

厚生労働科学研究費

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 —

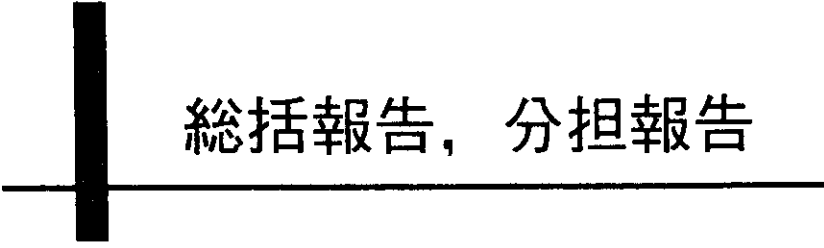
平成 14 年度 研究成果報告書

平成 15 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

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
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を評価
—脳・感覚器疾患等を中心にして—

主任研究者 吉川泰弘
(東京大学大学院農学生命科学研究科)

研究要旨

高齢化社会を迎え2030年までには65歳以上の高齢者が、わが国人口の15%以上を占めようとしている。こうした急速な変化は、先進諸国においてもわが国が最初である。従って、高齢化社会に伴う弊害をどう克服していくかは、わが国が独自に解決する必要のあるテーマであり、極めて重要な課題である。特に老人病、とりわけ痴呆症、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QOLの低下や孤立化だけでなく、社会的負担も著しく大きなものになる。

本研究ではヒトにもっとも近縁な霊長類を用いて、げっ歯類では外挿が困難な自然発症の老人病モデル、あるいは実験的誘発老人病モデルを開発し、そのモデルを用いて病態解析と、新規治療法の開発・評価を行っている。

平成14年度は、痴呆症等神経疾患、眼疾患、肥満、糖尿病、パーキンソン病を取り上げ、自然発症モデルの解析、発症機序に関する分子生物学的研究を進めた。眼疾患を中心に緑内障の実験的老人病モデルの開発とその病態解析を試み、自然発生黄斑変性症ではドルーゼンに沈着した物質の解析を免疫学的手法で行った。またヒトではゲノム科学や細胞科学の成果を利用した遺伝子治療や再生医療などの新規治療法が次世代医療として取り組まれ始めている。本研究班でも、糖尿病モデルでは初めてブタの膵島細胞を用いた異種移植による治療評価を試みた。さらに新規治療法を臨床応用に結びつけるため、霊長類のパーキンソンモデル系を用いた運動機能改善及び認知機能改善のための評価系の開発とその有効性を検討した。またエイジングファームのデータベース化も進めた。

分担研究者：所属氏名

寺尾恵治（感染症研究所筑波霊長類センター）
久和 茂（東京大学大学院農学生命科学研究科）
鈴木通弘（社団法人予防衛生協会）
吉田高志（感染症研究所筑波霊長類センター）
小野文子（社団法人予防衛生協会）

A. 研究目的

高齢社会に伴い増加する痴呆症、パーキンソン病、感覚器疾患、肥満・糖尿病等は高齢者に多くの負担をかける、これら高齢者のQOL問題の克服は厚生労働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、晩発性遺伝子発現、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。この点筑波霊長類センターのカニクイ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開発された動物モデル系を用いた治療研究の両側面から研究を進めている。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。加齢性黄斑変性ではカニクイザルの遺伝子マップを用いた神経疾患関連遺伝子の探索を進めている。新規治療法の有効性・安全性評価として異種移植の手法を利用し、2型糖尿病を対象とした新規治療法のモデル系開発を試みている。

このように本研究班では霊長類を用いて、主要な老人病の新規治療法の安全性・有効性を評

価するためのシステム開発を目的として研究を進めている。

B. C. 方法と結果

①老人斑形成に関する種差を明らかにすることにより、老人斑形成の機序を解析する目的で、80日齢のカニクイザル胎児脳及び対照として18日齢のラット胎児脳を用いた。初代培養神経系細胞を用いて、種々の分子種の低濃度Aβ投与が神経系の長期培養に与える影響を検索した。サル胎児脳に比較しラット胎児脳培養ではグリア細胞の反応が非常に強かった。Aβ投与の神経細胞に対する障害性はどちらの種に関してもみられなかった。サル類の初代神経培養細胞に比較して齧歯類の場合には、強いグリア細胞の修復反応が見られた。こうしたグリア細胞反応の強さの差が、老人斑形成能の差になり、齧歯類では老人斑が形成されない可能性が考えられた。

②フィリピンのカニクイザル繁殖施設で得られた典型的な加齢性網膜黄斑変性症のドルーゼンの組成を免疫組織学的に解析した。網膜色素細胞下にみられた激しいドルーゼンには炎症に関連する蛋白群、特にC3, C5, MAC、及び抗補体蛋白群、アミロイドP蛋白、Aβ蛋白、アポE蛋白などの沈着が明らかにされた。他方、わが国ではじめて明らかにされたサル類の遺伝性黄斑変性に関しては連鎖解析と遺伝子のシーケンスデータから、ヒト黄斑家系のEL4VL4遺伝子ではないことが明らかになった。現在ヒトにおける他の家系性黄斑変性症の遺伝子について、その関連性を検索している。またサル類を用いた緑内障モデルでは網膜、視神経の神経繊維の脱リン酸化が起きていることが、サル類のモデルではじめて解明された。

③サル類のパーキンソン病モデルの治療評価のために、差分解法を用いた運動機能改善のコ

ンピュータによる評価系とは別に、今回認知機能改善評価のために色課題自動提示装置を開発した。色の提示条件と正解、不正解はコンピュータで制御できることから、単純弁別課題と逆転弁別課題の異なった課題提示に対する被験体カニクイザルの反応が評価できた。また MPTP 長期連続投与で作成したパーキンソンモデルカニクイザルと正常カニクイザルについて、単純色弁別課題および逆転弁別課題に対する反応性を調査した。その結果、MPTP 処理によりパーキンソン症状を発症しているサルでは、色弁別の初期学習能の低下はみられるが、繰り返しにより弁別能は向上した。しかし、典型的な set-shifting 課題である逆弁別機能が著しく低下しており、反復学習による機能向上も認められなかった。

④エイジングファームの加齢に伴う II 型糖尿病サル 3 頭を用いて以下の実験を行った。糖尿病を自然発症したカニクイザルを用いて成熟ブタ膵内分泌細胞を内包した免疫抑制剤を必要としない異種移植の可能な人工膵島を腹腔内に移植し、糖尿病治療効果について検討した。血糖値、インシュリン値をモニターするとともに抗ブタ膵内分泌細胞抗体を測定したところ 8 例中 7 例で抗体が検出された。抗体が陰性で維持された 1 例において約半年間血糖値の低下とインシュリン値の上昇が認められ Bio-AEP が有効に機能したものと思われた。また、抗体が検出された個体から摘出したチャンパーでは破損が認められた。このことは移植に用いたチャンパーが何らかの理由で劣化し、一部が破損し、移植したブタの膵島細胞が異物として認識されたことを示している。今後チャンパーについて安定した形態を確立することにより、糖尿病治療の新たな展開に寄与すると考えられるとともに、自然発症性糖尿病カニクイザルを用いた治療実験は、ヒトへ臨床応用に先駆けて、異種移植における重要

な問題である PERV (ブタ内在性レトロウイルス) 等の検討においても重要な役割を担うと考えられる。

⑤ 5 生活習慣病の原因の一つとして注目される肥満の解明を図る目的で、霊長類センターの成熟カニクイザルを対象として、脂肪代謝とその調節機構について、脂肪組織で合成され血流に放出されるサイトカインであるレプチンに注目して解析を行った。その結果、性成熟が完了した動物(メスでは 5 歳齢以上、オスでは 9 歳齢以上)では、二波長 X 線密度測定装置で測定した体脂肪率と血中レプチン濃度とが正に相関し、レプチン濃度と肥満との密接な関係が実証された。しかし、それより若い個体では、体脂肪率と係わり無く、レプチン濃度は年齢と負の相関が認められた。今後、この意味の違いについて詳細な検討を加える必要がある。

D. 考察

ヒトの老人病の予防・治療を進めるにあたり、人に近縁な霊長類の老齢性疾患モデルを用いた新規で高度な治療法の安全性や有効性に関する評価を進める必要がある。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モデル系を用いた治療研究を進めている。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作成し、わが国の老齢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。

本年度は老人斑形成の種差の解析のために、初代神経系培養細胞を用いたアミロイドコア蛋白の神経細胞、グリア細胞に対する影響を遺伝子発現、蛋白発現の経過から解析し、グリア細胞の反応性の違いが明らかにされた点は、今後の研究にとって重要である。また網膜変性症の形成機序、特に炎症性蛋白の沈着の分析、家系

性網膜変性症の遺伝子解析が進められた。さらに例数を増やして再現性をみる必要がある。緑内障モデルでは低眼圧緑内障で見られる網膜、視神経の神経繊維の脱リン酸化が起きていることが、カニクイザルのモデルではじめて解明された点は、学術的価値が大きい。パーキンソン病モデルの運動・認知機能評価の一環として開発された、認知機能評価で色課題試験で正刺激に反応する色弁別機能はほぼ正常で、負刺激に反応する逆弁別機能だけが低下している事実は、パーキンソン患者にみられる認知・弁別機能の障害ときわめて類似しており、本モデルがパーキンソン患者の運動機能障害のみならず、認知機能障害を評価する有用なモデルであると判断できた。2型糖尿病の異種移植によるモデル治療は、今度も例数を増やすとともに、材料の確保、チェンバーの改善など技術的改良が必要な点も多いが、人への外挿に重要である。肥満とレプチン及び加齢の関連については、さらに基礎的な解析が重要と思われる。

これらの成果は、患者への直接的還元が期待される。さらに長寿科学研究の専門家への研究成果報告としても広報されている（平成14年度、名古屋）。また長寿センターとの老人斑形成機序に関する共同研究、感覚器センターとの筑波網膜編成家系コロニーの作成計画、米国との共同研究計画など、本研究班の成果は広く公開され、また活用されている。

E. 結論

14年度は、痴呆症等神経疾患、眼疾患、肥満、糖尿病、パーキンソン病を取り上げ、自然発症モデルの解析、発症機序に関する分子生物学的研究を進めた。また眼疾患を中心に実験的老年病モデルの開発とその病態解析を試みた。ヒトではゲノム科学や細胞科学の成果を利用した遺伝子治療や再生医療などの新規な治療法が

次世代医療として取り込まれ始めている。本研究班でも糖尿病モデルではブタの膵島細胞を用いた異種移植による治療評価を試みた。新規治療法を臨床応用に結びつけるため、霊長類を用いたパーキンソンモデル系を用いた運動機能改善及び認知機能改善のための評価を進めた。またエイジングファームのデータベース化を進めた。

F. 研究発表等

1. Inenaga, T., Nishida, E., Kawamura, S., Yoshikawa, Y. Renal function tests on diabetes-induced and non-induced APA hamsters. *Exp. Anim.* 51, 437-445, 2002
2. Kamiya, K., Kikkawa, Y., Ishii, T., Kyuwa, S., Yoshikawa, Y. Changes in mRNA expression in mouse postnatal cochlea by differential display methods. *Exp. anim.* 51, 431-435, 2002
3. Ikegami, T., Miranda, EG., Caraor, A.B., Manalo, D., Miranda, Nj., Niikura, M., Saijo, M., Une, Y., Nomura, Y., Kurane, I., Ksiazek, TG., Yoshikawa, Y., MORikaya, S. Histopathology of natural Ebola virus subtype Reston infection in cynomolgus macaques during the philippine outbreak in 1996. *Exp. Anim.* 51, 467-455, 2002
4. Horiuchi, K., Takatori, a., Inenaga, T., Ohta, E., Yamanouchi, J., Kawamura, S., Ishii, T., Kyuwa, S., Yoshikawa, Y. The effect of probucol on atherosclerosis in streptozotocin induced diabetic hyperlipidemic APA hamster in different stages of atherosclerosis. *Exp. Anim.* 51, 457-464, 2002

5. Ikegami, T., Saijo, M., Niikura, M., Miranda, EG., Calaor, AB., Hernandez, M., Malano, DL., Kurane, I., Yoshikawa, Y., Morikawa, S. *Microbiol. Immunol.* 46, 633-638, 2002
6. Negishi, T., Ishii, Y., Kawamura, S., Kuroda, Y., Yoshikawa, Y. Cryopreservation and primary culture of cerebral neurons from cynomolgus monkeys. *Neurosci. letters*, 289, 21-24, 2002
7. Negishi, T., Ishii, Y., Kawamura, S., Kuroda, Y., Yoshikawa, Y. Cryopreservation of brain tissue from primary culture. *Exp. Anim.* 51, 383-390, 2002
8. Lee, WW., Nam, KH., Terao, K., Yoshikawa, Y. Age-related telomere length dynamics in peripheral blood mononuclear cells of healthy cynomolgus monkeys measured by flow FISH. *Immunol.* 105, 458-465, 2002
9. Furuta, T., Kikuchi, T., Miyadera, H., Yoshikawa, Y. Pneumocystis carinii infection in red-bellied tamarins and cynomolgus monkeys, and the characterization of the mitochondrial large subunit ribosomal RNA gene of P. carinii. *J. Euk. Microbiol.* 107-108, 2002
10. Miranda, ME., Yoshikawa, Y., Manalo, DL., Calaor, AB., Miranda, NL., Cho, F., Ikegami, T., Ksiazek, TG., Chronological and spatial analysis of the 1996 Ebola REston virus outbreak in a monkey breeding facility in the Philippines. *Exp. Anim.* 51, 173-179, 2002
11. Yamanouchi, J., Takatori, A., Nishida, e., Kawamura, S., Yoshikawa, Y. Expression of lipoprotein receptors in the aortic walls of diabetic APA hamsters. *Exp. Anim.* 51, 33-41, 2002
12. Takatori, A., Nishida, E., Inenaga, T., Horiuchi, K., Kawamura, S., Itagaki, S., Yoshikawa, Y. Functional and histochemical analysis on pancreatic islets of APA hamsters with SZ-induced hyperglycemia and hyperlipidemia. *Exp. Anim.* 51, 9-17, 2002
13. Hatta, Y., Kanai, T., Matsumoto, Y., Kyuwa, S., Hayasaka, I., Yoshikawa, Y. Analysis of cDNA coding MHC class II beta chain of the chimpanzee (Pan troglodytes). *Exp. Anim.* 51, 133-142, 2002
14. Tsutsui, S., Itagaki, S., Kawamura, S., Harada, K., Karaki, H., doi, K., Yoshikawa, Y. D-galactosamine induced hepatocyte apoptosis is inhibited in vivo and in cell culture by a calcium calmodulin antagonist. *Exp. anim.* 52, 43-52, 2003
15. Kwon, J., Kikuchi, T., Setsue, R., Ishii, Y., Kyuwa, S., Yoshikawa, Y. Characterization of the testis in congenitally ubiquitin carboxy-terminal hydrolase-1 defective (gad) mice. *Exp. anim.* 52, 1-9, 2003
- 吉川泰弘 霊長類を用いた老人病モデルの研究
平成13年度厚生科学研究 14-32,
2002

吉川泰弘 動物実験と福祉 アニテックス15,
18-22、2003

吉川泰弘 生命科学と実験動物 学術の動向
31-34 2002, 9

研究報告書

分担研究者 久和 茂
研究協力者 木村 展之

ラットおよびカニクイザル胎仔大脳皮質初代培養系における低濃度アミロイドβ長期暴露による影響と比較（アルツハイマー病進行機序の検索および種差の検索）

研究要旨：

アルツハイマー病主病変である老人斑は、大脳皮質内にアミロイドβ蛋白 (Aβ) がβシート状に凝集・蓄積する病変であり、ヒトおよびカニクイザルを含む霊長類では正常老化の過程において確認される病変でもある。老人斑はアルツハイマー病の発症に先駆けて脳内に形成され、アルツハイマー病発症あるいは進行に影響を与えていると考えられている。前回の検索で我々は、ラット胎仔大脳皮質初代培養系を用いてAβの神経系細胞に与える影響およびAβ分子種による差異を検索した。ラットを含むげっ歯類は、自然発症的に老人斑形成が見られない動物種である。そこで今回我々はヒトに近縁で、ヒトと同様に老人斑が老齢個体大脳皮質に自然発症的に形成されるカニクイザル脳組織を用いて、Aβ暴露の影響を生化学的に検索した。また、ラットにおける検索結果と比較することで、げっ歯類と霊長類との種差も併せて検索した。

A. 研究目的：

前回の報告で明らかにしたラット胎仔大脳皮質初代培養系におけるAβ長期暴露実験をもとに、カニクイザル胎仔大脳皮質初代培養系を用いて同様の検索を行うことで、霊長類の神経系細胞においても低濃度Aβの神経系細胞に対する影響が見られるかどうかを主題として検索を行った。前回の報告を含め、過去に行われたAβ暴露実験系はげっ歯類の細胞を用いているものやセルラインがほとんどである。ヒトに近縁なカニクイザル脳組織の初代培養系を用いることによって、より実際のヒト脳内に近い環境でAβ暴露実験を行うことは大きな意義をもつと思われる。また、ラットでの結果と比較することによって、種差による神経

系細胞の反応性の差異および実験系としての評価も併せて行うことが目的である。

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および胎齢80日齢のカニクイザル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Aβ 2μM および 5μM を添加した（ラット：N=10、カニクイザル：N=6）。加えたAβは（1）生体内で主として産生される分子種のAβ 1-40（2）凝集性および毒性の高い分子種のAβ 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）添加メディウム（DMEM）で使用濃度に希釈して用いた。

A β 添加後 3、7 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、神経細胞に関する検索項目として Synaptophysin、APP および GSK3 β を、アストログリアに関する検索項目として GFAP および ApoE である。

(1) Synaptophysin 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。(2) APP は A β 前駆体蛋白であり、A β 添加によって APP から A β 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。(3) 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 β 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。(4) GFAP および (5) ApoE はアストログリアの活性化を検索するのに適しており、ApoE は脳内で脂質輸送に深く関わる蛋白であるとともに老人斑形成に関わる重要なアルツハイマー病関連蛋白質である。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) ラットおよびカニクイザルともに Synaptophysin 蛋白量は A β 暴露によって大きな影響は見られなかった。逆に培養後も Synaptophysin 蛋白量の継続的上昇が見られた。(2) APP 蛋白量はラットおよびカニクイザルともに添加培養後を通して一

定値を示しており、切断様式にも何ら変化は見られなかった。(3) GSK3 β はラットおよびカニクイザルともに添加培養 14 日目に若干の増加 (約 1.5 倍) が確認されたが、有意差は見られなかった。(4) GFAP 蛋白量はラット胎仔大脳皮質初代培養系において添加培養 14 日目に顕著な増加が見られ、A β 1-42 添加群で最も大きな増加が確認された。一方、カニクイザル初代培養系では A β 暴露による GFAP 蛋白量の増加は見られなかった。(5) ApoE 蛋白量は、ラットおよびカニクイザルともに添加培養 14 日目に有意な増加が見られた。ここでも、A β 1-42 暴露群が最も大きな蛋白量増加を示した。

D. 考察：

これまで A β 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 β を添加して短時間での測定がほとんどであった。また、用いられている培養細胞系もげっ歯類由来のものやセルライン化したものがほとんどで、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。今回我々は、ヒトに近縁で自然発症的に老人斑が大脳皮質に形成されるカニクイザル脳組織を用い、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 A β 暴露実験を行った。また、同時にラットでの検索も併せて行い、前回の検索結果を確認するとともに種差の有無も確認した。今回得られた検索結果より以下のことが考察された。

1) ラットおよびカニクイザルともに Synaptophysin 蛋白量の減少がみられ

なかったことから、低濃度 A β 暴露によって神経網回路形成の阻害は生じていないことが示唆された。過去の報告や前回の報告における Caspase-3 活性上昇などの神経細胞死への A β の関与はさらに慎重な検討が必要であると思われる。

- 2) 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 β 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。ここでもラットおよびカニクイザルにおける種差は確認されなかった。
- 3) ラットおよびカニクイザルともに GSK-3 β の著しい上昇は見られなかったが、実際の生体内でもさほど蛋白量の増減がない GSK-3 β が有意差はないものの役 1.5 倍の上昇を見せたことはさらなる検討の必要があると思われる。最近の知見によると、GSK-3 β は蛋白量に変化が見られなくとも活性化を示すことが明らかになった。今後は、GSK-3 β 活性に関する検討を行うことが重要であると考えられる。
- 4) GFAP はラットでは著しく蛋白量が増加したものの、カニクイザルではほとんど蛋白量に変化が見られなかった。このことから、A β に対するアストログリアの反応性はげっ歯類の方が敏感であると思われる。
- 5) ApoE はラットおよびカニクイザルともに A β 1-42 添加群で優位な上昇が見られたことから、種によらず神経系では A β 1-42 によって ApoE 産生が促進されることが示唆された。ラ

ットを含むげっ歯類では、ApoE はアストログリアによって産生されるが、霊長類ではアストログリアのみならず神経細胞もまた ApoE を産生することが過去に報告されている。(4) で述べたように、カニクイザル実験群ではアストログリア活性化が確認されなかったことから、今回見られた ApoE 蛋白量上昇はアストログリアではなく神経細胞による効果である可能性も秘めている。

F. 結論：

ラットおよびカニクイザルともに、低濃度 A β によって惹起された反応が ApoE 蛋白量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、やはり ApoE 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。しかしながら、カニクイザル実験群ではアストログリア活性化を示すマーカーである GFAP の蛋白量に大きな変化が見られなかったこと、およびヒトを含む霊長類では神経細胞でも ApoE 遺伝子の発現が見られることから、今回検索された ApoE 蛋白量増加がアストログリアによるものなのか、神経細胞によるものなのかを明らかにすることが急務であると思われる。今後はアストログリア単独培養系も用いた検索を行う予定である。また同実験系を用いることで、A β が直接アストログリアを刺激しているのか、あるいは神経細胞が A β による刺激を受けた結果として GFAP および ApoE 蛋白量上昇が生じるのかも重要な研究課題になると思われる。

今回の検索では有意な差はみられなかったものの、タウキナーゼの一つである

GSK-3 β の蛋白量上昇が見られた。GSK-3 β はA β によって活性化し、タウをリン酸化させることがトランスジェニックマウスを用いた実験系で報告されている。GSK-3 β はリン酸化部位によって活性化・不活化がコントロールされているキナーゼであり、今後はGSK-3 β の活性に関する検索も併せて行う予定である。

参考文献：

Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild 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, Whittemor 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, Korszyn 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.

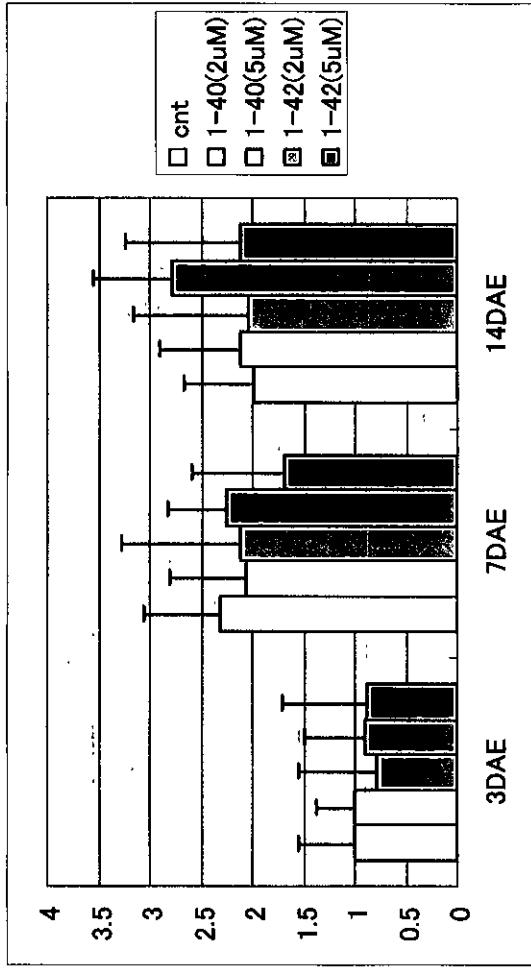
Lupo G, Anfuso CD, Assero G, Strosznajder RP, Walski M, Pluta R, and Alberghina M. Amyloid β (1-42) and its β (25-35) fragment induce in vitro phosphatidycholine hydrolysis in bovine retina capillary pericytes. *Neurosci. Lett.* 303: 185-188, 2001.

Sato S, Tatebayashi Y, Akagi T, Chui DH, Murayama M, Miyasaka T, Planel E, Tanemura K, Sun X, Hashikawa T, Yoshioka K, Ishiguro K, Takashima A. Aberrant tau phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 β and JNK3 induces oligomeric tau fibrils in COS-7 cells.

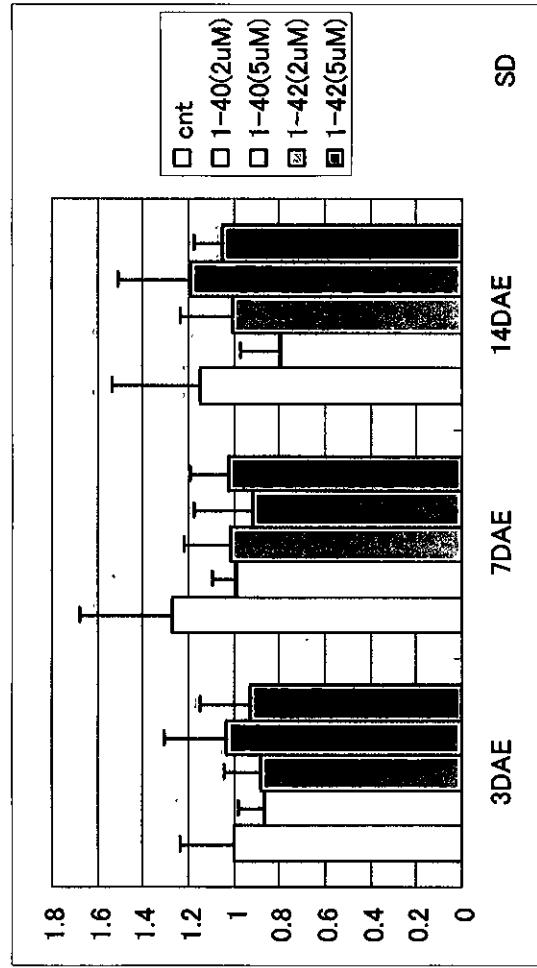
J Biol Chem. 277(44):42060-5.2002.

Synaptophysin

ラット

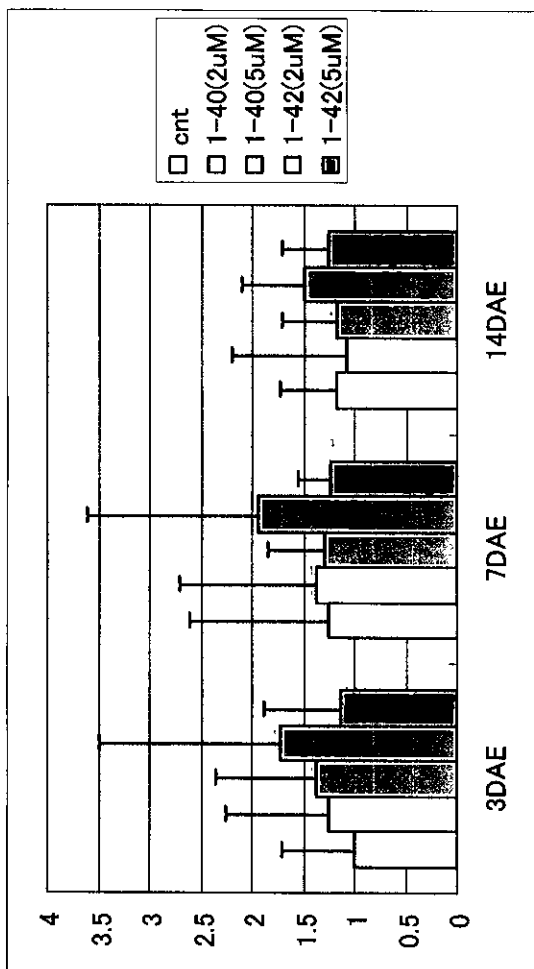


カニクイザル

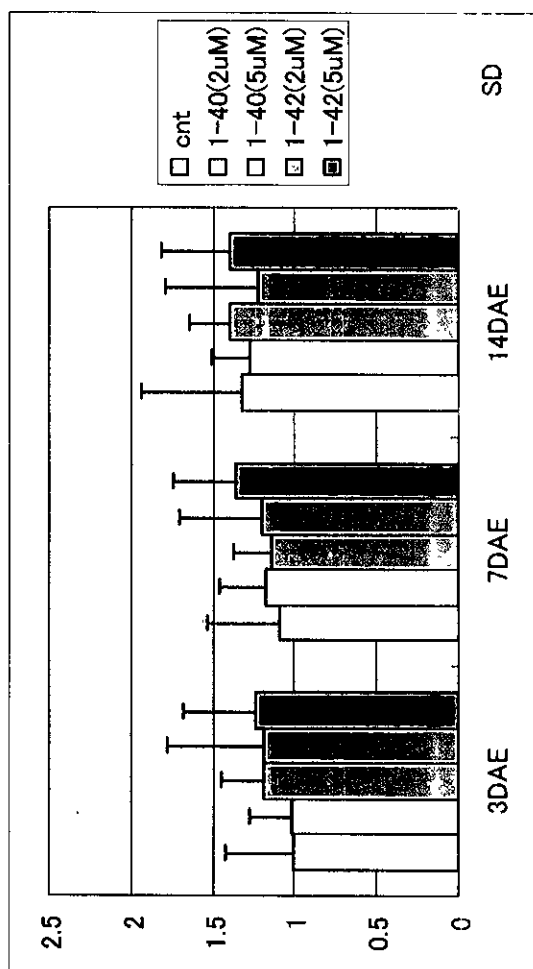


APP

ラット

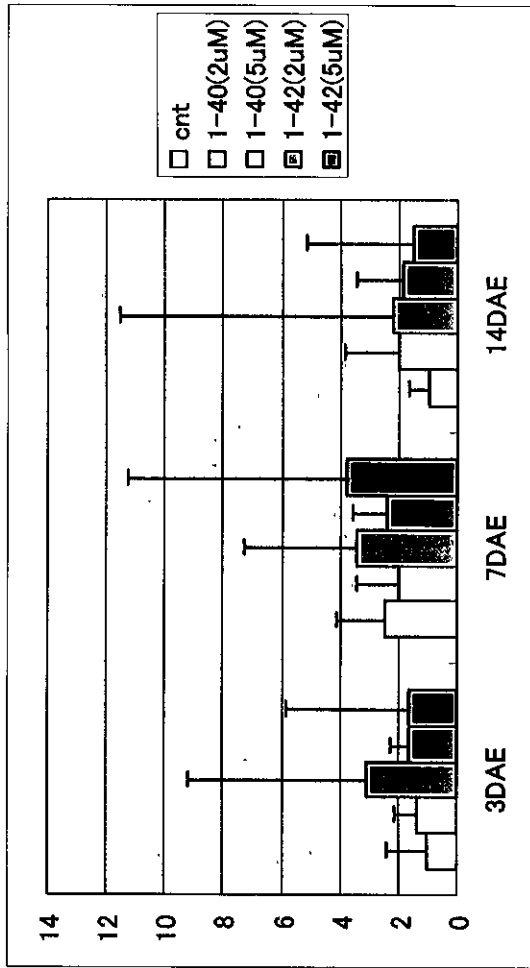


カニクイザル

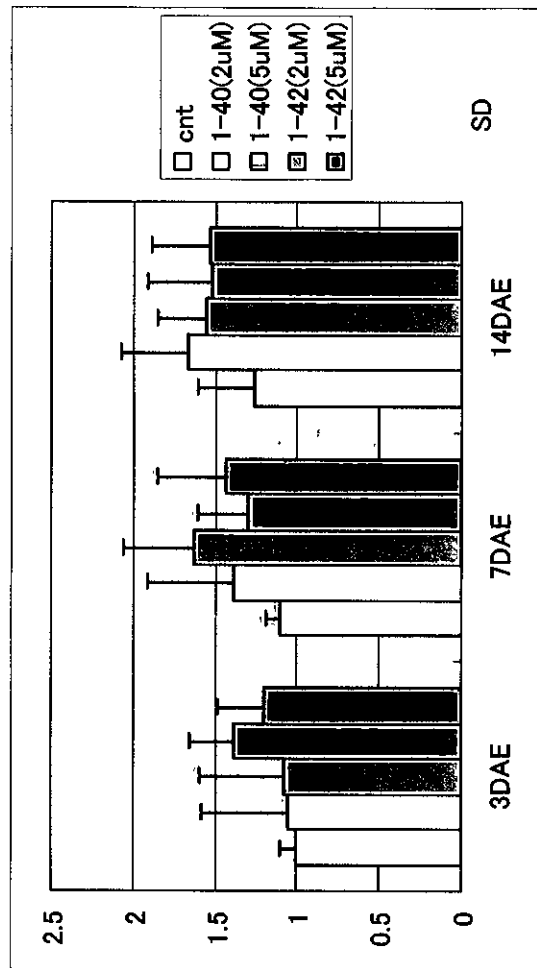


GSK3beta

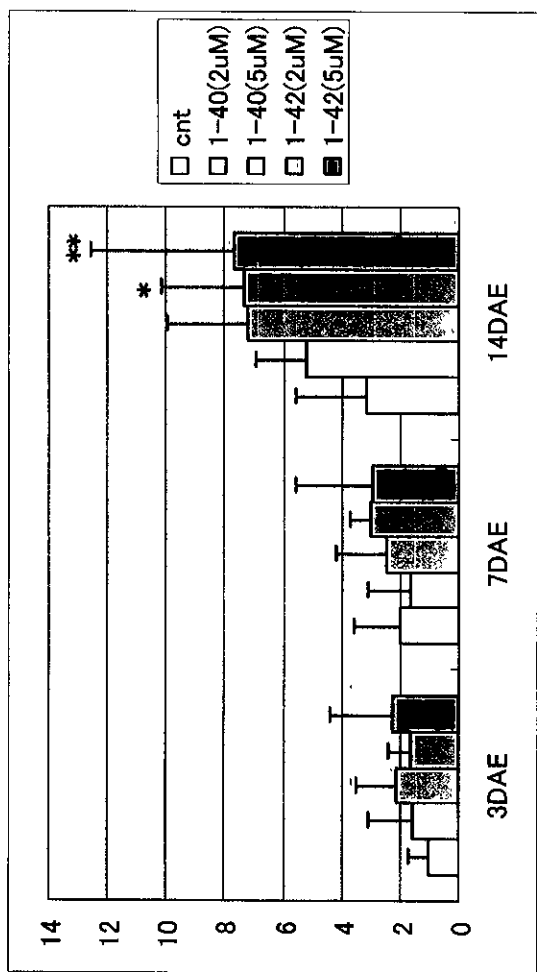
ラット



カニクイザル



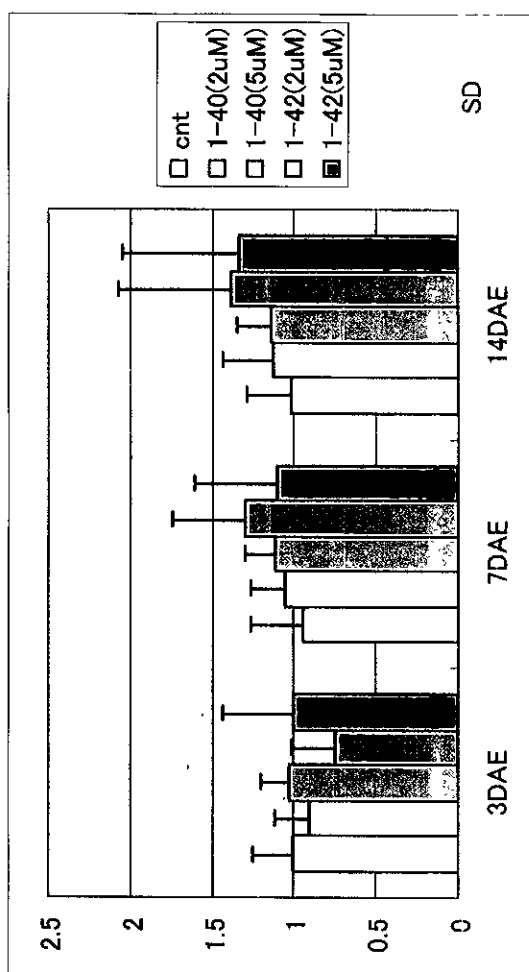
GFAP



*P<0.03

**P<0.03

ラット

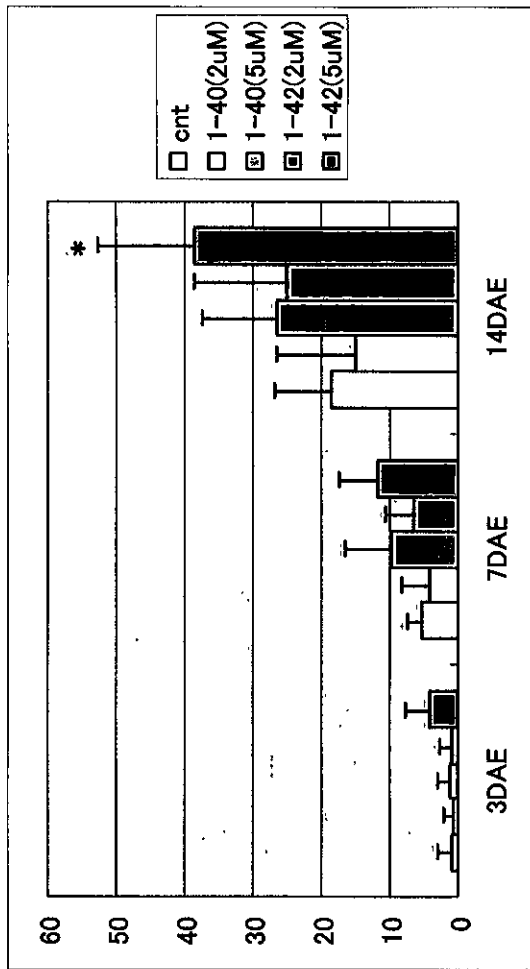


カニクイザル

ApoE

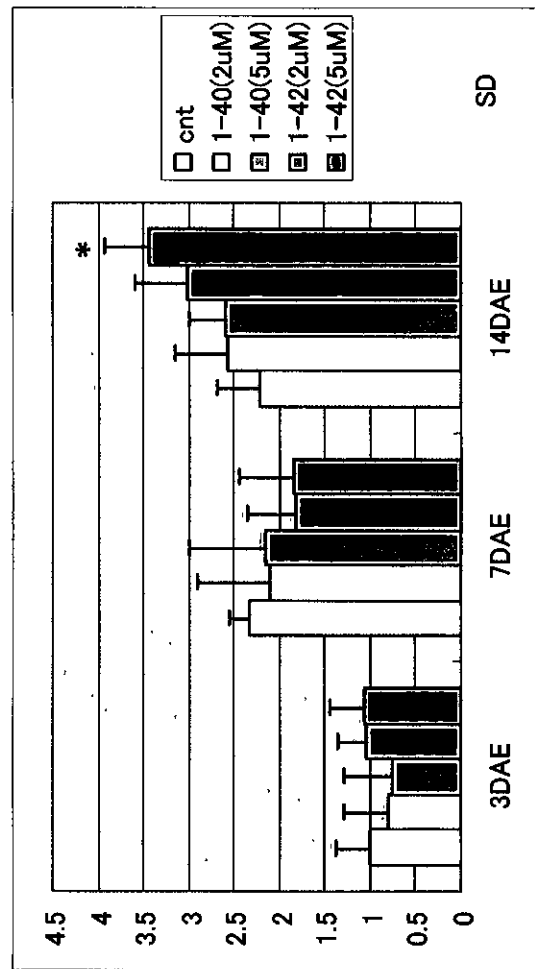
ラット

*P<0.01



カニクイザル

*P<0.03



研究報告書

分担研究者 久和 茂
研究協力者 木村 展之

ラットおよびカニクイザル胎仔大脳皮質初代培養系における低濃度アミロイド β 長期暴露による影響と比較（アルツハイマー病進行機序の検索および種差の検索）

研究要旨：

アルツハイマー病主病変である老人斑は、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・蓄積する病変であり、ヒトおよびカニクイザルを含む霊長類では正常老化の過程において確認される病変でもある。老人斑はアルツハイマー病の発症に先駆けて脳内に形成され、アルツハイマー病発症あるいは進行に影響を与えていると考えられている。前回の検索で我々は、ラット胎仔大脳皮質初代培養系を用いて $A\beta$ の神経系細胞に与える影響および $A\beta$ 分子種による差異を検索した。ラットを含むげっ歯類は、自然発症的に老人斑形成が見られない動物種である。そこで今回我々はヒトに近縁で、ヒトと同様に老人斑が老齢個体大脳皮質に自然発症的に形成されるカニクイザル脳組織を用いて、 $A\beta$ 暴露の影響を生化学的に検索した。また、ラットにおける検索結果と比較することで、げっ歯類と霊長類との種差も併せて検索した。

A. 研究目的：

前回の報告で明らかにしたラット胎仔大脳皮質初代培養系における $A\beta$ 長期暴露実験をもとに、カニクイザル胎仔大脳皮質初代培養系を用いて同様の検索を行うことで、霊長類の神経系細胞においても低濃度 $A\beta$ の神経系細胞に対する影響が見られるかどうかを主題として検索を行った。前回の報告を含め、過去に行われた $A\beta$ 暴露実験系はげっ歯類の細胞を用いているものやセルラインがほとんどである。ヒトに近縁なカニクイザル脳組織の初代培養系を用いることによって、より実際のヒト脳内に近い環境で $A\beta$ 暴露実験を行うことは大きな意義をもつと思われる。また、ラットでの結果と比較することによって、種差による神経

系細胞の反応性の差異および実験系としての評価も併せて行うことが目的である。

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および胎齢80日齢のカニクイザル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（ラット：N=10、カニクイザル：N=6）。加えた $A\beta$ は（1）生体内で主として産生される分子種の $A\beta$ 1-40（2）凝集性および毒性の高い分子種の $A\beta$ 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）添加メディウム（DMEM）で使用濃度に希釈して用いた。