

筑波大学

博士（医学）学位論文

寄贈

石井一弘氏

DA
1927 (H6)
1997

Alzheimer 病脳での $A\beta$ 異常沈着に及ぼす
Apolipoprotein E4 と presenilin-1
変異効果に関する生物学的研究

1997

筑波大学大学院博士課程医学研究科

石井一弘

目 次	
序 章	1
1. アルツハイマー病の病理と生化学.	2
2. アルツハイマー病の分子生物学.	5
引用文献	9
図・表	15
第 I 章 $A\beta$ 1-40 及び $A\beta$ 25-35 の神経細胞毒性.	20
1. 目的.	21
2. 対象及び方法.	21
3. 結果及び考察.	22
引用文献.	24
図・表	25
第 II 章 アルツハイマー病における $A\beta$ と Apolipoprotein E の genotype 効果.	27
1. 目的.	28
2. 対象及び方法.	28
3. 結果及び考察.	29
引用文献.	31
図・表	33
第 III 章 アルツハイマー病における $A\beta$ と presenilin 1 の ミスセンス変異効果.	38
1. 目的.	39
2. 対象及び方法.	39
3. 結果及び考察.	40
引用文献.	43
図・表	45
終 章	48

引用文献	51
図・表	52
謝 辞	54
参考文献	55

Abbreviations

本論文では以下の略語を用いる.

ABC	avidine-biotin complex	アビチン・ビオチン複合体
A β	amyloid β protein	アミロイドベータ蛋白
AD	Alzheimer's disease	アルツハイマー病
ApoE	apolipoprotein E	アポリポ蛋白 E
β APP	beta-amyloid precursor protein	ベータアミロイド前駆体蛋白
CM	conditioned medium	条件培地
CS	calf serum	幼牛血清
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium	ダルベッコ変法イーグル培地
DNA	deoxyribonucleic acid	デオキシリボヌクレオチド
EDTA	ethylenediamine tetra acetic acid	エチレンジアミン 4 酢酸
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay	酵素免疫測定法
FAD	familial Alzheimer's disease	家族性アルツハイマー病
HS	horse serum	ウマ血清
LSD	least significant difference	最小有意差法
MAP-2	microtubule associated proteins type 2	微小管関連蛋白 2 型
NFT	neurofibrillary tangle	神経原線維変化
PCR	polymerase chain reaction	ポリメラーゼ連鎖反応
PHFs	paired helical filaments	ペアードヘリカルフィラメント
PBS	phosphate buffered saline	リン酸バッファー・生理食塩水
PS-1	presenilin 1	プレセニリン 1
PS-2	presenilin 2	プレセニリン 2
sAD	sporadic Alzheimer's disease	孤発性アルツハイマー病
SDS	sodium dodecyl sulfate	ドデシル硫酸ナトリウム
S.E.	standard error	標準誤差
TE	tris-HCl buffer with EDTA	EDTA入りトリスバッファー

TFA trifluoro acetate
TPK tau protein kinase

トリフルオロ酢酸
タウプロテインキナーゼ

序 章

1. アルツハイマー病の病理と生化学.

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease ; AD) は痴呆を主症状とする進行性の神経変性疾患である. 初期では正常老化による記憶力低下と区別することは難しいが, 徐々に長期記憶低下や高次機能障害 (失計算・失行・空間認知障害) が出現し, 中期以降は明らかな異常症状を示す. すなわち, 失見当, 失語, 徘徊, 夜間せん妄や幻覚・妄想がみられる. さらに自発語も少なくなり, 歩行障害が出現し, 末期には失禁状態となり, 四肢が拘縮し, 寝たきりとなる. 最期は経口摂取の不能となり, 衰弱し, 感染症などの合併症で死亡する. AD は大部分を占める孤発性アルツハイマー病 (sporadic AD ; sAD) と数%の常染色体優性遺伝形式を示す家族性アルツハイマー病 (familial AD ; FAD) からなっている. さらに FAD は65歳以前に発症する早期発症型 FAD と65歳以降に発症する晩期発症型 FAD の2つに分類される.

AD の剖検脳では幾つかの重要な特徴的な病理学的所見がみられる. 特に高次機能や記憶を司る海馬や連合野での神経細胞の脱落が顕著であるが, さらに神経原線維変化 (neurofibrillary tangle ; NFT) と老人斑 (senile plaque) (図1) は AD に特徴的な2大病理所見である. 変性神経細胞の細胞内蓄積物である神経原線維変化は paired helical filaments (PHFs) という二本の線維がねじれ合わさった構造物の集合体である (1). この PHFs は多量にリン酸化された, 微小管関連蛋白であるタウ蛋白 (異常リン酸化タウ蛋白) を主成分とする. タウ蛋白のリン酸化は2種類のタウ蛋白キナーゼ (tau protein kinase : TPK) によって引き起こされ, TPK I と TPK II と呼ばれている. このうち TPK I が異常リン酸化に直接的に関与している (2). PHF のもう一つの主成分はユビキチンであり, 異常蛋白としての PHF を蛋白分解系へと媒介する作用を示すことが知られているが, PHF の高度な不溶性のため脳内に蓄積することが知られている. しかしながら, 神経原線維変化は AD 以外の神経変性疾患にも認められ, 疾患特異性は低い.

一方, 典型的老人斑は細胞外のアミロイド線維が中心に蓄積した core (核) は軸索終末や樹状突起が変性した変性突起や活性化ミクログリアや 反応性アストロサイトに囲まれている. 神経原線維変化と違って, 老人斑は, Down 症候群

(21 trisomy), AD に多く認められるのと正常老人脳などに少量認められるだけである。このことから老人斑は神経原線維変化と比較して疾患特異性が高い病理学的変化であると言える。

老人斑を構成している $A\beta$ 蛋白は主に $A\beta$ 1-40 と $A\beta$ 1-42 (43) の2種類の分子種からなり、前駆体である膜糖蛋白の β APP から未同定の酵素によって切断され、膜から細胞外へ分泌されている (3, 4)。 β APP はアミノ酸数が 751, 770, 695 の3 isoform が alternative splicing によって作られる。751 と 770 の isoform は Kunitz 型の serine protease inhibitor 部位が分子内に存在し、全身の臓器に発現している。一方、695は神経細胞に強く発現している。この $A\beta$ 蛋白の前駆体である β APPには secretory pathway と endosomal / lysosomal pathway の2つの代謝経路が存在する。secretory pathway において、 β APP は $A\beta$ のシーケンス内で α -secretase という未同定の酵素で切断され 90-100-kDa の分子量の分泌型となり細胞外に分泌される。また、endosomal / lysosomal pathway では β APP は β -secretase と γ -secretase (いずれも未同定)によって、上記の2種類の $A\beta$ 蛋白が作られる。 $A\beta$ 蛋白は正常な細胞内代謝では可溶性 $A\beta$ として分泌され、血漿中や髄液中に健常者と同様に AD 患者にも認められる。また、 β APP は heterotrimeric GTP 結合蛋白である G_0 を調節している神経細胞受容体の可能性が指摘されている (5)。分泌型 β APP は自己分泌因子として細胞増殖を刺激する作用や細胞接着を媒介する作用があることが推察されている。このように β APP の作用については多岐にわたる報告があるが、実際の生理機能は未だに不明である。

いわゆるアミロイド仮説によれば、 $A\beta$ は AD を起こす原因物質である。この仮説は4つの重要な証拠に基づいている。① FAD の一部の家系は β APP の点突然変異が原因である。② 21番染色体上に存在する β APP が過剰に発現する Down 症候群では若年性に AD が発症する。③ $A\beta$ は神経細胞毒性を有し (4, 6), この細胞毒性により神経細胞死が多量に生じ、痴呆になる。④ AD の最初期の病理変化はびまん性老人斑と呼ばれる非線維性の $A\beta$ 沈着である (7)。ということである。合成 $A\beta$ を使った数々の研究の結果、 $A\beta$ は自己凝集能を有し、線維化することがわか

った。加えて $A\beta$ 分子種により、凝集速度が異なるという注目すべき seeding 仮説 (nucleation dependent polymerization 仮説) が提唱された。すなわち $A\beta 1-42(43)$ が $A\beta 1-40$ に比べてきわめて重合しやすく、脳血管アミロイドや老人斑形成において、まず $A\beta 1-42(43)$ が重合し、それが核となって $A\beta 1-42(43)$ のみならず $A\beta 1-40$ も沈着し、アミロイド線維として増生していくという説である (8, 9) (図2)。この説は初期老人斑のびまん性老人斑が $A\beta 1-42(43)$ からできていること (10) や、後述する FAD が若年発症することもよく説明できる。この $A\beta$ の凝集能は β -sheet 構造に密接に関係しており、各 $A\beta$ monomer が互いに逆平行に重合し、疎水性がより強くなり凝集・線維化すると考えられている (11)。 $A\beta$ 神経細胞毒性は $A\beta$ が凝集して不溶性アミロイド線維になることが必要である。非線維化、無構造の $A\beta$ は単一分子の $A\beta$ と同様に毒性を示さないことがわかっている。 $A\beta$ 毒性の機序として、 $A\beta$ が oxidative stress を誘導し、培養神経細胞の細胞内イオン環境を破壊することが明らかになっている (12)。加えて、 $A\beta$ はミクログリアを活性化し、このミクログリアは老人斑に関連した炎症過程で中心的役割を果たすらしい (13)。 $A\beta$ 線維が結合し、細胞膜にて free radical 産生を生じさせる可能性があるレセプターとして、the receptor for advanced glycation end products (RAGE) と Class A scavenger receptor の2つが候補として挙げられている (14, 15)。また、 $A\beta$ が神経細胞膜上で free radical を発生し、不飽和脂肪酸を酸化して過酸化脂質を増やし、細胞膜を傷害することが知られている (16)。

正常の神経細胞内代謝では $A\beta 1-40$ の産生が大部分であり、 $A\beta 1-42(43)$ は殆ど産生されない。しかし、最近の研究では AD における老人斑では $A\beta 1-42(43)$ を優位に多く含んでいることが判った (10, 17)。ある病的状況の下では $A\beta 1-42(43)$ の産生が増え、 $A\beta 1-42(43)$ の増加は老人斑の形成を促進すると考えられる。なぜなら、 $A\beta 1-42(43)$ は $A\beta 1-40$ と比べて凝集しやすいからである (9)。FAD の β APP717 点突然変異において選択的に $A\beta 1-42(43)$ の産生が増加し (18, 19), β APP670/671 の突然変異では $A\beta 1-40$ と $A\beta 1-42(43)$ の両方が増加することはこのモデルを支持する (20, 21)。さらに β APP717 の点突然変異を過剰

発現させた transgenic mouse は $A\beta$ 蓄積に関連した神経変性変化を生じ (22), 血漿中の可溶性 $A\beta$ 1-42 (43) も β APP717 や PS1 の変異では上昇しているが, 大多数を占める sAD 患者は $A\beta$ 1-42 (43) が増加していない. sAD では老人斑形成において $A\beta$ と $A\beta$ 修飾因子などが複雑に関与しているのかもしれない. $A\beta$ 修飾因子として, 老人斑に関連した幾つかの蛋白質が in vivo で同定されている. 例えば, β APP, ApoE, ApoJ (23), NAC (24), heparan sulphate proteoglycans (25), serum amyloid P component (26), α 1-antichymotrypsin (27), や補体を含む炎症関連蛋白質である. Al, Zn, Fe, Hg, Cu などの金属との関係も指摘されている. それらの多くは $A\beta$ と結合し $A\beta$ の凝集を促進したり, 阻害したりすることが in vitro にて証明されている. また, 反復する鈍的外傷 (boxer's brain) も AD の外的要因となりうる.

2. ADにおける分子生物学.

分子生物学の進歩により FAD に関連した4つの異なる遺伝子が見つかった. 第21番染色体に関連した β APP, 第19番染色体に関連した ApoE, 第14番染色体上の新しい蛋白のプレセニリン1 (presenilin 1 : PS1) と, 第1番染色体上の新しい蛋白のプレセニリン2 (presenilin 2 : PS2) である. FADの中にはこれら4つの遺伝子に関連しない家系がまだ存在している. 最近, 第12番染色体に関連している晩期発症型FAD家系も報告され, また, 関連が不明のFAD家系も多く残っていることから, これらの家系から多くの AD 原因蛋白質が発見される可能性を秘めている (28).

第21番染色体に関連した β APP は endosomal / lysosomal pathway で代謝されると老人斑を構成する $A\beta$ となる. さらに Down 症候群 (21 trisomy) の患者は脳病理上ADと区別できず, 50歳までに痴呆になり, NFT や痴呆に先行して $A\beta$ の蓄積が生じる. このことは β APP をコードしている第21番染色体の増幅転写が原因と考えられる. β APP の変化が AD の原因である直接的証拠は β APP717 や β APP670/671 (Swedish type) の変異を有する FAD や hereditary cerebral hemorrhage with

amyloidosis of the Dutch-type (HCHWA-D) のように $A\beta$ の異常蓄積を起こす家族性疾患群には $A\beta$ のシークエンス内やその近傍に幾つかの点突然変異があることである (図3) . 先に述べたように, これら β APP の点突然変異は secretase を介した β APP 代謝が変わり, $A\beta$ 全体の分泌量増加, $A\beta$ 1-42 (43) 比率の増加や, さらに $A\beta$ 線維形成が亢進することが推察される. β APP が原因の FAD はごく一部ではあるが, β APP の点突然変異が FAD の原因であると言う事実は $A\beta$ 原因仮説を強く支持する.

晩期発症型 FAD の連鎖解析の結果, 第19番染色体長腕との連鎖が1991年に Pericak-Vance らによって示された (29) . 同年, これとは独立に Namba らは, ApoE が AD 脳の老人斑・神経原線維変化・血管アミロイドにみられることを免疫組織化学的に証明した (30) . そして, 1993年 A.D.Roses らは, この第19番染色体に位置するアポリポ蛋白 E (ApoE) と晩期発症型 FAD との関連を報告し (31) , 晩期発症型 FAD と ApoE との関連が注目され始めた.

ApoE は分子量約30K (アミノ酸299個) の血清脂質の輸送や代謝に関係した蛋白で, 主に3種の対立遺伝子型 ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$) が存在する. 第19番染色体上のこれらの対立遺伝子は2箇所の多型性で区別される. 蛋白質レベルでは112と158番のアミノ酸が Cys の場合は E2, 112番が Cys で158番が Arg では E3, 112と158番が Arg では E4 の表現型となる (図4) . ApoE は肝臓だけでなく中枢神経系のグリア細胞 (アストロサイトやオリゴデンドロサイト) でも産生されており, 神経細胞の維持・再生・修復に関与していると考えられている. FAD の約80%, sAD の約60%以上が最低1個の $\epsilon 4$ を有し, 対照者の3~4倍多いことから, AD では $\epsilon 4$ 対立遺伝子頻度が高いことが明らかとなっている (31) . $\epsilon 4$ ホモ接合体は $\epsilon 4$ ヘテロ接合体より AD 発症が若年化し, つまり $\epsilon 4$ の数が0から1,2と増えるに従って発病率の上昇と発症年齢が約10年ずつ低下することから, $\epsilon 4$ の遺伝子用量効果が認められた. 逆に AD では $\epsilon 2$ の頻度が低いことが確認されている. ApoE が AD 発症にどの様に関与しているかは正確には解っていない. ApoE と $A\beta$ との結合性を調べた結果, E4 は E3 や E2 に比べて様々な条件で非常に強い結合性を示すことがわかった

(32) . 異常シャペロン仮説によると ApoE4 が $A\beta$ または β APP により強く結合し、プロテアーゼ処理の異常や $A\beta$ の不溶化が生じアミロイド線維形成を起こすと考えられている.

ApoE ϵ 4 が晩期発症型 FAD の原因遺伝子として明らかになっただけでなく, sADを含めた AD 発症の危険因子として同定された. この点で, 他の FAD と比べて質的にやや低い意味をもつ. 事実他の β APP や PS1 の突然変異の有病率がほぼ100% であるのに対し ApoE ϵ 4 の有病率が 約50% である. ϵ 4 を有する頻度と相関する疾患として AD の他に diffused Lewy body disease (汎発性レビー小体病)や脳血管性痴呆がある.

早期発症型 FAD の 約70% は第14番染色体長腕に関連していることは1992年 Schellenberg らによって報告された (33) が, この原因遺伝子 PS1 がわかったのは1995年 Sherrington らによってである (34) . 続けて早期発症型 FAD の Volga-German 家系の原因遺伝子座が第1番染色体に存在することがわかり, 調べた5家系に突然変異が発見され, PS2 と名付けられた (35) . PS1 は467個のアミノ酸からなり, 膜貫通部位を7-9箇所 to 有する膜タンパクが想定されている (34) . PS2 は PS1 と蛋白質レベルで 約67%, 膜貫通部分では 約84%の相同性がある (35) . 両者の違いは6-7番の膜貫通部位の間にある親水基部分が PS2 では PS1 よりアミノ酸24残基分短いことと, N末端の80アミノ酸が異なる点である (36) . 現時点で第14番染色体に関連した FAD で PS1 上に20数箇所の mutation と exon 9 deletion が, 第1番染色体に関連した Volga-German家系の FAD で PS2 上に2つの mutation が発見されており, mutation は膜通過領域もしくは膜表面 (特に第2と第6膜通過領域及びループ部) に集中している (図5) .

PS1 は電位依存性カルシウムチャンネルの α subunit, 線虫 *C.elegans* の SPE-4 (34) との類似性が示されたが, さらに線虫 *C.elegans* の SEL-12 と高いホモロジーを持つことがわかった (37) . *sel-12* は *lin-12* 遺伝子の発現を抑制する遺伝子として発見された. LIN-12 は細胞間シグナル伝達に関わるレセプターである Notch ファミリー (哺乳類では Notch 1) に属しているが, *sel-12* は *lin-12*

の細胞表面のレセプターの段階、または細胞内輸送や細胞膜からの recycling の段階に影響を及ぼしていると考えられている (37)。この PS1 蛋白の生理機能はまだ明らかになっていないが、SEL-12 の機能から推察したり、PS1 の突然変異に関連している患者細胞で $A\beta$ の分泌が増加しているとの報告 (38) などから、PS1 の $A\beta$ 産生や β APP 代謝への関与が考えられている。これまで明らかになった突然変異部位は膜通過ドメインもしくは膜表面に集中しており、膜機能および膜表面上の部位において PS1 は重要な役割を果たしていることが予想される。 $A\beta$ が late-Golgi 画分からエンドゾームにおいて β APP から産生されているが、膜蛋白である PS1 の突然変異が結果として β APP の膜画分での蓄積を生じ、 $A\beta$ 産生を亢進させているのかもしれない (36)。残念ながら β APP は LIN-12 や Notch 1 とはホモロジーがない。しかし、PS1 は LIN-12 とホモロジーの高い未知の蛋白を介して β APP の代謝に関わっているかもしれない。

以上のように、AD 研究は AD 脳の異常蓄積物の分析から $A\beta$ 、タウ蛋白の解析が生化学的にはじまり、1980年代後半からは常染色体優性遺伝を示す FAD 家系の分子生物学的研究から原因遺伝子のコードする4つの蛋白 (β APP, ApoE, PS1, PS2) が同定された。それぞれの原因蛋白の生理機能はいまだに解明されていないため、原因蛋白の機能解析という研究方向も重要であろう。しかし同時に、環境要因など多因子の影響を受けていて、AD の中でも大多数を占める sAD を視野に入れ、研究をすすめていく必要があると思われる。本論文は、Seeding 仮説とアミロイド原因仮説に沿って $A\beta$ と他の原因蛋白質間の相互作用を調べることを目的とした。第1章ではアミロイド原因説の根拠となっている $A\beta$ 神経細胞毒性の実験系を確立し、第2章では ApoE genotype が $A\beta$ に及ぼす効果を明らかにし、第3章では PS1 の異常が $A\beta$ に及ぼす効果を調べた。

引用文献

- 1) Selkoe, D. J. (1991) The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron* 6: 487-498.
- 2) Ishiguro, K., Takamatsu, M., Tomizawa, K., Omori, A., Takahashi, M., Arioka, M., Uchida, T., Imahori, K. (1992) Tau protein kinase I converts normal tau protein into A68-like component of paired helical filaments. *J. Biol. Chem.* 267: 10897-10901.
- 3) Selkoe, D. J. (1994) Cell biology of the amyloid β -protein precursor and the mechanism of Alzheimer's disease. *Annu. Rev. Cell Biol.* 10, 373-403.
- 4) Yankner, B. A. (1996) Mechanisms of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neuron* 16: 921-932.
- 5) Nishimoto, I., Okamoto, T., Matsuura, Y., Takahashi, S., Okamoto, T., Murayama, Y., Ogata, E. (1993) Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTP-binding protein G(o). *Nature* 362: 75-79.
- 6) Yankner, B. A., Dawes, L. R., Fisher, S., Villa-Komaroff, L., Oster-Granite, M. L., Neve, R. L. (1989) Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with Alzheimer's disease. *Science* 245: 417-420.
- 7) Yamaguchi, H., Hirai, S., Morimatsu, M., Shoji, M., Harigaya, Y. (1988) Diffuse type of senile plaques in the brains of Alzheimer-type dementia. *Acta Neuropathol Berl.* 77: 113-119.
- 8) Jarrett, J. T., Berger, E. P., Lansbury, P. T. Jr. (1993) The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* 32: 4693-4697.
- 9) Jarrett, J. T., Lansbury, P. T. Jr. (1993) Seeding "one-dimensional

- crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? Cell 73: 1055-1058.
- 10) Iwatsubo, T., Odaka, A., Suzuki, N., Mizusawa, H., Nukina, N., Ihara, Y.
(1994) Visualization of A beta 42 (43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42 (43). Neuron 13: 45-53.
 - 11) Lansbury, P. T. Jr., Costa, P. R., Griffiths, J. M., Simon, E. J., Auger, M., Halverson, K. J., Kocisko, D. A., Hendsch, Z. S., Ashburn, T. T., Spencer, R. G., Tidor, B., Griffin, R. G. (1995) Structural model for the beta-amyloid fibril based on interstrand alignment of an antiparallel sheet comprising a C-terminal peptide. Nat. Struct. Biol. 2: 990-998.
 - 12) Harris, M. E., Hensley, K., Butterfield, D. A., Leedle, R. A., Carney, J. M.
(1995) Direct evidence of oxidative injury produced by the Alzheimer's beta-amyloid peptide (1-40) in cultured hippocampal neurons. Exp. Neurol. 131: 193-202.
 - 13) Meda, L., Cassatella, M. A., Szendrei, G. I., Otvos, L. Jr., Baron, P., Villalba, M., Ferrari, D., Rossi, F. (1995) Activation of microglial cells by beta-amyloid protein and interferon gamma. Nature. 374: 647-650.
 - 14) Yan, S. D., Chen, X., Fu, J., Chen, M., Zhu, H., Roher, A., Slattery, T., Zhao, L., Nagashima, M., Morser, J., Migheli, A., Nawroth, P., Stern, D., Schmidt, A. M.
(1996) RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. Nature 382: 685-691.
 - 15) El-Khoury, J., Hickman, S. E., Thomas, C. A., Cao, L., Silverstein, S. C., Loike, J. D. (1996) Scavenger receptor mediated adhesion of microglia to beta-amyloid fibrils. Nature 382: 716-719.
 - 16) Markesbery, W. R. (1997) Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. Free Radic. Biol. Med. 23: 134-147.

- 17) Gravina, S. A., Ho, L., Eckman, C. B., Long, K. E., Otvos, L. Jr., Younkin, L. H., Suzuki, N., Younkin, S. G. (1995) Amyloid beta protein (A beta) in Alzheimer's disease brain. Biochemical and immunocytochemical analysis with antibodies specific for forms ending at A beta 40 or A beta 42 (43). J Biol.Chem. 270: 7013-7016.
- 18) Tamaoka, A., Odaka, A., Ishibashi, Y., Usami, M., Sahara, N., Suzuki, N., Nukina, N., Mizusawa, H., Shoji, S., Kanazawa, I. et al (1994) APP717 missense mutation affects the ratio of amyloid beta protein species (A beta 1-42/43 and a beta 1-40) in familial Alzheimer's disease brain. J Biol.Chem. 269: 32721-32724.
- 19) Suzuki, N., Cheung, T. T., Cai, X. D., Odaka, A., Otvos, L. Jr., Eckman, C., Golde, T. E., Younkin, S. G. (1994) An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. Science 264: 1336-1340.
- 20) Citron, M., Oltersdorf, T., Haass, C., McConlogue, L., Hung, A. Y., Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Lieberburg, I., Selkoe, D. J. (1992) Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. Nature 360: 672-674.
- 21) Cai, X. D. Golde, T. E., Younkin, S. G. (1993) Release of excess amyloid beta protein from a mutant amyloid beta protein precursor. Science 259: 514-516.
- 22) Games, D., Adams, D., Alessandrini, R., Barbour, R., Berthelette, P., Blackwell, C., Carr, T., Clemens, J., Donaldson, T., Gillespie, F. et al. (1995) Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. Nature 373: 523-527.
- 23) Matsubara, E., Frangione, B., Ghiso, J. (1995) Characterization of

- apolipoprotein J - Alzheimer's A beta interaction. *J. Biol. Chem.* 270: 7563-7567.
- 24) Masliah, E., Iwai, A., Mallory, M., Ueda, K., Saitoh, T. (1996) Altered presynaptic protein NACP is associated with plaque formation and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 148: 201-210.
 - 25) Kalaria, R. N., Kroon, S. N., Grahovac, I., Perry, G. (1992) Acetylcholinesterase and its association with heparan sulphate proteoglycans in cortical amyloid deposits of Alzheimer's disease. *Neuroscience* 51: 177-184.
 - 26) Janciauskiene, S., Garcia-de-Frutos, P., Carlemalm, E., Dahlback, B., Eriksson, S. (1995) Inhibition of Alzheimer beta-peptide fibril formation by serum amyloid P component. *J. Biol. Chem.* 270: 26041-26044.
 - 27) Ma, J., Yee, A., Brewer, H. B. Jr., Das, S., Potter, H. (1994) Amyloid-associated proteins alpha 1-antichymotrypsin and apolipoprotein E promote assembly of Alzheimer beta-protein into filaments. *Nature* 372: 92-94.
 - 28) Pericak-Vance, M. A., Bass, M. P., Yamaoka, L. H., Gaskell, P. C., Scott, W. K., Terwedow, H. A., Menold, M. M., Conneally, P. M., Small, G. W., Vance, J. M., Saunders, A. M., Roses, A. D., Haines, J. L. (1997) Complete genomic screen in late-onset familial Alzheimer disease. *JAMA* 278: 1237-1241.
 - 29) Pericak-Vance, M. A., Bebout, J. L., Gaskell, P. C. Jr., Yamaoka, L. H., Hung, W. Y., Alberts, M. J., Walker, A. P., Bartlett, R. J., Haynes, C. A., Welsh, K. A., et al (1991) Linkage studies in familial Alzheimer disease : evidence for chromosome 19 linkage. *Am. J. Hum. Genet.* 48: 1034-1050.
 - 30) Namba, Y., Tomonaga, M., Kawasaki, H., Otomo, E., Ikeda, K. (1991) Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kure plaque amyloid

- in Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain Res.* 541: 163-166.
- 31) Corder, E.H., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Small, G.W., Roses, A.D., Haines, J.L., Pericak-Vance, M.A. (1993) Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261: 921-923.
 - 32) Strittmatter, W.J., Weisgraber, K.H., Huang, D.Y., Dong, L.M., Salvesen, G.S., Pericak-Vance, M., Schmechel, D., Saunders, A.M., Goldgaber, D., Roses, A.D. (1993) Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid β peptide: Isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 8098-8102.
 - 33) Schellenberg, G.D., Bird, T.D., Wijsman, E.M., Orr, H.T., Anderson, L., Nemens, E., White, J.A., Bonnycastle, L., Weber, J.L., Alonso, M.E. et al (1992) Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Science* 258: 668-671.
 - 34) Sherrington, R., Rogaev, E.I., Liang, Y., Rogaeva, E.A., Levesque, G., Ikeda, M., Chi, H., Lin, C., Li, G., Holman, K. et al (1995) Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375: 754-760.
 - 35) Rogaev, E.I., Sherrington, R., Rogaeva, E.A., Levesque, G., Ikeda, M., Liang, Y., Chi, H., Lin, C., Holman, K., Tsuda, T., et al (1995) Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature*, 376: 775-778.
 - 36) Selkoe, D.J. (1995) Missense on the membrane. *Nature* 375: 734-735.
 - 37) Levitan, D., Greenwald, I. (1995) Facilitation of lin-12-mediated signalling by sel-12, a *Caenorhabditis elegans* S182 Alzheimer's disease gene. *Nature* 377: 351-354.

38) Querfurth HW, Wijsman EM, St George-Hyslop PH, Selkoe, D. J. (1995)

β APP mRNA transcription is increased in cultured fibroblasts from the familial Alzheimer's disease-1 family. Mol. Brain Res. 28: 319-337.

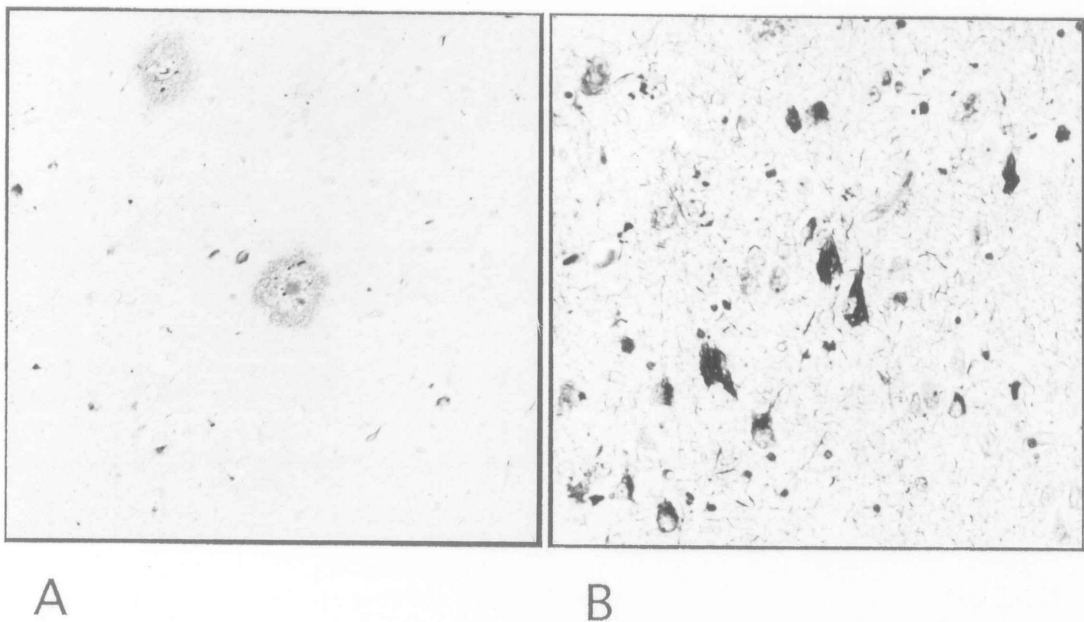


図1 A) 典型的老人斑

(AD患者側頭葉海馬のビルショウスキー染色 $\times 150$)
神経細胞外の構造物で中心部のコアと周辺部のハローからなる。

B) 神経原線維変化

(AD患者側頭葉海馬のビルショウスキー染色 $\times 180$)
神経細胞内にみられる糸くず状の構造物。

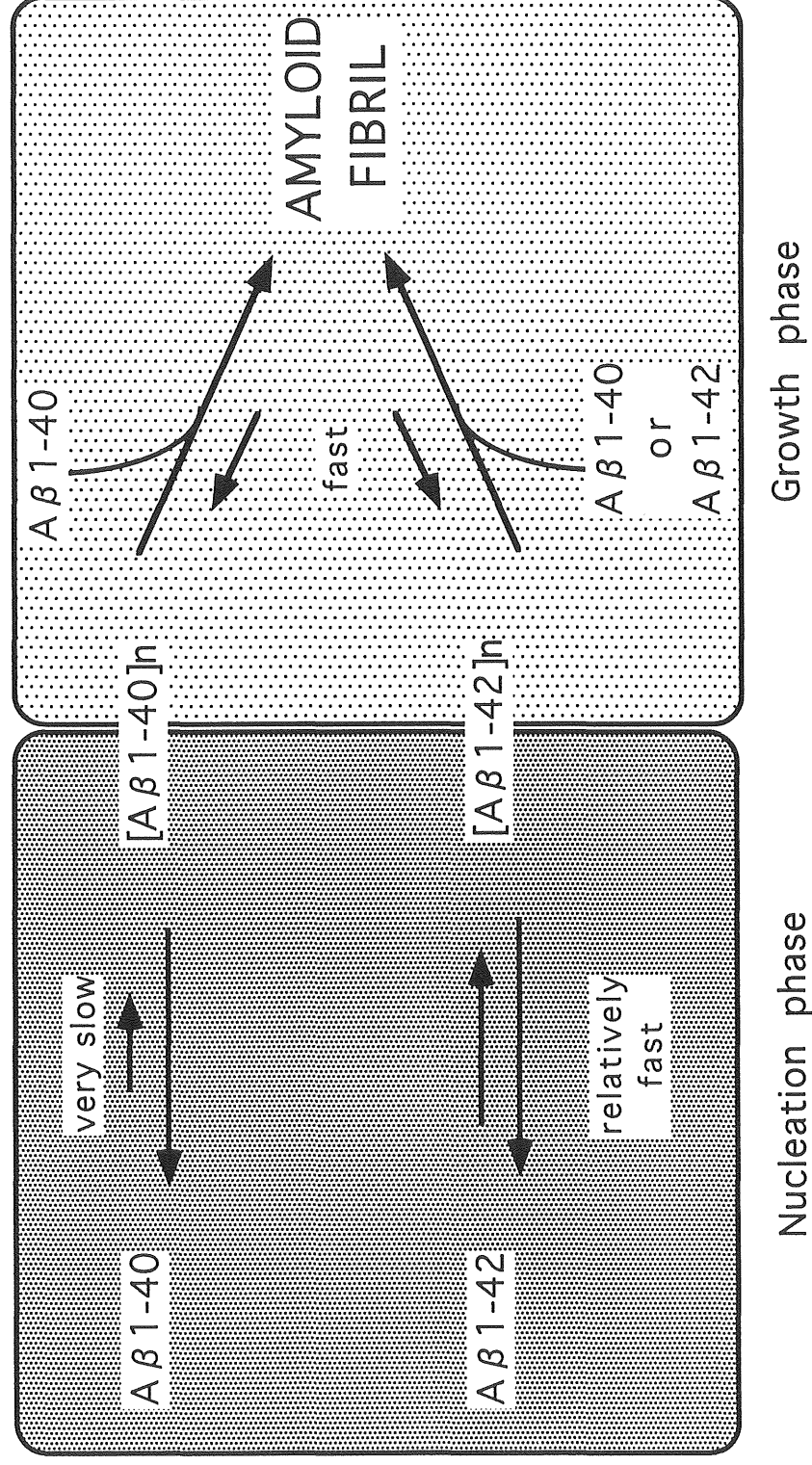


図2. ADにおける $A\beta$ 沈着の nucleation-dependent polymerization仮説

$A\beta 1-42$ が $A\beta 1-40$ と比べて極めて重合しやすい。まず、 $A\beta 1-42$ が重合して核 ($[A\beta 1-42]_n$) を形成する。この核に $A\beta 1-42$ のみならず、 $A\beta 1-40$ も沈着し、アミロイド線維として増生していく。

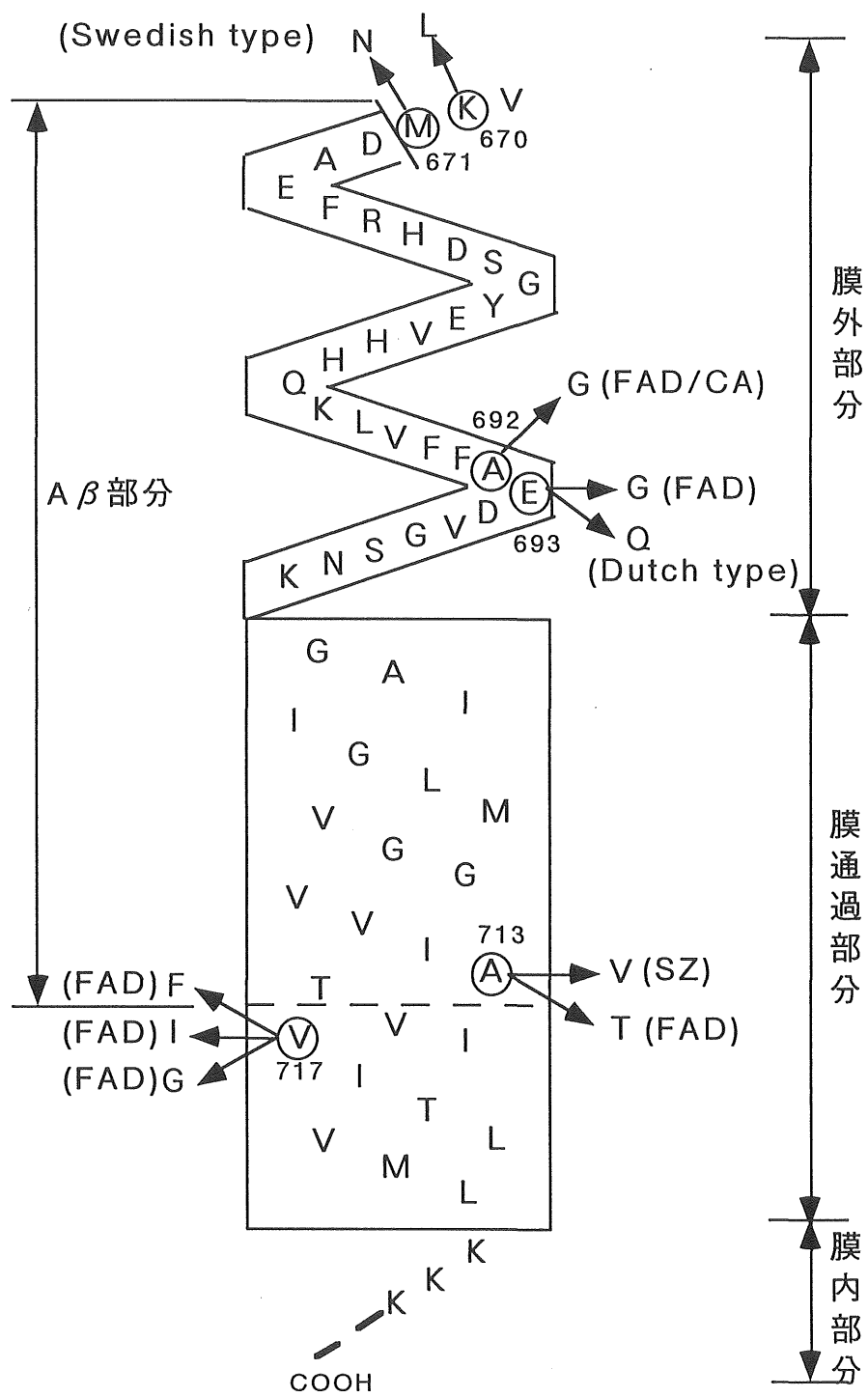
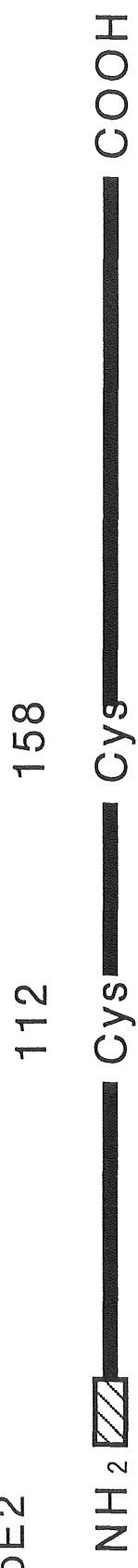


図.3 β APPと点突然変異部位.

ApoE2



ApoE3 (Wild type)



ApoE4



図. 4 ApoEの表現型.

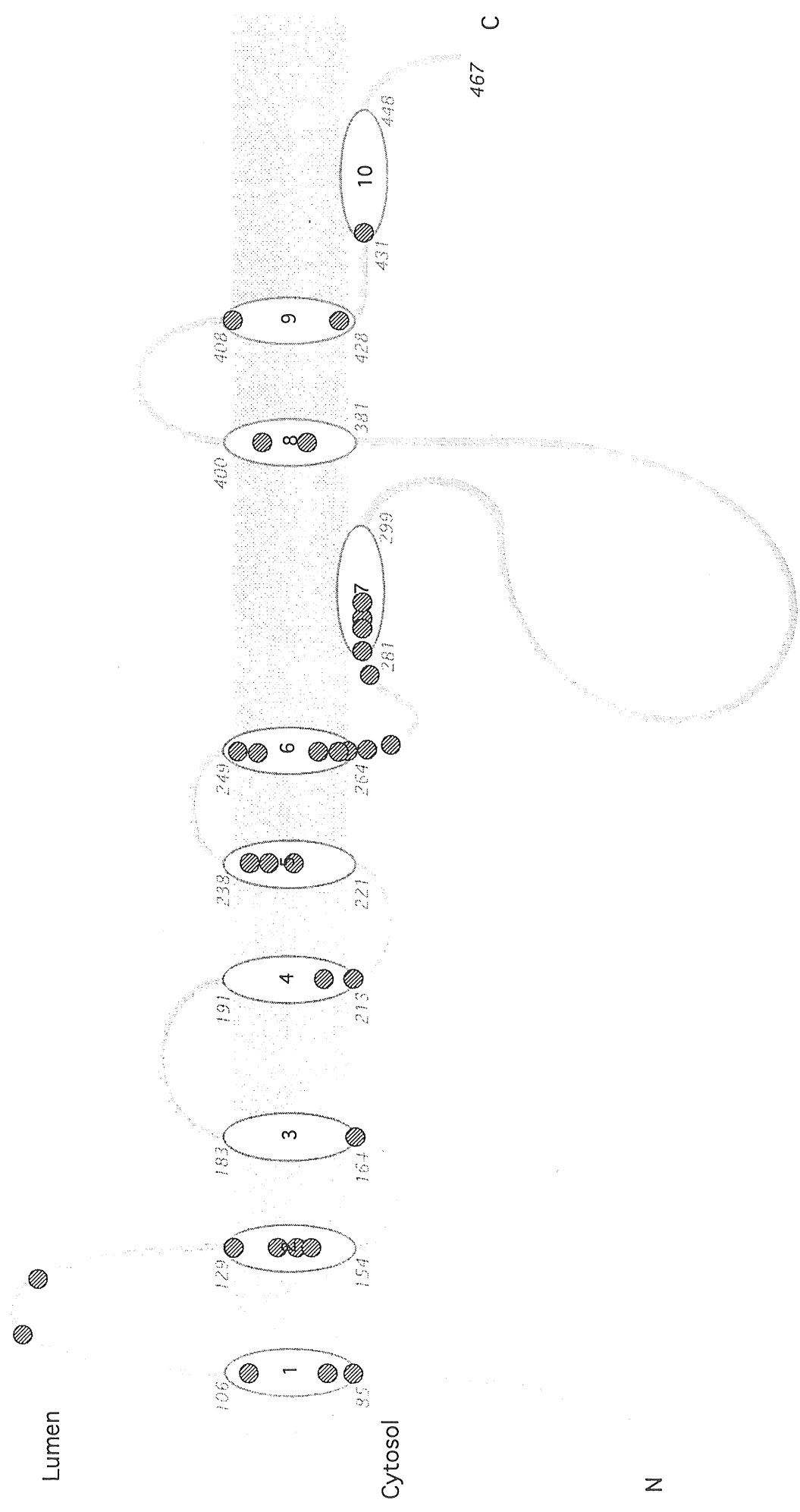


图5. PS1 蛋白と点突然変異の位置. ● ; 点突然変異部位

第 I 章

A β 1-40及びA β 25-35の神経細胞毒性

1. 目的

初代神経細胞培養系におけるA β の神経細胞毒性はすでに認められてはいるが、その培養条件やA β 毒性結果などは報告により様々であり、実験条件を明らかにしていない報告も非常に多い。我々は初代神経細胞培養系におけるA β 毒性を確認するとともに、A β 毒性を消去する治療薬開発などを視野に入れた初代神経細胞培養系確立を目的とし実験を行った。またこのA β 毒性は本研究全体がアミロイド仮説にその基盤を求めることから、極めて重要な位置づけがされている。

2. 対象と方法

初代神経細胞培養：

ICR系マウス (Japan SLC bleeding) 胎生16-17日齢の脳皮質神経細胞を0.05 %trypsin (Gibco-BRL) , 0.2% DNase I (Worthington)150 μ l, 15分間37℃の条件でdissociateしたものを用いた。培養液はDulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (Gibco-BRL)に5% horse serum (HS) (heat inactivated; Biocell), 5% fetal bovine serum (FBS) (heat inactivated; Hyclone) , 5 μ g/ml Na₂SeO₃, 100 μ M putrescine, 1 μ M progesterone, 5 μ g/ml transferrin, 5 μ g/ml insulin を加えて用いた。ただし、4日目に添加するA β を希釈するための培養液はHSとFBSを除いたものである (1)。

細胞密度は、神経細胞数測定用として2.5 μ g/ml poly-L-lysine (Sigma)コートした24well (2 cm²/well) 組織培養皿 (Falcon) に1 \times 10⁴/cm² (400 μ l/well) の細胞密度で播種し、5% CO₂, 95% room air, 37℃の条件で細胞培養した。4日間培養後の細胞にA β を添加した。

A β の調製：

human A β 1-40 (DAEFRHDSGYEVHHQKLFFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV; Bachem :Lot#76H49611), human A β 25-35 (GSNKGAIIGLM; Bachem : Lot#514718) を2 mM HCl (Wako 精密分析用) で溶解し、各200 μ gに分注し、凍結乾燥後に使用前まで-80℃で保存した。また、使用直前に再度、2 mM HClで溶解し凍結乾燥を行い、TFAを完全に取り除いた (2) 。A β は最初 0.1 μ g/ μ lの濃度で培養液 (serum free) に溶

解し、さらに超音波細胞破砕器 (Seiko 7040) で10秒間、4回 超音波破砕を実施して完全に溶解させた。 1.0×10^5 nM ($A\beta$ 1-40 は 2.0×10^4 nM) から 2 nMの希釈系列を作成し、培養細胞4日目に培養液を半分 (200 μ l) 置換するという方法で添加した。従って、 $A\beta$ の最終濃度は 0.5×10^5 nM ($A\beta$ 1-40 は 1.0×10^4 nM) から 1 nMである。serum free medium のみを添加したコントロールも同時に作成した。さらに2日間培養後に神経細胞毒性を測定した。

細胞毒性測定：

生存する神経細胞数を計測する目的で神経細胞特異蛋白であるMAP-2 (a, b, c) を認識する抗MAP-2抗体で免疫染色し、神経細胞数をカウントし、コントロールと比較して求めた。まず、培養細胞の固定は0.3% Triton-X 100, 4% paraformaldehyde / 0.12 M sucrose / PBSにて室温で30分間行い、20% calf serum (CS)/PBSにてブロッキング後、抗MAP-2抗体 monoclonal antibody ($\times 200$; Sigma) /10% CS/PBSを1次抗体として用い、一昼夜、4℃で反応させた。PBSにて3回洗浄後に2次抗体の biotinized 抗 mouse IgG抗体 ($\times 500$; Vector) /10%CS/PBSを用い、一昼夜、4℃で反応させた。ABC法 (Vectastain elite ABC kit: Vector) で発色後に写真撮影を行った。1つの軸索を持ち、幾つかの神経突起を有する形態的に正常な神経細胞をカウントした。各well平均200個以上の神経細胞をカウントした。各 $A\beta$ 濃度に3wellを使用し、各濃度の cell の平均神経細胞個数を求めた。コントロールとの平均神経細胞個数との比を計算し %control とし、標準誤差 (S. E.) も同時に求め、同じ実験を3回行った。

3. 結果および考察

$1 \times 10^6/\text{cm}^2$ の細胞密度で $A\beta$ の毒性を調べると $1 \times 10^4/\text{cm}^2$ の細胞密度と同程度の細胞毒性を得るのに、約10倍の $A\beta$ 濃度が必要である (未発表データ)。つまり、細胞密度が高すぎても $A\beta$ の神経毒性が出にくいことが判っている。至適細胞密度は $1 \sim 5$ ($\times 10^4/\text{cm}^2$) の細胞密度である。この細胞密度でのserum free培養液による神経細胞の生存維持は不可能であり、serum入りの培養液を使わねばならない。

本研究の培養条件にて神経細胞数計測時に全細胞に占める神経細胞（MAP-2 陽性細胞）の比率は 90% 以上であった。A β 濃度によって、軸索及び神経突起の伸長が阻害される（図 1）。A β 1-40 及び A β 25-35 において濃度依存的に神経細胞毒性が認められた（図 2）。毒性は過去の報告にほぼ一致していた（2, 3）。A β 1-40 は A β 25-35 に比べて同濃度で毒性が強いと考えられた。

引用文献

- 1) Banker, G. A. , and Cowan, W. M. (1977) Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture. Brain Res. 26: 397-425.
- 2) Kaneko, I. , Yamada, N. , Sakuraba, Y. , Kamenosono, M. , Tutumi, S. (1995) Suppression of mitochondrial succinate dehydrogenase, a primary target of β -amyloid, and its derivative racemized at Ser residue. J. Neurochem. 65: 2585-2593.
- 3) Yankner, B. A. , Duffy, L. K. , Kirschner, D. A. (1990) Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides. Science 250: 279-282.

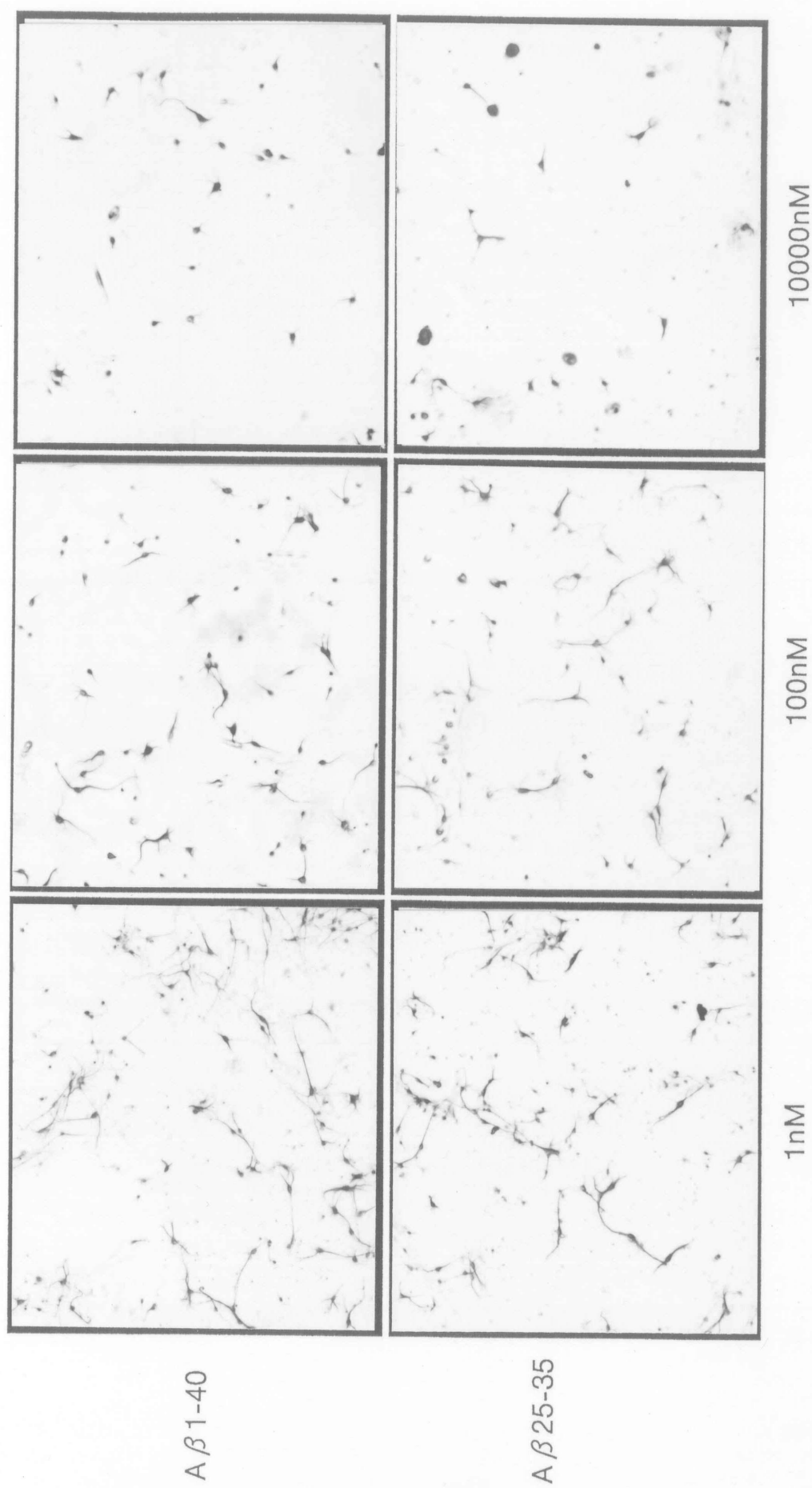


図1 A β 1-40及びA β 25-35の各濃度におけるマウス大脳皮質初代培養の抗MAP-2抗体による免疫細胞染色. (×90)

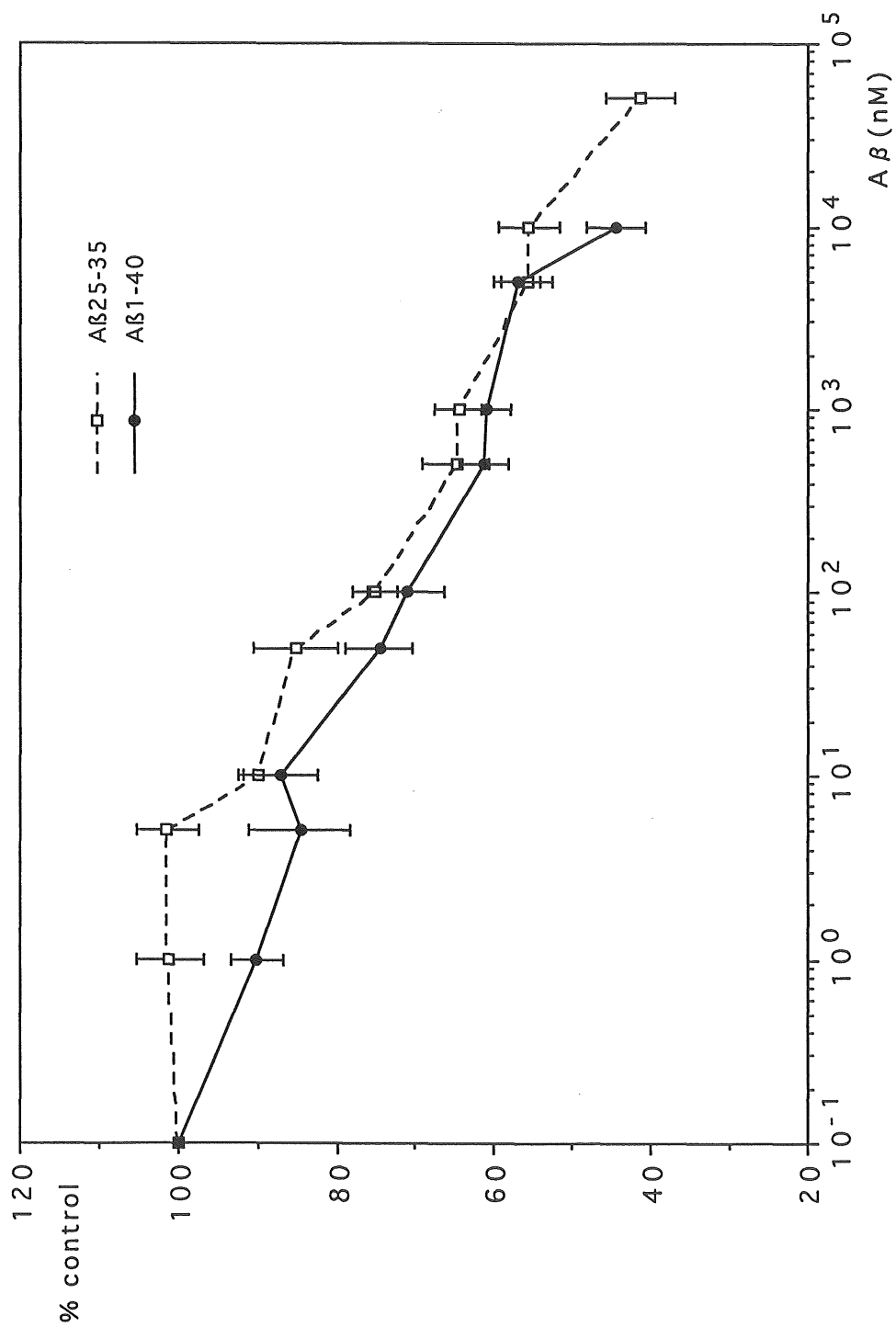


図2. マウス初代神経細胞培養におけるAβ25-35及びAβ1-40の神経細胞毒性.

第Ⅱ章

アルツハイマー病における $A\beta$ とApolipoprotein E の
genotype 効果

(参考文献1 ; Brain Research 748, 1997: 250-252)

1. 目的

ApoE ϵ 4 allele は晩期発症型 FAD の関連が指摘されている (1) . また, sAD におけるリスク因子であることもわかった (2) . sAD も晩期発症型 FAD も臨床症状や脳の病理所見は同じである. しかるにこれら sAD と FAD では, 病態機構や既知の原因遺伝子から作られる蛋白間の相互作用が非常に類似しており, 同じ現象をみている可能性が高い. 近年, sAD で, ApoE の genotype と老人斑における A β 分子種の関係が免疫組織学的に明らかになった (3) . しかしながら, 免疫組織学的手法は既に手元にあるパラフィン切片を使用し簡便に行える利点はあるが, 組織を2次元でしかも1部分のみを検討しており, 結果が全体を反映しない危険性が大きい. 我々は凍結剖検脳を使い, 生化学的手法で, ApoE の genotype と A β 分子種の関係を調べることを目的とした.

2. 対象及び方法

A β の定量:

sAD 患者剖検脳の側頭葉で -80°C 凍結保存された36例 (死亡時平均年齢76.4歳; 56~98歳) を対象にした.

凍結剖検脳 (約0.5 g) に5体積量の蟻酸を加え, テフロン製ホモジェナイザーにて懸濁し, さらに超音波細胞破碎器 (Seiko 7040) で10秒間, 3回施行した. 次に100,000 \times g, 4°C にて30分間の遠心分離 (Hitachi himac CS120, RP80AT rotor) を行い, 上清 (蟻酸可溶性画分) を得た. その上清を NaOH で中和後に sandwich ELISA法にて各A β を定量した. sandwich ELISA 法のN末認識抗体 (固相抗体) として BAN50 (anti-A β 1-16) または BNT77 (anti-A β 11-28) を使用した. また, C末認識抗体 (標識抗体) として BA27 (anti-A β 1-40) または BC05 (anti-A β 35-43) を使用した (図1) . A β 1-40 及び A β 1-42 ペプチドの用量反応曲線から, サンプルの各 A β 量を計算した (4) .

ApoE の型決定:

凍結剖検脳に1ml buffer (10 mM Tris-HCl pH8.0, 0.1 M EDTA pH 8.0, 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ RNAase, 0.5% SDS) を加えテフロン製ホモジェナイザーにて懸濁後, 37°C

1 時間反応させた。次に100 μ g の proteinase K (Boeringer Mannheim) を加え、さらに55°C 3 時間反応させ、フェノール・クロロフォルム抽出後に 10 M $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, 100% ethanol にて genomic DNA を沈殿させた。genomic DNA を TE で溶解後に0. D. 260 nm を測定し、各サンプルの DNA 量を決定した。

primer として primer 1 ApoE23: 5'-TCCAAGGAGCTGCAGGCGCGCA-3' primer 2 ApoE31: 5'-ACAGAATTGCGCCCGGCCTGGTACACTGCCA-3' を用いて95°C 30秒, 64°C 1分, 72°C 1.5分を1 cycle として40 cycles 行った (ASTEC, PC-700) . positive controlとして pEFbos-human E2, pEFbos-human E3 及び pEFbos-human E4 (100 ng) を用いた。次に PCR 産物を制限酵素 Hha I (Takara) にて37°C, 2 時間の条件で消化した。Hha I 消化産物を 8% acrylamide gel にて電気泳動(100V, 40分, 室温) し, positive control のパターンと比較して、各サンプルの ApoE のゲノム型決定を行った (5) (図2) .

3. 結果及び考察.

ApoE のゲノム型は $\epsilon 3/\epsilon 3$: 20例, $\epsilon 3/\epsilon 4$: 12例, $\epsilon 4/\epsilon 4$: 4 例であった。full-length form $\text{A}\beta 1-40$ は $\epsilon 3/\epsilon 3$: 0.641 ± 0.171 , $\epsilon 3/\epsilon 4$: 8.09 ± 4.32 , $\epsilon 4/\epsilon 4$: 13.5 ± 8.29 (mean \pm S.E. ; nmol/g) であり, $\text{A}\beta 1-42$ は 14.7 ± 3.41 , 14.8 ± 3.33 , 34.5 ± 11.6 (nmol/g) であった。N末が切断されているtruncated form は $\text{A}\beta \text{X}-40$: $\epsilon 3/\epsilon 3$: 4.39 ± 3.33 , $\epsilon 3/\epsilon 4$: 14.7 ± 7.04 , $\epsilon 4/\epsilon 4$: 41.6 ± 24.4 (nmol/g) であり, $\text{A}\beta \text{X}-42$ は 78.3 ± 14.5 , 76.2 ± 12.4 , 185.0 ± 69.9 (nmol/g) であった。各群において標本分布が偏っていたため、全データを対数値に変換し, $\log (\text{A}\beta 1-40) = [\text{A}\beta 1-40]$ と表記して、以後の統計処理を行った。すなわち, $\epsilon 3/\epsilon 3$, $\epsilon 3/\epsilon 4$, $\epsilon 4/\epsilon 4$ の各群の full-length form である $[\text{A}\beta 1-40]$ は 2.42 ± 0.16 , 3.13 ± 0.29 , 3.89 ± 0.33 ($\log (\text{nmol/g})$) で, $[\text{A}\beta 1-42]$ は順に 3.80 ± 0.18 , 4.10 ± 0.28 , 4.46 ± 0.19 ($\log (\text{nmol/g})$) であった (図3) . また, truncated form の $[\text{A}\beta \text{X}-40]$ は 2.89 ± 0.15 , 3.56 ± 0.23 , 4.29 ± 0.41 ($\log (\text{nmol/g})$) で, $[\text{A}\beta \text{X}-42]$ 4.65 ± 0.13 , 4.71 ± 0.17 , 5.20 ± 0.16 ($\log (\text{nmol/g})$) であった

(図4)． $[A\beta]$ の平均値に各群間で差があるか Fisher's LSD (least significant difference) 法を用い統計学的に調べたところ、 $[A\beta 1-40]$ と $[A\beta X-40]$ は危険率 $P<0.05$ で $\epsilon 3/\epsilon 3$ 群と $\epsilon 3/\epsilon 4$ 群間および $\epsilon 3/\epsilon 3$ 群と $\epsilon 4/\epsilon 4$ 群間において有意差がみられた。 $[A\beta 1-42]$ および $[A\beta X-42]$ は各群間において有意差は認められなかった(図3, 4)．さらに有意差をより確実なものとするために $[A\beta 1-40]/[A\beta 1-42]$ および $[A\beta X-40]/[A\beta X-42]$ を求め各群間で比較したところ、同様に危険率 $P<0.05$ で $\epsilon 3/\epsilon 3$ 群と $\epsilon 3/\epsilon 4$ 群間および $\epsilon 3/\epsilon 3$ 群と $\epsilon 4/\epsilon 4$ 群間において有意差がみられた(図5)．

以上をまとめると、ApoE $\epsilon 4$ は sAD 脳内における $[A\beta 1-40]$ 及び $[A\beta X-40]$ を有意に増加させる．ApoE $\epsilon 4$ は sAD 脳内における $[A\beta 1-40]/[A\beta 1-42]$ 及び $[A\beta X-40]/[A\beta X-42]$ の比を有意に増加させる．N末が切断されているtruncated form と full length formの結果が同じことから、ApoE genotype の $A\beta$ 沈着に及ぼす効果は $A\beta$ のC末端に関連し、N末端は影響されないことがわかった．

我々の結果は $A\beta 1-40$ (Ter-40) 及び $A\beta 1-42$ (43) (Ter-42) 末端認識抗体を用いて各々老人斑の個数と面積比を免疫組織学的に定量した報告結果をさらに強固に支持するものである(3)．また、ApoE $\epsilon 4$ は老人斑や血管への $A\beta$ の蓄積を増加させるという、これまでの報告を同時に支持するものであり、従来の主張とも矛盾しない(6, 7, 8, 9)．

脳内に沈着する $A\beta$ 分子種は早期発症型 FAD と晩期発症型 sAD とでは異なるようである．PS1 や β APP の関連した FAD は血漿や細胞上清に $A\beta 1-42$ (43) が増加しているとの報告がある．一方、晩期発症型 AD の危険因子である ApoE $\epsilon 4$ が $A\beta 1-40$ と関係していることをこの研究で示した．知る限りにおいて、早期発症型 FAD における ApoE $\epsilon 4$ と $A\beta$ の関係を生化学的に調べた報告はない． $A\beta 1-40$ における ApoE $\epsilon 4$ allele 効果は sAD だけでなく、FAD にも認められる可能性があり、今後の重要な研究課題であるといえよう．

引用文献

- 1) Corder, E. H., Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Schmechel, D. E., Gaskell, P. C., Small, G. W., Roses, A. D., Haines, J. L., Pericak-Vance, M. A. (1993) Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261: 921-923.
- 2) Corder, E. H., Saunders, A. M., Risch, N. J., Strittmatter, W. J., Schmechel, D. E., Gaskell, P. C. Jr. Rimmler, J. B., Locke, P. A., Conneally, P. M., Schmechel, K. E. et al (1994) Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat. Genet.* 7: 180-184.
- 3) Gearing, M., Mori, H., Mirra, S. S. (1996) A beta-peptide length and apolipoprotein E genotype in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 39: 395-399.
- 4) Suzuki, N., Cheung, T. T., Cai, X. D., Odaka, A., Otvos, L. Jr., Eckman, C., Golde, T. E., Younkin, S. G. (1994) An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. *Science* 264: 1336-1340.
- 5) Hixson, J. E., Vernier-DT (1990) Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. *J. Lipid Res.* 31: 545-548.
- 6) Greenberg, S. M., Rebeck, G. W., Vonsattel, J. P., Gomez-Isla, T., Hyman, B. T. (1995) Apolipoprotein E epsilon 4 and cerebral hemorrhage associated with amyloid angiopathy. *Ann. Neurol.* 38: 254-259.
- 7) Iwatsubo, T., Mann, D. M., Odaka, A., Suzuki, N., Ihara, Y. (1995) Amyloid beta protein (A beta) deposition: A beta 42(43) precedes A beta 40 in Down syndrome. *Ann. Neurol.* 37: 294-299.
- 8) Rebeck, G. W., Reiter, J. S., Strickland, D. K., Hyman, B. T. (1993)

Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer's disease: allelic variation and receptor interactions. *Neuron*. 11: 575-580.

- 9) Schmechel, D.E., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Crain, B.J., Hulette, C.M., Joo, S.H., Pericak-Vance, M.A., Goldgaber, D., Roses, A.D. (1993) Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 9649-9653.

凍結剖検脳，約0.5g + 5vol. 蟻酸



懸濁及び超音波破碎



100,000 Xg, 30分間, 4℃



上清をNaOHにて中和



sandwich ELISA

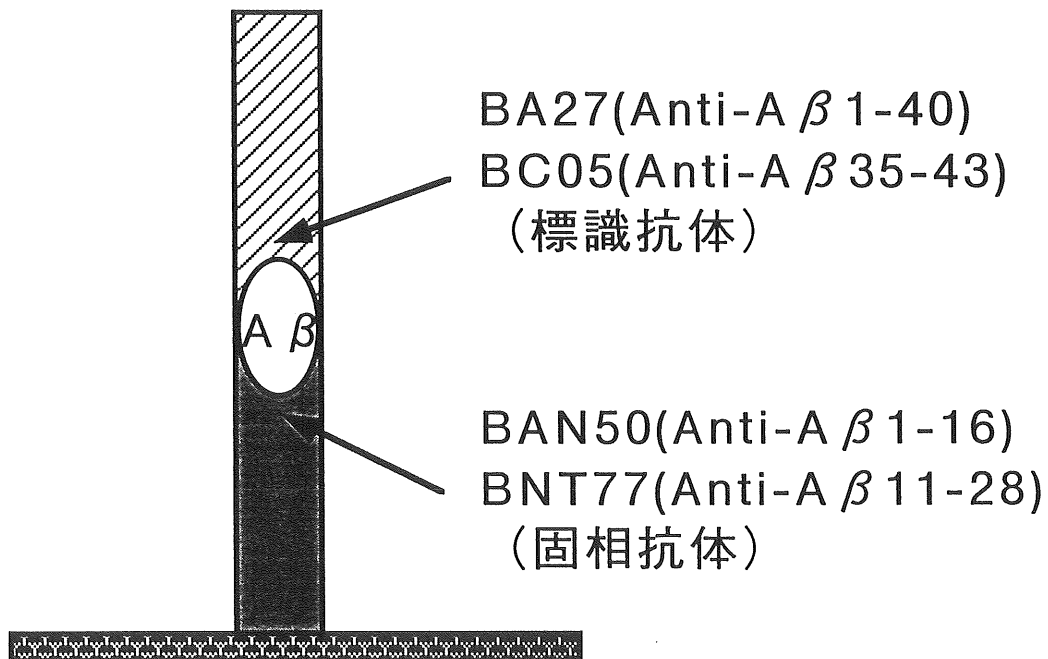


図1. A β 40及び42のsandwich ELISA法による定量. (Suzuki et al, 1994, Science)

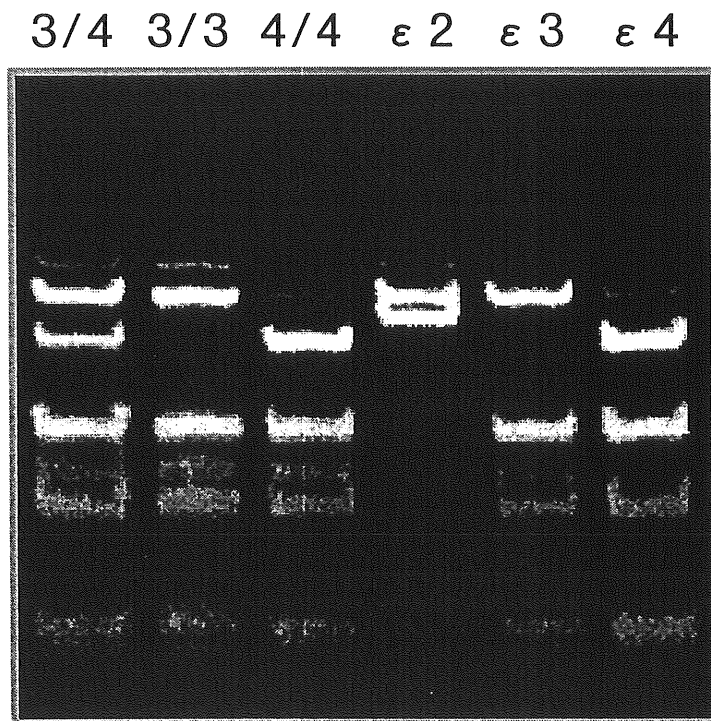
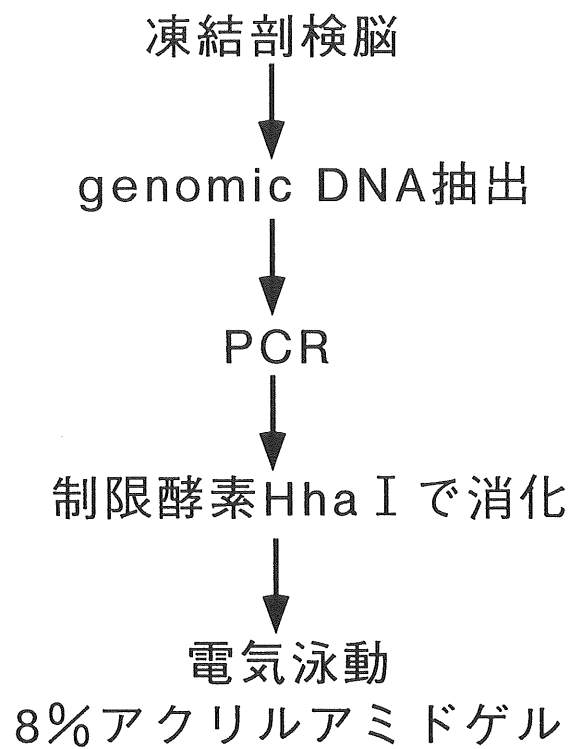


図 2 . ApoEのゲノム型決定方法.
(Hixson et al, 1990, J. Lipid. Res)

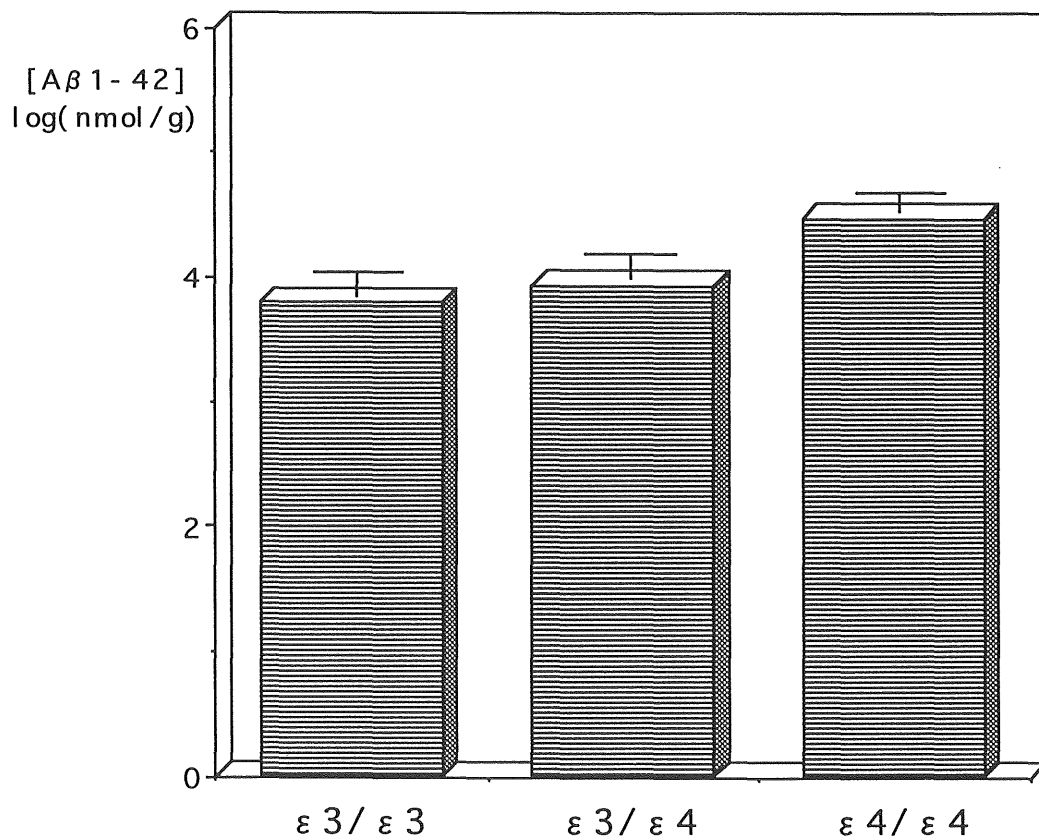
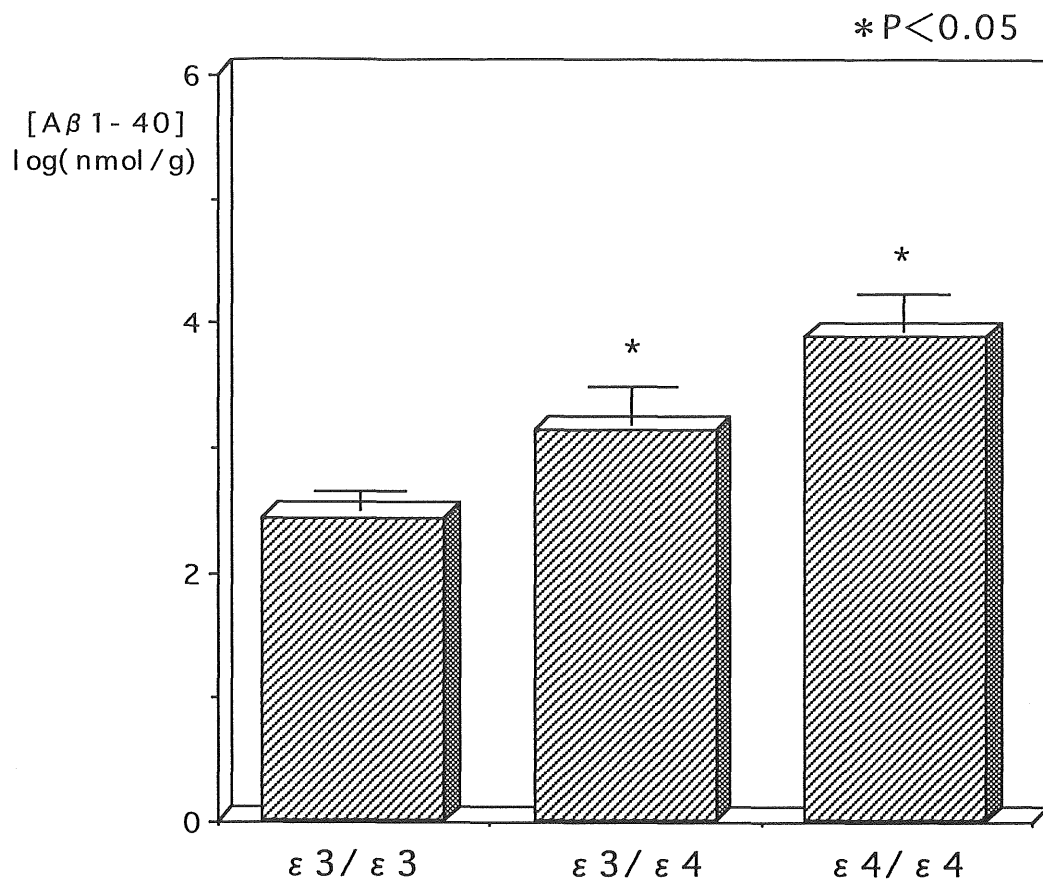


図3. Aβ 1-40及びAβ 1-42(full-length form)の ApoE ε 4効果.

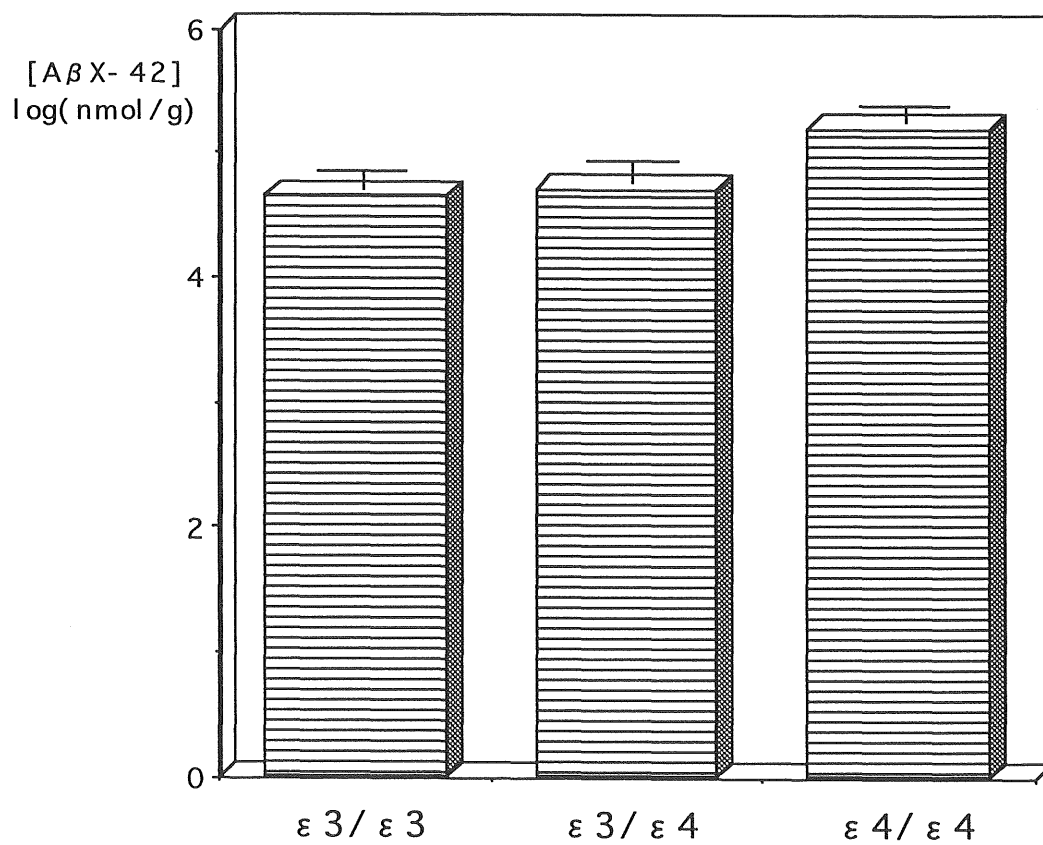
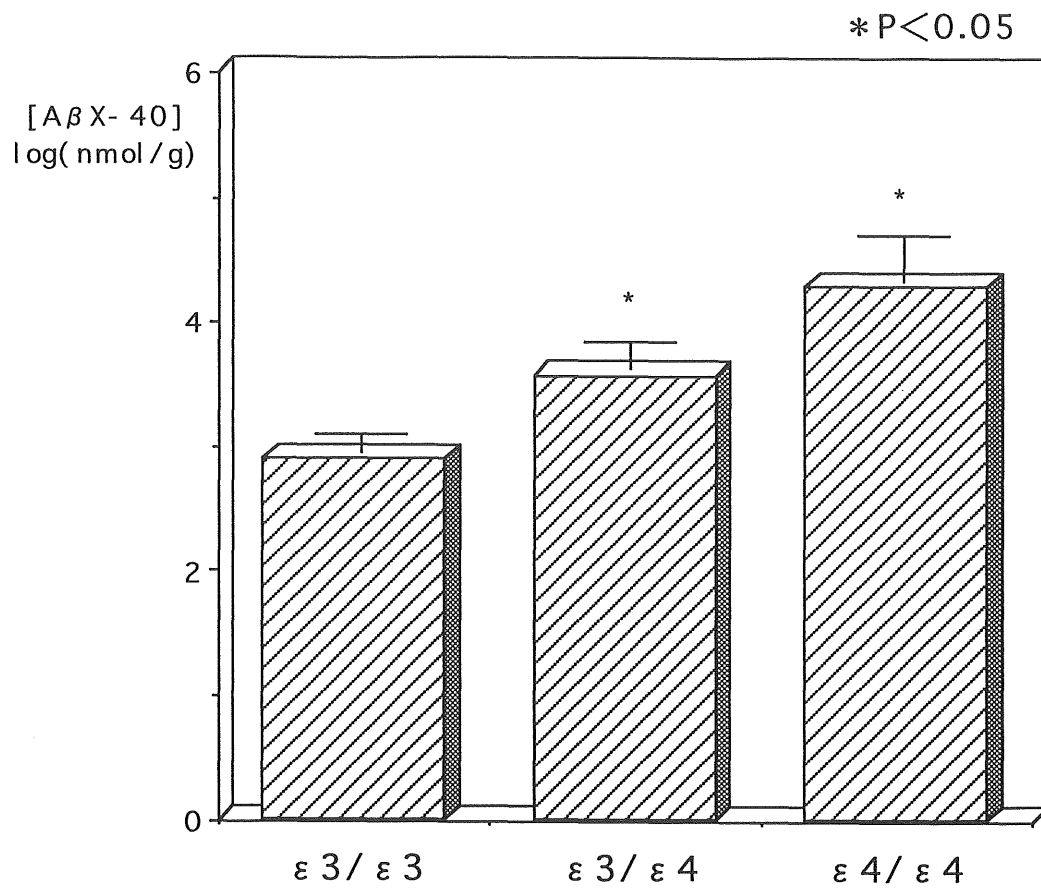


図4. AβX-40及びAβX-42(truncated form)の ApoE ε4効果.

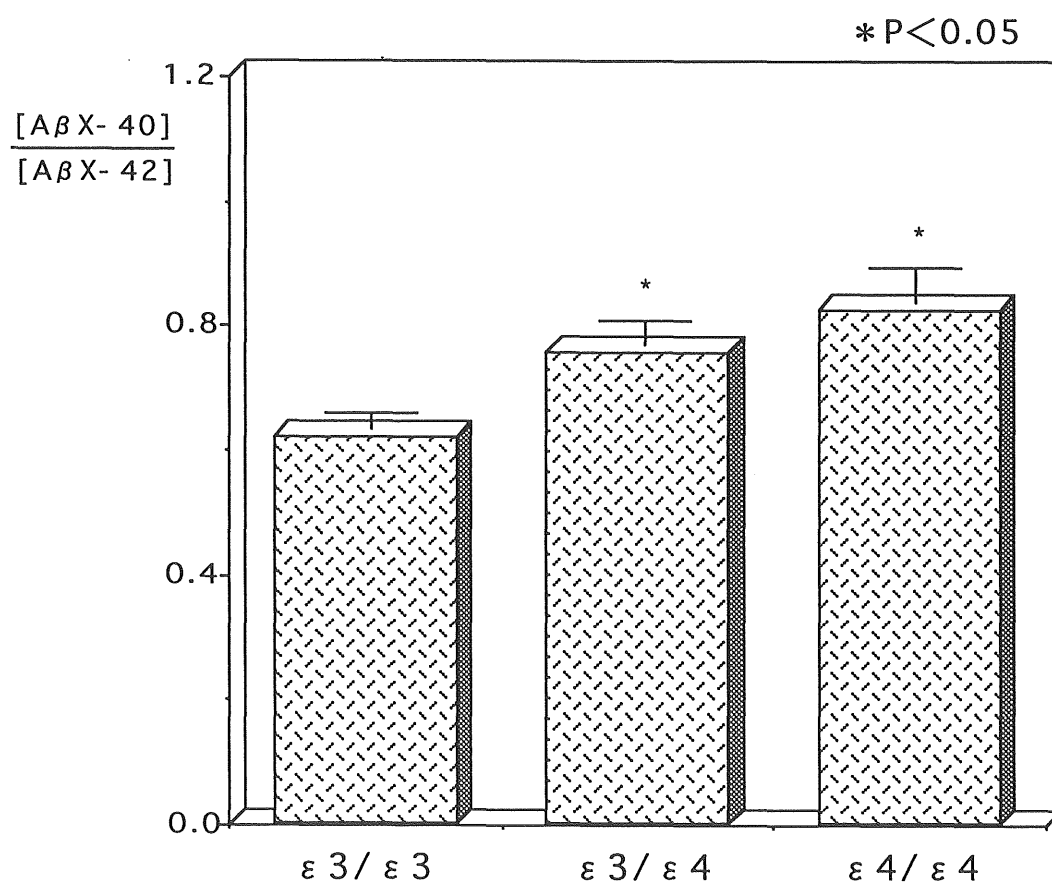
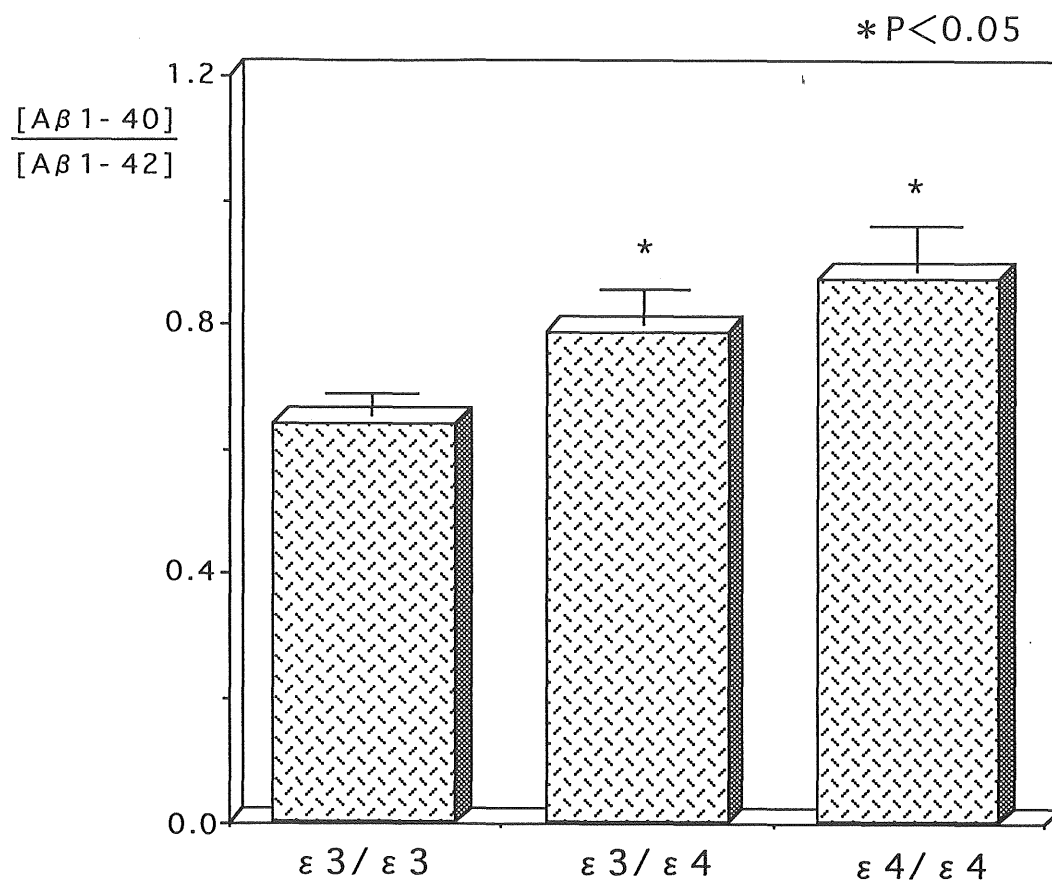


図 5. $A\beta 40/A\beta 42$ の ApoE $\epsilon 4$ 効果.

第Ⅲ章

アルツハイマー病における $A\beta$ と
presenilin 1のミスセンス変異効果
(参考文献2 ; Neuroscience letters 228, 1997: 17-20)

1. 目的

大部分の AD は sAD であり、遺伝性を示す FAD の割合はたかだか数%ではあるが、FAD のもつ意義は逆により重要である。両者の臨床像と病理に本質的な差はなく、むしろ FAD が遺伝性である点から染色体上の異常に的を絞りきれぬ点でも完結的な結論が得られる。さらに、遺伝的に均質なことから AD の原因を探る上で非常に有利であることがその主要な根拠である。よって、この FAD に対する研究の成果が、環境要因が複雑に関与している sAD の原因解明にも繋がると考えられている。

FAD のうち、 β APP717 と β APP670/671 では免疫組織学的検索で老人斑における $A\beta$ 1-42(43) が増加している (1)。さらに PS1 の点突然変異のある FAD 家系の患者血漿中及び線維芽細胞の培養上清中の $A\beta$ 1-42(43) 濃度が正常コントロールと比較して有意に上昇しているという報告もある (2)。これら事実から PS1 点突然変異患者の剖検脳における老人斑において $A\beta$ 1-42(43) が増加していることが推察される。我々は PS1 (H163R) 点突然変異患者及び PS1 (exon 9 deletion: Δ 9) 患者の剖検脳を用い、免疫組織学的手法で定量的に $A\beta$ 1-42(43) の増加を確認することを目的とした。

2. 対象及び方法

対象：

sAD (75歳，女性，罹病期間16年間；63歳，男性，罹病期間11年間；62歳，男性，罹病期間 8 年間) 3 例の側頭葉（中側頭回）切片．PS1 (H163R) 点突然変異患者 (62歳，女性，罹病期間 11年間) の側頭葉（中側頭回）切片 (3)．PS1 (Δ 9) 患者 (64歳，男性，罹病期間19年間) の側頭葉（中側頭回）切片 (4) ．

抗体の作成：

$A\beta$ 1-40 と $A\beta$ 1-42 の各々 C 末端 5 アミノ残基の VGGVV と GVVIA の合成ペプチドを作成し key hole limpet hemocyanin を結合した後，ウサギに免疫し，各々を Ter-40 及び Ter-42 とした．それらの抗体価と反応性は $A\beta$ の C 末端 $A\beta$ 1-40 及び $A\beta$ 1-42(43) を使って調べた (5, 6) ．

免疫組織染色:

組織ブロックを formalin にて固定, 脱水後に paraffin に包埋し, ミクロトームで $5\ \mu\text{m}$ の切片にした. 切片を脱 paraffin 処理後に 99% 蟻酸にて 10 秒間前処理を行った (7). 20%CS / PBS にて blocking 後に 1 次抗体の Ter-40 または Ter-42 ($\times 400$: polyclonal antibody) / 10%CS / PBS を用い, 一昼夜 $4\ ^\circ\text{C}$ で反応させた. 2 次抗体の biotinized 抗rabbit IgG 抗体 ($\times 500$; Vector) / 10%CS / PBS を用い, 一昼夜, $4\ ^\circ\text{C}$ で反応させた. 次に ABC 法 (Vectastain elite ABC kit: Vector) で処理し, 0.2 mg/ml 3,3'-diaminobenzidine, 0.01% H_2O_2 で発色した. 老人斑の形態学的解析:

形態学的解析はまず免疫染色切片で関心領域を 100 倍で 5 領域, 写真撮影した. 写真撮影に際し, Ter-40 と Ter-42 の免疫染色切片上で同一領域を選んだ. キャビネ大の写真を Scanner-computer system (Hewlett Packard ScanJet 4C/T, Power Macintosh 8100/100) で gray scale digital image に変換した. コントラストと明るさを標準化した後, artifacts を画像解析ソフトウェア (NIH imaging 1.52, Adobe Photoshop 3.0J) にて除去した. この時, 同時に血管アミロイドを含む老人斑以外の染色部位を取り除いた. Ter-40 及び Ter-42 染色部分の面積を計測し, 全画面に対する比率として求めた (area ; %). また, 顕微鏡用 scale から画像の実面積を計算し, 老人斑の個数を単位面積あたりの個数 (個/ mm^2) で求めた.

3. 結果及び考察

Ter-42 陽性老人斑を面積比 (area) 及び単位あたりの個数 (density) の両方で sAD ($1.80 \pm 1.38\ \%$, 247 ± 43 個/ mm^2 ; mean \pm S.E.) と比較したところ, PS1 (H163R) ($4.74 \pm 0.38\ \%$, 633 ± 54 個/ mm^2) 及び PS1 ($\Delta 9$) ($6.17 \pm 0.16\ \%$, 641 ± 5 個/ mm^2) では有意に増加していた (Fisher's LSD 法: $*P < 0.001$) (図 1, 2).

Ter-40 陽性老人斑は単位あたりの個数 (density) について sAD (69 ± 22 個/ mm^2), PS1 (H163R) (51 ± 9 個/ mm^2) 及び PS1 ($\Delta 9$) (92 ± 13 個/ mm^2) の 3 群間で平均値に差は認められなかった. しかし, Ter-40 陽性老人斑の面積比は sAD ($0.414 \pm$

0.15 %) と PS1 ($\Delta 9$) (0.90 ± 0.17 %) 間で面積比の平均値で $P=0.07$ と PS1 ($\Delta 9$) の面積比が増加している傾向がみられた。さらに PS1 ($\Delta 9$) と PS1 (H163R) (0.19 ± 0.04 %) 間では面積比が PS1 ($\Delta 9$) で有意に増加していた (Fisher's LSD法: $*P < 0.001$) (図 1, 3)。

Ter-42 陽性老人斑は面積比及び単位あたりの個数の両方とも sAD と比較すると PS1 (H163R), PS1 ($\Delta 9$) の両方で増加していた。この結果は PS1 点突然変異を有する患者で血漿中の $A\beta 1-42(43)$ の濃度が増加していたとする、最近の報告に一致する (2)。

Ter-40 陽性老人斑は面積比に関して sAD や PS1 (H163R) と比べて, PS1 ($\Delta 9$) にて増加傾向がみられた。このことから $A\beta$ 蓄積に及ぼす PS1 の効果は PS1 点突然変異の部位によって変わる可能性が考えられた。 $\beta APP717$ の遺伝子を導入した培養細胞の上清では $A\beta 1-42(43)$ のみが増加し (8), $\beta APP670/671$ では $A\beta 1-40$ と $A\beta 1-42(43)$ の両方が増えていた (9)。しかし, $\beta APP717$ 及び $\beta APP670/671$ の剖検脳の免疫組織学的検索では, $A\beta 1-42(43)$ のみの蓄積増加がみられた。PS1 ($\Delta 9$) は PS1 (H163R) や βAPP 点突然変異と比べて $A\beta 1-40$ の蓄積傾向が認められることから, PS1 点突然変異の部位特異的效果が存在するのかもしれない。さらに PS1 には $A\beta$ 分泌とは異なった, $A\beta$ 沈着に関する変異部位特異的な作用があると考えられる。

PS1 と相同性が高い蛋白である SEL-12 や SPE-4 から PS1 の機能を推察すると PS1 は膜の recycling や trafficking に関係しているのかもしれない (10)。exon9 部分は点突然変異が集中している重要部分であり, ループ部分の前半を形成する親水領域でもあることから, 膜上で他の蛋白や細胞器官に影響を及ぼすことが考えられる (2, 4, 11)。PS1 の点突然変異は βAPP の maturation や βAPP の trafficking に障害を及ぼし, 結果として異常な $A\beta$ が産生されるのかもしれない。PS1 の生理機能及び病的機能を理解するためにも, PS1 と $A\beta$ または他の蛋白質との相互作用は解明されなければならない。さらに第 2 章で述べたように PS1 ($\Delta 9$) と PS1 (H163R) は ApoE の Type はまだ決定されていないので, PS1 ($\Delta 9$)

の $A\beta_{1-40}$ 増加は ApoE4 効果が原因である可能性も考えられ、両症例の ApoE 型を決定しなければならない。また、凍結脳から生化学的方法を用いて $A\beta$ 分子種の定量を行う必要がある。

引用文献

- 1) Mann, D.M., Iwatsubo, T., Ihara, Y., Cairns, N.J., Lantos, P.L., Bogdanovic, N., Lannfelt, L., Winblad, B., Maat-Schieman, M.L., Rossor, M.N. (1996) Predominant deposition of amyloid-beta 42(43) in plaques in cases of Alzheimer's disease and hereditary cerebral hemorrhage associated with mutations in the amyloid precursor protein gene. *Am. J. Pathol.* 148: 1257-1266.
- 2) Scheuner, D., Eckman, C., Jensen, M., Song, X., Citron, M., Suzuki, N., Bird, T.D., Hardy, J., Hutton, M., Kukull, W., Larson, E., Levy-Lahad, E., Viitanen, M., Peskind, E., Poorkaj, P., Schellenberg, G., Tanzi, R., Wasco, W., Lannfelt, L., Selkoe, D., Younkin, S. (1996) Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat. Med.* 2: 864-870.
- 3) Kamino, K., Sato, S., Sakaki, Y., Yoshiiwa, A., Nishiwaki, Y., Takeda, M., Tanabe, H., Nishimura, T., Ii, K., St-George-Hyslop, P.H., Miki, T., Ogiwara, T. (1996) Three different mutations of presenilin 1 gene in early-onset Alzheimer's disease families. *Neurosci. Lett.* 208: 195-198.
- 4) Sato, S., Kamino, K., Miki, T., Doi, A., Ii, K., St George-Hyslop, P.H., Ogiwara, T., Sakaki, Y. (1997) Splicing mutation of presenilin 1 gene for early-onset familial Alzheimer's disease. *Hum. Mutat.*, (in press).
- 5) Gearing, M., Schneider, J.A., Robbins, R.S., Hollister, R.D., Mori, H., Games, D., Hyman, B.T., Mirra, S.S. (1995) Regional variation in the distribution of apolipoprotein E and A β in Alzheimer's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 54: 833-841.
- 6) Gearing, M., Mori, H., Mirra, S.S. (1996) A beta-peptide length and apolipoprotein E genotype in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 39:

395-399.

- 7) Kitamoto, T., Ogomori, K., Tateishi, J., Prusiner, S.B. (1987) Formic acid pretreatment enhances immunostaining of cerebral and systemic amyloids. *Lab. Invest.* 57: 230-236.
- 8) Suzuki, N., Cheung, T.T., Cai, X.D., Odaka, A., Otvos, L. Jr., Eckman, C., Golde, T.E., Younkin, S.G. (1994) An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. *Science* 264: 1336-1340.
- 9) Citron, M., Oltersdorf, T., Haass, C., McConlogue, L., Hung, A.Y., Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Lieberburg, I., Selkoe, D.J. (1992) Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature* 360: 672-674.
- 10) Sherrington, R., Rogaev, E.I., Liang, Y., Rogaeva, E.A., Levesque, G., Ikeda, M., Chi, H., Lin, C., Li, G., Holman, K. et al (1995) Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375: 754-760.
- 11) Weidemann, A., Paliga, K., Durrwang, U., Czech, C., Evin, G., Masters, C.L., Beyreuther, K. (1997) Formation of stable complexes between two Alzheimer's disease gene products: presenilin-2 and beta-amyloid precursor protein. *Nat. Med.* 3: 328-332.

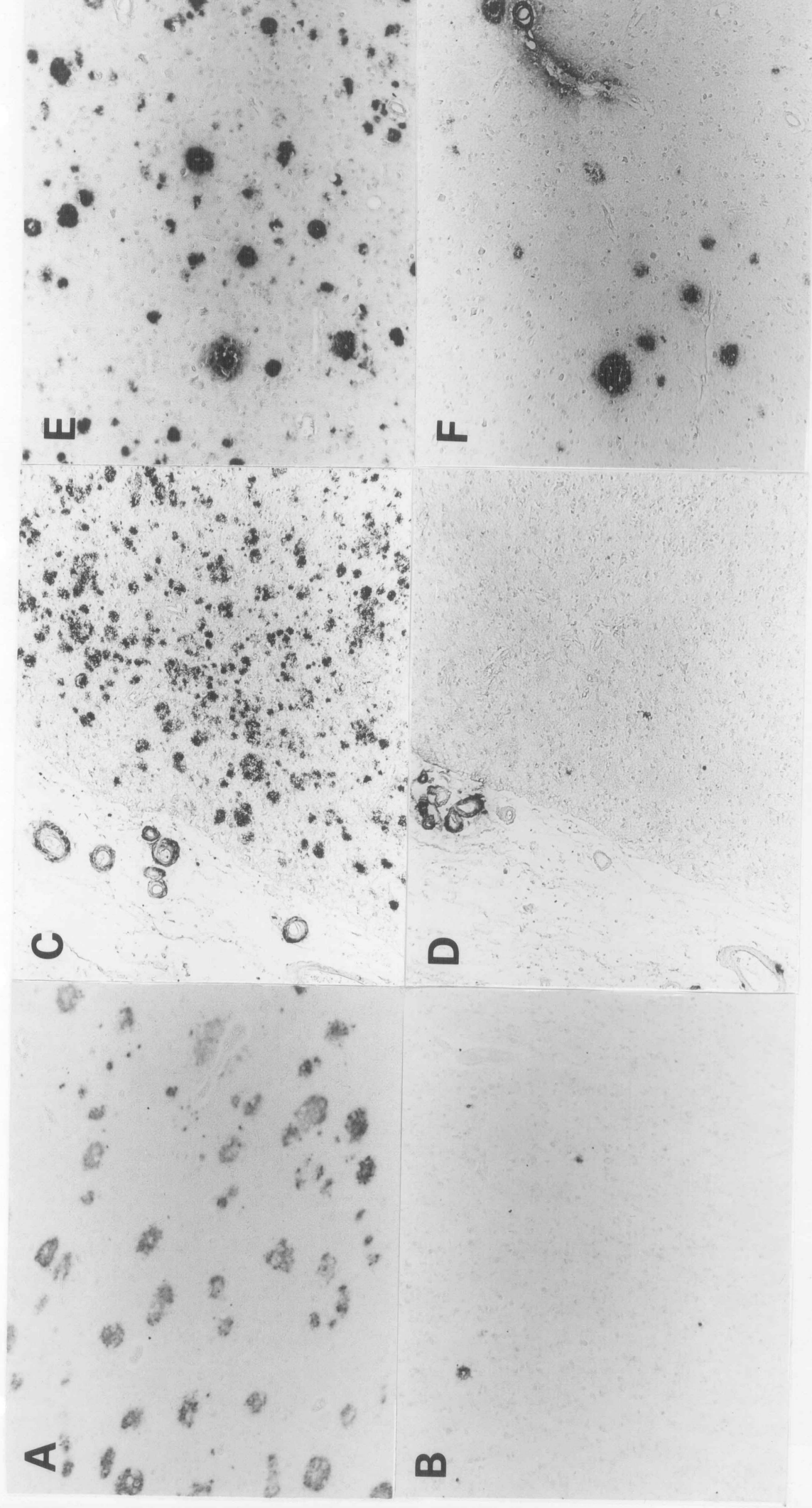
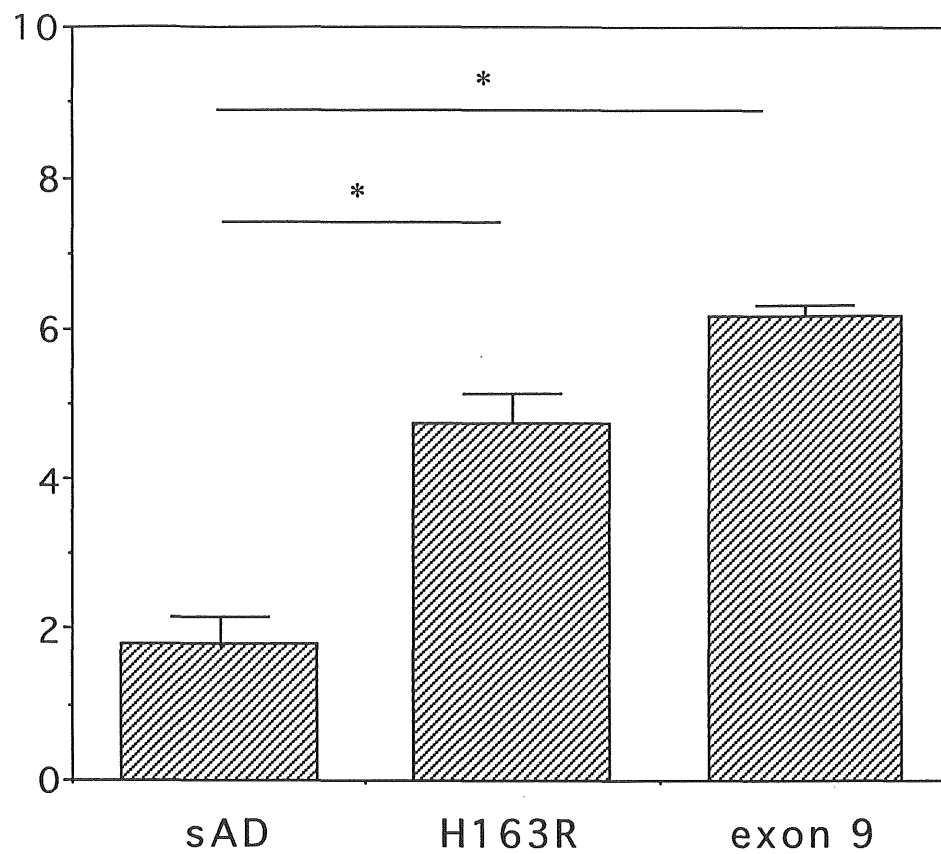


図1 Ter-40 及び Ter-42抗体を用いた老人斑と血管性アミロイドの
 免疫組織染色. A, C, E; Ter-42抗体による染色, B, D, F;
 Ter-40抗体による染色. A, B; SAD, C, D; PS1(H163R),
 E, F; PS1(Δ 9).

1-42 area ratio (%)

* $P < 0.001$



1-42 density (/mm²)

* $P < 0.001$

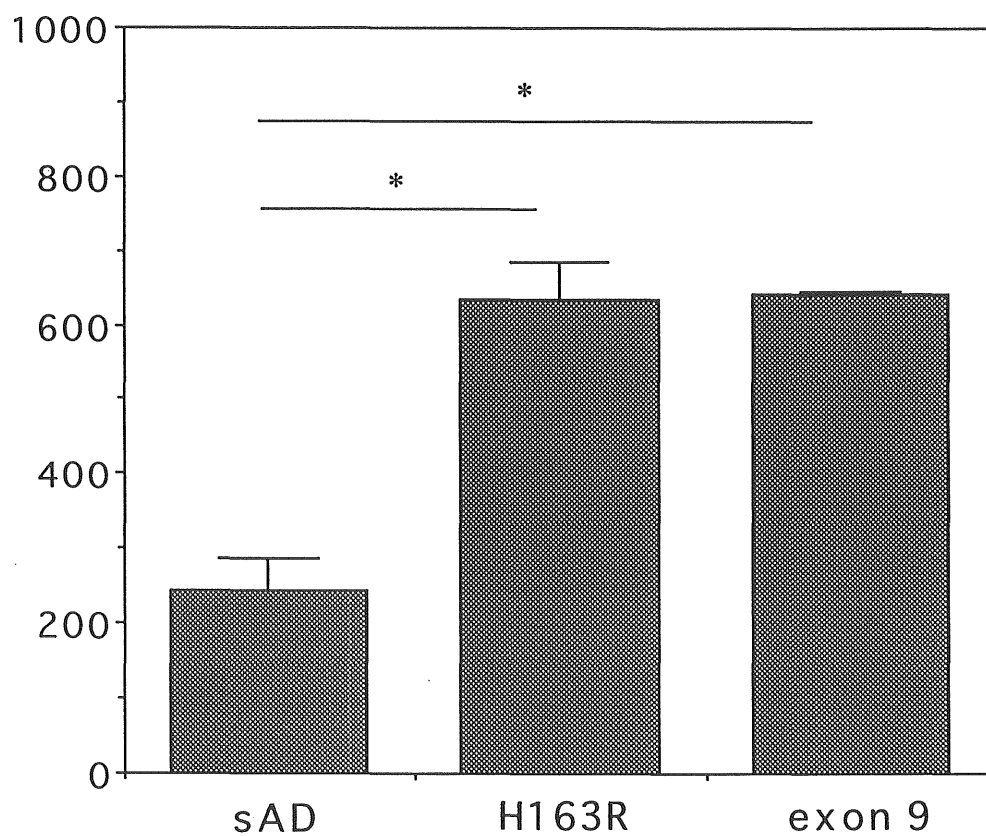
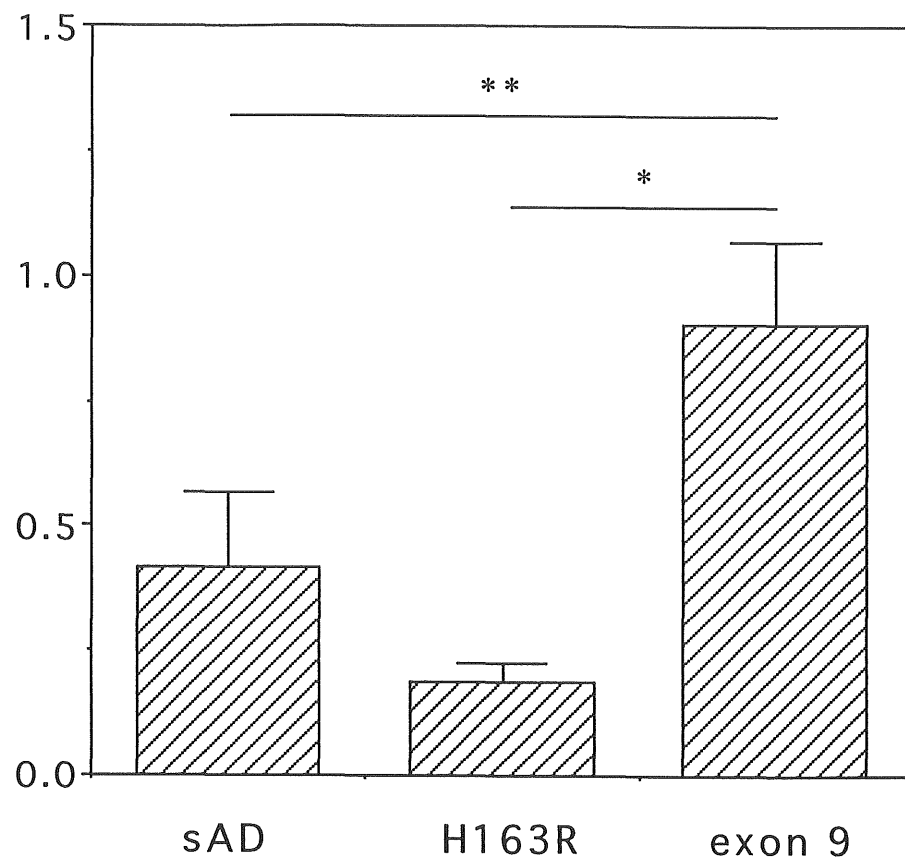


図2 Ter-42陽性老人斑のarea ratioとdensity

1-40 area ratio (%)

** P=0.07

* P<0.001



1-40 density (/mm²)

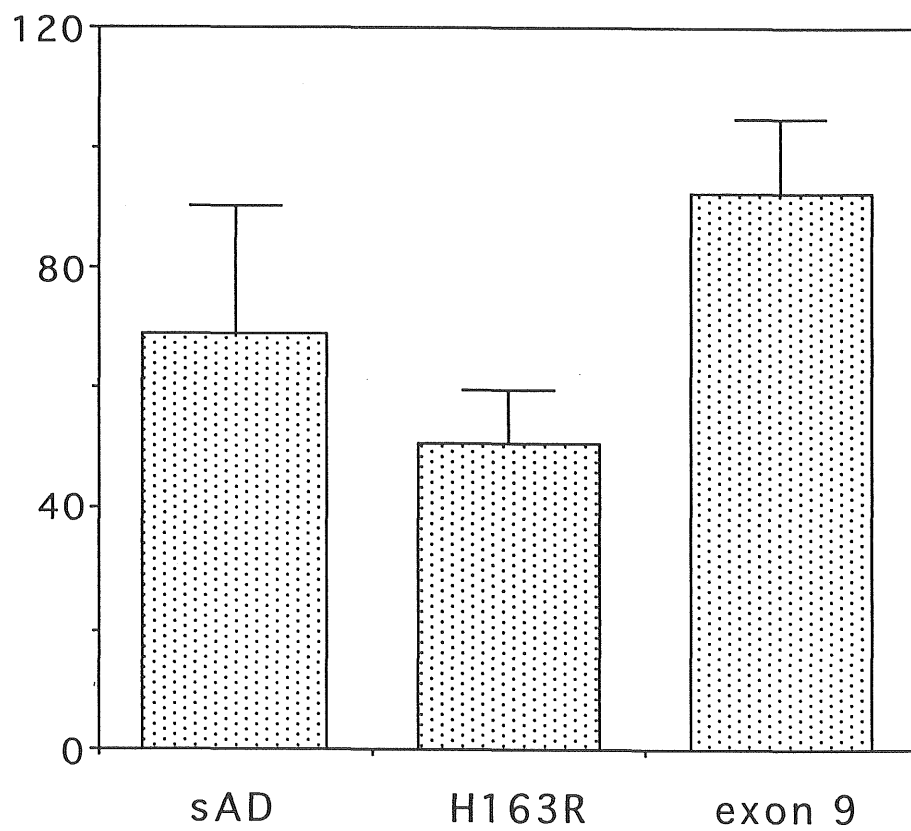


図3 Ter-40陽性老人斑のarea ratioとdensity

終章

本研究の成果を nucleation-dependent polymeration 仮説 (1, 2) に基づいて解説する。A β 1-42 が多量体化するのは 図1 より比較的速やかに進行するが A β 1-42 の nucleation 相が律速段階になっている。PS1 や β APP の点突然変異では血漿中や脳内で A β 1-42 が増加しており、核(nuclear)となる A β 1-42 が多く産生されることから growth 相への移行が早くなり、つまり AD 発症が若年化することが説明できる (図2) 。次に growth 相では A β の核に A β 1-42 だけでなく A β 1-40 も沈着してアミロイド線維を形成する (図1) 。ApoE ϵ 4 は A β 1-40 との結合が ApoE ϵ 3 より強いとする報告もあるので A β 1-40 に結合して A β 1-40 の核への蓄積を促進するのかもしれない。これは nucleation まで正常人と同様な速度で進行し、ApoE ϵ 4 が存在すると growth 相で蓄積が促進されるので発症が比較的加速される。sAD でも ApoE ϵ 4 の dose が増えるごとに発症が8-10 年早くなることが報告されており、分子レベルでの説明に合う結果である。本研究は、早期発症の PS1 (Δ 9) 及びPS1 (H163R) 脳内で A β 1-42 が増加していること、ApoE ϵ 4 の allele dose が増えるに従い A β 1-40 が脳内で増加していることを証明した。

我々の結果は nucleation-dependent polymeration 仮説の一部を証明したのみならず、今後の治療薬開発への手がかりを与えている。ほとんど多くの AD は sAD であり、晩期発症である。すなわち、nucleation 相は正常人とあまり変わらないことが想像される。問題は growth 相で、ここでは他の様々の外的・内的要因が影響を及ぼしている可能性が大きい。この growth 相が促進されている (傾きが大きい; 図2) ために sAD として発症するのであろう。従って、この growth 相を促進させる要因 (物質) を阻害することが分子レベルでのより現実的な治療薬になると考えられる。また、凝集A β によって生じる酸化ストレスを軽減させる一部の抗酸化剤も治療薬としての可能性を秘めている。A β 線維形成による神経細胞毒性実験系も確立していることから、抗酸化作用を持ち、A β に結合し、A β の凝集・線維形成を防ぐ可能性を秘めている Chrysamine G (コンゴレッドのカルボキシル酸類似体) (3, 4) のA β 神経毒性阻止効果をこの系で調べる予定である。今後はこの系を用い、他の治療薬候補物質を探索していきたい。

本稿では $A\beta$ による神経細胞死を中心に研究をすすめ、 $A\beta$ が毒性を発揮する凝集 $A\beta$ の分子種と原因蛋白との関係について明らかにしてきた。しかし、AD 脳内で起こっている事象はより複雑なはずで、神経-神経間または神経-グリア間のシグナル伝達異常や、局所の autocrine, paracrine などの液性因子による相互作用の異常などは全くわかっていない。原因蛋白の生理機能が解明され、神経細胞単独の異常ではなく神経細胞間のneural net work やグリア系細胞との相互作用における機能異常についても近い将来、目を向けられると思われる。

引用文献

- 1) Jarrett, J. T., Berger, E. P. Lansbury, P. T. Jr. (1993) The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* 32: 4693-4697.
- 2) Jarrett, J. T., Lansbury, P. T. Jr. (1993) Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell* 73: 1055-1058.
- 3) Klunk, W. E. Debnath, M. L., Pettegrew, J. W. (1994) Development of small molecule probes for the beta-amyloid protein of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 15: 691-698.
- 4) Klunk, W. E., Debnath, M. L., Pettegrew, J. W. (1995) Chrysamine-G binding to Alzheimer and control brain: autopsy study of a new amyloid probe. *Neurobiol Aging*. 16: 541-548

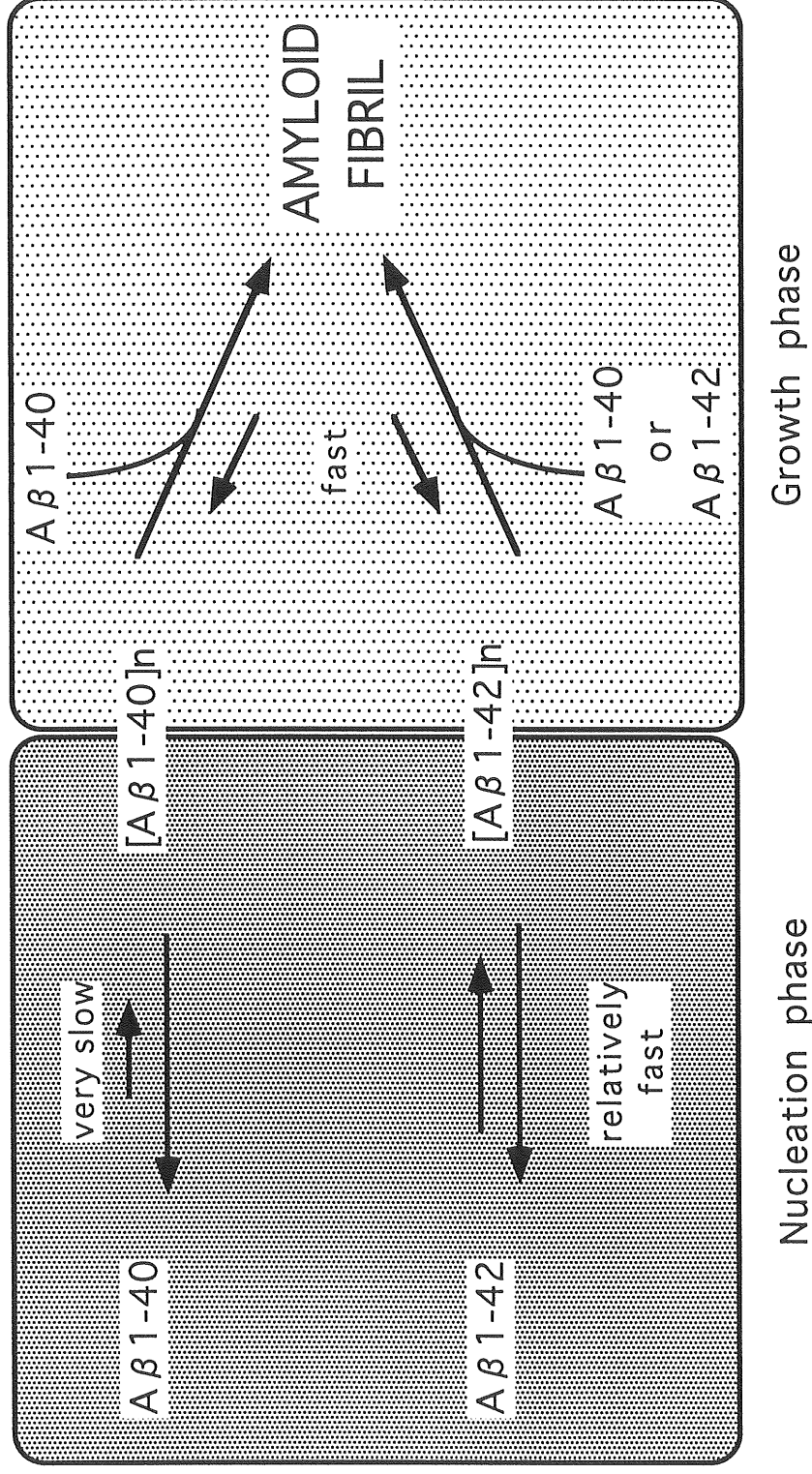


図1. ADにおけるAβ沈着の nucleation-dependent polymerization仮説

Aβ1-42がAβ1-40と比べて極めて重合しやすい。まず、Aβ1-42が重合して核（[Aβ1-42]_n）を形成する。この核にAβ1-42のみならず、Aβ1-40も沈着し、アミロイド線維として増生していく。

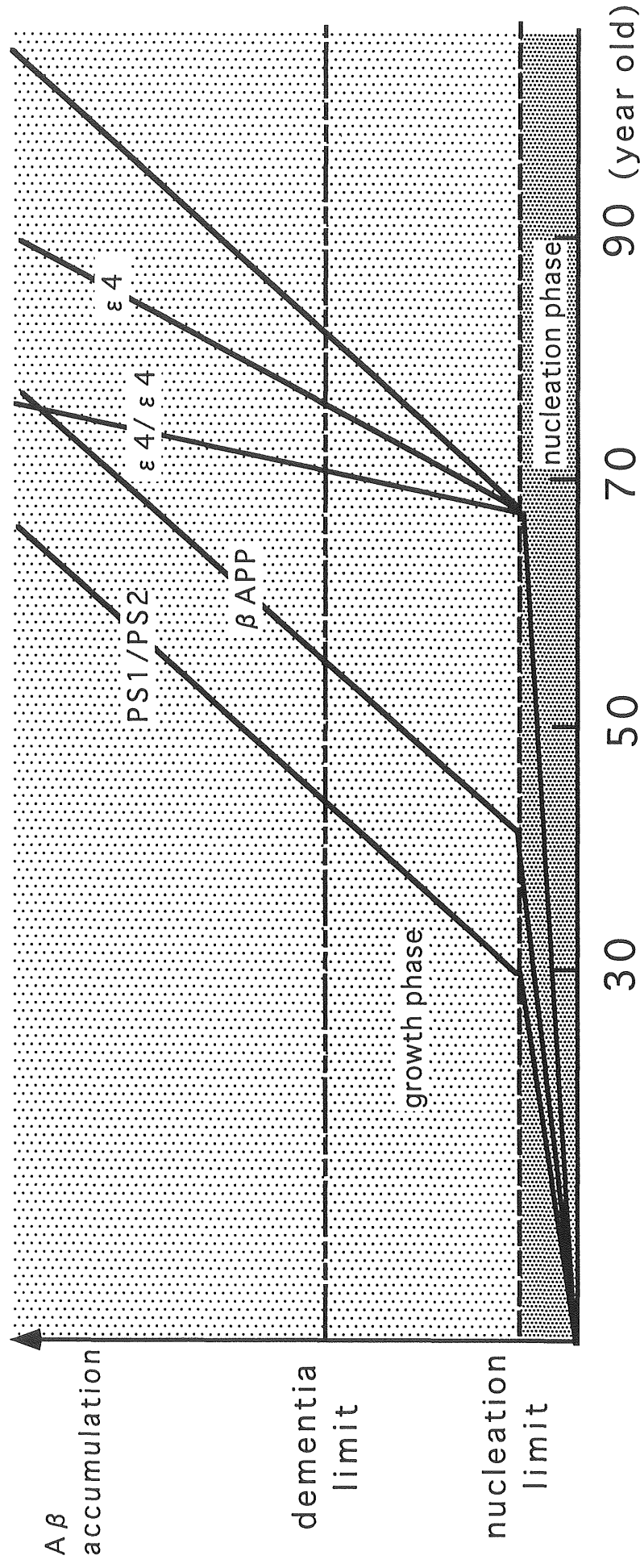


図2. PS1,PS2及び β APP点突然変異FADとsADまたは晩発性FADにおけるA β 蓄積と年齢の関係. 濃い網線は核形成相(nucleation phase),薄い網線は成長相(growth phase). 破線は核形成相の限界, 2点破線は痴呆発症の限界を示す. PS1,PS2及び β APPの点突然変異効果は核形成相の傾きが大きい. ApoE効果は成長相の傾きが $\epsilon 4$ の数に応じて, 大きくなる.

謝 辞

終わりに臨み、本研究の達成と論文作成において、常に御指導と御教示を賜りました筑波大学臨床医学系神経内科 庄司進一教授、玉岡 晃助教授、ならびに東京都精神医学総合研究所分子生物学部門 森 啓室長に深甚の謝意を表します。

本研究を遂行するに際し、御助言および御協力を賜りました東京医科歯科大学神経内科 水澤英洋教授、徳島大学病理学第一教室 伊井邦雄助教授、新潟大学脳研究所神経内科 辻 省次教授、病理学 高橋 均教授、東京都神経病院神経内科大竹敏之先生、Emory University School of Medicine Mirra-SS, Gearing-M, University of Tronto St. George-Hyslop-PH, Fraser-PE に心から深謝いたします。

また、本研究の遂行に多大な御指導、御鞭撻を賜りました東京都精神医学総合研究所分子生物学研究部門の皆様に御礼申し上げます。

最後に、本研究の遂行にあたり精神的、経済的に常に支えてくれた父、母および 妻 育子に深く感謝いたします。