

本年度は、そのような薬剤スクリーニングのための培養細胞アッセイシステムの確立を目的とした。

## B. 研究方法

- 1) 人工的に細胞質内に A $\beta$  を蓄積させ、それが経時的に分解していく過程をアッセイする培養細胞系を確立した。細胞としては、ヒト神経芽細胞腫 (SH-SY5Y) を用いた。
- 2) 導入する A $\beta$  は A $\beta$ 40 を用いた。合成 A $\beta$ 40 を Alexa Fluor で蛍光ラベルし、培養細胞に hyperosmotic influx 法を利用して導入した。Hyperosmotic influx 法は、目的ペプチドを含む高浸透圧培養液で10分間処理することで細胞の pinocytosis を誘導し、さらに低浸透圧培養液に交換し2分間処理、細胞質内にフリーのペプチドを蓄積させた。
- 3) 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観察し、また抗 A $\beta$ 40 抗体による免疫染色にてその経時的变化を検討した。

## C. 研究結果

蛍光ラベルした A $\beta$ 40 は 488 nm 波長で緑色の蛍光を発する。蓄積したペプチドはユビキチン化され、プロテアソーム分解を受けると考えられる。蛍光 A $\beta$ 40 がプロテアソーム分解を受けると細胞質内の蛍光強度が減少していく。我々は、共焦点レーザー顕微鏡下リアルタイム観察にて、A $\beta$ 40 の蛍光は細胞質内導入 30 分後、60 分後にはあきらかに減少することを見出した (図 2)。コンピューター

処理により蛍光強度変化の定量的評価は可能で、細胞内蓄積 A $\beta$ 40 の分解能を定量することができる (データ未提示)。また、DAB 免疫染色にても同様に細胞質内 A $\beta$ 40 の経時的減少を確認した (図 3)。

## D. 考察

一般に、加齢に関連してニューロンに影響を及ぼす酸化ストレスは、培養細胞系では H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を加えることでモデルとされている。我々は、そのような H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理が細胞質内の A $\beta$ 42 蓄積を誘導し、さらに核内へ移行、p53 の発現増強に至ることを見出した。一方、代表的 AD モデルマウスある Tg2576 では、生後 4 ヶ月頃からニューロン内 A $\beta$ 42 蓄積、6 ヶ月頃から記憶障害などの認知機能障害、8 ~ 12 ヶ月頃に細胞外 A $\beta$ 42 沈着が生ずることが最近報告されている。このことは、ニューロン内 A $\beta$ 42 沈着こそが細胞外沈着よりも直接認知機能障害に関わっていることを示唆している。ニューロン内 A $\beta$ 42 の病的機序としては、ミトコンドリア障害、シナプス障害、ライソゾーム障害などが提唱されているが、我々は直接 p53 経路を活性化する経路が特に多数のニューロン消失に重要と考えている。

本研究における我々の目標は、AD におけるニューロン死や認知機能障害を抑制する治療薬の探索・開発である。そのためには、酸化ストレスに対して過剰に細胞質内に蓄積する A $\beta$ 42 の核移行あるいは核内での p53 プロモーターに対する作用を抑制することが重要と考えている。最近の知見より、細胞質内に増加した A $\beta$ 42 はユビキチン化されプロテアソーム

ムで分解を受けると考えられている。さらにプロテアソームは細胞質内のみならず、核内 A $\beta$ 42 も分解している可能性がある。したがって、プロテアソーム機能を賦活し、A $\beta$ 42 を含む異常蓄積蛋白の分解を促進する薬剤は治療薬として有望である。我々はそのような薬剤を探索するシステムとして、培養細胞の細胞質内に直接 A $\beta$ ペプチドを注入、その分解過程を観察・定量する実験系の確立を行った。まず、ペプチドとしては A $\beta$ 40 を選択した。その理由としては、A $\beta$ 40の方が不溶性の高分子形態をとりやすく、生理的状态で細胞質に導入しやすいことがある。実際には、A $\beta$ 40分解を促進する薬剤は、A $\beta$ 42分解促進にも効果があると予想される。次に、hyperosmotic influx法については、トランスフェクションとは違って、小分子蛍光物質でラベルしたペプチドを直接導入できること、導入直後から分解過程を経時的に観察できること、導入以降は持続的には産生されないことがメリットであり、本研究の目的によく合致している。実際、図2・3に示すように、導入1時間以内に速やかに分解される。興味深いことに、図2ではびまん性の蛍光は分解されやすいが顆粒状の蛍光物質は残存しやすい。これは、aggresomeといわれるプロテアソーム抵抗性の構造物と考えられる。現在、本実験系の信頼性チェックのため、抗ユビキチン抗体との二重染色やプロテアソーム抑制剤が与える影響を確認中である。

今後、本実験系を利用して、プロテアソーム機能抑制薬および促進薬の影響を定量的に評価し、特に治療薬剤として実

現性のある薬剤を探索していく予定である。例としては、Bcl-2増加作用やプロテアソーム活性化作用があり神経保護効果が注目されている rasagiline や apomorphine、またプロテアソーム機能を促進する細胞内 heat shock protein (HSP)などの影響を確認していく。

#### E. 結論

ADにおける細胞内A $\beta$ 42/p53誘導性アポトーシス経路を抑制する治療薬探索のための実験システムを構築した。細胞内A $\beta$ 42によるニューロン死は認知障害や細胞外老人斑形成の上流にあると考えられ、そのような薬剤は有力なAD治療薬となる可能性がある。

#### F. 研究発表

##### 【論文発表】

- 1) 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
- 2) 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

- 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.* 209: 75-77, 2003
- 4) 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
- 5) 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
- 6) 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

【学会発表】

- 1) 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
- 2) 大八木保政 他：アルツハイマー病における細胞内 Aβ42 の分子病理。第 22 回日本痴呆学会、東京、2003

年 10 月 3 日

- 3) Ohyagi, Y., et al.: Novel p53-dependent neurodegeneration in Alzheimer's disease: the role of intracellular Aβ42. The 5th international conferences on Alzheimer's disease and Parkinson's disease. Seville, May 9, 2003.

G. 知的所有権の取得状況

特になし

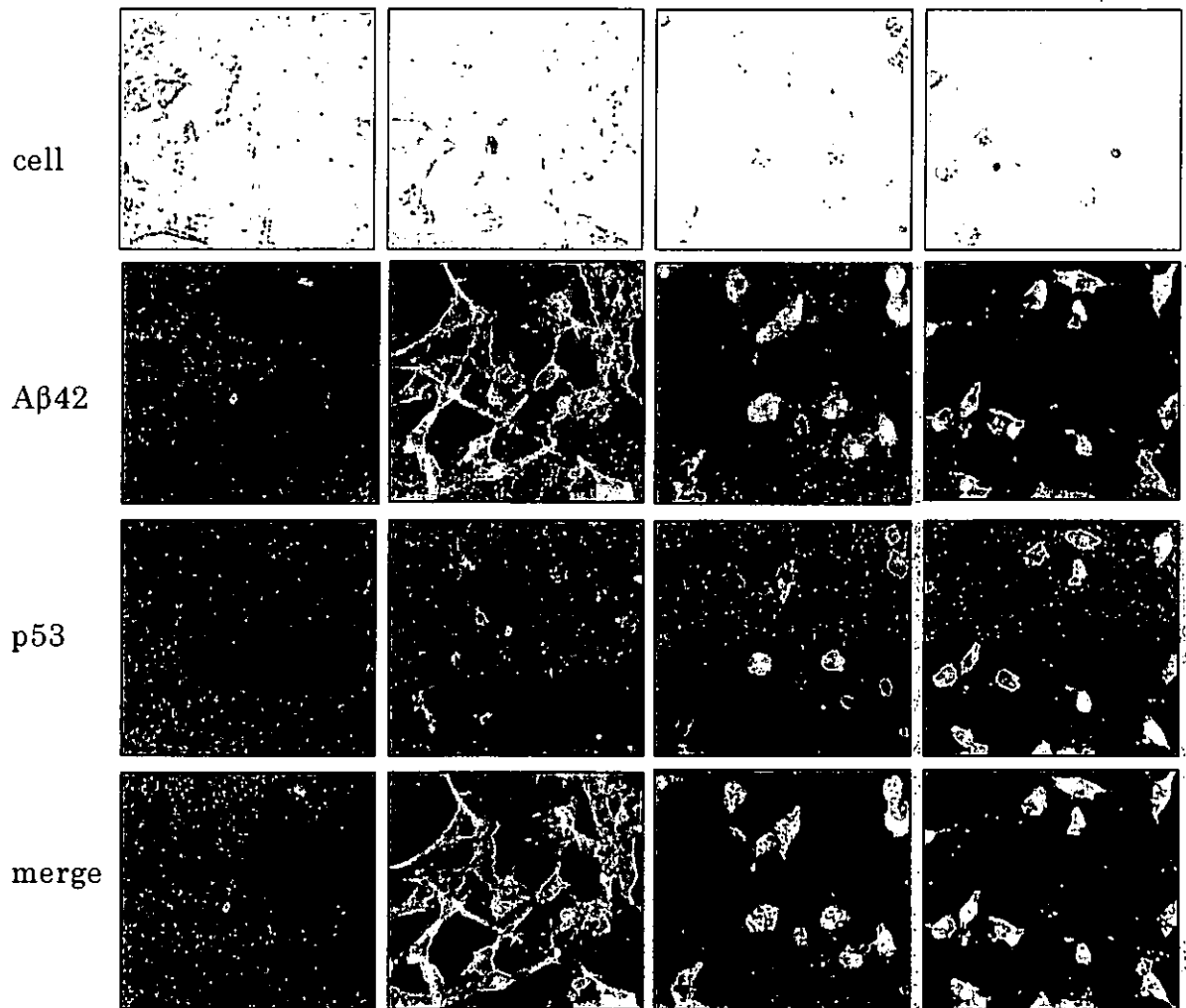


図1. 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理モルモット培養ニューロンにおける核への Aβ<sub>42</sub> 蓄積と p53 発現誘導の共焦点レーザー顕微鏡による経時的観察。

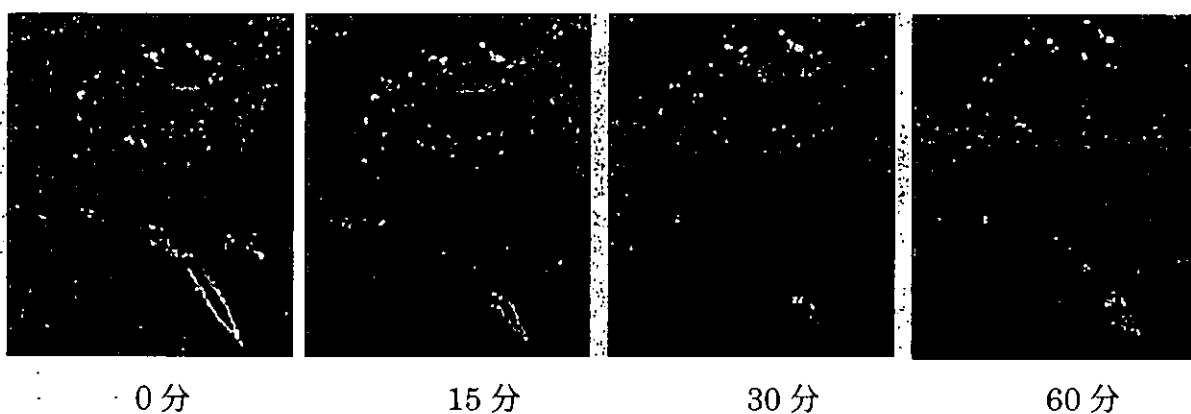


図2. 共焦点レーザー顕微鏡による SH-SY5Y に蛍光ラベル Aβ40 導入後の経時的な蛍光強度の減少の観察。細胞質内に分解困難と考えられる aggresome を形成した Aβ40 が一部残存する。

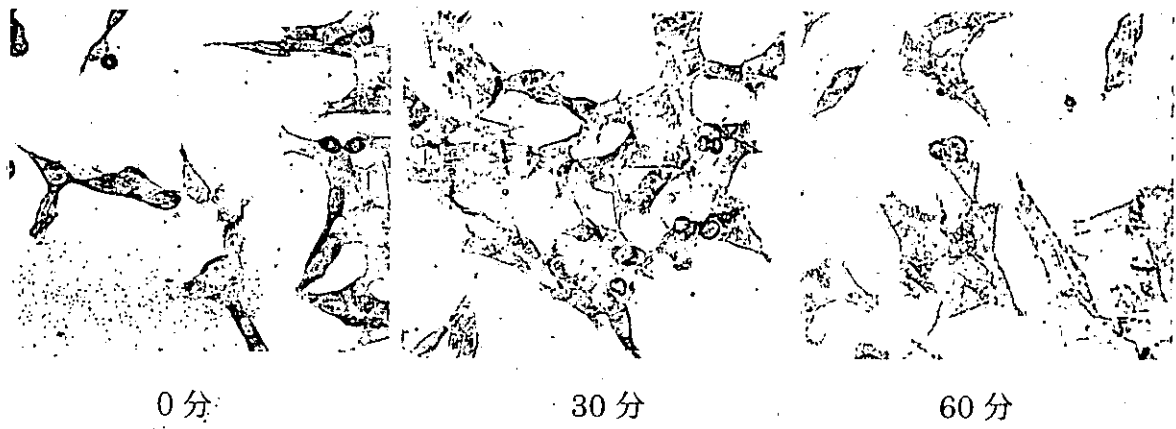


図3. 抗 Aβ40 抗体(BA-27)による SH-SY5Y 内の Aβ40 免疫染色(DAB)。経時的な Aβ40 の減少がみられる。

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

分担研究者 工藤 喬 大阪大学大学院医学系研究科助教授

研究要旨：アルツハイマー病の病態過程に小胞体ストレスが関与しているという知見より、小胞体ストレスからの神経細胞の離脱を図る方策をアルツハイマー病の治療戦略に応用できないかを検討した。小胞体ストレス反応のうち分子シャペロン（GRP 78）誘導を起こし、かつ小胞体ストレスを起こさないコンパウンドを検索した。これらの検索により、コンパウンド X を得たが、他に細胞毒性を持つことが示唆され、更なる検討が必要となった。

A. 研究目的

高齢化社会を迎え、痴呆中でもアルツハイマー病(AD)の治療法の確立は急務である。我々は、家族性ADの責任遺伝子であるプレセニリン1(PS1)の変異体は小胞体(ER)ストレス反応を減弱せしめ、ストレス脆弱性を生じること、アミロイド蛋白(A $\beta$ )は神経細胞にERストレスを起こすことを報告してきた。これらの知見はADの病理過程にERストレスが関与していることを示している。本研究は、この事実を踏まえ、ERストレスから神経細胞の離脱を図ることを治療戦略として検討する。ERストレスは、分子シャペロンの誘導、蛋白翻訳抑制、プロテアソームを介した蛋白分解で小胞体に蓄積したunfolded proteinを処理し、ストレスからの離脱を図るとされる。このうち、治療戦略として応用可能な分子シャペロン誘導について、本年度は検討した。

B. 研究方法

本研究は、ERストレスで誘導され蛋白の折りたたみ是正を行う分子シャペロン GRP

78 を人為的に誘導する薬剤の検索を行った。

1) 1次スクリーニング

GRP 78 の5'-UTR で転写因子がバインドするERSE領域を3個含む-132~+7の領域をHela細胞のゲノムDNAからPCRにて増幅し、ホタルルシフェラーゼ遺伝子を含むpGL3ベクター(Promega社)に挿入し、レポータープラスミドとした。Hela細胞にレポータープラスミドと対照として1/10のウミシイタケルシフェラーゼを発現するpRL-SV40(Promega社)を同時にトランスフェクションし、パーマネントセルラインを構築した。候補コンパウンドを添加の後、細胞ライセートをDual-Luciferase Reporter Assay System(Promega社)を用い、両ルシフェラーゼ活性を測定した。

2) 2次スクリーニング

1次スクリーニングでGRP 78を誘導できるとされたコンパウンドでも、単にERストレスを惹起する薬剤を除外しなければならない。2次スクリーニングでは、蛋白転写抑制する系を用いて、コンパウンドがERストレスを起こさないかを検討した。具体的に

は、コンパウンドを添加した細胞のライセートをリン酸化 eIF2 $\alpha$  を認識する抗体でウェスタンブロットした。

### 3) PS1 変異細胞への効果判定

ER ストレスに脆弱である PS1 変異細胞に 1, 2 次スクリーニングをパスしたコンパウンドを添加し、Thapsigargin で ER ストレスをかけ、ストレス脆弱性が改善されるかを MTS アッセイで検討した。

(倫理面への配慮)

本年度の研究は、全て細胞実験である。

## C. 研究結果

ある種のコンパウンド(便宜的にコンパウンド X と称す) が、レポーターアッセイで GRP 78 誘導能を有することが認められた。更に、コンパウンド X の添加は eIF2 $\alpha$  をリン酸化することはなく、ER ストレスを惹起しないことが示唆された。しかし、コンパウンド X を PS1 変異細胞に添加したところ、ER ストレスをかけなくても MTS 活性の低下が見られ、コンパウンド X に何らかの細胞毒性があることが示唆された。

## D. 考察

ER ストレスに対する反応は、分子シャペロンの誘導、蛋白翻訳抑制、プロテアソームを介した蛋白分解で小胞体に蓄積した unfolded protein を処理するとされるが、その中で治療戦略として利用可能なのは分子シャペロン誘導と考えられた。そこで、GRP 78 のプロモーター配列を用いたレポーターアッセイ系を構築して、GRP 78 誘導剤を検索した。コンパウンド X はレポーターアッセイにより GRP 78 誘導能を持つことが確認された。GRP 78 誘導能を持つコンパウン

ドでも、ER ストレスを起こすことで作用していたら治療薬にならない。そこで、蛋白翻訳抑制系に関与する別の ER ストレス反応で、このコンパウンド X を検討したところ、eIF2 $\alpha$  のリン酸化は起こさず、この薬剤は直接 GRP 78 のプロモーター領域に作用してその誘導を起こすことが示唆された。しかし、実際に PS1 変異細胞に添加したところ、他の細胞傷害作用があることが示唆された。コンパウンド X の用量を更に検討する必要があるが、コンパウンド X の構造を更に検討し、細胞毒性の減弱を図ることも考慮される。また、構築された 1, 2 次スクリーニングで新たなコンパウンドの検索を行う予定である。

## E. 結論

ER ストレスから神経細胞を離脱せしめる方策を AD の治療戦略として検討した。ER ストレス反応のうち分子シャペロン誘導に着目し、レポーターアッセイにて GRP 78 誘導コンパウンドを検索した(1次スクリーニング)。また、このコンパウンドが ER ストレスを起こさないかを他の ER ストレス反応系で検討した(2次スクリーニング)。これらのスクリーニングでコンパウンド X を選択してきたが、他の細胞毒性を有することが示唆された。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

・小胞体ストレスと神経変性疾患

工藤 喬



Dementia Japan 17(1): 1-7, 2003

・小胞体ストレスと神経変性疾患

工藤 喬

日本神経精神薬理誌 23 : 105-109, 2003

## 2. 学会発表

シンポジウム 変性疾患における神経細胞  
死

アルツハイマー病の神経変性過程における  
ER ストレスの関与について

工藤 喬、片山泰一、今泉和則

第 22 回日本痴呆学会、東京、2003

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

研究成果の刊行に関する一覧表

著者氏名	論文タイトル名	雑誌名	号、巻、頁	年
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	
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
Tanahashi H, Asada T, Tabira T.	Association between tau polymorphism and male early-onset Alzheimer's disease.	NeuroReport	15:175-180	2004
Tabira T.	Alzheimer's disease: mechanisms and development of therapeutic strategies.	Geriatrics and Gerontology International	3: 175-188	2003
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
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
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
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
Ertekin-Taner N, Ronald J, Asahara H,	Fine mapping of the a -T catenin gene to a quantitative trait locus on	Hum. Mol. Genet.	12: 3133-3143	2003

Younkin L, Hella M, Jain S, Gnida E, Fadale D, Ohyagi Y, Singleton A, Scanli L, De Andrade M, Petersen R, Graff-Radford N, Hutton M, Younkin S	chromosome 10 in late-onset Alzheimer's disease pedigrees.			
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
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
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
Yoshiura T, Mihara 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
工藤 喬	小胞体ストレスと神経変性疾患	Dementia Japan	17: 1-7	2003
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
Ishida C, Kakishima A, Okino S, Furukawa Y, kan M, Oda Y, Nakanishi I, Maki fuchi T, Kitamoto T, Yamada M.	Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease with MM1-type prion protein and plaques.	Neurology	60: 514-517	2003

<p>Toyooka K, Yuichiro Watanabe Y, Shuji I, Shimizu E, Iyo M, Nakamura R, Asama K, Makifuchi T, Kakuta A, Takahashi H, Someya T, Nawa H</p>	<p>A decrease in interleukin-1 receptor antagonist expression in the prefrontal cortex of schizophrenic patients.</p>	<p>Neuroscience Research</p>	<p>46: 299-307</p>	<p>2003</p>
<p>Fluhrer R, Multhaup G, Schlicksupp A, Okochi M, Takeda M, Lammich S, Willem M, Westmeyer G, Bode W, Walter J, Haass C.</p>	<p>Identification of a beta-secretase activity, which truncates amyloid beta-peptide after its presenilin-dependent generation.</p>	<p>J Biol Chem.</p>	<p>278: 5531-8.</p>	<p>2003</p>

20030700

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、  
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。