

3681-3686, 2000.

4. Araki W, Yuasa K, Takeda S, Shirotani K, Takahashi K, Tabira T : Overexpression of presenilin-2 enhances apoptotic death of cultured cortical neurons. The molecular Basis of Dementia, 920: 241-244, 2000.

## 2. 学会発表

なし

## H. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

現在、某製薬会社と特許の取得について契約中である。

厚生科学研究費補助金（21世紀型医療開拓推進研究事業）  
分担研究報告書

Aβ発現アデノウイルスベクターを投与したマウスの組織解析

分担研究者 田平 武

国立療養所中部病院長寿医療研究センター センター長

アデノウイルスベクターを投与したマウスの各組織を解析した。  
Aβ発現アデノウイルス粒子を経口投与したマウスにおいて、経口投与5ヶ月後にも上部消化管上皮細胞に Aβ蛋白の発現を認めた。コントロールとして、E.coli LacZ 発現アデノウイルスベクター投与したマウスの上部消化管上皮細胞にも5ヶ月間 Lac Z の発現を認めた。他の臓器に炎症反応が起こっていないか、各臓器の組織を検索したが、脳および腎臓を含め他臓器に炎症所見は認められなかった。

1) 研究目的

欧米では、アルツハイマー病の治療として Aβペプチドのワクチン療法が行われているが、我々は、アデノウイルスベクターを用いた新しい経口ワクチン治療法の開発を試みている。今年度は、Aβ発現アデノウイルス粒子を経口投与したマウスにおいて、上部消化管上皮細胞における Aβ蛋白の発現の経過や、自己免疫反応による他の臓器に炎症反応が起こっていないか、各臓器の組織を検索したので報告する。

2) 研究方法

アデノウイルス投与したマウスの組織の凍結切片を用いて実験を行った。

1) 組織中の Aβ蛋白や老人斑を検出するために、70% formic acid で処理し、5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> で内因性の peroxidase 活性を失活させた。抗 Aβ抗体(1000 倍希釈)またはマウス血清(500 倍希釈)と反応させた後、peroxidase 標識 2 次抗体を加え、DAB 染色を行った。

2) Lac Z の発現解析のため、β-gal staining kit (In vitrogen 社)を用いて、β-galactosidase 染色を行った。

## C. 研究結果

アデノウイルス粒子を経口投与したマウスの上部消化管の凍結切片を解析した。

1. コントロールとして、E.coli LacZ 遺伝子をアデノウイルスベクターに組み込んだベクターを作成した。このコントロールウイルス粒子を経口投与し、腸管細胞における Lac Z の発現を  $\beta$ -galactosidase 染色を行い解析した。その結果、経口投与5ヶ月経過後も  $\beta$ -gal 陽性細胞を腸管上皮細胞に認めた (図1)。

2. A $\beta$ 発現アデノウイルス粒子を経口投与したマウスにおいても、1ヶ月後に解剖したマウスの上部消化管上皮細胞に A $\beta$ 蛋白の発現を認めた (図2)。経口投与5ヶ月後にも A $\beta$ 蛋白の発現を認めた (図3)。さらに同組織切片を congo red 染色し、A $\beta$ の沈着を認めた (図4)。

3. 他の臓器に炎症反応が起こっていないか、各臓器の組織を検索したが、最も炎症が起こりやすいと考えられる脳および腎臓を含め、炎症所見は認められなかった (図5)。

## 2. 考察

欧米では、アルツハイマー病の治療として A $\beta$ ペプチドのワクチン療法が行われているが、我々は、アデノウイルスベクターを用いた新しい経口ワクチン治療法の開発を試みている。APP の分泌シグナルである N 末の最初の signal

sequence (18アミノ酸)を A $\beta$ 43 の N 末に結合させた融合遺伝子 APPsignal sequence+ A $\beta$ 43 cDNA を作成し、効率よく A $\beta$ が細胞外に分泌されるようなアデノウイルスベクター (pAdeno-X-signal seq-A $\beta$ 43) を開発した。

C57BL/6J マウスに A $\beta$ アデノウイルス  $1.5 \times 10^7$  pfu, コントロールとして Lac Z アデノウイルス  $1.0 \times 10^7$  pfu 経口投与し、経時的にマウスを解剖し組織を解析した。

A $\beta$ 発現アデノウイルス粒子を経口投与したマウスにおいては、1ヶ月後に解剖したマウスの上部消化管上皮細胞に A $\beta$ 蛋白の発現を認めた。経口投与5ヶ月後にも A $\beta$ 蛋白の発現を認めた。さらに同組織切片を congo red 染色し、A $\beta$ の沈着を認めた。

A $\beta$ 蛋白に対する抗体が産生されるため、諸臓器において自己免疫反応による炎症が起こる可能性が考えられたが、最も炎症が起こりやすいと考えられる脳および腎臓を含め、炎症所見は認められなかった。

## E. 結論

A $\beta$ 発現アデノウイルス粒子を経口投与したマウスにおいて、経口投与5ヶ月後にも上部消化管上皮細胞に A $\beta$ 蛋白の発現を認めた。コントロールとして、E.coli LacZ 発現アデノウイルスベクター投与したマウスの上部消化管上皮細胞にも5

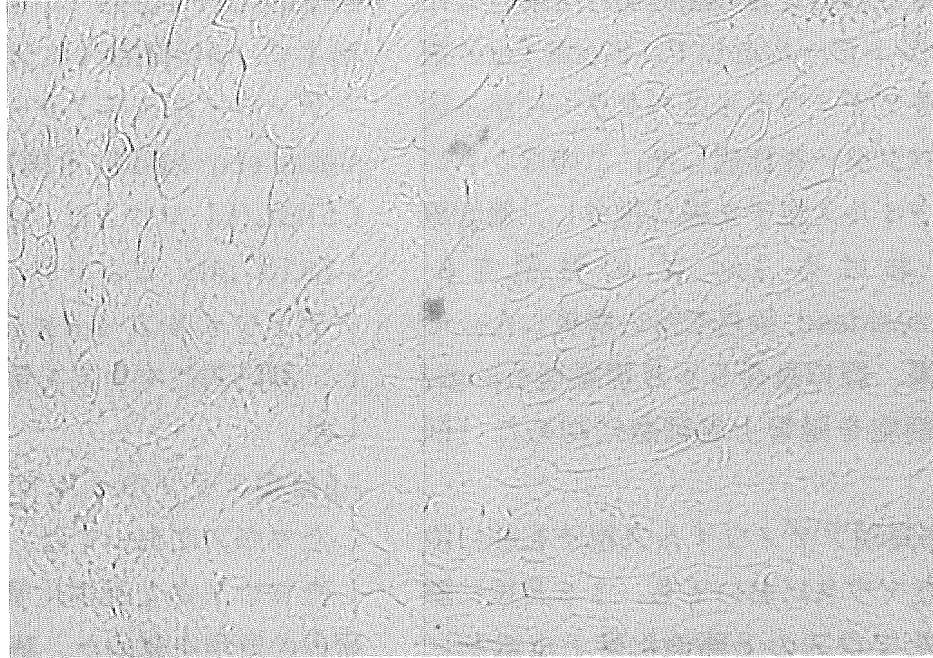


図 1 E.coli LacZ 発現アデノウイルスベクター投与したマウスの上消化管上皮細胞の $\beta$ -galactosidase 染色。

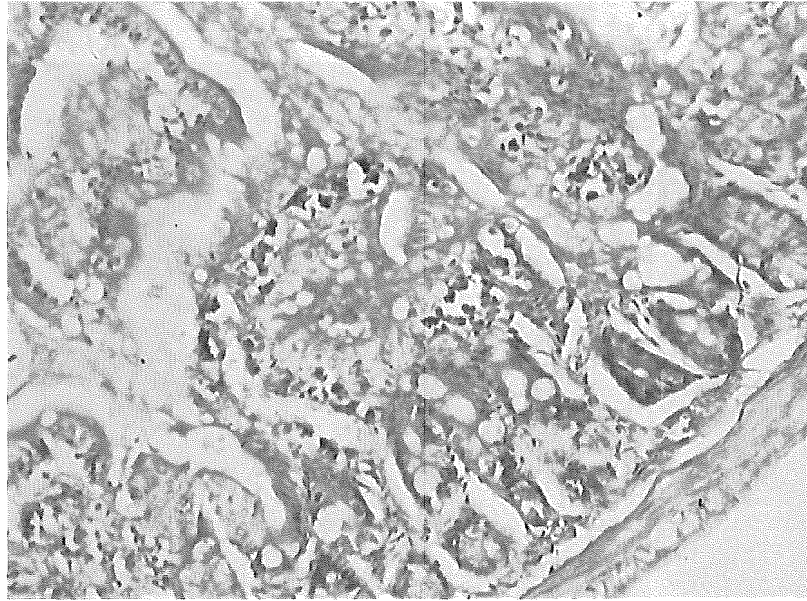


図 2 A $\beta$ 発現アデノウイルス投与したマウスの上部消化管上皮細胞における A $\beta$ 蛋白の発現（1ヶ月後）。

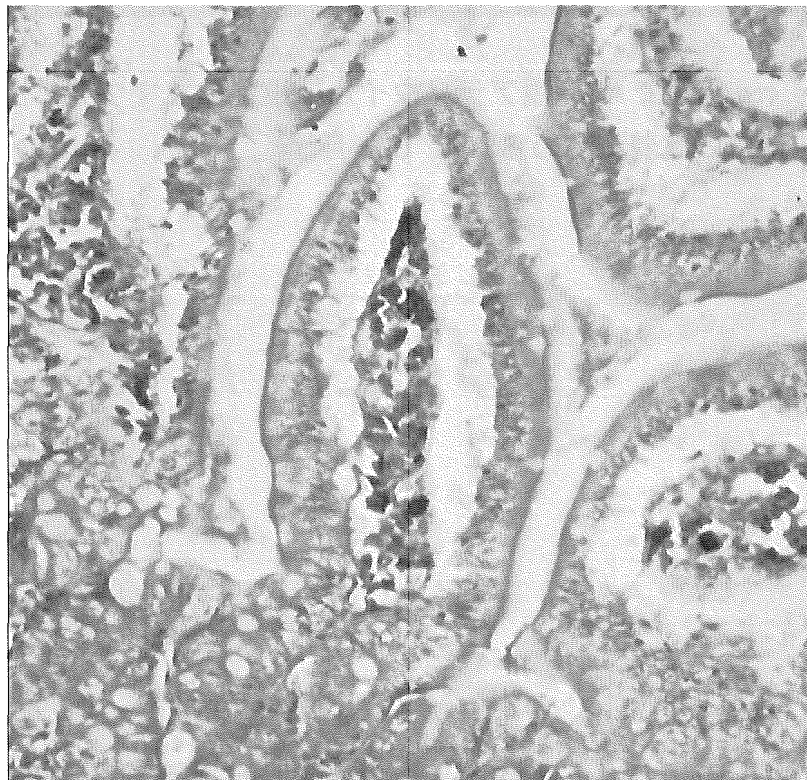


図 3 A $\beta$ 発現アデノウイルス投与したマウスの上部消化管上皮細胞における A $\beta$ 蛋白の発現（5ヶ月後）。

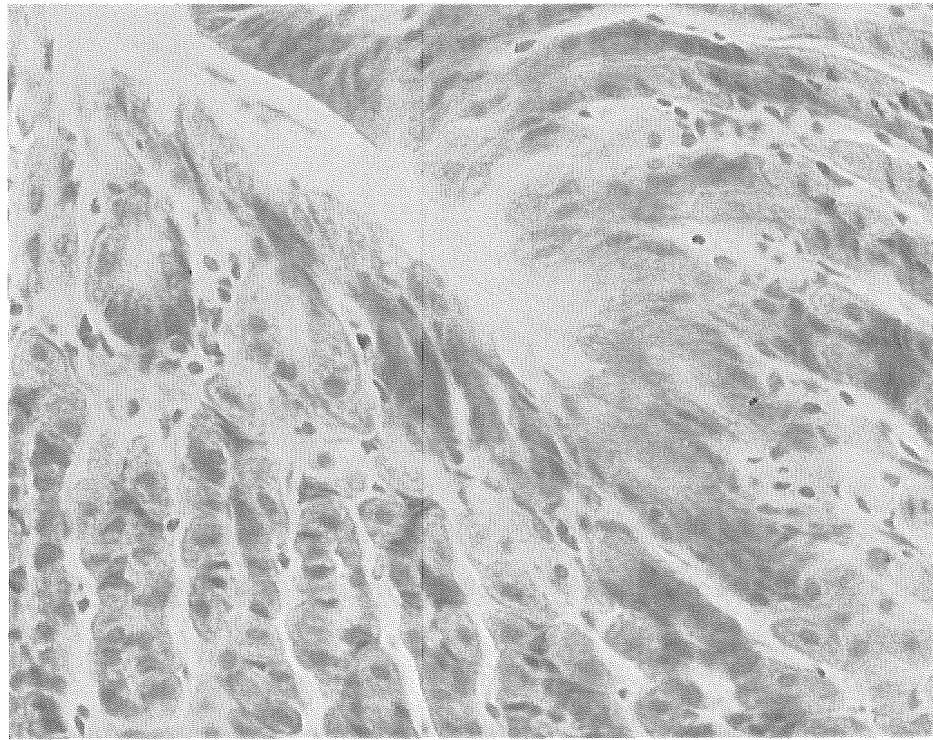


図4 Congo red 染色；A $\beta$ 発現アデノウイルス投与したマウスの上部消化管上皮細胞における A $\beta$ 蛋白の沈着が認められる（5ヶ月後）。

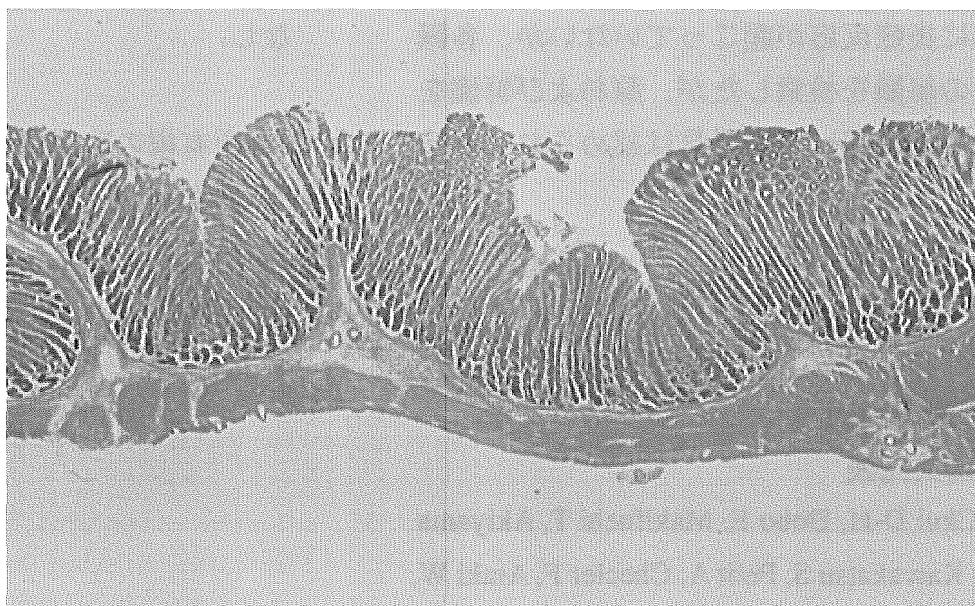


図 5a 上部消化管上皮細胞の HE 染色。

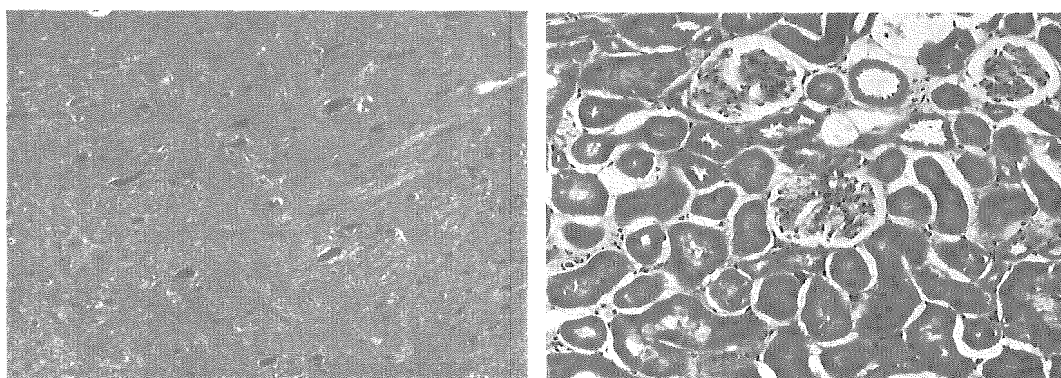


図 5b 脳（左）および腎臓（右）の HE 染色。炎症所見は認められなかった。

ヶ月間 Lac Z の発現を認めた。他の臓器に炎症反応が起こっていないか、各臓器の組織を検索したが、脳および腎臓を含め他臓器に炎症所見は認められなかった。

F. 健康危険情報  
該当なし

### G. 研究発表

#### 1)論文発表

1.Chui D-H, Dobo E, Makifuchi T, Akiyama H, Kawakatsu S, Petit A, Checler F, Araki W, Takahashi K, Tabira T: Apoptotic neurons in Alzheimer's disease frequently show intracellular Ab42 labeling. J. Alzheim .Dis. 3: 231-239, 2001.

2.Araki W, Yuasa K, Takeda S, Takeda K, Shirotani K, Takahashi K, Tabira T : Pro-apoptotic effect of presenilin 2(PS2) overexpression is associated with down regulation of Bcl-2 in cultured neurons. J. Neurochem. 79:1161-1168, 2001.

3.Tanahashi H, Tabira T.: Three novel alternative spliced isoforms of the human beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme (BACE) and their effect on amyloid beta-peptide production. Neuroscience Letters 307:9-12, 2001.

2)学会発表  
なし

### G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
特になし



## 研究成果の刊行に関する一覧表

1. Chui D-H, Dobo E, Makifuchi T, Akiyama H, Kawakatsu S, Petit A, Checler F, Araki W, Takahashi K, Tabira T: Apoptotic neurons in Alzheimer's disease frequently show intracellular Ab42 labeling. *J. Alzheimer Dis.* 3: 231-239, 2001.
2. Kowalska A, Asada T, Arima K, Kumakiri C, Kozubski W, Takahashi K, Tabira T: Mutational analysis of the tau gene in patients with frontotemporal dementia. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 21: 450-455, 2001
3. Shirotani K, Takahashi K, Araki W, Maruyama K, Tabira T: Mutational analysis of intrinsic regions of presenilin 2 that determine its endoproteolytic cleavage and pathological function. *J. Biol. Chem.* 275: 3681-3686, 2000.
4. Araki W, Yuasa K, Takeda S, Shirotani K, Takahashi K, Tabira T : Overexpression of presenilin-2 enhances apoptotic death of cultured cortical neurons. *The molecular Basis of Dementia*, 920: 241-244, 2000.
5. Araki W, Yuasa K, Takeda S, Takeda K, Shirotani K, Takahashi K, Tabira T : Pro-apoptotic effect of presenilin 2(PS2) overexpression is associated with down regulation of Bcl-2 in cultured neurons. *J. Neurochem.* 79:1161-1168, 2001.
6. Tanahashi H, Tabira T.: Three novel alternative spliced isoforms of the human beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme (BACE) and their effect on amyloid beta-peptide production. *Neuroscience Letters* 307:9-12, 2001.

20010596

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので  
P27「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください