

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 14 日現在

機関番号：83903

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890251

研究課題名（和文） 家族性アルツハイマー病脳内アミロイド形成における
γセクレターゼ機能障害の意義研究課題名（英文） The impact of clinical presenilin mutations on amyloid formation
in the brains of familial Alzheimer disease

研究代表者

及川 尚人 (OIKAWA NAOTO)

国立長寿医療研究センター・認知症先進医療開発センター 治療薬探索研究部・流動研究員

研究者番号：00583585

研究成果の概要（和文）：プレセニリン遺伝子に変異を有する家族性アルツハイマー病における脳内アミロイド形成機序を解明すべく、プレセニリン/γセクレターゼの機能障害及び神経細胞膜脂質（ガングリオシド）のアミロイド形成誘導能に着目し、γセクレターゼ活性低下による神経細胞膜脂質組成の変化の有無について検討した。その結果、神経系培養細胞のγセクレターゼ活性低下により、アミロイド形成起始部である突起末端部においてガングリオシド量の増加が観察された。このことから、プレセニリン遺伝子変異に起因するγセクレターゼ機能障害が、膜脂質環境の変化を介して脳内アミロイド形成を誘導している可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：To clarify the significance of clinical presenilin mutations in amyloid formation in the brains of familial Alzheimer disease, we examined whether γ-secretase inhibition, which seems to be induced by the presenilin mutations, alters the levels of membrane lipids, including GM1-ganglioside, which is an inducer of amyloid formation, in vitro. Under pharmacological inhibition of γ-secretase activity, levels of gangliosides, including GM1-ganglioside, increased at neuritic terminals, which are the initial sites of amyloid formation, of differentiated PC12 cells. This result suggests that clinical presenilin mutations can induce amyloid formation via the alteration of membrane lipid environment in brains.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,210,000	363,000	1,573,000
2011 年度	1,120,000	336,000	1,456,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,330,000	699,000	3,029,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：神経変性疾患、認知症、アルツハイマー病、プレセニリン、γセクレターゼ、アミロイドβプロテイン、アミロイド、ガングリオシド

1. 研究開始当初の背景

(1) プレセニリン (PS) 遺伝子に変異を有する家族性アルツハイマー病 (PS-FAD) 患者の脳においては、孤発性と同等の、もしくはよ

り高度な脳実質におけるアミロイドβ蛋白質 (Aβ) の沈着及びアミロイド形成が観察されている。その分子機序に関しては、PS を活性中心とする Aβ 産生酵素である γセクレタ

一々の機能障害による、高凝集性 AB の産生亢進が要因であるとする説が有力なものとして支持されていた。しかしながら、アミロイド形成の脳領域依存性や沈着したアミロイド形態の特異性など、PS-FAD 脳においては孤発性のそれとは異なる特徴が観察されていることから、AB 産生亢進とは異なる機序が関与している可能性が強く示唆されていた。

(2) アルツハイマー病 (AD) 脳において、細胞膜を構成する脂質の 1 種である GM1-ガングリオシドに結合した AB (GAB) が発見されていた。また、GM1-ガングリオシドが AB の凝集及びアミロイド形成を促進することが *in vitro* 及び *in vivo* で観察されていた。加えて、AB 蓄積の脳領域特異性が当該領域に選択的に発現されるガングリオシドの分子種により決定される可能性や、AB 沈着の起始部であることが示唆されている神経突起末端 (シナプス前膜) において、老化依存的に出現する特異なマイクロドメイン上で GAB が形成されることが報告されていることから、脳内で GAB が形成され、それが “seed” となって可溶性 AB の凝集を誘導していることが強く示唆されていた。

(3) 細胞膜において、ガングリオシドは他の細胞膜構成脂質であるコレステロールやスフィンゴミエリンとともに、マイクロドメイン (ラフト) を形成していることが報告されているが、興味深いことに、GM1-ガングリオシド依存的な AB の細胞膜への結合やアミロイド形成が、コレステロール量の増加及びスフィンゴミエリン量の減少により促進されることが観察されていた。このことから、ガングリオシドを取り巻く脂質環境の変化が GAB 依存的な AB の沈着及びアミロイド形成に影響することが示唆されていた。

(4) 家族性アルツハイマー病 (FAD) 関連遺伝子変異を有する PS の、PS 欠失繊維芽細胞への導入により、細胞内コレステロール量の増加及びスフィンゴミエリン量の減少が報告されていた。加えて、野生型の繊維芽細胞の γ セクレターゼ阻害剤処理により、コレステロール量の増加が観察されていることから、脳内の神経細胞においても PS 遺伝子変異及び γ セクレターゼ活性低下により細胞膜脂質組成が変化することが示唆されていた。

(5) 以上のことから、「FAD 関連変異型 PS → γ セクレターゼ活性低下 → 神経細胞膜脂質特性変化 → AB 凝集・アミロイド形成」の病態カスケードが存在することが想定された。

2. 研究の目的

本研究は PS-FAD の脳内 AB 凝集及び蓄積の分子機序に関して、細胞膜脂質が有する AB 凝集誘導能に着目し、PS 遺伝子の FAD 関連変異による神経細胞膜脂質の組成、分布などの特性変化と、それによる AB 凝集への影響を明らかにすることを目的とした。加えて、PS-FAD における γ セクレターゼ機能障害の、神経細胞膜脂質特性と AB 凝集誘導能への影響を検討し、PS-FAD における γ セクレターゼ機能障害の病理学的意義の解明を目指した。

3. 研究の方法

神経栄養因子 (NGF) を用いて神経様に分化させた PC12 細胞 (PC12N) と γ セクレターゼ阻害剤である DAPT を用いて、 γ セクレターゼ活性低下による細胞膜脂質への影響を検討した。

(1) PC12N を 0.05 μ M ~ 1 μ M の低濃度で 1 日処理し、培養上清中に産生された AB 濃度を測定し、PS 遺伝子変異における γ セクレターゼ活性低下を検討する上での DAPT の最適濃度を検討した。

(2) AB 重合起始部である突起末端部を回収すべく、PC12N をダウンスホモジェナイズしシヨ糖密度勾配遠心法により分画し、突起末端部のマーカー蛋白質であるシナプトフィシン (synaptophysin) 及びアミロイド前駆体蛋白質 (APP) を含む各種オルガネラのマーカー蛋白質 (細胞膜、Annexin II ; 小胞体、Bip/GRP78 ; ゴルジ体、p115, GM130 ; ミトコンドリア、Tom20) を用いたウエスタンブロット法により、突起末端部が回収される画分の同定を試みた。回収された突起末端部を更に浸透圧ショック処理し、遠心操作により細胞膜 (以後 NTPM と称する) を回収した。

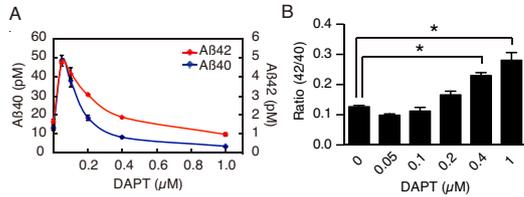
(3) 回収した NTPM の一部を用い、市販の試薬キットによりコレステロール量を測定した。残りの試料は、有機溶媒で全脂質を抽出し、質量分析によりガングリオシド、スフィンゴミエリン、及びフォスファチジルコリン量の測定を行った。

4. 研究成果

(1) 以前より、培養細胞の低濃度の γ セクレターゼ阻害剤処理により、逆説的に AB 産生量が増加することが報告されていた。本研究においても PC12N のごく低濃度の γ セクレターゼ阻害剤処理により AB 産生量が増加することが観察された (図 1 A)。加えて、AB 産生量が減少する程度の γ セクレターゼ活性阻害において、低及び抗凝集性の AB 分子種である AB40 の産生量に対する、高凝集性の AB 分子種である AB42 の産生量の比率が上昇していた (図 1 B)。変異型の PS を発現する培

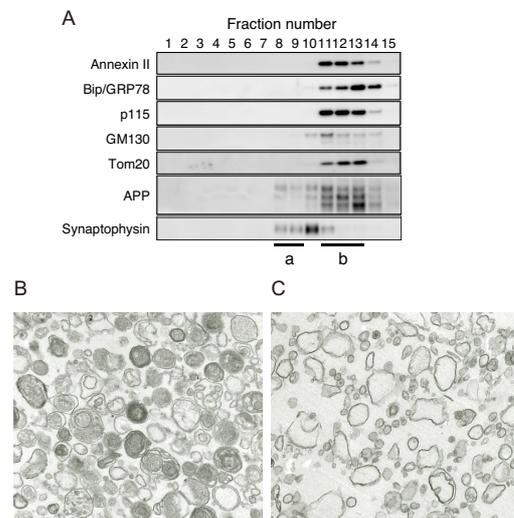
養細胞において、AB 産生量の低下及び AB42/40 比率の上昇が観察されていることから、本実験の結果より、PS 遺伝子変異によって γ セクレターゼの活性低下が生じている可能性が示唆された。

図 1



(2) 神経及び神経様培養細胞において生化学的に突起末端部の細胞膜を回収し解析した報告はなかった。本研究では PC12N において、緩やかな細胞破碎及びシヨ糖密度勾配遠心法により、突起末端部マーカー蛋白質が豊富に存在する突起末端部試料 (図 2 A-a) と、小胞体やゴルジ体、ミトコンドリアなどのマーカー蛋白質が豊富な細胞体試料 (図 2 A-b) を分画することに成功した。また、浸透圧シヨック処理による、突起末端部試料 (図 2 B) からの細胞膜試料 (NTPM) (図 2 C) の回収方法を確立した。

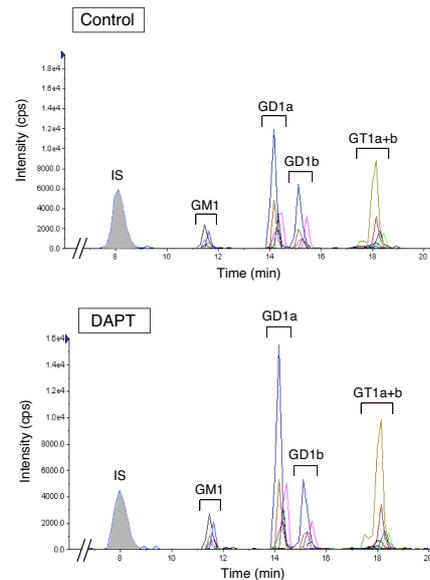
図 2



(3) 膜脂質依存的なアミロイド形成の分子機序の解明にあたっては、細胞全体の脂質変動ではなく、アミロイド形成起始部である突起末端部の脂質動態を観察することが必要である。しかしながら、これまでの報告においては、変異型 PS 及び γ セクレターゼ活性阻害の効果を、培養細胞全体を対象に議論していた。今回、上記で確立した方法により回収した PC12N の NTPM と細胞体試料について

脂質解析を行ったところ、コレステロール、スフィンゴミエリン、及び細胞膜を構成するリン脂質の大半を占めるフォスファチジルコリンについては、NTPM、細胞体試料ともに γ セクレターゼ活性阻害 (1 μM DAPT 処理) による量的変化は観察されなかった。一方で、 γ セクレターゼ活性阻害により、NTPM において GM1、GD1a、GT1a+b-ガングリオシド量の増加が観察された (図 3)。このことから、 γ セクレターゼ活性の低下により、突起末端部局所特異的に、ガングリオシド代謝が変化している可能性が示唆された。

図 3



(4) FAD 脳内アミロイド形成における PS 遺伝子変異の意義としては、その発見当初より、「 γ セクレターゼ活性の亢進による AB42/40 比率の上昇が主な原因である」との考えが主流である。しかしながら近年の詳細な検討により、 γ セクレターゼ活性の亢進に関しては、PS 遺伝子変異によって AB の産生量が減少すること、低濃度の γ セクレターゼ阻害剤処理により産生される AB42/40 比率が上昇することなどが観察されていることから、実際には γ セクレターゼ活性が低下していることが強く示唆されている。また、AB 産生量及び AB42/40 の比率に関しても、本研究を開始した年に報告された γ セクレターゼ活性をほぼ完全に消失した PS 遺伝子変異を筆頭に、AB42/40 比率にはほぼ変化が生じていない遺伝子変異も報告されている。これらの事実は、PS 遺伝子変異においては γ セクレターゼの活性が低下しており、また、産生された AB の量的もしくは質的变化以外の要因が脳内アミロイド形成に寄与している可能性を強く示唆している。本研究では、 γ セクレターゼの活性低下により、アミロイド形成起始部

である突起末端部において、アミロイド形成誘導能を有するガングリオシドの量が増加していることを初めて報告した。AD脳において、アミロイドの沈着を伴う神経突起末端部において GM1-ガングリオシドが増加していること、ラフトにおいて GM1-ガングリオシドが増加していることが報告されていることから、PS 遺伝子変異が神経細胞膜脂質の変化を介して脳内アミロイド形成に寄与している可能性が伺われる。脳実質側、すなわち細胞膜の脂質変化に焦点を当てて PS 遺伝子変異における分子病態を追求する研究は世界的に見ても極めて稀である。しかしながら、近年、AD脳における細胞膜脂質の量的及び質的变化や、 γ セクレターゼ活性への細胞膜脂質組成及び脂肪酸鎖長の影響が多数報告されていることから、今後膜を対象とした AD病態解析が重要な課題の一つになってくると思われる。今後、本研究については、遺伝子ノックインマウスや患者由来の iPSC 細胞を対象に、細胞膜脂質の変化のみならず、PS 遺伝子及び γ セクレターゼ活性低下と脂質変化をつなぐ分子機序についても追求すべく発展させるべきであろう。

(2) 研究分担者 ()

研究者番号 :

(3) 連携研究者 ()

研究者番号 :

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)

[学会発表] (計 2 件)

- ① Naoto Oikawa, Miho Goto, Kazutaka Ikeda, Ryo Taguchi, Katsuhiko Yanagisawa, Inhibition of γ -secretase activity increases ganglioside levels at neuritic terminals of differentiated PC12, 3rd international symposium of Nagoya university global COE, December 9, 2011, Nagoya
- ② Naoto Oikawa, Miho Goto, Kazutaka Ikeda, Ryo Taguchi, Katsuhiko Yanagisawa, Suppression of γ -secretase activity increases ganglioside levels at neuritic terminals of differentiated PC12, 2012 ASBMB annual meeting, April 23, 2012, San Diego

6. 研究組織

(1) 研究代表者

及川 尚人 (OIKAWA NAOTO)

国立長寿医療研究センター・認知症先進医療開発センター 治療薬探索研究部・流動研究員

研究者番号 : 00583585