慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	抗体の制御する細胞表面βアミロイド前駆体蛋白の新規神経細胞障害機能
Sub Title	
Author	須藤, 遥(Sudo, Haruka) 西本, 征央
Publisher	慶應医学会
Publication year	2003
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.80, No.3 (2003. 9) ,p.T187- T211
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	学位論文
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20030901-0187

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

慶應医学・80(3)：T187～T211，2003

学位論文

抗体の制御する細胞表面βアミロイド前駆体蛋白の新規神経細胞障害機能

慶應義塾大学医学部薬理学教室
（指導：西本征央教授）
須藤　遥（すどう　はるか）

（平成14年8月22日受付）

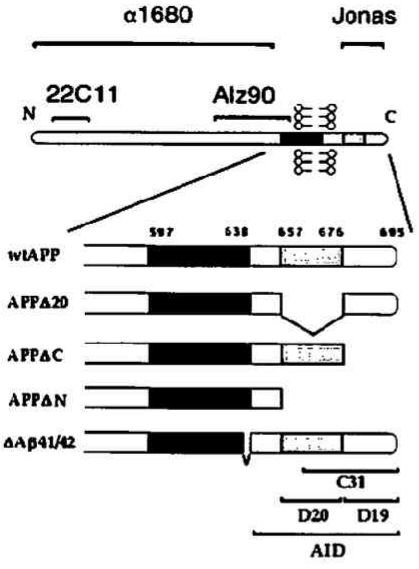
Key Word： amyloid precursor protein, antibody-induced neuronal death, Aβ polypeptide, Alzheimer's disease.

アルツハイマー病は，最もよくみられる神経変性疾患であり，進行性の神経脱落と老人斑の沈着により特徴づけられる．老人斑の主な構成要素はAβアミロイドであり，それはAmyloid precursor protein（APP）と名付けられた膜貫通型前駆体蛋白質から切り取られて産生される．Kangら（1987）によって695残基で構成されるAPP695が同定された[1]のに続き，少なくとも10のアイソフォームが同定され，それら全ては単一の遺伝子の選択的スプライシングから生じている[2]．

家族性アルツハイマー病（familial Alzheimer's disease；FAD）の遺伝学的研究は，APPの構造変化がアルツハイマー病を起こすことを明らかにしたが，それは，あるFAD症例がAPP695のV642残基のI，FあるいはG変異，またはK595/M596残基のNL変異を持っているという発見に基づいている[3]．これらの変異はアルツハイマー病の形質に連鎖し[4]，それらがアルツハイマー病の遺伝的原因であることが示された．しかしながら，如何にFADにリンクした変異がアルツハイマー病の特有の病態を引き起こすかについてはほとんど理解されていない．Yamatsujiら（1996）は，APPの3つのV642変異体が神経細胞毒性を起こすかを調べ，FADの原因変異体を不死化神経細胞F11に発現すると，アポトーシスによる細胞死を誘導することを見い出した[5]．この知見は，他の複数の研究グループによって確認された[6~8]．更に，APP，あるいは，Presenilin-2（PS2）のFAD変異体による細胞死は，制御されうる可能性があり，制御標的の少なくとも一つは，神経細胞特異的3量体G蛋白質Goによると考えられることも発見された[5,6,9]これらの観察は，野生型APPは神経細胞死の調節に関連して生理的機能を持っており，その機能異常がFADの大脳における異常な神経脱落に寄与しているのではないかということを示唆していた．

このような研究背景で，私は，野生型APPの細胞死関連機能を解析するために本研究を行った．変異を持たない全長の野生型APPの*in vivo*における機能については，従来，ほとんど何も知られていない．細胞増殖と神経突起伸長機能が見い出されたが[10~13]，それは可溶性APP（sAPP），つまり，APPの細胞外部分に関するもの，あるいは，Aβポリペプチドに関するものであった．しかしながら，APP遺伝子欠失マウスが中枢神経系の発生異常をきたしたこと[14,15]あるいは，von Kochら（1997）の研究[16]で，APPとAPPに非常に類似するAmyloid precursor-like protein-2（APLP2）の両者を破壊したマウスの所見から示唆されるように，野生型APPはAβの前駆体としての役割という病理的側面の他に，胎生期における神経発生において生理的な機能をも

本論文は，Sudo H, Jiang H, Yasukawa T, Hashimoto Y, Niikura T, Kawasumi M, Matsuda S, Takeuchi Y, Aiso S, Matsuoka M, Murayama Y, Nishimoto I：Antibody-regulated neurotoxic function of cell-surface β-amyloid precursor protein. Mol Cell Neurosci 16：708-723, 2000の一部，およびSudo H, Hashimoto Y, Niikura T, Shao Z, Yasukawa T, Ito Y, Yamada M, Hata M, Hiraki T, Kawasumi M, Kouyama K, Nishimoto I：Secreted Aβ does not mediate neurotoxicity by antibody-stimulated amyloid precursor protein. Biochem Biophys Res Commun 282：548-556, 2001の一部を含む．



第1図　本研究で使用した抗体の認識部位，および組み換え変位体APPの構造，APPのドメイン構造．使用した抗体はAlz90抗体，APP695の細胞外511-608残基を認識するマウスモノクローナル抗体；22C11，APP695の細胞外66-81残基を認識するマウスモノクローナル抗体；α1680，APP695の細胞外1-591残基を認識するラットモノクローナル抗体；Jonas抗体，APP695の細胞内643-695残基を認識するマウスモノクローナル抗体である。APP変異体の構造については，黒，灰色，薄い灰色の領域はそれぞれAβ1-42領域，His657-Lys676ドメイン（ドメイン20：D20），Met677-Asp695ドメイン（ドメイン19：D19），にそれぞれ一致している。AID及びC31に関しては本文を参照。なお，APPエンドサイトーシスシグナル配列NPTYはドメイン19に含まれ，ドメイン20には存在しない。（Sudo H et al：Biochem Biophys Res Commun 282：548-56, 2001の第3図を許可を得て転載，一部改変）

つ可能性が非常に大きい．この考えを支持し，Qiuら（1995）は海馬の神経細胞において細胞表面のAPPはそのアイソフォームに依存した様式で神経突起の伸長を刺激することを観察した[17]．Coulsonら（1997）とGillianら（1997）は独立に細胞表面のAPPは神経の接着において機能を持つことを発見した[18,19]．Perezら（1997）は細胞に存在するAPPが神経生存，軸索形成，樹状突起形成に寄与することを報告した[20]．ここに私は，抗APP抗体はAPP695を過剰発現する不死化神経細胞，ならびに，初代培養神経細胞に細胞死を誘導することを報告する．そして，これらの抗体が細胞表面のAPPに作用していることを明らかにし，更に，その根底にある分子機構について解析した．

従来確立されたAPPの持つ機能とはAβの前駆体としてのものであるため，そのメカニズムとして考えられる最も簡単な考え方は，抗体の結合したAPPがAβを産生し神経細胞死を起こすというものである．従来，Aβはアルツハイマー病の病因と密接な関連性を有するものとして研究されてきた．事実，AβX-42（Aβ42）の沈着はアルツハイマー病患者大脳で最も早期から観察される異常であり[21]，*in vitro*で初代培養神経細胞をAβで処理すると細胞死を生じる[22,23]．しかし，*in vivo*での神経脱落におけるAβの関与は，これまで証明されてこなかった[24-28]．従って，本研究では，抗APP抗体の誘導する細胞死が，分泌されたAβによって介在されているかについても検討した．そして，複数の証拠が，抗APP抗体の誘導する野生型APPを介した神経型細胞死は，Aβの産生を介していないことを明らかにした．

本研究は，細胞表面の野生型APPが神経細胞死を制御するという新規の機能を見い出し，かつ，野生型APPの神経細胞死誘導機能がAβを介していないという証拠を与えるものである．

なお，第1図[29]に本研究で使用した抗体の認識部位，および組み換え変異体APPの構造，APPのドメイン構造について示した．

実験方法

1. 遺伝子と試薬

野生型APP遺伝子は，pcDNA1プラスミドに挿入したマウスAPP695cDNA全長を用いた．APP-ED（APP1-591）cDNAは部位特異的変異誘導キット（Stratagene, La Jolla, CA, USA）により作成し，変異DNA配列はシークエンスにより確認した．APPΔ20およびAPPΔCについては（Hashimotoら，2000）[30]に記述されている．APPΔNについては（Nishimotoら，1993）[31]に記述されている．APPΔAβ41/42は（Yamatsujiら，1996）[5]に記述されているV642I-APPΔ41/42から作成した（第1図参照）．α1680抗体は協和発酵（町田，東京）の好意により提供された．この抗体は大腸菌で産生させたGST融合APP1-591組み換え体に対して作成された抗体で，GSTは認識せずAPP1-591を特異的に認識する．α1680原液は全蛋白質濃度1 mg/mlのハイブリドーマ培養上清であり実験においては，特に言及しない限り原液の1/10濃度でこれを使用した．原液中のα1680の濃度は約5 μg/mlと測定された．α1680をエピトープ吸着するために大腸菌産生

GST 融合 APP1-591 蛋白質を用意し室温下 8 時間 Glutathione-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) と混合して APP1-591 結合 Glutathione-beads を得た．室温下で 8 時間 APP1-591 結合 Glutathione-beads，あるいは，非結合 Glutathione-beads (それぞれ 500 μl/tube) をα1680 と混合した．ビーズを遠心により沈澱させた後，上清を F11/APP 細胞の培地にα1680 を加えたのと同様に加えた．この上清は免疫染色にも用いた．ブロッキングの後，染色されたシートを HRP 標識した抗ラット免疫グロブリン抗体で処理し化学蛍光バンドを ECL detection kit (Amersham Pharmacia Biotech) により探知した．22C11 と Alz90 抗体 (Alz90Ab) は Roche Diagnostics (Basel, Switzerland) から購入した．ビーズに不動化した Alz90 抗体を作成するために 10 μl の Alz90 抗体溶液 (100 μg/ml) を Protein G-Sepharose，あるいは，対照の Glutathione-Sepharose (各々 500 μl) と共に室温で 8 時間保温した．この溶液を F11/APP 細胞の培地に全て加えた (最終濃度 1 ml/well)，培養プレートを 1 rpm で CO_2 培養器内で 6 時間震盪し，培地を HamF-12 に交換後，更に 66 時間培養した．抗マウス IgG 抗体である 5183-1304 抗体は Biogenesis (Brent-wood, NH, USA) から購入した．この抗体は PBS による透析をした後に使用した．もう一つの IgM 型抗マウス IgG 抗体は SANBIO (Uden, The Netherlands) から購入し，この抗体は透析をしないで使用した．ビオチン標識抗マウス IgG (H+L) ウサギ IgG は IBL (栃木) から，アビジンは Wako Life Science (大阪) から購入した．22C11 の Fab 断片は Pierce のキットにより作成した．メーカーの指導書に従い，50 μg の 22C11 を室温下で一晩持続撹拌によりビーズに不動化したパパインで処理しその上清を Fab+Fc 溶液として回収した．免疫ブロット解析により 22C11 は Fab と Fc に切断されたことを確認した．これによると酵素処理前の 22C11 の濃度と比較して切断したサンプルは 2 倍濃度の Fab 断片と 1 倍濃度の Fc 断片を含んでいた．Glutathione-ethyl-ester (GEE) は Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) から購入した．Aβペプチドは Bachem (Bubendorf, Switzerland) から購入した．Ac-DEVD-CHO，および，Ac-DEVD-MCA は Peptide Inc. (大阪) から購入した．PTX は Calbiochem (San Diego, CA, USA) から購入した．PTX の不活化は 90 ℃，1 時間加熱して行った．

2. 細胞培養

F11 細胞は，過去の研究 (Yamatsuji ら，1996)[5] に記載されているように HamF-12 (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA) に 18%FBS (FBS；HyClone, Logan, UT, USA) と抗生物質を加えた培地 (HF-18%) にて培養した．Bu695 細胞は大阪大学 K. Yoshikawa 博士の好意による提供を受け，DMEM (Life Technologies) に 10%FBS と抗生物質を加えた培地にて培養した．野生型 APP 発現 F11 細胞 (F11APP) は次のようにして確立した．野生型 APP cDNA を pBabe/puro (puromycin 抵抗性遺伝子) と共にリポフェクション法 (APP cDNA 9 μg, pBabe/puro 1 μg, LipofectAMINE (GIBCO, Gaithersburg, MD, USA) 10 μl) にて F11 細胞に遺伝子導入した．14 μg/ml の puromycin により抵抗性を有する細胞を選別し，4～5 週間後コロニーを 5 μg/ml の 22C11 による免疫染色にて解析，高発現のコロニーを限界希釈にてサブクローニングした．野生型 APP あるいは変異型 APP の F11 細胞に対する一過性の遺伝子導入では F11 細胞を 7×10^4 個/well の密度で 6-well のプレートに播き，HF-18%培地にて 12～16 時間培養した．これに野生型 APPcDNA を血清非存在下にて 3 時間遺伝子導入した (1 μg APPcDNA, 2 μl LipofectAMINE, 4 μl Plus reagent；GIBCO)．さらに HF-18%下に 18 時間培養した後，細胞を血清非存在下の Ham's-F12 培地のもとで抗体で処理した．細胞死の測定は抗体処理 48 時間後にトリパンブルー染色にて行った．

初代培養マウス大脳皮質神経細胞の培養は poly-L-lysine と laminin の両者でコートされた 6-well プレート (SUMILON, 秋田) にて行った．この作成法では培養細胞の 98%を神経細胞が占める．Poly-L-lysine をコートされたプレート (SUMILON) も同様に使った．神経細胞を 1.25×10^5 個/well の密度で播き，抗 APP 抗体，非特異的 IgG，Aβ1-42 にて血清非存在下，高濃度グルコース含有 DMEM (Life Technologies) (hDMEM) に N2 supplement を加えた培地 (hDMEM-N2) 下で (4.5 mg/ml glucose を含む DMEM, N2 supplement：5 μg/ml insulin, 100 μg/ml transferrin, 6.3 ng/ml progesterone, 16 μg/ml putrescine, 5.2 ng/ml selenite をそれぞれ最終濃度とした；Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA) 処理した．抗体処理 72 時間後，細胞死をトリパンブルー染色で測定した．N2 supplement に代えて 5%馬血清 (HS；HyClone) (hDMEM-HS) を用いた実験もある．

初代培養ヒトアストロサイトは Bio Whittaker

(Walkersville, MD, USA) から得た．培地は ABM [Astrocyte's basal medium あるいは CCMD190 (Clonetics Media Department Laboratory)] に 5% FBS, 20 ng/ml EGF, 25 μg/ml progesterone, 50 μg/ml transferrin, amphotericin/gentamicin を加えたものを用いた．実験においては細胞を poly-L-lysine-coated プレート (SUMILON) に 1.25×10^5個/well の密度で播いた．24 時間の成長培地での培養後，5%FBS を含む hDMEM に培地を交換し抗 APP 抗体で処理した．5%HS を FBS の代わりに用いた時も同様な結果を得た．

3. 細胞死測定

F11 細胞，F11/APP 細胞，Bu695 細胞の細胞死は血清非存在下にて測定した．細胞死はトリパンブルー染色により以下のように行った．私は，トリパンブルー染色法が惹起された細胞死を正確に反映していることを確証するために，この測定に二つの異なるプロトコールを使った．(i) 細胞をピペッティングにより傷めないように剥がし，懸濁液として回収した．全細胞を正確に集めるために PBS で各 well を洗い洗浄液も細胞懸濁液に加えた．位相差顕微鏡下に well を観察し，残った細胞がないことを確認した後，0.1%トリパンブルー溶液 (Sigma, Aldrich) (最終濃度 0.02%) を懸濁液に加え 37℃で 15 分保温した．(ii) 細胞をピペッティングにより傷めないように剥がした後，室温で 50 μl の 0.4%トリパンブルー溶液を 200 μl の細胞懸濁液に加えた (最終濃度 0.08%)．染色した細胞をトリパンブルー溶液をいれてから 3 分以内に数えた．両方のプロトコールは同様な結果を与えた．細胞死率は全細胞数に対するトリパンブルーで染色された細胞数の割合 (%) として決定した．したがって，これらの方法で測定した細胞死率は，接着している細胞と，接着していない細胞の両者を対象としている．抗体処理をしなかった時の基礎細胞死率は実際に基礎レベルで惹起されている細胞死を反映し，細胞を剥がしたことにより起きた人為的なものではない．というのは，in situ で細胞をトリパンブルーで染めると鏡検下に同様な割合の染色陽性の死細胞が見い出されるからである．さらに，この方法で測った細胞死率は，Cell Counting Kit-8 (Wako Pure Chemical Industries, 東京) を使った WST-8 [2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt] によって測定した生細胞率と線型に逆相関した[32]．TUNEL アッセイをするにあたっては細胞を poly-L-lysine で被覆したスライドに播いた．DNA ラダー測定は Takara (京都) のキットを用いて行った．Hoechst 染色では細胞は Hoechst 33258 (Sigma) (最終濃度 5 μM) で一分間処理した．

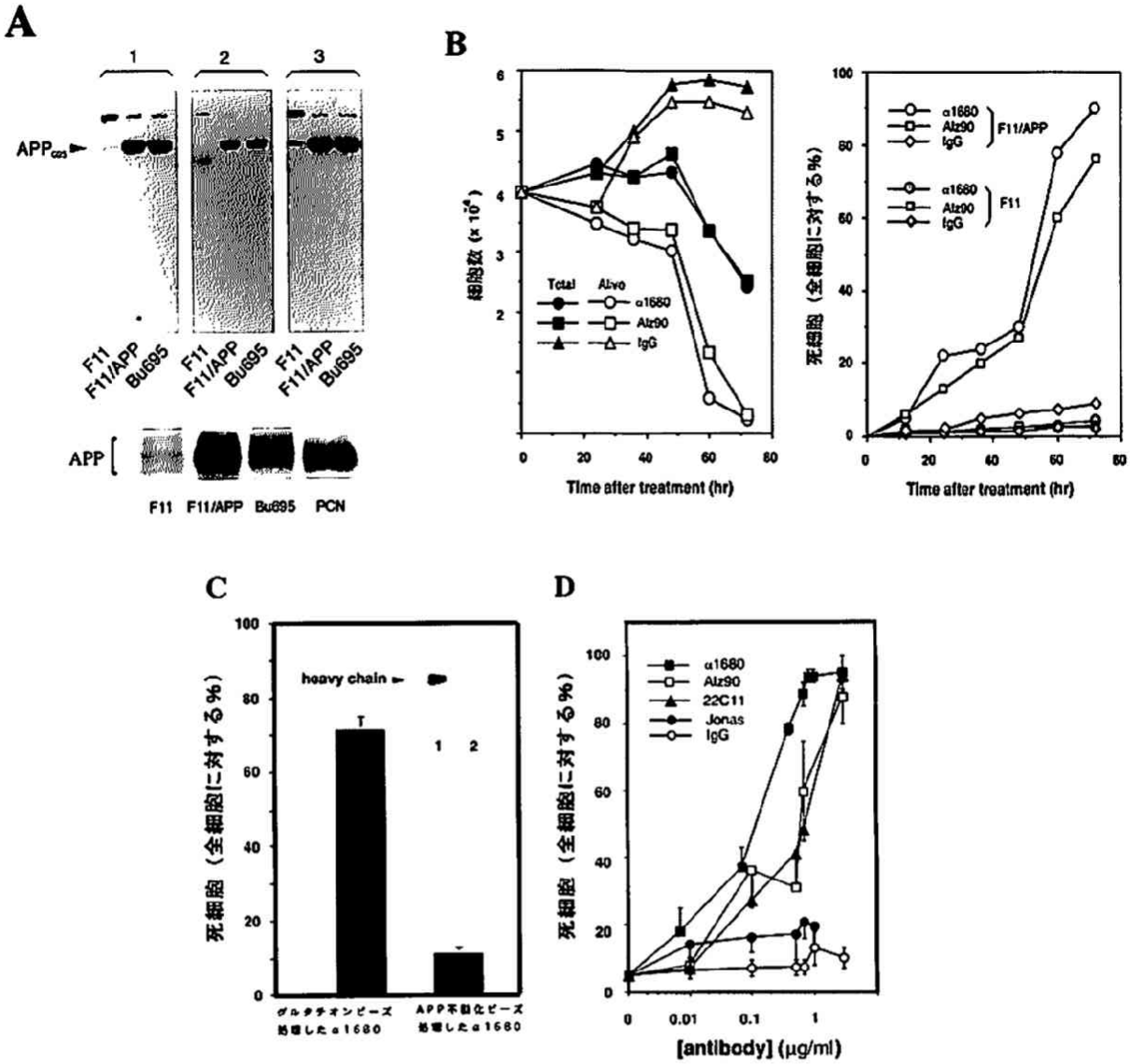
4. 免疫染色

初代培養神経細胞表面の蛋白質を免疫染色するために，細胞を氷冷 2%パラフォルムアルデヒド，および，0.2%グルタルアルデヒド/PBS で 4℃で 2.5 時間処理し，氷冷 PBS で 10 分間洗浄を 3 回くり返して固定した．さらに 3% BSA/PBS にて洗浄後，細胞を室温下で 2 時間，3% BSA/PBS 存在下にて 1 次抗体 (10 μg/ml 抗 APP 抗体あるいは非特異的マウス IgG) で処理し，PBS による 10 分間の洗浄を 3 回行った．2 次抗体は 42 μg/ml の FITC 標識抗マウス IgG 抗体 (Sigma, St Loius, MO, USA) で，3%BSA/PBS 存在下，室温下で 1 時間処理し，4℃で 10 分間の PBS による洗浄を 3 回くり返した．株化細胞の細胞表面蛋白質の免疫染色では，細胞を 2%パラフォルムアルデヒド，及び，0.2%グルタルアルデヒド/PBS で室温で 1 時間処理し，室温下に PBS で 10 分間の洗浄を 3 回くり返すことにより固定した．他の点では初代培養細胞の染色と同様に行った．株化細胞でも初代培養神経細胞においても，10 μg/ml の 22C11 を処理すると，細胞表面の APP の染色は飽和した．

5. 免疫ブロット解析

細胞培地中の Aβの免疫ブロットは以下のように行った．細胞懸濁液を Tris/Tricine ゲル電気泳動を (Giambarella ら，1997)[9]に記述されているように行った．エレクトロブロッティングした後，ブロットしたシートを 1 μg/ml 抗 Aβ1-40 ポリクローナル抗体 (Pharmingen, San Diego, CA, USA) 及び 1 μg/ml 抗 Aβ1-42 ポリクローナル抗体 (Pharmingen)，および，2 次抗体 [1/5000, HRP-標識羊抗ウサギ IgG (H+L), Bio-Rad] の混合物で解析した．細胞 APP の免疫ブロッティングは以下のように実施した．各細胞の細胞懸濁液を 22C11，α1680，Alz90 抗体，を 1 次抗体とし，2 次抗体として 1/5000 希釈 HRP 標識ヤギ抗マウス IgG (H+L) (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を使って，SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて行った．

本研究の全ての実験は少なくとも 3 回，独立した処理によってくり返され，それぞれが本質的に同じ結果を与えた．統計学的解析は Student's t-test によって行った．



第2図　抗APP抗体のF11及びF11/APP細胞に対する効果．(A) F11/APP及びBu695細胞に発現したAPP695の免疫ブロット解析。上のパネルでは各50 μgのF11，F11/APP，Bu695細胞の細胞懸濁液を用いてSDS-PAGEを行い，Alz90抗体（5 μg/ml；パネル1），α1680（1/10希釈；パネル2），22C11（5 μg/ml；パネル3）で免疫ブロット解析した．F11のα1680免疫ブロット解析においてのみ観察された90-100 kDaのバンドは再現性がなかった．下のパネルではF11，F11/APP，Bu695，初代培養大脳皮質神経細胞（PCN）懸濁液のSDS-PAGEを行い，22C11を用いて免疫ブロット解析した．少なくとも3回行った互いに独立な実験の代表的な結果を示す．(B) 抗APP抗体処理したF11/APP細胞の細胞死の時間依存性．（右）細胞（F11/APP，オープンシンボル；F11，斜線シンボル）をα1680（×1/10），Alz90（1 μg/ml），非特異的IgG（1 μg/ml）で処理した．（左）F11細胞を抗体処理した後の各時間後における全細胞数及び生存細胞数を示した．細胞死率をトリパンブルー染色法で測定した．右パネルでは左パネルと同様なしかし独立した実験で得られたデータに基づいて細胞死率を測定した．各値は3回の独立した実験の平均値である．各々の標準偏差は各値の5%未満である．示した結果は同様な3回の実験結果における代表的なものである．(C) F11/APP細胞死に対する抗体吸着の効果．F11/APP細胞を抗体吸着処理したα1680あるいは抗体吸着処理過程の対照操作したα1680はα1680をそれぞれAPP不動化ビーズ（抗体吸着処理），対照グルタチオン結合ビーズで処理しその上清を1/10希釈率で用いた．挿入図は抗体吸着処理対照（レーン1）α1680をHRPラベル抗ラットIgG抗体によって免疫ブロット解析した結果を示している．各値は3回の独立した実験の平均値±標準偏差を示している．(D) F11/APP細胞における精製抗APP抗体の用量作用曲線．F11/APP細胞を示したような各濃度の精製抗APP抗体で処理し，処理後72時間にて細胞死率をトリパンブルー染色法により測定した．各数値は少なくとも3回の独立した処理から得られた平均値±標準偏差を示している．(Sudo H et al：Mol Cell Neurosci 16：708-723, 2000の第1図を許可を得て転載，一部改変)

結　果

1. 抗APP抗体はF11/APP細胞に細胞死を誘導する

野生型APPの機能を解析するために，神経系の神経細胞に発現する野生型APP695を過剰発現したF11細胞を確立し（第2図A）[33]，F11細胞の親株と比較した．F11細胞は胎生13日のラット初代培養神経細胞をマウス神経芽細胞腫N18TG2と細胞融合することにより不死化した細胞で，活動電位の発生を含む神経細胞特異的な機能を維持し，初代培養神経のモデルの中で最もよく確立したものの一つである[34]．モノクローナル抗体α1680はAPPの細胞外ドメインであるAPP1-591を認識する抗体であるが，α1680でF11/APP細胞を処理すると処理後72時間で80〜90%の細胞が死滅した（第2図B）[33]．死細胞数は24時間後では少ないが48時間後には顕著に増加し始めた．野生型APP695を安定発現させた他のF11細胞クローンにおいてもα1680は同様な時間経過で同様な程度の細胞死を誘導した（データは示していない）．対照として，たとえ処理後72時間であっても，非特異的IgGは，ほとんどF11/APP細胞に細胞死を誘導せず，α1680をF11細胞に処理しても細胞死は惹起されなかった．F11/APP細胞を非特異的IgGで処理すると第2図B左パネルに示すように，細胞数はむしろ増加し処理前より少し高いレベルの飽和状態に達した．この現象は培地を新しくしたことに起因すると考えられる．

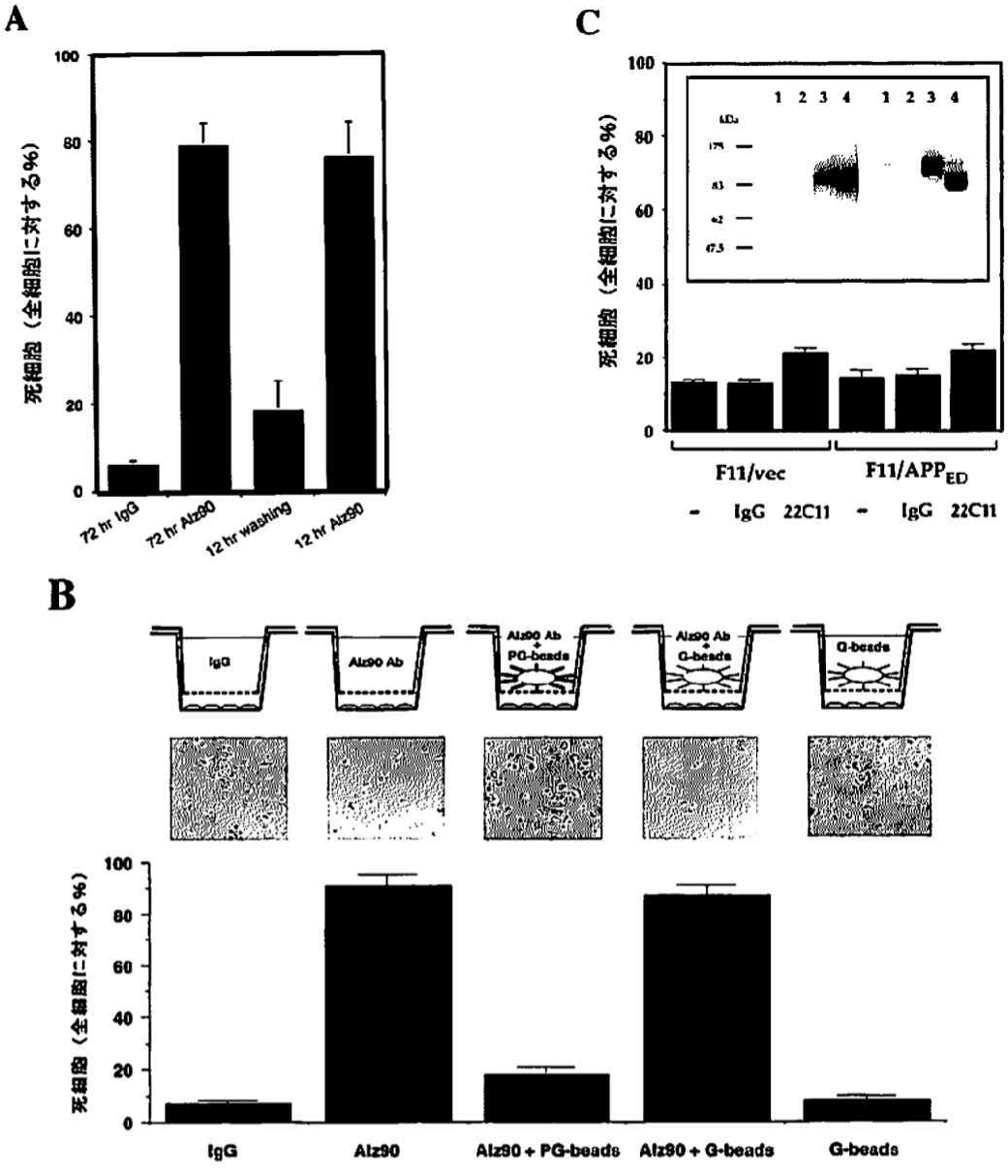
次に，Glutathione beadsに不動化したGST融合APP1-591抗原によって吸着処理したα1680の効果を調べた．吸着処理をしたα1680で72時間処理したが細胞死はほとんど惹起されなかった（第2図C）[33]．対照のモック吸着α1680を，α1680をGlutathione beadsに同様に吸着処理することにより作成したが，これは，吸着処理前のα1680に匹敵する細胞死誘導効果を示した．HRP標識抗ラットIgG抗体を用いて吸着処理，あるいは，モック吸着処理後の抗体溶液を免疫ブロット解析したが，この操作により，抗体は効果的に吸着されていることが判明した（第2図C挿入図）．これらの結果によりF11/APP細胞に細胞死を誘導したのは抗APP抗体であって，抗体溶液の溶媒や他の不純物ではないことが明らかとなった．

APP細胞外ドメインに対する精製抗体の効果を第2図D[33]に示す．使用した抗体はAlz90抗体，APP695の細胞外511-608残基を認識するマウスモノクローナル抗体；22C11，APP695の細胞外66-81残基を認識するマウスモノクローナル抗体；α1680，APP695の細胞外1-591残基を認識するラットモノクローナル抗体；Jonas抗体，APP695の細胞内643-695残基を認識するマウスモノクローナル抗体である．精製α1680はF11/APP細胞に最も強力に細胞死を起こし，その誘導効率は72時間で90%以上であった．その誘導効率は，0.5 μg/ml処理の場合，72時間で90%以上であった．Alz90抗体と22C11の細胞死を起こすefficacyは，同じ0.5 μg/mlでは，この約1/2であった．第2図Bに示したとおりAlz90抗体により誘導されたF11APP細胞死の時間経過は，本質的にα1680のそれと同じであり，Alz90抗体は，親株であるF11細胞に細胞死を誘導できなかった．これらの抗体の中で，Alz90抗体は，APLP2を認識せず，APPのみを認識する抗体として知られており[35]，したがってAPPはこれらの抗体で共通に認識される唯一の抗原である．したがって，これらの結果は，抗体のAPPに対する結合が細胞死を惹起したことを示している．APPの細胞内領域を認識するJonas抗体の効果も調べたところ，APP細胞外ドメインを認識する抗体と対照的に，Jonas抗体はF11/APP細胞に細胞死を誘導しなかった．この結果は抗APP抗体はAPPの細胞外領域に作用して，細胞死を誘導していることを示唆している．

したがって，観察された抗APP抗体の誘導する神経細胞死を起こす機序として2つの可能性がありうる．抗体は，(i) 細胞表面のAPPに作用したか，あるいは(ii) 培地中のAPPに作用したかである．後者の可能性は，すなわち，抗体が栄養因子として存在していた分泌型APP（sAPP）を吸収することによって細胞死を誘導したという意味である．sAPPが，非神経細胞に対してではあるが，細胞の栄養因子として機能することは以前から知られている[36,37]．しかしながら，私は，この可能性は低いと推測した．培養上清中のsAPP濃度はF11APP細胞よりF11細胞の方が低いと推測されるため，もしそのような場合であるならば，抗APP抗体はF11細胞にも同等あるいはそれ以上に強く細胞死を誘導しなければならない．にもかかわらず，実際には，F11細胞に効果的に細胞死を誘導できる抗体はなかったからである．

2. 抗APP抗体はsAPPでなく細胞表面のAPPに作用している

どちらの分子機構で，抗APP抗体が細胞死を誘導するのかを決定するために，以下の一連の実験を行った．最初に，培地をくり返し洗うことにより可溶性の因子を



第3図　抗APP抗体は細胞表面のAPPに作用することによりF11/APP細胞死を誘導する．(A) F11/APP細胞を最初の12時間，1時間おきに培地交換をくり返し，その後無血清Ham-F12下にて60時間培養し（12hr washing），細胞死率を実験開始後72時間で測定した．F11/APP細胞を最初の12時間だけ1 μg/mlのAlz90抗体（12hr Alz90）にて処理するか，72時間1 μg/mlの非特異的IgG（72hr IgG）にて処理した．図に示したすべての数値は3〜10回の独立した実験の平均値±標準偏差を示している．(B) F11/APP細胞を72時間，事前に混合したAlz90（最終1 μg/ml）と不動化Protein Gビーズを積めたマイクロフィルターインサートの存在下にて72時間培養した．細胞死率をトリパンブルー染色法にて測定した（Alz90＋PG-beads）．また細胞を，事前に混合したAlz90（最終1 μg/ml）と不動化グルタチオンビーズのみを積めたマイクロフィルターインサートの存在下にて（G-beads）72時間培養した．インサート内の培地と細胞に直接する培地の間に効率的な行き来があることを確かめるために，非特異的IgGあるいはAlz90抗体（最終各1 μg/ml）をビーズ非存在インサート培地内に加え72時間F11/APP細胞を培養し，細胞死率を同様な方法で測定した．最上段のパネルは各状況を説明している．中段のパネルは各々の処理をしたウェルで接着している細胞を位相差顕微鏡で観察した時の代表的な像である．(C) APP-ED（F11/APP-ED）を過剰発現したF11細胞，pcDNAだけを遺伝子導入した対照F11細胞（F11/vec）を22C11（2.5 μg/ml），非特異的IgG（2.5 μg/ml），あるいは無処理（−）で72時間処理した．他の実験と同様細胞死率をトリパンブルー測定で測った．挿入図はpcDNA（レーン2），APP695（レーン3），APP-ED（レーン4）を遺伝子導入したF11細胞の細胞懸濁液（右4レーン；20 μg/レーン）及び培地（左4レーン；20 μl/レーン）中のAPPを2.5 μg/ml 22C11と1/5000 HRPラベル抗マウスIgG抗体により免疫ブロットしたものを示す．左の数値は分子量を示す．（Sudo H et al：Mol Cell Neurosci 16：708-723, 2000の第2図を許可を得て転載，一部改変）

取り除くことの効果を調べた（第3図A）[33]．実験開始後最初の12時間，F11/APP細胞を1時間に1回の割合で培地を交換したが，この操作によって細胞死率はほとんど増加しなかった．一方Alz90抗体で12時間処理すると，ほとんどの細胞において，その後3日間で細胞死が誘導された．もし抗APP抗体が培地からsAPPを吸収することで細胞死を誘導したならば，APP由来の想定される分泌性因子の効果を極小とすると考えられる培地のくり返し交換もまた，細胞死を誘導したはずである．

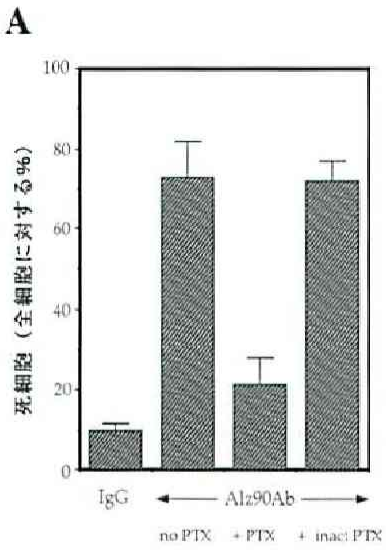
次に，F11/APP細胞からは隔離されているがsAPPに作用することは可能なAlz90抗体の効果を調べた．Protein-G-Sepharoseによって前処理したAlz90を（ビーズを除去せずに），底にマイクロフィルターを持つウェルインサート上に積めた．F11/APP細胞をこのウェルインサート下に72時間処理したが，細胞死は誘導されなかった（第3図B）[33]．抗体を結合したビーズがsAPPと接触することを保証するために，処理最初の24時間，培養プレートをCO_2培養器の中で緩やかに（1 rpm）震盪した．これらの条件下で72時間おいた後，ウェル外にあるビーズは見い出されなかった．対照として，Alz90抗体をGlutathione-Sepharoseで前処置した混合物を積めたコントロールインサート下に，F11/APP細胞を同様に培養したところ細胞死が誘導された．それは，Alz90抗体を単に加えただけのウェルインサートの下に誘導される細胞死と同程度であった．一方，インサートにGlutathione-Sepharose，あるいは，IgGを加えてもほとんど細胞死は生じなかった．使用したインサートは，3 μmの孔があり培地中の可溶性蛋白がビーズ結合Alz90抗体に相互作用することは可能だが，Alz90抗体がF11/APP細胞に作用することは，ビーズが孔を通らないために不可能である．実際，培養後の培地を抗IgG抗体を用いて免疫ブロットしたが，Alz90抗体/Protein-G-Sepharoseを積めたインサートによって処理した細胞の（インサートを除いた，72時間後の）培地中には測定可能な量のAlz90抗体は含まれていなかった．一方，Alz90抗体とコントロールであるGlutathione-Sepharoseを積めたインサートによって処理した細胞の（インサートを除いた，72時間後の）培地中には，ビーズの入っていないインサートに単にAlz90抗体を加えただけの処理をした細胞の培地

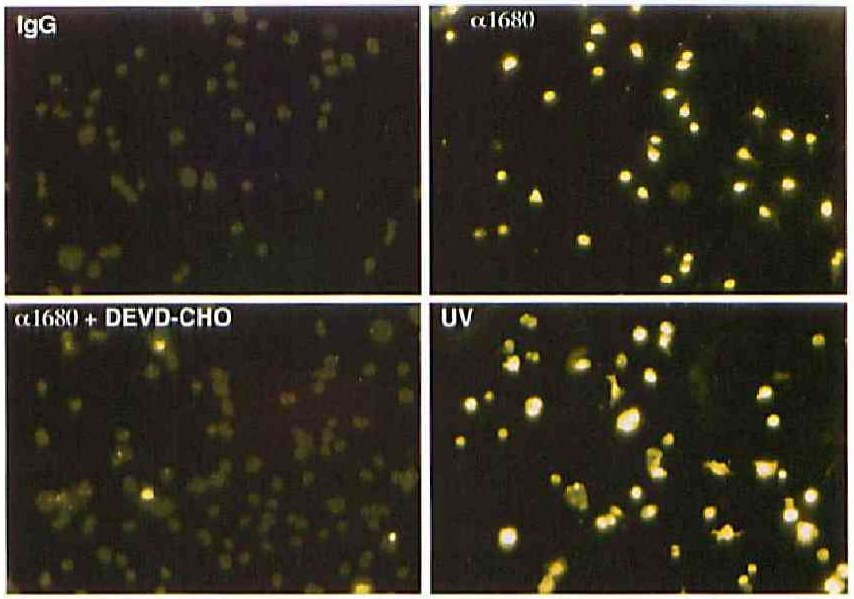
第1表　Bu695細胞に対する抗APP抗体の効果

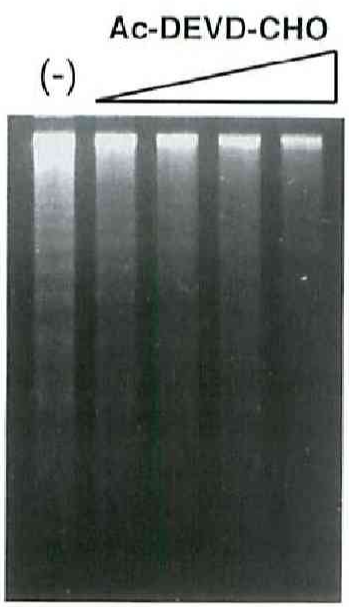
	細胞死率（%）	
	F11/APP	Bu695
IgG	5.0±0.5	5.2±1.0
Alz90抗体	87.0±2.0	5.8±2.0
Alz90抗体＋Ac-DEVD-CHO	25.0±6.4*	6.2±1.6
Alz90抗体＋Ac-DEVD	79.0±5.2	5.7±2.3
Ac-DEVD-CHO	7.2±1.8	5.6±1.0
Ac-DEVD	7.0±1.5	7.6±1.5

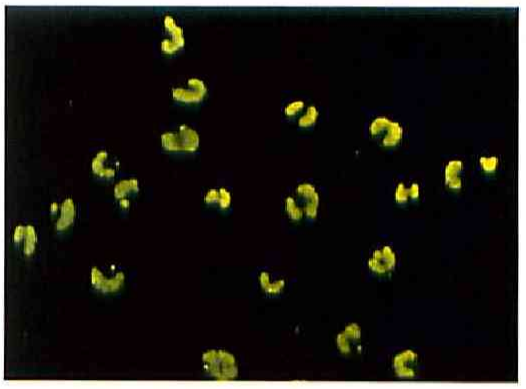
Bu695細胞に対する抗APP抗体の効果F11/APP細胞あるいはBu695細胞は1 μg/mlの非特異的IgGあるいはAlz90抗体により10 μM Ac-DEVD-CHOあるいはAc-DEVD（C端修飾を欠くAc-DEVD）の存在下または非存在下に72時間処理し細胞死をトリパンブルー染色により測定した。10 μM Ac-DEVD-CHOあるいはAc-DEVDのみも陰性対照として調べた。*P<0.01；Alz90抗体の誘導する細胞死に比較してStudant'st-testによって有意差あり。（Sudo H et al：Mol Cell Neurosci 16, 708-723, 2000の第1表を許可を得て転載，一部改変）

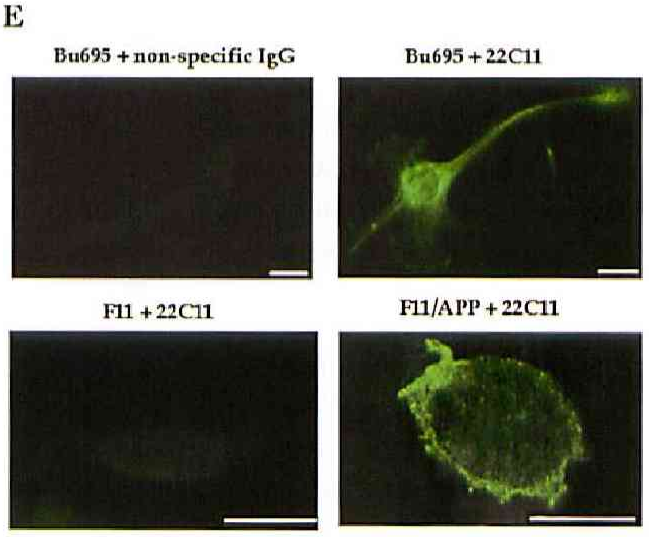
第4図　抗APP抗体によるF11/APP細胞死の特徴．（A）PTXの効果．F11/APP細胞を無処理（no PTX），0.5 μg/ml PTX（＋PTX），0.5 μg/ml 不活性化PTX（＋intactPTX）によって24時間処理し，さらに1 μg/ml Alz90抗体により72時間処理し，細胞死をトリパンブルー染色法で測定した．数値は独立した3回の実験の平均値±標準偏差を示している．（B）TUNEL染色．F11/APP細胞を非特異的IgG（1 μg/ml，左上）あるいはα1680（×1/10右上）によって24時間処理し染色しこれをTUNEL法によりFITCラベルdUTPで染色した．左下のパネルは10 μM Ac-DEVD-CHOの存在下にα1680（×1/10）によって処理したF11/APP細胞をTUNEL染色した．右下のパネルはUV（320 μJ/cm2×10s）照射したF11/APP細胞をTUNEL染色した．これらの図は少なくとも3回の同様な実験から代表的な視野あるいは結果を示したものである．（C）DNAのラダー化．F11/APP細胞を各々の濃度のAc-DEVD-CHOの存在下あるいは非存在下［(－)］に24時間Alz90抗体（1 μg/ml）にて処理し得られた細胞サンプルをDNAラダーアッセイした．Ac-DEVD-CHOの濃度は0.1, 1, 10, 100 μM（左から右へ）である．（D）抗APP抗体により誘導されたF11/APP細胞核の形態．この図はα1680処理したF11/APP細胞をTUNEL染色しその核を示したものである．アポトーシスを起こした細胞の核に典型的な核濃縮，核切断，核断片化が観察できる．このような形態変化はおおむね，抗APP抗体処理後24～32時間で誘導された．（E）Bu695, F11, F11/APP細胞表面APPの免疫染色．膜非穿孔の細胞を22C11及び非特異的IgGにより免疫染色した．Alz90抗体による染色でもここに挙げたのと同様な染色像を得た．これらの蛍光像とBの像は同じ条件下にて得られた．スケールバーは20 μmを示す．（Sudo H et al：Mol Cell Neurosci 16：708-723, 2000の第3図を許可を得て転載，一部改変）


A
死細胞（全細胞に対する%）
100
80
60
40
20
0
IgG
Alz90Ab
no PTX
+ PTX
+ inact PTX


B
IgG
α1680
α1680 + DEVD-CHO
UV


C
Ac-DEVD-CHO
(-)


D


E
Bu695 + non-specific IgG
Bu695 + 22C11
F11 + 22C11
F11/APP + 22C11

に存在した量に匹敵するAlz90抗体が含まれていた（データは示していない）．以上の免疫ブロットの結果は次のことを示している．(i) Alz90抗体はGlutathione-Sepharoseを積めたウェルインサートのマイクロフィルターを実際に通過する；(ii) Alz90抗体はProtein-G-Sepharoseを積めたウェルインサートのマイクロフィルターを通過できない．抗体の分子量が約150 kDaであり，対してsAPPは97 kDaであるからsAPPもまた，マイクロフィルターを通ると考えられる．これらの結果は細胞死を誘導するには抗APP抗体と細胞表面のAPPが直接に相互作用することが必要であるということを示している．

抗APP抗体がsAPPに結合して細胞死を誘導しないことを直接示すために，次に，APPの細胞外ドメイン全長にほぼ相当するAPP1-591（APP-ED）を過剰発現したF11細胞における抗APP抗体の効果を調べた．これらの細胞ではAPP-EDはF11/APP細胞におけるAPPと同程度に発現していたのであるが，2.5 μg/mlまでの濃度の22C11では，非特異的IgGと同様に，ほとんど細胞死を誘導しなかった（第3図C）[33]．

これら複数の蓄積した証拠に基づき，私は，抗APP抗体は，細胞表面のAPPに直接作用して神経細胞死を惹起すると結論した．このことは，APPが細胞表面において受容体様の機能を持つことを示している．

3. APPを発現したグリア系細胞に対する抗APP抗体の効果

次に，抗APP抗体の細胞死をもたらす効果について別の細胞系で検討した．この実験においては，F11/APP細胞と同程度にAPP695を発現している別のタイプの細胞を調べるように注意した．F11細胞における内因性のAPPは，抗体依存性細胞死を誘導するには量的に不十分と考えられるので，細胞あたりのAPPの発現レベルは，抗APP抗体の細胞死誘導作用の有無を決定する重要な因子であると考えられる．私は，免疫ブロット解析から，F11/APP細胞とそのAPP695発現レベルが同等であったBu695細胞を使った（第2図A）．Bu695細胞はGFAP陽性ヒトanaplastic astrocytoma由来細胞株にAPP695 cDNAを導入し安定発現させた細胞である[38]．

Bu695細胞において，非特異的IgGによる処理と比較して，Alz90抗体は細胞死率を増加させることはできなかった（第1表）[33]．一方，上に記述したように，Alz90は，F11/APP細胞では高い細胞死誘導効果をもつことが再度確認された．これらのデータはAPPが引き金となるアポトーシスは神経細胞系の細胞では働いているが，グリア細胞系の細胞では働いていない細胞内プログラムによって介在されている可能性を示唆している．そうでなければ，抗APP抗体誘導性細胞死を抑制するグリア系細胞特有の分子機構が存在している可能性が考えられる．いずれにせよ，抗APP抗体誘導性細胞死が神経系細胞にみられ，グリア系細胞でみらなかったことは極めて重要である．

4. 抗APP抗体によるF11/APP細胞死の特徴

次に，抗APP抗体によるF11/APP細胞の死の特徴を調べた．第4図B[33]はTUNEL染色の結果を示している．F11/APP細胞を非特異的IgGによって処理した時，事実上核がTUNEL陽性を示した細胞はなかった．それに対して紫外線を照射すると事実上照射されたすべての細胞においてDNA断片化が生じた．細胞をα1680で処理すると80～90%の細胞で処理後24時間にて核にDNA断片化を生じた．もう一つの対照実験として，膜透過性細胞内カスパーゼ阻害剤であるAc-DEVD-CHOはα1680の起こすDNA断片化能力を消失させた．これは，抗APP抗体はF11/APP細胞においてカスパーゼとカスパーゼ依存性DNAaseを含む細胞内プログラムを活性化するということを示唆している．

更に，Ac-DEVD-CHOの存在下，あるいは，非存在下において，F11/APP細胞をα1680で24時間処理した時のDNAラダーリングについて調べた．細胞から抽出したDNAがヌクレオゾーム単位の断片に分断され，180 bp単位のラダーを形成することはアポトーシスの決定的な特徴の一つである[39]．第4図C[33]に示したようにα1680をF11/APP細胞に処理すると180 bpのDNAラダーリングを生じ，更に，これはAc-DEVD-CHOを加えることにより阻害された．高濃度のAc-DEVD-CHOを加えるほどより強いDNAラダーリングの阻害が観察された．また，α1680でF11/APP細胞を処理した時，TUNEL染色での細胞の核形態についても調べた．抗体処理後24時間から36時間にかけて，事実上，全ての細胞がその核を変化させた．観察された核変化は，核濃縮，核切断，核断片化等であった（第4図D）[33]．これらの特徴はすべて，アポトーシスの特徴である．

Ac-DEVD-CHOによるDNA断片化の阻害効果に一致して，抗APP抗体による細胞死はこのカスパーゼ阻害剤で抑制された（第1表）．10 μMのAc-DEVD-CHOはAlz90抗体の誘導する細胞死を顕著に減少させた．対照として，C端をアルデヒド修飾していない細胞不透

過性の Ac-DEVD は同じ濃度で抗体の誘導する細胞死を阻害する効果を持たなかった．これらの結果は抗 APP 抗体がアポトーシスを誘導することにより細胞死を起こすことだけでなく，DEVD ペプチドの阻害効果は細胞内の標的に作用することによっていることを示している．

一方，Bu695 細胞を Alz90 抗体で処理しても DNA ラダーは認められず，TUNEL 陽性の核もほとんど出現しなかった（データは示していない）．対照として紫外線を Bu695 細胞に照射すると 180 bp 単位の DNA ラダー形成を認め，TUNEL 陽性細胞の増加も認めた（データは示していない）．これは，α1680 抗体の場合も同じ結果であり，この抗体は Bu695 細胞に細胞死を誘導できなかった（Bu695 細胞において非特異的 IgG の誘導する生細胞率を 100%としたとき，α1680 抗体の誘導する細胞死は Ac-DEVD-CHO の非存在下，あるいは，存在下にて各々，119%±4%，及び，104±2%）．Bu695 細胞をα1680 抗体で処理しても TUNEL 測定による DNA 断片化は生じなかった（データは示していない）．これらの結果は Bu695 細胞はアポトーシスを誘導する機構を備えているが，抗 APP 抗体には抵抗性を持つことを示している．Bu695 細胞における全 APP 量と細胞表面の APP 発現は F11/APP 細胞や初代培養神経細胞のそれらと同等であったことは繰り返し強調されなければならない（第 2 図 A 及び 4 E）[33]．

5. 初代培養神経細胞の抗 APP 抗体による細胞死

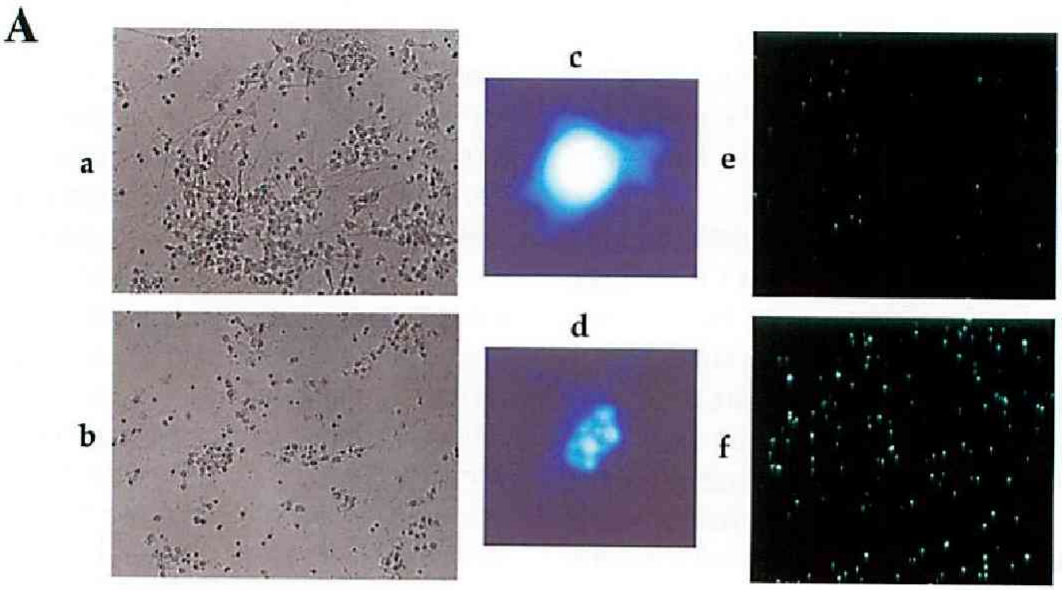
次に，初代培養神経細胞が抗 APP 抗体に同様に反応するのかを検討した．初代培養神経細胞は，F11/APP 細胞や Bu695 細胞と同程度の APP を発現している（第 2 図 A）．初代培養神経細胞を抗 APP 抗体である 22C11，Alz90 抗体で処理すると，N2 supplement を含む培地（hDMEM-N2）の存在下に，有意に細胞死率が増加した．対照の非特異的 IgG は，hDMEM-N2 のみと比較して，有意な効果は観られなかった（第 6 図 A）[29]．22C11 による細胞死誘導は N2 supplement に比較して HS の存在によって増強された［72 時間後の値で，hDMEM-HS 存在下での細胞死率は 96.9±0.5%，しかるに同条件で hDMEM-N2 存在下での細胞死率は，77.3±3.6%（3 回の独立した実験での平均値±標準偏差）］．第 5 図 A[33]は，初代培養神経細胞を精製 Alz90 抗体で処理すると，非特異的 IgG では惹起されない細胞死が誘導されることを示している．誘導される細胞死は核分断，神経突起変性，プレート面からの剥離等の典型的なアポトーシスの特徴を伴う．

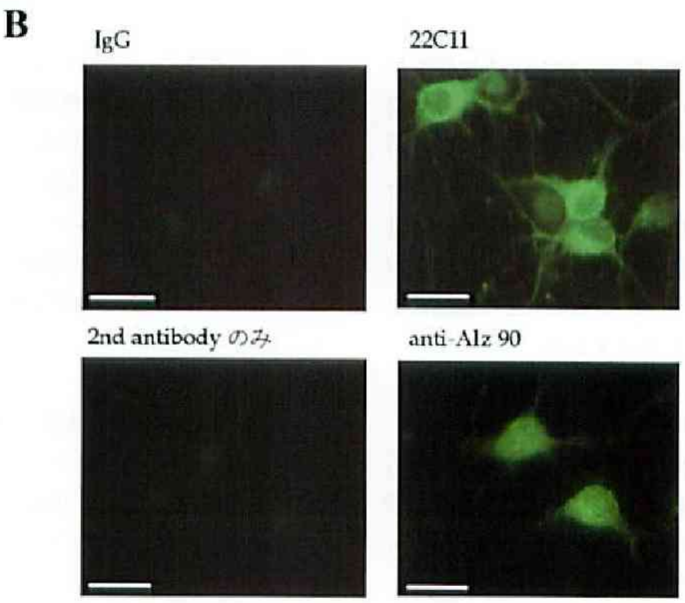
Alz90 抗体は APLP2 を認識せずに APP を選択的に認識するので，これらのデータは特異的 APP 刺激が神経細胞にアポトーシス型の細胞死をもたらすことを示している．APLP2 は APP に対する相同性が高い分子で APP とほぼ同じ組織分布や細胞内発現を示す[34]．22C11 もまた同様に，初代培養大脳皮質神経細胞に神経突起脱落，退縮，プレート面からの剥離等を伴うアポトーシス型の細胞死をもたらす．22C11 と Alz90 共に，初代培養神経細胞に対し，時間，用量依存的に細胞死を生じる．しかるに非特異的 IgG はほとんど毒性を持たない（22C11 の用量作用依存性の活性については第 5 図 C を参照）．対照として各々の濃度の 22C11 は，初代培養アストロサイトに対して細胞死効果を持たなかった．アストロサイトでは処理後 72 時間での細胞死率は，0 及び 2.5 μg/m*l* の 22C11，2.5 μg/m*l* の非特異的 IgG で，各々，6.2±2.9%，3.2±0.4%，8.1±1.9%（独立な 3 回の実験の平均値±標準偏差）であった．

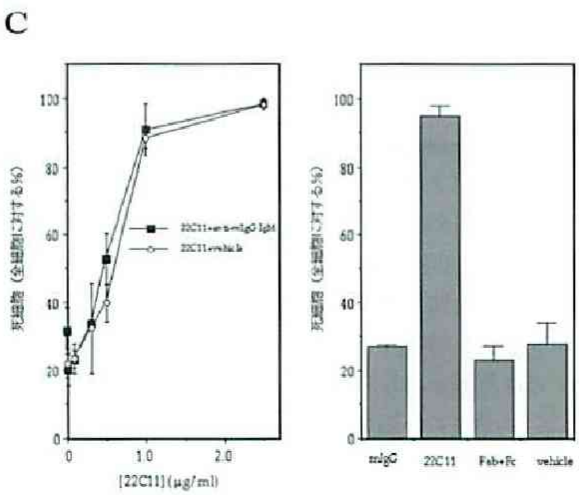
第 5 図 B[33]は，22C11 及び Alz90 抗体による膜非穿孔条件での，初代培養神経細胞の免疫染色を示している．初代培養神経細胞は細胞体と神経突起の表面に APP を発現していた．神経細胞表面に有意に APP が存在していることは複数のグループによる報告と一致しており[40~42]，また初代培養神経細胞においてもやはり，APP は抗 APP 抗体による神経細胞死の細胞表面調節因子として機能するという考えにも合致している．

6. APP の抗体による活性化機序の検討

細胞表面 APP が抗体によって活性化されることは，天然の APP リガンドが存在し，その作用を抗体が模倣するという推測を生む．しかしながら，APP の抗体による活性化が，抗体特有のクロスリンクによるものならば，APP の活性化もまた，抗 APP 抗体特有のものと考えられ，天然に APP リガンド分子が存在する可能性は極めて低くなる．抗体による APP の活性化が，抗体によるクロスリンクによるものか，受容体のリガンド分子が誘導するような二量体化や多量体化によるものかを区別することは通常容易ではない．しかし私は，以下の検討を行って両者の区別を試みた．抗体による抗原分子のクロスリンクとは典型的には IgM クラスの抗体が誘導する現象である．IgG クラスの抗体は通常の条件では抗原分子のクロスリンクをほとんど誘導しないが，これに IgM クラスの抗 IgG 抗体を添加することによって，特異的に誘導することができる[43,44]．22C11 は IgG クラスの抗体であるため，それが APP を活性化する作用機序は，22C11 による APP 分子の二量体化もしくは多量


A
a
b
c
d
e
f


B
IgG
22C11
2nd antibody のみ
anti-Alz 90


C
死細胞（全細胞に対する%）
[22C11] (μg/ml)
mIgG
22C11
Fab+Fc
vehicle

体化であって，クロスリンクとは異なるものと推察されるが，この考えを更に実証するため，22C11 単独の作用と，IgM クラスの抗 IgG 抗体存在下の 22C11 の効果を比較した．二種類の異なる抗マウス IgG 抗体(IgM)の存在下で 22C11 による初代培養神経細胞死誘導が増強されることは見い出されなかった［第 5 図 C の左パネルは 5183-1304 抗体；もう一つの抗マウス IgG 抗体(IgM) のデータは示していない］．更なる確認として，10 μg/ml のビオチン化抗 IgG 抗体と 20 μg/ml avidin の混合物の，22C11 誘導性細胞死に対する効果も検討した．avidin は 4 個の biotin に結合できるため 22C11 に結合したビオチン化抗 IgG 抗体は IgM と同様なクロスリンクを惹起するからである．この実験でも，ビオチン化抗 IgG 抗体と 20 μg/ml avidin の混合物添加による，22C11 誘導性細胞死の増強は観察されなかった(データは示していない)．これらの結果は 22C11 による APP の活性化は，いわゆる抗体によるクロスリンクではなく，APP の二量体化あるいは多量体化で達成されるものであることを示している．

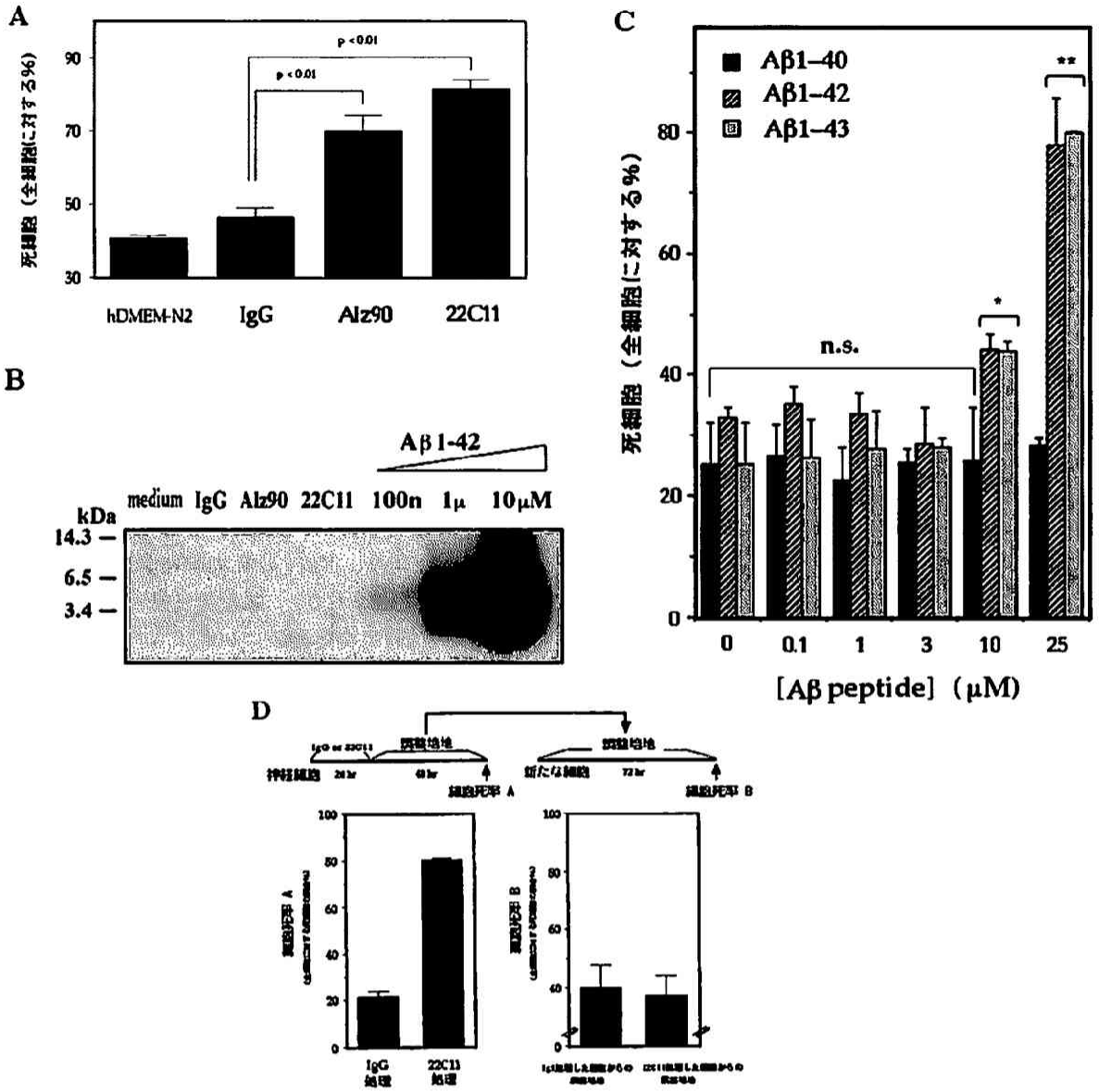
APP の二量体化が 22C11 による活性化に必要であることを示すために，22C11 の Fab 断片が，インタクトな 22C11 と同様に神経細胞死を誘導できるか否かを検討した．第 5 図 C[33]の右パネルは，初代培養神経細胞において，22C11 の Fab 断片は，神経細胞死を誘導する能力を失ったことを示している．Fab 断片は APP を認識できることは確認されている（データは示していない)．これらのデータは，IgG クラスの抗体である 22C11 は，おそらく APP を二量体化させるが，二量体化した APP と 22C11 の複合体が更にクロスリンクされて，細胞死シグナルが惹起されているわけではないという考えを支持している．これらの検討から，抗体による APP の活性化は，抗体特有のクロスリンクによるものではなく，したがって，抗体以外に APP を二量体化させるリガンド分子であれば APP を活性化できることを示し，APP の天然リガンドが存在する可能性を示している．

7. 受容体様分子として APP の発するシグナルの特徴

APP が細胞表面の受容体様に機能しているかを更に調べるために，細胞表面の受容体からのシグナルを伝達する 3 量体 G 蛋白質の特異的阻害剤である百日咳毒素（PTX）の，抗 APP 抗体誘導性細胞死に対する効果を調べた（第 4 図 A)[33]．私の所属する研究室や他の研究室は，これまで，哺乳類の APP，及び，ショウジョウバエの APP ホモログである APPL の細胞内シグナルの一つは PTX 感受性 Go 蛋白を介したものであると示唆してきた[31,42,45,46]．F11/APP 細胞を PTX の存在下に Alz90 抗体で処理すると，細胞死は顕著に抑制された．対照として PTX を処理前に 90℃にて 1 時間処理すると PTX の抗体の誘導する細胞死に対する阻害効果はほとんど観察されなくなった．これは PTX による阻害がこの毒素の触媒活性によっていることを示し，APP が抗体依存性に発する細胞内シグナルを PTX 感受性 G 蛋白が介在していることを示している．

次に，抗酸化剤である GEE の抗 APP 抗体による神経細胞死に対する効果を検討した（第 7 図上)[29]．Rohn らは，22C11 の誘導する神経細胞死は GEE によって抑制されたと報告した[47]．これに一致し，1 mM の GEE は血清存在下（第 7 図 A)[29]，あるいは，N2 supplement 存在下にて（第 7 図 B)[29]，22C11 による神経細胞死を有意に抑制した．GEE による抑制は N2 supple-

第 5 図　抗 APP 抗体の初代培養大脳皮質神経細胞に対する効果．(A) 初代培養大脳皮質神経細胞を 2 μg/ml 非特異的 IgG (a, c) あるいは Alz90 抗体 (b, d) によって 72 時間処理した．a 及び b では 4 回の同様な独立した実験において位相差顕微鏡で観察された代表的な視野を示した．c と d では Hoechst33258 による染色で明らかとなった抗体処理細胞の代表的な核の形を示した．e と f では初代培養神経細胞を 2 μg/ml の非特異的 IgG (e) あるいは Alz90 抗体で 24 時間処理し，TUNEL 法によって断片化した DNA を染色した．3 回の独立した実験の結果から代表的なものを示した．(B) 初代培養大脳皮質神経細胞表面における APP の発現．膜非穿孔の初代培養神経細胞を 10 μg/ml 22C11 (22C11)，Alz90 (抗 Alz90) あるいは非特異的 IgG (IgG) を 1 次抗体とし，FITC ラベルゴート抗マウス IgG 抗体 (1/100 希釈) を 2 次抗体として免疫染色した．さらに別の対照実験として神経細胞を 2 次抗体のみで染色した．スケールバーは 20 μm を示している．(C) 抗 APP 抗体を抗マウス IgG 抗体によってクロスリンキングする，あるいは抗 APP 抗体を Fab 断片化することの効果．左パネルでは初代培養神経細胞を 5 μg/ml 抗マウス IgG 抗体 5183-1304 の存在下あるいは非存在下に漸増する各濃度の 22C11 により 72 時間処理した．細胞死をトリパンブルー染色法にて測定した．右パネルでは初代培養神経細胞を 2.5 μg/ml (≒17nM) 22C11 (22C11)，非特異的マウス IgG (mIgG)，22C11 酵素切断断片である約 34 nM の Fab と約 17 nM の Fc 混合液 (Fab+Fc)，酵素処理用バッファーのみ (vehicle) にて 72 時間処理した．細胞死をトリパンブルー染色法で測定した．どちらのパネルの値も 3 回の独立した実験結果の平均値±標準偏差を示している．(Sudo H et al：Mol Cell Neurosci 16, 708-723, 2000 の第 4 図を許可を得て転載，一部改変)



第6図　抗APP抗体による神経細胞死はAβを介しているかの検討．A：抗APP抗体の毒性．初代培養神経細胞を無処理（hDMEM-N2），2.5μg/ml非特異的IgG（IgG），Alz90抗体（Alz90），22C11によってhDMEM-N2存在下に72時間処理した．細胞死測定はトリパンブルー染色による．この結果の全ての値は独立して行った3回の実験の平均値±標準偏差を示している．$p<0.01$はStudent's t-testによった．B：抗APP抗体処理した神経細胞の培養上清中に含まれるAβペプチドの免疫ブロット解析．初代培養大脳皮質神経細胞を2.5 μg/ml 22C11，抗Alz90抗体（Alz90），非特異的IgG（IgG）により72時間処理した．さらにもう一つ別の対照として抗体による処理をしていない神経細胞の培養上清（hDMEM-N2）も同様に調べた．培養上清はTris/Tricineゲル電気泳動し抗Aβ1-40抗体と抗Aβ1-42抗体の混合物で解析した．培地に含まれるAβペプチドを半定量化するために濃度既知の合成Aβ1-42溶液を同じゲルの中で電気泳動した．同様な実験を互いに独立に処理した実験由来のサンプルを用いて4回行ったが結果は同様であった．C：Aβペプチドの毒性効果．初代培養神経細胞を表示した濃度のAβ1-40，Aβ1-42，Aβ1-43で血清非存在hDMEM-N2下に72時間処理した．細胞死をトリパンブルー染色測定で測った．*$p<0.05$，**$p<0.01$はStudent's t-testによる．n.s.，有意差なし．D：抗体処理した神経細胞由来培養上清の新たな神経細胞に対する効果．初代培養神経細胞を2.5 μg/ml 22C11あるいは非特異的IgG（IgG）により24時間処理した．培地をhDMEM-N2に交換した後，細胞を48時間培養した．22C11あるいはIgG処理による神経細胞の細胞死率はトリパンブルー染色法によって抗体処理後72時間で測定した（左パネル，細胞死率A）．22C11あるいはIgG処理細胞の培地交換後48時間培養しその後回収した培養上清に4.5 mg/ml glucoseを加えた．この培養上清を新しい細胞に処理し72時間後，細胞死をトリパンブルー染色法で測定した（右パネル，細胞死B）．同様な実験を3回行った．（第6図B以外はSudo H et al：Biochem Biophys Res Commun 282：548-56，2001の第1図を許可を得て転載，一部改変）

ment 存在下において減弱していた．血清存在下に 1 μg/ml 22C11 が誘導する神経細胞死は GEE の存在下にてほぼ完全に抑制された．

これらの結果は，APP が抗体依存性に誘導する細胞死シグナル伝達経路には，PTX 感受性 3 量体 G 蛋白の活性化とフリーラジカルの産生が含まれていることを示している．そして，APP が，*in vitro* で G 蛋白共役受容体様の様式で機能すること[45]を考えると，細胞表面の APP[33,40,42]は細胞表面受容体のような機能を持っている可能性が高い．

8．細胞外に分泌される Aβ は，APP 誘導性神経細胞死を介在しない

次に，以下に述べる一連の実験で，APP が抗体依存性に誘導する神経細胞死を APP から分泌される Aβが介在するか否かにつき検討した．

1）抗 APP 抗体の誘導する細胞死に伴う培地中の Aβ

抗体処理した神経細胞から分泌された Aβ ペプチドの濃度が神経細胞死を生じるに十分な濃度であるかを調べた．第 6 図 A[29]の実験において，抗 Aβ40，及び，抗 Aβ42 抗体による免疫ブロット解析の結果，22C11，及び，Alz90 抗体処理し細胞死をおこした神経細胞の培地中には Aβ ペプチドは検出されなかった．本免疫ブロットでは，Aβ は 100 nM の濃度までは確実に検出されるため，この結果は，同培地中には Aβ は，Aβ40，Aβ42 のいずれも，100 nM 以上には含まれていないこと示す（第 6 図 B）．一方，Aβ1-40，Aβ1-42，Aβ1-40 のいずれも，3 μM 以下の濃度では初代培養神経細胞に細胞死を誘導しなかった（第 6 図 C）[29]．Aβ1-40 ではより高濃度でも神経毒性は観察されなかった．10 μM 以上の濃度における Aβ1-42，Aβ1-43 の神経細胞毒性は本質的には同等であった．

22C11 とは対照的に，Aβ ペプチドの毒性は血清の存在下で弱められたことは特記に値する［Aβ 処理により 72 時間での時点で，80.2±6.0%の初代培養神経細胞が細胞死を惹起するが，hDMEM-HS 存在下では，Aβ 処理後 72 時間での時点で，57.4±4.9%へ細胞死率が有意に減少する（3 回の独立した実験での平均値±標準偏差）第 7 図 C と第 7 図 D を参照］．これまでの報告には Aβ 1-42 による細胞死の用量作用曲線を血清存在下で調べたものはない．本研究で観察された N2 supplement 存在下での Aβ1-42 の誘導する細胞死の用量作用曲線は他の研究室のデータと一致する[48]．

これらのデータは抗 APP 抗体の誘導する細胞死は神経細胞からの分泌された Aβによって介在されているのではないことを示す第一の証拠を提示する．

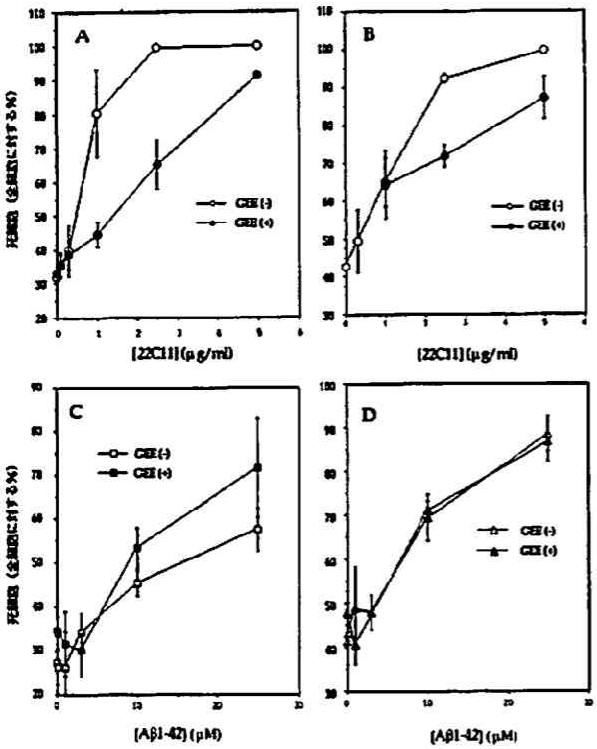
2）細胞死を発生した神経細胞由来の培養上清の効果

次に，抗 APP 抗体処理された神経細胞の培養上清が神経毒性を持つか否かについて検討した．この目的のためには，それ自身神経毒性のある抗 APP 抗体を培養上清から除去しなければならない．予備的検討により，抗 APP 抗体を処理しないで 72 時間培養した神経細胞から回収した培養上清に抗体除去のための処理を行うと，もはや培地は神経細胞を健常に維持できず，3 日間で 70 %以上の細胞死を誘導してしまうことが明らかとなった．このため，他の方法でこの課題を解決することを試みた．

まず，初代培養神経細胞を 2.5 μg/ml 22C11 にて 24 時間処理し，培地を新しいものに交換することで抗体を除去した．そして細胞死を抗体処理開始から 72 時間後に測定した．これと共に，培養後半 2/3 に当たる 24 時間から 72 時間の間の 48 時間分の培養上清を回収し，これを新鮮な神経細胞に処理し，培養上清による処理開始後 72 時間で細胞死を測定した．この培養上清は，22C11 を処理され，確かに，高度の細胞死を起こした神経細胞から得たものであったが（第 6 図 D[29]，左パネル），対照の培養上清で処理したものと比較して，この 22C11 で処理した神経細胞由来の培地で処理した新たな神経細胞において細胞死の増加は，ほとんど観察されなかった（第 6 図 D 右パネル）．抗体の誘導する細胞死の大部分は，抗体処理後 24 時間と 72 時間の間の培養後半 2/3 で生じており（抗体処理後の細胞死率は 24 時間後で 2.5 μg/ml の IgG で 31.6±6.7%，2.5 μg/ml の 22C11 で 37.9±8.0%［3 回の独立した実験の平均値±標準偏差］に過ぎず，これらの細胞死率の間に有意差はない），これらの結果は，抗 APP 抗体が誘導する神経細胞死を可溶性因子が介在している可能性は極めて低いことを示している．

3）Aβ1-42 による神経細胞死に対する GEE と血清の効果

次に，膜透過型抗酸化剤である GEE の Aβ1-42 による神経細胞死に対する効果を調べ，これを抗 APP 抗体による神経細胞死に対する GEE の効果と比較した（第 7 図上と第 7 図下を参照）[29]．第 7 図上に示した馬血清，および，N2 supplement 下の GEE の 22C11 の誘導する細胞死を抑制する効果とは対照的に，血清存在下（第 7 図 C），あるいは，N2 supplement 存在下（第 7 図 D）の両条件で，GEE は Aβ1-42 による毒性を弱めな



第7図　GEEのAβ1-42あるいは抗APP抗体による神経細胞死に対する効果．初代培養神経細胞を漸増する各濃度のAβ1-42で1mM GEE存在あるいは非存在下，hDMEM-HS（C）あるいはhDMEM-N2（D）存在下に処理した．細胞死をトリパンブルー染色法にて処理後72時間で測定した．これと平行して初代培養神経細胞を1mMのGEEの存在下あるいは非存在下にて各々の濃度の22C11で処理し，72時間後に細胞死をトリパンブルー染色によって測定した．この実験もhDMEM-HS（A）あるいはhDMEM-N2（B）の2条件で行った．（Sudo H et al：Biochem Biophys Res Commun 282：548-56, 2001の第2図を許可を得て転載，一部改変）

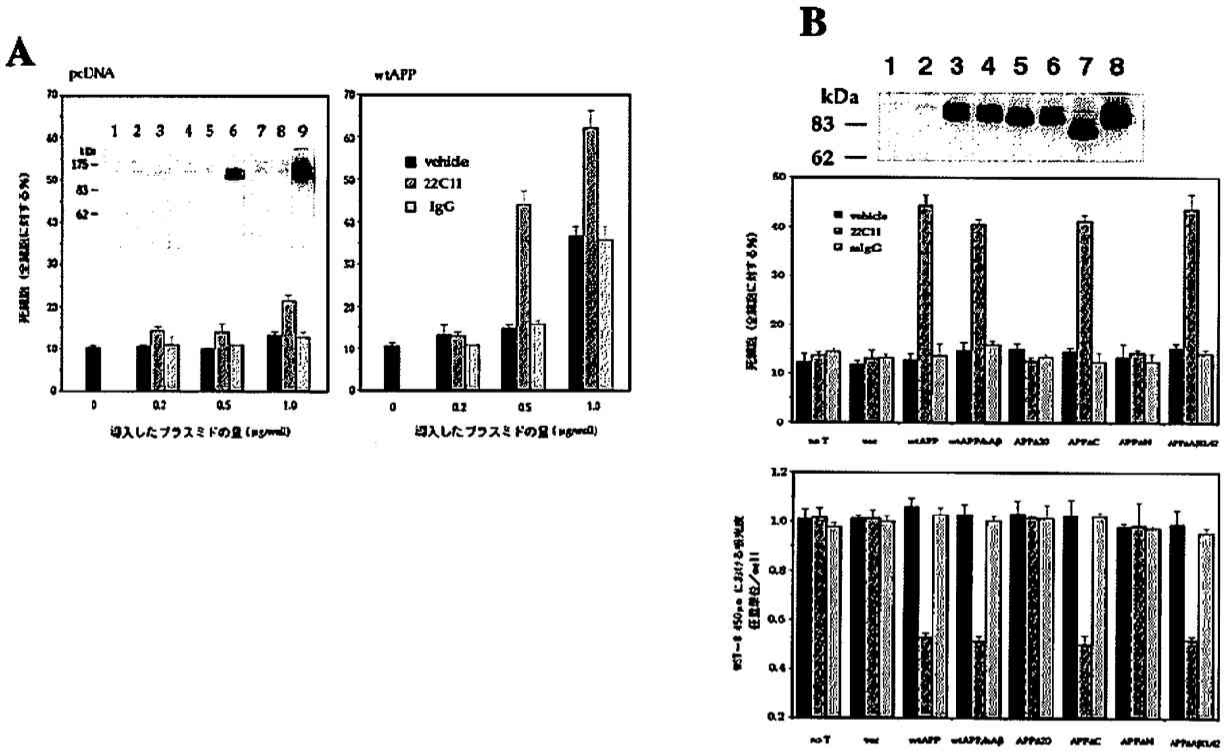
かった．これらの結果は抗APP抗体はAβ1-42とは異なるメカニズム，あるいは，少なくともAβ1-42によるメカニズムに含まれない機構をその下流に含むことを示している．この結果は，抗APP抗体は分泌されたAβ1-42を介さず神経毒性を発揮するという考えに対するもう一つの有力な証拠を与えると考えられる．

8.　APP誘導性神経細胞死の責任を担うAPP領域はAβ42ドメインではなく，APPの細胞内ドメインである

抗APP抗体処理で細胞死が惹起されない不死化神経細胞株であるF11細胞に，一過性に野生型APP cDNAを導入した時，抗APP抗体は細胞死を誘導できるか，もしそうならAPPのどのドメインが細胞死誘導に寄与しているのかを調べた．既に上に記載したように，F11細胞に野生型APPを安定的に発現した場合，F11細胞は抗APP抗体依存性の細胞死誘導能を獲得するため，野生型APPを一過性に発現しても抗APP抗体は細胞死を誘導できると予想される．

F11細胞に0.5μg/mlの野生型APP cDNAを発現すると，22C11によって有意に細胞毒性が誘導された．この細胞死は，同じ条件で，非特異的IgGでは誘導されなかった（第8図A右パネル）[29]．野生型APP cDNAを0，あるいは，0.2μg導入した時，あるいは，0.2，0.5μgの空ベクター（pcDNA）だけを導入した時，22C11依存性の細胞死は誘導されなかった（第8図A）[29]．22C11依存性の細胞毒性は，細胞生存率測定法であるMTTアッセイの改良法であるWST-8アッセイで確認した．私の所属する研究室では，WST-8がもたらす細胞生存率はトリパンブルーによる細胞死率と高度に逆相関することを確立している．0.5μgの野生型APP cDNAを細胞に導入すると，22C11による処理でWST-8細胞生存率に有意な減少を生じた（第8図B最下段パネル左から3番目のカラム）[29]．細胞生存率の低下は非特異的IgGでは観察されなかった．細胞死の結果に一致して，APPは0.5μgの遺伝子導入の時は十分に発現していたが，0あるいは0.2μgを遺伝子導入した時は全くあるいはほとんど発現していなかった（第8図A挿入図）[29]．これらの結果は，野生型APPを安定発現させたF11細胞には抗APP抗体は細胞死を誘導するが，もとのF11細胞では誘導しなかったという第2図の実験結果に合致し，ここで再び，APPが抗APP抗体の誘導する細胞死を介在する直接的な証拠を確認した．

1.0μgの野生型APP cDNAを遺伝子導入し組み換え野生型APPが過剰発現した時，抗体が存在しなくても有意な細胞死を生じたことは特記に値する（0.5μg野生型APPを遺伝子導入した時と比較して約20%の増加；第8図A右パネル）．同じ条件下でpcDNAを同様に遺伝子導入しても細胞死率は増加しなかった（第8図A左パネル）．したがって，野生型APPの過剰発現は，抗体を必要とせずに細胞毒性を発揮することになる．これと並んで，1μgの野生型APP cDNAを遺伝子導入した時，抗体依存性の細胞死率は更に上昇した（0.5μgの野生型APPを遺伝子導入した時と比較して約20%の増加）．既に別の研究で，この野生型APPの過剰発現による細胞毒性はAPPのC端ドメインMet677-Asn695（Domain19）によることが明らかにされてい



第8図　一過性に野生型APP及び変異型APPを導入したF11神経系細胞に対する22C11の毒性．A：抗APP抗体毒性の遺伝子導入依存性．F11神経系細胞に表示した量のpcDNA（左パネル）あるいは野生型APP全長（右パネル）を導入した．これらをPBSのみ（ビークル,黒棒），2μg/ml マウスIgG（IgG，灰色棒），2μg/ml 22C11（22C11，斜線棒）によって処理した．抗体処理48時間後，細胞死測定をトリパンブルー染色にて行った．挿入図は0.2μg/ml DNA（レーン1，何もいれず；レーン2，pcDNA；レーン3，野生型APPcDNA），0.5μg/ml DNA（レーン4，何もいれず；レーン5，pcDNA；レーン6，野生型APPcDNA）あるいは1μg/ml DNA（レーン7，何もいれず；レーン8，pcDNA；レーン9，野生型APPcDNA）をF11細胞に導入してその細胞懸濁液中のAPPを2.5μg/ml 22C11によって免疫ブロットした結果である．左の数値は分子量を示している．B：さまざまなAPP組み換え変異体の抗APP抗体神経毒性を媒介する効果．F11細胞に，遺伝子導入なし（no T），0.5μgのpcDNA（vec），野生型APP cDNA，各APP変異体cDNAをそれぞれ遺伝子導入し，これらをPBS（ビークル，黒棒），2μg/ml マウスIgG（IgG，灰色棒），2μg/ml 22C11（22C11，斜線棒）で処理した．細胞死を抗体処理後48時間でトリパンブルー染色法により測定した（中のパネル）．細胞生存率もまた抗体処理後48時間でWST-8測定により測定した（下のパネル）．上のパネルはF11細胞に0.5μgのpcDNA（レーン2），野生型APP（レーン3），野生型APP/hAβ（レーン4），APPΔ20（レーン5），APPΔC（レーン6），APPΔN（レーン7），APPΔAβ41/42（レーン8）をそれぞれ遺伝子導入し，その細胞懸濁液（各レーン20μg）の中に含まれるAPPを2.5μg/ml の22C11で免疫ブロットした結果である．レーン1は増殖期にあるF11細胞のサンプルを示している．左の数値は分子量を示している．（Sudo H et al：Biochem Biophys Res Commun 282：548-56, 2001の第3図を許可を得て転載，一部改変）

る[30]．

次に，抗体依存性の野生型APPの毒性のみ観察される0.5μg cDNA導入プロトコールを使って，抗体依存性に神経細胞死をおこすAPPのドメインを調べた．（第1図および第8図B参照）F11細胞にAβ領域である41番と42番残基を欠いたAPPを導入し，（wtAPPΔAβ41/42），22C11で処理すると，F11細胞に野生型APPを遺伝子導入し，22C11で処理した時にみられたのと同等の強さの細胞死が生じた．このことは，ヒト化Aβドメインを持つマウス野生型APP（wtAPP/hAβ）の場合も同様であった．マウスとヒトのAPP695のAβ領域は3残基が異なっている［各々，601残基（Aβ第5残基）のGlyとAla，606残基（Aβ第10残基）のPheとTyr，609残基（Aβ第13残基）のArgとHis］．今回の結果は野生型APP，および，野生型APP/hAβともに22C11依存性細胞毒性を同程度発揮することを

示している．対照的に，野生型 APP cDNA で細胞内ドメイン His657-Lys676（ドメイン 20）を欠いたもの（wtAPPΔ20）を細胞に導入すると，22C11 は細胞死を全く増強しなかった．これに対して，22C11 はドメイン 19 を欠いた野生型 APP（wtAPPΔC）を導入した細胞に細胞死を誘導し，その強度は，野生型 APP を導入した細胞に 22C11 処理がもたらすのと同等であった．対照の IgG では，wtAPPΔC を導入した細胞に細胞死を誘導できなかった．これらの結果は，ドメイン 20 が APP の抗体刺激による細胞毒性の責任領域であることを示しているが，この考えに合致して，野生型 APP の His657 以降の C 末端を欠いたもの（wtAPPΔN）を導入した細胞において，やはり，22C11 は細胞死を誘導できなかった．導入された野生型 APP とその変異体は，F11 細胞に同程度発現していた（第 8 図 B 上パネル）[29]．これらの結果は，細胞死誘導の責任を担うドメインは Aβ1-42 領域ではなく細胞内ドメインの特定の領域であることを示している．

考　察

私は，本研究で，抗 APP 抗体が細胞表面の APP に直接作用し神経細胞死を引き起こすことを示した．その知見は，神経細胞において膜貫通型の野生型 APP は分子レベルで細胞表面細胞死調節因子として，抗体依存性に受容体様機能を発揮することを意味している．これまでのところ野生型 APP の機能についての情報は極めて限られたものであった．APP は増殖と神経突起伸長に関わるかもしれないが（緒言参照），その効果は可溶性 APP のものである．膜結合型 APP が選択的にシナプスに局在することは膜貫通型 APP が正常神経生理において何らかの機能を持つことを示唆している．Storey ら（1996）は，APP が，神経突起の活発に動く部分ではなく静的な神経細胞表面に存在することを報告している[41]が，これは APP は比較的安定した機能を神経細胞表面で営んでいることを示唆している．これまで，複数のグループが，各々独立して APP が神経において細胞表面受容体様機能を担っていることを言及した．APP の受容体様機能について知見を見い出したのは，私が所属する研究室のチームである[31]．その後，同グループは，*in vitro* のリポソーム系を用いて，(i) 野生型 APP は，共に再構成された Go を，抗体依存性に活性化する機能を持つこと，(ii) Gi を APP と共に再構成した場合は Gi を活性化できないこと，(iii) 家族性アルツハイマー病の原因となる 3 種類の V642 変異体において（抗体の必要なく）恒常的に Go を活性化すること，を示した[45,49]．Russo ら（1998）は，同様な概念を見つけたが，それは，野生型 APP は核内転写因子を活性化する細胞質アダプターである Fe65 と相互作用し，家族性アルツハイマー病に関係した APP は Fe65 との相互作用が変化するというものであった[50]．Brouillet ら（1999）は，1993 年の Nishimoto らの発見（APP は，His657-Lys676 を介して Go に結合し，Gi には結合しない）[31]を再確認すると共に，脳の細胞膜標本において，野生型 APP を 22C11 で処理すると G 蛋白の活性化状態が変化することを明らかにした[42]．これらの報告から明らかにされてきた知見を更に掘り下げて，本研究は，野生型 APP は神経細胞死を細胞外から調節する細胞膜表面分子としての機能を持つことを示している．F11 細胞における内因性 APP がこの機能を示せないことは存在量が足りなく細胞死が生じるほど細胞内メカニズムを活性化し続けることができないことに起因すると考えられた．

本研究で検出された野生型 APP の機能の生理的関連性は，現在のところ不明である．抗 APP 抗体が初代培養神経細胞においてその作用を持つことは，この APP の機能が何らかの生理的関連性を持つことを示唆するが，この機能を活性化する天然のリガンドが見つかるまでそのようには結論できない．最近，Torroja ら（1999）は，ショウジョウバエの APP ホモログである APPL がその細胞内ドメインの APP における Go 結合ドメインに相当する領域を介して細胞表面受容体様機能を持つことを明らかにした[46]．彼らはまた，APPL の細胞内ドメインの生理的機能を調節する天然のリガンドが存在していることも推定した．本研究は，APP もまた，天然のリガンドによって調節される生理機能を持つことを支持している．天然のリガンドの存在に関わる議論として，この APP の介在する細胞死誘導機構が，抗体特有のクロスリンキングによるものであるか否かを議論することもまた重要である．抗体による分子クロスリンキングは細胞表面 Fc 受容体（FcR）について最もよく調べられてきた．FcR に IgG が結合しても FcR のクロスリンキングはほとんど生じないが，IgM か，あるいは，IgG 及び IgG の二次抗体（IgM）の混合物によって FcR のクロスリンキングが最もよく誘導されることが示されてきた．従って，本研究では，22C11（マウス IgG）の誘導する神経細胞死が，抗マウス IgG 抗体（IgM）を加えた時に増強されるか否か，更に，4 分子のビオチンに結合する avidin を使ってクロスリンクした 22C11 の細胞死誘導作用が増強されるか否かを検討し，APP が抗体依存性に神経細胞死を誘導するには，IgG クラスの

抗APP抗体がAPPに結合することで十分であることを明らかにした．抗APP抗体をFab断片化すると細胞死を起こす能力が消えるという結果とあわせると，これらの実験結果は，APPの抗体による刺激はおそらく2量体化を促進し，この状態のAPPを更にクロスリンクしてもほとんど増強効果はないことを示唆している．したがって，このAPPの機能は抗体だけがクロスリンキングによって誘導できるような限定的なものではなく，EGFがEGF受容体に誘導する[51]ようにAPPを2量体化するようなリガンドが，活性化できる生理的な機能である可能性が高い．細胞死が抗体にはよらないAPPの2量体化によって誘導できるか否かを調べることは魅力的であり，それは2量体化が誘導可能な分子とAPP cDNAを融合した遺伝子を作成することで可能である．現在，私の研究室では，そのような検討が進行中である．

生理的関連性と同様にこの機能の病理的関連性，すなわち，アルツハイマー病との関連性もまた調べるに値する課題である．孤発性アルツハイマー病はAPPのいかなる突然変異とも関係していないため，APPの突然変異以外のしかるべき原因が大多数の孤発性アルツハイマー病の根底にはあるに違いない．Aβの産生がすべてのアルツハイマー病にみられることを考えると，APPをめぐる異常がすべてのアルツハイマー病に存在していることは確実である．したがって，野生型APPを持つ個体に起きる孤発性アルツハイマー病でのAPP異常は孤発性アルツハイマー病の中心的原因である可能性が高い．これまで，そのようなAPP異常は結果として認められるAβの産生でありAβの沈着と考えられて来た．その最大の理由は，Aβ産生がAPPの唯一の機能と考えられて来たからである．しかし，本研究により，APPはAβを産生する以外の機能を持つことが見い出された．孤発性アルツハイマー病の可能な原因の一つが，この機能におけるAPP刺激システムの異常である可能性は高い．野生型APPが抗体依存性に誘導する出力は，家族性アルツハイマー病の原因となるAPP変異体の出力と同じであるからである．しかし，*in vivo* においてこれを支持する証拠はまだない．今後，マウスやサルの脳室内に抗APP抗体を投与して，*in vivo* で神経脱落や大脳萎縮が起こるか否かを検討することが重要である．抗APP抗体による神経細胞死は同期して発生すると考えられるため，脳炎様異常が起こると予想される．

本研究は，APPの抗体依存性細胞死誘導機構を詳しく検討するものではないが，特異抗体の結合したAPPによる細胞死はPTXによって阻害され，不活化されたPTXでは阻害されず，Ac-DEVD-CHOで阻害されるが，細胞不透過性DEVDでは阻害されず，細胞透過性抗酸化剤GEEにより抑制されることを明らかにしている．これらのデータは，抗体によってひき起こされる野生型APPによる細胞死は，PTX感受性G蛋白質と活性酸素種が介在して，DEVD感受性カスパーゼ，すなわちアポトーシスを実行するシステインプロテアーゼが遂行する細胞死であることを示している．このことは，家族性アルツハイマー病変異体のAPPやPS2が誘導する細胞死がPTX感受性G蛋白質を介したアポトーシスであるという報告[5,6,30]によく一致している．したがって，APPの抗体依存性細胞死誘導機能を介在するPTX感受性G蛋白質は3種類のGiと1種類のGoの内のいずれであるか，PTX感受性G蛋白が如何にしてカスパーゼを調節するか，そして活性化されるカスパーゼのアイソフォームは何かなどを明らかにすることは重要である．その後の私の所属する研究室における研究により，APPの抗体依存性細胞死誘導機構として，まずGo蛋白質を介すること[52]，単量体型G蛋白質であるCdc42，Rac，MAPキナーゼキナーゼキナーゼの一つであるAsk-1，広義MAPキナーゼの一つc-Jun N端キナーゼ，NADPHオキシダーゼ，カスパーゼ9および3の活性化を介していること（投稿中）が明らかにされた．一方，Mbebi（2002）らによる研究[53]においては，APPの抗体依存性細胞死誘導機構はカルモジュリン，カルパインの活性化，カルモジュリン依存性キナーゼ-IVおよび転写因子であるCREBのダウンレギュレーションを介するとされている．

また野生型APPを発現すると神経生存に正あるいは負いずれに影響するかは論争されている段階であることは附記しておくべきであろう．Perez（1997）らは野生型の神経細胞はAPPを欠いた神経細胞よりも細胞死に抵抗性であることを観察した[20]．Xuら（1999）は，野生型APPの発現は神経細胞株B103のP53による細胞死に対して防御効果があること，家族性アルツハイマー病APP変異体にはこの作用がないことを報告した[54]．一方，本研究以外に，野生型APPの発現は，非刺激状態でアポトーシスを増加させることがいくつかのグループから報告されている．Nishimuraら（1998）[55]，および，Bursztajnら（1998）[56]はそれぞれ独自に野生型APPをウイルスによる過剰発現すると初代培養神経細胞に変性を生じることを報告した．またWolozinら（1996）[8]，および，Zhaoら（1997）[4]は，野生型APPの安定的過剰発現はPC12細胞の血清除去によるアポトーシスの促進を，程度は小さいものの，有意に増強することを観察した．したがってまた，本研究が明らかにした

抗体の結合した野生型APPによって誘導される細胞死を，抗体の結合していない野生型APPが恒常的に持っている機能と区別することは必要であろう．

抗APP抗体が，初代培養神経細胞において細胞死を起こすという研究は他にもある（Rohnら，2000；Mbebiら，2002）．Rohnらの研究[47]は，私の研究とは独立に行われ，Mbebiらの研究[53]は私の研究に基づいて行われている．Rohnらの研究と私の研究の比較では次のことが重要である．(i) Rohnらの研究では，APPにもAPLP2にも親和性のある抗APP抗体が使われたため，抗APP抗体はAPPを介して細胞死を誘導しているのかAPLP2を介しているのか不明である．私の研究では，APPを認識しAPLP2を認識しないことの確立した抗体が使われているので，抗APP抗体はAPPを介して細胞死を誘導していることが証明されている．後に，Mbebiらの研究で，ノックアウトマウス由来の神経細胞を使って，抗体は，APPを介してもAPLP2を介しても細胞死を誘導できることが明らかにされた．(ii) 私の研究では，抗体の作用は細胞表面のAPPによって伝達され，可溶性APPを介するものではないことが証明されているが，Rohnらの研究では，標的となるAPPについて不明のままとされている．(iii) Rohnらの研究では，APPのクロスリンキングが細胞死を引き起こす可能性に言及するのみで，細胞死誘導機能が抗体によるAPPのクロスリンキングに限定される可能性が高いか否かの検討はなされていない．既に議論したように，私の研究では，APPの2量体化が本質的であり，抗体によるクロスリンキングはAPPの2量体化以上の効果をもたらしてはいないと考えられる．(iv) Rohnらの研究は，しかしながら，本研究には欠けている価値ある情報を与えている．彼等は，22C11は，神経細胞死以外に，神経突起の特定の領域に限定して局在化した神経突起変性をもたらすことを見い出した．これはAPPの神経障害性シグナルの少なくとも一つは核を通過しないということを示唆している．彼等はまた，APPのシグナルに対してPTXが阻害効果を持つことを未発表データとして記載している．APPによる神経突起退縮にPTXが阻害効果を持つことは大変興味深い．成長円錐には特にGoが多く存在している．また，神経突起伸長時にグアニンヌクレオチドによってGoを活性化する，あるいはGoを過剰発現すると，突起伸長が促進されることが報告されている[57]．更に，軸索修復過程にはGAP-43が重要であり，これは成長円錐に局在し，Goを活性化する[58]．逆に，軸索ガイダンスにおいて，成長円錐が反発因子であるコラプシンIやNI35と出会うとコラプスする現象が知られているが，このようなコラプスする現象もPTXによって阻害されるとする報告[59,60]がある．つまり成長円錐，あるいは，その分化したプレシナプスには，神経突起の伸長と退縮，あるいは，軸索ガイダンス，シナプスの発芽と退縮を制御するGoの介在する機構が存在し，抗体の結合したAPPがその機構を制御しうる可能性が考えられる．ネトリン-DCC系の機能欠損マウスで脳梁欠損がみられたように，神経発生における成長円錐機能の重要性を考えれば，このことは，マウスstrainにもよるが，APPノックアウトマウスの形質の一つが脳梁の欠損であることに関係しているのはないかと考えられ，極めて興味深い．(v) 私の研究では，抗体の結合したAPPはAβの分泌を介して神経細胞死を誘導するのではないことを明らかにしたが，Rohnらや，Mbebiらの研究では検討されていない．抗APP抗体による処理にひき続き70%以上の神経細胞が死んだ時，分泌されていたAβ42はせいぜい100 nMであり，しかるに，Aβ1-40，Aβ1-42，Aβ1-43はいずれも3 μM未満の濃度では細胞死を誘導しない．事実，wtAPP/hAβを遺伝子導入したF11細胞の培地中のヒトAβ42は非刺激では4.7±1.5 pM（3回の独立した実験における平均値±標準偏差）であり，2 μg/mlの22C11刺激下では9.6±0.7 pMであった．加えて，細胞膜透過性抗酸化剤であるGEEは，抗APP抗体による神経細胞死を抑制するが，Aβ1-42による細胞死は抑制しないという結果は，APP誘導性細胞死をAβが介在しないことの証拠の一つであるが，GEEがAβの誘導する神経細胞死を抑制できないということはLockhartら[61]により報告されている．

本研究が，Rohnらの研究，あるいは，Mbebiらの研究に対して，優れているその他の点は，本研究では組み換えAPP導入を使った実験により，抗体依存性細胞死誘導機能の責任ドメインを同定している点である．すなわち，抗APP抗体の毒性をAPPが伝達するにはAβ領域の第41残基と第42残基は必要ではない．必要なのは細胞内のドメイン20と呼ばれるHis657-Lys676領域であり，更にC端のドメイン19（Met677-Asn695）も必要ではない．最近，野生型APPの最C端の31残基のドメイン，C31と呼ばれる部分が，神経毒性を持つということが報告[62]されているが，抗体が結合したAPPは神経毒性を生じるのにC31ドメインを使ってはいないようである．なぜならば，C31の約2/3が（19残基/31残基）がこの機能に関しては必要ではないからである．これらの結果は以下のことを示したこれまでの複数の研究室による研究に矛盾しない．(i) 野生型

APPはドメイン20を介してPTX感受性G蛋白質Goと相互作用する[31]．：(ii) 野生型APPがドメイン20を介してGoを活性化するには抗APP抗体処理が必要である[45]が，家族性アルツハイマー病原因遺伝子であるV642I/F/G-APPはドメイン20を介してGoを恒常的に活性化する能力がある[49]．(iii) APPのV642I変異体はドメイン20を介しPTX感受性の神経細胞死を起こす[30,63]．(iv) 最近，Passerらは，C31ではなくAβ領域以降のAPP細胞内ドメイン（AID）が細胞毒性を持つと報告した[64]．また，最近，細胞内に蓄積したAβ凝集体が神経細胞死を惹起しているのではないかという研究がいくつか報告された．LaFerlaら[24]は，細胞内にAβ1-42を過剰発現したトランスジェニックマウスにおいて顕著な神経細胞死を生じたと報告した．Chuiら[28]は家族性アルツハイマー病原因遺伝子であるPS1変異体を過剰に発現したトランスジェニックマウスにおいてAβの細胞外沈着ではなく，むしろ細胞内に蓄積したAβ42ペプチドに相関して細胞死が生じることを示した．細胞内Aβによる介在は魅力ある考えであるが，しかしながら，本研究にてwtAPPΔAβ41/42から得られたデータは，明らかにAβ1-42領域は，抗体依存性にAPPが誘導する細胞死には必要ではなく，したがって，更に細胞内Aβ42蓄積もまた介在していないであろうことも示唆している．

このように，本研究が，野生型APPはAβに起因しない神経細胞毒性機能を持つことを示したことは極めて重要である．Aβペプチド，その中でも特により長いAβ42がアルツハイマー病の病因に関係していることは以前から示唆されてきた．実際，Aβ42の沈着はアルツハイマー病で最も早期から観察される異常である[21]．したがって，Aβ1-42を含むAβペプチドが*in vitro*で神経細胞を殺すこと[22,23]や，細胞のAβ42分泌が家族性アルツハイマー病の原因遺伝子であるAPP，PS1，PS2の変異体を細胞に発現すると細胞のAβ分泌が増加するということが確立されてきた[55]．それにもかかわらず，Aβ沈着がアルツハイマー病大脳でおきている神経細胞死の真の原因であるかどうかはいまだに決定されていない．細胞外のAβ沈着を過剰に産生するトランスジェニックマウスの研究は，Aβ沈着は神経シナプス数を減少させるが，神経細胞脱落を誘導しないことを示した[26,27]．本研究の提示する知見においては，抗APP抗体による神経細胞死の機序に関し，抗APP抗体が作用した神経細胞から分泌されたAβの神経細胞死活性については完全には否定できないが，本研究において観察された細胞死においては限られた役割しか持っていない．

また，抗APP抗体による細胞死が神経細胞に特異的に惹起されるのか，あるいはグリア細胞にも惹起されるかという命題は極めて重要である．初代培養アストロサイトについてはtotalのAPP発現量がF11細胞と同程度（未発表データ）なので，細胞表面のAPPも極めて少ないのではないかと考えられるが，厳密には初代培養神経細胞，初代培養アストロサイトに対して（および後述のBu695細胞に対しても）細胞表面APPをビオチン標識抗APP抗体によって染色し，cell sorterによって細胞表面APPを発現する細胞の割合を決定するflow cytometric assayが必要である．しかしながら，totalの免疫ブロットによるAPP発現量はF11細胞と同程度なので，おそらく初代培養アストロサイトにおいて細胞死が起こらなかったことの主因は，細胞表面APPの発現量が，F11/APP細胞や初代培養神経細胞に比較して極めて少なかったためであると考えられる．次はBu695細胞の所見である．Bu695細胞は既に記述したがGFAP陽性anaplastic astrocytoma由来細胞株にAPPを安定発現した細胞である．[Bu695細胞そのもののグリア細胞マーカーについてはわかっていない．またBu695細胞におけるGo蛋白質の発現量はF11細胞と同程度である．(未発表データ)] F11/APP細胞や初代培養神経細胞と総APP量，細胞表面APP量が同じグリア系細胞であるBu695細胞において，抗APP抗体が細胞死を誘導しなかったという結果に基づけば，グリア系細胞にはAPPが引き金となるアポトーシスを伝達する細胞内プログラムが働いていないか，あるいは，そのような細胞内プログラムは存在するが，さらにこの細胞内プログラムを抑制するグリア系細胞特有の分子機構が存在している，などの可能性が考えられる．またBu695細胞でのみ細胞死が起きない現象は，Bu695細胞特異的な現象であることは厳密には否定できない．神経細胞の特異性についてはさらに今後の詳細な検討が必要であろう．

抗APP抗体による細胞死の機序において，エンドサイトーシスとラフトの関与について検討することは重要な課題である．抗体が細胞膜表面に存在する蛋白質に細胞外から結合するとラフトへ移行しやすいことが報告されている[66]．本研究において，抗体の標的となっているAPPがラフト内に存在するのか，あるいはラフト外に存在するのか，あるいはラフト外に存在するAPPが抗体結合後ラフト内に移行するのかは不明である．また膜表面抗原は抗体結合後，急速にエンドサイトーシスされることも知られている[66]．したがって，抗体を結合したAPPが細胞死シグナルを出力する部位は細胞内かもし

れない．

神経細胞のどのような機能的分画が抗APP抗体による細胞死に関して感受性を持っているかという検討もまた重要である．本研究ではこれを直接検討してはいない．しかし，私の使用した初代培養神経細胞は各種の機能を持つ神経細胞を含むので，おそらくはほぼ全ての細胞が死滅する結果とあわせて考えると，機能の差は，抗体に対する感受性に関与しないのではないかと考えられる．

総　括

以上，本研究により以下のことが結論される．(1) 抗APP抗体は，神経細胞，およびAPPを発現した神経細胞株に細胞死を誘導する，(2) 抗APP抗体はAPPの細胞外ドメインに結合することにより細胞死を誘導する，(3) 標的となるAPPは，培養液中の可溶性APPではなく細胞表面のAPPである，(4) 抗APP抗体が誘導する細胞死は，神経細胞特異的である可能性が考えられ，たとえ同程度のAPPが発現していてもグリア系細胞では誘導されない可能性が高い．(5) 抗APP抗体が誘導する細胞死は，典型的なアポトーシスである，(6) 抗APP抗体が誘導する細胞死は，APPの二量体化，あるいは，多量体化によると考えられ，抗体特有のクロスリンクに限定されるものではない，(7) Aβは，APPが抗体依存性に誘導する細胞死を介在しない，(8) 前項に一致して，APPが抗体依存性に誘導する細胞死の責任を担うAPPのドメインはAβ1-42領域ではなく細胞内のHis657-Lys676領域である，(9) 細胞死誘導責任領域として同定されたHis657-Lys676領域を介してAPPはGoと相互作用するというこれまでの複数の報告に一致して，抗APP抗体が誘導する細胞死は百日咳毒素で抑制される．

APPが抗体依存性に細胞死を誘導する分子機構が，神経細胞特異的な可能性が大きい点，抗体特有のクロスリンクに限定されるものではないと考えられる点，Aβが介在しない点，その代わり，細胞内の生理的シグナル伝達機構を使っている点などは，すべて，生理的な天然のAPPリガンドが存在し，このリガンドの受容体としてAPPが生理的な機能を発揮している可能性が高いことを示している．更に，APPの家族性アルツハイマー病変異体と同じ出力を，APPが抗体依存性に惹起できることは，ここに見い出されたAPP機能の異常としてアルツハイマー病の病態が発生しうることを示唆するものである．本研究で見い出されたAPPの機能がアルツハイマー病と関係している直接の証拠はまだ見つかっていない．しかし，これまで，Aβ以外には，変異のないAPPとアルツハイマー病の病態とを直結する分子機構は知られていなかった．変異のないAPPの機能を初めて明らかにした本研究の持つ意義は極めて大きいと考えられる．本研究で見い出されたAPPの新規機能の生理的関連性及び病理的関連性を明らかにすることは，正常，あるいは，アルツハイマー病という病理的状態における神経細胞の機能を理解するのに新しい道を開くと期待される．

本稿を終えるにあたり，本研究の機会を与えて頂き，御指導御校閲を賜りました慶應義塾大学医学部薬理学教室西本征央教授，松岡正明助教授に，深甚なる謝意を表します．また御尽力頂きました薬理学教室員の方々に深謝致します．

文　献

1) Kang J, Lemaire HG, Unterback A, Salbaum JM, Masters CL, Grezeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Muller-Hill B：The precursor of Alzheimer disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. Nature 325：733-736, 1987
2) SandBrink R, Masters CL, Beyreuther K：βA4-amyloid protein precursor mRNA isoforms without exon 15 are ubiquitously expressd in rat tissues including brain, but not in neurons. J Biol Chem 269：1510-1517, 1994
3) Hardy J：Framining β-amyloid. Nat Genet 1：233-234, 1992
4) Karlinsky H, Vaula G, Haines JL, Ridgley J, Bergeron C, Mortilla M, Tupler RG, Percy ME, Robitaille Y, Noldy NE, et al：Familial Alzheimer's disease and a missense mutation in codon 717 of the β-amyloid precursor protein gene. Neurology 42：1445-1453, 1992
5) Yamatsuji T, Okamoto T, Takeda S, Fukumoto H, Iwatsubo T, Suzuki N, Odaka A, Ireland S, Kinane TB, Nishimoto I：G-protein-mediated neuronal DNA fragmentation by familial Alzheimer's disease-associated V642 mutants of APP. Science 272：1349-1352, 1996
6) Wolozin B, Iwasaki K, Vito P, Ganjei JK, Lacana E, Sunderland T, Zhao B, Kusiak J W, Wasco W, D'Adamio L：Participation of presenilin2 in apoptosis：Enhanced basal activity conferred by an Alzheimer mutation. Science 274：1710-1713, 1996
7) Zhao B, Chrest FJ, Horton,Jr WE, Sisodia SS, Kusiak JW：Expression of mutant amyloid precursor proteins induces apoptosis in PC12 cells. J Neurosci Res 47：253-263, 1997
8) Luo JJ, Wallace W, Riccioni T, Ingram DK, Roth GS, Kusiak JW：Death of PC12 cells and hippocampal

neurons induced by adenoviral-mediated FAD human amyloid precursor protein gene expression. J Neurosci Res 55 : 629-642, 1999

9) Giambarella U, Yamatshuji T, Matsui T, Ikezu T, Murayama Y, Levine MA, Katz A, Gautam N, Nishimoto I : G protein βγ complex-mediated apoptosis by familial Alzheimer's disease mutant of APP. EMBO J 16 : 4897-4907, 1997

10) Schubert W, Prior R, Weidemann A, Dirckesen H, Multhaup G, Masters CL, Beyreuthr K : Localization of Alzheimer βA4 amyloid precursor protein at central and peripheral synaptic sites. Brain Res 563 : 184-194, 1991

11) Milward EA, Papadopoulos R, Fuller SJ, Moir RD, Small D, Beyreuther K, Masters CL : The amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is a mediator of the effects of nerve growth factor on neurite outgrowth. Neuron 9 : 129-137, 1992

12) Mattson MP, Cheng B, Culwall AR, Esch FS, Liebergurg I, Rydel RE : β-Amyloid precursor protein metabolites and loss of neuronal Ca2+ homeostasis in Alzheimer's disease. Trends Neurosci 16 : 409-414, 1993

13) Small DH, Nurcombe V, Reed G, Clarris H, Moir R, Beyreuther K, Masters CL : A heparin-binding domain in the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is involved in the regulation of neurite outgrowth. J Neurosci 14 : 2117-2127, 1994

14) Muller U, Cristina N, Li Z-W, Wolfer DP, Lipp H-P, Rulicke T, Brandner S, Aguzzi A, Weissmann C : Behavioral and anatomical deficits in mice homozygous for a modified β-amy loid precursor protein gene. Cell 79 : 755-765, 1994

15) Zheng H, Jiang M, Trumbauer ME, Sirinathsinghji DJS, Hopkins R, Smith DW, Heavens RP, Dawson GR, Boyce SHY, Van Der Ploeg LHT : β-Amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity. Cell 81 : 525-531, 1995

16) Von Koch CS, Zheng H, Chen H, Trumbauer M, Thinakaren G, Van Der Ploeg LH, Price LH, Price DL, Sisodia SS : Generation of APLP2 KO mice and early postnatal lethality in APLP2/APP double KO mice. Neurobiol Aging 18 : 661-669, 1997

17) Qiu WQ, Ferreira A, Miller C, Koo EH, Selkoe DJ : Cell-surface beta-amyloid precursor protein stimulates neurite outgrouwth of hippocampal neurons in an isoform-dependent manner. J Neurosci 15 : 2157-2167, 1995

18) Coulson EJ, Barrett GL, Storey E, Bartlett PF, Beyreuther K, Masters CL : Down-regulation of the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease by antisense oligonucleotides reduces neuronal adhesion to specific substrata. Brain Res 770 : 72-80, 1997

19) Gillian AM, Mcfarlane I, Lucy FM, Overly C, McConlogue L, Breen KC : Individual isoforms of the amyloid beta precursor protein demonstrate differential adhesive potentials to constituents of the extracellular matrix. J Neurosci Res 49 : 154-160, 1997

20) Perez RG, Zheng H, Van Der Ploeg LH, Koo EH : The β-amyloid precursor protein of Alzheimer's disease enhances neuron viability and modulates neuronal polarity. J Neurosci 17 : 9407-9414, 1997

21) Iwatsubo T, Okada A, Suzuki N, Mizusawa H, Nukina N, Ihara Y : Visualization of Aβ42(43) and Aβ40 in senile plaques with end-specific Aβ monoclonals : Evidence that an initially deposited species is Aβ 42(43). Neuron 13 : 45-53, 1994

22) Loo DT, Copani A, Pike CJ, Whittemore ER, Walencewicz AJ, Cotman CW : Apoptosis is induced by β-amyloid in cultured central nervous system neurons. Proc Natl Acad Sci USA 90 : 7951-7955, 1993

23) Gschwind M, Huber G : Apoptotic cell death induced by β-amyloid 1-42 peptide is cell type dependent. J Neurochem 65 : 292-300, 1995

24) LaFerla FM, Tinkle BT, Bieberich CJ, Haudenschild CC, Jay G : The Alzheimer's Aβpeptide induces neurodegeneration and apoptotic cell death in transgenic mice. Nat Genet 9 : 21-29, 1995

25) Moechars D, Lorent K, De Strooper B, Dewachter I, Van Leuven F : Expression in brain of amyloid precursor protein mutated in the α-secretase site causes disturbed behavior, neuronal degeneration and premature death in transgenic mice. EMBO J 15 : 1265-1274, 1996

26) Irizarry MC, Soriano F, McNamara M, Page KJ, Shenk D, Games D, Hyma BT : Aβdeposition is associated with neuropil changes, but not with overt neuronal loss in the human amyloid precursor protein V717F (PDAPP) transgenic mouse. J Neurosci 17 : 7053-7059, 1997

27) Irizarry MC, McNamara M, Fedorchak K, Hsiao K, Hyaman BT : APPsw transgenic mice develop age-related Aβdeposits and neuropil abnormalities, but no neuronal loss in CA1. J Neuropathol Exp Neurol 56 : 965-973, 1997

28) Chui DH, Tanahashi H, Ozawa K, Ikeda S, Checler F, Ueda O, Suzuki H, Araki W, Inoue H, Shirotani K, et al : Transgenic mice with Alzheimer pressenilin 1 mutations show accelerated neurodegeneration without amyloid plaque formation. Nat Med 5 : 560-564, 1999

29) Sudo H, Hashimoto Y, Niikura T, Zongjun shao, Yasukawa T, Ito Y, Yamada M, Hata M, Hiraki T, Kawasumi M, et al : Secreted Aβ does not mediate neurotoxicity by antibody-stimulated amyloid precursor protein. Biochem Biophys Res Commun 282 : 548-556, 2001

30) Hashimoto Y, Niikura T, Ito Y, Nishimoto I : Multi-

ple mechanisms underlie neurotoxicity by different types of Alzheimer's disease mutations of amyloid precursor protein. J BiolChem 275 : 34541-34551, 2000

31) Nishimoto I, Okamoto T, Matsuura Y, Okamoto T, Murayama Y, Ogata E : Alzheimer amyloid protein precursor forms a complex with brain GTP binding protein. Nature 362 : 75-79, 1993

32) Hashimoto Y, Jiang H, Niikura T, Ito Y, Hagiwara A, Umezawa K, Abe Y, Murayama Y, Nishimoto I : Neuronal apoptosis by apolipoprotein E4 through low-density lipoprotein receptor-related protein and heterotrimeric GTPases. J Neurosci 20 : 8401-8409, 2000

33) Sudo H, Jiang H, Yasukawa T, Hashimoto Y, Niikura T, Kawasumi M, Matsuda S, Takeuchi Y, Aiso S, Matsuoka M, et al : Antibody-regulated neurotoxic function of cell-surface β-amyloid precursor protein. Mol Cell Neurosci 16 : 708-723, 2000

34) Platika D, Boulos MH, Baizer L, Fishman MC : Neuronal traits of clonal cell lines derived by fusion of dorsal root ganglia neurons with neuroblastoma cells. Proc Natl Acad Sci USA 82 : 3499-3503, 1985

35) Clarris HJ, Key B, Beyreuther K, Masters CL, Small DH : Expression of the amyloid protein precursor Alzheimer's disease in the developing rat olfactory system. Brain Res Dev Brain Res 88 : 87-95, 1995

36) Roch JM, Masliah E, Roch-Levecq AC, Sundsmo MP, Otero DA, Veinbergs I, Saitoh T : Increase of synaptic density and memory retention by a peptide representing the trophic domain of the amyloid β/A4 protein precursor. Proc Natl Acad Sci USA 91 : 7450-7454, 1994

37) Jin LW, Ninomiya H, Roch JM, Schubert D, Masliah E, Otero DA, Saitoh T : Peptides containing the RERMS sequence of amyloid β/A4 protein precursor bind cell surface and promote neurite extension. J Neurosci 14 : 5461-5470, 1994

38) Hayashi Y, Kashiwagi K, Yoshikawa K : Protease inhibitors generate cytotoxic fragments from Alzheimer amyloid protein precursor in cDNA transfected glioma cells. Biochem Biophys Res Commun 187 : 1249-1255, 1992

39) Wyllie AH : Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. Nature 284 : 555-556, 1980

40) Jung SS, Nalbantoglu J, Cashman NR : Alzheimer's β-amyloid precursor protein is expressed on the surface of immediately ex-vivo brain cells : A flow cytometric study. J Neurosci Res 46 : 336-348,1996

41) Storey E, Spurck T, Pickett-Heaps J, Beyreuther K, Masters CL : The amyloid precursor protein of Alzh eimer's disease is found on the surface of static but not activity motile portions of neurites. Brain Res 735 : 59-66, 1996

42) Brouillet E, Trembleau A, Galanaud D, Volovitch M, Bouillot C, Valenza C, Prochiantz A, Allinquant B : The amyloid precursor protein interacts with Go heterotrimeric protein within a cell compartment specialized in signal transduction. J Neurosci 19 : 1717-1727, 1999

43) Teti G, Misefari A, Venza-Teti D, La Via M F : Reditribution of mouse spleen cell Fc receptors follwing treatment with mouse or human aggregated immunoglobulin G. J Reticuloendothel Soc 33 : 287-292, 1983

44) Aida Y, Onoue K : Triggering of the superoxide generation of macrophages by crosslinking of Fc gamma receptor. J Biochem 95 : 1067-1072, 1984

45) Okamoto T, Takeda S, Murayama Y, Ogata E, Nishimoto I : Ligand-dependent G protein coupling function of amyloid transmembrane precursor. J Biol Chem 270 : 4205-4208, 1995

46) Torroja L, Packard M, Gorczyca M, White K, Budnik V : The drosophila beta-amyloid precursor protein homolog promotes synapse differentiation at the neuromuscular junction. J Neurosci 19 : 7793-7803, 1999

47) Rohn TT, Ivins KJ, Bhar BA, Cotman CW, Cribbs DH : A monoclonal antibody to amyloid precursor protein induces neuronal apoptosis. J Neurochem 74 : 2331-2342, 2000

48) Giovanni A, Wirtz-Brugger F, Keramaris E, Slack R, Park DS : Involvement of cell cycle elements,cyclin-dependent kinases, pRb, and E2F×DP, in β-amyloid-induced neuronal death. J Biol Chem 274 : 19011-19016, 1999

49) Okamoto T, Takeda S, Giambarella U, Matsuura Y, Katada T, Nishimoto I : Intrinsic G-coupling fuction of amyloid orecursor protein as a novel target of V642 mutations linked to familial Alzheimer disease. EMBO J 15 : 3769-3777, 1996

50) Russo T, Faraonio R, Minopoli G, De Candia P, Derenzis S, Zambrano N : Fe65 and the protein network centered around the cytosolic domain of the Alzheimer's β-amyloid precursor protein. FEBS Lett 434 : 1-7, 1998

51) Lemmon MA, Schlessinger J : Regulation of signal transduction and signal diversity by receptor oligomerization. Trends Biochem Sci 19 : 459-463, 1994

52) Hashimoto Y, Tsuji O, Niikura T, Yamagishi Y, Ishizaka M, Kawasumi M, Chiba T, Kanekura K, Yamada M, Tsukamoto E, et al : Involvement of c-Jun N-terminal kinase in amyloid precursor protein-mediated neuronal cell death. J Neurochem 84 : 1-14, 2003

53) Mbebi C, See V, Mercken L, Pradier L, Muller U, Loeffler JP : Amyloid precursor protein family-induced neuronal death is mediated by impairment of the neuroprotective calcium/calmodulin protein kinase IVdependent signaling pathway. J Biol Chem

277 : 20979-20990, 2002

54) Xu X, Yang D, Wyss-Coray T, Yan J, Gan L, Sun Y, Mucke L : Wild-type but not Alzheimer-mutant amyloid precursor protein confers resistance against p53-mediated apoptosis. Proc Natl Acad Sci USA 96 : 7547-7552, 1999

55) Nishimura I, Uetsuki T, Dani SU, Ohsawa Y, Saito I, Okamura H, Uchiyama Y, Yoshikawa K : Degeneration *in vivo* of rat hippocampal neurons by wild-type Alzheimer amyloid precursor protein overexpressd by adenovirus-mediated gene transfer. J Neurosci 18 : 2387-2398, 1998

56) Bursztajn S, Desouza R, Mcphei D, L Berman SA, Shioi J, Robakis NK, Neve RL : Overexpression in neurons of human presseilin-1 or a presenilin-1 familial Alzheimer disease mutant does not enhance apoptosis. J Neurosci 18 : 9790-9799, 1998

57) Xie R, Li L, Goshima Y, Strittmatter SM : An activated mutant of α subunit of Go increases neurite outgrowth via protein kinaseC. Dev Brain Res 87 : 77-86, 1995

58) Strittmatter SM, Igarashi M, Fishman MC : GAP-43 amino terminal peptides modulate growth cone morphology and neurite outgrowth. J Neurosci 14 : 5503-5513, 1994

59) Goshima Y, Nakamura F, Strittmatter P, Strittmatter SM : Collapsin induced growth cone collapse mediated by an intracellular protein related to UNC-33. Nature 376 : 509-514,1995

60) Igarashi M, Strittmatter SM, Vartanian T, Fishman MC : Mediation by G proteins of signals that cause collapse of growth cones. Science 259 : 77-79, 1993

61) Lockhart BP, Benicourt C, Junien JL, Privat AJ : Inhibitors of free radical formation fail to attenuate direct-amyloid25-35 peptide-medeiated neurotoxicity in rat hippocampal cultures. J Neurosci Res 39 : 494-505, 1994

62) Lu DC, Rabizadeh S, Chandra S, Shayya RF, Ellerby LM, Ye X, Salvesen GS, Koo EH, Bredesen DE : A second cytotoxic proteolytic peptide derived from amyloid β-protein precursor. Nat Med 6 : 397-404, 2000

63) 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 15 : 498-509, 1996

64) Passer B, Pellegrini L, Russo C, Siegel RM, Lenardo MJ, Schettini G, Bachmann M, Tabaton M, D'Adamio L : Generation of an apoptotic intracellular peptide by γ-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid β precursor protein. J Alzheimer's Dis 2 : 289-301, 2000

65) St.George-Hyslop PH : Molecular genetics of Alzheimer disease. Semin Neurol 19 : 371-383, 1999

66) Verkade P, Harder T, Lafont F, Simons K : Induction of caveolae in the apical plasma membrane of Madin-Darby Canine Kidney cells. J Cell Biol 148 : 727-739, 1999