

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による新規治療法
の開発と評価

— 脳・感覚器疾患等を中心にして —

平成 13 年度 研究成果報告書

平成 14 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

総括研究報告書

霊長類を用いた老人病モデルによる新規治療法の開発と評価
—脳・感覚器疾患等を中心にして—

研究要旨

30年以内に65歳以上の高齢者が全人口の15%以上をしめる高齢社会を迎えようとしている。こうした状況は、先進国でわが国が最初であり、高齢社会に伴う弊害をどう克服して行くかは重要な問題である。特に老人病、なかでも痴呆症、パーキンソン病、感覚器疾患や代謝病のような疾患の増加は、高齢者の孤立化をもたらすだけでなく、社会的な負担も著しく増大させる。これらの疾患の克服は21世紀のわが国にとって大きな問題である。

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人病モデルの開発と、その病態解析を進めている。平成13年度は痴呆症、パーキンソン症、眼疾患、脂質代謝、糖尿病をとりあげ、自然発症モデルの病態解析と発症機序に関する研究を進めた。また眼疾患を中心に海外における老齡サル研究資源の共同利用を海外と進めた。緑内障については実験モデルの利用を試みた。またエイジングファーム群の死亡個体に関する臨床診断・病理検索(データベース化)を進めた。

A. 研究目的

高齢社会を迎え痴呆症、パーキンソン病、感覚器疾患、肥満・糖尿病等、高齢患者のQOL問題の克服は厚生科学の主要課題である。しかし、これら老年性疾患は原因が複雑で、加齢に伴う多臓器機能減退、晩発性遺伝発現、ホメオスターシス機構の破綻、環境因子が複合して発症する複合性疾患である。こうした疾患の発症機序の解析には、長寿で、生理・代謝機能、脳・神経系の構造・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。

本研究班では重要なヒトの老年性疾患に関し、霊

長類を用いて自然発症モデル及び実験モデルの開発とその有用性評価を進めている。また研究基盤確立のため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、わが国の老齡ザルを用いた共同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作成も進めている。またゲノム科学の手法を利用し、老人病を対象とした新規次世代治療法のモデル系の開発を試みている。このため治療効果の評価に有効な老齡ザルモデルの開発と治療プロトコル、及び有効性評価のシステムを開発する。特に齧歯類モデルで評価し得ない脳、感覚器疾患等を対象として、遺伝子治療、再生医療等を含む臨床応用可能な次世代治療法の有効性と安全性を評価することも研究班の目的としている。

B. 材料および方法

痴呆症、パーキンソン症、眼疾患、脂質代謝、糖尿病について、*in vitro* モデル、自然発症モデルの解析と発症機序に関する研究を進めた。また眼疾患を中心に海外における老齢サル研究資源の共同開発を進めた。緑内障については実験モデルの利用を試みた。さらに新規治療法を臨床研究に結びつけるための霊長類モデル系を用いた評価系を確立するための基盤研究として骨髄幹細胞の分離技術開発等をはじめた。エージングファーム群の死亡個体に関する臨床診断・病理検索を進めた。

C, D. 結果と考察

①老人斑は脳皮質にアミロイドβ蛋白が凝集し蓄積したものであり、老人斑が脳内に形成され、次いで神経原線維変化が生じると考えられている。本年度は *in vitro* での霊長類モデル系の作成基盤として、18日齢のラット胎仔脳皮質を用いて神経回路網を形成する初代培養系を作成し、培養3日後にAβを添加した。Aβはβシート凝集に關与するアミノ酸配列のみからなるAβ₂₅₋₃₅、凝集性および毒性が低い分子種のAβ₁₋₄₀、凝集性・毒性が最も高いAβ₁₋₄₂を用いた。ApoEは実験開始7日目より蛋白の発現が見られ、培養後14日後ではコントロール群と比べApoEの発現量が上昇した。GFAPでも同様の結果が得られたが、ApoEほどの有意差は確認されなかった。また活性化Caspase-3の発現は実験開始後14日後のみに確認され、Aβ₂₅₋₃₅添加群およびAβ₁₋₄₂添加群でよく存在が確認された。APPの発現量と開列、Synの発現量、GSK-3βの発現量にはコントロール群と実験群で差は確認されなかった。

②パーキンソン病の予防法および新規治療法の開発を目的として、カニクイザルを用いてMPTPの静脈内投与による慢性化モデルの開発と、コンピュータによる自動行動解析システムを用いた重症度診断法の開発を試みた。MPTPの静脈内投与で誘発されるパ

ーキンソニズムの発症感受性には著しい個体差がみられた。慢性型パーキンソン様症状を長期間持続する個体、肝機能障害により急性毒性で死亡する個体、投与中止後に一過性症状を呈した後で回復する個体群に分けられた。急性毒性ケースでは肝機能をモニターしながら、MPTPの投与量および投与間隔を微調整する必要があることが明らかになった。また肝機能測定値により次のMPTP継続投与を調整する方法を適用した結果、投与中止後も安定的なパーキンソン症状が持続するモデルの開発に成功した。病態モデルを用いた新規治療法の有効性評価を目的として、自動行動解析システムによる重症度診断法を検討した結果、干ブドウを採る手の動きを差分解析することにより重症度の診断が可能であることが明らかになった。

③ヒト用のアディポネクチン・ラジオイムノアッセイ測定キットを用いてカニクイザルの測定が可能であるか否か検討した。その結果、カニクイザルの測定に十分適合すると判断された。雌カニクイザルの場合、有意な相関関係が検出されたのは、体重と中性脂肪との間であった。さらに中性脂肪と血糖値の間にも強い関係が認められ、雌カニクイザルの肥満が高脂血症・糖尿病と深い関係にあることが明らかになった。またインシュリンとレプチンとの正の関係にあったことから、糖尿病発症と脂質代謝との関係が明らかになった。他方、脂肪組織で合成され、血流に放出されるサイトカインの一種であるアディポネクチンは、レプチンやインスリンとは逆の挙動を呈し、体重とも負の相関が認められた。

④サル類を用いた眼科領域の新規治療法の開発と評価のための基礎的研究として、リスザル眼底加齢変化、カニクイザルを用いた実験的緑内障モデルの作成と発症機序、緑内障治療薬の作用機序の研究、網膜黄斑変性モデルに関する研究を取り上げた。その結果、リスザル0日齢から15歳齢における眼底像は加齢に伴い著しい変化を示すことが明かとなった。また緑内障性神経障害の発症機序として中間径フィ

ラメントが脱リン酸化を起こし、軸索輸送に障害が起こり、神経脱落を来す可能性が唆された。また加齢性黄斑変性を自然発症した老齢カニクイザルについて主にドルーゼンに注目して組織学的検索を行い、AMD モデルとしての評価を行った。その結果、カニクイザル加齢性黄斑変性では AMD の滲出型前段階と萎縮型に相当する 2 型がみられることが明らかになった。ドルーゼンは糖タンパクを含み、一部はリン脂質に富む球状構造を有していた。透過型電子顕微鏡下では内部に電子密度の濃い微細顆粒が散在する疎な微細網状構造物として観察された。これらの所見はヒトのドルーゼンと共通するものであり、カニクイザル加齢性黄斑変性が AMD モデルとして非常に有用であることが示された。また遺伝性黄斑変性モデルと並行して解析することにより病態機序解明にむけて貴重な知見が得られるものと考えられる。

⑤エイジングファームに導入した 1998 年から 2001 年までの 3 年間に 60 頭中 10 頭が死亡もしくは全身状態悪化のため予後不良と判断して安楽死となった。死亡例の 6 割が糖尿病を発症しており、糖尿病が加齢疾患をコントロールするうえで非常に重要な病態であることが明らかとなった。膵臓の組織学的検索では発症の経過、時期による明らかな傾向は認められなかった。死亡の原因は感染症を併発していることが重要な誘因となっていることから、糖尿病発症に伴う免疫能の変動を明らかにしていく必要があると考えられた。現在エイジングファームにおける糖尿病治療研究として、ブタ膵島細胞移植による治療研究を進めている。生理的代謝能に対する影響とともに異種移植における、感染症に対する安全性について検討をおこなっている。

E. 結論

本年度は痴呆症、パーキンソン症、眼疾患、脂質代謝、糖尿病をとりあげ、自然発症モデルの病態解析と発症機序に関する研究を進めた。また眼疾患を中心に海外における老齢サル研究資源の共同利用を

フィリピンと進めた。緑内障については実験モデルの利用を試みた。またエイジングファーム群の死亡個体に関する臨床診断・病理検索（データベース化）を進めた。

F. 研究発表

Kimura, N., Nakamura, S., Goto, N., Narushima, E., Hara, I., Scichiri, S., Saitou, K., Nose, M., Hayashi, T., Kawamura, S., Yoshikawa, Y. Senile plaques in an aged western lowland gorilla, *Exp. Anim.* 50, 77-81, 2001.

Nakayama, H., 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. Letter.* 297, 195-198, 2001.

Kamiya, K., Takahashi, K., Kitamura, K., Momoi, T., Yoshikawa, Y. Mitosis and apoptosis in postnatal auditory system of the C3H/He strain. *Brain Res.* 901, 296-302, 2001.

Takahashi, K., Kamiya, K., Urase, K., Suga, M., Takizawa, T., Mori, H., Yoshikawa, Y., Ichimura, K., Kuida, K., Momoi, T. Caspase-3-deficiency induces hyperplasia of supporting cells and degeneration of sensory cells resulting in the hearing loss. *Brain Res.* 894, 359-367, 2001.

Setoguchi, A., Okuda, M., Nishida, E., Yazawa, M., Ishizaka, T., Hisasue, M., Nishimura, R., Sasaki, N., Yoshikawa, Y., Masuda, K., Ohno, K., Tsujimoto, H. Results of hyperamplification of centromeres in naturally developing tumors of dogs. *American J. Vet. Rec.* 62, 1134-1141, 2001.

久保南海子、小山高正、川崎勝義、山海直、寺尾恵治、土田順子、吉川泰弘 老齡サルと若齡サルにおける位置再認課題での位置偏好反応の検討 動物心理研究 51, 11-18, 2001.

Okada, A., Igarashi, H., Kuroda, M., Terao, K., Yoshikawa, Y., Sankai, T. Cryopreservation induced acrosomal vesiculation in live spermatozoa from cynomolgus monkeys. Hum, Reproduct. 16, 2139-2147, 2001.

Kimura, N., Nakamura, S., Honda, T., Takashima, A., Nakayama, H., Ono, F., Sakakibara, I., Doi, K., Kawamura, S., Yoshikawa, Y. Age-related changes in the localization of presenilin-1 in cynomolgus monkey brain. Brain Res. 922, 30-41, 2001.

研究報告書

分担研究者 東京大学大学院農学生命科学研究科 久和 茂

研究協力者 東京大学大学院農学生命科学研究科 木村 展之

ラット胎仔大脳皮質初代培養系における低濃度アミロイド β 長期暴露実験 (アルツハイマー病進行機序の検索)

研究要旨：

アルツハイマー病主病変には、大きく分けて老人斑と神経原線維変化が存在する。老人斑は、大脳皮質内にアミロイド β 蛋白 ($A\beta$) が β シート状に凝集し、異常蓄積したものであり、神経原線維変化は微小管結合蛋白タウが異常リン酸化して細胞内に蓄積したものである。アルツハイマー病態を考えると、まず老人斑が脳内に形成され、次いで神経原線維変化が生じるとというのがアルツハイマー病進行の大きな流れとなっている。これまで、様々な培養細胞系に $A\beta$ を添加して、その細胞に対する $A\beta$ の影響を検索するという研究が数多く行われてきた。ヒトおよびげっ歯類の培養神経細胞では、アポトーシスの誘起やリン酸化の亢進 (GSK-3 β の蛋白量上昇やリン酸化タウの出現) が生じるなどの報告があり、培養アストログリア細胞では、アストログリアの活性化 (GFAP の蛋白量上昇により確認される) およびアポリポ蛋白 E (ApoE) の蛋白発現増加などの報告が寄せられている。今回我々は、神経回路網を形成することが明らかになっているラット胎仔大脳皮質初代培養系を用いて、 $A\beta$ の神経細胞系に対する作用について検索を行った。

A. 研究目的：

過去に報告されている研究は、10 μ M 以上の濃度で $A\beta$ が添加されている場合がほとんどであり、 $A\beta$ の暴露時間は24時間以内が大部分を占める。しかし、実際の脳内では長い年月をかけて少量の $A\beta$ が蓄積し、やがては老人斑とよばれるアミロイド凝集塊となることが知られている。そこで今回の実験では、2および5 μ M という比較的低濃度の $A\beta$ を初代培養系に加えて実験を行い、 $A\beta$ 添加後1, 3, 7, 10および14日後の培養細胞における各種蛋白群の動向を検索した。即ち、実際の脳内で $A\beta$ が産生された後、老人斑が形成されるまでの初

期段階でどのような反応が生じているかを検索し、老人斑形成機構およびリン酸化への影響を検索することを主旨とする。

B. 研究対象および方法

胎齢18日齢のラット胎仔大脳皮質を用いて初代培養系を作成し、培養3日後に $A\beta$ 2 μ M および5 μ M を添加した(N=10)。加えた $A\beta$ は (1) β シート凝集に関与するアミノ酸配列のみからなる $A\beta$ 25-35 (2) 凝集性および毒性が低い分子種の $A\beta$ 1-40 (3) 凝集性および毒性が最も高い分子種の $A\beta$ 1-42 を用いて検索を行った。

それぞれ DMSO で可溶化した後、10%ウシ胎仔血清 (FCS) 添加メディア (DMEM) で使用濃度に希釈して用いた。 $A\beta$ 添加後 1, 3, 7, 10 および 14 日後に細胞を回収して SDS にて細胞融解させ、Westernblotting 法を用いて生化学的に検索を行った。

検索した蛋白群は、ApoE、GFAP、Caspase-3、アミロイド前駆体蛋白 (APP)、シナプトフィジン (Syn) および GSK-3 β である。これらの蛋白群を検索した理由は、(1) ApoE および GFAP はアストログリアの活性化を検索するのに適しており、特に ApoE は老人斑形成あるいは形成抑制に関わる重要なアルツハイマー病関連蛋白質である。(2) Caspase-3 はアポトーシスカスケードの最下層に存在する因子で、培養細胞系におけるアポトーシス系反応の検索に適していると思われる。(3) APP は生体内で切断され、 $A\beta$ が産生されることがこれまでの研究で明らかになっている。過去に、 $A\beta$ 添加によって APP から $A\beta$ の産生量が増加するという報告や、APP の切断経路に影響が見られるという報告が寄せられている。(4) Syn はニューロンの神経終末部に存在するシナプス小胞を構成する蛋白質で、神経回路網の状態を検索するのに適していると思われる。(5) GSK-3 β は老人斑と並ぶアルツハイマー病主病変である神経原線維変化の形成に深く関与しているとされているリン酸化酵素で、 $A\beta$ の神経細胞系に対するリン酸化の影響を検索するのに適していると思われるからである。尚、コントロールとして DMSO のみを添加させた実験群を用いた。

C. 結果 :

(1) ApoE は実験開始7日目より蛋白の発現が見られ、培養後14日後ではコントロール群と比べ、2 μ M および 5 μ M 添加群ともに ApoE の蛋白量が上昇した。ApoE 上昇度は $A\beta$ 25-35 および $A\beta$ 1-42 添加群で顕著な増加が見られたのに対し、 $A\beta$ 1-40 添加群ではコントロールと比べて変化がなかった。GFAP でも同様の結果が得られたが、ApoE ほどの有意な差は確認されなかった。(2) Caspase-3 は活性化すると、切断を受けて活性化 Caspase-3 となる。この活性化 Caspase-3 の蛋白発現は実験開始後14日後のみに確認され、 $A\beta$ 25-35 添加群および $A\beta$ 1-42 添加群でもっともよく存在が確認された。また、この活性化 Caspase-3 の蛋白発現は 2 μ M 添加群よりも 5 μ M 添加群での発現量が高いという濃度依存性が確認された。(3) APP の蛋白量および切断仕様に関して、コントロールと実験群とで差異は確認されなかった。(4) Syn の蛋白量に関して、コントロールと実験群とで差異は確認されなかった。また、 $A\beta$ を添加したことによる Syn の蛋白量減少も確認されなかった。(5) GSK-3 β の蛋白量に関して、コントロールと実験群とで差異は確認されなかった。

D. 考察 :

これまで $A\beta$ の培養細胞系に対する影響について多数の報告がなされてきたが、いずれも高濃度の $A\beta$ を添加して短時間での測定がほとんどであった。これは $A\beta$ の各種細胞に対する影響をみるには適しているが、実際のアルツハイマー病態を再現して

いるとは言いがたい。今回我々が検索したのは、実際の脳組織と同様にグリア細胞存在下で神経回路網を形成する大脳皮質初代培養系を用いて低濃度の $A\beta$ を添加し、最大2週間の長期にわたって検索を行ったものである。即ち、脳内にアミロイドが溜まり始めたアルツハイマー病の初期段階での $A\beta$ の効果を検索したものである。今回得られた結果より以下のことが考察された。

- 1) 低濃度 $A\beta$ 投与によって ApoE および GFAP が上昇することから、アストログリアは非常に敏感に $A\beta$ に対して反応することが示唆された。即ち、正常脳組織がアルツハイマー病化する初期段階においてアストログリアの反応、とくに ApoE の増加が重要な役割をもつのではないかとということが示唆された。
- 2) Caspase-3 の活性化が低濃度 $A\beta$ 投与によっても確認されたが、若干コントロール群でも存在が確認されるため、本実験での $A\beta$ の添加が Caspase-3 の活性化に全面的に関与しているとは考えにくい。
- 3) APP の蛋白発現量および切断仕様に変化が見られなかったことから、低濃度 $A\beta$ 添加では、過去に報告されているような APP に対する影響は見られないことが明らかになった。従って、APP の切断に影響を与えるのは多量の $A\beta$ が蓄積された状態でのみ生じるのではないかと考えられた。
- 4) Syn 蛋白量の減少が見られなかったことから、本実験に用いた濃度では $A\beta$ によるニューロンに対する毒性はさほど大きくないということが確認された。

このことから、考察の2) で述べたように、本実験系におけるアポトーシス系反応に $A\beta$ が関与しているかどうかはさらに深く検討する必要があると考えられる。

- 5) GSK-3 β の上昇が見られなかったことから、本実験で用いた低濃度では $A\beta$ による GSK-3 β の亢進は起きないことが明らかになった。考察3) と同様、GSK-3 β の蛋白発現上昇もまた、アルツハイマー病進行のより後期において惹起される反応ではないかということが示唆された。

F. 結論：

低濃度 $A\beta$ によって惹起された反応が ApoE および GFAP の上昇であったことから、アルツハイマー病の初期状態ではアストログリアの反応、特に ApoE 上昇が非常に重要な役割を担っているのではないかと考えられる。ApoE はその遺伝子型から、ApoE2、ApoE3 および ApoE4 という3つのサブタイプが存在する。このうち、ApoE2 および ApoE3 は $A\beta$ 凝集に対して抵抗性に働くのに対し、ApoE4 は $A\beta$ 凝集を促進することから、孤発性アルツハイマー病危険因子の一つに挙げられている。脳内で $A\beta$ が産生された結果として ApoE の蛋白量が増加し、ApoE4 を有する個体では産生された $A\beta$ が凝集性を増し老人斑形成が亢進するという仮説が立てられる。この結果、多量に蓄積した $A\beta$ が神経細胞死を誘起したり、GSK-3 β などの微小管結合蛋白タウリン酸化酵素を活性化するのではないかと考えられる。サイクリンキナーゼの一つである CDK5 がタウのリン酸化に関与している

との報告が存在し、ApoEはこのCDK5の活性化に関与しているという報告もなされている。これまで老人斑形成と神経原線維変化との間に明確な関与は見出されなかったが、今回の結果と最新の研究報告をあわせて考えると、ApoEがこの2つの主病変をつなぐ役割を果たしているのではないかと示唆された。今後はApoEが実際にタウのリン酸化に関与しているのかどうかを明らかにすべく研究を続行していく予定である。

参考文献：

Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Englund J, Salvesen GS, and Roses AD. Apolipoprotein E: high-avidity binding to β -amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 1977-1981, 1993.

Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D, George-Hyslop PH, Pericak-Vance MA, Joo SH, Rosi BL, Gusella JF, Crapper-Machlachlan DR, Alberts MJ, Hulette C, Crain B, Goldgaber D, and Roses AD. Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* 43: 1467-1472, 1993.

Loo DT, Copani A, Pike CJ, Edward P, Whitemor ER, Walencewicz AJ, and Cotman CW. Apoptosis is induced by β

-amyloid in cultured central nervous system neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 7951-7955, 1993.

Takashima A, Honda T, Yasutake K, Michel G, Mrayama O, Murayama M, Ishiguro K, and Yamaguchi H. Activation of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 β by amyloid β peptide (25-35) enhances phosphorylation of tau in hippocampal neurons. *Neurosci. Res.* 31: 317-323, 1998.

Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, and Yuan J. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid- β . *Nature.* 403: 98-103, 2000.

Vincent B, and Smith JD. Astrocytes down-regulate neuronal β -amyloid precursor protein expression and modify its processing in an apolipoprotein E isoform-specific manner. *Euro. J. Neurosci.* 14: 256-266, 2001.

Chapman J, Korczyn AD, Karussis DM, and Michaelson DM. The effects of APOE genotype on age at onset and progression of neurodegenerative diseases. *Neurology.* 57: 1482-1485, 2001.

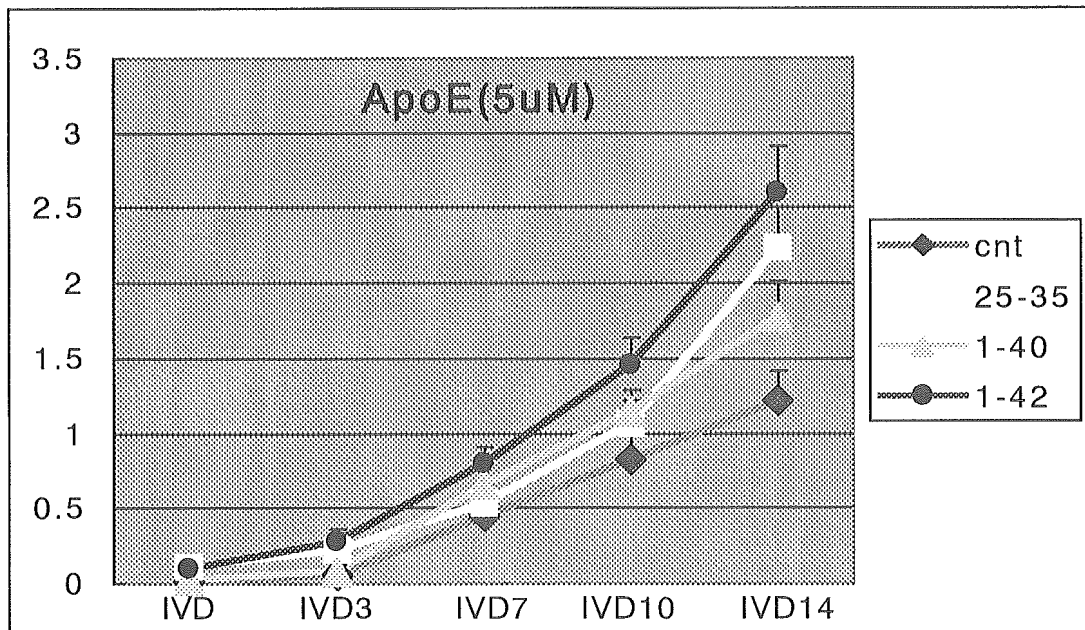
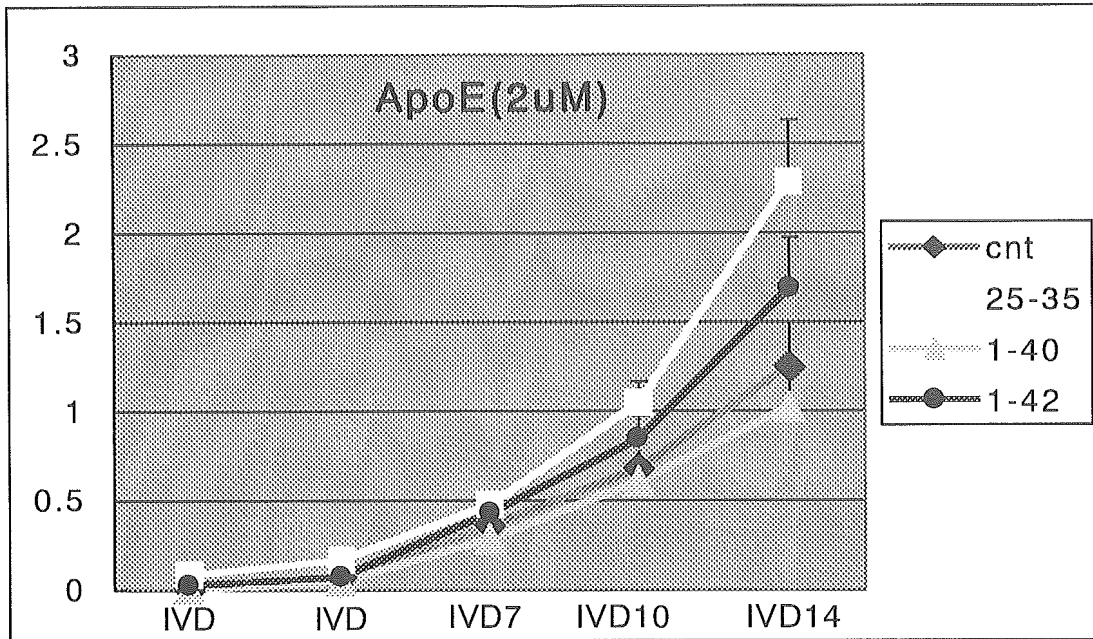
Ladu MJ, Shah JA, Reardon CA, Getz GS, Bu G, Hu J, Guo L, and Van Eldik LJ. Apolipoprotein E and apolipoprotein E

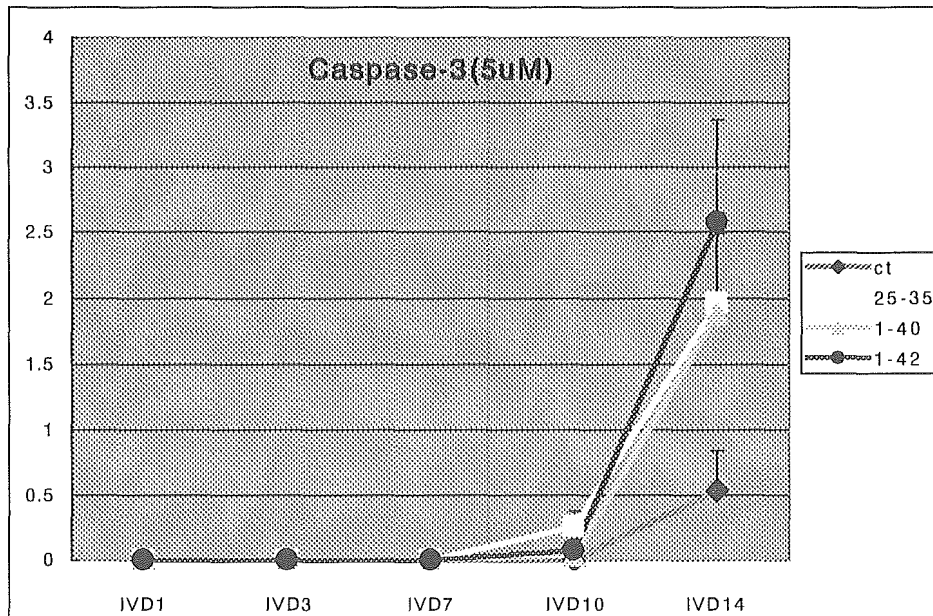
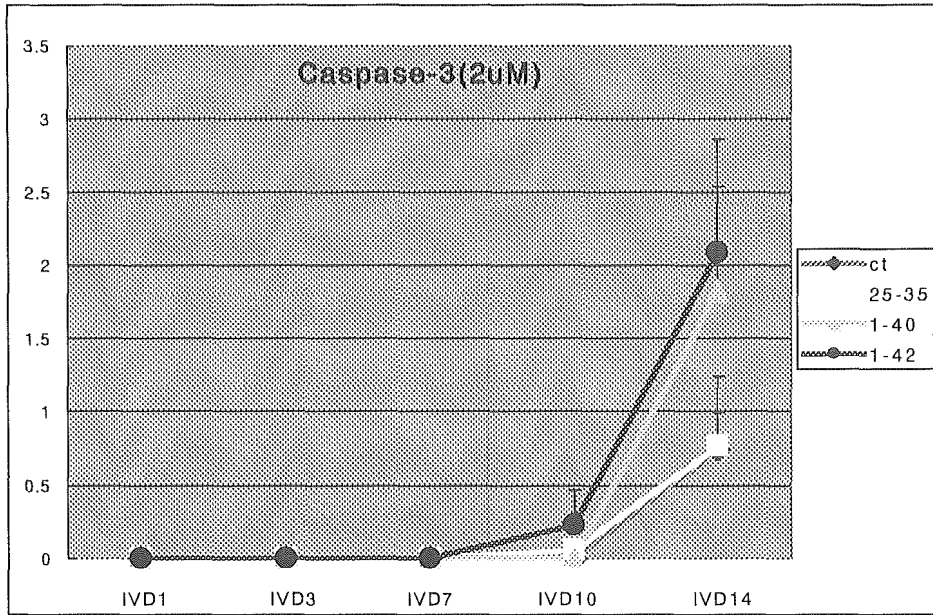
receptors modulate A β -induced glial neuroinflammatory responses. Neurochem. International. 39: 427-434, 2001.

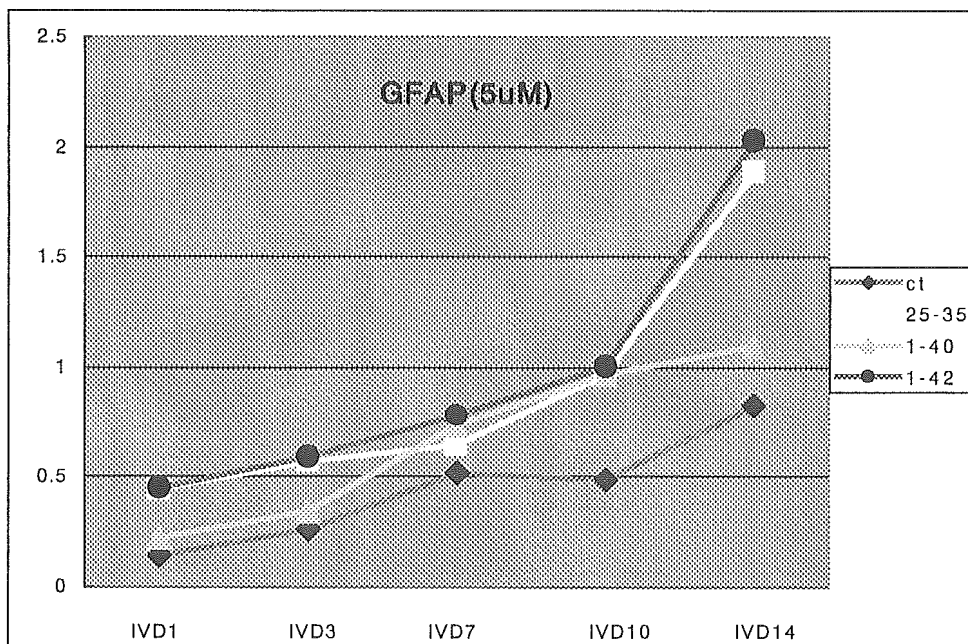
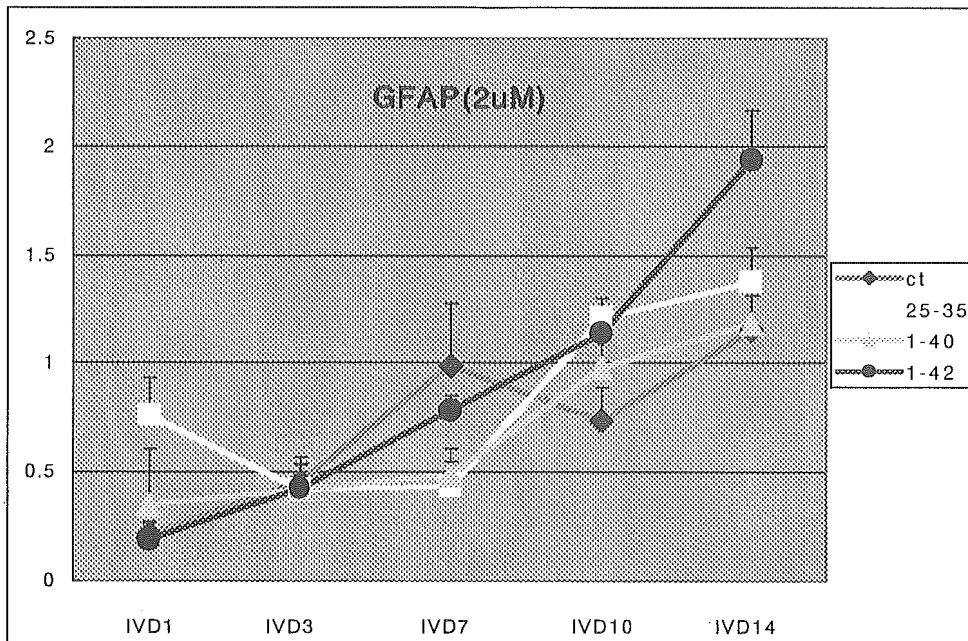
Chochina SV, Avdulov NA, Igbavboa U, Cleary JP, O'hare EO, and Wood WG. Amyloid β -peptide1-40 increases neuronal membrane fluidity: role of cholesterol and brain region. J. Lipid Res. 42: 1292-1297, 2001

Morishima Y, Gotoh Y, Zieg J, Barrett T, Takano H, Flavell R, Davis RJ, Shirasaki Y, and Greenberg ME. β -amyloid induces neuronal apoptosis via a mechanism that involves the c-Jun N-terminal kinase pathway and induction of Fas ligand. J. Neurosci. 21(19): 7551-7560, 2001.

Lupo G, Anfuso CD, Assero G, Strosznajder RP, Walski M, Pluta R, and Alberghina M. Amyloid β (1-42) and its β (25-35) fragment induce in vitro phosphatidylcholine hydrolysis in bovine retina capillary pericytes. Neurosci. Lett. 303: 185-188, 2001.







カニクイザルを用いたパーキンソン病モデルの作出と自動行動解析システムを用いた重症度診断法の開発

分担研究者 寺尾恵治（国立感染研・筑波霊長類センター）

研究要旨

高齢者の生活の質（QOL）を著しく損なう重要な疾患であるパーキンソン病の予防法および新規治療法の開発を目的として、カニクイザルを用いて神経毒である MPTP（1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine）の静脈内投与による慢性化モデルの開発と、コンピュータによる自動行動解析システムを用いた重症度診断法の開発を試み、以下の成績を得た。

1、MPTP の静脈内投与で誘発されるパーキンソニズムの発症感受性には著しい個体差があり、同一条件で投与した場合でも、四肢の振戦をともなう慢性型のパーキンソン様症状を長期間持続する場合、急性毒性により急激に行動不全を引き起こし死亡する場合および投与中止後に一過性に症状を呈した後で快復する場合に分けられた。

2、MPTP の急性毒性により死亡したケースでは肝機能障害が疑われる所見が得られ、肝機能をモニターしながら、MPTP の投与量および投与間隔を微調整する必要があることが判明した。

3、MPTP 投与前に GOT および GPT 値を測定し、測定値により次回の継続投与および投与量を調整する方法を適用した結果、MPTP 投与中止後も安定的なパーキンソン症状が持続するモデルの開発に成功した。

4、カニクイザルのパーキンソン病モデルを用いた新規治療法の有効性評価を目的として、自動行動解析システムによる重症度診断法を検討した結果、干ブドウを採る手の動きを差分解析することにより、重症度の診断が可能であると判断した。

キーワード：カニクイザル、パーキンソン病、MPTP、肝機能、行動解析

A. 研究目的

急速な高齢化社会の到来により、高齢者の健康保持と積極的社会参加の促進は緊急かつ重大な課題となった。なかでも痴呆症、パーキンソン病、感覚器障害のような行動機能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生活の質を著しく低下させ、社会的負担も増大する。本研究では、カニクイザルを用いて高齢化社会における重要な疾患とみられているパーキンソン病のモデルを作成し、新規な予防法および治療法の安全性および有用性を評価することを目的として

いる。神経毒である MPTP（1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine）を静脈内投与することにより、パーキンソン病に類似した病態モデルが各種実験動物で作製できることが知られている。一方で MPTP 処理による動物モデルでは、一過性のパーキンソニズムは誘導できるが、MPTP 投与中止後に安定してパーキンソン病に特徴的な振戦などの症状を長期間持続させることが困難であるという指摘もある。事実、MPTP を用いたパーキンソン病モデル作出は古くから試みられているにもかかわらず、慢性的な症状を持続させる霊長類モデルの作出が報告されたのはわずか 3 年前である。今年度は、カニクイザルを用いて安定的なパーキンソニズムを持続する慢性

モデルの開発と、客観的な病態診断法としてコンピュータによる自動行動解析システムを利用した重症度診断法の開発を試みた。

B. 材料および方法

筑波霊長類センターで繁殖育成された4～16歳の正常カニクイザル6頭をケミカルハザード対策を施した陰圧アイソレータ内に収容し、磷酸緩衝液(PBS)に溶解したMPTP(Sigma)を週1回の割で静脈内投与した。MPTPはPBSで溶解後、四重の密封容器に収容して4℃で保存した。MPTPの人への毒性を考慮し、MPTP投与法、無毒化法、飼育管理法、汚物処理法に関して作業マニュアルを作製し、ケミカルハザード防止につとめた。

MPTP投与後数日おきに5分間/回の割でサルを観察し、異常行動の出現を以下のSCOREで定量化した。SCORE-1:体重減少、食欲不振、あくびの多発、反応の鈍さ、SCORE-1:無関心、体重減少、手を使う行動の鈍さ、SCORE-3:無動、対光反射消失、失調症状、手の震え、眼瞼下垂、麻痺、四肢の運動麻痺、SCORE-3:傾眠傾向、四肢麻痺、SCORE-4:昏睡、SCORE-5:死亡。

MPTPの投与量は0.5ug/Kg、0.25ug/Kg、0.125ug/Kgの3用量とし、要に応じて増減した。MPTPによる肝障害の目安として、投与時に採血し血清中のGOTおよびGPT値を自動測定装置で測定し、測定値を基に次の投与時期、投与量を適宜修正した。

カニクイザルのパーキンソン病モデルを用いた新規治療法の有効性評価では、症状の改善を判定する客観的な指標が必要となるため、自動行動解析システムを用いて手の運動を解析した。ケージ前面に干ブドウを置き、これをサルが手を伸ばしてつかみとる行動をビデオテープで記録し、手を伸ばして干ブドウをつかみ、これを口元に運ぶ

一連のつかみ取り行動の運動量を差分解析するとともに、動きの周波数を分析した。

C. 結果と考察

1) MPTP0.5ug/kg 投与例:

図1は3歳齢の若齢ザルに0.5ug/KgのMPTPを週一回の割で投与した場合のパーキンソニズム発現経過を示したものである。このケースでは、SCORE-0.5の症状を発現するまでに、100日間の連続投与が必要で、その後投与回数の増加とともに症状が悪化し、典型的なパーキンソニズムである四肢の振戦が出現するSCORE-2の症状が持続し、この病態はMPTPの投与を中止した後も、3ヶ月間安定して持続した。安定した慢性化モデルの好例である。

一方、図2には図1のケースと同様な方法で0.5ug/KgのMPTPを静脈内投与したにもかかわらず、症状の出現に個体差を生じた典型的な3例を示す。#12は約6ヶ月間かけて0.5ug/KgのMPTPを連続投与したにもかかわらず、典型的なパーキンソニズムの症状が出現せず、6ヶ月目に投与した直後に急激に状態が悪化し、数日後に死亡した。#13は数回の投与でSCORE-3まで症状が悪化したが、投与を中止した後約2ヶ月で回復した例である。これに対し、#14はMPTP一回の投与で全身麻痺が生じ、2ヶ月間にわたる集中治療と人工給餌で生存させることはできたが、最終的に死亡した例である。これらの結果から、図1に示す慢性モデルと同一の条件でMPTPを投与したにもかかわらず、個体によって症状の出現が大きく異なることが判明した。モデル作出では安定的に有用なモデルを作出する必要があるため、MPTPに対する感受性の個体差を適切にモニターする方法の開発が必須と判断した。

一方、年齢によるMPTP感受性の違いについては、図1に示す個体と図2の#13は4～5歳齢、図2の#12は8歳齢、#14は16歳齢であることから、壮年ザルは若齢ザルに比べてMPTP感受性

が高い可能性が示唆される。そこで、15歳前後の壮年ザルを用いて安定的にパーキンソンモデルを作製する方法を検討した。

2) 肝機能モニターによる低濃度投与：

図2の#14のケースで全身症状の悪化から、肝機能障害を疑い血清中のGOTおよびGPTを測定した結果、いずれも200以上の値を示し重度の肝機能障害が疑われた。MPTPの肝毒性に関する報告は少ないが、図2の結果から、少なくともカニクイザルではMPTPの肝毒性感受性に個体差が存在し、同一の投与量にもかかわらず肝機能障害に差があり、これがパーキンソニズムの発症に個体差を生じる要因であることが推測された。そこで、新しいモデル作成法として、①高感受性を示す可能性のある壮年ザルを使用し、②MPTP投与量を0.5ug/Kgから0.25または0.125ug/kgに減量するとともに、③血中のGOT、GPT値をモニターしつつ次回の投与と投与量を調整する方法を試みた。図3にその一例を示す。この個体(#39：15歳)では、0.25ug/KgのMPTPを3週連続で投与した時点でSCORE-2の症状が生じ、投与を中止した。症状がSCORE-1に軽減した時点で投与を再開し、この時点のGOT値が50以上と比較的高値を示していたので、以後は投与量を0.125ug/Kgに減じて連続投与した。肝機能の改善がみられかつ症状がSCORE-1のレベルで終始していたので、12週目に0.25ug/kgの投与を再開した。これによりSCORE-2の症状が再現し、GOTの一過性の上昇を期に再度投与量を0.125ug/Kgに減じたところ、投与中止後2ヶ月以上にわたり安定的にSCORE-2の症状を示すモデルが作出できた。このことから、MPTPに感受性の高い壮年ザルを用いて、肝機能をモニターしながら低濃度のMPTPを連続または間欠的に投与する方法が、カニクイザルで再現性の高い安定した慢性パーキンソン病モデル作製であると判断した。

3) 行動解析システムを用いたパーキンソニズムの重症度診断：

パーキンソン病を標的とした遺伝子治療プロトコルの有効性評価では、症状の改善を客観的に評価する指標の確立が必須となる。図1に示すMPTP投与モデルザルについて、自動行動解析システムを用いて手の動きを解析し、症状の評価が可能か否かを検討した。図4右に示すように、サルケージ前面にセットした板に干ブドウを置き、サルが手を伸ばして干ブドウをつかむ動作をビデオテープに記録した。この一連の行動について時間あたりの運動量を差分解析により、また動作の連続性を周波数解析で求めた。図4左に投与前と発症後の手の動きを解析した結果を示す。発症前では、時間あたりの運動量は連続した一峰性のグラフとなり、周波数解析でも(結果略)1Hz付近に大きな山が観察されることから、手を伸ばして干ブドウをつかんで手を戻す、という行動は連続した一つの行動であると判断できる。一方、発症後(MPTP処理)では時間あたりの運動量が二峰性を示し、1Hzの周波数のピークが消失して2Hz付近にピークが現れている。実際の観察でも発症したサルでは干ブドウに向かって手を伸ばす行動と干ブドウをつかんで戻すという行動の間に休止期が入ることが観察されている。発症により干ブドウという小さな標的を掴みにくくなっているためと判断される。行動解析結果はこのような手の運動傷害を数値化することが可能であることを示しており、今後新規治療法での有効性評価に有用なシステムと判断できる。

E. 結論

カニクイザルを用いて神経毒MPTPの低濃度連続投与によるパーキンソン病モデルの作出を試みた。

MPTPに対する感受性には年齢差があり、15

歳以上の壮年ザルは若齢ザルに比べて感受性が高い可能性が示唆された。

同一年齢でも、発症に至る感受性に大きな個体差があり、これが MPTP の肝毒性による可能性が考えられた。

肝機能をモニターしながら、MPTP の継続投与、投与量を調整する方法を確立し、これにより安定的に慢性化モデルの作製が可能になると判断した。

自動行動解析システムを用いて、干ブドウをつかむ一連の手の動きを解析した結果、運動量と周波数分析で重症度診断が可能であると判断した。

F. 研究発表

1. 論文発表

TERAO,K.,FUJIMOTO,K.,SHIMOZURU,Y.,N AGAI,Y.and YOSHIKAWA,Y. (2001) Possible role of peripheral CD14^{low} monocytes in the development of collagen-induced arthritis in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). EXPERIMENTAL ANIMALS, 50: 9-18

TAKAHASHI,K.,MIYAKE,S.,KONDO,T., TERAOK,K.,HATAKENAKA,M.,HASHIMOTO,S. and YMAMURA,T.(2001). Natural killer type 2 (NK2) bias in remission of multiple sclerosis. JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, 107: R23-R29.

AGEYAMA,N.,SHIBATA,H., NARITA,H., HANARI,K.,KHONO,A.,ONO,F., YOSHIKAWA,Y. and TERAOK,K.(2001) Specific gravity of whole blood and total blood volume in nonhuman primates. CONTEMPORARY TOPICS IN LABORATORY ANIMAL SCIENCE,40:33-35.

久保南海子、小山高正、川崎勝義、山海直、寺尾恵治、土田順子、吉川泰弘 (2001)、老齢ザルと若齢ザルにおける位置再認課題での位置偏好反応の検討、動物心理研究、51 : 11-18

OSADA,N., HIDA,M., TANUMA,R., ISEKI,K., HIRATA,M., SUTO,Y., HIRAI,M., TERAOK,K., SUZUKI,Y.,SUGANO,S. and HASHIMOTO,K. (2001). Assignment of 118 novel cDNAs of cynomolgus monkey brain to human chromosome. GENE, 275: 31-37

KUBO,N.,KOYAMA,T.,KAWASAKI,K., TSUCHIDA,J., SANKAI,T., TERAOK,K. and YOSHIKAWA,Y. (2001) Behavioral complements in a positional learning and memory task by aged monkeys. BEHAVIOURAL PROCESS, 56: 15-22.

MURAMATSU,S., FUJIMOTO,K., IKEGUCHI,K., SHIZUMA,N., KAWASAKI,K., ONO,F., SHEN,Y., WANG,L., MIZUKAMI,H., KUME,A., MATSUMURA,M., NAGATSU,I., URANO,F., ICHINOSE,H., NAGATSU,T., TERAOK,K., NAKANO,I and OZAWA,K. (2002), Behavioral recovery in primate model of Parkinson's disease by triple transduction of striatal cells with adeno-associate viral vectors expressing dopamine-synthesizing enzymes. HUMAN GENE THERAPY, 13: 345-354.

KAWASAKI,K., MITSUI,Y., ONO,T., OGAWA,H., TAKANO,I., SANKAI,T. and TERAOK,K. (2002) Simple assay method for serum oxytocin and comparison of serum oxytocin levels between infant-accepted and infant-rejected monkeys during parturition in cynomolgus monkeys. EXPERIMENTAL ANIMALS, -in press-

LEE,W.W., NAM,K.H., TERAOK,K. and YOSHIKAWA,Y (2002) Age related telomere length dynamics in healthy cynomolgus monkey's PBMC measured by Flow FISH. IMMUNOLOGY, -in press-

SHIMADA,MK., SHOTAKE,T. and TERAOK,K. (2002). Mitochondrial sequence

variations within and between subspecies of savanna monkeys (*Cercopithecus aethiops*) JOURNAL OF HEREDITY, -in press-

2. 学会発表

松本 淳、川合 覚、寺尾恵治、相川正道、松田 肇、重症マラリア疾患モデルにおける自己免疫応答の解析：Plasmodium coatneyi 感染アカゲザルにおける自己抗体産生の推移、第70回日本寄生虫学会・第53回日本衛生動物学会合同大会、2001年4月4日-6日、山形

清水裕子、寺尾恵治、石田貴文、マカク延命細胞にみられた p53 遺伝子異常、第17回日本霊長類学会、2001年7月12日～15日、京都

坂手龍一、肥田宗友、菅野純夫、橋本雄之、

早坂郁夫、寺尾恵治、平井百樹、霊長類遺伝子データベース、第17回日本霊長類学会、2001年7月12日～15日、京都

肥田宗友、坂手龍一、鈴木 穰、菅野純夫、五條堀孝、橋本雄之、寺尾恵治、平井百樹、ヒトとカニクイザル mRNA5'領域の比較、第17回日本霊長類学会、2001年7月12日～15日、京都

Lee WW, Nam, KH, Shibata,H., Terao,K. and Yoshikawa,Y. Age-related increase in peripheral CD4+ CD8+ double positive T cells in cynomolgus monkeys (longitudinal study). The 31th Annual Meeting of Japanese Society for Immunology, December 11-13, 2001, Osaka.

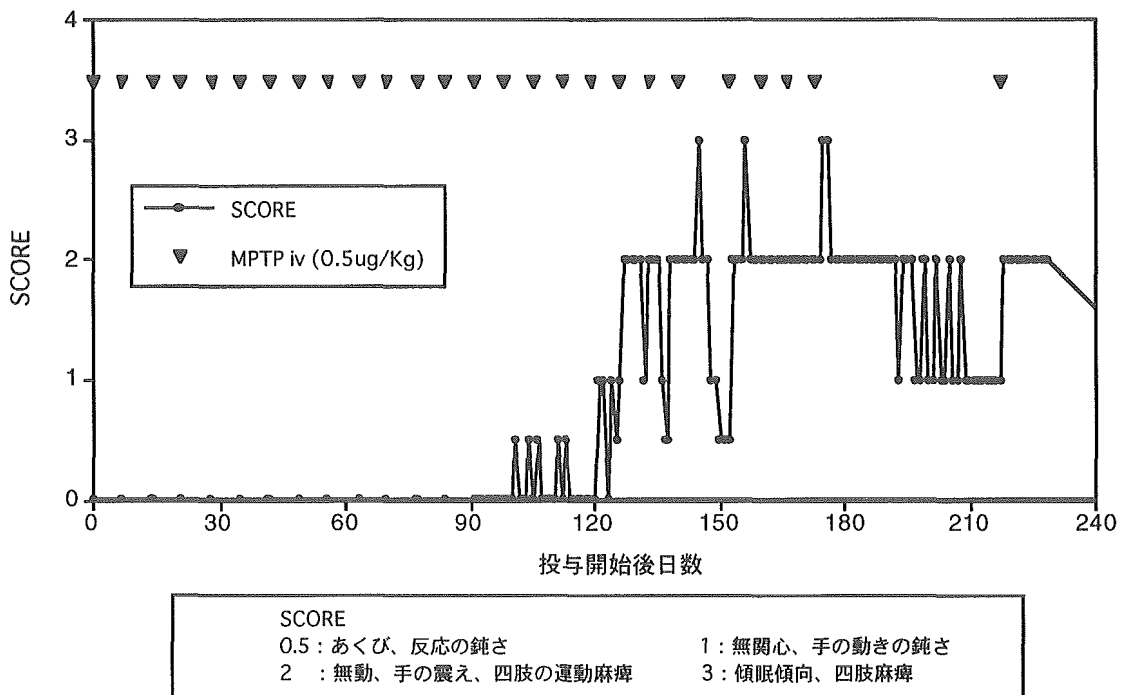


図1：MPTPの低濃度長期投与によるカニクイザルパーキンソン病モデルの作成

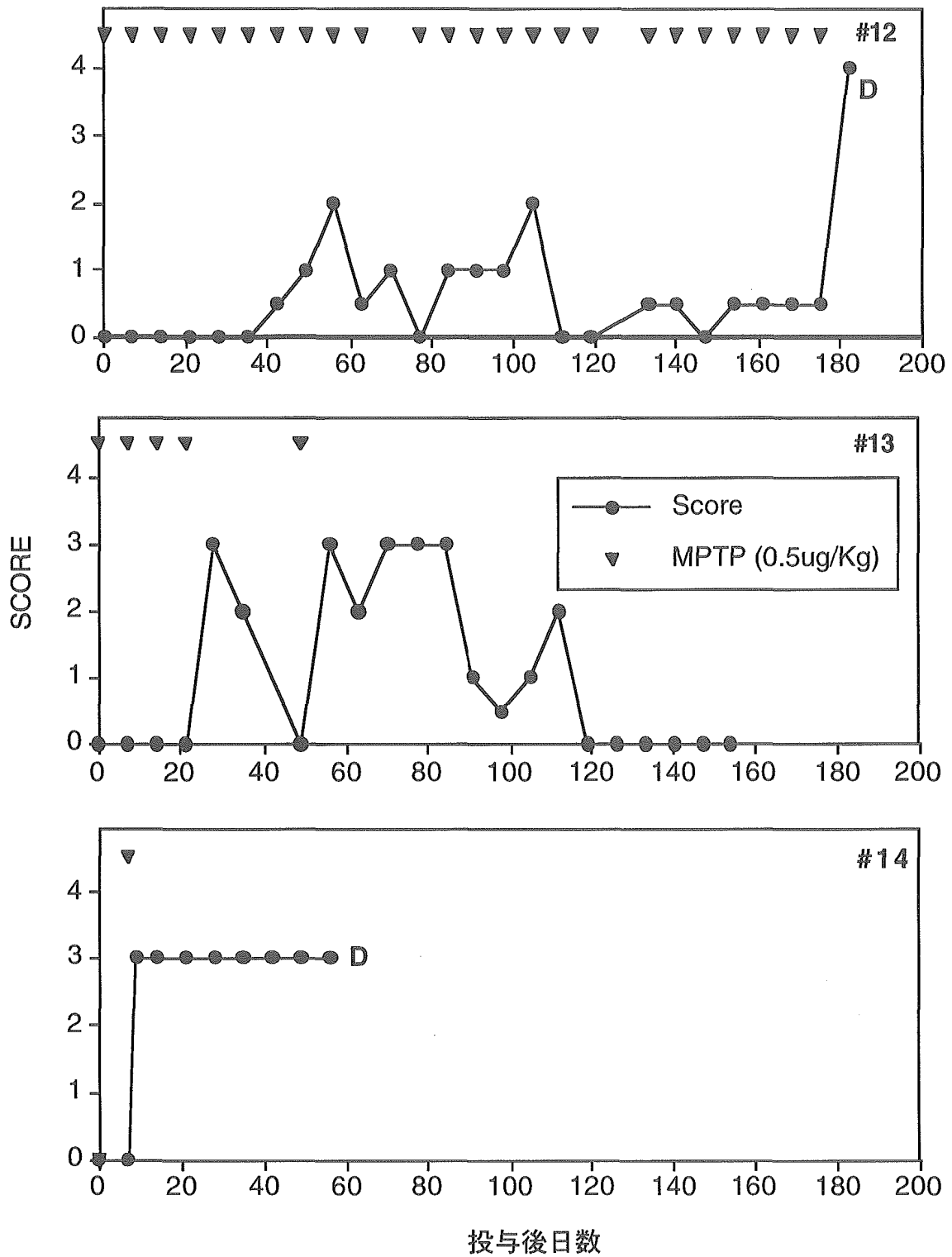


図 2 : MPTP 連続投与によるパーキンソン様症状発症の個体差