

# Intracellular Accumulation of Toxic Turn Amyloid- $\beta$ is Associated with Endoplasmic Reticulum Stress in Alzheimer's Disease

副島, 直子

<https://hdl.handle.net/2324/1398282>

---

出版情報：九州大学, 2013, 博士 (医学), 課程博士  
バージョン：  
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開 (4)

氏名・(本籍・国籍)	そえじま なお こ 副島直子(長崎県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	医博甲第2629号
学位授与の日付	平成25年6月30日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系学府 医学専攻
学位論文題目	Intracellular Accumulation of Toxic Turn Amyloid- $\beta$ is Associated with Endoplasmic Reticulum Stress in Alzheimer's Disease (アルツハイマー病において、毒性ターン構造をもつ Amyloid- $\beta$ の細胞内蓄積は、小胞体ストレスと関連する)
論文調査委員	(主査) 教授 康 東天 (副査) 教授 北園孝成 教授 神庭重信

## 論文内容の要旨

諸言：アルツハイマー病(AD)は高齢者で一般的に見られる認知症で、病理学的に老人斑と神経原線維変化が特徴である。神経原線維変化は神経細胞内の過リン酸化タウ蛋白、老人斑は細胞外の Amyloid- $\beta$  蛋白(A $\beta$ )から成る。A $\beta$ の蓄積は、神経原線維形成より早期から始まっており、老人斑の主要な蓄積物である A $\beta$ 42は、高い凝集性を持つ。最近、A $\beta$ オリゴマーは A $\beta$ 線維と比べ、シナプスに、より高い毒性を有することが報告され、細胞外 A $\beta$ オリゴマーをターゲットに研究が行われている。神経細胞内 A $\beta$ オリゴマーは *in vivo* で、小胞体、エンドソーム/リソソーム、ミトコンドリアに蓄積する。おそらく A $\beta$ オリゴマーは疾患過程の早期に、シナプス終末の内・外側の両方で形成され、細胞内および細胞外 A $\beta$ と相互に影響すると考えられる。それゆえ、神経細胞内の A $\beta$ オリゴマーの蓄積は、細胞外と同様に、シナプス機能障害や記憶障害に関連するかもしれない。最近、22・23アミノ酸間でターン構造を有し高い毒性をもつ A $\beta$ 42が、ADの神経細胞に蓄積することが報告された。今回の研究で、私たちは変異 PS1 トランスフェクト細胞、3xTg-AD マウス、および AD 脳における A $\beta$ 、毒性ターン構造 A $\beta$ 、高分子量 A $\beta$ オリゴマーの蓄積を調べた。また A $\beta$ の細胞内蓄積と ER ストレスマーカーの GRP78、細胞内輸送系蛋白の Rab4、Rab6 との関係性を、培養細胞、3xTg-AD マウス、AD 脳で調べた。

方法：ヒト線維芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞に、ヒト野生型 PS1、変異 PS1 の G384A、I143T を導入した細胞、G384A と A $\beta$ -precursor protein (A $\beta$ PP)をダブルトランスフェクトした細胞を用いた。triple transgenic AD モデル(3xTg-AD)(A $\beta$ PP<sub>KM670/671NL</sub>/PS1<sub>M146V</sub>/Tau<sub>P301L</sub>) マウス、nonTg マウスの 2、5、7、12 カ月齢を用いた。ヒト脳組織として AD 患者、コントロールの剖検脳の前頭葉・側頭葉を用いた。細胞、マウス脳組織は抗 4G8(A $\beta$ 17-24)、12F4(A $\beta$ 42 C 端)、11A1(アミノ酸 22-23 でターン構造をとる毒性の高い A $\beta$ 42)、A11(~50-75kD の高分子量 A $\beta$ オリゴマー)抗体および、小胞体ストレスマーカーの抗

GRP78 抗体、細胞内輸送系蛋白の抗 Rab4(early endosome)、Rab6(ゴルジ-ER 逆行性輸送) 抗体で染色した。ヒト脳組織は、抗 11A1、A11、4G8 抗体で免疫組織染色を行い、抗 11A1 抗体と抗 GRP78、Rab4、Rab6 抗体の二重免疫蛍光染色を行った。定量的測定のため、細胞染色では各 10 個ずつ細胞の蛍光強度を測定し、マウス脳では海馬 CA1 の DAB 染色強度を測定した。Western blotting(WB)は、培養細胞、マウス脳の蛋白で、抗 GRP78、Rab4、Rab6 抗体を用いて行い、バンド強度を測定し  $\beta$ -actin のバンド強度で補正した。各染色、WB はそれぞれ 5 回行い解析した。多重比較は Tukey-Kramer 法を用いた。

結果：①4G8 と 11A1 は変異 PS1 細胞でよく染色され、A $\beta$ PP を共にトランスフェクトした細胞では劇的に A $\beta$  蓄積が増加した。12F4 の免疫染色も同様であった。A11 は PS1 変異により増強され、A $\beta$ PP の共発現では減弱した。②3xTg-AD マウスの神経細胞では、4G8、11A1、A11、12F4 の染色は、それぞれ 5、2、7、5 カ月齢から見られた。③トランスフェクト細胞では、Rab4、GRP78 は細胞質に、び慢性の免疫反応性を認め、Rab6 は核周囲に局在を認めた。蛍光強度の測定では、Rab6、GRP78 は、PS1 変異細胞で著明に増加を認めた。有意ではなかったが Rab4 も同じ傾向であった。WB では、Rab6、GRP78 レベルは、PS1 遺伝子変異、APP 遺伝子の共発現で増加し、蛍光染色の定量的評価と一致した。④3xTg-AD マウスの神経細胞では、抗 Rab4、Rab6、GRP78 抗体はそれぞれ 7、7、2 カ月齢から染色された。non-Tg マウスでは Rab4、Rab6 は 12 カ月齢でも染色を認めず、GRP78 は 3xTg-AD マウスの染色と比べ明らかに低かった。DAB 染色強度の定量的解析では、GRP78 レベルは 3xTg-AD マウスの特に若年期に著明に増加した。WB では、3xTg-AD マウスと non-Tg マウスの GRP78、Rab4、Rab6 の蛋白レベルに明らかな差は見られなかった。⑤神経細胞内の毒性ターン構造 A $\beta$  の蓄積は、AD 早期の GRP78 蛋白量の増加に関連していることが示唆された。その可能性を確かめるため AD 患者脳での免疫染色を行った。抗 4G8、11A1 抗体では多くの老人斑、神経細胞が染色され、抗 A11 抗体では少しの神経細胞の染色を認めた。二重免疫蛍光染色では、AD 脳ではコントロールと比べ、11A1 と GRP78 の高い免疫反応性および共局在を認めた。

考察：毒性ターン構造 A $\beta$  は、3xTg-AD マウス脳の神経細胞で、認知障害出現前早期の A $\beta$  蓄積の主要構造である可能性がある。高分子量 A $\beta$  オリゴマーは認知障害出現後に染色性を認め、記憶障害の主要な原因ではないことが示唆される。トランスフェクト細胞では、A $\beta$  の過剰産生が A $\beta$  蓄積を促進する可能性、変異 PS1 は高分子量 A $\beta$  オリゴマーの形成を促進し、A $\beta$ PP は A $\beta$  凝集を減ずる可能性がある。変異 PS1 は Rab6 と GRP78 の蛋白量を増加させ、A $\beta$ PP を共にトランスフェクトさせた細胞ではこの変化が増強した。これらの蛋白の免疫反応性のパターンは、4G8 や 11A1 の免疫反応性のパターンと相関した。毒性ターン構造 A $\beta$  の蓄積は ER ストレスを引き起こし、細胞内蛋白輸送系に影響を与えるかもしれないと考えられる。3xTg-AD 脳の結果から、毒性ターン構造 A $\beta$  が早期に ER stress を引き起こし、高分子量 A $\beta$  オリゴマーは蛋白輸送系の異常に関係する可能性が示唆された。毒性ターン構造 A $\beta$  は、小胞体での異常な折りたたみにより産生され、GRP78 レベルの増加は毒性ターン構造 A $\beta$  形成の UPR を表しているかもしれない。AD 脳の二重免疫蛍光染色では、神経細胞内に毒性ターン構造 A $\beta$  と GRP78 の共局在が見られ、これを支持する。毒性ターン構造 A $\beta$  の蓄積は、AD の ER ストレスと強く関連すると推測される。神経細胞内の毒性ターン構造 A $\beta$  の蓄積は、認知機能障害の前に ER ストレスを引き起こす可能性、PS1 変異蛋白は ER ストレスを加速させ、高分子量 A $\beta$  オリゴマーの産生を促進させる可能性が推測される。これらのオリゴマーの産生は、蛋白輸送系の機能障害をさらに促進し、認知機能障害を悪化させることが推測される。

結論： 変異 PS1 トランスフェクト細胞、3xTg-AD マウス、AD 患者における、A $\beta$ 、細胞内輸送系蛋白、ER ストレスマーカーの発現を明らかにした。3xTg-AD マウスにおいて、毒性ターン構造 A $\beta$  は、認知機能障害出現前の早期から蓄積することを明らかにした。病初期の AD モデルマウス、AD 患者で、神経細胞内の毒性ターン構造 A $\beta$  が ER ストレスと関連する可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

amyloid- $\beta$  (以下 A $\beta$ ) がアルツハイマー病 (以下 AD) の病初期から神経細胞に蓄積する。最近申請者のグループはアミノ酸 22 番、23 番間でターン構造を取る毒性の強い A $\beta$  が AD 患者脳の神経細胞内に蓄積することを見出しているが、本論文は presenilin1 (以下 PS1) 遺伝子をトランスフェクトした SH-SY5Y 細胞、3xTG-AD マウス脳、AD 患者脳における、A $\beta$ 、毒性ターン構造 A $\beta$ 、高分子量 A $\beta$  オリゴマーの蓄積を調べたものである。免疫染色で、毒性ターン構造 A $\beta$  の蓄積は G384A-PS1 変異細胞および I143T-PS1 変異細胞で促進され、A $\beta$  前駆体タンパク質遺伝子を共にトランスフェクトした細胞ではさらに増強された。一方、高分子量 A $\beta$  オリゴマーの蓄積は PS1 変異細胞で促進されたが、A $\beta$  前駆体遺伝子を共にトランスフェクトした細胞では軽度であった。3xTg-AD マウスにおいて、毒性ターン構造 A $\beta$  は認知機能が障害されていない 2 月齢の神経細胞でみられた、一方、高分子量 A $\beta$  オリゴマーは記憶力障害が出現している 7 月齢の神経細胞で見られた。更に、細胞内輸送タンパク質調整分子である Rab4, Rab6, 小胞体ストレスマーカーである GRP78 は免疫染色およびウエスタンブロットで PS1 変異細胞、3xTg-AD マウス脳の神経細胞での蓄積が認められた。特に GRP78 の免疫反応性は 2 月齢で増加していた。AD 患者脳組織における 2 重蛍光免疫染色で、毒性ターン構造 A $\beta$  と GRP78 との関連性がみられた。これら結果から、AD モデルマウスおよび AD 患者脳で、神経細胞内の毒性ターン構造 A $\beta$  の蓄積は小胞体ストレスとの関連性がある可能性が示唆された。

以上の結果は、毒性ターン構造 A $\beta$  の小胞体内蓄積が小胞体ストレスを引き起こし、AD の発症に寄与している可能性を示唆した、この領域の研究に優れた新しい知見を加える意義あるものと認められる。発表のあと、専門的立場から種々の質問を行ったが、いずれも適切な回答を得た。よって主査副査 3 人の委員の合議の結果、試験は合格とした。