

20030700

厚生労働科学研究研究費補助金

こころの健康科学研究事業

アルツハイマー病の神経細胞死を誘導する遺伝子機能の解析と抑止法の開発

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 田平 武

平成16年4月

## 目 次

### I. 総括研究報告書

- アルツハイマー病の神経細胞死を誘導する遺伝子機能の解析と抑止法の開発…… 1  
田平 武

### II. 分担研究報告書

1. シナプス機能障害を標的としたアルツハイマー病新規治療法の開発……7  
武田雅俊
2. A $\beta$ と結合し、神経細胞死を誘導する蛋白質の同定……11  
田平 武
3. Post-embedding 電顕免疫組織化学法の検討……17  
卷淵隆夫
4. 細胞内 A $\beta$  分解促進因子の探索……19  
大八木保政
5. 小胞体ストレス反応をふまえたアルツハイマー病の新しい治療戦略……27  
工藤 喬

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表……31

### IV. 研究成果の刊行物・別刷

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

アルツハイマー病の神経細胞死を誘導する遺伝子機能の解析と抑止法の開発

主任研究者 田平 武 国立長寿医療センター研究所 所長

研究要旨 本研究はアルツハイマー病の病態の中核をなすシナプスの変性と神経細胞死を引き起こす遺伝子機能を解析し、それを抑止する方法を開発することを目的に開始された。その為にまずシナプス変性に関わる A $\beta$ 分子種の同定を試み、MAS による A $\beta$ 分子種を同定するシステムを立ち上げることに成功した。神経細胞死に関する研究では、神経細胞内 A $\beta$ の局在を明らかにするとともに A $\beta$ と結合する蛋白質のスクリーニングを試みた。その結果、細胞内局在は未だ明らかにできなかったが、A $\beta$ と結合する蛋白質として glypican-1 と新規蛋白質 ADIP を見出した。両者は A $\beta$ と結合し、神経細胞死を誘導したので、これを用いて細胞死を抑止する薬物をスクリーニングするシステムを立ち上げた。また細胞内 A $\beta$ 分解を促進することにより細胞死を抑止する方法を開発する為に蛍光標識した A $\beta$ を作製し、蛍光を測定することで A $\beta$ 分解促進因子をスクリーニングする系を立ち上げた。さらに、小胞体ストレスによる神経細胞死を抑止する方法を開発する為に、分子シャペロン GRP-78 を誘導する物質をスクリーニングし、コンパウンド X を得た。本研究はアルツハイマー病のシナプス変性、神経細胞死を抑止する方法を開発することを目的に順調なスタートを切り、研究は予定どおり進捗した。

分担研究者

大八木保政	九州大学大学院医学系研究科 附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ポ ストゲノム疾患解析学講座プロ セシング異常疾患分野 助教授
卷淵隆夫	国立療養所犀潟病院 臨床研究 部長
武田雅俊	大阪大学大学院医学系研究科ポ ストゲノム疾患解析学講座プロ セシング異常疾患分野 教授

れば、抑止方法が開発できると期待される。本研究は A $\beta$ と結合する蛋白質や小胞体ストレス関連蛋白の遺伝子機能を *in vitro*、*in vivo* で解析し、アルツハイマー病における神経細胞死のカスケードを明らかにすると共に、これを抑止する薬物をスクリーニングし、治療薬のシードを得ることを目的とする。また、シナプス変性に関わる A $\beta$ 分子種を同定し、これを特異的に認識し、その分子種形成を阻害する物質をスクリーニングし、薬物開発をめざす。アルツハイマー病は高齢者に多い痴呆疾患で、徐々に進行し、ヒトにとって最も重要な人間らしさを失う病気である。その原因となるシナプス障害、神経細胞死のメカニズムの解明は最も重要かつ必要な研究であることは言うまでもない。本研究によりシナプス変性や神経細胞死の機序が明らかになれば、その中からシナプス・神経細胞変性・細胞死を抑止する方法が開発されると期待され、社会に与えるインパクトは計り知れない。

A. 研究目的

アルツハイマー病の脳に特徴的であるのは  $\beta$  アミロイド沈着による老人斑の形成であるが、症状に直結するのはシナプスの変性と神経細胞死である。アルツハイマー病の神経細胞死の機序は複雑であるが、細胞内外の A $\beta$ により誘導・活性化される遺伝子機能を解析し、それにより細胞死が誘導されるメカニズムを解明す

## B. 研究方法

### 1) シナプス変性に係る A $\beta$ 分子種の同定

HEK293 細胞に野生型プレセニン 1 (PS1wt) とスウェーデン変異アミロイド前駆体蛋白 (APPsw) を恒常的に発現する細胞株を樹立し、研究に用いた。培養上澄を回収し、A $\beta$ 抗体 4G8 で免疫沈降し、10-20% トリスートリシンゲルで SDS-PAGE を行い、ウエスタンプロットを行い、A $\beta$ 抗体 6E10 で検出した。また、サンプルの半量を同様に免疫沈降し、飽和アルファーシアノ-4-ヒドロキシシナミ酸を含む TWA (トリフルオロ酢酸:水:アセトニトリル=1:20:20) に溶解し、MAS で解析した。

### 2) A $\beta$ の細胞内局在の同定

4%パラホルムアルデヒドで固定し、20%蔗糖バッファーに保存しておいた AD 脳を LR White resin に包埋し、加速剤を加え 60°C で重合する方法と加速剤を加えず紫外線照射で重合する方法で標本作製した。これを薄切し、モノクローナル A $\beta$ 抗体 M872 (DAKO)、ポリクローナル A $\beta$ 40、A $\beta$ 42 抗体 (Calbiochem) で免疫染色を行った。

### 3) A $\beta$ 結合蛋白の同定

a) ヒト脳の蛋白画分を塩濃度勾配により分画し、ドットプロットにより合成 A $\beta$ 40 が結合する画分を回収した。同じ画分にヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) が出るのが分かったので、これをウエスタンプロットし、A $\beta$ 40 で前処理することによりヘパリチナーゼによるネオエピトープの出現が著しく低下することを指標に HSPG の分子種を同定した。次に、この HSPG の細胞内局在を明らかにする為に、detergent-insoluble glycosylolipid rich fraction (DIG) を既報の方法により抽出し、ウエスタンプロット法により調べた。また、AD 脳における局在は免疫組織化学により調べた。さらに、APPsw を安定的に発現する SH-SY5Y 細胞株に、テトラサイクリンで誘導できる当該 HSPG 遺伝子を導入し、その発現が細胞の増殖、生存にどのような影響を及ぼすかを調べた。

b) A $\beta$ 結合蛋白を同定する方法としてもう一つは yeast two hybrid system を用いた。A $\beta$ 1-42 を bait としてヒト脳 cDNA ライブラリーをスクリーニングした。得られた候補遺伝子の塩基配列を決定し、興味ある遺伝子を選択した。選択した遺伝子産物が A $\beta$ と結合するか否かは当該遺伝子に Myc を、A $\beta$ 1-40 又は A $\beta$ 1-42 に HA タグをつけ、pull down assay によった。この遺伝子が Doxycyclin により誘導発現される SH-SY5Y 細胞を樹立し、この遺伝子産物の細胞内局在を免疫細胞染色により明らかにするとともに、A $\beta$ 1-42 cDNA を導入し、細胞の増殖生存に対する効果を調べた。

### 4) A $\beta$ 分解促進因子の検索

細胞内 A $\beta$ が蓄積することで細胞死が促進されることから、その分解促進因子を探索することで細胞死を抑制できると考えられる。そこで、A $\beta$ 1-40 に蛍光をつけ、細胞内に hyperosmotic influx 法により導入した。細胞内 A $\beta$ 40 の蛍光の消失過程を共焦点レーザー顕微鏡で経時的に観察し、抗 A $\beta$ 抗体による免疫染色と対比した。

### 5) 小胞体ストレスを介する細胞死の抑止法の開発

小胞体ストレスを回避するシャペロン分子 GRP78 を誘導する物質をスクリーニングする為に、その転写調節領域遺伝子を PCR で増幅し、レポーターとしてのルシフェラーゼ遺伝子に結合し、HeLa 細胞に導入した。種々のコンパウンドを添加後、ルシフェラーゼレポーターアッセイシステム (Promega) を用いてスクリーニングした。

### (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。動物実験は所属施設の動物実験倫理委員会の承認を得て行なった。

## C. 研究結果

### 1) シナプス変性に係る A $\beta$ 分子種の同定

PS1wt/APPsw を発現する細胞培養液を回収し、TOF-MAS 解析により A $\beta$ 分子種を解析した。その結果、A $\beta$ モノマーからテトラマーまで、この方法で識別できることが明らかになった。

次に、この細胞の粗膜画分を抽出し、 $\gamma$ セクレターゼのセルフフリーアッセイを行った。この方法により $\gamma$ 切断を受けた APP の C 末端断片を確認し、新規 A $\beta$ の産生を確認した。

### 2) A $\beta$ の細胞内局在の同定

LR white resin 包埋切片は A $\beta$ 抗体による免疫染色が可能であった。60℃加熱重合すると抗原性が低下し、室温による紫外線照射重合が優れていた。

### 3) A $\beta$ 結合蛋白の同定

ヒト脳より A $\beta$ 結合性のある HSPG を分離し、glypican-1 であることを明らかにした。glypican-1 は A $\beta$ モノマーより重合 A $\beta$ をよりよく結合した。また、glypican-1 は lipid raft に主に局在し、A $\beta$ モノマー、オリゴマーとともに回収され、AD 脳では老人斑に $\beta$ アミロイドと共存した。APPsw 発現細胞にテトラサイクリンで glypican-1 を誘導すると、細胞の増殖は停止し、細胞死が誘導された。

Yeast two hybrid system では A $\beta$ を結合する新規遺伝子 ADIP を見出した。ADIP は核移行シグナル、カスパーゼ活性化リクルートドメインを有した。ADIP は主に細胞質に局在したが、ドキシサイクリンで誘導する系に A $\beta$ 1-42 を発現させると核へ移行し、著しいアポトーシスを誘導した。

### 4) A $\beta$ 分解促進因子の検索

蛍光標識した A $\beta$ 40 を細胞内に導入し、経時的に観察することで A $\beta$ 分解の速度をみる事が出来た。蛍光の消退は A $\beta$ 抗体による免疫染色の消退と一致した。

### 5) 小胞体ストレスを介する細胞死の抑止法の開発

GRP78 を誘導するコンパウンド X を得た。コンパウンド X 自体が小胞体ストレス誘導剤でないことを、eIF2 $\alpha$ のリン酸化を促進しないことより確認した。コンパウンド X を PS1 変異細胞にかけると、それ自体に何らかの細胞毒性が見られた。

## D. 考察

本研究では AD のシナプス変性、神経細胞死の機序を解析し、それを抑止する方法を開発することを目的にスタートした。いずれも AD の中核的病態と考えられる $\beta$ アミロイドあるいは A $\beta$ に関連させて研究を行った。シナプス機能の障害は A $\beta$ オリゴマーにより生じることが Selkoe らにより示されている。今回、MAS を用いた A $\beta$ 分子種を同定する方法を確立したので、それを回収し、海馬スライス標本を用いて長期増強効果を指標にシナプス機能を障害する A $\beta$ 分子種を同定できると期待される。

神経細胞死に関しては A $\beta$ と結合する物質をスクリーニングした。その結果、HSPG の一つ glypican-1 が明らかになった。誘導性 glypican-1 と A $\beta$ を発現すると細胞死が誘導された。今後、このシステムを用いて細胞死を抑止する薬物のスクリーニングを行う予定である。また、A $\beta$ と結合し、アポトーシスを強く引き起こす新規物質 ADIP を発見した。誘導性 ADIP と A $\beta$ を発現する細胞も、細胞死を抑止する薬物のスクリーニングに有用である。

本研究者は、これまでの研究で神経細胞内 A $\beta$ 42 の蓄積は p53 の活性化を介し細胞死を引き起こすことを明らかにしていた。P53 を抑制すると癌化などの問題が予想されるので、A $\beta$ の細胞内蓄積を減少させる因子のスクリーニングをすることにした。本研究で、蛍光 A $\beta$ 40 を細胞内に導入し、経時的に観察することで、A $\beta$ 分解の速度が分かるようになった。今後、このシステムを用いて細胞内 A $\beta$ 分解促進因子をスクリーニングする予定である。

AD の発症には血管因子、即ち虚血も危険因

子となっている。虚血は小胞体ストレスを生じ、細胞障害を引き起こすが、本研究者らは  $A\beta$  それ自体小胞体ストレスを生じること、小胞体ストレスが  $A\beta$  産生を増強することを示していた。そこで、小胞体ストレスを緩和する分子シャペロン GRP78 を誘導するレポーターアッセイシステムを構築した。これを用いて GRP78 の発現誘導を促進するコンパウンド X を得た。コンパウンド X 自体、小胞体ストレスを引き起こすことはなかったが、細胞毒性が見られた。今後これをシードに安全で有効な薬剤を開発する予定である。

#### E. 結論

- 1) シナプス変性に関わる  $A\beta_{42}$  分子種を同定するシステムを立ち上げた。
- 2)  $A\beta$  の細胞内局在を超微形態学的に明らかにする為の方法を検討した。
- 3)  $A\beta$  と結合し細胞死を誘導する物質を 2 つ見出した。1 つは glypican-1 であり、他は新規物質 ADIP であった。
- 4) 細胞内  $A\beta$  分解促進因子をスクリーニングするシステムを立ち上げた。
- 5) 小胞体ストレスを緩和する分子シャペロン GRP78 の誘導を促進する物質コンパウンド X を得た。

#### F. 研究発表

##### 論文発表

- 1) Watanabe N, Araki W, Chui DH, Makifuchi T, Ihara Y, Tabira T. Glypican-1 as an  $A\beta$  binding HSPG in the human brain: Its localization in DIG domains and possible roles in the pathogenesis of Alzheimer's disease. FASEB J (in press)
- 2) Takeda K, Wataru A, Tabira T. Enhanced generation of intracellular  $A\beta_{42}$  amyloid peptide by mutation of presenilins PS1 and PS2. Eur J Neurosci 19:258-264, 2004.
- 3) Tanahashi H, Asada T, Tabira T. Association between tau polymorphism and male early-onset Alzheimer's disease. NeuroReport 15:175-180, 2004.

4) Tabira T. Alzheimer's disease: mechanisms and development of therapeutic strategies. Geriatrics and Gerontology International 3: 175-188, 2003.

5) Hashimoto-Gotoh T, Tsujimura A, Watanabe Y, Iwabe N, Miyata T, Tabira T. A unifying model for functional difference and redundancy of presenilin-1 and -2 in cell apoptosis and differentiation. Gene 323: 115-123, 2003.

6) Konagaya M, Kato T, Sakai M, Kuru S, Matsuoka Y, Konagaya Y, Hashizume Y, Tabira T. A clinical and pathological study of a Japanese case of Amyotrophic Lateral Sclerosis/Parkinsonism-Dementia Complex with family history. J Neurol 250: 164-70, 2003.

7) Santa Y, Uyama E, Chui DH, Arima M, Kotorii S, Takahashi K, Tabira T. Genetic, clinical and pathological studies of CADASIL in Japan: a partial contribution of Notch3 mutations and implications of smooth muscle cell degeneration for the pathogenesis. J Neurol Sci 212: 79-84, 2003.

8) Yamada T, Ohyagi Y, Shinnoh N, Kikuchi H, Osoegawa M, Ochi H, Kira J, Furuya H: Therapeutic effects of normal cells on ABCD1 deficient cells in vitro and hematopoietic cell transplantation in the X-ALD mouse model. J Neurol Sci 218: 91-97, 2004.

9) Ertekin-Taner N, Ronald J, Asahara H, Younkin L, Hella M, Jain S, Gnida E, Fadale D, Ohyagi Y, Singleton A, Scanlin L, De Andrade M, Petersen R, Graff-Radford N, Hutton M, Younkin S: Fine mapping of the  $\alpha$ -T catenin gene to a quantitative trait locus on chromosome 10 in late-onset Alzheimer's disease pedigrees. Hum Mol Genet 12: 3133-3143, 2003.

10) 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 209: 75-77, 2003.

11) Kikuchi H, Yamada T, Furuya H, Doh-ura K,

Ohyagi Y, Iwaki T, Kira J: Involvement of cathepsin B in the motor neuron degeneration of amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 105: 462-468, 2003.

12) Ikezoe K, Furuya H, Ohyagi Y, Osoegawa M, Nishino I, Nonaka I, Kira J: Dysterlin expression in tubular aggregates: their possible relationship to the ER stress. *Acta Neuropathol* 105: 603-609, 2003.

13) Yoshiura T, Mihara F, Tanaka A, Ogomori K, Ohyagi Y, Taniwaki T, Yamada T, Yamasaki T, Ichimiya A, Kinukawa N, Kuwabara Y, Honda H: High b value diffusion-weighted imaging is more sensitive to white matter degeneration in Alzheimer's disease. *NeuroImage* 20: 413-419, 2003.

14) 工藤 喬. 小胞体ストレスと神経変性疾患 *Dementia Japan* 17: 1-7, 2003.

15) 工藤 喬. 小胞体ストレスと神経変性疾患 *日本神経精神薬理誌* 23: 105-109, 2003.

16) 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.

17) Toyooka K, Watanabe Y, Iritani S, Shimizu E, Iyo M, Nakamura R, Asama K, Makifuchi T, Kakuta A, Takahashi H, Someya T, Nawa H. A decrease in interleukin-1 receptor antagonist expression in the prefrontal cortex of schizophrenic patients. *Neuroscience Research* 46: 299-307, 2003.

18) Fluhrer R, Multhaup G, Schlicksupp A, Okochi M, Takeda M, Lammich S, Willem M, Westmeyer G, Bode W, Walter J, Haass C. Identification of a beta-secretase activity, which truncates amyloid beta-peptide after its presenilin-dependent generation. *J Biol Chem* 278: 5531-8, 2003.

【学会発表】

1) Tabira T. What cottonwoolplaques tell us. 6th International conference AD/PD 2003 (Invited

speaker) 9. May, 2003. Seville

2) Ohyagi Y, Asahara H, Tsuruta Y, Chui DH, Furuya H, Kira J, Tabira T: Novel P53-dependent neurodegeneration in Alzheimer's disease: The role of intracellular Abeta42. 6th International conference AD/PD 2003. 9. May, 2003. Seville

3) 田平 武. 家族性非アルツハイマー病型痴呆-最近の進歩、第44回日本神経学会総会(教育講演) 平成15年5月17日 横浜

4) 田平 武. アルツハイマー病第44回日本神経病理学会総会学術研究会(ランチョンセミナー) 2003年5月30日 名古屋

5) 田平 武. アルツハイマー病型痴呆の予防・治療法開発の展望. 第45回日本老年医学会(教育講演) 2003年6月18日 名古屋

6) 田平 武. アルツハイマー病型痴呆の薬物療法とQOLの改善 特別講演 第18回日本老年精神医学会(教育講演). 2003年6月18日 名古屋

7) Hara H, Takahashi K, Tabira T. Development of a safe vaccine. Symposium 19th June. The 23rd Japanese congress of gerontology. Nagoya

8) Tabira T. Alzheimer's disease: mechanisms and development of therapeutic strategies. The 26th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society. (Morning Lecture) July 25, 2003, Nagoya

9) 渡辺哲史、田平 武. 神経細胞死におけるAβ結合性 HSPG グリピカン-1 の関与について. 第22回日本痴呆学会. 平成15年10月4日 東京

10) H Hara, Adachi K, Tabira T. New oral vaccine for Alzheimer's disease using recombinant AAV. Society for Neuroscience Meeting Nov. 9, 2003 New Orleans

11) Tabira T. Molecular basis of Alzheimer's disease. Plenary Lecture. The 7th Asia/Oceania regional congress of gerontology, Nov. 26, 2003 Tokyo

12) 田平 武. ワクチン療法 update. 第125回日本医学会シンポジウム. 平成15年12月11日 東京

13) 大八木保政 他: アルツハイマー病(AD)モデルマウスにおける細胞内 Aβ42 の検討. 第44

回日本神経学会総会、東京、2003年5月16日

14) 大八木保政 他：アルツハイマー病における細胞内 A $\beta$ 42 の分子病理。第 22 回日本痴呆学会、東京、2003年10月3日

15) Ohyagi Y, et al.: Novel p53-dependent neurodegeneration in Alzheimer's disease: the role of intracellular A $\beta$ 42. The 5th international conferences on Alzheimer's disease and Parkinson's disease. Seville, May 9, 2003.

16) 工藤 喬、片山泰一、今泉和則：シンポジウム 変性疾患における神経細胞死 ER ストレスの関与について。第 22 回日本痴呆学会 東京、2003

G. 知的所有権の取得状況

- 1) 特許取得
- 2) 実用新案登録
- 3) その他



厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）

分担研究報告書

シナプス機能障害を標的としたアルツハイマー病新規治療法の開発

分担研究者 武田雅俊 大阪大学大学院・ポストゲノム疾患解析学講座・精神医学

研究要旨

アルツハイマー病（AD）は高齢化社会の保健・福祉・生活衛生に大きな影を落とす神経変性疾患であり、その高い有病率、長い罹病期間、障害の重大さから大きな社会問題となっており、その克服はきわめて優先度が高い研究課題である。1980年代からADの分子レベルの病理過程についての研究が進展しており、その治療法の開発は現実的な研究課題となりつつある。世界的に見ても現時点での治療戦略はアミロイド沈着の抑制という観点に絞られてきており、 $\gamma$ セクレターゼ阻害剤、 $\beta$ セクレターゼ阻害剤、アミロイドワクチン療法などが試みられてきたが、残念なことにいずれの戦略も行き詰まりを示していることは周知の事実である。もちろんアミロイド産生抑制やアミロイド排泄を目指した治療法の開発は今後も引き続き為されて行くであろうが、現段階では実用化の道は開けていない。

本研究の目的は、ADの認知障害に関連するシナプス障害に焦点を当ててその病態メカニズムを明らかにし、シナプス障害を阻害する画期的な治療法開発をめざすことにある。家族性ADの原因遺伝子であるプレセニリンと $\beta$ APPの機能はそれぞれA $\beta$ を形成する $\gamma$ 切断を担う酵素と基質であることが示唆されている。このADの遺伝子機能の産物であるA $\beta$ は脳内に蓄積するより前に可溶性の多量体を形成していると考えられているが、本研究ではA $\beta$ の多量体形成の本態を明らかにすると同時にシナプス障害のメカニズムを解明することを第一の目標とする。

本年度から当研究計画に参加した我々は、培養細胞中のA $\beta$ のアミノ及びカルボキシ末端をMALDI-TOF型質量分析による解析により決定するシステムを開発した。そして、培養細胞上清中のA $\beta$ 数量体を同定し同時にセル・フリー・アッセイ系で $\beta$ APPの<デュアル切断>を観察することに成功した。来年度は患者脳内のA $\beta$ 数量体構成単位の分子種を決定し、将来的にはその分子種の数量体形成のメカニズムを明らかにする予定である。

キーワード；アルツハイマー病、アミロイド $\beta$ 蛋白、オリゴマー形成、シナプス毒性

## A. 研究目的

病理学的にはADはA $\beta$ の老人斑への蓄積を例外のない特徴とする。AD患者脳ではこの他にも神経病理学的変化が認められる。神経原線維変化などのA $\beta$ 以外の異常な蛋白質蓄積はAD特異的ではなく汎神経変性疾患で認められる。このことはこれらの病変がADというより神経変性に関連していることを示している。また神経細胞死は患者脳で観察すると、大脳皮質の層構造に関連した神経細胞の大規模な消失が認められ非常に選択的な細胞死メカニズムが働いていると考えられる。また、ADモデル動物ではこのような神経細胞死は再現されておらず、AD研究の中でも最も謎が深い分野である。このような知見はアミロイドによる細胞毒性という観点だけでは治療薬の開発まですぐには進めない可能性を示唆している。それらに比較して、AD患者脳で起こるシナプス減少は神経細胞の突起の退縮で容易に説明でき、同時に重要なことにAD患者の痴呆症状（記憶障害などの認知障害）を説明する責任病変として最も可能性が高いと考えられる。したがって、このシナプス障害の起こる過程を阻害することができれば最低限のAD病理過程の理解でAD症状の発現を抑えることができると考えられる。現時点では老化の過程を阻害することが現実的に難しく、ADの病理過程の完全な理解にはまだ幾許かの時間がかかることが予想される。しかし、今後のわが国の人口高齢化はこの時間差を許さない状況にある。我々の提案するAD治療戦略は症状の抑制という点で最も直接的であり、かつ最小限の病理過程理解を治療につなげる点で短期間で開発可能であると考えられ

る。

## B. 研究方法

### 1) 細胞培養

HEK293細胞に野生型プレセニリンとスウェーデン変異型ベータアミロイド蛋白前駆体を恒常的に発現させ、定法により培養した。

### 2) 分泌アミロイドベータ蛋白のウェスタンブロットティング及びマススペクトロミー解析

培養上清をそれぞれ回収後、アミロイドベータ蛋白抗体(4G8)で免疫沈降、10-20%トリストリシングルでSDS-PAGEを行った後、ニトロセルロース膜に転写した。定法によりアミロイドベータ蛋白抗体(6E10)を用いてフィルムに感光させた。またサンプルの半量を同様に免疫沈降した後、飽和アルファ-シアノ-4-ヒドロキシシナミ酸を含むTWA(トリフルオロ酢酸:水:アセトニトリル=1:20:20)に溶解し、マススペクトロミーで解析した。

### 3) *de novo* アミロイドベータ蛋白定量・定性システム

野生型プレセニリンとスウェーデン変異型ベータアミロイド蛋白前駆体を恒常的に発現した細胞を回収し、定法により粗膜分画を抽出した。粗膜分画を37°C, 30分間インキュベートした。100,000 x gで超遠心し回収した上清と沈降物を超音波破碎の後、再度超遠心して回収した上清を4G8で免疫沈降し、2)の方法でウェスタンブロットティング及びマススペクトロミー解析を行った。

### C. 研究結果

脳組織や培養細胞の膜分画を抽出し試験管内で培養すると $\beta$ APPの $\gamma$ 切断が起こる。しかし、基質を多量に含んだ膜分画を用いても、新規 CTF $\gamma$ の生成は少量認められるだけである。PS1 wt/ $\beta$ APP sw 共発現細胞を20分間パルスし、30分間チェースした。IP-blot とはことなり、大部分のラジオアイソトープのついた $\beta$ APPのCTF stubsは20分から40分の比較的短時間のうちに分解されCTF $\gamma$ が生成された。この事実は $\beta$ APPのトラフィッキングと細胞内分布が $\gamma$ 切断を受ける条件として重要であることを示唆している。

次にCTF $\gamma$ の反対側の新規 $A\beta$ 産生について検討した。膜分画を37°Cで培養した後、超遠心しその上清中にCTF $\gamma$ 及び $A\beta$ が同定されるかどうか検討した。この分画にはかなりの量のCTF $\gamma$ が認められたにもかかわらず、比較的少量の $A\beta$ しか認められなかった。続いて、この分画を採取した後の沈査を超音波破碎し超遠心後の上清に含まれる可溶性蛋白を回収した。この分画にはかなりの量の $A\beta$ が同定されるにもかかわらず、CTF $\gamma$ は殆ど認められなかった。

さらに、我々がここで観察している $\beta$ APPの蛋白分解が生細胞で起こっている $\gamma$ 切断と同一のものかどうか検討した。新規 $A\beta$ をIP-MSで解析し、そのMS spectrumを膜分画調整前の培養上清中の $A\beta$ と比較したところ、殆どなんの違いも認められなかった。続いて $A\beta$ の counterpartであるCTF $\gamma$ についても同様の結果を得た。これらのことから、我々がセル・フリー・アッセイ系で観察している蛋白分解は生

細胞で起こっているPS/ $\gamma$ セクレターゼによる $\gamma$ 切断と違いのないことが証明された。

抽出膜分画にproteinase K、triton X-100を添加し $A\beta$ が蛋白分解を受けるかどうか検討した。トライトンをういて膜分画を可溶化すると殆どの $A\beta$ は可溶性分画に認識された。また可溶性分画の $A\beta$ はproteinase Kにより分解されたが、膜分画をそのままproteinase K処理しても $A\beta$ やGRP78の分解は見られなかった。このことから我々は新規 $A\beta$ はマイクロゾームのルーメンに可溶性蛋白として放出されていると考えた。

### D. 考察

$\beta$ APPがPS/ $\gamma$ -secretaseによる膜内切断を受けるとNTFとして $A\beta$ 、CTFとしてCTF $\gamma$ がそれぞれ産生される。我々はこの $\gamma$ 切断をセル・フリー・アッセイ系で再現し、その産生された新規 $A\beta$ 及びCTF $\gamma$ が生細胞で産生されるそれらと同一であることを示した。20分の37°C培養で産生された新規 $A\beta$ のC端は $\gamma$ 40切断の結果を、そしてCTF $\gamma$ のN端は $\gamma$ 49切断を、それぞれ反映しており、 $\gamma$ 40切断由来のCTF $\gamma$ や $\gamma$ 49切断由来の $A\beta$ は観察されなかった。この事実は、 $\beta$ APPの膜内デュアル切断がほぼ同時に起こったことを示唆している。重要なことに膜内切断の結果生じたNTF( $A\beta$ )とCTF(CTF $\gamma$ )は異なるフラクションに主に同定された。この結果から我々はPS/ $\gamma$ -secretaseによる $\beta$ APP-CTF stubsの切断が主に細胞膜上ではなくマイクロゾーム膜上で起こり、CTF $\gamma$ は膜分画を培養したした上清中に放出されるが、 $A\beta$ は沈査中のmicrosome内腔

に liberate されている可能性を考えた。

#### E. 結論

培養細胞中の A $\beta$ のアミノ及びカルボキシ末端を MALDI-TOF 型質量分析による解析により決定するシステムを開発した。そして、培養細胞上清中の A $\beta$ 数量体を同定し同時にセル・フリー・アッセイ系で BAPP の〈デュアル切断〉を観察することに成功した。来年度は患者脳内の A $\beta$ 数量体構成単位の分子種を決定し、将来的にはその分子種の数量体形成のメカニズムを明らかにする予定である。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文

Fluhrer R, Multhaup G, Schlicksupp A, Okochi M, Takeda M, Lammich S, Willem M, Westmeyer G, Bode W, Walter J, Haass C.

Identification of a beta-secretase activity, which truncates amyloid beta-peptide after its presenilin-dependent generation.

J Biol Chem. 2003 278(8):5531-8.

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）  
分担研究報告書

A $\beta$ と結合し、神経細胞死を誘導する蛋白質の同定

分担研究者 田平 武 国立長寿医療センター研究所 所長

研究要旨 アルツハイマー病における神経細胞死誘導の機序を解析する中から細胞死を抑止する方法を開発することを目的に研究を開始した。その為にアミロイド $\beta$ 蛋白質（A $\beta$ ）と結合する蛋白質を探索し、ヘパラン硫酸プロテオグリカンの一つ glypican-1 と新規物質 ADIP を見出した。いずれも A $\beta$ 存在下に細胞死を誘導した。これらの蛋白質を発現する細胞株を樹立し、細胞死を抑止する薬物をスクリーニングする系を立ち上げた。

研究協力者

Madipali Laksmna（国立長寿医療  
センター研究所外来研究員）

渡辺哲史（ 同 ）

武田和也（ 同 ）

の抑止方法も開発が可能であると期待される。本研究は A $\beta$ と結合し、細胞死を誘導する蛋白をスクリーニングし、A $\beta$ に関連した細胞死誘導因子を同定し、それによる細胞死を抑止する物質をスクリーニングし、創薬につなげることを目的とする。

A. 研究目的

アルツハイマー病(AD)は高齢者における痴呆疾患の主たる原因となっており、患者の数は我国ではおよそ 100 万人と推定されている。その数は年々増加しており、有効な治療法のない今日、一刻も早い予防・治療法の開発が望まれている。

AD 患者の脳に特徴的であるのは $\beta$ アミロイド沈着による老人斑の形成であるが、症状に直結するのはシナプスの変性と神経細胞死である。AD における神経細胞死の機序は複雑であるが、細胞内外に沈着する A $\beta$ により誘導・活性化される遺伝子機能を解析し、それにより細胞死が誘導されるメカニズムを解明すれば、そ

A. 研究方法

1) A $\beta$ と結合する蛋白質の同定：ドットプロット法によるスクリーニング

ヒト脳のホモジネートより蛋白画分を抽出し、食塩の濃度勾配によりフラクションに分け、各フラクションをドットプロットした。このドットプロットに合成 A $\beta$ 1-40 を作用させ、A $\beta$ 結合画分の有無をまず検討した。その中に A $\beta$ 結合画分があったので、物質を同定する為に、ヘパリチナーゼを作用させた後、3G10 モノクローナル抗体で検出する方法で、ヘパラン硫酸プロテオグリカン（HSPG）の可

能性を検討した。A $\beta$ 結合画分と HSPG が一致したので、HSPG を同定する為はその画分を電気泳動し、Western blot を行い、A $\beta$ を作用させた後へパリチナーゼ処理することにより反応が減弱するバンドの分子量から HSPG の種類を推定した。次いで、推定した HSPG に対する特異抗体を用いて同様に検討し、物質を同定した。この A $\beta$ 結合性 HSPG の局在を知る為には細胞のフラクショネーションを行い、部位を推定すると共に、免疫組織化学を行った。そして、この HSPG が A $\beta$ 存在下にどのような働きをするかを知る為には、アミロイド前駆体蛋白 (APP) の Swedish 変異型 (APP<sup>sw</sup>) を安定的に発現する SH-SY5Y 細胞を樹立し、これにテトラサイクリン誘導型にしたその HSPG を発現させたときの細胞の変化を調べた。

## 2) A $\beta$ を結合する蛋白質の同定：Yeast two hybrid 法によるスクリーニング

A $\beta$ 1-42 をベイトとして yeast two hybrid 法による結合蛋白をスクリーニングする系を構築し、ヒト脳のライブラリーをスクリーニングした。この方法により複数の候補物質が得られたが、その中に一つだけ新規の興味ある物質が含まれていた。この物質の遺伝子をクローニングし、塩基配列を決定した。この物質が A $\beta$ 1-40、A $\beta$ 1-42 と結合することを Myc あるいは HA タグをそれぞれにつけて免疫沈降法により確認した。次いで、この物質を各種の細胞に発現させ局在を調べるとともに、A $\beta$ 存在下に見られる細胞の変化を調べた。

(倫理面への配慮)

剖検脳を用いた研究は剖検承諾書をとって行われた。最近の剖検承諾書には研究用使用の許可が得られている。

## B. 研究結果

ヒト脳蛋白を分画し、ドットプロット法により合成 A $\beta$ 1-40 と結合する画分を見出し、HSPG の画分と一致することが分かった。Western blot した後、その膜に A $\beta$ を先に作用させ、その後へパリチナーゼ処理すると著しくその作用が減弱する 66 kDa のバンドが見出された。分子量から glypican-1 であると推定され、これは glypican-1 の抗体で確認された。glypican-1 に対し fresh A $\beta$  (モノマー) より凝集 A $\beta$  (オリゴマー) の方がより結合しやすいことが分かった。細胞の亜分画をとって調べると、glypican-1 はいわゆる detergent-insoluble glycolipid rich (DIG) fraction に回収された (図 1)。またこのフラクションには A $\beta$ のモノマー、オリゴマーと一緒に回収され、細胞内で共存ないし結合状態にあると推定された。免疫組織化学的に glypican-1 はびまん性老人斑及び古典的老人斑の両方に $\beta$ アミロイドと共存することが分かった。APP<sup>sw</sup> 細胞に glypican-1 を発現させテトラサイクリンで ON にすると、細胞増殖が著しく障害され、細胞は死に到った (図 2)。

Yeast two hybrid 法では A $\beta$ 1-42 と結合する新規物質を見出した。この物質の遺伝子をクローニングして塩基配列を決定すると、グルタミンリッチドメイン、核移行シグナル、カスパーゼ活性化リクルードドメインなどが見られ細胞死に関

連する可能性が推定された。A $\beta$ -HA とこの物質に MYC をつけた遺伝子を構築し、それぞれの抗体で免疫沈降すると、いずれの方法でも A $\beta$  との結合が確認された (図3)。A $\beta$  は 40、42 の両方が結合した。この物質を細胞に強発現すると細胞質に発現が見られた。次いでこの細胞に A $\beta$  を作用させると、核へ移行し細胞のアポトーシスを誘導した (図4)。このことから、この物質を A $\beta$ -related death inducing protein (ADIP) と命名した。

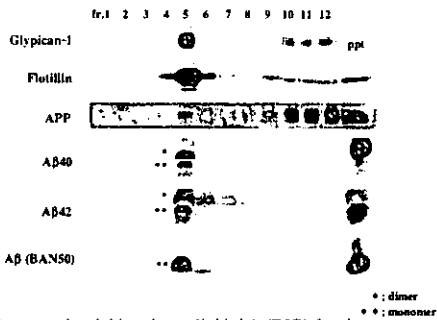


図1. Detergent insoluble sphingolipid rich (DIG) fraction. Glypican-1はflotillin, A $\beta$  monomer, A $\beta$  oligomerとともにDIG画分に回収された。

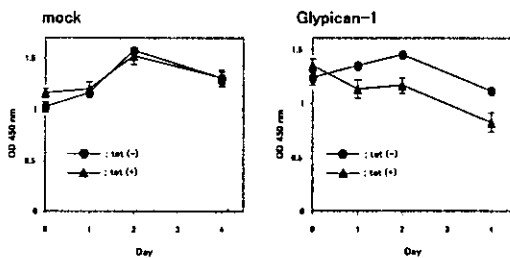


図2. 細胞増殖に対するglypican-1の効果 APPswを発現する細胞にTet-onにしたglypican-1またはベクターのみを発現させ、細胞増殖に及ぼすglypican-1の影響をしらべた。図のごとく、glypican-1は細胞増殖を止め、細胞死を誘導した。

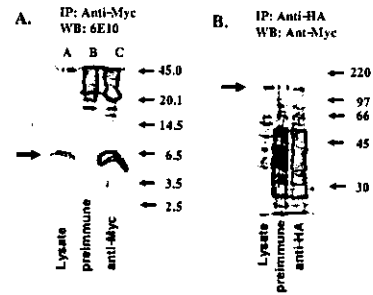


図3. ADIPとA $\beta$ 1-42の結合 MycタグをつけたADIPとHAタグをつけたA $\beta$ 1-42を発現させ、免疫沈降、Western blotを行った。右向き矢印A:A $\beta$ , B: ADIP

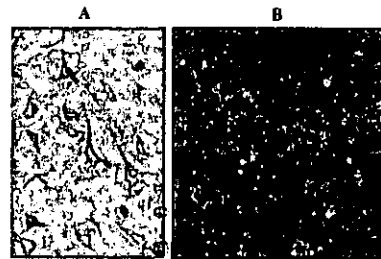


図4. ADIPの局在と細胞死  
A. 抗体による免疫細胞染色ではヒト脳では神経細胞の細胞質に主として見られた。  
B. DOX-on ADIPとA $\beta$ 1-42をSH-SY5Y細胞に導入Lonとするとはじめ細胞質に発現し、やがて核へ移行し、アポトーシスを誘導した。

#### D. 考察

本研究はアルツハイマー病における神経細胞死のメカニズム解明とその抑止法の開発を目的としてスタートした。アルツハイマー病の病態機序の中核に $\beta$ アミロイドが存在することに鑑み、A $\beta$ に関連した神経細胞死の機序に焦点を当てて研究を開始した。その為にはA $\beta$ と結合する分子の同定が重要と考え、2つの方法でスタートした。一つは脳の蛋白分画をドットプロットし、その結合蛋白を同定する方法をとった。その結果、glypican-1がA $\beta$ を結合し、細胞死を誘導することが分かった。2年目はこの系を用いて細胞死を抑制する薬物のスクリーニングを行う予定である。

第2の方法は yeast two hybrid 法を用

い、A $\beta$ 1-42 に結合する蛋白を探索した。その結果、新規物質 ADIP を見出した。ADIP は A $\beta$  と共存すると核へ移行し、強いアポトーシス誘導因子となった。その詳細なメカニズムを解析する中に細胞死を抑制する方法が見出されるものと期待される。さらに、A $\beta$ /ADIP による細胞死誘導のシステムを用いて、これを抑制する薬物のスクリーニングを行う予定である。

#### E. 結論

A $\beta$  と結合し神経細胞死を誘導する 2 つの物質を見出した。一つはヘパラン硫酸プロテオグリカンの一つ glypican-1、他は新規物質 ADIP であった。これらを発現する細胞株を樹立し、細胞死を抑制する薬物のスクリーニングの系を立ち上げた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 【論文発表】

- 1) Watanabe N, Araki W, Chui DH, Makifuchi T, Ihara Y, Tabira T. Glypican-1 as an A $\beta$  binding HSPG in the human brain: Its localization in DIG domains and possible roles in the pathogenesis of Alzheimer's disease. FASEB J (in press)
- 2) Takeda K, Araki W, Tabira T. Enhanced generation of intracellular A $\beta$ 42 amyloid peptide by mutation of presenilins PS1 and PS2. Eur J Neurosci 19:258-264, 2004.
- 3) Tanahashi H, Asada T, Tabira T. Association between tau polymorphism and male early-onset Alzheimer's disease. NeuroReport 15:175-180, 2004.
- 4) Tabira T. Alzheimer's disease: mechanisms and development of therapeutic strategies. Geriatrics and Gerontology International 3: 175-188, 2003.
- 5) Hashimoto-Gotoh T, Tsujimura A, Watanabe Y, Iwabe N, Miyata T, Tabira T. A unifying model for functional difference and redundancy of presenilin-1 and -2 in cell apoptosis and differentiation. Gene 323: 115-123, 2003.
- 6) Konagaya M, Kato T, Sakai M, Kuru S, Matsuoka Y, Konagaya Y, Hashizume Y, Tabira T. A clinical and pathological study of a Japanese case of Amyotrophic Lateral Sclerosis/Parkinsonism-Dementia Complex with family history. J Neurol 250: 164-70, 2003.
- 7) Santa Y, Uyama E, Chui DH, Arima M, Kotorii S, Takahashi K, Tabira T. Genetic, clinical and pathological studies of CADASIL in Japan: a partial contribution of Notch3 mutations and implications of smooth muscle cell degeneration for the pathogenesis. J Neurol Sci 212: 79-84, 2003.

##### 【学会発表】

- 1) Tabira T. What cottonwoolplaques tell us. 6th International conference AD/PD 2003 (Invited speaker) 9. May, 2003. Seville
- 2) Ohyagi Y, Asahara H, Tsuruta Y, Chui DH, Furuya H, Kira J, Tabira T: Novel P53-dependent neurodegeneration in Alzheimer's disease: The role of intracellular Abeta42. 6th International conference



AD/PD 2003. 9. May, 2003. Seville

3) 田平 武. 家族性非アルツハイマー病型痴呆-最近の進歩、第44回日本神経学会総会（教育講演）平成15年5月17日 横浜

4) 田平 武. アルツハイマー病第44回日本神経病理学会総会学術研究会（ランチオンセミナー）2003年5月30日名古屋

5) 田平 武. アルツハイマー病型痴呆の予防・治療法開発の展望. 第45回日本老年医学会（教育講演）2003年6月18日 名古屋

6) 田平 武. アルツハイマー病型痴呆の薬物療法とQOLの改善 特別講演 第18回日本老年精神医学会（教育講演）. 2003年6月18日 名古屋

7) Hara H, Takahashi K, Tabira T. Development of a safe vaccine. Symposium 19th June. The 23rd Japanese congress of gerontology. Nagoya

8) Takeshi Tabira. Alzheimer's disease: mechanisms and development of therapeutic strategies. The 26th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society. (Morning Lecture) July 25, 2003, Nagoya

9) 渡辺哲史、田平 武. 神経細胞死におけるA $\beta$ 結合性HSPGグリピカン-1の関与について. 第22回日本痴呆学会. 平成15年10月4日 東京

10) Hara H, Adachi K, Tabira T. New oral vaccine for Alzheimer's disease using recombinant AAV. Society for Neuroscience Meeting Nov. 9, 2003 New Orleans

11) Tabira T. Molecular basis of Alzheimer's disease. Plenary Lecture. The 7th Asia/Oceania regional congress of gerontology,

Nov. 26, 2003 Tokyo

12) 田平 武. ワクチン療法 update. 第125回日本医学会シンポジウム. 平成15年12月11日 東京

H. 知的所有権の取得状況

特になし

Post-embedding電顕免疫組織化学法の検討

分担研究者 卷淵 隆夫 国立療養所犀潟病院、臨床研究部長  
研究協力者 五十嵐善男、長澤大輔、稲津哲也

研究要旨

アルツハイマー病の神経細胞内にも存在する $\beta$ アミロイドの超微形態を検討する目的で、従来、免疫染色した光顕標本を戻し電顕法(pre-embedding法)で試みてきたが、超微形態の保持に問題があり、今回低温重合樹脂を用いたpost-embedding法を検討した。その結果、抗体の浸透が従来と異なるので染色条件の調整が必要だが、蟻酸処理などを必要とする $\beta$ アミロイド免疫染色にも使えると考えられた。また新しく抗 $\beta$ アミロイド40及び42抗体を入手し、染色条件の検討と特異性の評価を行った。

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脳を抗 $\beta$ アミロイド42(A $\beta$ 42)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A $\beta$ 42に陽性である。

我々はアルツハイマー病の神経細胞内に存在する $\beta$ アミロイドの存在様式を検討する目的で、従来、免疫染色した光顕標本を戻し電顕法(pre-embedding法)で試みてきたが、超微形態の保持等に問題があった。今回、低温重合樹脂LRホワイトレジンを用いたpost-embedding法が、抗原性の賦活化に蟻酸処理等を必要とする $\beta$ アミロイド電顕免疫組織化学に使用できるか、そしてその至適条件等を検討した。

また新しく市販された $\beta$ アミロイド40及び42の抗体を入手し、染色条件の検討と特異性の評価を行った。

B. 研究方法

4%paraformaldehydeに固定し、sucrose bufferに保存しておいた人アルツハイマー病の大脳側頭葉皮質を使用して、LR white resinの重合方法(加速剤を加え60°C加熱重合、加速剤を加えず60°C加熱重合、加速剤を加え紫外線照射で室温重合、加速剤を加えず紫外線照射で室温重合)の検討、薄切と切片貼り付け方法の検討、免疫染色の条件の検討を行った。抗 $\beta$ アミロイド抗体には通常使用しているmonoclonal mouse anti-human beta-amyloid抗体(DAKO M872)を使用した。

また、polyclonal rabbit anti-human beta-

amyloid 40及び42抗体(Calbiochem, FCA3540, 3542)を購入し、通常のパラフィン切片の光顕標本で染色条件の検討を行った。

C. 研究結果

①免疫染色の場合一般に加熱により抗原性を失う場合があるので、出来るだけ加熱は避けるか温度を低くしたい。しかし、LR ホワイトレジンの重合方法の検討では、加速剤を加えて加熱しないと重合せず硬化しなかった。一般に抗 $\beta$ アミロイド抗体の場合、加熱したパラフィン切片でも抗原性の賦活化により染色が可能なので、この位の加熱は問題ないと考えられるが、抗原によっては失活する危険もあり、応用範囲が狭まると考えられた。

②LRホワイトレジンに包埋し、加速剤を加えて60°Cに加熱し重合させたブロックを薄切して、シランコーティングしたスライドガラスに出来るだけ熱を加えずに貼り付け、光顕標本作製した。蟻酸処理により非常に剥がれ易かったが、 $\beta$ アミロイド免疫染色をした。通常 $\beta$ アミロイド免疫染色標本で認められる老人斑と比較して染色性は薄いがほぼ同じ構造が認められた。(図1)。

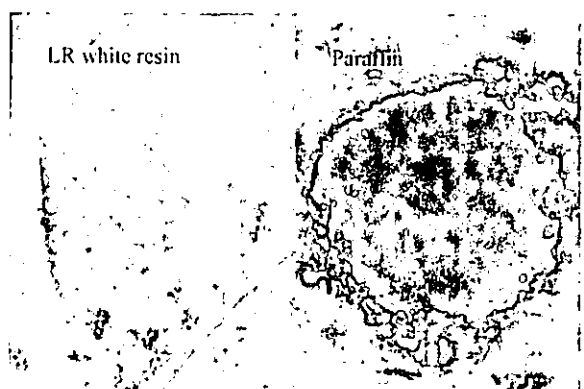


図1: 左はLRホワイトレジンに包埋し加速剤を加

えて60°C加熱し重合させたブロックの光顕標本で、 $\beta$ アミロイド免疫染色をした。右に対照として示した通常の $\beta$ アミロイド免疫染色標本で認められる老人斑を同じ構造が染色性は薄い認められる。

③新しい抗 $\beta$ アミロイド40及び42抗体の染色条件の検討と染色性の評価を行った。

通常の蟻酸処理の後、両抗体とも500倍希釈で至適な染色が得られた。それらの染色性は抗40抗体の染色が老人斑の芯に認められ、従来の報告と一致しており、染色の特異性に特に問題は認められなかった。(図2)

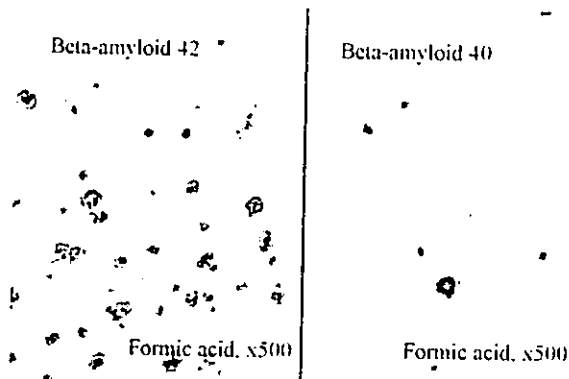


図2: 右が抗 $\beta$ アミロイド40抗体、左が抗 $\beta$ アミロイド42抗体による染色である。抗42抗体は老人斑の周辺部も染めるが、抗40抗体は主に老人斑の芯に認められ、染色の分布が異なる。

#### D. 考察

①一般に抗 $\beta$ アミロイド抗体の場合、加熱したパラフィン切片でも抗原性の賦活化により染色が可能なので、この位の加熱は問題ないと考えられるが、抗原によっては失活する可能性もあり、応用範囲が狭まると考えられる。従って低温重合の条件を更に検討する必要がある。

②新しい抗 $\beta$ アミロイド40及び42抗体の染色条件の検討と染色性の評価を行った。

通常の蟻酸処理の後、両抗体とも500倍希釈で至適な染色が得られた。それらの染色性は従来の報告と一致しており、特異性に特に問題は認められなかった。

#### E. 結論

低温重合樹脂であるLRホワイトレジンをを用いたpost-embedding法による電顕免疫組織化学は低温重合を更に検討する必要があるが、抗 $\beta$ アミロイド抗体では抗原性の保存が出来るので十分使えると考えられた。

今後新しく得た抗 $\beta$ アミロイド40及び42抗体を用いてpost-embedding法による電顕免疫組織化学を行う方向性が確認された。

## 細胞内 A $\beta$ 42 分解促進因子の探索

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、細胞内 A $\beta$ 42 が転写因子作用を有し、p53 プロモーターを活性化、その過剰発現を誘導することで神経細胞(ニューロン)のアポトーシス死を促進することを提唱している。また、アルツハイマー病(AD)モデルマウスおよび AD 患者脳でも、細胞内 A $\beta$ 42 蓄積と p53 発現が変性ニューロンに顕著であることを確認した。従って、AD におけるニューロン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り、この経路を抑制することがニューロン脱落を抑止し、AD における重要な治療法となる可能性がある。本年度は、このような薬剤を探索・開発するために、細胞内 A $\beta$ 42 分解過程を培養細胞で観察するシステムの確立を行った。

### A. 研究目的

アルツハイマー病(AD)における細胞内 A $\beta$ 42 によるニューロン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薬剤の探索・開発を目的とする。AD 脳においては、ニューロンの消失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 $\beta$  が病態に深く関わっていることが広く知られている。従って、A $\beta$ 42 とニューロン死の関係を分子レベルで明らかにすることは根本治療を考える上で極めて重要である。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、ニューロン内での病的作用が 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 が直接 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。実際に、モルモット初代培養神経細胞では、過酸化水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)処理によるアポトーシス誘導にて、A $\beta$ 42 が時間経過とともに核に集積し、それとともに細胞内に p53 集積を認めた(図 1)。従って、細胞内 A $\beta$ 42 は酸化ストレスにより核内移行が促進され、p53-dependent アポトーシスを促進すると考えられる。このような細胞内 A $\beta$ 42 に起因するニューロン死のプロセスを効果的に抑止する方法として、細胞内 A $\beta$ 42 の分解機構を促進することは非常に有力と考えられる。本研究の目的は、神経細胞内 A $\beta$ 42 分解速度を定量的にアッセイする方法を開発し、AD におけるニューロン脱落を抑止する薬剤の探索を行っていくことにある。