

「脳を知る」  
平成8年度採択研究代表者

井原 康夫

(東京大学大学院医学系研究科 教授)

## 「アルツハイマー病における神経細胞死の解明」

### 1. 研究実施の概要

アルツハイマー病の病理学的特徴は、老人斑と神経原線維変化 (PHF) である。老人斑は、アミロイド線維から成り、その主要成分は分子量約 4,000 の タンパク (A<sub>β</sub>) と同定され、PHFの主要成分は微小管結合タンパクの 1 つである  $\tau$  と同定されている。以上の二つの病変の時系列を決めるために、各年齢のダウン症候群患者の脳が分析され、現在 . . . 神経細胞死という病理カスケードが信じられている。

本研究の目的は 1) カスケードの最初期に位置する細胞外の A<sub>β</sub> 沈着の機序; および 2) カスケードの終わりに位置する細胞内  $\tau$  沈着と神経細胞死の関係、を解明することである。この目的にそって、主としてヒト剖検脳を用いて および  $\tau$  を蛋白化学的に解析し、その結果に基づき、仮説をたて、cultured cell, transgenic miceを用いて検証していった。

### 2. 研究実施内容

#### 2 - 1 A<sub>β</sub> 蓄積の初期過程の同定

以前のELISAでは、正常またはそれに近いと考えられる症例では、A<sub>β</sub> 値はほとんどが測定限界以下であったので、測定法をさらに改良して、正常例の脳内の A<sub>β</sub> 濃度を測定することを試みた。この改良法を用いて、20歳から80歳までの剖検脳内の A<sub>β</sub> の定量をおこなった。その結果、以下のことが判明した。

1) 正常脳においても、不溶性画分に A<sub>β</sub> が存在し、A<sub>β</sub> 40は約5 pmol/g、A<sub>β</sub> 42は約0.5 pmol/gと測定された。したがって、不溶性画分の A<sub>β</sub> は正常脳における正常な代謝産物である。2) この不溶性画分の A<sub>β</sub> 42が40歳台後半から急激に上昇し、この増加は70歳位まで続く。その後、プラトーとなる。3) A<sub>β</sub> 40はなかなか上昇しないが、A<sub>β</sub> 42と相関があり、A<sub>β</sub> 42が高値の例では、高値を呈することが多い。4) ApoE4のalleleが存在すると、A<sub>β</sub> 蓄積のカーブが左方にシフトするらしい; すなわち、早期に A<sub>β</sub> が立ち上がる。

以上の観察結果から、第1に、脳の不溶性画分に存在する A<sub>β</sub> 42がアミロイド蓄積のもとになることが明らかとなった。第2に、上に述べた4)を仮定す

ると、これまで一見矛盾したいろいろな観察結果が十分に説明できるようになる。ApoE4を有すると、A<sub>42</sub>の蓄積が早期におこり、ある程度以下の年齢では、老人斑の密度またはA<sub>42</sub>の蓄積量が高い。しかし、ある程度以上の年齢では、AD例の中で比較した場合、A<sub>42</sub>のレベルは、ApoE4陰性例と比較しても差が存在しないが、A<sub>40</sub>のレベルは差が存在する。A<sub>40</sub>とADが相関するという事は、単に、A<sub>42</sub>が早期に蓄積を開始し、A<sub>40</sub>がその結果高値を呈するようになったということである。

## 2 - 2 A の蓄積初期過程と低密度膜ドメイン

A が蓄積を開始した脳の不溶性画分の中には、種々の膜小器官の画分が存在すると考えられる。しかし、正常脳における不溶性画分でその性質がある程度以上明らかとなっているのは、低密度膜ドメイン (low-density membrane domain) のみであろう。この膜ドメインは、cholesterol, sphingolipid含量が高いことが特徴である。

ヒトニューロプラストーマ (SH-SY5Y) をTriton X-100 中でホモジネートしたものを蔗糖密度勾配法で分画すると、低密度界面に、低密度膜ドメインが回収され、ここに (Triton-insoluble) A の約50%が存在する。正常のヒト脳を同様に分画すると、ニューロプラストーマの場合と同じように、低密度膜画分にA<sub>40</sub>, A<sub>42</sub>が存在する。かつ、A<sub>42</sub>が蓄積するにつれ、この画分のA<sub>42</sub>が高値を呈するようになる。このことは、A<sub>42</sub>蓄積の少なくとも一つのpathwayは低密度膜ドメインを介してということを示唆している。

以上のことをさらに支持するのが、PS2 transgenic miceの観察結果である。wild-type PS2 transgenic miceではA の脳内レベルはnontransgenic miceのそれと異ならないが、mutant (N141I) PS2 transgenic miceではA<sub>42</sub>の脳内レベルが上昇する (A<sub>40</sub>のレベルは上昇しない)。A<sub>42</sub>のレベルの上昇は不溶性画分において顕著に見られる。このようなtransgenic miceの2系統 (PS2の発現量がほぼ等しい) の脳を分画してA の定量をおこなった。その結果、低密度膜ドメインの画分で、wild-type PS2 miceではnontransgenic miceと変わらないが、mutant PS2 miceにおいてはA<sub>42</sub>が顕著に上昇していることが見出された。すなわち、mutant PS2 transgenic mice脳内のA<sub>42</sub>蓄積は、ヒトA<sub>42</sub>蓄積の初期過程に類似している。これは、このtransgenic miceの解析によって、ヒトA<sub>42</sub>蓄積に関して重要な情報が得られることを意味している。

## 2 - 3 PHF 形成と神経細胞死の関係の解明

の役割については、アミロイド蓄積の結果による2次的な現象であり、AD発症には重要でないという意見(アミロイドカスケード仮説)がアルツハイマー病研究者の間では強かったが、この考えに修正をせまったのが、Frontotemporal

dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 (FTDP-17)の原因が 遺伝子の変異であるという発見である。この疾患は、常染色体優性遺伝形式をとり、臨床的には、行動異常、痴呆、パーキンソニズムが特徴で、病理学的には、前頭・側頭葉皮質、皮質下核における神経細胞、グリア内の神経原線維変化(PHF-like fibrilの形成)の形成と神経細胞の脱落を主な特徴とする。この疾患の発見により、 の異常が神経原線維変化の形成および神経細胞脱落の必要にして十分条件であることが明らかとなった。

遺伝子の変異は、exonおよびintronに認められる。これらの異常は、 の微小管結合領域およびその近傍に集中しており、この領域の何らかの重大な生物学的活性を疑わせる。Intronic mutation(5'-splice donor site)が存在すると、exon 10のsplicing-inを活性化するため、4-repeat が増加することが共通の異常と考えられている。

ではこのような 遺伝子の変異があった場合、神経細胞はなぜ死ぬのだろうか。Exonic mutationは微小管結合領域に集中しているので、まず考えられるのが、微小管重合能の低下である。実際、多くのexonic mutationにおいて、cell-free系では重合能が低下しており、この低下が少なくとも、FTDP-17の原因の一部となっているのではないかと主張された。しかし、野生、変異 のstable transfectantを解析すると、変異型で一貫してpolymerized tubulinの割合が、小さいということとはなかった。このことは、cell-free系で観察された異常が、必ずしも培養細胞で現れないことを示している。 のknockout miceにおいて中枢神経系の異常、症状がほとんどなかったということを考えるのなら、FTDP-17における変異 の役割は、loss-of-functionというよりもgain-of-functionではないかと疑われる。

## 2 - 4 膜結合型A に対するモノクローナル抗体の調製

本研究はAD初期脳に見い出された膜結合型A (GM1ガングリオシド結合型A、GM1/A)の分子特性ならびに形成機序を検討する為に特異抗体を作成し、AD脳におけるA 沈着開始機構を、AD病態細胞モデルを対象に解明すること目的とする。

AD脳から調製した膜画分を抗原として用い、膜結合型A に対する特異的モノクローナル抗体(IgM抗体)を作成することに成功し、さらに遺伝子工学的手法によりIgGキメラ抗体を作成することにも成功した。また、人工脂質二重膜上において形成させたGM1/A を抗原として多種のモノクローナル抗体を作成する実験においては、GM1/A の形成が確認されるとともに、マウスに免疫することにより特異抗体が産生されていることを示唆する予備的実験結果が得られた。

## 2 - 5 プレセニリン変異の役割の検討

本分担研究者は、AD発症におけるプレセニリン変異の役割を中心に検討を行った。変異PS2のA $\beta$ 42産生に対する影響を、いくつかの培養細胞にtransient transfectionさせ、ELISAを用いて検討した。その結果、PS1の場合と同様に、FAD変異が存在するときのみ、分泌されるA $\beta$ 総量中のA $\beta$ 42の割合が増加することを明らかにした。この観察によって、APP717, presenilin1, 2にFAD変異があるときには、A $\beta$ 42の割合が増加することが共通項であることがわかった。

その仕事をさらに発展させ、PS2C末端のA $\beta$ 42産生及び機能型PS複合体形成における役割を検討した。生体内に存在するPS蛋白のほとんどはプロセッシングを受けた断片型蛋白(NTF and CTF)である。断片型・全長型PSのいずれがA $\beta$ 42産生亢進能を持つ機能型かを知るため、断片型PS2をコードするcDNAを培養細胞に発現させると、全長分子と異なり、A $\beta$ 42の分泌は全く増加しなかった。この結果は、PSがA $\beta$ 代謝に影響を及ぼす際、N,C末端断片が安定化複合体を形成することが必要であることを示唆する。さらにPS最C末端数残基の欠如、アミノ酸付加、最終残基Ile448のアルギニンへの置換などはA $\beta$ 42産生亢進及び断片型PSの安定化を阻害することから、この部分がAD発症に重要な機能を果たすことを確認した。

## 2 - 6 各種アルツハイマー関連遺伝子を導入したトランスジェニック動物を作製し、アルツハイマー病の動物モデルを作製する

### ・ knock-inマウスの作製

マウス genomic DNAに変異体を挿入したtargetting vectorを用いたES J1株での相同組替えによって、knock-inマウスの作製を試みた。現在、S4R, P301L, V337Mのキメラが得られている。

### ・ 長期飼育

アルツハイマー病の病態解析には長期飼育が必要である。この目的のために、得られたTgマウスを長期飼育している。本年度前半までにPS2 Tg miceの長期飼育を行い、それらは井原研での解析に供された。

## 3 . 主な研究成果の発表 (論文発表)

Enya M, Morishima-Kawashima M, Yoshimura M, Shinkai Y, Kusui K, Khan K, Games D, Schenk D, Sugihara S, Yamaguchi H, Ihara Y: Appearance of sodium dodecyl sulfate-stable amyloid  $\beta$ -protein (A $\beta$ ) dimer in the cortex during aging. Am. J. Pathol., 154, 271-279 (1999)

Watanabe A, Takio K, Ihara Y: Deamidation and isoaspartate formation in smeared tau in paired helical filaments- unusual properties of the microtubule-binding domain of tau. J. Biol. Chem., 274, 7368-7378 (1999)

Matsumura N, Yamazaki T, Ihara Y: Stable expression in Chinese hamster ovary cells of mutated tau genes causing frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 (FTDP-17). *Am. J. Pathol.*, 154, 1649-1656 (1999)

Funato H, Enya M, Yoshimura M, Morishima-Kawashima M, Ihara Y: The presence of sodium dodecyl sulfate-stable amyloid  $\beta$ -protein dimers in the hippocampus CA1 not exhibiting neurofibrillary tangle formation. *Am. J. Pathol.*, 155, 23-28 (1999)

Ren J, Utsunomiya I, Taguchi K, Ariga T, Tai T, Ihara Y, Miyatake T: Localization of verotoxin receptors in nervous system. *Brain Res.*, 825, 183-188 (1999)

Komano H, Sudoh S, Kawamura Y, Wang R and Yanagisawa K: Implications of presenilin 1 mutations in Alzheimer's disease. *Mech. Ageing Develop.*, 107,281-298 (1999)

Michikawa M. and Yanagisawa K: Apolipoprotein E4 isoform-specific actions on neuronal cells in culture. *Mech. Ageing Develop.*, 107,233-243 (1999)

Mizuno T, Nakata M, Naiki H, Michikawa M, Wang R, Haass C and Yanagisawa K: Cholesterol-dependent generation of a seeding amyloid  $\beta$ -protein in cell culture. *J. Biol. Chem.*, 274,15110-15114 (1999)

Isobe I, Michikawa M and Yanagisawa K: Enhancement of MTT, a tetrazolium salt, exocytosis by amyloid  $\beta$ -protein and chloroquine. *Neurosci. Lett.*, 266,129-132(1999)

Michikawa M and Yanagisawa K: Inhibition of cholesterol production, and not of nonsterol isoprenoid products induces neuronal cell death. *J. Neurochem.*, 72, 2278-2285 (1999)

Iwatsubo T: Amyloid  $\beta$  protein and presenilins in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Acta. Histochem. Cytochem.*, 32, 13-15 (1999)

Fukumoto H, Tomita T, Matsunaga H, Ishibashi Y, Saido TC, Iwatsubo T: Primary cultures of neuronal and non-neuronal rat brain cells secrete similar proportions of amyloid  $\beta$  peptides ending at A $\beta$  40 and A $\beta$  42. *Neuroreport*, 10, 2965-2969 (1999)