

厚生科学研究費

長寿科学総合研究事業

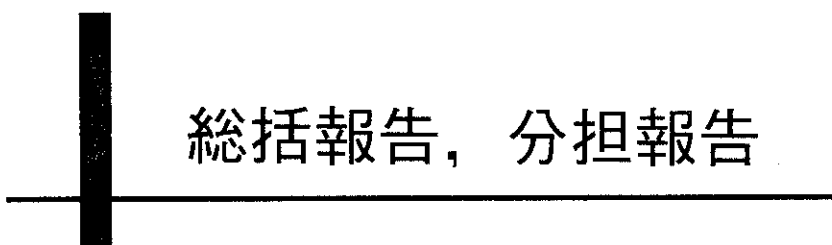
霊長類を用いた老人病モデルの開発と長寿科学
研究基盤高度化に関する研究

平成 11 年度 研究成果報告書

平成 12 年 3 月

班 長 吉 川 泰 弘

東京大学大学院 農学生命科学研究科



総括報告，分担報告

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

総括報告書

霊長類を用いた老人病モデルの開発と長寿研究基盤高度化に関する研究

吉川泰弘（東京大学大学院 農学生命科学研究科 教授）

研究要旨

サル類を用いた自然発症老人病モデル及び実験モデルの開発に関しては、ほぼ初期の予定にそって進行した。老人斑形成に関しては類人猿、新世界ザルを含めた比較動物学的解析が始められた、また認知機能評価システムも実際に若齢群、老齢群での比較が可能になり、また問題点も明らかになった。神経レセプター遺伝子の多様性、サル類とヒトの染色体シテニーに関する著しいデータの蓄積が進んだ。動脈硬化症モデル、緑内障モデルについては治療法の作用機序に踏み込んだ解析が始められつつある。生殖系、免疫系の正常加齢変化の解析は一部T細胞クローンの消長や遺伝子解析まで進展し、霊長類の特性が明らかにされつつある。またエイジングファームの個体群のデータ蓄積と糖尿病治療薬の評価に有効利用出来たことは、ファームの維持側にとっても利用側にとっても最初の試みであり、非常に生産的な結果となった。

○吉川泰弘（東大院農学生命、教授）

鳥居隆三（滋賀医科大、助教授）

中村紳一郎（日獣大、助手）

小山高正（日本女子大心理、助教授）

鈴木通弘（予防衛生協会、科長）

寺尾恵治（霊長類センター、室長）

吉田高志（同上、主任研究官）

国枝哲夫（岡山大農、助教授）

村山美穂（岐阜大農、助手）

A. 研究目的

21世紀の超高齢化社会をひかえ、痴呆症、骨粗鬆症、動脈硬化症、糖尿病など高齢者の健康維持に関する研究が喫緊に解決すべき厚生科学の主要課題となっている。しかし、これらの老年性疾患はその原因が複雑であり、加齢に伴う多臓器の機能減退、晩発性遺伝子の発現、ホメオスターシス機構の破綻、内分泌器官の萎縮、環境因子などが複合して発症

する複合性疾患と考えられる。従って、こうした疾患の発症機序を解析したり、早期診断、有効治療法を開発するにはヒトに類似した高等動物の病態モデルが必要である。また自然発症モデルとともに実験的に誘発するモデルの開発も必要である。

このような疾患モデル動物としては、長寿であり、生理・代謝機能、脳・神経系の構造と機能がヒトに極めて類縁する実験用霊長類が適している。霊長類センターの飼育ザルは各個体の生年月日、家系、個体の病歴、ドックの生化学データなどが全て揃っており、情報が蓄積されているので複合因子の解析には最適である。ヒトへの外挿が容易であるため、治療薬や治療法の評価を含めて、サル類のモデルで得られた研究成果は、社会への還元が期待される。

本研究班では、実験用霊長類を用いて主要な老人病モデルの開発、モデルを用いた病態の解析、薬効評価系の開発と進めて行くことが目的である。また長寿科学研究の研究資源開発としてエイジングファームの確立とその有効利用の拡大、cDNAライブラリー作成、遺伝子解析及び遺伝連鎖解析を行い研究基盤を高度化することも目指している。

B. C, 研究方法と結果

1) 老人斑形成機序に関する研究：老人斑の形成機序を新世界ザルであるリスザル、旧世界ザルに属するカニクイザル及び類人猿のゴリラの脳を用いてヒトと比較しながら研究を進めた。カニクイザルで老人斑の危険因子であるプレセニリン (P S—1) の発現と老人斑との関連を解析し、C末端が老人斑の形成と強く関連する事を明らかにした。また加齢に伴うP S—1のN末端、C末端の発現を生化学的に神経細胞の分画について検索した。その結果P S—1は胎生期から既に発現していること、加齢に伴い発現が増加し、C末端はミクロゾーム分画に強く発現する事、加齢個体では核分画にもC末端の強い発現がみられた。高齢のリスザルでは小型の老人斑が多く、成熟型老人斑に相当するものが多く見られ、少数ではあるが瀰漫型老人斑もみられた。しかしアミロイドへの成熟過程は他の動物種に比べて遅い可能性が示唆された(中村、吉川)。

2) 高次記憶学習機能評価に関する研究：カニクイザルを用いて、加齢に伴う高次認知機能の低下を評価する系を確立するため、WGTA法と指迷路法を用いて検討した。WGTA法では高齢群は初期段階から実験に集中し、一貫して課題解決のため

の正しいアプローチをとることができた。一方、若齢群は初期段階で実験への集中力を欠き、課題に取り組むスタートが老齢個体よりも遅れた。課題を習得できた個体では、習得過程にプリファレンス行動が効果的戦略として働いていた。3段式指迷路では、格段をクリアーするための試行数、エラー数ともに、老若の差はなかった。エラーボックス付きの4段迷路では、比較的容易に1段目をクリアーするが、2段目のクリアーは困難であり、1段目と反対方向へ移動するという課題の難しさのため、あるいは1段目に落としてももう1段落とさなければ報酬がもらえないという、強化の遅延のための可能性が考えられた。(小山ら)。

3) 行動性格に関連する遺伝子の系統進化に関する研究：老齢化による痴呆症などの中枢神経系の機能障害には非常に個体差が大きいことが知られている。本研究では、ヒトの性格や脳機能障害に関連すると報告されている脳内神経伝達物質関連遺伝子について非ヒト霊長類を用いて解析し、これらの遺伝子型とサルの性格や高齢化に伴う行動の変化との関連を明らかにすることを目的としている。サル類におけるこれら遺伝子型と行動特性の関係が明らかになれば、痴呆症などの発症機序の解明や、

予防・治療法の開発において、モデル動物としてのサル類の有用性がより一層高まると考えられる。本年度は、18種の非ヒト霊長類においてドーパミントランスポーター(DAT1)、セロトニンレセプター(5-HT_{2A})、コレシストキニン(CCK)遺伝子の多型領域をPCR増幅し、塩基配列を決定した。その結果、パーキンソン病の発症に関わると推察されているDAT1遺伝子は、チンパンジーなどの大型類人猿よりもむしろカニクイザルの方がヒトに近似していることが明らかになった(村山ら)。

4) 雄性生殖機能の加齢性変化：カニクイザルの雄性生殖機能の加齢変化について検討を加えた。精巣機能を、細胞分裂の指標となる核内増殖抗原(PCNA)の発現状況、組織中のテストステロンの存在状況、およびステロイドホルモンの合成酵素として代表的な3 β -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼの検出状況から調べた。その結果、新生仔期(出生後数日以内)の精巣ではヒトと同じように活発な機能発現が見られるものの、その後休眠状態になり、4歳齢頃に再度活発化し春機発動期到来となる。その反映として血中テストステロン濃度も増加し始める。10歳齢頃には体重もプラトーに達し、成長も完了し、その後、加齢と

ともに生殖機能も低下に転じると考えられるが17歳齢の個体であっても明確な機能低下を検出する事は出来なかった(吉田ら)。

5) 実験的粥状動脈硬化症モデルの開発: 高コレステロール食を投与したニホンザルモデルを用いて実験的粥状動脈硬化症の発生と経過を独自開発した血管内視鏡により解析した。今年度はメスの個体に2%コレステロール食を摂取させることにより、オスと同様動脈硬化症モデルが作成されることを明らかにした。ついて動脈硬化症の進展にエストロジェンが影響するか否かを調べるため、卵巣摘出メス及び卵巣摘出メスにエストロジェンを投与した個体を用いて検索した、その結果エストロジェンが抗動脈作用効果を持つことが示唆された(鳥居ら)。

6) 老年性眼疾患モデルの開発: これまでカニクイザルの加齢性黄斑変性症及び若年性の遺伝性黄斑変性症モデルに着いて解析してきた。本年度は自然発症性及び実験的眼疾患モデルについて研究を進めた。その結果筑波医学実験用霊長類センターにおいて飼育されているカニクイザルに観察された白内障は6,199頭中53頭、先天性白内障は4,773頭中4頭であり、その発生率は極めて低率であることを明らかにした。また実験

的緑内障モデルについてはカニクイザル眼を用いた緑内障治療薬の作用機序解明に関する研究を進めた。緑内障治療薬のプロスタグランدينF2アルファ関連製剤であるイソプロピルウノプロストンとラタノプロストンの眼内薬物動態の一部が今回の研究により明らかになった。また、イソプロピルウノプロストンの眼圧下降機序が、毛様体筋の細胞外基質の変化による可能性が示唆された(鈴木ら)。

7) マカカ属サル類の加齢性免疫特性に関する研究: T細胞レセプター(TCR)の多様性に関して加齢性変化を検索した。その結果胎児、新生児ではT細胞クローンはほとんど存在しないが、生後4~5日齢、5歳、9~11歳、15~16歳では増殖T細胞クローンは加齢に伴い増加すること、一度出現したクローンは6カ月は安定して出現すること、脾臓では増殖T細胞クローンが存在するのに、リンパ節ではT細胞クローンは検出されにくいことが明らかになった。今回の研究によりVβ遺伝子のSSCP法での解析、塩基配列解析が可能になり、これまでの研究で得られたCD4CD8両陽性(DP)細胞の由来について検索出来る。DP細胞は非胸腺由来の休止期メモリーT細胞に属し、かつヘルパー活

性もキラー活性も有していることから、チンパンジーを含めた系統解析も必要である（寺尾、吉川ら）。

8) カニクイザルの遺伝子連鎖解析：老人病及び加齢性疾患と類似する遺伝病に関連する遺伝子を明らかにする目的で、カニクイザルの染色体連鎖地図の作成を進めた。その結果、カニクイザルにおいてはヒトの第7の染色体の約 117cM、および第21染色体の約 22cM に対応する領域が同一の染色体上に存在していることが確認された。したがって、ヒト7染色体と第21染色体のかなりの部分に対応する領域がカニクイザルの第2染色体に含まれていること、さらにその境界はカニクイザル染色体上約 16cM の領域に存在することが明らかとなった。また、APP 遺伝子等、ヒトの疾患に関与する第21染色体上の遺伝子はいずれもカニクイザルにおいては第2染色体に存在することが示唆された。（国枝ら）。

D. E. 考察と結論

1) 老人斑形成と認知機能評価：老人斑の形成機序をリスザル、カニクイザル及びゴリラという霊長類進化にそって、加齢個体の脳をヒトと比較しながら研究を進められた点は非常に良かった。またカニクイザルについて加齢に伴う P S - 1 の N 末端、

C 末端の発現を生化学的に神経細胞分画について検索し、胎生期から既に発現していること、加齢に伴い発現が増加し、加齢個体では核分画にも強い発現がみられたことは非常に興味深い。今後はより定量的な比較が可能になる方法の開発が必要である。高次認知機能を評価するシステムの開発研究では WGTA あるいは指迷路テストの結果、老齢ザルの学習能力の低下はみられず、老齢ザルの学習過程の行動には若齢群と異なるパターンがあり、効果的な方略として働いていたことが明らかになった。今後はエイジングファーム個体を対象とした長期縦断的解析を通じて痴呆症モデルの個体が検出される可能性がある。

2) 性格行動と老人病関連遺伝子の検索：加齢性に起こる中枢神経系の機能障害の個体差が大きい原因の1つとして考えられる、脳内神経伝達物質関連遺伝子についてサル類でデータを蓄積することは重要である。また高齢化に伴う行動の変化との関連を明らかにすることが出来れば、ヒトへの外挿として興味深い。本研究では18種の非ヒト霊長類においてドーパミントランスポーター (DAT1)、セロトニンレセプター (5-HTR2A)、コレシストキニン (CCK) 遺伝子の多型領域を PCR 増

幅し、塩基配列を決定し比較をおこない、DAT1 遺伝子は、チンパンジーなどの大型類人猿よりもむしろカニクイザルの方がヒトに近似していることを明らかにしている。霊長類の進化過程でどのように分化したのか、またヒトを含めたこれらの動物種の社会性の類似、相違点との関連が明らかになれば非常に面白い。カニクイザルの染色体連鎖地図の作成では、ヒトとの染色体シンテニーの解析からカニクイザルではヒトの第7の染色体、および第21染色体に対応する領域が同一の染色体上に存在していることが確認され、カニクイザルの第2染色体に含まれていることが明らかとなった。また、APP 遺伝子等、ヒトの疾患に関与する第21染色体上の遺伝子はいずれもカニクイザルにおいては第2染色体に存在することが示唆された。

3) 実験モデルの開発研究：高コレステロール食を投与したニホンザルモデルを用いて実験的粥状動脈硬化症の発生と経過を解析している。今年度はメスの個体について動脈硬化症の進展にエストロジェンが影響するか否かを調べるため卵巣摘出雌群を用いて検索した。その結果エストロジェンが抗動脈作用効果を持つことが示唆された。ヒトでも閉経後の糖尿病、動脈硬化症の発生は重要な

問題であり今後、このモデル系を用いて内分泌系の作用機序を明らかにする必要がある。加齢性眼疾患モデル開発では自然発症性及び実験的眼疾患モデルについて研究を進めた。その結果筑波医学実験用霊長類センターにおいて飼育されているカニクイザルに観察された白内障は約53/6,200頭、先天性白内障は4/4,800頭で、発生率は極めて低率であることを明らかにした。また実験的緑内障モデルを用いて緑内障治療薬の眼圧下降機序は毛様体筋の細胞外基質に変化を起こす事で、葡萄膜強膜路抵抗が変化する可能性を示唆した。ヒトに近縁な動物モデルとして更に応用が望まれる。

4) 生殖系、免疫系の加齢変化及びエイジングファーム：カニクイザルの雄性生殖機能について免疫組織化学的に検討を加えた。新生仔から17歳齢までのカニクイザルを対象とした。17歳例までは加齢に伴う精巣機能の低下は明らかではなかった。しかし本研究によって技術的基盤は確立された。また免疫系の加齢変化研究ではT細胞レセプター (TCR) の多様性に関して多くの基盤データを得ることが出来た。胎児、新生児ではT細胞クローンはほとんど存在しないが、生後4~5日齢、5歳、9~11歳、15~16歳では増殖

T細胞クローンは加齢に伴い増加すること、一度出現したクローンは6カ月は安定して出現すること、脾臓では増殖T細胞クローンが存在するのに、リンパ節ではT細胞クローンは検出されにくいことが明らかになった。これらの方法論はこれまでの研究で得られたCD4CD8両陽性T細胞(DP-T)についても検索可能である。DP-T細胞は非胸腺由来の休止期メモリーT細胞に属し、かつヘルパー活性もキラー活性も有

していることから、チンパンジーを含めた系統解析も必要である。またエイジングファームの個体群のデータ蓄積と糖尿病治療薬の評価に有効利用出来たことは、ファームの維持側にとっても利用側にとっても最初の試みであり、非常に生産的な結果となった。

F. 研究発表
(業績資料参照)

リスザルの老人斑に関する病理学的研究

分担研究者：中村紳一朗（日本獣医畜産大学獣医病理学教室）

高齢リスザル大腦を検索したところ、これまでの報告とは異なり多くの老人斑を認めた。組織学的には以前の報告と同様に、他種動物に比較して小型の老人斑が多く観察された。免疫組織学的に検索したところ、小型ではあるが老人斑内に腫大神経突起を認め、ヒト、カニクイザルなどの成熟型老人斑に相当するものと思われた。また、ヒトの瀰漫型に一致する型の老人斑も認められた。しかし、いずれの型の老人斑はアミロイド沈着が認められず、前駆体タンパク（A β ）からアミロイドへの成熟過程が、他種動物とは異なることが推測された。

A. 研究目的

アルツハイマー病の特徴的な病理組織学的所見である老人斑および脳血管アミロイド症は様々な種の霊長類で確認されており、リスザルでもすでに報告されている [3, 4]。しかし、リスザルでは老人斑は少数で、むしろ脳血管アミロイド症が高頻度であるため [3]、老人斑の特徴に関する詳細な検索は行われていない。

ヒトの老人斑はいずれも嗜銀性であり、以下の特徴によって分類される。1) 成熟型老人斑；コンゴレッド染色陽性で、腫大神経突起を含み、さらにグリアの強い反応が見られる、2) 瀰漫型老人斑；1) にあげた変化が見られない、などである。一方、霊長目の動物種ではヒトの分類とは異なる形状の老人斑も確認されている [1, 2]。

サル類を用いたモデルを確立する上で、それぞれの種の老人斑および脳血管アミロイド症の特徴を把握しておくことが非常に重要である。今年度は、リスザルを用いたモデル確立を目指し、多数の老人斑を示した高齢リスザル10例の脳について、その特徴を病理組織学および免疫組織化学的に検索したので報告する。

B. 研究方式

動物：国立感染症研究所筑波霊長類センター

(TPC) および東京大学医科学研究所奄美病害動物研究施設に由来する20歳以上のリスザル (*Saimiri sciureus*) 10例の脳を検索材料とした。

病理組織学的検索：それぞれの大腦を10%中性緩衝ホルマリン固定し、前頭葉、扁桃体および海馬を含む側頭葉と頭頂葉、さらに後頭葉をそれぞれ前額断に切り出し、パラフィン包埋材料を作製した。4 μ mに薄切した切片で、HE染色、Periodic Acid Methenamin Silver (PAM) およびDirect Fast Scarlet (DFS) アミロイド染色（武藤化学）を行った。

免疫組織学的検索：これら10例の動物のうち、TPCに由来する4例を用いて、免疫組織学的検索を行った。アミロイド β 蛋白 (A β ; Boehringer Mannheim)、アポリポ蛋白E (apoE; DAKO)、 α 1-アンチキモトリプシン (α -ACT) アミロイド β 前駆体蛋白 (APP; Boehringer Mannheim)、ユビキチン (Ub; DAKO)、ニューロフィラメント (NF; DAKO)、tau II (Sigma)、GFAP (DAKO) に対する一次抗体を用い、LSAB法 (DAKO) を用いて染色した。

C. 研究結果

組織学的検索：PAM染色では、今回検索した10例すべての大腦皮質に老人斑が観察された。老人斑には、1) 中心部に嗜銀性のコアを持

ち、その周囲にコロナ様構造を示す円形の斑、
2) 嗜銀性の小顆粒状構造からなる円形の斑、
3) 嗜銀性の小型顆粒状構造が瀰漫性に広がる不定形の斑、4) 嗜銀性の細線維状構造が瀰漫性に広がる不定形の斑、の4種類が観察された。また、肥厚した毛細血管が強い嗜銀性を示した。1) および2) の見られた部分をHE染色で観察すると、神経網は脱落し、弱好塩基性の一様な物質に占められていた。一方、3) と4) の見られた部分のHE染色では著変が見られなかった。

また、DFS染色ではいずれの部位にも陽性像は観察されなかった。

免疫組織学的検索：免疫組織化学的にはいずれの型の老人斑もA β とapoEに陽性であった。各老人斑でのA β とapoEの陽性部位はPAM染色のそれと一致していた。一方、上記1)、2) および3) 型の老人斑は α ACTに対する抗体に陽性であったが、4) 型の老人斑はすべて陰性であった。A β に対する抗体によってPAM染色より約1.5倍多くの4) 型老人斑が検出された。apoEに対する抗体はPAM染色とほぼ同数の老人斑を検出した。apoE陽性の1)、2) および3) 型老人斑の数と α ACT陽性の同型の老人斑数はほぼ同等であった。

前述の1) および2) 型の老人斑ではAPP、UbおよびNF陽性の顆粒状構造物が認められたが、同構造物はtau IIに対して陰性であった。またGFAPに対する免疫染色ではほとんどの老人斑に対して星状膠細胞とその突起が反応していた。先述の3) 型の老人斑にもAPP、UbおよびNF陽性の顆粒状構造物が散在性に認められ、その数は1) および2) 型の老人斑よりも少数であった。GFAPに対する免疫染色では明らかな星状膠細胞体は認められなかったが、老人斑内に突起が伸張している像がしばしば認められた。4) 型の老人斑にはAPP、UbおよびNF陽性の構造物および星状膠細胞の反応は認められなかった。

毛細血管はA β 、apoEおよび α ACTに対す

る抗体が陽性像を示した。また髄膜の血管にはA β およびapoEの陽性像が認められた。成熟型老人斑とA β 、apoEおよび α ACT陽性毛細血管とはしばしば隣接して観察された。

D. 考察

今回の検索で、リスザルの老人斑は3種類の型に分けられることが明らかになった。1) および2) 型の老人斑は免疫組織化学的にAPP、Ub、NFに陽性の腫大神経突起と明瞭なアストログリアの反応が確認されたので、ヒト、カニクイザル、イヌなどの成熟型老人斑に一致するものと考えられ、さらに両者の形状から1) が古典型、2) が原始型の老人斑であると考えられた[5]。3) の型の老人斑は少数の腫大神経突起とアストログリアの反応が見られたので、1) および2) 型より未熟な老人斑と考えられた。4) 型の老人斑は腫大神経突起、アストログリアの反応ともに観察されないため、ヒト、カニクイザル、イヌなどの瀰漫型老人斑に一致するものと考えられた。

3) 型の老人斑は1) および2) 型に比べると比較的大型で分散してA β が観察される。分散したA β が次第に凝集し、その凝集A β が毒性を示し、APP、Ub、NF陽性の腫大神経突起およびアストログリアの増数を誘起するものと考えられる。従って、3) \rightarrow 2) \rightarrow 1) 型という過程を経て、リスザル老人斑は成熟するものと考えられた。

リスザルで1) および2) のような形状を示す老人斑は、ヒトではコンゴレッド陽性のアミロイドを持つ。しかし、リスザルの老人斑にはいずれもアミロイドの沈着が確認されなかった。この理由として、1) リスザルの老人斑に沈着するA β はアミロイドとしての性質を持つほど成熟していない、2) アミロイドとして成熟しているものの、老人斑自体が非常に小さいためにアミロイド染色では検出できない、3) アミロイドの成熟過程が他

種動物と異なる、などが考えられる。これらの点については、成熟したアミロイド線維の有無と状態の相違を、電顕観察によって確認したいと考えている。

リスザルのA β の分子種のうち、少なくとも血管ではA β 40よりもA β 42の方が多く沈着していると報告されている [3]。しかし、霊長類の老人斑の分子種を免疫組織学的にかつ生化学的に詳細に検索した報告はない。これには多くの霊長目に属する種のB virus感染等、ハザードの問題が関係していると思われる。その点、B virus感染の報告のないリスザルは安全であり、今後は老人斑の多く出現している症例を用いて、生化学的検索による霊長類の詳細なA β 分子種の解析が可能と思われる。

E. 結論

ヒトとのいくつかの相違点が見られるものの、リスザルは成熟型老人斑の形成の過程を見るために有用な動物だと考えられる。また、ハザード等に対する注意点も少なく、今後の生化学的な検索への適応も十分だと思われる。今後、リスザルの特性を生かし、A β 沈着および老人斑の形成に対する霊長類のモデル確立を目指そうと考えている。

F. 引用文献

1. Nakamura S, Nakayama H, Kiatipattanasakul W, Uetsuka K, Uchida K, and Goto N. Senile plaques in very aged cats. *Acta Neuropathol.* 91: 437-439. 1996.
2. Nakamura S, Nakayama H, Uetsuka K, Sasaki N, Uchida K, and Goto N. Senile plaques in an aged two-humped (Bactrian) camel (*Camelus Bactrianus*). *Acta Neuropathol.* 90: 415-418. 1995.
3. Sawamura N, Tamaoka A, Shoji S, Koo EH, Walker LC, Mori H.

Characterization of amyloid β protein species in cerebral amyloid angiopathy of a squirrel monkey by immunohistochemistry and enzyme-linked immunosorbent assay. *Neurosci. Lett.* 764: 225-229. 1997.

4. Walker LC, Masters B, Beyreuther K, Price DL. Amyloid in the brain of aged squirrel monkeys. *Acta Neuropathol.* 80: 381-387. 1990.
5. Wisniewski HM, Terry RD. Re-examination of the pathogenesis of the senile plaques. In: Zimmerman HM (ed) *Progress in Neuropathology*, vol 2. Grune and Stratton, New York, pp1-26 1973.

G. 研究業績

論文発表

- 1) Nakayama, Katayama K, Ikawa A, Miyawaki K, Shinozuka J, Uetsuka K, Nakamura S, Kimura N, Yoshikawa Y, Doi K. Cerebral amyloid angiopathy in an aged great spotted woodpecker. *Neurobiol. Aging* 20: 53-56. 1999.
- 2) Yamawaki H, Sato K, Hori M, Ozaki H, Nakamura S, Nakayama H, Doi K, Karaki H. Impairment of endothelium-dependent relaxation by a long-term PDGF-treatment in organ-cultured rabbit mesenteric artery. *Am. J. Physiol.* 277 H318-323. 1999.
- 3) Nakamura S, Ono F, Hamano M, Odagiri K, Kubo M, Komatsuzaki K, Terao K, Shinagawa M, Takahashi K, Yoshikawa Y. Immunohistochemical detection of apolipoprotein E within the prion-associated lesions in squirrel monkey brains. *Acta Neuropathol.* (in press).
- 4) 中村紳一郎、吉川泰弘. 老齢動物特に霊

長類脳の加齢変化. 脳の科学 (印刷中).

学会発表

1. 佐村英里子、松野佐好子、木村展之、中村紳一朗、玉岡晃、庄司進一、中山裕之、土井邦雄、吉川泰弘. 老齡犬脳における amyloid β protein分子種の解析. 第127回日本獣医学会. 相模原. 1999年4月.
2. 木村展之、中村紳一朗、成島悦雄、原樹子、七里茂美、斎藤和夫、野瀬修央、林貴子、後藤直彰、吉川泰弘. ローランドゴリラ脳に認められた老人斑について. 第127回日本獣医学会. 相模原. 1999年4月.
3. 木村展之、中村紳一朗、中山裕之、高島明彦、本多俊幸、土井邦雄、吉川泰弘. カニクイザルのpresenilin-1蛋白局在に関する生化学的研究. 第40回日本神経病理学会. 横浜. 1999年6月.
4. 中山裕之、中村紳一朗、木村展之、吉川泰弘、土井邦雄. 老齡のアカゲラ (*Picoides major*) に観察された脳血管アミロイド症. 第40回日本神経病理学会. 横浜. 1999年6月.
5. 中村紳一朗、木村展之、佐村英里子、小野文子、高橋公正、吉川泰弘. リスザルの老人斑に関する免疫組織化学的検索. 第128回日本獣医学会. 熊本. 1999年10月.
6. 須田龍介、鍛冶典之、中村紳一朗、小守忍、多川政弘、鷺巣誠. 犬の全脳虚血モデルにおける低体温療法の効果. 第128回日本獣医学会. 熊本. 1999年10月.

カニクイザルのPS-1発現の年齢に伴う変化

分担研究者：中村紳一朗（日本獣医畜産大学・獣医病理学教室）

多くの高齢のサル類には老人斑が認められ、アルツハイマー病のモデル動物としての有用性が期待されている。その中で、当研究班の目的は老人斑の病理発生を明らかにすることである。近年、老人斑の主構成蛋白であるA β の初期沈着にはpresenilin-1蛋白（PS-1）が深く関わっていると考えられている。今年度の研究ではカニクイザルの老人斑でのPS-1の局在を認め、さらに生化学的にも加齢に伴う特徴的なPS-1発現の変化を認めた。

A. 研究目的

アルツハイマー病の主病変である老人斑および脳血管アミロイド症は生化学的にアミロイド β 蛋白（A β ）から構成されている。このA β が脳内に沈着し、さらにこれらの病変を形成するに至るまでに、様々な因子が関与していることが推測されている。一つはapolipoprotein E（apoE）で、In vitroでA β と共存することによって、A β の自己凝集能を促進することが知られている[1]。さらに最近、presenilin-1蛋白（PS-1）がA β の沈着の促進に深く関わっていると考えられている。いくつか存在するA β の分子種の中でも初期沈着に深く関わると考えられているA β 42は、PS-1の強制発現細胞を用いたIn vitroの実験系、トランスジェニックマウスを用いたIn vivoの実験系で、その分泌の上昇が確認されている[2]。

PS-1は脳内では主に神経細胞で発現しており、オルガネラの膜に7~9カ所の貫通領域をもつ蛋白と考えられている。この全長蛋白は第6~7貫通領域内に存在する親水性ドメインの一部で、N末端部分とC末端部分の2カ所に限定分解されると考えられている[1]。しかし、PS-1の全長、N末端およびC末端の局在の年齢に伴う変化を詳細に調べた研究はこれまでにない。またPS-1の免疫染色の結果は使用した抗体の間で差が見られている。

そこで本研究では、本多らによって作製さ

れ、また生化学的性状が明らかにされているN12（PS-1の全長、N末端を認識）とM5（C末端を特異的に認識）を用いた免疫組織学的検索を行った[3]。さらに局在を詳細に検索するため、ショ糖勾配法を用いて脳組織をマイクロゾーム、核、ミトコンドリア、ミエリン、シナプトゾーム、サイトゾルの6分画に分離し、N12とM5によるウェスタンブロッティングを行った。

B. 研究方式

動物：国立感染症研究所筑波医学実験用霊長類センターから得られた、年齢の異なる胎仔から35歳までのカニクイザル（*Macaca fascicularis*）計16例を用いた。そのうち11例を病理組織学および免疫組織化学的検索、5例をウェスタンブロッティングに用いた。

病理組織学的検索：大脳組織の10%中性緩衝ホルマリン、パラフィン包埋材料を用いて、4 μ m切片を作成し、病理組織学的検索としてHE、過ヨウ素酸メセナミン銀染色（PAM）およびアルカリコンゴレッド染色を行った。

免疫組織化学的検索：一次抗体としてウサギポリクローナル抗体N12（PS-1の全長、N末端を認識）およびM5（C末端を特異的に認識）を用いた。これらをsABC法（DAKO）によって染色した。

ウェスタンブロッティング：前頭葉、扁桃核を含む側頭葉、海馬を含む側頭葉、後頭葉お

よび小脳から得た新鮮凍結組織をショ糖勾配法によってマイクロゾーム、核、ミトコンドリア、ミエリン、シナプトゾーム、サイトゾルの6分画に分離した。それぞれのタンパク濃度を定量の後、すべての分画のタンパク量を一定にして、SDS-PAGEで電気泳動を行った。泳動されたタンパクをゲルからPVDF膜 (Millipore) に転写し、N12とM5を一次抗体とする免疫反応を行った後、ECL化学発光 (Amersham) で特異反応を検出した。

C. 研究結果

病理組織学的検索：PAM染色では11例中の4例（22歳以上）に老人斑を認めた。4例すべてに成熟型老人斑を認め、1例（26歳）に瀰漫型老人斑を認めた。

免疫組織化学的検索：

N12；胎仔以外の2-35歳の動物の脳において、N12は多くの部位の神経細胞を染色し、細胞質内は顆粒状であった。神経網および白質も微弱な陽性像を認めた。それらのうち、大脳新皮質の免疫染色像は年齢によって異なっていた。若齢または中年齢動物で新皮質中層 (IIIからIV層) の神経細胞が染色されたのに対し、老齢動物では全層の神経細胞が染色された。胎仔の脳では上皮板の細胞の細胞質内が陽性を示した。

M5；胎仔以外の2-35歳の動物の脳において、M5は多くの部位の神経細胞を染色し、細胞質内は顆粒状であった。また神経網および白質にも強い顆粒状の陽性像を認めた。大脳新皮質の陽性像はN12とは異なり、加齢に伴う局在の差は認められなかった。さらに老齢動物に観察された成熟型老人斑の腫大神経突起が染色された。胎仔の脳では上皮板の細胞の細胞質内だけでなく細胞間の線維状の構造物も陽性を示した。

ウェスタンブロットティング：

N12；N12は49kDの全長PS-1と27kDのN末端PS-1を検出した。両バンドともに採材部位

による差は認められなかった。

27kDのN末端PS-1は、抽出された分画の中でもマイクロゾームにもっとも強いバンドが出現し、核、シナプトゾームの順に強かった。核分画のバンドは年齢とともに強くなっていた。一方、ミエリン、サイトゾルおよびミトコンドリアでは特異バンドは検出されなかった。

49kDの全長PS-1のバンドの強さは、全体的に27kDのN末端よりも弱かった。また年齢に伴う変化、部位の間での差はほとんど認められなかった。16歳と32歳の動物の核およびマイクロゾーム分画にやや強いバンドが認められた。

M5；M5は19kDのC末端PS-1を特異的に検出した。採材部位による差は認められなかった。

19kDのC末端PS-1のバンドはマイクロゾームで最も強く、次に核およびシナプトゾームが強かった。マイクロゾームの発現は年齢と関係なく同等であったが、核およびシナプトゾームは高齢の動物ほどその発現が強くなっていた。

D. 考察

PS-1の局在に関する免疫組織化学的検索は主にヒトまたは齧歯類で行われてきた。最近、アカゲザル、ネズミキツネザルなど霊長類のPS-1の局在に関する報告も知られている[4, 5]。これらは神経細胞における局在という点ですべて一致しているが、その他の細胞での局在、または老人斑および神経原線維変化といった病変での局在については使用した抗体の間で結果が異なっている。

以上の点を改善するために、生化学的性状の明らかな抗体、N12とM5を用いた免疫組織化学的検索を行った。また様々な種の霊長類で老人斑が確認されているにも関わらず、これまでの検索では老人斑を持つ動物での検索は行われていないので、老人斑を持つ動物を用いた検索も行った。さらにこれらの局在を

生化学的にも証明するために、ショ糖勾配法によって脳をいくつかの分画に分離した後に、ウェスタンブロットを行った。

免疫組織化学的検索とウェスタンブロットの結果をあわせ、次のようなことが明らかになった。1) N12は全長とN末端PS-1を検出するが、ウェスタンブロットで検出されたのがほとんどN末端PS-1であったため、免疫染色における陽性像の多くはN末端PS-1の局在を示していること、2) 両抗体ともに免疫染色では神経細胞の細胞質を顆粒状に染色し、この染色性はウェスタンブロットのマイクロゾームの反応性と一致する、およびM5の神経網および白質の染色性はウェスタンブロットのシナプトゾームの分画の反応性と一致すること、3) 全長、NおよびC末端は胎仔から高齢動物のすべての個体に発現しているタンパクで、特にC末端は免疫組織学的に老人斑にも出現すること、加齢に伴いシナプトゾームでの発現が増えることから加齢性病変の形成に深く関わる因子であること、などが考えられた。

PS-1のノックアウトマウスまたは強制発現細胞を用いたIn vitroの実験系では、老人斑形成において分子種となるべくA β 42が非常に増加することが明らかになっている[2]。今回の我々の検索ではこれまでに報告されているA β の前駆体タンパク (APP) の局在とPS-1の局在とが一致していることが明らかになった。老人斑ではその腫大神経突起にC末端を確認しており、PS-1のC末端が特に老人斑形成と深く関わっていることが推測された。

E. 結論

免疫組織化学的には老人斑にPS-1のC末端が認められ、生化学的にはシナプトゾームでその発現が顕著に増加していた。従って、老人斑を含む加齢性病変の形成にはPS-1のC末端が深く関わっていることが示唆された。今後はPS-1全長、NおよびC末端のそれぞれがA β の蓄積とどのように関わっているか、サル

初代培養神経細胞を用いて明らかにしていくつもりである。

F. 引用文献

- 1) Schellenberg GD, Bird TD, Wilsman EM, Orr HT, Anderson L, Nemens E, White J, Bonnyeastle L, Weber JL, Alonso E, Potter H, Heston LL, Martin GM : Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Science* 1992. 258: 668-671
- 2) Duff K, Eckman C, Zehr C, Yu X, Prada C-M, Perez-Tur J, Hutton M, Buee L, Harigaya Y, Yager D, Morgan D, Gordon MN, Holcomb L, Refelo L, Zenk, B, Hardy J, Youkin S : Increased amyloid b-42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature* 383: 1996. 710-713
- 3) Murayama O, Honda T, Tercken M, Murayama M, Yasutake K, Nihonmatsu N, Nakazato Y, Michel G, Sato K, Takahashi H, Takashima A : Different effects of Alzheimer-associated mutations of presenilin 1 on its processing. *Neurosci Lett* 1997
- 4) Calenda A, Mestre-Frances N, Czech C, Pradier L, Petter A, Bons N, Bellis M : Molecular cloning, sequencing, and brain expression of the presenilin 1 gene in *Microcebes murians*. *Biochem Biophys Res Com* 1996. 228 : 430-439
- 5) Lah JJ, Heilman CJ, Nash NR, Rees HD, Yi H, Counts SE, Levey AI : Light and electron microscopic localization of the presenilin-1 in primate brain. *J Neurosci* 1997. 17 : 1971-1980

G. 研究業績 :

論文発表；

1. Kiatipattanasakul W, Nakayama H, Nakamura S, and Doi K. Lectin histochemistry in the aged dog brain. *Acta Neuropathol.* 1998. 95: 261-268.
2. 中村紳一郎、木村展之、中山裕之、小野文子、榊原一兵、土井邦雄、吉川泰弘。カニクイザルにおけるアルツハイマー病に関連する病変の病理組織学的研究。霊長類研究。1998. 14: 83-87.
3. Nakamura S, Nakayama H, Goto N, Ono F, Sakakibara I, and Yoshikawa Y. Histopathological studies on senile plaques and cerebral amyloidoses in aged cynomolgus monkeys. *J. Med. Primatol.* 1998. 27: 244-252.
4. Nakayama H, Katayama K, Ikawa A, Miyawaki K, Shinozuka J, Uetsuka K, Nakamura S, Kimura N, Yoshikawa Y, Doi K. Cerebral amyloid angiopathy in an aged great spotted woodpecker. *Neurobiol. Aging* (In press).
5. Yamawaki H, Sato K, Hori M, Ozaki H, Nakamura S, Nakayama H, Doi K, Karaki H. Impairment of endothelium-dependent relaxation by a long-term PDGF-treatment in organ-cultured rabbit mesenteric artery. *Am. J. Physiol.* (In press)

学会発表；

1. 木村展之、中村紳一郎、中山裕之、高島明彦、本多俊幸、土井邦雄、吉川泰弘。カニクイザルのpresenilin-1蛋白質の局在に関する研究。第125回日本獣医学会。宇都宮。1998年4月。
2. 中村紳一郎、中山裕之、ウイジット・K、谷吉朗、土井邦雄、吉川泰弘。各種動物のアミロイドに認められた、アポリポ蛋白Eの共沈着。第125回日本獣医学会。宇都宮。1998年4月。

3. 木村展之、中村紳一郎、中山裕之、高島明彦、本多俊幸、土井邦雄、吉川泰弘。カニクイザルのpresenilin-1蛋白質局在に関する病理組織学的研究。第39回日本神経病理学会。博多。1998年5月。
4. 中村紳一郎、木村展之、小野文子、榊原一兵、寺尾恵治、吉川泰弘。サル類に認められる脳アミロイド症。第15回日本霊長類学会。岡山。1998年6月。
5. 中村紳一郎、小野文子、寺尾恵治、高橋公正、吉川泰弘。プリオン蛋白(PrP)欠損マウス由来の抗モノクローナル抗体を用いたリスザル実験的海綿状脳症の免疫組織化学的研究。第126回日本獣医学会。江別。1998年8月。
6. Nakayama H, Katayama K, Ikawa A, Miyawaki K, Shinozuka J, Uetsuka K, Nakamura S, Kimura N, Ishida K, Yoshikawa Y, Doi K. Cerebral amyloid angiopathy in an aged great spotted woodpecker. American College of Veterinary Pathologists 49th Annual Meeting. St. Louis, Missouri. 1998. Nov.
7. 木村展之、中村紳一郎、成島悦雄、原樹子、七里茂美、斉藤和夫、野瀬修央、林貴子、後藤直彰、吉川泰弘。ローランドゴリラ脳に見られた老人斑について。第127回日本獣医学会。相模原。1999年4月。
8. 佐村英里子、松野佐好子、木村展之、中村紳一郎、玉岡晃、庄司進一、中山裕之、土井邦夫、吉川泰弘。老齢犬脳におけるamyloid b protein分子種の解析。第127回日本獣医学会。相模原。1999年4月。

高次脳機能障害モデルに関する研究

分担研究者：小 山 高 正（日本女子大学・人間社会学部）

研究要旨

カニクイザルを用いて、加齢に伴う高次認知機能の低下を評価する系を確立するため、WGTA法と指迷路法を用いて検討した。WGTA法では老齢群は初期段階から実験に集中、一貫して課題解決のための正しいアプローチをとることができた。一方、若齢群は初期段階で実験への集中力を欠き、課題に取り組むスタートが老齢個体よりも遅れた。課題を習得できた個体では、習得過程にプリファレンス行動が効果的戦略として働いていた。3段式指迷路では、格段をクリアーするための試行数、エラー数ともに、老若の差はなかった。エラーボックス付きの4段迷路では、比較的容易に1段目をクリアーするが、2段目のクリアーは困難であり、1) 1段目と反対方向へ移動するという課題の難しさのため、2) 1段目に落としてももう2) 1段落とさなければ報酬がもらえないという、強化の遅延のための可能性が考えられた。

A,B. 研究目的と研究方法

従来、サル類の高次脳機能をみるために使われてきたWGTAは、課題の種類に関わらず、訓練ならびに実験に時間と労力がかかった。老齢ザルの脳機能障害を簡便に識別できる装置の開発が必要である。われわれは、environment enrichment に用いられていたパズルフィーダーを改良して、脳機能障害をもつ老齢ザルのスクリーニングができないかと考えた。

(1) 実験1：WGTAによる老齢ザルの記憶戦略の調査

①被験体：雌カニクイザル9頭

(年齢：老齢群 23-27 歳齢 4・非老齢群 12-13 歳齢 5)

②装置：実験室に運び入れた実験用飼育ケージ4個とWGTAおよびビデオカメラ

③手続き：

(a)遅延反応課題(Delayed Response 以下 DR)：

DRは予備訓練と、90%以上の正答率に達するまで続ける学習課題段階と、その後の遅延1~30秒の記憶課題段階からなる。行動解析は、学習段階の実験場面について各行動カテゴリー（課題に対する正アプローチ、誤アプローチ、課題に関心のない状態の行動）の割合を検討した。また記憶段階の遅延場面について各行動カテゴリー（正刺激に対する手がかり的行動、誤刺激に対する手がかり的行動、その他）の割合を検討した。

(b)場所型遅延非見本合わせ課題(Delayed Nonmatching-to-Position 以下 DNMP)：DNMPは90%以上の正答率に達するまで続ける学習課題段階と、その後の遅延10~300秒の記憶課題段階からなる。行動解析は、学習段階の実験場面について選択反応時の位置プリファレンス率を検討した。

(2) 実験2：改良型指迷路による空間認知能力テスト

①被験体：雌カニクイザル11頭（年齢7歳齢）

②装置：飼育ケージにとりつけられた改良型指迷路および8mmビデオカメラ

指迷路は高さ（右、左）×横幅×奥行きが144、179×244×37mmの亚克力板製であり、装置前面と背面には透明亚克力板を、側面と上下部および4段の各迷路床面には白色亚克力板を用いた。迷路部は高さ×横幅×奥行きが33×178×30mmであり、床面両端に縦横が30×25mmの開口部を設けた。開口部の一方は正解側であり、もう一方はエラー側であった。エラーボックスは35×56×30mmであり、エラーボックス前面には白色塩化プラスチック製の板を内側から張り付けた。これは、被験体からエラーボックス内の報酬に接触できないようにするためである。

③手続き：

実験は、馴化、課題1（1段目から報酬を落として取り出す）、課題2（2段目から1段目に報酬を落としさらに下へ落として取り出す）、課題3（3→2→1で報酬を取り出す）、課題4（4→3→2→1で報酬を取り出す）、ランダムテスト（課題1～4をランダムな順番で行う）と行った。

1試行は実験者が報酬を装置内に置いてから被験体はその報酬を得るまでとし、2分経過しても装置、報酬に触れない場合は無反応でその試行を中止した。各課題の基準達成は、連続10試行における正試行率が90%である。ランダムは、各段8試行計32試行行った。

C,D. 研究結果と考察

（1）WGTAによる老齡ザルの記憶戦略

①老齡個体は初期の段階から実験に集中していて、

一貫して課題解決のための正しいアプローチをとることができた。これに対して、初期の段階で若齡個体は実験そのものへの集中力を欠き、課題に取り組むスタートが老齡群よりも遅れた。

②自力で課題を習得できた個体は、プリファレンス期間あった。一方、自力で習得できなかった個体はプリファレンス期間がなかった。そこで、任意にプリファレンスを起こすような矯正試行を挿入後に速やかに習得できた。このことから、この課題の習得過程にはプリファレンス行動が効果的戦略として働いていた。

③WGTAの結果をまとめると、

(a)老齡ザルの学習能力の低下はみられなかった。
(b)老齡ザルの学習過程の行動には、非老齡とは異なるパターンがあり、それが習得に効果的な方略として働いていた。

（2）老齡ザルの学習課題習得能力および行動的特徴の検討

Delayed Responseの結果から、老齡ザルの記憶能力に関する個体差は大きく、これまでの研究でも様々な形で報告されてきた（Rapp,1992;1994）。今回測定した記憶能力にも年齢的要素よりも個体差が大きく反映されたといえる。

遅延期間のスクリーンの向こうで個体がどのような行動をとっているのか。成績の違いには、行動面でも明確なパターンがあるのか。記憶課題の成績差の原因を探るため、遅延期間中の被験体の行動について解析を行った。

観察された行動のうち手がかり的行動について正答率と照会してみると、どの個体についてもその二つが連動していることがわかる。すなわち4頭とも遅延1秒の手がかり的行動の出現率が高く

正答率も高い。一方、遅延 5 秒以上の場合は成績下位の 2 頭の出現率と正答率ともに低下している。この結果から観察された手がかり的行動が「記憶するため」に重要であると推察できる。したがって特に遅延時間が長い場合において「手がかり」を上手に使うことができたか否か、が DR の成績差の重要な要因であることが明らかになった。そのようなものの獲得の段階がこの課題には含まれていることを本実験の結果から指摘することができる。また今回の結果は、記憶保持を老齢が特有の方法で行っているということよりも、老齢個体でも全体で共通した方法を維持していることが記憶能力の維持につながっていることを示している。つまり劣化した何らかの能力を補うような行動的戦略は、今回は見いだせなかったということである。

(3) 改良型指迷路による空間認知能力テスト

3 段式指迷路では、格段をクリアーするための試行数、エラー数ともに、老若の差はなかった。この装置では、仕組みを理解によって学習が進んでいるのか、単に餌を早く動かせることで試行錯誤的に学習が進んでいるのかの判別ができないので、エラーボックス付きの 4 段迷路を作った。その結果、装置の仕組みを理解しているらしいことがわかった。しかし、サルは比較的容易に 1 段目をクリアーするが、2 段目が非常にむずかしい。それが、餌を 1 段目と反対方向へ移動するという課題の難しさなのか、1 段目に落としてももう 1

段落とさなければ報酬がもらえないという、強化の遅延もしくはいわゆる 2 次的強化のために難しいことがはっきりしないことがわかった。

E. 結論

WGTA テストの結果をまとめると、老齢ザルの学習能力の低下はみられず、老齢ザルの学習過程の行動には、若齢群とは異なるパターンがあり、それが習得に効果的な方略として働いていた。また 3 段式指迷路テストでは、格段をクリアーするための試行数、エラー数ともに、老若の差はなかった。エラーボックス付きの 4 段迷路では、比較的容易に 1 段目をクリアーするが、2 段目のクリアーは困難であり、1 段目と反対方向へ移動するという課題が難しいため、あるいは 1 段目に落としてももう 1 段落とさなければ報酬がもらえないという、強化の遅延のための可能性が考えられた。

F. 研究発表

<学会活動>

久保南海子、川崎勝義、小山高正

「老齢ザル特有の記憶戦略はあるのか？－位置遅延過程の行動解析から－」 日本心理学会第 63 回大会（中京大学）平成 11 年 9 月 5-7 日

小山高正、川崎勝義

「2 歳児の指迷路解決課題と空間認知能力」日本発達心理学会第 11 回大会（東京女子大学）