

厚生科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

高齢者の精神機能老化機序とその対策に関する

精神神経免疫学的研究

平成12年度 総括研究報告書

主任研究者 武田 雅俊

平成13年(2001)年 3月

## 目 次

### I. 総括研究報告

- 高齢者の精神機能老化機序とその対策に関する精神神経免疫学的研究…… 1  
武田 雅俊

### II. 分担研究報告

1. 脳血流低下状態における神経細胞機能とストレス応答蛋白の研究…… 9  
武田 雅俊
2. アルツハイマー病におけるNK細胞活性とサイトカインの産生能の変化  
に関する研究…… 13  
新井 平伊
3. 老化とストレス反応性に関する研究…… 17  
神庭 重信
4. 高齢者の精神機能老化機序の解明とその対策に関する研究…… 21  
山脇 成人

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表…… 23

### IV. 研究成果の刊行物・別刷…… 24

厚生科学研究費補助金(長寿科学総合研究事業)

総括研究報告書

## 高齢者の精神機能老化機序の解明とその対策に関する精神神経免疫学的研究

主任研究者 武田雅俊 大阪大学大学院医学系研究科神経機能医学講座教授

高齢者の精神機能老化の機序を解明する目的で、アルツハイマー病における免疫能の変化、アポトーシス関連遺伝子の老化に伴う変化、老化に伴う CREB のリン酸化やサイトカインの変化、プレセニン1と小胞体ストレス反応の関連と言うテーマに絞り、精神神経免疫学的立場から検討を加えた。これらの研究から、老年者に認められる認知機能と感情障害発生機序の生物学的基盤の一端が明らかとなった。引き続きこのような検討を進めることで老化に伴う精神機能障害を予防する方策が開発可能であることが示された。

キーワード: 老化、アルツハイマー病、ナチュラルキラー細胞、サイトカイン、CREB、小胞体、ストレス

### 研究組織

主任研究者: 武田雅俊

(大阪大学大学院医学系研究科教授)

分担研究者: 新井平伊

(順天堂大学医学部教授)

分担研究者: 山脇成人

(広島大学医学部教授)

分担研究者: 神庭重信

(山梨医科大学教授)

しかし、脳の老化過程により精神機能が低下すると考えられているものの、その機序については今なお断片的な知見しかない。従って、老年者に見られる認知障害や感情障害の機序を生物学的基盤をもって検討することは重要である。本研究は、高齢者の精神機能老化について精神神経免疫学的に様々な角度から検討し、予防策を開発することを目的とした。

### B. 研究方法

この研究課題は、臨床的な老年期痴呆の症候学蓄積と近年のめざましい精神神経免疫学がくみ合わさって初めて可能になると考えられる。従って、本研究では臨床研究と基礎研究が有機的に統合されるような班員構成とし、基礎・臨床の研究成果を統合して新たに知見が得られるよ

### A. 研究目的

高度な高齢化社会を迎え、老年期精神障害に対する対策はその有病率の高さから、社会的急務と言える。これまでの臨床研究により、老年期精神障害の特徴が明らかにされ、その診断法や対処法についても一定の進展が認められている。

うにした。

新井班員は、30名のアルツハイマー病(AD)患者と30名の年齢及び性別をマッチさせた健康対照者のナチュラルキラー細胞活性(NK活性)、NK細胞数、及びサイトカイン産生能について測定し比較した。山脇班員は、老齢ラット及び成人期ラットを対象に慢性多様性ストレスを行い、大脳皮質前頭部・海馬でのアポトーシス関連遺伝子(Bcl-2、Bax)の発現を検討した。神庭班員は、老齢及び若齢ラットを用いて恐怖条件付けにおけるphospho-cAMP-responsive element binding protein(pCREB)陽性細胞の老化による変化について検討した。また、脳内サイトカインの拘束ストレスに対する反応性を老齢及び若年ラット群で比較を行った。武田班員は、家族性アルツハイマー病(FAD)の原因遺伝子プレセニリン1(PS1)の変異と小胞体(ER)ストレスセンサーであるPERKの活性化について検討した。

### C. 研究結果

(1)アルツハイマー病(AD)におけるNK細胞活性とサイトカインの産生能の変化に関する研究(新井班員)

血清中のNK細胞活性は男性群、女性群ともに健康対照者(HC)群に比して、AD群で統計学的有意差をもって低下が認められた。一方、NK細胞数は2群間に有意差は認められなかった。しかし、NK細胞活性値をNK細胞数で除したNK細胞1個あたりのNK細胞活性は健康対照者群に比して、AD群で統計学的有意差をもって低下が認められた。また、サイトカイン産生能

は、IFN- $\gamma$ はHC群に比して、AD患者群で統計学的有意差をもって低下が認められた。IL-2、IL-6で健康対照者群に比して、AD群で統計学的有意差をもって増加が認められた。その他のサイトカインに関して有意差は認められなかった。

(2)老齢ラットのアポトーシス関連遺伝子からみた脆弱性の検討(山脇班員)

老齢ラットでの、慢性多様性ストレスによる大脳皮質前頭部及び海馬のBcl-2、Bax mRNAの発現を検討したが、対照群との間に有意な差はみられなかった。Bcl-2、Baxのimmunoreactivityの慢性多様性ストレスによる影響を同じく大脳皮質前頭部及び海馬で検討したが、有意な差はみられなかった。

(3)恐怖条件付けにおけるphospho-cAMP-responsive element binding protein(pCREB)陽性細胞の老化による変化(神庭班員)

学習直後ではすくみ行動(%freezing)は高週令、低週令で差は認められなかったが、1時間後で低週令群で有意に増加していた。また、pCREB陽性細胞数も海馬CA1領域において低週令群で有意に陽性細胞数の増加が認められた。

(4)脳内サイトカインのストレス反応性の変化に対する老化の影響(神庭班員)

若令ラットでは、線条体で、30分と120分以降で有意に( $P < 0.05$ )負荷前と比較してTNF含量が増加し、ストレスによって、TNFが線条体で変化して行くことが明らかとなった。また、老令と若令の比較では、線条体、視床下部において基

礎値で、老令群で有意に TNF 含量が小さかった。

(5) 変異プレセニン1がもたらす小胞体ストレス脆弱性について(武田班長)

PERK の活性化について、MOCK、野生型 PS1、変異型 PS1( $\Delta E9$ ) 導入細胞について、 $1\ \mu\text{M}$  thapsigargin または  $1\ \mu\text{M}$  DTT で刺激を加えたものを、5分から30分まで検討すると、MOCK 及び野生型 PS1 では刺激後 15 分で PERK の完全なリン酸化が見られたのに対し、変異型ではリン酸化の遅延が観られた。更に、PERK の下流にある eIF2  $\alpha$  について検討すると、 $1\ \mu\text{M}$  thapsigargin 刺激後、MOCK 及び野生型で、15 分後に eIF2  $\alpha$  の完全なリン酸化が観られたのに対し、変異型では、リン酸化の遅延が観られた。

#### D. 考察

神経細胞内の情報伝達系に関するセカンドメッセンジャー、蛋白のリン酸化・脱リン酸化、核内転写因子などと共に、各種ストレス蛋白の動態は精神機能の老化過程の生物学的基盤として重要な要素と考えられる。また近年、神経細胞と免疫細胞とのクロストークが明らかにされ、神経ペプチドやサイトカインを介してお互いが調節を受けているとされ、これらも老化と密接に絡む問題と考えられている。本研究では、このような背景をふまえて、脳の老化過程における生物学的基盤を明らかにし、精神機能老化による認知障害・感情障害の発症機序を明らかにしようとした。

まず、AD 患者の免疫能変化について検討した。AD における NK 細胞活性の低下についての

メカニズムについては明らかではないが、いくつかの仮説がある。一つは AD において血小板膜の異常が認められるのと同様に NK 細胞を含めたリンパ球の膜に異常があり、それによりキラー活性が低下するという説である。二つめの仮説は、NK 細胞内でのサイクリック AMP レベルの異常や細胞内カルシウムイオンチャンネル( $\text{Ca}^{++}$ )の透過性の異常など、NK 細胞内での代謝異常があるという説がある。

アポトーシス関連遺伝子発現に対する老化の影響についても検討した。今回の研究結果は、成人期及び老齢ラットに適応困難な多様性ストレスを慢性に投与しても、ストレス負荷による大脳皮質前頭部・海馬の Bcl-2, Bax の mRNA レベル及び immunoreactivity レベルは変化しないことを示していた。ストレスに伴う細胞障害の形成過程には、興奮性アミノ酸刺激による NMDA 受容体を介した細胞内カルシウムの濃度亢進や、グルココルチコイド亢進によるグルコースの取り込み低下による変性メカニズムなどが報告されている。その一方で高齢者にみられるストレス脆弱性の発現に関しては、同一ストレスが成人期に暴露された場合と異なる遺伝子発現変動による機能障害の関与の可能性もある。

CREB やサイトカインの誘導に対する老化の影響についても検討した。低週齢ラットにおいて認められた、すくみ行動の変化と pCREB 陽性細胞の CA1 での増加が、老齢ラットではみとめられなかった。CREB のリン酸化が学習に関係していると考えられていることから、我々の結果は、老化による学習機能の低下に CREB リン酸化の低下が関与している可能性を示していると考えら

れた。また、脳内のサイトカインの変化については、これまでストレスとインターロイキン $1\beta$ に関する報告が多く、今回我々が調べたTNFに関する報告は少ない。今回脳内のいくつかの部位でTNFの含量が老化によって変化していることは、老化によるHPA系やその他の脳機能の変化を考える上で興味深いものと考えられた。

変異体PS1と小胞体ストレス反応に及ぼす影響についても検討した。今回PERKで観られた反応阻害は、これまでに示されたように、IRE1とPS1において観られた結果と同様で、PS1の変異が、UPRを障害し、ERのストレスセンサーを介した経路を阻害している事が考えられる。これは、様々なERストレスに対し、PS1の変異体は脆弱性をもたらすことを示唆するものである。この機作は、変異型PS1がもたらす神経細胞変成過程を説明できるかもしれない。

## E. 結論

- (1) ADではNK活性の低下、 $IFN-\alpha$ の上昇、 $IL-2$ ・ $IL-6$ の上昇を認め、免疫能の変化が生じていることが示唆される。
- (2) 成人期・老年期ラットで、慢性ストレスによる海馬神経細胞の変性が、アポトーシスとは関連のないメカニズムで引き起こされることが示唆される。
- (3) 老化における記憶障害にCREBリン酸化の影響があることが示唆された。
- (4) 老齢ラットはTNFの含量が少なく、ストレスによる含量増加が小さいことが示唆される。
- (5) 変

異型PS1はERストレスに対する反応を抑制し、これがストレス脆弱性をもたらすと考えられる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- (1) 神庭重信他：情報記憶と海馬．日薬誌，116:111-115, 2000.
- (2) Takashi Kudo, et al: Are cerebrovascular factors involved in Alzheimer's disease?. Neurobio.Aging 21, 215-224, 2000
- (3) 工藤 喬他：プレセニリン蛋白の病理  
Pharma Medica 18(2):41-48:2000.
- (4) Takashi Kudo, et al: Impairment of response to ER stress in presenilin 1 mutant  
Neuroscientific Basis of Dementia, C.Tanaka, P.I.McGeer, Y.Ihara (eds), p193-p199, Birkhauser Verlag Basel, 2001。

### 2. 学会発表

The 5th International Conference on Progress in Alzheimer's and Parkinson's Disease, 3/31-4/5, 2001

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

分担研究報告書

高齢者の精神機能老化機序の解明とその対策に関する精神神経免疫学的研究

変異プレセニリン1がもたらす小胞体ストレス脆弱性について

分担研究者 武田雅俊 大阪大学大学院医学系研究科神経機能医学講座教授

家族性アルツハイマー病の原因遺伝子として発見されたプレセニリン1 (PS1)について現在精力的な研究が内外で進められている。PSは小胞体(ER)膜に局在する蛋白で、その変異体の存在は各種の神経細胞障害に脆弱性をもたらすことが示唆されている。ERには unfolded protein response(UPR)として ER stress に対する反応系が存在し、それをなす分子として IRE1 と PERK が同定されている。これまでの我々は、変異型の PS1 は IRE1 による UPR を阻害し、分子シャペロン GRP78 をダウンレギュレートし、ER stress 脆弱性をもたらすことを示した。今回は、もう一つの ER stress response である PERK を介する系に対する変異型 PS1 の影響について検討した。PERK は ER 内の unfolded 蛋白を検知すると、開始因子 eIF2 $\alpha$  をリン酸化し、蛋白の翻訳を抑制する系を活性化する。それにより、新たに蛋白が ER 内に送り込まれないようにして ER の負荷が軽減される。変異型 PS1 を発現させた細胞に ER stress を負荷し、eIF2 $\alpha$  のリン酸化を検討したところ、野生型 PS1 及び MOCK を導入した細胞に対し、抑制傾向が見られた。この結果より、PERK を介する ER stress response に関しても変異型 PS1 が抑制的に働くことが示唆された。IRE1 と PERK の ER stress 検知ドメインは相同性が高いが、変異型 PS1 が両分子に抑制的に働くことから、このストレス検知機構に PS1 が関与していると考えられる。

キーワード： アルツハイマー病、小胞体、ストレス、細胞死

A. 研究目的  
病理学的には老人班や神経原線維変化な  
アルツハイマー病は初老期に発症し、 どの所見を大脳皮質に広範に認める進行

性痴呆疾患である。人口の高齢化に伴い、先進諸国では痴呆患者は急激に増加し、現在日本では、痴呆患者は65歳以上人口の約5%、85歳以上では約30%といわれる。これらの大部分を占めるのがアルツハイマー病であり、日本では約70万人、全世界では一千万人以上と推定され、その病態解明が急がれている。

早発性アルツハイマー病において、分子生物学的アプローチの有力な糸口として、その原因遺伝子である $\beta$ -APP、プレセニリン1(PS1)、プレセニリン2が同定されている。アルツハイマー病の大部分を占めるのは孤発例であるが、これらの遺伝子を手掛かりとしてアルツハイマー病全体の病態解明しなければならない。

プレセニリンは小胞体(ER)膜に局在する蛋白で、その変異体の存在は各種の神経細胞障害に脆弱性をもたらすことが示唆されている。ERにはunfolded protein response(UPR)としてER stressに対する反応系が存在し、そのセンサー分子としてIRE1、PERKが同定されている。いずれもER内でのunfolded proteinの蓄積を感知し、それぞれ異なった機構でER内の恒常性を保つ。昨年度我々は変異型プレセニリン1はIRE1によるUPRを阻害し、分子シャペロンGRP78を介してER stress脆弱性をもたらすことが示された。

本年度はもう一つのUPRをもたらすPERKを介する系について変異型PS1との関係について検討した。PERKはER内

に異常蛋白質が蓄積されると、eIF2 $\alpha$ をリン酸化し、蛋白の翻訳を抑制する系を活性化してERへの負荷を軽減する機構で機能する。そこで、我々は、野生型・変異型プレセニリン遺伝子をそれぞれ導入したマウスのN2a細胞に、ThapsigarginやDTTを用いてER stressを加え、PERKとeIF2 $\alpha$ の反応を見た。

## B. 研究方法

野生型と変異型( $\Delta E9$ )のPS1遺伝子を、マウスのN2a細胞にリポフェクトアミン法で導入し、G418で選択した。野生型PS1及び変異型PS1の各々を、50-60%コンフルエントになるように培養し、刺激開始の1時間前に、メEDIUM交換を行った。1時間後に、1 $\mu$ M-thapsigargin-DMEMと培養液を交換して刺激を加え、適当な時間に冷PBS(-)で反応を停止させ、1% triton lysis buffer (20 mM HEPES pH7.5, 150 mM NaCl, 1% tritonX-100, 10% glycerol, 1 mM EDTA, 10 mM terasodium pyrophosphate, 100 mM NaF, 17.5 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 1 mM phenylmethylsulphonyl fluovide(PMSF)、4 /ml aprotinin)で、回収した上清をSDS-PAGEし、ウェスタンブロッティングした。

PS1の1から14残基に対するポリクロナル抗体、また、PERK 1094から1114残基に対するポリクロナル抗体を作製し、

ProtOn Kit1 でアフィニティ精製した。抗 KDEL モノクロナル抗体 (Stressgen)、抗 PS1 モノクロナル抗体 (Chemicon)、抗リン酸化 eIF2 $\alpha$  ポリクロナル抗体 (Research Genetics Company) については購入した。

次に、免疫染色については、野生型 PS1 を発現させた細胞を 4% パラホルムアルデヒドで固定し、0.3% TritonX-100 に 10 分間浸透させ、抗 PERK、抗プレセニン 1 抗体、抗 KDEL 抗体で 4°C 5 時間インキュベートし、0.02 M PBS で洗浄後、FITC-conjugated 抗ラビットまたは Cy3-conjugated 抗マウス抗体で 2 時間染色した。その後、0.02M PBS で洗い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

### C. 研究結果

PERK の活性化について、MOCK、野生型 PS1、変異型 PS1 ( $\Delta E9$ ) 導入細胞について、1  $\mu$ M thapsigargin または 1  $\mu$ M DTT で刺激を加えたものを、5 分から 30 分まで検討すると、MOCK 及び野生型 PS1 では刺激後 15 分で PERK の完全なリン酸化が見られたのに対し、変異型ではリン酸化の遅延が観られた。

更に、PERK の下流にある eIF2 $\alpha$  について検討すると、1  $\mu$ M thapsigargin 刺激後、MOCK で野生型で、15 分後に eIF2 $\alpha$  の完全なリン酸化が観られたのに対し、変異型では、リン酸化の遅延が観られた。

次に、PERK とプレセニン 1 の局在について、免疫染色を検討した。抗 PERK

抗体での染色では、典型的な ER パターンが観られた。一方、抗 PS1 抗体で染色すると、ER-Golgi パターンを示していた。また、ER 部分は共染色され、両者の共存が確認された。

### D. 考察

変異型 PS1 を導入した細胞では、MOCK や野生型と比較して、ER のストレス感知センサーである PERK の活性化が阻害されていた。また、予想通り PERK の下流に位置する eIF2 $\alpha$  のリン酸化も同様に遅延していた。また、免疫染色上は電顕において、PS1 と PERK は共通して ER 膜上にみられた。

今回 PERK で観られた反応阻害は、これまで示されたように、IRE1 と PS1 において観られた結果と同様で、PS1 の変異が、UPR を障害し、ER のストレスセンサーを介した経路を阻害している事が考えられる。これは、様々な ER ストレスに対し、PS1 の変異体は脆弱性をもたらすことを示唆するものである。この機作は、変異型 PS1 がもたらす神経細胞変成過程を説明できるかもしれない。

近年、Ire1 及び PERK を介する UPR の系で、元々それぞれの分子についている GRP78/Bip が解離することがシグナルの発端のなることが報告されている。PS1 は ER 膜上で Ire1 及び PERK と結合しており、変異型 PS1 は Ire1 及び PERK を介す流刑を共通して阻害することから、こ

の GRP78/Bip 解離機構に変異体が何らかの影響を与えることが予想される。

#### E. 結論

変異型 PS1 は ER ストレスに対する UPR を阻害し、それがストレスに対する神経細胞の脆弱性をもたらし、アルツハイマー病脳で観られる神経細胞変性過程の一部であることが示唆された。

#### F. 健康危険情報

特記すべき事項なし。

#### G. 研究発表

##### 論文発表

① Are cerebrovascular factors involved in Alzheimer's disease?

Takashi Kudo, Kazunori Imaizumi, Hitoshi Tanimukai, Taichi Katayama, Naoya Sato, Yu Nakamura, Toshihisa Tanaka, Yujiro Kashiwagi, Yuka Jinnno, Masaya Tohyama, Masatoshi Takeda

Neurobio.Aging 21, 215-224, 2000

② プレセニリン蛋白の病理

工藤 喬、中野有香、武田雅俊、今泉和則

Pharma Medica 18(2):41-48:2000.

③ Impairment of response to ER stress in presenilin 1 mutant

Takashi Kudo, Kazunori Imaizumi, Taiichi Katayama, Naoya Sato, Yuka Nakano, Yuka Jinnno, Yuko Segawa, Junji Takeda, Masaya Tohyama, Masatoshi Takeda

Neuroscientific Basis of Dementia, C.Tanaka, P.I.McGeer, Y.Ihara (eds), p193-p199, Birkhauser Verlag Basel, 2001。

##### 学会発表

The 5th International Conference on Progress in Alzheimer's and Parkinson's Disease, 3/31-4/5, 2001

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべき事項なし。

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

分担研究報告書

高齢者の精神機能老化機序の解明とその対策に関する精神神経免疫学的研究

### 変異プレセニリン1がもたらす小胞体ストレス脆弱性について

分担研究者 武田雅俊 大阪大学大学院医学系研究科神経機能医学講座教授

家族性アルツハイマー病の原因遺伝子として発見されたプレセニリン1 (PS1)について現在精力的な研究が内外で進められている。PSは小胞体(ER)膜に局在する蛋白で、その変異体の存在は各種の神経細胞障害に脆弱性をもたらすことが示唆されている。ERには unfolded protein response(UPR)として ER stress に対する反応系が存在し、それをなう分子として IRE1 と PERK が同定されている。これまでの我々は、変異型の PS1 は IRE1 による UPR を阻害し、分子シャペロン GRP78 をダウンレギュレートし、ER stress 脆弱性をもたらすことを示した。今回は、もう一つの ER stress response である PERK を介する系に対する変異型 PS1 の影響について検討した。PERK は ER 内の unfolded 蛋白を検知すると、開始因子 eIF2 $\alpha$  をリン酸化し、蛋白の翻訳を抑制する系を活性化する。それにより、新たに蛋白が ER 内に送り込まれないようにして ER の負荷が軽減される。変異型 PS1 を発現させた細胞に ER stress を負荷し、eIF2 $\alpha$  のリン酸化を検討したところ、野生型 PS1 及び MOCK を導入した細胞に対し、抑制傾向が見られた。この結果より、PERK を介する ER stress response に関しても変異型 PS1 が抑制的に働くことが示唆された。IRE1 と PERK の ER stress 検知ドメインは相同性が高いが、変異型 PS1 が両分子に抑制的に働くことから、このストレス検知機構に PS1 が関与していると考えられる。

キーワード： アルツハイマー病、小胞体、ストレス、細胞死

A. 研究目的  
病理学的には老人斑や神経原線維変化など  
アルツハイマー病は初老期に発症し、どの所見を大脳皮質に広範に認める進行

性痴呆疾患である。人口の高齢化に伴い、先進諸国では痴呆患者は急激に増加し、現在日本では、痴呆患者は65歳以上人口の約5%、85歳以上では約30%といわれる。これらの大部分を占めるのがアルツハイマー病であり、日本では約70万人、全世界では一千万人以上と推定され、その病態解明が急がれている。

早発性アルツハイマー病において、分子生物学的アプローチの有力な糸口として、その原因遺伝子である $\beta$ -APP、プレセニリン1(PS1)、プレセニリン2が同定されている。アルツハイマー病の大部分を占めるのは孤発例であるが、これらの遺伝子を手掛かりとしてアルツハイマー病全体の病態解明しなければならない。

プレセニリンは小胞体(ER)膜に局在する蛋白で、その変異体の存在は各種の神経細胞障害に脆弱性をもたらすことが示唆されている。ERにはunfolded protein response(UPR)としてER stressに対する反応系が存在し、そのセンサー分子としてIRE1、PERKが同定されている。いずれもER内でのunfolded proteinの蓄積を感知し、それぞれ異なった機構でER内の恒常性を保つ。昨年度我々は変異型プレセニリン1はIRE1によるUPRを阻害し、分子シャペロンGRP78を介してER stress脆弱性をもたらすことが示された。

本年度はもう一つのUPRをもたらすPERKを介する系について変異型PS1との関係について検討した。PERKはER内

に異常蛋白質が蓄積されると、eIF2 $\alpha$ をリン酸化し、蛋白の翻訳を抑制する系を活性化してERへの負荷を軽減する機構で機能する。そこで、我々は、野生型・変異型プレセニリン遺伝子をそれぞれ導入したマウスのN2a細胞に、ThapsigarginやDTTを用いてER stressを加え、PERKとeIF2 $\alpha$ の反応を見た。

## B. 研究方法

野生型と変異型( $\Delta E9$ )のPS1遺伝子を、マウスのN2a細胞にリポフェクトアミン法で導入し、G418で選択した。野生型PS1及び変異型PS1の各々を、50-60%コンフルエントになるように培養し、刺激開始の1時間前に、メディアウム交換を行った。1時間後に、1 $\mu$ M-thapsigargin-DMEMと培養液を交換して刺激を加え、適当な時間に冷PBS(-)で反応を停止させ、1% triton lysis buffer (20 mM HEPES pH7.5、150 mM NaCl、1% tritonX-100、10% glycerol、1 mM EDTA、10 mM terasodium pyrophosphate、100 mM NaF、17.5 mM  $\beta$ -glycerophosphate、1 mM phenylmethylsulphonyl fluovide(PMSF)、4 /ml aprotinin)で、回収した上清をSDS-PAGEし、ウェスタンブロットティングした。

PS1の1から14残基に対するポリクロナル抗体、また、PERK 1094から1114残基に対するポリクロナル抗体を作製し、

ProtOn Kit1 でアフィニティ精製した。抗 KDEL モノクロナル抗体 (Stressgen)、抗 PS1 モノクロナル抗体 (Chemicon)、抗リン酸化 eIF2 $\alpha$  ポリクロナル抗体 (Research Genetics Company) については購入した。

次に、免疫染色については、野生型 PS1 を発現させた細胞を 4%パラホルムアルデヒドで固定し、0.3% TritonX-100 に 10 分間浸透させ、抗 PERK、抗プレセニン 1 抗体、抗 KDEL 抗体で 4°C 5 時間インキュベートし、0.02 M PBS で洗浄後、FITC-conjugated 抗ラビットまたは Cy3-conjugated 抗マウス抗体で 2 時間染色した。その後、0.02M PBS で洗い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

### C. 研究結果

PERK の活性化について、MOCK、野生型 PS1、変異型 PS1 ( $\Delta E9$ ) 導入細胞について、1  $\mu$ M thapsigargin または 1  $\mu$ M DTT で刺激を加えたものを、5 分から 30 分まで検討すると、MOCK 及び野生型 PS1 では刺激後 15 分で PERK の完全なリン酸化が見られたのに対し、変異型ではリン酸化の遅延が観られた。

更に、PERK の下流にある eIF2 $\alpha$  について検討すると、1  $\mu$ M thapsigargin 刺激後、MOCK で野生型で、15 分後に eIF2 $\alpha$  の完全なリン酸化が観られたのに対し、変異型では、リン酸化の遅延が観られた。

次に、PERK とプレセニン 1 の局在について、免疫染色を検討した。抗 PERK

抗体での染色では、典型的な ER パターンが観られた。一方、抗 PS1 抗体で染色すると、ER-Golgi パターンを示していた。また、ER 部分は共染色され、両者の共存が確認された。

### D. 考察

変異型 PS1 を導入した細胞では、MOCK や野生型と比較して、ER のストレス感知センサーである PERK の活性化が阻害されていた。また、予想通り PERK の下流に位置する eIF2 $\alpha$  のリン酸化も同様に遅延していた。また、免疫染色上は電顕において、PS1 と PERK は共通して ER 膜上にみられた。

今回 PERK で観られた反応阻害は、これまで示されたように、IRE1 と PS1 において観られた結果と同様で、PS1 の変異が、UPR を障害し、ER のストレスセンサーを介した経路を阻害している事が考えられる。これは、様々な ER ストレスに対し、PS1 の変異体は脆弱性をもたらすことを示唆するものである。この機作は、変異型 PS1 がもたらす神経細胞変成過程を説明できるかもしれない。

近年、Ire1 及び PERK を介する UPR の系で、元々それぞれの分子についている GRP78/Bip が解離することがシグナルの発端のなることが報告されている。PS1 は ER 膜上で Ire1 及び PERK と結合しており、変異型 PS1 は Ire1 及び PERK を介す流刑を共通して阻害することから、こ

の GRP78/Bip 解離機構に変異体が何らかの影  
響を与えることが予想される。

#### E. 結論

変異型 PS1 は ER ストレスに対する UPR  
を阻害し、それがストレスに対する神経  
細胞の脆弱性をもたらし、アルツハイマ  
ー病脳で観られる神経細胞変性過程の一  
部であることが示唆された。

#### F. 健康危険情報

特記すべき事項なし。

#### G. 研究発表

##### 論文発表

① Are cerebrovascular factors involved in  
Alzheimer's disease?

Takashi Kudo, Kazunori Imaizumi, Hitoshi  
Tanimukai, Taichi Katayama, Naoya Sato, Yu  
Nakamura, Toshihisa Tanaka, Yujiro  
Kashiwagi, Yuka Jinnno, Masaya Tohyama,  
Masatoshi Takeda

Neurobio.Aging 21, 215-224, 2000

② プレセニリン蛋白の病理

工藤 喬、中野有香、武田雅俊、今泉和  
則

Pharma Medica 18(2):41-48:2000.

③ Impairment of response to ER stress in  
presenilin 1 mutant

Takashi Kudo, Kazunori Imaizumi, Taiichi  
Katayama, Naoya Sato, Yuka Nakano, Yuka  
Jinnno, Yuko Segawa, Junji Takeda, Masaya  
Tohyama, Masatoshi Takeda

Neuroscientific Basis of Dementia, C.Tanaka,  
P.I.McGeer, Y.Ihara (eds), p193-p199,  
Birkhauser Verlag Basel, 2001。

#### 学会発表

The 5th International Conference on  
Progress in Alzheimer's and Parkinson's  
Disease, 3/31-4/5, 2001

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべき事項なし。

## アルツハイマー病におけるNK細胞活性とサイトカインの産生能の変化に関する研究

研究者 新井平伊 順天堂大学医学部精神医学教室教授  
石塚卓也・馬場元

研究要旨：アルツハイマー病(AD)の免疫機能の異常については、これまでも中枢神経系内でのサイトカインの増加や減少などが報告されているが、末梢血中の免疫異常については一定した結論に達していない。そこで今回我々は、ADの末梢血中の免疫機能の変化について調査し、以前我々が報告した正常加齢による免疫機能の変化との相違について検討した。

### A. 研究目的

アルツハイマー病(AD)について、これまでに剖検脳でのインターロイキン $1\beta$ (IL- $1\beta$ )の濃度の上昇や髄液内のIL-6の濃度の上昇などが報告されており、その中枢神経内での免疫学的変化は次第に明らかにされつつある。中枢神経内での免疫機能の変化があれば末梢血に反映される可能性もある。実際に末梢血中のNK細胞活性の低下やIL- $1\beta$ , TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ), TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ )が血清中で高値を示し重症度と関連するといった報告がある。しかしその一方でADでの血清中のサイトカインは変化を示さないといった報告もあり一定した結論に達していない。以前、我々は加齢による免疫機能の変化について調査した。これによれば、末梢血中のNK細胞活性は加齢による変化はなく、キラー活性の高いリンパ球を中心としたNK細胞数の増加が起こり、結果

として個々のNK細胞活性の低下を補っているものと思われた。そこで今回我々はADの末梢血中の免疫学的変化について調査を行ない、免疫機能の加齢による変化との相違について検討したのでここに報告する。

### B. 研究方法

#### (倫理面への配慮)

対象は文書で本研究に対しての同意を得られた健常対象者30名及びアルツハイマー型痴呆と診断された順天堂大学メンタルクリニック外来通院患者30名である。年齢、性別をマッチさせた健常者はいずれも身体的基礎疾患及び精神疾患はなく、日常規則正しい生活を送っている。DSM-IV・NINCDS-ADRDAの診断基準よりADと診断された30名は、mini-mental state examination (MMSE)にて痴呆の評価を行った。なお、本研究を施行するにあたり順天堂大学治験審査委員会の承認を受けている。

NK活性の測定はエフェクター細胞対ターゲット細胞比(E/T)=20における%細胞傷

害活性として測定した。日内変動による誤差をさけるため、採血は午前10時から12時の間に統一した。エフェクター細胞は、被検者の末梢血を conray-ficall (d=1.077)を用いて比重遠心分離して得られた単核細胞を RPMI1640 Medium(10%FCS 加)を加えて  $1 \times 10^6$ /ml に細胞濃度を調整した。ターゲット細胞にはヒト赤芽球性白血病細胞株 K-562 を用いた。K-562 を RPMI1640medium (10%FCS 加)中で継代培養したものを遠心分離によって集め、50 100  $\mu$  Ci の  $^{51}\text{Cr}$ -クロム酸ナトリウムを添加して 37°C で1時間培養することによって  $^{51}\text{Cr}$  標識した。これを  $1 \times 10^6$ /ml に濃度調整し使用した。上記により調整されたターゲット細胞をマイクロプレートに分注し、これに最大解離群には 1N-HCl を、自然解離群 (control)には RPMI 1640 medium (10%FCS 加)を、そして実験解離群にはエフェクター細胞を E/T=20 の比率で分注した。これをプレート遠心器で 800rpm、5 分間遠心した後 5%CO<sub>2</sub> 培養器で 3.5 時間培養した。培養した後各 well から上清を採取し  $\gamma$ -シンチレーションカウンターにて細胞傷害により遊離した  $^{51}\text{Cr}$  を測定した。NK 活性値は (実験解離 自然解離) / (最大解離 自然解離) により算出した。

NK 細胞数およびサブセットの測定は、上記と同様の手順で採取、分離し細胞濃度を調整した単核細胞に FITC、PE、PerCP でそれぞれ蛍光標識した抗 CD3 モノクローナル抗体、抗 CD16 モノクローナル抗体、抗 CD56 モノクローナル抗体を添加し、4°C で 30 分間培養した。これ

に lysing reagent を添加して室温で 15 分間静置した後 PBS で洗浄し、最後に lysing reagent を加えてレーザーフローサイトメーターを用いて測定した。

サイトカイン産生能の測定には、細胞濃度を  $1 \times 10^6$ /ml に調整したリンパ球に Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (50ng/ml) および ionomycin (200ng/ml) を添加して 5%CO<sub>2</sub> 培養器で 37°C、4 時間培養し、得られた培養液をインターロイキン (IL) -1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, インターフェロン (IFN) - $\gamma$  の濃度を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (R&D Systems 社製 米国) を用いて測定した。

検査結果は平均 $\pm$ SD で表した。健常対照群および DAT 群の検査結果の有意差を検討するために、Mann-Whitney U-test・Wilcoxon signed rank test にて分析した。

なお、本研究を施行するにあたり順天堂大学治験審査委員会の承認を受けている。

(許可番号：2000-009)

### C. 研究結果

正常対照者群 (control) とアルツハイマー病患者群 (AD) 間に年齢、肥満指数 (Body mass index: BMI)、生化学的指標の統計学的有意差は認められなかった。

Mini mental state examination (MMSE) は 2 群間に統計学的有意差が認められた。

#### NK cell activity

血清中の NK 細胞活性は男性群、女性群ともに健常対照者 (HC) 群に比して、AD 群で統計学的有意差をもって低下が認められた。

#### NK 細胞数・リンパ球サブセット

NK 細胞数は 2 群間に有意差は認められなかった。しかし、NK 細胞活性値を NK 細胞数で除した NK 細胞 1 個あたりの NK 細胞活性は正常対照者群に比して、AD 群で統計学的有意差をもって低下が認められた。

#### NK 細胞活性と年齢と MMSE の相関性

AD 群における NK 細胞活性と年齢および MMSE には相関性は認められなかった。

#### サイトカイン産生能

サイトカイン産生能は、IFN- $\gamma$  は HC 群に比して、アルツハイマー病患者群で統計学的有意差をもって低下が認められた。IL-2, IL-6 で正常対照者群に比して、AD 群で統計学的有意差をもって増加が認められた。その他のサイトカインに関して有意差は認められなかった。

#### D. 考察

以前、我々は加齢による免疫機能の変化について調査した。これによれば、NK 細胞活性は加齢による変化はなく、キラー活性の高いリンパ球を中心とした NK 細胞数の増加が起こり、結果として個々の NK 細胞活性の低下を補っているものと思われた。今回我々の調査ではアルツハイマー病において NK 細胞活性は低下を示したが、NK 細胞数について変化はなく加齢変化に見られたようなリンパ球の増加による代償機構が働かない可能性が示唆された。AD における NK 細胞活性の低下についてのメカニズムについては明らかではないが、いくつかの仮説がある。一つは AD において血小板膜の異常が認められるのと同様に NK 細

胞を含めたリンパ球の膜に異常があり、それによりキラー活性が低下するという説である。二つめの仮説は、NK 細胞内でのサイクリック AMP レベルの異常や細胞内カルシウムイオンチャンネル(CA $^{++}$ )の透過性の異常など、NK 細胞内での代謝異常があるという説がある。このように加齢変化と AD の免疫変化には相違があり、これはサイトカインの変化にも表れている。NK 細胞の活性化や分化、増殖に関連するサイトカインは IFN- $\gamma$ 、IL-2 である。加齢によるサイトカイン産生能の変化は IFN- $\gamma$ 、IL-2 ともに増加を示し、これは NK 細胞数の増加にともなう上昇と考えられた。しかし、AD において IFN- $\gamma$  は低下が認められ、IL-2、IL-6 は増加を示した。Arago らは AD において NK 細胞活性の低下は認められたが、IL-2、IFN- $\alpha$  などのサイトカインには異常が認められなかったと報告しており、我々の調査とは異なる結果となった。IFN- $\gamma$  は主として NK 細胞、一部 T 細胞から産生され、NK 細胞に対しては細胞傷害活性を増強させるが、NK 細胞の増殖にはむしろ抑制的に作用すると言われている。IL-2 は主に CD4 $^{+}$ T 細胞のサブセットのうち、Th1 細胞 (ナイーブ T 細胞) より産生され、NK 細胞に関しては細胞傷害活性、細胞増殖ともに刺激すると言われている。また中枢神経内では海馬アセチルコリンの放出を抑制する。IL-6 は中枢神経内では、コリン作動性ニューロンの生存維持を司ると言われている。AD 群の IFN- $\gamma$  産生能は NK 細胞数が不変であるにも関わらず低下が認められたということは、その主たる産生場所である NK

細胞の活性を含めた機能の低下によるものと思われる。また IL-2 は NK 細胞活性の低下を補うべく増加しているものと思われる。

#### **E. 結論**

今回の研究で AD において認められた免疫機能の異常は、加齢による免疫機能の変化とは異なるものと思われ、AD は生体内において全身性に免疫学的異常をきたす疾患であることも推測された。このような免疫能の異常が感染疾患や悪性腫瘍などの 2 次的な合併症を引き起こす原因となりうることもあり、常に考慮していく必要があるものと思われた。

1

## 老化とストレス反応性に関する研究

神庭重信(山梨医科大学精神神経医学講座教授)

本年度は(1)恐怖条件づけにおける phospho-cAMP-responsive element binding protein (pCREB)陽性細胞の老化による変化について検討を行い、footshock 後のすくみ行動が1時間後に低週令群で有意に増加していた。また、海馬 CA1 領域では pCREB 陽性細胞数が低週令群で有意に減少していた。このことから、老化における記憶障害に CREB リン酸化の影響があることが予想された。また、(2)脳内サイトカインのストレス反応性の変化に対する老化の影響について検討を行った。本年度は、視床下部-下垂体-副腎皮質系 (HPA 系) とそれを制御すると最近報告されている脳内サイトカインの、拘束ストレスに対する反応性を、老齢 (75 週令)、若年ラット群 (10 週令) で比較を行った。中枢でのサイトカイン量、特に Tumor Necrosis Factor (TNF) に部位により変化があり、また、ストレス反応性が異なっていることが明らかとなった。

キーワード: 老化, phospho-cAMP-responsive element binding protein (pCREB), ストレス, サイトカイン,

免疫系, HPA 系,

(1) 恐怖条件づけにおける

phospho-cAMP-responsive element binding protein (pCREB) 陽性細胞の老化による変化

A. 研究目的

ここでは、老化による学習能の変化に phospho-cAMP-responsive element binding protein (pCREB) 陽性細胞の変化がどのように関係しているかについて明らかにすることを目的として

いる。情動回路には海馬が含まれると考えられているが<sup>1)</sup>、Contextual fear conditioning においてみとめられる freezing は、扁桃体および海馬の破壊により障害されることから<sup>2)3)</sup>、ここでの freezing には扁桃体や海馬が関係すると考えられている。一方で、cAMP-responsive element-binding protein (CREB) は神経細胞内への Ca<sup>2+</sup> の流入に伴いリン酸化される転写因子であるが、長期増強 (LTP) が CREB のノックアウト動物で障害されることや<sup>4)</sup>、CRE-LacZ transgenic mouse において学習過程で LacZ の増加することなどから<sup>5)</sup>、そのリン酸化が学習と関係していることが想定されている。恐怖条件

付けによる学習が老化により障害されることはすでに報告されており<sup>6)</sup>、LTP も加齢やストレスによる影響を受ける<sup>7)</sup>が、この学習の障害に CREB のリン酸化が関与しているかについての報告はない。このため、われわれは、CREB リン酸化が、老齡ラットの学習にどのように関係しているかについて検討を行った。

#### B. 研究方法

行動実験:120 週令の高週令ラットと12週令の低週令ラットに恐怖条件づけを行い、foot shock 直後と1時間後に freezing(すくみ行動)を評価した。恐怖条件付けはチャンパー(28x21x22 cm)に移されてから3分後に20秒間、800Hz、20dB の音刺激を行い、最後の2秒間に 0.75mA 2秒間の footshock を行った。

実験後断頭し、ドライアイス—イソペンタンを用いて凍結させ、-70°Cで保存した。

免疫染色:10 $\mu$ m の切片を作成し、4%PFA で15分間固定した。ブロッキングの後 1:500 rabbit polyclonal anti-pCREB antibody および、1:200 rabbit polyclonal anti-CREB antibody にて48時間インキュベート後、1:200 biotinylated antirabbit IgG で1時間反応させ、ABC キットで呈色した。

#### C. 研究結果

学習直後ではすくみ行動(%freezing)は高週令、低週令で差は認められなかったが、1時間後で低週令群で有意に増加していた。また、pCREB 陽性細胞数も海馬 CA1領域において低週令群で有意に陽性細胞数の増加が認められた。

#### D. 考察

低週令ラットにおいて認められた、すくみ行動の変化とpCREB 陽性細胞の CA1 での増加が、老齡ラットではみとめられなかった。CREB のリン酸化が学習に関係していると考えられていることから、我々の結果は、老化による学習機能の低下に

CREB リン酸化の低下が関与している可能性を示していると考えられた。

#### (2)脳内サイトカインのストレス反応性の変化に対する老化の影響

##### A. 研究目的

老化はさまざまな生体機能に変化をもたらす。ストレス反応に大きな役割を果たすとされる視床下部—下垂体—副腎皮質系(HPA 系)に関してもその活性が変化しているとする報告が多くなされている<sup>8)-13)</sup>。一方で HPA 系に関しては最近、免疫系の物質と考えられていたサイトカインがその制御の一端をになっている事が明らかとなってきている。<sup>14)15)</sup> その中でもわれわれは Tumor Necrosis Factor(TNF)が脳内で HPA 系の制御に関与していることを明らかにしてきた<sup>16)</sup>。我々は本実験では、脳内で HPA 系の制御に影響を与えていると考えられるサイトカインが老化によりどのように変化しているかについて検討を行った。

##### B. 研究方法

検討には10週令(若年群)または75週令(老齡群)のSD系雄性ラットを用いて行った。本年は、脳内の Tumor Necrosis Factor(TNF)に関する検討を行った。まず、若令群でストレスによる(ここでは拘束ストレス)脳内での変化を経時的に検討を行った。ラットの脳部位は断頭後速やかに Glowinski and Iversen(1966)にしたがって切り分け計量の後速やかに-80°Cで保存した。ホモジナイズした脳組織は、遠心したのち、上清をサイトカインの測定に用いた。測定には ELISA を用いた。

また、老齡(100週令)と若令(10週令)を30分、60分の拘束ストレスを負荷し、0分(無負荷)とともに断頭し、各部位に分けた後に同様に ELISA で測定した。

##### C. 研究結果