

20010190

厚生科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

高齢者の精神神経機能老化機序の解明とその対策に関する

精神神経免疫学的研究

平成13年度 総括研究報告書

主任研究者 武田 雅俊

平成14年(2002年)3月

目 次

I. 総括研究報告書

高齢者の精神神経機能老化機序とその対策に関する精神神経免疫学的研究・・・1

II. 分担研究報告書

1. 老齢がもたらす小胞体ストレスと脆弱性について・・・6

武田 雅俊

2. 認知機能と IL-6 及び TFG- β 1 遺伝子多型の関連・・・10

新井 平伊

3. 老化とストレス反応性に関する研究・・・14

神庭 重信

4. 加齢のおよぼすストレス反応性への影響に関する研究・・・18

山脇 成人

III. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・21

VI. 研究成果の刊行物・別刷・・・23

高齢者の精神機能老化機序の解明とその対策に関する精神神経免疫学的研究

主任研究者 武田雅俊 大阪大学大学院医学系研究科神経機能医学講座教授

高齢者の精神機能老化の機序を解明する目的で、認知機能と IL-6 及び TGF- β 1 遺伝子多型の関連、老化に伴うストレス反応分子の変化、老化に伴う海馬神経新生の変化、及び老化に伴う小胞体ストレス反応の変化というテーマに絞り、精神神経免疫学的立場から検討を加えた。これらの研究から、老年者に認められる精神機能老化の機序が、遺伝子発現レベル、細胞小器官レベル、細胞反応レベル、免疫反応レベルでの理解が深まり、今後の老年期精神機能障害を予防する方策の開発に重要なヒントをもたらした。

キーワード： 老化、ストレス、神経新生、小胞体、IL-1、TGF- β 1

研究組織

主任研究者：武田雅俊

（大阪大学大学院医学系研究科教授）

分担研究者：新井平伊

（順天堂大学医学部教授）

分担研究者：神庭重信

（山梨医科大学教授）

分担研究者：山脇成人

（広島大学医学部教授）

なお断片的な知見しかない。従って、老年者に見られる認知障害や感情障害の機序を生物学的基盤で検討することは重要である。本研究は、高齢者の精神機能老化について精神神経免疫学的に様々な角度から検討し、予防策を開発することを目的とした。本年度は最終年度にあたり、課題検討を遺伝子発現レベル、細胞小器官レベル、細胞反応レベル、免疫反応レベルに絞り込み、より具体的な結論を得よう努力した。

A. 研究目的

高度な高齢化社会を迎えた本邦にとって老年期精神障害に対する対策はその有病率の高さから社会的急務と言える。これまでの臨床及び基礎研究により老年期精神障害の特徴が明らかにされ、その診断法や対処法についても一定の進展が認められている。しかし、脳の老化過程により精神機能が低下すると考えられているものの、その機序については今

B. 研究方法

この研究課題は、臨床的な老年期痴呆の症候学蓄積と近年のめざましい精神神経免疫学がくみ合わさって初めて可能になると考えられる。従って、本研究では臨床研究と基礎研究が有機的に統合されるような班員構成とし、基礎・臨床の研究成果を統合して新たに知見が得られるようにした。

新井班員は、128名のアルツハイマー病（AD）患

者と 83 名の年齢及び性別をマッチさせた健常対照者(HC)の IL-6 及び TGF- β 1 の遺伝子多型について PCR-RFLP 法を用いて検討した。また、IL-6 産生能についてリンパ球培養液を ELISA で検討した。

神庭班員は、30 ヶ月齢老齢ラットと 3 ヶ月齢若年ラットに BrdU を腹腔内投与しておき、footshock による恐怖条件づけをして、海馬における BrdU 陽性細胞を観察することで、神経新生について検討した。また、Panax Ginseng の学習障害に関する効果について、若年ラットに投与し、同様の実験を行った。

山脇班員は、20 ヶ月齢老齢ラットと 3 ヶ月齢若年ラットに拘束ストレス、振動ストレス、水泳ストレスを 4 日間負荷し、海馬から RNA を抽出して cDNA アレイ法にかけ、老齢と若年で遺伝子発現に差があるものを検討した。差のある遺伝子については real-time quantitative PCR 法にて確認した。

武田班長は、24 ヶ月齢老齢砂ネズミと 5 ヶ月若年砂ネズミに 5 分間脳虚血を負荷し、再灌流後の脳を摘出して、小胞体(ER)ストレスのマーカーである eIF2 α と PERK のリン酸化について検討した。

C. 研究結果

(1) AD 発症に関する IL-6 及び TGF- β 1 遺伝子多型の関連 (新井班員)

IL-6vnter 遺伝子においては、AD 群と HC 群との間に統計学的な有意差は認められなかったが、IL-6prom 遺伝子においては AD 群において G 対立遺伝子頻度が統計学的有意差をもって高かった。この遺伝子多型測定を行った AD 群の内 15 名、HC 群の内 26 名においては血清 IL-6 濃度を併せて測定したところ、G 対立遺伝子を保有する AD 群において統計学的有意差をもって IL-6 濃度が高かった。

TGF- β 1 の codon 10 と codon 25 遺伝子においては、

AD 群と HC 群との間に統計学的な有意差は認められなかった。

(2) 老齢ラットにおける恐怖条件づけ後の神経新生の変化(神庭班員)

老齢群では 2 時間後の freezing が若年群より有意に少なく、BrdU 陽性細胞数も若年群に見られるような増加を示さなかった。

老齢群に対する Panax Ginseng 投与では freezing 増加および BrdU 陽性細胞数の増加の両方の効果を示した。

(3) 海馬でのストレス性遺伝子発現変動に及ぼす加齢の影響 (山脇委員)

老齢ストレス負荷ラットと若年ストレス負荷ラットの各アレイのバックグラウンドを補正した結果、発現に差が見られる遺伝子が 6 種類見つかった。これら 6 個の遺伝子に関して、real-time quantitative PCR 法による詳細な発現の解析を行った結果、Rattus norvegicus amphiphysin I 遺伝子のみの発現に有意な差がみられた。この amphiphysin I の老齢ストレス負荷群、老齢対照群、若年ストレス負荷群、成熟期対照群の 4 群間で発現の解析を行ったところ、ストレス負荷によって有意に老齢ラット海馬では amphiphysin I は発現の低下することが解明された。

(4) 加齢による小胞体ストレス反応の変化 (武田班長)

若年砂ネズミでは、再灌流 15 分後に PERK 及び eIF2 α は速やかにリン酸化され、30 分後にはそれらのリン酸化の度を上げながら推移した。一方、老齢動物では、PERK 及び eIF2 α のリン酸化は遅延し、再灌流 30 分後でも、これらのリン酸化は僅かであった。

D. 考察

これまで 2 年間我々は、高齢者の精神機能老化の

機序を解明し、それに対する有効な方策を検討してきた。題目通り精神神経免疫学的手法を中心としてきたが、各班員はそれぞれ違った切り口からこの問題に取り組んできた。各班員のこれまでの成果を踏まえ、最終年度である本年度はテーマへの取り組みを具体的に絞り込んで行った。即ち、遺伝子発現レベル、細胞小器官レベル、細胞反応レベル、免疫反応レベルでの取り組みに限定し、より確実な成果を得る努力をした。

まず、遺伝子発現レベルの取り組みとして、ストレスによって発現する遺伝子で、加齢によって変化するものの検索にあたった。cDNA アレイ法及び real-time quantitative PCR 法により、中枢神経系前シナプス部でエンドサイトーシスに密接に関与している amphiphysin I 遺伝子の発現が、老齢ラットのストレス負荷時に有意に減弱していることが得られた。この amphiphysin I 遺伝子はシナプス小胞の clathrin 被膜形成に dynamin I と共に、密接に関与することが知られている。従って今回の研究結果から得られたストレス負荷に伴う amphiphysin I の発現低下は、シナプス部でのエンドサイトーシスの低下を引き起こし、前シナプス部での神経伝達物質合成の低下を招くと考えられる。

次に、細胞小器官レベルでの高齢者における変化について検討した。以前より我々は、プレセニリン 1 の変異体が小胞体ストレス反応(UPR)を阻害することを示してきたが、本年度は老化による UPR の変化について検討した。若年砂ネズミでは再灌流開始後速やかに PERK や eIF2 α がリン酸化されたが、老齢ネズミではリン酸化の程度がきわめて低く、UPR が低下していることが分かった。この事実は、老齢ネズミが再灌流時に細胞障害を受けやすいことを示している。従って、老化も UPR を障害し、

神経細胞にストレス脆弱性を獲得せしめることが示された。

細胞反応レベルの検討では、恐怖条件づけに伴う神経新生が老化により抑制されることが示された。海馬歯状回における BrdU 陽性細胞数の増加が、学習に関係していると考えられていることから、我々の結果は老化における学習機能の低下に海馬歯状回における神経新生の低下が関与している可能性を示していると考えられた。さらに、若年ラットにおいて、Panax Ginseng が freezing と BrdU 陽性細胞数をともに増加させることから、海馬歯状回における神経新生と学習をともに増強する効果を持つことが示唆される。

免疫反応レベルでの取り組みとして、AD 発症と IL-6 及び TGF- β 1 遺伝子多型の関連について検討した。TGF- β 1 の遺伝子多型においては HC 群と AD 群には相違は認められなかったが、IL-6 については IL-6prom 遺伝子で HC 群と比較し AD 群において G 対立遺伝子頻度が有意差をもって高く、また今回同時に行った血清 IL-6 濃度の測定においても、AD 群において有意差をもって高いという結果が得られた。IL-6 は脳内ではグリア細胞やアストロサイトが産生している。神経細胞には IL-6 受容体が発現しており IL-6 の作用により神経細胞の分化が促進される。現在までに IL-6 は CSF で増加することが認められており、また AD 剖検脳では IL-6 の mRNA も蛋白も発現の増強が認められているが、正常対象と比べてびまん性のアミロイド沈着部において高い比率で抽出されるとの報告がある。このことから、IL-6 の発現が老人斑形成に関係している可能性が考えられている。今回我々は IL-6prom 遺伝子の遺伝多型と血清 IL-6 濃度において AD に特徴的な所見が得られた。このことから AD の血清における IL-6

濃度の変化は遺伝子レベルの異常に基づく可能性が考えられた。

近年、長期にわたるグルココルチコイドの分泌が老化による神経細胞のストレス脆弱をきたすとの報告がある。グルココルチコイドへの長期暴露は、神経組織の免疫能の低下、ER ストレスをきたす細胞内へのカルシウム流入や神経新生を阻害するとされている。従って、本年度に得られた知見はグルココルチコイド仮説に帰結できるのかもしれない。更に、免疫能の活性化、小胞体シャペロン蛋白の誘導や神経新生を促進する物質の投与は、精神機能老化の予防策として有効であることが示唆された。

E. 結論

- (1) IL-6prom 遺伝子は AD 群において G 対立遺伝子頻度が統計学的有意差をもって高く、G 対立遺伝子を保有する AD 群において統計学的有意差をもって IL-6 濃度が高かった。
- (2) 老齢ラットでは 2 時間後の freezing が若年ラットより有意に少なく、BrdU 陽性細胞数も若年群に見られるような増加を示さなかった。
- (3) ストレス負荷によって有意に老齢ラット海馬では amphiphysin I は発現の低下することが解明された。
- (4) 老齢ラットでは小胞体ストレス反応が抑制されていた。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Circulating natural killer cell activity and cytokine production in Alzheimer's disease. Takuya Ishizuka, Hajime Baba, Shinji Higashi and Heii Arai Alzheimer's Reports Vol.4 Number 2 pp81-85, 2001

(2)The-concentrations-of-serum-Dehydroepiandrosterone, Dehydroepiandrosterone-sulfate-and cortisol in Japanese sporadic Alzheimer's disease. Takuya Ishizuka, Shinji Higashi ,Hajime Baba,Kanehisa Imai, Ko Eto and Heii Arai Alzheimer's Reports Vol.4 Number 6 pp205-208, 2001

(3)Alzheimer 病の精神免疫学的所見 石塚卓也、新井平伊 医学のあゆみ Vol 197 No.12 pp920-921, 2001

(4)精神神経免疫機能の老化とその対策 石塚卓也、新井平伊 老年精神医学雑誌 Vol 12 No 3 pp236-244, 2001

(5) Influence of restraint stress on the expression and the serine/threonine phosphatase activity of calcineurin in the rat brain. Takahashi J, Tanaka K, Morinobu S, Fujimaki K, Li S-T, Kato K, Ohkawa M, Yamawaki S, Kato N: Synapse 40: 130-136, 2001.

(6) Clinical features and treatment response of patients with major depression and silent cerebral infarction. Yamashita H, Fujikawa T, Yanai I, Morinobu S, Yamawaki S: Neuropsychobiol., 44: 176-182, 2001.

(7) Cognitive dysfunction in recovered depressive patients with silent cerebral infarction. Yamashita H, Fujikawa T, Yanai I, Morinobu S, Yamawaki S: Neuropsychobiol., 45: 12-18, 2002.

(8)Increased production of β -amyloid and vulnerability to endoplasmic reticulum stress by an aberrant spliced form of presenilin 2. Naoya Sato, Kazunori Imaizumi, Takayuki Manabe, Manabu Taniguchi, Junichi Hitomi,

Taiichi Katayama, Takunari Yoneda, Takashi Morihara, Yuichi Yasuda, Tsutomu Takagi, Takashi Kudo, Takehide Tsuda, Yasuto Itoyama, Takao Makifuchi, Paul E. Fraser, Peter St George-Hyslop, Masaya Tohyama
J.Biol.Chem. 276(3) 2108-2114, 2001.

(9) Disturbed activation of endoplasmic reticulum stress transducers by familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 mutations. T.Katayama, K.Imaizumi, A.Honda, T.Yoneda, T.Kudo, M.Takeda, K.Mori, R.Rozmahel, P.Fraser, P.St.George-Hyslop, M.Tohyama
J Biol Chem. 276(46)43446-43454, 2001

2. 学会発表

(1) Circulating natural killer cell activity and cytokine production in Alzheimer's disease. Takuya Ishizuka, Hajime Baba, Shinji Higashi, Heii Arai. The 10th Pacific Rim Collage of Psychiatrists, Nov.2001. Melbourne.

(2) Association of Transforming Growth Factor- β 1 Gene Polymorphism with Japanese Sporadic Alzheimers Disease. Shinji Higashi Tohru Ohnuma, Nobuto Shibata, Takuya Ishizuka, Maiko Higashi, Heii Arai. The 10th Pacific Rim Collage of Psychiatrists, Nov.2001. Melbourne

(3) Interleukin 遺伝子多型とアルツハイマー病発症との関連 柴田展人 大沼徹 高橋正 馬場元 石塚卓也 大塚恵美子 植木彰 長尾正嗣 新井平伊 第16回日本老年精神医学会 June 2001. 大阪

(4) Interleukin 遺伝子多型とアルツハイマー病発症との関連 柴田展人 大沼徹 高橋正 馬場元 石塚卓也 大塚恵美子 植木彰 長尾正嗣 新井平伊 第23回日本生物学的精神医学会 April 2001 長崎

(5) 遺伝子改変マウスを用いたアルツハイマー病発

症機構の解析 玉置寿男、久保田正春、杉山仁視、前田秀一郎、保坂恭子、神庭重信 第3回感情・行動・認知(ABC)研究会

(6) ラット脳内 bcl-2 発現に対するストレスの影響。辻 誠一、森信 繁、菅原幸子、末永貴美、川野樹一郎、加賀谷有行、山脇 成人: 第23回日本生物学的精神医学会(4.11-13, 2001 長崎)。

(7) Vascular depression as a treating resistant depression. Yamawaki S, Fujikawa T. CINP Regional Meeting (10.2-5, 2001 Hiroshima, Japan).

高齢者の精神機能老化機序の解明とその対策に関する精神神経免疫学的研究

老齡がもたらす小胞体ストレス脆弱性について

分担研究者 武田雅俊 大阪大学大学院医学系研究科未来医療開発専攻

ポストゲノム疾患解析学講座プロセッシング異常疾患分野教授

プレセニリン1 (PS1)は小胞体(ER)膜に局在する蛋白で、その変異体の存在は各種の神経細胞障害に脆弱性をもたらすことが示唆されている。ER には unfolded protein response(UPR)として ER stress に対する反応系が存在し、それをなす分子として IRE1、PERK などが同定されている。前年度までの我々の検討で、変異型 PS1 は IRE1 による UPR を阻害し、分子シャペロン GRP78 をダウンレギュレートすることで ER stress 脆弱性をもたらすこと、更に変異型 PS1 は PERK による UPR をも阻害し、下流の eIF2 α のリン酸化が抑制されることを示した。これらの障害は、蛋白の折りたたみ補正や蛋白翻訳抑制といった UPR を阻害し、細胞にストレス脆弱性をもたらすことが示された。今年度は、孤発性アルツハイマー病の病態を解明するにあたり、変異型 PS1 と同等の効果を UPR に持つ因子について検討した。成熟砂ネズミに5分間の脳虚血を負荷し、再灌流後の脳組織では、経時的に UPR が発現することが示された。アルツハイマー病の最も重要な危険因子は、aging であることから、老齡砂ネズミに脳虚血を負荷し、UPR について検討した。老齡動物では、再灌流中の eIF2 α のリン酸化が抑制されていることが示された。この結果より、aging は UPR を阻害し、神経細胞のストレス脆弱性を惹起することが示され、アルツハイマー病の神経変性の原因となることが示唆された。

キーワード： 老齡、アルツハイマー病、小胞体、ストレス、細胞死

A. 研究目的

アルツハイマー病は初老期に発症し、病理学的には老人斑や神経原線維変化な

どの所見を大脳皮質に広範に認める進行性痴呆疾患である。人口の高齢化に伴い、先進諸国では痴呆患者は急激に増加し、

現在日本では、痴呆患者は65歳以上人口の約5%、85歳以上では約30%といわれる。これらの大部分を占めるのがアルツハイマー病であり、日本では約70万人、全世界では一千万人以上と推定され、その病態解明が急がれている。

早発性アルツハイマー病において、分子生物学的アプローチの有力な糸口として、その原因遺伝子である β -APP、プレセニリン1(PS1)、プレセニリン2が同定されている。アルツハイマー病の大部分を占めるのは孤発例であるが、これらの遺伝子を手掛かりとしてアルツハイマー病全体の病態解明しなければならない。

プレセニリンは小胞体(ER)膜に局在する蛋白で、その変異体の存在は各種の神経細胞障害に脆弱性をもたらすことが示唆されている。ERにはunfolded protein response(UPR)としてER stressに対する反応系が存在し、そのセンサー分子としてIRE1、PERKが同定されている。いずれもER内でのunfolded proteinの蓄積を感じ、それぞれ異なった機構でER内の恒常性を保つ。

前年度までの我々の検討で、変異型PS1はIRE1によるUPRを阻害し、分子シャペロンGRP78をダウンレギュレートすることでER stress脆弱性をもたらすこと、更に変異型PS1はPERKによるUPRをも阻害し、下流のeIF2 α のリン酸化が抑制されることを示した。これらの障害は、蛋白の折りたたみ補正や蛋白翻訳抑制と

いったUPRを阻害し、細胞にストレス脆弱性をもたらすことが示された。

今後は孤発性アルツハイマー病の病態を解明するにあたり、変異型PS1と同等の効果をUPRに持つ因子について検討しなければならない。アルツハイマー病の最も重要な危険因子はagingであり、本年度は老齢砂ネズミを用い、脳虚血を負荷し再灌流時のUPRを検討し、若年砂ネズミと比較した。

B. 研究方法

老齢砂ネズミとして24ヶ月齢の動物を、対照の若年砂ネズミとして5ヶ月齢の動物を用いた。砂ネズミは50 mg/kg ケタミンで麻酔の後、保温プレート上にのせ直腸温を37°Cに維持しながら手術を行った。両側総頸動脈を露出し、動脈クリップをかけ血流を5分間遮断した。その後、クリップを外し再灌流を行い、15分及び30分度に断頭した。全脳を取り出し、1:5 w/vの氷冷ホモジュウナイズバッファー(50 mM HEPES, pH 7.5, 140 mM potassium acetate, 4 mM magnesium acetate, 2.5 mM diithiothreitol, 50 mM sodium fluoride, 5 mM okadaic acid, 0.23 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 μ g/ml aprotinin, 10 μ g/ml leupeptine, 7 μ g/ml pepstatin A)を加え、超音波破碎を行った。12,000 xgで15分間遠心し、得られた上清をウエスタンブロットに供した。ウエスタンブロットには、リン酸化 eIF2 α を認

識する抗リン酸化 eIF2 α 抗体、リン酸化及び非リン酸化を認識する eIF2 α 抗体、更に PERK の C 端ペプチドで作詞した抗体を用いた。

C. 研究結果

若年砂ネズミでは、再灌流 15 分後に PERK 及び eIF2 α は速やかにリン酸化され、30 分後にはそれらのリン酸化の程度を上げながら推移した。一方、老齢動物では、PERK 及び eIF2 α のリン酸化は遅延し、再灌流 30 分後でも、これらのリン酸化は僅かであった。従って、老齢動物は UPR が阻害されており、脳虚血後の再灌流時に発生する神経細胞障害に脆弱であると考えられた。

D. 考察

一過性脳虚血後の再灌流時に、PERK や eIF2 α がリン酸化されることから、脳虚血及び引き続く再灌流は ER ストレスであることが示された。ER ストレスが生じると、ER ルーメン内には折りたたみが不十分な或いは折りたたみが不正な蛋白が蓄積する。PERK はこれを検知し、自己リン酸化を受け、シグナルを下流の eIF2 α に伝える。EIF2 α もリン酸化を受け、蛋白の翻訳抑制を行うことが報告されている。蛋白合成が虚血後脳で低下している事実は以前から報告があり、今回の結果はそれに合致する。

脳虚血が ER ストレスになるメカニズムとして、もっとも考えられるのは、虚

血に伴うカルシウム動態の異常であろう。また、虚血に伴う ATP の低下や ER 内の酸化還元の異常なども考えられるが、今後の検討が必要である。

AD の最も重要な危険因子は aging である。従って、本研究では老齢動物における再灌流時の変化に注目した。若年砂ネズミでは再灌流開始後速やかに PERK や eIF2 α がリン酸化されたが、老齢ネズミではリン酸化の程度がきわめて低く、UPR が低下していることが分かった。この事実は、老齢ネズミが再灌流時に細胞障害を受けやすいことを示している。我々の前年度までの検討で、PS1 の変異体が UPR を障害し、ストレス脆弱性を獲得することを示したが、本年度の検討から、aging も同様な影響をもたらすことが示された。従って、UPR を補正してやることが、孤発性及び家族性 AD の共通した治療戦略になることが示唆された。

E. 結論

Aging は UPR を障害し、神経細胞の ER ストレス脆弱性を増すことが示された。

F. 健康危険情報

特記すべき事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

① Increased production of β -amyloid and vulnerability to endoplasmic reticulum stress

by an aberrant spliced form of presenilin 2
Naoya Sato, Kazunori Imaizumi, Takayuki
Manabe, Manabu Taniguchi, Junichi Hitomi,
Taiichi Katayama, Takunari Yoneda, Takashi
Moriyama, Yuichi Yasuda, Tsutomu Takagi,
Takashi Kudo, Takehide Tsuda, Yasuto
Itoyama, Takao Makifuchi, Paul E.Fraser,
Peter St George-Hyslop, Masaya Tohyama
J.Biol.Chem. 276(3) 2108-2114, 2001.

② Disturbed activation of endoplasmic
reticulum stress transducers by familial
Alzheimer's disease-linked presenilin 1
mutations

T.Katayama, K.Imaizumi, A.Honda,
T.Yoneda, T.Kudo, M.Takeda, K.Mori,
R.Rozmahel, P.Fraser, P.St.George-Hyslop,
M.Tohyama
J Biol Chem. 276(46)43446-43454, 2001

2. 学会発表

第 20 回日本痴呆学会

平成 13 年 10 月 4 日—5 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべき事項なし。

認知機能と IL-6 及び TGF- β 1 遺伝子多型の関連

順天堂大学医学部精神医学教室

新井平伊

A. 研究目的

アルツハイマー病(AD)に対する抗炎症薬の発病予防効果についての報告など、ADの病態と免疫炎症反応が関係する可能性について検討されている。実際に末梢血中のナチュラルキラー(NK)細胞活性の低下やインターロイキン(IL)- 1β 、トランスフォーミンググロースファクター(TGF)- β が血清中で高値を示し重症度と関連するといった報告がある。またAD患者の剖検脳では様々なサイトカインの発現増強がみられ、IL-6のAD脳内での発現増強やTGF- β 1が老人斑内に認められるとの報告がある。このようにADでの中枢神経内での免疫学的変化は次第に明らかにされつつある。我々もこれまで加齢による精神免疫機能に対して加齢や精神機能が及ぼす影響についての変化について報告をおこなった。また、認知機能障害のモデルとして用いたADの血清においてはナチュラルキラー(NK)細胞活性の低下と共に、インターフェロン(IFN)- γ の低下、IL-2、IL-6の増加などの各種サイトカイン産生能の異常が認められた。そこで今回我々はAD脳内で発現増強が報告されているIL-6とTGF- β 1についての遺伝子多型について検査をおこない、精神神経免疫機能に対する認知機能障害の及

ぼす影響を検討したので報告する。

B. 研究方法

対象は文書において本研究に対して同意の得られた健常対象者83名、及びNINCDS-ADRDAの診断基準によりアルツハイマー病と診断された外来通院者128名である。年齢、性別をマッチさせた健常者はいずれも身体的基礎疾患及び精神疾患はない。両群共に採血前に本研究の目的と意義について説明し同意を得ており、インフォームドコンセントをおこなっている。なお本研究を施行するにあたり、順天堂大学治験審査委員会の承認を得ている。

本研究に使用したgDNAはNucleon II kitを使用し、白血球より採取した。IL-6及びTGF- β 1の遺伝子型はPCR-RFLP法を用いて測定された。IL-6vntr遺伝子においては5'-CAGAAGAAGCTCAGATGACTGG-3'と3'-GCTGGGCTCCTGGAGGGG-5'の2つのプライマーと10 \times reaction buffer、dNTP Mixture、Taq DNA Polymeraseを使用し、PCRを行った。IL-6prom遺伝子では5'-CAGAAGAAGCTCAGATGACTGG-3'と3'-GCTGGGCTCCTGGAGGGG-5'のプライマーを使用し、またTGF- β 1遺伝子では5'-TTCCCTCGAGGCCCTCCTA-3'と3'-

GCCGCAGCTTGGACAGGATC-5'のプライマーを使用して、同様にPCRを行った。

さらにIL-6prom 遺伝子においては611bpのPCR産物を制限酵素SfaNIを使用して切断を行い、G対立遺伝子とC対立遺伝子を得た。TGF-β1遺伝子においては296bpのPCR産物を制限酵素MspAIIを使用して切断を行いcodon 10のT対立遺伝子とC対立遺伝子を、また制限酵素BglIを使用して切断を行いcodon 25のG対立遺伝子とC対立遺伝子を得た。

2%メタファーゲル上で電気泳動をおこない、エチジウムブロマイド染色によって各々の対立遺伝子の同定を行った。

IL-6産生能の測定には、細胞濃度を $1 \times 10^6/\text{ml}$ に調整したリンパ球にPhorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (50ng/ml)及びionomycin (200ng/ml)を添加して5%CO₂培養液で37°C、4時間培養し、得られた培養液をenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (R&D Systems 社製 米国)を用いて測定した。

AD群及びHC群の遺伝子多型の検査結果の有意差を検討するためにChi-square testにて分析をおこなった。またサイトカイン産生能の検査結果は平均±SDで表し、有意差を検討するためにMann-Whitney U-test・Wilcoxon signed rank testにて分析を行った。

C. 研究結果

IL-6 遺伝子

IL-6vnr 遺伝子においては、AD群とHC群との間に統計学的な有意差は認められな

かったが、IL-6prom 遺伝子においてはAD群においてG対立遺伝子頻度が統計学的有意差をもって高かった。この遺伝子多型測定を行ったAD群の内15名、HC群の内26名においては血清IL-6濃度を併せて測定したところ、G対立遺伝子を保有するAD群において統計学的有意差をもってIL-6濃度が高かった。

TGF-β1 遺伝子

TGF-β1のcodon 10とcodon 25遺伝子においては、AD群とHC群との間に統計学的な有意差は認められなかった。

D. 考察

我々は、これまでも加齢や精神状態による免疫機能の変化及び認知機能障害としてのADにおける免疫機能の相違についての報告をおこなった。そこではADにおいてNK細胞活性の低下がみられ、またNK細胞活性と強い関連性をもつIFN-γとIL-2産生能の変化、及びIL-6産生能の低下が認められた。つまりADの免疫学的機能の変化は、中枢神経系のみならず、末梢の細胞においても変化が生じている可能性が示唆された。一方今回の研究においてはTGF-β1の遺伝子多型においてはHC群とAD群には相違は認められなかったが、IL-6についてはIL-6prom 遺伝子でHC群と比較しAD群においてG対立遺伝子頻度が有意差をもって高く、また今回同時に行った血清IL-6濃度の測定においても、AD群において有意差をもって高いという結果が得られた。IL-6は脳内ではグリア細胞やアストロサイトが産生している。神経細胞に

は IL-6 受容体が発現しており IL-6 の作用により神経細胞の分化が促進される。現在までに IL-6 は CSF で増加することが認められており、また AD 剖検脳では IL-6 の mRNA も蛋白も発現の増強が認められているが、正常対象と比べてびまん性のアミロイド沈着部において高い比率で抽出されるとの報告がある。このことから、IL-6 の発現が老人斑形成に関係している可能性が考えられている。今回我々は IL-6prom 遺伝子の遺伝多型と血清 IL-6 濃度において AD に特徴的な所見が得られた。このことから AD の血清における IL-6 濃度の変化は遺伝子レベルの異常に基づく可能性が考えられた。また今回の研究では十分な検討は難しいが、この遺伝子レベルの異常が現在までに報告されている中枢神経系の異常と関連をもつことも考えられ、AD の発病との関わりについての理解につながる可能性もあることからさらなる検討をおこなう必要があるものと思われる。

E. 結論

AD において認められた免疫機能の変化は、末梢血中の変化のみならず IL-6 においては遺伝子レベルにおいても同様に認められ、この遺伝子多型による炎症反応が AD 発症の危険因子である可能性が示唆された。またこのような免疫能の異常が感染疾患や悪性腫瘍などの二次的な合併症を引き起こす原因となることもあり、常に考慮していく必要があるものと思われた。今後は免疫機能の遺伝子レベルの異常についてさらに検討をおこない AD や認知機能障害との関連性を解明するこ

とで、AD の病態生理について把握することが可能になるとと思われる。

G. 研究発表

1. 論文発表

Circulating natural killer cell activity and cytokine production in Alzheimer's disease.

Takuya Ishizuka, Hajime Baba, Shinji Higashi and Heii Arai

Alzheimer's Reports Vol.4 Number 2 pp81-85, 2001

The-concentrations-of-serum-

Dehydroepiandrosterone,

Dehydroepiandrosterone-sulfate-and cortisol in Japanese sporadic Alzheimer's disease.

Takuya Ishizuka, Shinji Higashi, Hajime Baba, Kanehisa Imai, Ko Eto and Heii Arai

Alzheimer's Reports Vol.4 Number 6 pp205-208, 2001

2000.11 Alzheimer 病の精神免疫学的所見

石塚卓也、新井平伊

医学のあゆみ Vol 197 No.12 pp920-921, 2001

精神神経免疫機能の老化とその対策

石塚卓也、新井平伊

老年精神医学雑誌 Vol 12 No 3 pp236-244, 2001

2. 学会発表

Takuya Ishizuka, Hajime Baba, Shinji Higashi, Heii Arai

Circulating natural killer cell activity and cytokine production in Alzheimer's disease.

The 10th Pacific Rim Collage of Psychiatrists, Nov.2001.Melbourne.

Shinji Higashi Tohru Ohnuma, Nobuto Shibata,
Takuya Ishizuka, Maiko Higashi, Heii Arai
Association of Transforming Growth Factor- β 1
Gene Polymorphism with Japanese Sporadic
Alzheimers Disease.

The 10th Pacific Rim Collage of Psychiatrists,
Nov.2001.Melbourne

柴田展人 大沼徹 高橋正 馬場元 石塚卓
也 大塚恵美子 植木彰 長尾正嗣
新井平伊

Interleukin-6 遺伝子多型とアルツハイマー病
発症との関連

第 16 回日本老年精神医学会 June 2001. 大阪
柴田展人 大沼徹 高橋正 馬場元 石塚卓
也 大塚恵美子 植木彰 長尾正嗣

新井平伊

Interleukin-6 遺伝子多型とアルツハイマー病
発症との関連

第 23 回日本生物学的精神医学会 April 2001
長崎

老化とストレス反応性に関する研究

神庭重信（山梨医科大学精神神経医学講座教授）

本年度は（1）恐怖条件付けにおける freezing の変化と海馬神経新生の老化による変化について検討を行った。footshock 後のすくみ行動が 2 時間後では高週齢群と比較して低週齢群で有意に増加していた。海馬歯状回における、BrdU 陽性細胞数の増加は低週齢群では認められたが、高週齢群では認められなかった。このことから、老化における記憶障害に、神経新生の影響があることが示唆された。さらに、加齢によるラットの学習障害に効果があるとされている Panax Ginseng を低週齢ラットに用いて恐怖条件付けを行ったところ、すくみ行動の増加と BrdU 陽性細胞数の増加が認められた。このことから、Ginseng の学習障害改善機序の一つとして、BrdU 陽性細胞数の増加という機序が考えられた。さらに（2）学習障害モデルである家族性アルツハイマー病家系に見られる変異型ヒト APP 過剰発現トランスジェニックマウスに血清アミロイド P 成分欠損マウスを掛け合わせた SAP 欠損 tg マウスを作成した。12 ヶ月齢の雌 SAP 欠損 tg マウスはモリス水迷路における、学習獲得において対象野生型マウスより優れた成績を示した。

キーワード：老化、神経新生、BrdU、Panax Ginseng、SAP、APP

（1）恐怖条件付けにおける海馬神経新生の老化による変化

A. 研究目的

低週齢のラットでは学習により海馬歯状回における神経細胞の増殖が増加することが知られている。一方、神経細胞の増殖は加齢により低下する。このため、学習による神経細胞の増殖系の変化に対する加齢による影響を検討する。このことにより、加齢に伴う認知機能および記憶力の低下の発生機序の一つを明らかにすることを目的とする。さらに、高週齢のラットにおける学習障害に効果があるとされている Panax Ginseng を低週齢のラッ

トに投与し、記憶増強効果の機序について検討し、今後の創薬につなげる。

B. 研究方法

BrdU 投与：恐怖条件付けの 5 日前に 200mg/kg の BrdU を 4 回に分け 6 時間おきに腹腔内注射を行った。

行動実験：120 週齢に高週齢ラットと 12 週齢の低週齢ラットに恐怖条件付けを行い、footshock 直後と 2 時間後に freezing を評価した。恐怖条件付けはチャンバー（28×21×22×cm）に移されてから 3 分後に 20 秒間、800Hz、20dB の音刺激を行い、最後の 2 秒間に 0.75mA 2 秒間の footshock を行った。

実験後 4%PFA にて灌流固定、24 時間の後固

定を経て40 μ mの凍結切片を240 μ mおきに10枚採取し、BrdU陽性細胞を免疫染色を用いて染色した。10枚の切片におけるBrdU陽性細胞数を数えた後、歯状回の面積により除すことにより標準化を行い比較した。

低週齢群に対するPanax Ginsengは100mg/kgおよび200mg/kg5日連続経口投与した後に同様の恐怖条件付けを行い2時間後に灌流固定を行いBrdU陽性細胞数の変化を観察した。

なお、これらの実験は山梨医科大学動物実験倫理委員会の承認を得たものである。

C. 研究結果

高週齢群では2時間後のfreezingが低週齢群より有意に少なく、BrdU陽性細胞数も低週齢群に見られるような増加を示さなかった。

低週齢群に対するPanax Ginseng投与ではfreezing増加およびBrdU陽性細胞数の増加の両方の効果を示した。

D. 考察

低週齢ラットにおいて認められた、freezingの変化と海馬歯状回におけるBrdU陽性細胞数の増加が、高週齢ラットでは認められなかった。海馬歯状回におけるBrdU陽性細胞数の増加が、学習に関係していると考えられていることから、我々の結果は老化における学習機能の低下に海馬歯状回における神経新生の低下が関与している可能性を示していると考えられた。

さらに、低週齢ラットにおいて、Panax GinsengがfreezingとBrdU陽性細胞数とともに増加させることから、海馬歯状回における神経新生と学習とともに増強する効果を持つことが示唆される。以前より、Panax

Ginsengは加齢による学習障害を改善する作用が知られていることから、今回の我々の結果はPanax Ginsengの作用機序の一つを解明したものと考えられた。

E. 結論

今回の我々の結果は加齢による神経新生の低下が学習能力の低下を説明する一つのメカニズムであることを解明した。さらに、Panax Ginsengによる学習増強効果の作用機序の一つが、神経新生の増加であることを示唆する結果を得た。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

本年度は、これらの実験に関する論文の発表は行わなかった。

2. 学会発表

THE MECHANISMS OF MEMORY ENHANCEMENT THROUGH GINSENG
R. Den, K. Kudo, C. X. QIAO, K. Yamada, S. Kanba CIMP 2001

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

Panax Ginsengにおける神経新生効果(予定)

2. 実用新案登録

特になし

(2) 遺伝子改変マウスを用いたアルツハイマー病発症機構の解析

A. 研究目的

アルツハイマー病患者の脳に見られる老人斑の主成分である β -アミロイドペプチド(A β)はアミロイド前駆体蛋白(APP)がプロテアーゼによるプロセッシングを受けることによって産生される。Hsiaoらは、スウェーデンの家族性アルツハイマー病家系に見られる変異を有するヒトAPPを過剰に発現するトランスジェニック(tg)マウスを作成し、A β の生成亢進と学習記憶障害を報告している。また、血清アミロイドP成分(SAP)は、肝臓で合成される血清糖蛋白質で、全てのアミロイド中に共通する成分であり、in vitroでA β アミロイドの形成を促進することが報告されている。今回SAPが加齢に伴う記憶障害にin vivoで関与しているか否かを調べるために、SAPを欠損マウスとAPP過剰発現トランスジェニックマウスを掛け合わせたSAP欠損tgマウスを作成し、記憶障害について検討した。

B. 研究方法

SAP欠損tgマウスの作製: ジーンターゲティング法を用いてSAPが破壊されたアレルを持つマウスを作製した。シャイオらの作成したヒト変異型APP過剰発現トランスジェニックマウスを購入し、SAP欠損マウスと交配させた。マウスは12ヶ月齢まで、飼育され行動実験に供された。

行動実験: モリス式水迷路 1982年のもりすの方法に準拠して行った。直径120cm円形プールを24℃の水で満たし、直径10cmのプラットフォームを水面から隠れるように設置した。このプールにマウスを投下しプラットフォームへ到達するまでの時間を測定した。1クール4回施行し、30秒間のインターバルを入れた。この施行を2時間後にも行い、連続

3日間施行した。

なお、これらの実験は山梨医科大学動物実験倫理委員会の承認を得たものである。

C. 研究結果

学習獲得において、12ヶ月齢の雄はSAP欠損tgマウスは対象野生型マウスとの間に有意な差が存在しなかった。12ヶ月齢の雌ではSAP欠損tgマウスと対象野生型マウスの間に有意な差が見出された。

D. 考察

APP過剰発現トランスジェニックマウスの記憶障害がSAPをノックアウトすることにより、雄では対象野生型マウスと同等の記憶獲得能を示すこと、さらに雌では対象野生型マウス以上の記憶獲得能を示すことから、SAPはAPP過剰発現時における記憶障害に深く関与していることが示唆された。

E. 結論

APP過剰発現による学習障害がSAPを欠損させることにより生じなくなることから、今後、SAPを血清中より除去するなどの方法により、今後アルツハイマー病の予防法の開発にせまることが可能となるかもしれない。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

特になし

2. 学会発表

遺伝子改変マウスを用いたアルツハイマー病
発症機構の解析 玉置寿男、久保田正春、杉
山仁視、前田秀一郎、保坂恭子、神庭重信第3
回感情・行動・認知(ABC)研究会

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含
む）

特になし。

分担研究報告書

加齢のおよぼすストレス反応性への影響に関する研究

分担研究者 山脇成人 広島大学医学部神経精神医学講座 教授

研究要旨 Sensory gating systemとは外界からの刺激に対して、生体の感受性を変化させる前注意的な神経機構で、環境への適応に重要な役割を果たしていると考えられている。今回の検討から、急性のストレスはgating systemの異常を引き起こすこと、さらにこのgating systemの異常はストレスの予期に関連している可能性が考えられた。

A. 研究目的

加齢によってストレス抵抗性の減弱することが報告されているが、そのメカニズムの詳細は解明されていない。このため加齢のストレス反応性におよぼす影響の脳内メカニズムを解明する目的で、老齢および成熟期ラットの海馬を対象に、ストレス負荷に伴う遺伝子発現の違いをcDNAアレイ法・real-time quantitative PCR法を用いて検索した。その結果 amphiphysin I 遺伝子の発現低下が老齢ストレス群に特異的であり、この amphiphysin I 遺伝子発現の減少によってエンドサイトーシスの障害が予想され、老齢期のうつ病でみられる記憶力障害の発症機序の一因となっている可能性が示唆された。

A. 研究目的

精神障害の発症過程に心理社会的ストレスの密接に関与していることが、うつ病や外傷後ストレス障害などの臨床研究から提唱されてきている。中でも高齢者では、環境の変化などの些細なストレス要因の存在下でも精神障害の発症が頻回に報告され、加齢による中枢神経系の何らかの変化がストレス脆弱性の発現に深く関与していると推論されている。しかしながら具体的にどのような脳内の加齢に伴うマクロ的・ミクロ的变化が、ストレスに対する抵抗性の減弱に関連しているかについては、ほとんど解明されていない状況である。

そこで本年度は、加齢のおよぼす脳機能のストレス脆弱性形成に関与する非器質的要因を明らかにする目的から、老齢ラット海馬でストレスによって特異的に成熟期ラットと発現の異なる遺伝子を探索した。

B. 研究方法

対象は Sprague-Dawley ラットで、老齢群は 20 ヶ月齢を成熟期群は 3 ヶ月齢を用いた。なお、以下の実験は広島大学動物実験指針

に基づき行った。多様性ストレスは 60 分間拘束ストレス・60 分間振動ストレス・30 分間水泳ストレスを連続して行い、これを 4 日間連続して負荷した。最終ストレスは拘束ストレスとレスストレス負荷終了直後に海馬を摘出し、Ambion の RNAqueous Kit のプロトコールに準じて total RNA を抽出した。老齢ストレス群および成熟期ストレス群とも、それぞれ 8 匹のラットから total RNA を抽出した。

老齢ストレス負荷ラットと成熟期ストレス負荷ラットの海馬での遺伝子発現の違いのスクリーニングは cDNA アレイ法にて行い、ここで著明な発現の差の見られた遺伝子を対象に real-time quantitative PCR 法にて詳細な発現の違いを再検討した。cDNA アレイには 207 種の cDNA を含む、Atlas cDNA Expression Array (CLONTECH) を用いた。各ラット海馬から得た total RNA を DNase I 処理後に、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ 存在下で逆転写酵素を用いて single strand cDNA に逆転写した。これをプローブとしてアレイに 68°C 18 時間ハイブリダイズさせ、各 cDNA spot に結合しているプローブの放射活性を Fuji Film BAS2000 にて計測した。

Real-time quantitative PCR 法には、DNase I 処理を行った total RNA をサンプルに逆転写酵素を用いて合成した cDNA をテンプレートとして使用した。各目的とした遺伝子の coding sequence を Gene Bank より検索し、これをデータに Primer Express ソフトウェアにて forward, reverse primer と Taq Man probe の塩基配列を設計し、各 primer や蛍光標識 Taq Man probe の合成を行った。このようにして作成したプライマーセットを使い、ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (SDS) を用いて PCR 反応を行い蛍光強度を計測後、SDS ソフトウェアで解析した。

C. 研究結果

老齢ストレス負荷ラットと成熟期ストレ