

厚生労働科学研究費補助金

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 17 年度 総括・分担研究報告書

平成 15～17 年度 総合研究報告書

主任研究者 田平 武

平成 18 (2006) 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…… 8
田平 武
2. 塩酸アポモルフィンの細胞内 A β および p53 分解促進作用と神経細胞死の抑止…… 10
大八木保政
3. 分子シャペロン誘導剤のアルツハイマー病治療への応用…… 19
工藤 喬
4. 海馬尾部および灰白層におけるアルツハイマー病変の検討…… 24
卷淵 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……27
武田雅俊

III. 研究成果の刊行に関する一覧表……33

IV. 研究成果の刊行物・別刷

V. 総合研究報告書……37

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 研究所長

研究要旨 Aβと結合し神経細胞死を誘導する AB-DIP は細胞周期を G2/M 期に停止させることを見出した。細胞内 Aβ分解促進剤の候補物質として塩酸アポモルフィンを得た。BiX は小胞体ストレスを緩和し、Aβ産生を低下させるとともに、中大脳動脈閉塞による梗塞領域を縮小させた。Aβはベータセクレターゼ(BACE)の基質となるとともに、Aβフラグメントは(BACE)活性を抑制した。

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

るシナプス障害や神経細胞死に深く関わっている。

本研究は細胞内・外 Aβ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. Aβと結合し細胞死に関わる AB-DIP の発現がテトラサイクリンで on となる強発現系を樹立する。この系にテトラサイクリンで AB-DIP を発現させ、FACS により細胞周期を解析する。また、AB-DIP の in vivo での機能を解析する為にトランスジェニックマウスを作製する。

2. 細胞内 Aβの分解促進剤を開発する為に、蛍光標識した合成 Aβ1-40 を浸透圧法により細胞にとり込ませ、経時的にその分解速度を測定できる系を樹立した。これに各種化合物をかけて Aβ分解を促進する物質を選択した。本年度はウエスタンブロットで Aβの分解を確認する。また、選択した物質の作用を調べる為に細胞を

A. 研究目的

本主任研究者は家族性アルツハイマー病遺伝子の一つプレセニン 1 の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 Aβの蓄積が関与する可能性を示した。また、最近 Aβオリゴマーが直接シナプスに結合し、障害を引き起こすことも示された。このように、Aβはアルツハイマー病の中核的病態であ

in vitro で H₂O₂ 処理し、細胞内 A β 42 産生増強による細胞死誘導系を用いる。

3. 小胞体ストレス(ER)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した。二次スクリーニング系はそれ自体が ER ストレスを誘導しないことを他の ER ストレスマーカーを用いて調べる系を樹立した。これらを用いて 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 β 産生を解析する。また、それによって得られる物質の in vivo での作用をみる為にマウス頸動脈よりカニューレを挿入し、中大動脈閉塞による脳梗塞を誘発して調べた。

4. 細胞内 A β 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ため、本年度は AD の病理学的変化をとくに灰白層(indusium griseum)の神経原線維変化に注目して調べた。

5. A β 産生に重要なベータセクレターゼ(BACE)活性阻害剤を開発する為にリコンビナント BACE を作製した。これを用いて消光性基質を用いた in vitro BACE アッセイを行うとともに、BACE 活性阻害作用を有する物質のスクリーニングに用いた。

(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 β と結合し細胞死を誘導する A β -related death-inducing protein (AB-DIP)は細胞周期を G2/M 期で停止させる機能があることが分かった。変異 AB-DIP トランスジェニックマウスは外見上異常がなかった。現在、野生型 AB-DIP トランスジェニックマウスを作製中である。

2. 細胞内 A β 分解はプロテアソームで行われ、塩酸アポモルフィンはその分解を促進させた。また、H₂O₂ 処理により細胞内 A β 42 増加が起こり p53 を介して細胞死が誘導されるが、塩酸アポモルフィンはその細胞死を抑制した。

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する結果、APP の細胞内輸送が変化し、A β 産生が抑制された。また、中大動脈閉塞による梗塞領域を有意に縮小した。

4. アルツハイマー病患者海馬の神経原線維変化は後方に行く程減少した。しかし、アルツハイマー型認知症では後方にも広がりを見せ、灰白層にも病変が見られた。しかし、灰白層には老人斑は観察されなかった。

5. A β そのものは BACE の基質となり、11 位と 35 位で切断された。また、A β フラグメントは BACE 活性を阻害した。

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 β 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Aβ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、Aβが結合する物質をスクリーニングし、細胞死を誘導する新規物質 AB-DIP を見出した。今回 AB-DIP が細胞周期に関わることを見出した。近年アルツハイマー病患者脳における細胞周期マーカーの発現が注目されている。神経細胞のような静止期にある細胞が再び細胞周期に入ると細胞死が起こることが知られており、Aβによる細胞死の一つのメカニズムに参与している可能性がある。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 Aβ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制する新しい標的になると思われる。

一方、細胞内 Aβ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 Aβ分解を促進する化合物として塩酸アポモルフィンが得られた。塩酸アポモルフィンはすでにヒトに使用されている薬であり、ヒトへの応用が可能であると期待される。

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、Aβ産生を抑制することを見出した。また、in vivo で脳梗塞病変を縮小させることを見出した。本剤は Aβ産生を抑制し、ER ストレスを緩和するという二面から AD の治療薬になり得ると期待される。

今回、BACE が Aβペプチドで阻害され

ることを初めて見出した。これは、これまでになく BACE 阻害薬が開発される可能性を示唆している。

E. 結論

1. Aβと結合し細胞死を誘導する物質 AB-DIP は、細胞周期を G2/M 期に停止させた。
2. 細胞内 Aβ分解を促進する化合物として塩酸アポモルフィンを得た。
3. 海馬の連続とみなされる灰白層に神経原線維変化を見出した。
4. GiX は小胞体ストレスを緩和し、Aβ産生の抑制と梗塞巣の縮小を示した。
5. Aβはそれ自体 BACE の基質になるとともに、Aβペプチドは BACE を阻害することを見出した。

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: Amyloid beta peptide binds a novel death-inducing protein, AB-DIP. *FASEB J* 2005 (doi: 10.1096/fj.05-3672fie)
2. Ohyagi Y, Tsuruta Y, Motomura K, Miyoshi K, Kikuchi H, Iwaki T, Taniwaki T, Kira J: Intraneuronal amyloid β 42 enhanced by heating but counteracted by formic acid. *J. Neurosci Methods*, in press; 2006

3. Ohyagi Y, Tabira T: Intracellular amyloid β -protein and its associated molecules in the pathogenesis of Alzheimer's disease (review). Mini-Rev. Med Chem, in press, 2006
4. Taniwaki T, Okayama A, Yoshiura T, Togao O, Nakamura Y, Yamasaki T, Ogata K, Shigeto H, Ohyagi Y, Kira J, Tobimatsu S: Functional network of the basal ganglia and cerebellar motor loops in vivo: Differential activation patterns between self-initiated and externally triggered movements. NeuroImage, in press, 2006
5. Furuya H, Murai H, Takasugi K, Ohyagi Y, Urano F, Kishi T, Ichinose H, Kira J: A case of late-onset Segawa syndrome (autosomal dominant dopa-responsive dystonia) with a novel mutation of the GTP-cyclohydrolase I (GCH1) gene. Clin. Neurol. Neurosurg. in press, 2006
6. Furuya H, Ikezoe K, Ohyagi Y, Miyoshi T, Fujii N: A case of progressive posterior cortical atrophy (PCA) with vivid hallucination: are some ghost tales vivid hallucinations in normal people? J Neurol Neurosurg Psychiatry, in press, 2006
7. 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 β 42 activates p53 promoter: a pathway to neurodegeneration in Alzheimer's disease. FASEB J 19: 255-257, 2005
8. Furuya H, Shinnoh N, Ohyagi 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
9. Furuya H, Yamada T, Ohyagi 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 (Suppl 1), S39-S44, 2005
10. Yoshio Bando, Reiko Onuki, Taiichi Katayama, Takayuki Manabe, Takashi Kudo, Kazunari Taira, Masaya Tohyama. Double-strand RNA dependent protein kinase (PKR) is involved in the extrastriatal degeneration in Parkinson's disease and Huntington's disease. Neurochem Int 46, 11-18, 2005
11. Interaction of presenilins with

- Zhenyu Du, Takuya Yamane, Michiko Shirane, Takashi Kudo, Masatoshi Takeda, Koichi Takebayashi, Yoichi Noda, Keiichi I Interaction of presenilins with FKBP38 promotes apoptosis by reducing mitochondrial Bcl-2. Nakayama, Masaki Nishimura. Human Molecular Genetics 14(13): 1889-1902, 2005.
12. Kentaro Tanemura, Du-Hua Chui, Tetsuya Fukuda, Miyuki Murayama, Jung-Mi Park, Takumi Akagi, Yoshitaka Tatebayashi, Tomohiro Miyasaka, Tetsuya Kimura, Tsutomu Hashikawa, Yuka Nakano, Takashi Kudo, Masatoshi Takeda, Akihiko Takashima. Formation of Tau Inclusions in Knock-in Mice with Familial Alzheimer Disease (FAD) Mutation of Presenilin 1 (PS1) J Biol Chem 281(8): 5037-5041, 2006
13. Takashi Kudo, Masayo Okumura, Kazunori Imaizumi, Wataru Araki, Takashi Morihara, Hitoshi Tanimukai, Eiichiro Kamagata, Nobuhiko Tabuchi, Ryo Kimura, Daisuke Kanayama, Akio Fukumori, Shinji Tagami, Masayasu Okochi, Mikiko Kubo, Hisashi Tanii, Masaya Tohyama, Takeshi Tabira, Masatoshi Takeda. Altered localization of amyloid precursor protein under endoplasmic reticulum stress. Biochem Biophys Res Commun 344: 525-530, 2006
14. Takehiro Yasukawa, Yohei Kirino, Norie Ishii, Ian J. Holt, Howard T. Jacobs, Takao Makifuchi, Nobuyoshi Fukuhara, Shigeo Ohta, Tsutomu Suzuki, Kimitsuna Watanabe. Wobble modification deficiency in mutant tRNAs in patients with mitochondrial diseases. FEBS Letters 579: 2948-2952, 2005.
15. Okochi M, Fukumori A, Jiang J, Itoh N, Kimura R, Steiner H, Haass C, Tagami S, Takeda M. Secretion of the Notch-1 A β -like peptide during Notch signaling. J Biol Chem, 2006 Epub
16. Fukumori A, Okochi M, Tagami S, Jiang J, Itoh N, Nakayama T, Yanagida K, Ishizuka-Katsura Y, Morihara T, Kamino K, Tanaka T, Kudo T, Tanii H, Ikuta A, Haass C, Takeda M. Presenilin-dependent γ -secretase on plasma membrane and endosomes is functionally distinct BIOCHEMISTRY, 2006 in press
17. Sato N, Okochi M, Taniyama Y, Kurinami H, Shimamura M, Takeuchi D, Hamada H, Fukumori A, Kiyosue K, Taguchi T, Tanaka T, Miyasaka M, Takeda M, Ogihara T, Morishita R Development of new screening system for Alzheimer disease, in vitro A β sink assay, to identify the dissociation of soluble A β from fibrils.

- Neurobiology of Disease. 2006 Epub
18. K Taguchi, H Yamagata, W Zhong, K Kamino, H Akatsu, R Hata, T Yamamoto, K Kosaka, M Takeda, I Kondo, T Miki. Identification of susceptibility genes for sporadic Alzheimer's disease using hippocampus-related candidate genes. *Ann Neurol* 57: 585-588, 2005
19. Nakajima T, Takauchi S, Ohara K, Kokai M, Nishii R, Maeda S, Takanaga A, Tanaka T, Takeda M, Seki M, Morita Y. Alpha-synuclein-positive structures induced in leupeptin-infused rats. *Brain Res* 1040: 73-80, 2005
20. Nessa BN, Tanaka T, Kamino K, Sadik G, Ansar AB, Kimura R, Tanii H, Okochi M, Morihara T, Tagami S, Kudo T, Takeda M. Toll-like receptor 3 mediated hyperphosphorylation of tau in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Psychiatry Clin Neurosci.* 2006 Apr; 60 Suppl 1: S27-33.
21. Kimura R, Kamino K, Yamamoto M, Kida T, Akatsu H, Uema T, Kobayashi T, Hattori H, Nuripa A, Nessa BN, Kazui H, Ikejiri Y, Tanaka T, Tanii H, Kudo T, Yoneda H, Yamagata H, Miki T, Takeda M. Albumin gene encoding free fatty acid and beta-amyloid transporter is genetically associated with Alzheimer disease. *Psychiatry Clin Neurosci.* 2006 Apr; 60 Suppl 1: S34-9.
22. Hua-Qin Wang, Y Nakaya, Z Du, T Yamane, M Shirane, T Kudo, M Takeda, K Takebayashi, Y Noda, Keiichi I. Interaction of presenilins with FKBP38 promotes apoptosis by reducing mitochondrial Bcl-2. *Human Molecular Genetics* 14(13), 1889-1902, 2005
23. H Tanii, N Matsumoto, Y Kashiwagi, M Okochi, T Tanaka, T Kudo, K Kamino, Y Okazaki, M Takeda. Aluminum alters viability and axonal transport system in Alzheimer's disease pathogenic mutation-bearing cells. *Psychogeriatrics* 4, 20-23, 2005
24. Masayasu Okochi, Masatoshi Takeda Possible assessment of Alzheimer's γ -secretase activity by level of A β -like peptide. *Psychogeriatrics* 54, suppl2, S57-S61, 2005
- 【学会発表】
1. 大八木保政 他：アルツハイマー病における細胞内アミロイド β 蛋白分解促進薬の探索。第46回日本神経学会総会、鹿児島、2005年5月26日
2. 三好克枝、大八木保政 他：プレセニン1遺伝子変異が促進するアポトーシ

ス経路の検討。第 46 回日本神経学会総会、鹿児島、2005 年 5 月 26 日

3. 大八木保政 : Pathogenesis of intracellular amyloid β -protein 42: A novel therapeutic target in Alzheimer's disease. 第 48 回日本神経化学会福岡大会(シンポジウム)、福岡、2005 年 9 月 29 日

4. 大八木保政 他 : アルツハイマー病における細胞内蓄積 A β の意義とその分解促進薬の探索。第 24 回日本認知症学会、大阪、2005 年 9 月 30 日

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

発明の名称 : アルツハイマー病の予防・治療剤

発明者 : 大八木保政

出願人 : 国立大学法人九州大学

出願番号 : 特願2006- 73054

出願日 : 平成 18 年 3 月 16 日

2. 分子シャペロン BiP 誘導剤 (BiP inducer X; BIX) 工藤 喬

出願準備中

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 AB-DIP の機能をみる為にテトラサイクリンで誘導される AB-DIP 発現細胞株を樹立した。AB-DIP を発現誘導すると細胞周期が G2/M で停止することが分かった。また、AB-DIP トランスジェニックマウスの作製を試み、変異 AB-DIP マウスは外見上異常を認めなかった。現在、野生型 AB-DIP マウスを作製中である。

研究協力者

Madepalli K. Lakshmana

（長寿医療センター研究所外来研究員）

武田和也（ 〃 特任研究員）

細胞を回収し、トリプシン処理後、70% エタノールで 4℃30 分固定した。細胞を洗浄後 propidium iodide 200 μ l (50 μ g/ml) と RNAase 50 μ l (100 μ g/ml) を作用させ、FACScan により解析した。

A. 研究目的

我々は A β と結合し細胞死を誘導する新規物質を見出し A β -related death inducing protein (AB-DIP) と命名した。昨年度の研究で、AB-DIP は A β を細胞外から作用させた場合及び A β と共発現させた場合に、A β による細胞死を増強することを示した。本年度は AB-DIP の機能を in vitro でさらに明らかにするとともに、in vivo での機能を明らかにする為にトランスジェニックマウスを作製することを目的とする。

トランスジェニックマウスの作製の為にまず Thy-1 プロモーターと AB-DIP 遺伝子の全コード領域を pUC18 ベクターの SmaI 部位にクローニングし、野生型及び変異塩基配列を有する cDNA を作製、これを pTSC21K の Xho I 部位に挿入した。また、テトラサイクリン誘導型を作製する為に、PCDNA4TO ベクターに野生型 AB-DIP の cDNA を挿入した。抗体作製用には AB-DIP の N 末端部及び C 末端部をそれぞれ pGEX4T-2 ベクターに挿入し、GST 融合タンパク発現ベクターを作製した。

B. 研究方法

Doxycyclin (Dox) で発現調節される AB-DIP 遺伝子導入 SH-SY5Y 細胞株を樹立し、in vitro の研究に用いた。この細胞株に Dox を添加し、36 時間培養した。

C. 研究結果

SH-SY5Y 細胞に DOX で AB-DIP の発現を誘導すると G2/M 期の細胞が 32.03% に増加した (図 1)。これは G2/M 期細胞

周期停止剤 Nocodazol 添加時の 35.46% に匹敵した。空ベクターのみに Dox を添加した場合は 16.29% であった。

トランスジェニックマウス作製の野生型及び変異 cDNA を作製した。Dox で発現調節される遺伝子は現在作製中である。GST 融合蛋白作製用 cDNA は N 末、C 末共に作製できた。Thy-1 プロモーターをもつ変異型 AB-DIP のトランスジェニックマウスは誕生したが、外見上異常を認めなかった。現在、野生型 AB-DIP 導入トランスジェニックマウスの作製を行っている。

D. 考察

AB-DIP は細胞周期を G2/M 期に停止させる機能を有することが分かった。ここでは示していないが、AB-DIP は G2/M 期にリン酸化されることも分かった。最近、アルツハイマー病患者由来剖検脳では細胞周期に関する遺伝子発現が高頻度に見られることが示されており、神経細胞に細胞周期を強制的に誘導すると細胞死が引き起こされることが示されている。従って、AB-DIP は $A\beta$ と結合し核へ移動し、何らかの機序で細胞周期に関わる遺伝子を発現させ、細胞死を誘導する可能性がある。

AB-DIP の *in vivo* での機能を見る為にトランスジェニックマウスを作製している。これまでに変異遺伝子発現マウスは誕生し、今の所外見上異常は見られない。現在、野生型遺伝子導入マウスを作製中である。このマウスができれば、アミロイド前駆体蛋白遺伝子トランスジェニックマウスとかけ合わせることで、 $A\beta$ によ

り細胞死が誘導されるモデルマウスが得られると期待される。

E. 結論

- AB-DIP は細胞周期を G2/M 期で停止させる機能がある。
- AB-DIP のトランスジェニックマウス作製を試み、変異 AB-DIP トランスジェニックマウスでは外見上異常が認められなかった。

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. Amyloid beta peptide binds a novel death-inducing protein, AB-DIP. FASEB J 2005 (doi: 10.1096/fj.05-3672fie)

H. 知的所有権の取得状況

なし

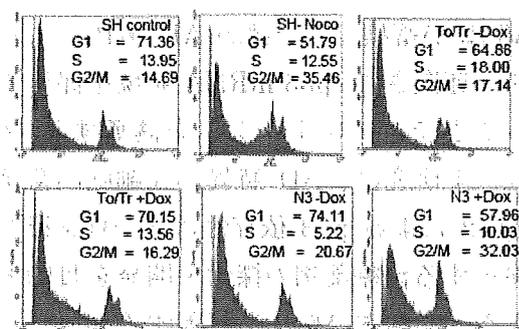


図 1. AB-DIP の細胞周期に及ぼす効果

Dox により AB-DIP を誘導すると G2/M 期の細胞が増加した。

塩酸アポモルフィンの細胞内 A β および p53 分解促進作用と神経細胞死の抑止

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 β 42 による神経細胞死を抑止するために、細胞内蓄積 A β 42 の分解促進薬を探索した。その方法として、培養細胞内に A β 40 を蓄積させ、その分解過程を定量的に評価した。今回は、そのような薬剤候補として、塩酸アポモルフィンを検討した。細胞内蓄積 A β を分解する酵素であるプロテアソームの阻害薬剤である MG132 を加えると、想定通り A β 分解が抑制されたが、塩酸アポモルフィンを加えるとその作用が中和され、A β 分解が回復した。一方、過酸化水素処理によるアポトーシス誘導では、p53 蛋白増加の抑制と細胞生存率の顕著な改善が見られた。以上の結果は、塩酸アポモルフィンが細胞内蓄積 A β 42 と p53 分解を促進し、アルツハイマー病における神経細胞死抑止薬の有力な候補であることを示唆した。

A. 研究目的

我々は、一般に想定されている細胞外 A β オリゴマーの神経細胞毒性よりも、ニューロン内での病的作用がアルツハイマー病(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、ニューロンの細胞質内に A β 42 が蓄積し、一部が AB-DIP により核に運搬され、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)。本研究は、AD 特異的な細胞内蓄積 A β 42 による p53 依存性ニューロン死を抑止する治療薬剤の探索・開発を目的とする。細胞内 A β 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 β 42 あるいは p53 の分解機構を促進することが有用である。本年度は、その一つとして塩酸アポモルフィンを検討した。

B. 研究方法

- 1) 昨年度同様に、hyperosmotic influx 法により、ヒト神経芽細胞(SH-SY5Y)の細胞質内に A β 40 を蓄積させ、それが経時的に分解していく過程をウェスタンブロット解析した。
- 2) プロテアソーム活性抑制剤である MG132、およびプロテアソーム促進薬と考えられる塩酸アポモルフィン(APO)を添加し、細胞内 A β 40 分解速度に変化をきたすか、ウェスタンブロットのバンド強度により定量的に評価した。
- 3) SH-SY5Y 細胞を過酸化水素(H₂O₂)処理することで細胞死を誘導し、24 時間後の p53 蛋白レベルをウェスタンブロットで、細胞生存率を Cell Titer Blue 法で、残存細胞を免疫染

色で形態学的に評価した。

C. 研究結果

培養細胞内に蓄積した A β ペプチドは 30 分間で明確に分解されたが、APO で分解が促進され、MG132 で分解が抑制された。MG132 の分解抑制作用は APO によりブロックされた(図 2A/B)。以上より、APO は AD 脳の神経細胞内に病的に蓄積した A β 42 の分解を回復し、神経細胞のミトコンドリアやシナプス障害、アポトーシスのリスクを軽減することを示唆する。

次に、H₂O₂ 処理による培養細胞のアポトーシス誘導において、APO 処理を加えると p53 蛋白増加の抑制(図 3A)、細胞生存率も有意に回復した(図 3B)。APO の抗アポトーシス作用は 10 μ M にピークがあり、それ以上では逆に効果は低下した(図 3B)。細胞形態的には、APO 追加により、H₂O₂ 処理による培養細胞のアポトーシス変化の抑制と残存細胞数の明らかな増加が見られた(図 4)。

D. 考察

我々は、培養細胞の細胞質内に直接 A β ペプチドを注入、ウェスタンブロットにより分解過程を観察・定量する実験システムを確立した。さらに、APO はプロテアソーム機能を促進することが示唆されている薬剤であり、その効果を調べたところ、予想通り細胞内 A β 分解を促進した。従って、APO では、加齢とともにニューロン内に蓄積する A β 42 の分解を促進し、ミトコンドリア障害やシナプス障害、p53 依存性アポトーシスによる神経

細胞死を抑止する効果が期待される。実際に、H₂O₂ 処理によるアポトーシス誘導における p53 発現増加の抑制が見られ、細胞生存率の回復が確認された。APO の細胞保護作用では、A β 42 の分解促進だけでなく、p53 の分解促進も重要と考えられる。

AD における分子レベルの治療標的の仮説を図 5 に示す。AD における病因には、体質的・遺伝的素因と加齢・虚血・外傷など後天的な素因が考えられるが、何れの場合も A β 42 産生が高まることが数多く報告されている。多くの研究者が標的としている細胞外 A β 42、特にそのオリゴマーの形成や毒性の抑止には、セクレターゼ阻害、凝集阻害、分解促進、ワクチン治療などが開発されつつある。一方、細胞内 A β 42 の蓄積抑止法については、ワクチン治療の部分的有効性が知られているが、詳細はほとんど研究されていない。我々が見出した APO の細胞内 A β 分解促進作用は、これまでの治療戦略とは異なる作用で、特に神経細胞死を直接抑制する薬剤として、AD 治療での実用化が期待される。今後は、トランスジェニックマウスなど AD モデル動物において、その有効性を検討していく予定である。

E. 結論

AD における細胞内 A β 42/p53 誘導性アポトーシス経路を抑止する治療薬の一つとして塩酸アポモルフィンを同定した。培養細胞系において、細胞内 A β および p53 分解促進とともに酸化ストレス誘導性アポトーシスに対する防御作用を示し

た。

F. 研究発表

【論文発表】

- 1) Ohyagi Y, Tsuruta Y, Motomura K, Miyoshi K, Kikuchi H, Iwaki T, Taniwaki T, Kira J: Intraneuronal amyloid β 42 enhanced by heating but counteracted by formic acid. *J. Neurosci. Methods*, in press, 2006
- 2) Ohyagi Y, Tabira T: Intracellular amyloid β -protein and its associated molecules in the pathogenesis of Alzheimer's disease (review). *Mini-Rev. Med. Chem.*, in press, 2006
- 3) Taniwaki T, Okayama A, Yoshiura T, Togao O, Nakamura Y, Yamasaki T, Ogata K, Shigeto H, Ohyagi Y, Kira J, Tobimatsu S: Functional network of the basal ganglia and cerebellar motor loops in vivo: Differential activation patterns between self-initiated and externally triggered movements. *NeuroImage*, in press, 2006
- 4) Furuya H, Murai H, Takasugi K, Ohyagi Y, Urano F, Kishi T, Ichinose H, Kira J: A case of late-onset Segawa syndrome (autosomal dominant dopa-responsive dystonia) with a novel mutation of the GTP-cyclohydrolase I (GCH1) gene. *Clin. Neurol. Neurosurg.* in press, 2006
- 5) Furuya H, Ikezoe K, Ohyagi Y, Miyoshi T, Fujii N: A case of progressive posterior cortical atrophy (PCA) with vivid hallucination: are some ghost tales vivid hallucinations in normal people? *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, in press, 2006
- 6) 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 β 42 activates p53 promoter: a pathway to neurodegeneration in Alzheimer's disease. *FASEB J* 19: 255-257, 2005
- 7) Furuya H, Shinnoh N, Ohyagi 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
- 8) Furuya H, Yamada T, Ohyagi 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. (Suppl 1)*, S39-S44, 2005

【学会発表】

- 1) 大八木保政 他：アルツハイマー病における細胞内アミロイド β 蛋白分解促進薬の探索。第46回日本神経学会総会、鹿児島、2005年5月26日
- 2) 三好克枝、大八木保政 他：プレセ

ニリン1遺伝子変異が促進するアポトーシス経路の検討。第46回日本神経学会総会、鹿児島、2005年5月26日

- 3) 大八木保政 : Pathogenesis of intracellular amyloid β -protein 42: A novel therapeutic target in Alzheimer's disease. 第48回日本神経化学会福岡大会(シンポジウム)、福岡、2005年9月29日

- 4) 大八木保政 他 : アルツハイマー病における細胞内蓄積 $A\beta$ の意義とそ

の分解促進薬の探索。第24回日本認知症学会、大阪、2005年9月30日

G. 知的所有権の取得状況

発明の名称 : アルツハイマー病の予防・治療剤

発明者 : 大八木 保政

出願人 : 国立大学法人九州大学

出願番号 : 特願2006-73054

出願日 : 平成18年3月16日

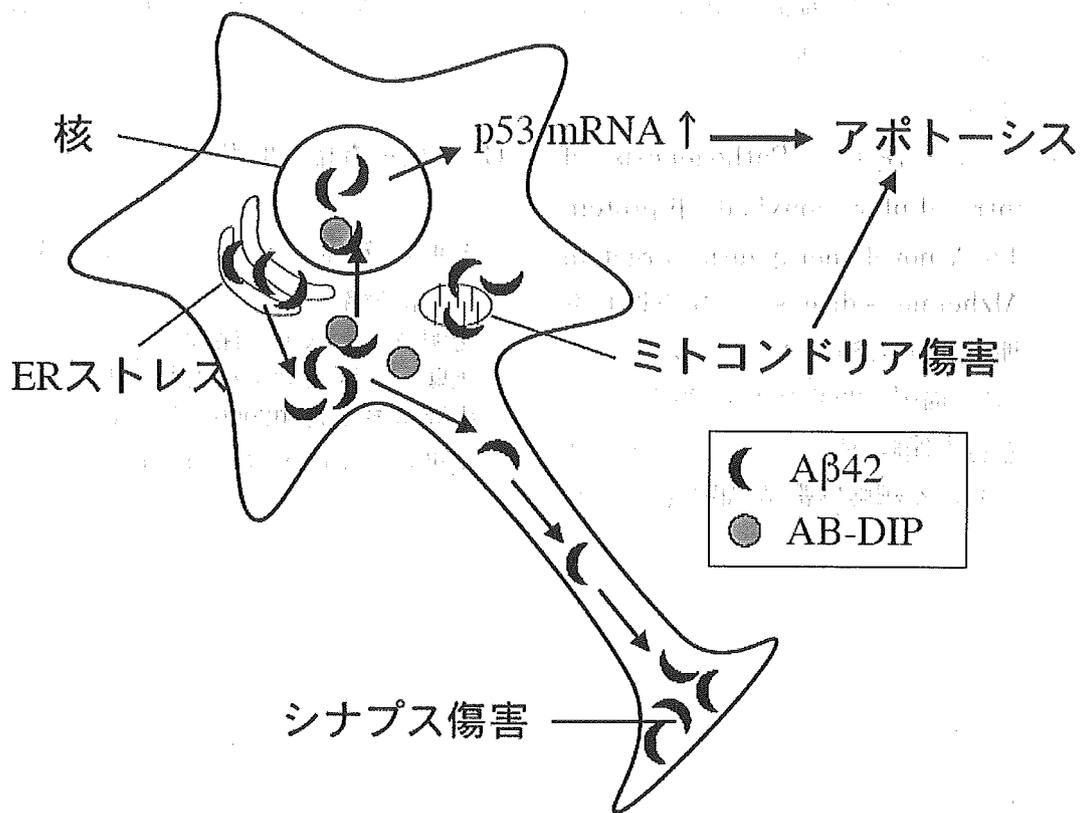


図1. 細胞内 Aβ42 による神経細胞障害機序と p53 依存性アポトーシス。老化(酸化ストレス)や Aβ42 の過剰産生/分解低下により神経細胞質内 Aβ42 蓄積が生じ、ER ストレス、ミトコンドリア障害、シナプス障害を生ずるとともに、その一部はカスパー9で活性化された AB-DIP により核へ移行、p53 mRNA 発現増強を介して、神経細胞のアポトーシスを促進する。従って、Aβ42 分解/p53 分解の促進は、神経細胞の機能障害やアポトーシス死を抑制すると考えられる。

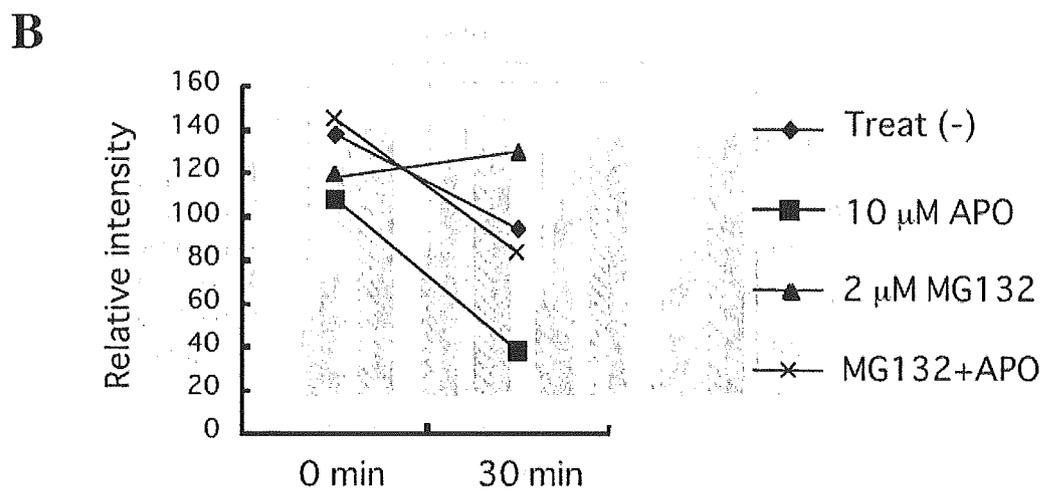
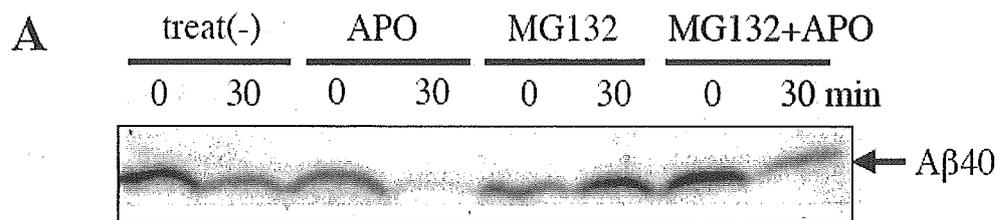


図 2. SH-SY5Y 細胞に A β 40 ペプチド蓄積後の経時的な減少における MG132 の分解抑制と APO によるその分解促進。A) ウェスタブロット解析。B) 0 分/30 分後のバンド強度の変化。

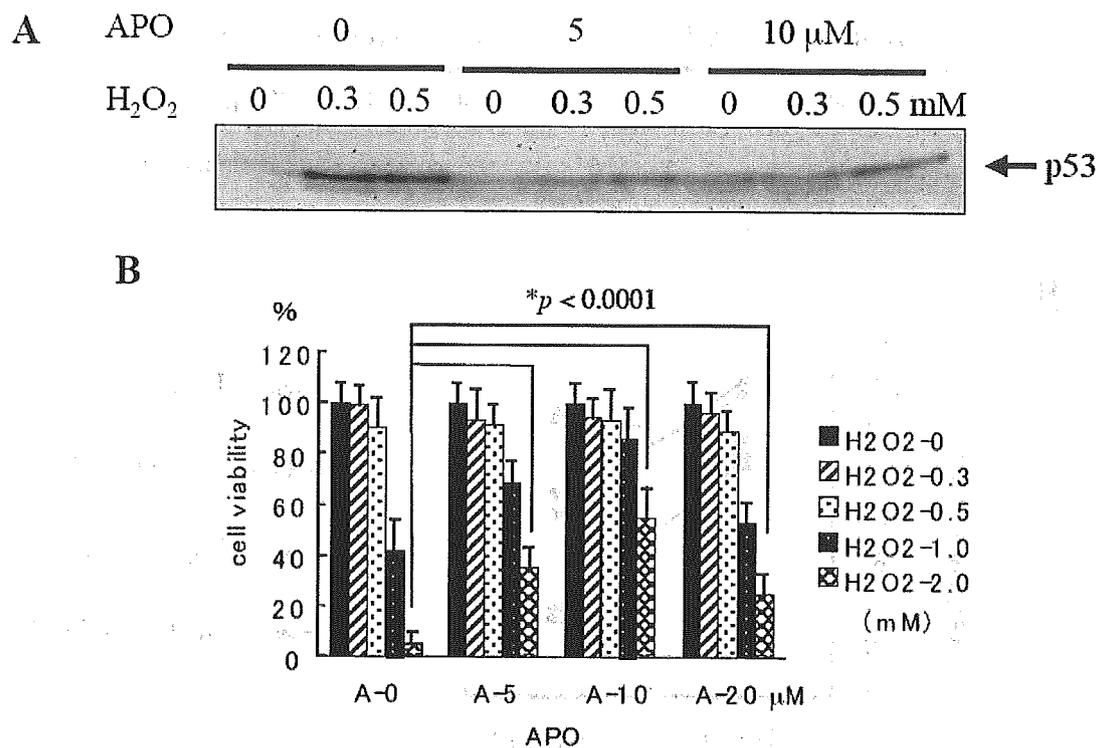


図 3. 過酸化水素(H_2O_2)処理による 24 時間後の p53 蛋白増加とアポトーシス誘導における APO の抑止効果と細胞生存率の回復。A) p53 のウェスタンブロット解析。B) 細胞生存率。APO 処理により、 H_2O_2 誘導性の p53 増加の抑制と細胞生存率の回復を認める。APO の抗アポトーシス作用は 10 μM にピークがある。

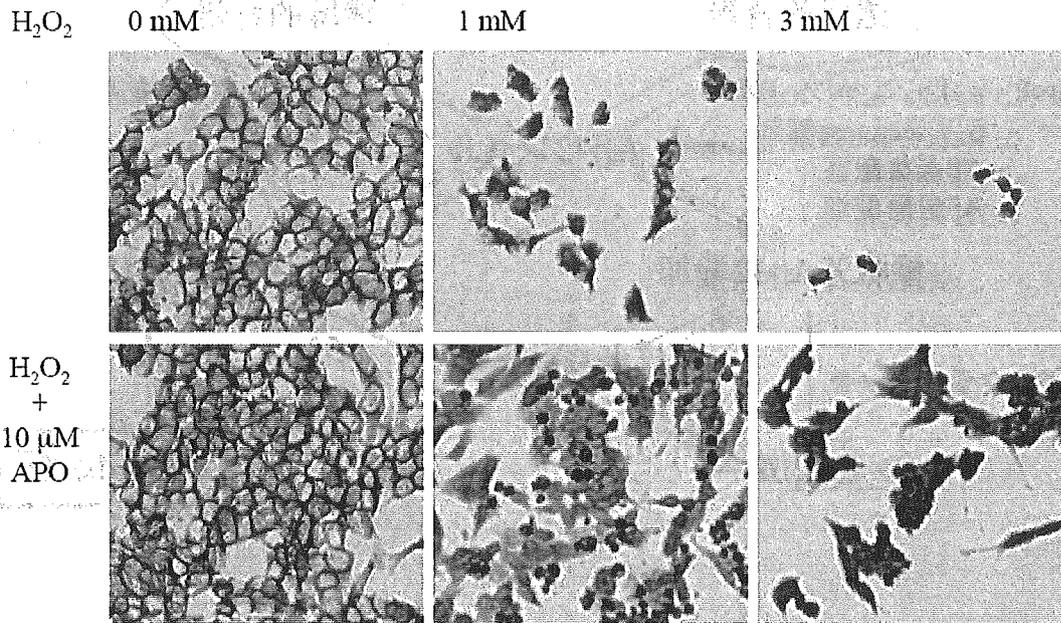


図4. APOによる抗アポトーシス作用。SH-SY5Y細胞の抗APP抗体による免疫染色。
H₂O₂処理によるアポトーシス死はAPO添加により明らかに抑制され、細胞の
残存が観察される(X200)。

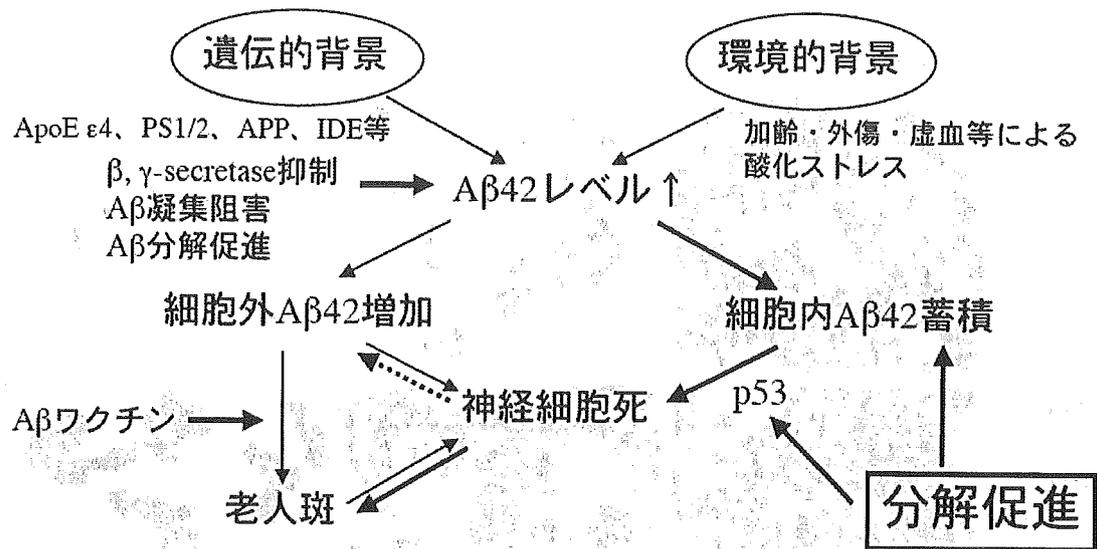


図 5. アルツハイマー病における分子病態の細胞外・細胞内 Aβ42 カスケード仮説と治療戦略。遺伝的背景および環境的背景とも共通の経路として Aβ42 産生レベルが上昇する。細胞外分泌 Aβ42 はオリゴマーとして神経細胞死を誘導し、細胞内蓄積 Aβ42 は p53 経路を介して神経細胞死を誘導する。細胞外 Aβ42 を標的とする種々の治療法に加えて、細胞内 Aβ42 および p53 を分解する治療薬が必要であり、APO はその一つとなりうる。