

平成21年 5月22日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008年度
 課題番号：19591367
 研究課題名（和文） アミロイドベータに対する中枢神経細胞の防御機能に関する研究：遺伝子修復の観点から
 研究課題名（英文） Study about defense function against amyloid-beta toxicity to central nervous system cells: from the viewpoint of DNA repair
 研究代表者
 岸本 年史（KISHIMOTO TOSHIFUMI）
 奈良県立医科大学・医学部・教授
 研究者番号：60201456

研究成果の概要：アルツハイマー病の原因として考えられているアミロイドベータ（ $A\beta$ ）が集まってできる重合体の作製条件を検討、調整した。そして、この重合体が神経系の細胞であるN2a neuroblastoma 細胞に与える細胞毒性について調べた。加える $A\beta$ 重合体の濃度が高くなるにつれて、細胞死がより生じることが確認された。また、 $A\beta$ による細胞死の機序として活性酸素が関与しているのかについて検討した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,700,000	510,000	2,210,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：アミロイドベータ重合体、神経毒性、DNA損傷、DNA修復

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病（AD）は認知症の代表的な疾患の1つで、原因としてはアミロイドベータ（ $A\beta$ ）仮説が提唱されています。これは脳内において神経細胞膜上にあるアミロイド前駆体蛋白から酵素により切り出された可溶性の $A\beta$ 蛋白質が重合、凝集そして蓄積し不溶化した結果、神経細胞死を引き起こし、ADに特徴的な老人斑や神経原線維変化を呈してくるというものです。しかし、蓄積した $A\beta$ が神経細胞死を引き起こすとしても、実際には、神経細胞死が生じる前（10数年以上前）から認知機能上の障害が出現しており、どういったメカニズムが脳内で生じ

ているのか未だ結論が出ていません。1つの可能性として、蓄積する前段階の $A\beta$ が、重合した結果、神経細胞の NMDA 受容体を介して、長期増強（LTP）などの記憶のメカニズムに影響を与える可能性があります。しかし、こうした神経毒性による DNA 損傷の可能性やその修復といった生体の防御する側についての研究は極めて少ないのが現状です。染色体 DNA の損傷には、塩基の加水分解、アルキル化、酸素ラジカルによるものや、一本鎖 DNA 切断があり、これには塩基除去修復（BER）が働くことが知られています。また、脳内ではヌクレオチド除去修復（NER）による修復が必要な酸化的 DNA 損傷が生じるとも報告

(Brooks PJ, JBC, 29: 22355-22362, 2000) されており、こうした修復機構は脳内において欠かせないものとなっています。事実、NER 欠損遺伝病である色素性乾皮症患者では進行性の神経障害を発症することが知られています。これまで、ADでは、対照者と比べて、大脳皮質において2倍高い頻度で一本鎖切断によるDNA損傷を認めたとする報告(Davydov V, Neurobiology of Aging, 24: 771-776, 2003)、酸化された塩基を取り除く修復メカニズムの欠損(Lovell MA, J Neurochemistry, 24: 771-776, 1999)そしてA β 蛋白質が培養神経細胞に対して酸化ストレスを促進するという報告(Yatin SM, J Mol. Neurosci. 11: 183-197, 1998)を認めています。しかしながら、NERに関する報告はほとんど認めていません。

脳内におけるA β による影響を、このようなDNA損傷・修復という観点から検討することは新たな治療法を提示する可能性があります。

2. 研究の目的

申請者は、神経およびアストロサイトの培養細胞を用いて、A β 蛋白質がDNAに及ぼす影響(細胞毒性など)とその修復について検討した。

3. 研究の方法

(1) 神経系セルラインであるN2a neuroblastoma細胞に対するA β の細胞毒性について検討した。

①A β の重合体の作成

Human A β 42 (ペプチド研究所) をジメチルスルホキシドに溶解し、超音波処理後、リン酸緩衝食塩水、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)を加えて37°Cで6時間反応させる。さらに希釈をしてから同様に18時間放置した。重合体の確認のため、15%ポリアクリルアミドゲルを用いたSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を施行した。

②A β による細胞毒性の確認(MTS*アッセイ)

*MTS:3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium

N2a細胞を96well plateに3000 cells/well 蒔き、37°C、4時間培養後、A β 重合体を含む溶液(最終の全A β 濃度、1、2、5、そして10 μ M)を添加し、4日後にMTSアッセイを行った。培養液のみのグループ(以下GM)を対照とした。

MTSアッセイは、MTSが生細胞の働きにより、発色性のホルマザンに変換されることを利用し、細胞増殖および細胞毒性試験における生細胞率を測定する方法である。

(2) A β によって誘導される細胞死が、酸化ストレスに保護的に働くglutathioneにより阻害を受けるかについて検討した。

(1) ②の実験と同様に、N2a細胞を用いて、細胞播種4時間後に、最終濃度A β 10 μ Mとglutathione(0、100、200、そして300 μ M)を合わせて添加し、4日後にMTSアッセイを行った。

4. 研究成果

(1)

①重合体作製のための条件を検討し、最終的に、4kDa(A β 単量体)と15-20kDa付近に2本のバンド(A β 重合体)が検出された。

②A β を含む溶液と同じ組成の溶媒のみで刺激した場合の細胞死の割合を差し引いても、A β 重合体を含む溶液で、濃度依存性に細胞死が認められた(図1)。

A β 重合体溶液10 μ M、4日間で、生存率は26.2%まで低下した。一元配置分散分析(ANOVA)にて統計学的な有意差(P<0.01)を認め、対照との多重比較(Turkey test)では、5、10 μ Mにおいて有意な(P<0.001)低下を認めた。

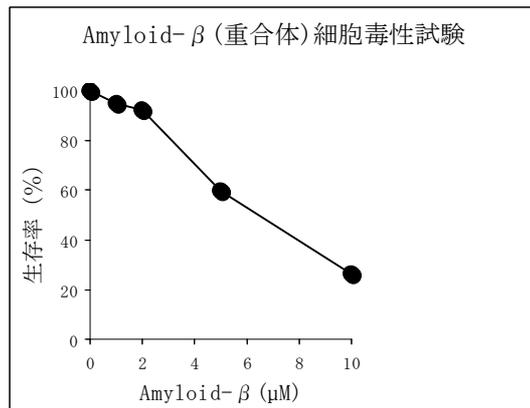


図1(各々の濃度につきn=4)

(2) どの濃度のglutathione併用群においても、A β 単独群と同様に、細胞毒性が生じていた(図2)。

A β 単独群とglutathione併用群とのANOVAにて、統計学的な有意差(P<0.01)を認め、単独群との多重比較(Turkey test)では、50 μ M併用群を除いて、単独群よりも有意な低下を認めた(図2)。これらの結果から、glutathioneは、同時に投与した場合、A β 重合体による4日間の刺激による細胞毒性を防御しないことが示された。

A β による酸化ストレス、少なくともA β 重合体による細胞毒性に対し、同時投与では、glutathioneが防御的に働く可能性は否定された。しかし、今回の実験系では、A β とglutathioneを同時投与の影響があるため、

さらに条件を変えた追試が必要である。つまり、先に glutathione を1時間ほど作用させた後に、A β 重合体を加えるなどである。

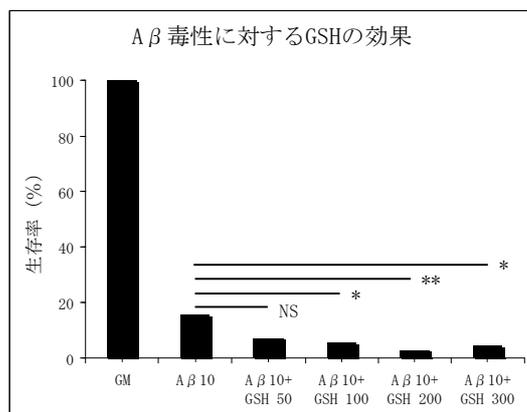


図2 (各々の濃度につき n=4)
NS: nonsignificant、*P<0.05、**P<0.01

(3) 考察並びに今後の展望

A β 誘導性細胞毒性は、過剰な活性酸素種 (ROS) の産生とアポトーシスがメカニズムとして考えられてきており、この酸化ストレスは、ADの発展と進行における重要な要因を占めている。

一方、Glutathione (GSH) は、内因性の非酵素的抗酸化物質、oxyradical スカベンジャーとして、広く認知されており、フリーラジカルによる酸化ストレスに対する防御と脂質の過酸化とDNA損傷を抑制し、細胞分裂、DNA修復、酵素活性の調整、転写因子の活性化、陰イオンと陽イオンのホメオスターシスの調整、そして酸化損傷に対する防御を含めた代謝過程の広範囲に渡って関係している。また、神経系はとりわけ酸化損傷に対して影響を受けやすく、Glutathione による防御に依存しているとされている

(Woltjer RL, J Neurochemistry 93: 1047-1056, 2005)。

こうした背景から、GSHによる保護効果の検討を行ったわけであるが、今回の実験系からはそれを示すことができなかった。考えられる問題点としては、GSHがその保護効果をもたらすためには、細胞内に取り込まれる必要性があり、今回A β 重合体と同時に投与をしたため、細胞毒性に保護的に働くに十分な細胞内の濃度まで上昇しなかった可能性がある。また、刺激後、十分な神経細胞死が生じる4日後に設定したことで、当初は保護されていたが、その時間的な限界点を超過してしまっていた可能性がある。これを確認するためには、継時的な実験系での検討が必要である。また、推測の域はでないが、同時投与したことで、GSHが逆に毒性を強める方向に働いた可能性も否定はできない。統計学的には、A β 単独群と比較して、併用群において有意な差を認めており、さらなる検討が

必要である。

今回の実験では、A β による刺激濃度が従来の報告と比べて高くなっているが、これは完全に純粋なA β 重合体の濃度ではなく、単量体も含めているため、全体としての濃度が高くなっているものと考えられた。

今後、作用機序の異なる抗酸化物質も試み、A β 重合体の酸化ストレスに関与していることを確認し、その後、酸化損傷の程度の測定と修復能の検討を行う予定である。

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 2件)

①Nishiwaki T, Kobayashi N, Iwamoto T, Yamamoto A, Sugiura S, Liu YC, Sarasin A, Okahashi Y, Hirano M, Ueno S, Mori T. Comparative study of nucleotide excision repair defects between XPD-mutated fibroblasts derived from trichothiodystrophy and xeroderma pigmentosum patients. DNA repair, 7 : 1990-1998, 2008年、査読有

②吉岡玲、山本亜弥、森俊雄、中村祐、森川将行、芳野浩樹、木内邦明、牧之段学、岸本年史、神経芽細胞腫由来 N2a 細胞株におけるエストロゲンのヌクレオチド除去修復に対する効果、日本神経精神薬理学雑誌、27巻、77-83、2007年、査読有

〔学会発表〕(計 2件)

①森川将行、認知機能進行予防へのアプローチ、第15回日本行動医学会学術総会、2009年3月1日、大阪人間科学大学庄屋学会

②森俊雄、XPD 変異を共通する二つの遺伝疾患で紫外線皮膚がん頻度に大差が生じる機構の解析、第30回日本光医学・光生物学会、2008年7月11日、島根県医師会館

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岸本 年史 (KISHIMOTO TOSHIFUMI)
奈良県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：60201456

(2) 研究分担者

森 俊雄 (MORI TOSHIO)
奈良県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号：10115280

(3) 連携研究者

森川 将行 (MORIKAWA MASAYUKI)

奈良県立医科大学・医学部・博士研究員
研究者番号：30305726

岩本 顕聡 (IWAMOTO TAKAAKI)
奈良県立医科大学・医学部・博士研究員
研究者番号：20448773