

学 位 論 文 題 名

Inhibition of Alzheimer's amyloid-beta peptide-induced  
reduction of mitochondrial membrane potential  
and neurotoxicity by gelsolin

(ゲルソリンによるアルツハイマー病のベータ・アミロイド誘発  
ミトコンドリア膜電位低下と神経毒性の抑制)

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

緒 言

老人性痴呆の原因の一つであるアルツハイマー病の特徴は、神経の進行性機能不全と海馬など脳の特異的な領域での神経細胞の喪失である。これらの病変は、前駆体 amyloid protein precursor の分解で生じるベータ・アミロイドによって引き起こされる。すなわち神経細胞の死滅は、繊維状のベータ・アミロイドが凝縮して形成されるアミロイド斑の蓄積と関係がある。これらの病変には、ミトコンドリア膜に存在する蛋白質複合体チャネルの開放によるミトコンドリア膜電位の低下、チトクローム c の放出、カスパーゼの活性化、DNA の損傷からなるミトコンドリア依存的な細胞死の経路が関与している。以上のアルツハイマー病での神経変性へ至る過程を阻止することが、この疾患を治療する上で重要である。一方 Koya らの研究から、ヒト T 細胞リンパ腫細胞株においては、アクチン調節蛋白質ゲルソリンがミトコンドリアにも存在し、ミトコンドリア膜電位の低下とミトコンドリアからのチトクローム c 放出を阻害することによりアポトーシスを抑制することが知られている。本研究では、神経様に分化誘導可能なラット副腎褐色細胞腫株 PC12 をモデル系として、ベータ・アミロイドによって誘発される神経細胞傷害性に対するゲルソリンの抑制効果について検討し、さらに抑制に必要なゲルソリン機能ドメインの同定をおこなった。

材料と方法

1. 細胞株、発現プラスミドの構築および遺伝子導入— ラット副腎褐色細胞腫株 PC12 は 10% 馬血清および 5% 牛胎児血清 (FCS) 添加 DMEM 培地を用いて 37°C、5% 炭酸ガス含有大気下で培養した。PC12 の神経様形態への分化誘導は、50~60% 増殖の状態では培養液に神経成長因子 (NGF) を 100ng/ml で添加し 5 日間培養することによりおこなった。また、分化後には 1ng/ml の NGF を添加して培養を継続した。PC12 の細胞死を検討する場合には、3% FCS を添加した DMEM 培養液を用いた。ヒト・ゲルソリン全長 cDNA の発現プラスミドには、LKCG を用いた。また、ゲルソリン・セグメント 5、6 および 5-6 の発現ベクターは、LKCG プラスミドをテンプレートに用いてそれぞれの該当領域を PCR で増幅し、PCR 産物を発現用プラスミド pCMV-FLAG に挿入することにより構築した。リポフェクション法により発現プラスミドを PC12 細胞に導入し、ネオマイシンで選択することにより、ヒト・ゲルソリンの全長および各セグメントの安定発現細胞株を樹立した。また、各クローンにおける導入遺伝子の発現は、抗 FLAG-tag 抗体を用いたウェスタン・ブロッティング法により確認した。

2. 細胞死の誘導およびミトコンドリア機能の解析— 室温で繊維化させたベータ・アミロイドの水溶液を各濃度(0.5 から 10  $\mu$ M まで)で神経様に分化した PC12 細胞に添加し、細胞死を誘導した。細胞死の判定は、ヨウ化プロピジウムとヘキスト 33342 の二重染色法により行った。また、ミトコンドリア膜電位はローダミン 123 処理後蛍光分光光度計にて解析した。さらに、ウェスタン・ブロッティング法によりミトコンドリアから細胞質へのチトクローム c の放出を検討した。
3. RNA 干渉— ラット・ゲルソリンに対する低分子干渉性 RNA (SiRNA) の発現ベクター pS-RGSN1 は、ラット・ゲルソリン cDNA の蛋白質コード領域 640 から 658 番目までに相当する 19 mer をコードするオリゴヌクレオチド (センス鎖およびアンチセンス鎖) を pSilencer3.1-Hyg に挿入することにより構築した。ハイグロマイシンで選択しラット・ゲルソリンの発現が安定して抑制された細胞株を樹立した。陰性対照としては、緑色蛍光蛋白質遺伝子 (GFP) を標的とした SiRNA 発現ベクター pS-GFP を PC12 細胞に導入し作成した。また、各クローンのラット・ゲルソリンの発現はウェスタン・ブロッティング法により確認した。

## 結 果

1. PC12 細胞に、リポフェクション法によりヒト・ゲルソリン発現プラスミドを導入後、ネオマイシンにより選択し、安定してヒト・ゲルソリンを発現する細胞株および対照 (Neo) 細胞株を樹立した。また、ウェスタン・ブロッティング法より、ゲルソリンを高発現することによって内因性ラット・ゲルソリンへの影響がないことを確認した。NGF 処理により神経様に分化させたこれらの細胞株に 0.5 から 10  $\mu$ M までベータ・アミロイドを添加し 48 時間培養した結果、Neo 細胞株ではベータ・アミロイドによって誘発された核の凝縮や断片化など細胞死の変化が観察された。これに対し、ヒト全長ゲルソリン発現細胞株においては、ベータ・アミロイドによる神経毒性が顕著に抑制された。
2. ヒト・ゲルソリン C 末端のアポトーシス抑制作用を調べるために、C 末端を構成するセグメント 5、セグメント 6 およびセグメント 5-6 を安定して発現する PC12 細胞株を上記と同様に樹立した。各ドメインの発現は、ウェスタン・ブロッティング法で確認した。10  $\mu$ M のベータ・アミロイドで処理した際の細胞死に対する効果を解析した結果では、セグメント 5 を発現する細胞株ではヒト・ゲルソリン全長を発現する細胞株と同様の細胞傷害性に対する抵抗性を示したが、セグメント 5-6 を発現する細胞株では、ヒト・ゲルソリン全長発現細胞株およびセグメント 5 発現細胞株と比較してこの抵抗性は若干低下していることが判った。また、セグメント 6 を発現する細胞株ではこのような抵抗性は観察されなかった。
3. ヒト・ゲルソリン全長およびセグメント 5 を発現する細胞株では、10  $\mu$ M のベータ・アミロイド処理により誘起されるミトコンドリア膜電位の低下とミトコンドリアから細胞質へのチトクローム c 放出が抑制されたが、セグメント 5-6 を発現する細胞では若干弱い抑制が観察され、セグメント 6 を発現する細胞株では、このような抑制作用がみられなかった。これらの結果から、ゲルソリンの細胞死抑制効果は、カスパーゼのケスケード上流にあるミトコンドリアのレベルであることと、この細胞死抑制効果に関与する機能ドメインは、セグメント 5 に存在することが推測された。
4. 内在性のラット・ゲルソリンはベータ・アミロイドで誘発した細胞死にどのような影響があるかを検討するために、RNA 干渉法により内在性のラット・ゲルソリンの発現を低下させた PC12 細胞株を樹立し、10  $\mu$ M のベータ・アミロイド処理に対する影響を検討した。48 時間後の結果では、pS-RGSN1 を導入した細胞株は親株および陰性対照である pS-GFP を導入した細胞株より死んだ細胞が増加したことから、ラット・ゲルソリン干渉性 RNA 導入細胞株は、細胞傷害性に対する感受性が高いことが証明された。

## 結 語

アルツハイマー病の原因であるベータ・アミロイドにより誘発される神経細胞の細胞死は、ヒト・ゲルソリンの強制発現によりミトコンドリア経路を介して抑制されることが明らかとなった。そして、ヒト・ゲルソリンのセグメント5が、この抗細胞死作用を担っていることが証明された。また、内在性のラット・ゲルソリンも神経細胞においてベータ・アミロイドによる細胞傷害性に対する抵抗性因子として機能することが示された。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 中 一 馬

副 査 教 授 守 内 哲 也

副 査 教 授 葛 巻 暹

学 位 論 文 題 名

## Inhibition of Alzheimer's amyloid-beta peptide-induced reduction of mitochondrial membrane potential and neurotoxicity by gelsolin

(ゲルソリンによるアルツハイマー病のベータ・アミロイド誘発  
ミトコンドリア膜電位低下と神経毒性の抑制)

老人性痴呆の原因の一つであるアルツハイマー病は、ベータ・アミロイド蛋白質によって引き起こされ、この病変にはミトコンドリア膜に存在する蛋白質複合体チャネルの開放によるミトコンドリア膜電位の低下、チトクローム c の放出、カスパーゼの活性化、DNA の損傷からなるミトコンドリア依存的な細胞死の経路が関与している。本論文では、アクチン調節蛋白質ゲルソリンを用いて、アルツハイマー病での神経変性へ至る過程を阻止するための遺伝子治療の基礎研究をおこなった。神経様に分化誘導可能なラット副腎褐色細胞腫株 PC12 をモデル系として、ベータ・アミロイドによって誘発される神経細胞傷害性に対するゲルソリンの抑制効果について検討し、さらに抑制に必要なゲルソリン機能ドメインの同定をおこなった。PC12 細胞に、リポフェクション法によりヒト・ゲルソリン発現プラスミドを導入後、ネオマイシンにより選択し、安定してヒト・ゲルソリンを発現する細胞株および対照 (Neo) 細胞株を樹立した。神経成長因子処理により神経様に分化させたこれらの細胞株にベータ・アミロイドを添加し培養した結果、Neo 細胞株ではベータ・アミロイドによって誘発された核の凝縮や断片化など細胞死の変化が観察された。これに対し、ヒト全長ゲルソリン発現細胞株においては、ベータ・アミロイドによる神経毒性が顕著に抑制された。ヒト・ゲルソリン C 末端のアポトーシス抑制作用を調べるために、C 末端を構成するセグメント 5、セグメント 6 およびセグメント 5-6 を安定して発現する PC12 細胞株を上記と同様に樹立した。ベータ・アミロイドで処理した際の細胞死に対する効果を解析した結果では、セグメント 6 を発現する細胞株では、ベータ・アミロイドに対する抵抗性は観察されなかった。これに対して、セグメント 5 を発現する細胞株ではヒト・ゲルソリン全長を発現する細胞株と同様の細胞傷害性に対する抵抗性を示した。セグメント 5-6 を発現する細胞株では、この抵抗性が若干低下していることが判った。また、ヒト・ゲルソリン全長およびセグメント 5 を発現する細胞株では、ベータ・アミロイド処理により

誘起されるミトコンドリア膜電位の低下とミトコンドリアから細胞質へのチトクロームc放出が抑制されたが、セグメント 5-6 を発現する細胞では若干弱い抑制が観察され、セグメント 6 を発現する細胞株では、このような抑制作用がみられなかった。これらの結果から、ゲルソリンの細胞死抑制効果は、カスパーゼのケスケード上流にあるミトコンドリアのレベルであることと、この細胞死抑制効果に関与する機能ドメインは、セグメント 5 に存在することが推測された。次に、内在性のラット・ゲルソリンがベータ・アミロイドで誘発した細胞死にどのような影響があるかを検討するために、低分子 RNA 干渉法により内在性のラット・ゲルソリン発現を低下させた PC12 細胞株を樹立し、ベータ・アミロイド処理に対する影響を検討した。ゲルソリンに対する干渉性 RNA を導入した細胞株は親株および陰性対照である GFP に対する干渉性 RNA を導入した細胞株に比べ細胞死を起こした細胞数が増加したことから、ラット・ゲルソリン干渉性 RNA 導入細胞株は、細胞傷害性に対する感受性が高いことが証明された。

公開發表において副査守内哲也教授より、本研究の臨床応用への展望および具体的な方法について質問があった。続いて副査葛巻暹教授より、機能ドメインの解析、ゲルソリンとベータ・アミロイドの結合性についての質問があった。また主査田中より、ゲルソリンのミトコンドリア内の局在、アクチン調節機能や癌抑制機能も含めてのゲルソリンの多機能性の意義についての質問があった。これらに対して申請者は、自己の研究結果と文献的知識を基に誠実に、概ね妥当な回答を行った。

本研究によって、アクチン調節蛋白質ゲルソリンがベータ・アミロイドによって誘発される神経細胞の細胞障害性を阻止することが初めて示された。今後、生体での基礎実験も加えることによって、治療への応用が期待される研究として評価される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。