

神経細胞興奮が amyloid precursor protein (APP) の processing へ及ぼす影響

石 黒 敬 信

新潟大学大学院医歯学総合研究科

神経内科学分野

(主任：小野寺理教授)

The Effect of Neuronal Excitement on APP processing in Cultured Cells

Takanobu ISHIGURO

Department of Neurology,

Niigata University Graduate School of Medical and Dental Science

(Director: Prof. Osamu ONODERA)

要 旨

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。A β はアミロイド前駆体タンパク (amyloid precursor protein: APP) から β -secretase および γ -secretase により産生される。近年、脳機能画像研究から AD 早期における神経活動の亢進と病態進展の関係性が示唆されている。本研究では興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸による持続的な神経細胞興奮が A β 産生を含む APP processing に及ぼす影響について検証した。神経細胞興奮の程度と興奮の持続時間に依存した APP processing の変化を捉えるため、ラット大脳皮質由来初代神経培養細胞 (胎生 17 日) を用いた刺激実験系で検討した。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。グルタミン酸 (0.1-100 μ M) 添加により EGR-1 の一過性の発現増加をみとめ、高濃度であるほど EGR-1 の発現はより増加し持続時間も延長した。グルタミン酸 100 μ M では添加 2 時間で全長型 APP の発現が一過性に低下し、これに伴い APP C 末端断片 β (APP-CTF β) も発現が抑制された。一方、グルタミン酸 0.1 μ M では添加 2 時間で APP-CTF β の発現亢進、添加 24 時間で可溶性 APP β (soluble APP β , sAPP β) の発現亢進および A β 増加がみられた。これらの結果から、高濃度のグルタミン酸による神経細胞興奮は A β 産生に抑制的に、一方、低濃度のグルタミン酸による持続的な神経細胞興奮は A β 産生に促進的に働くと考えられた。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する。

Reprint requests to: Takanobu ISHIGURO
Department of Neurology,
Brain Research Institute, Niigata University,
1-757 Asahimachi-dori, Chuo-ku,
Niigata 951-8585, Japan.

別刷請求先：〒 951-8585 新潟市中央区旭町通 1-757
新潟大学脳研究所神経内科

石 黒 敬 信

キーワード：アルツハイマー病，神経細胞興奮，アミロイド前駆体タンパク， β -アミロイド，APP processing，グルタミン酸

はじめに

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease: AD) は認知症の最大の原因疾患である。主要な病理変化は神経細胞外に老人斑として沈着する β -アミロイド (β -amyloid: A β) と神経細胞内に神経原線維変化として蓄積する過剰にリン酸化されたタウである。脳脊髄液や脳機能画像検査によるバイオマーカー研究により A β 沈着，タウの神経細胞内への蓄積，神経細胞死，認知症の発症へと至る病態進展過程が明らかとなっている¹⁾。

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 default mode network と呼ばれる安静時脳活動の高い領域と一致することが分かっている²⁾³⁾。また，A β は neural network の興奮性を亢進させ，てんかん活動を引き起こすことが知られており⁴⁾，AD 未発症時点で潜在的なてんかん活動が存在すると認知機能低下が著しいことが報告されている⁵⁾。さらに，AD モデルマウスや軽度認知機能障害患者に対して抗てんかん薬であるレベチラセタムを用いることで神経細胞の異常興奮性が抑制され，認知機能が改善したことが報告されている^{6)–8)}。このように，AD における神経活動亢進と病態進展との関連性が指摘されている⁹⁾。

A β は神経細胞膜に存在するアミロイド前駆体タンパク (amyloid precursor protein: APP, 全長型 APP: full-length APP, APP-FL) から β -secretase および γ -secretase により産生される (amyloidogenic pathway, 図1)。すなわち，APP は β -secretase により APP C 末端断片 β (APP-C terminal fragment β , APP-CTF β) と可溶性 APP β (soluble APP β , sAPP β) に切断される (β 切断)。さらに APP-CTF β は γ -secretase により細胞外に放出される A β と APP 細胞内ドメイン (APP intracellular domain, AICD) に切断される (γ 切断)。一方，APP が α -secretase により切断されると APP C 末端断片 α (APP-C

terminal fragment α , APP-CTF α) と可溶性 APP α (soluble APP α , sAPP α) に切断される (α 切断)。APP-CTF α は γ 切断により p3 と AICD に切断され，A β は産生されない (non-amyloidogenic pathway, 図1)。

これまで，AD モデルマウスを用いた検証において，脳の電氣的刺激により脳間質液中の A β 量が神経活動依存的に変化すること¹⁰⁾¹¹⁾，NMDA (N-methyl-D-aspartate) 濃度に依存した脳間質液中の A β 産生の変化が報告されている¹²⁾。しかしながら，神経細胞興奮の程度と持続時間に依存した APP processing の分子病態の検証は *in vivo* では困難である。また，*in vitro* の検証では NMDA 型受容体^{13)–15)}，AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionate) 型受容体¹⁶⁾，代謝型グルタミン酸受容体¹⁷⁾ といったグルタミン酸受容体の活性化が APP processing へ及ぼす影響について報告されているが，いずれも選択的アゴニストによる検証である。

本研究では，中枢神経系で主要な興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸を用いて，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，興奮の程度や持続時間が APP processing に及ぼす影響について *in vitro* により検証した。

材料と方法

細胞培養

ラット大脳皮質初代培養神経細胞 (胎生 17 日，Wako) を用いた。1% Penicillin-Streptomycin (Gibco) を加えた神経細胞用培地 (Wako) で培養し 3 日おきに培地交換を実施，14 日目に最終培地交換を行い，その 12 時間後から薬剤添加実験を行った。

添加薬剤

神経細胞興奮は興奮性神経伝達物質である L-グルタミン酸 (Sigma-Aldrich) を用いた。APP

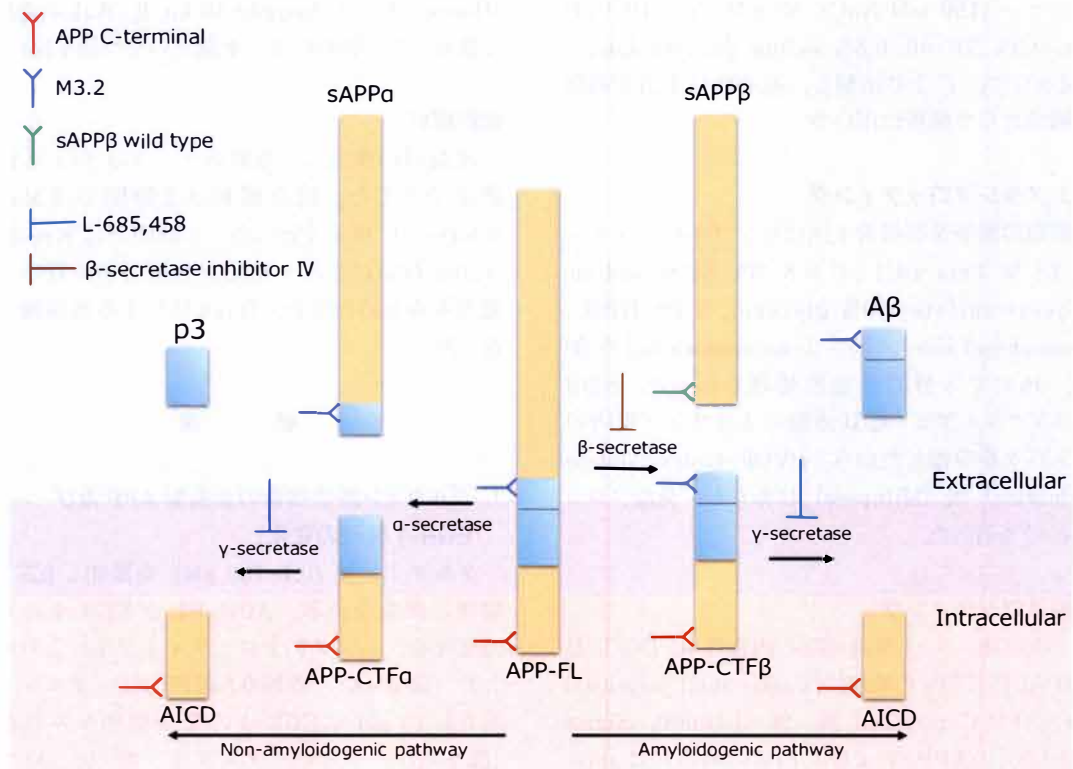


図1 APP processing

Aβ 産生経路 (amyloidogenic pathway) と非産生経路 (non-amyloidogenic pathway) がある。β-secretase により全長型アミロイド前駆体タンパク (full-length amyloid precursor protein: APP-FL) から APP C 末端断片 β (APP-C terminal fragment β, APP-CTF β) および細胞外成分となる可溶性 APP β (soluble APP β, sAPP β) に切断される。APP-CTF β は γ-secretase により細胞外に放出される Aβ と APP 細胞内ドメイン (APP intracellular domain, AICD) に切断される。一方、APP-FL が α-secretase により切断されると APP C 末端断片 α (APP-C terminal fragment α, APP-CTF α) 及び細胞外成分となる可溶性 APP α (soluble APP α, sAPP α) に切断される。APP-CTF α は γ-secretase により p3 と AICD に切断される。この場合、Aβ は産生されない。β-secretase 阻害剤により APP-CTF β, sAPP β, Aβ の産生が減少する。γ-secretase 阻害剤により Aβ, p3 の産生が抑制され、γ 切断を受けないことで APP-CTFs が増加する。また、APP processing の評価に用いた免疫ブロッティングにおける一次抗体の認識部位をそれぞれ示した。

processing の評価及び Aβ 産生抑制の効果の検証のため、γ-secretase 阻害剤 (L-685,458: 2 μM, Wako) および β-secretase 阻害剤 (β-secretase inhibitor IV: 5 μM, Merck Millipore) を使用した。また、グルタミン酸による神経細胞興奮に対する NMDA 型受容体の活性化抑制の影響を検証するため、NMDA 型受容体の非競合型アンタゴニストである MK-801 (5 μM, Wako) を使用した。

細胞回収

細胞培養液を回収し 0.5 mM Phenylmethane-sulfonyl fluoride (PMSF, Sigma-Aldrich) を加え、遠心処理を行った上で上清をタンパク解析に用いた。続いて培養細胞を Phosphate buffered saline (PBS, Sigma-Aldrich) で 2 回洗浄し、0.5% Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich) 及び 1% Phosphatase Inhibitor Cocktail 2 および 3 (Sigma-Aldrich) を加えた細胞溶解液

ッファー (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.5% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 5 mM EDTA) により溶解し、遠心後に上清を細胞溶解液として解析に用いた。

ウエスタンブロッティング

細胞溶解液及び培養上清にサンプルバッファー (0.15 M Tris-HCl pH 6.8, 6% SDS: sodium dodecyl sulfate, 30% glycerol, 0.1% BPB : bromophenol blue), 15% 2-mercaptoethanol を加え、96℃で3分間熱変性処理を行った。SDS ポリアクリルアミド電気泳動によりサンプル内のタンパクを分離したのち、PVDF (polyvinylidene difluoride) 膜 (Millipore) に転写し、免疫ブロッキングを行った。

免疫ブロッキング

一次抗体: ラット神経細胞の内在性 APP-FL および APP-CTFs の検出には anti-rabbit polyclonal anti-APP C-terminal 抗体 (1:10000, Sigma Aldrich), sAPP α および CTF β の検出には anti-mouse monoclonal anti-mouse/rat β -Amyloid, 1-16 抗体 (clone:M3.2) (1:1000, Biolegend), sAPP β の検出には anti-rabbit polyclonal anti-human sAPP β wild-type 抗体 (1:1000, IBL) をそれぞれ用いた (図1)。神経細胞興奮の指標である EGR-1 は anti-rabbit monoclonal anti-EGR-1 抗体 (1:1000, Cell Signaling Technology) により検出した。細胞溶解液の免疫ブロッキングにおける loading control は anti-mouse monoclonal anti- β -actin 抗体 (1:10000, Cell Signaling Technology) を用いた。

二次抗体: HRP (horseradish peroxidase) を標識した mouse あるいは rabbit immunoglobulin (DAKO) を使用し、Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) により可視化し、ImageQuant LAS4000mini (GE Healthcare) による半定量解析を行った。

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

培養上清中の A β_{x-40} 定量は sandwich ELISA

(Human/Rat β -Amyloid 40 kit II, Wako) を用いて測定した。解析には二重測定の平均値を用いた。

統計解析

複数回の検証による解析データは平均 \pm 標準誤差で示した。統計解析は2群間では Mann-Whitney U 検定を行った。3群間では Kruskal-Wallis 検定による一元配置分散分析を行い、有意差をみとめた場合、Dunn 法による事後検定を行った。

結 果

1. グルタミン酸添加後の全長型 APP 及び EGR-1 発現の変化

グルタミン酸 (0.1-100 μ M) を添加し 0.5-8 時間後に細胞を回収、APP-FL と EGR-1 の発現の変化をウエスタンブロッティング法により解析した (図2-A)。添加0.5時間では、グルタミン酸 0.1-10 μ M で EGR-1 の発現増加がみられた (図2-B)。一方で、グルタミン酸 100 μ M では EGR-1 の発現増加がみとめられなかった。APP-FL の発現はグルタミン酸 100 μ M でのみ低下をみとめた。添加3時間では、EGR-1 はグルタミン酸 0.1 μ M および 1 μ M では発現がみられないが、10 μ M および 100 μ M では発現増加がみられ、特に 100 μ M では強い発現をみとめた。また、添加0.5時間と同様にグルタミン酸 100 μ M により APP-FL の発現低下をみとめた。添加8時間では、すべての条件で EGR-1 の増加はみとめられなかった。添加0.5および3時間でみられた APP-FL の発現低下は回復していた。これらのグルタミン酸の濃度および添加時間に依存した EGR-1 と APP-FL の発現の経時的な変化を評価するため、各添加時間における免疫ブロッキング (図2-C) のシグナルの EGR-1/ β -actin の平均値を図2-Dに示した。EGR-1 の発現増加は一過性であり、高濃度のグルタミン酸により強く発現し、ピークに達するまでの時間が遅延していた。また、APP-FL の発現の変化はグルタミン酸 0.1 μ M では明らかではなかったが (図

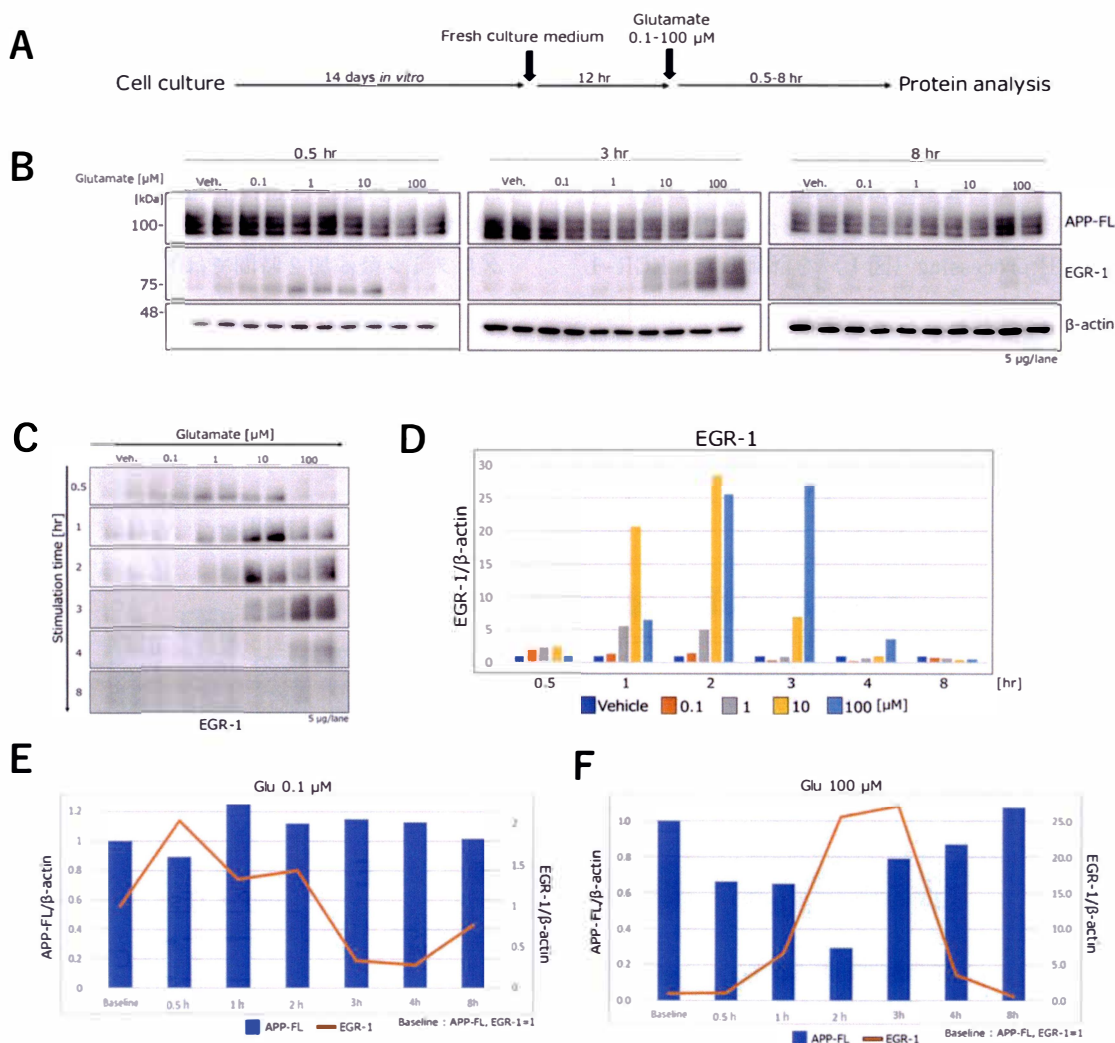


図2 グルタミン酸添加後の全長型APP及びEGR-1発現の変化

A: 培養14日目に培地を交換し、12時間後にグルタミン酸0.1-100 μ Mを添加、0.5-8時間後に細胞を回収しウェスタンブロッティング解析を行った。グルタミン酸を添加しないものには対照として超純水を同量添加した。B: グルタミン酸投与後0.5, 3, 8時間後のそれぞれのAPP-FL, EGR-1, β -actinの免疫ブロッティングを示した。CおよびD: グルタミン酸0.1-100 μ M投与後0.5-8時間のEGR-1の免疫ブロッティングを示した。また、それぞれのバンドのシグナル強度を半定量解析し、EGR-1/ β -actinのN=2の平均値を算出、各時間における対照に対する比を示した。グルタミン酸0.1 μ Mでは添加後0.5時間でピークアウトし、100 μ Mでは3時間でピークアウトした。グルタミン酸が高濃度であるほど、ピークは強く、発現の持続時間も長い、発現までの潜時は延長した。EおよびF: グルタミン酸0.1 μ M, 100 μ Mにおいて添加後0.5-8時間のAPP-FLおよびEGR-1の免疫ブロッティングのシグナル強度を半定量解析し、APP-FL/ β -actin, EGR-1/ β -actinのN=2の平均値を算出、各添加時間での対照に対する比をグラフ化した。グルタミン酸0.1 μ Mでは添加0.5時間でEGR-1はピークとなった。APP-FLの変化は明らかではなかった。グルタミン酸100 μ Mでは添加2-3時間でピークとなり、APP-FLは添加2時間で強い発現低下がみられた。検証した条件(グルタミン酸0.1-100 μ M, 添加時間0.5-8時間)ではEGR-1の発現増加及びAPP-FLの発現低下はいずれも一過性であり、グルタミン酸が高濃度であるほど、その程度は強く持続時間は延長した。

2-E), 100 μ M では添加2時間に最も強い一過性の発現低下をみとめた (図2-F).

2. グルタミン酸 100 μ M による APP processing の変化

グルタミン酸 100 μ M 刺激では, APP-FL の発現低下が明らかであったことから, 同刺激による APP processing (図1) を評価した. EGR-1

が高発現し APP-FL の発現が最も低下した添加2時間および EGR-1 がピークアウトした添加8時間での APP processing を APP-FL, APP-CTFs の変化により解析した. APP-CTF α と APP-CTF β を区別するために, 最終培地交換の時点で β -secretase 阻害剤 (図1) を添加する検討も同時に行った (図3-A).

グルタミン酸添加2時間では EGR-1 は強く発

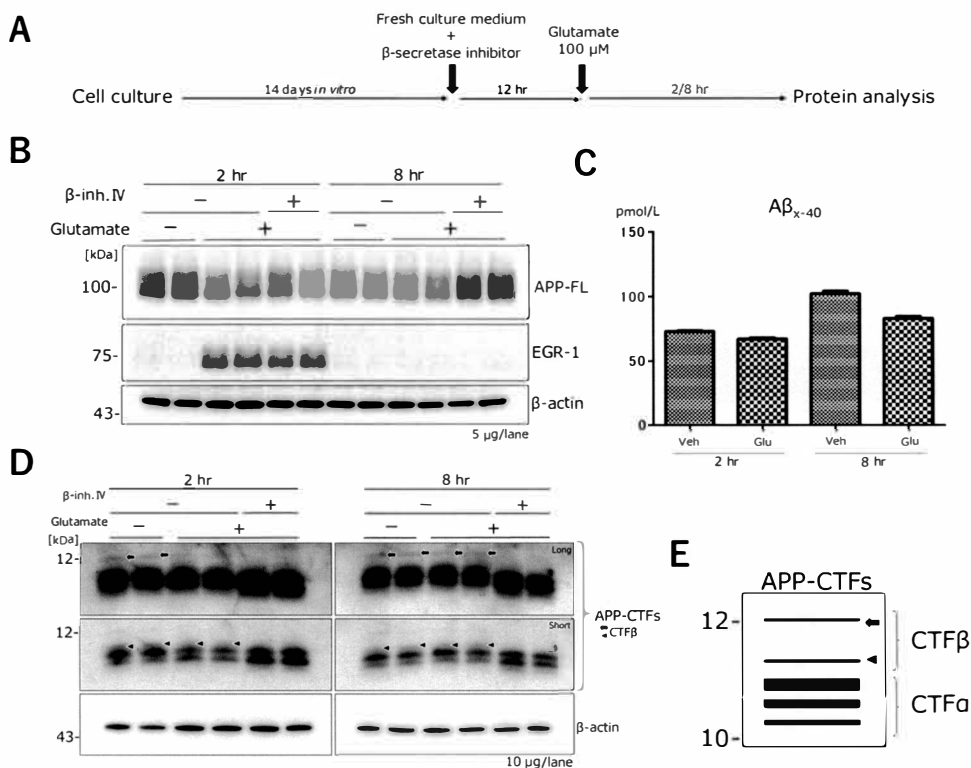


図3 グルタミン酸 100 μ M による APP processing の変化

A: 培養14日目に培地を新鮮なものに交換し, 12時間後にグルタミン酸 100 μ M を添加, 2時間後, 8時間後にそれぞれ細胞および培養上清を回収しウエスタンブロッティング解析あるいは ELISA 解析を行った. APP-CTF β の特定のため, 最終培地交換時に β -secretase 阻害剤 (β -secretase inhibitor IV, 5 μ M) を同時に添加した. 添加しないものには対照としてジメチルスルホキシド (dimethyl sulfoxide, DMSO) を同量添加した. B: グルタミン酸 100 μ M 添加後2時間, 8時間のそれぞれの APP-FL, EGR-1, β -actin の免疫ブロッティングを示した. APP-FL は添加2時間では発現が低下し, 8時間では対照に近いレベルまで発現が回復した. EGR-1 は添加後2時間で強く発現し, 8時間ではピークアウトした. C: グルタミン酸 100 μ M 添加後2時間, 8時間で回収した培養上清について $A\beta_{x-40}$ 定量を行った (N=2). グルタミン酸刺激による $A\beta_{x-40}$ の増加はみられなかった. D: グルタミン酸 100 μ M 添加後2時間, 8時間の APP-CTFs, β -actin を示した. グルタミン酸 100 μ M 添加により2時間では対照に比して CTF β (矢印, 矢頭) の発現の低下をみとめた. 8時間では対照に近いレベルまで CTF β の発現は改善した. E: APP-CTFs は 12kDa 付近で複数のバンドが検出され, β -secretase 阻害剤添加により発現が低下するバンド (矢印, 矢頭) を CTF β として同定した.

現し APP-FL の発現は低下した (図 3-B). 8 時間では APP-FL の発現低下は対照に近いレベルまで回復した (図 3-B). グルタミン酸添加 2 時間および 8 時間における培養上清中の $A\beta_{x-40}$ を ELISA により定量したところ, グルタミン酸添加による有意な増加はみられなかった (図 3-C). また, グルタミン酸添加 2 時間では APP-CTF β は発現が低下し, 8 時間で対照に近いレベルまで回復した (図 3-D, E). 以上から, EGR-1 の発現増加を伴う APP-FL の発現低下は, β 切断の亢進ではなく α 切断の亢進によると考えられた.

3. グルタミン酸 0.1 μ M 及び 100 μ M による APP processing の変化

APP-CTFs は産生されるとすみやかに γ -

secretase により分解される. そこで, APP-CTFs の変化をより明確にするために, γ -secretase 阻害剤により γ 切断を抑制した上でグルタミン酸刺激を 2 時間行い APP-CTFs の変化をみた (図 4-A). 添加するグルタミン酸は EGR-1 が最も高発現した 100 μ M と低発現した 0.1 μ M の 2 段階の濃度で設定した. グルタミン酸 100 μ M では EGR-1 の高発現とともに, APP-FL の発現低下が明らかであった (図 4-B). グルタミン酸 0.1 μ M では APP-CTF β の発現亢進がみられ, 100 μ M では発現低下がみられた (図 4-C). これらから, グルタミン酸 100 μ M での刺激条件では β 切断の抑制がみられた一方で, グルタミン酸 0.1 μ M では β 切断が亢進することが示唆された.

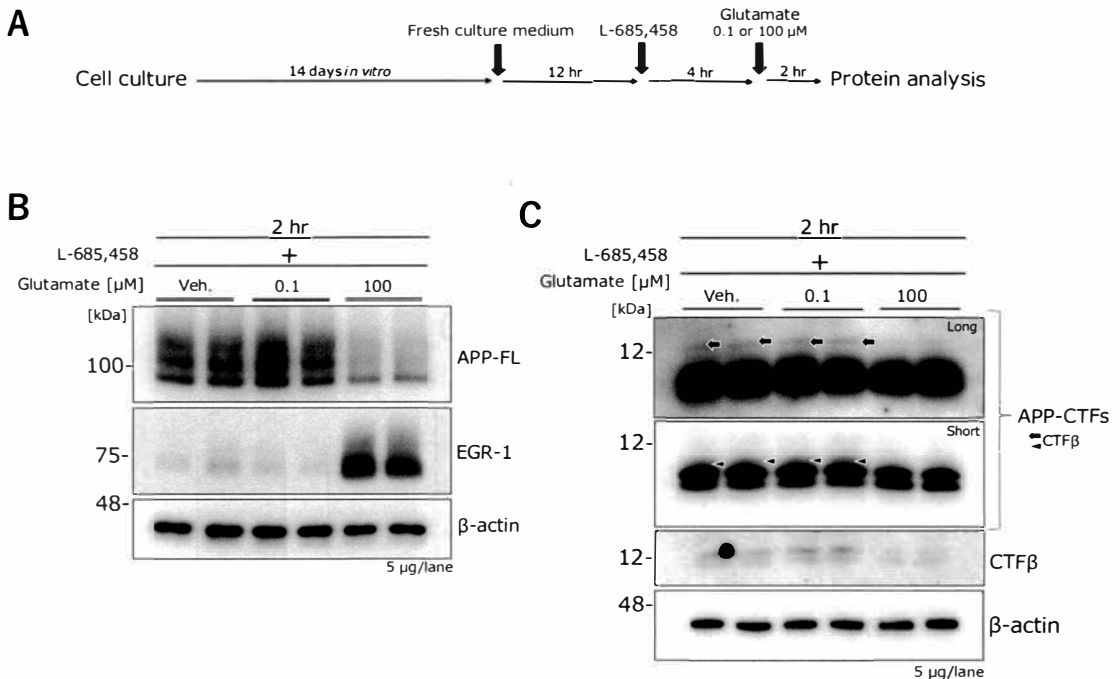


図 4 グルタミン酸 0.1 μ M 及び 100 μ M による APP processing の変化

A: 培養 14 日目に培地を交換し, 12 時間後に γ -secretase 阻害剤 (L-685,458, 2 μ M) を加えた. その 4 時間後にグルタミン酸 0.1 μ M, 100 μ M を添加, 2 時間後に細胞を回収しウエスタンブロッティング解析を行った. B: グルタミン酸 0.1 μ M, 100 μ M 添加 2 時間後の APP-FL, EGR-1, β -actin の免疫ブロッティングを示した. C: グルタミン酸 0.1 μ M, 100 μ M 添加 2 時間後の APP-CTFs (CTF β : 矢印, APP-CTF β , β -actin) を示した. CTF β はグルタミン酸 0.1 μ M では発現が増加し, 100 μ M では発現が低下した.

4. グルタミン酸 0.1 μ M 添加 24 時間後の APP processing の変化

次に、 β 切断の亢進が示唆されたグルタミン酸 0.1 μ M での刺激において、より長時間の条件で同様に amyloidogenic APP processing をもたらすかについて検証した (図 5-A)。グルタミン酸 0.1 μ M 添加により sAPP β は増加し (図 5-B)、APP-FL で補正すると有意な増加を示した (図 5-C)。さらに、 β -secretase 阻害剤により β 切断を抑制すると sAPP β の消失とともに、APP-

FL の発現増加傾向をみとめた (図 5-B)。また、ELISA 解析により培養上清中の A β_{x-40} が有意に増加していた (図 5-D)。以上から、グルタミン酸 0.1 μ M による持続的な神経細胞興奮は β 切断の亢進を介して A β 産生を亢進させることが示唆された。

5. 神経興奮依存性の A β 産生に対する NMDA 型受容体アンタゴニストの影響

グルタミン酸 0.1 μ M による長時間の刺激によ

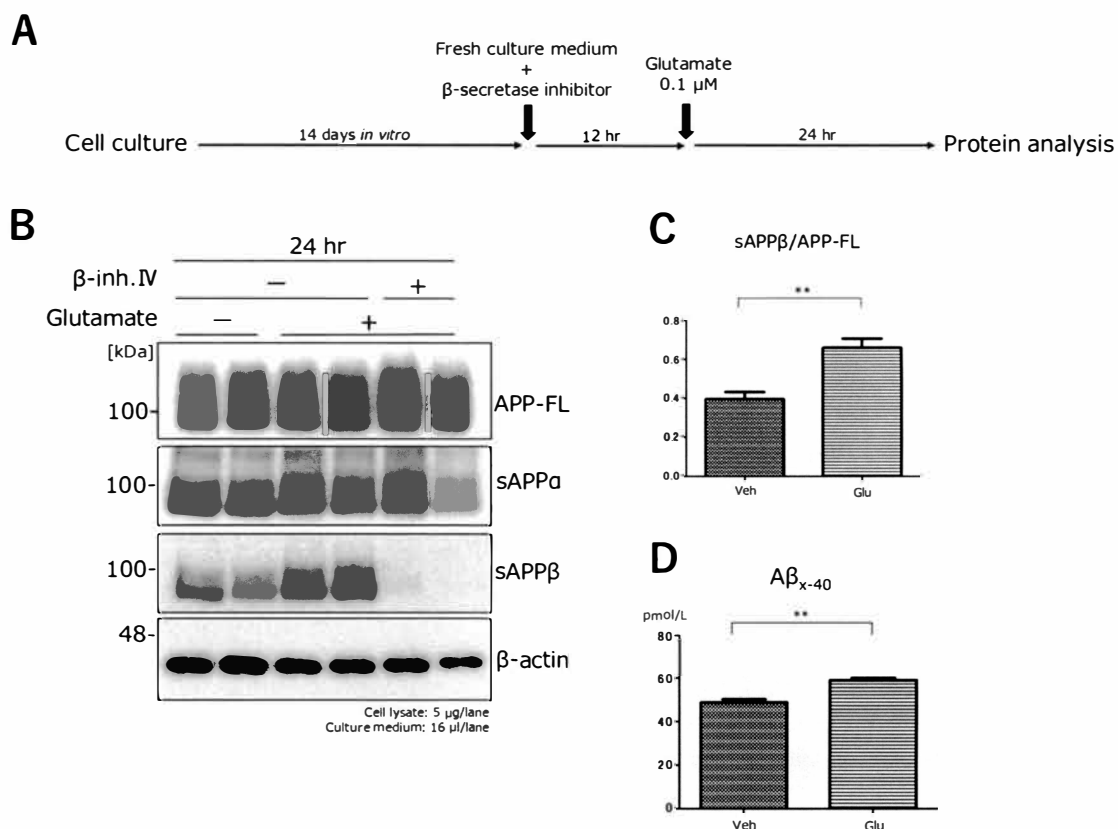


図5 グルタミン酸 0.1 μ M 添加 24 時間後の APP processing の変化

A: 培養 14 日目に培地を新鮮なものに交換し、12 時間後にグルタミン酸 0.1 μ M を添加、24 時間後に細胞および培養上清を回収しウエスタンブロッティング解析あるいは ELISA 解析を行った。sAPP β 発現の確認のため、最終培地交換時に β -secretase 阻害剤 (β -secretase inhibitor IV, 5 μ M) を同時に添加する条件も検証した。添加しないものには DMSO を同量添加した。B: グルタミン酸 0.1 μ M 添加後 24 時間の APP-FL, sAPP α , sAPP β , β -actin の免疫ブロッティングを示した。C: sAPP β /APP-FL の免疫ブロッティングの半定量解析結果を示した。グルタミン酸添加により有意に増加をみとめた。D: A β_{x-40} 値の解析結果を示した。グルタミン酸添加により有意に増加をみとめた。C および D においては対照、グルタミン酸添加群それぞれ N=6 の複数回の検証を行った。統計的解析は Mann-Whitney U 検定を用い、平均値 \pm 標準誤差を示した。有意差判定 $p < 0.01$ を ** とした。

る $A\beta$ 産生の増加が NMDA 型受容体の活性化を介するかを検証するため、グルタミン酸添加時に NMDA 型受容体アンタゴニストである MK-801 を併用し、24 時間後に回収しウエスタンブロッティング解析を行った (図 6-A)。グルタミン酸添加により $sAPP\beta$ は $sAPP\alpha$ に比して発現が優

位になり、MK-801 添加によりこれが有意に抑制された (図 6-C)。 $sAPP\beta/APP-FL$ はグルタミン酸添加で増加傾向があり MK-801 添加によりこれは有意に抑制された (図 6-D)。ELISA による $A\beta_{x-40}$ の解析では、グルタミン酸添加により増加傾向をみとめ、MK-801 添加で有意に低

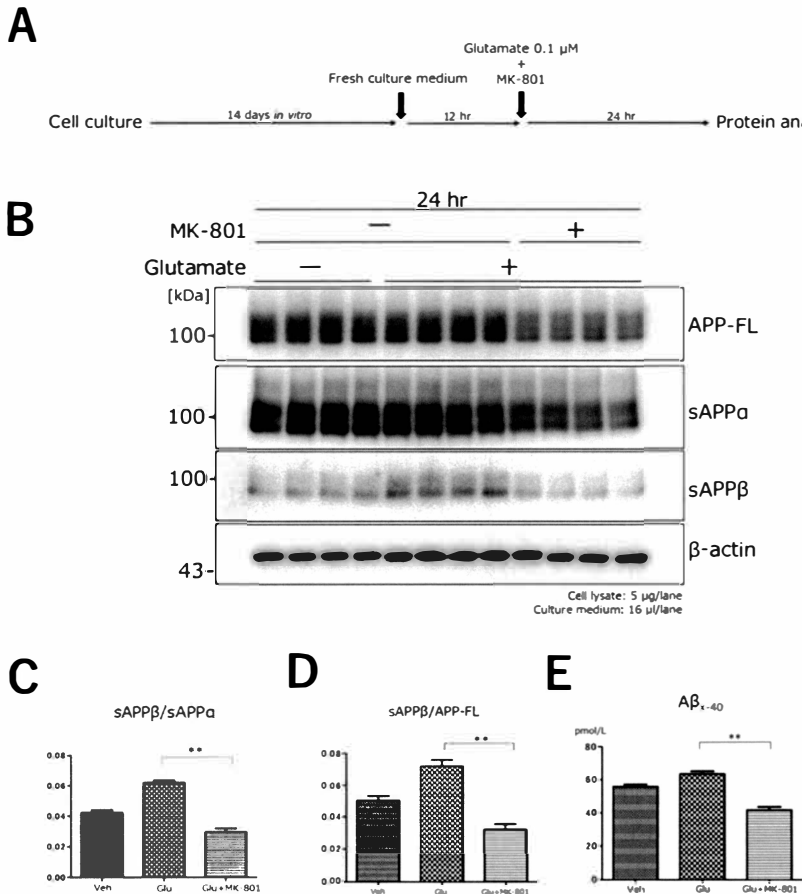


図 6 神経興奮依存性の $A\beta$ 産生に対する NMDA 型受容体アンタゴニストの影響

A：培養 14 日目に培地を新鮮なものに交換し、12 時間後にグルタミン酸 0.1 μM および NMDA 型受容体アンタゴニストである MK-801 5 μM を添加、24 時間後に細胞および培養上清を回収しウエスタンブロッティング解析あるいは ELISA 解析を行った。MK-801 を添加しないものには DMSO を同量添加した。B：APP-FL, $sAPP\alpha$, $sAPP\beta$, β -actin の免疫ブロッティングを示した。C： $sAPP\beta$ の $sAPP\alpha$ に対する比の半定量解析の結果を示した。グルタミン酸添加により $sAPP\beta$ がより優位になる傾向がみとめられ、MK-801 添加によりこれが有意に抑制された。D： $sAPP\beta/APP-FL$ の免疫ブロッティングの半定量解析結果を示した。 $sAPP\beta$ はグルタミン酸添加で増加傾向があり MK-801 添加により有意に抑制された。E： $A\beta_{x-40}$ 値の解析結果を示した。複数回の検証でグルタミン酸添加により増加傾向をみとめ、MK-801 添加で有意に低下をみとめた。C, D, E における統計的解析は各群 N=4 の複数回の検証について Kruskal-Wallis 検定で一元配置分散分析を行い、有意差をみとめた場合、Dunn 法による事後検定を行った。平均値 ± 標準誤差を示した。有意差判定 $p < 0.01$ を ** とした。

下がみられた(図6-E)。以上から、グルタミン酸 0.1 μ M により促進された amyloidogenic pathway は NMDA 型受容体の活性化を介していることが示唆された。

考 察

本研究では神経活動の持続的な亢進が AD 病態へ関与するとの仮説を立て、グルタミン酸による神経細胞興奮が A β 産生を含む APP processing に及ぼす影響について培養細胞を用いて検証した。高濃度グルタミン酸 (100 μ M) による刺激では APP-FL 及び APP-CTF β の発現が低下し、 α 切断が優位となった。一方、低濃度グルタミン酸 (0.1 μ M) による刺激では APP-CTF β あるいは sAPP β の増加、A β 産生の増加をみると、 β 切断の亢進がみられた。

神経細胞興奮の指標として EGR-1 を用いた。EGR-1 は c-fos, Arc などの最初期遺伝子 (IEGs: immediate-early genes) の一つとされ、神経細胞においてシナプス活動や活動電位に伴うカルシウムイオンの流入などにより発現が誘導される^{18) 19)}。EGR-1 の発現は AD 剖検脳や AD モデルマウスで増加しており^{20) 21)}、また、 β -secretase 発現の転写因子として働き amyloidogenic APP processing を増加させることが報告されている²²⁾。しかし、本研究ではグルタミン酸 100 μ M 刺激で EGR-1 の強い発現増加に伴い、一過性の APP-FL の発現低下をみとめたが、APP-CTF β の増加を伴わなかったことから、APP-FL の発現低下は amyloidogenic APP processing の亢進によるものではないと考えられた。さらに、グルタミン酸 100 μ M による刺激では APP-FL の低下に比し、APP-CTFs (主に CTF α) の発現は低下しておらず、 α 切断が相対的に亢進していることが示唆された。これらから、本研究における EGR-1 の一過性の発現増加は AD 剖検脳や AD モデルマウスでみとめる持続的な発現増加とは異なる現象であり、神経活動亢進の病的な持続が A β 産生に影響すると考えられた。グルタミン酸 0.1 μ M による長時間での刺激条件において、 β 切断を介した A β

産生亢進がみられていることはこれを支持する。この amyloidogenic APP processing は MK-801 による NMDA 型受容体の阻害により抑制されたことから、NMDA 型受容体の持続的活性化は A β 産生を促進すると考えられた。ただし、MK-801 による sAPP β 、A β 産生に対する抑制効果は強く、その発現は対照よりも低下していた。MK-801 添加は APP-FL の発現も抑制しており、NMDA 型受容体は神経細胞における APP-FL の発現の維持にも機能している可能性がある。

本研究から、グルタミン酸による刺激は濃度と持続時間により APP processing が amyloidogenic と non-amyloidogenic の間で変化することが分かった。神経活動が APP processing に変化をもたらす機序として、既報では NMDA 型受容体の活性化を介した α -secretase 活性の変化が指摘されている^{12) 13)}。特に、NMDA 型受容体の強い活性化は α -secretase 活性を上昇させることで α 切断が優位となり、弱い活性化では α 切断が抑制されることで β 切断が増加するとされる¹²⁾。本研究では APP-CTF α に比して APP-CTF β の変化が、また sAPP α に比して sAPP β の変化が大きくみられた。これは、 β 切断の変化を示唆する結果であり、 β -secretase の発現や活性について今後の検証が必要である。

また、*in vitro* における検証では^{14) 15)} NMDA 型受容体はその局在によって APP processing へ及ぼす影響が異なることが報告されている。シナプス外 NMDA 型受容体の活性化は A β 産生につながるとされる一方、シナプス領域 NMDA 型受容体の活性化は APP mRNA の発現抑制¹⁴⁾ と α 切断の増加により A β 産生に抑制的¹⁵⁾ とされる。本研究においても、APP-FL の発現が一過性に低下しており、 α 切断の増加のみではなくシナプス領域 NMDA 受容体の活性化を介した APP mRNA の発現抑制が関与している可能性がある。

今回の研究における低濃度グルタミン酸による刺激ではシナプス外 NMDA 型受容体が主に活性化され、高濃度グルタミン酸による刺激ではシナプス領域 NMDA 型受容体が主に活性化している可能性がある。特に、低濃度グルタミン酸による

APP processing の挙動がシナプス外 NMDA 型受容体の活性化によるものであるかを明らかにするためには、非 NMDA 型受容体およびシナプス領域 NMDA 型受容体を阻害した状態におけるグルタミン酸添加、すなわち、シナプス外 NMDA 型受容体の選択的刺激により、同様の挙動がみられるかについて検討が必要である。また、AMPA 型受容体の活性化が一過性の APP-FL の発現低下に伴って α 切断を促進させる報告¹⁶⁾もあり、高濃度グルタミン酸による興奮では AMPA 型受容体の活性化をみている可能性もある。

本研究における amyloidogenic APP processing は主に NMDA 型受容体活性化による変化を反映している可能性を支持した。今後は、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神経細胞興奮依存性の APP processing の変化に対する効果を詳細に検証することにより、神経活動亢進に起因する早期 AD 病態に対する新たな治療介入点を見出していくことが重要であると思われる。

結 論

グルタミン酸による神経細胞興奮は β 切断亢進を介した amyloidogenic APP processing をもたらし、興奮が強くなると逆にこれが抑制される。このように神経細胞興奮の程度によって APP processing は変化することが示唆された。

謝 辞

本研究のご指導をいただきました新潟大学脳研究所神経内科学分野教授 小野寺理先生、新潟大学脳研究所遺伝子機能解析学分野教授 池内 健先生、助教 春日健作先生に深謝致します。

参考文献

- 1) Jack CR Jr, Knopman DS, Jagust WJ, Petersen RC, Weiner MW, Aisen PS, Shaw LM, Vemuri P, Wiste HJ, Weigand SD, Lesnick TG, Pankratz VS, Donohue MC and Trojanowski

JQ: Tracking pathophysiological processes in Alzheimer's disease: an updated hypothetical model of dynamic biomarkers. *Lancet Neurol.* Feb; 12: 207-216, 2013.

- 2) Buckner RL, Snyder AZ, Shannon BJ, LaRossa G, Sachs R, Fotenos AF, Sheline YI, Klunk WE, Mathis CA, Morris JC and Mintun MA: Molecular, structural, and functional characterization of Alzheimer's disease: evidence for a relationship between default activity, amyloid, and memory. *J Neurosci.* Aug 24; 25: 7709-7717, 2005.
- 3) Sperling RA, Laviolette PS, O'Keefe K, O'Brien J, Rentz DM, Pihlajamaki M, Marshall G, Hyman BT, Selkoe DJ, Hedden T, Buckner RL, Becker JA and Johnson KA: Amyloid deposition is associated with impaired default network function in older persons without dementia. *Neuron.* Jul 30; 63: 178-188, 2009.
- 4) Palop JJ, Chin J, Roberson ED, Wang J, Thwin MT, Bien-Ly N, Yoo J, Ho KO, Yu GQ, Kreitzer A, Finkbeiner S, Noebels JL and Mucke L: Aberrant excitatory neuronal activity and compensatory remodeling of inhibitory hippocampal circuits in mouse models of Alzheimer's disease. *Neuron.* Sep 6; 55: 697-711, 2007.
- 5) Vossel KA, Ranasinghe KG, Beagle AJ, Mizuiri D, Honma SM, Dowling AF, Darwish SM, Van Berlo V, Barnes DE, Mantle M, Karydas AM, Coppola G, Roberson ED, Miller BL, Garcia PA, Kirsch HE, Mucke L and Nagarajan SS: Incidence and impact of subclinical epileptiform activity in Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* Dec; 80: 858-870, 2016.
- 6) Sanchez PE, Zhu L, Verret L, Vossel KA, Orr AG, Cirrito JR, Devidze N, Ho K, Yu GQ, Palop JJ and Mucke L: Levetiracetam suppresses neuronal network dysfunction and reverses synaptic and cognitive deficits in an Alzheimer's disease model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Oct 16; 109: E2895-2903, 2012.
- 7) Bakker A, Krauss GL, Albert MS, Speck CL, Jones LR, Stark CE, Yassa MA, Bassett SS, Shelton AL and Gallagher M: Reduction of

- hippocampal hyperactivity improves cognition in amnesic mild cognitive impairment. *Neuron*. May 10; 74: 467-474, 2012.
- 8) Bakker A, Albert MS, Krauss G, Speck CL and Gallagher M: Response of the medial temporal lobe network in amnesic mild cognitive impairment to therapeutic intervention assessed by fMRI and memory task performance. *Neuroimage Clin*. Feb 21; 7: 688-698, 2015.
- 9) Vossel KA, Tartaglia MC, Nygaard HB, Zeman AZ and Miller BL: Epileptic activity in Alzheimer's disease: causes and clinical relevance. *Lancet Neurol*. Apr; 16: 311-322, 2017.
- 10) Cirrito JR, Yamada KA, Finn MB, Sloviter RS, Bales KR, May PC, Schoepp DD, Paul SM, Mennerick S and Holtzman DM: Synaptic activity regulates interstitial fluid amyloid-beta levels in vivo. *Neuron*. Dec 22; 48: 913-922, 2005.
- 11) Kamenetz F, Tomita T, Hsieh H, Seabrook G, Borchelt D, Iwatsubo T, Sisodia S and Malinow R: APP processing and synaptic function. *Neuron*. Mar 27; 37: 925-937, 2003.
- 12) Verges DK, Restivo JL, Goebel WD, Holtzman DM and Cirrito JR: Opposing synaptic regulation of amyloid- β metabolism by NMDA receptors in vivo. *J Neurosci*. Aug 3; 31: 11328-11337, 2011.
- 13) Lesné S, Ali C, Gabriel C, Croci N, MacKenzie ET, Glabe CG, Plotkine M, Marchand-Verrecchia C, Vivien D and Buisson A: NMDA receptor activation inhibits alpha-secretase and promotes neuronal amyloid-beta production. *J Neurosci*. Oct 12; 25: 9367-9377, 2005.
- 14) Bordji K, Becerril-Ortega J, Nicole O and Buisson A: Activation of extrasynaptic, but not synaptic, NMDA receptors modifies amyloid precursor protein expression pattern and increases amyloid- β production. *J Neurosci*. Nov 24; 30: 15927-15942, 2010.
- 15) Hoey SE, Williams RJ and Perkinson MS: Synaptic NMDA receptor activation stimulates alpha-secretase amyloid precursor protein processing and inhibits amyloid-beta production. *J Neurosci*. Apr 8; 29: 4442-4460, 2009.
- 16) Hoey SE, Buonocore F, Cox CJ, Hammond VJ, Perkinson MS and Williams RJ: AMPA receptor activation promotes non-amyloidogenic amyloid precursor protein processing and suppresses neuronal amyloid- β production. *PLoS One*. Oct 24; 8, 2013.
- 17) Kim SH, Fraser PE, Westaway D, St George-Hyslop PH, Ehrlich ME and Gandy S: Group II metabotropic glutamate receptor stimulation triggers production and release of Alzheimer's amyloid (beta) 42 from isolated intact nerve terminals. *J Neurosci*. Mar 17; 30: 3870-3875, 2010.
- 18) Duclot F and Kabbaj M: The Role of Early Growth Response 1 (EGR1) in Brain Plasticity and Neuropsychiatric Disorders. *Front Behav Neurosci*. Mar 6; 11: 35, 2017.
- 19) Okuno H: Regulation and function of immediate-early genes in the brain: beyond neuronal activity markers. *Neurosci Res*. Mar; 69: 175-186, 2011.
- 20) Gómez Ravetti M, Rosso OA, Berretta R and Moscato P: Uncovering molecular biomarkers that correlate cognitive decline with the changes of hippocampus' gene expression profiles in Alzheimer's disease. *PLoS One*. Apr 13; 5: e10153, 2010.
- 21) Lu Y, Li T, Qureshi HY, Han D and Paudel HK: Early growth response 1(Egr-1)regulates phosphorylation of microtubule-associated protein tau in mammalian brain. *J Biol Chem*. Jun 10; 286: 20569-20581, 2011.
- 22) Qin X, Wang Y and Paudel HK: Early Growth Response 1 (Egr-1) Is a Transcriptional Activator of β -Secretase 1 (BACE-1) in the Brain. *J Biol Chem*. Oct 14; 291: 22276-22287, Epub 2016 Aug 30, 2016.

(平成31年1月16日受付)