

- intracellularly in cells derived from human brain. *Biochemistry* 2000;39:10831-10839.
- 3) Kawarabayashi T, Younkin LH, Saido TC, et al. Age-dependent changes in brain, CSF, and plasma amyloid  $\beta$  protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2001;21:372-381.
  - 4) Suzuki N, Cheung TT, Cai XD, et al. An increased percentage of long amyloid  $\beta$  protein secreted by familial amyloid  $\beta$  protein precursor ( $\beta$  APP717) mutants. *Science* 1994;264:1336-1340.
  - 5) Kanai M, Matsubara E, Isoe K, et al. Longitudinal study of cerebrospinal fluid levels of tau, A beta1-40, and A beta1-42(43) in Alzheimer's disease: a study in Japan. *Ann Neurol* 1998;44:17-26.
  - 6) Lee SJ, Liyanage U, Bickel PE, et al. A detergent-insoluble membrane compartment contains A  $\beta$  in vivo. *Nat Med* 1998;4:730-734.
  - 7) Wolozin B, Kellman W, Rousseau P, et al. Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arch Neurol* 2000;57:1439-1443.
  - 8) Refolo LM, Pappolla MA, Malester B, et al. Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. *Neurobiol Dis* 2000 ;7:321-31.
  - 9) Simons K, Ikonen E Functional rafts in cell membranes. *Nature* 1997;387:569-572.
  - 10) Choo-Smith LP, Garzon-Rodriguez W, Glabe, et al. CG, Acceleration of amyloid fibril formation by specific binding of A  $\beta$ -(1-40) peptide to ganglioside-containing membrane vesicles.
  - 11) Taraboulos A, Scott M, Semenov A, et al. Cholesterol depletion and modification of COOH-terminal targeting sequence of the prion protein inhibit formation of the scrapie isoform. *J Cell Biol* 1995;129:121-32.

## Mechanism of amyloid $\beta$ protein deposition in APPsw mice

by

Mikio SHOJI

Takeshi KAWARABAYASHI, Yasuo HARIGAYA, Masaki IKEDA,

Etsuro MATSUBARA

from

Department of Neurology, Gunma University of school Medicine

To clarify the mechanism of amyloid  $\beta$  protein ( $A\beta$ ) deposition in APPsw mice (Tg2576 mice) model of Alzheimer's disease (AD),  $A\beta$  was evaluated by ELISA, immunoblotting, and immunocytochemistry. The expression of amyloid precursor protein in APPsw mice is 7 fold of nontransgenic mice, and does not change with aging. Changes in  $A\beta$  begin at 7-8 months as SDS-insoluble forms of  $A\beta$  42 and  $A\beta$  40 that require formic acid for solubilization appear. As insoluble  $A\beta$  appears, SDS-soluble  $A\beta$  decreases significantly suggesting that it may be converting to an insoluble form. Histologically, neuritic plaques appear from 8 months while diffuse plaques do not appear until 12 months. Coincident with the marked deposition of  $A\beta$  in brain, there is a significant decrease in CSF  $A\beta$  42 and plasma  $A\beta$ . This may be the reason why decrease of  $A\beta$  42 in CSF and plasma is a useful premorbid biomarker for AD.

When brains of APPsw mice are homogenized with Triton-X, and separated by sucrose gradient fractionation,  $A\beta$  exists in lipid rafts fraction.  $A\beta$  in lipid rafts increases from the early period of amyloid deposition. By EM, amyloid fibrils are detected from lipid rafts. Lipid rafts may be the place where the  $A\beta$  deposition and aggregation begin.

## 脳アミロイドーシスの治療法の検討

研究者 東海林 幹 夫\* 針 谷 康 夫\* 瓦 林 毅\*  
松 原 悦 朗\* 池 田 将 樹\* 岡 本 幸 市\*  
平 井 俊 策\*\*

### はじめに

脳アミロイドーシスはアルツハイマー病と脳血管アミロイドアンギオパチーによる脳血管障害患者にみられる特徴的变化である。この2つの疾患は社会の高齢化とともに近年、急増しており、両者の疾患原因である脳アミロイドーシスの早急な治療法の確立が求められている。さらに、アルツハイマー病患者脳では脳アミロイドとともに神経原線維変化も出現するため、この2つの病理的变化の発現機序、関連と治療法の開発も求められている。我々はこの目的のために脳アミロイドーシスを再現する動物モデルの開発を行い、脳アミロイドの形成機序を解明してきた。本年度の研究ではさらに、脳アミロイドーシスによる痴呆の解明のために、神経原線維変化を出現するマウス (Tau R406W) の開発とともに、APPswマウスより4倍の速度で脳アミロイド沈着を再現するマウス (APPswxPresenilin-1 L286V) を開発して、治療法の評価をより迅速に可能にするシステムの確立を先ず行った。さらに、脳アミロイドーシスの根本的な治療法として注目されつつあるA $\beta$ ワクチン療法を本邦でも可能かどうか検討するため、APPswマウスを用いてA $\beta$ 42ワクチンの効果を検

討とするとともに、この治療を行う場合に最も問題となると考えられる異常コンフォーメーションを有したA $\beta$ が近年問題となっているヒトプリオンと同様に伝播性を有するかどうか検討を加えた。

### 対象と方法

16匹のAPPswマウス (7male、9female) に、6ヶ月齢 から50 $\mu$ gのA $\beta$ 42をアジュバントともに皮下注射し、免疫を行った。免疫は1回/月で行い、12ヶ月齢で脳を検索した。対照として18匹の無処理age-matched APPsw miceを用いた。半脳は4%パラフォルム固定パラフィン切片を作成し、Ab9201および各種A $\beta$ に対する抗体で免疫染色を行った。A $\beta$ 沈着の評価は海馬がみえる前額断大切片をNIH imageを用いて免疫染色陽性面積の総計を計算するとともに、顕微鏡で同定された直径50~150 $\mu$ mの大型の老人斑とそれ以下の老人斑、アミロイドアンギオパチーに分けて出現数を定量した。APPsw miceの半脳をTBSと70%ギ酸で連続抽出し、鈴木らによって確立されたSandwich ELISA系を用いて経時的にA $\beta$ 40、A $\beta$ 42量を測定した。また、脳検索時に同時に血液を採取し、A $\beta$ 42に対する抗体価の上昇を検討した。

アルツハイマー病患者脳約1gに1mlの2%SDSを加え、テフロンホモジェナイザーでホモジェナイズし、100,000xgで遠心した。沈査を70%ギ酸をも

\*群馬大学医学部神経内科

\*\*東京都立神経病院

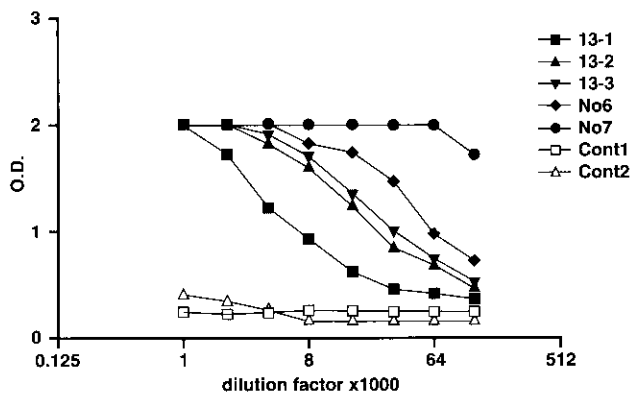


Fig. 1. Anti-Aβ42 antibody titer(ELISA)

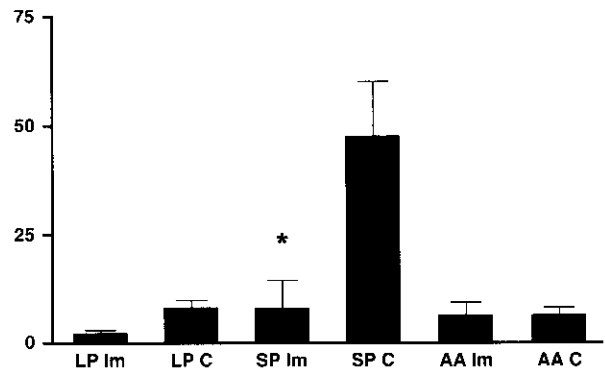


Fig. 2a. Number of senile plaques

ちいて再度抽出して得られた脳Aβアミロイド凝集粗分画をさらにSuperose 12カラムを用いて、monomer (15分画) と oligomer (13,14分画) に分離して、それぞれの分画5 μgを3.5~5ヶ月齢APPswマウス計32匹の脳内に注入し、~3ヶ月後に脳を組織学的に検索した。対照として同年齢のnon-transgenic miceを検索した。

### 結果と考察

Aβ42免疫APPsw miceは16匹の内11匹が経過中に死亡した。生存した5匹のすべて(13-1, 13-2, 13-3, No6, No7)に対照マウス (cont1, cont2) に比べて×8,000倍から×64,000倍に投与したAβ42に対する抗体価の上昇がみられた (Fig.1)。組織学的にはこのうち4匹に組織学的に老人斑蓄積の減少がみられた。海馬を含む前額断大切片で直径50~150 μmの大型の老人斑 (Large plaque: LP) とそれ以下の老人斑 (Small plaque: SP)、アミロイドアンギオパシー (Amyloid angiopathy: AA)に分けて出現数を計算し、免疫群 (Im) と対照群 (C) では2.6 ± 1.7(LPIm), 8.6 ± 5.9(LPC), 8.8 ± 12.0(SPIIm), 47.3 ± 34.7(SPC), 7.8 ± 5.9(AAIm), 8.1 ± 6.3(AAC)であり、免疫群で有意に小型の老人斑の抑制が認められた (P<0.05, Fig.2a)。同じ切片でNIH imageを用いてAβ免疫染色陽性部位を定量すると、免疫群 (Area Im) で839 ± 649 pixelで対照群では1098 ± 581 pixelで、有意さはみられなかった (Fig. 2b)。以上のことは、免疫群では小経の老人斑の生成を抑制する

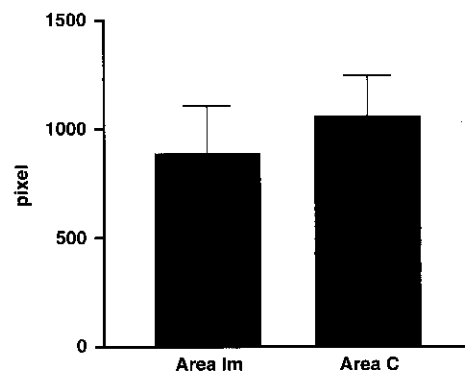


Fig. 2b. Senile plaque area

ことを示している。

次に、ELISAでAβ40およびAβ42を測定した。TBSで抽出した可溶性Aβ分画では免疫群Aβ40は326 ± 452 fmol/ml (Im)、Aβ42は80 ± 7 fmol/ml (Im)であった。対照群Aβ40は1261 ± 1204 fmol/ml (Cont)、Aβ42は76 ± 78 fmol/ml (Cont)であった。蓄積したアミロイドを定量するギ酸抽出分画では免疫群Aβ40は556 ± 559 pmol/ml (Im)、Aβ42は111 ± 61 pmol/ml (Im)であった。対照群Aβ40は1064 ± 712 pmol/ml (Im)、Aβ42は231 ± 130 pmol/ml (Im)であった。このギ酸分画の免疫群でAβ42の有意な蓄積の減少が認められた (P<0.05, Fig. 3)。したがって、このAβ免疫療法で主に改善するのは脳アミロイドとして沈着したAβ42と考えられる。

ヒトAβアミロイド注入実験では32匹のAPPsw

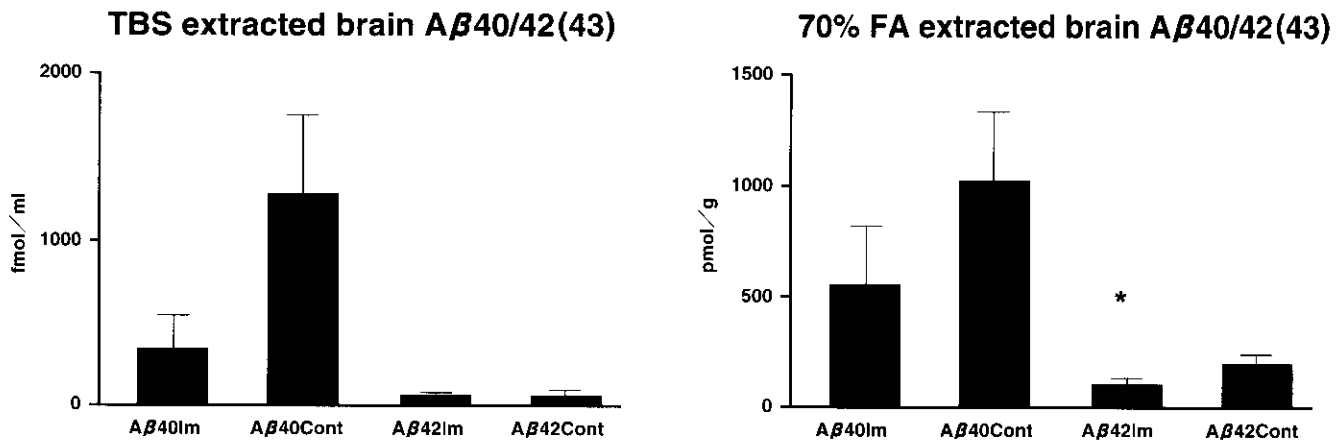


Fig. 3, ELISA for Aβ40 and Aβ42(43) in the Tg brain

マウスの内、2ヶ月後に生存したマウスでは5匹であった。死亡は注入一週間後に多く、広範な炎症壊死像と注入した脳アミロイド沈着の代謝像が観察された。注入部位以外にもAβが染色された。経時的な検討では注入したヒト脳アミロイドは塊状となって、transgenic mice群、対照群ともに認められ、3ヶ月後でも代謝されずに沈着していた。対照の生食群ではこのような変化はみられなかった。ヒトAβアミロイドを投与したtransgenic miceで3ヶ月後に注入部位の対側に新たな老人斑の出現がみられた。以上のことは、ヒトAβアミロイドは一旦脳内に存在すると代謝に抵抗性で長期間存在し、Aβアミロイドの形成を促進する可能性があることを示している。

以上のことから、Aβ42による免疫療法は明らかに脳アミロイド沈着を阻止することが可能であると思われた。このことから脳アミロイドーシスの根本的な治療は可能であると思われる。現実的にヒトに臨床応用するためには、これらの動物モデルを用いて、さらに大規模な基礎的検討の集積、投与方法の改善などが迅速に必要と思われる。さらに、脳アミロイドーシスの程度と治療法の効果をヒトで評価可能な臨床マーカーの確立も急がれる。経過中に多数の死亡例がみられたこと、効果が生き残ったマウスの約4割にしかみられなかったことから、今後、投与方法の改善や副作用の詳細な解明が必要であると思われた。ヒトAβアミ

ロイド注入実験ではアミロイド沈着促進傾向がみられたことから、アルツハイマー病の素因のあるものに、もし、構造変異したAβが投与された時には逆に脳アミロイド形成を促進する可能性が考えられた。したがって、ヒトにヒトAβ42を投与するワクチン療法で、もし、Aβ42が構造変化を起こしたAβ42が投与された場合、逆にAβアミロイド蓄積を促進する可能性があり、Aβワクチン療法で解決すべき重要な課題と考えられた。今後、さらに詳細な検討とヒトへの現実的な臨床応用が望まれる。

## 文 献

- 1) Schenk D, Barbour R, Dunn W, et al. Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature*. 1999 8;400(6740):173-7.
- 2) Bard F, Cannon C, Barbour R, et al. Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nat Med*. 2000 Aug;6(8):916-9.
- 3) Weiner HL, Lemere CA, Maron R, et al. Nasal administration of amyloid-beta peptide decreases cerebral amyloid burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 2000

48(4):567-79.

- 4 ) Morgan D, Diamond DM, Gottschall PE, et al. A  $\beta$  peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature*. 2000 Dec 21;408(6815):982-5.
- 5 ) Janus C, Pearson J, McLaurin J, et al. A  $\beta$  peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease. *Nature*. 2000 21;408(6815):979-82.
- 6 ) Chen G, Chen KS, Knox J, et al. A learning deficit related to age and  $\beta$ -amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature*. 200021;408(6815):975-9.

## The study of therapy of brain A $\beta$ amyloidosis

by

Mikio SHOJI\*

Yasuo HARIGAYA\*, Takeshi KAWARABAYASHI\*, Etsuro MATSUBARA\*,  
Masaki IKEDA\*, Koich OKAMOTO\*, Shunsaku HIRAI\*\*

from

\*Department of Neurology, Gunma University School of medicine

\*\*Tokyo metropolitan Neurological Hospital

The pathogenesis of the brain amyloidosis and its therapy were studied using transgenic mice model. Two special transgenic mice showing brain tauopathy (tau R406W) and rapid deposition of A  $\beta$  (APPsw x Presenilin-1 L286V) were newly invented. To evaluate A  $\beta$  vaccine therapy, A  $\beta$  42 was injected subcutaneously into APPsw mice every month from 6 years old. At 12 months old, small senile plaques and the amounts of A  $\beta$  42 amyloids were significantly decreased. To clarify the possibility to accelerate amyloid deposits by the human brain A  $\beta$  with abnormal conformation, the formic acid extracted human A  $\beta$  amyloid was injected into the APPsw brain. Injected A  $\beta$  amyloid existed during 3 months and new senile plaques appeared in the opposite site cortex at 6.5 months. These findings suggested the effect of human amyloids to facilitate amyloid formation in the brain with risk factors. Further investigation should be necessary to apply these findings for developing therapy of Alzheimer's disease.

## 脳アミロイドーシスは痴呆を引き起こす

研究者 針 谷 康 夫\* 東海林 幹 夫\* 富 所 康 志\*  
池 田 将 樹\* 松 原 悦 朗\* 瓦 林 毅\*  
五十嵐 康\*\*

### 目 的

現在、アルツハイマー病(AD)の発症機序として、まずアミロイド $\beta$ 蛋白(A $\beta$ )が沈着して脳A $\beta$ アミロイドーシスが起り、続いて神経原線維変化と神経細胞死などが出現してくるアミロイド・カスケード説が有力視されている。しかしながら、この脳A $\beta$ アミロイドーシスがどのように痴呆を発症してくるのか未だ明らかではない。我々は、Initial eventである脳A $\beta$ アミロイドーシスの生成機序の解明や予防が最も重要であると考え、これまで家族性ADの原因遺伝子を発現するtransgenic mice(TG)を作成解析することにより、これらの検討を行ってきた。

今回、我々は脳A $\beta$ アミロイドーシスと記憶学習障害を認めるTG (APPsw mice) を用いて、AD脳でみられるsecondary eventすなわち神経細胞やシナプスの消失、グリア細胞の反応性や過剰リン酸化されたtauの蓄積、神経原線維変化などの病理学的変化やAcetylcholine (ACh) の低下などの生化学的変化が認められるかどうかを明らかにした。

### 方 法

1) 4, 8, 12, 18ヶ月齢のAPPsw mice脳のparaffin切片を抗A $\beta$ 抗体で染色し経時的変化を明らか

にした。Gallyas染色で神経原線維変化を検索した。

- 2) 隣接切片をNissl+Congo-redの2重染色を行い、アミロイドコアを中心に同心円状に4つの領域に分け各々の領域に含まれる神経細胞・非神経細胞を計測し、単位面積あたりの細胞密度を求め比較検討した(図1a)。蛍光色素(DAPI)とTUNEL法で染色しApoptosisの有無を検討した。
- 3) 隣接切片を抗 $\beta$  APPC末抗体、抗ApoE抗体、抗GFAP抗体、抗Microglia抗体、抗Somatostatin抗体、抗Substance P抗体、抗Choline acetyltransferase抗体で免疫染色を行った。
- 4) プレシナプスマーカーである $\alpha$ -synuclein、ポストシナプスマーカーであるDrebrinに対する抗体を用いて免疫染色し、シナプス量を比較検討した。
- 5) 各種リン酸化部位特異tau抗体(anti-PS199, anti-PS205, anti-PT231/PS235, anti-PS396, anti-PS413, AT8, Alz50, PHF1, CP13)および抗ubiquitin抗体、さらにtau蛋白質リン酸化酵素関連(anti-act GSK3 $\beta$ , anti-inact GSK3 $\beta$ , anti-GSK3 $\alpha$ , anti-act CDK5, anti-MAPK, anti-fyn)に対する抗体を用いて免疫染色を行いtauの蓄積が認められるかどうか検討した。
- 6) マウス脳の一部を70%ギ酸で抽出しSandwich

\*群馬大学医学部神経内科

\*\*東京都立神経病院



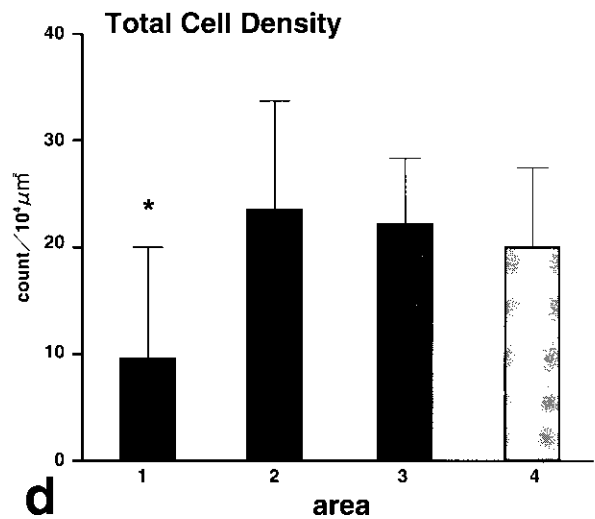
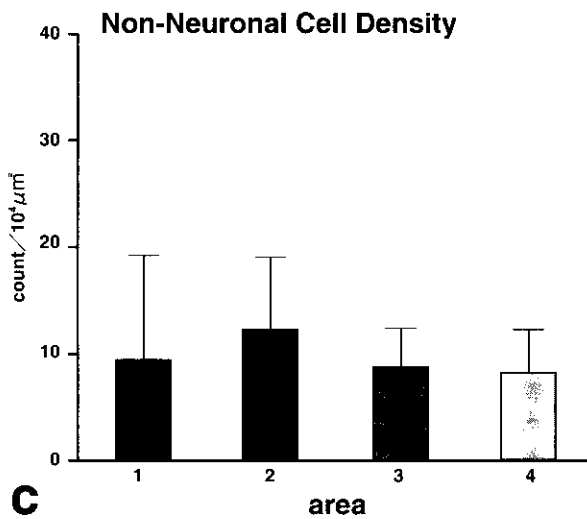
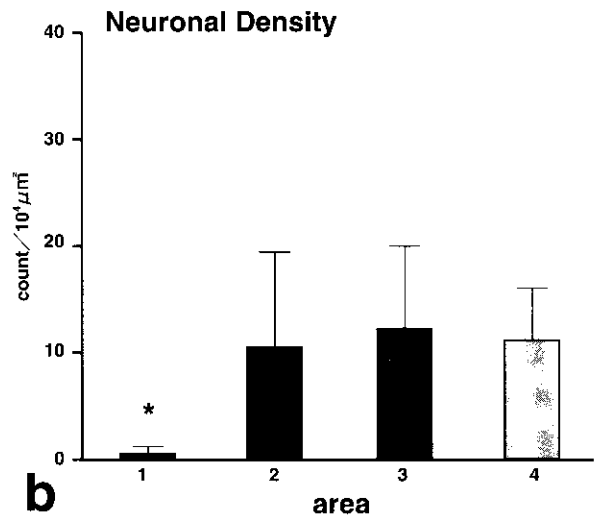
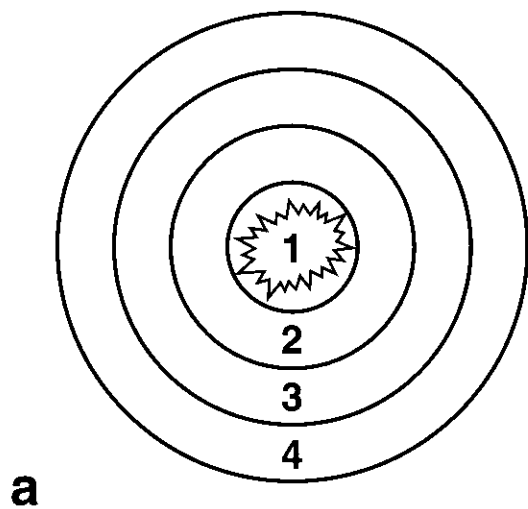


図1. 神経細胞の消失

アミロイドコアを中心に同心円状に四つの領域に分け内側から領域1, 2, 3, 4とする。

領域1では領域2-4に比べて有意に神経細胞の密度の低下を認める。

非神経細胞の密度に明らかな差は認めない。

総細胞の密度でも領域1で有意の低下を認める。

ELISA系 (BNT-77 / BA-27, BNT-77/BC-05)

を用いて経時的に脳内Aβ<sub>40</sub>, 42量を測定した。

- 7) 7ヶ月齢のAPPsw mice 5匹、対照7匹に電気ショックに対する受動的回避試験を行った。具体的にはマウスを明室に入れ隣の暗室に入ると3秒間電気ショックを与えた。その後、毎日1回5日間連続で試験を施行し、明室か

ら暗室へ入るまでの時間を反応潜時として測定した。

5分以上明室にいる場合は受動的回避反応を習得したものとみなした。その後は毎週1回検査を施行しその反応潜時を測定し比較した。

- 8) 受動的回避試験終了後の10ヶ月齢のマウス脳

表1. 免疫染色のまとめ  
非神経細胞の密度に明らかな差は認めない。

抗体	老人斑	変性神経突起
<b>A<math>\beta</math> related</b>		
anti-A $\beta$	++	
anti-C of $\beta$ APP		++
anti-ApoE	++	
<b>synapse</b>		
anti- $\alpha$ -synuclein		++
anti-Drebrin		+
<b>Neurotransmitter</b>		
anti-Somatostatin		+
anti-Substance P		+
anti-ChAT		+
<b>Neurofibrillary tangles</b>		
<b>Site-specific p tau</b>		
anti-PS199		+
anti-PS205		±
anti-PT231/PS235		+
anti-PS396		+
anti-PS413		+
AT8		+
Alz50		+
PHF1		+
CP13		+
Ubiquitin	++	++
<b>Tau protein kinase</b>		
anti-act GSK3 $\beta$		+
anti-Inact GSK3 $\beta$		-
anti-GSK3 $\alpha$		+
anti-act CDK5		+
anti-MAPK		+
anti-fyn		+

で各部位（大脳皮質、海馬、線条体、脳幹、小脳）毎にAch濃度を測定した。

### 結果と考察

- 1) APPsw mice 脳の経時的検討では8ヶ月齢で巨大なCored plaqueが、12ヶ月齢でDiffuse plaqueが大脳皮質、海馬、嗅脳に出現し、加齢とともに増加した。Amyloid Angiopathyは10ヶ月齢からみられた。
- 2) 老人斑コアを含む領域1では神経細胞の密度が明らかに低下していた（図1b）。神経細胞以外の細胞密度では4領域間に差は見られなかった（図1c）。全細胞数でも領域1で有意に細胞密度が低下していた（図1d）。このマウスでは少なくとも老人斑コアの部分では神経細胞が消失していることが明らかとなった。Apoptosisの所見はみられなかった。
- 3) 老人斑は抗ApoE抗体でも染色された。老人斑

Decrease of Acetylcholine Levels in APPsw Brains

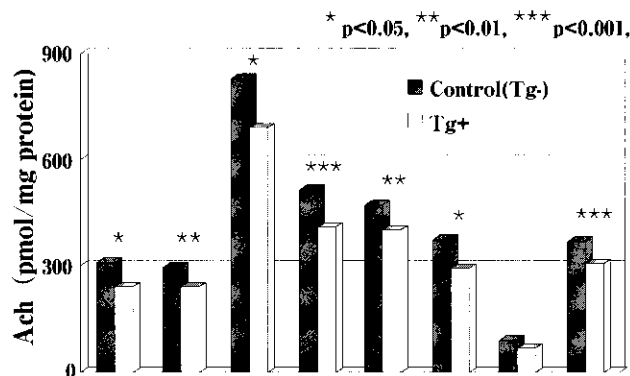


図2. 脳内Acetylcholine濃度  
大脳皮質や海馬ではAcetylcholine濃度の有意の低下を認める。

周囲には著明なastrogliosis, microgliosisがみられた。周囲には $\beta$  APP陽性のdystrophic neuritesが多数認められ、一部は抗somatostatin抗体、抗sub-stance P抗体、抗choline acetyltransferase抗体で染色された（表1）。このことからdystrophic neuritesにこれらの神経伝達物質が蓄積していることが明らかとなった。

- 4) 抗 $\alpha$ -synuclein抗体、抗drebrin抗体による染色では老人斑の部位でいずれも染色性が低下しており、この部位ではシナプス消失もあるものと考えられた（表1）。
- 5) dystrophic neuriteの一部は各種リン酸化部位特異tau抗体で染色され、経時的にこの染色性は増加した。このことは既に世界で確立されている各種リン酸化tau抗体を用いた検討でも確認された（表1）。Tau リン酸化酵素に対する抗体のうち、fynによって活性化されたGSK 3 $\beta$ 、GSK 3 $\alpha$ 、CDK5、MAPKに対する抗体がdystrophic neuritesの一部を染色したことから、tauリン酸化酵素群の中で特に活性化GSK 3 $\beta$ が重要な役割をしていることが推察された。神経原線維変化は見出せなかった。
- 6) 脳内A $\beta$ をELISAで定量すると、4ヶ月齢で既にA $\beta$ 蓄積がみられ、8ヶ月齢から指数関数的に大量のA $\beta$ の蓄積が確認された。組織学的

に同定される脳アミロイドは生化学的なA $\beta$ 蓄積量とよく相関していた。

- 7) 電気ショックによる受動的回避試験では、APPsw mice、対照ともに1回の電気ショックで受動的回避反応を習得した。その後、いずれの群でも電気ショックの記憶を保持していたが、APPsw miceでは3週後の32週齢(8ヶ月齢)から回避行動の潜時が短縮し始め、34週齢(8.5ヶ月齢)から有意差が認められ(P<0.05)、加齢とともに著明となった(P<0.01)。これらの結果は記憶障害が出現したことを意味している。
- 8) APPsw miceでは大脳皮質、海馬で有意のAChの低下が見られた(図2)。

以上、このAPPsw miceではAD脳で見られるび慢性老人斑、典型的老人斑、amyloid angiopathyが再現され、AD脳と同じA $\beta$ 分子種が蓄積していた。老人斑芯では神経細胞とシナプスの有意の減少がみられた。老人斑周囲のdystrophic neuritesに $\beta$ APP、神経伝達物質、異常リン酸化tauの蓄積が認められた。神経原線維変化の再現にまで至っていないが、A $\beta$ 蓄積が明らかな記憶障害や脳内ACh量の低下をも引き起こすことから、脳A $\beta$ アミロイドーシスはADにおける痴呆発症のもっとも重要なfactorであるとともに、治療の第一のターゲットであると考えられた。

## 結 論

A $\beta$ アミロイドーシスは神経細胞死とリン酸化tauの蓄積を誘発し、学習記憶障害を引き起こすものと考えられる。

## 参考文献

- 1) Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, et al. Correlative memory deficits, A $\beta$  elevation, amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 1996; 274:99-102.
- 2) Tomidokoro Y, Harigaya Y, Matsubara E, et al. Brain A $\beta$  amyloidosis in APPsw mice induces accumulation of presenilin-1 and tau. *JwPathol.* (in press).
- 3) Tomidokoro Y, Harigaya Y, Matsubara E, et al. Impaired neurotransmitter systems by A $\beta$  amyloidosis in APPsw transgenic mice overexpressing amyloid  $\beta$  protein precursor. *Neurosci Lett* 2000; 292:155-158.
- 4) Tomidokoro Y, Ishiguro K, Harigaya Y, et al. A $\beta$  amyloidosis induces the initial stage of tau accumulation in APPsw mice. *Neurosci Lett* 2001; 299(3):169-172.
- 5) Ikarashi Y, Harigaya Y, Tomidokoro Y, et al. Inhibition of passive avoidance memory and decrease in the brain concentration of acetylcholine in APPsw mice overexpressing mutant amyloid  $\beta$  protein precursor (submitted).

Brain A  $\beta$  amyloidosis in APPsw mice induces memory impairment with decrease of acetylcholine,  
focall loss of neurons with accumulation of phosphorylated tau

by

Mikio SHOJI\*,

Yasuo HARIGAYA\*, Yasushi TOMIDOKORO\*, Masaki IKEDA\*,

Etsuro MATSUBARA\*, Takeshi KAWARABAYASHI\*, Yasushi IKARASHI\*\*

from

\*Department of Neurology, Gunma University School of Medicine

\*\*Department of Neuropsychopharmacology, Gunma University School of Medicine

To clarify the role of brain amyloid  $\beta$  protein (A  $\beta$ ) amyloidosis in Alzheimer's disease (AD), we examined the APPsw mice (K Hsiao et al. Science 1996) expressing human  $\beta$  amyloid protein precursor ( $\beta$  APP)<sub>695</sub>  $\Delta$  NL under the hamster prion promoter.

In the brain of APPsw mice, cored, diffuse plaques and amyloid angiopathy were recognized such as those in AD brains. In areas of cored plaques, the number of neurons were significantly decreased compared with those in other cored plaque-free cortices of APPsw mice ( $p < 0.01$ ). Pre- and postsynaptic protein,  $\alpha$ -synuclein and drebrin were also absent in these cored plaques. In dystrophic neurites around the cored plaques,  $\beta$  APP, somatostatin, substance P and choline acetyltransferase accumulated. Phosphorylated-tau was detected within the cores and dystrophic neurites. The levels of A  $\beta$  40 and A  $\beta$  42 in brains remarkably increased with the evolution of brain A  $\beta$  amyloidosis from 8 months old. Passive avoidance test revealed that memory impairment appeared from 8 months old and progressively advanced. Significant decreases in acetylcholine levels were found in cerebral cortex and hippocampus of the brains.

Thus, the cored plaques substituted normal brain tissues with focal loss of neurons and synapses, and caused subsequent pathology such as dystrophic neurites and appearance of phosphorylated tau. These findings suggested a potential role of brain A  $\beta$  amyloidosis to induce disturbance of the cholinergic system, and secondary pathological steps lead in to mental disturbance in AD.

## 神経細胞内のタウ蛋白蓄積と記憶運動機能障害の低下を認めた 変異タウ(R406W)トランスジェニックマウスの検討

研究者 池 田 将 樹 針 谷 康 夫 瓦 林 毅  
松 原 悦 朗 岡 本 幸 市 東海林 幹 夫

### 目 的

大脳にタウ蛋白からなる神経原線維変化が出現する種々の神経変性疾患は近年tauopathyという疾患概念として理解されつつある。このうちアルツハイマー病では脳アミロイドーシスとともにタウ蛋白を主成分とする神経原線維変化の出現が特徴とされている。

家族性アルツハイマー病の原因遺伝子変異がA $\beta$ を増加させ、A $\beta$ 過剰発現マウスでは脳アミロイドが再現でき、タウ遺伝子変異はアルツハイマー病とは異なるparkinsonismを伴う家族性前頭側頭型痴呆(FTDP-17)を引き起こすことから、アルツハイマー病ではA $\beta$ 増加が脳A $\beta$  amyloidosisを誘発し、二次的にtauopathyを発生させるものと考えられる。従来A $\beta$ 過剰発現マウスでは著明な神経細胞死やtauopathyを示さないため、脳A $\beta$  amyloidosisがtauopathyを誘発する機序は不明であった。家族性前頭側頭型痴呆(FTDP-17)の原因遺伝子タウのミスセンス変異がタウ蓄積と神経細胞死を引き起こす機序を明らかにし、tauopathyと脳アミロイドとの関係を解明するため、ミスセンス変異および正常型タウ遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作製し、遺伝子導入していないコントロールマウスも加えて検討を行った。

### 方 法

導入遺伝子としてHamster Prion Promoterと変異型タウ(R406W)遺伝子および正常型タウ遺伝子を用い、micro-injection法にてマウス受精卵に注入し、成育したトランスジェニックマウスを解析した。変異型、正常型タウ遺伝子はいずれもfour repeat tau cDNAを用いた。作製したトランスジェニックマウスと同月齢の遺伝子導入していないコントロールマウスについてはローターロッド(1分間16回転)による運動機能測定、Passive avoidance test(受動的回避試験)による学習記憶機能測定、各種生化学的神経病理学的検討の解析を行った。

### 結 果

10月齢タウ(R406W)トランスジェニックマウスの各種リン酸化タウ抗体、非リン酸化タウ抗体による免疫細胞学的検討では前頭葉、側頭葉の皮質と白質、海馬の神経細胞と神経突起に著明なタウ蛋白の蓄積を認めた。同マウスでは前頭葉、側頭葉では神経細胞数減少とGFAP染色により巨大なアストロサイトを伴う著明なグリオーシスが認められた。6月齢タウ(R406W)トランスジェニックマウスでは病理学的変化がみられなかった。A $\beta$ による染色では陽性所見は得られなかった。電顕所見では細胞質内に無数のstraight tubule(直径約

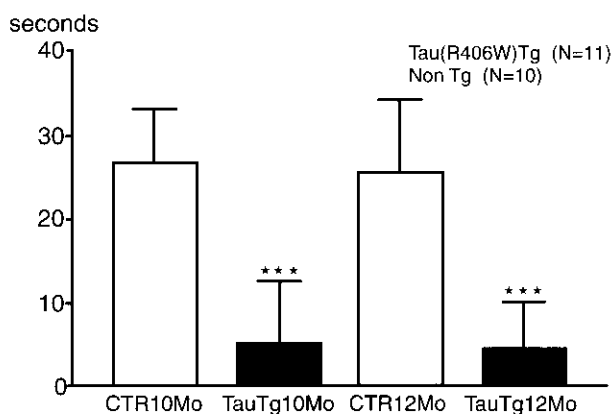


図1. ローターロッドによる運動機能測定  
10月齢および12月齢の変異型タウ(R406W)トランスジェニックマウスは遺伝子導入されていないコントロールマウスに比べ有意に運動機能の著明な低下を認めた(p<0.001)

10nm)が確認された。

マウス脳サルコシル不溶分画を作製後、ヒト特異的タウ抗体であるE1によるWestern blottingでは68kDのfour repeat tauとその代謝産物が認められた。コントロールマウスや低発現トランスジェニックマウスではタウのバンドは確認されなかった。

10月齢および12月齢の変異型タウ (R406W) トランスジェニックマウスはローターロッドによる運動機能測定では運動機能の著明な低下を認めた(図1)。10月齢の変異型タウ(R406W)トランスジェニックマウスとコントロールマウスの逃避反応の学習到達度において差は認められなかったが(図2a)、7週目以降にも明らかな学習記憶の保持障害が認められた(図2b)。

## 結 論

変異型タウ (R406W) 蛋白の過剰発現はトランスジェニックマウス脳にtauopathyを引き起こし、前頭葉、側頭葉、海馬神経細胞内の変異タウ蛋白の蓄積と神経細胞死を誘導した。さらに、学習行動実験から変異型タウトランスジェニックマウスの運動機能の著明な低下、学習記憶保持機能障害が認められた。これらの所見は我々の開発した変異

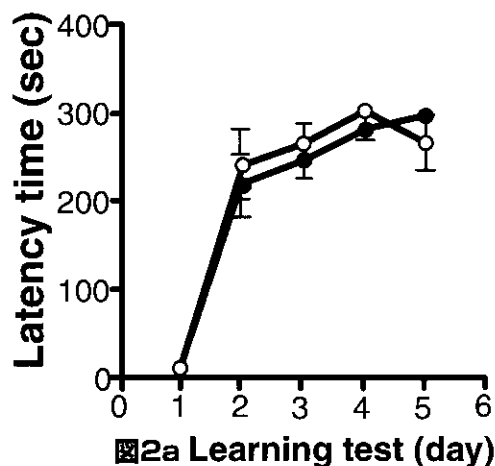


図2a Learning test (day)

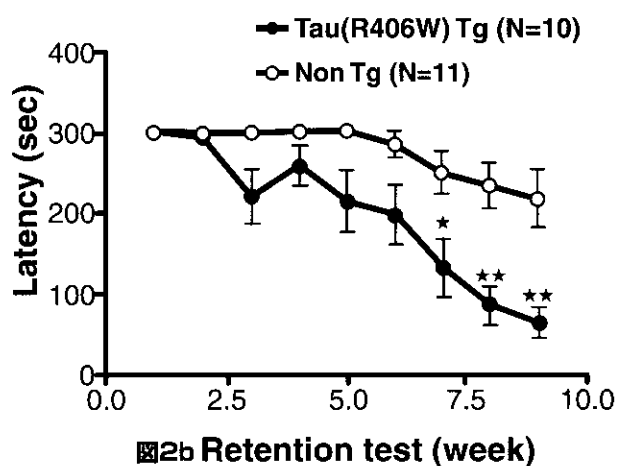


図2b Retention test (week)

図2. 受動的回避試験

10月齢の変異型タウ(R406W)トランスジェニックマウスとコントロールマウスの逃避反応の学習到達度において差は認められなかったが(図2a)、7週目に学習記憶の保持障害が認められ(p<0.005)、8週目においても確認された(p<0.001)(図2b)。

型タウ (R406W) トランスジェニックマウス (Tau<sub>rw</sub>)が家族性前頭側頭型痴呆(FTDP-17)の動物モデルとして疾患の発生機序と治療法を検討する上で有用であることを示している。今回の結果からはtauopathyが脳Aβ amyloidosisを誘発することはなかったが、既に確立している変異APPマウス (APP<sub>sw</sub>)と交配させた変異Tau<sub>rw</sub> X APP<sub>sw</sub>マウスを作製し解析することにより、Aβ amyloidosisによる二次性tauopathyの解明が期待される。

## 文 献

- 1) Spillantini MG & Goedert M. Tau protein pathology in neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci* 1998; 21: 428-433.
- 2) Poorkaj P, Bird TD, Wijsman E, et al. Tau is a candidate gene for chromosome 17 frontotemporal dementia. *Ann Neurol* 1998; 43: 815-825.
- 3) Hutton M, Lendon CL, Rizzu P, et al. Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* 1998; 393: 702-705.
- 4) Spillantini MG, Murrell JR, Goedert M. Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia. *Proc Natl Acad USA* 1998;95: 7737-7741.
- 5) Reed LA, Grabowski TJ, Schmidt ML, et al. Autosomal dominant dementia with wide spread neurofibrillary tangles. *Ann Neurol* 1997; 42: 564-72.
- 6) Lewis J, McGowan E, Rockwood J, et al. Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein. *Nat Genet* 2000 ; 25: 402-405.

Memory loss and parkinsonism with severe tauopathy in the fronto-temporal lobe of transgenic mice of overexpressing tau R406W

by

Masaki IKEDA

Yasuo HARIGAYA, Etsuro MATSUBARA,

Takeshi KAWARABAYASHI, Koichi OKAMOTO, Mikiyo SHOJI

from

Department of Neurology, Gunma University School of Medicine

To establish how mutant tau cause accumulation of tau and subsequent neuronal death leading movement disorder and memory loss, we have generated transgenic mice expressing mutant human 4 repeats tau R406W and wild type tau. We reported that the tau R406W transgenic mice showed massive tau accumulation in the fronto-temporal lobe and hippocampus associated with neuronal cell loss and severe gliosis. Accumulation of straight tubules in neurons and sarkosyl insoluble tau aggregates were revealed in the tau R406W mice brain. In the Rotor rod test, tau R406W mice showed motor dysfunction at 10 months old. Passive avoidance retention test demonstrated that memory disturbance significantly occurred at 7th week after completing learning passive avoidance.

Neurobehavioural examinations proved that tau R406W transgenic mice exhibited memory loss and parkinsonism. These findings indicated that the phenotypes of tau R406W mice were compatible with those in FTDP-17.

Thus, the tau R406W mouse is the valuable tool to elucidate the mechanism of tauopathy including Alzheimer's disease and a useful model for developing therapeutic agents.



平成12年度

# 研究事業報告

厚生省特定疾患対策研究事業  
アミロイドーシスモデル動物における発症機序の解明に関する研究

平成12年度研究報告会

日 時：平成13年3月1日、14時～

場 所：山口大学医学部霜仁会館

参加者：主任研究者、分担研究者他、計30名

内 容：1. 挨拶

主任研究者 石原得博

2. 研究発表（内容は前掲）—主任研究者、分担研究者

3. その他

平成12年度

アミロイドーシスモデル動物における  
発症機序の解明に関する研究

会員名簿

区分	氏名	所属	職名
主任研究者 分担研究者	石原得博	山口大学医学部第一病理	教授
	前田秀一郎	山梨医科大学第一生化学	教授
	樋口京一	信州大学医学部附属加齢適応研究センター脈管病態分野	教授
	東海林幹夫	群馬大学医学部神経内科	講師
	横田忠明	小倉記念病院病理	部長
	高橋睦夫	山口大学医学部附属病院病理部	助教授
	河野道生	山口大学医学部寄生体学	教授
(事務局) 経理事務連絡担当者	河野裕夫	山口大学医学部病理学第一講座 〒755-8505 宇部市南小串1丁目1-1 Tel (0836) 22-2200 Fax (0836) 22-2219 E-mail: pathol1@po.cc.yamaguchi-u.ac.jp	講師