

筑波大学

博士（医学）学位論文

アルツハイマー病患者における
cDNAサブトラクション法を用いた脳部位特異的遺伝子発現の解析

2014

筑波大学

渡邊倫子

略語表

A β ; Amyloid- β

AD; Alzheimer's disease

Apo; Apolipoprotein

APP; Amyloid precursor protein

BACE1; β -site APP cleaving enzyme 1

DLB; Dementia with Lewy bodies

DMEM; Dulbecco's modified Eagle's medium

FAD; Familial Alzheimer's disease

GSK-3 β ; Glycogen synthase kinase-3 β

MCI; Mild cognitive impairment

MMSE; Minimental state examination

PBS; Phosphate-buffered saline

PS; Presenilin

SAD; Sporadic Alzheimer's disease

siRNA; Short interfering RNA

Tg; Transgenic

WHO; World Health Organization

目次

第一章 文献的考察	1頁
1)アルツハイマー病とは	
2)アミロイド β 蛋白とタウ蛋白質	
3)タウ蛋白質と微小管	
4)神経原線維変化	
第二章 目的	9頁
第三章 対象と方法	13頁
1. 患者	
2. 剖検、神経病理学的診断及び免疫細胞化学(ICC)	
3. ヒト組織由来 RNA の単離と cDNA 合成	
4. サブトラクション反応(subtraction suppression hybridization、SSH) cDNA ライブラリーの構築サブトラクティブハイブリダイゼーション	
5. siRNA を用いた RNA 干渉による機能解析	
6. 細胞培養	
7. トランスフェクションと安定化細胞株の作製	
8. TRIM32/37 及び MAP1B のノックダウン細胞の逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR)	
9. アミロイド β 処理された神経芽腫細胞における新規遺伝子配列の逆転写ポリメ ラーゼ連鎖反応	

第四章 結果	23頁
1. サブトラクション陽性クローンの探索と免疫組織化学による解析	
2. RNA 干渉による MAP1B 及び TRIM32/37 の発現抑制	
3. サブトラクション反応によって得られた新規クローンの塩基配列決定	
4. A β 処理された神経芽腫細胞における新規核酸配列の発現	
第五章 考察	28頁
1. 微小管関連蛋白質ファミリーである MAP1B と MAP2 の発現変化	
2. アルツハイマー病患者の後頭葉皮質における TRIM32、TRIM37 の発現の上昇	
3. その他発現変化する遺伝子	
4. サブトラクション反応により得られた新規な塩基配列	
第六章 結論	37頁
Figure Legends	38頁
引用文献	46頁
謝辞	57頁

緒言

アルツハイマー病は 1904 年にドイツ人医師 A, Alzheimer によって初めて見出された脳の神経変性疾患の 1 つである。しかし、100 年以上を経た今日においても、その原因が不明であるため根本的治療方法も確立されていない。そこで、その根本的原因を明らかにする目的で、ヒトの脳組織を用い、アルツハイマー病に関連する遺伝子を探索することを研究課題とした。

この研究課題を実施するに当たり、これまで報告されてきたアルツハイマー病の原因に関する文献を以下の順にその内容をまとめ、本研究課題との関係を考察する。

- 1) アルツハイマー病とは
- 2) アミロイド β 蛋白とタウ蛋白質
- 3) タウ蛋白質と微小管
- 4) 神経原線維変化

1. アルツハイマー病とは

認知症は、後天的な脳の器質的障害により、いったん正常に発達した知的機能が全般的かつ持続的に低下した状態と定義され、記憶障害と判断力の低下のために、社会的活動や日常生活に著しい障害を呈する疾患である(認知症疾患治療ガイドライン 2010)。現在、認知症患者は全世界で約 3700 万人にまで増えており、毎年約 460 万人の患者が発症している(Ref. 1, 2)。我が国の患者数は約 462 万人と言われており(厚生労働省研究班 代表者・朝田隆筑波大教授 調査結果)、急速な高齢化により、認知症患者は増え続けている(Ref. 1)。認知症患者のなかでもアルツハイマー病(Alzheimer's disease ; AD)の占める割合は約半分と大きく、次いで、血管性認知症が約 20%を占める。アルツハイマー病発症の危険因子として高齢、家族歴、頭部外傷、性別等が挙げられるが、最大の危険因子は年齢である。65 歳頃からのアルツハイマー病の有病率は年齢とともに増加し、85 歳以上においては 40%にも達し

(Ref. 1、3)、早急な治療薬・診断方法等の開発が求められている。

アルツハイマー病は、初期症状として、数分前のことを忘れる、物や人の名前が思い出せない等の記銘力障害がみられ、本人だけでなく、家族もまた気がつかないうちに発病する。アルツハイマー病の病変の進行は、側頭葉の内側部(健忘症状)から始まり、側頭連合野から頭頂葉(道に迷う等の空間的見当識障害)へ、その後、後頭葉(誰なのか分からない)や前頭葉(失禁)へ進行するため(Ref. 4)、患者の現在の状態から、アルツハイマー病のステージや進行度を判断することができる。一方、血管性認知症は、前頭葉への血流が低下して発症するため、症状は人格の変化と社交性の消失という前頭葉症状であるが、アルツハイマー病の初期にみられる記憶障害はさほど顕著ではない。血管性認知症の進行は、続く脳血管障害発生部位に依存する。すなわち、認知症状も、障害された脳部位により異なる。

アルツハイマー病の大多数は、アルツハイマー型老年性認知症(Senile dementia with Alzheimer's type ; SDAT)という65歳以上において発症するものであり、65歳未満に発症するADと区別され、両者を合わせてDAT (Dementia with Alzheimer's type)と呼ばれていた(Ref. 5)。しかし近年は、発症年齢で区別することが本質的なものではないことから、AD及びSDATの両者を合わせて(つまりDATと同義語として)、ADと広く呼ばれている。また、65歳未満で発症するADには、常染色体優性遺伝を示す家族性アルツハイマー病(Familial AD : FAD)が存在し(Ref. 6)、これまでに報告されている遺伝子として、アミロイド前駆体蛋白(Amyloid Precursor Protein:APP)、プレセニリン1(Presenilin 1:PS1)及びプレセニリン2(Presenilin 2:PS2)が知られている。いずれのADにおいても、アルツハイマー病の重要な病理所見である老人斑や神経原線維変化(neurofibrillary tangle:NFT)等の脳組織内の異常構造物の出現は共通しており、FADにおける遺伝子変異をもとにしたAPP、PS1及びPS2の研究はアルツハイマー病発症の原因を探るため多くの研究者において解析が進められている。

アルツハイマー病患者脳に特徴的な老人斑を形成する蛋白質として、アミロイドβ蛋白

(Amyloid β protein: A β) が知られているが、APP (770 個のアミノ酸から構成される) の一部が切断され、形成される。1991 年、FAD において、21 番染色体上に存在する APP 遺伝子の点突然変異で、APP の 717 番目のバリンがイソロイシンに変異することが報告された (Ref. 7)。その後、APP 遺伝子の他の部位の点突然変異も報告され、発症と関連した重要な遺伝子と考えられている。1992 年には、より多くの家系での変異が、14 番染色体上のプレセニン 1 遺伝子に発見され (Ref. 8)、現在では 40 以上の変異が報告されている。また、1 番染色体上のプレセニン 2 遺伝子にも点突然変異が発見されている。これら遺伝子の変異によって、A β の異常産生など、A β の代謝が変化するものと考えられている。

一方、孤発性アルツハイマー病 (SAD) は、FAD よりも発症時期が遅く、多因子遺伝病と考えられる。1993 年アポリポ蛋白 E (apoE) の遺伝子多型 (APOE) が報告された (Ref. 9)。apoE は主なアイソフォームとして 3 種類の型が知られており、それに対応する遺伝子多型としてそれぞれ APOE2, APOE3, APOE4 が存在する。中でも APOE4 を有する群ではアルツハイマー病患者の割合が有意に高く、また、APOE4 を有する患者では発症年齢がより若年化することから、APOE4 がアルツハイマー病の発症を促進する重要な危険因子であることが示唆された。アルツハイマー病の重要な病理所見である老人斑や神経原線維変化中に apoE が存在することも報告されている (Ref. 10)。

しかし、SAD だけをかんがみても、APOE4 を有していない症例は半数以上あり、APOE4 を持たないにもかかわらず発症する場合もある。発症に関しては APP, PS1, PS2, apoE だけでなく、それ以外に複数の因子が複雑に影響していることが広く考えられている。すなわち、認知症のうち多数を占める孤発性アルツハイマー病は、単一遺伝子病に見られるような遺伝子異常と疾患発症が直接対応するものではなく、複数の遺伝学的因子や環境要因、その他の要因が相互に作用して生じる多因子遺伝病であると考えられる。

2. アミロイドβとタウ蛋白質

神経変性による認知症の病態は「異常タンパク質が神経細胞内外に蓄積する」という機序で説明されており、異常タンパク質がリン酸化やユビキチン化を受け、線維凝集して神経細胞毒性を獲得すると考えられている。

APP やプレセニリンの変異が多く報告され、これら変異が Aβ₄₂ の異常産生を誘導することから、アルツハイマー病の原因として“アミロイドカスケード仮説”が提唱され、アルツハイマー病の機序の解析において、現在最も有力視されている。このアミロイドカスケード仮説は、

脳内 Aβ₄₂ の異常産生 →

Aβ オリゴマーの形成・蓄積 →

びまん性老人斑の形成 →

グリア細胞の活性化、酸化ストレス障害 →

タウ蛋白質の異常リン酸化 →

神経細胞死

とされる。このカスケードの起点である Aβ の産生を抑制することが、アルツハイマー病の根本治療になるものとして注目されている。

アミロイドカスケード仮説の解明に、Aβ の沈着が生じる APP 転スジェニックマウスが作製され (Ref. 11)、AD の病態を反映するモデルとして広く用いられている。Schenk らにより、APP 転スジェニックマウスを Aβ ペプチドにより免疫することにより、アミロイド沈着を抑制できた (Ref. 12) ことから、アミロイドカスケード仮説に基づいた治療法として、アミロイドワクチン療法が開発され、臨床治験が進められた。欧米では患者による臨床治験が開始されたが、第 II 相試験開始直後に患者に副作用として髄膜炎が高い確率で起こったため、試験は中止された。その後、より安全な免疫療法をめざして研究者たちの解析が進められているものの、治療として有効なものは未だ無い (Ref. 13)。

また、γ セクレターゼは、Aβ をその前駆体である APP から切断する酵素であるので、Aβ 産

生抑制をめざし、 γ セクレターゼ阻害薬の開発も進められている。しかし、 γ セクレターゼの基質には APP だけでなく、細胞分化過程に重要な Notch などもあり、安全性に対する問題も考慮しなければならない。そのため、APP 切断を特異的に阻害するが、Notch の切断は阻害しない薬剤の開発が進められ、臨床試験段階である (Ref. 13)。

つまり、多くの研究者により長年行われている"アミロイドカスケード仮説"に基づいた開発は、期待されていたほど結果が得られておらず、別の観点に基づく開発も必要であると認識されるようになってきている。

一方、神経原線維変化を形成し得るタウ蛋白質は、微小管結合蛋白のひとつで微小管形成を促進するものである。タウ蛋白質は選択的スプライシングにより 6 種類のアイソフォームを発現し、そのアイソフォームはリピート配列に基づき 6 種類に分類される。微小管との結合はこのリピート配列によって生じる。タウ蛋白質には多くのリン酸化部位があり、溶液中では折りたたみ構造を取らないので、細胞内のリン酸化酵素のよい標的となる。実際、リン酸化・脱リン酸化の反応により、微小管との重合・脱重合がおこる。過剰にリン酸化されたタウ蛋白質は微小管結合を消失しており、微小管の不安定化をもたらす。また、微小管を遊離したタウ蛋白質はタウ蛋白質の細胞質内濃度を高め、自己重合して神経原線維変化へ移行する。アルツハイマー病の神経原線維変化の構成因子である paired herical filament (PHF) と straight filament は、過剰にリン酸化されたタウ蛋白質でできた線維である (Ref. 14, 15)。

アルツハイマー病はタウオパチーの側面も持っている。タウオパチーとは、その病態過程は神経細胞やグリアにタウ蛋白質の異常な蓄積を伴い、アルツハイマー病の神経原線維変化ばかりでなく、ピック病、皮質基底核変性症等の変性疾患でもみられる (Ref. 15)。近年、アミロイド過剰発現マウスで、タウ蛋白質のノックアウトマウスとかけ合わせることで内因性のタウ蛋白質を減らすと、その細胞死が抑制できることが報告された (Ref. 16)。この事実は、アルツハイマー病においてタウオパチーのほうが神経変性に関与しており、前述したように"アミロイドカスケード仮説"に基づく治療法開発とともに、タウオパチーに基づく治療法開発の重要性が示唆さ

れている。

3. タウ蛋白質と微小管

微小管は細胞骨格を形成し、細胞内のタンパク質の輸送や、細胞内小器官輸送のレールとして機能している。この輸送機構において、タウ蛋白質がリン酸化されると微小管が不安定化し、細胞内の物質輸送が抑制される可能性がある(Ref. 17)。

タウ蛋白質は、アルツハイマー病の病態に特徴的な PHF の主要構成成分であるが、前述のように他の神経変性疾患においてもその異常蓄積が報告されている。認知症を示す神経変性疾患の中で、ピック病と類似の臨床症状を持つ一群の疾患を前頭側頭型認知症(frontotemporal dementia: FTD)又は前頭葉型認知症(frontal lobe dementia:FLD)と呼ぶが、これらの疾患群は性格変化や人格変化に伴う行動異常が先行し、記憶力障害や空間認知障害が後に出現することが特徴である。病理学的には、前・側頭葉を中心とする大脳萎縮と神経細胞脱落、タウ蛋白質を含む細胞封入体や神経原線維化の出現があり、A β の沈着や老人斑の形成がないことを特徴とする。FTD のうち、常染色体優性遺伝形式を示し、パーキンソンニズムを高頻度に伴う家系から、“第 17 番染色体遺伝子に連鎖し、パーキンソンニズムを高頻度に伴う家族性 FTD”(frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17, FTDP-17)が分離された。1998 年、原因遺伝子としてタウ遺伝子の点突然変異が相次いで報告され、タウ遺伝子の変異が神経変性を導くことが明らかになった(Ref. 18, 19)。変異型タウを強制発現させたトランスジェニックマウスの報告では、タウ蛋白質の異常フィラメントが形成され、軸索輸送に関してもタウ蛋白質の過剰発現によって蛋白の輸送が抑制されることが示されている(Ref. 20)。

4. 神経原線維変化

A β 蓄積や神経原線維変化がはじめて検出されてから、認知症の症状を示すまでには、数十

年が必要であると考えられている。神経原線維変化の出現はその部位の神経機能の低下、特にシナプス機能の低下または神経変性の程度を示す目安となっており、神経原線維変化の出現頻度の増大と広がりによって認知症の程度を説明することが可能である(Ref. 21 - 23)。A β とタウ蛋白質の関係においては、培養細胞を用いた研究で、線維型A β やA β オリゴマーを細胞に添加すると、タウ蛋白質のリン酸化が亢進することや線維状のタウフラグメントが産生することが示されてきた(Ref. 24 - 27)。A β オリゴマーがJNKの活性化を通してタウ蛋白質のリン酸化を促進することも報告されている(Ref. 28)。

A β は、ユビキチン依存性タンパク質分解を抑制することが報告されている(Ref. 29 - 30)。ユビキチン-プロテアソームシステムは、障害された蛋白質や異常な蛋白質の分解に関与する他、細胞機能調節タンパク質や半減期の短いタンパク質の代謝にも関与するため、その異常により神経細胞の機能障害が起こると考えられる。また、A β やタウ蛋白質の蓄積も促進され、過剰なリン酸化蛋白も蓄積する。さらに、シナプスにおける受容体の取り込みにも関与するため、シナプス可塑性を障害し、アルツハイマー病における神経細胞機能障害を生じるものと考えられている。

A β は過剰にリン酸化されたタウ蛋白質からなる神経原線維変化を誘発することが知られている(Ref. 31)。A β によって、ユビキチン依存性蛋白分解経路が抑制され、細胞内にタウ蛋白質が蓄積し、過剰なリン酸化タウ蛋白質によって神経細胞障害が誘導されることも示されている(Ref. 32)。タウ蛋白質は細胞内シグナル伝達系の多くのタンパク質に作用することが知られており、その異常は神経細胞障害をきたすものと考えられている(Ref. 33)。

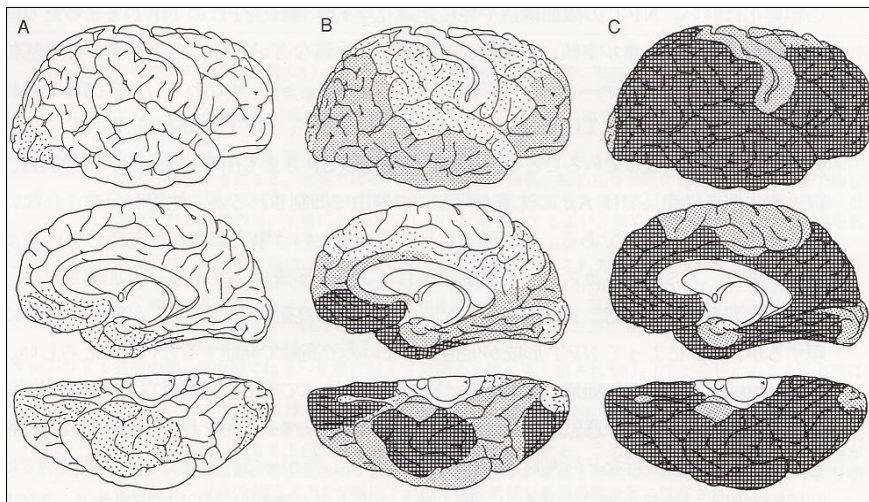
このように、タウ蛋白質のみについて考えても、それに相互作用する蛋白質やそれらの結合やリン酸化の作用は複雑にクロストークしている。また、アミロイドカスケード仮説のみによってもアルツハイマー病発症の全貌を明らかにすることはできない。多因子によってその発症と進行を呈するアルツハイマー病について、網羅的な解析が求められている。

以上、アルツハイマー病は加齢を最大の原因因子とし、APP、プレセニリン、タウ蛋白質、アポリポ蛋白等が原因因子及び危険因子であって、それらを標的とした医薬品の開発が進められている。また、アミロイドカスケード仮説が提唱され、それに基づく解析が多くの研究者によって進められている。しかし、超高齢化社会を迎えるにつれ、益々アルツハイマー病患者が増えるであろうにもかかわらず、アルツハイマー病のみならず種々認知症について、根本的な治療方法はなく、また、アルツハイマー病発症のメカニズムやアルツハイマー病の診断には未だ問題点が多い。それには、アルツハイマー病が、多様な因子が複雑に関連しあって起こる異質性な多因子病であることに起因していると考えられる。アミロイドカスケード仮説や変異解析のみでは解明が難しくなっているアルツハイマー病の分子機構について、多面的かつ網羅的な解析が必要である。

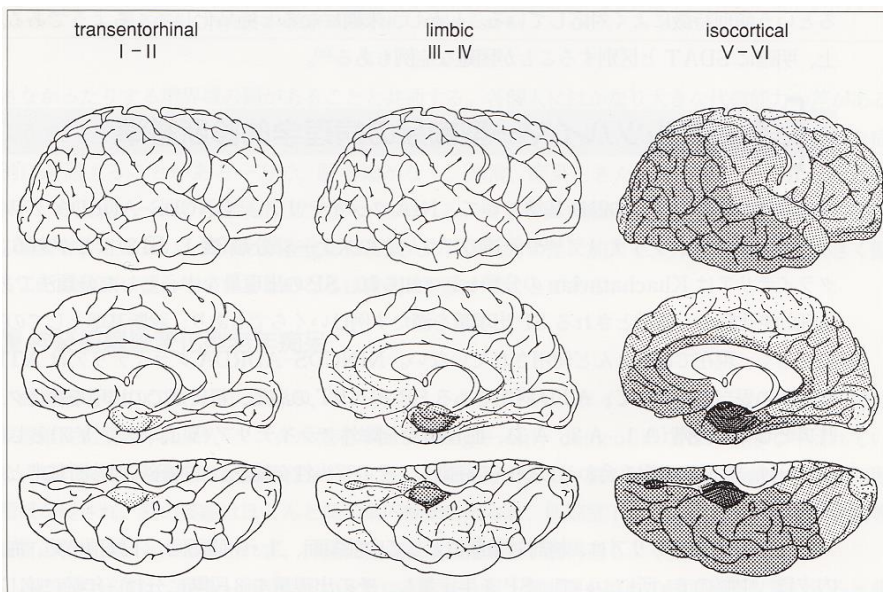
目的

アルツハイマー病患者の脳部位特異的な神経脱落や病理学的変化は、アルツハイマー病に特異的なものであり、アルツハイマー病の病理学的診断に利用されている。すなわち、アルツハイマー病の病理学的診断は、神経細胞の脱落、神経原線維変化や老人斑の量と分布が指標となっており、その中でも Braak H と Braak E らによるステージ分類が国際的に汎用されている(下図参照) (Ref. 21 -23)。

Braak らは、アルツハイマー病患者と健常老化患者の神経原線維化や老人斑について詳細な検討の結果、神経原線維変化の分布はアルツハイマー病の進行とともに、6 段階に亘って進行するとし、海馬の一部や側頭葉内側などが含まれる嗅内野ステージ(transentorhinal stage、ステージ I+ステージ II)、側頭葉外側や海馬などが含まれる辺縁系ステージ(limbic stage、ステージ III+ステージ IV) 及び大脳皮質全体的な変化である新皮質ステージ(isocortical stage、ステージ V+ステージ VI)に分類した。神経原線維変化は、海馬に先行して内嗅領皮質の pre- α 層に出現しており、また、認知症との相関性については、特に新皮質ステージでみられる。嗅内野ステージでは認知機能は正常であり、辺縁系ステージのステージ III 期において認知症例は殆どなく、軽度認知障害(MCI)の段階に留まるとされ、新皮質ステージでは認知症とほぼ相関するとされている。この進展ステージ分類は、どの研究においても高い一致率を持っており、最も信頼性が高いとされている。(Ref. 34, 35)。



Braakによる脳のアβ沈着の進展 (A→B→Cへ進行)



Braakによる脳の内FT形成の進展 (IからVIへ進行)

Braak and Braak, *Neurobiology of Aging*, 1997参照

このようにして、脳における神経細胞の脱落、萎縮、各種病変によって、その部位が司る機能が失われ、症状として現れ、その症状及び病理学的変化の部位によって、発症及び進行の診断や、アルツハイマー病と他の認知症の識別が可能となる。したがって、脳部位特異的な解

析や比較を行うことにより、神経変性疾患の原因の糸口を探ることができるのではないかと考えられる。

また、アルツハイマー病における神経原線維変化と老人斑は、加齢によっても出現する構造物であり、老人斑やそのもととなるA β の蓄積等は認知症の発症のはるかに前から起こっていることから、正常(単なる加齢)と疾患との境界をどこにするかは難しい。さらに、アルツハイマー病の進行に伴う病理変化について、疾患段階と病理像とを正確に関連付けることもまた、複雑で困難なものである。しかしながら、上記のBraakらによる分類からも明らかのように、老人斑や神経原線維変化の進展と疾患段階とを関連付けて、アルツハイマー病の発症及び進行を解析することは、非常に重要である。

一方、アルツハイマー病脳の後頭葉皮質は、病理学的に変化の少ない領域であるが、この後頭葉皮質に由来するcDNAライブラリーを用いて、A β 誘導新細胞死から保護する因子(Humanin)が単離されたという報告がある(Ref. 95, 96)。後頭葉などの抵抗性を有する脳領域には、このような神経保護作用を有する因子が存在し、また、海馬や側頭葉などの脆弱な部位には神経細胞障害を促進させる因子が存在するとも考えられ、各領域に特異的に存在する因子を同定することは、アルツハイマー病治療薬の開発に有用である。

したがって、本研究では、アルツハイマー病において、患者が臨床的にも病理学的にも末期と診断される段階ですら比較的正常な機能を維持している後頭葉皮質と、アルツハイマー病発症の早い段階において著明な神経細胞死や病理学的変化が認められる側頭葉皮質について、影響を受けた遺伝子を比較・検出すれば、アルツハイマー病の原因に関与する遺伝子を明らかにすることができないかと考え、以下の検討を行った。

- 1) 生理的老化患者とアルツハイマー病患者における側頭葉皮質での遺伝子発現の比較
- 2) 生理的老化患者とアルツハイマー病患者の後頭葉皮質での遺伝子発現の比較
- 3) アルツハイマー病患者の側頭葉皮質と後頭葉皮質での遺伝子発現の比較

近年、マイクロアレイをはじめとする網羅的・ゲノム的アプローチによって、一度に数千の遺伝子の発現状態を解析することが可能になった。この技術は、複雑にその原因因子や危険因子が相互に作用する多因子疾患の解析に適したものである。実際、アルツハイマー病患者及び対照患者の剖検脳組織において遺伝子発現解析がなされており(Ref. 36)、多くの研究者たちがcDNAマイクロアレイ技術を駆使してアルツハイマー病に特異的な遺伝子発現プロファイルを研究している(Ref. 37 - 39)。しかし、マイクロアレイ解析は、アレイにスポットされている遺伝子のサブセットにおける異なる発現は同定できるが、新しい遺伝子を同定することができない。一方、Caoらによって提唱されたサブトラクション法は、信頼度の高い方法であって、未知の遺伝子を含む異なる発現をするあらゆる遺伝子を同定することができる(Ref. 39 - 42)。また、PCR-selectサブトラクション法(suppression subtractive hybridization, SSH)も開発され、標的の集団内のcDNAの量を均一にするノーマライゼーションステップを行うことによって、低レベルの転写産物を検出することを可能にした(Ref. 40 - 42)。

それゆえ、本研究では、遺伝子発現のパターンを比較するため、このPCR-select cDNAサブトラクション技術を用いて、アルツハイマー病発症の前期及び後期における脳部位特異的な遺伝子発現変化について、網羅的・体系的な解析を行った。

対象と方法

1. 患者

孤発性 AD (early stage; low incidence; 【表1】)の患者は the Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CREAD) 及び Braak ステージに基づき病理診断された (Ref. 43, 4)。対照群は、有意な神経学的障害のない生理的老化患者である。患者は、MMSE (Mini Mental State Examination) 及び HDS-R (改定長谷川式簡易知能評価スケール) によって認知障害について評価された (Ref. 44, 45)。MMSE は認知精神状態の分類や評価に広く使われており、主に記憶力、計算力、言語力、見当識を測定する。HDS-R テストもまた、認知症のスクリーニングテストとして広く使用されており、認知症かどうかを 5~10 分程度で判別し、知能障害の有無と障害の程度をおおよそ把握することができる。

脳組織は福祉村病院長寿医学研究所 (愛知豊橋市) のブレインバンクから提供を受け、研究の実施に際して、BF 研究所及び福祉村病院の各倫理委員会の承認を得た。当該ヒト由来材料の特別な使用はヘルシンキ宣言にのっとり行われ、インフォームドコンセントは患者の家族から得た。脳は重量を計測後、液体窒素で凍結され、-80°C で保存され、人工呼吸器による延命措置等がなされておらず、死後脳摘出までの時間 (PMI) が比較的短い (3~4 時間) 症例を選んだ。

2. 剖検、神経病理学的診断及び免疫細胞化学 (ICC)

脳は摘出秤量後、矢状断に切断され、血管やその他の病変を肉眼により剖検された。診断試料には、コンピュータ断層撮影 (CT) スキャンニングで異常が認められた大脳半球を使用し、右大脳半球を病理診断に使用し、左大脳半球を試験標本として用いた。病理診断により、老人斑および神経原線維変化に基づくステージが決定され、アルツハイマー病及び生理的老化と診断された患者脳組織を用いた。大脳半球はブロックとし、4%パラホルムアルデヒド

(PFA, Sigma)により固定した。試料をパラフィン包埋し、定法の組織学的、免疫組織化学の試験用に 5 mm の切片に加工した。試料は、メセナミン銀(MS)染色及び Gallyas-Braak (GB)変法により、老人斑及び神経原線維変化を染色した。微小管関連蛋白質 1B(MAP1B) (Abcam Ltd, Cambridge, UK)の免疫染色には、1:1000 で希釈したモノクローナル抗体により標準的な ABC 法を使用した。DAKO EnVision (Dako, Kyoto, Japan)にて検出を行い、洗浄したのちに、免疫反応させ、染色はジアミノベンジジン (DAB)を添加して可視化した (Ref. 44, 45)。

3. ヒト組織由来 RNA の単離と cDNA 合成

試験用のRNAは比較的無傷な状態で抽出されたものを用い、RNAの精度は下記に示すようにして分析した。第1と第2のサブトラクション反応では、AD及び生理的老化症例の中から、同性で、年齢が近い症例から得られたRNAを用いた。AD患者の後期においてすら、ADに関連した病理学的変化が認められない部位とされる (Ref. 21)後頭葉皮質を用い、第3の部位特異的サブトラクション反応には、同一患者の側頭葉皮質と後頭葉皮質における遺伝子発現の変化を比較した【表1】。患者脳は中程度のADのステージであって、比較的若い(75歳)患者を選び、AD発症以外の影響がないように考慮した。

組織は各患者の側頭葉皮質においてはBrodmann No.21(T2領域)、後頭葉皮質においてはBrodmann No.19(外側後頭回付近)である。

Total RNAは、RNeasy MAXI RNA isolation kit(QIAGEN, Tokyo, Japan)を用い、プロトコールに従って抽出した (Ref. 40)。完全にホモジナイゼーションするため、凍結した大脳組織に直接Buffer RLT (グアニジンイソチオシアン酸を含む) を加え、その混合液をMixer Mill MM 301(Retsch GmbH, Haan, Germany) によって十分に可溶化した(30 agitation/secで2分程度)。RNAは260nmの吸光度によって測定され、キャピラリーゲル電気泳動(Agilent Technologies, Japan)を用い、28S/18S ribosomal RNAによる品質の

チェックを行った。それぞれの試料の total RNA(1 μ g, 0.2 μ g/ μ l) を cDNA (oligo (dT)-primed SMARTTM-cDNA-synthesis (Clontech, Tokyo, Japan)、Superscript II(Invitrogen, Tokyo, Japan)により、プロトコールに従って逆転写反応し、次に0.5 μ lが long-distance-PCR(LD-PCR)に用いた(Ref. 40)。修飾oligo(dT) primer (CDS primer) がLD-PCR増幅に用いた(Ref. 40)。The SMARTTM-oligonucleotide- anchor sequenceと poly(A)⁺ sequenceがend-to-end cDNA合成(LD-PCR)のuniversal priming siteとして利用された。cDNA 合成に用いられたサイクル数は、Elongase enzyme mix-protocol(invitrogen)による直線的な増幅のPCRが進む範囲を選択した。構成的に発現するリボゾーム蛋白質S12のcDNAをPCR増幅により、鋳型として使用したRNAを測定した。コントロールとして逆転写酵素なしのRNA又はRNAなしのサンプルによって、DNAのコンタミネーションがないことを確かめた。cDNA-PCR産物は、1.0%アガロースゲル電気泳動によって分析された。

4. サブトラクション反応(subtraction suppression hybridization、SSH) cDNA ライブラリーの構築サブトラクティブハイブリダイゼーション

【表1】に示したように、本研究では三通りのサブトラクション解析を行った。1) AD/側頭葉皮質vs生理的老化/側頭葉皮質、2) AD/後頭葉皮質vs生理的老化/後頭葉皮質、3) AD/側頭葉皮質vs AD/後頭葉皮質(同一患者)である。

サブトラクション反応(suppressive subtractive hybridization, SSH) はPCR select subtraction kit(Clontech)を用いて、マニュアルに従い行った(Ref. 40)。下記に要約を述べる。

PCR-Select-cDNAサブトラクション技術は、差次的に発現する塩基配列を選択的に増幅させる技術に基づいており、2つのmRNA集団を比較し、ひとつのmRNA集団(本研究においては、たとえばAD患者)において発現が増加し、もうひとつの集団(コントロールである生理的

老化患者)では発現が増加していない遺伝子を取得できる技術である(Ref. 40, 46, 47)。プロトコールに従って、mRNAのすべてがSMART™-PCR-cDNA合成(Clontech)によりcDNAに変換した。比較のため、上記1)、2)及び3)におけるふたつのcDNA集団をハイブリダイゼーションし、ハイブリッドを形成した配列を除去した。したがって、ハイブリダイズされずに残ったcDNAsはひとつの集団(たとえば1)のAD側頭葉皮質)において発現する遺伝子であって、コントロールmRNA由来のものではないことを意味する。

サブトラクションライブラリーの作製において、サブトラクトされたインサートは、pUC18プラスミドの制限酵素Sma I 部位に連結されて、コンピテント細胞であるDH5αへトランスフォームした。単一の白コロニーを選択し、96ウェルプレート12枚でグリセロールストックとして保存した(glycerol 15%、-80°C)。コロニーPCRにてインサートの大きさを見積もったところ、1000 bp平均であった。

ディファレンシャルスクリーニング

差次的な発現をするcDNAを単離するため、本研究ではClontech's PCR-Select Differential Screening Kitを使用した。組み換えコロニーは、96ウェルプレートで100µl LB培地で37°C2時間振盪培養した。各培地の1µlをPCRして組み換えcDNAsを作製した。そのcDNAsをフィルター上に3個ずつスポットし、ハイブリダイズさせてforward-又はreverse-subtracted cDNAプールに対応するジゴキシゲニン(DIG)標識プローブによりハイブリダイズした。そのcDNAは制限酵素RsaI, SmaI及びEagIで消化し、アダプター配列が除去されたcDNAである。標識されたプローブは、スピンフィルター(Clontech Chroma-Spin 100カラム)によって精製した。ハイブリダイゼーションはrotisser式インキュベーター(Gene-Roller GRH10, Savant (Savant Instruments Inc., NY, USA))で行った。メンブレンは1 mMエチレンジアミン四酢酸(EDTA)、0.25M Na₂HPO₄ (pH7.2)及び7%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)溶液中で72°C30分プレハイブリダイズした。熱変性された標識プローブ

を添加し、72°Cで一晩ハイブリダイゼーションした。ハイブリダイゼーションののち、メンブレンは低ストリンジェントな洗浄バッファー (standard saline citrate (2×SSC, 塩化ナトリウム, クエン酸ナトリウム, pH7)、0.1% SDS, 65°C) で20分間を3回洗い、高ストリンジェントな洗浄バッファー (0.5×SSC, 0.1% SDS, 65°C) で20分間で2回洗浄した。メンブレンをラップし、フィルムに感光させて (Fuji RX, Osaka, Japan)、ハイブリダイゼーションシグナルを検出した。ハイブリダイゼーションシグナルはFujiFilm LAS1000 plusで取り込み、FujiFilmArrayGaugeソフトウェアで数値化し、SPSSソフトウェア11.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) で統計解析を行った。forward-subtracted プローブにだけ特異的にハイブリダイズしたクローン (reverse-subtracted probeにはハイブリダイズしない) が、差次的な発現をする候補とした。Forward-subtracted プローブが特異的にハイブリダイズし、シグナル強度が reverse-subtracted プローブに対して0.5倍相対的なクローン (=RRSレベルとして【表2】～【表4】に記載されている) について、その後、塩基配列を決定した (ABI PRISM Big-Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer Japan Co Ltd, Yokohama, Japan) ; Sequencer: ABI PRISM Model 3100)。

BLAST 検索

差次的な発現をするサブトラクション陽性クローンの塩基配列について、NCBI NR, NCBI Ref. Seqデータベース (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/>)、BLASTNプログラム (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)を用いてホモロジー検索を行った (Pruitt KD, et al., 2001)。【表2】、【表3】及び【表4】はホモロジー検索の結果を示している。さらにGet Ontology (GO) project (<http://www.geneontology.org/>)よりMolecular function, Biological process, Cellular componentをもとに遺伝子のアノテーションをまとめた。

5. siRNA を用いた RNA 干渉による機能解析

RNA干渉技術は特異的な標的に対して特定のmRNAを発現抑制し、二本鎖small interfering RNA (siRNA)を、細胞内に導入して、遺伝子の機能を評価するものである。実験は先の報告に従って行った(Ref. 48 - 52)。SHSY5Y ヒト神経芽腫細胞は定期的に継代し、指数関数的な生育を維持した。トランスフェクションの24時間前に75%コンフルエントの細胞をトリプシン処理して、抗生物質のない新鮮な培地で1:5に希釈し($1-3 \times 10^5$ cells mL⁻¹)、24 ウェルプレート(500 μ l well⁻¹)に移した。siRNAアッセイをするため、0.5 μ g二本鎖siRNA/ウェルをOligofectamine(Invitrogen)によって付着細胞用のプロトコールで報告されたように実施した。トランスフェクション効率は、コトランスフェクションした緑色蛍光タンパク質(GFP)発現ベクターと0.2 μ g二本鎖siRNA well⁻¹によって定量した。標的遺伝子の特異的な発現抑制はそれぞれ2回ずつの8回の独立した実験によって確認した(2因子ANOVAと独立t-検定)。siRNA解析のため、細胞生存率をCell Titer 96 Aqueous One solution assay (Promega, Madison, WI, USA)によって48時間後に測定した(Ref. 53)。コントロールとして、一本鎖センス相補 RNAオリゴ(control-1, 一本鎖siRNA)と反転TRIM32/37 の配列の二本鎖siRNA(control-2)を用いた。標的であるTRIM32/37のsiRNAの配列は、開始コドンの位置に対応した位置(nt)49-nt69 nt及びnt88-nt108(TRIM32)、nt64-nt84及びnt100-nt120(TRIM37)である(Dharmacon Research, Lafayette, CO, USA)。

MAP1B 遺伝子の特異的なノックダウンのため、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)グレードのオリゴヌクレオチドを使用した。

MAP1B siRNA sense ;

gatccccGACCTATGCTACACTGCAGttcaagagaCTGCAGTGTAGCATAGGTCttttttgg
aaa ,

MAP1B siRNA anti-sense ;

agcttttccaaaaaaGACCTATGCTACACTGCAGtctcttgaaCTGCAGTGTAGCATAGGTC
cgg

大文字がMAP1Bに対応する配列である。これらオリゴヌクレオチドはsiRNA発現ベクターであるpSilencer 3.1 hygro(Ambion, Aystin, TX, USA)にライゲーションさせて、標的mRNA発現を構成的に抑制にした。発現ベクターの作成方法はマニュアルに従った。上記合成オリゴヌクレオチドを1 µg/mlに溶解後、アニーリング反応(90°C3分)し、冷却して電気泳動でその結合を確認後、pSilencer 3.1 hygro vectorへライゲーションさせた。プラスミドを化学的コンピテント細胞DH10B(invitrogen)にトランスフォームし、ハイグロマイシン耐性コロニーを得た。単一コロニーを培養して、プラスミドDNAをQIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN)を用いて精製した。BigDye Terminator Cycle Sequencing Kitで反応後ABI PRISM 3100 Genetic Analyzerにてインサートの塩基配列確認をした。EndoFree Plasmid Maxi Kit(QIAGEN)にてトランスフェクション用プラスミドDNAを抽出した。

6. 細胞培養

ヒト神経芽腫細胞SHSY5Yは、15%ウシ胎児血清(FCS)含有ダルベッコ変法イーグル培地(D-MEM/F12(1:1))で、37°Cで加湿された5%CO₂/95%airで培養した。神経分化のため、細胞はPoly D-Lysine(PDL)コートされた6ウェルプレートに1.5 x 10⁴ cell well⁻¹で蒔いた。翌日、オールトランスレチノイン酸(RA)(10µM)を含む新鮮な培地に交換し、1週間培養した。その後、細胞をリン酸緩衝食塩水(PBS)で2回洗浄して、脳由来神経栄養因子(BDNF、以前に報告されたように(Ref. 54)、0.1%ウシ血清アルブミン(BSA)中で溶解した)を50 ng ml⁻¹で含む無血清培地でさらに1週間培養した。細胞は上述のようにCell Titer 96 Aqueous One solution assay によって測定した(それぞれ2回ずつの8回の独立した実験によって確認した(2因子ANOVAと独立t-検定))。(Ref. 53)

7. トランスフェクションと安定化細胞株の作製

トランスフェクションの前日、SHSY5Y細胞は15%FCS含有D-MEM/F12(1:1)培地で1 x

10⁵ cell well⁻¹で蒔いた。80%コンフルエントに生育した細胞を、6 µl FuGENE6 (Roche Diagnostics K.K., Tokyo, Japan)と2µgのプラスミドDNAとをプロトコールどおりに混和させた溶液を無血清培地でトランスフェクションを行った。抗生物質によるセレクションは hygromycine-B (50µg ml⁻¹; Invitrogen)を添加した15%FCS含有D-MEM/F12(1:1)培地によって4週間行った。

8. TRIM32/37 及び MAP1B のノックダウン細胞の逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR)

TRIM32/37 及び MAP1B の mRNA の発現レベルをチェックするため、RT-PCR を以前に述べられた手法により行った (Ref. 53)。細胞の total RNA を TRIzol reagent-protocol (Invitrogen)に従って抽出し、吸光度 260nm で分光測定により定量した。各試料の total RNA (20 µl, 0.2 µg/ml)はプロトコールに従って cDNA に逆転写され (Superscript IITM-reverse transcriptase (RT) (Invitrogen))、次に Takara Ex Taq Hot Start polymerase 及び 95°C 8 分の pre-start PCR step によって、ポリメラーゼを活性化させ、増幅反応を行った。プライマーは、

MAP1B : forward primer : 5'-gatccttcatcaccgaagtg-3'

reverse primer : 5'-ctgcaaacaaggcagaatcg-3'、

TRIM32 : forward primer : 5'-atggctgcagcagcagcttctcacctg-3'

reverse primer : 5'-ataccccatggttgctcagctggctc-3'、

TRIM37 : forward primer : 5'-atggatgaacagagcgtggagagcattgct-3'

reverse primer : 5'-gtgatgataatcttcattctgaatcttctc-3'、

を用いた。構成的に発現する β-actin 遺伝子の PCR 増幅により、用いた RNA を測定した (primer : Stratagene (La Jolla, CA, USA))。コントロールとして、逆転写酵素のない RNA サンプル又は RNA のないサンプルを用いて、DNA がコンタミネーションしていないことを確

認した。各 cDNA の増幅に用いられたサイクル数は Elongase™ enzyme mix protocol (Invitrogen) に従って、直線的増幅を示す範囲で行った。PCR 産物は 1.5% アガロースゲル電気泳動で解析した(それら PCR 産物はシーケンシングによって確認した)。

9. アミロイド β 処理された神経芽腫細胞における新規遺伝子配列の逆転写ポリメラーゼ連鎖反応

アルツハイマー病では Aβ が凝集して不溶性の線維を形成しアミロイドとなり脳に沈着する。Aβ は神経細胞に対して毒性を有し、細胞死を引き起こす。そこで、新規に単離されたサブトラクション陽性クローンの神経細胞死に対する影響を解析するため、アミロイド β により処理された SHSY5Y 神経芽腫細胞における発現を検出した。上述のように、RA 及び BDNF によって分化誘導された SHSY5Y 神経芽腫細胞を用いた。アミロイド β は、合成された Aβ (1-40) ペプチド (PEPTIDE, Osaka, Japan) に、0.1% NH₄OH 及び D-PBS を添加し、37°C で 24 時間インキュベーションしたものを用いた。RA 及び BDNF によって分化誘導され、無血清培地に培地交換された SHSY5Y 細胞に、Aβ (1-40) の濃度を 20 μM に調整して添加した。調整した Aβ (1-40) 溶液またはコントロール液を添加した後、3、6 及び 24 時間の細胞からそれぞれ定法に従って total RNA を抽出した。これら Aβ 処理神経細胞において、タウは Aβ 添加 3 時間後から有意にリン酸化されていたことをウェスタンブロッティングにより確認した。細胞死は MTT 活性を指標に検出し、Aβ 2~20 μM で濃度依存性に、また、添加後 4 ないし 8 日後に著明となった。

抽出された RNA は定法に従い cDNA に逆転写した (Superscript II™ reverse transcriptase (RT) (Invitrogen))。次に Takara Ex Taq Hot Start polymerase 及び 95°C 8 分の pre-start PCR step によってポリメラーゼを活性化させ、増幅を行った。プライマーは、

新規クローン P9TLDR : forward primer : 5'-gatggaaggtgtcttagac-3'

reverse primer : 5'-ggcttccactgtgctatttc-3'

を用いた。構成的に発現する β -actin遺伝子のPCR増幅により用いられたRNAを測定した (primer : Stratagene (La Jolla, CA, USA))。コントロールとして、RT酵素のないRNAサンプル又はRNAのないサンプルを用いて、DNAがコンタミネーションしていないことを確認した。各cDNAの増幅に用いられたサイクル数はElongaseTM enzyme mix protocol(Invitrogen)に従って直線的増幅を示す範囲で行った。PCR産物は、 β -actinが661bp、P9TLDRが442bpのバンドとして、1.5%アガロースゲル電気泳動で解析した。

結果

1. サブトラクション陽性クローンの探索と免疫組織化学による解析

アルツハイマー病患者(同一患者)における部位間サブトラクション、側頭葉サブトラクション及び後頭葉サブトラクションの各サブトラクション反応により陽性として得られたクローンについて、塩基配列を決定し、ホモロジー検索を行った。得られた結果をそれぞれ【表 2】～【表 4】に示す。本研究では、両方向でのサブトラクション反応を行ったので、サブトラクション反応の各々で、up-regulated 及び down-regulated の両方向の遺伝子を得ることができた。

【表 2】には、アルツハイマー病患者(同一患者)における部位間サブトラクション反応の陽性クローンの遺伝子とそのアノテーションを示す。Microtubule associated protein 1B(MAP1B)の mRNA 発現は、アルツハイマー病患者の後頭葉皮質に比べてアルツハイマー病患者の側頭葉皮質で down-regulate していた。一方、【表 3】に示すように、後頭葉サブトラクションでは、MAP1B mRNA 発現は生理的老化患者の後頭葉皮質に比べてアルツハイマー病患者の後頭葉皮質において down-regulate していた。MAP1B が AD 後頭葉皮質において down-regulate することは、複数の患者においても同様の傾向が見られた。また、対照的に、microtubule associated protein 2(MAP2)は、MAP1B やタウと同様に微小管関連蛋白グループに属しているタンパク質であるが、アルツハイマー病患者の後頭葉皮質において発現が up-regulate していた。

さらに、【表 3】に示すように、アルツハイマー病患者後頭葉皮質において、TRIM37 と TRIM32 の発現レベルが up-regulate しており、【表 4】においては、neuronal reticulon-3 (RTN3)の発現がアルツハイマー病患者側頭葉皮質において down-regulate していた。

ここで、微小管関連蛋白質 MAP1B は、【表 2】及び【表 3】に示すように、独立した 2 つのサブトラクション反応において陽性クローンとして取得されたため、信頼度が高く、アルツハイマ

一病発症メカニズムを解くうえで Key となるものと考えられる。また、MAP2 がサブトラクション陽性クローンであることも考慮すると、アルツハイマー病発症の進行におけるタウ蛋白質と微小管システムの役割は重要と考えられ、それらの機能解析をさらに進めることにした。

次に、MAP1B のタンパク質レベルでの発現解析をアルツハイマー病患者脳組織の免疫組織化学法によって解析した(【図 1】【図 2】)。抗 MAP1B 抗体により陽性細胞は茶色に染色され、【図 1】及び【図 2】に示すように、アルツハイマー病患者の海馬・側頭葉皮質において MAP1B タンパク質発現が僅かに減少する傾向がみられ、側頭葉皮質における MAP1B mRNA 発現の低下と相関していた。HE 染色により細胞の核を染色したが、アルツハイマー病患者の海馬・側頭葉皮質は特に神経細胞が脱落しており、後頭葉皮質の免疫染色により MAP1B が神経細胞の軸索や樹状突起に存在していることがわかった。また、老人斑、神経原線維変化と MAP1B との間の相関は認められなかったが、MAP1B 強陽性細胞のいくつかは神経原線維変化様の形態を示しており(【図 2】)、一方、強陽性細胞に老人斑状の形態を示すものはなかった。

2. RNA 干渉による MAP1B 及び TRIM32/37 の発現抑制

RNA 干渉(RNAi)は配列特異的に遺伝子発現を抑制する技術であって、二本鎖 RNA(dsRNA)によって惹起されるものである(Ref. 48)。本研究では、small interfering RNA(siRNA)により、特異的にヒト SHSY5Y 神経芽腫細胞の内在性 MAP1B、TRIM32 及び TRIM37 の発現をそれぞれに抑制したところ、神経細胞の生存率が減少した(【図 3】～【図 6】)。【図 3】は、SHSY5Y 神経芽腫細胞の内在性 TRIM32 及び TRIM37 の mRNA 発現が抑制されたことを RT-PCR によって確認した結果である。【図 3】A 及び B のレーン 4 は siRNA によって TRIM32 及び TRIM37 の発現が減少したことを示している。【図 4】には、TRIM32 及び TRIM37 の発現抑制による神経細胞の生存に対する影響を Cell Titer アッセイによって測定した結果を示す。コントロール-1 及びコントロール-2 に示される神経芽腫細胞

の生細胞数に比べて、TRIM32 及び TRIM37 の発現が抑制された神経芽腫細胞の生細胞の数が減少していた。

また、MAP1B の発現を構成的に抑制するため、siRNA 発現ベクターをトランスフェクションした神経芽腫細胞は、抗生物質により 4 週間セクションを行い、細胞株を調整した。SHSY5Y 神経芽腫細胞の内在性 MAP1B の発現抑制について RT-PCR にて検出したところ、【図 5】に示されるように、コントロール形質転換体(つまり、scrambled siRNA や GFP 特異的 siRNA により処理された細胞、未処理の細胞;レーン 2、4 及び 5)では、MAP1B 遺伝子は発現抑制されておらず、MAP1B 発現抑制ベクターが導入された安定化細胞株では、MAP1B の mRNA が発現抑制されたことを確認した(レーン 3)。

該安定化株をオールトランスレチノイン酸(RA)と BDNF の刺激によって神経分化を誘導したところ(【図 6】)、コントロール siRNA の発現ベクターと、MAP1B siRNA の発現ベクターが導入された神経芽腫細胞とは、それぞれ異なる細胞の表現型を示した。【図 6】(A)及び(B)に示されるコントロール細胞(コントロール 1; GFP-transfected 及びコントロール 2: scramble-transfected)は、トランスフェクションされていない神経芽腫細胞と同様に、神経突起伸長の形態を示した。一方、【図 6】(C)に示される MAP1B mRNA が特異的に抑制された神経芽腫細胞は、その形態がコントロール細胞と異なり、神経突起伸長がなく、付着せずに剥離している細胞も存在した。また【図 6】(D)にて、細胞の生存率を示す。RA 処理のみでは細胞死は誘導されなかったが、SHSY5Y 細胞の最終的な神経分化が誘導される 3-7 日間の BDNF 処理によって刺激された際に、MAP1B の発現抑制神経芽腫細胞においてのみ、このような表現型が観察された。

3. サブトラクション反応によって得られた新規クローンの塩基配列決定

BLAST 検索の結果、機能付けされた遺伝子や EST の配列に有意な相同性がない塩基配列について、新規なサブトラクション陽性クローンとしてさらに解析を進めた。

同一アルツハイマー病患者内における部位間サブトラクション反応として、アルツハイマー病患者側頭葉皮質 vs アルツハイマー病患者後頭葉皮質の反応で得られた 2 つのクローン、TeOcR03B03, TeOcF03B11 (P9TLDR) の塩基配列について、それぞれ Genbank へ登録した (Accession number; AB116553, AB128931)。それら塩基配列から予測されるアミノ酸配列についても hypothetical protein として登録した。【図 7】及び【図 8】に、新規なサブトラクション陽性クローンの塩基配列と予測アミノ酸配列を示す。【図 7】に示される TeOcR03B03 は、アルツハイマー病患者側頭葉皮質にて発現が up-regulate したものであり、一方、【図 8】に示される TeOcF03B11 (P9TLDR) はアルツハイマー病患者側葉皮質にて発現が down-regulate していたものである。これら 2 クローンの mRNA 発現は他のアルツハイマー病患者脳組織においても確認されたが、当該塩基配列から予測されるアミノ酸配列を含むタンパク質の発現を確認することはできなかった。

TeOcR03B03 (DDBJ Accession number : AB116553) 1199 bp

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/AB116553>)

TeOcF03B11(P9TLDR) (DDBJ Accession number : AB128931) 1589 bp

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/AB128931>)

【図 9】に示すように、同一アルツハイマー病患者の側葉皮質にて発現が down-regulate していたクローン、P9TLDR (Temporal Lobe Down-Regulate) は、Gorilla 及び Callithrix jacchus とファミリータンパク質であるが、いずれも機能未知である。P9TLDR の C 末端側 aa44-aa75 は、human neuron navigator 1 protein (NAV1 (1877aa), microtubule-associated protein involved in neuronal migration, Ref. 55) に高い同一性(50%)を有し、31 アミノ酸がオーバーラップする。また、同じ 31 アミノ酸が NEK5 (NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 5)にも相同であった。さらに、染色体上において、P9TLDR が NCAM1 (neuronal cell adhesion molecule 1)のエクソン 1 とエクソン 2 との間

に逆向きで存在する(Chr 11q23.1)。【図 10】に示すように、複数の AD 患者脳組織において側頭葉皮質にて P9TLDR の発現が減少する傾向が見られた。

4. A β 処理された神経芽腫細胞における新規核酸配列の発現

サブトラクション反応により得られた新規クローンについて、アルツハイマー病との関連を解析するため、A β により処理された培養神経細胞における発現解析を行った。A β 処理された SHSY5Y 神経芽腫細胞は、タウがリン酸化され、神経細胞死が誘導されたことを確認した(【図 11】)。RNA は A β 処理後 0、3、6 及び 24 時間の細胞から経時的に単離されたものであり、RT-PCR によって P9TLDR の発現の変化を検出した。RT-PCR は 3 回追加的に行い、同様の結果を検出した。

【図 12】レーン 9~11 に見られるように、A β 処理により経時的に P9TLDR の発現が減少していた。A β 処理された SHSY5Y 神経芽腫細胞は、A β 処理後 3 時間にタウのリン酸化が起こり、同程度の時間から P9TLDR の発現が減少していた。また、A β 処理された SHSY5Y 神経芽腫細胞は、4 日程度で神経細胞死が顕著になるが、それよりも早い段階で P9TLDR の発現が変化した。

考察

本研究において、アルツハイマー病患者脳組織を使用し、側頭葉皮質と後頭葉皮質及びアルツハイマー病の発病により発現レベルが異なる因子を探索したところ、微小管関連蛋白質であるMAP1B及びMAP2の発現変化を検出し、また、アルツハイマー病患者の後頭葉皮質においてTRIM32やTRIM37の発現の上昇を検出した。MAP1B及びTRIM32やTRIM37については、さらなる機能解析をsiRNAによる発現抑制を行い、神経細胞死との関連を分析した結果、これら因子の発現抑制によって、神経芽腫細胞の生存が抑制された。さらに、【表2】～【表4】に示されるアルツハイマー病患者脳組織により異なる遺伝子発現を示す因子には、タンパク質の分解系(ユビキチン・プロテアソームシステム)やA β の産生に關与するものが見出した。これらの因子について様々な分子レベルでの報告がなされているが、本研究ではアルツハイマー病患者脳において実際にそれらが発現変化していることを同時に見出した。加えて、同一患者脳内にて発現変化する新規クローンを単離し、A β 処理した神経芽腫細胞においてもその発現が変化することを検出した。

1.微小管関連蛋白質ファミリー(MAPsファミリー)であるMAP1BとMAP2の発現変化

MAP1Bは胎児脳において発現が多く、分化に伴い発現が減少するが(Ref. 56)、アルツハイマー病脳では、MAP1Bは神経原線維変化や老人斑に存在し、PHF (paired helical filaments)の構成成分となっている(Ref. 57)。MAP1B及びMAP2は微小管関連蛋白質ファミリーに属するが、タウ蛋白質もまた、当ファミリーに含まれる。微小管は、他の細胞骨格系と相互作用して細胞の形態を維持し、有糸分裂や軸索流などの細胞内物質輸送の通路を確保する等の機能を有し、MAPsファミリーは微小管に結合してチューブリンと微小管の重合を促進する。タウ蛋白質がリン酸化されるとリン酸化タウ蛋白質(P-tau)となり、他の神経の微小管

関連蛋白質であるMAP1とMAP2とともに、微小管結合能を失い、正常な細胞骨格が崩壊され、また、P-tauはPHFを形成して軸索への物質の輸送を妨げる(Ref. 58, 59)。このようにして、タウ蛋白質のリン酸化により、神経の微小管ネットワークの崩壊が引き起こされ、タウ蛋白質と同様に、MAP1Bもまたプロリン指向性タンパク質キナーゼであるGSK3Bによって過剰なリン酸化を受ける(Ref. 60)。しかしながら、MAPsファミリーのアルツハイマー病発症と進行におけるそれぞれの役割とその差異については、未だ不明な点が多い。

本研究では、アルツハイマー病患者脳において、MAPsファミリーに属するMAP1BとMAP2の発現レベルが相反して変化することを見出した。すなわち、(1)MAP1Bの発現がアルツハイマー病患者脳において低く(表2、表3)、(2)MAP2の発現がアルツハイマー病患者脳において高いことから(表3)、MAP1BとMAP2の微小管関連蛋白質が、アルツハイマー病の進行の間、脳部位ごとに異なる機能的役割を有すると考えられる。そして、本研究におけるMAP1Bの機能の喪失により、神経突起伸長が抑制され、細胞死を誘導するという知見(図6)は、Aβの存在なしに神経細胞死が誘導されるものであり、MAP1Bがアミロイドカスケード仮説においてAβ蓄積以降に作用するものであろうと考えられる(ref.61)。

MAP1Bの発現解析について、生体マウスの各組織におけるマイクロアレイ発現解析が報告されており(Ref. 97)、心臓や脾臓、肝臓等に比べ中枢神経系組織の発現が多く、一方、脳組織においては、大脳皮質(7.3)や運動野(8.8)に比べると海馬(4.1)や嗅内野(4.1)の発現が少ないことが示されている。さらに、患者脳組織を用いたマイクロアレイ解析では、Braak stage I-II及びIII-IVに比べて、Braak stage V-VIの側頭葉皮質において、MAP1Bの発現が減少することも報告されている(Ref. 98)。本研究では、AD患者においてMAP1B発現が、特に側頭葉や海馬にて減少することを示したが、これら報告と相関するものである。

また、Mukaetova-Ladinska EBらは、AD患者17名、LB患者5名を含むdementia患者脳組織(側頭葉及び新皮質)によるMAP2蛋白質発現解析において、AD患者の新皮質におけるMAP2の発現は正常脳に比べ多いことを示し(Ref. 65)、本研究におけるMAP2がAD患

者後頭葉皮質にて発現がup-regulateすることと一致するものである。さらに、彼らは、AD患者側頭葉皮質におけるMAP2発現変化は他のdementia患者より少なく、神経原線維変化とMAP2発現変化とは相関しないとも報告しており(Ref. 65)、MAP2のみの発現変化による機能的変化は少なく、他の因子と作用することで機能を発揮する可能性をさらに支持するものであって、MAP2ノックアウトマウスが奇形を現すことなく生存するという報告にも裏付けられる(Ref. 62)。

本研究では、アルツハイマー病患者後頭葉皮質とコントロール患者後頭葉皮質のサブトラクション反応において、MAP1BとMAP2の発現レベルが相反する(表3)ことから、MAP1Bの機能の低下に対し、MAP2が発現上昇することにより、その役割を補完する可能性が考えられる。しかし一方、MAP1Bの発現抑制のみにより神経伸長が抑制されたこと(図6)を考慮すると、神経突起伸長については、内在性のMAP2のみでは補完なされないと考えられる。MAPsファミリーに属するそれぞれにおいて類似する共通機能は多いものの(Ref. 62)、MAP1Bの機能が他のMAPsによって、必ずしも完全に補完できるものではないという報告(Ref. 62 - 64)とも一致する。また、MAP1B及びMAP2のノックアウトマウスは致死的であって、MAP2とMAP1Bは機能的な微小管形成を通じて樹状突起伸長と細胞移動に重要な役割を果たすという報告(Ref. 62)からも、これら微小管関連蛋白質のAD患者能における変化は興味深いものである。さらに、MAP1B及びMAP2ダブルノックアウト及びMAP1Bシングルノックアウトの神経細胞にMAP2C(MAP2のアイソフォーム)を導入したところ、神経突起の伸長が回復し、MAP1BとMAP2の機能がoverlapしていることを確認したという報告(Ref. 99)をかんがみると、MAP1Bの発現が減少したAD後頭葉皮質にて、MAP2の発現が上昇し、後頭葉皮質の機能が維持され、神経障害に対し抵抗性を示しているとも考えられ、MAPsが各部位にて重要な役割を果たしていることが示唆される。

MAP1BやMAP2はTauと同様に過剰にリン酸化されることによりNFT、PHFの形成を誘導し、それらのリン酸化/脱リン酸化のバランスが不均衡になると、神経細胞の構造や軸索輸送

が崩壊して、結果として神経細胞死がおこる。MAP1B及びMAP2は主としてPP2A及びPP2Bそれぞれによって脱リン酸化されることが示され、PP2Aはアルツハイマー病患者脳にて活性が減少することも知られており、微小管関連蛋白質の脱リン酸化／リン酸化機構のバランスがNFT形成に特に重要と考えられ(Ref. 93)、MAP1B及びMAP2の脱リン酸化／リン酸化の僅かな調節の違いにより、病態や形態学的な変化が導かれるものとも考えられる。さらに、Aβによって神経細胞のカルシウム濃度が上昇、Calpainが活性化し、神経細胞死が誘導される際に、MAP1Bを含む微小管関連蛋白質が蛋白分解を受けることが報告されている(Ref. 94)。本研究において、正常脳に比べAD後頭葉皮質においてCalpain3の発現がdown-regulateされることを見出したが(表3)、Calpainが十分に活性化しないため、AD後頭葉皮質にて神経細胞死及び微小管関連蛋白質の分解が誘導されにくいものとも考えられる。

2. アルツハイマー病患者の後頭葉皮質におけるTRIM32、TRIM37の発現の上昇

本研究では、アルツハイマー病患者の後頭葉皮質においてTRIM32、TRIM37の発現の上昇が検出された(表3)。また、神経芽腫細胞においてTRIM32やTRIM37の発現を抑制したところ、生存細胞数の減少が見られた(図4)。また、APPノックアウトマウスの脳領域ごとのマイクロアレイ発現解析では、前頭前野において、TRIM32及びTRIM37の発現が高く、海馬において低いことも示されている(Ref. 66, 67)。前頭前野は後頭葉皮質のようにADの後期においても病理学的変化が少なく、また、海馬は側頭葉皮質と同様に脆弱な領域であるから、本研究における病理学的変化と関連した発現解析と一致するものである。

TRIM32及びTRIM37遺伝子はtripartite motif (TRIM, RING-B-box-coiled-coil)ファミリータンパク質をコードしており、抗アポトーシス性の作用、及び、E3ユビキチンリガーゼの性質を有している(Ref. 68 - 70)。ユビキチンリガーゼはユビキチン・プロテアソームシステムによるタンパク質分解の中心的役割を有しており、異常タンパク質の蓄積を分解し、真核生物

にひろく保存されている。TRIM32は、p53癌抑制因子ファミリーのひとつである転写因子p73の標的であり、p73と相互作用しユビキチン化、分解を促進して、神経前駆細胞の分化において機能する(Ref. 71)。また、アルツハイマー病におけるユビキチン・プロテアソームシステムの関与も解析されており(Ref. 72 - 74)、A β は、ユビキチン依存性タンパク質分解を抑制することが報告されている(Ref. 29, 30, 75)。TRIM32及びTRIM37のようなユビキチンリガーゼが活性化されることにより、蓄積したA β が分解されることによって、後頭葉皮質における神経保護作用が誘導される可能性も考えられ、異常蛋白質の分解促進によるAD進行の抑制を期待させるものである。神経保護因子として単離されたHumaninは、TRIMファミリーのひとつであるTRIM11と結合し、それにより細胞内のHumaninレベルを制御することも報告されている(Ref. 100)。後頭葉皮質由来のHumaninもまたTRIMに関与し、TRIMによる保護作用の解析は非常に重要と考えられる。さらに、近年、ユビキチンリガーゼMITOLがMAP1B-LC1と会合して蛋白分解を促進すること、MITOLをノックダウンするとMAP1B-LC1がミトコンドリアに蓄積して、ミトコンドリア機能障害を引き起こすことが報告された(Ref. 76)。MAP1Bの主な役割は微小管の安定化であるが、ミトコンドリアの働きを抑制することやユビキチン・プロテアソームシステムとの関わりもまた興味深い。

3.その他発現変化する遺伝子

さらに今回、アルツハイマー病患者側頭葉皮質において、reticulon-3(RTN3)遺伝子の発現がdown-regulationしていた(表4)。Reticulonのファミリーには4つのタンパク質、reticulon-1(RTN1),reticulon-2(RTN2),reticulon-3(RTN3)及びreticulon-4(RTN4、Nogo)が存在するが、これらは障害後の神経の神経突起伸長の抑制に関与することが知られており、APPを切断する β セクレターゼ(BACE-1)の結合のパートナーとしても知られている。Reticulonは、BACE-1の活性を抑制し、in vivoにおけるBACE-1のレベルを減少させ、A β の産生を減少させる。脳において、BACE-1は主に神経細胞中のreticulon-3と共局在化して

おり、一方、reticulon-4はより多くオリゴデンドロサイトに存在する。いずれかのreticulonタンパク質の発現の上昇によりA β の産生が実質的に減少する。さらに、reticulon-3の発現の低下により、A β の分泌が増加することから、reticulonタンパク質はBACE-1のネガティブモジュレーターであることが示唆されている。また、reticulonタンパク質はAPPに対するBACE1の接近を阻止し、APPタンパク質の切断を減少させる。本研究ではアルツハイマー病患者脳において神経reticulon-3のdown-regulationを報告したが(表4)、この結果は、アルツハイマー病患者脳におけるreticulonの発現の変化が、アルツハイマー病患者におけるアミロイド斑の形成や細胞のA β に対する応答と一致するものである(Ref. 77- 79)。

また、dystonin-1eB、neuronal ankyrin-2及びHSP-90の発現が、アルツハイマー病患者の側頭葉皮質においてdown-regulateしていた(表4)。この結果は、細胞骨格関連のタンパク質の発現が、アルツハイマー病初期におけるタングルの形成を促進しているという仮説をさらに支持する。Dystoninは神経の細胞骨格の組織化を維持するものであり(Ref. 80)、脳内に多く存在するankyrin-2は、細胞膜裏打ち構造を構築する蛋白質のひとつであり、微小管にも結合することが知られている(Ref. 81)。また、凝集性のタウ蛋白質とHSP-90/70との間には逆の相関があり、HSP-90/70が増加するとタウ蛋白質の微小管への結合が促進されることも報告されている(Ref. 82)。

ここで、HSP-90とE3ユビキチンリガーゼのひとつであるCHIP(carboxyl terminus of the HSP70-interacting protein)が、タウ蛋白質をユビキチン化し、細胞死を防ぐという報告があり(Ref. 83)、CHIPのup-regulationがタウの凝集を減弱させることも知られている(Ref. 84)。上述したように、ユビキチン・プロテアソームシステムの機能障害が、アルツハイマー病のように遅行性で進行性の神経変性疾患の発症を導くものと考えられている。神経原線維変化を構成するPHFには、高度にリン酸化されたP-tauに加え、それに結合したユビキチンが存在する。ユビキチンB(UBB)遺伝子は、ユビキチン分子がタンデムに結合したポリユビキチンをコードする遺伝子であり、アルツハイマー病患者の大脳皮質の沈着物中に、変異したAPPとユビキ

チンBが認められたことが報告されている(Ref. 85)。非遺伝性の早期発症型及び晩期発症型アルツハイマー病で、この変異が広く検出されている。Aβによる神経毒性及びプロテアソームの抑制は、アルツハイマー病患者の脳で増加したE2-25K/Hip-2によって仲介され、また、E2-25K/Hip-2は、ユビキチンB変異体(UBB+1)によって仲介される神経毒性に必要とされるものであり、アルツハイマー病患者において発見されたプロテアソームを阻害する(Ref. 63, 64)。多くの研究者が、アルツハイマー病におけるユビキチン・プロテアソームシステムの機能不全における分子メカニズムの解明について注目しており、本研究においては、ユビキチン・プロテアソームシステムの崩壊がアルツハイマー病脳の機能不全が大きな原因のひとつであることが示唆された。

4. サブトラクション反応により得られた新規なクローン

本研究では、アルツハイマー病患者脳の一部に依存してその発現が変化する新規な塩基配列を同定した。【図7】及び【図8】に示される新規なクローン、TeOcR03B03及びTeOcF03B11 (P9TLDR)の塩基配列及び予測アミノ酸配列は、Genbankへ登録した(Accession number; AB116553及びAB128931)。

これら2クローンはアルツハイマー病患者側頭葉皮質vsアルツハイマー病患者後頭葉皮質の反応で陽性クローンとして単離されたものであって、TeOcR03B03クローンはアルツハイマー病患者側頭葉皮質にて発現がup-regulateしており、P9TLDRはAD患者側葉皮質にて発現がdown-regulateしたものである。【図12】に示すように、アルツハイマー病患者側葉皮質にて発現がdown-regulateするP9TLDRの培養細胞における発現を検出したところ、Aβ処理した神経細胞にて経時的に減少した。

Aβ処理により神経芽腫細胞はタウ蛋白質のリン酸化を3時間後(【図11】)、JNKのリン酸化を6時間後に確認したが(Ref. 86)、同程度のAβ処理時間において当該新規クローンの発現が減少した。また、Aβ処理されたSHSY5Y神経芽腫細胞は、4日程度で神経細胞死が

顕著になるが、それよりも早い段階で当該クローンの発現が変化することから、P9TLDR の発現変化は神経細胞死よりもかなり前に、Tau のリン酸化がおこる段階で調節されているものと考えられる。そして、神経原線維変化やアミロイド斑が多くみられる側頭葉皮質において、P9TLDRの生体内の現象は、A β 処理された神経芽腫細胞にてP9TLDRの発現が減少するという *in vitro* 解析と一致するものであり、当該クローンの A β に対する密接な応答が示唆される。

【図 9】に示すように、P9TLDR は C 末端側配列に NAV1 及び NEK5 と高い相同性を有する部分が存在する。NAV1 は、主に神経系で発現し、*C. elegans* ホモログは軸索ガイダンスを誘導することが報告されている (Ref. 87)。マウスにおいて、神経発生段階にて発現し、神経細胞の移入 (migration) において微小管と結合し (Ref. 88)、また、ProteinArray 発現解析では、A β 42 と有意に結合するタンパク質のひとつとして報告されている (Ref. 89)。また、NEK5 の機能は詳細にわかっていないが、骨格筋の分化とともに発現が増加し、カスパーゼ 3 を活性化させ、細胞死を誘導させることが報告されている (Ref. 90)。これらタンパク質の機能より、P9TLDR が軸索ガイダンスや神経突起伸長の誘導となんらかの関わりがあり、A β や微小管との結合の可能性も考えられる。一方、染色体上において、P9TLDR が NCAM1 (neuronal cell adhesion molecule 1) の遺伝子内に位置すること (Chr 11q23.1) も、注目すべきことである。NCAM1 は、細胞接着因子のひとつであって、細胞間の相互作用に関与し、また、神経発生のみならず、障害された神経細胞や神経可塑性において重要な役割を果たし、神経突起伸長 (neurite outgrowth) を誘導する (Ref. 91)。さらに、A β を脳内に注入したラットに対し、NCAM1 由来ペプチドが、タウリン酸化、神経細胞死を抑制し、GSK3 β 活性も抑制することも報告されている (Ref. 92)。

P9TLDR は、脳部位によって発現が変化し、つまり、アルツハイマー病において抵抗性のある領域 (後頭葉皮質) よりも、脆弱で神経脱落が比較的早い段階で起こる領域 (側頭葉皮質) で発現が減少するものであって、臨床症状が現れ始めるステージの患者より単離されたことか

ら、病理学的変化と臨床症状との相関を解析するうえで役立つ可能性がある。そして、不可逆的に長い年月をかけて規則的に各領域に障害がおこるアルツハイマー病において、発症及び進行のための新たなマーカーとして使用し、早期発見や予防に貢献できることを期待する。

患者における病理学的変化は、アルツハイマー病発症の十～数十年前からおこるため、認知症症状が認められない期間が非常に長く、また、脳組織にてアミロイドの沈着や神経原線維変化が形成されても認知症状を発症しない患者も多い。本研究では、病理学的及び臨床的にアルツハイマー病と診断された患者脳組織において遺伝子発現解析を行ったが、症状を実際に呈する患者脳を解析することにより、発症のメカニズムを探るものである。AD と生理的老化の両患者で、脆弱な脳部位と抵抗性を有する脳部位といった視点により比較・解析することにより、ユビキチン・プロテアソームシステム、微小管関連蛋白質及び新規遺伝子が、各部位において各々作用すること、そして、それらが相互作用していることが示唆された。長期間、加齢をはじめとする多くの危険因子により刺激を受け続ける脳組織が、どのようにそれらから逃れ、また、影響を受けるのか、総合的に脳全体として解析する必要があることを、本研究は再認識させるものである。近年、マイクロアレイやプロテオーム解析により、AD 患者の海馬、前頭葉、頭頂葉等の各領域における発現解析が進められている (Ref. 101-103)。患者脳の各領域における解析に基づき、疾患の進行と臨床学的データの相関を分析することに役立つことが示唆され、各研究により見出された結果をさらに連携させ、多量のデータを多方面から解析することにより、多段階多因子による AD 発症と進行の解析が進むであろうと考えられ、本研究はその一端を担うものである。

結論

本研究によって、アルツハイマー病患者における神経の生と死の調節に関連するタンパク質の新しい知見が示唆された。特に、微小管関連蛋白質、MAP1B及びMAP2の神経細胞死における役割、並びに、TRIM32/37を含むユビキチン・プロテアソームシステムの新たな知見は、アルツハイマー病発症のメカニズムやそれに関わる因子の相互作用が示唆される。また、新規に得られた核酸配列は、Aβの毒性に依存したマーカーとなり得るものであり、アルツハイマー病発症への関与も興味深い。このようにしてアルツハイマー病患者脳における発現解析結果が、アルツハイマー病発症及び進行過程を把握するうえで鍵となり、アルツハイマー病研究に有用なものとなると考える。

Figure Legend

【図1】 免疫組織化学による MAP1B タンパク質の発現解析 — Control

【図2】 免疫組織化学による MAP1B タンパク質の発現解析 — AD

病理診断によりアルツハイマー病及び生理的老化と診断され、老人斑および神経原線維変化に基づくステージが決定された患者脳組織を用いた。脳組織を、4%パラホルムアルデヒド (PFA, Sigma) により固定し、パラフィン包埋後、免疫組織化学用切片に加工した。微小管関連蛋白質 1B (MAP1B) (Abcam Ltd, Cambridge, UK) の免疫染色には、1:1000 で希釈したモノクローナル抗体により標準的な ABC 法を使用した。DAKO EnVision (Dako, Kyoto, Japan) にて検出を行い、洗浄したのちに、免疫反応させ、染色はジアミノベンジジン (DAB) を添加して可視化した。細胞の核は HE 染色にて染色した。

Occ;後頭葉皮質、Temp;側頭葉皮質 (T2 領域)、Hip;海馬 (CA3)

AD;アルツハイマー病患者、Ctrl;生理的老化患者

DAB により茶色に強く染まった細胞の形態が神経原線維変化様の形態を示す。

弱拡大 (Scale bare = 100 μ m)、強拡大 (Scale bare = 50 μ m)

【図3】 TRIM32/37 特異的 siRNA をトランスフェクトした SHSY5Y 神経芽腫細胞における逆転写ポリメラーゼ反応 (RT-PCR) による mRNA 発現解析

細胞に 0.5 μ g 二本鎖 siRNA/ウェルで siRNA 導入した。コントロールとして、一本鎖センス相補 RNA オリゴ (control-1, 一本鎖 siRNA) と反転 TRIM32/37 の配列の二本鎖 siRNA (control-2) を用いた。標的である TRIM32/37 の siRNA の配列は、開始コドンの位置に対応した位置 (nt)49-nt69 nt 及び nt88-nt108 (TRIM32)、nt64-nt84 及び nt100-nt120 (TRIM37) である。

siRNA 導入後、細胞より total RNA を精製し、プロトコールに従って cDNA に逆転写して

(Superscript IITM-reverse transcriptase (RT) (Invitrogen))、Takara Ex Taq Hot Start polymerase 及び 95°C 8 分の pre-start PCR step によって、増幅反応を行った。プライマーは、TRIM32 : forward primer : 5'-atggctgcagcagcagcttctcacctg-3'、reverse primer : 5'-atacccatggttgcagctggctc-3'、TRIM37 : forward primer : 5'-atggatgaacagagcgtggagagcattgct-3'、reverse primer : 5'-gtgatgataatcttcattctgaatcttctc-3'を用いた。PCR 産物は 1.5%アガロースゲル電気泳動で解析した。

上段左;TRIM32 の mRNA 発現、上段右 TRIM37 の mRNA 発現

下段左及び右; β -actin の mRNA 発現

レーン 1;DNA 分子量マーカー、

レーン 2;コントロール-1 細胞(1 本鎖 siRNA をトランスフェクト)

レーン 3;コントロール-2 細胞(TRIM32/37 の逆配列の 2 本鎖 siRNA をトランスフェクト)

レーン 4;TRIM32/37 特異的 2 本鎖 siRNA をトランスフェクトした細胞

【図4】 SHSY5Y 神経芽腫細胞の生存における TRIM32/37 発現の影響

TRIM32/37 の siRNA を導入した神経芽腫細胞の細胞生存率を Cell Titer 96 Aqueous One solution assay (Promega, Madison, WI, USA)によって、導入 48 時間後に測定した。96 ウェルアッセイプレートの 100 μ l の培養培地中に 20 μ l /ウェルで CellTiter 96 Aqueous One Solution Reagent を加え、37°Cで 1 時間インキュベートし、490nm で吸光度を測定した。

上段、左から、コントロール-1 細胞; 1 本鎖 siRNA をトランスフェクトした細胞

コントロール-2 細胞; TRIM32/37 の逆配列の 2 本鎖 siRNA をトランスフェクトした細胞

TRIM32 特異的 2 本鎖 siRNA をトランスフェクトした細胞

下段、左から、コントロール-1 細胞; 1 本鎖 siRNA をトランスフェクトした細胞

コントロール-2 細胞;TRIM32/37 の逆配列の 2 本鎖 siRNA をトランスフェクトした細胞

TRIM37 特異的 2 本鎖 siRNA をトランスフェクトした細胞

【図5】 MAP1B 特異的 siRNA をトランスフェクトした SHSY5Y 神経芽腫細胞における逆転写ポリメラーゼ反応(RT-PCR)による mRNA 発現解析

MAP1B の発現を構成的に抑制する神経芽腫細胞は、以下のように作製した。MAP1B 特異的 siRNA、sense ;

gatcccgGACCTATGCTACTGAGTtcaagagaCTGCAGTGTAGCATAGGTCttttttgg
aaa 、 anti-sense ;

agcttttccaaaaaaGACCTATGCTACTGAGTtctctttaaCTGCAGTGTAGCATAGGTC
cgg

で合成し、siRNA 発現ベクターである pSilencer 3.1 hygro(Ambion, Aystin, TX, USA)にライゲーションし、化学的コンピテント細胞 DH10B(invitrogen)にトランスフォームさせ、ハイグロマイシン耐性コロニーを得た。単一コロニーを培養して、プラスミド DNA を QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN)を用いて精製した。EndoFree Plasmid Maxi Kit(QIAGEN)にてトランスフェクション用プラスミド DNA を抽出し、神経芽腫細胞に導入した。hygromycine-B(50 μ g ml⁻¹ ; Invitrogen)を添加した 15%FCS 含有 D-MEM/F12(1:1)培地によって 4 週間セレクションを行った。セレクション後、細胞より total RNA を精製し、プロトコールに従って cDNA に逆転写して(Superscript IITM-reverse transcriptase (RT) (Invitrogen))、Takara Ex Taq Hot Start polymerase 及び 95°C8 分の pre-start PCR step によって、増幅反応を行った。プライマーは、MAP1B : forward primer : 5'-gatccttcatcaccgaagtg-3'、reverse primer : 5'-ctgcaaacaggcagaatcg-3'、を用いた。PCR 産物は 1.5%アガロースゲル電気泳動で解析した。

上段;MAP1B の mRNA 発現、下段; β -actin の mRNA 発現

レーン 1; ΦX/HaeIII マーカー

レーン 2; scrambled siRNA をトランスフェクトしたコントロール細胞

レーン 3; MAP1B 特異的 siRNA をトランスフェクトした細胞

レーン 4; GFP 特異的 siRNA をトランスフェクトした細胞

レーン 5; 無処理の細胞

レーン 6; λ/StyI マーカー

【図 6】MAP1B 特異的 siRNA をトランスフェクトした SHSY5Y 神経芽腫細胞における分化誘導と生存細胞数に対する影響

ヒト神経芽腫細胞 SHSY5Y は Poly D-Lysine(PDL)コートされた 6 ウェルプレートに 1.5×10^4 cell well⁻¹ で蒔き、15%ウシ胎児血清 (FCS) 含有ダルベッコ変法イーグル培地

(D-MEM/F12(1:1)) で培養した。翌日、オールトランスレチノイン酸(RA)(10 μ M)を含む新鮮な培地に交換し、1 週間培養した。その後、細胞をリン酸緩衝食塩水 (PBS) で 2 回洗浄して、

脳由来神経栄養因子 (BDNF) を 50 ng ml⁻¹ で含む無血清培地でさらに 1 週間培養した。細胞は Cell Titer 96 Aqueous One solution assay によって測定した。

A; GFP 特異的 siRNA がトランスフェクトされた細胞

B; scrambled siRNA がトランスフェクトされたコントロール細胞

C; MAP1B 特異的 siRNA がトランスフェクトされた細胞 (Scale bare = 50 μ m)

D; MAP1B 発現抑制による SHSY5Y 神経芽腫細胞の生存率への影響

(ELISA Cell Titer 96 Aqueous assay (Promega)による生存細胞数の測定、*P<0.05)

左から、

コントロール-1 細胞; GFP 特異的 siRNA がトランスフェクトされた細胞

コントロール-2 細胞; scrambled siRNA がトランスフェクトされた細胞

MAP1B 特異的 siRNA がトランスフェクトされた細胞

【図 7】 サブトラクション反応により得られた新規クローン(TeOcR03B03)の塩基配列

AD 患者側頭葉皮質 vs AD 患者後頭葉皮質の反応により陽性クローンとして同定した。

AD 患者側頭葉皮質にて発現が up-regulate したクローンである。1199 塩基は DDBJ

Accession number : AB116553として登録した。195-494ntより予測されるアミノ酸配列も登録した。

【図 8】 サブトラクション反応により得られた新規クローン(P9TLDR)の塩基配列

AD 患者側頭葉皮質 vs AD 患者後頭葉皮質の反応により陽性クローンとして同定した。

AD 患者側頭葉皮質にて発現が down-regulate したクローンである。1589 塩基は DDBJ

Accession number : AB128931)として登録した。717-950ntより予測されるアミノ酸配列も登録した。

【図 9】 hypothetical protein P9TLDR

P9TLDR(Temporal Lobe Down-Regulate)は 11 番染色体 Chr 11q23.1 上に位置し、NCAM1 (neuronal cell adhesion molecule 1)の第 1 エクソンと第 2 エクソンとの間に位置する。P9TLDR は、Gorilla 及び Callithrix jacchus にファミリータンパク質を有するが、いずれも機能未知である。C 末端側配列(aa44-aa75)に NAV1 (human neuron navigator 1 protein)に高い同一性(50%)を有し、31 アミノ酸がオーバーラップする。また、同じ 31 アミノ酸が NEK5 (NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 5)にも相同であった。

【図 10】 患者脳組織における P9TLDR の mRNA 発現解析

AD 患者及び生理的老化患者の側頭葉皮質及び後頭葉皮質の脳組織より、RNeasy MAXI RNA isolation kit(QIAGEN, Tokyo, Japan)を用い、Total RNA を抽出した。RNA は定法

に従い cDNA に逆転写し (Superscript IITM-reverse transcriptase (RT) (Invitrogen))、Takara Ex Taq Hot Start polymerase 及び 95°C 8 分の pre-start PCR step によってポリメラーゼを活性化させ、増幅を行った。プライマーは、P9TLDR : forward primer : 5'-gatggaaggctgtcttagac-3'、reverse primer : 5'-ggcttcactgtgctatttc-3' を用いた。PCR 産物は 1.5% アガロースゲル電気泳動で解析した。

レーン 1-4; 生理的老化患者後頭葉皮質 (Cont-Occi)

レーン 5-8; 生理的老化患者側頭葉皮質 (Cont-Temp)

レーン 9-13; AD 患者後頭葉皮質 (AD-Occi)

レーン 14-17; AD 患者側頭葉皮質 (AD-Temp)

レーン NT; 鋳型なし (no template)

【図 11】 アミロイド β により処理された SHSY5Y 神経芽腫細胞

A. 形態変化

前述のように RA 及び BDNF により分化誘導された SHSY5Y 神経芽腫細胞を用いた。アミロイド β は、合成された A β (1-40) ペプチド (PEPTIDE, Osaka, Japan) に、0.1% NH₄OH 及び D-PBS を添加し、37°C で 24 時間インキュベーションしたものを用いた。RA 及び BDNF によって分化誘導され、無血清培地に培地交換された SHSY5Y 細胞に、A β (1-40) の濃度を 20 μ M に調整して添加した。コントロールは A β が含まれていない点のみ異 A β (1-40) 溶液またはコントロール液を添加した後、3、6 及び 24 時間の細胞からそれぞれ定法に従って total RNA を抽出した。RNA は定法に従い cDNA に逆転写し (Superscript IITM-reverse transcriptase (RT) (Invitrogen))、Takara Ex Taq Hot Start polymerase 及び 95°C 8 分の pre-start PCR step によってポリメラーゼを活性化させ、増幅を行った。プライマーは、P9TLDR : forward primer : 5'-gatggaaggctgtcttagac-3'、reverse primer : 5'-ggcttcactgtgctatttc-3' を用いた。PCR 産物は 1.5% アガロースゲル電気泳動で解析し

た。

左;無処理 SHSY5Y 細胞、右;A β 処理 4 日の SHSY5Y 細胞

B.タウのリン酸化の Western blot

A β 処理した細胞は TRIZOL (Invitrogen) によりタンパク質を精製し、10% SDS ポリアクリルアミドゲルにより電気泳動した。ゲルを PVDF (polyvinylidene difluoride) 膜に転写し、5%スキムミルクと 5% BSA にてブロッキングした。膜は抗リン酸化タウ抗体(AT-8: BR-03, AUTOGENBIOCLEAR) 又は抗タウ抗体 (577801, CALBIOCHEM)でインキュベートし、ECF Western blotting reagent packs (Amersham Pharmacia Biotech)で可視化した。

p-MAPT:抗リン酸化タウ抗体(上段)、MAPT:抗タウ抗体(下段)

左; A β 処理 3 時間の SHSY5Y 細胞

中; A β 処理 6 時間の SHSY5Y 細胞

右; A β 処理 24 時間の SHSY5Y 細胞

C.MTT アッセイ

MTT (SIGMA) は D-PBS で 3 mg/ml に溶解し、培養液に最終濃度 0.3 mg/ml で添加して、CO₂ インキュベーターで 4 時間反応した。10% SDS 及び 1 mM NH₄OH で反応を停止させ、さらに 37°C で 24 時間反応させたのち、550 nm の吸光度を測定した。

1d;A β 処理 1 日の SHSY5Y 細胞

2d;A β 処理 2 日の SHSY5Y 細胞

4d;A β 処理 4 日の SHSY5Y 細胞

8d;A β 処理 8 日の SHSY5Y 細胞

C;無処理、A β ;A β 処理

【図 12】 アミロイド β 処理された SHSY5Y 神経芽腫細胞における逆転写ポリメラーゼ反応

(RT-PCR)による P9TLDR の発現解析

抽出したRNAは定法に従いcDNAに逆転写し(Superscript IITM-reverse transcriptase

(RT) (Invitrogen))、Takara Ex Taq Hot Start polymerase及び95°C8分のpre-start

PCR step によってポリメラーゼを活性化させ、増幅を行った。プライマーは、P9TLDR :

forward primer : 5'-gatggaaggctgtcttagac-3'、 reverse primer :

5'-ggcttccactgtgctatttc-3'を用いた。PCR産物は、 β -actinが661bp、P9TLDRが442bpのバ

ンドとして、1.5%アガロースゲル電気泳動で解析した。

レーン 1、13 ; λ /StyI マーカー

レーン 2、8 ;無処理 SHSY5Y 細胞

レーン 3、9 ;A β 処理 3 時間の SHSY5Y 細胞

レーン 4、10 ; A β 処理 6 時間の SHSY5Y 細胞

レーン 5、11 ; A β 処理 24 時間の SHSY5Y 細胞

レーン 6、12 ; 鋳型なし

レーン 7 ; Φ X/HaeIII マーカー

引用文献

- 1; Mount C and Downton C.
Alzheimer disease: progress or profit?
Nat Med 2006;12: 780-784.
- 2; Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L et al.
Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study.
Lancet. 2005;366(9503):2112-2117.
- 3; Breteler MM, Claus JJ, van Duijn CM, Launer LJ, Hofman A.
Epidemiology of Alzheimer's disease.
Epidemiol Rev. 1992;14:59-82.
- 4; Braak H, Braak E.
Neuropathological staging of Alzheimer-related changes.
Acta Neuropathol (Berl) 1991;82:239-259.
- 5; Sulkava R.
Alzheimer's disease and senile dementia of Alzheimer type. A comparative study.
Acta Neurol Scand. 1982;65(6):636-650.
- 6; Van Broeckhoven CL.
Molecular genetic analysis of early onset familial Alzheimer's disease.
Neurobiol Aging. 1989;10(5):437-438; discussion 446-448.
- 7; Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F et al.
Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease.
Nature. 1991;349(6311):704-706.
- 8; Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M et al.
Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease.
Nature. 1995;375(6534):754-760.
- 9; Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE et al.
Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families.
Science. 1993;261(5123):921-923.
- 10; Namba Y, Tomonaga M, Kawasaki H, Otomo E, Ikeda K.
Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jakob disease

- Brain Research. 1991;541(1):163-166
- 11; Games D, Adams D, Alessandrini R, Barbour R, Berthelette P et al.
Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein.
Nature. 1995 Feb 9;373(6514):523-7.
- 12; Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, Hu K et al.
Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse.
Nature. 1999 Jul 8;400(6740):173-7.
- 13; Mangialasche F, Solomon A, Winblad B, Mecocci P, Kivipelto M.
Alzheimer's disease: clinical trials and drug development.
Lancet Neurol. 2010 Jul;9(7):702-16.
- 14; Walker LC, Diamond MI, Duff KE, Hyman BT.
Mechanisms of protein seeding in neurodegenerative diseases.
JAMA Neurol. 2013 Mar 1;70(3):304-10.
- 15; Lee G, Leugers CJ.
Tau and tauopathies.
Prog Mol Biol Transl Sci. 2012;107:263-93.
- 16; Roberson ED, Scarce-Levie K, Palop JJ, Yan F, Cheng IH, Wu T et al.
Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model.
Science. 2007;316(5825):750-754.
- 17; Fujii T, Watanabe M, Ogoma Y, Kondo Y, Arai T.
Microtubule-associated proteins, MAP 1A and MAP 1B, interact with F-actin in vitro.
J Biochem. 1993 Dec;114(6):827-9.
- 18; Clark LN, Poorkaj P, Wszolek Z, Geschwind DH, Nasreddine ZS et al.
Pathogenic implications of mutations in the tau gene in pallido-ponto-nigral degeneration and related neurodegenerative disorders linked to chromosome 17.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Oct 27;95(22):13103-7.
- 19; Spillantini MG, Murrell JR, Goedert M, Farlow MR, Klug A, Ghetti B.
Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Jun 23;95(13):7737-41.
- 20; Zhang B, Maiti A, Shively S, Lakhani F, McDonald-Jones G, Bruce J et al.
Microtubule-binding drugs offset tau sequestration by stabilizing microtubules and

reversing fast axonal transport deficits in a tauopathy model.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Jan 4;102(1):227-31. Epub 2004 Dec 22.

21; Braak H, Braak E.
 Development of Alzheimer-related neurofibrillary changes in the neocortex inversely recapitulates cortical myelogenesis.
Acta Neuropathol. 1996;92(2):197-201.

22; Braak H, Braak E.
 Frequency of stages of Alzheimer-related lesions in different age categories.
Neurobiol Aging. 1997;18(4):351-357.

23; Braak H, Braak E.
 Staging of Alzheimer-related cortical destruction.
Int Psychogeriatr. 1997;9 Suppl 1:257-261; discussion 269-272.

24; Ferrari A, Hoerndli F, Baechi T, Nitsch RM, Götz J.
 beta-Amyloid induces paired helical filament-like tau filaments in tissue culture.
J Biol Chem. 2003;278(41):40162-40168.

25; Pennanen L, Götz J.
 Different tau epitopes define Abeta42-mediated tau insolubility.
Biochem Biophys Res Commun. 2005;337(4):1097-1101.

26; Park SY, Ferreira A.
 The generation of a 17 kDa neurotoxic fragment: an alternative mechanism by which tau mediates beta-amyloid-induced neurodegeneration.
J Neurosci. 2005;25(22):5365-5375.

27; Gamblin TC, Chen F, Zambrano A, Abraha A, Lagalwar S, Guillozet AL et al.
 Caspase cleavage of tau: linking amyloid and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100(17):10032-10037.

28; Ma QL, Yang F, Rosario ER, Ubeda OJ, Beech W, Gant DJ et al.
 Beta-amyloid oligomers induce phosphorylation of tau and inactivation of insulin receptor substrate via c-Jun N-terminal kinase signaling: suppression by omega-3 fatty acids and curcumin.
J Neurosci. 2009;29(28):9078-9089.

29; Gregori L, Fuchs C, Figueiredo-Pereira ME, Van Nostrand WE, Goldgaber D.
 Amyloid beta-protein inhibits ubiquitin-dependent protein degradation in vitro.
J Biol Chem. 1995;270(34):19702-19708.

30; Almeida CG, Takahashi RH, Gouras GK.
 Beta-amyloid accumulation impairs multivesicular body sorting by inhibiting the

ubiquitin-proteasome system.

J Neurosci. 2006;26(16):4277-4288.

31; Bolmont T, Clavaguera F, Meyer-Luehmann M, Herzig MC et al.

Induction of tau pathology by intracerebral infusion of amyloid-beta -containing brain extract and by amyloid-beta deposition in APP x Tau transgenic mice.

Am J Pathol. 2007;171(6):2012-2020.

32; Leschik J, Welzel A, Weissmann C, Eckert A, Brandt R.

Inverse and distinct modulation of tau-dependent neurodegeneration by presenilin 1 and amyloid-beta in cultured cortical neurons: evidence that tau phosphorylation is the limiting factor in amyloid-beta-induced cell death.

J Neurochem. 2007;101(5):1303-1315.

33; Ballatore C, Lee VM, Trojanowski JQ.

Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders.

Nat Rev Neurosci. 2007;8(9):663-672.

34; Selkoe DJ.

Cell biology of protein misfolding: the examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases.

Nat Cell Biol 2004;6:1054-61.

35; Iqbal K, Alonso Adel C, Chen S, Chohan MO, El-Akkad E, Gong CX et al.

Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies.

Biochim Biophys Acta 2005, 1739: 198-210.

36; Blalock EM, Geddes JW, Chen KC, Porter NM, Markesbery WR, Landfield PW.

Incipient Alzheimer's disease: microarray correlation analyses reveal major transcriptional and tumor suppressor responses.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(7):2173-2178.

37; Hata R, Masumura M, Akatsu H, Li F, Fujita H, Nagai Y et al.

Up-regulation of calcineurin Abeta mRNA in the Alzheimer's disease brain: assessment by cDNA microarray.

Biochem Biophys Res Commun 2001;284:310-16.

38; Colangelo V, Schurr J, Ball MJ, Pelaez RP, Bazan NG, Lukiw WJ.

Gene expression profiling of 12633 genes in Alzheimer hippocampal CA1: transcription and neurotrophic factor down-regulation and up-regulation of apoptotic and pro-inflammatory signaling.

J Neurosci Res 2002;70:462-73.

39; Cao W, Epstein C, Liu H, DeLoughery C, Ge N, Lin J et al.

Comparing gene discovery from Affymetrix GeneChip microarrays and Clontech PCR-select cDNA subtraction: a case study.

BMC Genomics 2004;5:26.

40; Heese K, Nagai Y, Sawada T.

Identification of a new synaptic vesicle protein 2B mRNA transcript which is up-regulated in neurons by amyloid beta peptide fragment (1–42).

Biochem Biophys Res Commun 2001;289:924–8.

41; Shi J, Cai W, Chen X, Ying K, Zhang K, Xie Y.

Identification of dopamine responsive mRNAs in glial cells by suppression subtractive hybridization.

Brain Res 2001;910:29–37.

42; Kakinuma Y, Saito F, Osawa S, Miura M.

A mechanism of impaired mobility of oligodendrocyte progenitor cells by tenascin C through modification of wnt signaling.

FEBS Lett 2004;568:60–4.

43; Mirra SS, Heyman A, McKeel D, Sumi SM, Crain BJ, Brownlee LM et al.

The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD), Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease.

Neurology 1991;41:479–86.

44; Akatsu H, Takahashi M, Matsukawa N, Ishikawa Y, Kondo N, Sato T et al.

Subtype analysis of neuropathologically diagnosed patients in a Japanese geriatric hospital.

J Neurol Sci 2002;196:63–9.

45; Akatsu H, Yamagata H, Chen Y, Miki T, Kamino K, Takeda M et al.

TAFI polymorphisms at amino acids 147 and 325 are not risk factors for cerebral infarction.

Br J Haematol 2004;127:440–7.

46; Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B et al.

Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries.

Proc Natl Acad Sci USA 1996;93:6025–30.

47; Diatchenko L, Lukyanov S, Lau YF, Siebert PD.

Suppression subtractive hybridization: a versatile method for identifying differentially expressed genes.

Meth Enzymol 1999;303:349–80.

48; Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T.

Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells.

Nature 2001;411:494–8.

49; Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R.

A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells.

Science 2002;296:550–3.

50; Heese K, Yamada T, Nagai Y, Sawada T.

CGI-94 controls neuronal survival.

Brain Aging 2002;2:44–8.

51; Lee NS, Dohjima T, Bauer G, Li H, Li MJ, Ehsani A et al.

Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells.

Nat Biotechnol 2002;20:500–5.

52; Maxwell MM, Pasinelli P, Kazantsev AG, Brown RH Jr.

RNA interference-mediated silencing of mutant superoxide dismutase rescues cyclosporin A-induced death in cultured neuroblastoma cells.

Proc Natl Acad Sci USA 2004;101:3178–83.

53; Heese K, Fujita M, Akatsu H, Yamamoto T, Kosaka K, Nagai Y et al.

The splicing regulatory protein p18SRP is down-regulated in Alzheimer's disease brain.

J Mol Neurosci 2004;24:269–76.

54; Encinas M, Iglesias M, Liu Y, Wang H, Muhaisen A, Cena V et al.

Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells.

J Neurochem 2000;75:991–1003.

55; Martínez-López MJ, Alcántara S, Mascaró C, Pérez-Brangulí F et al..

Mouse neuron navigator 1, a novel microtubule-associated protein involved in neuronal migration.

Mol Cell Neurosci. 2005 Apr;28(4):599-612.

56; Sato-Yoshitake R, Shiomura Y, Miyasaka H, Hirokawa N.

Microtubule-associated protein 1B: molecular structure, localization, and phosphorylation-dependent expression in developing neurons.

Neuron. 1989,3(2):229-38

57; Hasegawa M, Arai T, Ihara Y.

Immunochemical evidence that fragments of phosphorylated MAP5 (MAP1B) are

bound to neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Neuron*. 1990,4(6):909-18.

58; Kins S, Crameri A, Evans DR, Hemmings BA, Nitsch RM, Gotz J. Reduced protein phosphatase 2A activity induces hyperphosphorylation and altered compartmentalization of tau in transgenic mice. *J Biol Chem* 2001;276:38193–200.

59; Iqbal K, Grundke-Iqbal I. Discoveries of tau, abnormally hyperphosphorylated tau and others of neurofibrillary degeneration: a personal historical perspective. *J Alzheimers Dis*. 2006;9(3 Suppl):219-42. Review.

60; Goold RG, Gordon-Weeks PR. Microtubule-associated protein 1B phosphorylation by glycogen synthase kinase 3beta is induced during PC12 cell differentiation. *J Cell Sci* 2001;114:4273–84.

61; Gevorkian G, Gonzalez-Noriega A, Acero G, Ordoñez J, Michalak C, Munguia ME, Govezensky T, Cribbs DH, Manoutcharian K. Amyloid-beta peptide binds to microtubule-associated protein 1B (MAP1B). *Neurochem Int*. 2008 May;52(6):1030-6. Epub 2007 Nov 12.

62; Teng J, Takei Y, Harada A, Nakata T, Chen J, Hirokawa N. Synergistic effects of MAP2 and MAP1B knockout in neuronal migration, dendritic outgrowth, and microtubule organization. *J Cell Biol* 2001;155:65–76.

63; Takei Y, Teng J, Harada A, Hirokawa N. Defects in axonal elongation and neuronal migration in mice with disrupted tau and map1b genes. *J Cell Biol* 2000;150:989–1000.

64; Gonzalez-Billault C, Engelke M, Jimenez-Mateos EM, Wandosell F et al. Participation of structural microtubule-associated proteins (MAPs) in the development of neuronal polarity. *J Neurosci Res* 2002;67:713–19.

65; Mukaetova-Ladinska EB, Xuereb JH, Garcia-Sierra F, Hurt J, Gertz HJ et al. Lewy body variant of Alzheimer's disease: selective neocortical loss of t-SNARE proteins and loss of MAP2 and alpha-synuclein in medial temporal lobe. *ScientificWorldJournal*. 2009 Dec 16;9:1463-75.

66; Weyer SW, Klevanski M, Delekate A, Voikar V, Aydin D, Hick M et al. APP and APLP2 are essential at PNS and CNS synapses for transmission, spatial learning and LTP.

EMBO J. 2011 Jun 1;30(11):2266-80.

67;

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/tools/profileGraph.cgi?ID=GDS4134:1435604_at ,

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/tools/profileGraph.cgi?ID=GDS4134:1427476_a_at

68; Locke M, Tinsley CL, Benson MA, Blake DJ.

TRIM32 is an E3 ubiquitin ligase for dysbindin.

Hum Mol Genet. 2009 Jul 1;18(13):2344-58. Epub 2009 Apr 6.

69; Horn EJ, Albor A, Liu Y, El-Hizawi S, Vanderbeek GE, Babcock M et al.

RING protein Trim32 associated with skin carcinogenesis has anti-apoptotic and E3-ubiquitin ligase properties.

Carcinogenesis 2004;25:157-67.

70; Kallijarvi J, Lahtinen U, Hamalainen R, Lipsanen-Nyman M et al.

TRIM37 defective in mulibrey nanism is a novel RING finger ubiquitin E3 ligase.

Exp Cell Res 2005;308:146-55.

71; Gonzalez-Cano L, Hillje AL, Fuertes-Alvarez S, Marques MM, Blanch A et al.

Regulatory feedback loop between TP73 and TRIM32.

Cell Death Dis. 2013 Jul 4;4:e704.

72; Jiang YH, Beaudet AL.

Human disorders of ubiquitination and proteasomal degradation.

Curr Opin Pediatr. 2004 Aug;16(4):419-26.

73; Gorman AM.

Neuronal cell death in neurodegenerative diseases: recurring themes around protein handling.

J Cell Mol Med. 2008 Dec;12(6A):2263-80. Epub 2008 Jun 27.

74; Mishra M, Paunesku T, Woloschak GE, Siddique T, Zhu LJ, Lin S et al..

Gene expression analysis of frontotemporal lobar degeneration of the motor neuron disease type with ubiquitinated inclusions.

Acta Neuropathol. 2007 Jul;114(1):81-94. Epub 2007 Jun 14.

75; Song S, Jung YK.

Alzheimer's disease meets the ubiquitin-proteasome system.

Trends Mol Med 2004;10:565-70.

76; Yonashiro R, Kimijima Y, Shimura T, Kawaguchi K, Fukuda T et al.

Mitochondrial ubiquitin ligase MITOL blocks S-nitrosylated MAP1B-light chain 1-mediated mitochondrial dysfunction and neuronal cell death.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Feb 14;109(7):2382-7.

77; He W, Lu Y, Qahwash I, Hu XY, Chang A, Yan R.

Reticulon family members modulate BACE1 activity and amyloid-beta peptide generation.

Nat Med 2004;10:959–65.

78; Wildasin K.

Role of reticulon proteins in Alzheimer's disease.

Lancet Neurol 2004;3:576.

79; Yan R, Shi Q, Hu X, Zhou X.

Reticulon proteins: emerging players in neurodegenerative diseases.

Cell Mol Life Sci 2006;63:877–89.

80; Dalpé G, Leclerc N, Vallée A, Messer A, Mathieu M et al.

Dystonin is essential for maintaining neuronal cytoskeleton organization.

Mol Cell Neurosci. 1998;10(5-6):243-257.

81; Pielage J, Cheng L, Fetter RD, Carlton PM, Sedat JW, Davis GW.

A presynaptic giant ankyrin stabilizes the NMJ through regulation of presynaptic microtubules and transsynaptic cell adhesion.

Neuron. 2008;58(2):195-209.

82; Dou F, Netzer WJ, Tanemura K, Li F, Hartl FU, Takashima A et al.

Chaperones increase association of tau protein with microtubules.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100(2):721-6. Epub 2003 Jan 9.

83; Shimura H, Schwartz D, Gygi SP, Kosik KS.

CHIP-Hsc70 complex ubiquitinates phosphorylated tau and enhances cell survival.

J Biol Chem 2004;279:4869–76.

84; Sahara N, Murayama M, Mizoroki T, Urushitani M, Imai Y et al.

In vivo evidence of CHIP up-regulation attenuating tau aggregation.

J Neurochem. 2005;94(5):1254-63.

85; van Leeuwen FW, de Kleijn DP, van den Hurk HH, Neubauer A et al.

Frameshift mutants of beta amyloid precursor protein and ubiquitin-B in Alzheimer's and Down patients.

Science. 1998;279(5348):242-247.

86; 永井康雄, 小笠原愛智, Klaus Heese.

Aβ1-40 および Aβ1-42 による細胞死とその抑制遺伝子・タンパク

日薬理誌 (Folia Pharmacol. Jpn.) 2004;124:135-143.

87; Maes T, Barceló A, Buesa C.

Neuron navigator: a human gene family with homology to unc-53, a cell guidance gene from *Caenorhabditis elegans*.

Genomics. 2002 Jul;80(1):21-30.

- 88; Martínez-López MJ, Alcántara S, Mascaró C, Pérez-Brangulí F et al. Mouse neuron navigator 1, a novel microtubule-associated protein involved in neuronal migration. *Mol Cell Neurosci.* 2005 Apr;28(4):599-612.
- 89; Oláh J, Vincze O, Virók D, Simon D, Bozsó Z, Tökési N, Horváth I et al. Interactions of pathological hallmark proteins: tubulin polymerization promoting protein/p25, beta-amyloid, and alpha-synuclein. *J Biol Chem.* 2011 Sep 30;286(39):34088-100.
- 90; Shimizu K, Sawasaki T. Nek5, a novel substrate for caspase-3, promotes skeletal muscle differentiation by up-regulating caspase activity. *FEBS Lett.* 2013 Jul 11;587(14):2219-25.
- 91; Kleene R, Mzoughi M, Joshi G, Kalus I, Bormann U, Schulze C et al. NCAM-induced neurite outgrowth depends on binding of calmodulin to NCAM and on nuclear import of NCAM and fak fragments. *J Neurosci.* 2010 Aug 11;30(32):10784-98.
- 92; Klementiev B, Novikova T, Novitskaya V, Walmod PS, Dmytriyeva O et al. A neural cell adhesion molecule-derived peptide reduces neuropathological signs and cognitive impairment induced by Abeta25-35. *Neuroscience.* 2007 Mar 2;145(1):209-24. Epub 2007 Jan 16.
- 93; Gong CX, Wegiel J, Lidsky T, Zuck L, Avila J, Wisniewski HM et al. Regulation of phosphorylation of neuronal microtubule-associated proteins MAP1b and MAP2 by protein phosphatase-2A and -2B in rat brain. *Brain Res.* 2000 Jan 24;853(2):299-309.
- 94; FIFRE Alexandre, SPONNE Isabelle, KOZIEL Violette et al. *J Biol Chem.* 2006 Jan 6;281(1):229-240.
- 95; Hashimoto Y, Niikura T, Tajima H, Yasukawa T, et al. A rescue factor abolishing neuronal cell death by a wide spectrum of familial Alzheimer's disease genes and Abeta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 May 22;98(11):6336-41.
- 96; Hashimoto Y, Ito Y, Niikura T, Shao Z, Hata M, Oyama F, Nishimoto I. Mechanisms of neuroprotection by a novel rescue factor humanin from Swedish mutant amyloid precursor protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 May 4;283(2):460-8.
- 97; Zapala MA1, Hovatta I, Ellison JA, Wodicka L, Del Rio JA, et al. Adult mouse brain gene expression patterns bear an embryologic imprint.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Jul 19;102(29):10357-62.

98;

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/tools/profileGraph.cgi?ID=GDS4135:226084_at

99; 藤俊琳

神経細胞形態形成における微小管関連蛋白2と1B(MAP2・MAP1B)の分子遺伝学的研究
東京大学学位論文要旨, 2002, 117268号

(<http://gazo.dl.itc.u-tokyo.ac.jp/gakui/cgi-bin/gazo.cgi?no=117268>)

100; Niikura T1, Hashimoto Y, Tajima H, Ishizaka M, Yamagishi Y, et al.

A tripartite motif protein TRIM11 binds and destabilizes Humanin, a neuroprotective peptide against Alzheimer's disease-relevant insults.

Eur J Neurosci. 2003 Mar;17(6):1150-8.

101; Manavalan A1, Mishra M, Feng L, Sze SK, Akatsu H, Heese K.

Brain site-specific proteome changes in aging-related dementia.

Exp Mol Med. 2013 Sep 6;45:e39.

102; Ray M, Zhang W.

Analysis of Alzheimer's disease severity across brain regions by topological analysis of gene co-expression networks.

BMC Syst Biol. 2010 Oct 6;4:136.

103; Takei H1, Buckleair LW, Rivera A, Powell SZ.

Brain tissue microarrays in neurodegenerative diseases: validation of methodology and immunohistochemical study of growth-associated protein-43 and calretinin.

Pathol Int. 2007 Dec;57(12):775-83.

謝辞

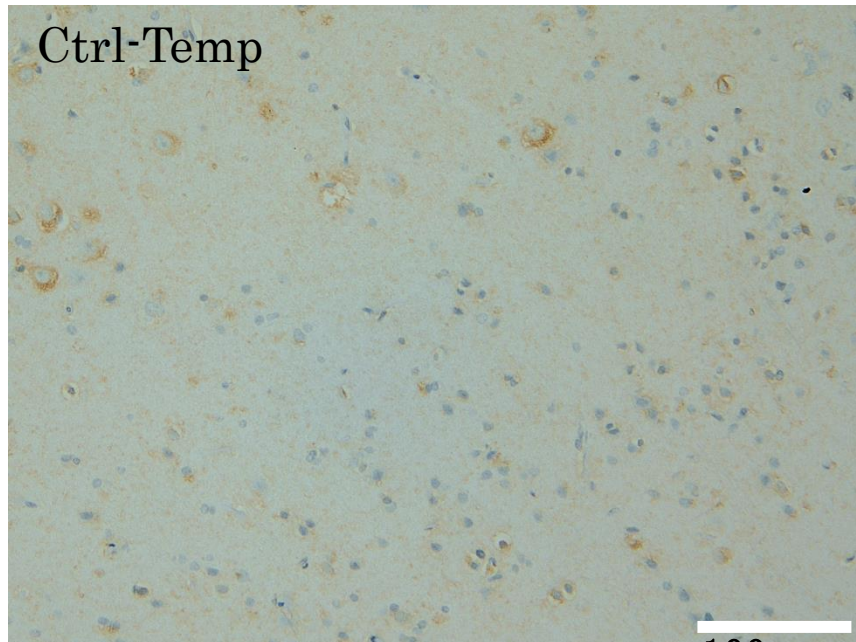
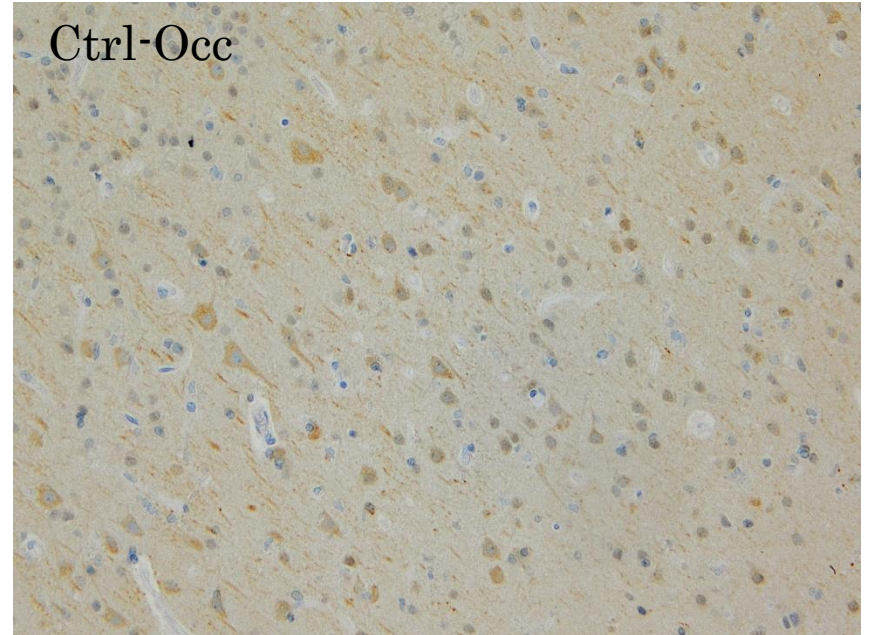
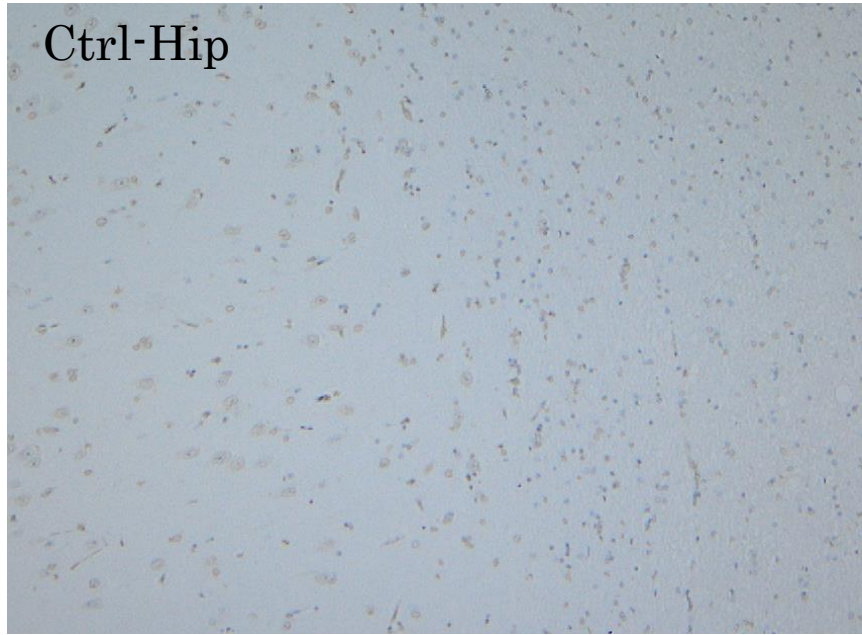
本研究の御指導・御鞭撻を賜りました、筑波大学疾患制御医学専攻 朝田隆教授、宮内卓教授に深甚なる感謝の意を申し上げます。本研究の御指導を頂きました長浜バイオ大学 三輪正直学長、筑波大学 フロンティア医科学専攻長 岡村直道教授及び筑波大学疾患制御医学 下條信威講師に深く感謝申し上げます。

また、本研究を御指導・御協力頂きました、前ビーエフ研究所 Dr.Klaus Heese、永井康雄博士、小笠原愛智博士に深謝申し上げます。

さらに、本研究の検体及び病理学的解析に御指導を賜りました福祉村病院長寿医学研究所 赤津裕康副所長に厚く御礼を申し上げます。

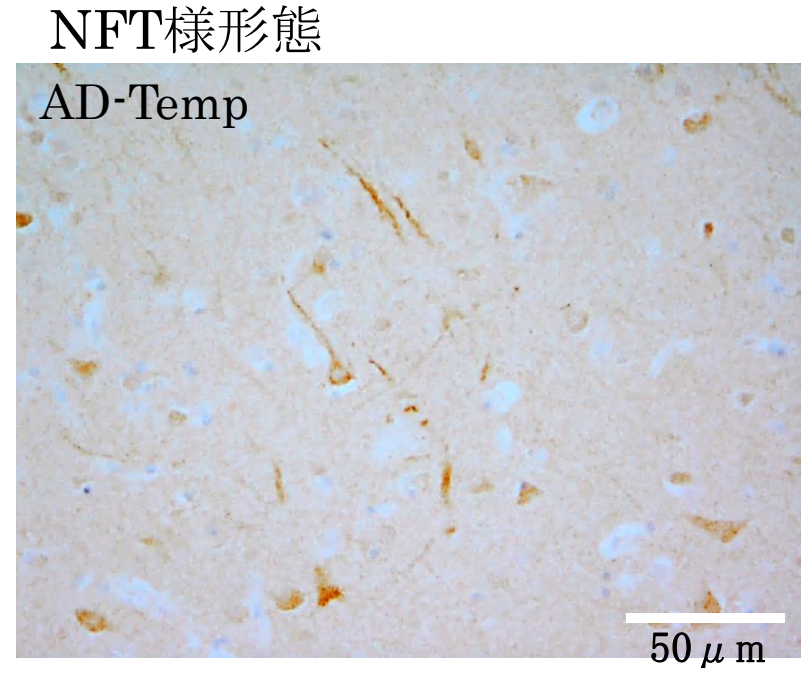
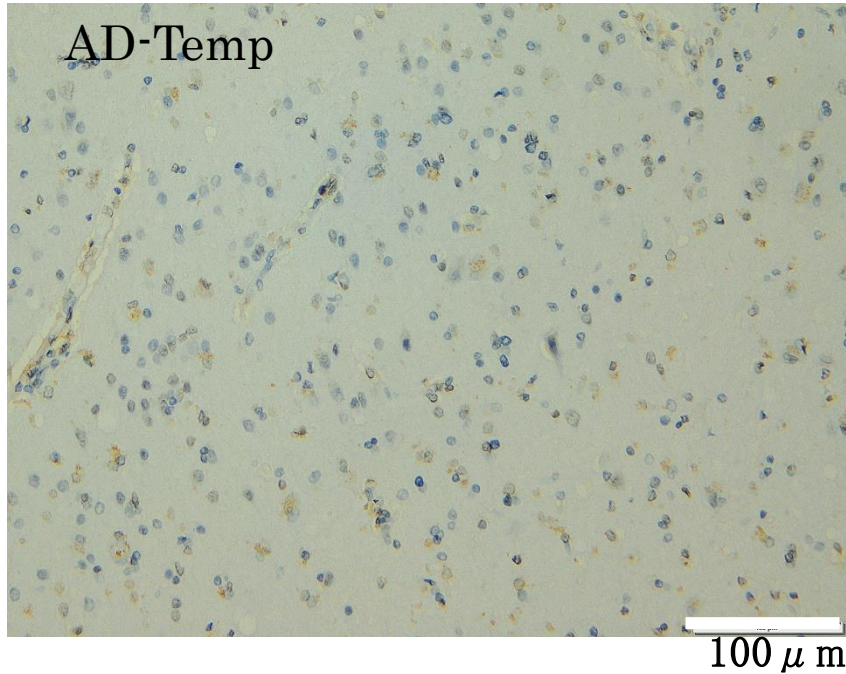
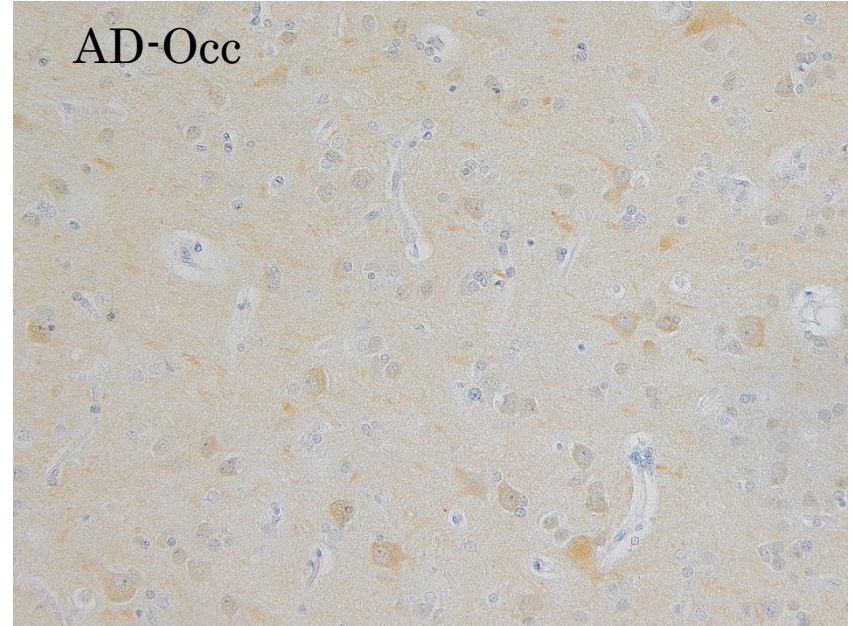
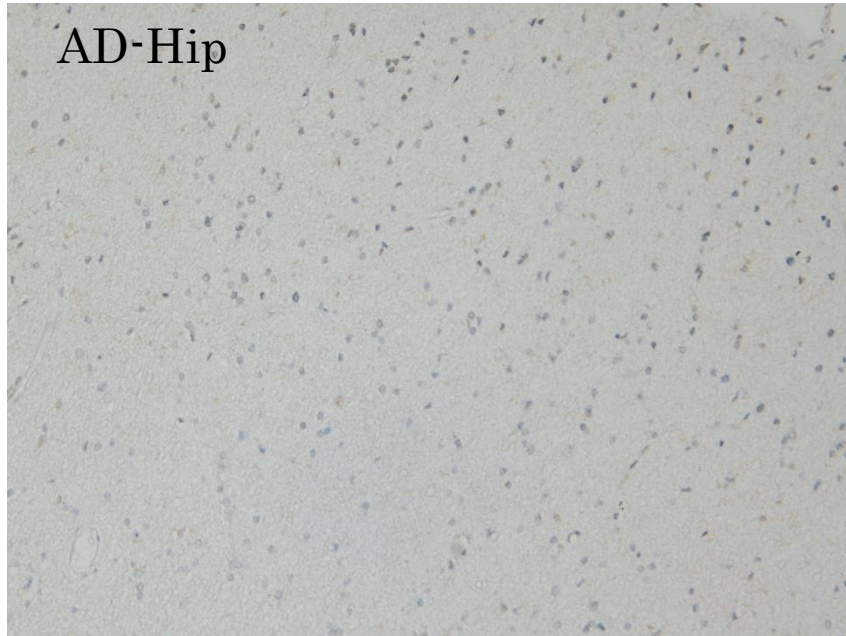
そして、本研究を遂行するにあたり御協力を頂きました前ビーエフ研究所 渡邊健一氏に深く感謝申し上げます。

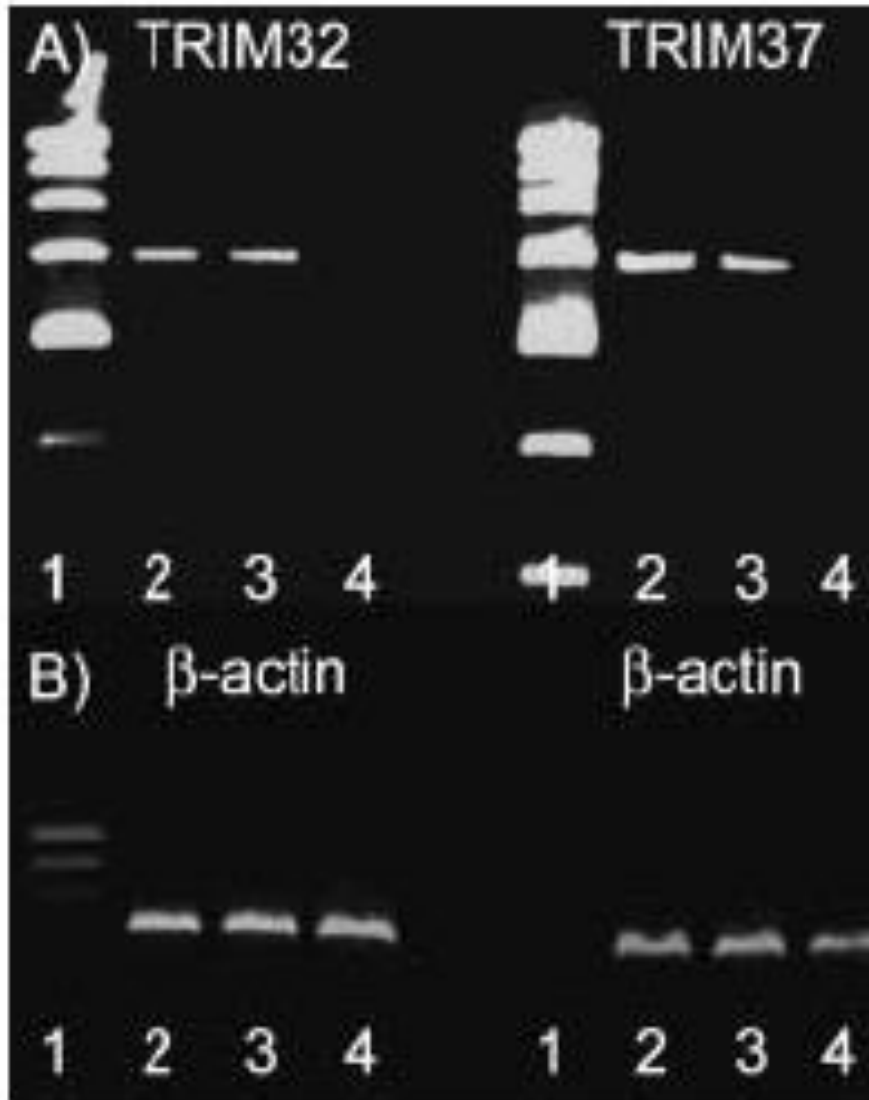
【図1】 免疫組織化学によるMAP1Bタンパク質の発現解析 — Control



100 μ m

【図2】 免疫組織化学によるMAP1Bタンパク質の発現解析 - AD





【図3】

TRIM32/37特異的siRNAをトランスフェクトしたSHSY5Y神経芽腫細胞における逆転写ポリメラーゼ反応(RT-PCR)によるmRNA発現解析

上段左;TRIM32のmRNA発現、上段右TRIM37のmRNA発現
下段左及び右; β -actinのmRNA発現

レーン1;DNA分子量マーカー、

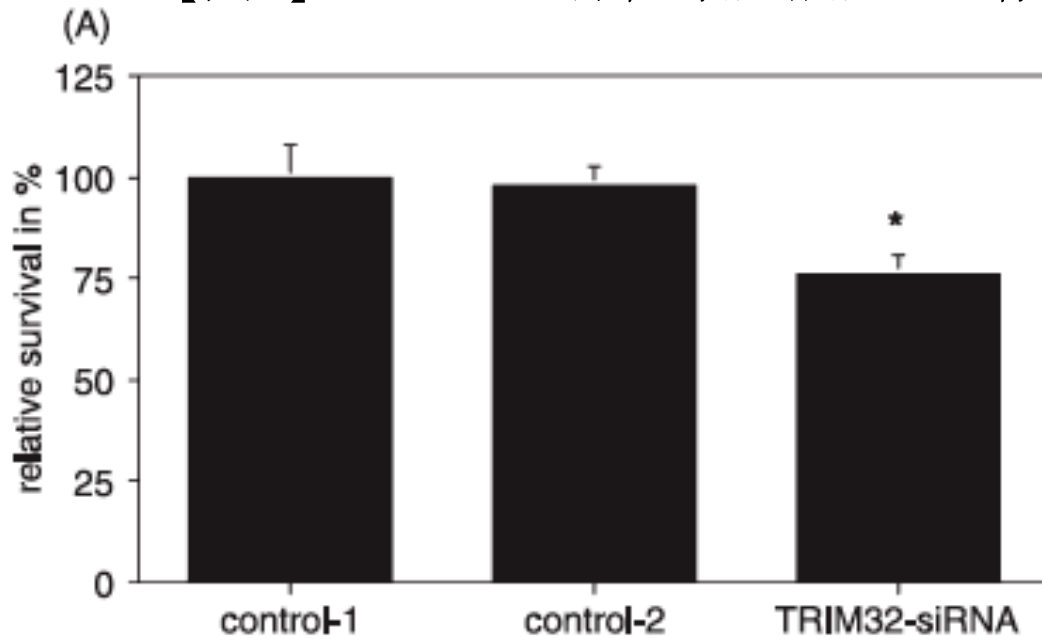
レーン2;コントロール-1細胞(1本鎖siRNAをトランスフェクトした)

レーン3;コントロール-2細胞

(TRIM32/37の逆配列の2本鎖siRNAをトランスフェクトした)

レーン4;TRIM32/37特異的2本鎖siRNAをトランスフェクトした細胞

【図4】 SHSY5Y神経芽腫細胞の生存におけるTRIM32/37発現の影響



ELISA Cell Titer 96 Aqueous assay (Promega)により生存細胞を測定した。
(*P<0.05)

上段、左から、

コントロール-1細胞;

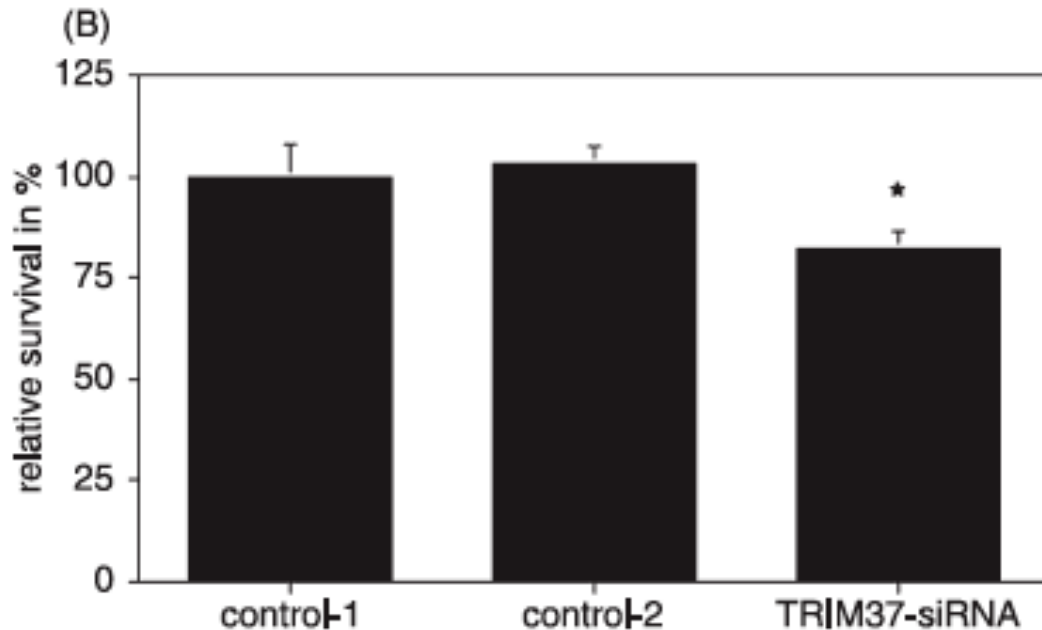
1本鎖siRNAをトランスフェクトした細胞

コントロール-2細胞;

TRIM32/37の逆配列の2本鎖siRNAを

トランスフェクトした細胞

TRIM32特異的2本鎖siRNAをトランスフェクトした細胞



下段、左から、

コントロール-1細胞;

1本鎖siRNAをトランスフェクトした細胞

コントロール-2細胞;

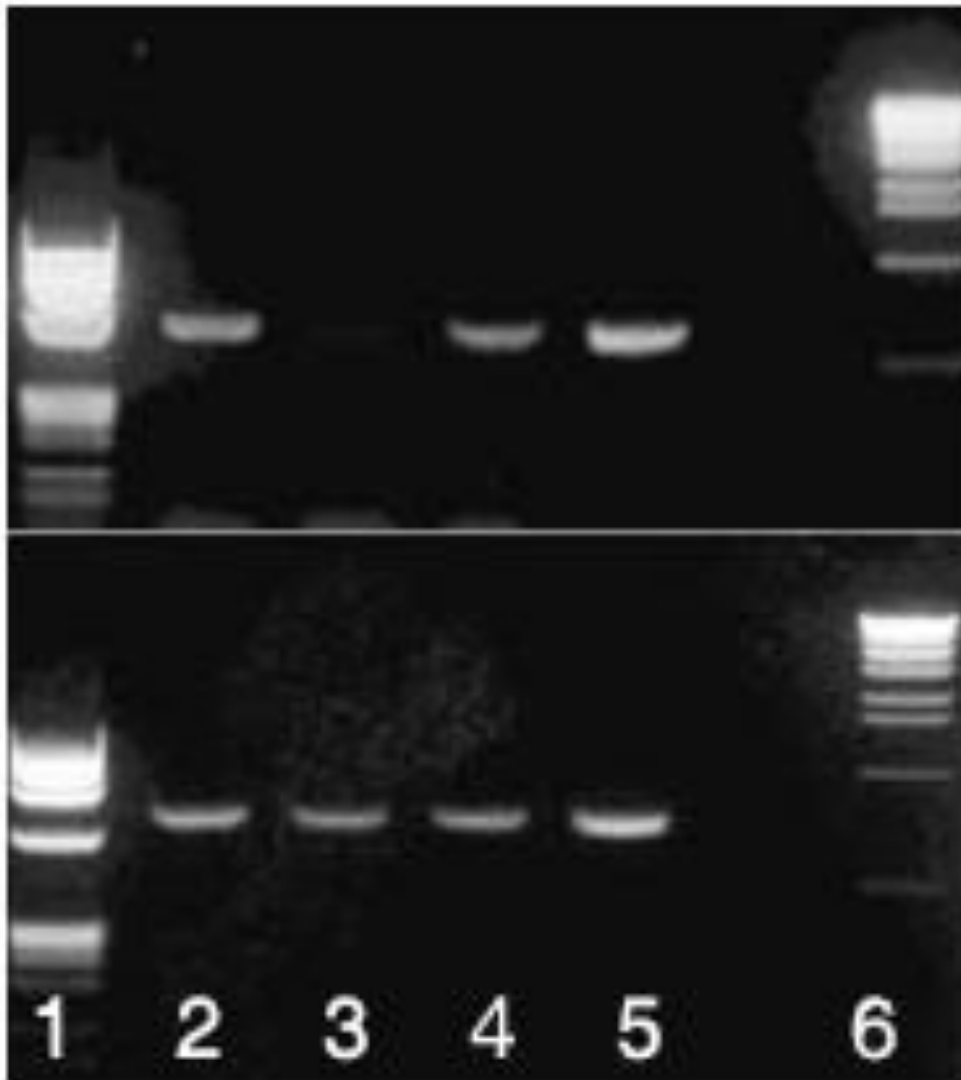
TRIM32/37の逆配列の2本鎖siRNAを

トランスフェクトした細胞

TRIM37特異的2本鎖siRNAをトランスフェクトした細胞

【図5】

MAP1B特異的siRNAをトランスフェクトしたSHSY5Y神経芽腫細胞における逆転写ポリメラーゼ反応(RT-PCR)によるmRNA発現解析



上段; MAP1BのmRNA発現
下段; β -actinのmRNA発現

レーン1; Φ X/HaeIIIマーカ

レーン2; scrambled siRNAをトランスフェクトした
コントロール細胞

レーン3; MAP1B特異的siRNAをトランスフェクトした細胞

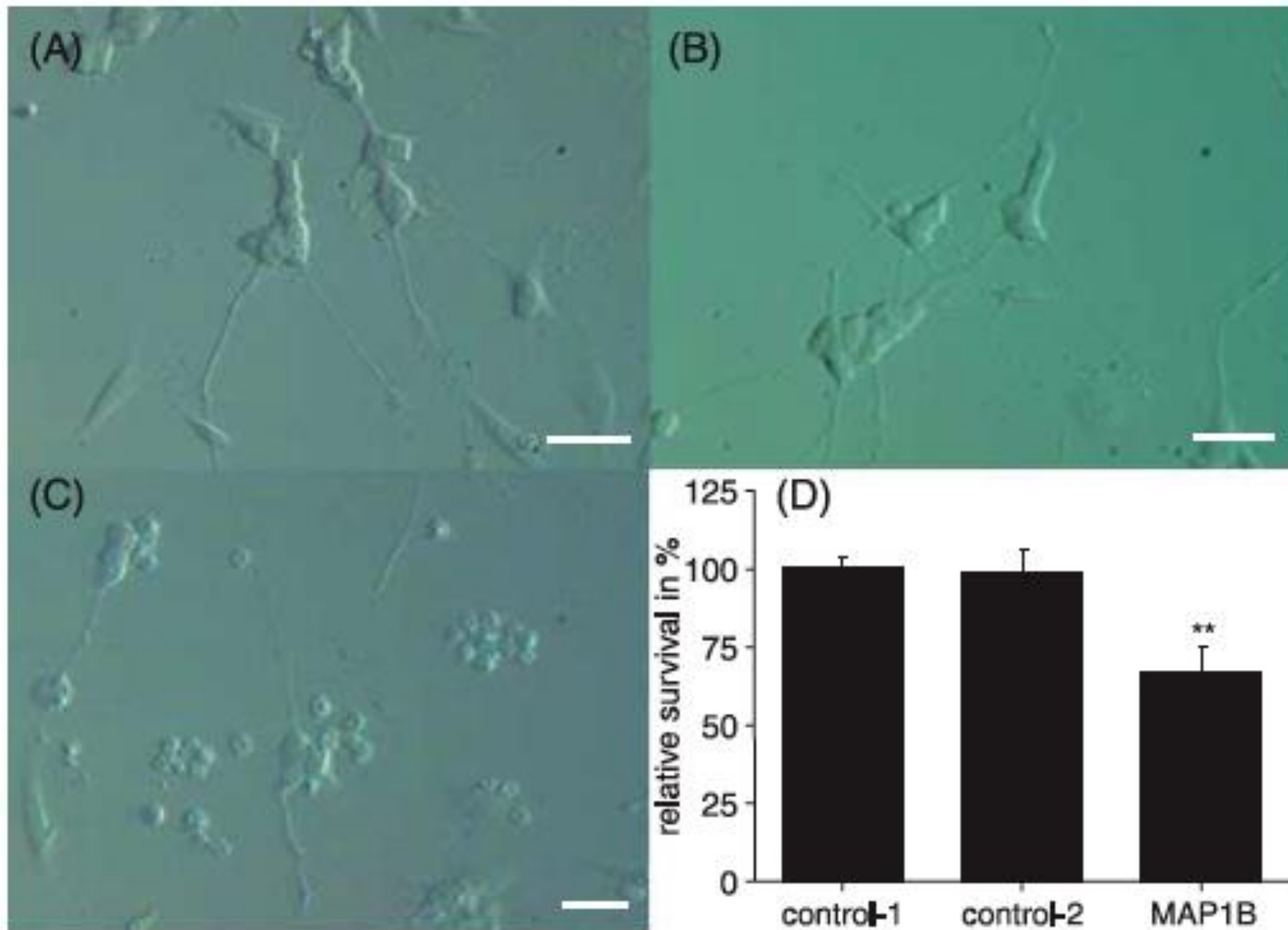
レーン4; GFP特異的siRNAをトランスフェクトした細胞

レーン5; 無処理の細胞

レーン6; λ /StyIマーカ

【図6】

MAP1B特異的siRNAをトランスフェクトしたSHSY5Y神経芽腫細胞における分化誘導と生存細胞数に対する影響





siRNAトランスフェクション後、安定化細胞株を得て、RA/BDNFにより7日間処理して分化誘導した。

A; GFP特異的siRNAをトランスフェクトした細胞
B; scrambled siRNAをトランスフェクトしたコントロール細胞
C; MAP1B特異的siRNAをトランスフェクトした細胞
(Scale bare = 50 μ m.)

D; MAP1B発現抑制によるSHSY5Y神経芽腫細胞の生存率への影響
(ELISA Cell Titer 96 Aqueous assay (Promega)による生存細胞数の測定、*P<0.05)
左から、
コントロール-1細胞; GFP特異的siRNAをトランスフェクトした細胞
コントロール-2細胞; scrambled siRNAをトランスフェクトした細胞
MAP1B特異的siRNAをトランスフェクトした細胞

【図7】サブトラクション反応により得られた新規クローンの塩基配列

TeOcR03B03 (DDBJ Accession number : AB116553) 1199 bp

```
1  cccaaccctt tggaggagcc tgaaaaaat ctgggcagaa tgtaggactt ctttattttg
61  tttaaagggg taacacagag tgcccttatg aaggagttgg agatcctgca aggaagagaa
121 ggagtgaagg agagatcaag agagagaaac aatgaggaac atttcatttg acccaacatc
181 ctttaggagc ataaatgttg aactaagtt atcccttttg tgctaaaatg gacagtattg
241 gcaaatgat accacaactt cttattctct ggcctatat tgctttggaa acacttaaac
301 atcaaatgga gttaaataca ttttgaaat ttaggtagg aatattggt gaggaggcct
361 caaaaagggg gaaacatctt ttgtctggga ggatatttc cattttgtgg atttcctga
421 tcttttcta ccacctgag ggggtggggg aattatcatt ttgctacatt ttagaggtca
481 tccaggattt ttgaaacttt acattcttta cggttaagca agatgtacag ctcagtcaaa
541 gacactaaat tcttctaga aaaatagtgc taaggagtat agcagatgac ctatatgtgt
601 gttggctggg agaatatcat cttaaagtga gagtgatggt gtggagacag ttgaaatgct
661 agtgctagag cctctgtggt gtgaatgggc acgtagggtt gttgcattag aaagtgactg
721 tttctgacag aaattttag ctttgtgcaa actcaccac catctacctc aataaaatat
781 agagaaaaga aaaatagagc ggtttgagtt ctatgaggta tgcaggccca gagagacata
841 agtatgttcc tttagtcttg cttctgtgt gccacactgc cctccaca ccatagctgg
901 gggcaattgt ttaaagtc atttgttccc actagctgcc ttgcacatta tttcatttt
961 cctggaattt gatacagaga gcaatttata gccaattgat agcttatgct gtttcaatgt
1021 aattctgtgg taaataactt aggaactgcc tcttctttt ctttgaaaac ctacttataa
1081 ctgttgctaa taagaatgtg tattgttcag gacaactgt cccatacag ttgggttgta
1141 accctcatgc ttggcccaa taaactctct acttatatca aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
```

hypothetical protein(195~494 translated)

MLTLYSYPFCAKMDSIGKMIPQLLILWLYIALETLKHQMELNLYLKFRLGNIGEEASKR
GKHLLSGRIFSILWISLIFFYHPEGWWELSFCYILEVIQDF

【図8】 サブトラクション反応により得られた新規クローンの塩基配列

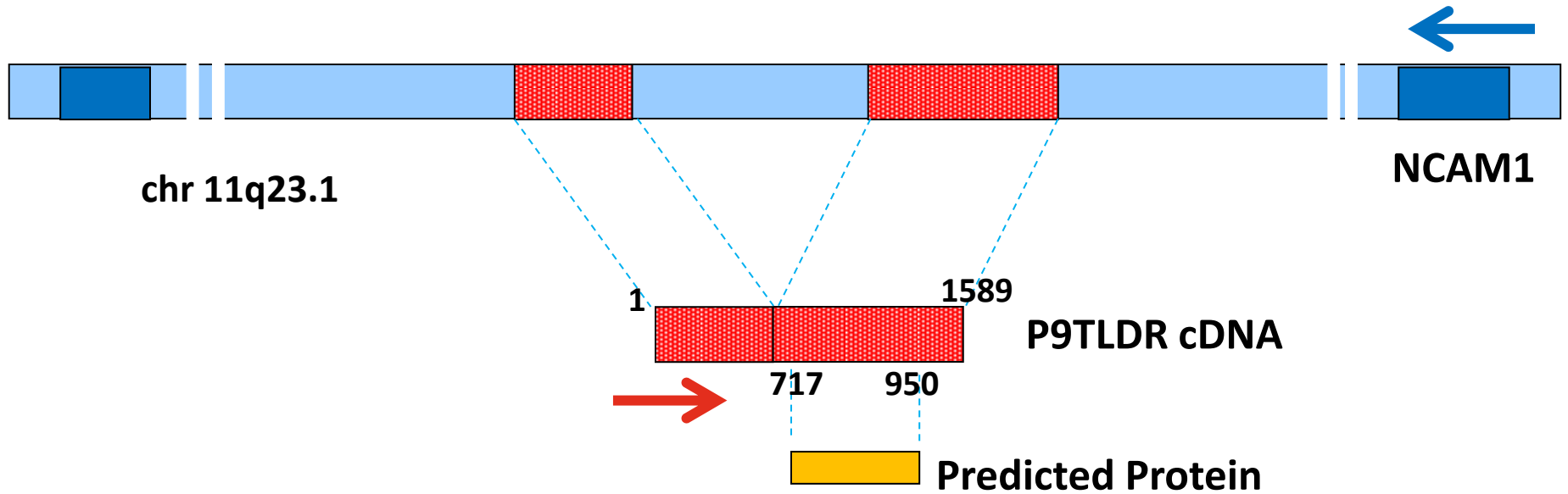
P9TLDR (DDBJ Accession number : AB128931) 1589 bp

```
1 ttccggccga ggtacacatg gagccataca tagagtcaca ttagtggtgg tttgttctcc
61 taggtgcttg aagggtcct gtagtccaag tcattgtata ttagttacc aaggtaaag
121 taagtaatta agggaacaga gtgcagtggc tccaactgtg ctatttctca ctttgtttg
181 catattgcta ggatccagag cgatatgatt ggcatttgag ggaagataag caccatactt
241 gtgttgctta ttttctttt aattaagttg cttctgaca atcatacttt ctgacattta
301 tttagccttt acattttata aatcacttcc acatatgctg tttcatttag ttctctcaac
361 atcagaaggt agtgtgattt ctcttcaga agctaagtgg agggagagat gattcctgat
421 aacattggg gatgcccgtg agaggggtgg ctggcacact gtttctcaact ggatgactgc
481 ctaccgctg cgcttacctt tgtgctacca gagcaggggg aaggagactt gcagcgagat
541 ggcaggacgg ggtcccgtga ggtaaaggag tctaagacag cttccatcc tccagttagc
601 cagatcccag tttccgagaa gtatggcgga cggttccccg gtgcttgccg gtcttgagg
661 tgggcatgaa caatagagga agtcaggaga cacagtcttg ctgaatctc tacaacatgc
721 tgggcagaaa ggcactgcc aaaggatget acgtacaagg ccacagacag tggctgcct
781 gcagatctgc ccatgccac aagcgaccaa atacttttta tctttcttt ttttctttt
841 tttgtttcg ctctgtcac ccaggctgga gtgcagtgag ccgatatcgc accacactgc
901 attcagcct gggggacaga ccaagactcc gtctcaaaaa aattaaataa aatgaagtct
961 gcatgagtcc aatagctac cgtgtttcat atctttctg tatctaaaat tgttatctc
1021 tgacctrhta gaaagggtct aaacctctgc tttcttttta gataaacca tagattattt
1081 tgggggggtg ttgtgaggtt ttttgcaaa ttagataatc agtaagtccc tagcgccata
1141 gactgggcca gatgcaactgg gcaatgtaa gaaataagca atgtcctgcc ctataggaac
1201 ttgccattgt tcaattgaat ttgttgactt tgtttctctc tggaattata tataatttcc
1261 tgtttgctat gatccttacc taaaataaaa cctgcagtat tatccattc actccttgga
1321 atgtttgat ttatgactat tcagcagttc tgcctcatca ataggctctc aggaatgtcc
1381 taaattggca atctgtggac tgggtgggtc catctagagc ctgatagggt ggaaccacta
1441 gacaaatgga gactgtcttt tgtgtcgtt gcttgtttca gcacccctgg aaggataatt
1501 tactttcaa agcttcatta gctaaatgaa actcaagtct tgcctcttta gttaagaca
1561 gtttctttta aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
```

hypothetical protein(717~950 translated)

MLGRKALAKGCYVQGHRQWSACRSAACHKRPNTFYLFFFSFFLF
RSCHPGWSAVSRYRTLHSSLGDRPRLRLKKIK

【☒9】 hypothetical protein P9TLDR



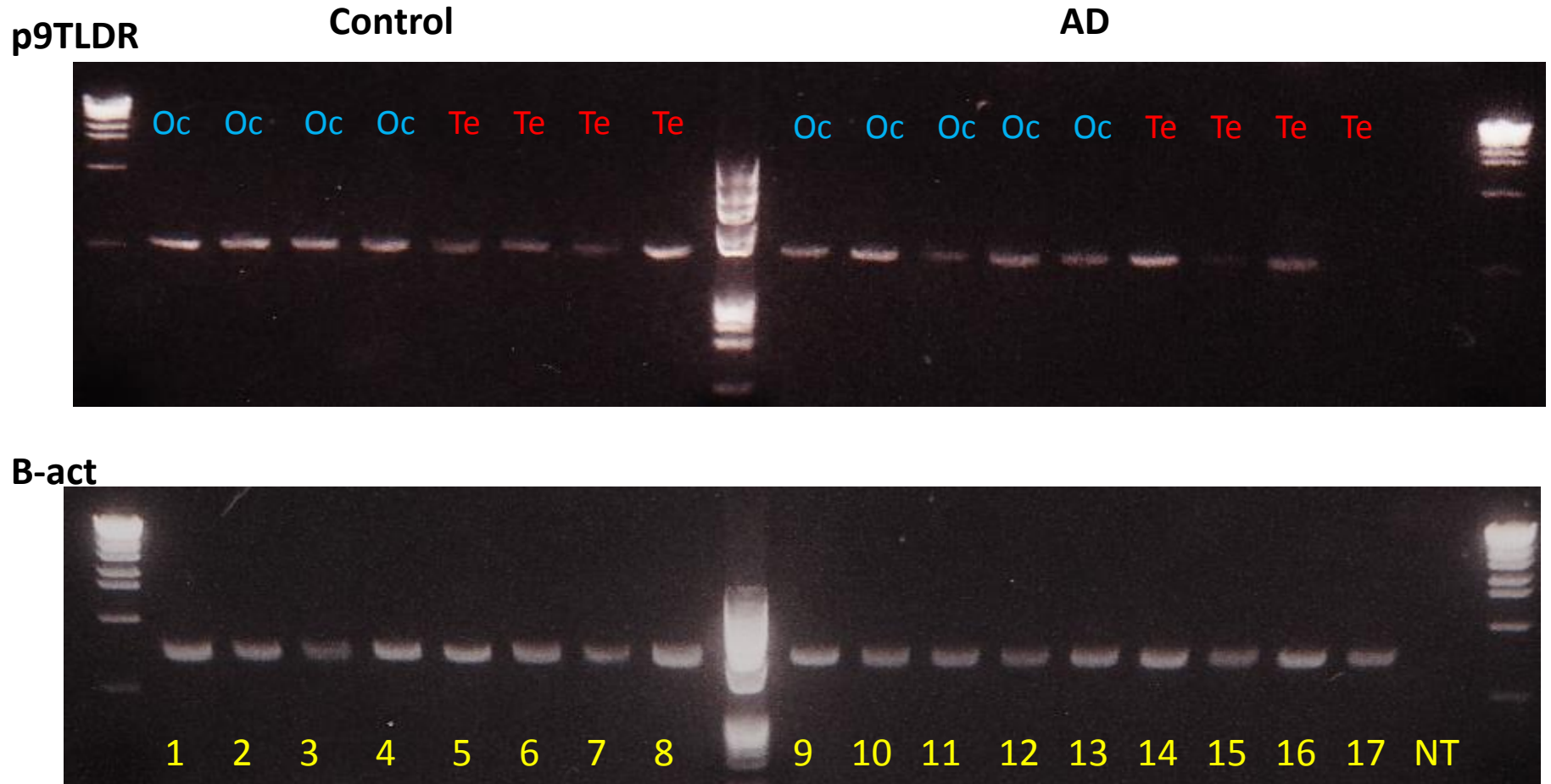
MLGRKALAKGCYVQGHRQWSACRSAACHKRPNTFYL
FFSFFLFRSCHPGWSAVSRYRTLHSSLGDRPRLRLKKIK

Length : 77 aa
MW : 9039 Da

44 – 75 aa :

High homology to NAV1 and NEK5

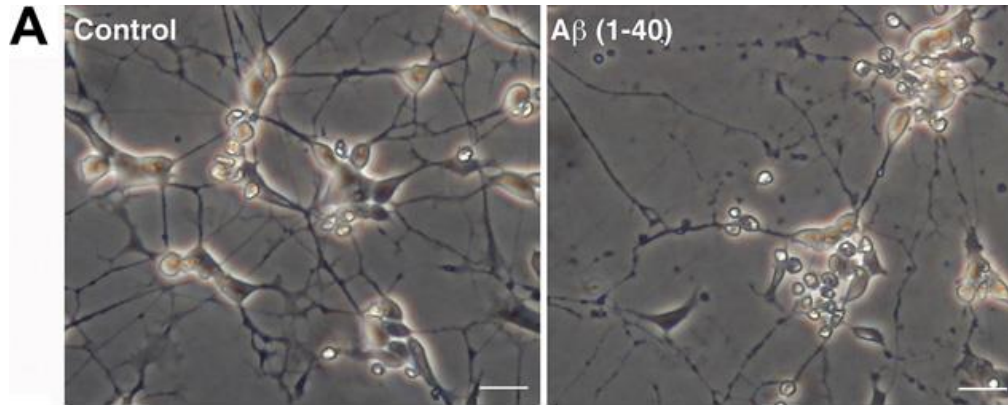
【図10】 患者脳組織におけるP9TLDRのmRNA発現解析



Lane1-4; Cont-Occi,
Lane5-8;Cont-Temp

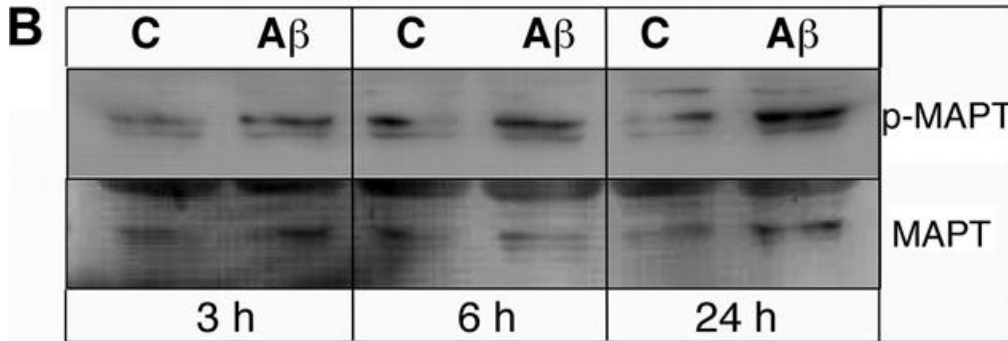
Lane9-13; AD-Occi,
Lane14-17;AD-Temp

【図11】 アミロイドβにより処理されたSHSY5Y神経芽腫細胞



A. 形態変化

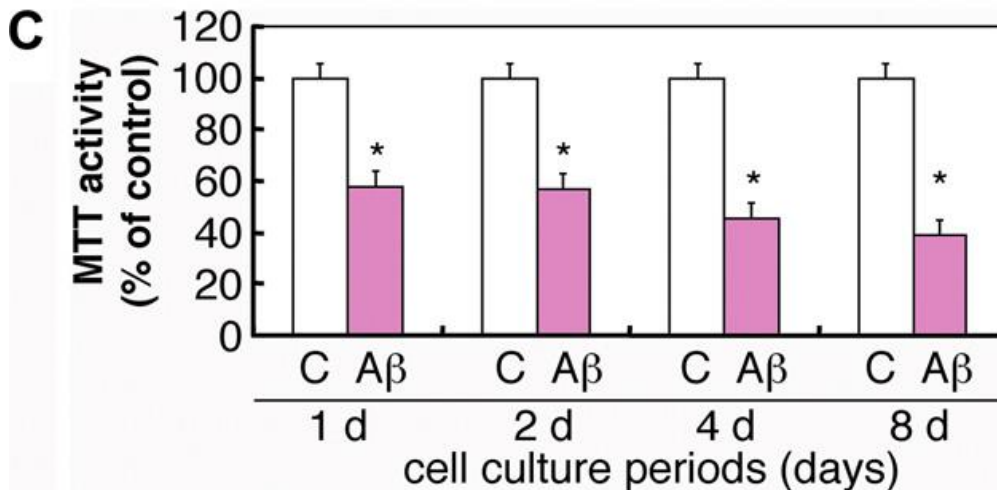
左; 無処理SHSY5Y細胞
右; Aβ処理4日のSHSY5Y細胞



B. タウのリン酸化のWestern blot

p-MAPT: 抗リン酸化タウ抗体
MAPT: 抗タウ抗体

左; Aβ処理3時間のSHSY5Y細胞
中; Aβ処理6時間のSHSY5Y細胞
右; Aβ処理24時間のSHSY5Y細胞

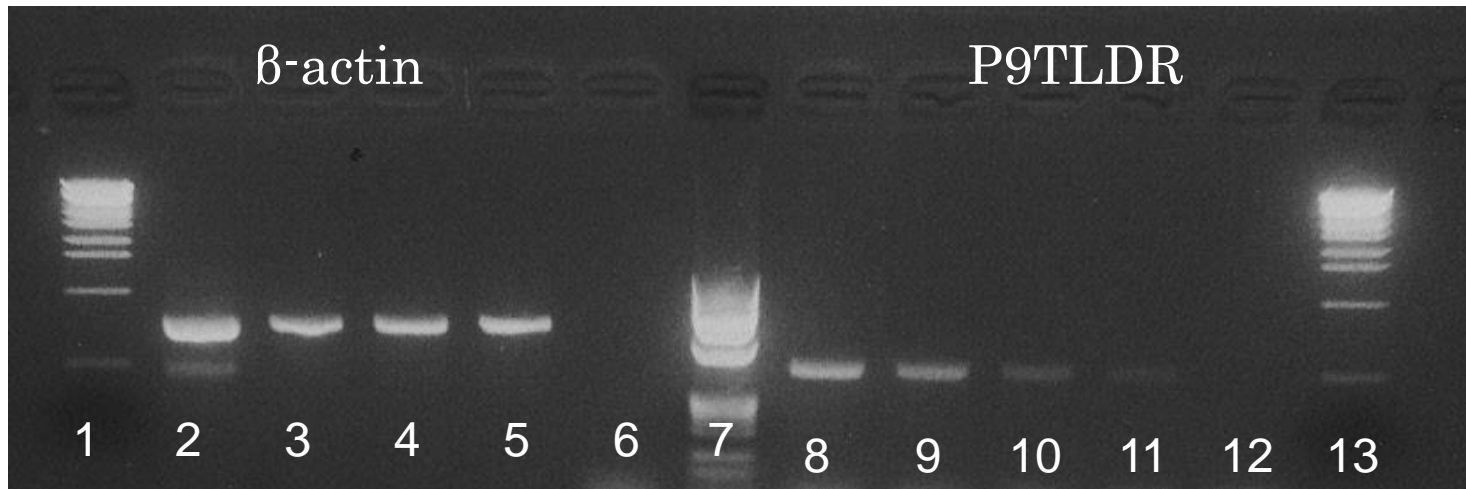


C. MTTアッセイ

1d; Aβ処理1日のSHSY5Y細胞
2d; Aβ処理2日のSHSY5Y細胞
4d; Aβ処理4日のSHSY5Y細胞
8d; Aβ処理8日のSHSY5Y細胞

【図12】

アミロイド β 処理されたSHSY5Y神経芽腫細胞における
逆転写ポリメラーゼ反応(RT-PCR)によるP9TLDRの発現解析



- レーン1、13 ; λ /Stylマーカー
- レーン2、8 ; 無処理SHSY5Y細胞
- レーン3、9 ; A β 処理3時間のSHSY5Y細胞
- レーン4、10 ; A β 処理6時間のSHSY5Y細胞
- レーン5、11 ; A β 処理24時間のSHSY5Y細胞
- レーン6、12 ; 鋳型なし
- レーン7 ; Φ X/HaeIIIマーカー

【表1】 サブトラクション反応組合せ

反応番号	患者番号	病理診断	性別	年齢	アミロイド斑 (- A,B,C)	NFTs ステージ (I-VI)	PMI (時間)	大脳皮質領域
1	I	生理的老化	男性	84	-	II	3	側頭葉皮質
	II	SDAT	男性	88	C	IV	4	側頭葉皮質
2	III	生理的老化	女性	88	-	I	3	後頭葉皮質
	IV	SDAT	女性	79	C	V	3	後頭葉皮質
3	V	SDAT	女性	75	C	III-IV	3	後頭葉皮質
	V	SDAT	女性	75	C	III-IV	3	側頭葉皮質

SDAT;アルツハイマー型老年性痴呆 (Senile dementia with Alzheimer's type)

NFTs; 神経原線維変化 (neurofibrillary tangles)

PMI; 死後経過時間 (post-mortem-interval in hours)

- = なし、A = 軽度、B = 中等度、C = 重度

側頭葉皮質; Brodman no. 21 ('T2' 領域)

後頭葉皮質; Brodman no. 19 (lateral occipital gyrus付近)

M = 男性、F = 女性

【表2】 脳部位特異的cDNAサブトラクション解析
AD患者側頭葉皮質 vs 生理的的老化側頭葉皮質

遺伝子名	GenBank登録番号	機能	RRSレベル
AD側頭葉皮質down-regulated			
neuronal ankyrin-2 (ANK2)	NM_020977	membrane-/actin- cytoskeleton-associated	2.4
dystonin-1eB	NM_020388	defects in this gene causes neurodegeneration by paired fast axonal transport	2.3
heat shock 90 kDa protein-1 (HSP90)	NM_005348	chaperone	2.0
neuronal reticulon-3 (RTN3)	NM_006054	binding partners of the β - site cleaving enzyme-1 (BACE1)	2.0
AD側頭葉皮質up-regulated			
L-arginine:glycine amidinotransferase	NM_001482	creatine biosynthesis	2.2
carbonic anhydrase X (CA10)	NM_020178	zinc-dependent carbonate dehydratase activity involved in brain development	1.9

【表3】 腦部位特異的cDNAサブトラクション解析
AD患者後頭葉皮質 vs 生理的的老化後頭葉皮質

AD後頭葉皮質down-regulated			
calpain 3 (CAPN3)	NM_173089/-90	calcium-dependent cysteine proteases	2.4
microtubule-associated protein 1B (MAP1B)	NM_005909	microtubule stabilization	2.2
spastic paraplegia 20, spartin (SPG20)	NM_015087	microtubule-interacting and endosomal trafficking leucule	2.1
P33MONOX	DQ073392	monooxygenase	2.1
CLIP-170-related protein (CLIPR-59)	NM_015526	modulator of microtubule dynamics	2.0
AD後頭葉皮質up-regulated			
tripartite motif-containing 37 (TRIM37)	NM_015294	ubiquitin-protein ligase activity	2.3
tripartite motif-containing 32 (TRIM32)	NM_012210	ubiquitin-protein ligase activity	2.3
F-box and leucine-rich repeat protein 3 A (FBXL3A)	NM_012158	ubiquitin-protein ligase activity	2.2
microtubule-associated protein 2 (MAP2)	NM_031846	microtubule stabilization	2.2

【表4】 脳部位特異的cDNAサブトラクション解析
AD患者側頭葉皮質 vs AD患者後頭葉皮質

遺伝子名	GenBank登録 番号	機能	RRSL レベル
AD側頭葉皮質down-regulated microtubule-associated protein 1B (MAP1B)	NM_032010	microtubule stabilization	2.4
neurocalcin delta (NCALD)	NM_032041	calcium sensor interacting with actin	2.3
AD側頭葉皮質up-regulated FK506 binding protein 14 (FKBP14)	NM_017946	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase regulating protein folding	2.4
Harp (harmonin-interacting ankyrin-repeat containing protein)	NM_145865	constitutes a scaffolding protein complex	2.0