

200400732A

厚生労働科学究費補助金

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16年度総括・分担研究報告書

主任研究者 田平 武

平成17（2005）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. AB-DIP の機能解析と神経細胞死抑制…… 6  
田平 武
2. 細胞内 A $\beta$ 分解促進と家族性アルツハイマー病の神経細胞死抑止…… 11  
大八木保政
3. 小胞体ストレスによるアミロイド前駆体蛋白の局在変化について…… 16  
工藤 喬
4. A $\beta$ 抗体を用いた免疫電顕による早期細胞内アミロイド分布の検討…… 21  
巻淵 隆夫
5. 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……24  
武田雅俊

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表…… 30

## IV. 研究成果の刊行物・別刷

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制法の開発

主任研究者 田平 武 国立長寿医療センター 研究所長

研究要旨  $A\beta$ と結合し神経細胞死を誘導する新規物質 AB-DIP を見出した。ドミナントネガティブ AB-DIP、AB-DIP に対する siRNA はその細胞死を抑制した。細胞内  $A\beta$ の局在を検討し、エンドソーム・リンソーム系、小胞体・ゴルジ体に対応する所見を得た。細胞内  $A\beta$  分解促進剤を開発する為の系を立ち上げ、候補物質として化合物 A を得た。BiX は小胞体ストレスを緩和し、 $A\beta$ 産生を低下させた。 $A\beta$ 1-42 産生を抑制し Notch 切断に影響を与えない新規 NSAID を見出した。

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
工藤 喬	大阪大学大学院医学系研究 科助教授
卷淵隆夫	国立病院機構さいがた病院 臨床研究部長
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 教授

合し、障害を引き起こすことも示された。本研究は細胞内・外  $A\beta$ による神経細胞死及びシナプス障害の機構を明らかにする中から、それ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.  $A\beta$ と結合し細胞死に関わる分子を two hybrid system により明らかにし、これを強発現する系を樹立する。この系にその dominant negative 遺伝子及び siRNA を導入し、細胞死抑止効果を調べる。
2. 細胞内  $A\beta$ の分解促進剤を開発する為に、合成  $A\beta$ 1-40 を蛍光標識し、浸透圧法により細胞にとり込ませ、経時的に蛍光強度を測定することによりその分解速度を測定できる系を樹立する。これに各種化合物をかけて  $A\beta$ 分解を促進する物質を選択する。
3. 小胞体ストレスに際し誘導されるシャペロン GRP-78 のプロモーター領域を用

A. 研究目的

アルツハイマー病 (AD) ではワクチン療法の可能性が示されるなど、その根本的予防・治療法の開発に向けて研究が進んでいる。しかし、我々は以前にプレセニリン 1 変異トランスジェニックマウスを樹立し解析した結果、老人斑を伴わず神経細胞死が促進されており、細胞内  $A\beta$ の蓄積が関与する可能性を示した。また、最近  $A\beta$ オリゴマーが直接シナプスに結

いてその誘導促進剤をスクリーニングする為のレポーターアッセイ系を樹立する。これを用いて GRP-78 誘導剤をスクリーニングするとともに、その細胞を用いて APP のプロセッシング、A $\beta$ 産生を解析する。

4. 細胞内 A $\beta$ の局在を明らかにする為に電子顕微鏡を用いた研究を行ってきたが成功しなかった。本年度は再び光学顕微鏡に戻り免疫組織染色によりその局在を推定する。

5. オリゴマーによるシナプス障害機構を明らかにする為に質量分析によるオリゴマー分子種の同定を試みたが、ヒト脳では成功しなかった。本年度は非ステロイド性消炎剤の中からバイオインフォマティクスを用いて A $\beta$ 42 切断阻害活性を有し Notch 切断阻害活性を有しないものを選択し、実際にその化合物を用いて $\gamma$ -セクレターゼ阻害作用を確認する。

#### (倫理面への配慮)

動物実験はすべて研究者所属施設の動物実験倫理委員会の承認の下に行われた。剖検は剖検承諾書をとって行われ、担当した病理医が保存した試料について共同研究を実施した。

### C. 研究結果

1. A $\beta$ と結合し細胞死を誘導する新規物質が得られたので、A $\beta$ -related death-inducing protein (AB-DIP)と命名した。AB-DIP は 776 個のアミノ酸からなり、caspase activation and recruitment domain (CARD)、グルタミンリッチドメイン、核移行シグナルがあり、そ

れ自体カスパーゼ 9 により切断を受け活性型となった。AB-DIP を強発現すると細胞死が誘導され、細胞内・外の A $\beta$ によりその細胞死は増強された。ドミナントネガティブ AB-DIP 及び AB-DIP に対する siRNA はその細胞死を抑制した。

2. 細胞内 A $\beta$ 分解はプロテアソーム阻害剤である MG132 の添加により抑制された。化合物 A を加えるとその分解は有意に促進された。

3. シャペロン誘導剤として見出された GiX は GRP-78 の誘導を引き起こし、小胞体ストレスを緩和した。GiX を添加した細胞では A $\beta$ 産生が抑制された。

4. 免疫組織化学により細胞内 A $\beta$ 陽性細胞を検討したところ、アストロサイトが高頻度に見出され、ニューロンや血管内皮細胞もしばしば陽性所見を示した。A $\beta$ 40 陽性物質は顆粒状で、細胞質に局在した。老人斑近傍では A $\beta$ 42 陽性アストロサイトやニューロンが散見された。

5. NSAID のうち $\gamma$ -セクレターゼ特異的阻害作用を有する候補薬剤 40 種を選択した。その中から A $\beta$ 42 特異的に切断活性を阻害し、Notch の切断に影響を与えない新規コンパウンドの一つを得た。この IC50 は 20 $\mu$ M程度で、sulindac の半分以下であった。

### D. 考察

本研究者らは酸化ストレスやプレセニリン 1 変異により細胞内 A $\beta$ が増加し細胞死を誘導することを見出した。そのメカニズムを解析し、一つは A $\beta$ が p53 プロモーター領域に結合し、直接これを活性化し細胞死を誘導することを明らかにした。

また、A $\beta$ が結合する物質をスクリーニングしヘパラン硫酸プロテオグリカンの一つグリピカン1を見出した。グリピカン1を強発現する細胞にA $\beta$ を添加すると細胞死が誘導された。この系を用いて細胞死を抑止する化合物のスクリーニングを行い、1,000個の中から30個程の候補物質を得た（未発表）。これらについてはin vivoでその作用を確認する必要があり、現在、良いin vivoのモデルを探索しているところである。

本研究はA $\beta$ と結合して細胞死を誘導する神経物質AB-DIPを見出した。AB-DIPには細胞死に係る分子に共通のCARDドメインがあり、核移行シグナルを有した。そのドミナントネガティブフォーム及びsiRNAはA $\beta$ による細胞死を抑制したので、AB-DIPはADにおける細胞死を抑止する新しい標的になると思われる。

一方、細胞内A $\beta$ の分解を促進する薬も有効であると思われる。今回プロテアソーム活性を上げA $\beta$ 分解を促進する化合物Aが得られた。今後、この化合物についてin vivoでの効果を見る必要がある。

細胞内A $\beta$ の局在は未だ確かでない。海外の研究者により multivesicular body、その他の vesicle であることが示されている。今回の光顕による検討ではエンドソーム・リソソーム系、小胞体ゴルジ系であることに矛盾しない結果を得た。今後電顕による検討が必要である。

プレセニリン変異があると小胞体ストレス脆弱性となる。今回 GiX という化合物が小胞体ストレスを緩和し、A $\beta$ 産生を抑制することを見出した。そのメカニズ

ムはまだ良く分っていないが、ADの新しい治療薬となる可能性がある。

A $\beta$ オリゴマーによるシナプス障害の機序解明は重要な課題である。しかし、今のところAD脳からシナプス障害に関与するA $\beta$ 分子種（オリゴマー）の同定はうまく行っていない。

NSAIDの一部はA $\beta$ 42特異的抑制作用があると言われている。今回、バイオインフォマディクスを用いてA $\beta$ 42切断を阻害しNotch切断を阻害しないものを選択し、実際sulindacより優れたNSAIDを一つ見出した。この物質をシードとして更に改変を加えることでA $\beta$ 42特異的切断阻害剤が開発されると期待される。

## E. 結論

1. A $\beta$ と結合し細胞死を誘導する物質AB-DIPを見出した。
2. 細胞内A $\beta$ 分解を促進する化合物Aを得た。
3. 細胞内A $\beta$ の局在が少し分かった。
4. GiXは小胞体ストレスを緩和し、A $\beta$ 産生を抑制した。
5. sulindacより優れたNSAIDを一つ見出した。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 【論文発表】

1. Lakshmana MK, Araki W, Tabira T. A novel death-inducing protein, AB-DIP interacts with amyloid beta protein and mediates its neurotoxicity. FASEB J

(in press)

2. Ohyagi Y, Asahara H, Chui D-H, Tsuruta Y, Sakae N, Miyoshi K, Yamada T, Kikuchi H, Taniwaki T, Murai H, Ikezoe K, Furuya H, Kawarabayashi T, Shoji M, Checler F, Iwaki T, Makifuchi T, Takeda K, Kira J, Tabira T. Intracellular A $\beta$ 42 activates p53 promoter: a pathway to neurodegeneration in Alzheimer's disease. *FASEB J* 18: NIL\_198- NIL\_226, 2004.

3. Watanabe N, Araki W, Chui DH, Makibuchi 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*. 18(9): 1013-5, 2004.

4. 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.

5. Takeda K, Araki W, Akiyama H, Tabira T. Amino-truncated amyloid beta-peptide (A $\beta$ 5-40/42) produced from caspase-cleaved amyloid precursor protein is deposited in Alzheimer's disease brain. *FASEB J* 18: 1755-7, 2004.

6. Tabira T. Molecular basis of Alzheimer's disease: From amyloid hypothesis to treatment in the foreseeable future. *Ger Gerontol* 4: S27-S31, 2004.

7. Hitomi J, Katayama T, Eguchi Y, Kudo T, Taniguchi M, Koyama Y, Ma-

nabe T, Yamagishi S, Bando Y, Imaizumi K, Tsujimoto Y, Tohyama M. Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and A $\beta$ -induced cell death. *J Cell Biol* 165: 347-356, 2004.

#### 【学会発表】

1) 大八木保政 他：神経細胞内 A42 の生理的・病的機能とその治療。第 45 回日本神経学会総会、東京、2004 年 5 月 12 日

2) 三好克枝、大八木保政 他：プレセニリン遺伝子変異の神経細胞死におけるプロテアソーム機能抑制の影響。第 45 回日本神経学会総会、東京、2004 年 5 月 12 日

3) 鶴田裕子、大八木保政 他：アルツハイマー病における細胞内 A $\beta$ 42 の免疫染色法の比較検討。第 45 回日本神経学会総会、東京、2004 年 5 月 12 日

4) Miyoshi, K., Ohyagi, Y., et al.: Familial AD mutant presenilin enhances apoptosis caused by proteasome inhibition and oxidative stress. The 34th Annual Meetings of Society for Neuroscience. San Diego, Oct 23, 2004.

5) Ohyagi, Y., et al.: Intracellular A $\beta$ 42-related neurodegeneration: Search for drugs to degrade cytosolic A $\beta$ 42. The 34th Annual Meetings of Society for Neuroscience. San Diego, Oct 27, 2004.

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

発明者：田平 武、荒木亘、マデパリ・  
ケイ・ラクシュマナ

特許出願人：(財)ヒューマンサイエンス  
振興財団

出願番号：特願 2004-367780

発明の名称：AB-DIP、並びにアルツハイ  
マー病の予防及び治療剤

出願年月日：平成 16 年 12 月 20 日

発明者：大河内正康、武田雅俊  
セル・フリー・Notch 切断分析方法およ  
び薬剤スクリーニング方法

PCT/JP2004/1668

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

AB-DIP の機能解析と神経細胞死抑制

分担研究者 田平 武 国立長寿医療センター 研究所長

研究要旨  $A\beta$ 1-42をベイトとして yeast two hybrid systemにより  $A\beta$  と結合する新規物質を見出し、AB-DIP と命名した。AB-DIP を dominant negative にすることで  $A\beta$ による細胞死は抑制された。さらに、 $A\beta$ 強発現による細胞死は AB-DIP の siRNA で抑制された。以上より、AB-DIP は  $A\beta$ による細胞死を抑止する標的分子になると考えられる。

研究協力者

Madepalli K. Lakshmana

（長寿医療センター研究所外来研究員）

A. 研究目的

$A\beta$ は老人斑に蓄積する他、細胞内にも蓄積し細胞死と関連する所見が得られている。しかし、細胞内  $A\beta$ が細胞死をおこす分子機構は明らかでない。本研究は  $A\beta$  と結合し細胞死を誘導する分子機構を明らかにし、その中から細胞死抑止法を確立することを目的とする。

B. 研究方法

AB-DIP の全長遺伝子をクローニングし、塩基配列を決定、その配列をもとに部分ペプチドに対するポリクローナル抗体を作製した。AB-DIP の mRNA 発現はクローンテック社のヒト組織 RNA 及び脳各部位の RNA を購入し、ノーザンブロット法により調べた。 $A\beta$ と AB-DIP の結合を調べる為に myc ラベルした AB-DIP

及び HA ラベルした  $A\beta$ 1-40 と  $A\beta$ 1-42 を作製し、特異抗体を用いて免疫沈降、ウエスタンブロットを行った。AB-DIP と  $A\beta$ の結合部位を調べる為に各種 deletion mutant を作製し、両者の結合実験を行った。また、AB-DIP に遺伝子変異を挿入し dominant negative クローンを選択した。AB-DIP を強発現した細胞を可視化する為に EGFP を結合した。また、Doxycycline で発現が on になる tet-on AB-DIP 細胞株を樹立した。AB-DIP の siRNA はスタートコドンから 1601-1631 塩基上流の 21 塩基対に対応する 2 本鎖 RNA を作製した。対照としてルシフェラーゼ遺伝子の 153-171 塩基対に対応する RNA 及び非特異的スクランブル RNA を用いた。AB-DIP の局在はペプチド抗体を作製し、免疫組織染色を行った。

C. 研究結果

AB-DIP は 776 個のアミノ酸よりなり、N 末側に caspase activation and recruitment



domain (CARD)、グルタミンリッチドメイン、核移行シグナルを有した。また、配列の中に細胞接着配列 (RGD)、RGD 結合モチーフ (DDM) があり、カスパーゼ切断部位配列 (LEKD) があつた。C 末端側にはショウジョウバエで保存されたドメイン D1、D2 が存在した(図 1)。

```

1  MNNSLN... 56
51  TTMVYV... 100
101 QAVYVA... 150
151  IIPSL... 200
201  AGVSL... 250
251  EMPITV... 300
301  ITPPTGE... 350
351  AVKLEDD... 400
401  AVAGTY... 450
451  QVAEVE... 500
501  LAPGR... 550
551  ... 600
601  SHVTEEM... 650
651  LRQTKK... 700
701  ... 750
751  GAV... 776
  
```

図 1. AB-DIP のアミノ酸配列

Caspase activation and recruitment domain (CARD) はオレンジで、核移行シグナルは青で、RGD-DDM 配列は緑で、カスパーゼ切断配列はアンダーラインで、ショウジョウバエで保存された D1、D2 ドメインはピンクで示す。四角は抗体作製ヘプチドを示す。

AB-DIP 蛋白はウエスタンブロットにより 97KDa のバンドと 62KDa のバンドとして見出された。

AB-DIP の mRNA 発現は全身臓器で見られ、脳の各部位に ubiquitous に発現が見られた(図 2)。

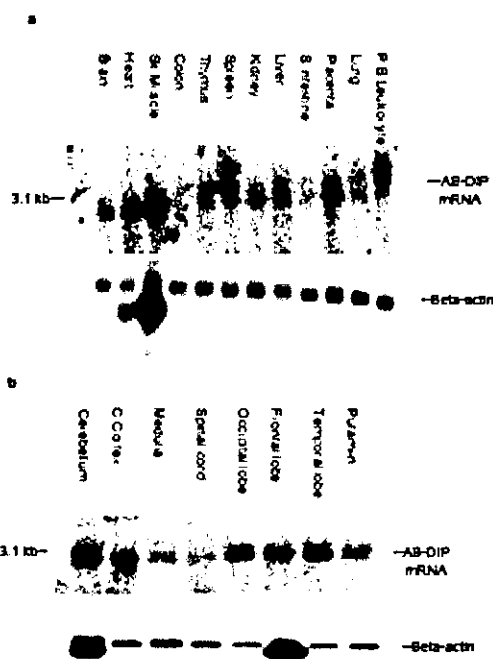


図 2. AB-DIP の mRNA 発現

AB-DIP は全身臓器、脳内各部位に ubiquitous に発現している。

AB-DIP と Aβ の結合を調べる為に免疫沈降-ウエスタンブロットを行った。myc 抗体で免疫沈降し、抗 Aβ 抗体(6E10)でウ

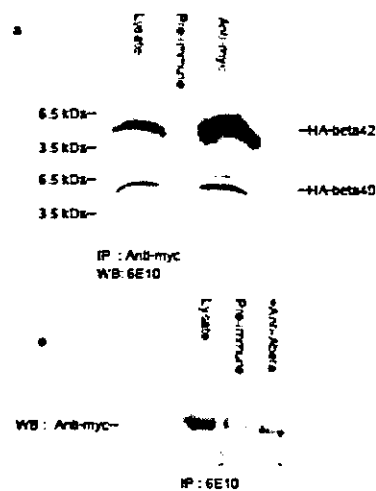


図 3. AB-DIP と Aβ の結合

AB-DIP と Aβ が結合していることを免疫沈降、ウエスタンブロットで調べた。

エスタンプロットを染色するとA $\beta$ 40 及びA $\beta$ 42 が検出された。逆に 6E10 で免疫沈降し myc 抗体で染色すると AB-DIP が検出された(図3)。以上より AB-DIP とA $\beta$ は細胞内で結合していることが確認された。

培養細胞を AB-DIP 抗体で染色すると主として細胞質が染色された。AB-DIP 遺伝子を強発現させた細胞では細胞質とともに核が染色された。AB-DIP の強発現細胞を観察するとそれ自体で細胞死が誘導されることが分かった。その細胞死は p53 を強発現させた細胞とほぼ同等であった。AB-DIP とA $\beta$ 1-42 を共発現すると細胞死はさらに増強された(図4)。

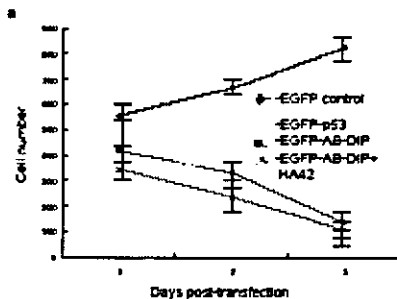


図4. AB-DIP による細胞死

AB-DIP を強発現すると細胞死が観察された。これにA $\beta$ を共発現すると細胞死は増強された。

テトラサイクリン誘導 AB-DIP を安定的に発現する細胞にA $\beta$ 1-40、A $\beta$ 1-42 を 20 $\mu$ Mの濃度で処理すると約 40%の細胞が死滅した。この細胞死は dominant negative AB-DIP を導入した細胞では有意に抑制された(図5-1)。

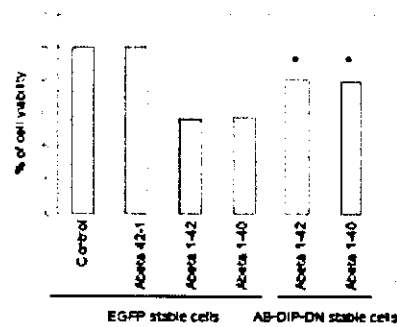


図5-1. AB-DIP による細胞死とその抑制

AB-DIP を安定的に発現する細胞にA $\beta$ 1-40、A $\beta$ 1-42 をかけると細胞死が誘導された。AB-DIP を dominant negative にすると細胞死は抑制された。

次に上記 AB-DIP を発現する細胞に AB-DIP を共発現したところ、アネキシンV陽性細胞が 48 時間後、72 時間後に多数観察された。これに AB-DIP の siRNA を導入すると、そのアポトーシスは有意に抑制された(図5-2)。

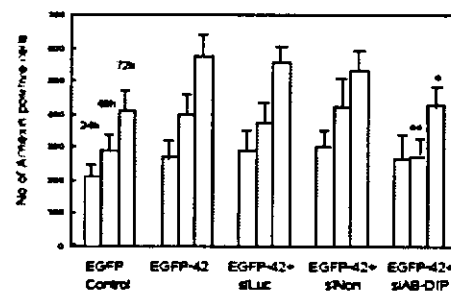


図5-2. AB-DIP とA $\beta$ 1-42 を共発現すると細胞死が誘導された。これに AB-DIP の siRNA を導入すると細胞死が優位に抑制された。ルシフェラーゼの siRNA 及び非特異的 siRNA には抑制効果が見られなかった。

#### D. 考察

昨年度の研究でA $\beta$ 1-42 をベイトとして yeast two hybrid system によりA $\beta$ と結合する蛋白質をスクリーニングし、新規

物質を見出した。この物質は強発現することで細胞死を誘導するので、A $\beta$ -related death-inducing protein (AB-DIP)と命名した。AB-DIP に対する抗体を用いた免疫沈降により AB-DIP が共沈したことから両者は細胞内で結合していると考えられる。AB-DIP はアポトーシス誘導関連物質に共通の CARD ドメインを有し、核移行シグナルを有した。また、それ自体、カスパーゼ切断部位を有し、全長蛋白(97KDa)がカスパーゼにより切断され 62KDa の活性化型になると考えられた。AB-DIP を dominant negative にすると A $\beta$ による細胞死が抑制され、AB-DIP の siRNA によっても A $\beta$ による細胞死が抑制された。従って AB-DIP は A $\beta$ による細胞死に関与しており、これを抑制することで A $\beta$ による細胞死を抑止できると考えられる。Preliminary な結果では AD 脳では AB-DIP は神経細胞に主として見られ、対照と分布及び発現量に大きな違いはなかった。しかし用いた抗体がペプチド抗体であり、現在 GST 融合蛋白を作り抗体作製中である。その抗体ができれば詳細な検討を行う予定である。また、in vivo の意義を明らかにする為にトランスジェニックマウスを作製中である。

#### E. 結論

A $\beta$ と結合し細胞死を誘導する物質 AB-DIP を見出した。AB-DIP を抑制することで A $\beta$ による細胞死が抑制された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 【論文発表】

1. Lakshmana MK, Araki W, Tabira T. A novel death-inducing protein, AB-DIP interacts with amyloid beta protein and mediates its neurotoxicity. FASEB J (in press)

##### 【学会発表】

1. 田平 武. シンポジウム「アルツハイマー病の治療： A $\beta$ ワクチン」第 45 回日本神経学会総会 平成 16 年 5 月 12 日 東京
2. 田平 武. 市民公開シンポジウム II いきいきした老後をめざして「アルツハイマーを予防・治療するワクチンの開発」第 4 6 回日本老年医学会学術集会・総会 平成 16 年 6 月 18 日 千葉
3. 田平 武. 特別講演「高齢者医療の現状と将来」第 54 回日本病院学会 平成 16 年 7 月 2 日 横浜
4. Takashi Kudo, Daisuke Kanayama, Kazunori Imaizumi, Taichi Katayama, Masayasu Okochi, Takeshi Tabira, Masaya Tohyama, Masatoshi Takeda. ER stress is entangled with Abeta pathology. The 9th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders, July 18, 2004. Philadelphia
5. Takeshi Tabira, Hideo Hara. Oral Abeta vaccine is safe and effective. The 9th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders, July 20, 2004. Philadelphia
6. Shinya Saito, Kiyoko Murayama, Noriko Takahashi, Takeshi Tabira, Wataru Araki. Characteristics of the protein expression of

APH-1. The 9th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders, July 21, 2004. Philadelphia

7. Takeshi Tabira. Beta-amyloid vaccination and Alzheimer's disease. Oct. 1 2004 7th International Congress of Neuroimmunology, Venice, Italy

8. 田平 武. ワクチン療法の展望. 第19回大学と科学公開シンポジウム アルツハイマー病－治療の可能性を探る  
平成16年10月31日 福岡

9. Takeshi Tabira. Novel A-beta immunization approaches. Alzheimer's and Parkinson's Diseases: Insights, Progress and Perspectives. 7th International conference. March 11, 2005, Sorrento

G. 知的所有権の取得状況

発明者：田平 武、荒木亘、マデパリ・ケイ・ラクシュマナ

特許出願人：(財)ヒューマンサイエンス振興財団

出願番号：特願 2004-367780

発明の名称：AB-DIP、並びにアルツハイマー病の予防及び治療剤

出願年月日：平成16年12月20日

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

細胞内 A $\beta$ 分解促進と家族性アルツハイマー病の神経細胞死抑止

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、アルツハイマー病における細胞内A $\beta$ 42による神経細胞死の抑止法開発のため、細胞内に蓄積するA $\beta$ 42の分解を促進する薬剤を探索している。その方法として、培養細胞内に傾向ラベルしたA $\beta$ 40を蓄積させ、その分解過程を定量的に評価した。A $\beta$ 分解促進作用を有する薬剤の一つとして、化合物Aを見出した。一方、家族性アルツハイマー病における変異プレセニリン1のアポトーシス促進作用を抑止するために、その特異的アポトーシスプロセスを解析した。プロセス特異的カスパーシス活性を測定したところ、変異型プレセニリン1はカスパーシス9の活性化を促進し、ミトコンドリア系アポトーシスを促進する可能性が考えられた。従って、カスパーシス9の抑止は家族性アルツハイマー病の特異的治療薬となる可能性がある。

A. 研究目的

アルツハイマー病(AD)における特異的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開発を目的とする。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ている。加齢にともなう酸化ストレスの過剰により、神経細胞内A $\beta$ 42の蓄積が生じ、その一部が核に移行してp53 mRNA発現を促進することで、アポトーシスを誘導する(図1)。この細胞内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有力である。昨年度は細胞内A $\beta$ 分解を定量的にアッセイする方法を開発し、本年度はい

くつかの薬剤を検討した。

一方、家族性アルツハイマー病(FAD)では、アポトーシス経路を促進することが知られているが、その分子メカニズムの詳細は不明である。ニューロンは、加齢とともに酸化ストレスの蓄積や細胞内の蛋白分解酵素であるプロテアソームの機能低下により、アポトーシスが促進する。従って、FADに関連する遺伝子変異、特に変異型プレセニリン(PS)1により、そのようなアポトーシス促進がニューロンの脱落にかかわっている可能性がある。その特異的プロセスを同定・解析することにより、FAD治療につながるアポトーシス抑止法の可能性を探る。

B. 研究方法

- 1) 人工的にヒト神経芽細胞腫 (SH-SY5Y) の細胞質内に A $\beta$  を蓄積させ、それが経時的に分解していく過程を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。
- 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) プロテアソーム抑制剤である MG132 処理と、それに対してプロテアソーム促進作用を有する可能性のある化合物を添加することで、細胞内 A $\beta$ 40 分解能に変化をきたすか、蛍光強度測定により、定量的に評価した。
- 4) SH-SY5Y 細胞に、ヒトの野生型 PS1 および変異型 PS1 (I143T、G384A) を定常的に発現させ、その細胞を MG132 で処理した。
- 5) 細胞生存率を MTT アッセイ、カスパーズ 3/7、4、8、9 活性を特異基質分解量により測定した。

### 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。プロテアソーム抑制剤である MG132 を添加するとその強度減少が低下し、化合物 A を添加すると、その

MG132 の作用はブロックされた(図 2A/B)。このことは、化合物 A のような薬剤は、AD 脳の神経細胞内に病的に蓄積した A $\beta$ 42 の分解を回復し、神経細胞のアポトーシスリスクを低下させる可能性を示唆する。

次に、PS1 トランスフェクト細胞では、MG132 が誘導するアポトーシス死において、MTT アッセイでは生存率に差はなかったものの、カスパーズ 3/7 活性は変異 PS1 細胞株において、活性の軽度上昇を認めた(データ未提示)。さらに、細胞内カスパーズ活性においてはカスパーズ 9 が変異 PS1 細胞で選択的に上昇しており(図 3)、このことから PS1 遺伝子変異のミトコンドリア系アポトーシスプロセス促進作用が示唆された(図 4)。以上のことは、カスパーズ 9 活性の選択的抑制が PS1 変異による FAD 治療の一つとなりうる可能性を示唆した。

### D. 考察

我々は昨年度、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・定量する実験システムを確立した。正常条件下では、プロテアソーム分解促進作用の評価が困難であるため、MG132 添加により人為的にプロテアソーム機能を抑制し、その状態を改善するような薬剤の効果を検討した。化合物 A はプロテアソーム機能を促進することが最近示唆されている薬剤であり、その効果を調べたところ、予想通り MG132 の作用をブロックした。このことから、このような薬剤では、加齢とともに神経細胞内に蓄積する A $\beta$ 42 の分解を促進し、p53 依存性アポトーシスによ

る神経細胞の脱落を抑止する効果が期待される。今後、ウェスタンブロット解析による作用確認や、Aβ42 導入による神経細胞死の抑止効果を確認していく。また、他に類似作用を有する薬剤の検討も行っていく。

本年度は、異なったアプローチの一つとして、家族性 AD(FAD)の神経細胞死に注目した。PS1 の遺伝子変異は多くの若年性 FAD の原因であり、その病的機序として Aβ42 産生増加や ER ストレス/アポトーシス感受性の亢進などが提唱されているが、詳細は不明である。アポトーシス感受性が亢進しているとすれば、その経路の特異的抑止法を開発することで、FAD の神経細胞死の抑止や孤発性 AD の治療にも応用できる可能性がある。我々は、野生型/変異型 PS1 トランスフェクト細胞をモデルとして、MG132 処理後に各種カスパーシ活性の測定をし、PS1 の FAD 変異がミトコンドリア系のカスパーシ 9 活性を選択的に亢進させる作用を有する結果を得た。最近、PS1 はミトコンドリアで  $\gamma$ -secretase complex を構成していること、いくつかのミトコンドリア局在 proapoptosis 分子と関連していることが報告されており、これまであまり注目されていなかったミトコンドリア系 apoptosis に PS1 変異の病的作用が関係している可能性が示唆された(図 4)。今後は、MG132 以外にも酸化ストレス、ER ストレス、ミトコンドリア毒性を誘導する薬剤等で同様の傾向を認めるか、またそのような作用は Aβ産生を介した作用か、なにかの直接作用か検討が必要である。仮に、カスパーシ 9 活性の選択的亢進が PS1 変異の病的な影響とすると、カス

パーシ 9 活性の抑制は FAD における神経細胞死に対する特異的治療の一つとなる可能性が考えられる。

## E. 結論

AD における細胞内 Aβ42/p53 誘導性アポトーシス経路を抑止する治療薬の検討を行った。また、PS1 変異 FAD における神経細胞死の特異的プロセスの解析を行った。プロテアソーム促進薬は細胞内 Aβ42 分解を促進し、ニューロン死のリスクを低下させる可能性を示唆した。また、PS1 変異はミトコンドリア系アポトーシスプロセスを選択的に促進し、カスパーシ 9 の選択的抑制は FAD 治療薬の一つとなる可能性を示唆した。

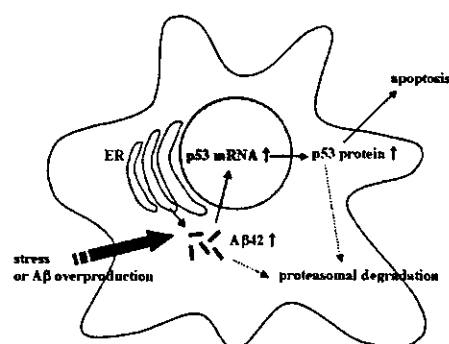


図 1. 細胞内 Aβ42 誘導 p53 依存性アポトーシスの作業仮説。加齢による酸化ストレスや過剰産生/分解低下により神経細胞質内 Aβ42 蓄積が生じ、その一部は核へ移行、p53 mRNA 発現増強を介して、神経細胞のアポトーシスを促進する。プロテアソーム分解を促進することで、そのプロセス抑制が期待される。

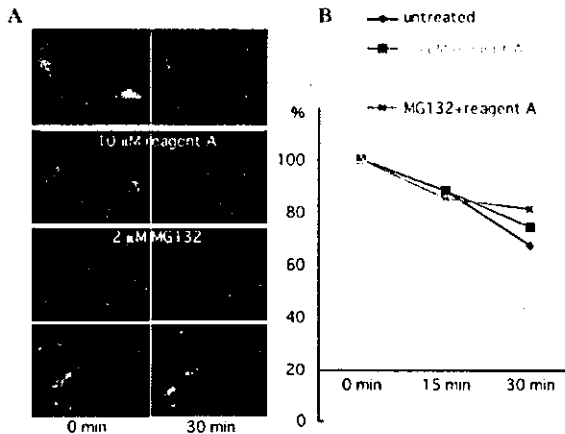


図2. SH-SY5Y に蛍光ラベル Aβ40 導入後の経時的な蛍光強度の減少における MG132 の分解抑制作用と化合物 A によるそのブロック。A) 共焦点レーザー顕微鏡による観察。B) 局所における平均蛍光強度の変化。

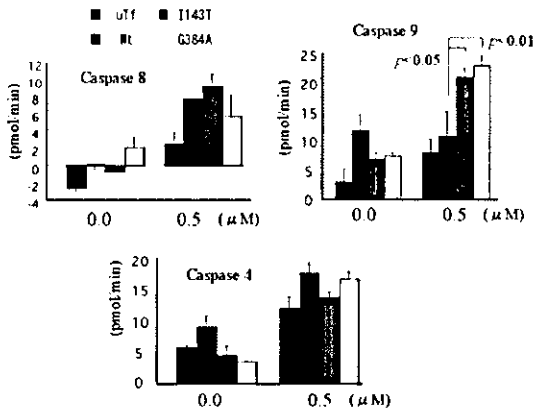


図3. MG132 処理(0, 0.5 μM) 24 時間後のカスパーゼ活性。FAD 変異型 PS1 細胞では、野生型 PS1 細胞に比べて、カスパーゼ 9 の有意な上昇を認めた。

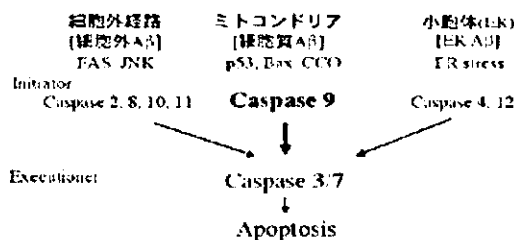


図4. PS1 変異によるアポトーシス促進作用の機序。MG132 によって誘導されるアポトーシスにおいては、変異 PS1 のカスパーゼ活性促進効果はカスパーゼ 9 に見られることから、ミトコンドリア系を介するアポトーシス経路が重要と考えられる。

## F. 研究発表

### 【論文発表】

- 1) Ohyaig Y, Asahara H, Chui D-H, Tsuruta Y, Sakae N, Miyoshi K, Yamada T, Kikuchi H, Taniwaki T, Murai H, Ikezoe K, Furuya H, Kawarabayashi T, Shoji M, Checler F, Iwaki T, Makifuchi T, Takeda K, Kira J, Tabira T: Intracellular Aβ42 activates p53 promoter: a pathway to neurodegeneration in Alzheimer's disease. *FASEB J* 18: NIL\_198-NIL\_226, 2004
- 2) Furuya H, Shinnoh N, Ohyaig Y, Ikezoe K, Kikuchi H, Osoegawa M, Fukumaki Y, Nakabeppu Y, Hayashi T, Kira J: Some flavonoids and DHEA-S prevent the cis-effect of expanded CTG repeats in the stable PC12 cell transformant. *Biochem. Pharmacol.* 69: 503-516, 2005
- 3) Furuya H, Yamada T, Ohyaig Y, Miyoshi T, Fujii N, Kira J: Neurological signs and symptoms in patients with chronic PCB intoxication (*Yusho* accident) for more than 36 years. *J. Dermatol. Sci.*, in press, 2005
- 4) Kawamura N, Ohyaig Y, Kawajiri M, Yoshiura T, Mihara F, Furuya H, Kira J: Serial diffusion-weighted MRI in a case of Wilson's disease with acute onset



hemichorea. J. Neurol. 251: 1413-1414, 2004

- 5) 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

G. 知的所有権の取得状況  
特になし

【学会発表】

- 1) 大八木保政 他：神経細胞内 A $\beta$ 42 の生理的・病的機能とその治療。第 45 回日本神経学会総会、東京、2004 年 5 月 12 日
- 2) 三好克枝、大八木保政 他：プレセニリン遺伝子変異の神経細胞死におけるプロテアソーム機能抑制の影響。第 45 回日本神経学会総会、東京、2004 年 5 月 12 日
- 3) 鶴田裕子、大八木保政 他：アルツハイマー病における細胞内 A $\beta$ 42 の免疫染色法の比較検討。第 45 回日本神経学会総会、東京、2004 年 5 月 12 日
- 4) Miyoshi, K., Ohyagi, Y., et al.: Familial AD mutant presenilin enhances apoptosis caused by proteasome inhibition and oxidative stress. The 34th Annual Meetings of Society for Neuroscience. San Diego, Oct 23, 2004.
- 5) Ohyagi, Y., et al.: Intracellular A $\beta$ 42-related neurodegeneration: Search for drugs to degrade cytosolic A $\beta$ 42. The 34th Annual Meetings of Society for Neuroscience. San Diego, Oct 27, 2004.

厚生科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）

分担研究報告書

小胞体ストレスによるアミロイド前駆体蛋白の局在変化について

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：我々は以前、presenilin 1 の変異体は神経細胞の小胞体(ER)ストレス反応を低下させることを報告した。アミロイドカスケード仮説の観点から、ER ストレスがアミロイドβ蛋白(Aβ)の産生に影響するのか興味深い問題である。神経細胞に ER ストレスを負荷すると、Aβ 40 および Aβ 42 の産生は低下することが明らかになった。免疫組織化学および細胞小器官分画による検討から、ER ストレスはアミロイド前駆体蛋白(APP)の局在を late compartment から early compartment に異動させ、γ切断の場から APP を離すことで、Aβ 産生を低下させるという機序が想定された。ER ストレス下での APP と ER シャペロンである BiP との結合は、増強しており、BiP と結合した APP が ER 等の early compartment に戻されると考えられた。ER ストレス反応が障害された細胞では、この機序が働かず、相対的に Aβ の蓄積が上昇すると考えられた。今回の結果は、ER ストレスによるシャペロン誘導が、Aβ 産生の調節機構のひとつとして働くことを示唆するものである。

A. 研究目的

アルツハイマー病(AD)で一番はじめに報告された遺伝子変異はアミロイド前駆体蛋白(APP)の変異であるが、これは老人斑の構成分子であるアミロイドβ蛋白(Aβ)の産生を増加させることが示されている。さらに、AD の遺伝子変異として presenilin 1 (PS1) および 2 (PS2)の変異が報告され、これらも凝集性の高い Aβ 42 の産生を増強することが示されている。以上のような事実を踏まえ、Aβ の蓄積を AD の基幹病理過程であり、神経原線維変化の構成分子であるタウのリン酸化等も Aβ 病理の結果であるとするアミロイドカスケード仮説が広く受け入れられている。(Hardy, J., and Selkoe, D. J. (2002) *Science* 297, 353-356) 近年、APP は β-secretase, BACE1, と γ-secretase で切断

されることで Aβ が産生することが明らかになり、γ切断 は PS1 を中心とした γ complex によって行われることも明らかになった。(Haass, C. (2004) *EMBO J.* 23, 483-488) また、PS1 は小胞体 (ER) に多く局在するとされるが、γ complex は細胞膜や endosome などに存在し、実際のγ切断を行うことが明らかになってきている。(Cupers, P., Bentahir, M., Craessaerts, K., Orlans, I., Vanderstichele, H., Saftig, P., De Strooper, B., and Annaert, W. (2001) *J. Cell Biol.* 154, 731-740)(Annaert, W. G., Levesque, L., Craessaerts, K., Dierinck, I., Snellings, G., Westaway, D., George-Hyslop, P. S., Cordell, B., Fraser, P., and De Strooper, B. (1999) *J. Cell Biol.* 147, 277-294)

以前我々は、PS1 の変異体が ER ストレス 検知分子の活性化を抑制し、変異神経細胞が ER ストレスに脆弱となることを報告した。(Katayama, T., Imaizumi, K., Sato, N., Miyoshi, K., Kudo, T., Hitomi, J., Morihara, T., Yoneda, T., Gomi, F., Mori, Y., Nakano, Y., Takeda, J., Tsuda, T., Itoyama, Y., Murayama, O., Takashima, A., George-Hyslop, P. S., Takeda, M., and Tohyama, M. (1999) *Nat. Cell Biol.* 8, 479-485) (Katayama, T., Imaizumi, K., Honda, A., Yoneda, T., Kudo, T., Takeda, M., Mori, K., Rozmahel, R., Fraser, P., George-Hyslop, P. S., and Tohyama, M. (2001) *J Biol Chem.* 276, 43446-43454) (Yasuda, Y., Kudo, T., Katayama, T., Imaizumi, K., Yatera, M., Okochi, M., Yamamori, H., Matsumoto, N., Kida, T., Fukumori, A., Okumura, M., Tohyama, M., and Takeda, M. (2002) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296, 313-318) (Kudo, T., Katayama, T., Imaizumi, K., Yasuda, Y., Yatera, M., Okochi, M., Tohyama, M., and Takeda, M. (2002) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 977, 349-355) また、我々は、老齢動物に脳虚血を負荷する実験で、孤発性 AD の危険因子である加齢により ER ストレス反応が障害されることを示している (投稿中)。これらの事実から、小胞体ストレス反応は家族性、孤発性を問わず、AD の病理過程に関与していることが示唆される。したがって、本研究では ER ストレス反応と A $\beta$  産生、即ち APP 代謝との関係を明らかにした。

## B. 研究方法

Cell Culture and Cell Lines - SH-SY5Y

にスウェーデン型変異 APP670/671 を導入し SY5Y/swAPP を構築した。HEK293 に V5 でタグした nicastrin を導入し 293/Nct-V5 を構築した。胎生 14.5 日の PS1/PS2<sup>+</sup> マウスの胎児より PS ノックアウト線維が細胞を調整した。IRE1 遺伝子のキナーゼドメインを欠失させて SY5Y/swAPP に導入し SY5Y/swAPP/ $\Delta$ IRE1 を構築した。このドミナントネガティブ細胞では BiP の誘導が抑制され、ER ストレスに対する脆弱性を示した。

ER ストレス-ER ストレスは、70-80%コンフルエントな細胞に負荷した。ER ストレス負荷前に、必ず 1 時間以上新しい培地に置き換えた。ER ストレスは各濃度の thapsigargin と tunicamycin を 24 時間負荷した。

免疫沈降とウエスタン法- SY5Y/swAPP の培地 10 ml を 2,500 rpm で 5 分間遠心した。15  $\mu$ l の protein G sepharose (Gibco)、5  $\mu$ l の 4G8 (抗 A $\beta$  抗体)、10  $\mu$ l の 1 M Tris-HCl、8  $\mu$ l の 0.5 M EDTA、8  $\mu$ l の protease inhibitor cocktail (Sigma) を 8 ml の上清に加え、18 時間 4°C で反応させた。RIPA でビーズをよく洗浄の後、sample buffer と煮沸し、6E10 (抗 A $\beta$  抗体) によるウエスタン法に供した。

免疫組織化学 - 細胞は 4% paraformaldehyde で固定し、0.5% tritonX-100 で permeabilizing した。細胞は抗 APP 抗体 22C11 と抗 KDEL 抗体や GM130 と二重染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

細胞小器官分画・細胞を homogenizing buffer (10 mM Triethanolamine, 10 mM acetic acid, 250 mM sucrose, 1 mM EDTA,

1 mM DTT, and protease inhibitor cocktail)でホモジュナイズし、9,500 rpm, 10 min, 4 C で遠心し、上清を得る。Nycodenz gradient を用い、上清を遠心して細胞小器官分画を得る (Hammond, C., and Helenius, A. (1994) *J. Cell Biol.* 126, 41-52)( Rickwood, D., Ford, T., and Graham, J. (1982) *Anal. Biochem.* 123, 23-31 )。各分画は、抗 calnexin (ER のマーカー) 抗体や GM130 (ゴルジのマーカー) などを用いたウエスタン法で確認した。結合実験・SY5Y/swAPP を 1 % Nonidet P-40 lysis buffer でホモジュナイズし、抗 APP 抗体と抗 KDEL 抗体を用いた相互免疫沈降を行った。

Blue Native gel 電気泳動 (BN-PAGE)・泳動 1 日前に 5-13.5% polyacrylamide ゲルを作成した。細胞を 1% CHAPSO, 500 mM  $\epsilon$ -amino caproic acid, 20 mM Hepes (pH 7.4), 2 mM EDTA, and 10% glycerol でライシスし、100,000 x g で 1 時間遠心し、上清を BN-PAGE に供した (Schagger, H., Cramer, W.A., and von Jagow, G. (1994) *Anal. Biochem.* 217, 220-230)。

(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

thapsigargin and tunicamycin で処理した SY5Y/swAPP の培地の免疫沈降によると、ER ストレスにより A $\beta$  40 あるいは A $\beta$  42 の産生は低下した。

近年、 $\gamma$ -secretase 活性は PS1, nicastrin, Aph-1, Pen-2 で構成される  $\gamma$  complex に存在することが明らかになっている (De Strooper, B. (2003) *Neuron* 38, 9-12)。故

そこで、ER ストレスがこの  $\gamma$  complex に及ぼす影響について検討した。293/Nct-V5 に ER ストレスを与え、BN/PAGE をウエスタン法で検討したところ、 $\gamma$  complex 形成は ER ストレスによっても変化せず、 $\gamma$ -secretase 活性は ER ストレスにより変化しないことが示唆された。

SY5Y/swAPP を用いた免疫組織化学的検討では、APP は通常では細胞膜をなどの late compartment に存在するが、ER ストレスにより APP の局在が ER やシスゴルジにシフトし、それらのマーカーと共染された。この APP の ER ストレスによる early compartment へのシフトは細胞小器官分画によっても確認された。

この ER ストレスによる APP の局在変化は、ドミナントネガティブの SY5Y/swAPP/ $\Delta$ IRE1 どうなるのか。SY5Y/swAPP/ $\Delta$ IRE1 に ER ストレスを与え、分泌される A $\beta$  を免疫沈降法で検討すると、野生型 IRE1 細胞でみられる A $\beta$  産生の低下が観察されなかった。さらに、細胞小器官分画による検討では、野生型細胞にみられる APP の ER ストレスによる early compartment へのシフトも、ドミナントネガティブ細胞では観察されなかった。

ER ストレス下では、BiP が unfolded 蛋白に結合し、その KDEL を介して、ER への逆行輸送が活性化される (Yamamoto, K., Fujii, R., Toyofuku, Y., Saito, T., Koseki, H., Hsu, V.W., and Aoe T. (2001) *EMBO J.* 20, 3082-3091)。そこで、ER ストレスにより BiP が APP と結合するかを検討したところ、ER ストレスにより APP に結合する BiP が増加することが示された。