

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	石黒 敬信
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大院博 (医) 第 846 号
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
博士論文名	神経細胞興奮が amyloid precursor protein (APP) の processing へ及ぼす影響
論文審査委員	主査 教授 那波 宏之 副査 教授 柿田 明美 副査 教授 小野寺 理

博士論文の要旨

【背景と目的】

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease: AD)の主要な病理変化の一つは神経細胞外に沈着する β -アミロイド (β -amyloid: A β)から構成される老人斑である。近年の脳機能画像研究により、最も早期に A β が沈着する脳領域は安静時の脳活動の高い領域と一致することが明らかとなるなど、神経活動亢進と A β 産生、AD 病態進展との関連性が示唆されている。A β は全長型アミロイド前駆体タンパク (full-length amyloid precursor protein: APP-FL) から β -secretase, γ -secretase による β 切断および γ 切断により産生される (amyloidogenic APP processing) が, α -secretase による切断 (α 切断) を受けると, A β は産生されない (non-amyloidogenic APP processing)。本研究では、主要な興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸による神経細胞興奮が β 切断を介した A β 産生亢進をもたらすのか、また、それは興奮の程度や持続時間についてどのような条件でもたらされるのかについて培養細胞アッセイ系を用いて検証した。

【方法】

ラット大脳皮質由来初代神経培養細胞 (胎生 17 日)を用いた。グルタミン酸の添加濃度及び時間を段階的に設定し薬剤添加後に細胞溶解液及び培養上清を回収し、発現タンパクについてウエスタンブロット法あるいは sandwich ELISA 法による解析を行った。神経細胞興奮は early growth response factor-1 (EGR-1) の発現により評価した。APP C 末端断片 (APP-CTFs) の評価のため、 γ -secretase 阻害剤 (L-685,458) あるいは β -secretase 阻害剤 (β -secretase inhibitor IV) を使用した。また、N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) 型受容体阻害の APP processing への影響を検証するため、NMDA 型受容体アンタゴニストである MK-801 を用いた。

【結果】

グルタミン酸 (0.1-100 μ M) 添加により EGR-1 の一過性の増加をみとめ、高濃度であるほど EGR-1 の発現は増加した。グルタミン酸 100 μ M 添加 2 時間では APP-FL の発現は低下し、APP C 末端断片 β (APP-CTF β) の発現も低下していた。 γ -secretase 阻害剤を添加の上、グルタミン酸 0.1 μ M および 100 μ M による 2 時間刺激を行ったところ、グルタミン酸 0.1 μ M では APP-CTF β の発現増加がみられ、100 μ M では APP-FL の発現低下および APP-CTF β の発現低下をみとめた。グルタミン酸 100 μ M による 2 時間刺激では γ -secretase 阻害剤の有無にかかわらず、APP C 末端断片 α (APP-CTF α) の明らかな低下はみとめなかった。さらに、グルタミン酸 0.1 μ M で 24 時間の長

時間刺激を行ったところ、可溶性 APP β (soluble APP β , sAPP β) および A β の増加をみとめた。MK-801 存在下でグルタミン酸 0.1 μ M で 24 時間の刺激を行ったところ、sAPP β および A β の増加は有意に抑制された。

【考察と結論】

グルタミン酸 100 μ M による 2 時間刺激では APP-FL および APP-CTF β の発現が低下していたが、APP-CTF α の発現低下を伴っておらず、APP-FL の発現低下は β 切断の亢進ではなく α 切断の亢進による可能性が示唆された。一方、グルタミン酸 0.1 μ M では 2 時間刺激および 24 時間刺激のいずれも β 切断の亢進が示唆された。すなわち、高濃度のグルタミン酸による短時間刺激では A β 産生が抑制されたが、低濃度のグルタミン酸による持続的な神経細胞興奮は APP-FL の β 切断亢進を介して A β 産生の増加をもたらすと考えられた。このように神経細胞興奮の程度によって APP processing は変化することが考えられた。また、本研究でみられた amyloidogenic APP processing は主に NMDA 型受容体の活性化を介していると考えられたが、そのほかの選択的アンタゴニストや抗てんかん薬を用いた検証も必要である。本研究は持続的な神経細胞の興奮が A β 産生亢進を介し AD 病態に関与することを示唆し、持続する神経興奮の抑制が AD の新たな治療ターゲットとなる可能性を支持した。

審査結果の要旨

【背景と目的】アルツハイマー病の主要な病理変化の一つは神経細胞外に沈着する β -アミロイド (β -amyloid: A β) から構成される老人斑である。本研究では、興奮性神経伝達による A β 産生制御とその興奮持続性の効果について培養神経細胞アッセイ系を用いて検討している。

【方法】ラット大脳皮質由来初代神経培養細胞を用い、グルタミン酸の添加後に細胞溶解液及び培養上清を回収し、ウエスタンブロット法あるいは ELISA 法による定量解析を行っている。 γ -secretase 阻害剤あるいは β -secretase 阻害剤と NMDA 型グルタミン酸受容体阻害剤 MK-801 を用い、当該分子の関与を分析している。

【結果】申請者はグルタミン酸 (0.1-100 μ M) 添加により神経活動マーカー EGR-1 の一過性の増加をみとめ、高濃度であるほど大きな EGR-1 発現増加を観察した。グルタミン酸の 100 μ M 添加 2 時間では APP-FL の発現は低下し、APP C 末端断片 β (APP-CTF β) も低下していた。 γ -secretase 阻害剤添加により、グルタミン酸濃度 0.1 μ M の 2 時間刺激は APP-CTF β の発現を増加させたが、逆にグルタミン酸濃 100 μ M は APP-FL の発現低下および APP-CTF β の発現を低下させた。本条件では γ -secretase 阻害剤の有無にかかわらず、APP C 末端断片 α (APP-CTF α) の低下はみとめていない。一方グルタミン酸 0.1 μ M の 24 時間刺激は可溶性 APP β および A β を増加させたが、MK-801 追加によりその増加は阻害された。

【結論】

低濃度のグルタミン酸による持続的な神経細胞興奮は APP-FL の β 切断亢進を介して A β 産生亢進をもたらすと考えられる。

よって本研究は持続的な神経細胞の興奮が A β 産生亢進を介し AD 病態に関与することを示唆するとともに、持続する神経興奮の抑制が AD の新たな治療ターゲットとなる可能性を指摘したところに博士論文としての価値を認める。