5) アルツハイマー病関連侵害刺激下の神経細胞死と生存

新倉 貴子 橋本 祐一 田島 裕久 伊藤 友子 西本 征央

Key words：アルツハイマー病，ヒューマニン（Humanin），アミロイド前駆体蛋白，プレセニリン，神経細胞死

（日老医誌 2003；40：36—40）

はじめに

神経細胞死はアルツハイマー病（AD）における主要な病理組織学的所見のひとつである。ADは神経細胞の変性，脱落により痴呆などの症状を呈する神経変性疾患であることから，神経細胞死はADの中心病態といえる。ADの病因は一般には，ADの病理学的特徴である老人斑や神経原線維変化といった異常蛋白質，特に老人斑の主成分であるベータアミロイド（A β ），の蓄積であると考えられている。しかしながら，これらの異常構造物がどのようにして神経細胞死を誘導するかについての分子機構は特定されておらず，その関与そのものについても異論がある。一方，神経細胞の欠損がAD発症の中心的要因であることから，神経細胞死の阻止を標的とした治療法はADの根治を目指す上で重要な課題であり，神経細胞死機序の解明はそのためにも不可欠といえる。

AD関連侵害刺激による神経細胞死

ADの病因のひとつと考えられているA β を高濃度で大脳皮質初代培養神経細胞に添加すると細胞死が誘導される。この細胞死には，酸化ストレス，カスパーゼ，JNKなどの細胞内経路が関与することが報告されている。しかし，細胞外A β の過剰な蓄積が認められるトランスジェニックマウスが神経細胞死を伴わない^{1)~3)}といった生体内でのA β の細胞毒性を否定する報告も少なくない。一方で，孤発性及び家族性ADの脳において神経細胞内のA β 1-42量の増加が認められる⁴⁾など細胞内A β の毒性が注目されつつある。

家族性AD（FAD）の原因遺伝子として現在までに，アミロイド前駆体蛋白質（APP），プレセニリン1（PS

1），プレセニリン2（PS2）が同定されている。これらの原因遺伝子の変異体は培養細胞において細胞死を直接誘導できることが以前より報告されている^{5)~7)}。APP変異体の誘導する細胞死機構の詳細な解析により，予想外なことに，異なるFAD変異体が異なる細胞内伝達経路で細胞死を誘導していることが明らかとなった（図1）。昆虫ホルモンであるエクダイソンを用いてAPP変異体の発現が生体内と同程度の低発現から生体内の約5倍量の高発現まで自在に操作できる培養細胞系において，ロンドン型APP変異体（V642I-APP）は低発現でも高発現でも，アポトーシスの際活性化する蛋白質分解酵素カスパーゼの拮抗剤（DEVD）および抗酸化剤（Glutathione ethyl ester：GEE）に感受性の細胞死を誘導し，これは百日咳毒素（PTX）感受性三量体G蛋白Goが結合するAPP細胞内ドメイン20（His657-Lys676）⁸⁾を介して起こる。また，この細胞死を抑制する抗酸化剤はNADPH酸化酵素を標的としている。一方，スウェーデン型家族性AD変異を持つAPP変異体（K595N/M596L-APP：NL-APP）においては，低発現ではDEVDおよびGEE感受性のアポトーシス型細胞死，高発現では両薬剤に非感受性の非アポトーシス型細胞死を誘導し，前者はAPPのロンドン型FAD変異体と同様，ドメイン20を介する一方，後者にはAPPのC末端19残基（Met677-Asn695）が関与している⁹⁾。

また，PS1変異体（M146L-PS1）による細胞死はどの発現量でもDEVD非感受性，GEE感受性で，非アポトーシス型の細胞死である。このGEE感受性の細胞死は一酸化窒素合成酵素を介し，Gi/o以外の未知の百日咳毒素（PTX）感受性因子が介在すると考えられる¹⁰⁾。さらに，PS2変異体（N141I-PS2）では，低発現による細胞死はV642I-APPと同様にDEVDおよびGEE感受性でNADPH oxidaseが関与する。一方，高発現による細胞死は，DEVD非感受性GEE感受性であることはM146L-PS1と同様であるが，主としてキサンチン酸化酵素が

T. Niikura, Y. Hashimoto, H. Tajima, Y. Ito, I. Nishimoto：慶應義塾大学医学部薬理学教室

Table 1 NH の特徴

1 細胞死抑制効果は AD の侵害刺激に特異的.			
(1) 抑制効果あり:FAD 遺伝子	APP 変異体 (V642I, K595N/M596L, A617G, L648P)		
	PS1 変異体 (M146L, H163R, A246E, L286V, C410Y)		
	PS2 変異体 (N141I, M239V)		
	抗 APP 抗体	22C11	
	A β ペプチド	A β 1-42, A β 1-43, A β 25-35	
(2) 抑制効果なし:	ポリグルタミン		
	SOD1 変異体 (家族性筋萎縮性側索硬化症)		
	プリオンペプチド (PrP106-126)		
	エトボシド		
	グルタミン酸		
2 基礎細胞死への影響なし.			
3 活性は 1 次構造に依存する.			
(1) HN 配列	MAPRGFSCLLLTSEIDLVPVKRRA	有効濃度: 10 μ M	
(2) HN 置換体	HNG	MAPRGFSCLLLTGEIDLVPVKRRA	有効濃度: 10nM
	HNA	MAPRGFSALLLTSEIDLVPVKRRA	有効濃度: 無効 (>10 μ M)
	AGA-HNG	MAPAGASCLLLTGEIDLVPVKRRA	有効濃度: 100-300pM
(3) 最小有効領域	PRGFSCLLLTSEIDL		
(4) 必須アミノ酸 (下線)	MAPRGFSCLLLTSEIDL <u>P</u> VKRRA		
4 細胞内で生合成された HN は分泌されて細胞外から働く.			
5 A β 産生に影響しない.			
6 抗 HN 抗体反応性の分子が生体内に存在する.			

関与すると考えられる. N141I-PS2 の惹起する細胞死は低発現だけでなく高発現時の細胞死にも PTX 感受性三量体 G 蛋白 Go を介している¹¹⁾.

以上のように, 同じ分子 APP でも変異体の種類によって細胞死機構が異なっており, そのアミノ酸配列の相同性から同様の機能を有すると考えられている PS1 および PS2 についても, これらの変異体はそれぞれ異なる細胞死機構を惹起する. このことは, これらの遺伝子変異が症状および病理所見が同じ AD という疾患の原因であることと一見矛盾するようではあるが, AD が, 神経細胞死機構そのものではなく, 神経細胞死という結果によって引き起こされることを考慮すると, その機構が同一である必要性はなく, 細胞死が同じ領域の神経細胞に同じ様な時間経過で発生すれば同じ症候群が惹起されると理解することができる. 事実, PS1 と PS2 の持つ神経発生における機能は同じではなく, むしろ相反するとする報告もなされている¹²⁾.

以上のような AD における多様で多彩な神経細胞死機序の存在は, メカニズムを基盤とする細胞死抑制を目的とした治療法で, 様々な原因によって惹起されると考えられる一般の AD に有効なものの開発が困難であることを予想させる. そこで発想を転換して, メカニズムにはこだわらずに AD 原因遺伝子による細胞死を抑制する因子を検索するという方針で無作為スクリーニングを実施し, 新規のペプチド因子ヒューマニン (Humanin: HN) を得た¹³⁾.

神経細胞死抑制因子 Humanin

HN はアミノ酸 24 残基からなる細胞死抑制因子であるが, 神経細胞死抑制効果を示す他の神経栄養因子とは異なる性質を持つ (Table 1)^{13)~16)}. HN の最大の特徴の一つは, 様々な種類の AD 関連神経細胞死への広範な抑制作用であり, 他の一つは, HN による細胞死抑制の特異性の厳密性にある. HN は V642I-APP のみならず, 現在までに検討した全ての FAD 遺伝子変異体の惹起する細胞死を陰性対照のレベルまで完全に抑制しうる. さらに, AD の発症原因の一つとされている神経細胞障害性を持つ A β が起こす神経細胞死や (Fig. 2), 抗 APP 抗体による神経細胞死に対しても抑制効果を発揮する. 一方, AD 以外の神経変性疾患の原因因子である長鎖ポリグルタミン, SOD1 変異体, プリオンペプチドが誘導する神経細胞死等には全く抑制効果を示さない. すなわち, HN は AD に関連する細胞死誘導刺激に極めて高い特異性を持つ細胞死拮抗因子である.

HN は A β による神経細胞死を抑制するが, その作用機序については尚不明である. FAD 変異体の惹起する細胞死に対しては, これらの遺伝子変異体によって増加する A β 産生を HN は抑制せず, HN の作用が A β 産生抑制ではないと結論することができる. さらに, 前述したように FAD 変異体はアポトーシス, 非アポトーシスの両方の細胞死経路を誘導するが, HN がこれらすべての FAD 変異体の誘導する細胞死を基礎レベルにまで抑制すること, また同じアポトーシスでも抗癌剤のエトボシドによるアポトーシスは抑制しないことから, HN の

Fig. 1 Mechanism of neuronal cell death caused by FAD mutant genes and Aβ. V642I-APP, NL-APP and N141I-PS2 cause GEE/DEVD-sensitive cell death. The target of GEE is NADPH oxidase. NL-APP augments GEE/DEVD-resistant cell death at high expression. N141I-PS2 activates xanthine oxidase through Go and induces GEE-sensitive/DEVD-resistant cell death at high expression level. M146L-PS1 causes GEE-sensitive/DEVD-resistant cell death through nitric oxide synthase and a novel target of PTX. Aβ induces cell death through oxidative stress and other intracellular signaling molecules.

Fig. 2 Effect of HN on Aβ1-43-induced cytotoxicity. Primary cortical neurons were pretreated with 10μM HN peptide for 16 hours and treated with 25μM Aβ1-43 for 72 hours. The viable neurons were visualized by the Calcein-AM treatment and observed under the fluorescent microscope.

細胞死抑制機序は細胞死機構特異的なのではなく、ADによる侵害刺激に特異的であるといえる。このような細胞死抑制因子はHNが初めてである。例えば、細胞死抑制遺伝子の代表であるBcl-2は、細胞死がアポトーシスであれば、上流の細胞死刺激によらず抑制できるが、細胞死が非アポトーシスであれば、原則として、抑制しないとされている。このような特徴は、HNの作用機序が

次のいずれかであることを示している。第1は、FAD原因遺伝子が、それらの間では最終的に共通で、しかも他の細胞死シグナルには共通でない細胞死分子機構を活性化させるという状況で、HNがその分子機構を標的にしている可能性である。しかし、上記のように、FAD原因遺伝子が細胞死機構のかかなり下流まで異なっている事実を考慮すると、この可能性は低い。第2は、HNが

遺伝子転写レベルに作用して、様々な遺伝子を発現し、それらが、各FAD遺伝子の誘導する細胞死の抑制に有効である可能性である。私達は、後者の可能性が高いと考え、現在研究を進めている。

HNは細胞内で翻訳されると細胞外に分泌され、細胞膜上の特異的因子に結合してその作用を発揮する。HNの分泌機構については、HNの配列が分泌蛋白質の持つシグナル配列の条件を満たし、その条件に適合しないL9R変異体は分泌能を喪失すること、HNの分泌がKC1やcAMPで促進されプレフェルディンによる阻害を受けるという調節的なものであることが明らかとなっている。また、細胞膜上に存在するHN結合因子は、(1) HNの刺激により細胞内シグナルカスケードを活性化させること、(2) HNが低濃度でも効果を発揮すること、(3) HNの構造活性相関の結果が、検討した全てのFAD遺伝子変異体とA β の細胞毒性に対して同一のプロフィールを示すことから、HN受容体であると推定される。事実、神経細胞表面には、HN誘導体への特異的受容体結合が存在する。HN受容体の同定は、HNの作用機序の解明のみならず、HNアゴニストの創出や受容体そのものの調節を基盤とした新たなAD治療法の確立に極めて有効であると考えられる。

HNの組織分布をHNの特異的抗体を用いて調べると、3週齢のマウスでは精巣と大腸に、HNに等しい分子量と抗原性を有するペプチドが検出される¹⁶⁾。このペプチドは、HNで予め吸収した抗体では認識されない為、マウスのHNと推定される。興味深いことに、組織のHN様ペプチドは、有機溶媒によって抽出した脂質画分にほぼ全量が移行し、脂質上にミセル状態で存在していることが示唆される。12週齢のマウスでは、精巣のみにHN様ペプチドが検出されるので、マウスにおいてHNの産生は年齢依存性の制御を受けていると推察される。

HNの組織学的検討をヒト大脳に対して実施した。HNはAD大脳皮質後頭葉のcDNAライブラリーから単離された遺伝子である為、AD後頭葉にはHN陽性の神経細胞の存在が予想されたが、果たして、予想通りAD後頭葉の神経細胞が抗HN抗体陽性を示していた。予想外なことに、HN陽性のグリア細胞が海馬を中心に大脳全体に認められるが、これらの所見は年齢相対照大脳ではほとんど認められない。従って、HNの産生は、ADによって影響されることが示唆される。マウスの結果と併せて、HNが生体内で産生されていることは確実と考えられる。

HNそのものをAD治療薬として応用することを考えると、生体内での安全性、安定性そして投与方法が課題

となる。前者に関しては、HNの構造活性相関の解析により、蛋白質分解酵素切断部位を欠損させたAGA-HNGのようにHNより3,000倍から10,000倍高い活性を持つ置換体も得られたことから¹⁵⁾、構造の修飾により活性が高く安定で毒性の低い誘導体を作出することが可能であると考えている。また、HNGをマウスの脳室内に投与しても毒性を示さず、さらにスコボラミンによる健忘症に拮抗することが報告されている¹⁷⁾。スコボラミンに対する拮抗作用は、HNG投与後15分という短時間で認められることから、HNの細胞死拮抗作用によるものではなく、HN受容体の活性化により短期および長期の異なる細胞内反応がもたらされることによる可能性が高い。よって、HNを有効に脳内に到達させることができれば、HNの神経細胞保護効果を発揮させることがin vivoでも可能であると考えられる。

おわりに

HNは、神経細胞死を直接阻止すること、AD関連の細胞死侵害刺激に特異的に作用すること、アミノ酸の置換によってpMオーダーで作用する誘導体が得られること等から、ADの根治療法を可能にする治療薬シードであると考えられる。HNがA β の産生や分解に影響しないことは、A β を標的とした他の治療法(A β 産生阻害、分解促進、免疫によるA β 除去)との併用による広範な治療法の確立が可能であることを示す。HNの作用機序の解明は、ADにおける神経細胞死機序と臨床的発症を規定する機構への理解を深め、さらなる治療薬開発の道を開くことが期待される。

文 献

- 1) LaFerla FM, Tinkle BT, Bieberich CJ, Haudenschield CC, Jay G: The Alzheimer's Abeta peptide induces neurodegeneration and apoptotic cell death in transgenic mice. *Nat Genet* 1995; 9: 21-30.
- 2) Irizarry MC, McNamara M, Fedorchak K, Hsiao K, Hyman BT: APPSw transgenic mice develop age-related Abeta deposits and neuropil abnormalities, but no neuronal loss in CA1. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997; 56: 965-973.
- 3) Irizarry MC, Soriano F, McNamara M, Page KJ, Schenk D, Games D, et al.: Abeta deposition is associated with neuropil changes, but not with overt neuronal loss in the human amyloid precursor protein V717F (PDAPP) transgenic mouse. *J Neurosci* 1997; 17: 7053-7059.
- 4) Tabira T, Chui DH, Kuroda S: Significance of intracellular Abeta42 accumulation in Alzheimer's disease. *Front Biosci* 2002; 7: a44-49.

- 5) Yamatsuji T, Okamoto T, Takeda S, Fukumoto H, Iwatsubo T, Suzuki N, et al.: G-protein mediated neuronal DNA fragmentation by familial Alzheimer's disease-associated V642 mutants of APP. *Science* 1996; 272: 1349—1352.
- 6) Yamatsuji T, Okamoto T, Takeda S, Murayama Y, Tanaka N, Nishimoto I: Expression of V642 APP mutant causes cellular apoptosis as Alzheimer trait-linked phenotype. *EMBO J* 1996; 15: 498—509.
- 7) Giambarella U, Yamatsuji T, Okamoto T, Matsui T, Ikezu T, Murayama Y, et al.: G protein betagammacomplex-mediated apoptosis by familial Alzheimer's disease mutant of APP. *EMBO J* 1997; 16: 4897—4907.
- 8) Nishimoto I, Okamoto T, Matsuura Y, Takahashi S, Okamoto T, Murayama Y, et al.: Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTP-binding protein Go. *Nature* 1993; 362: 75—79.
- 9) Hashimoto Y, Niikura T, Ito Y, Nishimoto I: Multiple mechanisms underlie neurotoxicity by different types of Alzheimer's disease mutations of amyloid precursor protein. *J Biol Chem* 2000; 275: 34541—34551.
- 10) Hashimoto Y, Ito Y, Arakawa E, Kita Y, Terashita K, Niikura T, et al.: Neurotoxic mechanisms triggered by Alzheimer's disease-linked mutant M146L presenilin 1: involvement of NO synthase via a novel pertussis toxin target. *J Neurochem* 2002; 80: 426—437.
- 11) Hashimoto Y, Niikura T, Ito Y, Kita Y, Terashita K, Nishimoto I: Neurotoxic mechanisms by Alzheimer's disease-linked N141I mutant of presenilin2. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 300: 736—745.
- 12) Hong CS, Caromile L, Nomata Y, Mori H, Bredesen DE, Koo EH: Contrasting role of presenilin-1 and presenilin-2 in neuronal differentiation in vitro. *J Neurosci* 1999; 19: 637—643.
- 13) Hashimoto Y, Niikura T, Tajima H, Yasukawa T, Sudo H, Ito Y, et al.: A rescue factor abolishing neuronal cell death by a wide spectrum of familial Alzheimer's disease genes and Abeta. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 6336—6341.
- 14) Hashimoto Y, Ito Y, Niikura T, Shao Z, Hata M, Oyama F, et al.: Mechanisms of neuroprotection by a novel rescue factor Humanin from Swedish mutant amyloid precursor protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 283: 460—468.
- 15) Hashimoto Y, Niikura T, Ito Y, Sudo H, Hata M, Arakawa E, et al.: Detailed characterization of neuroprotection by a rescue factor Humanin against various Alzheimer's disease-relevant insults. *J Neurosci* 2001; 21: 9235—9245.
- 16) Tajima H, Niikura T, Hashimoto Y, Ito Y, Kita Y, Terashita K, et al.: Evidence for in vivo presence of Humanin Peptide, a neuroprotective factor against Alzheimer's disease-related insults. *Neurosci Lett* 2002; 324: 227—231.
- 17) Mamiya T, Ukai M: [Gly14]-Humanin improved the learning and memory impairment induced by scopolamine in vivo. *Br J Pharmacol* 2001; 134: 1597—1599.

Abstract

Neuronal cell death by Alzheimer's disease-relevant insults and its rescue

Takako Niikura, Yuichi Hashimoto, Hirohisa Tajima, Yuko Ito, and Ikuo Nishimoto

Neuronal cell death accounts for the clinical manifestations in Alzheimer's disease (AD). To establish the curative therapy of AD, neuroprotection is one of the primary therapeutic targets, and the elucidation of the mechanism of neuronal cell death is mandatory. Detailed characterization of neuronal cell death caused by familial AD (FAD)-linked mutant genes revealed that different cell death pathways are evoked by different types of mutants. Humanin (HN), a newly identified neuroprotective peptide, suppresses neuronal cell death caused by all known FAD mutants and A β , while it has no effect on neuronal cell death caused by AD-irrelevant insults. The functional target of HN is the antagonism to neuronal death, not the modulation of A β production, suggesting that HN-based medication can be combined with other remedies targeting A β . HN is a promising seed for a novel therapy aiming at complete cure of AD through the suppression of neuronal loss.

Key words: *Alzheimer's disease, Humanin, Amyloid precursor protein, Presenilin, Neuronal cell death*
(*Jpn J Geriatr* 2003; 40: 36—40)