

厚生科学研究費

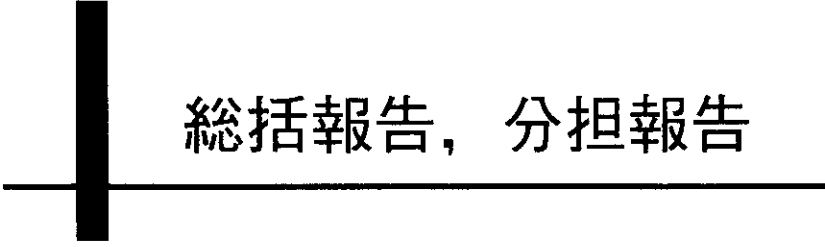
長寿科学総合研究事業

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 12 年度 研究成果報告書

平成 13 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

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

霊長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を行うとともに、モデルを用いた治療研究、遺伝子解析等広範な研究を展開した。老人斑形成機序に関してはP S 2の発現様式と加齢の関係を明らかにした。また老齡ザルの高次認知機能の測定に関してはWGTA システムを用いた評価系で記憶獲得に加齢による機能差が示されたことは興味深い。霊長類の神経伝達物質のレセプター遺伝子の多様性に関しては系統発生と単純には一致せず興味ある結果が得られた。サル類の肥満研究では成長に伴う肥満の出現パターンが明らかにされた。動脈硬化症モデルではエストロジェンの治療効果が明確にされた。また網膜変性、緑内障モデルは着実に研究が展開され、特に基盤研究として取り組んできたカニクイザルゲノムの遺伝子連鎖解析で、わが国で発見されたカニクイザルの家系性網膜黄斑変性症が第1染色体のマーカーと連鎖する可能性が指摘されたのは大きな成果である。免疫系の特性解析ではリンパ球のテロメアー長を測定する方法を新たに開発し、また懸案となっているD P細胞の起源が次第に明らかにされつつある。

○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）
中村紳一朗（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）

65歳以上の人口が全人口の7%を越える高齢化社会を経て、30年以内に高齢者が15%以上をしめる高齢社会を迎えようとしている。このような状況は先進国でわが国が最初であり、高齢社会に伴う弊害をどのように克服して行くかは類例のない重要な問題である。こうした高齢社会の到来は、また様々な老人病が増加することを意味している。なかでも痴呆症、パーキンソン病、感覚器疾患、肥満・糖尿病など、行動障害や高次脳機能障害をともなう疾患の増加は高齢者の孤立化を

A. 研究目的

もたらすだけでなく、社会的な負担も著しく増大する事になる。こうした高齢患者の QOL に関する問題の克服は厚生科学の主要課題である。

これらの老年性疾患はその原因が複雑で、加齢に伴う多臓器機能減退、晩発性遺伝子発現、ホメオスタシス機構の破綻、環境因子が複合して発症する複合性疾患である。そのため、こうした疾患の発症機序を解析するには、長寿で、生理・代謝機能、脳・神経系の構造と機能がヒトに類似する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、個体病歴、生化学データなどが全て揃っており複合因子の解析には最適である。本研究班では霊長類を用いて、齧歯類ではヒトへの外挿が困難な自然発症あるいは実験的老年病のモデルの開発とその病態解析を進めること、更にサル類のエイジングファームを霊長類センターに作成し、共同の研究資源とするとともに、正常老化に関するデータベースの作成を進めること、こうした研究資源を生かして有効な診断、治療法の開発のための基盤研究を進めることが目的である。

B, 研究方法

1) 老人斑形成機序に関する研究：老人斑形成のメカニズムを解明するための動物モデルの確立をカニクイザルを用いて検討してきた。これまで A β の分子種の解析、胎仔から老齢期までのカニクイザル脳組織の PS1 の局在および蛋白発現量の加齢に伴う変化を、免疫組織化学的および生化学的に検索した。今年度は、老人斑の主構成成分である A β の分泌

に関わるとされている、presenilin-2 (PS2) の胎仔から老齢期までの脳組織中の局在および加齢に伴う変化を、免疫組織化学的および生化学的に検索した。

2) 高次記憶学習機能評価に関する研究：老齢サルの認知能力に関する研究で、空間的認知能力と記憶特性に関しては主に遅延反応課題を用いて検証がなされており、空間記憶課題では短期の遅延時間でも加齢の影響が顕著であるとの結果が報告されてきた。しかし空間課題の獲得過程における年齢間での差については検出できなかった。そこで本研究では、獲得段階から短時間の遅延を含む Delayed Non Matching-to-Position (DNMP:遅延場所型非見本合わせ) 課題を用いて、空間課題の獲得における加齢の影響を検討した。さらに一度獲得した課題の呈示条件を操作し、課題に共通した情報に対する応用性について年齢間で検討した。

3) 神経伝達物質関連遺伝子多型と老齢ザルの行動特性：老人性痴呆症などの中枢神経機能障害には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サル類を用いて解析し、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。本年度は、18 種のサル類においてドーパミントランスポーター、セロトニンレセプター、コレシストキニン遺伝子の多型領域を PCR 増幅し、塩基配列を決定した。

4) 飼育下の雌カニクイザルを対象とする肥

満の研究：糖尿病・高血圧症・動脈硬化症・狭心症等の生活習慣病で最も大きな危険因子として肥満が注目され、ヒトでは血液の血糖値や中性脂肪・コレステロール値等がその指標として用いられている。本研究ではこれまで飼育下のカニクイザルの健康状態を把握するため、血液学的、血清生化学的測定値、及び二波長X線密度測定装置（DXA）による全身測定で、%Fatの値が雌カニクイザルの肥満指数として非常に優れていることを報告した。今回は体重を指標として雌カニクイザルでの肥満の発生状態を調査し、体重と血液学的および血清生化学的測定値との関係について解析した。血清の測定は肥満関連ホルモン（インスリン・レプチン）についても併せて行なった。

5) 実験的粥状動脈硬化症モデルの開発：昨年度に引き続き、動脈硬化性病変の発症にエストロゲンがどの様に関与するかを、また脂質低下と動脈硬化病変抑制作用を有するとされるエイコサペントエン酸の効果を検索した。また、リボカリン型プロスタグランジンD合成酵素が動脈硬化症の進展あるいは抑制の指標となり得るのか否か検討を加えた。

6) 老年性眼疾患モデルの開発：サル類の眼科領域疾患モデル開発のための基礎研究として、育成カニクイザルで慢性腎性網膜症が認められた症例について、病変の発生前から発生後にわたる普通眼底像の変化と、発生後のフルオレセイン蛍光眼底造影像、蛍光眼底造影像、網膜活動電位等の検討を行った。さらにカニクイザルの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。

7) カニクイザル網膜黄斑変性の遺伝学的解析：本研究では、カニクイザル染色体の連鎖地図を構築することにより、種々の形質の遺伝学的解析を行うためのシステムを確立し、カニクイザルに発生する網膜黄斑変性の原因遺伝子を明らかにすることを目的とした。本年度はヒトの特定の染色体に位置づけられているマイクロサテライト遺伝子座と対応するマイクロサテライトDNAを用いてカニクイザルの遺伝学的連鎖地図を構築し、ヒトとカニクイザルの染色体の対応を明らかとすること、これらの用いた連鎖解析により、網膜黄斑変性の原因遺伝子の染色体上の位置を明らかとすることを試みた。

8) 老齢カニクイザルをモデルとした老化と免疫機能の変化に関する研究：これまでの研究で、正常カニクイザルでは胸腺退縮が完了する前後に、末梢血中にCD4+/CD8+ T細胞（DP細胞）が増加すること、DP細胞の表現型およびT細胞レセプターのレパトアが胸腺DP細胞と異なることから、加齢に伴って出現する胸腺外分化T細胞である可能性を考え解析を進めてきた。今年度はDP細胞の由来（細胞系列）を明らかにする目的で、老齢カニクイザル末梢血から単離精製したCD4陽性T細胞（CD4sp）およびCD8陽性T細胞（CD8sp）とDP細胞のT細胞レセプターVβファミリー遺伝子の塩基配列を比較し、細胞レベルでの老化を解析する方法としてテロメア長をフローサイトメトリーで解析する技術（Flow FISH）を確立し、末梢血T細胞のテロメア長の加齢に伴う変化を検索した。

C・D、結果と考察

1) 老人斑形成機序に関する研究：PS2 は主に神経細胞や神経網に存在する点では、PS1 とほぼ一致していたが、加齢に伴う発現の増強が見られなかった点で PS1 とは著しく異なっていた。また免疫組織学的検索の結果から老人斑形成における PS2 の関わりは PS1 よりも弱いことが推測された。

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。課題の獲得には、年齢間での顕著な差がみられた。しかしいずれの老齢個体も最終的には獲得できたということは、5 秒程度の位置情報の保持能力は阻害されていないことを示唆する。すなわち老齢ザルにおいては、獲得段階から遅延時間が挿入された「位置再認課題」の学習能力は低下している。しかし、遅延をともなわない位置課題では獲得に差がないことから、記憶の負荷が老齢ザルの課題獲得を困難にした要因であると考えられる。またエラーボックス付きの4段迷路課題においては、老若に差はでなかったため、遅延時間をともなう指迷路に改良することとした。

3) 神経伝達物質関連遺伝子多型と老齢ザルの行動特性：サル類における DAT1、5-HTR2A、CCK 遺伝子の PCR 増幅に成功した。DAT1 遺伝子の反復回数には種間変異が大きく、大型類人猿では 1-2 回反復型が、テナガザルは多型性に富んでおり 5-13 反復型が、カニクイザルでは 12 回反復数を持つ遺伝子がほとんどであった。同遺伝子のヒト配

列との相同性は高く、ヒト-カニクイザル間では 81.8%であった。旧世界ザルの多様な種および、新世界ザルのリスザルにおいても反復領域の存在が確認されたが、原猿類では今のところ PCR 増幅に成功していない。5-HTR2A 遺伝子の多型部位については、ヒトでは C 対立遺伝子は約 60%存在するが、カニクイザルではすべて C 型であった。CCK 遺伝子多型部位では、ヒトで C、T 対立遺伝子の頻度はおよそ 6 : 4 であり、類人猿、テナガザル（各 1 頭）の塩基配列の解析では、いずれも C 型であった。塩基配列の比較から、5-HTR2A ではヒト-カニクイザル間 92.1%、CCK ではヒト-ゴリラ間 98.9%と、いずれも高い相同性が認められた。

4) 飼育下の雌カニクイザルを対象とする肥満の研究：霊長類センターの長期飼育コロニーの中で肥満個体の占める割合は 23.2%であり、境界型が 12.3%、正常と判断されるものはわずかに過半数（64.5%）を占めるに過ぎなかった。さらに肥満個体は、6 歳齢から 7 歳齢に成るところで一挙に約 15%へと増加する。この増加は、ほぼ集団の初産年齢に対応し妊娠・分娩・保育にともなう母体の生理的変化の反映であろうと推測された。また成熟、老齢に到るエイジングファームの雌カニクイザルの体重と血液関係の測定項目ならびに肥満関連ホルモンについての測定を行ったところ、肥満と脂質代謝・糖代謝および肥満の結果としての多血症との関係が実証された。

5) 実験的粥状動脈硬化症モデルの開発：卵巣摘出した雌ニホンザルにコレステロール食

とともにエストロゲンを投与した結果、血中コレステロール、apolipo-B の増加抑制、apolipo-A1、HDL-chol の減少抑制傾向がみられた。また6カ月を経過した個体においても血管内腔のアテロームの形成は極めてわずかであった。このことから、エストロゲンは抗動脈硬化作用を有することを確認できた。コレステロール食投与により動脈硬化症モデルを作成した後、エイコサペントエン酸を投与した結果、血中の脂質は著明な改善が見られた。しかし、血管内腔の動脈硬化病変の進展を抑制する効果は明らかに出来なかった。一方、血中リポカリン型プロスタグランジンD合成酵素は、コレステロール食に加えてエストロゲンを同時に投与し、病変の進展に抑制が見られた個体において値の増加が見られたことから、動脈硬化病変の進展抑制に関連があることが示唆された。

6) 老年性眼疾患モデルの開発：普通眼底撮影では、左右眼底全体に綿花様白斑、眼底出血、中心窩の周りに放射状に硬性白斑、網膜動脈の狭細化が観察された。ICG、FAG では、病変部に一致して蛍光色素の漏出、眼底出血部位に一致して低蛍光が観察された。ERG では錐体系および杆体系反応ともに正常範囲内であり、本症例はヒトの慢性腎性網膜症の診断や治療に対する動物モデルとなり得ることが明かとなった。また、実験的緑内障モデルの治療研究のため治療薬のイソプロピルウノプロストンとラタノプロストの眼内薬物動態を検索し、上記プロスタグランدين誘導体点眼薬の重要な副作用である虹彩などへの色素沈着の機序を解明した。

7) 網膜黄斑変性の遺伝学的解析：本研究の結果、カニクイザルの網膜黄斑変性の原因遺伝子は第1染色体上に存在することが示唆された。ヒトの第1染色体にはカニクイザルの疾患と類似した病態を示す遺伝性の網膜黄斑変性の原因遺伝子である STGD1 遺伝子が存在することが知られているが、今回、原因遺伝子と連鎖が見られた領域は STGD1 遺伝子が存在する領域とは異なっていた。しかし、この領域には、ヒトの網膜色素変性18型の原因遺伝子である RP18 遺伝子が存在していた。両疾患はともに常染色体優性の遺伝様式をとり、網膜の変性を主な症状とする遺伝性の眼疾患であることから、カニクイザルの網膜黄斑変性と RP18 遺伝子との関連が考えられた。今後、より近接するマーカーを用いた解析により、当該領域に存在する候補遺伝子を特定し、解析を行う必要がある。

8) 老齢カニクイザルをモデルとした老化と免疫機能の変化に関する研究：SSCP 法で検出される DP 細胞の T 細胞レセプター V β ファミリーに特異的なバンドの塩基配列を CD4sp 細胞のそれと比較した結果、両者の塩基配列が完全に一致したことから DP 細胞と CD4sp とが同一の細胞系列に属する T 細胞であると思われた。また Flow FISH 法で測定したテロメア長は Southern blotting で測定した長さと同じく高い相関を示すと同時に、加齢に伴って有意に短縮した。両者の回帰式からカニクイザル末梢リンパ球のテロメア長は一年あたり平均 63bp 短縮することが明らかになった。

E, 結論

1) 老人斑形成と認知機能評価：カニクイザルについて加齢に伴うPS-2のN末端、C末端の発現を免疫組織学的に検索し、胎生期から既に発現していること、PS-1と異なり加齢に伴って発現は増加しないことを明らかにした。今後生化学的解析が必要であろう。高次認知機能を評価するシステムの開発研究ではWGTAシステムを応用して、記憶獲得課程の解析により老齢ザルの学習が若齢群より困難であることが明らかになり、年齢の差が反映された意義は大きい。今後はエイジングファーム個体を対象とした縦断的解析が必要である。

2) 神経伝達物質関連レセプター遺伝子の多様性：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り、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。特に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り、単純な系統樹と一致しなかったことは興味深い。

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。メスの個体について動脈硬化症の進展にエストロゲンが抗動脈作用効果を持つこと、血中リポカリン型プロスタグランジンD合成酵素がエストロゲン投与で、病変の進展に抑制が見られた個体において増加が見られることから、病態のマーカーになる可能性が示唆された。またエイコサペントエン酸投与

は血中脂質を著明に改善するが、病変の進展を抑制する効果はなかった。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。

腎性網膜症の病態解析、実験的緑内障モデルを用いての緑内障治療薬の評価、薬物動態、副作用等、実用的な解析結果が得られつつある。これまで基盤研究として取り組んできたカニクイザルゲノムの遺伝子連鎖解析で、わが国で発見されたカニクイザルの家系性網膜黄斑変性症が第1染色体のマーカーと連鎖する可能性が指摘されたのは大きな成果である。今後の展開が期待される。

4) 肥満、免疫系の加齢変化及びエイジングファーム：サル類の肥満研究では成長に伴う肥満の出現パターンが明らかにされた。免疫系の特性解析ではリンパ球のテロメアー長を測定する方法を新たに開発し、また懸案となっているDP細胞の起源が次第に明らかにされつつある。

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)

カニクイザル Presenilin-2 の免疫組織化学的研究

分担研究者 中村紳一郎 (日本獣医畜産大学)

研究要旨

我々は、老人斑形成のメカニズムを解明するための動物モデルの確立を、カニクイザルを用いて検討している。今年度の検索では、老人斑の主構成成分である A β の分泌に関わるとされている、presenilin-2 (PS2) のカニクイザル脳での局在について、検討した。PS2 は主に神経細胞や神経網に存在する点では、PS1 とほぼ一致していたが、加齢に伴う発現の増強が見られなかった点で PS1 とは異なっていた。老人斑形成における PS2 の関わりは PS1 よりも弱いことが推測された。

A. 研究目的

Presenilin-1 (PS1) は、アルツハイマー病患者の老人斑や脳血管アミロイド症の形成に関わっている。特に、これらの病変に沈着するアミロイド β 蛋白 (A β) が、前駆体である β アミロイド前駆体蛋白 (APP) から分解される際に深く関わっているとされている。

一昨年、我々は胎仔から老齢期までのカニクイザル脳組織の PS1 の局在および蛋白発現量の加齢に伴う変化を、免疫組織化学的および生化学的に検索し、それらの結果を報告した。免疫組織化学的検索では、PS1 はヒトと同様、神経細胞の細胞体内に顆粒状染色像として確認され、N 末端フラグメント (N 末端) は加齢とともに陽性細胞数が増加し、C 末端フラグメント (C 末端) は全年齢を通じて高い発現が認められました。さらに、C 末端は成熟型老人斑の腫大神経突起にも確認されました。生化学的検索では、胎仔期から老齢期までマイクロゾーム分画において強い PS1 の発現が見られ、核分画および神経終末分画では全長 N 末端および

C 末端ともに発現量が増加しており、とくに核分画では全長 PS1 の発現が増加していることが明らかになった。これらのような事実から、我々は老人斑形成に PS1 の C 末端の加齢に伴う増加が深く関わっていると考えた。

一方で、PS1 と相同性が高く、やはり家族性アルツハイマー病の原因とされている遺伝子およびその産物として Presenilin-2 (PS2) が知られている。その局在や老人斑形成との関わりについては、PS1 ほど知られていない部分も多い。そこで今回の我々の研究として、PS2 の加齢に伴う変化について、胎仔期から老齢期までのカニクイザル脳組織を用いて免疫組織化学的な検索を行った。

B. 研究方法

動物：検索材料として、国立感染症研究所筑波霊長センターに由来する胎仔期 1 例、成長期 3 例、成熟期 3 例および老人斑の確認された老齢期 4 例の計 11 例のカニクイザルの大脳 (前頭葉、海馬を含む側頭葉、扁桃核を含む側頭葉、後頭葉)

および小脳を用いた。

免疫組織化学的検索：免疫組織化学検索材料は、定法に従い、ホルマリン固定・パラフィン包埋を行った脳組織を4 μ mに薄切し免疫染色に供した。

一次抗体には N20ウサギポリクローナル抗体(PS2・N末端;アミノ酸残基2-20; Santa Cruz)と C20ウサギポリクローナル抗体(PS2・C末端;アミノ酸残基535-554; Santa Cruz)の2種類を用いました。その後、ビオチン化抗ウサギ IgG ヤギポリクローナル抗体(Vector)および peroxidase 結合 streptavidin-biotin complex(DAKO)を反応させ、DABを基質として発色した。染色の特異性を確認するため、それぞれの抗体が認識する部位に対するペプチドを用いて吸収試験を行った。

C. 研究結果

胎仔脳では N20および C20ともに未分化神経細胞体が陽性を示し、細胞間が細顆粒状および瀰漫状に染色された。若齢動物では、N20および C20ともに大型の錐体神経細胞を染色し、大型の神経突起も顆粒状に染色された。若齢動物の脳組織では、両抗体に対する染色性の差異は見られなかった。成熟期の個体では、N20および C20ともに大型の錐体神経細胞に加えて小型神経細胞も陽性を示し、神経網および白質での陽性像は若齢動物に比べると増強していた。神経細胞の染色性に加え、神経網および白質などの神経終末部での染色性に両抗体の差異は見られなかった。20歳を超えた老齢動物の脳組織では成熟個体までの染色結果と同様、小型の神経細胞を含む

新皮質全層の神経細胞が陽性を示した。

これらの動物には多くの成熟型老人斑が認められたが、両抗体ともに、成熟型老人斑の腫大神経突起での陽性反応は認められなかった。このように加齢に伴って、やや陽性神経細胞数はやや増加していた。一方で、いずれの陽性部位も加齢に伴う、染色性の顕著な変化は認められなかった。

吸収試験では、大脳および小脳ともに、N20 および C20 の抗原となったそれぞれのペプチドとともに、N20 および C20 の神経細胞体、神経突起の顆粒状陽性像、さらに神経網における細顆粒状陽性像を吸収した。従って、上記の染色結果は PS2 に特異的な反応であることが証明された。

D. 考察

PS2 は胎仔期からすでに発現している蛋白であること、また神経細胞体内に顆粒状染色像として確認されたことから、小胞体に豊富に存在する蛋白質であること、神経網および白質といった神経終末部にも存在する蛋白質であることが明らかになりました。これらの結果は PS1 の結果とほぼ一致していたが、いくつかの点で PS1 と異なる所見が明らかになった。

PS1 では加齢に伴い、C末端が神経網や白質で発現が増強していたり、老人斑の腫大神経突起に出現するようになったのに対し、PS2 両末端は胎仔期から老齢期まで通じて発現の強さに大きな差異が認められなかった。

近年盛んに行われている PS1 と γ セクレターゼの活性に関する研究で、PS1 ノックアウト動物では γ セクレターゼが働かず APP 代謝に影響が見られたのに対

し、PS2 ノックアウト動物では APP 代謝になんら影響を及ぼさなかったとの報告がある。今回、1) 明らかに PS2 が加齢に伴って発現が増強していないであろうという結果、2) ノックアウトマウスでの PS2 の APP 代謝への影響に関する結果、などをあわせて考えると、PS2 の存在が老人斑形成に与える影響は小さいのではないかと、思われた。我々は、この関与の弱さが PS2 発現が PS1 の発現よりも小さいことに起因していると考え、ウェスタンブロット等による生化学的な半定量的な検索によって、PS1 および PS2 の発現量の差異および加齢に伴う変化を解析しようと考えている。

E. 結論

カニクイザルの PS2 の老人斑形成への関与は、ヒトや PS2 ノックアウト動物で考えられている結果と同様に、弱いものであると考えられた。APP 代謝への主たる関与については、PS1 が担っているものと予測された。

F. 引用文献

1) Deng G, Su JH, Cotman CW. Gene expression of Alzheimer-associated presenilin-2 in the frontal cortex of Alzheimer and aged control brain. *FEBS Lett.* 394: 17-20. 1996

2) Jaikaran ET, Marcon G, Levesque L, George-Hyslop PS, Fraser PE, Clark A. Localisation of presenilin 2 in human and rodent pancreatic islet beta-cells; Met239Val presenilin 2 variant is not associated with diabetes in man. *J Cell*

Sci. 112 (Pt 13): 2137-44. 1999

3) Palacino JJ, Berechid BE, Alexander P, Eckman C, Younkin S, Nye JS, Wolozin B. Regulation of amyloid precursor protein processing by presenilin 1 (PS1) and PS2 in PS1 knockout cells. *J Biol Chem.* 275: 215-22. 2000

G. 研究発表

1. 論文発表

① 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.* 100: 365-370. 2000

② Kiatipattanasakul W, Nakayama H, Yongisiri S, Chotiapisitkul S, Nakamura S, Kojima H, Doi K. Progressive supranuclear palsy with abnormal neuronal and glial argyrophilic fibrillary structures in the brain of an aged albino cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *Acta Neuropathol.* 100: 580-586. 2000

③ Kimura N, Nakamura S, Goto N, Narushima E, Hara I, Shichiri S, Saito K, Nose S, Hayashi T, Kawamura S, Yoshikawa Y. Senile plaques in a Western Roland gorilla. *Exp. Anim.* 50: 77-81. 2001

④ Nakayama H, Kiatipattanasakul W,

Nakamura S, Miyawaki K, Kikuta F, Uchida K, Kuroki K, Makifuchi T, Yoshikawa Y, Doi K. Fractal analysis of senile plaque observed in various animal species. *Neurosci. Lett.* 297: 195-198. 2001

⑤ Miyawaki K, Nakayama H, Nakamura S, Uchida K, Doi K. Three-dimensional structures of canine senile plaques. *Acta Neuropathol.* (in press).

2. 学会発表

⑥木村展之、中村紳一朗、小野文子、榊原一兵、吉川泰弘。カニクイザル presenilin-2 蛋白の免疫組織化学的検索。第41回日本神経病理学会。米子。2000

⑦宮脇京子、中山裕之、中村紳一朗、土井邦雄。共焦点レーザー顕微鏡を用いたイヌ老人斑の三次元構造解析。第41回日本神経病理学会。米子。2000

⑧中山裕之、ウィジット・K、中村紳一朗、小島英明、土井邦雄。進行性核上麻痺と考えられた老齡カニクイザルの一例。第41回日本神経病理学会。米子。2000

⑨中村紳一朗、尾関由里子、木村展之、中山裕之、吉川泰弘、土井邦雄、高橋公正。ニワトリ脳組織の β アミロイド前駆体蛋白 (APP) について。第130回日本獣医学会。大阪。2000

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

老齢サル認知能力に関する研究のなかでも、空間的認知能力と記憶特性に関しては、主に遅延反応課題を用いて検証がなされており、空間(位置)の記憶課題では短期の遅延時間でも加齢の影響が顕著であるとの結果が報告されてきた。しかし空間(位置)課題の獲得過程における年齢間での差については検出できなかった。そこで本研究では、獲得段階から短時間の遅延を含む Delayed Non Matching-to-Position (DNMP:遅延場所型非見本合わせ)課題を用いて、空間(位置)課題の獲得における加齢の影響を検討した。さらに一度獲得した課題の呈示条件を操作し、課題に共通した情報に対する応用性について、年齢間で検討した。

A, 研究目的

老齢ザルの脳に高齢者やアルツハイマー病で見られる老人斑が形成されることが本研究班の他のグループにより明らかにされた。そのためこうした老齢ザルで高次認知機能の障害あるいは記憶獲得課程における機能減退が見られるか否かを評価するシステムを開発する必要がある。本研究では WGTA 法を応用して、高次認知及び記憶機能の加齢による影響を明らかにする事を目的とした。

B, 研究方法

(1) 実験 1 : DNMP:Original 課題

①被験体:ニホンザル7頭(年齢:老齢群4頭、24-25歳齢・若齢群3頭、4-9歳齢)

②装置:行動観察用のビデオカメラ付属の WGTA

③手続き:

物体刺激を用いた遅延非見本合わせ課題の手続きを、位置刺激の課題として踏襲した。刺激板にある左右2つの穴の1つに報酬を入れ、それを円形のオブジェクトで覆った状態で呈示し、被験体に強制選択させる。次に刺激位置変更の

ために不透明版で刺激板と被験体の間を遮蔽し(遅延時間5秒)、強制選択位置とは反対の位置の穴のみに報酬を入れ、左右両方の穴を同型の円形のオブジェクトで覆い、不透明版を上げて呈示し自由選択させる。このとき報酬の入っている方のオブジェクトを選択した場合を正答とした。1セッション10試行で1日2セッション、3セッション連続で90%以上の正答率を達成規準とした。また獲得過程の行動解析は、選択時の被験体の Body Orientation について行った。

(2) 実験 2 : DNMP:Variable-Object 課題

①被験体:実験1を終了したニホンザル7頭(年齢:老齢群4頭、24-25歳齢・若齢群3頭、4-9歳齢)

②装置:行動観察用のビデオカメラ付属の WGTA

③手続き:

課題の手続きは Original 課題と同様であるが、位置刺激の呈示条件が異なる。Original 課題の場合、左右2つの穴を覆うオブジェクトはすべての試行において同型2個の1組が使用された。Variable-Object 課題の場合は同

型2個のオブジェクト10組を使用し、セッション内では各試行で異なるオブジェクト対が位置刺激として呈示された。1セッション10試行で1日1セッション、同日にOriginal課題も1セッション行った。2セッション連続で90%以上の正答率を達成規準とした。

C, D, 研究成果と考察

(1) DNMP:Original 課題の結果と考察

①課題の獲得には、年齢間での顕著な差がみられた。獲得するまでに要した平均試行数は老齢群 433 試行,若齢群 180 試行で、老齢群の方が有意に多かった。また獲得までの正答率の推移では、75%から基準達成までの試行数や上昇率は両群とも同様であったが、老齢群はチャンスレベルから75%までの期間がその4倍以上長かった。Body Orientationに関する行動解析からは、獲得過程において老齢の選択行動パターンは安定しにくいという傾向がみられた。

遅延反応課題のように獲得時に記憶の負荷がかからない課題の結果とは対照的に、位置刺激課題であっても獲得時に遅延の挿入という記憶的負荷が要求されると、老齢の課題獲得は顕著に阻害されることが判明した。しかしいずれの老齢個体も最終的には獲得できたということは、5秒程度の位置情報の保持能力は阻害されていないことを示唆する。獲得過程のチャンスレベル期間が長いことと行動パターンの不安定さは密接に関わっていると考えられ、今後は行動的方略としてのBo②結果をまとめると、老齢ザルにおいて、獲得段階から遅延時間が挿入された「位置再認課題」の学習能力は低下している。遅延をとまなわれない位置課題では獲得に差がないことから、記憶の負荷が老齢ザルの課題獲得を困難

にした要因であると考えられる。dy Orientation について詳細な検討が必要である。

(2) DNMP:Variable-Object 課題の結果と考察

①課題の獲得には、Original課題と同様に、年齢間での顕著な差がみられた。獲得するまで

に要した平均試行数は老齢群 117 試行,若齢群 27 試行で、老齢群の方が有意に多かった。老齢群の獲得までの正答率の推移は、75%から基準達成までの期間に対してチャンスレベルから75%までの期間が2倍以上長かった。獲得過程初期の反応時間は、老齢群のVariable-Object課題の場合のみ有意に長かった。

呈示されるオブジェクトが変化しただけで、一度獲得した手続きにもかかわらず、反応時間が長くなったり即時の獲得ができないということから、老齢は若干の呈示条件の変化にも脆弱であり、老齢ザルの獲得した課題の情報は限られた場面条件に依存した、非常に限定的なものであることを示唆する。老齢は課題に共通する情報を見出すことが困難、あるいは情報の応用能力に乏しいと考えられる。②結果をまとめると、老齢ザルにおいて、位置再認課題の転移(学習セット形成)はみられたが、その速度は遅い。老齢ザルは次元内転移にもかかわらず初期の課題では再獲得に時間がかかったことから、老齢ザルの認知機能は若干の呈示条件の変化にも脆弱であり、獲得した課題の情報は限られた条件場面に依存した限定的なものであることが示唆された。

(3) 改良型指迷路による空間認知能力テスト

トの結果と考察

エラーボックス付きの4段迷路課題においては、老若に差はでなかった。遅延時間をもなう指迷路に改良することになった。

E. 研究発表

<学会活動>

(1)久保南海子、川崎勝義、小山高正

「老齡ニホンザルにおける遅延反応課題とその行動解析」日本動物心理学会第60回大会

(上智大学)平成12年6月3-4日

(抄録)動物心理学年報 vol.50 (2):134

(2)川崎勝義、臼倉智子、久保南海子、土田順子、山海直、寺尾恵治、小山高正

「カニクイザルの指迷路学習課程の分析」日本動物心理学会第60回大会(上智大学)

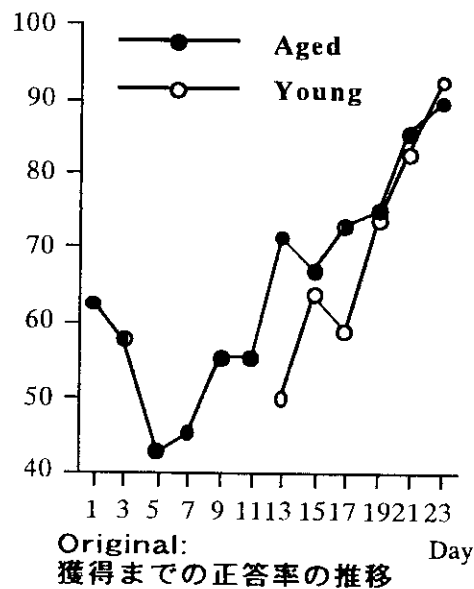
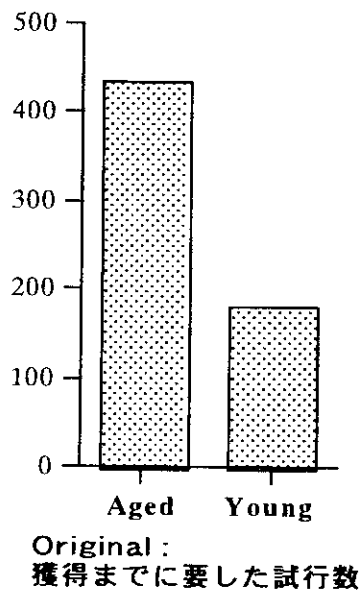
平成12年6月3-4日(抄録)動物心理学年報 vol.50 (2):135

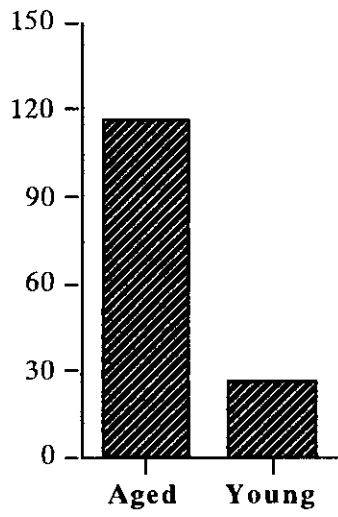
(3)久保南海子、川崎勝義、小山高正

老齡ザルにおける遅延場所型非見本合わせ課題—獲得過程と提示条件の検討—

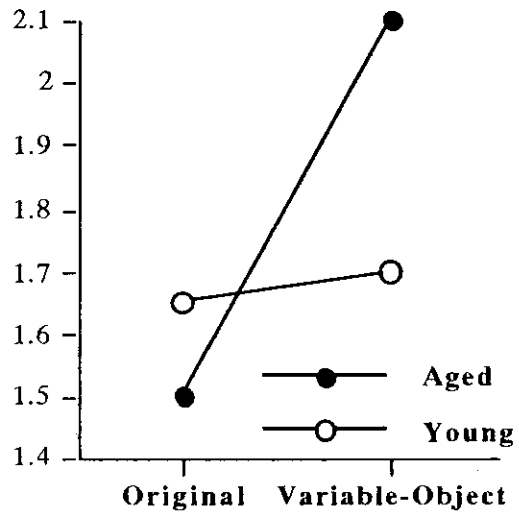
日本心理学会第64回大会(京都大学)平成12年11月6-8日

日本心理学会第64回大会論文集:p.824





Variable-Object:
獲得までに要した試行数



呈示条件別の反応時間

神経伝達物質関連遺伝子多型と老齡ザルの行動特性

分担研究者 村山美穂（岐阜大学農学部）

研究要旨： 高齡による痴呆症など中枢神経系の機能障害の発現には個体差が大きい。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た。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、筑波医学実験用霊長類センターで飼養されているカニクイザルの老齡個体 45 頭と非老齡個体 45 頭のドーパミンレセプター（DRD4）、セロトニンレセプター（5-HTT）、ドーパミントランスポーター（DAT1）遺伝子の多型領域を PCR 増幅し対立遺伝子頻度を比較した。また類人猿のモノアミンオキシダーゼ（MAO A）遺伝子の多型領域を PCR 増幅し、対立遺伝子頻度を解析した。

A. 研究目的

ヒトではさまざまな神経伝達物質関連遺伝子に多型が存在することが報告されており、そのうちのいくつかの遺伝子では遺伝子型と気質・性格との相関が示唆されている。DRD4 はエクソン部分に 48 塩基を単位とする 2-12 回の反復配列が存在し、反復数が多い対立遺伝子を持つと性格テストで「新奇性追求」のスコアが高い傾向にある（Ebstein *et al.*, 1996; Benjamin *et al.*, 1996）。5-HTT 遺伝子のプロモーター領域にも、約 20 塩基を単位とした反復配列の多型があり、14 回または 16 回反復の対立遺伝子が高頻度を占める。14 回反復遺伝子を持つ人は、不安の感じやすさ（anxiety）において高得点を示した（Lesch *et al.*, 1996）。DAT1 遺伝子には、3'非翻訳領域に 40 塩基を単位とした反復配列多型が存在する。3-13 回の反復数を持つ対立遺伝子が報告されており、9 回反復遺伝子を持つ人は新奇性追求傾向が低いと報告されている（Sabol *et al.*, 1999）。また、精神疾患との関連につ

いては、DRD4 の 7 回反復遺伝子とギャンブル依存症（Perez de Castro *et al.*, 1997）、5-HTT の 14 回反復遺伝子とアルツハイマー病など精神疾患（Oliveira *et al.*, 1998; Rosenthal *et al.*, 1998）との関連が報告されている。DAT1 では、11 回反復遺伝子とパーキンソン病の罹患率（Le Couteur *et al.*, 1997）、7 回反復遺伝子とアルコール依存症（Muramatsu *et al.*, 2000）、10 回反復遺伝子と注意欠陥・多動性症候群（ADHD）（Gill *et al.*, 1997）との関連が報告されている。こうした脳機能への影響は、神経伝達物質に対する感受性や伝達物質量を調節する能力が遺伝子型によって相違しているためと考えられるが、詳細なメカニズムについてはまだ不明な点が多い。

本研究では、非ヒト霊長類における神経伝達物質関連遺伝子の多型性について解析し、サル類の行動特性、特に高齡化に伴う行動変化を推定する指標となりうるかを調べ、老化モデル動物としてのサル類の遺伝的背景を明らかにすることを目的としている。

長寿個体と通常個体の間では高次脳機能が

遺伝的に異なっている可能性がある。そこで筑波医学実験用霊長類センターで維持されているカニクイザル老齢個体群と非老齢個体群との間で DRD4, 5-HTT, DAT1 多型領域の対立遺伝子頻度を比較し、対立遺伝子頻度の差違や老齢個体群特有の対立遺伝子が見られるかどうかを検証した。

MAO A はセロトニンやドーパミンなどの神経伝達物質を分解する酵素であり、MAO A 遺伝子のプロモーター領域には 30 塩基を単位とした反復配列が存在し、反復数 3 回と 4 回の対立遺伝子が高頻度を占める。プロモーター活性は 4 回のほうが 3 回に比べて高い。また特定の対立遺伝子とアルコール依存症 (Schmidt *et al.*, 2000) やパニック障害 (Deckert *et al.*, 1999) などの神経疾患との関連が報告されている。今回、新たに MAO A 遺伝子多型領域の PCR 増幅条件を類人猿で決定し、対立遺伝子頻度を調べた。

B. 研究方法

筑波医学実験用霊長類センターで維持されているカニクイザル老齢個体群 (20 才以上) 45 頭と、対照として非老齢個体群 45 頭 (DAT1 は 100 頭) の DRD4, 5-HTT, DAT1 多型領域を PCR 増幅し、アガロースゲル電気泳動によって遺伝子型を判定した。

チンパンジー、ゴリラ、オランウータン、テナガザルの MAO A 対立遺伝子頻度を調べた。PCR 産物をゲルから抽出して塩基配列を決定し、反復配列数を確認した。

C. 研究結果

表 1 にカニクイザル老齢群と対照群の DRD4, 5-HTT, DAT1 多型領域の対立遺伝子頻度を示した。DRD4 は反復数 5 回の対立遺伝子が大部分を占め、反復数 5 回が老齢個体 5 頭、対照個体 4 頭に、いずれもヘテロ型で見いだされた。5-HTT は反復数 23 回の対立遺伝子が大部分を占め、反復数 22 回が老齢個体 4 頭に、いずれもヘテロ型で見いだされたが、対照群はすべて反復数 23 回ホモ個体のみであった。 χ^2 検定の結果、老齢群と対照群間に 5% 有意水準で有意差が認められた。DAT1 は反復数 12 回の対立遺伝子が大部分を占め、反復数 11 回が対照個体 1 頭にヘテロ型で見いだされ、老齢群では反復数 12 回のホモ型のみ見いだされた。

表 2 にヒトと類人猿の MAO A 対立遺伝子の頻度分布を示す。ヒトでは反復数 3, 3.5, 4, 5 回の 4 種類の対立遺伝子の存在が確認されており、頻度分布に人種による差があることが報告されている (Sabol *et al.*, 1998)。類人猿の PCR 産物はすべて、ヒトで最も短い反復数 3 回以下に相当する長さであった。塩基配列を確認したところ、チンパンジーでは、ヒトと同じ 30 塩基の反復単位が 1 個存在しており、調査した 45 個体すべてが同じ型であった。ゴリラでは、30 塩基の前半に相当する 18 塩基が反復単位となっており、反復数 2 回、3 回、5 回の対立遺伝子が見いだされた。他の類人猿の対立遺伝子についても、現在、塩基配列の確認を行っている。

D. 考察

5-HTT では、反復数 22 回の対立遺伝子が

老齡群にのみ見いだされ、対立遺伝子の分布に对照群と有意差があることが示された。この現象の生物学的意味は、各対立遺伝子の機能（プロモーター活性）を調べれば明らかになるかもしれない。

今回、新たに MAO A 遺伝子の多型領域を類人猿で解析し、ヒト以外の動物で多型の存在をはじめて明らかにした。これら対立遺伝子間のプロモーター活性の異同についても解析を行う予定である。今後、カニクイザルでも MAO A プロモーターの塩基配列や多型性の有無について検討する。またサル類の神経伝達物質関連遺伝子群について情報を蓄積していく。

E. 結論

カニクイザルの老齡個体 45 頭と非老齡個体 45 頭において、神経伝達物質関連遺伝子 DRD4, 5-HTT, DAT1 の多型領域を PCR 増幅し対立遺伝子頻度を比較した結果、5-HTT では 22 回反復をもつ対立遺伝子が老齡群にのみ存在していた。また類人猿の MAO A 遺伝子の多型領域を解析し、ゴリラ、オランウータン、テナガザルで多型の存在を確認した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Wakao, K., Matsuzaki, I., Terao, K., Inoue-Murayama, M., Shimojo, N. & Murayama, Y.: Involvement of granzyme B expression in the enhancement of natural killer activity by β -

endorphin. *Brain Behav. Immun.* 14:27-40, 2000.

2) Inoue-Murayama, M., Sugimoto, Y., Niimi, Y. & Aso, H.: Type XVIII collagen is newly transcribed during bovine adipogenesis. *Differentiation* 65: 281-285, 2000.

3) Murayama, Y., Terao, K. & Inoue-Murayama, M.: Molecular cloning and characterization of cynomolgus monkey Fas. *Hum. Immunol.* 61: 474-485, 2000.

4) Inoue-Murayama, M., Niimi, Y., Takenaka, O., Okada, K., Matsuzaki, I., Ito, S. & Murayama, Y.: Allelic variation of the serotonin transporter gene polymorphic region in apes. *Primates* 41: 267-273, 2000.

5) Inoue-Murayama, M., Niimi, Y., Takenaka, O. & Murayama, Y.: Allelic variation of the dopamine receptor D4 gene polymorphic region in gibbons. *Primates* 41: 383-392, 2000.

6) 井上(村山)美穂, 新美陽子, 安達さとみ, 三谷宏明, 竹中修, 伊藤慎一, 村山裕一: 霊長類における神経伝達物質関連遺伝子の進化. *霊長類研究* 16: 69-76, 2000.

7) Matsunaga, S., Mukai, R., Inoue-Murayama, M., Yoshikawa, Y. & Murayama, Y.: Sequence and functional properties of African green monkey CD4 silencer. *Immunol. Lett.* 75: 47-53, 2000.

8) 村山美穂: 機能に関与する遺伝子を探す. 動物遺伝育種シンポジウム組織委員会(編): 家畜ゲノム解析と新たな家畜育種戦略. シュプリンガー・フェアラーク東京(東京) (ISBN 4-431-70873-1), pp. 10-12, 2000 (共著).

9) 井上(村山)美穂: 本当の父親は誰か—遺伝子から社会を見る. 杉山幸丸(編著): 霊

- 長類生態学—環境と行動のダイナミズム。京都大学学術出版会（京都），（ISBN 4-87698-406-9），pp.313-336, 2000（共著）。
- 10) 井上（村山）美穂・竹中修：遺伝子からみた霊長類の社会行動の進化。松沢哲朗・長谷川寿一（編）：心の進化—人間性の起源をもとめて。岩波書店（東京），（ISBN 4-00-005381-7），pp.198-202, 2000（共著）。
- 11) 井上（村山）美穂：性格関連遺伝子の霊長類における進化。学術月報 53: 21-25, 2000.
- 12) 井上（村山）美穂：性格遺伝子としての7回膜貫通型受容体遺伝子。佐藤公道・赤池昭紀（編）：別冊「医学のあゆみ」7回膜貫通型受容体研究の新展開—ポストゲノム時代の受容体研究のゆくえ—。医歯薬出版株式会社（東京） pp. 8536-8540, 2001.
- 13) Minvielle, F., Ito, S., Inoue-Murayama, M., Mizutani, M. & Wakasugi, N.: Genetic analyses of plumage color mutations on the Z chromosome of Japanese quail. *J. Hered.* 91: 499-501, 2000.
- 14) Kayang, B. B., Inoue-Murayama, M., Nomura, A., Kimura, K., Takahashi, H., Mizutani, M. & Ito, S.: Fifty microsatellite markers for Japanese quail. *J. Hered.* 91: 502-505, 2000.
- 15) 井上（村山）美穂，新美陽子，加藤和実，松浦直人，宮川修一，村山裕一，伊藤慎一：アジア在来犬のドーパミンD4受容体遺伝子多型（予報）。*在来家畜研究会報告* 19: 133-143, 2001.
- 16) Inoue-Murayama, M., Kayang, B. B., Kimura, K., Ide, H., Nomura, A., Takahashi, H., Nagamine, Y., Takeda, T., Hanada, H., Tatsuda, K., Tsudzuki, M., Matsuda, Y., Mizutani, M., Murayama, Y. & Ito, S.: Chicken microsatellite primers are not efficient markers for Japanese quail. *Anim. Genet.* 31: 2001 (in press).
- 17) Inoue-Murayama, M., Niimi, Y., Takenaka, O. & Murayama, Y.: Evolution of personality-related genes in primates. In "Contemporary Neuropsychiatry" Miyoshi, K. *et al.* eds., Springer-Verlag, Tokyo, pp. 433-436, 2001 (in press).

2. 学会発表

- 1) Inoue-Murayama, M., Niimi, Y., Takenaka, O. & Murayama, Y.: Evolution of personality-related genes in primates. The 3rd International Congress of Neuropsychiatry. (招待講演) Abstracts: 63, 2000 (京都) .
- 2) Kayang, B. B., Inoue-Murayama, M., Nomura, A., Kimura, K., Takahashi, H., Mizutani, M. & Ito, S.: Development and characterization of Japanese quail microsatellite markers and their utility in chicken. 27th International Conference on Animal Genetics, Abstracts: 6, 2000 (U. S. A.) .
- 3) Inoue-Murayama, M., Niimi, Y., Kato, K., Momoi, Y., Murayama, Y., Ito, S. & Iwasaki, T.: Allelic variation of the D4 dopamine receptor polymorphic region in two dog breeds, Golden Retriever and Shiba. 27th International Conference on Animal Genetics, Abstracts: 103, 2000 (U. S. A.) .
- 4) 井上-村山美穂，新美陽子，安達さとみ，三谷宏明，竹中修，伊藤慎一，村山裕一：霊長類における神経伝達物質関連遺伝子の進化。（霊長類進化研究会）*霊長類研究* 16: 69-76, 2000（犬山）。