

ES細胞から神経細胞への分化誘導法には、胚様体(embryoid body)を形成する方法、骨髄間質細胞(PA6)と共培養する方法、アストロサイトの条件培地(ACM)中で浮遊培養することにより、神経幹細胞を含むneural stem sphereを誘導する方法がある。

図2 ES細胞から神経細胞への分化誘導

ちおよそ1/4がドパミン細胞に分化する⁹⁾。また、骨髄間質細胞の一種であるPA6と共培養することにより胚様体の形成を経ずに神経細胞を分化させる方法も報告されている⁹⁾。最近、さらに効率のよい方法として、グリア細胞の条件培地を使用する方法が開発された¹⁰⁾。この方法では、未分化ES細胞のコロニーを拾い上げて、マウスまたはラット胎仔脳から採取したアストロサイトの条件培地中に入れ浮遊状態で培養することにより、神経幹細胞を大量に含む球状の細胞塊(neural stem sphere)を形成する。その後、このneural stem sphereを付着させると神経幹細胞のほとんど(98%)が神経細胞に分化し、そのうち最大70%をドパミン細胞に誘導することが可能である(図2, 3)。

3. モデルサルへの移植

治療実験には適切なモデル動物が必要となる。カンクイサルに、黒質のドパミン細胞を選択的に破壊する神経毒である1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP)を慢性的に投与することにより、振戦、無動・寡動、筋強剛、動作緩慢など、ヒトのパーキンソン病と同様の運動症状を示すモデル動物を作製することができる。私たちは、このモデルサルに、霊長類ES細胞由来の神経幹細胞を移植してその効果と安全性を検証する実験を行っている。まず、グリア細胞の条件培地を使用してneural stem sphereを形成する方法によりカンクイサルの



Nestin(緑)およびMAP2(赤)抗体による蛍光染色。付着させたneural stem sphere(左)周辺の神経幹細胞から神経細胞が分化してくる。

図3 カンクイサルES細胞から分化した神経細胞(→巻頭Color Gravure参照)

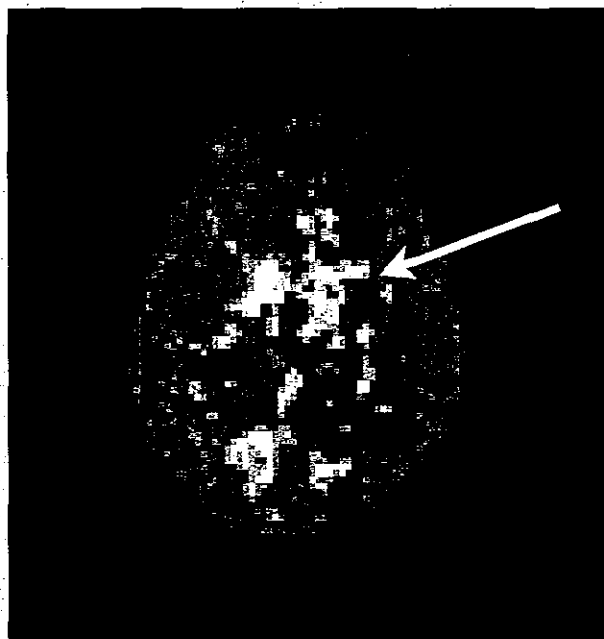
ES細胞から神経幹細胞を分化誘導した。この方法では、FACS (fluorescence activated cell sorter) や磁気ビーズによる分離を行わなくても、未分化なES細胞やフィーダー細胞の混入がほとんどない神経幹細胞を大量に調整できる。 $10^6 \sim 10^7$ の神経幹細胞をMPTPサルの片側の被殻へ移植した。移植前後のPETによる解析の結果、ドパミンの前駆物質である $[\beta\text{-}^{11}\text{C}]$ L-dopaとドパミントランスポーターのリガンドである β -CFTの取り込みの増加を認めた(図4)。さらに、メトアンフェタミン投与により移植側の被殻でドパミンの放出が促進されることが、ドパミン受容体のリガンドである ^{11}C -raclopride結合能の低下として間接的に示された。これらのことから、移植側の被殻においてドパミン機能が回復したことが明らかとなった。移植3ヵ月後の脳組織切片では、移植側の被殻に移植細胞(宿主細胞と区別するためGFP遺伝子を導入してある)由来のドパミン神経細胞が観察された。ヒトの胎児脳細胞移植の臨床試験と同様に運動障害の改善の程度は軽度であったが、不随意運動は認めていない。

今後の課題

現在、パーキンソン病の細胞移植のほとんどは線条体に対して行われている。厳密に正常の状態に修復することを目指すのであれば、黒質緻密部にドパミン神経細胞を移植して線条体までの投射線維も元通りに再生させること

が必要となる。しかし、黒質緻密部のドパミン神経細胞は均一ではないし、投射の局在まで含めて再構築することは困難であろう。仮に黒質緻密部のドパミン神経細胞と同じ性質の細胞を分化誘導できたとしても、それらの細胞を移植した場合にはパーキンソン病的過程に巻き込まれて再び変性してしまう可能性も考えられる。当面は、線条体におけるドパミンの補充が主な目標となるが、その場合にはウイルスベクターにより線条体の細胞にドパミン合成系の酵素遺伝子を導入して、直

接、線条体内でドパミンの合成を行う遺伝子治療との優劣を比較検討する必要がある¹⁴⁾。細胞移植では、ドパミンの補充以外に神経栄養因子やサイトカインの分泌などによる神経保護効果も期待したい。また、黒質ドパミン神経の変性ではなく、線条体の細胞の脱落によりパーキンソン病と同様の症状を示すパーキンソン症候群にも適応があるかもしれない。その場合、移植するのは、ドパミン神経細胞ではなくGABAを伝達物質とする神経細胞である。さらに、うつ状態、痴呆など黒質



選択的神経毒であるMPTPを慢性投与して作製したパーキンソン病モデルサルの片側の被殻に、カニクイサルES細胞由来の神経幹細胞を移植した。4週間後の $[\beta\text{-}^{11}\text{C}]$ L-dopaによるPET画像を示す。移植側で $[\beta\text{-}^{11}\text{C}]$ L-dopaの取り込みの増加が認められる(矢印)。

図4 移植4週間後のPET画像(→巻頭Color Gravure参照)

線条体系以外の障害に対する治療も考慮しなくてはならない¹²⁾。

ES細胞では、奇形腫の発生を防ぐ技術開発が必要になる。未分化な細胞を確実に排除する選択方法や、万一、奇形腫が発生したときに機能させる自殺遺伝子の導入などが検討されている。胎児脳細胞移植の知見から拒絶反応は比較的軽度と考えられているので、体細胞核移植したES細胞をあえて使用しなくてもよいかもしれない。患者自身の体細胞核を導入した場合、正常ヒト由来のドーパミン神経細胞よりもパーキンソン病の変性機序に侵されやすい可能性も考えられる。

日本国内でもヒトのES細胞が樹立され、パーキンソン病の移植治療に対する期待が高まっている。今後、サルモデルを使用してさらに検討を続けたい。

謝 辞

本稿で紹介したMPTPサルの実験は、自治医科大学神経内科(永田三保子, 滝野直美, 奈良優子, 古寺美加, 中野今治), 横浜市立大学生化学I(中山 孝, 井上順雄), 浜松ホトニクス(垣内岳春, 福本 大, 原田典弘, 西

山新吾, 塚田秀夫), 筑波霊長類センター(小野文子, 土田順子, 寺尾恵治), 田辺製薬先端医学研究所(鈴木 豊, 小西奈依, 近藤 靖, 仁藤新治)との共同研究で行われたもので、ここに感謝致します。

●文 献

- 1) Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, et al: Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in *PINK1*. *Science* **304**: 1158-1160, 2004
- 2) Piccini P, Brooks DJ, Bjorklund A, et al: Dopamine release from nigral transplants visualized *in vivo* in a Parkinson's patient. *Nat Neurosci* **2**: 1137-1140, 1999
- 3) Freed CR, Greene PE, Breeze RE, et al: Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med* **344**: 710-719, 2001
- 4) Olanow CW, Goetz CG, Kordower JH, et al: A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease. *Ann Neurol* **54**: 403-414, 2003
- 5) Gordon PH, Yu Q, Qualls C, et al: Reaction time and movement time after embryonic cell implantation in Parkinson disease. *Arch Neurol* **61**: 858-861, 2004
- 6) Freed CR, Breeze RE, Fahn S, et al:

Preoperative response to levodopa is the best predictor of transplant outcome. *Ann Neurol* **55**: 896; author reply 896-897, 2004

- 7) Bjorklund LM, Sanchez-Pernaute R, Chung S, et al: Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 2344-2349, 2002
- 8) Lee SH, Lumelsky N, Studer L, et al: Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* **18**: 675-679, 2000
- 9) Kawasaki H, Suemori H, Mizuseki K, et al: Generation of dopaminergic neurons and pigmented epithelia from primate ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 1580-1585, 2002
- 10) Nakayama T, Momoki-Soga T, Yamaguchi K, et al: Efficient production of neural stem cells and neurons from embryonic stem cells. *Neuroreport* **15**: 487-491, 2004
- 11) Muramatsu S, Wang L, Ikeguchi K, et al: Adeno-associated viral vectors for Parkinson's disease. *Int Rev Neurobiol* **55**: 205-222, 2003
- 12) Lang AE, Obeso JA: Time to move beyond nigrostriatal dopamine deficiency in Parkinson's disease. *Ann Neurol* **55**: 761-765, 2004

日本臨牀 第62巻・第9号（平成16年9月号）別刷

特集：パーキンソン病

遺伝子治療

村松 慎一

■ 文 献

- 1) Piccini P, et al: Dopamine release from nigral transplants visualized in vivo in a Parkinson's patient. *Nat Neurosci* 2(12): 1137-1140, 1999.
- 2) Freed CR, et al: Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med* 344: 710-719, 2001.
- 3) Olanow CW, et al: A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 54: 403-414, 2003.
- 4) Itakura T, et al: Autotransplantation of superior cervical ganglion into the brain. A possible therapy for Parkinson's disease. *J Neurosurg* 68(6): 955-959, 1988.
- 5) Date I, et al: Cografting with polymer-encapsulated human nerve growth factor-secreting cells and chromaffin cell survival and behavioral recover in hemiparkinsonian rats. *J Neurosurg* 84(6): 1006-1012, 1996.
- 6) Nagata M, et al: Efficient gene transfer of a simian immunodeficiency viral vector into cardiomyocytes derived from primate embryonic stem cells. *J Gene Med* 5: 921-928, 2003.
- 7) Martin G: Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 7634-7638, 1981.
- 8) Evans MJ, Kaufmann MH: Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292: 154-156, 1981.
- 9) Thomson JA: Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282: 1145-1147, 1998.
- 10) Lee SH, et al: Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 18: 675-679, 2000.
- 11) Kawasaki H, et al: Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron* 28: 31-40, 2000.
- 12) Nakayama T, et al: Efficient production of neural stem cells and neurons from embryonic stem cells. *Neuroreport* 15(3): 487-491, 2004.
- 13) Freed CR: Will embryonic stem cells be a useful source of dopamine neurons for transplantation into patients with Parkinson's disease? *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 1755-1757, 2002.
- 14) Kim JH, et al: Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* 418(6893): 50-56, 2002.
- 15) Hwang WS, et al: Evidence of pluripotent human embryonic stem cell line derived from a cloned blastocyst. *Science*, Epub 2004 Feb 12.

遺伝子治療

村松 慎一

Gene therapy for Parkinson's disease

Shin-ichi Muramatsu

Division of Neurology, Department of Medicine, Jichi Medical School

Abstract

Recent advances in gene transfer methods, especially development of a high titer recombinant adeno-associated viral (AAV) vector, are making gene therapy for Parkinson's disease (PD) a feasible therapeutic option in the clinical arena. Efficient and long-term expression of genes for dopamine (DA)-synthesizing enzymes in the striatum restored local DA production and allowed behavioral recovery in animal models of PD. Moreover, sustained expression of a glial cell line-derived neurotrophic factor gene in the striatum rescued nigral neurons and led to functional recovery in a rat model of PD, even when treatment was delayed until after the onset of progressive degeneration. A clinical trial to evaluate the efficacy of subthalamic transduction to produce inhibitory transmitters is underway.

Key words: Parkinson's disease, gene therapy, adeno-associated virus, dopamine

はじめに

遺伝子治療や細胞移植などの先端医学の研究対象として、パーキンソン病は多くの中枢神経疾患の中でも第一にあげられることが多い。その理由としては、①線条体に投射する中脳黒質緻密部のドーパミン細胞の変性が主な病変であり、脳の広範な領域が障害されるアルツハイマー病などの疾患に比べて目標を絞れること、②胎児脳細胞の移植、淡蒼球あるいは視床の破壊、視床下核の電気刺激などの定位脳手術が既に臨床応用され手技が確立していること、③線条体は解剖学的に他の脳組織から区別しやすくアプローチしやすいこと、④黒質線条体路を選

択的に傷害する神経毒を使用することにより、運動障害を呈するモデル動物を作製し、治療効果と安全性を検証する前臨床試験ができること、などがある。最近の遺伝子導入技術の進歩、特に高力価アデノ随伴ウイルス (adeno-associated virus: AAV) ベクターの開発により、霊長類の脳内の神経細胞に効率良く治療用遺伝子を導入し、長期間発現させることが可能になった。AAVベクターを使用したパーキンソン病の遺伝子治療は、動物実験における好結果を踏まえて臨床試験の段階に進もうとしている¹⁾。

I. AAVベクター

遺伝子治療では、治療用の遺伝子を効率良く

目的の細胞に導入し長期間発現させる技術が鍵となる。ウイルスを改変したベクターを利用する方法が優れており、これまで AAV のほかにアデノウイルス、ヘルペスウイルス、レトロウイルス(オンコレトロウイルスとレンチウイルス)などに由来するベクターが開発されている。このうち、オンコレトロウイルスベクターでは、非分裂細胞には遺伝子導入できないため、神経細胞を目標とした治療には適さない。また、アデノウイルスベクターとヘルペスウイルスベクターは、免疫反応を惹起しやすく、導入した遺伝子の発現が短期間しか持続しないという難点がある。AAV ベクターとレンチウイルスベクターは、実験動物の脳で神経細胞に効率良く遺伝子を導入し、数年以上も発現させることが確かめられている。特に AAV はレンチウイルス(HIV など)と異なり、野生型のウイルスに元々明らかな病原性がないため、臨床応用に際しては最も有力と考えられる。

AAV は線状の一本鎖 DNA をもつ *Parvovirus* である。成人の多くには不顕性感染しており、大多数では episomal concatemer として存在するが、少数はウイルスの塩基配列の一部と相同性の高い配列をもつ 19 番染色体の特定部位(S1 site)に組み込まれている。AAV の増殖には、アデノウイルスやヘルペスウイルスの機能(ヘルパー機能)が必要で、アデノウイルスの感染に際して AAV も活性化し増殖すると考えられている。霊長類の AAV には多くの型が分離されているが、遺伝子治療用ベクターとしては、最初に塩基配列が決定され研究も進んでいる 2 型の AAV(AAV-2)が使用されることが多い。AAV-2 では約 4.7 kb のゲノム DNA の両端に特徴的なヘアピン構造(inverted terminal repeats)があり、その間に非構造蛋白である Rep と外被蛋白である VP をコードする領域が存在する。遺伝子治療用の組換え AAV ベクターを作製する際には、Rep と VP をコードする部分を切り出して、その代わりに目的とする遺伝子をプロモーターと poly A 配列の間に挟んで組み入れる。AAV ベクターには、ウイルスゲノムサイズの制約から約 4 kb 以上の大きさの遺伝子は組み込めないが、

1 つの細胞に 2 種類以上の AAV ベクターを同時に感染させることにより、複数の遺伝子を発現させることが可能である。

II. 線条体におけるドパミン合成の回復

パーキンソン病の大部分では環境因子を含む複雑な要因が発症に関与すると推定されており、単一の遺伝子異常は明らかではない。そのため、現時点における遺伝子治療の目標は、遺伝子変異を修復することではなく、外来遺伝子の導入により障害された機能を補充し進行を少しでも遅らせることにある。

パーキンソン病の主症状である運動障害は、線条体におけるドパミンの欠乏と関連して生じ、線条体内のドパミン濃度を上げることにより軽減する。ドパミンの前駆物質である L-3,4-dihydroxyphenylalanine(L-dopa)を服用することで病初期には著効が得られる。経口投与された L-dopa は、線条体において黒質ドパミン神経細胞からの神経終末に存在する芳香族アミノ酸脱炭酸酵素(aromatic L-amino acid decarboxylase: AADC)によりドパミンに変換される(図 1)。しかし、進行したパーキンソン病では、ドパミン神経終末の変性脱落が著しく AADC の活性が低下しているため、L-dopa からドパミンへの変換が障害される。症状の改善を得るには高用量の L-dopa を頻回に投与することになり、血中濃度の変動に伴う不随意運動や、前頭葉に存在するドパミン受容体への作用による幻覚などの副作用が生じる。

そこで、AADC の遺伝子を線条体内に導入し酵素活性を回復し、再び L-dopa の効果が得られるようにする遺伝子治療が考えられる⁹⁾(図 2)。この方法では、L-dopa の服用を継続する必要があるが、L-dopa の量を調節することにより、ドパミンが過剰になることを防ぐことができる。将来的には、線条体内で L-dopa を合成するのに必要となるチロシン水酸化酵素 tyrosine hydroxylase (TH) と、TH の補酵素として働くテトラヒドロピオプテリン(BH4)を合成する際の律速酵素である GTP cyclohydrolase I(GCH)の遺伝子も導入することにより、L-dopa の内服を

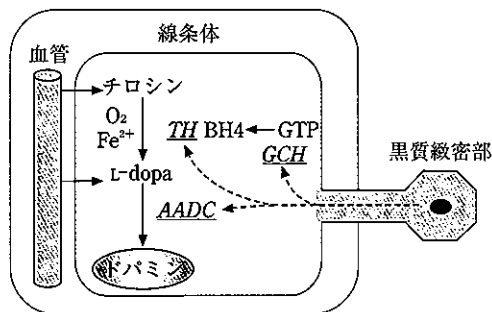
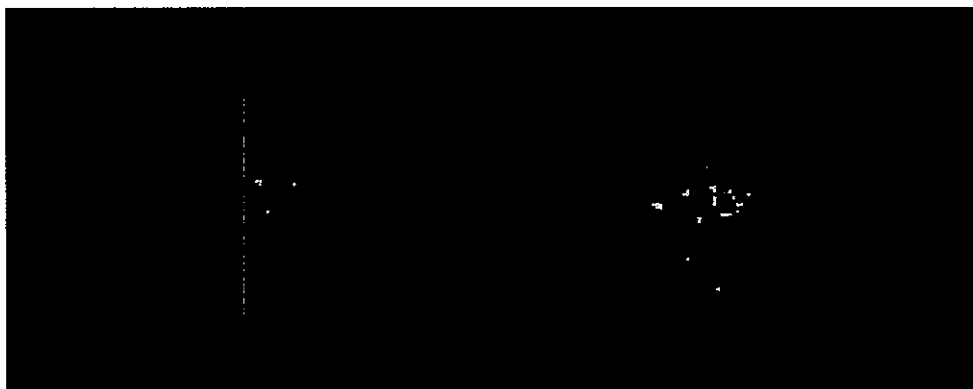


図1 線条体におけるドパミンの合成

経口投与されたL-dopaは、線条体において血液脳関門を通過し、黒質緻密部神経細胞からの軸索終末に存在する芳香族アミノ酸脱炭酸酵素(AADC)により、ドパミンに変換される。進行期のパーキンソン病ではこの神経終末の脱落が著しく、AADCの活性が低下している。そこで、AADCの遺伝子を発現させる遺伝子治療が考えられる。将来的には、チロシン水酸化酵素(TH)とTHの補酵素となるテトラヒドロピオプテリン(BH4)合成に必要なGTP cyclohydrolase I(GCH)の遺伝子も導入してL-dopaの服用を不要にする方法が望まれる。



遺伝子治療前

12週間後

図2 AADCの遺伝子を導入したモデルサルでの $[^{14}\text{C}]$ L-dopa PET画像

カンクイサルに神経毒1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine(MPTP)を慢性投与し、選択的に黒質のドパミン細胞を脱落させてパーキンソン病のモデルサルを作製した。その後、左側の被殻(図では右)に、AAVベクターによりAADCの遺伝子を導入した。線条体における $[^{14}\text{C}]$ L-dopaの取り込みは、遺伝子導入前には両側とも著しく低下しているが、治療12週間後には導入側で回復している(浜松ホトニクス、自治医科大学遺伝子治療、筑波霊長類センターとの共同研究による)。

不要とする遺伝子治療が望まれる。TH、AADC、GCHの3種類の酵素の遺伝子を線条体内で発現させる遺伝子治療は、選択的神経毒により黒質線条体路を破壊したパーキンソン病モデル動物を使用した実験で、その効果が確認されており期待できる³⁾。

パーキンソン病では、ドパミン以外にセロトニン、ノルアドレナリンなどにも障害があるこ

とが知られており、L-dopa治療があまり有効でない症状として、痴呆、うつ状態、姿勢反射障害、自律神経障害、すくみ足などがある。これらに対しては、線条体へのドパミン合成系酵素の遺伝子導入のみでは不十分で、より広範な遺伝子導入が必要かもしれない。しかし、ドパミン合成の回復により運動障害を治療することで、ADLの著しい改善が期待できる。現在、AAVベ

クターを使用してAADCの遺伝子を導入する臨床試験が自治医大と米国のUCSFで計画されている。

III. 神経栄養因子による細胞保護

パーキンソン病の遺伝子治療の第二の方法としては、神経保護作用のある物質を脳内に持続的に供給する遺伝子治療が考えられる。パーキンソン病における黒質ドパミン神経細胞の選択的な変性機序は十分解明されていないが、ミトコンドリア機能障害、フリーラジカル産生、アポトーシス、ミクログリア活性化など様々な要因が考えられており、それらにかかわる分子を利用した種々の変性抑制方法が考えられる。現在、最も有望なのは培養ドパミン神経細胞に対する強力な保護作用をもつ因子として単離されたglial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)である。欧米で行われたGDNFを蛋白質製剤として被殻に持続注入する第1相臨床試験では、運動障害の改善効果が認められた。しかし、この方法は高価であるとともに、注入用カテーテル留置に伴う位置ずれや感染などの合併症を生じる危険がある。そこで、線条体にGDNFの遺伝子を導入して持続的に発現させる遺伝子治療が考えられる。モデルラットの実験では、線条体への神経毒注入後、既に黒質線条体路の変性がある程度進行している状態でも、GDNFの遺伝子を搭載したAAVベクターを線条体に注入することにより黒質ドパミン細胞の変性脱落が抑制され、運動障害の改善効果が認められている⁹。このことから、今後、PETなどによりパーキンソン病を早期に診断しGDNFの遺伝子を線条体に導入する遺伝子治療を行えば、症状の増悪を抑制できる可能性がある。

IV. 視床下核の抑制

パーキンソン病では、視床下核の神経細胞の活動性が異常に亢進し、過剰な興奮性の出力を黒質網様部および淡蒼球内節に及ぼしている。定位脳手術により電極を視床下核に挿入し、高頻度刺激してその機能を抑制する深部脳刺激(deep brain stimulation: DBS)が行われるよう

になり、症状の改善が報告されている。この臨床経験に基づき、電気刺激の代わりに、抑制性伝達物質であるGABAの合成酵素glutamic acid decarboxylase (GAD-65およびGAD-67)の遺伝子を視床下核の細胞に導入して、本来興奮性の出力を抑制性に変換する遺伝子治療が考えられた⁹。視床下核は体積が小さく(140 mm³, 脳全体の0.02%)、神経細胞の数も約30万個と比較的少ないため、ごく少量のAAVベクターにより遺伝子導入が可能である。2003年8月には、米国でAAVベクターを使用して、この方法による臨床試験が開始された。しかし、視床下核の電気刺激が有効である機序は十分解明されているわけではなく、視床下核の過剰な興奮がGADの遺伝子導入後には過剰な抑制に代わる可能性や、視床下核内の機能局在により遺伝子導入の効果が異なる可能性も考えられる。サルの実験を行わずにラットの実験結果のみに基づいてヒトへの応用が行われたことについての批判もあり、臨床試験の結果が注目されている。

V. 遺伝子発現の調節

これまでは、導入した遺伝子の発現をいかに高めるかということに研究の焦点があったが、今後は過剰な発現を抑制する技術開発が必要である。一つの例として、エストロゲン受容体のリガンド結合部位と、Creリコンビナーゼとの融合蛋白質CreER^{T2}を応用したシステムを図3に示した。AAVベクターによってCreER^{T2}を発現させると、合成エストロゲンであるタモキシフェンの存在下のみCreリコンビナーゼの活性を発揮して2つのloxP配列の間に挟まれた目的の塩基配列を切り出すことができる。ドパミン合成系の酵素TH, AADC, GCHをそれぞれ発現する3種類のAAVベクターのうち、THだけをloxP配列の中に挿入したベクターを作製し、AAV-CreER^{T2}とともに使用すれば、万ードパミン産生が過剰になったときにはタモキシフェンを服用することにより、THの発現を抑制できる。その場合、AADCの活性は維持されるので、L-dopaを服用することによりドパミンの産生は可能である。

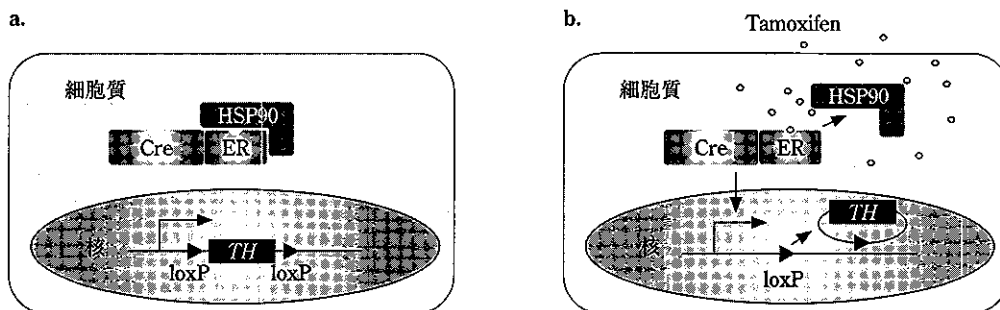


図3 AAV-CreER²によるTH遺伝子発現の抑制

改変したエストロゲン受容体のリガンド結合部位をCreリコンビナーゼと融合した蛋白CreER²による遺伝子発現の調節機構。

AAVベクターにより発現したCreER²は、細胞質ではHSP90と結合して不活性な状態にあるが(a)、合成エストロゲンであるタモキシフェンの存在下では核内に移行しCreリコンビナーゼの活性を発揮して、2つのloxP配列の間に挟まれた目的の塩基配列(この場合はTH)を切り出す(b)(IGBMC, Prof. Chambonらとの共同研究による)。

VI. 今後の展望

遺伝子治療は、1990年に米国の国立衛生研究所(NIH)において adenosine deaminase (ADA) 欠損症の小児に対して、末梢血のリンパ球にレトロウイルスベクターを使用してADA遺伝子を導入する世界初の試みが行われて以来、多くの期待を集めてきた。しかし、難治性の悪性腫瘍や先天性代謝異常症を主な対象としてきたこともあり、目立った成果はあげられていなかった。その間に、米国でアデノウイルスベクターを肝動脈内に投与したオルニチントランスカルバミラーゼ欠損症の青年が死亡した事例や、フ

ランスでレトロウイルスベクターによるX連鎖重症複合免疫不全症の小児に対する遺伝子治療において白血病が発生した事例など、重篤な副作用が報告されている。これらの事例では、使用されたベクターや原疾患の特性による要因が大きいと考えられている。パーキンソン病に対するAAVベクターによる遺伝子治療の安全性は高いと考えられるが、臨床応用に際しては注意が必要なことは間違いない。

今後は、傷害された遺伝子そのものを修復する技術の開発や細胞移植との組み合わせなどが行われるものと期待される。

■文 献

- 1) Muramatsu S, et al: Adeno-associated viral vectors for Parkinson's disease. *Int Rev Neurobiol* 55: 205-222, 2003.
- 2) Bankiewicz KS, et al: Convection-enhanced delivery of AAV vector in parkinsonian monkeys; *in vivo* detection of gene expression and restoration of dopaminergic function using pro-drug approach. *Exp Neurol* 164: 2-14, 2000.
- 3) Muramatsu S, et al: Behavioral recovery in a primate model of Parkinson's disease by triple transduction of striatal cells with adeno-associated viral vectors expressing dopamine-synthesizing enzymes. *Hum Gene Ther* 13: 345-354, 2002.
- 4) Wang L, et al: Delayed delivery of AAV-GDNF prevents nigral neurodegeneration and promotes functional recovery in a rat model of Parkinson's disease. *Gene Ther* 9: 381-389, 2002.
- 5) During MJ, et al: Subthalamic GAD gene transfer in Parkinson disease patients who are candidates for deep brain stimulation. *Hum Gene Ther* 12: 1589-1591, 2001.

新規毒性物質「アミロスフェロイド」の形成と神経細胞死 ～アルツハイマー病発症における神経細胞死の解明に向けて～

星 美奈子

タンパク質は固有の三次構造を取ることで生理的機能を果たす。「異常構造タンパク質」の凝集と蓄積は、アルツハイマー病を初めとする多くの神経変性疾患に共通の病態であるばかりか、病因である可能性も高くなっている。しかし、個々の疾患において凝集体の構造もその作用機序もまだ充分解明されてはいない。 β アミロイド ($A\beta$) は、アルツハイマー病発症への引き金を引くと考えられているが、若年時から生理的ペプチドとして存在する $A\beta$ が、老人の脳で神経毒を持つに至る物理化学的機構は未だ謎である。我々は、 $A\beta$ の神経細胞死活性と構造の問題に取り組み、化学合成した $A\beta$ の水溶液を回転攪拌させることで、球状の会合体が形成されることを見いだした。10-15 nm のこの球状 $A\beta$ の毒性は線維の約 400 倍も強く、これを「アミロスフェロイド」と名付け、今回発見の経緯を報告する。

はじめに

人は生まれた以上、いつかは死んでいく。しかし、誰もが「第2の人生」である老後を寝たきりで過ごしたくない。我が国は、高齢化社会から急速に超高齢化社会へと移行しつつあり、2050年には2.8人に1人が65歳以上という未曾有の事態に直面しようとしている(図1)。従って、「健やかに老いる」ということは、一人一人の問題であると同時に、社会全体にとって越えるべきハードルとなっ

た。特に、神経変性疾患は年々増加し、近い将来にがんや心疾患とならぶ主要な死因になると予測されている。従って、その代表であるアルツハイマー病の1日も早い新たな治療法の開発と臨床応用が望まれているが、発症機構の多くは未だ不明である。

筆者は「生体における高次な生命現象を物質(タンパク質)の物理化学的な変化で説明する」との視点で研究を行ってきた。そして、この何年間かは、アルツハイマー病の原因とされながらも未だ謎が多い β アミロイド(β -amyloid: $A\beta$)の神経細胞死機構の問題に取り組んでいる。そして先頃、研究の過程で見いだした新たな球状の構造体が非常に強い神経毒性を持つことから「アミロスフェロイド」(amylospheroid: ASPD)(図2)と名付け論文にまとめる機会を得た¹⁾。そして、その論文が契機となり、研究者以外の方に自らの研究を語るという貴重な経験をすることとなった。その時以来、治療や予防ということを実際に考えた時、基礎研究としては具体的にどこまでを明らかにすれば「わかった」と言えるのか、そして自らの研究はどこに位置しているのか、ということをししばしば思い巡らすようになった。そのことも踏まえつつ、本総説においては、アミロスフェロイド同定の経緯と今後の展望を簡単にまとめたいと思う。

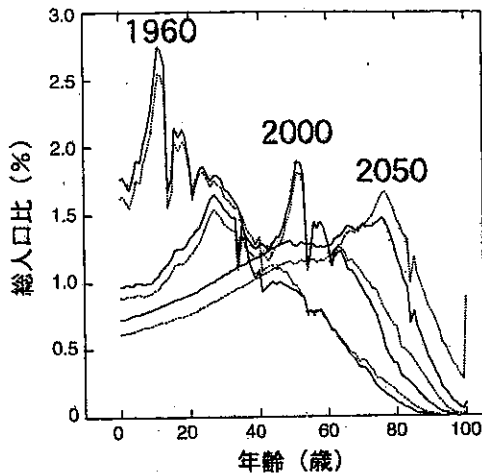
三菱化学生命科学研究所アルツハイマー病研究グループ
発症機序解明チームリーダー/主任研究員(〒194-8511
東京都町田市南大谷11号)

国立大学法人東京工業大学大学院生命理工学研究科生命
情報専攻広域生命情報講座連携客員助教授

Morphology and neurotoxicity of newly identified
spherical β -amyloid aggregates, 'amylospheroid', aiming
at elucidation of the neurodegenerative cascades
in Alzheimer's disease

Minako Hoshi, Ph.D., Leader (Unit of Neurodegenerative
Disease, Mitsubishi Kagaku Institute of Life
Sciences (MITILS), 11 Minamiooya, Machida, Tokyo
194-8511, Japan)

Visiting Associate Professor, Faculty of Bioscience
and Biotechnology, Department of Bioinformatics,
Tokyo Institute of Technology



出典：厚生省、国立社会保障・人口問題研究所

図1 日本における年齢別人口の推移

国立社会保障・人口問題研究所の調査に基づき、2050年のデータは中位推計による。高齢者人口の割合は2000年現在の17.4%から、2050年には35.7%の水準に達する。即ち、2.8人に1人が高齢者となる計算である。実線は男性、破線は女性を表す。

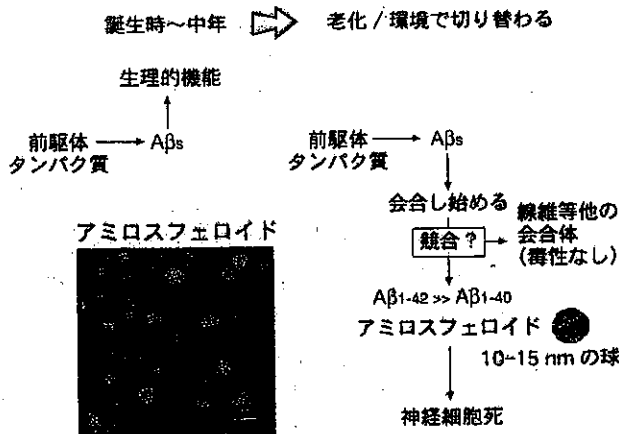


図2 アミロスフェロイド仮説

生理的Aβではマスキされていた毒性構造が、老化にともない会合するAβに切り替わり、特定の構造を取ることで顕在化し、神経細胞死を引き起こす。線維等には毒性がなく、一種の生体防御反応である可能性も考えられる。インセットはアミロスフェロイドの電子顕微鏡観察像。スケールは左が20nm、右が10nm。

1. 神経変性疾患と異常構造タンパク質の蓄積

我々が、研究の対象としているアルツハイマー病は、主要な神経変性疾患である。神経変性疾患とは、「血管障害、感染、中毒などのような明らかな原因がつかめない一群の神経疾患」²⁾とあるように、その発症機構は未知のものが多く、神経変性疾患とは原因不明であるということと同義語である状況が続いていた。しかし、徐々にそれぞれ

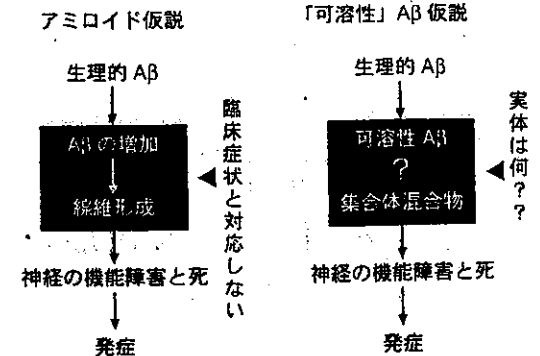


図3 アミロイド仮説(左)と可溶性Aβ仮説(右)

の疾患における発症の原因が明らかになり、さらに発症の原因となるタンパク質を物質レベルでも取り扱えるように変わりつつある。そして、この何年間かの医学研究の進歩から、「異常構造タンパク質の凝集」が共通の病態であり、かつ病因であることが明らかになってきた³⁾。しかしながら、それぞれの疾患において病因となるタンパク質が、なぜ生理的役割をはなれて病因となるのか、それはどのような構造変化を伴い、その結果神経の機能がなぜ阻害されるのかはまだ十分には理解出来ていないのが現状である。現時点で言えることは、いずれの場合もヒトが年を取ることと密接な関係にあるということである。従って、ヒトが老化する中で遺伝子(産物)がいかに変わるかが重要な課題となる。

アルツハイマー病の場合、2通りの異常構造タンパク質が脳に蓄積する。一つは脳のシミと呼ばれる「老人斑」を構成するAβ、もう一つは細胞内にたまる神経原線維変化を構成するリン酸化されたタウタンパク質である。1906年に学会で症例報告されて以来の初期の論争は、脳に残されたこの2通りの痕跡が、原因であるのか、結果であるのかという点に集中していた。そして、生化学・病理学・遺伝学・モデル動物実験などの各種の知見から、ようやくこの二つの特徴のうち、アルツハイマー病発症の上流は「Aβの蓄積」であり、神経原線維変化は比較的共通に認められる現象と考えられるに至った⁴⁾。当研究所においても、タウタンパク質リン酸化酵素I (tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3β⁵⁾: TPKI/GSK-3β)を同定し⁶⁾、AβによりTPKI/GSK-3βが活性化され、神経細胞死が起きることを明らかにしてきた⁷⁻¹⁰⁾。しかし、一方でAβとアルツハイマー病の関係はより複雑であった。老人の脳においてはアルツハイマー病の病因となるAβは、若い時から生理的ペプチドとして(その機能は未だ不明だが)アミロイド前駆体タンパク質(APP)から恒常的に切り出され、そして分解されている。このAβの生産と分解のバランスが、老化の過程で何らかの原因により崩れることで脳内のAβ量が増加し、結果として線維形成が起き

ると従来は考えられてきた¹⁴⁾ (アミロイド仮説) (図3)。しかし、この「Aβ主犯説」を支持する実験データもある一方で、疑問視する声も根強くあった。なぜなら、脳内のAβ量や線維量の増加は、必ずしも痴呆の重症度とは対応しなかったためである¹²⁻¹⁴⁾。最近発見されたArctic家系は、突然変異でAβの22番目のアミノ酸に置換が起きることでアルツハイマー病を早期発症するが、Aβ量は増加してはいない¹⁵⁾。さらに、多量のAβ線維を蓄えながら一見正常である老人達の存在もあり¹⁴⁾、Aβ量の増加だけで発症を説明することは困難であり、また線維が発症原因ではない可能性も考えられた (図3)。筆者も、前述のタウタンパク質リン酸化酵素Iによる神経細胞死シグナルカスケードの解明を目的に、初代培養神経にAβを投与してきたが、その過程で線維説には疑問を感じるようになった。そして、当時、東京都老人総合研究所の神経病部長であった水谷俊雄博士の下でアルツハイマー病患者の脳の神経病理学的解析に取り組んだ結果、脳における線維の蓄積場所と神経細胞脱落の部位が必ずしも相関しないことなどから、線維以外の構造体を探索する必要があると考えるに至った。また、40アミノ酸残基のAβ₁₋₄₀と42残基のAβ₁₋₄₂のどちらも老人斑を形成するにも関わらず、Aβ₁₋₄₂こそが発症の引き金を引くとされていたことも謎であった。これらの事実を統合して考えると、Aβが神経細胞死活性を獲得するのは、線維以外の「特定の構造」を取った時であると考えられる。即ち、年と共に脳内にAβが蓄積するが、それが「特定の構造」を取らない限り痴呆にはならず、またAβ₁₋₄₂はAβ₁₋₄₀よりもこの「特定の構造」を圧倒的に作りやすいということになる。

実際に患者脳においては、不溶性の線維である老人斑よりもより穏和な条件で抽出可能な「可溶性Aβ」¹⁶⁾が増えていること、その増加が神経細胞同士の情報交換の場であるシナプス減少とも良く対応することがわかり、線維ではない構造体が注目されるようになった^{14,17)}。患者脳にある可溶性Aβは、二〜数百量体の混合物で、40個のアミノ酸よりなるAβ₁₋₄₀、42個のアミノ酸よりなるAβ₁₋₄₂の双方から出来る¹⁷⁾。一方で、試験管内で形成される非線維の構造体としては、APP発現細胞の培養上清に分泌される二/三量体 (二量体ないしは三量体)、化学合成Aβから作られたプロトフィブリル^{18,19)}とAβ₁₋₄₂会合体混合物 (三〜六量体を中心に二十四量体まで) であるAβ-derived diffusible ligands (ADDLs)²⁰⁾が同定された。二/三量体はラット海馬の長期増強を抑制する²¹⁾。線維へ至る中間体であるプロトフィブリルはβシート構造を持つ幅4-10nm、長さ200nm以下の様々なサイズのみものである^{18,19)}。最近、亜種としてpore状プロトフィブリルが同定され、Arctic変異 (Aβの22番目のグルタミン酸がグリシンに突然変異したもの、アルツハイマー病を早期発症する) を

持つAβでは出現頻度が上がることが報告された²²⁾。ADDLsは、線維形成の抑制条件 (低温またはApo J添加) でAβ₁₋₄₂より生じる会合体混合物で、Aβ₁₋₄₀では形成されない²⁰⁾。原子間力顕微鏡下では高さ5nmの様々なサイズの楕円球に見える²⁰⁾。プロトフィブリル、ADDLs共に神経細胞死活性を示すが、何れも会合体混合物のまま扱われており、その中で神経細胞死活性を担う実体は不明である。ADDLsに関しては、2003年の北米神経科学の年会においてゲル濾過による精製が報告された。神経細胞死活性は14kDa以下の画分にはなく、ゲル濾過上で分子量50kDa以上の画分にあるという。しかし、三量体 (= ~14kDa) から二十四量体 (= ~108kDa) まで含まれるADDLsのいずれが (それとも全てが) 神経細胞死を引き起こすのかどうかは今のところ不明である。これらの線維ではないAβ集合体を線維形成の中間体と捉える見方もあり、最近の研究の一つのトレンドとなっているが、いずれにせよ、Aβの種類においても、Aβの集合の程度についても不均一な混合物であり、これらが線維形成の中間体であるかどうかも含めて、その形成機構、物理化学的性質のほとんどは不明であり、主に形態で互いが区別されているのが現状である (図3)。

2. アミロスフェロイドの同定

では、ここで改めてAβを中心にアルツハイマー病の発症機構を整理してみたい。現在でも、アルツハイマー病であるか否かの最終的な診断は、死後に行われる神経病理学的解析によっている。しかし、アルツハイマー病であろう、(probable Alzheimer's disease) ということは、神経細胞のシナプスの変異に始まる機能障害とそれに続く神経細胞死があるレベルに達することで起きる高次の脳機能障害により推測可能となる。従って、疾病の入り口はAβ、

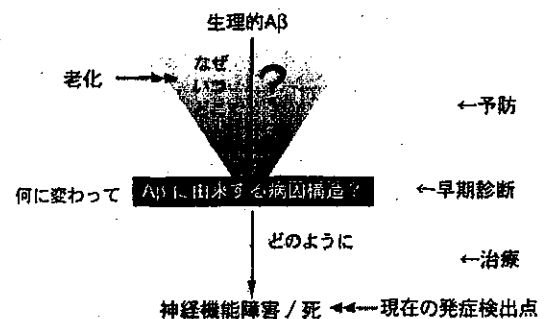


図4 Aβを中心と考えたアルツハイマー病発症の5W1H アルツハイマー病の発症は、生理的タンパク質であるAβが老化の過程で病因となる構造体へ変わったと考えることが出来る。従って、Aβがなぜ (why)、いつ (when) どこで (where)、どのような病因となる構造 (what) に変わること、どのように (how) 神経細胞の障害を引き起こすかという5W1Hが、全て分子レベルで解明できれば、発症機構は理解出来たと言えることとなる。

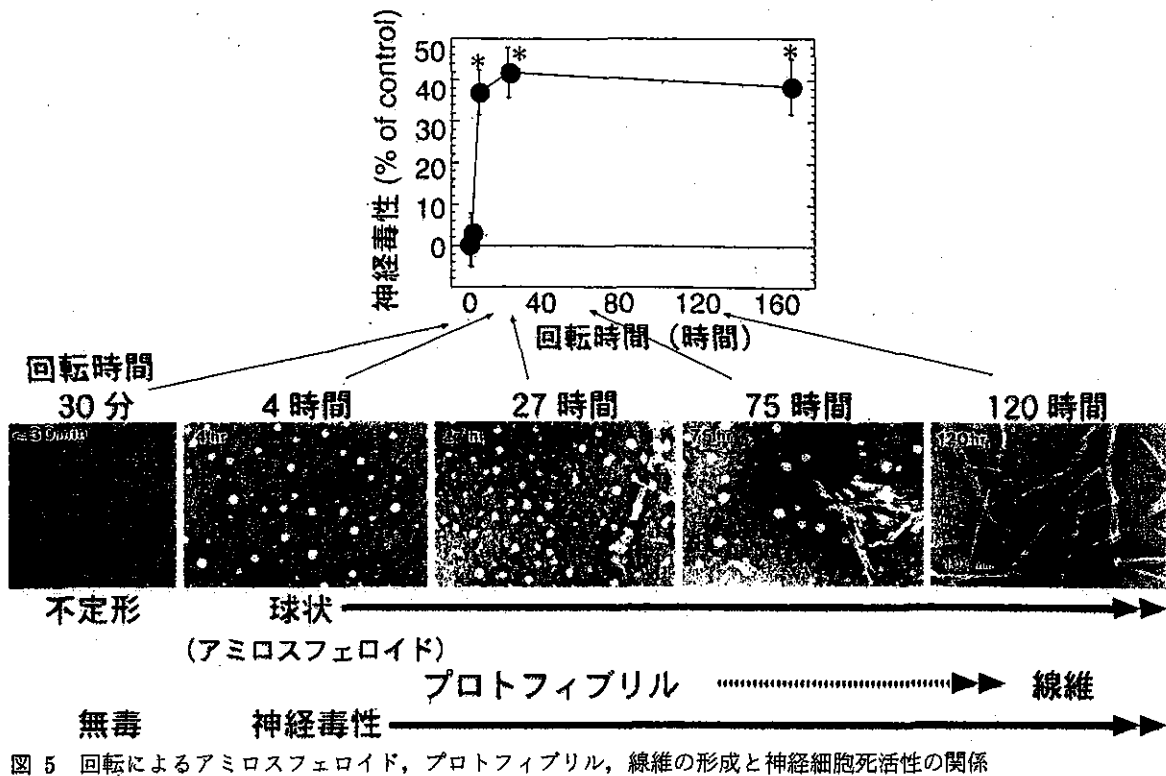


図5 回転によるアミロスフェロイド，プロトフィブリル，線維の形成と神経細胞死活性の関係

出口は神経機能障害/神経細胞死と設定出来るであろう。アルツハイマー病の発症の大部分は遺伝的変異を伴わないことから、本来は生理的タンパク質である $A\beta$ が老化の過程で病因となる構造体に変ったと考えることが出来る。従って、 $A\beta$ がなぜ(why)、いつ(when)どこで(where)、どのような病因となる構造に(what)変わること、どのように(how)神経細胞の障害を引き起こすかという5W1Hが、全て分子レベルで解明されれば、発症機構は理解出来たと言えることとなる(図4)。従来は、病因となる構造(what)は、脳内の $A\beta$ 量が増加しある閾値を越えたことで形成される線維であると考えられてきたわけであるが、前述してきたとおり脳内の $A\beta$ 量や線維量は必ずしも臨床症状と対応せず、病因となる構造体は他にあることが推測された。そこで、我々はまず病因となる構造体を試験管レベルで明らかにすることから開始することとした。

その当時、 $A\beta$ が「神経毒性を発揮する」ためには自己会合を起こさせることが必要²³⁾ということは明らかになっていたが、各々の研究者が独自に異なる調製方法で会合させた $A\beta$ は時に異なる活性を示し、また同一の調製方法に基づいても原材料となる化学合成した $A\beta$ の供給先やロットによっては毒性すら発揮されないということが知られていた。そこで、我々は、複雑かつ多様な $A\beta$ の自己集合過程を解明し、神経毒性を担う分子の実体を明らかにすべく、あえて重合しやすい $A\beta_{1-42}$ ではなく、生理的と見な

されている $A\beta_{1-40}$ を選び²⁴⁾、 $A\beta_{1-40}$ を大量に化学合成し、均一な原材料を確保した。次に、各種条件下での $A\beta$ 集合体形成を試みた。その結果、化学合成した $A\beta_{1-40}$ は溶かした直後は毒性を持たないが、その水溶液をゆっくり回転攪拌することで、やがて神経毒性が現れることを発見した^{25,26)}。静置した場合、 β シート構造を持つ線維が形成されるが、神経細胞死活性はほとんど認められなかった^{1,26)}。回転攪拌した場合、最初に出現するのは微小な球状構造であり、線維はかなり遅れて形成される(図5)。線維への中間体であるプロトフィブリルは、球状構造の後に認められるが、ある時間が経過すると全て線維になり観察されなくなる。一方、微小球は長時間の回転攪拌後も存在していた(図5)。また、単離した微小球状構造は長時間おいても、また引き続き回転攪拌しても線維に転換することはなく、さらに、線維形成が起きない低濃度の条件下でも形成された¹⁾。そこで、線維形成に必要な分子間の β シート形成を阻害することが知られているペンタペプチド(KLVFF, LPFFD)^{27,28)}を予め大過剰に $A\beta_{1-40}$ 水溶液に加え、その上で回転攪拌を行ったところ、確かに線維形成は阻害されたが、微小球状構造には影響がなく、神経毒性も保たれていた¹⁾。

これらの結果は、この微小球状構造は線維とは少なくとも途中からは異なる形成過程を取る可能性があること、さらに線維ではなく微小球状構造が神経毒性の担い手であることを示唆している。そこで、この微小球状構造体を「ア

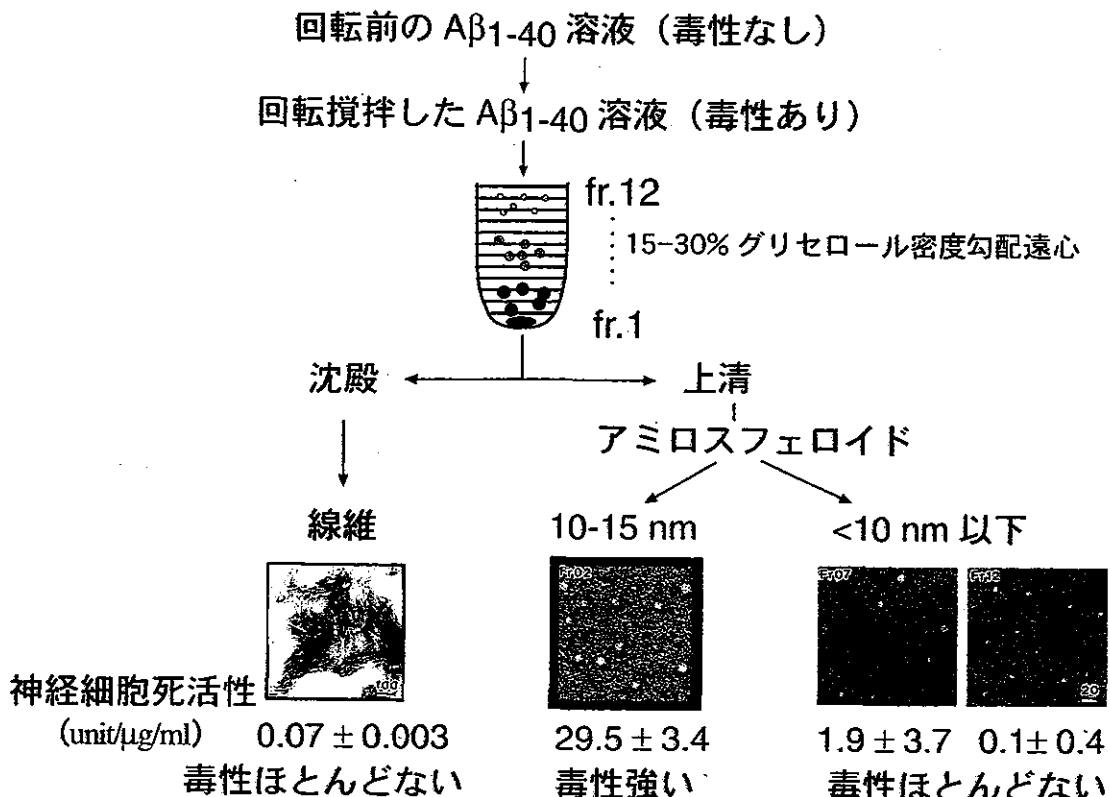


図 6 アミロスフェロイドの精製

「アミロスフェロイド」と名付け、グリセロール密度勾配遠心を用いた沈降係数による分離と構造活性相関から、直径 10-15 nm のアミロスフェロイドが神経細胞死活性を担う実体であることを明らかにした (図 6)^{1,26)}。アミロスフェロイドは、350 pM で毒性を示し、初代培養神経では全体の約 4 割の神経細胞に核の凝集と分断を伴う典型的アポトーシスを起こした (図 7)。一方、同様に精製したアミロイド線維は μM でもほとんど毒性がなかった (図 6)。アミロスフェロイドはアミロイド線維の約 450 倍という強い神経細胞死活性を持つ (図 6)。前述したとおり Aβ には、40 個のアミノ酸からなる Aβ₁₋₄₀ と、それに Ile と Ala が付いた Aβ₁₋₄₂ が存在する。そのいずれも線維や可溶性 Aβ を形成するが、アルツハイマー病の発症と相関するのはなぜか Aβ₁₋₄₂ であった。我々は、Aβ₁₋₄₂ が Aβ₁₋₄₀ と

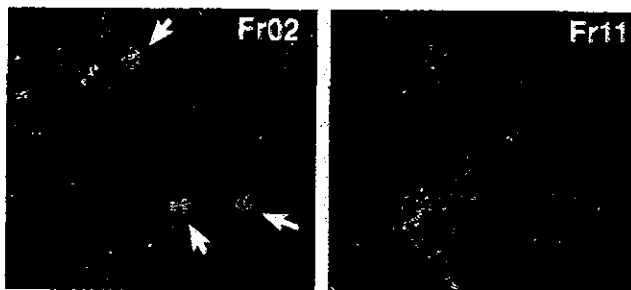
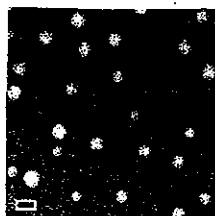


図 7 初代培養細胞に対するアミロスフェロイド毒性の検証

精製した各画分を投与後 48 時間経過すると、Fr.2 は核の凝集と分断を伴うアポトーシス様の神経細胞死 (左図→) が起きるが、Fr.11 では起きない。

Aβ₁₋₄₂ 由来のアミロスフェロイド



	Aβ ₁₋₄₂ 由来	Aβ ₁₋₄₀ 由来
比活性	100 倍以上	
形成濃度	1-0.01 μM	>0.1 μM
形成時間	8 時間以内 (1-0.01 μM)	30 時間以上 (50 μM)

図 8 Aβ₁₋₄₂ に由来するアミロスフェロイド

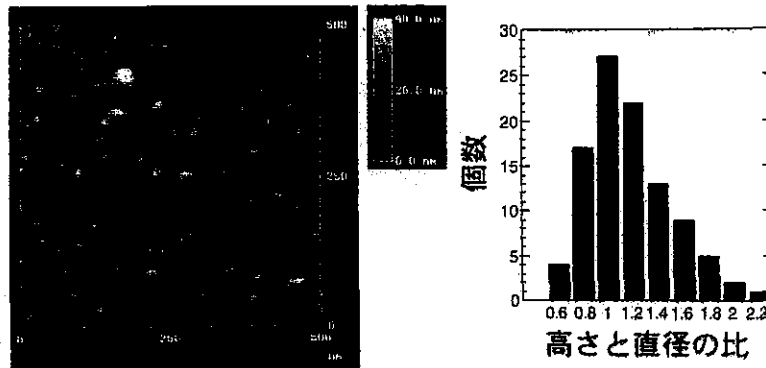


図9 溶液中におけるアミロスフェロイドの原子間力顕微鏡観察画像

同様に直径10-15 nmのアミロスフェロイドを形成するが、 $A\beta_{1-42}$ は $A\beta_{1-40}$ よりもアミロスフェロイド形成能力が高く、神経毒性も強いことを証明し、この差が発症との相関の差になっている可能性を示した(図8)¹⁾。

3. アミロスフェロイドの形態

前述のとおり、現在の各種の会合体は混合物であり、互いに形態で区別がつけられている。従って、これらとアミロスフェロイドを比較するには「視る」しかない。通常の観察には透過型電子顕微鏡を用いている。これは注意すれば非常に優れた検出法だが、真空中で観察するため試料が乾燥してしまい、また試料の高さを定量出来ないという欠点があった。そこで、三菱化学科学技術研究センターの協力を仰ぎ、まだあまり行われていない溶液下での原子間力顕微鏡観察を試みた。当初は、まるで冬の日本海さながらの画像しか撮れず、その後ようやく、どうやら探査針がアミロスフェロイドを引きずることがわかった。そこで、神経の培養から着想を得て探査針をコートすることを思いつき、また試料を乗せるマイカをシラン処理した結果、見事にアミロスフェロイドの姿が浮かび上がってきた(図9)¹⁾(Shibata-Seki, T. *et al.* 未発表データ)。そして、一つ一つのアミロスフェロイドについて正確な高さや直径を求めた結果、アミロスフェロイドは溶液中で直径=高さの真球であることが示され、プロトフィブリルやADDLsとは異なる形態を持つ新たな構造体であることが証明されたのである。

4. アミロスフェロイドの神経細胞死機構

精製したアミロスフェロイドは、数百 pM で神経細胞死を誘導するが、投与直後から細胞内カルシウムの上昇が起こり、自発的カルシウムスパイクの亢進が認められる²⁹⁾。それに伴い、神経突起の変形が認められ、投与後6時間には神経突起が切断され、細胞間をつなぐ線維連絡が減少するのが観察される³⁰⁾。アルツハイマー病の場合、神経細胞死に先行してシナプスが変性すると考えられているが³¹⁾、

アミロスフェロイド投与の初期反応もそれを示唆している。そして、2時間後をピークに一過的にタウタンパク質リン酸化酵素 TPKI/GSK-3 β の活性化が起こり、48時間後には神経細胞そのものが失われていた¹⁾。前述のとおり TPKI/GSK-3 β は、アルツハイマー病の病理学的特徴である神経原線維変化 NFT (neurofibrillary tangle) を構成する「過剰にリン酸化されたタウ」のリン酸化に関与する細胞質の酵素として当研究所で見いだされ、海馬初代培養細胞では A β の急性毒性による神経細胞死にも関与していることが示されている⁷⁻¹⁰⁾。確かに、アミロスフェロイド投与の初期にこのリン酸化酵素の阻害剤である LiCl を IC₅₀ 濃度である 2 mM³²⁾ 投与することでアミロスフェロイド毒性は効果的に抑制可能であるが、アミロスフェロイド投与から遅れて4時間以降の既に TPKI/GSK-3 β が活性化された後に阻害剤を投与しても何の影響も認められなかった。従って、アミロスフェロイドの毒性はその神経細胞死シグナル伝達の初期において TPKI/GSK-3 β を活性化し、神経細胞を死に至らしめている可能性が極めて高いことが証明された¹⁾。この場合はタウの機能障害が神経細胞死の鍵になっていると推定され、最近明らかになった FTDP-17 におけるタウの突然変異による神経細胞死と比較検討することで、その機構がより一層明らかになると考えられる。しかし、同時に筆者らは他の神経細胞死機構が動いていることも見いだしており、これらがそれぞれ加算的に神経細胞死を引き起こしているのか、それともそれぞれの現象がリンクしているのか、現在検討中である。また、インスリン応答のごく初期に Fyn による Tyr216 のリン酸化によって TPKI/GSK-3 β が活性化されることが報告されているが³³⁾ (その後 MAP キナーゼのカスケードによって Ser9 がリン酸化されることで不活性化される)、A β による神経細胞死においても Fyn が関与するという報告があり²⁰⁾、Fyn が TPKI/GSK-3 β の活性化に寄与している可能性が考えられる³⁴⁾。アミロスフェロイドによる神経毒性は細胞選択性、領域選択性があり、今後、下流の神経細胞死機構を分子レベルで解明していきたいと考えている。従

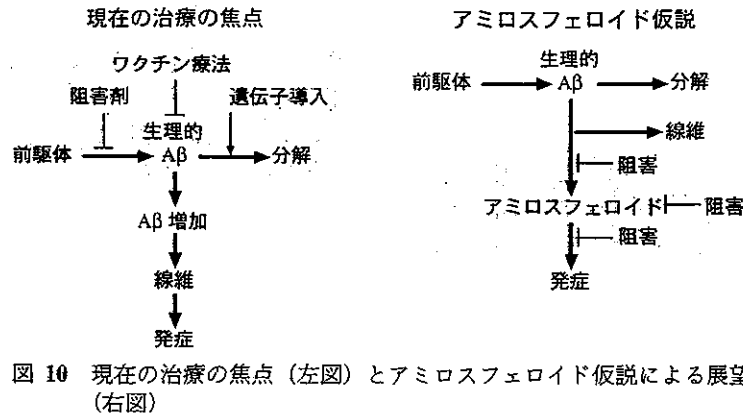


図 10 現在の治療の焦点 (左図) とアミロスフェロイド仮説による展望 (右図)

って、今後、アミロスフェロイド (類縁分子) の存在が実証されれば、アルツハイマー病発症と $A\beta$ 蓄積の間に残る矛盾を解き、過去の TPKE/GSK-3 の研究も踏まえ⁷⁻¹⁰⁾、アミロスフェロイド形成から神経細胞死、そしてアルツハイマー病発症へという一連の流れを提案することが可能となる。

5. アミロスフェロイド仮説の提唱

現在の発症阻止の方向性は、生理的 $A\beta$ と病因となる $A\beta$ を区別せずに一網打尽に脳内の $A\beta$ を全て絶つことにある (図 10)。前述したとおり $A\beta$ は APP より恒常的に切り出され、分解されている³⁵⁾。複雑な切り出しの制御もその酵素の全貌も未だ不明であるが、発症全体の数%を占める遺伝性のアルツハイマー病では $A\beta$ の切り出しが亢進するため、阻害剤が各種開発されている。しかし、副作用の問題が起きている。また、近年、理化学研究所の西道博士らにより分解酵素ネプリライシンが同定され³⁶⁾、二つのグループから遺伝子導入の結果が報告された^{37,38)}。岩田らの報告によると、ウイルスベクターにより発現されたネプリライシンは、シナプスにおいて $A\beta$ を分解する効果があることが示され³⁸⁾、今後の臨床応用への展開が望まれるところである。しかし、 $A\beta$ 切り出し/分解はフィードバック制御が働くため、制御機構が不明な現状での長期代謝抑制はリスクを伴うことは否定出来ない。一時期、最も有望に思われたのは、Schenk らが世界に先駆けて示し³⁹⁾、その後複数のグループにより追試がされた「ワクチン療法」^{40,41)}、即ち合成 $A\beta$ または抗 $A\beta$ 抗体の免疫によるモデルマウス脳のアミロイド線維沈着の消失と記憶学習行動異常の改善である。この療法はマウスでは当初目立った副作用が認められなかったため、作用機序が不明のまま 300 人以上の患者へ $A\beta$ 除去を目的に $A\beta$ が投与された。しかし、副作用がなかったマウスとは異なり、ヒトでは髄膜炎様症状が 5% に生じ、一部はステロイド投与等でも回復せず治験は中止された⁴²⁾。 $A\beta$ 除去に成功した例も甚大な組織破壊を伴う結果となった。Morgan らのワクチン療法

では学習行動の改善はアミロイド線維の減少と相関せずには起きないため、ごく微量に存在する線維以外の $A\beta$ 集合体が標的となったと推測される⁴³⁾。

以上を踏まえると、かくも多様に存在する $A\beta$ 集合体の中で神経毒性を担う構造体を明らかにすることは、一見遠回りようで効果的な療法への道を開くのではないだろうか。我々は、 $A\beta$ の様々な集合体から神経毒性を担う特定の構造 (アミロスフェロイド) の分離同定に試験管レベルだが世界で初めて成功し、線維には毒性がないことを示した。アミロスフェロイドの形成経路は線維と分岐している可能性があるため、もし我々の仮説が正しければ、生理的 $A\beta$ を阻害しない治療戦略が可能となる (図 10)。仮説の検証は今後の課題だが、アミロスフェロイドによって起こる神経細胞死の様子はアルツハイマー病で報告されるものと良く対応しており、神経細胞死へ至るカスケードの一翼を担っている可能性は高い。今後、特異的抗体を作製し、生体での実証を行うつもりである。我々の報告と相前後して、Glabe 博士らが金コロイド表面に $A\beta$ を人工的に並べた疑似 $A\beta$ 集合体を抗原として抗体を作り、これが $A\beta$ 集合体混合物の毒性を抑制し、患者脳において老人斑とは異なる部位を染色することを示した⁴³⁾。この抗体が実際に何を認識しているのか今後の解析が待たれる。

おわりに

アミノ酸が直鎖状に連結したタンパク質は、理論的には無数のコンフォメーションを取りうるが、多くは特定の三次構造に固定されている⁴⁴⁾。「三次構造はアミノ酸配列が決まれば周囲の溶媒 (主に水) との効果で一意的に決まる」とされてきた⁴⁵⁾。従って、遺伝情報、即ち DNA 上の塩基配列から自ずと三次構造も決まるはずである。しかし、 $A\beta$ という、たかだか 40-42 個のアミノ酸からなるペプチド一つを取ってみても、その構造の多様性は驚くばかりであり、タンパク質の三次構造は予想外に精妙で複雑な制御を受けていることを示している³⁾。アルツハイマー病の治療法開発は確かに急務ではあるが、もともと生理的に

も存在している A β の生理作用を阻害することなく疾病を抑えるためには、A β に由来する病因となる分子を同定し、その形成機構を解明することが欠かせない。その基礎的知見は、病気の診断や新たな治療法の開発にもつながる可能性が高い。前述してきたように可溶性 A β の実体は解明されつつあり、病因となる A β の構造体を物理化学的に解析することも夢ではなくなりつつある。

しかし、もし仮にアミロスフェロイドないしはその類縁分子が生体内に存在したとしても、発症機構の解明には、生理的 A β が「どのような分子機構で毒性を持つ集合体になるのか」、それを「制御する機構は何か」という問題を解かなくてはならない。アミロスフェロイドを初めとする複数の異なる A β 集合体が、試験管内で他のタンパク質等の助けを借りることなく形成されること、そしてその内の少なくとも一つである線維は実際にヒト脳で形成されることから、A β は自発的に集合し組織だった構造を形成する「自己組織化能力」⁴⁶⁻⁴⁸⁾ を持つと推測される。老化の過程で生理的 A β が、集合体へと変わるにあたっては、A β を取り巻く水とイオン環境、そしてシャペロンの作用等が考えられるがこれらは今後の課題である。我々は、今後、アミロスフェロイド形成において「回転攪拌」がどのような物理化学的変化を A β に引き起こしているかを解明するところからこの問題にアクセスしていきたいと考えている。A β に認められるような、老化に伴い集合体が形成されるという現象は、他の神経変性疾患の原因となるタンパク質においても共通に認められる病態である。原因タンパク質同士はアミノ酸配列にも本来の機能にも一見共通性はないが、類縁の凝集体を形成し神経細胞死を起こす。本来疾患とは関係のないタンパク質も実験的環境においては凝集することが報告されている⁴⁹⁾。これらのタンパク質は、自己組織化しある構造を取ることで、本来の機能にはない毒性を獲得している。このように元々のタンパク質のコンフォメーションと連鎖様式を変えることで新たな機能を獲得する自己組織化能は潜在的に全てのタンパク質に備わっているのかもしれない。多くの神経変性疾患の発症が老化と密接な関係にあることを考えると、タンパク質の自己組織化能によるダイナミックな構造代謝は老化の基本原則と深く関わるのかもしれない。近年のゲノムプロジェクトの成果により、人類は 35 億年という進化の過程で培われてきた「生命の設計図」の解読に成功し、次に生命の部品に当たるタンパク質の機能動態の解明が急ピッチで進められ、新たな局面が開けつつある。しかし、生命の営み全体を説明し、それが誤動作している疾患を克服するためには、まだまだ解決すべきことは多い。我々の研究はまだ一步を踏み出したところだが、アミロスフェロイドを入り口にいずれは老化という現象を物理化学的に解明出来たら本望である。

ここで述べた研究は、福岡女子大学佐藤一紀博士との共同研究によるものであり、佐藤道夫博士、野口彰彦氏、伊藤茜氏、坂本弓子氏、松本紳一郎氏、関禎子氏らの協力により成し遂げたものであります。この場を借りて感謝の意を表します。常に温かい励ましと助言を下された永井克孝所長とアミロスフェロイドの構造について議論いただいた若林健之博士には心から感謝いたします。また、ここに記載した成果は科学技術振興機構 PRESTO 並びに内藤財団の助成により実現したものです。最後になりましたが、私がアルツハイマー病の研究を始めるに当たっているいろいろとご指導賜り、また本稿執筆の機会を与えてくださった、今堀和友先生に深謝いたします。

文 献

- 1) Hoshi, M., Sato, M., Matsumoto, S., Noguchi, A., Yasutake, K., Yoshida, N., & Sato, K. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 6370-6375
- 2) 金澤一郎 (1987) 神経内科学 (豊島康夫編), pp. 569, 朝倉書店, 東京
- 3) Sherman, M.Y. & Goldberg, A.L. (2001) *Neuron* 29, 15-32
- 4) Selkoe, D.J. (2001) *Physiol. Rev.* 81, 741-766
- 5) Woodgett, J.R. (1990) *EMBO J.* 9, 2431-2438
- 6) Ishiguro, K., Takamatsu, M., Tomizawa, K., Omori, A., Takahashi, M., Arioka, M., Uchida, T., & Imahori, K. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 10897-10901
- 7) Takashima, A., Noguchi, K., Sato, K., Hoshino, T., & Imahori, K. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 7789-7793
- 8) Imahori, K., Hoshi, M., Ishiguro, K., Sato, K., Takahashi, M., Shiurba, R., Yamaguchi, H., Takashima, A., & Uchida, T. (1998) *Neurobiol. Aging* 19, s 93-s 98
- 9) Hoshi, M., Takashima, A., Noguchi, K., Murayama, M., Sato, M., Kondo, S., Saitoh, Y., Ishiguro, K., Hoshino, T., & Imahori, K. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 2719-2723
- 10) Hoshi, M., Takashima, A., Murayama, M., Yasutake, K., Yoshida, N., Ishiguro, K., Hoshino, T., & Imahori, K. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 2038-2041
- 11) Hardy, J.A. & Higgins, G.A. (1992) *Science* 256, 184-185
- 12) Dickson, D.W. & Yen, S.H. (1989) *Neurobiol. Aging* 10, 402-404; discussion 412-414
- 13) Terry, R.D., Masliah, E., Salmon, D.P., Butters, N., DeTeresa, R., Hill, R., Hansen, L.A., & Katzman, R. (1991) *Ann. Neurol.* 30, 572-580
- 14) Lue, L.F., Kuo, Y.M., Roher, A.E., Brachova, L., Shen, Y., Sue, L., Beach, T., Kurth, J.H., Rydel, R.E., & Rogers, J. (1999) *Am. J. Pathol.* 155, 853-862
- 15) Nilsberth, C., Westlind-Danielsson, A., Eckman, C.B., Condron, M.M., Axelman, K., Forsell, C., Sten, C., Luthman, J., Teplow, D.B., Younkin, S.G., Naslund, J., & Lannfelt, L. (2001) *Nat. Neurosci.* 4, 887-893
- 16) Klein, W.L., Krafft, G.A., & Finch, C.E. (2001) *Trends Neurosci.* 24, 219-224
- 17) Kuo, Y.-M., Emmerling, M.R., Vigo-Pelfrey, C., Kasunic, T.C., Kirkpatrick, J.B., Murdoch, G.H., Ball, M.J., & Roher, A.E. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 4077-4081

- 18) Walsh, D.M., Hartley, D.M., Kusumoto, Y., Fezoui, Y., Condron, M.M., Lomakin, A., Benedek, G.B., Selkoe, D. J., & Teplow, D.B. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 25945-25952
- 19) Hartley, D.M., Walsh, D.M., Ye, C.P., Diehl, T., Vasquez, S., Vassilev, P.M., Teplow, D.B., & Selkoe, D.J. (1999) *J. Neurosci.* **19**, 8876-8884
- 20) Lambert, M.P., Barlow, A.K., Chromy, B.A., Edwards, C., Freed, R., Liosatos, M., Morgan, T.E., Rozovsky, I., Trommer, B., Viola, K.L., Wals, P., Zhang, C., Finch, C. E., Krafft, G.A., & Klein, W.L. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 6448-6453
- 21) Walsh, D.M., Klyubin, I., Fadeeva, J.V., Cullen, W.K., Anwyl, R., Wolfe, M.S., Rowan, M.J., & Selkoe, D.J. (2002) *Nature* **416**, 535-539
- 22) Lashuel, H.A., Hartley, D.M., Petre, B.M., Wall, J.S., Simon, M.N., Walz, T., & Lansbury, P.T., Jr. (2003) *J. Mol. Biol.* **332**, 795-808
- 23) Lorenzo, A. & Yankner, B.A. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 12243-12247
- 24) Levine, H., 3rd. (1995) *Neurobiol. Aging* **16**, 755-764
- 25) Hoshi, M., Sato, M., Yoshida, N., Kobayashi, N.R., Okuda, A., & Sato, K. (2000) *Soc. Neurosci. Abstr.* **26**, 1283
- 26) 星 美奈子 (2002) *細胞工学* **21**, 728-732
- 27) Tjernberg, L.O., Naslund, J., Lindqvist, F., Johansson, J., Karlstrom, A.R., Thyberg, J., Terenius, L., & Nordstedt, C. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 8545-8548
- 28) Soto, C., Sigurdsson, E.M., Morelli, L., Kumar, R.A., Castano, E.M., & Frangione, B. (1998) *Nat. Med.* **4**, 822-826
- 29) Kobayashi, N.R., Hirasawa, T., Yoshida, N., Kudo, Y., & Hoshi, M. (1999) *Soc. Neurosci. Abstr.* **25**, 342
- 30) Hoshi, M. (1999) *J. Clin. Exp. Med.* **189**, 22-27
- 31) Selkoe, D.J. (2002) *Science* **298**, 789-791
- 32) Klein, P.S. & Melton, D.A. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 8455-8459
- 33) Lesort, M., Jope, R.S., & Johnson, G.V. (1999) *J. Neurochem.* **72**, 576-584
- 34) Hoshi, M., Ishiguro, K., Yoshida, N., Kobayashi, N.R., Sato, K., & Imahori, K. (1999) *Soc. Neurosci. Abstr.* **25**, 2125
- 35) Saido, T.C. (2002) in *A β Metabolism and Alzheimer's Disease* (Saido, T.C. ed.) pp.1-26, Landes Bioscience, Georgetown, Texas, USA
- 36) Iwata, N., Tsubuki, S., Takaki, Y., Watanabe, K., Sekiguchi, M., Hosoki, E., Kawashima-Morishima, M., Lee, H. J., Hama, E., Sekine-Aizawa, Y., & Saido, T. C. (2000) *Nat. Med.* **6**, 143-150
- 37) Marr, R.A., Rockenstein, E., Mukherjee, A., Kindy, M.S., Hersh, L.B., Gage, F.H., Verma, I.M., & Masliah, E. (2003) *J. Neurosci.* **23**, 1992-1996
- 38) Iwata, N., Mizukami, H., Shirotani, K., Takaki, Y., Muramatsu, S., Lu, B., Gerard, N.P., Gerard, C., Ozawa, K., & Saido, T.C. (2004) *J. Neurosci.* **24**, 991-998
- 39) Schenk, D., Barbour, R., Dunn, W., Gordon, G., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., Kholodenko, D., Lee, M., Liao, Z., Lieberburg, I., Motter, R., Mutter, L., Soriano, F., Shopp, G., Vasquez, N., Vandever, C., Walker, S., Wogulis, M., Yednock, T., Games, D., & Seubert, P. (1999) *Nature* **400**, 173-177
- 40) Janus, C., Pearson, J., McLaurin, J., Mathews, P.M., Jiang, Y., Schmidt, S.D., Chishti, M.A., Horne, P., Heslin, D., French, J., Mount, H.T., Nixon, R.A., Mercken, M., Bergeron, C., Fraser, P.E., St George-Hyslop, P., & Westaway, D. (2000) *Nature* **408**, 979-982
- 41) Morgan, D., Diamond, D.M., Gottschall, P.E., Ugen, K.E., Dickey, C., Hardy, J., Duff, K., Jantzen, P., DiCarlo, G., Wilcock, D., Connor, K., Hatcher, J., Hope, C., Gordon, M., & Arendash, G.W. (2000) *Nature* **408**, 982-985
- 42) Schenk, D. (2002) *Nat. Rev. Neurosci.* **3**, 824-828
- 43) Kaye, R., Head, E., Thompson, J.L., McIntire, T.M., Milton, S.C., Cotman, C.W., & Glabe, C.G. (2003) *Science* **300**, 486-489
- 44) Finkelstein, A. (1997) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 60-71
- 45) Anfinsen, C.B. (1973) *Science* **181**, 223-230
- 46) Yates, F.E. (1987) *Self-organizing Systems. The Emergence of Order*, Plenum, New York
- 47) Bushev, M. (1994) *Synergetics, Chaos, Order, Self-organization*, World Scientific, London
- 48) Nicolis, G. & Prigogine, I. (1977) *Self-organization in Non-equilibrium Systems*, Wiley, New York
- 49) Bucciantini, M., Giannoni, E., Chiti, F., Baroni, F., Formigli, L., Zurdo, J., Taddei, N., Ramponi, G., Dobson, C. M., & Stefani, M. (2002) *Nature* **416**, 507-511

蛋白質核酸酵素

2004年5月号増刊
Vol.49 No.7

細胞における 蛋白質の一生

生成・成熟・輸送・管理・分解・病態

編集

小椋 光・遠藤斗志也
森 正敬・吉田賢右

PNE
PROTEIN,
NUCLEIC ACID
AND ENZYME

共立出版

