

は内側と外側のある空胞状の構造であることが明らかとなった。したがってNuclear Bodyの内側は外側の Nuclear Plasm 側とは違った環境になっていることが予想される。内側と外側では、誘導され、存在する分子が異なっているのかなどの解析は今後の興味ある課題である。NT2ニューロンにおいてE2F1強制発現によって、アポトーシス誘導因子Baxやアポトーシス抑制因子Bcl-2が核内のNuclear Bodyに誘導されたが、その生理的意義、マトリクスで果たす役割については全く不明である。本研究の結果から生理的条件下でも、核からのアポトーシスシグナルの伝達に何らかの役割を担っている可能性が考えられる。

E. 結論

1. ヒトE2F1を高発現するアデノウイルスベクターを用いてヒト分化ニューロンに導入し細胞死を起こす実験系を確立した。
2. 細胞死がどのような経過で起こるのかを検討した。その結果カスパーゼ3の活性化を伴った典型的なアポトーシスであることを見いだした。
3. 強制発現されたE2F1は、細胞死に先だってNuclear Bodyを形成することが見いだされた。
4. E2F1誘導Nuclear Bodyは、核マトリクスに存在していた。このNuclear Bodyには内外の極性が存在した。
5. E2F1誘導Nuclear Bodyには、アポトーシス関連蛋白質であるBax、Bcl-2が誘導された。

F. 研究発表

1. 発表論文

Characterization and Chromosomal Mapping of a human necdin pseudogene.
Y. Nakada, H. Taniura, T. Uetsuki and K. Yoshikawa
Gene 245, 185-191, 2000

The postmitotic growth suppressor necdin interacts with a calcium binding protein (NEFA) in neuronal cytoplasm.
N. Taniguchi, H. Taniura, M. Niinobe, C. Takayama, K. Tominaga-Yoshino, A. Ogura and K. Yoshikawa.
J. Biol. Chem. 275, 31674-81, 2000

2. 学会発表

核マトリクスにおけるnecdinとp53の相互作用
谷浦秀夫、小林正克、松本国治、吉川和明
第73回日本生化学大会、2000.10

神経細胞におけるNecdinとE2F4の相互作用の解析
小林正克、谷浦秀夫、吉川和明
第73回日本生化学大会、2000.10

安定遺伝子導入細胞によるnecdinの機能解析
安藤拓、谷浦秀夫、吉川和明
第73回日本生化学大会、2000.10

ニューロンにおけるnecdin結合蛋白質の同定と解析
谷浦秀夫、谷口直子、高山千利、新延道夫、吉川和明
第43回日本神経化学会、2000.10

E2F1強制発現によるニューロンアポトーシス誘導機構の解析
植月太一、西村伊三男、原とも子、谷浦秀夫、吉川和明
第43回日本神経化学会、2000.1

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)遺伝子導入によりニューロンの変性条件を検討した。野生型APPや細胞質ドメイン(C31)を欠いたAPP変異体cDNA(Δ c31)はニューロン死を誘導したが、Ab領域を欠いた変異体cDNA(Δ Ab)や無関係な遺伝子発現では起こらなかった。一方、ワートマニンでAPP代謝産物の細胞外分泌を抑制すると、APPによるニューロン死は加速された。また、ビタミンC(Vc)よりもリン酸型Vcの方がニューロン死を遅延させる作用が強かった。これらのことから、本実験系におけるニューロン死には、細胞内APP代謝の何らかの過程が作用していると考えられた。また、APPとAbによるニューロン死誘導を比較したところ、両者によるニューロン死の相乗効果が働くことが明らかになった。一方、APP遺伝子導入によりグリア細胞ではIL-8生産が誘導された。IL-8はそれ自身ニューロンに対して何ら直接作用はもたらさなかったが、APP高発現ニューロンに対しては強い細胞障害作用を示した。さらに、グリアとニューロンを併置培養すると、APPによるニューロン死が促進された。これらの結果から、グリア細胞がAPPによるニューロン死の促進作用をもつ可能性が示唆された。

A. 研究目的

現在までのところ、孤発性ADには、アミロイドペプチド(Ab)やその凝集塊である老人斑が深く関わっていると考えられる研究者は多いが、これらがどのように脳神経細胞の変性/死滅をもたらすかという分子機構に関する見解は大きく異なっている。そのため、各研究者独自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ズ2、3、および12がAb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、Ab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、問題点や矛盾点もあり、まだまだ、AD病因の全容を解明する上では、究めて多くの不明点が残されている。

一方、私達は、これまで、アミロイド前駆体蛋白質(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、これが孤発性ADの病態の新たな側面を反映しているのではないかと予想している。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いた。その結果、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としてin vitroでの維持が可能であり、それらにアデノウイルスベクターを用いたAPP遺伝子発現で再ニューロンの変性過程を再現することが可能になった。この手法により孤発性ADの新たな細胞変性モデル系として遺伝子発現や細胞変性やその抑制、さらには、非ニューロンとの併置培養の効果について検討したので、それらの実験結果を報告する。

B. 研究方法

ラット胎児海馬ニューロンの初代培養はウイスターラット胎児（18-19日齢胎児）から海馬領域を無菌的に取り出し分散細胞を得た。10%牛胎児血清(FCS)を含んだDMEM (DMCM/FCS) に懸濁し、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。アストロサイトとニューロンの併置培養には、初代培養大脳神経細胞をDMCM/FCSで培養することで得られたアストロサイトの2~3代培養細胞を用いた。初代培養ニューロンにアデノウイルスベクターを用いてAPPまたはその変異体を感染させた。細胞には通常の免疫染色を施した。ニューロンの生存率は抗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次抗体として用い形態学的指標により変性死滅しつつあったニューロン割合を求めた。IL-8の蛋白質定量は、EILSA法により行っ

た。

C. 研究結果

APP遺伝子導入による海馬ニューロンの細胞変性/死滅

アストロサイトが約50%になるように添加した培養系（併置培養）とニューロンのみからなる培養系（ニューロン単独培養）でAPP遺伝子導入効果を比較、検討した。ニューロン単独培養では通常は95%以上がニューロンであるが、この培養条件ではAPP遺伝子導入後4~6日後に著しい細胞死が観察された。しかし、併置培養条件下では、細胞死がさらに1~2日早まることが判明した。則ち、APPによるニューロン死滅誘導は、非ニューロンの存在により加速されることが考えられた。

変異体APP遺伝子によるニューロン死誘導

次に、APP遺伝子およびその変異体遺伝子を用いて細胞死誘導効果を調べた。APP分子からAbの20アミノ残基相当部分を取り除いた変異体（ Δ Ab）では、APPによるニューロン死誘導作用は著しく低下していた。一方、APPの細胞質ドメインをC末端から31残基除去した変異体（ Δ C31）では、APPの作用と同等か、あるいは、約2~3倍ニューロン死誘導作用が増強していた。これらのことから、APPによるニューロン死の誘導にはAb領域が必要であると考えられたが、第2の細胞死誘導ドメインとして報告された、C末端細胞質ドメインは、必ずしも必要ではないと考えられた。

ワートマニンによる細胞死の増強

本実験系におけるニューロン死は、APP遺伝子の高発現やその細胞内代謝と深く関わっていると考えられるが、細胞外に放出されたAbが作用しているかどうかは、興味ある問題である。ホスファチジルイノシトール3リン酸キナーゼの阻害剤であるワー

トマニン、Abを含むAPP代謝産物の細胞外放出を著しく抑制させることが知られている。そこで、本実験系にワートマニン添加し、ニューロンの生存率を調べた。APP遺伝子導入とワートマニン添加を同時に施すと、APPによるニューロン死が著しく増強された。同時に、細胞内ではAPP代謝産物が2倍以上蓄積していた。ワートマニンによる増強効果は、Abによるニューロン死誘導反応では全く認められなかった。これらのことから、Abを含むAPP代謝産物が細胞内に留まることが、細胞死の原因となっていると考えられた。

APPとAbの相乗効果

APPやAbの相乗効果を明らかにするために、毒性を示さない以下の濃度のAb存在下でアデノウイルスによるAPP遺伝子導入を実施した。その結果、APPによるニューロン死が促進されることがわかった。逆に、APP遺伝子を発現するアデノウイルス濃度を下げてAbによるニューロン死誘導実験を行ったが、この場合でも、相乗効果があることが判明した。APPとAbによる相乗効果は神経株化細胞であるNT-2細胞やヒト神経前駆体細胞由来の神経細胞においても認められた。

APPによるIL-8の生産誘導と神経細胞死

次にIL-8生産におけるニューロン死の変化について解析した。神経系の細胞株ではどれもAPPによる著しいIL-8生産誘導は認められなかったが、アストロサイトーマ亜株やグリオーマでは顕著な誘導が認められた。初代培養細胞であるアストロサイトやマクロファージでも誘導された。以上のことから、APPによるIL-8産生は一般に非神経細胞で認められ、それが周囲の微小環境に放出される可能性が考えられる。IL-8を培養液に30mMの濃度まで添加しても、全くニューロンの生存には影響しなかった。ところが、APP遺伝子導入をIL-8添加と同時に行ったところ、ニューロン死の割合が

著しく増大した。したがってグリア細胞では、IL-8のようなケモカインの産生制御をすることで、近傍のニューロンに生存に影響を与えていると考えられた。

ニューロン死を抑制する因子

Abによるニューロン死はビタミンC (Vc) によって抑制される事が知られているため、同じような実験を本実験系で追試した。Vcの濃度を変化させても、APPによる細胞死には全く影響がなかった。しかしながら、より細胞内に透過する能力が高いリン酸型Vc (Vcp)を培養系に添加したところ、用量依存的に細胞死を遅延させることがわかった。ただ、この場合も、細胞死を完全に抑制することはできなかった。このことから、ニューロン死の原因となる反応に活性酸素種が介在している可能性が明らかになったが、その作用場所はVcが容易にアクセスできる細胞表面ではなく、細胞内部である可能性が高いと考えられた。種々の神経栄養因子を海馬ニューロン培養系に加えた後APP遺伝子導入を試みたところ、CNTFが神経細胞の変性死滅を抑制することが判明した。しかしながら、NGF、NT-3、NT-4、BDNF 等には抑制効果が認められなかった。

D. 考察

長期培養した成熟ニューロンにおいてAPP遺伝子が高発現すると、そのニューロンは死滅することを明らかにした。アデノウイルスによるAPP遺伝子発現のレベルは、細胞が持つ固有の発現量に比べて数倍以上上昇していると考えられる。神経栄養因子の欠如や細胞障害性ストレスによりAPPの遺伝子発現の上昇が認められていることから考えると、このこと自体がアルツハイマー病における病因あるいは病態と関連している

ケースも考えられる。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でも、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。

APPとAbの相乗効果を調べる実験から、両者がニューロン死誘導に関与している可能性がある。前述のように、APPから形成されたAbが細胞内に蓄積されることと、細胞外Abが細胞膜に作用することが、同じメカニズムにつながるのか、あるいは、相補的な役割を担っているかは明らかではない。細胞外Abによる細胞死は、Abは培養系に添加してから12~24時間ぐらいにほぼ50%ほどの細胞死が認められるが、その後はAbが存在するにも拘わらず、細胞死が進行しない。これは、Abの一部に細胞毒性をもった特殊な分子形態を持つものが存在するのか、あるいは、添加時に細胞膜との特別な反応（例えば、細胞内に取り込まれるような）が起こり、それが細胞死につながるのであって、単にAbが細胞と接触し続けることが重要ではないのかもしれない。APPとAbの相乗効果が意味する機構は、まだまだ不明な点が多い。一方、ニューロン単独の培養系に比べ、アストログリア細胞の共存条件がAPPのニューロン死誘導をより著明に促進する。APPはアストログリアに対して活性酸素種の生産促進、ケモカインIL-8の生産誘導がある。従って、AbあるいはAPPがグリア細胞に対してな何らかの作用をしていると考えられ、それが、ニューロン・グリアの相互作用にも影響を及ぼしていると考えられる。特に、IL-8は単独にニューロンに働きかけてもなんの効果もなかったが、APP高発現細胞では細胞死の促進効果を示した。現在、神経系細胞におけるIL-8受容体の発現について調べてい

る。あるいは、広く炎症性反応の誘導も起こっているのかもしれない。ニューロン・アストログリアの相互作用の一つに、神経栄養因子の生産、供給がある。種々の神経栄養因子の介在を調べたところ、毛様体神経栄養因子(CNTF)がAPPの作用を抑制した。また、海馬ニューロンの生存はCNTFに依存的であることから変性に抗する作用としてCNTF受容体の発現上昇があるか現在調べている。

結論

APP遺伝子高発現初代培養ラット海馬ニューロンは細胞変性しその後死滅するが、アストログリア細胞では活性酸素種やIL-8の産生を高める。ニューロンの変性過程にはAPP代謝産物が細胞外分泌を必要とせず、むしろ細胞内におけるAPP代謝産物の蓄積が様々な細胞障害活性をもたらすと考えられた。同様に、アストログリアでも細胞にストレスがかかり、ケモカインや神経栄養因子の産生の制御をおこなうと考えられた。そのような変化が、ニューロン変性や死滅を加速する反応に繋がる可能性も考えられた。以上、本モデル系における細胞死は、細胞内に蓄積したAbやAPP代謝産物によるものと考えられ、Abが細胞外から働くメカニズムとは異なると考えられた。アデノウイルスを用いた本病態システムは、AD病因に関わる分子探索の系として、治療薬や抗痴呆性食品のスクリーニング等にも有用な病態モデル細胞系と考えられた。

F.研究発表

- 1.論文発表 該当なし。
- 2.学会発表 該当なし。

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。