

氏 名	うえ だ けい いち 上 田 恵 一
学位(専攻分野)	博 士 (学 術)
学 位 記 番 号	博 乙 第 49 号
学位授与の日付	平成 9 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	アミロイド β タンパクの神経毒作用に関する研究
審 査 委 員	(主査) 教 授 宗 川 吉 汪 教 授 清 原 壽 一 教 授 遠 藤 泰 久 助教授 前 川 昌 平

論文内容の要旨

アミロイド β タンパク ($A\beta$) はアルツハイマー病 (AD) 患者脳にみられる老人斑の主要構成部分であり、39-43アミノ酸残基からなる。老人斑の付近に顕著な神経細胞変性が認められることから、 $A\beta$ が神経毒作用を示すとみられており、 $A\beta$ の作用機構を解明することは AD の発症機序解明、治療法の開発への道を開くものと考えられる。そこで本研究では $A\beta$ の神経毒作用機構を *in vitro* において検討した。

第 1 章では初代培養神経細胞における $A\beta$ の細胞毒作用を、ミトコンドリアのコハク酸脱水素酵素 (SDH) 活性の測定により検討した。全長の $A\beta$ に相当する $\beta 1-40$ 、 $A\beta$ の活性部位である $\beta 25-35$ は海馬神経細胞に対して SDH 活性の抑制を示した。 $A\beta$ は疎水性が高く、水溶液中で単量体が会合し、凝集する性質がある。 $\beta 1-40$ を中性水溶液中で 7 日間静置すると凝集し (aged $\beta 1-40$)、その細胞毒作用は約 10 倍増強した。Aged $\beta 1-40$ を用いた実験から、海馬や大脳皮質の培養神経細胞では 10^{-8} M から細胞死が観察された。小脳神経細胞では 10^{-6} M 以上ではじめて細胞死が認められた。グリア細胞は 10^{-5} M でも殆ど影響を受けなかった。以上、 $A\beta$ による神経毒作用は AD 脳の神経細胞脱落と類似した選択死、細胞特異性を有することが明らかとなった。

第 2 章では $A\beta$ による神経細胞死がアポトーシスであり、その過程においてプロテインキナーゼ A が関与することを明らかにした。初代培養大脳皮質神経細胞において $\beta 25-35$ 適用 48 時間後に顕著なミトコンドリア SDH 活性の低下がみられた。このとき、核染色による染色体の凝集、分断が観察されたこと、染色体 DNA のヌクレオソーム単位での切断がみられたこと、さらにタンパク合成阻害剤が細胞死を抑止したことから、 $\beta 25-35$ による細胞死はアポトーシスであると結論した。また、A キナーゼ阻害剤 H-89 が細胞死を顕著に抑制した。

第 3 章では $A\beta$ による細胞死におけるフリーラジカルと Ca^{2+} イオンの関与について明らかにした。大脳皮質および海馬初代培養神経細胞において $\beta 25-35$ 適用による細胞死が L 型 Ca^{2+} チャネルブロッカーのニモジピンで特異的に抑制された。 $A\beta$ による Ca^{2+} イオン流入を、全細胞型パッチクランプ法で検討したところ、16 時間の $\beta 25-35$ 曝露群において、 Ca^{2+} 電流密度が対照群と比較して 2 倍高いことが判明した。このとき生理的条件下での $^{45}Ca^{2+}$ 取り込みは増加し、これはニモジピンで特異的に抑制された。一方、フリーラジカル感受性蛍光色素を用いた測定から、 $\beta 25-35$ 適用 12 時間および 24 時間で有意な細胞内活性酸素レベルの上昇が認められた。ラジカルスカベンジャーのビタミン E は $\beta 25-35$ による Ca^{2+} の取り込みの増加を抑止したが、ニモジピンは $\beta 25-35$ によるフリーラジカルの発生に対して何の作用も示さなかった。以上の結果は、 $\beta 25-35$ による Ca^{2+} 流入の増加はフリーラジカルの発生の結果であることを示している。

第 4 章ではラット副腎褐色細胞腫由来細胞株 PC12 の $A\beta$ に対する作用を検討した。PC12 細胞を

β 25-35 で24時間曝露すると 10^{-7} M- 10^{-6} M の範囲で濃度依存的にミトコンドリア SDH 活性の抑制が認められたが、細胞死は認められなかった。 β 25-35 による SDH 活性の抑制は培養神経細胞と同様に H-89 により抑止された。このことは PC12 細胞と神経細胞において、少なくともミトコンドリア機能の低下に至る過程で、 $A\beta$ は共通の機構で作用することを示している。

論文審査の結果の要旨

本論文はアルツハイマー病 (AD) の病因因子の一つと考えられているアミロイド β タンパク ($A\beta$) の神経毒作用の機構を *in vitro* で詳細に検討したものである。凝集した $A\beta$ は、低濃度で海馬や大脳皮質の培養神経細胞の細胞死をもたらしたが、小脳細胞やグリア細胞の細胞死を引き起こさなかった。これは $A\beta$ の神経毒作用が AD 脳の神経細胞脱落と類似することを示している。また、 $A\beta$ の引き起こす細胞死がアポトーシスであり、その過程にプロテインキナーゼ A が関与する可能性を示した。さらに、 $A\beta$ による海馬や大脳皮質の培養神経細胞の細胞死が L 型 Ca^{2+} チャネルを介した Ca^{2+} イオンの流入によること、この Ca^{2+} イオンの流入は $A\beta$ によって発生するフリーラジカルにより引き起こされることを明らかにした。

以上の結果は、 $A\beta$ による細胞死の機構の解明において重要な示唆を与えるものであり、アルツハイマー病の解明および治療方法の開発に寄与するものと評価された。論文は慎重かつ丁寧に作成されており、論旨は極めて明解であった。本論文の内容は申請者を筆頭著者とする以下の4編の論文を基礎としている。なお、この他に申請者を著者とする論文2編が公表されている。

1. Ueda K., Fukui Y., and Kageyama H. (1994) Amyloid β protein-induced neuronal cell death: neurotoxic properties of aggregated amyloid β protein. *Brain Res.* 639, 240-244.
2. Ueda K., Fukui Y., and Kageyama H. (1994) Compromise of mitochondrial function induced by amyloid β protein in PC12 cells and protection by cyclic AMP-dependent protein kinase inhibitors. *Neurosci. Res. Commun.* 15, 195-200.
3. Ueda K., Yagami T., Kageyama H., and Kawasaki K. (1996) Protein kinase inhibitor attenuates apoptotic cell death induced by amyloid β protein in culture of the rat cerebral cortex. *Neurosci. Lett.* 203, 175-178.
4. Ueda K., Shinohara S., Yagami T., Asakura K., and Kawasaki K. (1997) Amyloid β protein potentiates Ca^{2+} influx through L-type voltage-sensitive Ca^{2+} channels: a possible involvement of free radicals. *J. Neurochem.* 68, 265-271.