

厚生科学研究費補助金

脳科学研究事業報告書

平成 14 年 2 月 28 日厚生労働省発健第 0 2 2 8 0 0 2 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：

国立療養所中部病院長寿医療研究センター

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 国立療養所中部病院長寿医療研究センター センター長

研究要旨 アルツハイマー病脳のマイネルト核でも細胞内 A β 42 蓄積が見られることが明らかになった。A β のオリゴマーはラフトに回収され、グリピカン1と結合することが分かった。p53 プロモーターに結合する A β 42 は、核内物質によりその結合が影響を受けることが分かった。また、ER ストレスはA β 産生を増強し、A β は ER ストレス脆弱性を高めることが分かった。

分担研究者

巻淵隆夫	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系研究科付 属脳神経病研究施設神経内科 講師
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 助教授
秋山治彦	東京都医学研究機構東京都精神 医学総合研究所 副参事研究員

特異的抗体による免疫電顕を行ない、A β 42 の細胞内局在を明らかにする。

3) A β と結合する蛋白質を蛋白質科学的にスクリーニングし、細胞内 A β と関連する蛋白質の機能を明らかにする。

4) A β 42 が p53 プロモーターに結合し、アポトーシスを誘導する機構を明らかにし、アポトーシス促進ないし制御に絡む物質を選択する。

5) ER ストレス脆弱性が PS1 変異することが分かったが、AD 特異性が見られない。そこで、ER ストレスと A β の関係を明らかにする。

(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、病態解明の一環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なった。

A. 研究目的

この研究はアルツハイマー病 (AD) 特にプレセニン1 (PS1) プレセニン2 (PS2) 変異によって起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ない、細胞内 A β 蓄積を有する神経細胞の分布を明らかにする。

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

C. 研究結果

1) アルツハイマー病のマイネルト核においても A β 42 の細胞内蓄積を示す神経細胞が見られた。

2) 細胞内 A β 42 の局在を知る目的で免疫電顕を行なったところ、特定の細胞内小器官である証拠は得られず、cytosol である可能性が高くなった。

3) 細胞内 A β 42 はしばしば神経原線維変形の部位に局在した。これは神経原線維変形

成時の巻き込みと思われる。

4) 線維化 $A\beta$ とよく結合するヘパラン硫酸プロテオグリカンの1つ、グリピカン1を見出した。グリピカン1はラフトに局在し、 $A\beta$ のオリゴマーと一緒に回収された。

5) $A\beta_{42}$ は p53 プロモーターに直接結合し、この結合は核内抽出物質の添加により増強することを明らかにした。

6) Er ストレスは $A\beta$ 産生を増強し、 $A\beta$ は ER ストレス脆弱性を高めることが分かった。

D. 考察

本研究者は 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 $A\beta_{42}$ の蓄積が見られ、アポトーシスの促進が見られることを示して来た。昨年の研究で、AD 脳においても $A\beta_{42}$ 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。 $A\beta_{42}$ 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。今回老人斑が殆ど見られないマイネルト核でも細胞内 $A\beta_{42}$ の蓄積を認めた。この研究により細胞内 $A\beta_{42}$ の重要性が一層明らかになった。

細胞内 $A\beta_{42}$ 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、その局在を明らかにすることは大変困難である。今年も引き続きその作業を行なった結果、特定の細胞内小器官に蓄積しているという証拠は得られなかった。このことから cytosol である可能性が高くなった。

今回の最大の成果はグリピカン1の発見である。これまで老人斑に HSPG が沈着していることは知られていたが、ラフトに局在する HSPG が $A\beta$ を結合することを明らかに出来

たことは驚きである。なぜならラフトは $A\beta$ 産生工場とされ、またラフトには GM1、コレステロールが豊富に存在し、seeding $A\beta$ も形成される。グリピカン1は $A\beta$ モノマーをあまり結合せず、ポリマーを結合した。従って、グリピカン1は $A\beta$ による細胞毒性を緩和している可能性がある。

$A\beta_{42}$ が p53 のプロモーターに結合することは昨年明らかにした。 $A\beta_{42}$ 陽性で p53 陽性の核を有する神経細胞が AD 脳で見られた。今回 $A\beta_{42}$ の p53 プロモーターへの結合が、核内抽出物質の添加で増強することが分かった。この物質を同定することで、アポトーシスを抑止する物質を見出すことが可能である。

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 Ire1p 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。昨年、ER センサーの一つ PERK の PS1 変異によりリン酸化が低下することを見出した。ER ストレスは虚血や感染などの時に生じるが、これまで AD と結びついていなかった。今年の研究で、 $A\beta$ も ER ストレスを生じること、ER ストレスは $A\beta$ 産生を増強することが分かり、AD に結びついたといえる。

E. 結論

PS 変異は $A\beta_{42}$ 産生増強、ひいては細胞内蓄積を引き起こし、p53 あるいは ER ストレス等を介して神経細胞死を促進している。

$A\beta$ オリゴマーを結合するグリピカン1の発見により、細胞死抑止法開発へ一つの道が開けそうである。

F. 研究発表

1) 論文発表

1. Araki W, Yuasa K, Takeda S, Shirotani K, Takahashi

- K, Tabira T. Overexpression of presenilin-2 enhances apoptotic death of cultured cortical neurons. *Ann New York Academy Sci*, vol 920, The Molecular Basis of Dementia, pp241-244, 2000
2. Poorkaj P, Grossman M, Steinbart E, Payami H, Sadovnick A, Nochlin D, Tabira T, Trojanowski JQ, Borson S, Galasko D, Reich S, Quinn B, Schellenberg G, Bird TD. Frequency of tau gene mutations in familial and sporadic cases of non-Alzheimer dementia. *Arch Neurol* 58: 383-387, 2001
 3. Miyamoto K, Kowalska A, Hasegawa M, Tabira T, Takahashi K, Araki W, Akiguchi I, Ikemoto A. Familial frontotemporal dementia and parkinsonism with a novel mutation at an intron 10 +11-splice site in the tau gene. *Ann Neurol*. 50: 117-120, 2001
 4. Tanahashi H, Tabira. Three novel alternatively spliced isoforms of the human beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme (BACE) and their effect on amyloid beta-peptide production. *Neurosci Lett* 307:9-12, 2001
 5. Tabira T. Cloquinol's return: cautions from Japan. (letter to the editor) *SCIENCE* Vol. 292. 22. P.2251, 2001
 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 A42 labeling. *J Alzheimer Dis* 3:231-239, 2001
 7. Kowalska A, Asada T, Arima K, Kumakiri C, Kozubski W, Takahashi K, Tabira T. Genetic analysis in patients with familial and sporadic frontotemporal dementia: Two tau mutations in only familial cases and no association with apolipoprotein e4. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders* 12:387-392, 2001
 8. Mann DMA, Pickering-Brown SM, Takeuchi A, Iwatsubo T, & Familial Alzheimer's Disease Study Group (Arango J, Bird T, Van Broeckhoven C, Brooks W, Brown R, Cairns N, Cras P, Ellison D, Haltia M, Li K, Jorgensen A, Krill J, Lantos P, Lippa C, Martins R, Nochlin D, Pollen D, Rosenberg C, Rossor M, Tabira T). Amyloid angiopathy and variability in amyloid beta deposition is determined by mutation position in presenilin-1-linked Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 158:2165-2175, 2001
 9. Araki W, Yuasa K, Takeda S, Takeda K, Shirotani K, Takahashi K, Tabira T. Proapoptotic effect of presenilin 2 (PS2) overexpression is associated with down-regulation of Bcl-2 in cultured neurons. *J Neurochem* 79:1161-1168, 2001
 10. Fujigasaki H, Uchihara T, Koyano S, Iwabuchi K, Yagishita S, Makifuchi T, Nakamura A, Ishida K, Toru S, Hirai S, Ishikawa K, Tanabe T, Mizusawa H. Ataxin-3 is translocated into the nucleus for the formation of intranuclear inclusions in normal and Machado-Joseph disease brains. *Exp Neurol*. 165: 248-56, 2000
 11. 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 beta-amyloid and vulnerability to endoplasmic reticulum stress by an aberrant spliced form of presenilin 2. *J Biol Chem*. 276: 2108-14, 2001
 12. Nakayama H, Kiatipattanasakul W, Nakamura S, Miyawaki K, Kikuta F, Uchida K, Kuroki K, Makifuchi T, Yoshikawa Y, Doi K. Fractal analysis of senile plaque observed in various animal species. *Neurosci Lett*. 297: 195-8, 2001
 13. Ishikawa K, Owada K, Ishida K, Fujigasaki H, Shun Li M, Tsunemi T, Ohkoshi N, Toru S, Mizutani T, Hayashi M, Arai N, Hasegawa K, Kawanami T, Kato T, Makifuchi T, Shoji S, Tanabe T, Mizusawa H. Cytoplasmic and nuclear polyglutamine aggregates in SCA6 Purkinje cells. *Neurology* 56: 1753-6, 2001
 14. Imai C, Sugai T, Iritani S, Niizato K, Nakamura R, Makifuchi T, Kakita A, Takahashi H, Nawa H. A quantitative study on the expression of synapsin II and N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein in schizophrenic patients. *Neurosci Lett*. 305: 185-8, 2001
 15. Yamazaki M, Makifuchi T, Chen KM, Mori O, Katayama Y, Takahashi H, Oyanagi K. Progressive supranuclear palsy on Guam. *Acta Neuropathol (Berl)*. 102: 510-4, 2001

16. Akiyama H, Kondo H, Ikeda K, Kato M, McGeer PL. Immunohistochemical localization of neprilysin in the human cerebral cortex: inverse association with vulnerability to amyloid β -protein(A β) deposition, *Brain Res* 902:277-281, 2001
17. Akiyama H, Kondo H, Ikeda K, Kato M, McGeer PL. Amyloid β -protein granules in glial cells in Alzheimer's disease brain. In: Tanaka C (eds): *Neuroscientific Basis of Dementia*, pp225-228, Birkhauser, Basel, 2001
18. Akiyama H, Neurons. In: Rogers J (ed). *Neuroinflammatory Mechanisms in Alzheimer's Diseases: Basic and Clinical Research*. Birkhauser, Basel, pp225-236, 2001
19. Yasojima K, Akiyama H, McGeer EG, McGeer PL. Reduced neprilysin in high plaque areas of Alzheimer brain: a possible relationship to deficient degradation of β -amyloid peptide, *Neurosci Lett* 297:97-100, 2001
20. Hino H, Akiyama H, Iseki E, Kato M, Kondo H, Ikeda K, Kosaka K. Immunohistochemical localization of plasminogen activator inhibitor (PAI)-1 in rat and human brain tissues, *Neurosci Lett* 297:105-108, 2001
21. Arai T, Ikeda K, Akiyama H, Tsuchiya K, Yagishita S, Takamatsu J. Intracellular processing of aggregated tau differs between corticobasal degeneration and progressive supranuclear palsy *NeuroReport* 12:935-938, 2001
22. Togo T, Iseki E, Marui W, Akiyama H, Ueda K, Kosaka K. Glial involvement in the degeneration process of Lewy body-bearing neurons and the degradation process of Lewy bodies in brains of dementia with Lewy bodies, *J Neurol Sci* 184:71-75, 2001
23. Uchihara T, Sato T, Suzuki H, Ikeda K, Akiyama K, Takatori T. Bunina body in frontal lobe dementia without clinical manifestations of motor neuron disease, *Acta Neuropathol* 101:281-284, 2001
24. Arai T, Ikeda K, Akiyama H, Shikamoto Y, Tsuchiya T, Yagishita S, Beach T, Rogers J, Schwab C, McGeer PL. Distinct isoforms of tau aggregated in neurons and glial cells in brains of patients with Pick's disease, corticobasal degeneration and progressive supranuclear palsy, *Acta Neuropathol* 101:167-173, 2001
25. Schwab C, Akiyama H. Familial British Dementia: new evidence in the labyrinth of tangles and plaques? *NeuroScience News* 4(2):22-29, 2001
26. Togo T, Akiyama H, Iseki E, Kondo H, Ikeda K, Kato M, Oda T, Tsuchiya K, Kosaka K. Occurrence of T cells in the brain of Alzheimer's disease and other neurological diseases, *J Neuroimmunol* 124:83-92, 2002
27. Ikeda K, Akiyama H, Arai T, Tsuchiya K. Pick-body-like inclusions in corticobasal degeneration differ from Pick bodies in Pick's disease, *Acta Neuropathol* 103:115-118, 2002
- 2) 学会発表
14. Tabira T, Chui DH, Araki W, Dobo E: Presenilin mutations and pathogenesis of Alzheimer's disease (Symposium) . 5th International Conference on Progress In Alzheimer's and Parkinson's Disease. April 1, 2001, Kyoto
2. Takeda K, Araki W, Tabira T: The effect of caspase cleavage of amyloid precursor protein on the production of amyloid beta-protein. Ivid April 4, 2001, Kyoto
3. Watanabe N, Araki W, Tabira T: Identification of A β binding heparan sulfate proteoglycan(s) in human brain. Ivid April 4, 2001, Kyoto
4. Araki W, Yuasa K, Takeda S, Takeda K, Shirota ni K, Takahashi K, Tabira T: Involvement of presenilin 2 in neuronal cell death. Ivid April 5, 2001, Kyoto
5. 荒木 亘, 武田和也, 田平 武: β アミロイド前 脳体蛋白のカスパーゼ切断と β 蛋白生成の関連性。第 42 回日本神経学会総会、平成 13 年 5 月 13 日
6. 田平 武: 痴呆ということ—一人の往く道—。第 42 回日本神経学会総会公開市民講座、平成 13 年 5 月 13 日
7. 田平 武: アルツハイマー病の基礎から臨床へ。第 12 回日本老年医学会東海地方会特別講演、2001 年 9 月 22 日 名古屋

8. 崔得華、田平武、中山宏、黒田重利、巻淵隆夫、有馬邦正、川勝忍、高島明彦： Cotton Wool Plaques 型 Alzheimer 病脳組織における A β 陽性神経細胞の分布について。第 20 回痴呆学会、2001 年 10 月 4 日 三重

9. 渡辺哲史、荒木 亘、崔得華、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 20 回痴呆学会、2001 年 10 月 4 日 三重

10. 田平武： 痴呆研究の最前線。第 2 回脳神経核医学研究会シンポジウム、平成 13 年 10 月 19 日 金沢

11. T. Tabira: CADASIL IN JAPAN AND PROCESSING OF NOTCH3 IN TRANSFECTED CELLS. Second International Congress on Vascular Dementia, 26 Jan. 2002 Salzburg

12. T. Tabira: Molecular genetics of Aging and Dementia. The Ninth International Conference: Peace through Mind/Brain Science, 31 Jan. 2002 Hamamatsu

13. 大八木保政 他： A β 42 は転写因子として p53 発現を誘導する - アルツハイマー病における意義 -。第 42 回日本神経学会総会、東京、2001 年 5 月 12 日

14. Ohyagi, Y., et al.: Intracellular amyloid- β 42 as a transcription factor: The role in Alzheimer pathology. 31st annual meeting of Society for Neuroscience. San Diego, Nov. 11, 2001.

15. Akiyama H, Kondo H, Ikeda K, Kato M, McGeer PL, Inverse association of neprilysin immunoreactivity with A β deposition in the cerebral cortex, 31th Annual Meeting of Society for Neuroscience, November 10-15, 2001, San Diego, CA, USA

16. 秋山治彦、近藤ひろみ、新井哲明、加藤雅紀、織田辰郎、土谷邦秋、池田研二、Familial British Dementia アミロイド前駆蛋白質(BRI)の脳皮質における発現、第 20 回日本痴呆学会、10 月 4-5 日、2001、津

17. 秋山治彦、都甲崇、近藤ひろみ、羽賀千恵、丹野瑛子、新井哲明、池田研二、井関栄三、加藤雅紀、織田辰郎、土谷邦秋、アルツハイマー型痴呆脳海馬に認められる T リンパ球の表現型について、第 42 回日本神経病理学会、5 月 24-26 日、2001 東京

18. 秋山治彦、脳皮質における neprilysin の分布とアルツハイマー病変との関連、第 42 回日本神経学会、5 月 11-13 日、2001、東京

G. 知的所有権の取得状況

- | | |
|-----------|----|
| 1) 特許取得 | なし |
| 2) 実用新案登録 | なし |
| 3) その他 | 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 国立療養所中部病院長寿医療研究センター
センター長

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 蓄積がマイネルト核でも見られることを明らかにした。細胞内 A β 42 による神経細胞死促進機構を明らかにする為に A β と結合する蛋白をスクリーニングし、グリピカン1を見出した。グリピカン1はラフトに局在し、A β との結合はモノマーよりポリマーの方が強かった。グリピカン1は初期から老人斑に沈着が見られた。

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。特に、細胞内 A β 42 蓄積による細胞死誘導機構の解明、抑止方法の開発を目指す。

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) ヒト脳凍結標本を 4M グアニジン塩酸、50mM トリスバッファー、1%NP-40 でホモナイズし、上澄を透析後、DEAE セファロース陰イオン交換カラム、NaCl (0-2.25M) の濃度勾配により蛋白質を分画、ドットプロット法により A β と特異的に結合する蛋白質をスクリーニングし、陽性画分について蛋白質を同定した。

(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。

C. 研究結果

1) 剖検脳の観察 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 は古典的の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。細胞内 A β 42 の蓄積は大脳皮質ニューロンのみでなく、マイネルト核のニューロンにも観察された。また、A β 42 は神経原線維変化の部位にしばしば局在した。

2) 結合蛋白の検討 ヒト脳より分画し、ドットプロットにより繊維化した A β 40 と結合する画分から HSPG が回収された (図 1)。その分子量は約 60KDa であり、グリピカン1の抗体と反応したことから、グリピカン1と同定した。グリピカン1は糖鎖部分により A β と結合すること、A β モノマーはあまり結合しないことが分かった。コントロール脳及び AD 脳より detergent-insoluble glycosphingolipid-rich (DIG) 画分をとり、ウェスタンプロットを行なったところ、グリピカン1は DIG 画分に回収された。DIG 画分には A β 40、A β 42 のモノマー、ダイマー、ポリマーと一緒に回収

された (図 2)。グリピカン 1 は初期老人斑にも沈着が見られた。

D. 考察

本研究者らは変異 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。昨年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、本研究でマイネルト核でも A β 42 の細胞内蓄積があることが分かった。マイネルト核では老人斑があまり見られないのに神経細胞死が強く起こることが疑問であったが、我々の研究結果からいくつかの疑問点が解決できる。

今回、A β を結合するグリピカン 1 を発見した。グリピカン 1 は既に物質として知られていたが、A β を結合することが分かったのは初めてである。大変興味深いことは、グリピカン 1 は GPI アンカー型蛋白質で、ラフトに局在した。最近、A β の産生工場としてラフトが注目され、ラフトには GM1 ガングリオシドやコレステロールが豊富に存在し、seeding A β が形成される。オリゴマー A β あるいはポリマー A β は細胞毒性が強いとされ、生体にとって有害である。グリピカン 1 はこの細胞毒性の強い A β を結合し、細胞毒性を緩和するとともに、細胞外に運び出し、老人斑に埋め込んでいる可能性がある。

今後はグリピカン 1 の強発現系細胞を用いて A β 42 による細胞死のメカニズムを探ることで、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止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 の沈着がマイネルト核にも見られることが明らかになった。

重合 A β を捕捉する分子グリピカン 1 を見出した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Araki W, Yuasa K, Takeda S, Shirotani K, Takahashi K, Tabira T. Overexpression of presenilin-2 enhances apoptotic death of cultured cortical neurons. *Ann New York Academy Sci*, vol 920, The Molecular Basis of Dementia, pp241-244, 2000
- (2) Poorkaj P, Grossman M, Steinbart E, Payami H, Sadovnick A, Nochlin D, Tabira T, Trojanowski JQ, Borson S, Galasko D, Reich S, Quinn B, Schellenberg G, Bird TD. Frequency of tau gene mutations in familial and sporadic cases of non-Alzheimer dementia. *Arch Neurol* 58: 383-387, 2001
- (3) Miyamoto K, Kowalska A, Hasegawa M, Tabira T, Takahashi K, Araki W, Akiguchi I, Ikemoto A. Familial frontotemporal dementia and parkinsonism with a novel mutation at an intron 10 +11-splice site in the tau gene. *Ann Neurol*. 50: 117-120, 2001
- (4) Tanahashi H, Tabira T. Three novel alternatively spliced isoforms of the human beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme (BACE) and their effect on amyloid beta-peptide production. *Neurosci Lett* 307:9-12, 2001
- (5) Tabira T. Clioquinol's return: cautions from Japan. (letter to the editor) *SCIENCE* Vol. 292. 22. P.2251, 2001
- (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 A42 labeling. *J Alzheimer Dis* 3:231-239, 2001
- (7) Kowalska A, Asada T, Arima K, Kumakiri C, Kozubski W, Takahashi K, Tabira T. Genetic analysis in patients with familial and sporadic frontotemporal dementia: Two tau mutations in only familial cases and no association with apolipoprotein e4. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders* 12:387-392, 2001
- (8) Mann DMA, Pickering-Brown SM, Takeuchi A, Iwatsubo T, & Familial Alzheimer's Disease Study Group (Arango J, Bird T, Van Broeckhoven C, Brooks W, Brown R, Cairns N, Cras P, Ellison D, Haltia M, Li K,

- Jorgensen A, Krill J, Lantos P, Lippa C, Martins R, Nochlin D, Pollen D, Rosenberg C, Rossor M, Tabira T. Amyloid angiopathy and variability in amyloid beta deposition is determined by mutation position in presenilin-1-linked Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 158:2165-2175, 2001
- (9) Araki W, Yuasa K, Takeda S, Takeda K, Shirotani K, Takahashi K, Tabira T. Proapoptotic effect of presenilin 2 (PS2) overexpression is associated with down-regulation of Bcl-2 in cultured neurons. *J Neurochem* 79:1161-1168

2. 学会発表

- 1) Tabira T, Chui DH, Araki W, Dobo E: Presenilin mutations and pathogenesis of Alzheimer's disease (Symposium) . 5th International Conference on Progress In Alzheimer's and Parkinson's Disease. April 1, 2001, Kyoto
- 2) Takeda K, Araki W, Tabira T: The effect of caspase cleavage of amyloid precursor protein on the production of amyloid beta-protein. Ivid April 4, 2001, Kyoto
- 3) Watanabe N, Araki W, Tabira T: Identification of A β binding heparan sulfate proteoglycan(s) in human brain. Ivid April 4, 2001, Kyoto
- 4) Araki W, Yuasa K, Takeda S, Takeda K, Shirotani K, Takahashi K, Tabira T: Involvement of presenilin 2 in neuronal cell death. Ivid April 5, 2001, Kyoto
- 5) 荒木 亘、武田和也、田平 武： β アミロイド前駆体蛋白のカスパーゼ切断と β 蛋白生成の関連性。第42回日本神経学会総会、平成13年5月13日
- 6) 田平 武：痴呆ということ—人の行く道—。第42回日本神経学会総会公開市民講座、平成13年5月13日
- 7) 田平 武：アルツハイマー病の基礎から臨床へ。第12回日本老年医学会東海地方会特別講演、2001年9月22日 名古屋
- 8) 崔得華、田平 武、中山 宏、黒田重利、巻淵隆夫、有馬邦正、川勝 忍、高島明彦： Cotton Wool Plaques型 Alzheimer 病脳組織における A β 陽性神経細胞の分布について。第20回痴呆学会、2001年10月4日 三重
- 9) 渡辺哲史、荒木 亘、崔得華、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20回痴呆学会、2001年10月4日 三重
- 10) 田平 武： 痴呆研究の最前線。第2回脳神経核医学研究会シンポジウム、平成13年10月19日 金沢
- 11) T. Tabira: CADASIL IN JAPAN AND PROCESSING OF NOTCH3 IN TRANSFECTED CELLS. Second International Congress on Vascular Dementia, 26 Jan. 2002 Salzburg
- 12) T. Tabira: Molecular genetics of Aging and Dementia. The Ninth International Conference: Peace through Mind/Brain Science, 31 Jan. 2002 Hamamatsu

G. 知的所有権の取得状況

なし

Fig. 1

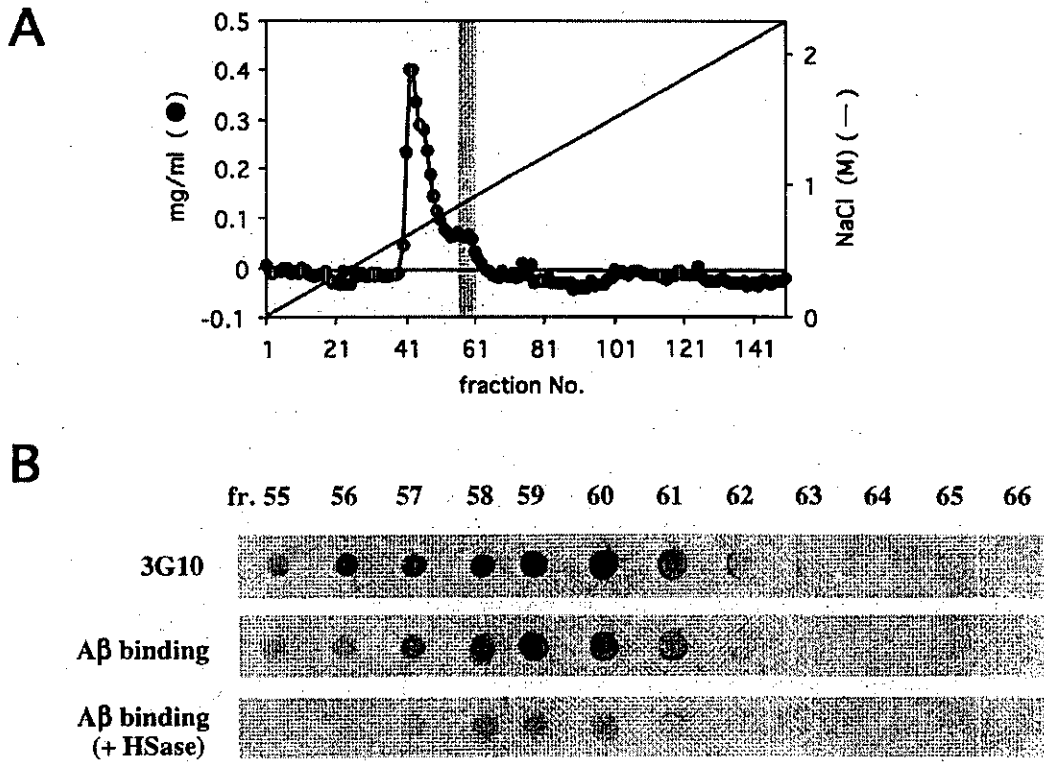
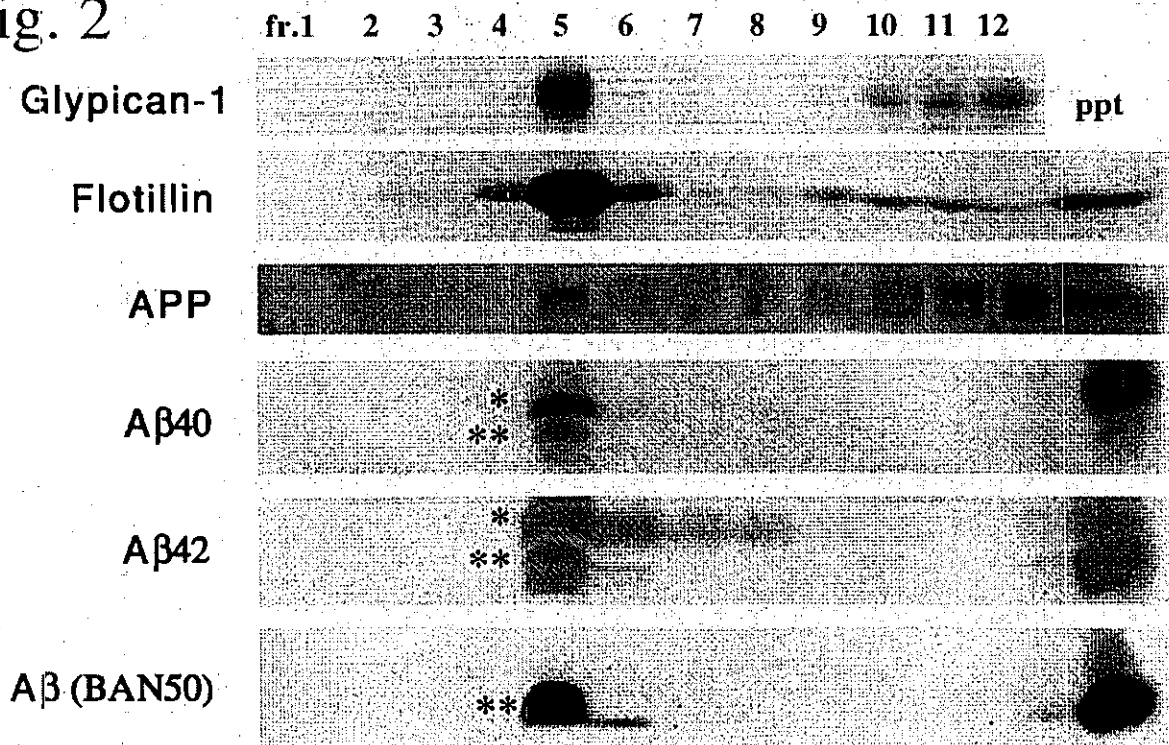


Fig. 2



研究要旨 我々はこれまで、細胞内 A β 42 が転写因子として heat shock elements (HSE)を含む p53 プロモーターを活性化、p53 過剰発現を誘導することで、神経細胞のアポトーシス死を促進することを見出した。また、アルツハイマー病(AD)脳でも、細胞内 A β 42 と p53 発現が関連していることを確認した。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 の病的作用、特に p53 過剰発現を介したアポトーシスプロセスが極めて重要であることがわかった。このような病的プロセスを始め、神経細胞内における AD 特異的病的変化を分子レベルで明らかにし、そのプロセスを抑制することは根本的治療法の開発につながる可能性が高い。本年度は、そのような治療法開発の手掛かりとなる未知の蛋白の同定・解明を目指し、新たな解析システムを確立した。

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の開発を目的とする。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。とりわけ、A β 42 といわれる不溶性の高い A β が AD の病態に深く関わっていることがよく知られている。従って、A β 42 と神経細胞死の関係を分子レベルで明らかにすることは極めて重要である。これまで我々は、一般に想定されている細胞外 A β の神経細胞毒性よりも、神経細胞内の病的作用が AD の神経細胞死には重要と考え、分子レベルでの解析を行ってきた。その結果、細胞内に増加した A β 42 は直接 p53 のプロモーター活性を高め、p53 過剰発現を介したアポトーシス死を誘導することを明らかにした。このような細胞内 A β 42 に起因する神経細胞死のプロセスを抑止する方法を開

発するために、さらに治療の標的となるような未知の蛋白を探索する技術の開発を行った。

B. 研究方法

- 1) 核内で A β 42 と共役して機能する蛋白を回収する方法として、A β 42 が heat shock element (HSE)の配列に特異的に結合する性質を利用した。A β 42-binding 配列である GGATTGGGGT の 4 回繰り返し配列の 2 重鎖オリゴヌクレオチドをビオチン化し、ストレプトアビジンラベル処理のマグネットビーズ (DYNAL)で A β 42 を沈降・回収した。
- 2) 細胞内 A β 42 過剰発現やプレセニリン変異によって変動する蛋白同定のため、differential display 法として 2 次元電気泳動(2DE)のセットアップを行った。装置は Amersham Pharmacia Biotech の Multiphor II 泳動装置を利用し、蛋白の可視化は銀染色で行った。

C. 研究結果

細胞内 A β 42 は、様々な細胞内結合蛋白との競合のため通常の免疫沈降法による回収は困難である。そこで我々は、HSE 配列に A β 42 が特異的に結合することを利用した細胞内 A β 42 回収法を確立した。図 1a に示すように、ゲルシフトアッセイで A β 42 が特異的に結合する配列(HSE-B)の 4 回繰り返し配列をビオチン化し、アビジンラベルしたマグネットビーズで回収した。興味深いことに、核抽出蛋白(NEP)を加えると A β 42 の HSE-B による回収が著明に増加した(図 1b)。このことは、何らかの核蛋白が核内で A β 42 と共役し、プロモーター活性の調節を行っている可能性を示唆する。

一方、細胞内 A β 42 による細胞死は、p53^{-/-} cell line (Saos2)及び p53^{+/+} cell line (U20S)の比較検討で、細胞内 A β 42 による細胞死が U20S に顕著であることから、ある程度 p53-dependent と考えられる。しかしそれ以外の重要な細胞内変化の存在も予想され、また家族性 AD の原因遺伝子であるプレセニリン(PS)1・2 の変異が細胞のストレス抵抗性に及ぼす影響や、それが細胞内 A β 42 の作用を介したものであるか否かは不明である。PS1・2 遺伝子変異が A β 42 産生を高めることは知られているが、細胞内における A β 42 の変動は解析困難な面もある。蛋白・分子レベルでの神経細胞死抑制法の開発するために、このような細胞内における蛋白レベルでの変動をさらに拡げて明らかにし、治療の標的となる分子同定を試みた。ポストゲノム時代はプロテオーム解析が

主流となりつつある。特に、蛋白レベルでの修飾や量的変化を解析する有力な方法として、2次元電気泳動(2DE)がしばしば利用されるようになってきている。我々は、AD 関連遺伝子変異がストレスや DNA 傷害に対する細胞防御反応に与える影響を解析するために、2DE を用いた differential display 法をセットアップした。具体的方法は図 2 に示すように、1次元目を等電点電気泳動で、2次元目を SDS-PAGE で行い、その際に量的・質的差が生ずるような蛋白スポットを mass spectrometry などを利用して同定、その細胞内変化の意義などを解析していく。本年度は、電気泳動装置のセットアップや泳動条件の設定を行い、図 3 に示すように、幾つかの変動蛋白スポットを検出した。

D. 考察

これまで進めてきた、あるいは現在進めている研究により、以下の点が明らかとなった。AD 脳における神経細胞死には p53 経路の活性化が重要であり、その一要因として細胞内 A β 42 による p53 プロモーターの直接活性化がある。従って、細胞外のアミロイド蛋白沈着よりもむしろ細胞内 A β 42 の異常増加が病因として重要かもしれない。今後、この可能性を検討するために、AD モデルマウスである変異 APP-transgenic mouse 脳における、p53 発現の加齢による変化などを解析していく必要がある。

次に、AD 根本治療の目標の 1 つとして神経細胞の病的大量死の抑制があるとするならば、上記のような細胞内 A β 42 による p53 カスケード

活性化の抑制やそれに付随する細胞内の病的な代謝変化を補正する必要がある。現在、前者の治療法の1つとしては、A β 42によるp53プロモーターの過剰活性化を抑制する方法が考えられる。我々は独自のオリゴDNAとマグネットビーズを利用したA β 42の回収法を開発し、A β 42の転写因子としての機能を調節する核蛋白の存在を確認した。今後、このような蛋白の同定や機能解析を通じて、A β 42の病的作用を抑制する方法の開発が望まれる。一方で、細胞内A β 42の病的作用あるいはPS1・2遺伝子の変異による細胞内代謝異常がp53経路以外の病的異常を誘導している可能性もあるので、そのような新規の病的プロセスあるいは関連蛋白の解明のために、2DEを利用したdifferential display法を開発した。現在、変異PS1・2導入細胞やA β 42導入細胞を利用して、このような関連蛋白の探索を進めている。そのような神経細胞内の異常プロセス解明を通じて、病的な神経細胞死を効果的に抑制する分子治療の開発を目指す予定である。

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。昨年度明らかにした細胞内

A β 42の病的機能の解明を進めるとともに、本年度は、神経細胞死を抑制する分子治療法開発のために、細胞内A β 42の新しい回収法、2DEを利用したdifferential display法を確立した。今後は、新規の細胞内・核内機能蛋白の同定を進める予定である。

F. 研究発表

【論文発表】

- 1) Ohyagi, Y., Asahara H, Chui D-H, Sakae N, Yamada T, Kikuchi H, Taniwaki T, Murai H, Furuya H, Takeda K, Kira J, Tabira T: Activation of the p53 promoter by A β 42: a novel pathway to neuronal death in Alzheimer's disease. submitted, 2002.

【学会発表】

- 1) 太八本保政 他: A β 42は転写因子としてp53発現を誘導するーアルツハイマー病における意義ー。第42回日本神経学会総会、東京、2001年5月12日
- 2) Ohyagi, Y., et al.: Intracellular amyloid- β 42 as a transcription factor: The role in Alzheimer pathology. 31st annual meeting of Society for Neuroscience. San Diego, Nov. 11, 2001.

G. 知的所有権の取得状況 特になし

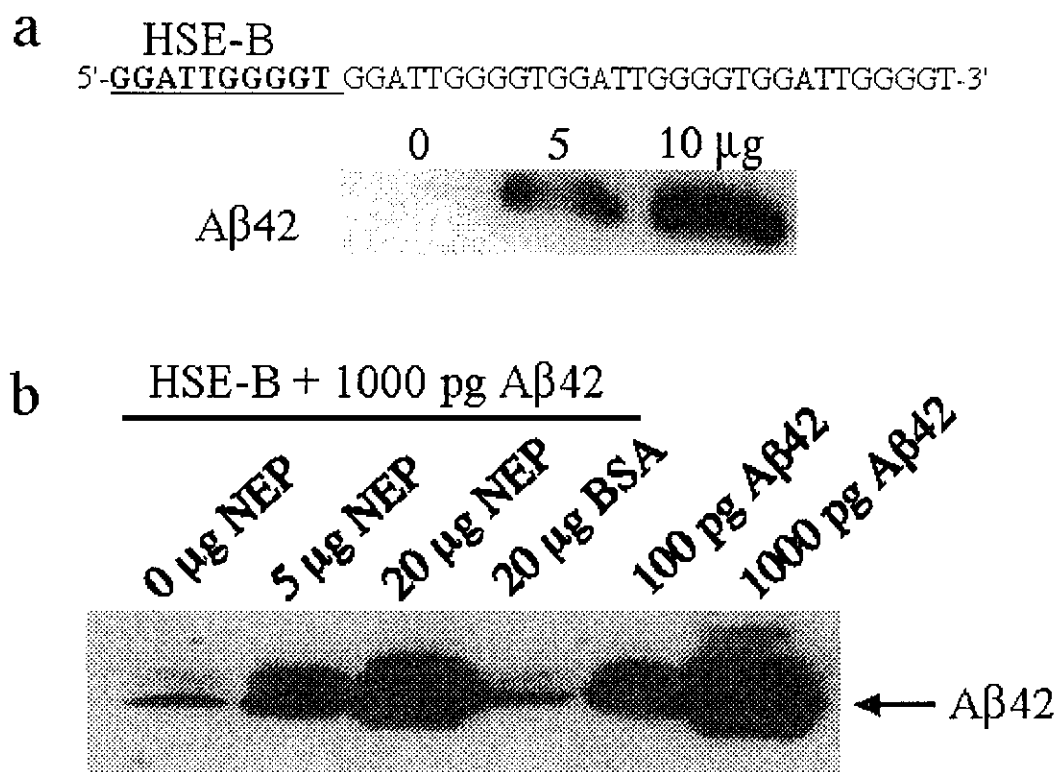


図1. HSE-B オリゴ DNA と合成 Aβ42 のゲルシフトアッセイ(a). HSE-B オリゴ DNA とマグネットビーズを利用した合成 Aβ42 の回収(b).
 NEP: nuclear extract protein, BSA: bovine serum albumin

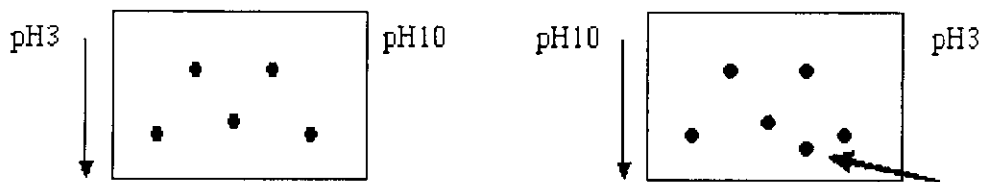
1. サンプル調整：比較する培養細胞株

↓ 尿素、プロテアーゼ阻害剤

2. 1次元目の泳動（等電点による分離）

pH3 ○ ██████████ ○ pH10

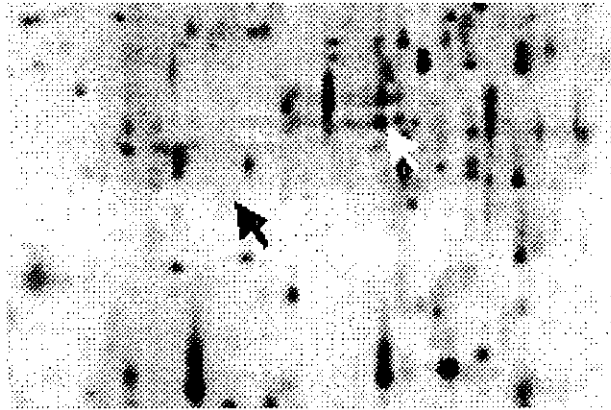
3. 2次元目の泳動（分子量による分離）及び可視



4. Mass spectrometryによる蛋白の同定、解析

図2. 2DE を利用した蛋白レベルでの differential display 解析の方法. 比較するサンプル間で発現に差が生ずる蛋白スポットを同定し(矢印)、Mass spectrometry により蛋白を同定する.

PS2/wild type



PS2/M239V

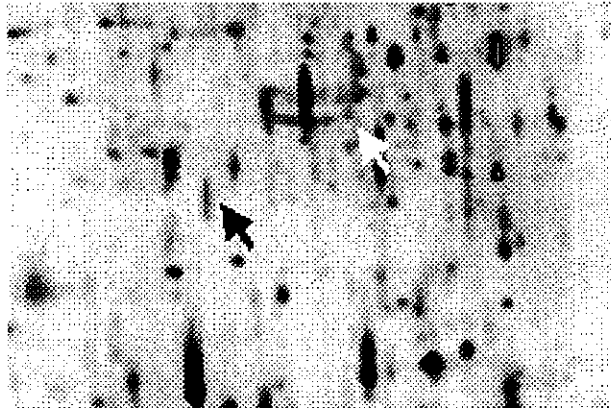


図3. 2DE differential display により見出される蛋白スポットの1例. 野生型および変異型 PS2 をトランスフェクトした細胞で、無血清培地による酸化ストレスを誘導し、反応に差がでる蛋白を探索している. 黒矢印: 変異 PS2 で出現する蛋白. 白矢印: 変異 PS2 で消失する蛋白.

アミロイド蛋白と小胞体ストレスに関する研究

工藤 喬 大阪大学大学院医学系研究科 助教授

研究要旨 unfolded protein response が障害されると A β の産生が増加することが示された。一方、A β の上昇は小胞体ストレスをきたすことも示された。従って、小胞体への負荷は A β の上昇をきたし、それが更なる小胞体ストレスをきたし、この過程で神経変性が起き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 の原因遺伝子である PS1 が小胞体に局在することから、小胞体 (ER)に負荷されるストレスと PS1 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、Ire1、PERK、ATF6 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。Ire1 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、PS1 変異体はこの UPR としての GRP78 誘導を阻害し、Ire1 の自己リン酸化を阻害することがわかった。更に昨年度の検討で、もう一つの小胞体センサー分子である PERK の活性化を PS1 の変異体が阻害することが示された。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、本年は、A β 上昇と小胞体ストレス (UPR) について検討を加えた。

B. 研究方法

1) UPR 障害細胞における A β 産生について

Ire1 のキナーゼ部分を欠失したコンストラクト (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 担った段階で、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。

2) A β による ER ストレス

60%confluent の N2A 細胞に fresh medium で pre-incubation の後、1 mM の A β 25-35、A β 1-40、A β 1-42、A β 35-25、A β 40-1 を medium に加え、6、12、24、36 時間後にライシスし、ウエスタン法にて ER ストレスマーカーである eIF2 α のリン酸化について検討した。

また、SY-5Y 細胞に野生型 APP 或いはスエーデン型 APP を導入した細胞を構築し、pre-incubation の後、ER ストレス発現物質である thapsigargin を培地中に与え、15、30、60 分後にライシスして、ウエスタン法にて ER ストレスマーカーである eIF2 α のリン酸化について検討した。

C. 研究結果

1) UPR 障害細胞における A β 産生について

Δ Ire 発現細胞は、野生型に比し、有意に培地に放出される A β 40 及び A β 42 が共に上昇していた。

PERK ノックアウト細胞では培地に放出される A β 40 及び A β 42 が共に上昇していて、A β 42 優位な上昇パターンを示した。

2) A β による ER ストレス

A β 25-35 を添加することにより、eIF 2 α のリン酸化が速やかに起こり、ER ストレスとなることが示され、この現象は A β 35-25 では認められなかった。また、A β 1-40 及び A β 1-42 は ER ストレスになるが、A β 40-1 は ER ストレスとならなかった。

APP 発現 SY-5Y 細胞は MOCK 細胞より、ER ストレスがかかりやすく、その傾向はスエーデン型 APP 発現細胞でより顕著であった。

D. 考察

UPR を担う ER ストレスセンサー分子である Ire 及び PERK の機能を低下或いは欠失せしめた細胞で A β 上昇が見られた。これらの細胞では、UPR が障害されているため、ER ストレスが持続することが考えられる。ER ストレス下では、ER-ゴルジ間の逆行性輸送が優位となることが知られており、プロセッシングを受ける APP が生理的な局在を変え、それに伴って A β が上昇したと推論される。PERK のノックアウトでは、A β 42 が優位に上昇したが、 Δ Ire 発現細胞では A β 40 及び A β 42 共に上昇したが、この差異については今後の検討が必要であろう。

A β の添加は ER ストレスをきたし、APP

の発現上昇は ER ストレスをきたしやすいことが示され、A β そのものが、ER ストレスの原因となる可能性が示された。

本年度の研究より、ER ストレス反応 (UPR) が障害されている場合に、A β 産生が亢進し、この A β が更なる ER ストレスとなり、神経変性をきたす悪循環となることが予想される。

E. 結論

unfolded protein response が障害されると A β の産生が増加する。一方、A β の上昇は小胞体ストレスをきたす。

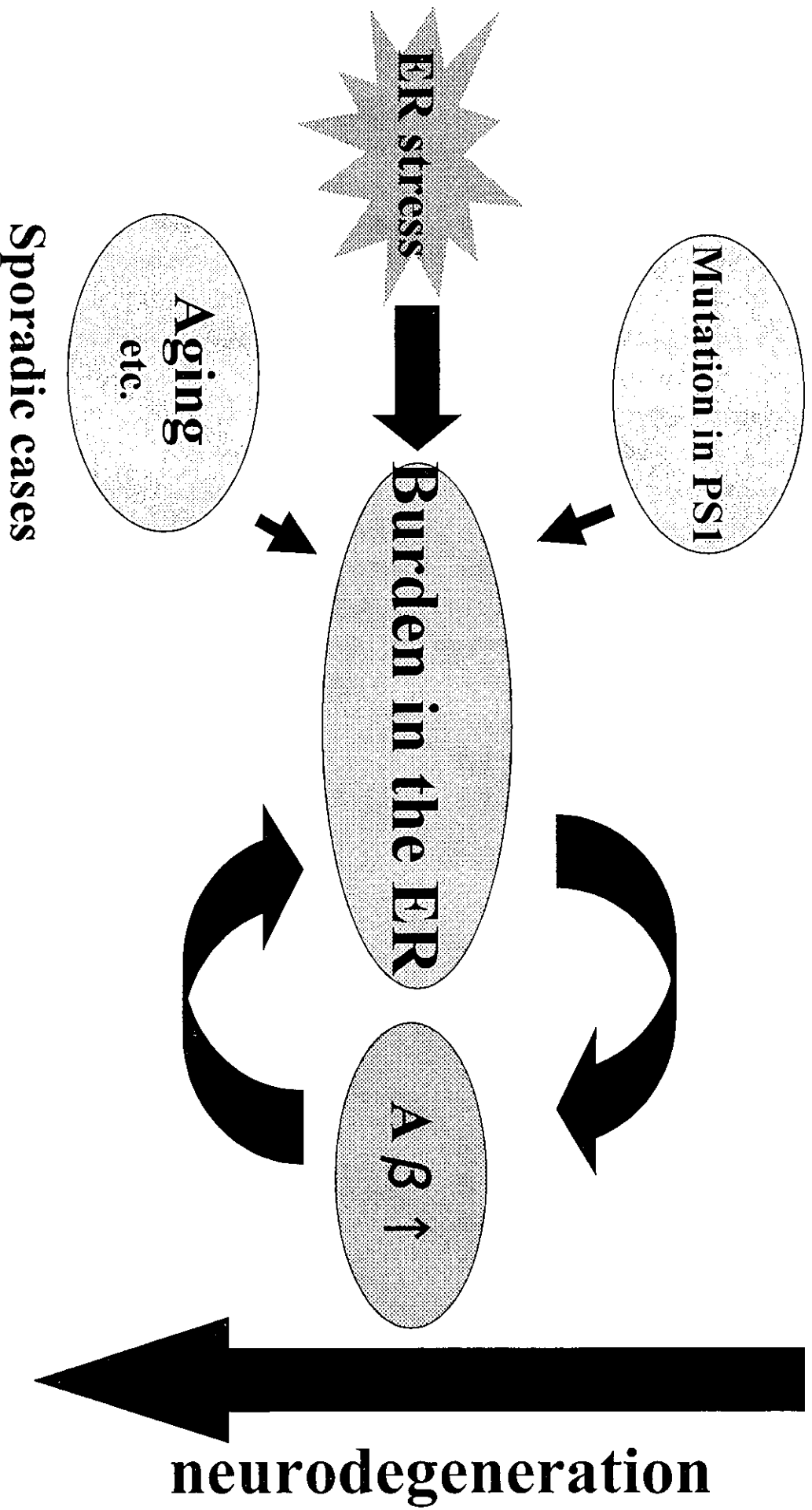
F. 研究発表

1. 論文発表

現在準備中

ER-A β vicious circle

FAD



分担研究報告書

アルツハイマー病脳における神経細胞死に関する研究

分担研究者 秋山 治彦 (財) 東京都医学研究機構 副参事研究員
東京都精神医学総合研究所

研究要旨 アルツハイマー病脳における神経細胞死について、神経細胞自体の変化および神経細胞以外の細胞の変化を剖検脳組織標本において観察し、その発生機序に関する考察を加えた。アルツハイマー病脳海馬では脳実質において正常対象者よりも多くの T リンパ球浸潤を認めたが、T リンパ球の数は疾患の進行度 (Braak の病期分類) とは相関せず、むしろその時点において生じている神経細胞変性の程度 (病勢) との関連が推測された。また、アルツハイマー病やピック病、神経原線維変化型老年痴呆などのタウオパチーに認められる神経細胞内 A β 42C 末端免疫活性の出現を、タウ蛋白質の異常凝集・蓄積と比較したところ、この両者は独立したプロセスであることが示唆された。神経原線維変化やピック球などのタウ異常構造に一致して、しばしば A β 42C 末端免疫活性が認められるのは、神経細胞内に蓄積したそれら線維性異常構造の上に、A β 42C 末端免疫活性を有するフラグメントが二次的に沈着するためであろうと推察された。

A. 研究目的

アルツハイマー病脳における神経細胞死の機序を解明するため、剖検脳組織標本において神経細胞および神経細胞以外の細胞の変化を免疫組織化学を用いて解析した。本年度は神経細胞内に出現する A β 42C 末端免疫活性の出現様式をタウの異常蓄積との関連において明らかにすると共に、アルツハイマー病海馬脳実質に出現する T リンパ球について検討を加えた。

B. 研究方法

剖検に際して海馬を含む側頭葉内側下面の大脳皮質を小ブロックとして切り出し、短時間パラフォルムアルデヒド固定を行った後、凍結切片を作製、様々な蛋白質やそのフラグメントに対する一次抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。

(倫理面への配慮)

本研究ではヒトゲノム解析は行わなかったが、剖検材料の組織病理学的研究に際しては、厚生労働省による倫理指針に準じ、東京都精神医学総合研究所の個人情報管理者による匿名化の後に使用した。

C. 研究結果

剖検脳海馬皮質の脳実質に認められる T リ

ンパ球を計数したところ、アルツハイマー病脳でのみ T リンパ球の脳実質への出現増加が認められた。この増加と、老人斑アミロイド沈着や神経原線維変化、疾患の進行度 (Braak の病期分類) との関連は明らかではなかった。

アルツハイマー病やピック病、神経原線維変化型老年痴呆などのタウオパチーに認められる神経細胞内 A β 42C 末端免疫活性の出現は、同一細胞内におけるタウ蛋白質の異常凝集・蓄積とは必ずしも一致していなかった。すなわち、タウの異常蓄積が全く認められない神経細胞においても細胞質の顆粒状 A β 42C 末端免疫活性が認められる場合がある一方で、タウ異常蓄積の初期状態を示すタウ陽性神経細胞の多数が A β 42C 末端免疫活性陰性を示した。また、A β 42C 末端免疫活性陽性神経細胞の出現と、グリア細胞内 A β 蓄積の程度から推察される局所における細胞外 A β 濃度上昇との間に明らかな関係を見出すことはできなかった。

D. 考察

アルツハイマー病脳実質における T リンパ球浸潤は海馬を中心とした辺縁系皮質に強く、また疾患の病期や A β 沈着・神経原線維変化の量と並行していないことから、その時点において神経細胞の変性・消失のプロセスが活発であるかどうかを反映している可能性が示唆