

## Amyloid $\beta$ の神経細胞への毒性を緩和する化合物の探索

飯田 顕久 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 臼井 健郎 (筑波大学 生命環境系)

### 背景・目的

高齢社会の進展に伴い、認知症患者の増加が問題となっている。その患者数は2002年には149万人であったのに対し、2012年には倍の300万人を突破した。認知症の主なものに、レビー小体型認知症、脳血管性認知症、アルツハイマー病がある。この中で脳血管性認知症の患者数は、治療法や予防法の進歩に伴い減少傾向にあるものの、アルツハイマー病患者は未だ増加傾向を示しており、認知症患者のうち約6割を占めるまでになっている。以上のことからアルツハイマー病の治療薬開発は喫緊の課題となっている。

アルツハイマー病は、年齢に関係した進行性の記憶障害や見当識障害、大脳巣症状(脳の限定した領域が欠損したために現れる症状)、精神症状などを臨床的特徴とする神経変性疾患である。アルツハイマー病患者の脳では、細胞間質への老人斑の蓄積や、神経細胞内の神経原線維変化が特徴的に起こっており、これらの存在がアルツハイマー病の確定診断に用いられているとともに、症状の原因とも考えられている。老人斑とは、機能不明な膜タンパク質APP (amyloid precursor protein) から切り出された、主に40-42残基のペプチドであるAmyloid  $\beta$  が細胞外で凝集・沈着したものであり、細胞膜上のイオンチャネルを遮断することでカルシウム恒常性の破綻を引き起こし、最終的に神経細胞死を引き起こすことが報告されている。また、神経原線維変化は細胞内微小管系が破綻した状態であり、凝集したAmyloid  $\beta$  が何らかのシグナル伝達系を介してタウタンパク質(神経特異的微小管結合タンパク質)を過剰にリン酸化することが原因だと考えられている<sup>2)</sup>。これらのことから、アルツハイマー病の治療戦略として、Amyloid  $\beta$  の凝集・沈着を防ぐ薬剤の開発が盛んに行なわれているものの、未だ根本的治療薬は見つかっていない。

アルツハイマー病の発症機構において、凝集したAmyloid  $\beta$  による神経細胞死が根本原因だと考えられる。このことはAmyloid  $\beta$  存在下でも神経細胞の死を防ぐことができれば、アルツハイマー病の発症を抑えられる可能性を示唆している。そこで今回、Amyloid  $\beta$  の細胞毒性を緩和する薬剤探索を行うための薬スクリーニング系の構築を行い、薬剤探索を行うこととした。

### 材料

- SH-SY5Y  
ヒト神経芽細胞腫由来細胞  
15% FBS を含む DMEM + Ham's F12 (1 : 1) 培地で培養
- Amyloid  $\beta$   
PBS に溶かし、4°C で保存

### 方法

SH-SY5Y を 96 穴プレート (フィブロネクチンコート) に蒔き、24 時間培養した。細胞の定着を確認後、無血清培地 OPTI-MEM へと培地を交換するとともに Amyloid  $\beta$  を添加し、3-5 日後に顕微鏡撮影した。細胞写真は画像解析ソフト Image J を用いて二値化・定量を行い、細胞凝集割合を判定した。

また、5 日後の写真撮影後、WST-8 法を用いて細胞生存率を調べた。

### 結果

Image J による二値化・定量法 (下図)、及び WST-8 法による細胞生存率測定から、Amyloid  $\beta$  処理により SH-SY5Y が凝集する様子や細胞生存率低下が確認できた。

現在、細胞内シグナル伝達経路に関わる化合物や、カルシウム恒常性を変化させる化合物などを中心に、Amyloid  $\beta$  による神経細胞への毒性を緩和する化合物探索を行っている。

詳細は発表会にて報告する。

### 参考文献

- 1) 服部尚樹, 北川香織, 中山靖久, 稲垣千代子「アミロイド  $\beta$  タンパクの神経毒性機構」日薬理誌 **131**, 326-332 (2008)
- 2) Tokutake T., Kasuga K., Yajima R., Sekine Y., Tezuka T., Nishizawa M., and Ikeuchi T., Hyperphosphorylation of Tau Induced by Naturally Secreted Amyloid- $\beta$  at Nanomolar Concentrations Is Modulated by Insulin-dependent Akt-GSK3 $\beta$  Signaling Pathway. *J. Biol. Chem.*, **287**, 35222-35233 (2012)

