

(論文内容の要旨)

進行性神経変性疾患であるアルツハイマー病 (AD) の発症原因について、もっとも広く受け入れられている仮説は、アミロイド前駆体タンパク (APP) から β および γ セクレターゼによって生じたアミロイド β タンパク ($A\beta$) が沈着し、重合凝集して毒性を生じ、神経細胞死を招き、ADの発症に至るといいう「アミロイドカスケード仮説」である。Rhoファミリーに属する低分子量Gタンパク質であるRac1は細胞骨格の再構築、細胞成長、神経細胞樹状突起の構造及びシグナル伝達等において重要な役割を果たしている。最近、Rac1のADへの関与について報告されたが、詳細は不明である。本研究において、著者はマウス海馬由来初代培養神経細胞及びHEK293細胞を用いてRac1によるAPPの転写制御機構について検討を行った。さらに、マウス海馬由来初代培養神経細胞を用いて $A\beta$ で誘発される神経細胞死におけるRac1の役割についても検討を行い、以下の新知見を得た。

第一章 Rac1によるAPP遺伝子の転写に対する制御

Rac1は γ セクレターゼのモジュレーターとして働くことによりAPPのプロセシングに関与することが報告された。しかしながら、この報告ではAPPを強制発現した非神経細胞を用いており、神経細胞におけるRac1とAPPの関係は不明のままであった。そこで、海馬由来初代培養神経細胞をRac1阻害剤であるNSC23766で処置したところ、全長APPのタンパク発現量が濃度依存的に減少した。その詳しいメカニズムを解明するため、著者はAPPの「プロセシング段階」、「分解段階」及び「生合成段階」に対するNSC23766の影響について検討した。プロセシングにより培地中に分泌されるsAPP α や $A\beta$ の量をELISA法によって測定したところ、NSC23766の処置によりsAPP α や $A\beta$ の分泌量は全長APPのタンパク発現量の減少に応じて濃度依存的に減少した。また、NSC23766処置は α 及び β セクレターゼ活性に影響を与えなかった。次に、プロテアソーム阻害剤であるMG132またはラクタシスチンを用いてAPP分解段階について検討したところ、NSC23766処置による全長APPのタンパク発現量の減少はMG132またはラクタシスチンとの共処置により元に戻らなかった。これらの結果は、NSC23766処置による全長APPのタンパク発現量の減少はプロセシング及び分解段階に因らないことを示している。次に、real-time PCRを用いてAPP生合成段階について検討したところ、NSC23766処置によりAPP mRNA量が有意に減少した。また、HEK293細胞にRac1 siRNAまたはRac1ドミナント抑制型遺伝子 (RacT17N) を強制発現させることにより、APPタンパク発現量及びmRNA量が減少することを確認できた。さらに、APP遺伝子のプロモーター領域を単離してプロモーターアッセイを行ったところ、APPプロモーターの-233bpから+41bpの領域配列がNSC23766やRacT17Nによって影響を受ける

ことが明らかになった。以上の結果により、神経細胞においてRac1はAPPプロモーターの-233bpから+41bpの領域配列を介してAPPの転写活性を制御していることが示唆された。

第二章 Rac1によるA β 誘発神経細胞死に対する制御

AD患者の脳内ではRac1発現の上昇や細胞骨格の異常が観察されることや、Rac1活性を阻害することにより記憶や学習の基本メカニズムとされる長期増強が亢進される等により、Rac1はAD治療薬の新たな創薬標的になる可能性が示唆された。そこで、本研究において著者はマウス海馬由来初代培養神経細胞を用いてA β で誘発される神経細胞死におけるRac1の役割について検討を行った。A β (1-42) 3、10、30 μ Mを細胞に添加して48時間培養した後、LDHアッセイにより評価を行ったところ、濃度依存的な細胞死が観察された。次に、Rac1阻害剤であるNSC23766を0、0.3、1、3、10 μ Mの濃度で3時間前処置したところ、A β (1-42) 10 μ Mにより誘発した神経細胞死に対して濃度依存的な保護作用が観察された。記憶の障害や、タウのリン酸化、A β の産生などADで見られる特徴はGSK3の活性とも深く関わっており、GSK3 β はAD発症に大きな役割を果たしていることが報告されている。そこで、著者はNSC23766の神経保護作用とGSK3 β との関わりについて検討を行った。細胞にA β (1-42)を単独処置したところ、Rac1の活性が上昇した。また、GSK3 β において9番目のセリン残基リン酸化の減少と216番目のチロシン残基リン酸化の増加が観察され、GSK3 β 活性も増強していることが示唆された。次に、NSC23766を3時間前処置し、さらにA β (1-42)処置したところ、NSC23766の前処置群はA β 単独処置群に比べ、GSK3 β において9番目のセリン残基リン酸化の増加と216番目のチロシン残基リン酸化の減少が観察された。次に、GSK3 β のセリン及びチロシン残基リン酸化の変化はGSK3 β 活性の変化を反映していることを調べるためにGSK3 β の下流因子である β カテニンの発現量を調べた。その結果、A β (1-42)処置により β カテニンの発現量は減少し、その減少はNSC23766前処置により元に戻った。また、GSK3 β 阻害剤SB216763は、A β (1-42)で誘発した神経細胞死に対する保護効果を示すことを確認した。以上の結果により、Rac1阻害剤はGSK3 β 活性を抑制することによりA β で誘発した神経細胞死に対して保護作用を示すことがわかった。

以上、著者は神経細胞においてRac1がADの原因遺伝子の一つであるAPPの転写活性を制御していることを明らかにした。また、Rac1はGSK3 β を介してA β で誘発した神経細胞死を制御していることも明らかにした。本研究の成果は、ADの発症機構及び病態解析の解明に寄与するものであり、新たな治療法の開発など臨床応用に結びつく有用な基礎的知見を提供するものである。

(論文審査の結果の要旨)

進行性神経変性疾患であるアルツハイマー病 (AD) の発症原因について、最も広く受け入れられている仮説は、アミロイド前駆体タンパク (APP) のプロセッシングにより生じたアミロイドβタンパク質 (Aβ) が沈着し AD の発症に至るとする「アミロイドカスケード仮説」である。Rhoファミリーに属する低分子量 G タンパク質である Rac1 は細胞骨格の再構築、細胞成長、神経細胞樹状突起の構造及びシグナル伝達などにおいて重要な役割を果たしており、最近、Rac1 の AD への関与について報告されたが、その機序の詳細は不明のままであった。そこで、申請者は、マウス海馬由来初代培養神経細胞及び HEK293 細胞を用い、Rac1 による APP 転写制御機構について検討を行った。さらに、マウス海馬由来初代培養神経細胞を用いて Aβ で誘発される神経細胞死における Rac1 の役割についても検討を行い、以下の新知見を得た。

第一章 Rac1 による APP 遺伝子の転写に対する制御

Rac1 はγセクレターゼのモジュレーターとして働くことによりアミロイド前駆体タンパク質 (APP) のプロセッシングに関与することが示唆されていたが、神経細胞における Rac1 と APP の関係は不明であった。そこで、海馬由来初代培養神経細胞を Rac1 阻害薬の NSC23766 により処置したところ、全長 APP のタンパク発現量が濃度依存的に減少した。NSC23766 処置はαおよびβセクレターゼ活性に影響を与えなかった。NSC23766 処置による全長 APP のタンパク発現量の減少はプロテアソーム阻害薬の影響を受けなかった。これらの結果は、NSC23766 処置による全長 APP のタンパク発現量の減少はプロセッシング及び分解段階に因らないことを示している。そこで、real-time PCR を用いて APP 生合成段階について検討したところ、NSC23766 処置により APP mRNA 量が有意に減少した。HEK293 細胞に Rac1 siRNA または Rac1 ドミナント抑制型遺伝子 (RacT17N) を強制発現させることにより、APP タンパク発現量及び mRNA 量が減少することを確認できた。さらに、APP 遺伝子のプロモーター領域を単離してプロモーターアッセイを行ったところ、APP プロモーターの -233bp から +41bp の領域配列が、NSC23766 や Rac1 ドミナント抑制型遺伝子により影響を受けることが明らかになった。以上の結果により、神経細胞において、Rac1 は APP プロモーターの -233bp から +41bp の領域配列を介して APP の転写活性を制御していることが示唆された。

第二章 Rac1 による A β 誘発神経細胞死に対する制御

AD 患者の脳内では Rac1 発現の上昇や細胞骨格の異常が観察されることや、Rac1 活性を阻害することにより記憶や学習の基本メカニズムとされる長期増強が亢進される等により、Rac1 は AD 治療薬の新たな創薬標的になる可能性が示唆されている。そこで、申請者はマウス海馬由来初代培養神経細胞を用い、A β で誘発される神経細胞死における Rac1 の役割について検討を行った。A β (1-42) により濃度依存的な細胞死が観察され、Rac1 阻害剤の NSC23766 は A β (1-42) 誘発神経細胞死を濃度依存的に抑制した。記憶の障害や、タウのリン酸化、A β の産生など AD で見られる特徴は GSK3 の活性とも深く関わっており、GSK3 β は AD 発症に大きな役割を果たしていることが報告されている。そこで、NSC23766 の神経保護作用における GSK3 β の役割について検討を行い、A β (1-42) は、Rac1 の活性上昇、GSK3 β の 9 番目のセリン残基リン酸化の減少と 216 番目のチロシン残基リン酸化の増加を引き起こし、A β (1-42) により GSK3 β 活性増強が生じることが示唆された。A β (1-42) による GSK3 β の 9 番目のセリン残基リン酸化の増加と 216 番目のチロシン残基リン酸化は、NSC23766 により抑制された。次に、GSK3 β のセリンおよびチロシン残基リン酸化の変化が GSK3 β 活性の変化を反映していること確認するために、GSK3 β の下流因子である β カテニンの発現量を調べたところ、A β (1-42) 処置により β カテニンの発現量は減少し、その減少は NSC23766 前処置により回復した。GSK3 β 阻害薬の SB216763 は、A β (1-42) で誘発した神経細胞死に対する保護効果を示すことを確認した。以上の結果により、Rac1 阻害薬は GSK3 β 活性を抑制することにより A β 誘発神経毒性に対する保護作用を発現することが示された。

以上、著者は神経細胞において Rac1 が AD の原因遺伝子の一つである APP の転写活性を制御していることを明らかにした。さらに、Rac1 は GSK3 β を介して A β により誘発される神経細胞死を制御することを明らかにした。本研究の成果は、AD の発症機構及び病態解析の解明に寄与するものであり、新たな治療法の開発など臨床応用に結びつく有用な基礎的知見を提供するものである。

よって本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成 21 年 2 月 23 日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。