北陸大学　紀要
第25号（2001）
pp. 1〜14

アルツハイマー病に関する研究現状とその防御モデル実験

毛　利　哲　郎*, 千　葉　賢　三*, 高　寺　恒　雄*,
山　崎　眞津美*, 郡　山　恵　樹*

A Short Review of Recent Studies of Alzheimer's Disease and Our Model Experiment for Neuronal Protection

Tetsuro Mohri*, Kenzo Chiba*, Tsuneo Takadera*,
Matsumi Yamazaki*, Yoshiki Koriyama*

Received November 1, 2001

Ⅰ　まえおき

20世紀初頭，ドイツのA.Alzheimerが，55歳で亡くなった女性の脳を解剖して，初めてその変化の特徴を学会に発表したいわゆるアルツハイマー病（これは元来，初老期に発症し，後に述べるような，脳組織の病理変化を特徴とする痴ほう性疾患に対する名称であったが，今日では重い老人性痴ほうのうち，循環系障害と関係のない患者に対しても広く使われる）は，高齢社会への推移とともに患者は増加し，我が国でも近年，老人性痴ほう患者の過半数を占めるようになった。因みに60歳以上の老人性痴ほう患者の総数は正確にはつかみ難いが，我が国では平成12年で160万人といわれる。

高齢発症にしろ初老期発症にしろ，今日までに，数少ない明らかに家族性（親族に多発するケース）の発症患者から何十種類もの関連遺伝子変異が発見されているが，大部分を占める弧発性の患者には遺伝的要因はないものと考えられ，従って長期間にわたる後生的な環境因子，あるいはトラウマ，栄養的因子，活性酸素種，および老化とある種の蛋白質あるいは脂質蛋白質の有無によるリスクファクターなどの発症要因も重要であると現在推定されている。

以下，そのようなアルツハイマー病の直接的な病因と成因のメカニズム，ならびに治療薬の現状について，要点をまとめ，考察するとともに，我々のモデル実験を紹介したい。

Ⅱ　病理変化

アルツハイマー病患者の死後解剖において，その脳に特徴的な次の三点の病理的変化がみられる。

＊薬　学　部
Faculty of Pharmaceutical Sciences

a　老人斑（senile plaque）と呼ばれる特異的な染色像（図１）が，大脳皮質連合野（特に前頭葉，頭頂葉，側頭葉の新皮質）と海馬などの大脳辺縁系（古皮質といわれる）に極めて数多く散在する。その部分の神経細胞は破壊されており，特殊なβアミロイド蛋白質を主とするコア蛋白質を中心にした沈着物が共通して存在する。この沈着物は正常脳にも見られることがあり，年令とともに数が増えるようである。その全体的な数は必ずしも痴ほうの進行とは関係がないが，アルツハイマー病では斑紋が大きく，10年以上の長いスパンで徐々にβアミロイド蛋白質が蓄積されるものらしい。高齢者では細動脈の血管壁にもアミロイド蛋白質が沈着する。

b　神経原繊維様凝集体（neurofibrillary tangle）。これも特殊な染色法によって明らかにされた神経細胞死の病理像である（図１）。神経原繊維様凝集体というのは，一般の細胞や神経細胞の軸索（アクソン）の中心部にある微小管の付随蛋白質であるタウ蛋白質が変性してできる，２本のフィラメント（PHF）がより合わさった凝集物のことである。タウ蛋白質は微小管の重合，さらに細胞の形態保持に寄与しているが，これが変性すると神経細胞は破壊される。老人斑のみ多くても痴ほうの症状は現われず，痴ほう患者では更にこの神経原繊維様凝集体が見られるのが普通である。

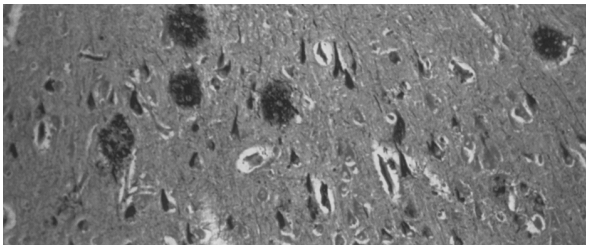


図１　アルツハイマー病患者（死後）の脳皮質切片の染色図。
特殊な染色で，老人斑が黒いしみ（５ケ所）のようにうき出ている。黒く細長い多くの染色像は，神経細胞が変性して，神経原繊維様凝集体が残ったものである。
平野朝雄（編著）カラーアトラス神経病理（２版），医学書院，1988年，96頁

c　神経細胞の萎縮・脱落

上記のような神経細胞死が見られる一方，それらの周辺でも神経細胞やその突起の変性・脱落や萎縮が見られる。従って脳皮質表面の溝の間隙が広くなり，脳実質が小さくなる（図２）。

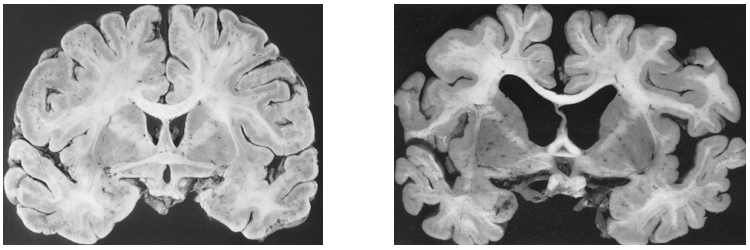
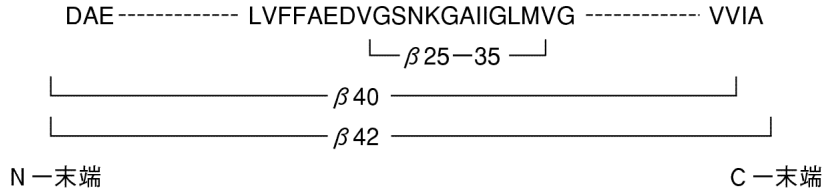


図２　脳前額断面図。左は正常脳。右はアルツハイマー病脳で，脳室および周辺の空間が拡大している。図１と同じ出典（32頁および35頁）。

III 直接的な病因について

1984年になって，カリフォルニア大学のG.G.Glenner[1]らによって，老人斑や血管壁アミロイドを形成する主蛋白質として，βアミロイド蛋白質（AP）が苦労の末同定されたが，この蛋白質は40または42個のアミノ酸残基が連結した難溶性のペプチドである（図３）。



各アルファベットはそれぞれ特定のアミノ酸残基を示す（例えばDはアスパラギン酸，Aはアラニン，Eはグルタミン酸，Vはバリンの略号）

図３ ヒトβアミロイド蛋白質（AP）のアミノ酸配列

C末端側に疎水性アミノ酸が並んでおり，分光学的な研究から，この分子の重合体が緩衝液（中性）中で時間的経過により順次βシート型の二次構造をとって，ますます難溶性の蛋白質繊維を形成して，酵素により加水分解され難くなることがわかった。老人斑ではこれに数種の付随蛋白質が共存しているようである。

しかし元々APはアミノ酸残基数695〜770の前駆体（３種）蛋白質（APP）として各組織の細胞により生合成され，それが一部分解（プロセシング）を受けて，主に40残基のペプチド（AP40）として，体液にも分泌されていて，通常に存在するものである。APPの構造を決定する遺伝子はヒトの第21番染色体にあることが分かっている。この遺伝子の祖先と思われるものはハエや寄生虫の仲間の線虫にもある。但しAPPがプロセシングを受けて，その一部がある種の蛋白質加水分解酵素阻害物質になるという以外，APPの生理的な意義については不明である。

アルツハイマー病や高齢者では，より難溶性の42残基のペプチド（AP42）の割合がAP産生の中で高くなり，脳に沈着し易くなるのではないかと言われている[2]。脳のAPは神経細胞だけではなく，それをとりまく細胞（一般にグリア細胞と言われる）でも産生される可能性がある。従って沈着し易いAP42の産生増強がこれらの細胞のいずれか，あるいはすべてで起こるのであろう。

APは生成の過程で他の分泌蛋白質と同じように，細胞のゴルジ体や形質膜（細胞膜）などの膜構造（これらは共通して脂質の分子層が二層構造をとり，内部は疎水性で，レセプターや蛋白質のプロセシング酵素もある）を経過していったん細胞外へ放出されるものと考えられる。1990年ハーバード大学のB.A.YanknerらはこのAP，あるいはC末端側の11残基（25〜35位）の疎水性フラグメントの重合体が，ラット大脳海馬の神経細胞の培養系に対して，直接致死毒性を示すことを証明した[3]。このように，本来産生されているAPPなり，その分解物であるAPペプチドが，神経細胞に毒性を示すのは何故か。

考えられる一つの理由は，APPからβアミロイド蛋白質への変換の異常な亢進である。APPが細胞で産生されると，これは小胞体やゴルジ体，リソソーム（エンドソーム），形質膜などの細胞小器官のいずれかにあると思われる三種の蛋白質分解酵素（α，β，γの各セクレターゼ）（図４）によりAPあるいは無害（生理活性があるという説もある）なペプチドとなって細胞外に放出されるものと考えられる。AP産生の異常な亢進を起こす原因と考えられる事実として，稀ではあるが家族性アルツハイマー病患者の一部からAPP遺伝子そのものの変異（５種）が見つかった。遺伝子変異は，APP蛋白質がAPに変換する過程で酵素分解（特にβとγセクレターゼで）される部位の近くで起こっており，このことがAPの産生を選択的に増強すると考えられるのである。

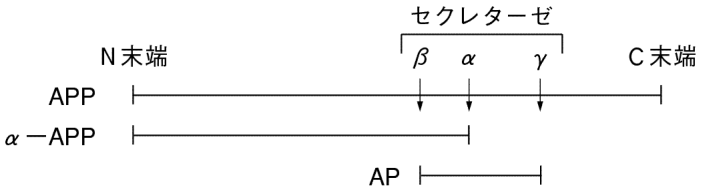


図４　AP前駆体（APP）から，種々加水分解酵素（セクレターゼ）によって，ペプチドが生成する模式図

その後関連遺伝子変異が多く発見されたが，それはヒト14番染色体のプレセニリン１遺伝子の異常と，１番染色体のプレセニリン２遺伝子の異常である。この２種のプレセニリンも本来正常な，互いに相同性の高い，形質膜内在蛋白質である。これらの蛋白質の生理的な役割も現在のところ不明である。ともにAPPからAPの切り出しに影響していることが考えられる（表１，染色体と遺伝子）。プレセニリン１遺伝子の変異は40種以上家族性アルツハイマー病患者から見い出されていて，すべての場合特にAP42の産生を増強するらしい。家族性アルツハイマー病に関連した遺伝子変異では，現在プレセニリン１の変異の例が最も多い。プレセニリン１の変異をもつネズミでもAP42の特異的な産生亢進が証明されている。

表１　家族性アルツハイマー病関連蛋白質遺伝子と発症との関係

蛋　白　質	遺伝子のある染色体番号	発症との関連
βアミロイド蛋白質の前駆体（APP）（変異体）	21	βアミロイド蛋白質（AP）産生増強 50代で発症
アポリポ蛋白質E4	19	老人斑形成の促進 60代以上で発症
プレセニリン１（変異体）	14	β１－42産生増強 40代で発症
プレセニリン２（変異体）	1	β１－42産生増強 50代で発症

最近の研究から，プレセニリン１はAPのＣ末端側切断酵素として想定されているγセクレターゼそのものではないかと推定されている[4]。しかし正常人にも多いAP40とアルツハイマー病老人斑に増えるAP42とは，APのＣ末端側でアミノ酸が切られる位置が少し違うだけであるから，それだけのためにプレセニリン１の40種以上のさまざまな遺伝子変異が必要なのだろうか。因みにプレセニリンの遺伝子は人の寄生虫に近縁の線虫にもあり，それより進化した動物にもAPPの遺伝子は広く受け継がれていると思われるので，これらの蛋白質が細胞毒性をもたらすためだけにあるということも考え難い。

一方APのＮ末端側切断に働くと想定されているβセクレターゼは神経細胞に活性が高いと言われ，毒性の神経細胞特異性を説明するには好都合である。この条件に合致する酵素としてBACE１とBACE２という蛋白質が報告されており，特に前者が脳と膵臓に多いので，こちらの方がβセクレターゼそのものではないかと言われている[5]。

しかし，このようにAP産生亢進の原因が，APPとプレセニリン１，２の遺伝子変異にあると考えられる家族性アルツハイマー病例は，全部合わせてもアルツハイマー病発症全体のごく一部でしかない。大部分のいわゆる孤発性（家族に患者例がない），あるいは老人性の痴ほうの根本原因はまだよくわかっていないのである。図５にアルツハイマー病発症の過程を簡単にまとめた[6]。

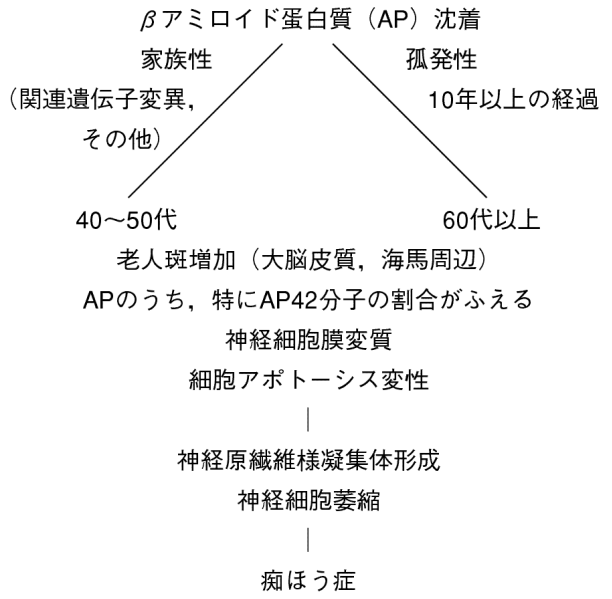


図５　アルツハイマー病発症過程

Ⅳ　リスクファクターとしてのアポリポ蛋白質E4

血中脂質やコレステロールを運ぶ役割をしている比重の小さなリポ蛋白質（脂質蛋白質）の蛋白質成分の一つであるアポ蛋白質Ｅ（２〜４の三つのタイプがある）のうちのE4型というのを多く持っている人は，高齢になったりAP産生過剰と重なると，アルツハイマー病になり

易いことが，疫学的に明らかになった[7]。その遺伝子ε4を19番染色体の対立遺伝子としてホモ（２倍）に持っている人が家族にいると，アルツハイマー病を高齢発症する確率が高い。その理由は明らかではないが，E4型のアポ蛋白質（あるいはそれを有するリポ蛋白質）が，AP蓄積あるいはその毒性発現に働くと考えられる。アポリポ蛋白質E4は他のタイプのＥよりも抗酸化作用（酸化ストレスを抑える作用）が弱いということも関係しているかもしれない。因みに，クロイツフェルト・ヤコブ病（牛の狂牛病に似たヒトの脳変性疾患）の発症にもアポリポ蛋白質E4が関係すると言われる。

Ⅴ　その他のリスクファクターと生理的な要因

弧発性のアルツハイマー病患者について，またほとんどの家族性アルツハイマー病患者についても，未だに上記のいずれが本当の原因であるのか決め難いのが実情である。これらの患者では老人斑の数が同年輩の正常人の脳と変わらないにもかかわらず，神経細胞の萎縮・脱落が見られることがある。その原因としてあげられるものは，過去の強度の頭部打撲（トラウマ），精神的ストレス，過酸化脂質や活性酸素による酸化ストレスの蓄積，エストロゲン分泌減少（女性），ビタミン（B1，B2，βカロチン，葉酸）や多価不飽和脂肪酸（リノレン酸，エイコサペンタエン酸，ドコサヘキサエン酸）の摂取不足などがある。

ところでアスピリンやその外の抗炎症剤で治療している人には，統計的に有意にアルツハイマー病の発症が少ないと言われる[8]。このことから，脳に何らかの原因で炎症が起こることがその機能障害をもたらすのであろうという考えもある。しかし，結果的には炎症が起こるとしても，それが痴ほうの原因であるとする確証はまだないし，それぞれの薬には副作用もあることであり，不必要に抗炎症剤を予防的に使用することは別の障害をもたらすので，今のままでその目的に使うことはできない。勿論その効果のメカニズムが明らかになれば，アルツハイマー病の進行をとめる薬を開発するヒントにはなるかもしれない。一方日本人の研究者らによって，APを分解する酵素（ネプリライシン，本来はエンドルフィンなどの脳ペプチドを分解することで見つかった）の発現が少ないマウスでは　AP42の脳（特に海馬）蓄積が多いことが最近明らかにされた[9]。ヒトでも老齢によってこの酵素の脳での活性が衰えることが，AP蓄積のひとつの原因なのかもしれない。因みに男性ではネプリライシンの発現が多い。

また日本の他のグループは，APP産生の過剰やプレセニリン変異などの原因で培養マウス脳神経細胞が死ぬ条件を設定し，そこでヒューマニンと名付けた蛋白質を培地に加えると，細胞死を防ぐことができることを発表した[10]。この蛋白質は本来心臓，骨格筋，腎臓，肝細胞などから分泌されていると考えられるので，生理的に神経細胞の外から作用してその細胞死を防いでいる可能性がある。また逆にパル４と名付けられた，細胞死を助長する蛋白質がアルツハイマー病脳（特に海馬）に多いことがわかり，この蛋白質とAPによる神経細胞死との関係を探るために，この蛋白質を発現する海馬細胞を培養し，培地からパル４を除いたところ，そのグループではAPによる細胞死が著しく低下したとアメリカのグループが発表した[11]。APは本来身体の常成分であるから，その異常な増加によって起こされる細胞の障害が，さらに別の蛋白質の存在により影響を受けるというメカニズムが生理的に備わっていることはあり得ることであり，アルツハイマー病の予防と治療を考えるヒントになる事実である。一般的に，種々の

神経細胞死（酸欠などによる）に際して防護的に働く蛋白質が誘導的，選択的に産生されるという報告はいくつかある。

VI　APの神経細胞に対する毒性メカニズム

上記のように間接的な原因，あるいはリスクファクターなどの影響によってアルツハイマー病の発症が促進されることはあるのであろうが，結果的には患者の脳に必ずおびただしい数の老人斑がみられることから，最近ではそこに存在するAPがアルツハイマー病の直接の原因であろうというのが大勢の見方である。

前脳にあるアセチルコリン伝達系大型神経細胞が海馬や大脳皮質に常に刺激を送っていないと，これらの支配領域の神経は退化，脱落する。アルツハイマー病患者においては，結果的にその大型神経細胞が不活化しており，そのことから対症療法的にアセチルコリンを強化することを目的として，いままでは治療薬が考えられてきた。現在アルツハイマー病専門薬として実用化されているアリセプト（ドネペジル）などはこのようなコンセプトから生れた[12)]。しかしこの薬は病気の原因を抑えるものではないので，アセチルコリン系の損傷の程度如何（重症度）によって薬の効果は異なるようである。

前述したように，APには培養した海馬の細胞に対する直接的な致死効果があることが報告されてから，我々の研究室では，その翌年（1991年）にいち早くAPやその毒性フラグメントの神経作用の検討を始めた。当時はまだ日本ではAPが市販では手に入らなかったので，短いフラグメント（25〜35位の11アミノ酸残基と22〜35位の14アミノ酸残基からなる２種のペプチド）を本学の生物薬品化学教室でペプチド合成していただき，それを用いて実験を始めた。後で知ったことであるが，海馬神経細胞に対するAPの直接作用を明らかにしたB.A.Yanknerはハーバード大学医学部教授であるが，当時あまり学会に信用がなく，彼の研究業績はアメリカではかなり叩かれていたらしい。

それは別にしても，同じ脳神経細胞（ラット）でも大脳新皮質や小脳の神経は海馬の神経に比較してなぜかAPの毒性に対して強いとか，培養神経に毒性を示すAPの濃度はかなり高い（10μモル以上）など不可解な実験事実が当時あった。またAPあるいはそのフラグメントも，合成したてのものはモノマーであり，そのままでは細胞に毒性を示さないということが初めはわからなかった。当初そのような不明な現象がいくつか指摘されて，APの直接的な毒性効果に対して一時は疑問がもたれた。その後APを塩類溶液（pH7.4）中で約１週間放置する（ageingという）と沈澱が現れて，それを培地で薄めても大部分は溶けないが，むしろ海馬，皮質に毒性が強くなることが経験的にわかってきた[13)]。沈澱には種々のオリゴマー，ポリマーなど重合の度合いの異なる分子が混在している可能性があり，毒性を示すのは低位の重合体ではないかと思われる。

海馬は特にAPの毒性に対する感受性が高い脳部位で，またこの領域は最近では大脳新皮質とともに学習・記憶の形成（特に事実の認知，文言の記憶はまずここで保持され，整理され，また増強されてから新皮質で貯蔵される）に重要な働きをしているものと考えられているので，この領域の神経障害は，従って健忘症，痴呆症の成立に深くかかわっていると思われ，海馬を含む大脳辺縁系は高度脳機能研究のポイントの一つである[14)]。大脳辺縁系はウサギ，ネコ，サ

ルの方がヒトよりも脳全体に占める割合が高く，このことは高等動物の基本的な学習・記憶のメカニズムにおいて，辺縁系が重要な器官であることを示している。

我々はラットの妊娠後18日目の胎仔の海馬（神経細胞が分化しつつある段階の細胞）を切り出し，トリプシン処理によって細胞を分離し，DMEM培地（牛血清を添加）を入れて，培養プレートに付着させて培養した[15)]。インキュベーターは10%のCO2を含む空気を流す。温度は37℃である。神経組織には神経細胞とそれをとりまくグリア細胞があり，後者はより速く増殖するので，cytosine arabinosideを加えて，増殖細胞（DNA合成が盛んである）を押さえて神経細胞を残した。そこで培地を取り替えて（血清を除く）APを加え，約１週間培養した。数日後に細胞は死んでいった。

その毒性のメカニズムとしては主に次のようなことが報告されている。

1　APはまず形質膜に吸着する。APの一部に疎水性のコアがあり，この部分が重ね合わさって重合しβシート構造をしたものは，脂質二分子膜である形質膜に組み込まれることが考えられる。膜の特定の蛋白質と結合するという説もある。形質膜に蓄積することは我々の実験によっても証明された[16)]。我々は25～35位のフラグメント（AP25－35）に蛍光色素ダンシル基が付加したものを適当に混和し，AP25－35の細胞への分布を追跡した（図６）。最近形質膜中のコレステロールの分布と生体組織におけるAPの沈着部位とが関係あるという報告があり，AP分布の細胞膜構造への影響とともに，それらの因果関係とAP毒性の引き金としてのコレステロールの意味は検討すべき問題である。

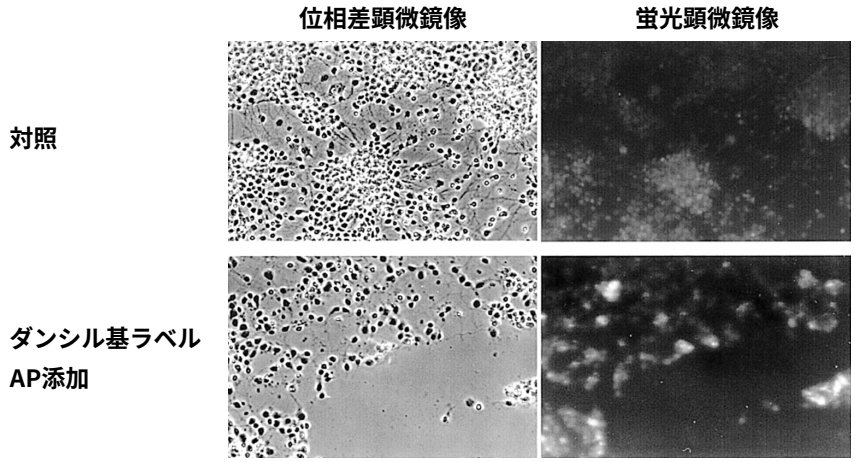


図６　蛍光ラベルAPの細胞への分布

2　APは形質膜中でイオンチャンネルを形成する。APを加えると神経細胞内のカルシウムイオン濃度調節に異常をきたす。これは膜に取り込まれたAPの重合体が，カルシウムなどの陽イオンに対する通路となり，イオンの自由な流入を助ける（細胞外の濃度が高いので）ことによるという。その結果小胞体やミトコンドリアに保持されているカルシウムも放出され，非特異的な蛋白質分解酵素（カルパインなど）が活性化されて，細胞の破壊がおこることが考えられる。

Ⅶ　タウ蛋白質の変性

神経細胞体やその軸索（最も長い神経突起で，神経刺激を伝える）にある微小管の重合，分解を調節し，神経細胞の成長，刺激伝達機能，栄養維持に働くのがタウ蛋白質で，通常でもそのセリン残基の一部はリン酸化（水酸基にリン酸が付加）されて，微小管に結合して存在しているのであるが，アルツハイマー病脳ではリン酸化が過剰に進み，タウ蛋白質自身が互いに凝集して，PHFという異常な微細繊維構造を作る。この構造物は軸索だけではなくて細胞本体にも生じ，微小管は分解して，神経細胞は死んでしまう。PHFは細胞がなくなっても繊維状のまま残る。

リン酸化を行なう酵素はタウ蛋白キナーゼと呼ばれるが，特にAPによって活性化されるキナーゼはグリコーゲンシンターゼキナーゼ３Bと同じである[17)]。このキナーゼはブドウ糖をエネルギーに変える重要な酵素，ピルビン酸デヒドロゲナーゼをもリン酸化して不活性化してしまうので，結果的に細胞のエネルギー産生不足をもたらすこともAPが細胞を殺す要因であろうと考えられる。因みに，ネズミでもAP（人のAPと比べて３つのアミノ酸が入れ代わっているだけである）を産生する能力（APPの遺伝子）は備わっているが，老齢ラットの脳にはPHFは見い出されていない。また老人斑に相当するAP沈着も普通見られない。AP蓄積にはその構造以外の要因が働くことを示唆している。

Ⅷ　APとRAGEとの結合

血液中などブドウ糖の多いところでは，ブドウ糖が非特異的に蛋白質に結合することがあり（糖尿病患者の血液では実際起こり易い），これがさらに変化して異状物質を形成すると，細胞にあるRAGEと呼ばれるレセプターにとりついて，細胞にとってさらに悪い反応を誘導する。APもRAGEに結合して，それが神経組織にあるミクログリアを刺激してその貪食作用（RAGEを持つ細胞を捕食する）を強め，またミクログリアはTNFや活性酸素種，一酸化窒素をたくさん放出して，やはり周りの神経細胞を攻撃する。死んだ細胞の蛋白質は別の細胞のRAGEに結合して連鎖反応をくり返す。いわゆる傷口で起こる炎症の連鎖反応に似ている。これも組織の中でおこるAPの細胞毒性発現機構の一つと考えられる。

Ⅸ　AP自身が活性酸素をつくる

活性酸素種にはスーパーオキサイド，ヒドロキシラジカル，過酸化水素などがあり，これらは呼吸に使われることはなく，むしろ過酸化脂質，変性蛋白質などをつくって細胞を破壊する。普通の代謝反応にともなって活性酸素は日常発生するが，それを分解する酵素があったり，還元して酸素や水にするので通常は問題にならない。APは細胞の脂質に入って金属イオンとともに過酸化水素を発生することが実験的に示されたが，その特異性とともに発生量と毒性との関係をもっと検討する必要があろう。ただ還元性（抗酸化作用）の強いビタミンEの摂取はアルツハイマー病の進行を遅らせるという報告がある。

X　APは神経細胞のアポトーシスを起こす

アポトーシスというのは，細胞死の中でも，例えば皮膚の表面の細胞がケラチン化して失われてゆくとか，植物では枯れ葉が落ちるように，言わば生理的な必要性から特異的に一部の細胞が死んでゆく場合に見られるものである。まず増殖が止まり，自分で持っているDNAや蛋白質を壊して細胞内小器官が分裂し，細胞機能は停止する。オタマジャクシの尾が切れるときのように，普通は組織の急激な破壊は起こらず，循環系や体全体の生存機能，ホメオスタシスを乱したり，苦痛をもたらすことはない。ところが実験的に神経細胞にAPを加えた場合は，非特異的にまず細胞核が凝縮してDNAの分解を起こし，さらに細胞小器官なども破壊して，アポトーシスに近い現象が見られ，不可逆的に細胞死にいたる[18)]。なぜそのような現象が起こって，必要な神経細胞まで失われてしまうのか。またその最初のきっかけとなる反応は何か。これがアルツハイマーの予防医学にとって重要なポイントである。

XI　神経細胞毒性の評価

まずAPの神経細胞に対する毒性を評価するために，APを加えたときの細胞の反応の何を測定するかが問題であった。比較的早い時期の変化を測定することは，毒性発現のメカニズムを探る上で有用であるが，明らかな細胞死も確認しなければならない。そこでAP処理後早い時期の細胞活性を測定するために，MTTという色素（細胞に取り込まれ，細胞活性の程度に応じて還元反応を受け，吸収波長が変わる）の化学変化を追跡，あるいは定量する方法を用い，また細胞死が進んで細胞膜の構造までが崩れ，その選択的透過性が失われてしまうことを測定するために，LDH（細胞内にある酵素）の細胞外流出を定量する方法を用いた。視覚的な細胞膜の透過性測定法として，トリパンブルーという黒色色素を細胞外に加えて，色素が細胞を染めれば（生きている細胞は色素を中に入れない）細胞死として数え，細胞数全体の中の死細胞の割合で細胞毒性を評価することも行なった。

XII　APの細胞毒性の防御とそのメカニズム

ラットにおいても海馬は学習・記憶能力の重要な器官であり，APの毒性を受け易いこともあって，我々はこの海馬の神経細胞を培養して，AP毒性の防御物質の試験を行なった。1993年，高寺らは22～35位のAPフラグメントが10，20，40 μg/mlの濃度で，濃度依存性に神経細胞のLDHの流出を増加させることを初めて報告した（図７）。同時に血清，インスリン，サイクリックAMPを添加すると，APのこの毒性はかなり抑えられることも見い出した（図８）。この結果により，APによる毒性は防御できる可能性がでてきた。その後25～35位のAPを用いてもその毒性は，血清，IGF－IIおよびニフェジピンにより防御できることが分かった。

そこで本格的に，アルツハイマー病患者脳で増加すると言われる完全なAP42を用いて，ラット培養海馬神経に対する毒性を先に述べた二つの方法で評価し，ホスホジエステラーゼ阻害作用（サイクリックAMPの分解を抑える）のあるプロペントフィリンの防御効果を試験した。このプロペントフィリンは以前に日本では脳代謝改善薬として治療に用いられていたものであ

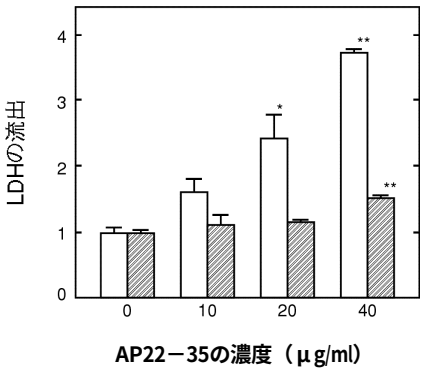


図7　22－35位のアミノ酸ペプチド（AP22－35）の毒性。海馬の培養神経細胞にAP22－35を添加して，３日間培養してから，LDHの流出を測定した。斜線入りのカラムはAPのC末端を変形して無効にしたものを添加した結果を示す。

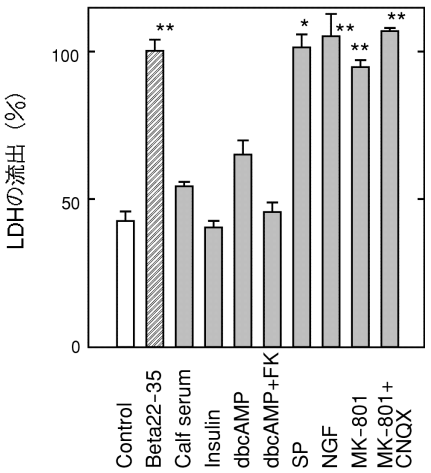


図8　AP22－35の毒性に対する防御物質。神経細の培養液に，AP22－35とともに，牛血清，インスリン，サイクリックAMP，FK（サイクリックAMP合成促進物質），サブスタンスP，グルタミン酸拮抗物質などを添加して培養した。血清，インスリン，サイクリックAMP，FKは毒性を抑えている。

るが，その後薬事審議会の最評価によりそれほど臨床的に効果が認められないとされた。しかし私達の動物脳細胞実験による研究結果では，神経伝達機能を調節していると言われるアデノシンの濃度を上げ，また神経の培養モデル細胞（PC12h）の分化誘導を起こすなどの作用が認められた。

APの毒性に対するプロペントフィリンの防御実験の結果，MTTの還元測定法とLDH流出測定法によって毒性の評価が著しく異なり，20 μMのAP添加により，MTT法では培養２日目で明らかな還元力低下の毒性が現れ，LDH法では３日目では毒性はまだ弱く（図９），５日以後強く毒性が現れた[19]。培養２日では細胞のミトコンドリアあるいは小胞体によるMTTの還

元力がAP添加により阻害されるが，細胞膜の選択的な透過性はまだあまり影響を受けていないものと考えられる。この間に細胞の代謝酵素系がまず障害を受けていることが示唆された。これらの毒性発現に対して20μg/mlのプロペントフィリン添加は，LDH流出に対しては完全に，またMTT還元に対しては，完全ではないがAPのみ存在時よりも約２倍にそれぞれ回復した（図10）。プロペントフィリンを添加（10～40μg/ml）して神経細胞を培養すると，細胞内にサイクリックAMPが著しく増加することも分かった（図11）。

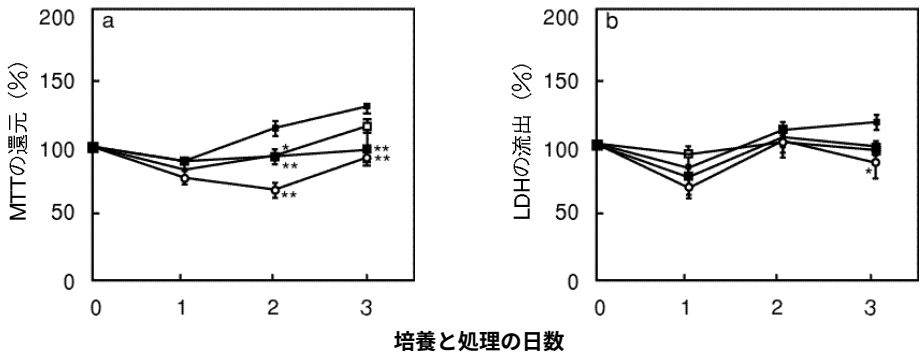


図９　AP42の毒性評価法２種の比較。左はMTT還元測定法。右はLDH流出測定法。
AP42の濃度　－×－　0　μM
－□－　5
－■－　10
－○－　20

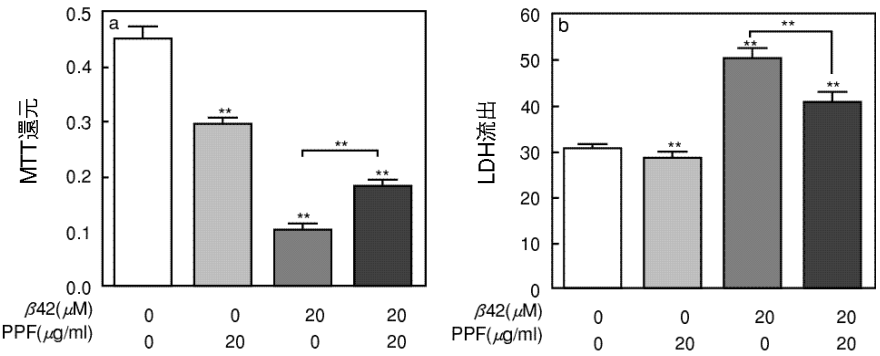


図10　AP42（β42）の毒性に対するプロペントフィリン（PPF）の防御効果。AP42およびPPFと７～８日培養した。

従ってサイクリックAMPの細胞内上昇が多分プロペントフィリンの毒性防御効果に寄与しているのであろうと考えられるが，この結果は先の，サイクリックAMP添加よるAPの毒性防御実験の結果と一致する。さらにこの効果がサイクリックAMPのどんな作用機構によるものか，現在検討中である。

前にも述べたように，APは常在の蛋白質であり，遺伝子変異があるヒトにしろ，ないヒト

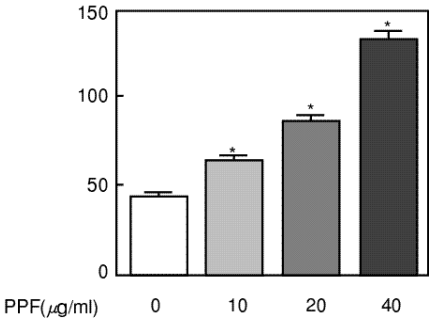


図11 プロペントフィリン添加による，細胞内サイクリックAMPレベルの上昇。

にしろ，それがゆっくりと異常に脳に蓄積することがアルツハイマー病の根本的な原因であると考えられるので，その蓄積による脳細胞の障害あるいは死は，薬物，あるいは細胞を活性化するような内部的因子の働きにより防御することが可能であると思われる。APのワクチンなどを注射してその分解を促進させる免疫療法も動物では成功している[20]。

謝　辞

この研究の遂行にあたり，北陸大学特別研究助成（1999－2000）の補助を受けたことを記し，併せて深く感謝いたします。また生物薬品化学教室の方々にはAPペプチドの合成を担当していただいたことを深謝いたします。

参考文献

1） G.G.Glenner, C.W.Wong, Biochem. Biophys. Res. Commun. 120, 885-890 (1984).
2） D.J.Selkoe, J. Biol. Chem. 271, 18295-18298 (1996).
3） B.A.Yankner, L.K.Duffy, D.A.Kirschner, Science 250, 279-282 (1990).
4） 武田雅俊，篠崎和弘，西川隆，田中稔久，工藤喬，中村祐，柏木雄次郎，日薬理誌　115, 79-88 (2000).
5） R.Vassar, B.D.Bennett, S.Babu-Khan, S.Kahn, E.A.Mendiaz, P.Denis, D.B.Teplow, S.Ross, P.Amarante, R.Loeloff, Y.Luo, S.Fisher, J.Fuller, S.Edenson, J.Lile, M.A.Jarosinski, A.L.Biere, E.Curran, T.Burgess, J.Louis, F.Collins, J.Treanor, G.Rogers, M.Citron, Science 286, 735-741 (1999).
6） 山口晴保，生体の科学　51, 18-24 (2000).
7） B.A.Yankner, Neuron 16, 921-932 (1996).
8） K.Sugaya, T.Uz, V.Kumar, H.Manev, Jpn.J.Pharmacol. 82, 85-94 (2000).
9） N.Iwata, S.Tsubuki, Y.Takaki, K.Shirotani, B.Lu, N.P.Gerard, C.Gerard, E.Hama, H.Lee, T.C.Saido, Science 292, 1550-1552 (2001).
10） Y.Hashimoto, T.Niikura, H.Tajima, T.Yasukawa, H.Sudo, Y.Ito, Y.Kita, M.Kawasumi, K.Kouyama, M.Doyu, G.Sobue, T.Koide, S.Tsuji, J.Lang, K.Kurokawa, I.Nishimoto, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 6336-6341 (2001).
11） Q.Guo, W.Fu, J.Xie, H.Luo, S.F.Sells, J.W.Geddes, V.Bondada, V.M.Rangnekar, M.P.Mattson, Nature Med.4, 957-962 (1998).
12） 長谷川雅哉，野田幸裕，前田洋子，山田清文，鍋島俊隆，日薬理誌　114, 327-336 (1999).
13） J.T.Jarrett, E.P.Berger, P.T.Lansbury, Jr., Biochemistry 32, 4693-4697 (1993).
14） 河内十郎（訳），記憶と脳，医学書院（1989）.

15） T.Takadera, N.Sakura, T.Mohri, T.Hashimoto, Neurosci. Lett 161, 41-44 (1993).
16） K.Chiba, N.Sakura, M.Yamazaki, T.Hashimoto, T.Mohri, Alzheimer's Rep. 1, 251-256 (1998).
17） M.Hoshi, A.Takashima, K.Noguchi, M.Murayama, M.Sato, S.Kondo, Y.Saitoh, K.Ishiguro, T.Hoshino, K.Imahori, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 2719-2723 (1996).
18） C.W.Cotman, A.J.Anderson, Mol.Neurobiol. 10, 19-45 (1995).
19） Y.Koriyama, M.Yamazaki, K.Chiba, T.Mohri, Jpn.J.Pharmacol. 82, 301-306 (2000).
20） R.B.DeMattos, K.R.Bales, D.J.Cummins, J.Dodart, S.M.Paul, D.M.Holtzman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98, 8850-8855 (2001).

■ 戻る ■