

少させた状態でnecdinを共発現させたところ、約10%までさらに減少した。これらのことからnecdinにはp53の細胞増殖抑制効果に拮抗する作用は認められなかった。

5. Necdinによるp53依存性アポトーシスの抑制

U2OS細胞にp53を過剰発現させると速やかにアポトーシスが誘導される。p53単独あるいはnecdinとの共発現によるp53陽性細胞の変化を経時的に調べた。p53単独発現では遺伝子導入後60時間より陽性細胞が減少し、72時間では48時間目に比べて約20%になった。またこの時Hoechst dye染色では核内クロマチンの凝集や分裂などアポトーシスと思われる染色像を呈していた。それに対してnecdinを共発現した細胞では、遺伝子導入後72時間でも48時間目と比べて約80%の細胞が生存し、Hoechst dye染色でも多くの細胞が正常な染色像を呈していた。このことからnecdinはp53依存性アポトーシスを抑制するものと考えられた。

F. 考察

がん抑制遺伝子産物p53は、UVや各種DNA障害性薬物で発現誘導され、細胞をアポトーシスに導く蛋白質として知られている。ニューロンにおいてもadenovirusを用いたp53の過剰発現によってアポトーシスが誘導されることや、p53欠損ニューロンがグルタミン酸、カイニン酸やcamptothecinなどの薬物に対して障害の抵抗性を示すことが報告されている。Necdinがp53依存性アポトーシスを抑制することから、ニューロンにおいてもp53依存性アポトーシスを調節している可能性が示唆される。私達は、S期進行に関与する転写因子E2F1が、P19細胞でニューロンへの分化に伴って活性化されたユビキチンプロテアソームで分解をうけること、またプロテアソームインヒビターで分解を抑制したりE2F1を強制発現させることによりニューロンのアポトーシスが誘導されることを報告している。NecdinがE2F1とも結合することを考慮するとE2F依存性アポトーシスなどニューロン死の幅広い機構に関与していることが示唆される。

E. 結論

1. 酵母two-hybrid法およびin vitro 結合実験より、necdinはp53のN末端転写活性化ドメインと結合した。
2. p21/WAF1プロモーターを用いたreporter assayによりnecdinはp53転写活性を抑制した。
3. Necdinはp53依存性アポトーシスを抑制した。

F. 研究発表

1. 論文発表

Physical and functional interactions of neuronal growth suppressor necdin and p53.

H. Taniura, K. Matsumoto, K. Yoshikawa

J. Biol. Chem. 274, 16242-16248, 1999

Regulation and deregulation of E2F1 in postmitotic neurons differentiated from embryonal carcinoma P19 cells.

M. Hara-Azuma, H. Taniura, T. Uetsuki, M. Niinobe, K. Yoshikawa

Exp. Cell Res. 251, 442-451, 1999

Characterization and chromosomal mapping of a human necdin pseudogene.

Y. Nakada, H. Taniura, T. Uetsuki, K. Yoshikawa

Gene 245, 185-191, 2000

2. 学会発表

谷浦秀夫、浅野徹、松本国治、吉川和明：ニューロン増殖抑制因子necdinと核マトリックス蛋白質hnRNP-Uの相互作用
第42回日本神経化学学会大会 広島
1999. 9. 16.

松本国治、谷浦秀夫、植月太一、吉川和明：ニューロン由来の細胞増殖抑制因子necdinによる転写抑制機構
第72回日本生化学会大会 横浜
1999. 10. 8.

谷口直子、谷浦秀夫、植月太一、新延道夫、吉川和明:ニューロン特異的蛋白質necdinとカルシウム結合蛋白質nucleobindinファミリーの相互作用
第72回日本生化学会大会 横浜
1999. 10. 8.

谷浦秀夫、松本国治、吉川和明:ニューロン増殖抑制因子necdinとp53の相互作用
第72回日本生化学会大会 横浜
1999. 10. 9.

小林正克、谷浦秀夫、吉川和明:NecdinによるG1/S期移行制御機構の解析
第72回日本生化学会大会 横浜
1999. 10. 9.

G. 知的所有権の取得状況
なし

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）
分担研究報告書

APP遺伝子導入細胞に誘導される因子の探索

分担研究者 林要喜知 旭川医科大学医学部 教授

研究要旨

アミロイド前駆体蛋白質（APP）から生産されるアミロイドA β ペプチドは、老人斑の主成分であり、アルツハイマー病の病因に関わる重要な分子である。本研究では、植月、吉川らが作製したAPP遺伝子発現アデノウイルスベクターを用いて、初代培養ラット海馬ニューロンにおける変性過程を解析すると共に、ヒトアストロサイトーマにおける遺伝子発現についても解析した。

まず、初代培養ラット海馬ニューロンを調製し、1～2ヶ月の長期培養を行った。この培養系にアデノウイルスベクターを添加すると、*in vitro*で成熟したニューロンは、数日間のうちに変性、死滅した。同じ培養皿に存在する非感染ニューロンや共存するグリア細胞は、ほとんど死滅しなかった。対照実験として用いた β -galactosidaseや他の遺伝子を発現するアデノウイルス感染では、ニューロンの死滅が認められなかった。変性しつつあるニューロンでは、突起の退縮や細胞体の膨潤などが認められた。次に、このニューロンの死滅過程にどのような分子が関わっているかを明らかにするため、細胞死に及ぼすカスパーゼの関与を検討した。ウイルス感染させた後に培養ニューロンにペプチド性カスパーゼ阻害剤を作用させたところ、幾つかのカスパーゼに作用する阻害剤やカスパーゼ3の阻害剤は、APPによるニューロン死の遅延をもたらした。それゆえ、カスパーゼ3を含むカスパーゼカスケードの一部が、本ニューロン死の過程に関わっていると推測された。

次に、ニューロンの変性、死滅過程に関わる遺伝子群を明らかにするため、初代培養海馬ニューロンと同じような細胞変性を示す株化細胞があるかどうかを広く探索した。その結果、ヒトアストロサイトーマ（U373MG）の亜株の一種が培養初代海馬ニューロンと同じようにAPPにより死滅することが観察された。この細胞変性過程を詳細に解析したところ、変性が現われ始める初期には、活性酸素種の増大や細胞形態の変化が初代培養ニューロンと同じ様な時間軸であらわれ、また、細胞死がおこる直前にはIL8生産が増大することが観察された。これらのことが、アストロサイトやミクログリアだけの変化かニューロンにも認められる共通の変化であるのか、今後さらに解析したいと考えている。以上、アデノウイルスを用いたAPP遺伝子強制発現システムは、アルツハイマー病病因に関わる分子機構を解析する上で、極めて興味深い病態細胞モデル系であると考えられた。

A. 研究目的

21世紀の超高齢社会到来を目前にして、アルツハイマー病（AD）など脳変性疾患の増大は大きな社会的問題となりつつある。今日、この社会的状況に対応するためには、ADの病因を明らかにし、本質的な治療や診断法を確立することが急務である。患

者数が少ない家族性ADに関しては、現時点までのところ、原因遺伝子や危険因子の特定など目覚ましい成果が得られている。しかしながら、ADの大部分を占める孤発性アルツハイマー病に対しては、同様な研究を進めるためには大きな障壁がある。その理

由の一つには、ADの病因研究・臨床研究に必要な病態モデル動物やモデル細胞系が確立されていないこと等が挙げられる。

現在、ADの病因は、アミロイドA β ペプチドやその凝集塊である老人斑にあると考える研究者が多く、これらが脳神経細胞の変性/死滅の原因であると見なされている。そのため、その作業仮説に立脚した研究が中心に展開されているのが現状である。近年、これらの孤発性ADのモデル系が注目されている。これは、細胞変性に関わる分子機構解析が次第に進んでいるからである。例えば、ごく最近、システインプロテアーゼファミリーに属するカスパーゼ2、3、および12がアミロイドA β ペプチドによる細胞死に介在しているというデータが相次いで報告された。また、他方では、アミロイドA β ペプチド生産に関わると考えられているプロテアーゼであるセクレターゼ類の遺伝子がクローニングされたこと等が挙げられる。しかしながら、この作業仮説には、問題点や矛盾もあり、まだまだ、AD病因の全容を解明する上では、極めて多くの不明点が残されている。

一方、私達は、これまで、APP遺伝子の過剰発現やAPPの代謝異常がニューロンの細胞死を誘発するというデータを幾つかのモデル細胞系を用いた実験から得ており、むしろ、これがADの病態に近いと予想している。本研究においてこの作業仮説の正否を確かめるために、これまで分裂期終了後のニューロンにAPP遺伝子導入を可能にする実験条件を検討してきた。その結果、第一に、初代海馬ニューロンを長期培養することにより成熟ニューロンに近いモデル細胞として維持されることが明らかとなった。第二には、アデノウイルスベクターを用いることにより、それら脆弱なニューロンにAPP遺伝子を高効率に強制発現させることが可能になった。これらの手法を組み合わせることにより、上記の目的を評価する実験系が完成した。さらに、本遺伝子導入系をアストロサイトーマの亜株の一つにも応用することが可能であると判明したので、これらを用いて細胞変性に関わる分子の解析を始めた。本研究では、この新たな変性モデル系を用いた実験内容をここに報告する。

B.研究方法

<実験材料>

アミロイドA β ペプチド(1-43)はバツケム社から、ヒトアストロサイトーマ細胞株(U373MG)はATCCからそれぞれ購入した。基礎細胞培養液(DMEM及びNeurobasal Medium)、無血清培地添加物B-27、インシュリン、プロジェステロン、トランスフェリン、及び、牛胎仔血清は、オリエンタルキブコから購入した。妊娠ラット(18-19日齢ラット)は、日本SLC社より入手した。培養皿塗布物質であるポリリジンはSigma社より、コラーゲンはUpsatate社(米国)より購入した。アデノウイルスベクターおよびヒト腎臓由来の株化細胞(293細胞)は大阪大学蛋白質研究所吉川和明教授より分与された。カスパーゼ阻害剤であるZ-VAD-fmkやY-VAD-fmkはフナコシから、AC-DEVD-CHOやAC-YVAD-CHOはペプチド研究所(大阪)より購入した。ヒトIL-8およびそのモノクローナル、ポリクローナル抗体およびU373MGの亜株は、鹿児島大学村山次哉博士から供与された。その他の試薬は実験用市販品を用いた。

<培養皿塗布>

コラーゲン塗布皿を作製するために、コラーゲン原液を培養皿に薄くのぼして広げ、無菌的に保温(37℃で30分以上)し、乾燥させた。使用前には、生理食塩水(PBS)で3回洗浄した。ポリリジン塗布には、先ず、ほう酸buffer(pH8.6、150mM)にポリリジン(1mg/ml)溶解させたものを作製した。無菌フィルターで濾過滅菌したものを50倍に希釈し、培養皿に適量加え、37℃で1時間以上保温した。これらの塗布皿も、PBSで3回洗浄した後、細胞培養に用いた。

<ラット胎仔海馬ニューロンの初代培養>

ウイスターラット胎仔(18-19日齢胎仔)から海馬領域を無菌的に取り出し、0.25%トリプシンおよび0.01%DNaseの混液で室温で15分間処理し、分散細胞を得た。10%牛胎仔血清を含んだDMEMに懸濁し、細胞濃度を 10^5 細胞/mlに調製した。その後、予めポリオルニチン(20mg/ml)で塗布した24穴マルチウエル培養皿(あるいは96穴)に1ml(あるいは

100ml) ずつ添加して培養を開始した。翌日、B-27添加物を含むNeurobasal Mediumに置換し、さらに、1~2ヶ月間ほど培養を継続した。培養は、37℃、5% CO₂/空气中、十分な湿度条件下で行った。培養液の交換は、培養皿の半量を1週間ごとに交換した。

<アストロサイトーマ細胞株の培養>

ヒトアストロサイトーマ (U373MG) 細胞株の培養は、通常、10%FCSを含むDMEMを用いた。変性誘導を誘導するために、U373MG細胞 (10⁴細胞/ml) をコラーゲン塗布マルチウエル (ファルコン96穴) にまき、コンフルエントになるまで培養を続けた。その後、アデノウイルスで感染させた。

<アデノウイルス感染>

各実験には、超遠心法により精製したアデノウイルスを用いた。これらは、予め、ヒト293細胞に対するアデノウイルス感染反応を利用してウイルスタイトを測定しておいた。初代培養ニューロンをアデノウイルスで感染させるためには、先ず、各マルチウエルの培養液を半分取り出し、そこに様々な量のアデノウイルスを加えた。十分に攪拌したこれら培養液をもとのマルチウエルに戻し、12時間培養を行った。その後、細胞にとりこまれなかった遺伝子を取り除くために培養液を交換した。同様にしてU373MG細胞にもアデノウイルス感染実験を行った。

<免疫染色と生細胞のカウント>

培養細胞を固定するため、培養液と等量の固定液 (PBSで希釈した7.4%フルムアルデヒド溶液) を静かに培養系に加えた。室温で30分固定後、メタノール/アセトン混液 (-20℃) で3分固定処理を施し、0.14Mグリシンおよび、2%過酸化水素水で処理した。その後、通常の免疫染色を施した。ニューロンの生存率を測定するためには、抗Map2モノクローナル抗体を、APP遺伝子陽性細胞を検出するためにはウサギ抗APP抗体を1次抗体として用い、発色にはベクター染色キットを使用した。これらの免疫染色細胞を位相差顕微鏡あるいは蛍光顕微鏡下で観察および写真撮影した。形態学的指標により良好な生存状態の

ニューロンと変性死滅しつつあったニューロン割合を求め、各実験における生存率を算出した。有意差検定はt検定により実施した。一方、ヒトアストロサイトーマの生存率測定は、扁平な接着細胞を生細胞としてカウントし、形態が崩れた細胞や自己溶解した細胞を変性死滅細胞と見なし、両者の割合から生存率を算出した。

<活性酸素種の測定>

まず、ヒトアストロサイトーマ (3x10⁴細胞/ml) 懸濁液をコラーゲン塗布35mm培養皿 (ファルコン) にまき、コンフルエントになるまで培養した。ウイルス感染処理後、様々な時間で0.10%トリプシン処理 (室温3分) により細胞を回収した。遠心操作を2回繰り返すことで洗浄し、PBSで懸濁 (2x10⁵細胞/ml) した。その後、2',7'-dichlorofluorescein diacetateを最終濃度が7mMになるように添加した。活性酸素種の測定には、蛍光分光器 (島津RF-5300PC) を使用し、22℃での保温下でおこなった。励起波長および測光波長は各々490および526nmを用いて、活性酸素種の生産初速度を求めた。各測定は、細胞回収後20分以内に終了した。

<ELISA法によるIL-8定量>

通常のEILSA法により定量した。則ち、予め、96マイクロタイタープレートに、抗ヒトIL-8モノクローナル抗体を結合させておき、そこに、既知濃度のヒトIL-8スタンダード液あるいは培養上清を100ml添加した。4℃で一晩放置した後、十分洗浄し、ウサギ抗ヒトIL-8ポリクローナル抗体を37℃で1時間作用させた。その後、アルカリリンフォスファターゼ結合ヤギ抗ウサギ抗体 (Tago社) で37℃で2時間処理し、p-nitrophenylphosphateの発色を405nmで測定した。各サンプル中の濃度は標準曲線から求めた。

C. 研究結果

<APP遺伝子高発現による海馬ニューロン死の誘導>

私達は、これまで、アミロイド前駆体蛋白質 (APP) 遺伝子を過剰発現させた神経系株化が、産生されたAPPの細胞内蓄積や代

謝亢進と共に、変性死滅することを観察してきた。そこで、今回、まず、APPによる細胞死滅が、初代培養神経細胞においても同様に認められる現象であるか否かを検討した。この目的のため、先ず、ラット胎仔海馬ニューロンを調製し、1-2ヶ月間培養を継続した。この長期培養により著しい突起伸展やグルタミン酸に対する反応性も認められたため、未熟な胎仔ニューロンから徐々に分化成熟したニューロンに変化しつつあると考えられた。

そこで、これらニューロンにAPP遺伝子を発現するアデノウイルスを感染させ、その後数日間培養を継続した。対照群として β -galactosidase遺伝子を発現するベクターを添加した培養系では、ウイルス量を200moiまで高めても、顕著なニューロン変性や死滅は観察されなかった。一方、APP遺伝子発現ウイルスの場合は、処理後培養2日間あたりまではほとんど有為な変化が観察されなかったが、2~3日にかけて急激な細胞変性が誘導され、それらに引き続いて著しい細胞死が認められた。培養系に添加するウイルス量を低下させると、アデノウイルスに感染、あるいは非感染ニューロンをつくり出すことができるが、この場合、APP遺伝子導入された細胞のみが変性死滅した。非感染ニューロンは、 β -galactosidase遺伝子発現アデノウイルスで感染した細胞と同様に何らの変化も受けずに、良好な生存状態を続けた。また、APPによる死滅ニューロンの培養上清を他のニューロン培養系に添加しても、ニューロンの生存には大きな変化が検出できなかった。以上のことから、APP遺伝子強制発現により長期培養海馬ニューロンは、数日間に変性、死滅することが明らかになった。また、この結果は、ニューロンが放出した何らかの液性物質、例えば、アミロイドA β ペプチドなどが細胞外から作用しているものではないと考えられた。

<APPとアミロイドA β ペプチドによるニューロン死の比較>

APP分子の細胞内代謝により生産されるアミロイドA β ペプチドは老人斑の主成分であり、これまで、アミロイドA β ペプチドによる初代培養ニューロンの変性誘導が広く解析されてきた。そこで、長期培養海馬ニューロン系にアミロイドA β ペプチド

(A β ₁₋₄₃)を添加し、APPによる細胞死と比較検討した。

先ず、A β ペプチドを無菌蒸留水に懸濁し、凝集塊を形成させて培養系に添加した。その結果、これまでの多くの報告と同様に、加えたペプチド凝集塊の用量に依存して細胞死が誘導された。この場合には、ペプチド添加後約12~24時間ほどで急激な細胞死滅が誘導された。不思議なことに、ペプチド処理日数を更に3~4日延長しても、細胞死の割合には、それ程、大きな影響が認められなかった。凝集ペプチドで細胞死を誘導した培養上清を回収して新たな培養系に添加したが、この場合は全く細胞死が認められなかった。次に、培養期間と細胞変性の誘発の関係を調べたが、これらでは、ニューロンの培養期間に関係なく、A β による細胞死が誘導された。

一方、APPによる細胞死誘導の場合には、ウイルス処理前の培養期間に大きく影響した。培養期間を4週間までの培養日数では、アデノウイルス感染ニューロンは細胞変性をおこさなかった。しかし、1~2ヶ月培養した場合、APP発現ウイルスにのみ細胞毒性が認められた。 β -galactosidaseやその他の遺伝子では、細胞死は誘導されなかった。これらのことから、アミロイドA β ペプチドによるニューロンの細胞死は、ニューロンの成熟や分化状態とは関わりなくおこる急激な細胞変性であると考えられた。

<カスパーゼ阻害剤によるAPP誘導海馬ニューロン死の遅延効果>

様々な細胞死の過程に不可逆的に活性化されるシステインプロテアーゼが介在していることが明らかにされており、ごく最近では、A β によるニューロン死滅の系でも関与が報告されている。そこで、本実験系におけるニューロン死にどのようなカスパーゼが関与しているかを検討した。幾つかの阻害剤を培養系に添加してウイルス感染の1~2日後に、様々なカスパーゼ阻害剤を添加した。対照群としてこれら阻害剤を溶解させたDMSOやカスパーゼ1,4,5などの阻害剤であるY-VAD-fmkは、APPによる細胞死を全く阻止することができなかった。しかしながら、カスパーゼ3の阻害剤AC-DEVD-CHOや非特異的に多種種類のカスパーゼを抑制する阻害剤Z-VAD-fmkで

は、程度の差はあるもが、APPによる細胞死を遅延させた。また、カスパーゼ1の阻害剤AC-YVAD-CHOにも同様な傾向があったが、抑制効果は極めて弱かった。しかしながら、これらのカスパーゼ阻害剤処理では、培養日数をさらに延長させると、どの場合も細胞変性が進みニューロンは死滅した。それゆえ、カスパーゼ3を含むカスパーゼカスケードの一部が、本ニューロン変性、死滅の過程にも関わっていると推測された。

<APPによるヒトアストロサイトーマの変性誘導>

長期培養した初代培養海馬ニューロンは、定性的な実験やミニスケールの実験には都合は良いが、発現遺伝子のクローニングや生化学的な実験には不適である。そこで、アデノウイルスベクターを用いたAPP遺伝子発現により変性過程を示す株化細胞を探索したところ、ヒトアストロサイトーマ(U373MG)の亜株が培養初代海馬ニューロンと極めて酷似した変性死滅過程を示すことがわかった。

アデノウイルスによりAPP遺伝子発現を上昇させた細胞では、感染後1~2日あたりから、扁平な細胞が球状になるものが出現した。さらに時間経過やウイルス量に応じて、そのような細胞の割合が高まった。感染後6~7日では、ほとんどの細胞は死滅した。これらの変化は、APPによる細胞毒性が発揮されたためと推察されるが、ウイルスによる細胞接着性が低下したという可能性も考えられる。そこで、アデノウイルスで β -galactosidaseの遺伝子導入を行ったところ、十分な時間経過後でも、感染細胞の接着性はほとんど変化せず、良好な細胞形態を維持していた。ただ、細胞質内には、多数のリソソーム様構造が観察された。親株のU373MG細胞では、どちらのウイルス感染でも大きな変化が現れなかった。それゆえ、U373MG細胞亜株の細胞変性は、APP遺伝子高発現が引き金になって誘導されたと考えられる。

<APP遺伝子による還元酸素種の生産>

APPによるU373MG細胞亜株の細胞変性過程には、どのような分子機構が介在するかは、興味ある問題である。アミロイドA β ペプチドによるニューロンの細胞死に

は、数種のラジカルや活性酸素種の発生が上昇するという多くの報告がなされている。そこで、dichlorofluorescein diacetateを細胞にとりこませて、活性酸素種の生成速度を調べた。

APP遺伝子高発現細胞では、ウイルス感染後1日後ほどでは大きな変化が認められなかったが、細胞形態が変化し始める2~3日から、最大30%ほどの生産が増大した。その後、しばらく、この亢進状態が持続した。しかし、さらに細胞変性が進むに伴い、逆に、活性酸素種の生産速度は低下してきた。一方、 β -galactosidase遺伝子の高発現細胞やウイルス未処理の細胞では、細胞が持つ固有の生産レベルを維持した。また、ウイルス添加量との関係を調べたところ、時間軸の変化と類似した変性が認められた。それゆえ、APP遺伝子発現により何らかのラジカルあるいは活性酸素種の生産が増加し、それが細胞変性の加速に関わっていると考えられた。

<APP誘導変性細胞におけるIL-8生産誘導>

APP遺伝子の発現上昇に伴い、活性酸素種の生産増大や細胞形態の変化が認められるが、その後細胞死に至る過程までには更に1~2日間の時間経過が必要であった。一方、U373MG細胞の特徴として、IL-8遺伝子が発現する能力があることが知られている。そこで、APP遺伝子発現によりIL-8遺伝子の働きやIL-8合成が変化するか否かを調べた。まず、ウイルス感染後から同様に培養上清に含まれるIL-8活性を測定したところ、ウイルス感染5~6日にかけてIL-8の生産が急激に高まることが明らかになった。しかしながら、この反応は、対照群のアデノウイルスやU373MG細胞親株では認められなかった。また、IL-8遺伝子発現を調べたところ、3-4倍上昇していることも明らかになった。それゆえ、APPによる細胞変性過程のどこかで、IL-8のような炎症性ケモカインの産生に影響を与えたと考えられた。

D. 考察

本研究において、APP遺伝子高発現が長期培養した成熟ニューロンで誘導されると、そのニューロンは死滅することが明らか

かになった。アデノウイルスによるAPP遺伝子発現の誘導は、細胞が持つ固有の発現レベルに比べて数倍以上上昇していると考えられる。このこと自体が、実際のアルツハイマー病における病因あるいは病態と相関しているとは考えにくい。しかしながら、APPの細胞内代謝活性が低下したり、APP分子を含めた細胞内輸送機構に変化が出てきた場合には、APP遺伝子発現の上昇時と似た変化が細胞内で起こりうると推測される。それゆえ、本実験モデルは、アルツハイマー病病態の何らかの変化を反映しているAD病態モデル系と考えられる。

長期培養を施した胎仔海馬ニューロンを用いた場合、アデノウイルスによるAPP遺伝子導入効果が細胞変性として観察されたが、培養期間が1~2週間である場合、非特異的な毒性が他の遺伝子を発現するウイルスでも認められた。この理由の一つとして、培養期間が短いと神経突起の伸展が必ずしも十分ではなく、また、培養基質への結合も不十分であるためと推測される。そのため、特に高濃度のアデノウイルス感染時には接着能が低下し、細胞がはがれてしまったのであろう。何故なら、アデノウイルスが細胞に感染し、内部に運び込まれる機構に細胞接着分子であるインテグリン類(avb5やavb3)などを利用しているからである。ただ、中枢神経系ニューロンでは、必ずしも、これらのインテグリンが十分機能しているわけではない。他の一つの可能性は、胎仔由来の幼弱なニューロンが機能的にも成熟分化していることが、APPの細胞毒性が発現するためには必要であるのかも知れない。グルタミン酸の受容体などの機能は培養1~2週間のニューロンで形成されるが、さらなる成熟条件として、あるいは、加齢や老化の条件としての何かが、病態細胞モデルには必要であるのかも知れない。実際、家族性アルツハイマー病やダウン症における痴呆の発症には加齢要因が関係していると見なされている点は、この可能性を示唆している。

APPによる細胞毒性は、細胞内で生産されたアミロイドA β ペプチドが関わっていると考えられる。何故なら、APPによる本長期培養海馬ニューロンの死滅時に、細胞内にアミロイド部分を含むフラグメントが蓄積されているからである。しかしながら、細胞死が起こるためには、さらに、細

胞内における何らかの変化が引き金になっていると考えられる。このような変化の実体は現時点ではあきらかではないが、一つの可能性としては、アミロイドA β ペプチドが作用する標的分子が細胞内にいる程度蓄積する必要があるのかもしれない。あるいは、細胞内のアミロイドペプチドを分解する能力の低下が必要なのであろう。

アデノウイルスで感染したニューロンが死滅するのは、APPの生産が亢進したものだけであり、その近傍の非感染性ニューロンは、決して同じようには死滅しなかった。また、アデノウイルス感染によって死滅したニューロンの培養上清を、未処理ニューロンの培養系に添加しても、細胞死がみとめられなかった。これらのことは、APPによる細胞死誘導は、細胞毒性物質が細胞外液に放出されておこるのではないと解釈される。それゆえ、本実験系の細胞死には、アミロイドA β ペプチドが細胞外から働くという可能性は低いと考えられた。また、この結果は、APP発現アデノウイルスを直接ラット脳内に注入した実験では、対側に逆行性（あるいは順行性）にAPP分子が運ばれたニューロンにおいて主として細胞変性が認められたという吉川らの事実と矛盾しない。

それでは、なぜ、アミロイドA β ペプチドが細胞培養系ニューロンに対して細胞毒性を示すのであろうか。一般に、細胞毒性が短時間であられる条件では、これらのペプチド濃度は10mMほどであり、これは脳脊髄液中の濃度と比べ3から4オーダー高い濃度と考えられる。実際培養系に添加した場合、ペプチド凝集塊で細胞がうめ尽くされるほどの濃度である。しかも、不思議なことに、これらの実験ではペプチドをニューロンに暴露した時間に比例して細胞死がおこるのではなく、12~24時間ぐらいで認められ、その後はあまり細胞死の割合が増えないという結果が得られた。すなわち、アミロイドA β ペプチドがニューロンに始めて接した時、ある確率でアミロイドペプチドの凝集塊が細胞内に取り込まれた結果、細胞変性がおこったのではないかも考えられる。何故なら、アミロイドペプチド塊はニューロンの周囲にいくら長時間存在しても、これらは、次々に細胞死を誘発しないからである。もし、この考えが正しいとすれば、アミロイドA β ペプチドの

作用点は細胞内にあるのかも知れない。APPの細胞死が数日必要なのは、案外、この分子塊に相当する分解産物の蓄積に時間を要するためかもしれない。現在、このことを明らかにするため、標識ペプチドを用いた細胞内取り込み実験を試みている。

カスパーゼ3の阻害剤がAPPによる細胞死を遅延させたが、完全に細胞死を抑制することができなかった。この理由は定かではない。長期培養海馬ニューロンは極めて脆弱であり、ペプチド性阻害剤の処理により、様々な非特異的な作用を受けるため、生存率が低下するためかもしれない。あるいは、これらのカスパーゼ作用が細胞死に直結しているのではなく、変性死滅過程に同時におこる変化の一つかもしれない。もし、そうであれば、明解な結果が出てこないと考えられる。最近、アミロイドA β ペプチドによる細胞死にカスパーゼ3だけではなく、カスパーゼ2や12などが重要な分子であるとの報告が出されたが、細胞死のシグナルの入り方の違いにより、関与するカスパーゼカスケードも異なるのかも知れない。

アデノウイルスベクターを用いたAPPによる変性過程がヒトアストロサイトーマ(U373MG)の亜株に於いて認められた。U373MGの親株や初代培養海馬ニューロンの培養系に存在するアストロサイトには、このアデノウイルスに抵抗性であるため、ニューロンと同じような細胞死がおこらない。アストロサイトーマ亜株で反応は、何らかの原因でこの細胞がニューロン型に変化した為に認められる現象なのか、それとも、定性的には、グリア系細胞でも同じような変性過程が働いているのかは、今後、解析しなければならぬ興味ある問題である。

U373MGの亜株が、APPの発現とともに形態変化を示したり、活性酸素種の生産を高めた。この両者にはどのような相互作用があるだろうか。APP分子は一型膜蛋白質としての構造を持つから、これが細胞接着分子インテグリンに接近し、細胞接着能を変化させたのであろうか。それにより細胞形態が変化し、何らかの機構により活性酸素やラジカルの発生が上昇したのであろうか。それとも、まず、はじめに、APP代謝産物の一部が、ラジカル等の発生を高め、その結果、細胞膜や膜蛋白質の過酸化反応

を引き起こし、細胞接着が低下したとも考えられる。また、近年、活性酸素は非特異的に細胞内分子を酸化するばかりではなく、特定の遺伝子発現を高める作用があることが明らかになってきた。U373MGの亜株におけるカスパーゼの活性化については検討していないが、ヒトNT-2細胞におけるカスパーゼの活性化と時間的な対応があることから(Uetsuki1999)、カスパーゼの標的として、APPやインテグリンなどの接着分子が変化したためかもしれない。

APPによりIL-8遺伝子発現上昇およびその分泌量の増大が認められたが、これは2次的な間接作用であると考えられる。何故なら、APP内蓄積とIL-8遺伝子発現には、少なくとも見て2~3日間の時間的ずれがあるからである。しかし、近年、アミロイドA β ペプチドによっても、IL-8のみならず幾つかのサイトカインやケモカインの産生誘導がなされると報告された。この場合も、IL-8誘導までの時間経過が本実験の結果と類似している。これは、直接的には、IL-8遺伝子発現に関わっているのがAPPではなく、その細胞内代謝産物であることを示唆している。もし、そうであれば、アミロイドA β ペプチドなどの特定の産物が細胞内にあるレベル以上蓄積することが、これらケモカインの遺伝子発現により密接にリンクしているかもしれない。勿論、細胞外のアミロイドA β ペプチドが効率的に細胞内に入る可能性は考えにくいから、おそらくは、APP産生を刺激して細胞内でできたその産物が働くとも考えられる。

APP遺伝子によるIL8生産増大はニューロンの細胞死にとりどのような意味を持っているのだろうか。ケモカインの産生増大は脳における炎症誘発を想像させる。アミロイドA β ペプチドの場合、ミクログリアがこれらの産生に関与することが知られているが、ニューロン死滅場所の微少環境は、常に、炎症状態と類似した諸反応が起きているのかもしれない。ただ、APPによるU373MGの亜株細胞での変化が、実際に、アストロサイトやミクログリアに起こる変化だけなのか、あるいは、ニューロンにも認められる共通の変化であるのか、今後さらに解析したいと考えている。いずれにしろ、APP遺伝子の高発現にともなう下流における反応解析は、APPによる細胞死の阻止という観点からは、極めて重要な意味を

持つと考えられる。現在、幾つかのAPP変異体を用いて、ニューロンやグリアの細胞死誘導のみならず、カスパーゼ活性化、細胞接着、その他のサイトカイン遺伝子の誘導、あるいは、新規遺伝子の活性化について検討を加えている。

E. 結論

長期初代培養されたラット海馬ニューロンは、*in vitro*条件下で、十分成熟・分化した分裂終了期ニューロンであると考えられる。これらのニューロンにアデノウイルス感染によりAPP遺伝子を強制発現させると、ニューロンは変性を開始し数日間のうちに死滅した。この細胞死は、細胞外に添加されたアミロイドA β ペプチドによる急激な細胞死とは異なり、徐々に、突起の退縮や細胞体の膨潤などが認められる変性過程を示した。それゆえ、アルツハイマー病態の一部あるいは病態の重要な変性過程を反映する可能性の高い実験系と考えられた。本ニューロンの変性過程には、カスパーゼ3を含むカスパーゼカスケードが関わっていると推測されたが、この点に関しては、今後さらに詳細な検討が必要であると思われる。

一方、ヒトアストロサイトーマ(U373MG)の亜株においても、長期海馬ニューロンと酷似した変性過程がAPP遺伝子発現により認められた。この株化細胞の変性過程には、活性酸素種の生成、細胞形態の変化、さらには、IL8生産の増大が観察されたことから、これらが、APP発現から細胞死にいたる分子機構解析のための重要な手がかりとなると考えられた。以上、アデノウイルスを用いたAPP遺伝子強制発現システムは、アミロイドA β ペプチドとは異なるアプローチを可能にするアルツハイマー病病態細胞モデル系であり、病因の解析のみならず、アルツハイマー病治療薬評価系としても期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

該当なし。

2. 学会発表

村瀬真一、林要喜知(1999) 中枢神経系における接着分子の遺伝子発現
第46回マトリクス研究会抄録集46, pp16
(愛知県瀬戸市、6月8-9日)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし。