

「脳を知る」
平成8年度採択研究代表者

井原 康夫

(東京大学大学院医学系研究科 教授)

「アルツハイマー病における神経細胞死の解明」

1. 研究実施の概要

アルツハイマー病の病理学的特徴は、老人斑と神経原線維変化 (PHF) である。老人斑は、アミロイド線維から成り、その主要成分は分子量約4,000の 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 $\beta \dots \tau$ 神経細胞死という病理カスケードが信じられている。

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

2. 研究実施内容

(1) $A\beta$ の蓄積初期過程と低密度膜ドメイン

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

この膜画分の $A\beta$ の蓄積が脳内のアミロイド蓄積に深く関わっているのではないかという仮説はすでに95年にわれわれによって提示された (Yanagisawa K, Odaka A, Suzuki N, Ihara Y Nature Med 1: 1062-1066, 1995)。今年度は、20から80歳代の非痴呆患者の脳内の $A\beta$ 全量を定量するとともに、低密度膜ドメインの $A\beta$ も定量し、両者を比較した。その結果、低密度膜画分の $A\beta$ 量が脳内蓄積 $A\beta$ 量によく相関した。この観察結果は、低密度膜ドメイン $A\beta$ の蓄積が脳内アミロイド蓄積とカップルしていることを示すものと考えられる。実際にどのようにこの膜画分の $A\beta$ が細胞外の $A\beta$ 蓄積と関係するかは現時点ではまったく不明であ

るが、ひとつの可能性として、 $A\beta$ が蓄積した低密度膜ドメインの shedding、それが seed になっての $A\beta$ の重合、アミロイド形成という過程が考えられる。

(2) PS2 γ secretase と $A\beta$ 42 の低密度膜ドメインへの取り込み

Cell-free 系での γ secretase の assay method を確立した。この方法を用いて PS2 transfectant から膜画分を調製し、測定に供した。その結果、N141I transfectant から調製された膜画分はほとんど $A\beta$ 42 のみを産生することが明らかとなった。また産生された $A\beta$ 42 は低密度膜ドメインに特異的に取り込まれることが分かった。まだ詳細は不明であるが、以前に得た mutant PS2 transgenic mice の所見はこれで説明可能である。すなわち N141I transgene が $A\beta$ 42 を産生し、それが特異的に低密度膜ドメインに取り込まれて同部位の $A\beta$ 42 のレベルが高くなったのである。

N141I OPS2 の γ secretase の特異性は予想外の結果であった。すなわち mutant PS2 は $A\beta$ 42 のみを産生する。この cell line は γ secretase の特異性を研究するのに重要なものであると同時に、特異性を変化させる薬剤または因子同定という観点からも重要と考えられる。

(3) FTDP タウ transgenic mice および knockin-mice の作製

tau transgenic mice に関しては promoter 選択の間違いから大幅に遅れをとった。現在はむしろ次に述べる knock-in project の方に重点を移していく過程にある。これは、現時点では遺伝子発現異常を DNA microarray を用いて検討することを目指しているからである。

Knockin mice

長期飼育、維持は V337M, S-4R, P301L の 3 系統に絞り込んで、実施する。V337M については、4 ヶ月では脳に病変は認められないが、12 ヶ月にて神経細胞およびアストロサイトに pretangle が出現するらしいことをつきとめた。現在この所見を確認中。

(4) GM1 ガングリオシドと $A\beta$ の相互作用の解析

アルツハイマー病 (AD) 発症病態を分子レベルで解明することを目標に研究を継続し、 $A\beta$ の凝集開始時点に seed として働くことが想定される GM1 ガングリオシド結合型 $A\beta$ (GM1- $A\beta$) の形成機構について物理化学的検討を加え、GM1 ガングリオシドが存在する膜内のコレステロール濃度が高い条件において GM1- $A\beta$ の形成が促進されること、また GM1- $A\beta$ による可溶性 Ab の凝集促進作用は抗 GM1- $A\beta$ 抗体により特異的に抑制されることを確認した。

(5) コレステロールの AD 発症危険因子としての役割の検討

遺伝的コレステロール代謝異常である C 型 Niemann-Pick 病の変異遺伝子を導入したトランスジェニック・マウスを対象に解析を進めた結果、同マウス脳にお

いては神経原線維変化の分子基盤であるタウ蛋白のリン酸化が亢進していること、さらにはこのリン酸化亢進には MAP キナーゼが関与している可能性を示唆する結果を得た。

(6) γ secretase 調節因子の同定

A β 産生におけるプレセニリンの役割を γ -セクレターゼ活性調節機構の視点から検討し、これまでに γ secretase 調節因子スクリーニングシステムを確立し、プレセニリンの同酵素活性を調節する遺伝子を複数クローニングすることに成功した。

(7) プレセニリン変異の役割の検討

プレセニリン (PS) 研究においては、PS が β APP を切断する γ セクレターゼとして作用するにはカルボキシ末端の特定アミノ酸配列に依存して形成される高分子量複合体を形成することが必要であることを明らかにし、複合体形成に必須なアミノ酸配列として Pro-Ala-Leu-Pro からなる高度に保存された PALP 配列を同定した。また A β 42 は AD 脳に最初期から優位に蓄積し、家族性 AD でも産生が増加する鍵分子であるが、 β APP からの A β 42 産生の際は trans-Golgi network 以降の late compartment であること、変異 PS が A β 42 上昇効果を及ぼすためには APP の細胞内ドメインは不要であることを明らかにした。

(8) CLAC (collagen-like Alzheimer amyloid plaque component) の同定

さらに新たな老人斑アミロイド成分として新規のコラーゲン様蛋白である CLAC を同定し、その前駆体として新規膜結合型コラーゲン様分子 CLAC-P を同定するとともに CLAC-P と A β の関係ならびに CLAC の生成機構を検討した。

(9) 各種アルツハイマー関連遺伝子を導入したトランスジェニック、ノックインマウスを作製、飼育した。

3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

Gu Y, Hamajima N, Ihara Y : Neurofibrillary tangle-associated collapsin response mediator protein-2 (CRMP-2) is highly phosphorylated on Thr-509, Ser-518 and Ser-522. *Biochemistry*, 39, 4267-4275 (2000)

Gu Y, Ihara Y : Evidence that collapsin response mediator protein-2 (CRMP-2) is involved in the dynamics of microtubules. *J. Biol. Chem.*, 275, 17917-17920 (2000)

Sawamura N, Morishima-Kawashima M, Waki H, Kobayashi K, Kuramochi T, Ito M, Oyama F, Ando S, Ihara Y : Mutant-presenilin 2-transgenic mice : A large increase in the levels of A β 42 is presumably associated with the low-density membrane domain that contains decreased levels of glycerophospholipids and sphingomyelin. *J. Biol. Chem.*, 275, 27901-27908 (2000)

Saito Y, Kawai M, Inoue K, Sasaki R, Arai H, Nanba E, Kuzuhara S, Ihara Y, Kanazawa I, Murayama S : Widespread expression of α -synuclein and τ immunoreactivity in hallervorden-spatz syndrome with protracted clinical course. *J. Neurol. Sci.*, 177, 48-59(2000)

Morishima-Kawashima M, Oshima N, Ogata H, Yamaguchi H, Yoshimura M, Sugihara S, Ihara Y : Effect of *apolipoprotein E* allele e4 on the initial phase of amyloid β -protein accumulation in the human brain. *Am. J. Pathol.*, 157, 2093-2099(2000)

Miyasaka T, Morishima-Kawashima M, Ravid R, Heutink P, van Swieten JC, Nagashima K, Ihara Y : Molecular analysis of mutant and wild-type τ deposited in the brain affected by FTDP-17 R406W mutation. *Am. J. Pathol.*, 158, 373-379 (2001)

Yamazaki T, Chang TY, Haass C, Ihara Y : Accumulation and aggregation of amyloid β -protein in late endosomes of Niemann-Pick Type C cells. *J. Biol. Chem.*, 276, 4454-4460(2001)

Ihara Y : PHF and PHF-like fibrils--cause or consequence? *Neurobiol. Aging*, 22, 123-126(2001)

Miyasaka T, Morishima-Kawashima M, Ravid R, Heutink P, van Swieten JC, Nagashima K, Ihara Y : Molecular analysis of mutant and wild-type τ deposited in the brain affected by the FTDP-17 R406W mutation. *Am. J. Pathol.*, 158, 373-379 (2001)

Fan Q-W., Isobe I, Asou H, Yanagisawa K, Michikawa M : Expression and regulation of apolipoprotein E receptors in the cells of the central nervous system in culture : A review. *AGE J.*, 24, 1-10(2001)

Sawamura N, Gong J.-S., Garver W. S., Heidenreich R. A., Ninomiya H, Ohno K, Yanagisawa K, Michikawa M : Site-specific phosphorylation of tau accompanied by activation of mitogen-activated protein kinase(MAPK) in brains of Niemann-Pick type C mice. *J. Biol. Chem.*, 276, 0314-10319(2001)

Isobe I, Yanagisawa K, Michikawa M : 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) causes Akt phosphorylation and morphological changes in intracellular organellae in cultured rat astrocytes. *J. Neurochem.*, 77, 274(2001)

Fan Q-W, Yu-W, Senda T, Yanagisawa K, Michikawa M : Cholesterol-dependent microtubule stabilization by modulating tau phosphorylation. *J. Neurochem.*, 76, 391-400(2001)

Takeuchi A, Irizarry MC, Duff K, Saido TC, Hsiao Ashe K, Hasegawa M, Mann DMA, Hyman BT, Iwatsubo T : Age-related amyloid β deposition in transgenic mice overexpressing both presenilin 1 and amyloid β precursor protein Swedish mutant is not associated with global neuronal loss. *Am. J. Pathol.*, 157, 331-339 (2000)