

from

Department of Pharmacology

KEIO University School of Medicine

APP is the precursor of amyloid, a major constituent of senile plaques deposited in the brain of Alzheimer disease (AD), and is known to be located on the surface of as well as inside neurons. While we have found that familial AD-associated V642 mutants of APP cause neuronal cells to undergo apoptosis in a novel mechanism, we now investigate the normal function of non-mutated wild-type APP. For this purpose, we have examined the F11 clone, a model of primary cultured neurons immortalized by fusion with neuroblastomas, and F11 overexpressing APP695. We find that anti-APP antibody acts on the extracellular domain of APP on the cell surface and causes apoptosis in the cells of neuroblast origin, but not those of glial origin, and thus conclude that the transmembrane form of APP serves as a neuronal death regulator homologous to Fas in immune cells. This conclusion provides a novel insight into the mechanism of sporadic AD in which neuronal death occurs without mutations in APP.

DRPLA遺伝子内CAGリピートの不安定化機構の解析 -レーザーキャプチャーマイクロダイセクション法を用いた ヒト生殖細胞形成過程における検討-

滝山 嘉久¹ 迫江 公己¹ 天池 美帆¹ 井波 尚子¹ 中野 今治¹ 西澤 正豊¹ 高橋 均²

はじめに

多くのCAGリピート病では、興味深いことに、原因遺伝子内のCAGリピート数が変動し、親子間で不安定であるという共通の特徴がある。我々はこれまでCAGリピート病における原因遺伝子内のCAGリピートの不安定化機構について研究を進めてきた。一昨年は、我々がそれまでにMachado-Joseph病 (MJD) 家系の臨床遺伝学的観察により報告してきた興味ある現象¹⁾⁻³⁾をsingle spermレベルで証明して報告した⁴⁾。まず、増大したCAGリピートは、病気が父親由来であるときに特に不安定であること、次にMJD1遺伝子内の正常アリのCGG/GGG多型が増大CAGリピートの不安定性に大きく影響すること、すなわち不安定性に関与するtransのfactorが存在するであろうということについてである。また、父親由来では子供の世代での発症者と健常者の比率が1対1からかたより、有意に発症者の比率が高いというmeiotic driveの現象もspermレベルで明らかにした。そして昨年は、CAGリピート病のなかでも最も著明な表現促進現象を示すDRPLAについてのsingle spermの解析を行い、DRPLAのsingle spermにおけるCAGリピート数の分散は、他のCAGリピート病に較べて際立って大きく、DRPLAの精子形成段階ではCAGリピートの不安定性が顕著であることを報告した⁵⁾。しかし、これまでのところ、この分子機構についての詳細は不明である。

そこで今年度は、DRPLAの精子および卵子形成のどの分化段階でリピート数が不安定となるのかをレーザーキャプチャーマイクロダイセクション(LCM)法を用いて、DRPLAの剖検組織において検討した。

対象および方法

DRPLA剖検例のformalin固定後の精巣と卵巢をparaffin包埋し、厚さ10ミクロンの連続切片を作成した。次いで、脱paraffin処理後、HE染色を行った切片から、LCM100 (ARCTURUS)を用いたLCM法により、直径30ミクロンの大ききで精子・卵子の形成過程にある種々の細胞群を切り取り、single sperm analysisで報告したように⁵⁾、nested PCR法によりCAGリピート部分を増幅した。PCR産物は、ABI PRISM 310 genetic analyzerにて電気泳動し、CAGリピート数を同定した。

結果

(1) 精巣での検討

レーザービームの直径30ミクロンでは、その直径が大きすぎて、精細管の精子形成過程にある個々の細胞を切り取ることが不可能であった。そこで、内腔側と基底膜側の細胞群を切り取ってCAGリピート数を比較した。その結果、精細管の内腔側の細胞群のリピート数のほうが、基底膜側の細胞群のリピート数よりも長い傾向にあった(図-A)。

(2) 卵巢での検討

卵子形成過程の細胞群については、ある程度大きな細胞は、核を単離することが可能で、CAGリピート数を同定することができた(図-B)。

考察

今回我々は、formalin固定後の組織切片から採取した細胞(群)においても、CAGリピート数の解析が可能であることを示した。

細胞を採取するために用いたLCM法は、スライドガラス上の組織切片にレーザービームを当てて、顕微鏡下に採取したい領域の細胞を特殊な膜につけるといふもので、簡便に細胞が採取でき、このままPCR解析へと移行できる利点がある⁶⁾。

¹ 自治医科大学神経内科

² 新潟大学脳研究所神経病理学部門病理学分野

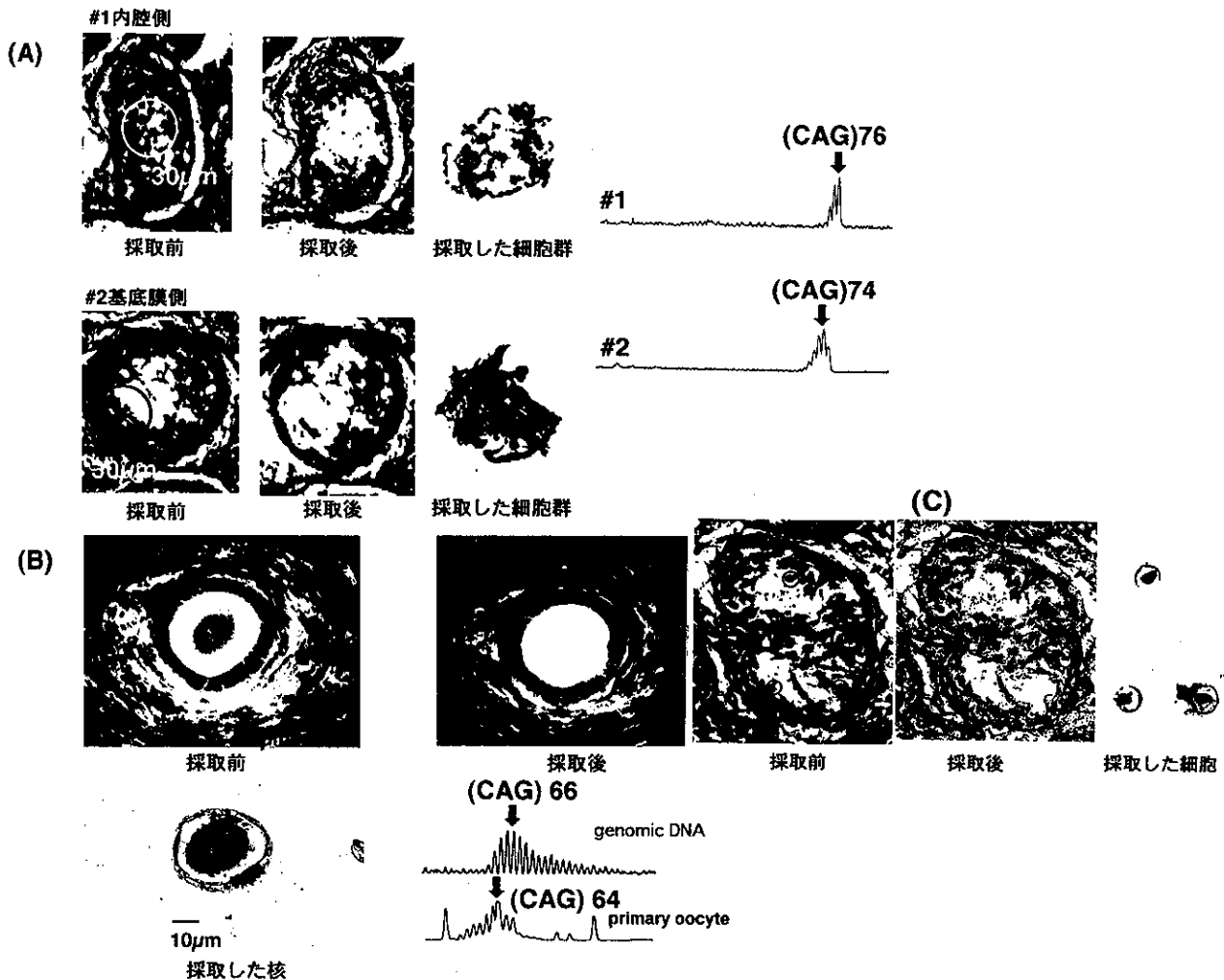


図 LCMを用いた細胞(群)の採取とCAGリピート数
 (A)精細管(LCM100) (B)卵巣(LCM100) (C)精細管(LCM200)

しかし、現時点で日本で販売されているLCM100では、細胞を切り取ることでできる範囲に制限があり、残念ながらそのスポットサイズを30ミクロン以下に絞り込むことはできない。

卵子については、LCM100を用いて、primary oocyteの核を切り取り、CAGリピート数が同定できた。しかし、今回対象とした患者の性周期にもよると思われるが、卵巣の連続切片の中に、成熟卵は存在せず、またレーザービームのスポットサイズの関係上、解析可能な細胞が少なかったため、今後の更なる検討が必要である。

正常アレルと増大アレルのPCR効率には差があり、正常アレルのPCR効率は70%程度であったが、増大アレルのPCR効率は10%程度であった。formalin固定した組織切片からとったDNAでは、約300bpよりもおきなサイズのDNAはほとんど変性していた。正常アレルのサイズは120bp程度であるが、増大アレルのサイズは300bpを越えるので、目的とするサイズの検出効率が低くなるのであろうと思われる。今後、random primerを用

いて、DNAをpreamplificationした後に、nested PCRを行う方法⁷⁾を検討する予定である。

精巣においては、精原細胞は精細管の基底層に位置しており、基本的に内腔に向かって、一次精母細胞、二次精母細胞、精細胞、精子へと分化していく。今回の検討では、精細管の内腔側の細胞群のリピート数のほうが、基底膜側の細胞群のリピート数よりも長い傾向にあった。しかし、この結果はそれぞれ種々の分化段階の細胞が混在しているので、やはり単一細胞を採取して検討する必要がある。ごく最近、米国で発売され始めたLCM200では、レーザービームの範囲を7.5ミクロンに絞り込むことが可能なので、精細管の細胞を単離することが可能である(図-C)。我々の研究室では、LCM200を導入する予定であり、今後DRPLAをはじめとするCAGリピート病の生殖細胞を単一細胞レベルで解析し、精子・卵子のどの形成段階でリピートが不安定となるのかを明らかにし、その分子機構を解明したい。

文 献

- 1) Takiyama Y, Igarashi S, Rogaeva EA, et al.: Evidence for inter-generational instability in the CAG repeat in the *MJD1* gene and for conserved haplotypes at flanking markers amongst Japanese and Caucasian subjects with Machado-Joseph disease. *Hum Mol Genet* 4: 1137-1146, 1995.
- 2) Igarashi S, Takiyama Y, Cancel G, et al.: Intergenerational instability of the CAG repeat of the gene for Machado-Joseph disease (*MJD1*) is affected by the genotype of the normal chromosome: implication for the molecular mechanisms of the instability of the CAG repeat. *Hum Mol Genet* 5: 923-932, 1996.
- 3) Ikeuchi T, Igarashi S, Takiyama Y, et al.: Non-Mendelian transmission in dentatorubral-pallidolusian atrophy and Machado-Joseph disease: the mutant allele is preferentially transmitted in male meiosis. *Am J Hum Genet* 58: 730-733, 1996.
- 4) Takiyama Y, Sakoe K, Soutome M, et al.: Single sperm analysis of the CAG repeats in the gene for Machado-Joseph disease (*MJD1*): evidence for non Mendelian transmission of the *MJD1* gene and for the effect of the intragenic CGG/GGG polymorphism on the intergenerational instability. *Hum Mol Genet* 6: 1063-1068, 1997.
- 5) Takiyama Y, Sakoe K, Amaike M, et al.: Single sperm analysis of the CAG repeats in the gene for dentatorubral-pallidolusian atrophy (*DRPLA*): the instability of the CAG repeats in the *DRPLA* gene is prominent among the CAG repeat diseases. *Hum. Mol. Genet.* (in press)
- 6) Emmert-Buck MR, Bonner RF, Smith PD, et al.: Laser Capture Microdissection. *Science* 274: 998-1001, 1996.
- 7) Zühlke C, Hellenbroich Y, Schaaff F, et al.: CAG repeat analyses in frozen and formalin-fixed tissues following primer extension preamplification for evaluation of mitotic instability of expanded SCA1 alleles. *Hum Genet* 100: 339-344, 1997.

Abstract

Analysis of the mechanism of the meiotic instability of expanded CAG repeats in the *DRPLA* gene: Laser Capture Microdissection method for germ line cells

by

Yoshihisa Takiyama¹, Kumi Sakoe¹, Miho Amaike¹, Naoko Inami¹,
Imaharu Nakano¹, Masatoyo Nishizawa¹, Hitoshi Takahashi²

from

¹Department of Neurology, Jichi Medical School

²Department of Neuropathology, Brain Institute, Niigata University

In the majority of CAG repeat diseases, there is a common phenomenon that expanded CAG repeat size in the causative gene is unstable between parents and offsprings. To investigate the mechanism of the meiotic instability of expanded CAG repeats in the gene for dentatorubral-pallidolusian atrophy (*DRPLA*), we analyzed CAG repeat sizes of the germ line cells in spermatogenesis and oogenesis from *DRPLA* autopsy tissues using Laser Capture Microdissection method (LCM).

Standard 5-10 μ m sections from formalin-fixed and paraffin-embedded testis and ovary were prepared on non coated glass slides. Sections were deparaffinized, stained with hematoxylin and eosin before LCM. The germ line cells from the glass slides were collected in the spots of 30 μ m diameter using LCM 100 (ARCTURUS). Two rounds of PCR were performed to amplify the CAG repeat lesion using the nested PCR strategy. The PCR products were then electrophoresed on an automated ABI PRISM 310 genetic analyzer, and the numbers of CAG repeats of the *DRPLA* gene in germ line cells were determined.

Results are as follows: 1) We could detect the CAG repeat sizes of the *DRPLA* gene in the germ line cells from formalin-fixed testis and ovary. 2) The laser spots of 30 μ m diameter of LCM 100 is too large to pick up a single cell from the testis. 3) The laser spots of LCM 200 (new system), which can be obtained in USA, is 7.5 μ m diameter. We showed that a single cell from the *DRPLA* testis can be picked up using LCM 200 system.

We showed that the CAG repeat sizes of the *DRPLA* gene can be detected in the germ line cells from formalin-fixed testis and ovary using LCM 100 system. Further study of single cell using LCM 200 system is required to elucidate the mechanism of meiotic instability of expanded CAG repeats during spermatogenesis and oogenesis.

歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(DRPLA)遺伝子の解析： CAG リピート伸長による神経細胞死の機構と、神経細胞死 を生じる部位の特異性の解析を目指して

山田 正夫 宮下 俊之 於保 祐子 禹 麻美
大葉 龍太郎 奥山 虎之 田所 恵子 永淵成夫

はじめに

最近の疾患遺伝子研究から、3塩基からなる反復配列の繰返し数が増加すると発症するという、新しいタイプの変異と発症機構が見出され、これまでに神経に関連する13種類の遺伝性疾患で明らかとされてきた。このうち、CAGリピートの伸長は、ハンチントン舞踏病(HD)、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(DRPLA)、脊髄小脳変性症(SCA1, SCA2, SCA3=MDJ, SCA6, SCA7)、脊髄球筋萎縮症(SBMA)の8疾患で見出され、これらは厚生省特定疾患の失調症あるいは神経変性疾患に含まれる。我々はDRPLAのリピート伸長を見出し、またDRPLA遺伝子のゲノムとcDNA構造を決定し²⁾、また伸長リピートの起源と創始者染色体を明らかにしてきた^{3,4)}。

これらの疾患はそれぞれ、脳の特定の部位を中心として神経細胞が変性死することによってそれぞれの疾患に特有な症状を呈するが、それぞれの疾患責任遺伝子は一般にどの組織でも発現しているとされる。したがって、疾患を一層理解し、また将来の治療法開発のためには、まず、神経細胞死の分子機構を明らかとし、さらに神経細胞死を生じる部位がどのようにして決定されているのかについて明らかにする必要がある。

最近、垣塚らのグループによって伸長CAGリピートを培養細胞系に導入し、伸長グルタミン鎖を持つ比較的短いペプチドを強発現させると培養細胞にアポトーシスが誘導できることが示され⁵⁾、また欧米のグループから、HDに由来する伸長CAGリピートを持ち伸長グルタミン鎖を生

成するトランスジェニックマウスではハンチントン舞踏病様の病態を呈することが報告された⁶⁾。これをきっかけとして、当研究室を含むいくつかの研究グループから一連の報告が続き、神経細胞死機構の研究が著しく進展してきた。特に、伸長グルタミン鎖は凝集体を形成することが示され、さらに疾患モデルマウスに加えて患者脳組織で核内封入体が見出され、これら疾患の発症機構として、凝集体形成によるアポトーシス誘導が中心的課題となってきた。当研究部でも、DRPLAの伸長ポリグルタミン鎖による凝集体形成を報告⁷⁾、さらにDRPLA蛋白質が一定の部位でCaspase-3によって切断を受け⁸⁾、断片化されたDRPLA蛋白質は一層凝集しやすいことなどを報告し、これらの進展に貢献した。

本研究ではこれら細胞死の機構を一層追求し、またDRPLA遺伝子の機能についても解析した。

対象および方法

主としてDRPLA遺伝子を用いて、伸長CAGリピートを強発現することによって培養細胞にアポトーシスを誘導する系を確立し、その反応を解析した。

結 果

1. 本年度、培養細胞系におけるCAGリピート強発現実験系について、一層進展させ、次の結果を得た。

1) CAGリピートを含むDNA断片を発現ベクターに連結し、培養細胞に導入して強発現させた。CAGリピートとして、DRPLA遺伝子のリピート

部分から得た、10 回および 70 回程度の CAG リピートを用いた。翻訳枠を変更し、70 回程度のポリグルタミン、ポリセリン、ポリアラニンとして強発現させたところ、いずれの場合にもアポトーシスを誘導できた。一方、同様に 10 回程度のポリグルタミン、ポリセリン、ポリアラニンとして強発現させた場合にはほとんど変化を認めなかった。また人工的に合成した他種類の 3 塩基配列リピートを用いた実験でも、調べた限り、長い場合には同様にアポトーシスを生じることを認めた。従って、ポリグルタミンに限らず、ポリセリン、ポリアラニンなど、単一のアミノ酸が 70 回程度連続するようなポリペプチド産物は細胞死を誘導できると考えられた。伸長したポリセリン、ポリアラニンを持つペプチドも凝集体を形成しやすいことを確認した。

2) SCA6 の患者では 21-27 回程度の CAG リピートを持つこと、さらには眼咽頭筋ジストロフィーでは PABP2 遺伝子の翻訳領域にある GCG リピートが 6-7 回では正常であり、患者では高々 8-13 回であること、などを合わせ考え、蛋白質産物が直接影響を及ぼすという仮説に対して、「同一のコドンを連続して、かつ高効率で翻訳すること」自身に細胞死が起因するという仮説も考えられ、それを合わせて検討してきた。

3) トランスフェクションによる DNA 断片導入法では、トランスフェクション自身による細胞死なども生じるため、実験系の改良を図り、伸長 CAG リピートの誘導発現系を確立した。テトラサイクリン添加あるいは非添加により、誘導的に CAG リピートをグルタミンに翻訳発現できる培養細胞系を作成した。この系で、凝集体形成を確認すると共に、細胞死に先だって Caspase-3, 8, 9 様の活性が上昇することを確認した。各 Caspase はプロ型として生成され、蛋白質分解酵素によって切断されることによって活性化されることが知られている。これら Caspase のうち特に Caspase-8 は伸長グルタミン鎖発現誘導後きわめて早期に切断されることを確認し、伸長ポリグルタミン鎖によるアポトーシス反応で重要な位置を占めていることがわかった。Green Fluorescent

Protein (GFP) をタグとしてつけた蛋白質の発現実験で、蛍光顕微鏡による観察では、ポリグルタミン鎖はまず細胞質に比較的均質に発現され、次第に凝集体を形成し、特に細胞核周辺に集まり、さらには細胞核内に観察されるようになってから、細胞核の断片化などアポトーシスが観察される。従って従来は細胞核での凝集体形成が必要ではないかと考えられていた。しかし、Caspase8 の切断が認められる時期には、ほとんどの細胞で大きな凝集体を形成しておらず、さらに核での凝集体は全くといっていいほど認められない。従って、顕微鏡下で認められるような凝集体が形成されるか否か、さらには細胞核に存在するか否かは本質的ではなく、凝集傾向があれば、すなわち顕微鏡下で観察できない程度の凝集体であっても、すでにアポトーシス反応が開始されている点は重要な知見である。

4) 培養細胞系における誘導発現系の構築には多大な労力が必要とされる。一方、大腸菌の系では容易である。そこで、大腸菌の系で、リピートを強制発現させ、成育に及ぼす効果などについて詳細に解析した。大腸菌では細胞死ではなく増殖遅延となるが、基本的には培養哺乳動物細胞で見られるのと同様の結果を得た。

2. DRPLA 遺伝子の機構解析

1) 酵母ツーハイブリッド系を用いてヒト胎児脳 cDNA ライブラリーを検索し、DRPLA 蛋白質と結合する約 30 種の結合蛋白候補を得た。そのうち IRSp53 について詳細に解析した。DRPLA がインスリン/IGF の下流で、シグナル伝達に関与していること、またアルギニン-グルタミン酸が交互に繰り返すモチーフを介して、相互に結合することなどを見出した。

考 察

培養細胞で見られるアポトーシスがどの程度、患者での神経細胞死を反映しているかは不明であるが、現段階では最も有力な実験系である。顕微鏡下で見られる凝集体ではなく、もっと微細な凝集体レベルで既にアポトーシスの引き金が引かれていることが判明したのは、本実験系での解

明を更に1段進めるものであった。

文 献

- 1) Nagafuchi S, Yanagisawa H, Sato K et al.: Dentatorubral and pallidolusian atrophy expansion of an unstable CAG trinucleotide on chromosome 12p. *Nature Genet.* 6: 14-18, 1994
- 2) Nagafuchi S, Yanagisawa H, Ohsaki E et al.: Structure and expression of the gene responsible for triplet repeat disorder, dentatorubral and pallidolusian atrophy (DRPLA). *Nature Genet.* 8: 177-182, 1994
- 3) Yanagisawa H, Fujii K, Nagafuchi S et al.: A unique origin and multiple process for generation of expanded DRPLA triplet repeats. *Hum. Mol. Genet.* 5: 373-379, 1996
- 4) Potter NT, Yanagisawa H, Yamada M: Different origins of expanded repeats for Haw River syndrome and dentatorubral-pallidolusian atrophy. *Lancet* 347: 1271, 1996
- 5) Ikeda H, Yamaguchi M, Sugai S et al.: Expanded polyglutamine in the Machado-Joseph disease protein induces cell death in vitro and in vivo. *Nature Genet.* 13: 196-202, 1996
- 6) Mangiarini L, Sathasivam K, Sellar M, et al.: Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell* 87:493-506, 1996
- 7) Miyashita T, Nagao K, Ohmi K, et al.: Intracellular aggregate formation of dentatorubral-pallidolusian atrophy (DRPLA) protein with the extended polyglutamine. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 249: 96-102, 1998
- 8) Miyashita T, Okamura-Oho Y, Mito Y et al.: Dentatorubral pallidolusian atrophy (DRPLA) protein is cleaved by caspase-3 during apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272: 29238-29242, 1997

Abstract

Studies on the gene and product responsible for a triplet repeat disorder, dentatorubral pallidoluysian atrophy, toward understanding of neuronal cell death at specific area of the brain

by

Masao Yamada, Toshiyuki Miyashita, Yuuko Oho, Mami U,
Ryutaro Oba, Torayuki Okuyama, Keiko Tadokoro, Shigeo Nagafuchi

from

National Children's Medical Research Center

The remarkable expansion of short stretches of trinucleotide repeats associated with diseases has emerged as one of the most fascinating phenomena in human genetics. Dentatorubral pallidoluysian atrophy (DRPLA), almost unheard of in Western countries but a little more common in Japan, has been identified by our group and independently by the Dr. Tsuji's group as the seventh member of diseases caused by triplet repeat expansion. Following the observation, the Haw River Syndrome (HRS), which occurs in a large family of African origin living at a rural area of North Carolina, has been shown to be associated with expansion of the same repeat as DRPLA by Dr. Burke's group. Since then, we have isolated and characterized cDNA and a genomic form of the DRPLA gene, characterized the DRPLA product, determined the chromosomal localization of the DRPLA gene, revealed a multistep process for generation of expanded DRPLA repeats, and detected founder chromosomes having expanded DRPLA repeats in the DRPLA patients and the Haw river patients.

Seven other disorders have so far been identified to be associated with expansion of CAG repeats, which include spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA), Huntington's disease (HD), spinocerebellar atrophy 1, 2, 3, 6 and 7 (SCA1, SCA2, SCA3=MJD, SCA6 & SCA7). These disorders are characterized by degeneration of neuron at distinctive anatomic area of the brain or other tissues, while each responsible gene is generally believed to be ubiquitously expressed. To understand the molecular mechanism of neuronal cell death as well as its tissue specificity of neuro-degeneration, we have been studying on the DRPLA gene and product with various approaches. We have found that overexpression of a relatively short peptide containing an extended polyglutamine stretch forms aggregates and induces apoptosis in transfected cultured cells. To clarify the apoptotic process, we have established cell lines which conditionally express the polyglutamine stretch with tags. In such a conditional expression system, we detected activation of caspase-8, one of the proteases involving in apoptosis, in a very early stage when the aggregate formation was not detected under a microscope. Thus, at least in these experimental systems, the initial step to trigger cell death takes place in the cytoplasm despite large aggregates are mostly detected in the nucleus.

We have also elucidated a normal function of the DRPLA product, which situates in a pathway of insulin / IGF-1 and serves a docking place for other proteins involving in transfer of the signal from the cell membrane to the nucleus.

ポリグルタミンが引き起こす神経細胞死の分子解析

垣塚 彰

目的

我々は、これまでに神経難病Machado-Joseph病の原因遺伝子を同定し、この疾患が、球脊髄性筋萎縮症やハンチントン舞踏病と同じく、原因遺伝子内のCAGの繰り返し配列の異常な伸長によって引き起こされることを明らかにした¹。これらの原因遺伝子は、それぞれがコードする蛋白質は全く異なっていたが、原因遺伝子内のCAGの繰り返し配列が共通にポリグルタミンリピートに翻訳される²。我々はこのことに着目し、伸長したポリグルタミンリピートを培養細胞に発現させると細胞がアポトーシスに陥ることを見だし、また、マウスの小脳の神経細胞に発現させると小脳の神経細胞が変性・萎縮し小脳失調を示すことを明らかにしてきた³。本研究では、ポリグルタミンを発現させる神経培養細胞系を作成し、ポリグルタミンが引き起こす神経変性の分子機構を解析することを目的とする。

研究方法

テトラサイクリン等の薬剤で遺伝子発現をコントロール出来るシステムを利用し⁴、同調してポリグルタミンを発現させる神経細胞株の樹立を試みる。そして、ポリグルタミンの発現によって引き起こされる神経細胞の形態・細胞死の生化学的な解析を行う。

結果

I. ポリグルタミンを同調的に発現させるPC12神経細胞の樹立

ラット副腎褐色細胞腫由来の神経細胞株PC12に、14(Q14)及び79(Q79)リピートからなるポリグルタミンをコードするCAGリピートをテトラサイクリンを培地から除くことで発現誘導が可能なプロモーター支配下にトランスフェクションし、その遺伝子が染色体に組み込まれた細胞株を樹立した。Q14とQ79には発現蛋白を検出するために共通のflagエピトープを付けた⁵。

大阪バイオサイエンス研究所第4研究部(分子医学)

テトラサイクリン存在下において、これらの細胞(PC12-Q14、PC12-Q79)は親株と同じく、NGF(Nerve Growth Factor)非添加では指数増殖を、NGF添加後は増殖の停止と神経様細胞への分化を示した(図1)。

テトラサイクリンを培地から除くと同時にNGF添加すると、PC12-Q14細胞は親株のPC12と同様に増殖の停止と分化を示した。一方、PC12-Q79細胞は神経様の分化を遂げながら徐々に死んでいき、Q79を誘導後96から120時間にかけて、ほとんど全ての細胞が死に絶えた(図1)。

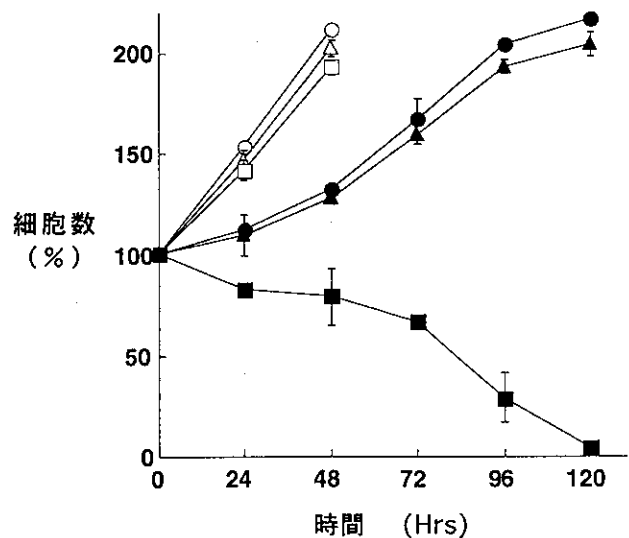


図1 ポリグルタミンを発現させたPC12細胞の増殖曲線
○PC12, tet(+), NGF(-)、●PC12, tet(-), NGF(+),
△PC12-Q14, tet(+), NGF(-)、▲PC12-Q14 tet(-), NGF(+),
□PC12-Q79, tet(+), NGF(-)、■PC12-Q79, tet(-), NGF(+)

II. 細胞内のポリグルタミンの凝集と神経細胞死

続いて、発現誘導されたポリグルタミンをflagエピトープに対する抗体で染色し、細胞内局在について解析を行った。Q79は、発現誘導から24時間後にはほぼ細胞質内に均一的に分布し、48時間後には細胞質に、96時間後には細胞質と核内に大きな凝集体として観察された⁶。このような凝集体は、PC-12-Q14細胞では観察されなかった。上述したように4日から5日後にかけて、ほとんど

すべての細胞が死滅したが、その時点で細胞をつぶさに観察すると、時折、ポリグルタミンに抵抗性を示す細胞のコロニーが見いだされた。驚いたことに、その細胞では、ポリグルタミンの凝集体は細胞質のみに存在しており、核内での凝集が見受けられなかった⁵。さらに核外移行シグナルをつないでポリグルタミンを核外に発現させたPC12細胞は細胞死を引き起こさなかった⁵。以上の結果は、核内で凝集したポリグルタミンにより何らかの細胞死シグナルが活性化され神経細胞死が誘導されることを示しており、ハンチントン舞踏病やMachado-Joseph病などのポリグルタミン病発症において、ポリグルタミンの核内凝集体が極めて重要な役割を果たしていると考えられた。

III. CPP32カスプーゼの解析

ここで樹立した細胞では、ポリグルタミンの発現及び細胞死が同調的に引き起こされるため、生化学的な解析に適している。まず、いわゆるアポトーシスに極めて重要と考えられているカスプーゼ、とくにCPP32 (caspase 3)(6)が、この細胞死の過程でどのように活性化されるかを検討した。コントロールとしてこの細胞をCaイオノフォアA23187で処理すると、処理後18時間後に於いて顕著なCPP32の活性を検出することが出来た。予期に反して、PC12-Q79細胞においてはCPP32の活性はA23187で処理した時と比べてわずかに上昇するだけであった⁵。

さらに、細胞をCPP32の阻害剤DEVD等で処理しても細胞死は抑制されなかった。この場合、核の凝集は抑制されたが細胞質の分断化は阻害されず、結果として細胞は死滅した⁵。従って、CPP32は、核の凝集やDNAのフラグメンテーションというようなアポトーシスの表現型を示すには重要であるが、細胞死のコミットメントには別の分子が関与していると考えられた。

IV. SEK1-JNK キナーゼの解析

この細胞を用いた他のアポトーシス関連物質の活性化をいろいろ解析したところ、SEK1-JNKのキナーゼカスケイドが活性化されていることが見いだされた⁵。SEK1、JNKはそれぞれMAPKK、MAPKに属するキナーゼで、種々のストレスに反応して上流のキナーゼによってリン酸化を受けて活性化される⁷。これらの活性化型キナーゼは、リン酸化されたキナーゼを特異的に認識する抗体を用いてWestern blot及び免疫染色で同定することが出来

る。Q79の発現によってJNK、SEK1ともその蛋白量にはそれほど変化を認めなかったが、Q79誘導24時間後からSEK1のリン酸化が、48時間後からJNKのリン酸化が検出された。この結果から、この系においてもSEK1-JNKのキナーゼカスケイドが順次活性化されていると考えられた⁵。もちろん、このようなSEK1-JNKの活性化はPC12-Q14細胞では認められなかった⁵。

V. 核内ポリグルタミンの凝集部位でのSEK1の活性化

続いて、免疫組織染色法をもちいてSEK1がどこで活性化を受けているかを検討した。先に述べたように、PC12-Q79細胞では、Q79発現24時間後では、ほとんどの細胞でQ79は、細胞質にとどまっている。解析の結果、そのような細胞では、活性化されたSEK1は検出されなかった。ところが、頻度は低いがいくつかの細胞でQ79が核内に凝集体を作りはじめている細胞が観察され、そのような細胞の核内で、活性化されたSEK1が検出された⁵。さらに、Q79発現72時間後では、ほとんど全ての細胞が細胞質と核内に大きなポリグルタミンの凝集体を有していたが、SEK1は核内のポリグルタミンの凝集体と一致した場所でのみ活性化を受けていることが見いだされた⁵。共焦点顕微鏡での解析では、観察した全ての細胞断面で核内のポリグルタミンの凝集部位に一致して活性化型SEK1が同定された。また、同じ場所でJNKの標的蛋白質の一つであるc-Junが活性化を受けていることが見いだされた⁵。

VI. ドミナント・ネガティブSEK1での細胞死の阻害

以上の結果は、核内でのポリグルタミンの凝集が、SEK1を活性化して細胞死シグナルを作り出しているという考えを導き出させる。したがって、続いての実験として、実際にSEK1の活性化が細胞死に繋がっているかどうかを解析した。

この実験では、SEK1の機能をブロックする変異体(ドミナントネガティブ変異体)(8)を発現させ、その結果細胞死が抑制されるかどうかの検討をおこなった。ドミナントネガティブSEK1 (DN-SEK1)を発現した細胞が判別出来るように、DN-SEK1はGFP(green fluorescent protein)のC-末端部位に融合した形(GFP-DN-SEK1)でPC12-Q79細胞に発現させた。

コントロールのGFPの発現ベクターのトランスフェクションでは、Q79誘導96時間後でGFPポジティブな細胞のおおよそ70%の細胞がアポトーシスに特徴的な形態を