

4002503

# アミロイド前駆体蛋白質高発現ニューロンの 作製とその変性過程の解析

(課題番号 : 09670099)

平成9年度～平成12年度 文部科学省科学研究費補助金  
基盤研究(C) 研究成果報告書

平成13年3月

研究代表者 林 要喜知

(旭川医科大学 医学部 教授)

## 目次

はしがき	2
研究組織および研究経費	3
研究発表	4
研究成果の概要	5
研究成果	7
1. アミロイド前駆体蛋白質 (APP) 遺伝子高発現ニューロンの細胞変性	7
2. Expression Pattern and Neurotrophic Role of the c-fms Proto-Oncogene M-CSF Receptor in Rodent Purkinje Cells	18
3. アミロイド前駆体蛋白質 (APP) による IL-8 生産誘導とニューロンの 細胞死	30
4. Arcadlin is a Neuronal Activity-regulated Cadherin Involved in Long Term Potentiation	41
5. アミロイド前駆体蛋白質 (APP) による細胞変性系を用いた抗痴呆 性植物資源の探索	48

## 【はしがき】

この研究報告書は、平成9年～12年度の4年間にわたる文部省科学研究補助金基盤研究(C)(2)「アミロイド前駆体蛋白質高発現ニューロンの作製とその変性過程の解析」(研究課題番号09670099)の成果をまとめたものである。

本研究は、アミロイド前駆体蛋白質(APP)の高発現細胞の変性過程の解析を通して孤発性アルツハイマー病(SAD)病態モデルとしての妥当性を検討し、また、その解析から得られた成果を同アルツハイマー病の予防や診断マーカー探索研究にどのようにフィードバックするかを念頭においてなされた。一般に、AD病態の分子機構を明らかにする研究は、この数年間アミロイド $\beta$ プロテイン( $A\beta$ )の生産増大に引き続いて、老人斑の形成、tau蛋白質のリン酸化異常による神経原線維変化の形成、さらには、神経細胞の変性死滅等が誘導されるカスケードを中心的にとらえた研究が多い。また、家族性アルツハイマー病(FAD)の原因遺伝子の研究からAPP、プレシナリンIやII、アポプロテインE4などの分子に変異が認められており、これらがFADにおける発症機序にかかわるだけでなく、SADの病態にも何らかの関わりがあると期待されていた。

しかしながら、私達は、これまでのSAD研究から、APPの発現上昇によるAPP代謝分子の細胞内蓄積がおこったり、あるいは、何らかの原因によるAPP代謝異常がおこることで細胞内ストレスを誘導され、それらが神経細胞の変性や死滅に繋がると予測していた。それゆえ、細胞外に放出される $A\beta$ や老人斑の形成、あるいは、細胞内ストレスによる神経原線維変化の形成などだけでは、必ずしもSADの分子機構を十分に説明できない可能性があると予想していた。筆者らは、本研究により、APP高発現による細胞変性がSADの新たな側面を反映している可能性を示した。同時に、APPによるケモカイン分子の誘導や、ニューロン・グリアの相互作用などなどを明らかにし、APPによる発現高進や代謝異常がおこり続ける脳内微少環境では、周囲の神経細胞の変性や細胞死誘導を広げる分子機構が存在することを明らかにした。また、本実験系を利用した機能性食品開発研究等による予防や変性阻止をするための研究は、現在のところは、その端をきったところであるが、予防や治療のための食物や治療薬のスクリーニング系としても有用であると考えられた。

本研究は決して十分な成果を上げたとは言えないが、SAD研究の一側面を明らかにした点において、さらには、裾野の広いSAD研究として発展するための可能性を示し得たことは望外の喜びであり、本研究による財政的な支援を頂いた文部省に心からお礼を申し上げる。

平成13年3月

研究代表者 旭川医科大学医学部生命科学  
林要喜知

文部科学省科学研究補助金 平成9年度～平成12年度

基盤研究(C)(2) アミロイド前駆体蛋白質高発現ニューロンの作製  
とその変性過程の解析

研究課題番号 09670099

**【研究組織】**

研究代表者：林要喜知 (旭川医科大学・生命科学・教授)

研究協力者：村瀬真一 (慶応大学・解剖学講座・助手)

研究協力者：山形要人 (東京都神経研究所・主任研究員)

**【研究経費】**

平成9年	1,400千円
平成10年	900千円
平成11年	900千円
平成12年	500千円
計	3,700千円

## 【研究発表】

### 学会誌等

1. Kobayashi, M., Tanaka, A., Hayashi, Y., and Shimamura, S. (1997)  
The CMV enhancer stimulates expression of foreign genes from the linked human EF-1a promoter. *Analytical Biochemistry*. 247, 179-181.
2. Yokoyama, Y., Ozawa, S., Seyama, Y., Namiki, H., Hayashi, Y., Kaji, K., Shirama, K., Shioda, M., and Kano, K. (1997) Enhancement of apoptosis in developing chicken neural retina cells by basic fibroblast growth factor. *J. Neurochemistry*. 68, 2212-2215.
3. Murase, S., and Hayashi, Y. (1998)  
Neuronal expression of integrin  $\alpha 1$  subunit in adult mouse brain. *J. Comparative Neurology*. 395, 166-176.
4. Murase, S., and Hayashi, Y. (1998)  
Concomitant expression of genes encoding integrin  $\alpha v \beta 5$  heterodimer and vitronectin in growing parallel fibre of postnatal rat cerebellum: A possible role as mediators of parallel fiber elongation. *J. Comparative Neurology*. 397, 199-212.
5. Murase, S., and Hayashi, Y. (1998)  
Expression of c-fms proto-oncogene M-CSF receptor in Purkinje cells during postnatal development. *J. Neuroscience*, 24, 10481-10492.
6. Murase, S., Motoyoshi, K. and Hayashi, Y. (1999)  
Expression of c-fms proto-oncogene/M-CSF receptor in postnatal Purkinje cells: possible function of M-CSF in the central nervous system. In: *Frontiers of Neural Development*, edited by Uemura K., Kawamura, K. and Yazaki, T, Springer-Verlag Tokyo, pp. 186-195.
7. Yamagata, K., Andreasson, K.I., Sugiura, H., Maru, S., Dominique, M., Irie, Y., Miki, N., Hayashi, Y., Yoshioka, M., Kaneko, K., Kato, H., Worley, P.F. (1999) Arcadlin is a neural activity-regulated cadherin involved in long term potentiation. *J. Biol. Chemistry*, 271, 19473-19479.

### 口頭発表

村瀬真一、林要喜知 (1999) 中枢神経系における接着分子の遺伝子発現  
第46回マトリクス研究会抄録集 46, pp16 (愛知県瀬戸市、6月8-9日)

## 【研究成果の概要】

### 1. アミロイド前駆体蛋白質 (APP) 遺伝子高発現ニューロンの細胞変性

#### : APP 誘導細胞死と A $\beta$ による細胞死の比較

孤発性アルツハイマー病 (SAD) の病態は、老人斑の主成分であるアミロイド A $\beta$ ペプチドの生産や細胞外蓄積、さらにはその細胞毒性と深く関わっていると考えられている。しかし、アミロイド A $\beta$ ペプチドをつくり出す APP 遺伝子発現上昇や代謝異常そのものがニューロンの変性、死滅を誘導することを、本研究で明らかにした。この発見は、SAD 病態の新たな側面を示しており、A $\beta$ の作用とともにアルツハイマー病の症候群としての多様な一面を反映していると考えられる。

### 2. Expression Pattern and Neurotrophic Role of the c-fms Proto-Oncogene M-CSF

#### Receptor in Rodent Purkinje Cells

SAD では、脳炎症状態がもたらされているとの考え方があり、また、老人斑の周囲にはミクログリアが多くの場合存在している。そこで、ミクログリアの増殖因子である M-CSF が脳で働く役割を明らかにするために、M-CSF が生産されないマウスの脳を解析したところ、小脳のプルキンエ細胞の数の減少が確認された。それゆえ、M-CSF はその他の神経細胞の生存に関わっており、SAD などの様々な脳の変性疾患にも重要な役割をになっていると考えられた。

### 3. アミロイド前駆体蛋白質 (APP) によるグリアにおける IL-8 生産誘導とニューロンの細胞死

アミロイド前駆体蛋白質 (APP) の遺伝子導入によりニューロンは変性、死滅するが、グリアは死滅しない。しかし、ある種のグリアは、ニューロンと同じように細胞変性過程を示した。この際、IL8 等の生産が増大することが観察された。また、ニューロンとグリア間に認められる相互作用がアルツハイマー病の病態においても深く関わっていると考えられ、SAD の脳の微小環境における病態変化 (例えば、脳の炎症性変化) を解析することが大切であると考えられた。

### 4. Arcadlin is a Neuronal Activity-regulated Cadherin Involved in Long Term Potentiation

SAD でニューロンの変性や死滅が著しい海馬では、長期増強効果を持つことが知られており、その反応に関わる遺伝子群を探索したところ、新たな遺伝子 Arcadlin を見い出すことができた。この遺伝子産物はカドヘリンファミ

リーメンバーの一つである細胞接着分子であった。ここではこの遺伝子の構造や諸性質をしらべて報告したが、残念ながら、本研究の SAD 病態モデル細胞の変性時における発現上昇や低下を検出することができなかった。

#### 5. アミロイド前駆体蛋白質 (APP) による細胞変性系を用いた抗痴呆性植物資源の探索

バラ科植物果実であるシュバイカには、抗酸化作用を有するビタミン類と同様に、培養神経細胞に対する保護作用を認めるのみならず、アルツハイマー病病態モデル細胞の細胞障害を軽減する作用が認められた。また、老齡チャイニーズハムスターの生存日数を延長する作用が確認されたことから、中枢神経系細胞の保護や機能維持に関わる何らかの生理活性物質が含まれると考えられた。シュバイカに含まれる抗痴呆性有効成分の同定や SAD 予防のための方策は、21 世紀の超高齢社会に求められる研究と期待される。

## 【研究成果】

アミロイド前駆体蛋白質（APP）遺伝子高発現ニューロンの細胞変性  
：APP 誘導細胞死と A $\beta$ による細胞死の比較

### 研究要旨

アミロイド前駆体蛋白質（APP）から生産されるアミロイド A $\beta$ ペプチドは、老人斑の主成分であり、アルツハイマー病の病因に関わる重要な分子である。本研究では、APP 遺伝子発現アデノウイルスベクターを用いて、初代培養ラット海馬ニューロンにおける変性過程を解析した。まず、初代培養ラット海馬ニューロンを調整し、1~2 ヶ月の長期培養を行った。この培養系にアデノウイルスベクターを添加すると、*in vitro* で成熟したニューロンは、数日間のうちに変性、死滅した。同じ培養皿に存在する非感染ニューロンや共存するグリア細胞は、ほとんど死滅しなかった。対照実験として用いた $\beta$ -galactosidase や他の遺伝子を発現するアデノウイルスウイルス感染では、ニューロンの死滅が認められなかった。変性しつつあるニューロンでは、突起の退縮や細胞体の膨潤などが認められた。そこで、このニューロンの死滅過程にどのような分子が関わっているかを明らかにするため、細胞死に及ぼすカスパースの関与を検討した。ウイルス感染させた後に培養ニューロンにペプチド性カスパース阻害剤を作用させたところ、幾つかのカスパースに作用する阻害剤やカスパース3の阻害剤は、APP によるニューロン死の遅延をもたらした。それゆえ、カスパース3を含むカスパースカスケードの一部が、本ニューロン死の過程に関わっていると推測された。以上のことから、アデノウイルスを用いた APP 遺伝子強制発現システムは、アルツハイマー病病因に関わる分子機構を解析する上で、究めて興味深い病態細胞モデル系であると考えられた。

### A. 研究目的

21 世紀の超高齢社会到来を目前にして、アルツハイマー病（AD）など脳変性疾患の増大は大きな社会的問題となりつつある。今日、この社会的状況に対応するためには、AD の病因を明らかにし、本質的な治療／診断法を確立することが急務である。患者数が少ない家族性 AD に関しては、現時点までのところ、原因遺伝子や危険因子の特定など目覚ましい成果が得られている。しかしながら、AD の大部分を占める孤発性アルツハイマー病に対しては、同様な研究を進めるためには大きな障害がある。その理由の一つには、AD の病因研究・臨床研究に必要な病態モデル動物やモデル細胞系が確立されていないこと等が



挙げられる。

現在、AD の病因は、アミロイド A $\beta$ ペプチドやその凝集塊である老人斑にあると考える研究者が多く、これらが脳神経細胞の変性/死滅の原因であると見なされている。そのため、その作業仮説に立脚した研究が中心に展開されているのが現状である。近年、これらの孤発性 AD のモデル系が注目されている。これは、細胞変性に関わる分子機構解析が次第に進んでいるからである。例えば、ごく最近、システインプロテアーゼファミリーに属するカスパー 2、3、および 12 がアミロイド A $\beta$ ペプチドによる細胞死に介在しているというデータが相次いで報告された。また、他方では、アミロイド A $\beta$ ペプチド生産に関わると考えられているプロテアーゼであるセクレターゼ類の遺伝子がクローニングされたこと等が挙げられる。しかしながら、この作業仮説には、問題点や矛盾もあり、まだまだ、AD 病因の全容を解明する上では、究めて多くの不明点が残されている。

一方、私達は、これまで、APP 遺伝子の過剰発現や APP の代謝異常がニューロンの細胞死を誘発するというデータを幾つかのモデル細胞系を用いた実験から得ており、むしろ、これが AD の病態に近いと予想している。本研究においてこの作業仮説の正否を確かめるために、これまで分裂期終了後のニューロンに APP 遺伝子導入を可能にする実験条件を検討していた。その結果、第一に、初代海馬ニューロンを長期培養することにより成熟ニューロンに近いモデル細胞として維持されることが明らかとなった。第二には、アデノウイルスベクターを用いることにより、それら脆弱なニューロンに APP 遺伝子を高効率に強制発現させることが可能になった。これらの手法を組み合わせたことにより、上記の目的を評価する実験系が完成した。本研究では、この新たな変性モデル系を用いた実験結果をここに報告する。

## B.研究方法

### 材料の入手

アミロイド A $\beta$ ペプチド (1-43) はバクケム社から、ヒトアストロサイトーマ細胞株 (U373MG) は ATCC からそれぞれ購入した。基礎細胞培養液 (DMEM 及び Neurobasal Medium)、無血清培地添加物 B-27、インシュリン、プロジェステロン、トランスフェリン、及び、牛胎児血清は、オリエンタルキブコから購入した。妊娠ラット (18-19 日齢ラット) は、日本 SLC 社より入手した。培養皿塗布物質であるポリリジンは Sigma 社より、コラーゲンは Upsatate 社 (米国) より購入した。アデノウイルスベクターおよびヒト腎臓由来の株化細胞 (293 細胞) は大阪大学蛋白質研究所吉川和明教授より分与された。カスパー 2 阻害

剤である Z-VAD-fmk や Y-VAD-fmk はフナコシから、AC-DEVD-CHO や AC-YVAD-CHO はペプチド研究所（大阪）より購入した。ヒト IL-8 およびそのモノクローナル、ポリクローナル抗体および U373MG の垂株は、鹿児島大学村山次哉博士から供与された。その他の試薬は実験用市販品を用いた。

#### 培養皿塗布

コラーゲン塗布皿を作製するために、コラーゲン原液を培養皿に薄くのぼして広げ、無菌的に保温（37℃で 30 分以上）し、乾燥させた。使用前には、生理食塩水（PBS）で 3 回洗浄した。ポリリジン塗布皿を作製するために、先ず、ほう酸 buffer (pH8.6、150mM) にポリリジン（1 mg/ml）溶解させたものを作製した。無菌フィルターで濾過滅菌したものを 50 倍に希釈し、培養皿に適量加え、37℃で 1 時間以上保温した。これらの塗布皿も、PBS で 3 回洗浄した後、細胞培養に用いた。

#### ラット胎児海馬ニューロンの初代培養

ウイスターラット胎児（18-19 日齢胎児）から海馬領域を無菌的に取り出し、0.25%トリプシンおよび 0.01%DNase の混液で室温で 15 分間処理し、分散細胞を得た。10%牛胎児血清を含んだ DMEM に懸濁し、細胞濃度を  $10^5$  細胞/ml に調整した。その後、予めポリオルニチン（20 $\mu$ g/ml）で塗布した 24 穴マルチウエル培養皿（あるいは 96 穴）に 1ml（あるいは 100 $\mu$ l）ずつ添加して培養を開始した。翌日、B-27 添加物を含む Neurobasal Medium に置換し、さらに、1~2 ヶ月間ほど培養を継続した。培養は、37℃、5%CO<sub>2</sub>/空气中、十分な湿度条件下で行った。培養液の交換は、培養皿の半量を 1 週間ごとに交換した。

#### アデノウイルス感染

各実験には、超遠心法により精製したアデノウイルスを用いた。これらは、予め、ヒト 293 細胞に対するアデノウイルス感染反応を利用してウイルスタイターを測定しておいた。初代培養ニューロンをアデノウイルスで感染させるためには、先ず、各マルチウエルの培養液を半分取り出し、そこに様々な量のアデノウイルスを加えた。十分に攪拌したこれら培養液をもとのマルチウエルに戻し、12 時間培養を行った。その後、細胞にとりこまれなかった遺伝子を取り除くために培養液を交換した。

#### 免疫染色と生細胞のカウント

培養細胞を固定するため、培養液と等量の固定液（PBS で希釈した 7.4%フルムアルデハイド溶液）を静かに培養系に加えた。室温で 30 分固定後、メタ

ノール／アセトン混液 (-20℃) で3分固定処理を施し、0.14M グリシンおよび、2%過酸化水素水で処理した。その後、通常の免疫染色を施した。ニューロンの生存率を測定するためには、抗 Map2 モノクローナル抗体を、APP 遺伝子陽性細胞を検出するためにはウサギ抗 APP 抗体を1次抗体として用い、発色にはベクター染色キットを使用した。これらの免疫染色細胞を位相差顕微鏡あるいは蛍光顕微鏡下で観察および写真撮影した。形態学的指標により良好な生存状態のニューロンと変性死滅しつつあったニューロン割合を求め、各実験における生存率を算出した。有意差検定は t 検定により実施した。一方、ヒトアストロサイトーマの生存率測定は、扁平な接着細胞を生細胞としてカウントし、形態が崩れた細胞や自己溶解した細胞を変性死滅細胞と見なし、両者の割合から生存率を算出した。

## C.研究結果

### APP 遺伝子高発現による海馬ニューロン死の誘導

私達は、これまで、アミロイド前駆体蛋白質 (APP) 遺伝子を過剰発現させた神経系株化が、産生された APP の細胞内蓄積や代謝亢進と共に、変性死滅することを観察してきた。そこで、今回、まず、APP による細胞死滅が、初代培養神経細胞においても同様に認められる現象であるか否かを検討した。この目的のため、先ず、ラット胎児海馬ニューロンを調整し、1-2 ヶ月間培養を継続した。この長期培養により著しい突起伸展やグルタミン酸に対する反応性も認められたため、未熟な胎児ニューロンから徐々に分化成熟したニューロンに変化しつつあると考えられた。

そこで、これらニューロンに APP 遺伝子を発現するアデノウイルスを感染させ、その後数日間培養を継続した (図 1、図 2)。対照群として  $\beta$ -galactosidase 遺伝子を発現するベクターを添加した培養系では、ウイルス量を 200moi まで高めても、顕著なニューロン変性や死滅は観察されなかった。一方、APP 遺伝子発現ウイルスの場合は、処理後培養 2 日間あたりまではほとんど有為な変化が観察されなかったが、2~3 日にかけて急激な細胞変性が誘導され、それらに引き続いて著しい細胞死が認められた。培養系に添加するウイルス量を低下させると、アデノウイルスに感染、あるいは非感染ニューロンをつくり出すことができるが、この場合、APP 遺伝子導入された細胞のみが変性死滅した (図 1B)。非感染ニューロンは、 $\beta$ -galactosidase 遺伝子発現アデノウイルスで感染した細胞 (図 1C) と同様に何らの変化も受けずに、良好な生存状態を続けた。また、APP による死滅ニューロンの培養上清を他のニューロン培養系に添加しても、ニューロンの生存には大きな変化が検出できなかった。以上のことから、APP

遺伝子強制発現により長期培養海馬ニューロンは、数日間に変性、死滅することが明らかになった。また、この結果は、ニューロンが放出した何らかの液性物質、例えば、アミロイド A $\beta$ ペプチドなどが細胞外から作用しているものではないと考えられた。

#### APP とアミロイド A $\beta$ ペプチドによるニューロン死の比較

APP 分子の細胞内代謝により生産されるアミロイド A $\beta$ ペプチドは老人斑の主成分であり、これまで、アミロイド A $\beta$ ペプチドによる初代培養ニューロンの変性誘導が広く解析されてきた。そこで、長期培養海馬ニューロン系にアミロイド A $\beta$ ペプチド (A $\beta$ 1-43) を添加し、APP による細胞死と比較検討した。

先ず、A $\beta$ ペプチドを無菌蒸留水に懸濁し、凝集塊を形成させて培養系に添加した。その結果、これまでの多くの報告と同様に、加えたペプチド凝集塊の用量に依存して細胞死が誘導された (図 3A)。この場合には、ペプチド添加後約 12 - 24 時間ほどで急激な細胞死滅が誘導された。不思議なことに、ペプチド処理日数を更に 3 ~ 4 日延長しても、細胞死の割合には、それ程、大きな影響が認められなかった (図 3B)。凝集ペプチドで細胞死を誘導した培養上清を回収して新たな培養系に添加したが、この場合は全く細胞死が認められなかった。次に、培養期間と細胞変性の誘発の関係を調べたが、これらでは、ニューロンの培養期間に関係なく、A $\beta$ による細胞死が誘導された。

一方、APP による細胞死誘導の場合には、ウイルス処理前の培養期間に大きく影響した (未発表データ)。培養期間を 4 週間までの培養日数では、アデノウイルス感染ニューロンは細胞変性をおこさなかった。しかし、1 ~ 2 ヶ月培養した場合、APP 発現ウイルスにのみ細胞毒性が認められた。 $\beta$ -galactosidase やその他の遺伝子では、細胞死は誘導されなかった。これらのことから、アミロイド A $\beta$ ペプチドによるニューロンの細胞死は、ニューロンの成熟や分化状態とは関わりなくおこる急激な細胞変性であると考えられた。

#### カスパーズ阻害剤による APP 誘導海馬ニューロン死の遅延効果

様々な細胞死の過程に不可逆的に活性化されるシステインプロテアーゼが介在していることが明らかにされており、ごく最近では、A $\beta$ によるニューロン死滅の系でも関与が報告されている。そこで、本実験系におけるニューロン死にどのようなカスパーズが関与しているかを検討した (図 4)。幾つかの阻害剤を培養系に添加してウイルス感染の 1 ~ 2 日後に、様々なカスパーズ阻害剤を添加した。対照群としてこれら阻害剤を溶解させた DMSO やカスパーズ 1,4,5 などの阻害剤である Y-VAD-fmk は、APP による細胞死を全く阻止することができなかった。しかしながら、カスパーズ 3 の阻害剤 AC-DEVD-CHO や非特

異的に多種種類のカスパーを抑制する阻害剤 Z-VAD-fmk では、程度の差はあるもが、APP による細胞死を遅延させた。また、カスパー 1 の阻害剤 AC-YVAD-CHO にも同様な傾向があったが、抑制効果は極めて弱かった。しかしながら、これらのカスパー阻害剤処理では、培養日数をさらに延長させると、どの場合も細胞変性が進みニューロンは死滅した。それゆえ、カスパー 3 を含むカスパーカスケードの一部が、本ニューロン変性、死滅の過程にも関わっていると推測された。

#### D. 考察

本研究において、APP 遺伝子高発現が長期培養した成熟ニューロンで誘導されると、そのニューロンは死滅することを明らかにした。アデノウイルスによる APP 遺伝子発現の誘導は、細胞が持つ固有の発現レベルに比べて数倍以上上昇していると考えられる。このこと自体が、実際のアルツハイマー病における病因あるいは病態と相関しているとは考えにくい。しかしながら、APP の細胞内代謝活性が低下したり、APP 分子を含めた細胞内輸送機構に変化が出てきた場合には、APP 遺伝子発現の上昇時と似た変化が細胞内で起こりうると推測される。それゆえ、本実験モデルは、アルツハイマー病病態の何らかの変化を反映している AD 病態モデル系と考えられる。

長期培養を施した胎児海馬ニューロンを用いた場合、アデノウイルスによる APP 遺伝子導入効果が細胞変性として観察されたが、培養期間が 1~2 週間である場合、非特異的な毒性がさまざまな遺伝子を発現するウイルスでも認められた。この理由の一つとして、培養期間が短いと神経突起の伸展が必ずしも十分ではなく、また、培養基質への結合も不十分であるためであろうと推測される。そのため、特に高濃度のアデノウイルス感染時には接着能が低下し、細胞がはがれてしまったのであろう。何故なら、アデノウイルスが細胞に感染し、内部に運び込まれる機構に細胞接着分子であるインテグリン類 ( $\alpha\beta5$  や  $\alpha\beta3$ ) などを利用しているからである。ただ、中枢神経系ニューロンでは、必ずしも、これらのインテグリンが十分機能しているわけではない。他の一つの可能性は、胎児由来の幼弱なニューロンが機能的にも成熟分化していることが、APP の細胞毒性が発現するためには必要であるのかも知れない。グルタミン酸の受容体などの機能は培養 1~2 週間のニューロンで形成されるが、さらなる成熟条件として、あるいは、加齢や老化の条件としての何かが、病態細胞モデルには必要であるのかも知れない。実際、家族性アルツハイマー病やダウン症における痴呆の発症には加齢要因が関係している点と見なされている点は、この可能性

を示唆している。

APP による細胞毒性は、細胞内で生産されたアミロイド A $\beta$ ペプチドが関わっていると考えられる。何故なら、APP による本長期培養海馬ニューロンの死滅時に、細胞内にアミロイド部分を含むフラグメントが蓄積されているからである。また、APP 分子からアミロイド A $\beta$ ペプチド領域を除去した変異体では細胞毒性が著しく減少した（未発表データ）からである。しかしながら、細胞死がおこるためには、さらに、細胞内における何らかの変化が引き金になっていると考えられる。このような変化の実体は現時点ではあきらかではないが、一つの可能性としては、アミロイド A $\beta$ ペプチドが作用する標的分子が細胞内にある程度蓄積する必要があるのこともなかもしれない。あるいは、細胞内のアミロイドペプチドを分解する能力の低下が必要なのであろう。

アデノウイルスで感染したニューロンが死滅するのは、APP の生産が亢進したものだけであり、その近傍の非感染性ニューロンは、決して同じようには死滅しなかった。また、アデノウイルス感染によって死滅したニューロンの培養上清を、未処理ニューロンの培養系に添加しても、細胞死がみとめられなかった。これらのことは、APP による細胞死誘導は、細胞毒性物質が細胞外液に放出されておこるのではないと解釈される。それゆえ、本実験系の細胞死には、アミロイド A $\beta$ ペプチドが細胞外から働くという可能性は低いと考えられた。また、この結果は、APP 発現アデノウイルスを直接ラット脳内に注入した実験では、対側に逆行性（あるいは順行性）に APP 分子が運ばれたニューロンにおいて主として細胞変性が認められたという吉川らの事実と矛盾しない。

それでは、なぜ、アミロイド A $\beta$ ペプチドが細胞培養系ニューロンに対して細胞毒性を示すのであろうか。一般に、細胞毒性が短時間であらわれる条件では、これらのペプチド濃度は 10 $\mu$ M ほどであり、これは脳脊髄液中の濃度と比べ3から4オーダー高い濃度と考えられる。実際培養系に添加した場合、ペプチド凝集塊で細胞がうめ尽くされるほどの濃度である。しかも、不思議なことに、これらの実験ではペプチドをニューロンに暴露した時間に比例して細胞死がおこるのではなく、12~24 時間ぐらいで認められ、その後はあまり細胞死の割合が増えないと結果が得られた。則ち、アミロイド A $\beta$ ペプチドがニューロンに始めて接した時、ある確率でアミロイドペプチド分子塊が細胞内に取り込まれた結果、細胞変性がおこったのではないかと考えられる。何故なら、アミロイドペプチド塊はニューロンの周囲にいくら長時間存在しても、これらは、次々に細胞死を誘発しないからである。もし、この考えが正しいとすれば、アミロイド A $\beta$ ペプチドの作用点は細胞内にあるのかも知れない。APP の細胞死が数日必要なのは、案外、この分子塊に相当する分解産物の蓄積に時間を要するためかもしれない。現在、このことを明らかにするため、標識ペプチドを用

いた細胞内取り込み実験を試みている。

APP による細胞死をカスパー 3 の阻害剤などが遅延させたが、完全に細胞死を抑制することができなかった。この理由は定かではない。長期培養海馬ニューロンは極めて脆弱であり、ペプチド性阻害剤の処理により、様々な非特異的な作用を受けるため、生存率が低下するためかもしれない。あるいは、これらのカスパー作用が細胞死に直結しているのではなく、変性死滅過程に同時におこる変化の一つかもしれない。もし、そうであれば、明解な結果が出てこないと考えられる。最近、アミロイド A $\beta$ ペプチドによる細胞死にカスパー 3 だけではなく、カスパー 2 や 1 2 などが重要な分子であるとの報告が出されたが、細胞死のシグナルの入り方の違いにより、関与するカスパーカスケードも異なるのかも知れない。

#### H. 図の説明

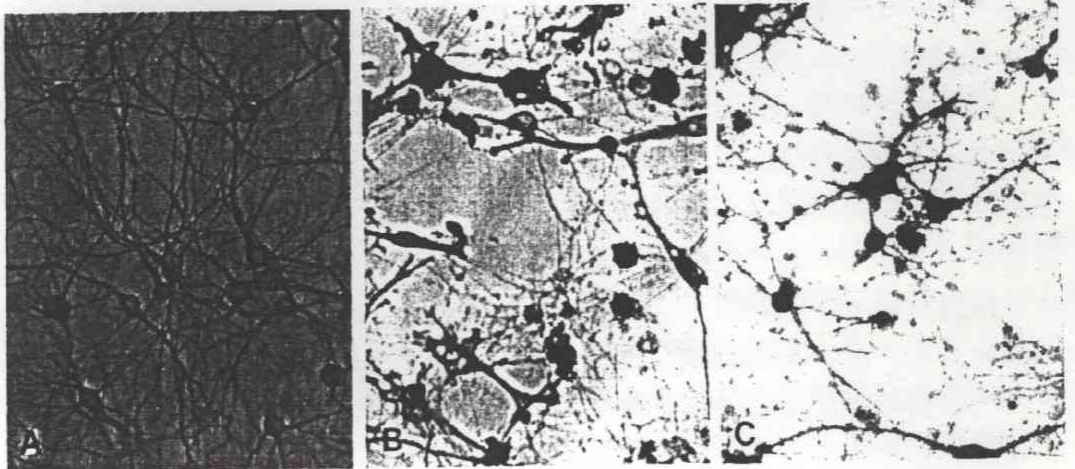


図 1 培養海馬ニューロンの位相差顕微鏡写真。長期培養したラット胎児海馬ニューロンをアデノウイルスで 12 時間感染させた。ウイルス含有培養液を除去し、新たな培養液で更に 4 日間培養した。その後、これらの細胞を抗 map2 抗体 (A) や抗 APP 抗体 (B) で免疫染色した。また、 $\beta$ -galactosidase を産生するアデノウイルスを感染させた細胞には、 $\beta$ -galactosidase 発色法にて染色した (C)。写真 A は、ウイルス未処理の細胞、写真 B はアミロイド前駆体蛋白質 (APP) 遺伝子を発現するアデノウイルス (70moi) で各々感染させたもの、写真 C は  $\beta$ -galactosidase を産生するアデノウイルスで感染 (200moi) させたもの。

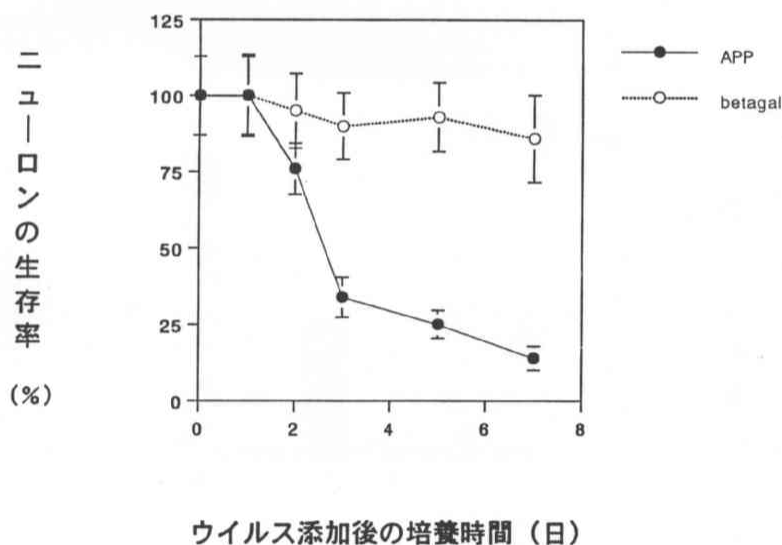
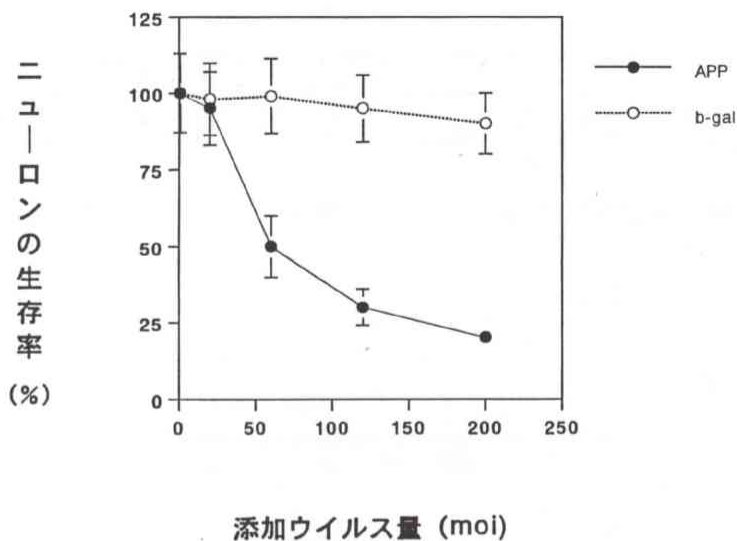


図2 APP 遺伝子高発現による海馬ニューロン死の誘導。A, マルチウエル (ファルコン 96 穴) で培養したラット胎児海馬ニューロンに様々な量のアデノウイルスを感染させ、APP 遺伝子あるいは $\beta$ -galactosidase を強制的に発現させた。感染後4日目に各々の実験群におけるニューロンの生存率を算出した。B, 長期培養したラット胎児海馬ニューロンにアデノウイルス (100moi) を12時間感染させ、APP 遺伝子を強制的に発現させた。培養液を交換後、1週間培養を継続した。経時的に一部のニューロンを固定し、各培養時間における生存率を測定した。



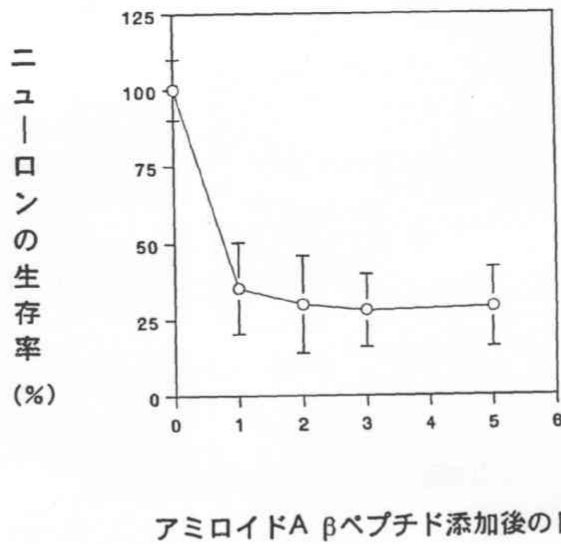
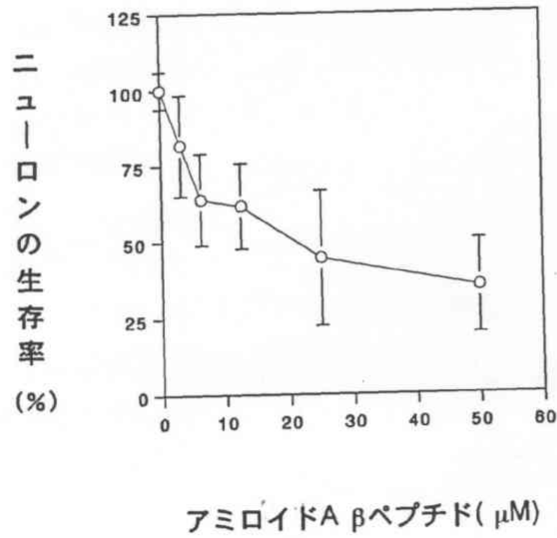


図3 アミロイド Aβペプチドによる初代培養海馬ニューロン死誘導。図1と同じように海馬ニューロンを長期間培養し、アミロイド Aβペプチドを添加した。その後、培養液を交換せずに、培養を継続した。A) では、細胞死誘導するアミロイド Aβペプチドの用量依存カーブを調べた。細胞はペプチド添加後4日後に固定した。B) では、アミロイド Aβペプチドを 20μM 添加し、ニューロンの生存率を経時的変化に調べた。

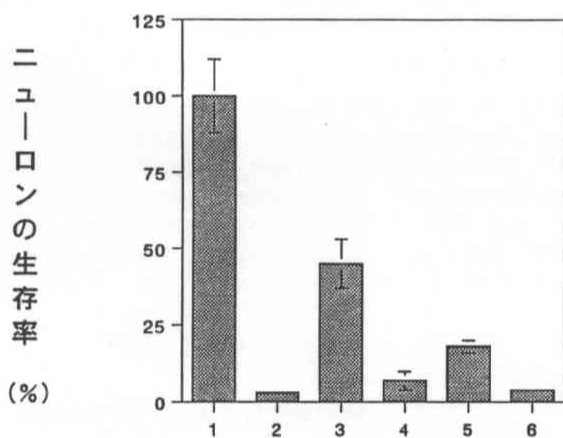
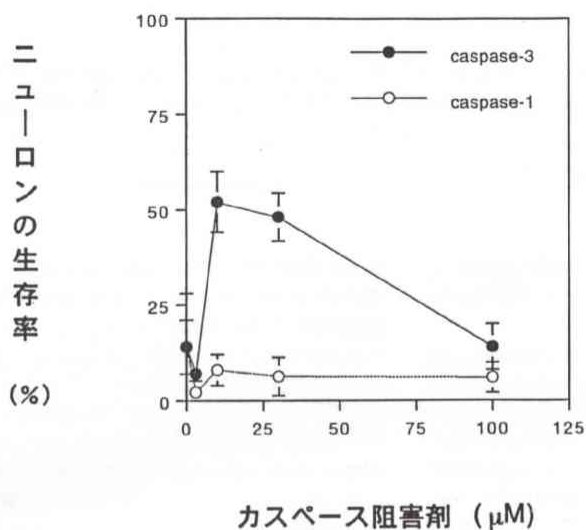


図4カスパーゼ阻害剤による APP 誘導海馬ニューロン死の遅延。ラット胎児海馬ニューロンにアデノウイルスを感染させた後、様々な濃度のカスパーゼ阻害剤を添加した。A)では、カスパーゼ3の阻害剤による APP 誘導細胞死の遅延効果を調べた。ウイルス添加後3日目に細胞の生存率を求めた。B)は、その他のカスパーゼ阻害効果を A)と同様にしらべた。サンプル1はウイルス未感染、サンプル2は APP アデノウイルス処理のみ、サンプル3~6は、サンプル2に、各々カスパーゼ阻害剤,AC-DEVD-CHO(10 $\mu$ M)、AC-YVAD-CHO(10 $\mu$ M)、Z-VAD-fmk(50 $\mu$ M)、Y-VAD-fmk(100 $\mu$ M)を各々添加したものの。