

「脳を知る」

平成8年度採択研究代表者

井原 康夫

(東京大学大学院医学系研究科 教授)

「アルツハイマー病における神経細胞死の解明」

1. 研究の概要

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

本研究の目的は細胞外の $A\beta$ 沈着と細胞内 τ 沈着の意義を解明することである。 $A\beta$ は凝集すると試験管内では神経毒性を示すようになる。したがって、 $A\beta$ が何故脳内では細胞外に沈着し、線維形成するのかが研究の焦点となっている。本研究はこのような流れとは全く異なり、 $A\beta$ の沈着自体が細胞変性過程の結果であると仮説の検証を目的とする。 τ 沈着は神経細胞の脱落と直接的な関係があることが知られている。本研究においては、この τ 沈着が神経細胞変性の最終段階の結果であるという仮説を検証する。

2. 研究実施内容

<井原康夫のグループ>

脳内各部位における $A\beta$ の ELISA を用いた定量とプロットとの比較検討をほぼ終了した。その結果、ELISA は SDS 電気泳動の際の $A\beta$ monomer のみを定量していたことが判明した。同時に SDS-stable $A\beta$ dimer が monomer 以前に脳内に蓄積していることが明らかとなった。現在この SDS-stable dimer を連続剖検例において定量する方法を検討している。

細胞内 $A\beta$ の存在は感度の高い ELISA ではじめて可能になった。分画をさらにすすめると detergent insoluble 画分にも $A\beta$ monomer, dimer が存在することが明らかとなった。おそらく sphingolipid と cholesterol に富んだ特異な膜ドメインに存在するものと考えられる。現在この知見がヒト脳および PS2 transgenic mice でどうなのか検討している。

τ の AD における意義は必ずしも明瞭ではなかった。Amyloid cascade theory では $A\beta$ の沈着がその後のすべての事象をひき起こすとされ、 $A\beta$ に比して、 τ の研究者人口は非常に小さかった。しかし、98年の春に続いて発表された、 τ が FTDP-17 (Frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17) の原因遺伝子であるという報告がこの状況を変えつつある。つまり τ に変異があると、前頭、側頭葉中心に萎縮をきたして、痴呆を呈し、また黒質の変性をきたして、parkinsonism になる。病理学的には、上記の部分を中心に、神経原線維変化の形成がみられ、かつ神経細胞脱落が著しい。以上のことから、 τ の変異の存在が神経原線維変化の形成と神経細胞脱落の必要十分条件であることが明確になった。言い換えれば、FTDP-17 は primary tauopathy として理解されるが、AD は secondary tauopathy として理解されないかということである。 τ の変異は exon 内および intron 内に存在することが知られており、前者の場合、微小管結合部位に集中している。後者の場合、2nd repeat が splice-in されやすくなり、4-repeat tau が 50% 増加する。Exon 内変異のある τ は微小管重合促進活性が低下する。しかし、4-repeat tau は重合促進活性が高く、この partial loss of function が神経細胞脱落を説明できるのかどうか全く不明である。Cell-free 系における検討からの τ の in vivo 機能の推定は問題がある。すなわち、 τ knockout mice では非常にわずかの異常しか検出できないからである。おそらく他の微小管結合タンパクがその機能を補うと考えられる。この点を考慮して、現在、 τ をトランスフェクトした細胞において機能異常がないかどうか検討をしている段階である。

<共同研究Aグループ>

τ の transgenic rat を作製したが、残念なことに脳における発現量が非常に低く、初期に目的にしていた manipulation (ミニポンプを装着して種々の薬剤を脳室内に持続的に投与する) して、脳内の τ の動態の解析のプロジェクトは中止となった。しかしこの transgenic rat は通常 τ の発現量が低い肝臓、筋肉にかなりのレベルで発現しており、そのことを利用して、 τ の lysosome での分解の証明に用いるべく検討をしている。高齢の mutant PS2 transgenic mice の検討が現在進んでいる。ELISA 定量法の改善によって、不溶性の $A\beta_{42}$ が年齢とともにさらに増大することが明らかになりつつある。

Wild APP, APP717, APPsw transgenic mice を試みたが、おそらくプロモータに起因すると思われるが、脳で高い発現をする transgenic mice は得られなかった。APP transgenic mice と PS2 transgenic mice との交配は現在見合わせている。

<共同研究Bグループ>

昨年度は Lewy body の主要成分としての α synuclein を報告したが、現在、Lewy body 内の α synuclein の C 末端が欠失しているらしいことを見出した。PS2 の

molecular dissection を行い、C 末端の機能について新知見を得た。

<共同研究Cグループ>

極性を持つ MDCK cell を用いて A β の分泌を調べ、apical 側に分泌される A β は重合能が高いことを明らかにした。この高い重合能はコンフォメーションの違いに起因するらしいことを発見した。

3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

- Funato H, Yoshimura M, Yamazaki T, Saido TC, Ito Y, Yokofujita J, Okeda R, Ihara Y: Astrocytes containing amyloid β -protein (A β)-positive granules are associated with A β 40-positive diffuse plaques in the aged human brain. *Am. J. Pathol.*, 152, 983-992 (1998)
- Yoshida H, Watanabe A, Ihara Y: Collapsin response mediator protein (CRMP) - 2 is associated with neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.*, 273,9761-9768 (1998)
- Yamaguchi H, Sugihara S, Ogawa A, Saido TC, Ihara Y: Diffuse plaques associated with astroglial amyloid β protein, possibly showing a disappearing stage of senile plaques. *Acta. Neuropathol.*, 95, 217-222 (1998)
- Nakabayashi J, Yoshimura M, Morishima-Kawashima M, Ito Y, Funato H, Miyakawa T, Yamazaki T, Ihara Y: Amyloid β -protein (A β) accumulation in the putamen and mammillary body during aging and in Alzheimer's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 57, 343-352 (1998)
- Yamazaki T, Ihara Y: Effects of specific protease inhibitors on amyloid β -protein 42 secretion. *Neurobiol. Aging.*, 19, S77-S79 (1998)
- Yanagisawa K, Ihara Y: GM1 ganglioside-bound amyloid β -protein in Alzheimer's disease brain. *Neurobiol. Aging.*, 19, S65-S67 (1998)
- Oyama F, Sawamura N, Kobayashi K, Morishima-Kawashima M, Kuramochi T, Ito M, Tomita T, Maruyama K, Saido TC, Iwatsubo T, Capell A, Walter J, Grünberg J, Ueyama Y, Haass C, Ihara Y: Mutant presenilin 2 transgenic mouse: Increased A β levels and a marked age-dependent increase in the A β 42 ratio in the brain. *J. Neurochem.*, 71, 313-322 (1998)
- Funato H, Yoshimura M, Tamaoka A, Ishikawa K, Ohkoshi N, Namekata K, Okeda R, Ihara Y: Quantitation of amyloid β -protein in the cortex during aging and in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.*, 152, 1633-1640 (1998)
- Murakami N, Oyama Y, Gu Y, McLennan IS, Nonaka I, Ihara Y:

- Accumulation of tau in autophagic vacuoles in chloroquine myopathy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 57,664-673(1998)
- Morishima-Kawashima M, Ihara Y: The presence of amyloid β -protein in the detergent-insoluble membrane compartment of human neuroblastoma cells. *Biochemistry*, 37, 15247-15253 (1998)
- Enya M, Morishima-Kawashima M, Yoshimura M, Shinkai Y, Kusui K, Khan K, Games D, Schenk D, Sugihara S, Yamaguchi H, Ihara Y: Appearance of sodium dodecyl sulfate-stable amyloid β -protein (A β) dimer in the cortex during aging. *Am. J. Pathol.*, 154, 271-279 (1999)
- Oyama F, Sawamura N, Kobayashi K, Morishima-Kawashima M, Kuramochi T, Ito M, Tomita T, Maruyama K, Saido TC, Iwatsubo T, Capell A, Walter J, Grunberg J, Ueyama Y, Haass C, Ihara Y: Mutant presenilin 2 transgenic mouse: Effect on an age-dependent increase of amyloid β -protein (A β)₄₂ in the brain. *J. Neurochem.*, 71, 313-322 (1998)
- Yanagisawa K, Ihara Y: GM1 ganglioside-bound amyloid β -protein in Alzheimer's disease brain. *Neurobiol. Aging.*, 19, 65-67 (1998)

他 24 件