

平成18年度

政策創薬総合研究
重点研究報告書（I）

目 次

課題番号			
KH11001	バイオフィトニクスを利用した細胞組織障害を視る、測る、解析する技術の開発	川西 徹	1
KH11002	成長制御機構の解明と成長障害治療法の開発	緒方 勤	16
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司	21
KH21004	動脈硬化症と血栓症にかかわるスフィンゴシン1-リン酸 (S1P) 受容体 (S1P3) の拮抗薬の開発	望月直樹	30
KH21005	遺伝子改変動物を用いた病態関連因子の解明と創薬への応用に関する研究	田上昭人	40
KH21006	病態時の侵害情報伝達に関与するプリン受容体の機能解明	井上和秀	100
KH21007	蛋白立体構造異常を原因とするコンフォメーション病に対する病態解明と創薬探索システムの確立	桃井 隆	126
KH21008	高密度CGHアレイを用いた新規白血病・リンパ腫治療薬の標的分子の探索	小川誠司	144
KH21009	脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	花田賢太郎	154
KH21010	繊維芽細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG1蛋白の関連と臓器繊維化の機序解明	香坂隆夫	168
KH21011	血管におけるレクチンを介する生体防御システムの解明と創薬への応用	若宮伸隆	181
KH21012	コネキシン遺伝子の癌抑制機能の網羅的解析；癌予防および治療への応用	矢野友啓	196
KH21013	免疫グロブリン大量静注療法的作用機序解明と新しい治療標的分子の探索	阿部 淳	208
KH21014	受精および初期胚発生における糖鎖の役割解析とその応用に関する研究	藤本純一郎	221
KH21015	細胞内エネルギー代謝制御分子の機能発現機構の解明と新規治療薬への応用	江崎 治	235
KH21018	アルツハイマー病における新規創薬ターゲット検索のための、APP細胞内ドメインの機能解析	中山耕造	247
KH21019	創薬への応用を目標としたB細胞の分化・増殖・細胞死の制御機構解明に関する研究	上出利光	262
KH21021	エンドトキシン認識・刺激伝達機構の解明と医療への応用に関する研究	西島正弘	286
KH21022	ウイルスRNA結合ペプチドを用いたC型肝炎治療薬の開発	鈴木哲朗	300
KH21023	末梢血幹細胞の分化増殖機構の解明と創薬への応用に関する研究	葛西正孝	310
KH21101	DNAマイクロアレイによる多発性硬化症の迅速診断法の樹立に関する研究	佐藤準一	318

KH22073	機能性精神疾患のハイスループットSNPs解析と機能解析による創薬標的分子の解明	功刀 浩 …… 344
KH31024	超難溶性薬物の効率的製剤化に非晶質の特異性を活用する技術とその評価法の確立	吉岡澄江 …… 358
KH31025	生薬及び漢方処方 of 科学的品質保証に関する研究	合田幸広 …… 373
KH31026	食中毒細菌の新規迅速検査法の開発とその評価法に関する研究	工藤由起子 …… 390
KH31027	ハイスループット・ヒト型遺伝毒性試験系の構築	能美健彦 …… 402
KH31028	ヒト肝細胞で置換された肝臓を持つマウスの医薬品開発への利用ー非拘束マウスの胆汁採取分析技術の確立ー	吉里勝利 …… 417
KH31029	高度分析評価技術を応用した医薬品製剤開発および製造工程管理手法の研究	檜山行雄 …… 435
KH31030	患者個別化薬物治療のための遺伝子タイピング法及びメタボロミクス的手法の開発に関する研究	斎藤嘉朗 …… 449
KH31031	細胞医療に用いられる細胞組織利用医薬品の品質・安全性評価技術の開発	山口照英 …… 466
KH31032	医薬品等の有効性・安全性を保証するための分析・解析技術の評価と標準化に関する研究	林 讓 …… 481
KH31034	プロテオミクス及び構造生物学的アプローチ等を用いたバイオ医薬品の特性解析・品質評価技術の開発	川崎ナナ …… 494
KH31035	生物由来製品のウイルス安全性に関する基盤研究	内田恵理子 …… 509
KH31036	臨床薬理学的視点による薬効ゲノム情報活用のための基盤研究	東 純一 …… 525
KH32074	IT技術を用いた低コストかつ高品質な大規模臨床試験実施基盤の構築	永井洋士 …… 537
KH41037	抗フリーラジカル療法を目指した基盤研究と創薬への応用	網脇祥子 …… 551
KH41038	ボツリヌス神経毒素有効成分を利用したジストニア・痙縮等の治療法の確立と筋萎縮性側索硬化症に対するdrug delivery systemの開発	梶 龍兒 …… 566
KH42075	熱帯病・寄生虫症に対する稀少疾病治療薬の輸入・保管・治療体制の開発研究	名和行文 …… 576

アルツハイマー病における新規創薬ターゲット検索のための、APP細胞内ドメインの機能解析

所属 信州大学医学部、人体構造学・講師
研究者 中山 耕造
研究期間 平成16年4月～平成19年3月

1. 研究要旨

APPの細胞内ドメイン(APPIC)は、 γ -セクレターゼによって細胞膜から切り出され、細胞質へと放出される事になる。我々は、APPICが神経細胞に選択的に核へ移行し、転写因子E2F1に結合してアポトーシスを誘導することを示した。また、アルツハイマー病(AD)患者の脳に、多量のE2F1が存在することを示した。さらに遺伝子相関解析をおこない、E2F1とE2F4がADの発症リスクに関与している可能性を示唆した。これらのことから、APPICがE2Fファミリーを介してADの発症に関与している可能性が考えられた。現在、APPICのAD発症への関与を直接的に検討するため、脳内でAPPICの発現を制御できるトランスジェニックマウスを作製している。加えて、APPIC結合蛋白質としてチュブリンを同定し、APPICはチュブリンの重合を促進する事を示した。

分担研究者

- (1) エーザイ株式会社シーズ研究所
佐藤 俊孝
- (2) 国立病院機構・久里浜アルコール症センター
樋口 進

2. 研究目的

多くの神経疾患、特にアルツハイマー病は加齢に伴って発症し、現在のところ有効な治療法もない。従って高齢化社会において、有効な治療法の開発は急務であり、新規の創薬ターゲット分子を見いだすためにも、新しい観点からの病因の解明に期待が寄せられている。

NotchとDeltaは共に膜蛋白質で、神経細胞の分化において重要な役割をおこなっており、アルツハイマー病(AD)やCADASIL等の疾患との関連で注目されている。現在までは、Deltaは単なるNotchのリガンドであり、その細胞内ドメインに機能はないと考えられていた。しかしながら、我々はDeltaの細胞内ドメインに結合する蛋白質を同定し、Notch同様にDeltaの細胞内ドメインも、 γ -セクレターゼによって切り出され、核に移行して転写因子Smadに結合して転写を調節することを示している。近年になって、多くのI型膜蛋白質が γ -セクレターゼによって切断され、細胞内ドメインが膜から切り出されることが知られてきている。従って、ある種のレセプター膜蛋白質ではDelta同様に、シグナルを受け取ると最終的に γ -セクレターゼによって細胞内ドメインが切り出され、それが核に移行し、転写因子に結合して転写を調節することはある程度一般化されるのではないかと考え、 γ -セクレターゼによって調

節されるシグナル伝達機構が広く存在する可能性を提唱している。

Amyloid Precursor Protein (APP)に関しても、国外の複数のグループから、 γ -セクレターゼによって切断されて、細胞膜から切り出された細胞内ドメインが核に存在することが報告されている。これらのことから、我々は現在のところ生理的機能があまり解析されていないAPPも γ -セクレターゼによって細胞内ドメインが切り出されることに注目して、NotchやDeltaと同様に、切り出された細胞内ドメインが核に移行して特定の遺伝子の転写を調節しており、それがADに関係している可能性を考えて研究している。

これらの結果を基に、本研究の直接的な目的は、APPの細胞内ドメインの機能解析にあり、具体的には以下の3点に焦点を絞って研究を進めた。

- (1) APPの細胞内ドメインの生理的・病的機能解析
- (2) APPの細胞内ドメイン結合蛋白質の同定
- (3) APPの細胞内ドメインに結合する転写因子E2Fファミリー遺伝子の多型とAD発症の連関の解析の同定

3. 研究方法

APPの細胞内ドメインを発現する embryonic carcinoma細胞(P19細胞)の作製と神経細胞への分化誘導に伴う細胞死の判定

APPの細胞内ドメイン(APPIC)をコードするcDNAとFLAG遺伝子を連結した発現ベクターをP19細胞に導入し、4週間G418で選択してG418耐性の複数のクローンを得た。なお、コントロールとして、発現ベクターのみを導入したP19細胞も同様に作製した。

また、全長の APP を発現する P19 細胞も作製した。

P19 細胞の神経細胞への分化誘導は、レチノイン酸存在下で 4 日間細菌用プレートをを用いて浮遊培養した後に、レチノイン酸を除いて通常の細胞培養用のプレートに撒き直して培養することでおこなった。この方法で、90%以上の P19 細胞が、神経細胞へと分化した。

細胞の生死は、トリパンブルーによる染色で判断している。また常法に従って、DNA の断片化を電気泳動により、更に TUNEL 法による染色をおこなってアポトーシスの判定をしている。

Protein/DNA complexes with biotin-labeled probe mix

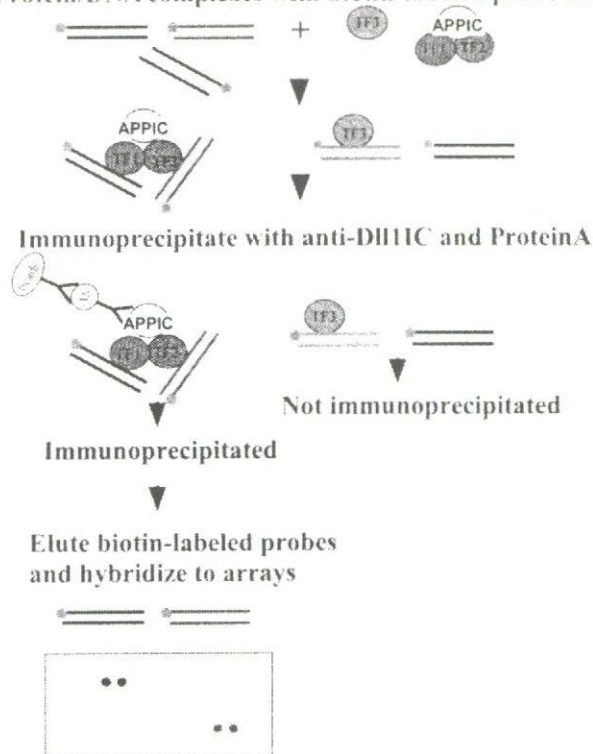


図 1 APPIC 結合転写因子のスクリーニング

APP の細胞内ドメインと結合する転写因子のスクリーニング (図 1)

仮に、細胞内ドメインに結合する転写因子があったとしても、存在する量が少ないため通常の方法では同定できない可能性がある。従って、結合転写因子を同定するために、まったく新しい方法を考えた。具体的には各週齢及び胎仔のマウスの脳から核蛋白質を抽出し、既知の 154 種類の転写因子の DNA 結合配列を合成して加え、APP の細胞内ドメインに対する抗体を用いて免疫沈降した。転写因子には合成 DNA が結合しており、もし転写因子が細胞内ドメインに結合すれば、細胞内ドメイン/転写因子/合成 DNA の三者の複合体が免疫沈降されるはずである。この沈降した複合体から DNA を回収しドットプロットを用いて、どの転写因子の結合配列が共沈降したかにより、結合する転写因子を推定した。

脳内で APPIC の発現をコントロールできる、トランスジェニックマウスの作製

バックが低い事より、Tet Off システムを用いる事にした。ベクターとしては、pBI を用いた。このベクターは、中央に転写因子である tTA の結合部位である TRE を持ち、さらにその両側に両方向性に CMV のミニマムプロモーターを持っている。APPICcDNA の 5' 側に 3 個の Flag Tag を付け、この片方の CMV ミニマムプロモーターの下流にクローニングした。さらに、もう片側の CMV ミニマムプロモーターの下流に EGFP をクローニングした。

常法に従って発現ベクターを受精卵に注入して、100 個体のマウスを得た。

E2F1 遺伝子の相関解析

対象は NINCDS-ADRDA の “probable” AD の基準を満たす日本人の孤発型の臨床 AD 症例 284 例である (男性: 87 例、女性: 197 例、平均年齢 ± 標準偏差 75.3 ± 9.0 歳)。正常コントロールは年齢・性をマッチさせた日本人 274 名である (男性: 96 名、女性: 178 名、73.9 ± 5.3 歳)。全てのコントロールの認知機能は、Mini-Mental State テスト (MMSE) で正常域に入っている。

今回相関解析に使用した SNP は rs2071056 で、exon 4 と 5 の間 (exon 5 の 5' の exon/intron 境界から約 160 bp 上流) の intron に存在する。相関解析は、AD 群と control 群のみの比較だけでなく、性、AD の発症年齢、APOE4 の存在の有無等で層化して検討した。

E2F4 遺伝子の相関解析

Sequencing の対象とした症例はすべて日本人の AD 症例である。AD は臨床的に診断されたものであり、全症例が NINCDS-ADRDA が制定した “probable” AD の基準を満たしている。E2F4 の sequencing の対象としたのは 12 例の孤発 AD 症例である。Apolipoprotein E 遺伝子の $\epsilon 4$ allele (APOE4) は、AD の強力な遺伝的リスク要因である。そこで、この影響を除外する意味で、我々の有する AD 症例の中で、APOE4 を有さない症例を sequencing の対象とした。

E2F4 の coding region を含む exon は全部で 10 ある。この全ての exon と両側の flanking intron をそれぞれ 40~60 base-pair (bp) ずつ sequencing した。ただし、3' 側の untranslated region については、stop codon より約 70bp までしか確認しなかった。Sequencing には、ABI Prism 310 Genetic Analyzer を使用した。ATG の start codon を含む exon を本報告書では exon 1 とする。Exon 9 および 10 は近傍に位置していたので、同じ primer set で一緒に sequence した。

その結果、exon 7 に VNTR を同定した。VNTR の repeat 数は、主に ABI Prism 310 Genetic Analyzer の波形で調べた。しかし、その repeat 数を確認するために、exon 7 の PCR 産物を 1 本鎖にして pGEM-T Easy Vector (Promega, USA) に subcloning して再び sequence した。

アフィニティークロマトグラフィーによる APP 細胞内ドメイン結合タンパク質の単離と同定

神経細胞への分化特異的に、APP の細胞内ドメインに結合するタンパク質があるのか否かについて、³⁵S-Met ラベルによる実験を行った。P19 細胞を α -MEM 培地で培養後、レチノイン酸添加、未添加群に分け、リプレATINGした。1 日培養後、³⁵S-Met を添加して終夜培養し、細胞内タンパク質をラベルした。培養後の細胞はホモジナイズ後に可溶性画分と膜画分に分け、それぞれの画分に大腸菌に発現させ精製した GST-APPIC フュージョン蛋白質を添加してインキュベートした後、グルタチオンセファロース (GE バイオサイエンス) を用いて細胞内ドメイン-タンパク質複合体を回収した。結合タンパク質は、バッファーでセファロースを洗浄後、NaCl 濃度を段階的に高くすることにより溶出した。

LC/MS によるタンパク質の同定は、LTQ (サーモエレクトロン) を用い、解析用ソフトウェア Mascot を用いて行った。

APPIC のチューブリン重合への影響は、以下の方法で検討した。PEM-G buffer (80mM PIPES pH 6.9-1mM EGTA-0.5mM MgCl₂-10% Glycerol) で溶解したブタ脳チューブリン (2.5mg/ml) に、GST (コントロール)、あるいは GST-APPIC を加え、37°C でインキュベートして経時的に 350nm の吸光度を測定した。対照実験として、微小管蛋白重合を促進するタキソール (微小管の安定化、過剰形成を引き起こし、微小管の脱重合を起りにくくし、その結果がん細胞分裂を阻害して抗腫瘍活性を発揮) を用いた。

その他の実験は、通常の方法でおこなった。

(倫理面への配慮)

ヒトの試料を用いる研究は、厚生労働省の臨床研究の倫理指針に従って、国立療養所久里浜病院・臨床研究部で限局しておこなった。

4. 研究結果

APP の細胞内ドメイン (APPIC) は、神経細胞に選択的な細胞内毒性を持つ

前述した仮説が正しいならば、APPIC は細胞内毒性を持つことになる。この点を調べるため、APPIC 及び全長の APP を発現する embryonic carcinoma 細胞 (P19 細胞) をレチノイン酸処理し、その後レチノイン酸を除くことにより神経細胞へと分化誘導した。その結果、発現ベクターのみを持つコントロール細胞同様に、90%以上の細胞が神経細胞へと分化した。全ての細胞において、分化誘導後 2 日目には突起を伸ばした神経細胞が認められた。

培養を続けると、コントロール細胞では細胞が増殖しながら神経細胞へと分化し続け、多数の神経細胞が出現した。しかしながら、APPIC 及び全長の APP を発現する P19 細胞の場合、培養を続けると明らかに死んでいる細胞が多数出現し、1 週間後には、全

ての神経細胞が死滅した。

細胞死を経時的に調べるために、分化誘導後 3 日目、4 日目、5 日目に細胞を回収し、トリパンブルーで染色して死細胞数を数えた (図 2)。その結果、コントロール細胞はこの期間を通して 10% 以下の細胞しか死んでいなかった。しかしながら、APPIC 及び全長の APP を発現する P19 細胞の場合、3 日目にはコントロールと同程度の死細胞しかないにもかかわらず、その後、明らかに死細胞が増えていた。細胞死数は、APPIC を発現する細胞の方が全長の APP を発現する P19 細胞よりも倍程度多かった。従って、APPIC は、神経細胞に選択的な細胞内毒性を持つと考えられた。

ここでみた細胞死がアポトーシスによるものかどうか調べるために、断片化した DNA を回収し電気泳動をおこなった (図 3)。その結果、全長の APP を発現させた細胞と細胞内ドメインのみを発現させた細胞では、神経細胞への分化に伴って、DNA のラダーが観察された。さらに、分化誘導後 4 日目に TUNEL 法で染色し、フローサイトメーターで陽性細胞の割合を測定したところ、コントロールでは 4% 程度の細胞しか陽性でなかったが、APPIC を発現した細胞では 39% が TUNEL 陽性となった。従って、この細胞死はアポトーシスによっておこなっていると結論できた。

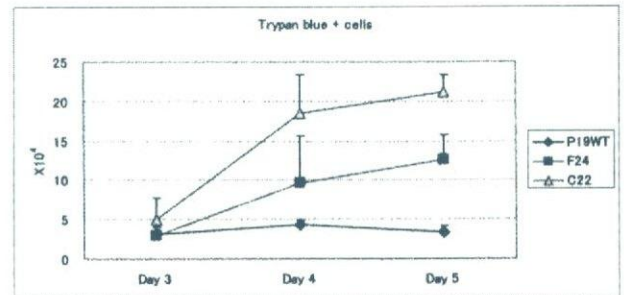


図 2、全長の APP (F24) と APPIC (C22) を発現した P19 細胞の神経分化誘導後の死細胞数。P19WT は発現ベクターのみを導入したコントロール細胞。

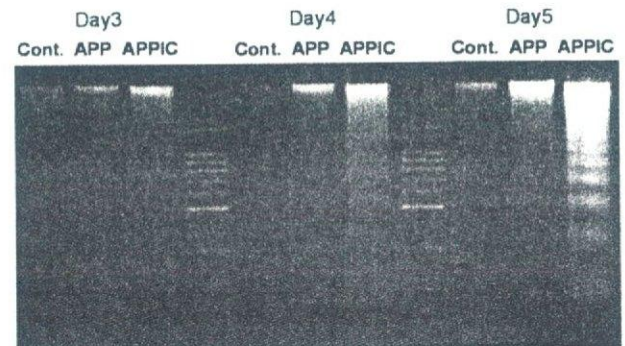


図 3、DNA の断片化。全長の APP を発現させた細胞 (APP) と細胞内ドメインのみを発現させた細胞 (APPIC) では、神経細胞への分化に伴って、DNA のラダーが観察され、アポトーシスが起っていることが明らかとなった。

APPIC は、核に存在する

前述したように、我々は APP も Notch や Delta 同様に、 γ -セクレターゼによって細胞内ドメインが切り出され、切り出された細胞内ドメイン (APPIC) が核に移行して特定の遺伝子の転写を調節しているのではないかと考えている。もしこの仮説が正しければ、APPIC は核に存在するはずである。

実際、傷害された脳において、APPIC が核に存在しているという論文が、国外から多数だされている。

我々も、抗 APPIC 抗体を用いて、8 週齢の正常雄マウス大脳皮質の免疫染色をおこなった。その結果 1 割以下の神経細胞ではあるが、核がこの抗体で染色される事が明らかとなった。

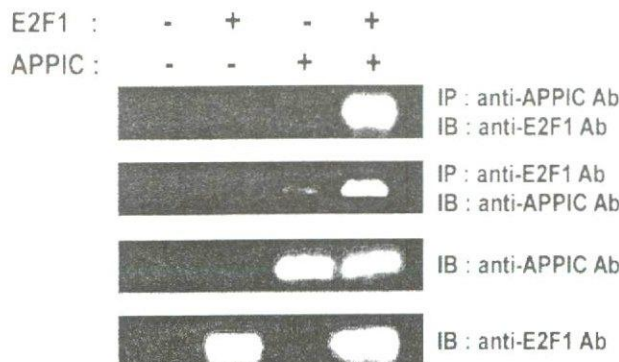


図 4、共免疫沈降により、E2F1 と APP 細胞内ドメイン (APPIC) の結合を示す。IP:免疫沈降、IB:ウエスタン

APP の細胞内ドメインに結合する、転写因子の同定

転写因子は一般的に量が少なく、通常の方法では検出できない可能性が高い。この点を克服するために、研究方法で詳しく述べたように新規の方法を開発した (図 1)。その結果、E2F1 が APPIC 結合転写因子として同定された。このスクリーニング方法を用いた場合、成体マウスの脳の核蛋白では E2F1 は強いシグナルを生じるが、胎仔の脳の核蛋白質では全くシグナルを示さない。この結果は、E2F1 と APPIC が成体脳の核内で、複合物を形成して存在することを強く示唆している。

E2F1 と APPIC の結合を確認するために、E2F1 と APPIC の発現ベクターを Cos7 細胞に導入して、免疫沈降をおこなった。図 4 に示すように、発現ベクターのみを導入したコントロール及び、E2F1 もしくは APPIC の発現ベクターのみを導入した Cos7 の場合、シグナルは検出できない。しかしながら、E2F1 と APPIC の両方の発現ベクターを導入した場合、強いシグナルが検出できた。この結果は、E2F1 と APPIC が結合することを明確に示している。

アルツハイマー病 (AD) における E2F1 の発現

これまでの結果によると、APPIC による細胞死の誘導は、E2F1 に依存していると考えられる。そこで、実際の AD 脳における、E2F1 の発現を検討した。大

脳皮質の委縮の進んだ典型的な AD 脳 3 検体から各 3 か所を選び、蛋白質を抽出してウエスタンブロッティングをおこなった。その結果、図 5 に示すように、1 つのサンプル以外では強い E2F1 の発現が認められた。

今回は、ヒト正常脳が手に入らなかったため、コントロールが無いが、E2F1 は、正常脳では発現が極めて低いことが知られており、やはりこの強い発現は AD の病態に何らかの形で関係している可能性が高いと考えている。

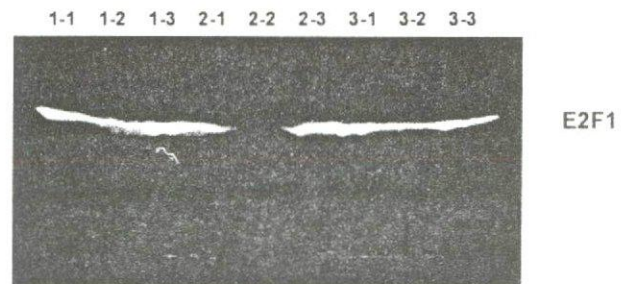


図 5、アルツハイマー病患者脳における、E2F1 の発現 (ウエスタンブロッティング)

脳内で APPIC の発現をコントロールできるマウスの作製

常法に従って Tet-off 発現ベクターを受精卵に注入して、100 個体のマウスを得た。そのうちの 27 系統は、導入遺伝子を持つトランスジェニックマウスであった。さらに 7 系統は、1 コピーの導入遺伝子を持つと考えられた。

脳内で APPIC の発現をコントロールできるマウスを得るために、現在、これらの 27 系統のトランスジェニックマウスを CamKII-tTA トランスジェニックマウスと交配している。

行動異常を示すマウスにおける、APPIC の発現解析

これらの解析をおこなっているうちに、1-61 という系統のトランスジェニックマウスが、生後 10 ヶ月程度から head tossig 及び運動失調という行動異常を示すようになった。このマウスは CamKII-tTA マウスと交配していないもので、tTA の発現はないはずである。しかしながら、何らかの原因で APPIC が発現するようになったのではないかと考え、RT-PCR により検証した (図 6)。

コントロールとしては、系統 1-431 と CamKII-tTA トランスジェニックマウスを交配して得られたダブルトランスジェニックマウス (double)、pBI-EGFP/3XFLAG-APPIC のみを持つマウス (EGFP)、CamKII-tTA のみを持つマウス (CamKII) を用いた。図 6 に示すように、全てのコントロールマウスにおいて、APPIC の発現は認められなかった。しかしながら、行動異常を示した系統 1-61 では、大脳のみならず小脳でも、有為に APPIC が発現している事が明らかとなった。

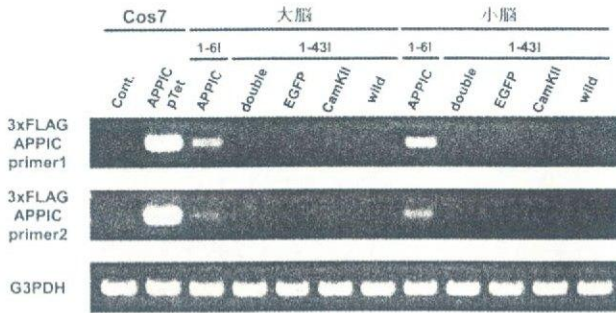


図6. 行動異常を示す1-61マウス脳における、RT-PCRによるAPPICの発現検討

1-61マウス、及びコントロールとして系統1-431とCamKII-tTAトランスジェニックマウスを交配して得られた各種マウスの大脳と小脳からRNAを抽出し、2種類のプライマーセットを用いてRT-PCRをおこなった。

インターナルコントロールとしては、G3PDHを増幅した。ポジティブコントロールとしては、Cos7細胞にAPPICを発現させたものを用いた。

表1. E2F1 gene の rs2071056 をマーカーとしたアルツハイマー病と健常者の遺伝子相関研究結果 (APOE genotype 別)

	Genotype			Allele	
	T/T	T/C	C/C	T	C
E4(-)	43	69	21	155	111
AD	(32.3)	(51.9)	(15.8)	(58.3)	(41.7)
Control	80	111	32	271	175
	(35.9)	(49.8)	(14.4)	(60.8)	(39.2)
E4(+)	65	65	21	195	107
AD	(43.1)	(43.1)	(13.9)	(64.6)	(35.4)
Control	15	22	14	52	50
	(29.4)	(43.1)	(27.5)	(51.0)	(49.0)

- APOE 遺伝子の genotype の分類は、APOE4 の有無に従って絵類した。
- 表中の数字は実数。その下の括弧内の数字は、それぞれ genotype、allele 間の比較におけるパーセント。
- APOE4(-)群では、AD と control の比較で、genotype、allele とともに有意差なし。しかし、APOE4(+)群では、genotype で $\chi^2=5.826$ 、 $P=0.054$ 、allele で $\chi^2=5.926$ 、 $P<0.025$ 。

アルツハイマー病(AD)における、E2F1 遺伝子の解析

これまでの一連の研究は、E2F ファミリー、特に E2F1 がアルツハイマー病 (AD) のリスクに関係していることを示唆している。

しかしながら、12 例の AD 症例における E2F1 遺伝子の sequencing の結果、variation は同定できなかった。既に知られているアミノ酸置換を伴う変異(例えば、His252Arg、Met276Val、Asn311Thr、Ser393Arg など) も同定できなかった。

さらに、既報の E2F1 遺伝子の SNP の中で informative な SNP を用いて、case-control デザイン

の遺伝子相関解析を行い、AD 群と control 群で rs2071056 (T/C の SNP) の genotype および allele 頻度を比較した。しかし、全体、性別、発症年齢別のいずれも差は認められなかった。

しかしながら、APOE4 の有無による比較では差が見られた。APOE4 は AD の遺伝的リスク要因である。APOE4 の存在は、AD の発症年齢を早めることが確認されている。そこで APOE4 の confounding 効果を除外するために、APOE4 の有無で、AD および control を層化して、T/C の分布を比較した。その結果、APOE4 を有さない群の比較では、差が認められなかった。しかし、APOE4 を有する群間の比較では、AD 群で T allele の頻度が有意に高かった (表1)。

表2. E2F4 gene の VNTR をマーカーとしたアルツハイマー病と健常者の遺伝子相関研究結果

Genotype	AD	Control
10/13	0 (0.0%)	3 (0.9%)
11/13	0 (0.0%)	4 (1.2%)
12/13	3 (0.9%)	4 (1.2%)
13/13	303 (89.6%)	305 (91.0%)
13/14	18 (5.3%)	12 (3.6%)
13/15	9 (2.7%)	7 (2.1%)
13/16	4 (1.2%)	0 (0.0%)
16/16	1 (0.3%)	0 (0.0%)
計	338 (100.0%)	335 (100.0%)

AD vs Control

$\chi^2 = 13.5863$, $df = 7$, $P = 0.0590$ 。

表3. E2F4 gene の VNTR をマーカーとしたアルツハイマー病と健常者の遺伝子相関研究結果 (short allele と long allele をグループ化したもの)

Genotype	AD	Control
10-12/13	3 (0.9%)	11 (3.3%)
13/13	303 (89.6%)	305 (91.0%)
13/14-16, 16/16	32 (9.5%)	19 (5.7%)
計	338 (100.0%)	335 (100.0%)

AD vs Control

$\chi^2 = 7.8785$, $df = 7$, $P = 0.0195$ 。

E2F4 遺伝子の相関解析

12 例 AD 症例における E2F4 遺伝子の sequencing の結果、exon7 以外に variation は全く同定できなかった。Exon 7 の VNTR は、AGC または CAG の triplet repeat で、wild type は 13 リピートである。

AD 群と control 群で E2F4 exon7 の VNTR の genotype および allele 頻度を比較した。表2のように、triplet repeat は 10 から 16 に分布していた。しかし、wild type の 13 repeat の数が圧倒的に多く、相関研究には必ずしも informative とは言えない多型である。AD と control の分布を比較すると、control 群に比べて AD 群で long allele (14 repeat から 16 repeat) の頻度が多く、逆に short repeat (10 repeat から 12 repeat) が少ない傾向があった。AD 症例で、非常に稀有な 16 repeat のホモ接合体が 1 例存在した。

表3は、short allele を有する者、および long allele を有する者をそれぞれ 1 群にまとめたもので

ある。表の通り、上記の傾向がより明らかで、AD と control 間で分布に有意差が認められる。

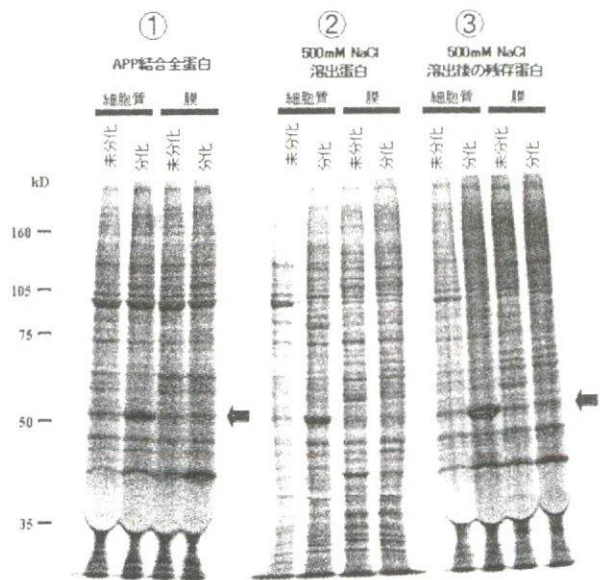


図7. ^{35}S -Met ラベルによる細胞内ドメイン結合タンパク質の検索。分子量 50,000 に強いバンドが見られた (矢印)。

アフィニティークロマトグラフィーによる APPIC 結合タンパク質の単離と同定

^{35}S -Met を培地に加え、P19 細胞をラベルした。その細胞から各フラクションを調整し、GST-APPIC フュージョン蛋白質をもちいて結合蛋白質を検索した (図7)。

この図から明らかなように、分化後の細胞質画分において、分子量 50,000 付近に非常に特異的で顕著なバンドを認めた (①)。そしてこのバンドに相当するタンパク質は、NaCl 濃度を高くすることで、細胞内ドメインから溶出されることが明らかになった (②、③)。また、膜画分においても、分子量 105,000 付近に特徴的なバンドを認めた (①)。このタンパク質は、細胞質画分にも認める)。なお、コントロールとして GST 蛋白質のみを用い、これらの蛋白質は単独の GST には結合しないことを確認してある。

そこでこれらのタンパク質を同定するために、マウス脳ホモジネートを用いて、タンパク質を大量に精製した。マウス脳を用いても分子量 50,000 付近のタンパク質が顕著に回収され (矢印)、分子量 105,000 付近のタンパク質は、NaCl 濃度 0.3-0.4M 付近に認められた。

これらのタンパク質を質量分析で解析した結果、分子量 50,000 付近のタンパク質は、 β チュブリンであることが明らかとなった。そこでまず、分子量 50,000 付近のタンパク質が確かに β チュブリンであることを確認するために、脳に多く存在するクラス III β チュブリンを認識する抗 Tuj 抗体を用いたウエスタンブロットを行った。その結果、免疫沈降により回収されたタンパク質は、Tuj 抗体で強く染色された。また、クラス III β チュブリンが APPIC に結合する事は、免疫沈降を用いて明らかにしている。

なお、APPIC はチュブリン重合に対して、タキソ-

ルのように明確ではないが、促進的に働くと考えられた

5. 考察

我々は Notch や Delta の解析結果から、 γ -セクレターゼによって、I 型膜蛋白質の細胞内ドメインが切り出され、切り出された細胞内ドメインが核に移行して特定の転写因子に結合し、遺伝子の転写を調節するという新しいシグナル伝達様式を提唱している。また近年知られてきたように、APP や Notch、Delta のみならず多くの I 型膜蛋白質が γ -セクレターゼによって切断されることから、このシグナル伝達様式は広く使われているのではないかと考えている。

生理的機能があまり解析されていない Amyloid Precursor Protein (APP) も同様のシグナル伝達の様式をとるといふ仮説のもと、これがアルツハイマー病 (AD) に関係している可能性を考えて研究している。

我々の γ -セクレターゼによって調節されるシグナル伝達の仮説が正しくて、かつ AD に関係しているのならば、APP の細胞内ドメイン (APPIC) は、細胞内毒性を持つはずである。その点を明らかにするために、APPIC 及び全長の APP を強制発現する embryonic carcinoma 細胞 (P19 細胞) を作製し、神経細胞へと分化誘導した。

コントロール細胞では細胞が増殖しながら神経細胞へと分化し続け、多数の神経細胞が出現した。しかしながら、APPIC 及び全長の APP を発現する P19 細胞の場合、神経細胞に分化すると細胞死をおこした (図2)。また、図3に示したように、細胞死に伴い明確に DNA ラダーを認める。加えて、多数の TUNEL 陽性細胞を検出した。従って、APPIC は、神経細胞に選択的にアポトーシスを誘導することになる。

我々の仮説が正しいならば、APPIC は核に存在するはずである。実際、傷害された脳では、APPIC が核に存在するという多数の報告がある。我々も、1割以下の割合ではあるが、大脳や海馬の神経細胞の核が、抗 APPIC 抗体で染色される結果を得ている。これらは、APPIC が神経細胞選択的に細胞質から核へ輸送されている可能性を示している。現在、我々はマスペクトルを用いて APPIC 結合蛋白質を同定しようとしているが、実際、核輸送に関係する RanBP9 を検出しており、Ran の系が APPIC の核移行に関係している可能性がある。

APPIC が核に存在することは、Delta 同様に、核内で転写因子に結合し転写を調節している可能性を示唆している。この点を明らかにするために我々が開発した新しい方法 (図1) でスクリーニングをおこない、APPIC に結合する転写因子として E2F1 を同定した。また、免疫沈降によって、E2F1 と APPIC の結合を確認している (図4)。

E2F1 は、アポトーシスや細胞周期を調節する転写因子である。多くの神経細胞において、E2F1 を強制発現すると細胞死がおこることが知られている。また、通常は神経細胞での発現は極めて低い、神経細胞死の直前に、発現が上昇することが多数報告されている。従って、APPIC が結合することにより E2F1 の活性に何らかの変化がおき、その結果として神経細胞死を引き起こす可能性が考えられ、AD との関係が興味深い。

これらの細胞レベルでの結果が、実際の AD の発症を反映しているのかを検討する第一歩として、AD 脳における E2F1 の発現を調べた。大脳皮質の委縮が進んだ典型的な AD 脳 3 検体の各 3 部位から、蛋白質を抽出してウエスタンブロッティングをおこなった。その結果、図 5 に示すように、1 つのサンプル以外では強い E2F1 の発現が認められた。今回は、ヒト正常脳が手に入らなかったため、コントロールが無いが、E2F1 は、正常脳では発現が極めて低いことが知られている。従って、この E2F1 の強い発現は、これまでに述べた細胞レベルでの結果が、AD の病態を何らかの形で反映しているのではないかと考えている。

さらに、遺伝子相関解析をおこなったところ、表 1 及び表 3 で示したように、E2F1 と E2F4 遺伝子の多型が AD の発症に関係する可能性を示唆する結果を得た。これらは、他の研究結果と考え合わせると極めて興味深い。しかしながら、本研究で示唆された AD と E2F ファミリーとの相関は、他の方法により早急に追試されなければならない。具体的には、より多くのサンプルを使用しての case-control デザインの相関解析、および家族サンプルを使用しての相関解析などである。

E2F1 はユビキチン化され、極めて短時間で分解されることが知られている。AD 脳で多量の E2F1 が検出されることから、核内で APPIC が結合することにより、ユビキチン化が阻害され、分解されにくくなっている可能性が考えられる。今後、この可能性を検討する予定である。

加えて、APPIC 結合蛋白質としてチュブリンを同定し、APPIC はチュブリンの重合を促進する事を示した。この APPIC の重合促進活性は、抗がん剤タキソールと比べるとかなり弱いと考えられた。しかしながら、何らかのかたちで AD の発症と関係していないかを今後検討したい。

これまでに述べた我々の研究結果が、AD の発症を反映しているかどうかは、非常に重要な問題であると考えている。この点を直接的に明らかにするために、APP の細胞内ドメインの発現を、脳特異的にコントロールできるトランスジェニックマウスを、新潟大学脳研究所の横山峯介先生、三菱化学生命研究所の中村健司先生と共同で作製中である。今後、このトランスジェニックマウスを用いて種々の解析をおこない、我々の仮説の正当性を直接的に検討したい。

6. 結論

(1) APPIC 及び全長の APP を強制発現する P19 細胞を作製し、神経細胞へと分化誘導した。その結果、神経細胞への分化に伴って、アポトーシスによる細胞死を誘導した。

(2) APPIC に結合する転写因子として、E2F1 を同定した。E2F1 は、細胞死を調節していることが知られており、APPIC が結合することにより何らかの変化がおき、細胞死を引き起こすと考えられた。

(3) AD 脳では、多量の E2F1 が検出された。従って、前述した細胞レベルでの結果が、AD の病態を反映していることを期待している。

(4) 遺伝子相関解析をおこない、E2F1 と E2F4 遺伝子の多型が AD の発症に関係する可能性を示唆する結果を得た。

(5) APPIC 結合蛋白質としてチュブリンを同定し、APPIC はチュブリンの重合を促進する事を示した。

7. 投稿論文、特許出願

1. 論文

4. Nakayama K., Nagase K., Tokutake Y., Koh C., Hiratochi M., Ohkawara T., Nakayama N., Multiple POU-binding motifs, recognized by tissue-specific nuclear factors, are important for Dll1 gene expression in developing neural stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 325, 991-996, 2004
5. Shiozawa T., Miyamoto T., Kashima H., Nakayama K., Nikaido T., Konishi I., Estrogen-induced proliferation of normal endometrial glandular cells is initiated by transcriptional activation of cyclin D1 via binding of c-Jun to an AP-1 sequence. *Oncogene*, 23, 8603-8610, 2004
6. Nakagawa A., Satake H., Nakabayashi M., Nishizawa M., Furuya K., Nakano S., Kigoshi T., Nakayama K. and Uchida K. Receptor gene expression of glucagons-like peptide-1, but not glucose-dependent insulinotropic polypeptide, in rat nodose ganglion cells. *Autonomic Neuroscience*, 110, 36-43, 2004
7. Miyatake R, Furukawa A, Matsushita S, Higuchi S, Suwaki H: Functional polymorphisms in the $\sigma 1$ receptor gene associated with alcoholism. *Biol Psychiatry* 55: 85-90, 2004.
8. Miyasaka K, Yoshida Y, Matsushita S, Higuchi S, Maruyama K, Niino N, Ando F, Shimokata H, Ohta S, Funakoshi A: Association of cholecystokinin-A receptor gene polymorphism with alcohol dependence in a Japanese population. *Alcohol Alcohol* 39: 25-28, 2004.
9. Nakamura Y, Yokoyama H, Higuchi S, Hara S, Kato S, Ishii H: Acetaldehyde accumulation suppresses Kupffer cell release of TNF- α and modifies acute hepatitis in rats. *J Gastroenterol* 39: 140-147, 2004.
10. Maruyama K, Higuchi S: The Japanese Society of Alcohol-Related Problems. *Addiction* 99: 419-424, 2004.
11. Miyasaka K, Yoshida Y, Matsushita S, Higuchi S, Shirakawa O,

- Shimokata H, Funakoshi A: Association of cholecystokinin-A receptor gene polymorphisms and panic disorder in Japanese. *Am J Med Genet* 127B: 78-80, 2004.
12. Koizumi H, Hashimoto K, Itoh K, Nakazato M, Shimizu E, Ohgake S, Koike K, Okamura N, Matsushita S, Suzuki K, Murayama M, **Higuchi S**, and Iyo M: Association between the brain-derived neurotrophic factor 196G/A polymorphism and eating disorders. *Am J Med Genet* 127B: 125-127, 2004.
13. Adachi J, Matsushita S, Yoshioka N, Funae R, Fujita T, **Higuchi S**, Ueno Y: Plasma phosphatidylcholine hydroperoxidase as a new marker of oxidative stress in alcoholic patients. *J Lipid Res* 45: 967-971, 2004.
14. Nakamura Y, Kobayashi Y, Ishikawa A, Maruyama K, **Higuchi S**: Severe chronic pancreatitis and severe cirrhosis have different frequencies and are independent risk factors in male Japanese alcoholics. *J Gastroenterol* 39: 879-887, 2004.
15. Matsushita S, Suzuki K, Murayama M, Nishiguchi N, Hishimoto A, Takeda A, Shirakawa O, **Higuchi S**: Serotonin transporter regulatory region polymorphism is associated with "core" anorexia nervosa. *Am J Med Genet* 128B: 114-117, 2004.
16. Masaki T, Mochizuki H, Matsushita S, Yokoyama A, Kamakura K, **Higuchi S**: Association of aldehyde dehydrogenase-2 polymorphisms with alcoholic polyneuropathy in humans. *Neurosci Lett* 363: 288-290, 2004.
17. Mochizuki H, Masaki T, Yokoyama A, Matsushita S, Kamakura K, Motoyoshi K, **Higuchi S**: Prolonged central sensory conduction time in alcoholics with hypoactive aldehyde dehydrogenase-2. *Neurosci Res* 50: 233-236, 2004.
18. Matsushita S, Kimura M, Miyakawa T, Yoshino A, Murayama M, Masaki T, **Higuchi S**: Association study of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene polymorphism and alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res* 28(11): 1609-1612, 2004.
19. Matsushita S, Arai H, Matsui T, Yuzuriha T, Urakami K, Masaki T, **Higuchi S**: Brain-derived neurotrophic factor gene polymorphisms and Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 112: 703-711, 2005.
20. Miyasaka K, Ohta M, Takano S, Hayashi H, **Higuchi S**, Maruyama K, Tando Y, Nakamura T, Takata Y, Funakoshi A: Carboxylester lipase gene polymorphism as a risk of alcohol-induced pancreatitis. *Pancreas* 30: e87-91, 2005.
21. Nakamura Y, **Higuchi S**, Maruyama K: Pancreatic volume associated with endocrine and exocrine function of the pancreas among Japanese alcoholics. *Pancreatol* 28: 422-431, 2005.
22. Yokoyama A, Omori T, Yokoyama T, Tanaka Y, Mizukami T, Matsushita S, **Higuchi S**, Takahashi H, Maruyama K, Ishii H, Hibi T: Esophageal melanosis, an endoscopic finding associated with squamous cell neoplasms of the upper aerodigestive tract, and inactive aldehyde dehydrogenase-2 in alcoholic Japanese men. *J Gastroenterol* 40: 676-684, 2005.
23. Nakamura Y, Ohmori T, **Higuchi S**, Maruyama K: Certain background factors exhibit an association with an increased risk for pancreatic calcification among Japanese male alcoholics. *Pancreas* 31: 225-231, 2005.
24. Hesselbrock V, **Higuchi S**, Soyka M: Recent development in the genetics of alcohol-related phenotypes. *Alcohol Clin Exp Res* 29: 1321-1324, 2005.
25. Kuwano R, Miyashita A, Arai H, Asada T, Imagawa M, Shoji M, **Higuchi S**, Urakami K, Kakita A, Takahashi H, Tsukie T, Toyabe S, Akazawa K, Kanazawa I, Ihara Y: Dynamin-binding protein gene on chromosome 10q is associated with late-onset Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 15(13): 2170-2182, 2006.
26. Miyasaka K, Hosoya H, Sekine A, Ohta M, Amono H, Matsushita S, Suzuki K, **Higuchi S**, Funakoshi A: Association of ghrelin receptor gene polymorphism with bulimia nervosa in a Japanese population. *J Neural Transm* 113(9): 1279-1285.
27. Kimura M, Kimura S, Matsushita S, Kashima H, **Higuchi S**: ALDH2 promoter polymorphism has no effect on the risk for alcoholism. *Alcohol Alcohol* 41(4): 368-371, 2006.
28. Yokoyama A, Mizukami T, Omori T, Yokoyama T, Hirota T, Matsushita S, **Higuchi S**, Maruyama K, Ishii H, Hibi T: Melanosis and squamous cell neoplasms of the upper aerodigestive tract in Japanese alcoholic men. *Cancer Sci* 97(9): 905-911, 2006.
29. Mochizuki H, Masaki T, Matsushita S, Kamakura K, Motoyoshi K, **Higuchi S**: Disinhibition of somatosensory evoked potential recovery in alcoholics. *Eur J Neurol* 13(8): 896-900, 2006.
30. Yokoyama A, Omori T, Yokoyama T, Sato Y, Mizukami T, Matsushita S, **Higuchi S**, Maruyama K, Ishii H, Hibi T: Risk of squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract in cancer-free alcoholic Japanese men: an endoscopic follow-up study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15(11): 2209-2215, 2006.
31. **Higuchi S**, Matsushita S, Kashima H: New findings of the genetic influence of alcohol use and dependence. *Curr Opin Psychiatry* 19(3): 253-265, 2006.
32. Yokoyama A, Yokoyama T, Ohmori T, Matsushita S, Mizukami T, Takahashi H, **Higuchi S**, Maruyama K, Ishii H, Hibi T: Helicobacter pylori, chronic atrophic gastritis, inactive aldehyde dehydrogenase-2, macrocytosis and multiple upper aerodigestive tract cancers and the risk for gastric cancer in alcoholic Japanese men. *J Gastroenterol Hepatol* 2007 22(2):210-217.
33. Yokoyama A, Ohmori T, Tanaka Y, Yokoyama T, Sugiura H, Mizukami T, Matsushita S, Mizukami T, **Higuchi S**, Maruyama K, Ishii H, Hibi T: p53 protein accumulation, cancer multiplicity, and aldehyde dehydrogenase-2 genotype in Japanese alcoholic men with early esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Lett* 247: 243-252, 2007.
34. Matsushita S, Suzuki G, Matsui T, Takasugi K, Yuzuriha T, Yokoyama A, Masaki T, Yoshida Y, Arai H, **Higuchi S**: Increased risk for silent brain infarction and deep white matter lesions in alcoholism. *J Psychiatric Res*, in press.
35. Iwasaki S, Ishiguro H, **Higuchi S**, Onaivi ES, Arinami T: Association study between alcoholism and endocannabinoid metabolic enzyme genes encoding fatty acid amide hydrolase and monoglyceride lipase in Japanese population. *Psychiatr Genet*, in press.
36. Ishiguro H, Iwasaki S, Teasentz L, **Higuchi S**, Horiuchi Y, Saito T, Arinami T, Onaivi ES: Involvement of cannabinoid CB2 receptor in alcohol preference in mice and alcoholism in humans. *Pharmacogenomics J*, in press.
37. Sasabe T, Furukawa A, Matsushita S, **Higuchi S**, Ishiura S: Association analysis of the dopamine receptor D2(DRD2) SNP rs1076560 in alcoholic patients. *Neurosci Lett*, in press.
38. Tian B.Q., Suzuki T., Yamauchi T., Sakagami H., Yoshimura Y., Miyazawa S., **Nakayama K.**, Saitoh F., Zhang J., Lu Y., Kondo H. and Endo S. Interaction of LDL receptor-related protein 4 (LRP4) with postsynaptic scaffold proteins via its C-terminal PDZ domain-binding motif, and its regulation by Ca²⁺/calmodulin -dependent protein kinase II. *Eur. J. Neurosci.* 11, 2864-2876, 2006
39. Hiratochi M., Nagase H., Kuramochi Y., Imamura T., Koh C.S., Ohkawara T. and **Nakayama K.** The Delta intracellular domain mediates TGF-β/Activin signaling through binding to Smads and has an important bi-directional function in the Notch-Delta signaling pathway. *Nucleic Acids Research*, 35, 912-922, 2007

2. 特許出願

なし

平成18年度
政策創薬総合研究
重点研究報告書(Ⅰ)

平成19年7月31日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団
〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル(小伝馬町駅前)4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社