

厚生労働科学研究費補助金

# こころの健康科学研究事業報告書

(平成14年度総括・分担研究報告書)

平成14年8月6日厚生労働省発健第0806003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-こころ-005)

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

平成15年4月10日

## 目 次

### I. 総括研究報告

- 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法の開発……………1  
田平 武

### II. 分担研究報告

1. カスパーゼ分解型アミロイド前駆体から産生される A $\beta$  の分子種……………7  
田平 武
2. 老人斑初期像としての微小老人斑の研究……………13  
卷淵隆夫
3. AD 特異的神経細胞死の分子機構……………15  
大八木保政
4. アミロイド蛋白と小胞体ストレスに関する研究……………21  
工藤 喬
5. アルツハイマー病脳における神経細胞死に関する研究……………27  
秋山治彦

厚生科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）  
総括研究報告書

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

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**  $A\beta_{42}$  と結合しアポトーシスを誘導する新規物質 Adip を見出した。アポトーシスに際し活性化されるカスパーゼにより切断された APP から分泌される  $A\beta$  は新種の  $A\beta_{5-40/42}$  であり、血管アミロイドとして AD 脳に沈着することを見出した。アルツハイマー病脳の微小老人斑をしらべたところ、アストロサイトあるいは神経突起の中に  $A\beta$  が蓄積していることが明らかになった。神経細胞内に蓄積する  $A\beta_{42}$  の一部は神経原線維変化と共存し、神経原線維変化の形成に関与する可能性を見出した。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。ER ストレスに際し活性化されるカスパーゼはヒトでは caspase 4 であることを明らかにした。

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

現する細胞株を樹立し、APP のプロセッシングをしらべ、分泌される  $A\beta$  の分子種を質量分析により明らかにする。また、得られた  $A\beta$  に対する特異抗体を作製し、AD 脳の免疫染色を行い、その意義を明らかにする。

2) 剖検脳を用いて、 $A\beta_{42}$  特異的抗体による免疫電顕を行ない、 $A\beta_{42}$  の細胞内局在を明らかにする。とくに本年度は老人斑周囲の微小老人斑に注目して解析する。

3)  $A\beta_{42}$  と結合する蛋白質を yeast two hybrid system によりスクリーニングし、細胞内  $A\beta_{42}$  と関連する蛋白質の機能を明らかにする。

4)  $A\beta_{42}$  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) 細胞外の  $A\beta$  が ER ストレスを引き起こすことが分かった。今年度は持続的に ER ストレス状態をひき起こす PERK の dominant negative 遺伝子を構築し、これを発現する細胞を用いて、 $A\beta$  産生と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。最近の剖検承諾書には研究への使用許可が明記されている。動物実験は所属研究所の動物実験倫理委

A. 研究目的

この研究はアルツハイマー病 (AD) 特にプレセニリン 1 (PS1) プレセニリン 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) APP はカスパーゼにより切断され、C 末の 31 個のアミノ酸を欠く APP  $\Delta$  C31 を生じる。この APP  $\Delta$  C31 の機能とくに  $A\beta$  産生との関係を明らかにするために、APP  $\Delta$  C31 を安定的に発

員会の承認を得て行なった。

### C. 研究結果

1) A $\beta$ 42 と結合する物質のスクリーニングにより新規物質を見出し Adip と命名した。Adip は caspase 結合ドメインと核移行シグナルを有し、遺伝子導入細胞にアポトーシスを誘導した。

2) APP  $\Delta$  C31 を安定的に発現する細胞は野生型 APP を発現する細胞と APP の発現量は同等であったが、A $\beta$  の N 末抗体でとらえられる A $\beta$  の量は明らかに低下していた。その理由を Western Blot でしらべると、N 末を欠く小型の A $\beta$  の産生が増加していた。その分子種を MASS でしらべると、A $\beta$ 5-40/42 であることが分かった。A $\beta$ 5-40/42 の N 末断端特異的抗体を作製し免疫染色を行うと、AD 脳では血管壁アミロイドが染色された。このことから AD 脳ではアポトーシスが *in vivo* で起こっていること、カスパーゼにより切断された APP からは A $\beta$ 5-40/42 が生じ、アミロイドアンジオパシーを引き起こすことが示唆された。

3) 細胞内 A $\beta$ 42 の局在を知る目的で免疫電顕を行なったが、剖検脳では死後変化が強く確定できなかった。一部は神経原線維変化と共存して存在が認められた。老人斑周囲には微小老人斑が多数存在し、その形態からアストロサイトあるいは神経突起の中である可能性が高い。

4) ER ストレスを持続的に引き起こすと考えられる PERK の dominant negative 細胞では A $\beta$ 40 および A $\beta$ 42 の産生が増強しており、ER ストレスが A $\beta$  産生増強を引き起こすことがわかった。また、ER ストレスに際し活性化されるカスパーゼは動物では caspase 12 であるといわれるが、ヒトでは明らかでなかった。今回それが caspase 4 であることがはじめて分かった。

5) A $\beta$ 42 は p53 プロモーターに直接結合し、p53 を活性化しアポトーシスを誘導することをこれまでに示した。今回 A $\beta$ 42 抗体で核抽出物の免疫沈降を行い、PCR により確かに p53 プ

ロモーターが存在することを確認することができた。A $\beta$ 42 と p53 の結合は核内抽出物資の添加により増強する。その核内因子を同定する試みを行ったが、成功しなかった。

### D. 考察

本研究者らは 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 (Chui DH et al, Nat Med, 1999)。また、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 (Chui DH et al, 2001)。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が、細胞内に蓄積する A $\beta$ 42 が神経細胞の変性、死を引き起こしていると考えerことで問題は解決できる。従って細胞内 A $\beta$ 42 により引き起こされる細胞死の機序を解明すれば、その抑止法が開発される期待され、本研究が開始された。

細胞内 A $\beta$ 42 がいかに細胞死を誘導するかを明らかにする為には、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。ただ、一部の A $\beta$ 42 は神経原線維変化と共存しており、タウのリン酸化に関与している可能性があることが分かった。これは最近他の研究者によっても示されており、高島ら、Nitch らはタウトランスジェニックマウス脳に A $\beta$  を注入するとタウの過剰リン酸化が引き起こされることを見出したと報告している。また、本研究者らは PS1 変異によりおこる cotton wool type plaque を示す AD 脳の検討から、A $\beta$ 42 がシナプス終末に蓄積しシナプス変性を引き起こすこ

とを見出した。このことから細胞内 A $\beta$ 42 の重要性が一層確かなものとなった。

今回 A $\beta$ 42 と結合する物質のスクリーニングにより新規蛋白を見出し、Adip と命名した。Adip は caspase 結合ドメインと核移行シグナルを有し、その強発現は細胞に著しい細胞死を誘導した。現在その機能の詳細、AD 脳における重要性を検討中である。

Caspase が活性化されると APP は C 末部分で切断され、C 末の 31 個のアミノ酸を欠く APP が形成される。このとき生じる C31 が細胞死を誘導するとの報告があったが、本研究者はこれを確認することができなかった。そこで APP  $\Delta$  C31 を安定的に発現する細胞株を樹立し解析したところ、A $\beta$ 5-40/42 という新種の A $\beta$  が産生され脳血管アミロイドとして沈着していることをみいだした。このことは AD 脳でアポトーシスが起きていることを示唆するとともに、カスパーゼの活性化がアミロイドアンジオパシーをひき起こし、AD の病態を助長する可能性があることを示唆していると思われる。

A $\beta$ 42 が p53 のプロモーターに結合することはこればでに明らかにした。今回 A $\beta$ 42 抗体による免疫沈降で確かに p53 のプロモーターが結合して共沈することを示し、その事実が一層確かなものとなった。また、A $\beta$ 42 を結合する Adip に核移行シグナルが認められたことから、A $\beta$ 42 は核に移行しうることが推定される。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ので、これを明らかにすればアポトーシスをコントロールする方法が開発される可能性がある。そこでその物質を同定する作業を開始したが、今のところ同定するに至っていない。

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、PERK を介する蛋白合成抑制の系も異常を生じることを見出した。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。従って、A $\beta$  による細胞死機構は p53、ER ストレス、酸化ストレスなど多岐にわたり、抑止法の開発も多面的にすすめる必要がある。

## 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。また、シナプス終末に蓄積しシナプス変性に関与すると考えられる。

A $\beta$ 42 を結合する Adip の発見により、細胞死抑止法開発への一つの道が開けそうである。

## F. 研究発表

### 1) 論文発表

1. Tabira T, Chui DH, Nakayama H, Kuroda S, Shibuya M: Alzheimer's disease with spastic paresis and cotton wool type plaques. *J. Neurosci. Res.* 70: 367-372, 2002.
2. Tanahashi H, Asada T and Tabira T. c954C $\rightarrow$ T polymorphism in the Fe65L2 gene is associated with early-onset Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 52: 52691-693, 2002.
3. Tabira T, Chui DH, Kuroda S: Significance of intracellular A $\beta$ 42 accumulation in Alzheimer's disease. *Front. Biosci.* 7: 44-9, 2002.
4. Takeda K, Araki W, Akiyama H, Tabira T: N-terminally truncated A5-40/42 production is increased from caspase-cleaved form of APP. (submitted)
5. Eto K, Asada T, Arima K, Makifuchi T, Kimura H: Brain hydrogen sulfide is severely decreased in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 293:1485-88, 2002

6. Koide T, Nakajima T, Makifuchi T, Fukuhara N: Systemic mastocytosis and recurrent anaphylactic shock. *Lancet* 369:2084, 2002
7. Toyooka K, Iritani S, Makifuchi T et al: Selective reduction of a PDZ protein, SAP-97, in the prefrontal cortex of patients with chronic schizophrenia. *J Neurochem* 83:797-806, 2002
8. Koide T, Ohtake H, Nakajima T, Furukawa H, Sakai K, Kamei H, Makifuchi T, Fukuhara N: A patient with dementia with Lewy bodies and codon 232 mutation of PRNP. *Neurology* 59:1619-1621, 2002
9. Ishida C, Kakishima A, Okino S, Furukawa Y, Kano M, Oda Y, Nakanishi I, Makifuchi T, Kitamoto T, Yamada M: Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease with MM1-type prion protein and plaques. *Neurology* 60:514-517, 2003
10. Arai T, Ikeda K, Akiyama H, Tsuchiya K, Iritani S, Ishiguro K, Yagishita S, Oda T, Odawara T, Iseki E, Different immunoreactivities of the microtubule-binding region of tau and its molecular basis in brains from Alzheimer's disease, Pick's disease, progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration, *Acta Neuropathol* (in press).
11. Arai T, Nonaka T, Hasegawa M, Akiyama H, Yoshida M, Hashizume Y, Tsuchiya K, Oda T, Ikeda K, Neuronal and glial inclusions in frontotemporal dementia with or without motor neuron disease are immunopositive for p62. *Neurosci Lett* (in press).
12. Tsuchiya K, Takahashi M, Shiotsu H, Akiyama H, Haga C, Watabiki S, Taki K, Nakano I, Ikeda K, Sporadic amyotrophic lateral sclerosis with circumscribed temporal atrophy: A report of an autopsy case without dementia and with ubiquitinated intraneuronal inclusions. *Neuropathol* 22:308-316, 2002.
13. Ikeda K, Akiyama H, Arai T, Ueno H, Tsuchiya K, Kosaka K, Morphometrical reappraisal of motor neuron system of Pick's disease and amyotrophic lateral sclerosis with dementia. *Acta Neuropathol* 104:21-28, 2002
14. 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
15. 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

【学会発表】

1. Takeshi Tabira: Presenilin mutations and Alzheimer's disease pathogenesis. (Invited speaker) The 8th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders, 25 July, 2002, Stockholm.
2. Kazuya Takeda, Wataru Araki, Takeshi Tabira: The production of N-terminally truncated beta-amyloid is increased by caspase-mediated cleavage of amyloid precursor protein. 8th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders 22 July, 2002 Stockholm
3. Wataru Araki, Kazuya Takeda, Takeshi Tabira: Presenilin mutations enhance the generation of intracellular beta-amyloid 42. 8th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders 22 July, 2002 Stockholm
4. Yasumasa Ohyagi, Hideaki Asahara, Nobutaka Sakae, Hirokazu Furuya, Jun-ichi Kira, Du-hua Chui, Takeshi Tabira: Activation of the p53 promoter by beta-amyloid 42: A novel pathway to neuronal death in Alzheimer's disease. 8th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders 24 July, 2002

- Stockholm
5. Takashi Kudo, Taiichi Katayama, Kazunori Imaizumi, Takeshi Tabira, Masaya Tohyama, Masatoshi Takeda: Endoplasmic reticulum stress and beta-amyloid production. 8th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders 24 July, 2002 Stockholm
  6. 渋谷 誠、立川 浩、柳下三郎、田平 武、棚橋 浩、小川恵弘、篠原幸人：瘻性四肢麻痺と cotton wool plaque を呈した presenilin 1 遺伝子変異 (P284) を伴う atypical Alzheimer 病の 1 剖検例、第 43 回日本神経病理学会総会学術研究会 2002 年 5 月第 43 回日本神経学会総会 2002 年 5 月 28 日 札幌
  7. 武藤多津郎、濱野忠則、得田彰、栗山勝、田平 武：PS-1 変異のガングリオシド (Gg) 合成に及ぼす影響の解明、2002 年 5 月 28 日 札幌
  8. 荒木 亘、武田和也、田平 武：プレセニリン遺伝子変異による細胞内 A $\beta$  の変化の解析、2002 年 5 月 29 日 札幌
  9. 田平 武：細胞内  $\beta$  アミロイドと神経細胞死、シンポジウム 第 21 回日本痴呆学会 2002 年 10 月 3 日 大阪
  10. 崔得華、田平 武、中山 宏、黒田重利、渋谷 誠、巻淵隆夫、有馬邦正、川勝 忍、秋山治彦、高島明彦：神経細胞及びシナプスにおける Abeta の蓄積と Cotton Wool Plaques 形成機序について、第 21 回日本痴呆学会 2002 年 10 月 3 日 大阪
  11. 荒木 亘、武田和也、田平 武、上田健治、秋山治彦： $\alpha$ -シフクレインに結合する新規タンパクの同定、第 21 回日本痴呆学会 2002 年 10 月 3 日 大阪
  12. 田平 武：アルツハイマー病の予防・治療法開発の展望 第 30 回薬物活性シンポジウム 2002 年 11 月 14 日 福岡
  13. 大八木保政 他：Ab42 と共役する核蛋白の抽出。第 43 回日本神経学会総会、札幌、2002 年 5 月 30 日
  14. 栄 信孝、大八木保政 他：2 次元電気泳動法による AD 特異的ストレス蛋白の探索。第 43 回日本神経学会総会、札幌、2002 年 5 月 30 日
  15. Ohyagi, Y., et al.: Activation of the p53 promoter by Ab42: a novel pathway to neuronal death in Alzheimer's disease. The 8th international conferences on Alzheimer's disease and related disorders. Stockholm, July 24, 2002.
  16. Ohyagi Y., et al.: Search for novel proteins related to neuronal death in Alzheimer's disease. The 32nd annual meeting of Society for Neuroscience. Orlando, Nov. 5, 2002.
  17. Akiyama H., Kondo H, Schwab C, McGeer PL, Arai T, Ikeda K, Immunohistochemical localization of Bri precursor protein (BriPP) in postmortem human brain tissues, 7th European Congress of Neuropathology, July 13-16, 2002 in Helsinki, Finland
  18. Akiyama H., Kondo H, Arai T, Haga C, Izumiyama Y, Ikeda K, Expression of cyclooxygenase-2 and c-Fos in the post-mortem brain tissues-no association with presumed immunohistochemical indication of elevated extracellular Abeta concentration, 8th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders, July 21-25, 2002, Stockholm
  19. 秋山治彦、脳の炎症と神経細胞、第 30

回臨床神経病理懇話会，11月23-24日，  
2002，金沢

20. 秋山治彦，アルツハイマーの画像診断「  
病理の立場から」アルツハイマーにおけ  
る炎症の役割，第3回脳神経核医学研究  
会，11月6日，2002，神戸
21. 秋山治彦，近藤ひろみ，新井哲明，池田  
研二，内門大丈，井上学，勝見幸則，福  
山秀直，ラット脳における末梢型ベンゾ  
ジアゼピン受容体陽性細胞，第21回日  
本痴呆学会，10月3-4日，2002，大阪
22. 秋山治彦，ヒト剖検脳組織標本における  
c-Fos/Fos 関連抗原の検出について，第4  
3回日本神経学会，5月29-31日，2002  
，札幌
23. 秋山治彦，近藤ひろみ，羽賀千恵，泉山  
洋子，新井哲明，池田研二，井関栄三，  
加藤雅紀，織田辰郎，入谷修司，土谷邦  
秋，剖検脳組織標本におけるシクロオキ  
シゲナーゼ(COX)-2 と c-Fos 蛋白質の免  
疫組織化学，第43回日本神経病理学会，  
5月15-17日，2002，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



## カスパーゼ分解型アミロイド前駆体から産生される A $\beta$ の分子種

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** アポトーシスが誘導される時に活性化されるカスパーゼにより分解され生じる C 末を欠くアミロイド前駆体の意義を検討するために APP $\Delta$ C31 を構築し、安定的に発現する細胞株を樹立した。この細胞株からは N 末の 4 アミノ酸を欠く A $\beta$  が産生され、アルツハイマー病のアミロイド沈着を伴う血管に沈着が見られた。その切断部位のアミノ酸配列から BACE 2 の関与が推定された。この結果はアルツハイマー病の脳でアポトーシスが起きていることを示唆するとともに、BACE 2 の関与があることを示している。

### 研究協力者

武田和也（長寿医療研究センター）

巻淵隆夫（国療 犀潟病院）

荒木 亘（国立精神・神経センター  
神経研究所）

秋山治彦（東京都精神研）

分子種についてはよく分かっていない。

これらのことを明らかにするためにカスパーゼ切断部位から C 末を欠く APP を発現する細胞株を樹立し、その意義を検討することを目的とする。

### A. 研究目的

アルツハイマー病(AD)の脳ではアポトーシスが起きているとする論文があり、また、本研究者らも TUNEL 法によりこれを確認した (Chui DH et al, 2001)。しかし、示されるその数は 1 年もしないうちに全ての神経細胞が消失するほどであり、現実には起きているか否かは議論のあるところである。また、アミロイド前駆体蛋白の C 末部分にはカスパーゼ切断部位があり、その活性化により C 末を欠く APP ができることがわかっているが、その後には産生される A $\beta$  の

### A. 研究方法

- 1) カスパーゼにより切断され、C 末の 3 1 個のアミノ酸を欠く APP 遺伝子 (APP $\Delta$ C) を構築し、これを安定的に発現するヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞株 (SH-APP $\Delta$ C) を樹立した。この細胞から分泌される APP, および A $\beta$  を免疫沈降し、Western Blot 法により詳細な検討を加えた。さらに、分泌された A $\beta$  を質量分析にかけ、そのアミノ酸配列を決定した。
- 2) 質量分析で明らかになった A $\beta$  に対する特異的ポリクローナル抗体を用

いて、アルツハイマー病脳免疫染色を行った。免疫染色の方法は以前に報告した方法によった (Akiyama H et al, 1997)。

## B. 研究結果

SH-APP $\Delta$ C 細胞が発現する APP は野生型 APP を発現する細胞 (SH-APP) とほぼ同等であったが、そのサイズはやや小さかった (図 1)。これらの細胞が分泌する A $\beta$  を A $\beta$  の C 末抗体 BNT77 でとらえた ELISA で行くと、A $\beta$  40, A $\beta$  42 と差がなかった。しかし、A $\beta$  の N 末抗体 BAN50 で行くと、SH-APP $\Delta$ C 細胞由来 A $\beta$  は A $\beta$  40, 42 と野生型に比し有意に少なかった (図 2)。その理由を調べるために Western Blot すると、SH-APP $\Delta$ C 細胞からは明らかにサイズの小さい A $\beta$  が産生されていた (図 3)。そこで、この A $\beta$  を回収して質量分析すると、A $\beta$  の 5 番目のアミノ酸から始まっていることが分かった。

そこで、A $\beta$  5-40/42 の N 末断端特異的抗体を作製し AD 脳の免疫染色を行ったところ、老人斑と血管アミロイドがよく染色された。この抗体は Western Blot 上は断端特異的であるが、1 番から始まる A $\beta$  との交差反応性は完全には否定できない。そこで、免疫染色に際し反応液に合成 A $\beta$  1-40 を加えて染色を試みた。その結果、老人斑の染色は消失し、血管壁のアミロイドの染色のみが残った (図 4)。従って、A $\beta$  5-40 は主として血管アミロイドとして沈着していると

結論した。

## D. 考察

この研究結果はアルツハイマー病の脳で実際にアポトーシスが起きていることを示唆している。何らかの機序でカスパーゼが活性化されると、C 末を欠く APP が産生され、その APP からは新種の A $\beta$  5-40, A $\beta$  5-42 が産生され、血管壁に沈着し、血管アミロイドシスをおこすことが分かった。大変興味深いことは、A $\beta$  を産生する  $\beta$  セクレターゼは主として BACE1 であるといわれ、BACE1 の阻害剤の開発が中心に行われている。しかし A $\beta$  4-5 の間を切る酵素はそのアミノ酸配列から BACE1 ではないと考えられる。その部位は 4FRHD であり、BACE2 の切断部位とされる 19FFAE あるいは 20FAED と FXXD/E という共通配列を有している。従って、その切断酵素は BACE2 である可能性が高い。もしそうであれば、AD の予防・治療薬として BACE1 の阻害剤の開発が行われているが、それだけでは不十分であるといえる。今後 BACE2 のノックアウト細胞、あるいは強発現細胞を用いてこの点を明らかにする必要がある。

## E. 結論

カスパーゼ切断型 APP からは A $\beta$  5-40/42 という新種の  $\beta$  蛋白が産生される。この A $\beta$  は AD 脳の血管アミロイドシスの形成に関与する。

## F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

【論文発表】

1. Tabira T, Chui DH, Nakayama H, Kuroda S, Shibuya M: Alzheimer's disease with spastic paresis and cotton wool type plaques. *J. Neurosci. Res.* 70: 367-372, 2002.
2. Tanahashi H, Asada T and Tabira T. c954C→T polymorphism in the Fe65L2 gene is associated with early-onset Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 52: 52691-693, 2002.
3. Tabira T, Chui DH, Kuroda S: Significance of intracellular A $\beta$ 42 accumulation in Alzheimer's disease. *Front. Biosci.* 7: 44-9, 2002.
4. Takeda K, Araki W, Akiyama H, Tabira T: N-terminally truncated A5-40/42 production is increased from caspase-cleaved form of APP. (submitted)

【学会発表】

- 1) Takeshi Tabira: Presenilin mutations and Alzheimer's disease pathogenesis. (Invited speaker) The 8th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders, 25 July, 2002, Stockholm.
- 2) Kazuya Takeda, Wataru Araki, Takeshi Tabira: The production of N-terminally truncated beta-amyloid is increased by caspase-mediated cleavage of amyloid precursor protein. 8th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Dis-

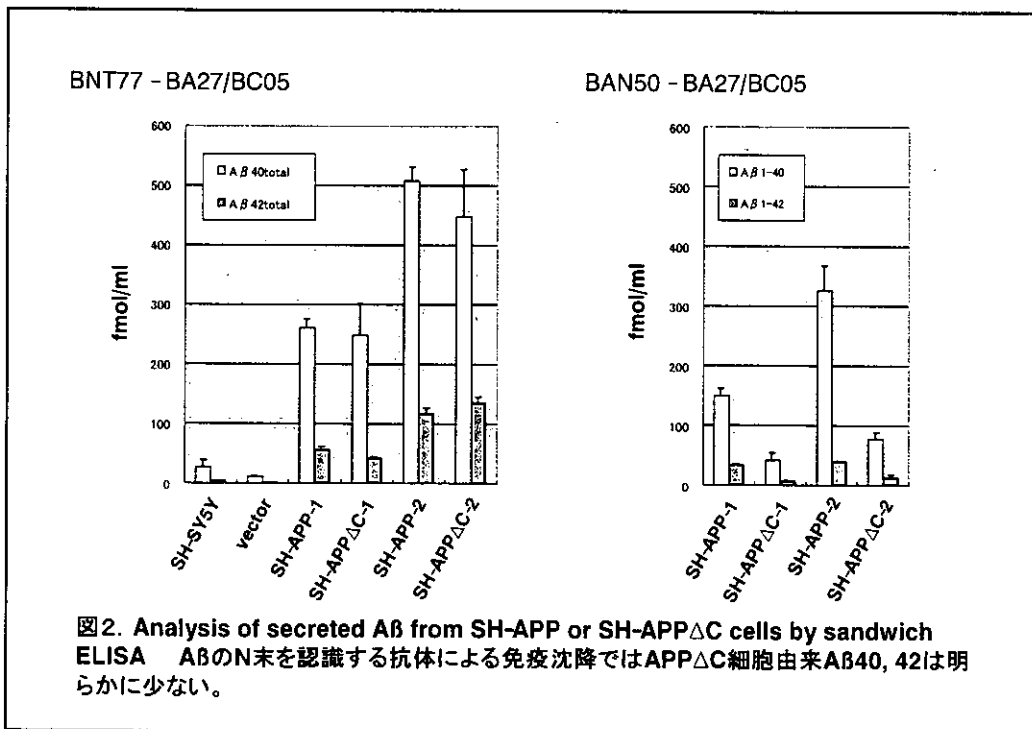
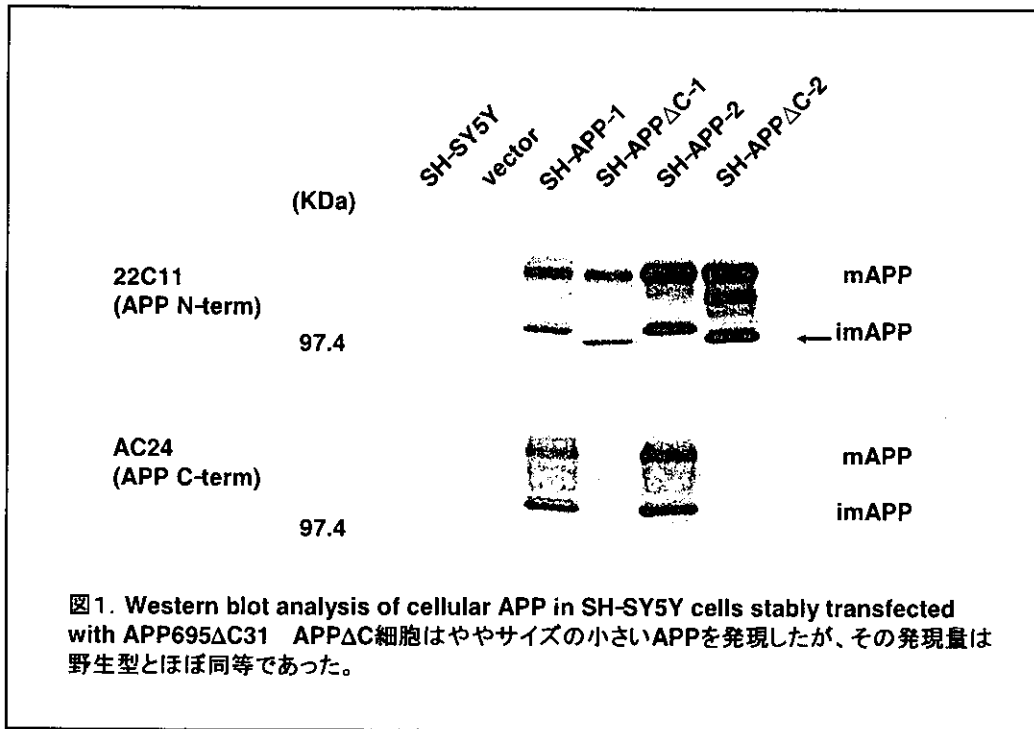
orders 22 July, 2002 Stockholm

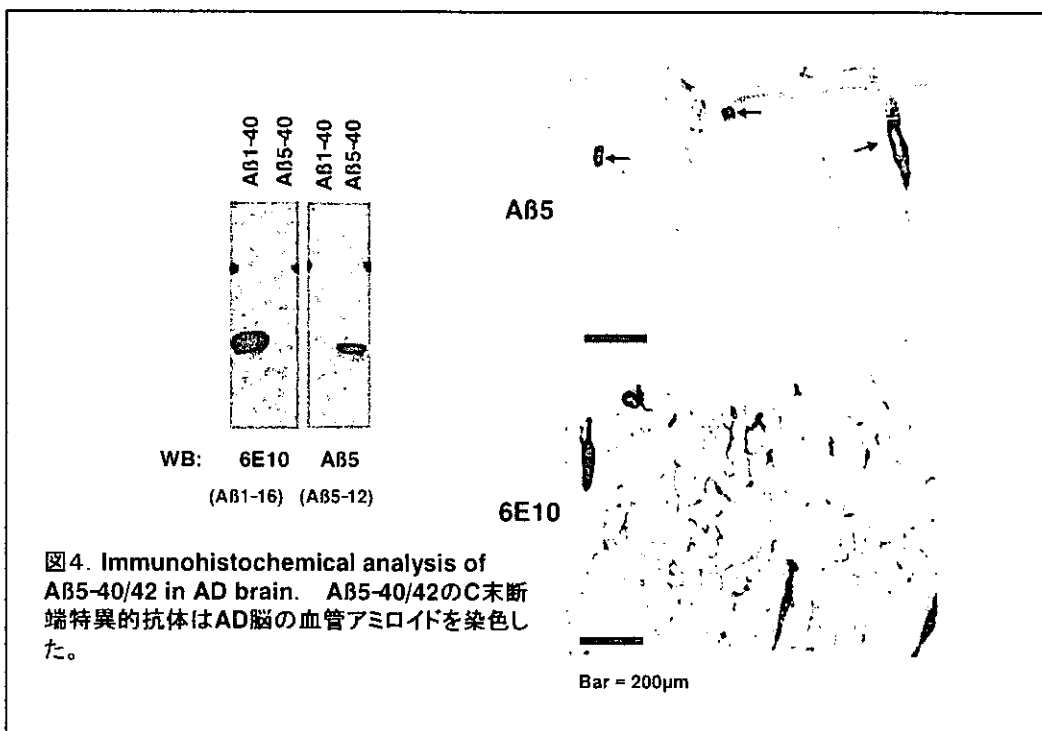
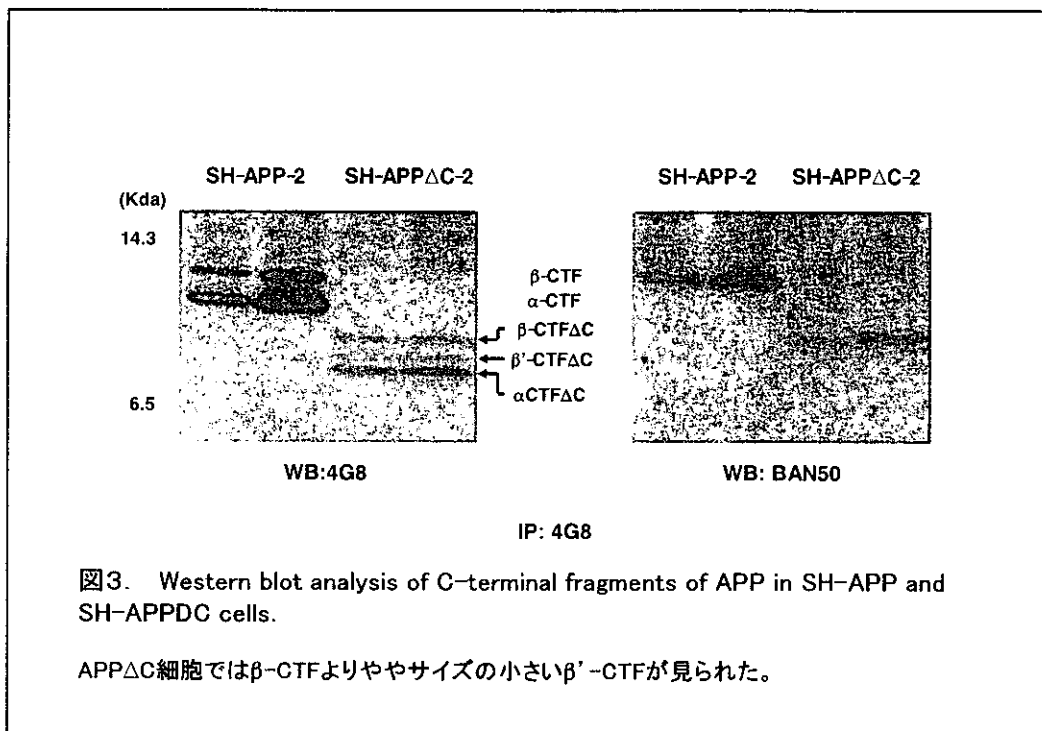
- 3) Wataru Araki, Kazuya Takeda, Takeshi Tabira: Presenilin mutations enhance the generation of intracellular beta-amyloid 42. 8th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders 22 July, 2002 Stockholm
- 4) Yasumasa Ohyagi, Hideaki Asahara, Nobutaka Sakae, Hirokazu Furuya, Jun-ichi Kira, Du-hua Chui, Takeshi Tabira: Activation of the p53 promoter by beta-amyloid 42: A novel pathway to neuronal death in Alzheimer's disease. 8th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders 24 July, 2002 Stockholm
- 5) Takashi Kudo, Taiichi Katayama, Kazunori Imaizumi, Takeshi Tabira, Masaya Tohyama, Masatoshi Takeda: Endoplasmic reticulum stress and beta-amyloid production. 8th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders 24 July, 2002 Stockholm
- 6) 渋谷 誠、立川 浩、柳下三郎、田平 武、棚橋 浩、小川恵弘、篠原幸人： 瘧性四肢麻痺と cotton wool plaque を呈した presenilin 1 遺伝子変異 (P284) を伴う atypical Alzheimer 病の 1 剖検例、第 43 回日本神経病理学会総会学術研究会 2002 年 5 月第 43 回日本神経学会総会 2002 年 5 月 28 日 札幌

- 7) 武藤多津郎、濱野忠則、得田彰、栗山勝、田平 武： PS-1 変異のガングリオシド (Gg) 合成に及ぼす影響の解明、2002年5月28日 札幌
- 8) 荒木 亘、武田和也、田平 武： プレセニリン遺伝子変異による細胞内 A $\beta$  の変化の解析、2002年5月29日札幌
- 9) 田平 武： 細胞内 $\beta$ アミロイドと神経細胞死、シンポジウム 第21回日本痴呆学会2002年10月3日 大阪
- 10) 崔得華、田平 武、中山 宏、黒田重利、渋谷 誠、巻渕隆夫、有馬邦正、川勝 忍、秋山治彦、高島明彦： 神経細胞及びシナプスにおける Abeta の蓄積と Cotton Wool Plaques 形成機序について、第21回日本痴呆学会 2002年10月3日 大阪
- 11) 荒木 亘、武田和也、田平 武、上田健治、秋山治彦：  $\alpha$ -シフクレインに結合する新規タンパクの同定、第21回日本痴呆学会 2002年10月3日 大阪
- 12) 田平 武： アルツハイマー病の予防・治療法開発の展望 第30回薬物活性シンポジウム 2002年11月14日 福岡

G. 知的所有権の取得状況

特になし





## 老人斑形成初期像としての微小老人斑の研究

分担研究者 卷淵 隆夫 国立療養所犀潟病院、臨床研究部長

### 研究要旨

アルツハイマー病の神経細胞内にも存在するとされるアミロイドの存在を検討する目的で、厚切りの免疫染色標本にて $\beta$ アミロイド陽性になる構造を焦点深度を移動させ立体的に観察し、 $\beta$ アミロイド陽性構造の由来を検討した。直径 $100\mu\text{m}$ 位の定型的な老人斑に加えて多数の微小な陽性構造が認められ、 $\beta$ アミロイド沈着の初期像と考えられた。更に、神経細胞の胞体部分が存在しない大脳皮質1層や皮質下白質にも層状に認められ、神経細胞由来ではなく他の細胞由来の可能性も考えられた。明らかに星膠細胞の形態を示唆する陽性構造も散見され、星膠細胞由来が示唆された。

### A. 研究目的

近年、老人斑の構成要素であるアミロイドが細胞外の組織間隙のみでなく、細胞内にも存在する可能性が生化学的、免疫組織化学的に報告された。プレセニン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大脳を抗 $\beta$ アミロイド42 (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、大脳皮質の一部の神経細胞がAbeta42に陽性である。

我々は1昨年と昨年、PS1トランスジェニックマウスと人アルツハイマー病の大脳皮質について、抗Abeta42抗体に陽性である超微構造を免疫戻し電顕 (pre-embedding法) で検討した。

今年度は $\beta$ アミロイド陽性構造の全体像を把握するために、人アルツハイマー病の厚切り切片を用いて、立体的に検討した。

### B. 研究方法

10%フォルマリン固定した人アルツハイマー病(3例)、対照例(2例)の大脳後頭葉皮質を寒天包埋し、マイクロスライサーで $20\mu\text{m}$ 厚さの厚切り切片を作成した。抗原性の賦活化を行った後、抗ヒト $\beta$ アミロイドマウスモノクローナル抗体(8-17 with C-terminal cysteine, DAKO M872)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。封入した光顕標本を用いて、焦点深度を移動させて検鏡し、その立体構造を検討した。また、陽性構造の直径を測定しヒストグラムを作成した。

### C. 研究結果

- ①直径 $100\mu\text{m}$ 位の定型的な老人斑に加えて多数の微小な陽性構造(微小老人斑)が認められた(図1)。
- ②神経細胞の胞体部分が存在しないはずの大

脳皮質1層や皮質下白質にも層状に散在して陽性の構造が認められた(図1)。



図1：アルツハイマー病の後頭葉皮質を抗 $\beta$ アミロイド抗体で免疫染色した標本の弱拡大像。

③抗 $\beta$ アミロイド抗体に陽性な構造の直径を測定しヒストグラムを作成して検討すると、直径 $100\mu\text{m}$ 位の定型的な老人斑に比較して微小老人斑の数は圧倒的に多く、その直径が増すに逆比例して数は減少し、また症例間のアルツハイマー病病変の強度に比例して増加していた(図2)。

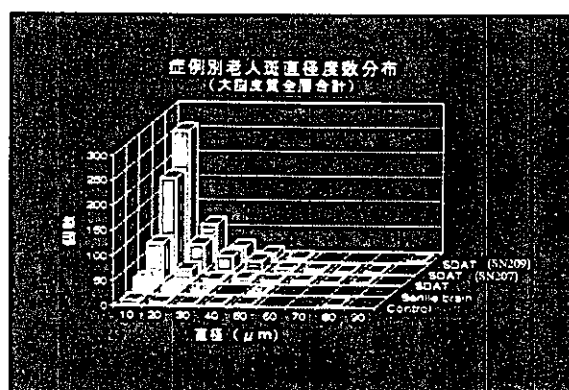


図2：抗 $\beta$ アミロイド抗体に陽性な構造の直径のヒストグラム。

④数は少なかったが、明らかに星膠細胞の形態を示唆する陽性構造も散見された（図3）。



図3：星膠細胞の形態に類似した陽性構造が散見された。

#### D. 考察

①微小老人斑はその数と直径の相関関係から考えて、 $\beta$ アミロイド沈着（老人斑）の初期像と考えられる。

②神経細胞胞体の存在しないはずの皮質1層や皮質下白質にも陽性構造は散見されたことから、神経細胞突起は否定できないが、少なくとも神経細胞体由来ではなく、他の細胞由来のものもある可能性が考えられる。

③数は少なかったが、明らかに星膠細胞の形態を示唆する陽性構造も散見されたことから、星膠細胞由来のものもあると考えられる。

#### E. 結論

人アルツハイマー病の脳皮質の $\beta$ アミロイド陽性の構造の初期像は、神経細胞の胞体以外の他の細胞成分特に星膠細胞に由来する可能性が示唆された。今後、この超微形態を低温重合樹脂を用いてpost-embedding法で検討する予定である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

1. Eto K, Asada T, Arima K, Makifuchi T, Kimura H: Brain hydrogen sulfide is severely decreased in Alzheimer's disease. *J Biochem Biophys Res Commun* 293:1485-88, 2002

2. Koide T, Nakajima T, Makifuchi T, Fukuhara N: Systemic mastocytosis and recurrent anaphylactic shock. *Lancet* 369:2084, 2002

3. Toyooka K, Iritani S, Makifuchi T et al: Selective reduction of a PDZ protein, SAP-97, in the prefrontal cortex of patients with chronic schizophrenia. *J Neurochem* 83:797-806, 2002

4. Koide T, Ohtake H, Nakajima T, Furukawa H, Sakai K, Kamei H, Makifuchi T, Fukuhara N: A patient with dementia with Lewy bodies and codon 232 mutation of PRNP. *Neurology* 59:1619-1621, 2002

5. Ishida C, Kakishima A, Okino S, Furukawa Y, Kano M, Oda Y, Nakanishi I, Makifuchi T, Kitamoto T, Yamada M: Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease with MM1-type prion protein and plaques. *Neurology* 60:514-517, 2003



## AD 特異的神経細胞死の分子機構

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 講師

**研究要旨** 我々はこれまで、細胞内 A $\beta$ 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 $\beta$ 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 $\beta$ 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。本年度は、AD モデルのトランスジェニックマウスにおける細胞内 A $\beta$ 42 の検討や、そのプロセスを抑制する治療法の開発につながる未知の蛋白の同定を試みた。

### 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 $\beta$  (A $\beta$ )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 $\beta$ 42 といわれる不溶性の高い A $\beta$ 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 $\beta$ 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 $\beta$ 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 $\beta$ 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 $\beta$ 42 に起因する神経細胞死のプロセスを抑制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 $\beta$ 42 と共役して機能する蛋白を回収する方法として、A $\beta$ 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 $\beta$ 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 $\beta$ 42 を沈降・回収した。
- 2) 細胞内 A $\beta$ 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。

- 3) ADモデルマウス(Tg2576)において、経時的に脳内の細胞内 A $\beta$ 42 および p53 の変動を検討した。

### C. 研究結果

細胞内 A $\beta$ 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 $\beta$ 42 が特異的に結合することを利用した細胞内 A $\beta$ 42 回収法を確立した。ゲルシフトアッセイで A $\beta$ 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 $\beta$ 42 の HSE-B による回収が著明に増加した。このことから、何らかの核蛋白が核内で A $\beta$ 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。本年度は、蛋白量の関係から、具体的な同定は出来ていないが、引き続き解析を継続している。

一方、細胞内 A $\beta$ 42 による細胞死は、p53<sup>-/-</sup> cell line (Saos2)及び p53<sup>+/+</sup> cell line (U20S)の比較検討で、細胞内 A $\beta$ 42 による細胞死が U20S に顕著であることから、細胞死の主体は 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 $\beta$ 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 $\beta$ 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 $\beta$ 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、昨年度に 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。これまでに、表1に示すように、3種の変動蛋白スポットを検出した。これらの蛋白は、野生型 PS 細胞に比べて、血清除去によるストレス起因性の量的変動が、PS 遺伝子変異で異常をきたしており、神経細胞の脆弱性に関係している可能性がある。今後は、マス・スペクトロメトリーによる蛋白解析を進めていく。

一方、これまでに明らかにした細胞内 A $\beta$ 42 沈着による p53 経路活性化が、細胞外 A $\beta$ 42 による神経細胞死よりも重要か検討するために、AD モデルマウスである FAD 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。現在ま

での preliminary なデータでは、図1に示すように、神経細胞内 A $\beta$ 42 沈着は細胞外沈着が始まる6~8ヶ月齢よりも以前の3ヶ月齢でも見られており、細胞内沈着がより早期であることを示唆している。

#### 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 $\beta$ 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 $\beta$ 42 の異常増加が病因として重要かもしれない。今回、その有意性はもう少し検討を要するが、AD モデルマウスである変異 APP-transgenic mouse 脳における、細胞外 A $\beta$ 42 沈着以前の細胞内 A $\beta$ 42 沈着は、我々の仮説を支持するものである。

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 $\beta$ 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 $\beta$ 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 $\beta$ 42 の回収法を開発し、A $\beta$ 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 $\beta$ 42 の病的作

用を抑制する方法の開発が望まれる。また最近、p53 転写活性を抑制する薬剤がパーキンソン病のモデルマウスの黒質神経細胞死を抑制する報告もあり、同じ理由から AD における治療薬としても利用できるかもしれない。一方で、細胞内 A $\beta$ 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 $\beta$ 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が、これまでに見出した3種の蛋白スポットについて、同定・解析を進めていく予定である。

#### E. 結論

AD の神経細胞死のメカニズムを、細胞内 A $\beta$ 42 の機能の観点から検討した。昨年度に確立した細胞内 A $\beta$ 42 の新しい回収法、2DE を利用した differential display 法を利用して、いくつかの候補蛋白を見出しており、今後はそれらの蛋白の同定を進める予定である。また、AD モデルマウスにおける細胞内 A $\beta$ 42 および p53 の意義についても引き続き検討していく。

#### 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 $\beta$ 42: a novel pathway to neuronal death in Alzheimer's disease. submitted, 2003.

- 2) Santa Y, Ohyagi Y, Yamada T, Oshima S, Ikezoe K, Kikuchi H, Taniwaki T, Asahara H, Tsuruta Y, Osoegawa M, Furuya H, Iwaki T, Kira J: Accumulation of amyloid- $\beta$ 42 in satellite cells in inflammatory myopathies: involvement of p53 and bax. submitted, 2003.
- 3) Furuya H, Yasuda M, Terasawa K, Tanaka K, Murai H, Kira J, Ohyagi Y: A novel mutation (L250V) in the presenilin 1 gene in a Japanese familial Alzheimer's disease with myoclonus and generalized convulsion. J. Neurol. Sci., in press, 2003.

4)

【学会発表】

- 1) 大八木保政 他:A $\beta$ 42 と共役する核蛋白の抽出。第 43 回日本神経学会総会、札幌、2002 年 5 月 30 日
- 2) 栄 信孝、大八木保政 他:2次元電気泳動法による AD 特異的ストレス蛋白の探索。第 43 回日本神経学会総会、札幌、2002 年 5 月 30 日
- 3) Ohyagi Y., et al.: Activation of the p53 promoter by Ab42: a novel pathway to neuronal death in Alzheimer's disease. The 8th international conferences on Alzheimer's disease and related disorders. Stockholm, July 24, 2002.
- 4) Ohyagi Y., et al.: Search for novel proteins related to neuronal death in Alzheimer's disease. The 32nd annual meeting of Society for Neuroscience. Orlando, Nov. 5, 2002.

G. 知的所有権の取得状況

特になし