

機関番号：13601

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20500334

研究課題名 (和文) APP 細胞内ドメインの神経毒性解析のための  
トランスジェニックマウスの作製研究課題名 (英文) Production of transgenic mice to analyze neuron specific  
toxicities of the intracellular domain of APP

研究代表者

中山 耕造 (NAKAYAMA KOHZO)

信州大学・医学部・講師

研究者番号：70192680

研究成果の概要 (和文)：

APPの細胞内ドメイン (AICD) を強制発現する embryonic carcinoma 細胞 (P19 細胞) を作製し、レチノイン酸処理により神経細胞へと分化誘導した。その結果、AICD を発現する P19 細胞の場合、神経細胞に分化することにより高率に細胞死をおこすことが明らかとなった。更なる解析の結果、AICD は神経細胞選択的にアポトーシスを誘導すると結論できた。また DNA チップを用いて、この細胞死の過程における遺伝子発現の変化を検討したところ、約 1% の遺伝子の発現が 10 倍以上増減しており、AICD がダイナミックに多数の遺伝子の発現を変化させている事を明らかにした。

さらに、AICD を脳選択的に発現するトランスジェニックマウスの作製を試みている。

研究成果の概要 (英文)：

Although amyloid precursor protein (APP) has a central role in Alzheimer's disease, the physiological functions of this protein are yet to be fully elucidated. We established an embryonic carcinoma P19 cell line expressing the intracellular domain of APP (AICD). While neurons were differentiated from these cell lines with retinoic acid treatment, expression of AICD induced neuron-specific apoptosis. We evaluated AICD-induced changes in gene expression through cell death. The expression of 41,256 transcripts was monitored by DNA microarray. The expression of 277 genes was induced more than 10-fold by the presence of AICD. Conversely, the expression of 341 genes was inhibited to less than one-tenth of the original level. These results suggest that AICD induces dynamic changes in gene expression, which may be closely correlated with AICD-induced neuron-specific apoptosis.

In addition, we are still producing transgenic mice to analyze neuron specific toxicities of the intracellular domain of APP leading to Alzheimer's disease.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：分子神経生物学

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：APP, Notch, アルツハイマー病,  $\gamma$ -セクレターゼ

## 1. 研究開始当初の背景

Amyloid Precursor Protein (APP)は、アルツハイマー病(AD)との関連は明確になっているが、その生理的な機能の解析は十分とは言えない。従って、APPの生理的機能を解析することは基礎研究として重要なだけでなく、より深くADを理解するためにも、さらには新規作用機序を持つ治療薬の開発等の応用にとっても極めて重要でかつ急務である。

また現在のところ、ADの発症のメカニズムとして、最終的に $\gamma$ -セクレターゼによってAPPが切断される事によって生じるフラグメントである $A\beta$ がアミロイドを形成して脳に沈着し、その毒性のため神経細胞死を引き起こすというアミロイド仮説が広く信じられている。しかしながら、アミロイドの毒性以外にも発症の原因がある可能性も示唆されている。例えば、マイネルト基底核のコリン作動性ニューロンはAD発症の極めて初期に障害を受けるが、この部位ではアミロイドの沈着が見られない。従って、現在ではアミロイドの毒性以外の要因で神経細胞死が引き起こされている可能性を考慮する必要がある。

## 2. 研究の目的

Notchは1回膜貫通型蛋白質(1型膜蛋白質)で、神経細胞の分化において重要な役割をおこなっており、ADやCADASIL等の疾患との関連で注目されている。Notchの細胞内ドメインは、最終的には $\gamma$ -セクレターゼによって細胞膜から切り出され、核に移行して転写因子に結合することにより遺伝子発現を調節していることが知られている。近年になって、多くの1型膜蛋白質が $\gamma$ -セクレターゼによって切断されることにより、その細胞内ドメインが細胞膜から切り出され、それが核に存在すると言うNotchに類似した報告が複数出て来ている。これらの事より、我々は、ある種のレセプター膜蛋白質ではNotch同様に、シグナルを受け取ると最終的に $\gamma$ -セクレターゼによって細胞内ドメインが切り出され、それが核に移行し、転写因子に結合して転写を調節しているのではないかと推測しており、 $\gamma$ -セクレターゼによって調節されるシグナル伝達機構が広く存在する可能性を提唱している。

これらのことより、APPの本来の生理機能もシグナル伝達にあり、それがADの発症にも関係しているのではないかと考えている。実際我々は、 $\gamma$ -セクレターゼによってAPPが切断されるときに $A\beta$ と同時に生じる細胞内ドメイン(AICD)が神経細胞選択的にアポトーシスを誘導することを培

養細胞レベルで示している。これらの結果は、 $A\beta$ の沈着以外にもAPPを介したADの発症に関与する機構が存在する可能性を示唆している。

本共同研究の目的は、このAICDによって誘導される神経細胞死の分子機構を明らかにする事にある。さらに現在、共同研究者の新潟大学脳研究所・横山峯介教授の研究室で作成を続けている、脳内でAICDを発現するトランスジェニックマウス(Tg)を用いて、培養細胞で見られたAICDによって引き起こされる神経細胞死が、より生理的な状態でも起こるのかを調べることにあ

## 3. 研究の方法

AICDを強制発現するembryonic carcinoma細胞(P19細胞)を、レチノイン酸存在下で4日間凝集培養し、その後再度培養皿にまき直して神経細胞へと分化誘導した。アポトーシスの判定は、DNAラダーの検出とTUNEL法によりおこなった。

発現量の解析は、Agilent社のDNAマイクロアレーを用いて、同社のプロトコールに従っておこなった。

tTA依存プロモーター下流にAICDを連結したベクターをマウスの受精卵に注入して、27匹のTgを得た。Jackson研究所から、CamKII $\alpha$ 遺伝子のプロモーターの下流にtTA遺伝子を繋いで作製したTgを入手しこのマウスと掛け合わせ、ダブルTgを得た。

さらに、プリオンプロモーターの下流にAICDを連結し、これを用いてTgの作成を試みた。

## 4. 研究成果

AICDを強制発現するP19細胞を、レチノイン酸処理により神経細胞へと分化誘導した。その結果、AICDを発現するP19細胞が神経細胞へ分化した場合のみ、多数の細胞が神経細胞死をおこした。この細胞死の過程においてDNAラダーが検出され、さらにTUNEL陽性の細胞が見られたため、この細胞死がアポトーシスである事が判明した(図1、図2)。

約2万の遺伝子に関して、この細胞死の過程における発現の変化をDNAマイクロアレーを用いて検討した。その結果、AICDによって約277遺伝子の発現が10倍以上増に増加していた。逆に341遺伝子の発現は、10分の1以下に減少していた。なお、代表的な17遺伝子に関してRT-PCRをおこない発現量を検討したところ、DNAマイクロアレーのデータと高い相関を示した。これらのことから、AICDが多数の遺伝子の発現をダイナミックに変化させている事が明らかになった(図3)。

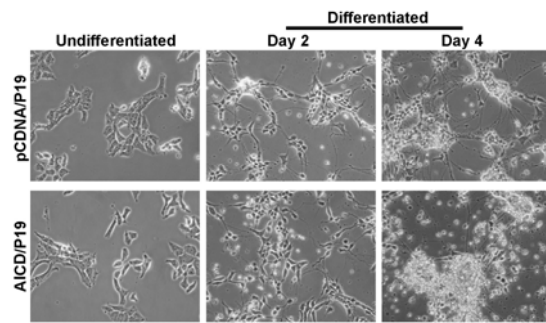


図1. AICD を発現する細胞(AICD/P19)では、神経細胞への分化に伴って細胞死が起るが、AICD を発現しない細胞(pcDNA/P19)では細胞死は起きない。

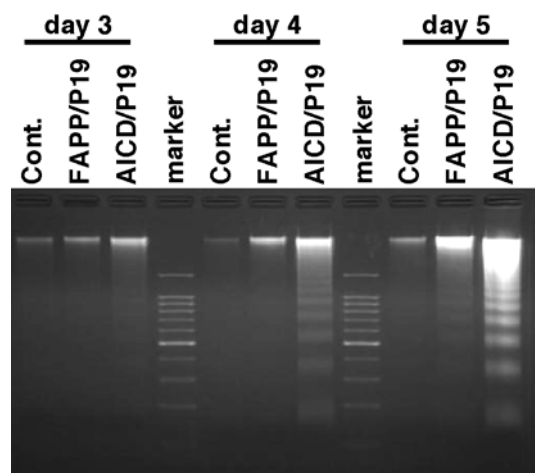
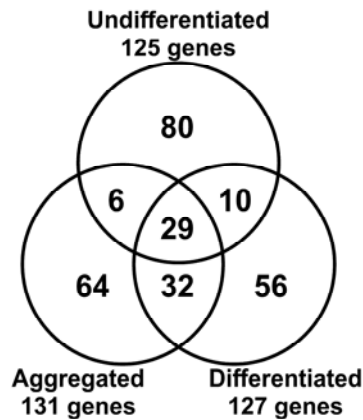


図2. AICD によって誘導される神経特異細胞死は、アポトーシスである。AICD を発現する細胞(AICD/P19)では、神経細胞への分化に伴って DNA ラダーが検出されるが、AICD を発現しない細胞(Cont.)では検出されない。なお、全長の APP を発現している細胞(FAPP/P19)では弱いアポトーシスが見られた。

AICD は神経細胞選択的にアポトーシスを誘導する。この細胞死の過程において、DNA マイクロアレーを用いた解析の結果、1%以上の遺伝子の発現が 10 倍以上増減しており、AICD がダイナミックに多数の遺伝子の発現を変化させている事が明らかとなった。なぜ、AICD がこのように多数の遺伝子の発現に影響するのかという問題に関しては実験を始めたばかりである。しかしながら、AICD が多くの転写因子に結合できるような結果が出始めており、AICD が多くの転写因子の活性に影響する事がその原因ではないかと推測している。

得られた DNA マイクロアレーのデータを基にクラスタリング解析をおこない、発現パターンにより任意に発現量に変化している遺伝子を分類した。さらに各グループにお

### A. 277 up-regulated genes



### B. 341 down-regulated genes

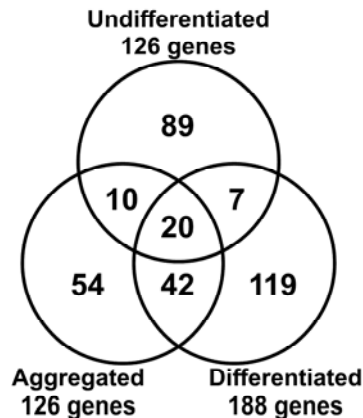


図3. A: AICD によって、発現が 10 倍以上に増強された遺伝子数。B: AICD によって、発現が 1/10 以下に抑制された遺伝子数。

いてパスウエー解析をおこなった。その結果、AICD によって細胞死に関する遺伝子等の発現が特に変化している訳ではない事が明らかとなった。では、なぜアポトーシスが怒っているのかという問題だが、一つの可能性として、あまりにも多くの遺伝子の発現が変化したために細胞の恒常性が壊されて細胞死に至るという事を考えており、今後検討したい。

tTA 依存プロモーター下流に AICD を持つ Tg と、CamKII  $\alpha$  遺伝子のプロモーターの下流に tTA を持つ Tg をかけ合わせて、ダブル Tg を得た。このマウスは CamKII  $\alpha$  遺伝子のプロモーターと tTA を持つために、Dox を除いた場合、生後 1 週目以降の脳でのみ AICD を発現するはずである。しかしながら、タンパク質レベルでの発現は検出できなかった。

また、脳で強い発現を示すプリオンプロモーターを用いて、AICD を脳で発現する Tg の作製も試みたが、やはり AICD のタンパク質レベルでの発現は検出できなかった。

二つの異なる方法で AICD を発現する Tg

の作製を試みたが、タンパク質レベルでの AICD の発現は認められなかったため、今後この原因を検討するとともに、より強力な CAG プロモーターを用いて、再度 AICD を発現する Tg の作製を試みる予定である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

(1) Nakayama K., Nagase T., Koh C.S. and Ohkawara T.,  $\gamma$ -Secretase-Regulated Mechanisms Similar to Notch Signaling May Play a Role in Signaling Events, Including APP Signaling, Which Leads to Alzheimer's Disease., Cell Mol. Neurobiol. 2011, (Review, Epub ahead of print)

(2) Ohkawara T., Nagase T., Koh C.S. and Nakayama K., Amyloid precursor protein intracellular domain alters gene expression and induces neuron-specific apoptosis., 2011, 457, 1-9

(3) Nagase H., Koh C.S., and Nakayama K.  $\gamma$ -Secretase-regulated Signaling Pathways, such as Notch Signaling, Mediate the Differentiation of Hematopoietic Stem Cells, Development of the Immune System, and Peripheral Immune Responses., 2011, 6, 131-141

(4) Nakayama K., Nagase H., Hiratochi M., Koh C.S. and Ohkawara T., Similar mechanisms regulated by  $\gamma$ -secretase are involved in both directions of the bi-directional Notch-Delta signaling pathway as well as playing a potential role in signaling events involving type 1 transmembrane proteins. Current Stem Cell Research and Therapy, 3, 288-302, 2008.

(5) Nakayama K., Ohkawara T., Hiratochi, M., Koh C.S. and Nagase H., The intracellular domain of amyloid precursor protein induces neuron-specific apoptosis. Neuroscience Letters, 444, 127-131, 2008.

[学会発表] (計 4 件)

(1) 大河原剛、長瀬尚史、中山耕造、The intracellular domain of amyloid precursor protein induces the dynamic change of the gene expression profiles. 分子生物学会、横

浜、2009 年 12 月

(2) 中山耕造、長瀬尚史、高昌星、大河原剛、The intracellular domain of amyloid precursor protein induces the dynamic change of the gene expression profile through the process of neuron specific apoptosis. Neuroscience 2009 (北米神経科学会)、シカゴ、USA、2009 年 11 月

(3) 中山耕造、長瀬尚史、高昌星、大河原剛、The intracellular domain of amyloid precursor protein induces neuron specific apoptosis. Neuroscience 2008 (北米神経科学会)、ワシントンDC、USA、2008 年 11 月

(4) 中山耕造、The intracellular domain of amyloid precursor protein induces neuron specific apoptosis. GORDON RESEARCH CONFERENCES、オックスフォード、イギリス、2008 年 8 月

[図書] (計 1 件)

(1) Nakayama K., Nagase H., Hiratochi M., Koh C.S. and Ohkawara T., Do similar mechanisms regulated by  $\gamma$ -secretase play a potential role in signaling events involving type 1 transmembrane proteins including Notch, Delta and APP?, Reserch Advances in Nucleic Acids Research, 2009

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

中山 耕造 (NAKAYAMA KOHZO)  
信州大学・医学部・講師  
研究者番号：70192680

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし

##### (4) 研究協力者

なし