

厚生科学研究費補助金

脳科学研究事業報告書

平成 12 年 12 月 27 日厚生省収健第 3 3 6 号

アルツハイマー病における神経細胞死促進機構の

解明と抑止方法の開発 (H12-脳-001)

主任研究者:

国立精神・神経センター 神経研究所疾病研究第 6 部

田平 武

アルツハイマー病における神経細胞死促進機構の解明と抑止方法の開発

主任研究者 田平 武 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第6部部长

研究要旨 アルツハイマー病脳でも細胞内 A β 42 蓄積がアポトーシスを促進していることが明らかになった。A β 42 は 24KDa のコンプレックスを作っており、p53 プロモーターに結合する。また、プレセニリン変異は A β 42 産生増強に加え、PERK のリン酸化を障害し、ER ストレス脆弱性を高めていることが分かった。

分担研究者

卷淵隆夫	国立療養所犀潟病院 臨床研究部長
大八木保政	九州大学大学院医学研究院脳研神経内科 助手
工藤 喬	大阪大学大学院医学系研究科生体統合医 学神経機能医学講座精神医学助手

4) A β 42 と結合する蛋白を yeast two hybrid system 及び免疫沈降法により明らかにし、アポトーシス促進にからむ物質を選択する。

5) ER ストレスセンサーの一つ PERK のリン酸化を指標にし、PS1 変異と ER ストレスの関連を明らかにする。

(倫理面への配慮)

剖検脳を用いた研究は剖検承諾書に基づき、病態解明の一貫として研究に供した。動物実験は所属研究所の動物実験倫理委員会の承認を得て行った。

A. 研究目的

この研究はアルツハイマー病、とくにプレセニリン1 (PS1)、プレセニリン2 (PS2) 変異によっておこるアルツハイマー病に見られる神経細胞死の促進機構を明らかにし、その中から発症を予防し、進行を抑止する方法を開発することを目的とする。

B. 研究方法

1) 孤発性アルツハイマー病及び PS1 変異による家族性アルツハイマー病の剖検脳を用いて、A β 40 及び A β 42 特異的抗体による免疫組織染色を行い、A β の細胞内蓄積の有無を明らかにする。更に、アポトーシスのマーカーである Hoechst 33342 及び TUNEL との二重染色を行い、アポトーシスとの関連を明らかにする。

2) 上記剖検脳及び本研究者らが作製した PS1 トランスジェニックマウスを用いて、A β 42 特異的抗体による免疫電顕を行い、A β 42 の細胞内局在を明らかにする。

3) PS1、PS2 と結合する蛋白質を yeast two hybrid system によりスクリーニングし、PS の機能を明らかにする。

C. 研究結果

1) アルツハイマー病脳においても A β 42 の細胞内蓄積を示す神経細胞が見られ、PS1 変異脳でとくに高頻度であった。また、細胞内 A β 42 蓄積を示しアポトーシスのマーカーである Hoechst 33342 陽性の神経細胞はアルツハイマー病脳で有意に高頻度であった。

2) 細胞内 A β 42 の局在を知る目的で免疫電顕を行ったが明らかにすることはできなかった。

3) PS2 と特異的に結合し、PS1 には結合しない新規物質 DRAL を見出し、その遺伝子をクローニングした。DRAL は脳と筋肉で高発現していた。

4) A β 42 は 24KDa のコンプレックスを形成していた。その構成蛋白を明らかにするために分離精製を行った。また、A β 42 は p53 プロモーターに直接結合しうることをゲルシフトアッセイにより明らかにした。

5) ER センサーの一つ PERK も PS1 のコントロール下にあり、PS1 変異により、そのリン酸化が低下することが分った。

D. 考察

本研究では PS1 変異トランスジェニックマウスを作製・解析し、加齢とともに神経細胞内 A β 42 の蓄積がみられ、アポトーシスの促進が見られることを示してきた。今回の研究で、ヒト脳においても A β 42 の細胞内蓄積が見られ、アポトーシスを促進しているとの結果を得た。A β 42 は従来細胞外の老人斑に蓄積し細胞死を引き起こしていると考えられてきたが、老人斑の程度と細胞死の程度が相関しないことから矛盾が指摘されてきた。この研究により細胞内 A β 42 の重要性が一層明らかになった。

細胞内 A β 42 がいかに細胞死を誘導するかは本研究の中心テーマである。その為にはまずその細胞内局在を明らかにする必要がある。しかし、剖検脳は死後変化が大きく、またマウス脳でも免疫組織染色の為に detergent やギ酸処理をする為に細胞へのダメージが大きく、局在は明らかにならなかった。また、細胞内 A β が何らかの物質と結合しており、抗体が結合しにくい状態にあることも考えられるので、今後更に検討が必要である。

細胞内 A β 42 は 24KDa のコンプレックスを形成していた。これは A β 42 のみのコンプレックスであるか、他の物質の介在があるか現在は不明であり、TOF-MASS 解析を行っているところである。また、A β 42 と特異的に結合する物質のスクリーニングを行う為の yeast two hybrid system の構築も行った。A β 42 が p53 のプロモーターに結合するとの結果を得たが、A β 42 が核へ移行するとの証拠はまだない。この点も今後更に検討する必要がある。

PS1 は ER ストレスに関連することが阪大の遠山らにより示された。即ち、PS1 変異があると ER ストレスセンサーである Irep のリン酸化が障害され、unfolded protein を捕捉する GRP78 の産生が低下し、細胞死を引き起こすというものである。今回、ER センサーの一つ PERK も PS1 変異によりリン酸化が低下することが分った。PERK は ER ストレスに際し蛋白の合成を抑制する働きがあるので、今後 APP の産生、ひいては A β 42 の産生との関連を明らかにする必要がある。

E. 結論

PS 変異は A β 42 産生増強、ひいては細胞内蓄積をひきおこし、神経細胞死を促進している。

F. 研究発表

1) 論文発表

- [1] Shirohara T, Takahashi K, Araki W, Tabira T. Mutational analysis of intrinsic regions of presenilin 2 which determine its endoproteolytic cleavage and pathological function. *J Biol Chem* 275(5):3681-6, 2000
- [2] Arima K, Kowalska A, Hasegawa M, Mukoyama M, Watanabe R, Kawai M, Takahashi K, Goedert M, Iwatsubo T, Tabira T, Sunohara N. Two brothers of frontotemporal dementia and parkinsonism with an N279K mutation of the tau gene. *Neurology* 54(9):1787-95, 2000
- [3] Tahanashi H, Tabira T. Alzheimer's disease-associated presenilin 2 interacts with DRAL, an LIM-domain protein. *Hum Mol Genet* 9(15):2281-9, 2000
- [4] Mizoguchi K, Yuzurihara M, Ishige A, Sasaki H, Chui DH, Tabira T. Mutant presenilin 2 transgenic mice. A large increase in the levels of Abeta 42 is presumably associated with the low density membrane domain that contains decreased levels of glycerophospholipids and sphingomyelin. *J Biol Chem* 275(36):27901-8, 2000
- [5] Sawamura N, Morishima-Kawashima M, Waki H, Kobayashi K, Kuramochi T, Frosch MP, Ding K, Ito M, Kim TW, Tanzi RE, Oyama F, Tabira T, Ando S, Ihara Y. Mutant presenilin 2 transgenic mice. A large increase in the levels of A β 42 is presumably associated with the low density membrane domain that contains decreased levels of glycerophospholipids and sphingomyelin. *J Biol Chem* 275(36):27901-8, 2000
- [6] Chui DH, Dobo E, Makifuchi T, Akiyama H, Kawakatsu S, Checler F, Araki W, Takahashi K, Tabira T. Apoptotic neurons in Alzheimer's disease frequently show intracellular A β 42 labeling. *J Alzheimer Dis* (in press)
- [7] Sato N, Imaizumi K, Manabe T, Taniguchi M, Hitomi J, Katayama T, Yoneda T, Morihara T, Yasuda Y, Takagi T, Kudo T, Tsuda T, Itoyama Y, Makifuchi T, Fraser PE, St George-Hyslop P, Tohyama M. Increased production of β -amyloid and vulnerability to ER stress by an aberrant spliced form of presenilin-2. *J Biol Chem* 276(3):2108-14, 2000
- [8] Ohya Y, Yamada T, Nishioka K, Clarke NJ, Tomlinson AJ, Naylor S, Nakabeppu Y, Kira J, Younkin SG. Selective increase in cellular A β 42 is related to apoptosis but not necrosis. *Neuroreport* 11(1):167-71, 2000
- [9] Kudo T, Imaizumi K, Tanimukai H, Katayama T, Sato N, Nakamura Y, Tanaka T, Kashiwagi Y, Jinno Y,

Tohyama M, Takeda M. Are cerebrovascular factors involved in Alzheimer's disease? *Neurobiol Aging* 21(2):215-24, 2000

2) 学会発表

1) Tabira T, Chui DH, Ozawa K, Ikeda S, Suzuki H and Checler F. Accumulation of A β 42 in neurons facilitates neuronal degeneration in PS1 transgenic mice. 6th Neurodegenerative Disorders: Common Molecular Mechanisms. April 9, 2000, Trinidad and Tobago, West Indies

2) Tabira T, Chui DH, Checler F. Intraneuronal A β and apoptosis in Alzheimer's disease.

Keystone Symposia Neuronal and Vascular Stress: A New Window on Alzheimer's Disease.

January 17, Sheraton Tamarron Resort, Durango, Colorado

3) 田平 武

細胞の外と中のA β . 第19回日本痴呆学会
会長講演 平成12年9月28日、木更津

4) Chui DH, Dobo E, Makifuchi T, Akiyama H, Kawakatsu S, Araki W, Takahashi K, Checler F, Tabira T. Intracellular A β 42 deposits and neurodegeneration in Alzheimer's disease. 第41回日本神経病理学会総会学術研究会 平成12年6月1日、米子

5) 武田 和也、荒木 亘、田平 武

細胞内に存在するアミロイド β タンパク質の定量分析 第19回日本痴呆学会 平成12年9月28日、木更津

6) 渡辺哲史、荒木 亘、田平 武

ヒト脳に存在するA β 結合性ヘパラン硫酸プロテオグリカンの同定 第19回日本痴呆学会 平成12年9月28日、木更津

7) Araki W, Tabira T

Presenilin 2 and neuronal cell death

COE 国際シンポジウム 第19回日本痴呆学会
ジョイントシンポジウム

平成12年9月28日、木更津

8) 大八木保政 他

A β 42は可溶性24KD蛋白として正常細胞内に存在する。—その核内移行と細胞間期— 第41回日本神経学会総会、平成12年5月24日、松本

9) 大八木保政 他

アポトーシスニューロン内に増加したA β 42のp53プロモーター活性への影響 第19回日本痴呆学会、平成12年9月29日、木更津

10) Ohyagi Y et al Intracellular amyloid- β 42 enhances the transcription activity of p53. 30th Annual Meeting of Society for Neuroscience, Nov. 9, 2000. New Orleans

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

アルツハイマー病における神経細胞死促進機構の解明と抑止方法の開発

分担研究者 田平 武 国立精神・神経センター神経研究所
疾病研究第6部 部長

研究要旨 アルツハイマー病脳の免疫組織染色を行い、神経細胞内 A β 42 蓄積がアポトーシスを促進していることを明らかにした。その程度は PS1 変異を有する症例でより顕著であった。PS 変異による神経細胞死促進機構を明らかにする為に PS あるいは A β 42 と結合する蛋白を yeast two hybrid system によりスクリーニングを開始し、PS2 と結合する新規蛋白 DRAL を見出した。さらに PS2 をアデノウイルスベクターに組み込み、神経細胞に強制発現した系を確立した。

A. 研究目的

この研究はアルツハイマー病、とくにプレセニリン 1 (PS1)、プレセニリン 2 (PS2) 変異によっておこる神経細胞死の促進機構を明らかにし、その中から発症を予防し、進行を抑止する方法を開発することを目的とする。

B. 研究方法

- 1) 孤発性アルツハイマー病及び PS1 変異を有する家族性アルツハイマー病剖検脳の免疫組織染色ホルマリン固定した脳を 20%蔗糖に浸透し、凍結切片を作製し、浮遊法で染色した。用いた抗体は A β x-40 特異的ポリクローナル抗体、FCA3340、同じく A β x-42 特異的抗体、FCA3542、アポトーシスを検出する Hoechst33342、及び TUNEL 染色である。いずれも免疫蛍光法を用い、リボフスチンによる自家蛍光はズダンプラック B 染色により消去した。観察はオリンパス共焦点レーザー顕微鏡を用いた。また、神経細胞数の計測は Neu N 染色を行い、光学顕微鏡によった。
- 2) プレセニリン結合蛋白質及び A β 42 結合蛋白質の同定 Yeast two hybrid system を用いて PS1、PS2、A β 42 と特異的に結合する蛋白質をスクリーニングし、陽性クローンについて cDNA のク

ローニングを行い、塩基配列を決定した。

- 3) 神経細胞死の機序解明 アデノウイルスベクターに野生型 PS2 及び変異 PS2 を組み込み、17 日齢ラット胎児脳より分離培養したニューロンに感染させ、Bcl-2 その他のアポトーシス関連物質の変化を観察した。

(倫理面への配慮)

剖検脳を用いた研究は剖検承諾書に基づき、病態解明の一貫として研究に供した。動物実験は所属研究所の動物実験倫理委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

- 1) 剖検脳の観察 Neu N 染色により神経細胞の核を染色し、大脳皮質の神経細胞数を計測した。その結果、アルツハイマー病脳では対照に比し、有意に神経細胞数の減少が見られた (図 1)。次に A β 抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。A β 42 はびまん性老人斑を含むすべての老人斑に沈着しており、A β 40 は古典的的老人斑の芯の部分に最も強く沈着していた。細胞内 A β 40 が陽性の神経細胞はまれであったが、A β 42 陽性神経細胞はアルツハイマー病脳で有意に増加しており、PS1 変異家族性アルツハイマー病脳でより顕著であった (図 2)。二重染色で観察すると細胞内 A β 42 陽性神経細胞はしばしば Hoechst 33342 によ

る核の濃染あるいは TUNEL 染色陽性を示し、アポトーシスに陥っていることが分った。その数はアルツハイマー病脳で有意に高頻度であった。

2) 結合蛋白の検討 Yeast two hybrid system により PS2 のループ部分に特異的に結合する新規物質 DRAL を見出した。DRAL は PS1 とは結合しなかった。DRAL は全身臓器に発現しており、とくに脳と骨格筋で高発現が見られた。DRAL の過剰発現で A β 40、A β 42 の産生が増加する傾向を認めたが、更に検討が必要である。A β 42 との結合蛋白は目下スクリーニング中である。

3) 細胞死の機序解明 PS2 の野生株及び変異株をアデノウイルスベクターに組み込み、一次培養ラット大脳皮質ニューロンに導入する系を確立した。現在、Bcl-2、BAX 等の変化、caspase 3 の変化、caspase 阻害剤の効果、Hoechst 33342 染色などによりアポトーシスの有無及びその機構を検討中である。

D. 考察

本研究者は変異 PS1 トランスジェニックマウスの観察から A β 42 が神経細胞内に蓄積し、神経細胞死をひきおこしている可能性を指摘した。今回アルツハイマー病脳での観察を行い、やはり A β 42 が細胞内に蓄積し、アポトーシスをひきおこしていることを示す結果を得た。従来、老人斑に沈着する β アミロイドの神経毒性、及び炎症反応による神経細胞障害が提唱されてきた。しかし、老人斑の程度と痴呆、あるいは神経細胞死の程度とは相関しないことが指摘され、その仮説は疑問視されてきた。また A β そのものの神経毒性も、in vitro では観察されるものの、in vivo では観察されにくく、その必要量も生理的量の 1000 倍以上を必要とするなど疑問点もあった。しかし、本研究が明らかにしたように、A β が細胞内に蓄積すればいくつかの疑問点が解決できる。今後は A β 42 の細胞内局在を明らかにし、A β 42 と結合する蛋白質の同定を行い、細胞死のメカニズムをさぐることで、アルツハイマー病発症機序の本態にせまり得ると期待される。またその中から神経細胞死を抑制する方法も開発可能である。

E. 結論

アルツハイマー病脳においても細胞内 A β 42 の沈着が神経細胞死を促進していることが明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- [1] Shirohara K, Takahashi K, Araki W, Tabira T. Mutational analysis of intrinsic regions of presenilin 2 which determine its endoproteolytic cleavage and pathological function. *J Biol Chem* 275(5):3681-6, 2000
- [2] Arima K, Kowalska A, Hasegawa M, Mukoyama M, Watanabe R, Kawai M, Takahashi K, Goedert M, Iwatsubo T, Tabira T, Sunohara N. Two brothers of frontotemporal dementia and parkinsonism with an N279K mutation of the tau gene. *Neurology* 54(9):1787-95, 2000
- [3] Tahanashi H, Tabira T. Alzheimer's disease-associated presenilin 2 interacts with DRAL, an LIM-domain protein. *Hum Mol Genet* 9(15):2281-9, 2000
- [4] Mizoguchi K, Yuzurihara M, Ishige A, Sasaki H, Chui DH, Tabira T. Mutant presenilin 2 transgenic mice. A large increase in the levels of Abeta 42 is presumably associated with the low density membrane domain that contains decreased levels of glycerophospholipids and sphingomyelin. *J Biol Chem* 275(36):27901-8, 2000
- [5] Sawamura N, Morishima-Kawashima M, Waki H, Kobayashi K, Kuramochi T, Frosch MP, Ding K, Ito M, Kim TW, Tanzi RE, Oyama F, Tabira T, Ando S, Ihara Y. Mutant presenilin 2 transgenic mice. A large increase in the levels of A β 42 is presumably associated with the low density membrane domain that contains decreased levels of glycerophospholipids and sphingomyelin. *J Biol Chem* 275(36):27901-8, 2000
- [6] Chui DH, Dobo E, Makifuchi T, Akiyama H, Kawakatsu S, Checler F, Araki W, Takahashi K, Tabira T. Apoptotic neurons in Alzheimer's disease frequently show intracellular A β 42 labeling. *J Alzheimer Dis* (in press)

2. 学会発表

- 1) Tabira T, Chui DH, Ozawa K, Ikeda S, Suzuki H and Checler F. Accumulation of A β 42 in neurons facilitates neuronal degeneration in PS1 transgenic mice. 6th Neurodegenerative Disorders: Common Molecular Mechanisms April 9, 2000, Trinidad and Tobago, West Indies
- 2) Tabira T, Chui DH, Checler F. Intraneuronal A β and apoptosis in Alzheimer's disease. Keystone Symposia Neuronal and Vascular Stress: A New Window on Alzheimer's Disease January 17, Sheraton Tamarron Resort, Durango, Colorado

3) 田平 武

細胞の外と中の A β 第 19 回日本痴呆学会
会長講演 平成 12 年 9 月 28 日、木更津

4) Chui DH, Dobo E, Makifuchi T, Akiyama H,
Kawakatsu S, Araki W, Takahashi K, Checler F, Tabira
T. Intracellular AB42 deposits and neurodegeneration in
Alzheimer's disease. 第 41 回日本神経病理学会総会
学術研究会 平成 12 年 6 月 1 日、米子

5) 武田 和也、荒木 亘、田平 武

細胞内に存在するアミロイド β タンパク質の定量分
析 第 19 回日本痴呆学会 平成 12 年 9 月 28 日、
木更津

6) 渡辺哲史、荒木 亘、田平 武

ヒト脳に存在する A β 結合性ヘパラン硫酸プロテオ
グリカンの同定 第 19 回日本痴呆学会 平成 12
年 9 月 28 日、木更津

7) Araki W, Tabira T

Presenilin 2 and neuronal cell death

COE 国際シンポジウム 第 19 回日本痴呆学会ジ
ョイントシンポジウム
平成 12 年 9 月 28 日、木更津

G. 知的所有権の取得状況

なし

Fig. 1 Counts of Surviving Neurons in AD and Control Brains

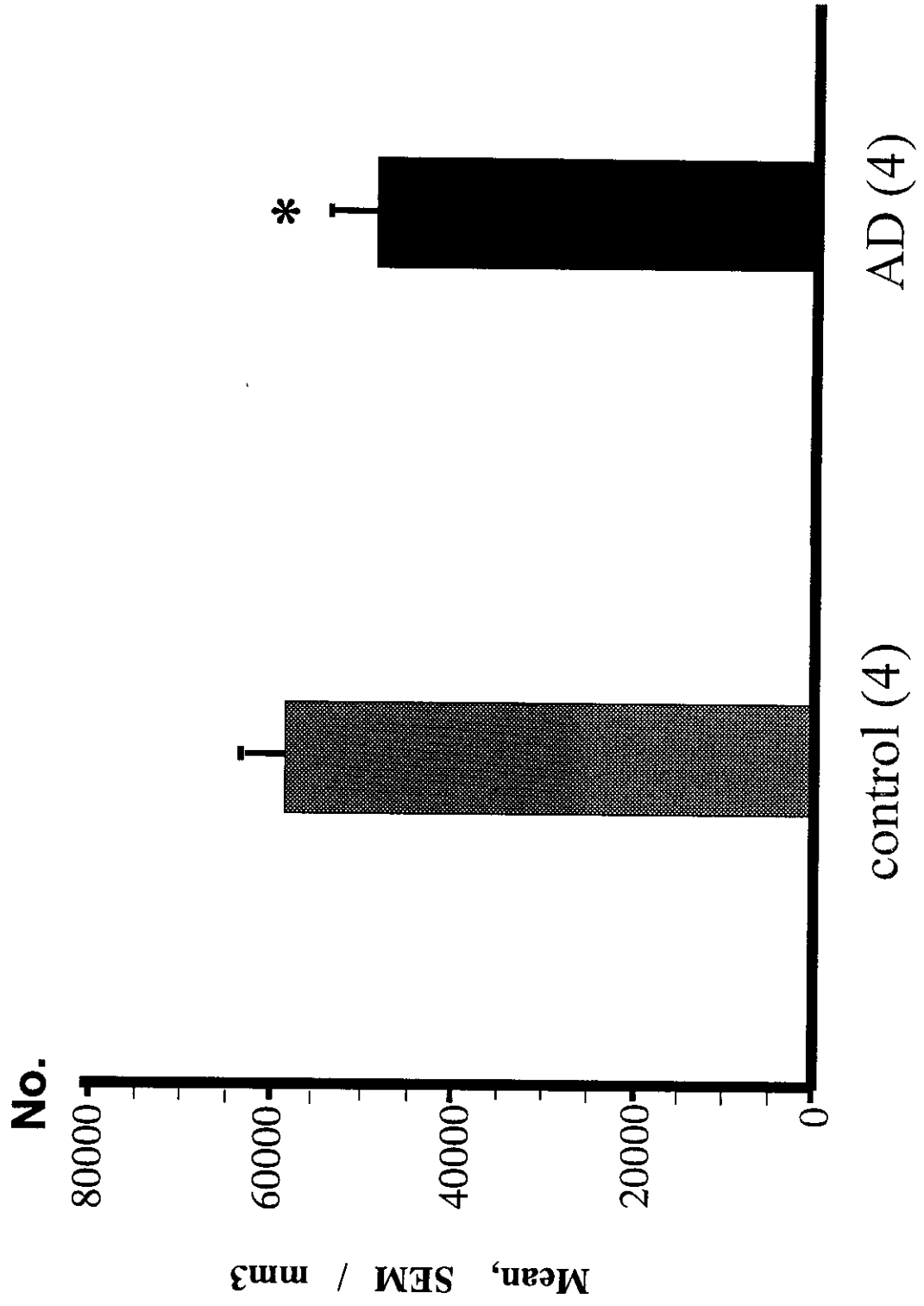
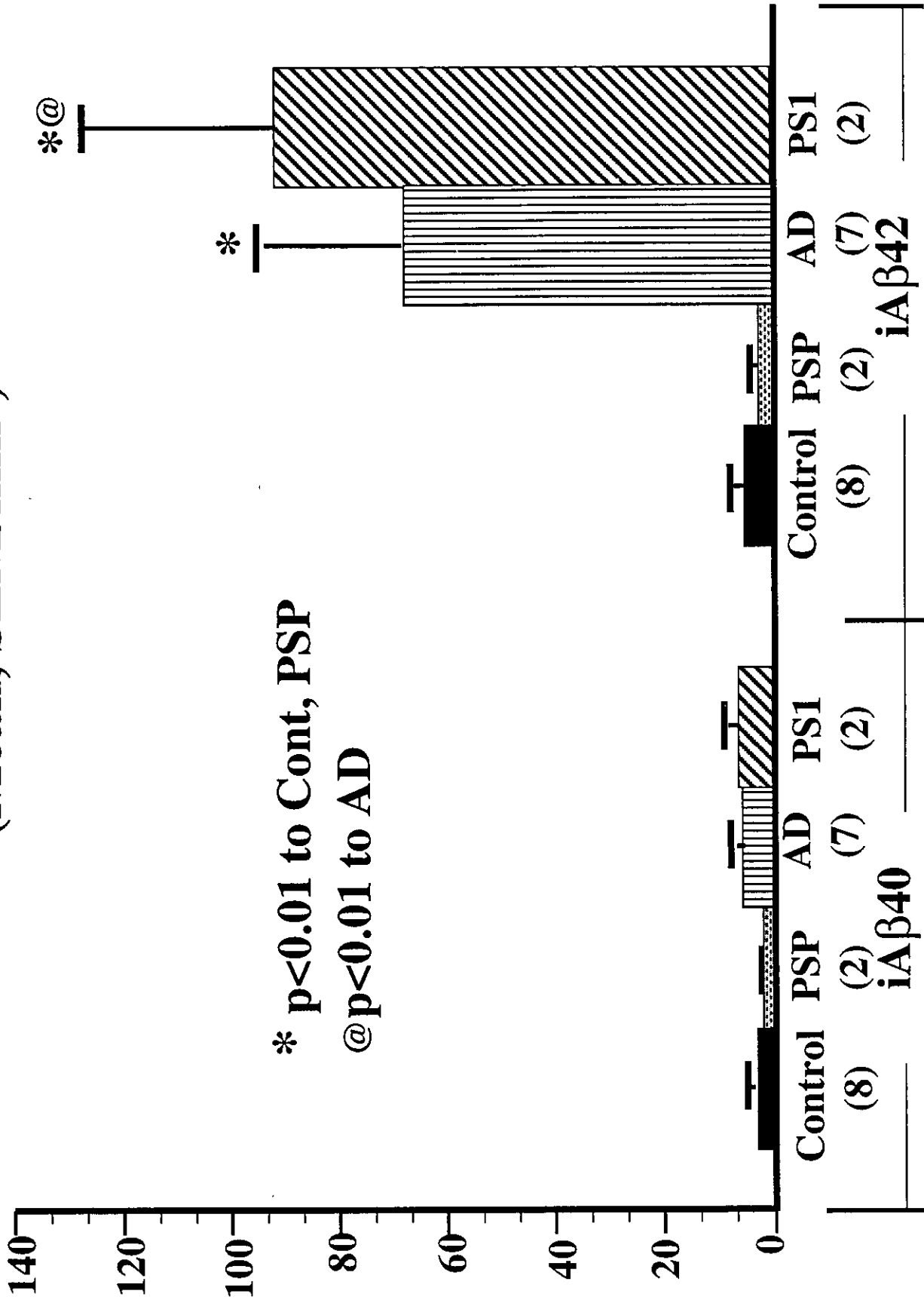


Fig. 2 Neuron Counts with Intracellular A β 40 or A β 42
 (Mean, SEM/mm²)



* p<0.01 to Cont, PSP
 @p<0.01 to AD

アルツハイマー病における神経細胞死促進機構の解明と抑止方法の開発

分担研究者 大八木保政 九州大学大学院医学研究院脳研神経内科

研究要旨 アルツハイマー病(AD)の病態に極めて重要な A β 42 は正常細胞内では 24 kD 蛋白として存在し、DNA 傷害に対して核内に沈着する。細胞内 A β 42 が転写因子、特に heat shock transcription factor (HSF)である可能性を検討した。Heat shock elements (HSE)を含む p53 プロモーターと A β 42 は *in vitro* で結合し、A β 42 トランスフェクト細胞では、p53 mRNA の過剰発現とルシフェラーゼアッセイによる直接の転写活性増強が認められた。また、p53 発現増加に相当するアポトーシス死が見られ、AD 脳では p53 蛋白の増加が認められた。従って、AD における神経細胞死の一因として細胞内 A β 42 による p53 過剰発現を介したアポトーシスプロセスが重要と考えられる。

A. 研究目的

アルツハイマー病(AD)の神経細胞死の分子メカニズムを明らかにし、その異常を修復する治療法を開発する。AD 脳において、神経細胞死とともに特徴的な老人斑の沈着が見られ、その主要成分はアミロイド β (A β)と呼ばれる 4 kD の不溶性アミロイド蛋白である。従って、A β と神経細胞死の関連を分子レベルで明らかにすることは極めて重要である。現在、多くの研究者は細胞外に沈着した A β が神経細胞毒性を有することで、二次的に神経細胞死が誘導されると考えている。しかし実際にはこのようなアミロイド仮説と矛盾するデータも多く、その真偽は未だ不明である。最近、AD 脳の神経細胞内に A β 42 が沈着していることが明らかにされ、細胞内 A β 42 と神経細胞死の関係が取りざたされている。神経細胞の老化において酸素ラジカルは極めて重要であるが、我々は A β 42 が酸化ストレスにより神経細胞内に選択的に増加・沈着することを見出した。この現象を出発点として、その意義、分子メカニズム、さらには AD 脳におけるその異常を明らかにし、最終的にこのプロセスの進行防止を可能とする治療法を開発することが本研究の目的である。

B. 研究方法

正常細胞内における A β 42 の存在を検討するために、培養細胞やマウス臓器蛋白の western blot を種々の抗

A β 抗体で検討した。また、シヨ糖密度勾配法にて、細胞内小器官における A β 42 蛋白の存在分布を検討した。その生理的機能を調べるために、核分画と細胞質分画に分離し、細胞周期や細胞分化の影響を検討した。一方、A β と p53 プロモーター DNA の結合性をゲルシフトアッセイ及びアビジン・ビオチン結合ビーズによる回収で検討した。細胞内に増加した A β の p53 mRNA 転写活性に対する効果を検討するために、A β 40 及び 42 発現ベクターとルシフェラーゼアッセイ用ベクターを培養細胞に導入し、それぞれの A β が p53 プロモーター活性に直接及ぼす効果を調べた。また、それらトランスフェクト細胞のアポトーシスアッセイを行った。さらに、AD 5 例及び正常対象 5 例の脳における p53 蛋白レベルを western blot で検討した。

C. 研究結果

A β 42 は極めて不溶化しやすい蛋白であり、正常細胞内では微量、もしくは他の蛋白との結合などにより水溶性構造をとっているはずである。現在まで、免疫沈降法などによる回収では極めて微量と推察されている。しかし最近、ELISA などではこれまで考えられていた以上に存在することが推察された。従って、抗体に反応しにくい複合体を形成している可能性がある。そこでまず、培養細胞の総蛋白を各種抗 A β 抗体による western blot 解析を行った。4 kD の A β は全く検出さ

れなかったが、興味深いことに、A β 42 の C 末特異抗体でのみ 24 kD の単一バンドが検出された。この蛋白は A β 17-24 に対する抗体でも弱く認識されたが、N 末特異抗体では検出できなかった。シヨ糖密度勾配法では細胞内の、特に小胞体やゴルジ体に多く存在していた。現在、この 24 kD 蛋白の回収及びアミノ酸配列の同定を試みている。24 kD 蛋白の生理的機能を検討するために、核分画と細胞質分画に分けて、細胞状態の変化に伴う量的変化を調べた。細胞周期の停止やニューロン分化により、この 24 kD の核分画での増加を認め、また H₂O₂ 処理によっても同様に核分画での増加を認めた。

以上のことより想定されることは、細胞内 A β 42 の生理的安定状態は可溶性蛋白であり、通常は小胞体やゴルジ体に蓄えられているが、DNA 傷害や分化といった細胞周期停止に関連して、核内で機能を発揮するということである。最近、理論的に A β は helix-turn-helix (HTH) motif を形成すると報告され、一方、HTH motif は heat shock promoter の転写活性を増強すると言われている。従って、細胞内 A β 42 は核内で熱ショック蛋白の転写調節に関わっている可能性がある。以前、A β 42 そのものを過剰発現させたトランスジェニックマウスでは、著しい脳の神経細胞のアポトーシス死が誘導されることが報告され、そのアポトーシスには p53 が重要とされていた。P53 のプロモーター領域には heat shock elements (HSE) が存在しているため、核内で増加した A β 42 が直接 p53 mRNA の転写を促進する可能性がある。ゲルシフトアッセイにより、p53 のプロモーター DNA と A β 42 の *in vitro* での結合能を検討したところ、p53 プロモーター、特にその HSE 部分に特異的に結合することが判明した。A β 40 の結合能は弱かった。また、ビオチン化オリゴヌクレオチドをアピジン結合ビーズにくっつけて合成 A β 42 の回収を行ったところ、特に核蛋白との相互作用で A β 42-HSE 結合が増強されることが認められた。このことは、A β 42 は核内環境下では効率よく HSE に結合することを示している。

次に、実際の細胞内で、A β 42 が p53 mRNA の発現に影響するか検討した。A β 40 あるいは A β 42 を培養細胞(SK-N-SH neuroblastoma)に過剰発現させたところ、A β 42 発現細胞で 6~7 倍の p53 mRNA 発現増加を認めたが A β 40 発現細胞では認めなかった。さら

に、直接 p53 プロモーターの転写活性に影響するか、p53 プロモーター下流にルシフェラーゼを組み込み、A β と同時に培養細胞にルシフェラーゼをトランスフェクトした。A β 42 導入細胞で、p53 mRNA 発現増加に相当する 6~7 倍のルシフェラーゼ活性の増加が見られ、A β 42 の作用は直接の転写活性増加と考えられた。やはり、A β 40 における作用は弱かった。また、cell viability assay 及び TUNEL assay により、A β 42 発現細胞ではアポトーシス死が促進されていた。このアポトーシスは p53 の過剰発現に関連していると考えられる。プロモーター DNA の A β 42 結合部位の配列を変更し、その結合能を約 50%に抑制すると、転写活性増加作用は約 50%に抑制され、A β 42 そのものの結合が重要と考えられた。

AD 5 例と年齢マッチした正常対象 5 例の脳組織の western blot による p53 蛋白の比較では、AD 脳で約 2 倍の発現増加を認め、AD 脳の神経細胞における p53 過剰発現が示唆された。

D. 考察

現在の AD メカニズムの主流仮説であるアミロイド仮説には以下の矛盾がある。1) 神経細胞死の程度や部位が必ずしも老人斑と一致しない、2) 老人斑の程度と痴呆症状の程度は必ずしも一致しない、さらに 3) 痴呆がなくとも老人斑が見られたり逆に老人斑が目立たない AD 様の痴呆症もある。以上より、AD における A β の意義として、明らかに何らかの病的役割は有しているが、必ずしも病理学的に残存しているものが重要というわけではない。細胞内に増加した A β 42 が神経細胞死を促進するか否かはまだ不明であるが、本来なんらかの生理的機能を有しており、そこに異常が生ずると神経細胞死を起こす可能性は十分にある。AD 脳においては、細胞内 A β 42 が関連した神経細胞死が亢進し、その後の細胞脱落時に不溶性の A β 42 が残存しやすくなっていると考えられる。

上記の研究結果より、細胞内 A β 42 の異常プロセスを以下のように考えている。まず、加齢・虚血や過剰な酸化ストレスに関連して神経細胞内の過酸化水素上昇があり、これが水酸ラジカルを生成する。水酸ラジカルは核 DNA 傷害を容易に起こし、DNA 修復機序が必要とされる。核内 24 kD 蛋白が反応性に

増加し、何らかのプロセスにより核内で活性型転写因子である A β 42 を生成する。活性型 A β 42 は p53 を始めとする熱ショック蛋白の転写を促進し、p53 は他の細胞周期停止に関連する蛋白発現を誘導する。このようなプロセスは基本的に神経細胞の自己防衛機能と考えられる。しかし一方、p53 の過剰発現はアポトーシスを容易に誘導する。DNA 修復とアポトーシスの境にどのような機序が働いているか不明であるが、細胞周期停止状態である神経細胞では p53 誘導性アポトーシスが起りやすいことは知られている。従って、本来核内 A β 42 は防御的に働いているが、軽微な機能異常でも神経細胞死を引き起こす可能性がある。我々の検討で、AD 脳で p53 が増加しているのは、自己防御であるとともに多くの神経細胞が前アポトーシス状態となっている可能性もある。

E. 結論

AD の神経細胞死のメカニズムを、細胞内 A β 42 の機能の観点から検討した。本年度は以下の点を明らかにした。1) A β 42 は正常細胞内で 24 kD 可溶性蛋白として存在し、細胞周期停止に関連して核内で増加する。2) 神経芽細胞腫で A β 42 を過剰に発現させると p53 誘導性アポトーシスを引き起こす。3) A β 42 は p53 プロモーターの HSE に結合し、直接 p53 mRNA の発現を増強する。4) AD 脳では p53 の過剰発現が見られ、神経細胞が前アポトーシス状態にあると考えられる。今後、細胞内 24 kD 蛋白のアミノ酸配列解析や核内の活性型 A β 42 の解析、その機能の調節機構と病的異常を調べていく予定である。

F. 研究発表

・論文発表

Ohyagi, Y., et al. Selective increase in cellular A β 42 is related to apoptosis but not necrosis. *NeuroReport* 11: 167-171, 2000.

・学会発表

- 1) 大八木保政 他：A β 42 は可溶性 24kD 蛋白として正常細胞内に存在する—その核内移行と細胞周期—。第 41 回日本神経学会総会、松本、2000 年 5 月 24 日
- 2) 朝原秀昭 他：細胞内 A β 42 による p53 プロモ

ーター活性調節 第 41 回日本神経学会総会、松本、2000 年 5 月 24 日

- 3) 大八木保政 他：アポトーシスニューロン内に増加した A β 42 の p53 プロモーター活性への影響 第 19 回日本痴呆学会、木更津、2000 年 9 月 29 日
- 4) Ohyagi, Y., et al.: Intracellular amyloid- β 42 enhances the transcription activity of p53. 30th annual meeting of Society for Neuroscience. New Orleans, Nov. 9, 2000.

G. 知的所有権の取得状況

なし

細胞内 A β 陽性構造の電子顕微鏡的検討

分担研究者 卷淵 隆夫 国立療養所犀潟病院臨床研究部長
共同研究者 田平 武 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第 6 部長
崔 得華 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第 6 部

研究要旨

プレセニリン 1 (PS1) トランスジェニックマウス及び人アルツハイマー病の神経細胞内の Abeta42 陽性構造について、リフレクションコントラスト顕微鏡 (RCM) と免疫戻し電顕により検討を行った。光顕で Abeta42 陽性であった神経細胞は、RCM では陽性所見を認めなかった。免疫戻し電顕では、PS1 トランスジェニックマウスでは陽性構造を認めなかったが、アルツハイマー病では細胞内小器官主に粗面小胞体の一部が Abeta42 陽性であった。しかし神経細胞内にアミロイドフィラメントは認めなかった。

A. 研究目的

近年一部の家族性アルツハイマー病では遺伝子異常が報告されており、アルツハイマー病の発症機序解明の手掛りとして期待される。この遺伝子異常、プレセニリン 1 (PS1) のアルツハイマー病の病理発生を検討する目的で、PS1 のトランスジェニックマウスを作成し、一部の神経細胞内に抗 β アミロイド 42 (Abeta42) 抗体に陽性所見を認めた。そこで、神経細胞内の Abeta42 陽性の局在を、リフレクションコントラスト顕微鏡 (RCM) と電子顕微鏡を用いて検討した。

B. 研究方法

4%paraformaldehyde 固定した PS1 トランスジェニックマウスと人アルツハイマー病の脳よりピブラトーム切片を作成した。抗 Abeta42 抗体を用いて浮遊法で免疫組織化学染色を行い、DAB で発色させた。2.5%glutaraldehyde 固定した。光学顕微鏡で観察して陽性神経細胞を確認しながら脳皮質を細切して、電子顕微鏡用小片を切出した。1%osmium oxide で後固定した。先に作成しておいたエポンブロックで曲らないようにして、水平にエポン包埋した。電顕ミクロトームで準超薄切片と超薄切片を連続切片で作成した。準超薄切片はスライドガラスに貼り付けトルイジンブルー染色した後、RCM の油浸 1000 倍像で観察した。超薄切片は電子染色したものと染めないものを電子顕微鏡で観察した。

C. 研究結果

- ①抗 Abeta42 抗体で免疫染色したピブラトーム切片を光学顕微鏡で観察すると、PS1 トランスジェニックマウスとアルツハイマー病の脳皮質の一部の神経細胞の胞体が陽性に染色されていた。
- ②この陽性であった神経細胞の準超薄切片を

RCM で観察すると、陽性像は認められなかった。

- ③この神経細胞の電子染色してない超薄切片を電子顕微鏡で観察すると、PS1 トランスジェニックマウスでは明らかな陽性像は認められなかった。アルツハイマー病では、細胞内小器官主に粗面小胞体の一部が陽性であった。電子染色した超薄切片では、神経細胞の胞体内にはアミロイドフィラメントは認められなかった。

D. 考察

- ①PS1 トランスジェニックマウス及び人アルツハイマー病の脳を抗 Abeta42 抗体で蛍光染色して共焦点顕微鏡で観察した研究 (崔ら) では、脳皮質の一部の神経細胞が Abeta42 に陽性である。抗 Abeta42 抗体で免疫染色し DAB で発色させたピブラトーム切片でも一部の神経細胞の胞体が染色されたのは、これに対応する所見である。

- ②RCM の観察で Abeta42 の明らかな陽性像が認められなかったことは、神経細胞の胞体内の Abeta42 が RCM での検出感度以下あるいは検出されない形態であることを示唆する。

- ③超薄切片の電子顕微鏡での観察では、トランスジェニックマウスと人アルツハイマー病では異なっており、今後の検討が必要である。

E. 結論

PS1 トランスジェニックマウスと人アルツハイマー病の脳皮質の神経細胞の胞体内には、Abeta42 がフィラメントを形成しない状態で存在するが、その局在は今後の検討が必要である。

F. 研究発表

論文発表

- [1] Chui DH, Dobo E, Makifuchi T, Akiyama H, Kawakatsu S, Checler F, Araki W, Takahashi K, Tabira T. Apoptotic neurons in Alzheimer's disease frequently show intracellular A 42 labeling. J Alzheimer Dis (in press)
- [2] Sato N, Imaizumi K, Manabe T, Taniguchi M, Hitomi J, Katayama T, Yoneda T, Morihara T, Yasuda Y, Takagi T, Kudo T, Tsuda T, Itoyama Y, Makifuchi T, Fraser PE, St George-Hyslop P, Tohyama M. Increased production of b-amyloid and vulnerability to ER stress by an aberrant spliced form of presenilin-2. J Biol Chem 276(3):2108-14, 2000

G. 知的所有権の取得状況

なし

アルツハイマー病と小胞体ストレスに関する研究

分担研究者 工藤 喬 大阪大学大学院医学系研究科神経機能医学 講師

研究要旨

プレセニリン1 (PS1) の変異体は unfolded protein response (UPR) センサーである PERK の機能を阻害し、家族性アルツハイマー病 (FAD) における神経細胞死の原因となることが示唆された。また、UPR の障害は A β の上昇を来す可能性を示した。従って、UPR の障害はアルツハイマー病の病理過程に関与する可能性が示唆された。

A. 研究目的

アルツハイマー病 (AD) の病理過程はまだ不明な点が多い。FAD の病因遺伝子である PS 1 が小胞体に局在することから、小胞体に負荷されるストレスと PS 1 に我々は着目した。小胞体には、種々のストレスに対して細胞の恒常性を保つために unfolded protein response (UPR) という機構があり、Ire 1、PERK、ATF 6 と小胞体膜に局在するセンサー分子によって調節されている。Ire 1 は UPR として自己のリン酸化が起こり、分子シャペロン GRP78 などが誘導され、folding を促すとされる。我々の過去のデータでは、PS 1 変異体はこの UPR としての GRP78 誘導を阻害し、Ire 1 の自己リン酸化を阻害することがわかった。本研究では、もう一つの小胞体センサー分子である PERK に対する PS 1 変異体の影響について検討した。また、AD の病理過程の根幹は、アミロイド蛋白特に A β 42 の上昇である。そこで、本研究では、障害された UPR と A β 上昇についても検討を加えている。

B. 研究方法

1) 小胞体センサー分子 PERK に対する PS 1 変異体の影響について

N2A 細胞及び SK-N-SH 細胞に野生型 PS 1、FAD 変異 PS 1 (A246E、 Δ E9)、MOCK を遺伝子導入し、stable cell line を確立した。これら細胞に、thapsigargin、tunicamycin、DTT といった小胞体ストレスを負荷し、5分、15分、30分後に細胞を回収し、抗 PERK 抗体及び抗リン酸化 eIF2 α 抗

体を用いたウェスタンブロットに供した。さらに、PS 1 ノックインマウスにより調整した線維芽細胞についても同様の実験を行った。

2) UPR 障害細胞における A β 産生について

Ire 1 のキナーゼ部分を失ったコンストラクト (Δ Ire) を作成し、野生型及び MOCK と共に N2A 細胞に遺伝子導入し、stable cell line を確立した。また、PERK のノックアウト線維芽細胞を New York University の David Ron 氏より供与を受けた。細胞が sub-confluent になった段階で、無血清培地に転換し、24時間後の培地を回収し、ELISA 法 (武田薬品工業から供与) にて A β 40 及び 42 量について計測した。

C. 研究結果

1) 小胞体センサー分子 PERK に対する PS 1 変異体の影響について

野生型細胞や MOCK 細胞では、PERK のリン酸化及び eIF2 α のリン酸化は速やかに生じるのに対し、FAD 変異 PS 1 細胞ではそれが遅延することが観察された。PS 1 ノックインマウス線維芽細胞では、小胞体ストレスに対する PERK の反応性は、変異アレルの heterozygous、homozygous になるにつれ障害されることが観察された。この結果より、PS 1 の変異体存在下では、PERK を介する UPR が障害され、それが細胞のストレス脆弱性を来すことが示唆された。

2) UPR 障害細胞における A β 産生について

△ Ire 細胞は野生型 Ire 細胞に比し、PERK ノックアウト (-/-) 細胞は野生型に比し、培地中に放出される Aβ特に Aβ42 の上昇する傾向が観察されたが、有意ではなかった。

D. 考察

AD の病理過程の根幹は Aβの上昇である。特に、当研究班では細胞内の Aβ蓄積について検討を加えている。今回の我々の検討から、UPR に関する分子の PERK が PS 1 の変異体により、機能に障害を受けることが示された。この事実は、Ire 1 が PS 1 の変異体により障害を受けるという以前の我々のデータと併せて、AD の病理過程に UPR 障害が関与することを示唆するものである。そこで、今後の課題としてこの UPR 障害と Aβ産生上昇との関係に注目したいと考えている。今回、UPR が障害されている細胞で、Aβ上昇が観察されたが、次年度よりこの結果について慎重に検討を加えていく予定である。

E. 結論

UPR の障害はアルツハイマー病の病理過程に関与する可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

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 Jinno, Masaya Tohyama, Masatoshi Takeda
Neurobiol. Aging 21, 215-224, 2000.

G. 知的所有権の取得状況

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名）	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
Mutational analysis of intrinsic regions of presenilin 2 which determine its endoproteolytic cleavage and pathological function. J Biol Chem 275(5):3681-6	2000		Shirotani K, Takahashi K, Araki W, <u>Tabira T</u>
Two brothers of frontotemporal dementia and parkinsonism with an N279K mutation of the tau gene. Neurology 54(9):1787-95	2000		Arima K, Kowalska A, Hasegawa M, Mukoyama M, Watanabe R, Kawai M, Takahashi K, Goedert M, Iwatsubo T, <u>Tabira T</u> , Sunohara N
Alzheimer's disease-associated presenilin 2 interacts with DRAL, an LIM-domain protein. Hum Mol Genet 9(15):2281-9	2000		Tanahashi H, <u>Tabira T</u>
Chronic stress induces impairment of spatial working memory because of prefrontal dopaminergic dysfunction. J Neurosci 15;20(4):1568-74	2000		Mizoguchi K, Yuzurihara M, Ishige A, Sasaki H, Chui DH, <u>Tabira T</u>
Mutant presenilin 2 transgenic mice. A large increase in the levels of A β 42 is presumably associated with the low density membrane domain that contains decreased levels of glycerophospholipids and sphingomyelin. J Biol Chem 275(36):27901-8	2000		Sawamura N, Morishima-Kawashima M, Waki H, Kobayashi K, Kuramochi T, Frosch MP, Ding K, Ito M, Kim TW, Tanzi RE, Oyama F, <u>Tabira T</u> , Ando S, Ihara Y
Apoptotic neurons in Alzheimer's disease frequently show intracellular A β 42 labeling. J Alzheimer Dis (in press)	2001		Chui DH, Dobo E, <u>Makifuchi T</u> , Akiyama H, Kawakatsu S, Checler F, Araki W, Takahashi K, <u>Tabira T</u>
Increased production of β -amyloid and vulnerability to ER stress by an aberrant spliced form of presenilin-2. J Biol Chem 276(3):2108-14	2001		Sato N, Imaizumi K, Manabe T, Taniguchi M, Hitomi J, Katayama T, Yoneda T, Morihara T, Yasuda Y, Takagi T, <u>Kudo T</u> , Tsuda T, Itoyama Y, <u>Makifuchi T</u> , Fraser PE, St George-Hyslop P, Tohyama M

<p>Selective increase in cellular Aβ42 is related to apoptosis but not necrosis. Neuroreport 11(1):167-71</p>	<p>2000</p>		<p>Ohyagi Y, Yamada T, Nishioka K, Clarke NJ, Tomlinson AJ, Naylor S, Nakabeppu Y, Kira J, Younkin SG.</p>
<p>Are cerebrovascular factors involved in Alzheimer's disease? Neurobiol Aging 21(2):215-24</p>	<p>2000</p>		<p>Kudo T, Imaizumi K, Tanimukai H, Katayama T, Sato N, Nakamura Y, Tanaka T, Kashiwagi Y, Jinno Y, Tohyama M, Takeda M.</p>