

A $\beta$  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 $\beta$  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 $\beta$  前駆体蛋白であり、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。(3) GSK-3 $\beta$  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。(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 $\beta$  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 $\beta$  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 $\beta$  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 $\beta$  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 $\beta$  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 $\beta$  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。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 $\beta$  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 $\beta$  暴露によって神経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 $\beta$  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 $\beta$  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。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 $\beta$  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 $\beta$  が有意差はないものの約 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 $\beta$  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 $\beta$  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 $\beta$  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 $\beta$  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 $\beta$  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 $\beta$  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 $\beta$  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 $\beta$  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 $\beta$ の蛋白量上昇が見られた。GSK-3 $\beta$ はA $\beta$ 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 $\beta$ 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 $\beta$ 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  $\beta$ -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  $\beta$ -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 $\beta$  by amyloid  $\beta$  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- $\beta$ . *Nature.* 403: 98-103, 2000.

Vincent B, and Smith JD. Astrocytes down-regulate neuronal  $\beta$ -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 $\beta$ -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  $\beta$  -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.  $\beta$  -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.

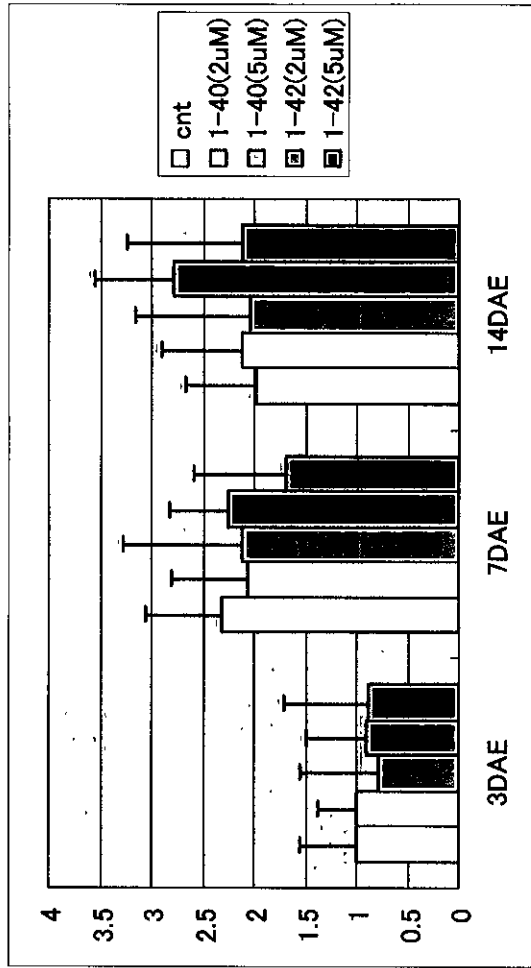
Lupo G, Anfuso CD, Assero G, Strosznajder RP, Walski M, Pluta R, and Alberghina M. Amyloid  $\beta$  (1-42) and its  $\beta$  (25-35) fragment induce in vitro phosphatidycholine hydrolysis in bovine retina capillary pericytes. *Neurosci. Lett.* 303: 185-188, 2001.

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 $\beta$  and JNK3 induces oligomeric tau fibrils in COS-7 cells.

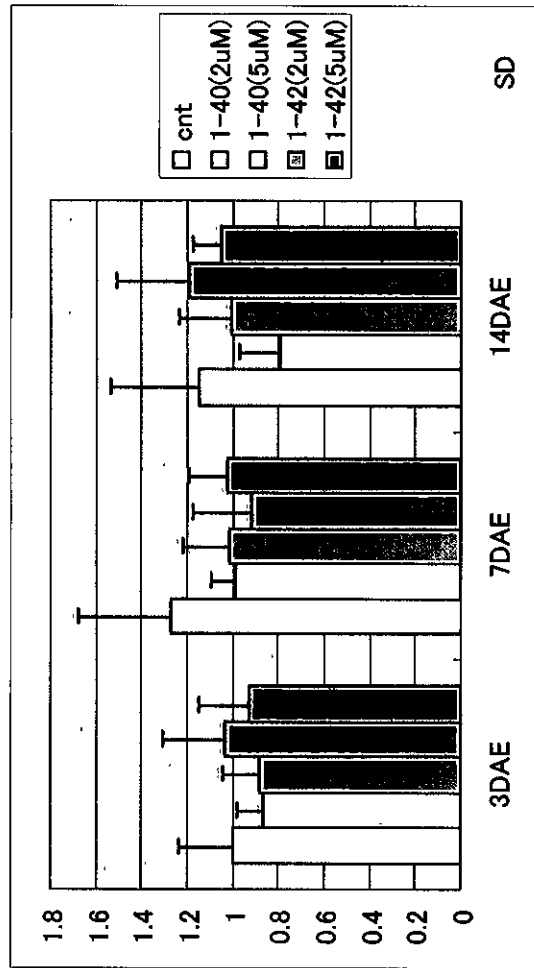
*J Biol Chem.* 277(44):42060-5.2002.

# Synaptophysin

ラット

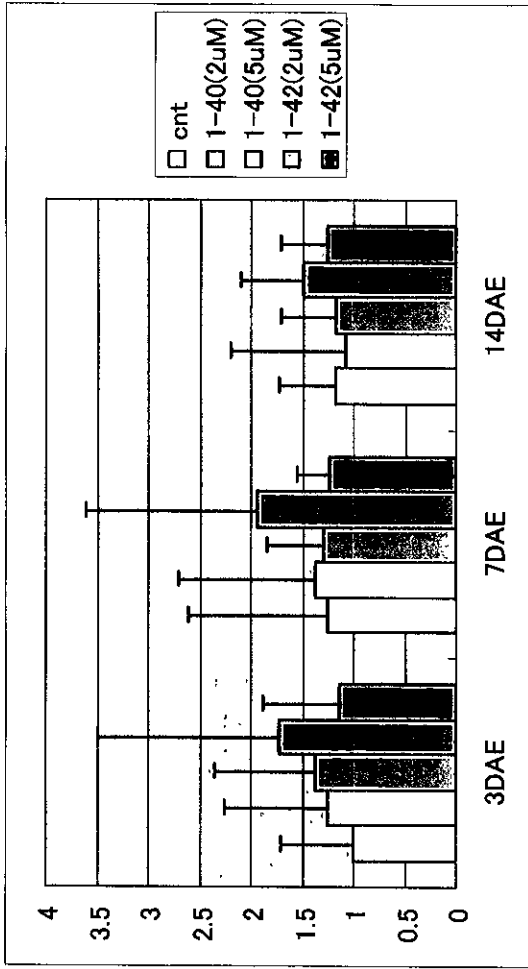


カニクイザル

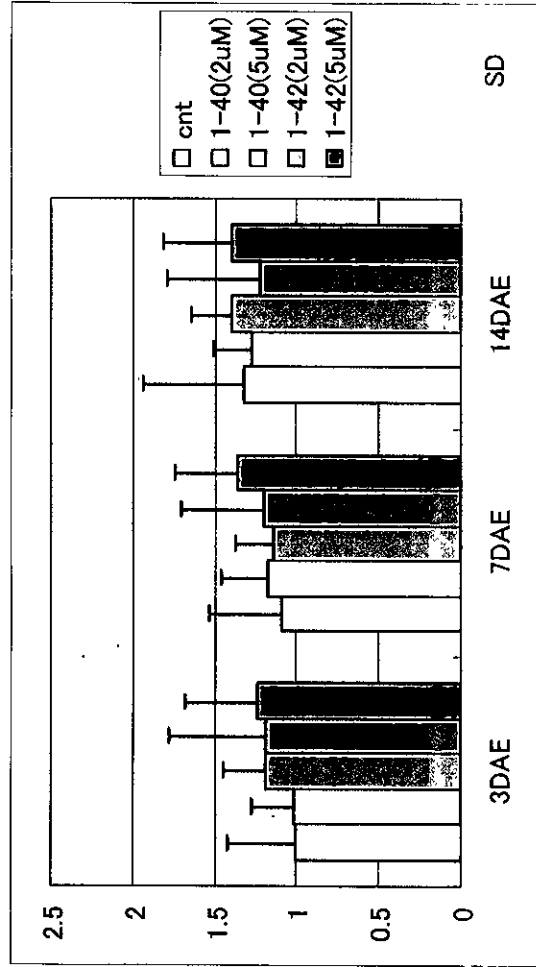


# APP

## ラット

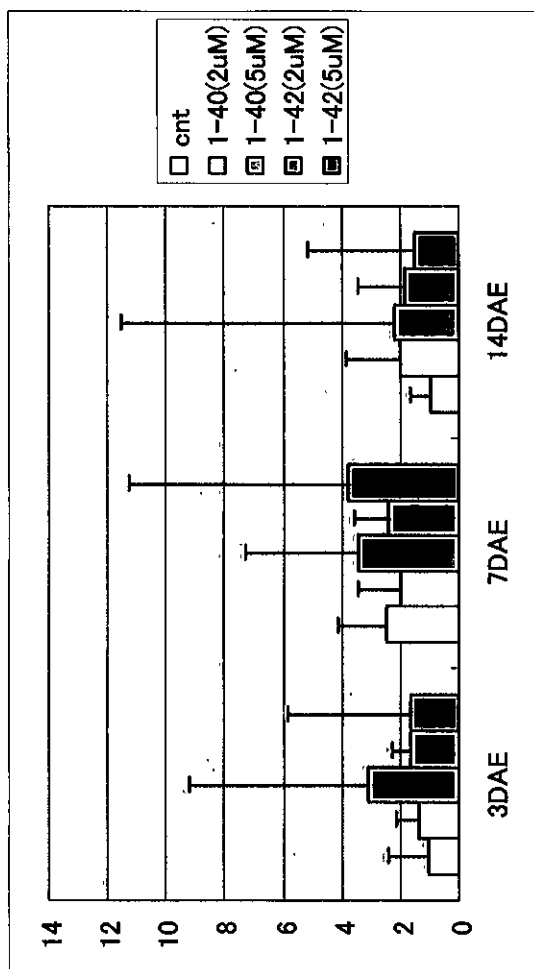


## カニクイザル

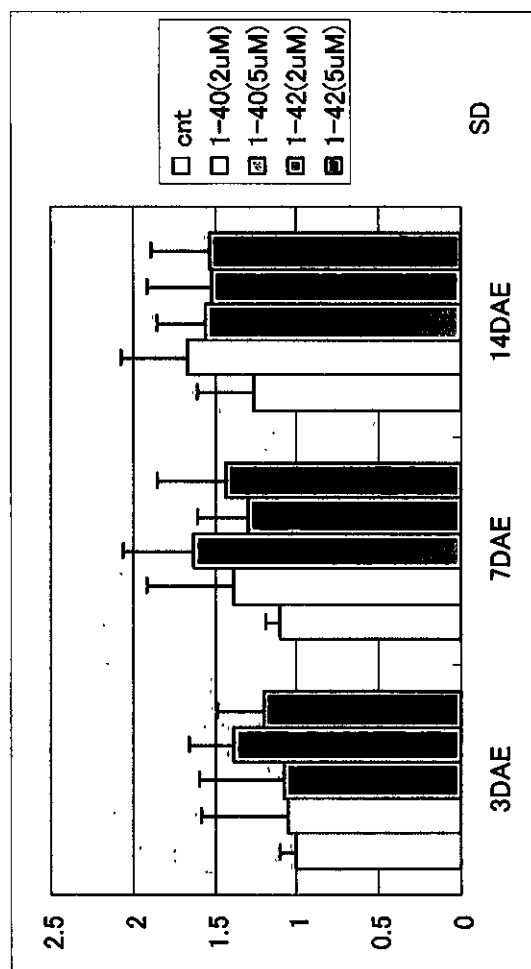


# GSK3beta

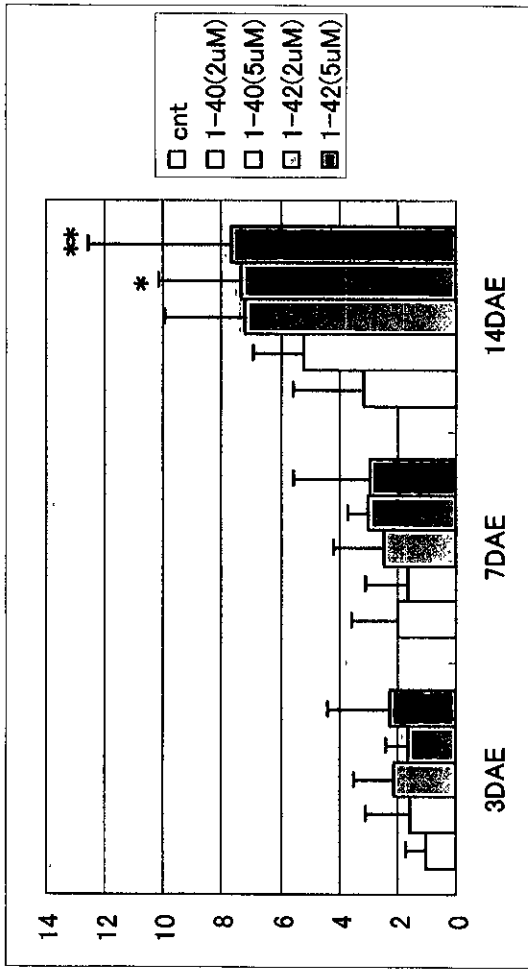
## ラット



## カニクイザル



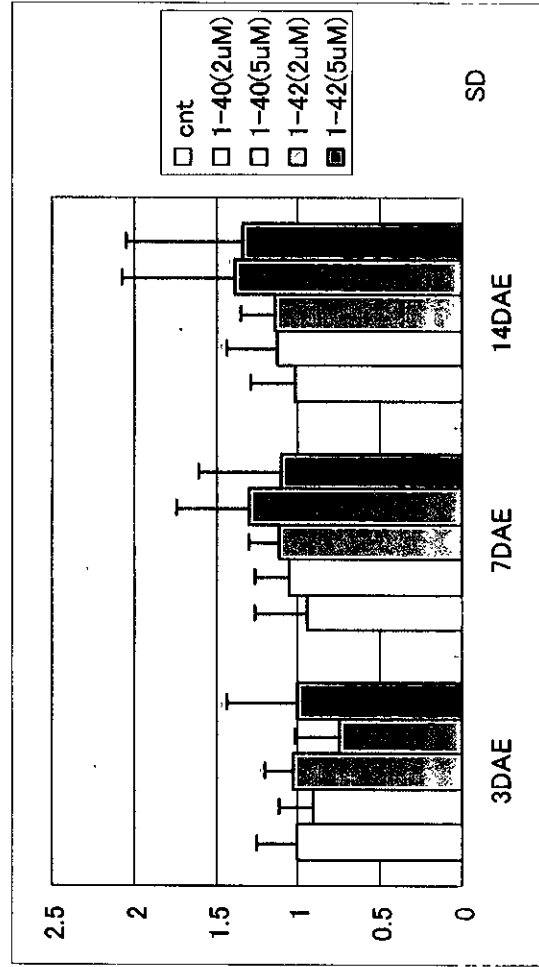
# GFAP



\*P<0.03

\*\*P<0.03

# ラット

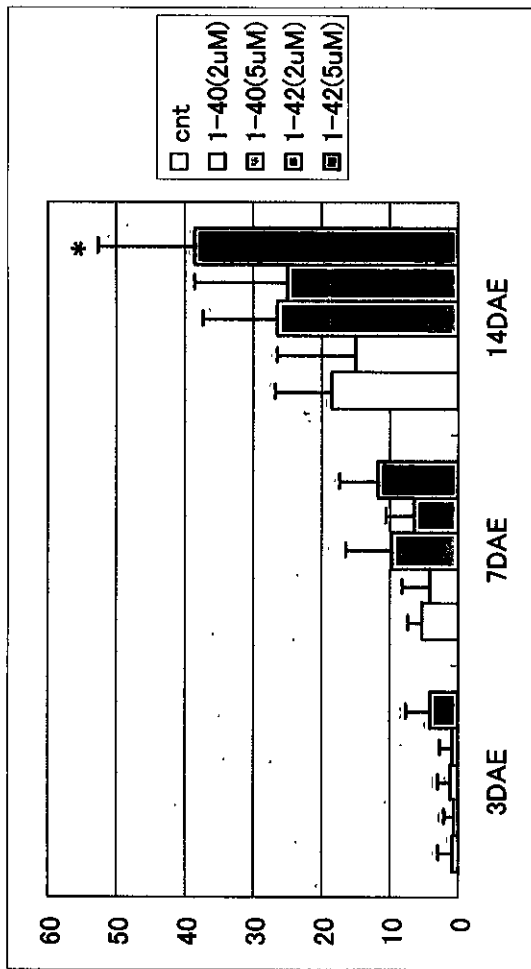


# カニクイザル



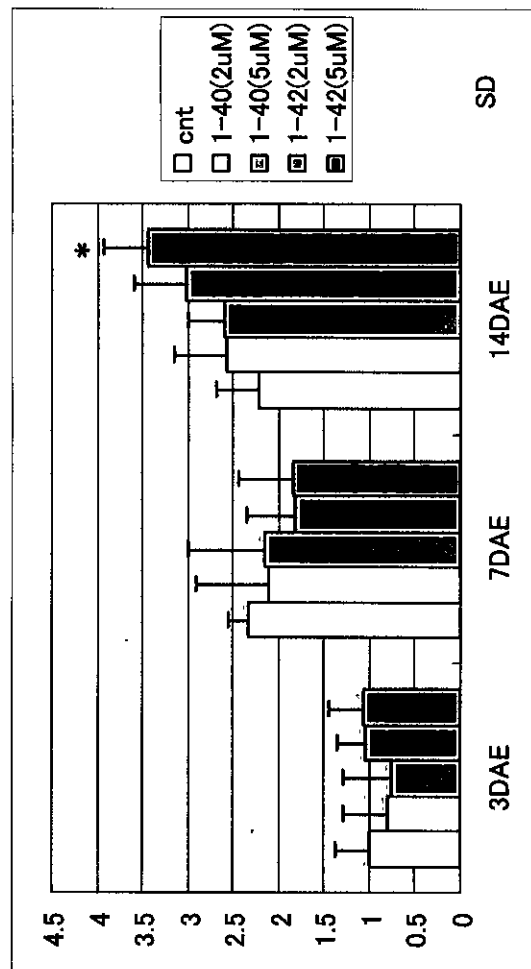
# ApoE

## ラット



\*P<0.01

## カニクイザル



\*P<0.03

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

分担研究報告書

網膜変性症モデルに関する研究

分担研究者	鈴木 通弘	社団法人 予防衛生協会
協力研究者	柏木 賢治	山梨医科大学 眼科 講師
	阿部 圭哲	山梨医科大学 眼科 助手
	梅田 慎介	東京大学大学院農学生命科学研究科

研究要旨 本研究では、サル類を用いた眼科領域疾患モデルによる新規治療法の開発と評価のための基礎的研究として、(1) ミドリザル眼底の加齢変化、(2) カニクイザルの眼を用いた実験的緑内障モデルの作成と緑内障発症機序の研究ならびに緑内障治療薬の作用機序の研究、(3) 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、

(1) ミドリザル 0 日齢から 90 日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。(2) 緑内障性神経障害の発症機序に関して、今回の研究により、生理的状态では、神経軸索内の高分子量中間径フィラメントはほとんどリン酸化をされているのにも関わらず、緑内障眼では、有意に脱リン酸化が促進していることが明かとなった。また、脱リン酸化の程度は緑内障性神経障害の強い部分に著明であることから、この分子の脱リン酸化が緑内障視神経障害の初期の変化である可能性も示唆された。また、緑内障治療薬の研究では、今回の研究により、塩酸ブナゾシンはぶどう膜強膜路からの房水の排出を促進するがプロスタグランジン(PG)製剤と異なり、細胞外器質代謝に対する影響はなく、PG 剤との相加効果も認められることから、PG とは異なる機序によりぶどう膜強膜路からの房水排出を促進する可能性が考えられた。(3) 加齢黄斑変性(AMD)のモデル動物を確立し、AMD の病態機序の解明・治療法の開発を行うため、カニクイザルにみられる加齢性黄斑変性と遺伝性黄斑変性の2種の黄斑変性について解析を進めた。本年度はドルーゼンの形成機序を明らかにするため、加齢性黄斑変性モデルにみられるドルーゼンの組成について免疫組織化学的手法による検討を行った。その結果、網膜色素上皮(RPE)によって産生された beta Amyloid が補体の活性化を引き起こし、それによる慢性的な炎症刺激が Amyloid P Component や Apolipoprotein E などの炎症性タンパク、さらに Vitronectin、Clusterin、MCP といった抗補体因子の集積を惹起しドルーゼンが形成される可能性が示唆された。また遺伝性黄斑変性モデルについては、原因遺伝子の同定のため家系をもちいた連鎖解析を進める一方、ヒト遺伝性黄斑変性の1つである Sorsby's fundus dystrophy の原因遺伝子 TIMP3 を候補遺伝子としてカニクイザルホモログのクローニングを行い、SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) 法と直接シーケンスにより疾患個体における変異解析を行った。その結果、疾患個体での有意な多型は認められず、本遺伝子は原因遺伝子として除外された。

## A.研究目的

超高齢化社会を迎え、加齢に伴う眼疾患の重要性が増しつつある。特に緑内障、白内障、網膜変性症のような晩発性の疾患に関しては、現在まで良い動物モデルの開発がなされていない。こうした眼科領域疾患の原因究明、診断、治療あるいは予防には、ヒトに類似した疾患モデルが必要である。特に、網膜黄斑変性のように、げっ歯類では見られない、霊長類特有の疾患はヒトに最も近縁なサル類を使用しなければ解明できず、こうした疾患モデルの開発研究が切望されている。

本年度の研究では、サル類を用いた眼科領域疾患モデルによる新規治療法の開発と評価のための基礎研究として、

(1)：ミドリザル眼底の各齢における眼底像を明らかにすることを目的とした。

(2) -1：前年度確認した、カニクイザル実験緑内障において、神経軸索の大分子量中間径フィラメントの脱リン酸化をさらに症例数を増やして確認すると共に、Western blotting を行い、より確実に評価する。さらに、ラット眼を用い、同様な変化が起こるかどうかが検討し、脱リン酸化が種を超えて起こるかどうかが検討することを目的とした。(2) -2：新しい緑内障治療薬である塩酸ブナゾシンの作用機序を解明すると共に、眼圧下降機序が類似していると考えられているプロスタグランジン関連抗緑内障治療薬ラタノプロストとの相互作用を検討することを目的とした。(3)：加齢黄斑変性(AMD)は欧米先進国においては成人失明原因の第1位となっており、我国においても診断基準の確立とともに急激に増加している。今後ますます進む高齢化社会において大きな問題となることは間違いない。しかしながら現在のところAMD に対する決定的な治療法はなく、

発生機序についてもほとんど明らかにされていない。その一因として適切なモデル動物が得られていないということがあげられる。これは一般に用いられるげっ歯類・イヌなどの実験動物とヒトでは視覚の果たす役割が大きく異なるうえ、網膜の組織学的構造も異なり、黄斑そのものが霊長類と一部の鳥類にしか存在しないためである。そこで、本研究はカニクイザルをもちいてAMD モデル動物を確立することを第一の目的とし、カニクイザルにみられる加齢性黄斑変性と遺伝性黄斑変性の2種の黄斑変性について解析を進めている。加齢性黄斑変性は老齢カニクイザルで散発的に自然発症し、AMDの最大の特徴であるドルーゼン(網膜色素上皮下への多形性物質の沈着)を呈するためAMD と類似の病態をとるものと考えられる。遺伝性黄斑変性は国立感染症筑波霊長類センターにおいて維持されているカニクイザルの家系にみられ、常染色体優性遺伝により若年性に黄斑変性を発症する。色素上皮細胞(RPE)内への顕著なリポフスチンの蓄積を認める点でAMD と共通している。本研究はこれら2つの黄斑変性モデルを並行して解析することによりAMD の病態機序の解明・治療法の開発を目指す。

ドルーゼンは眼底検査により黄白色のスポットして黄斑部に認められ、AMDの診断基準の1つとして臨床の場で用いられている。視力障害との直接の因果関係は明らかでないが、脈絡膜側からの血管新生を惹起し、重度の視力喪失を伴う滲出型AMD を引き起こす最大の危険因子として重要視されている。しかしながらドルーゼンの形成メカニズムについては依然不明であり、その組成についても明らかにされていない。ドルーゼンの組成を明らかにすることは、その形成メカ

ニズムを知るために必要不可欠である。昨年度は病理組織学的手法を用いて、加齢性黄斑変性モデルにみられるドルーゼンがAMDドルーゼンと同様の性状を示すことを明らかにした。そこで本年度は免疫組織化学的手法を用いてドルーゼンの組成について詳細な検討を行った。

一方、疫学調査によりAMDの発症には遺伝要因が関与していることが示されており、AMDへの感受性を決定する遺伝子を分離しようとする試みがなされている。しかしながら現在までのところ有意な報告はされていない。AMDと類似の所見を呈する遺伝性黄斑変性モデルの原因遺伝子の同定によってAMD発症に関与する遺伝子が明らかになることが期待される。現在、家系を用いた連鎖解析とヒトで既に遺伝性黄斑変性の原因遺伝子として同定された遺伝子を候補とした候補遺伝子法によって原因遺伝子の同定を進めている。昨年度は、Stargardt-like macular degenerationの原因遺伝子として同定されたELOVL4遺伝子について家系疾患個体における変異スクリーニングを行い、本疾患の原因遺伝子として除外した。本年度は、Sorsby's fundus dystrophyの原因遺伝子TIMP3について同様の変異解析を行った。

## B. 研究方法

(1)：動物は筑波医学実験用霊長類センターで繁殖・育成された0日齢から90日齢の合計176頭で、視診、触診により健康と判断された個体を対象とした。

すなわち、0日齢46頭、3日齢20頭、7日齢20頭、14日齢30頭、28日齢20頭、60日齢20頭、90日齢20頭である。

飼育環境は、室温 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $60 \pm 5\%$ 、オールフレッシュエア供給方式、換気

回数10回/時、人工照明時間14時間/日に設定された屋内の清浄環境である。飼料としては、よく洗浄されたリンゴおよびミカンを午前に各100g、サル用固型飼料(AS型、オリエンタル酵母株式会社)を午後に70g給与し、水は水道水を自動給水装置により自由摂取させた。母ザルによる哺育は出生日からとし、約15週齢で離乳した。

眼底観察および撮影の20分ほど前にトロピカミド・塩酸フェニレフリン(ミドリリンP、参天製薬株式会社)を動物の両眼に1~2滴滴下した。散瞳後に、塩酸ケタミン(ケタラール50、三共製薬株式会社)の10mg/kg(体重)を筋肉内に投与して全身麻酔し、携帯用眼底カメラ(RC-2、興和株式会社)により眼底の観察・記録を行った。但し、7日齢以前の動物の大部分は無麻酔下で観察・記録した。普通撮影時は国産カラーフィルム(Fujichrome ASA 100、富士フィルム株式会社)を用いた。

(2) -1：カニクイザルの片眼に対し、隅角部をレーザー光凝固し、眼圧を40mmHg程度までに上昇させる。もしくは成熟ラットの片眼に対し、強膜静脈を焼却し眼圧を上昇させる。他眼は未処置でコントロールとして使用する。カニクイザルの場合は約半年後、ラットの場合は約2-6ヶ月後に眼球を摘出し、視神経乳頭、網膜の切片標本を作成する。リン酸化中間径フィラメントを特異的に染色する抗体SMI31とリン酸化、非リン酸化中間径フィラメントともに、染色する抗体NF200を用いて、2重染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察する。観察像から、リン酸化率を算定し、緑内障と、コントロール眼におけるリン酸化率を比較する。また、視神経を標本として、蛋白を抽出しWestern blottingを試行する。

(2) -2 : カニクイザル眼から単離培養した毛様体筋細胞に対し、塩酸プナゾシン、ラタノプロスト、もしくはその基剤を添加し細胞外器質分解酵素であるmatrix metalloprotenases(MMP)活性をsubstrate zymographyにて測定した。またカニクイザル眼に塩酸プナゾシンとラタノプロストを点眼した際の眼圧の下降を測定した。

(3) : 15-24 歳の老齡カニクイザル 60 頭について眼底を観察し、加齡性黄斑変性を認めた 10 個体の黄斑部網膜について定法によりパラフィン切片を作成、一連の抗体を用いてドルーゼンに対する免疫染色を行った。抗原の賦活化、1次抗体希釈率・反応温度・反応時間については抗原ごとに個別に検討し、発色はDako社の Envison Kit (AEC 基質) を用いて行った。

ヒトTIMP3遺伝子の塩基配列をもとにプライマーを設計し、カニクイザルTIMP3遺伝子のイントロン・エキソン構造とcDNA全長の塩基配列を決定した。得られたイントロン・エキソン構造をもとに各エキソンについて再度プライマーを設計し、SSCP法と直接シーケンスにより、遺伝性黄斑変性家系の疾患個体6頭と正常個体4頭、家系外正常個体6頭について変異スクリーニングを行った。SSCPはPCR産物をフォルマミドで95℃、10分間熱変性後、12.5%ポリアクリルアミドゲルで5℃、600V、25mA、180分泳動し、銀染色後判定を行った。

### C.研究成果

(1) ミドリザルの0日齢より90日齢にいたる各齡での眼底所見

0日齢：観察した46頭の全例において、視神経乳頭ならびに黄斑部を除く眼底の色調は淡紅色を呈した。視神経乳頭は淡

紅色を呈し、黄斑は不明瞭であった。眼底反射は観察されなかった。全体的に脈絡膜血管が透過・観察された。動脈は淡紅色、静脈は暗赤色を呈した。視神経乳頭より分布する静脈は大きく上下に2分された。同じく動脈は静脈に伴って一部は黄斑上下側を走行し、弓状に長く湾曲した。また、カニクイザルと同様に網膜出血が7頭で観察された。すなわち、その内訳は自然分娩による出生例39頭中7頭

(17.9%)、帝王切開例では7頭中0頭であった。出血形態は点状、線状およびしみ状であり、各例において1眼底につき1ヶ所から10数ヶ所認められた。なお、これら網膜出血の発現と母ザルの産次回数、子ザルの性や出生時体重との間には有意な関係は認められなかった。すなわち、母ザルの産次回数別でみると、1産目では10頭中1頭 (10.0%)、2産目10頭中1頭 (10.0%)、3産目4頭中1頭 (25.0%)、4産目3頭中0頭 (0%)、5産目8頭中3頭 (37.5%)、6産目3頭中1頭 (33.3%)、7産目1頭中0頭 (0%) であった。子ザルの性別でみると雄ザルでは27頭中5頭 (18.5%)、雌ザルでは12頭中2頭 (16.7%) であった。子ザルの出生時体重別でみると、出生時200~299gの子ザルでは7頭中1頭 (14.2%)、300~399gでは27頭中5頭 (18.5%)、400~499gでは5頭中1頭 (20.0%) であった。しかし、自然分娩子における網膜出血の発現率は17.9%であるのに比べて、帝王切開7例での本症出現率は0%であった。なお、帝王切開を実施した7頭の妊娠日齢は妊娠156~169日齢であった。

3日齢：20頭の観察例において、視神経乳頭ならびに黄斑部を除く眼底の色調は淡紅色を呈した。視神経乳頭の色調は淡紅色を呈した。黄斑はわずかに暗調となり周囲と判別し得る例が14頭

(70.0%), 0日齢と同様の淡紅色は6頭(30.0%)に認められた。眼底反射は観察されなかった。網膜出血は2頭(10.0%)に観察された。

7日齢:20頭の観察例において、視神経乳頭ならびに黄斑部を除く眼底の色調は18頭(90.0%)が淡紅色,2頭(10.0%)の個体は部位により緑紫色を呈した。視神経乳頭の色調は20頭とも淡紅色を呈した。黄斑は3日齢時に比し、さらに暗調となり、20頭全例が赤色ないし赤褐色となった。眼底反射は観察されなかった。網膜出血は1頭(5.0%)に観察された。

14日齢:30頭の観察例において、視神経乳頭ならびに黄斑部を除く眼底の色調は14頭(46.7%)が7日齢と同様に淡紅色,16頭(53.3%)が部位により緑紫色を呈した。視神経乳頭の色調は全例淡紅色を呈した。黄斑は、7頭(23.3%)が赤色ないし赤褐色,23頭(76.7%)が淡褐色ないし暗褐色となった。眼底反射は16頭(53.3%)が弱陽性であった。網膜出血は観察されなかった。

28日齢:20頭の観察例の全例において、視神経乳頭ならびに黄斑部を除く眼底の色調は全般に淡紅色ないし緑紫色となった。視神経乳頭の色調は5頭(25.0%)が淡紅色を、15頭(75.0%)が橙色を呈した。黄斑は全例淡褐色ないし暗褐色であった。眼底反射は全例が弱陽性となった。網膜出血は観察されなかった。

60日齢:20頭の観察例の全例において、視神経乳頭ならびに黄斑部を除く眼底の色調は緑紫色ないし褐色を呈した。視神経乳頭の色調は橙色,黄斑は淡褐色ないし暗褐色であった。眼底反射は一見ピニール膜様で、弱陽性3頭(15.0%),中陽性17頭(85.0%)であった。網膜出血は観察されなかった。

90日齢:20頭の観察例において、視神経乳頭ならびに黄斑部を除く眼底の色調は緑紫色ないし褐色を呈した。視神経乳頭の色調は橙色,黄斑は淡褐色ないし暗褐色であった。眼底反射は60日齢より強くなり、全例が中陽性となった。網膜出血は観察されなかった。

(2) -1:カニクイザル眼の場合、コントロール眼において、視神経、網膜ともに、ほとんどの中間径フィラメントはリン酸化されていた。一方、緑内障眼においては、視神経乳頭陥凹が著明な、耳側においてより脱リン酸化が強く認められた。このような脱リン酸化はWestern blottingにても認められ、緑内障眼においては脱リン酸化中間径フィラメントにのみ特異的に反応するSMI32抗体に対し、バンドが検出されたが、コントロール眼においてはSMI32に対するバンドは認められなかった。ラット眼においても、コントロール眼ではほとんどリン酸化されているのに対し、実験緑内障眼においては、脱リン酸化が著明に亢進していた。

(2) -2:ラタノプロストは既報のようにMMP-2,3,9活性を有意に増加した。一方、塩酸ブナゾシンはMMP活性に対し有意な変化を示さなかった。カニクイザル眼に塩酸ブナゾシン、ラタノプロストを点眼した際に、眼圧は相加的に低下した。

(3):加齢性黄斑変性モデルにみられるドルーゼンに対する免疫染色の結果、免疫調節に関与するとされるAmyloid P Component、Apolipoprotein Eや補体成分C5、C3フラグメント、膜侵襲複合体C5b9(MAC)がドルーゼン中に蓄積していることが明らかとなった。また抗補体因子であるVitronectin、Clusterin、MCP(Membrane Cofactor Protein)も同様に蓄積を認めた。アルツハイマー病老人斑への蓄積が知られているbeta-Amyloid

についてはドルーゼン内への蓄積に加え、網膜色素上皮(RPE)細胞内にも陽性像を認めた。検討を行ったその他の抗原については陰性であった。

カニクイザル TIMP3 遺伝子のイントロン・エキソン構造と cDNA 全長の塩基配列を決定した。カニクイザル TIMP3 遺伝子はヒトと同じく 5 つの Exon からなり、cDNA 全長は 1887bp で推定アミノ酸 211 残基をコードし、アミノ酸レベルではヒト TIMP3 遺伝子と 100%一致していた。得られたイントロン・エキソン構造をもとに遺伝性黄斑変性家系の疾患個体と正常個体、家系外正常個体のエキソン周辺部について変異解析を行った。その結果、エキソン 1 の翻訳開始コドン直前に 9bp のインサートをヘテロで有する個体が疾患群で 1 頭みつけた。またエキソン 3 の下流に 16bp のインサートをヘテロでもつ個体が疾患群で 3 頭確認された。コード領域についてはアミノ酸置換を伴う有意な多型は疾患個体、正常個体ともに認められなかった。

#### D. 考 察

(1) : サル類において新生仔期をふくむ多数の動物をもちいた年齢別眼底所見に関する報告としては、著者らのカニクイザルとミドリザルに関する報告があるに過ぎないが、少数例のアカゲザルでの報告 [Johnson et al 1977, Ordy et al 1962] も参考にすることができる。そして、アカゲザル眼底像の年齢別における特徴、すなわち、眼底色調の変化像、黄斑不明時期 (0~3 日齢) の像および、眼底反射の像などは、カニクイザルおよびミドリザルでの所見と類似しており、これら 3 種のサルがこの点において類似していることが示された。

新生仔期の網膜出血については、1

日齢のアカゲザル 15 頭中 4 頭 (26.7%) においても観察されている [Jonson et al 1977]。さらにヒトにおいても、この時期に 30% の網膜出血例が認められ、原因のひとつに分娩時の頭部圧迫があげられている。加えて本症の発現は、帝王切開児で少なく、吸引分娩児で多いとの報告がある [山本 1980]。ミドリザル新生子の自然分娩子での網膜出血の発現率は 39 頭中 7 頭 (17.9%) であり、アカゲザル 15 頭中 4 頭 (26.7%)、カニクイザル 105 頭中 73 頭 (69.5%) に比べて低い割合を示した。この事実はミドリザルでの産道での新生子頭部圧迫が、他の 2 種のサルに比べて弱く、結果として網膜出血率に差が出たものとも考えられる。さらに、帝王切開分娩子では、カニクイザルでは 39 頭中 11 頭 (28.2%) に網膜出血が発現しているのに比べて、ミドリザルの帝王切開子では網膜出血は観察されていない。このことから、ミドリザル新生子網膜出血の発現に分娩時の産道での新生子頭部への圧迫の関与が大きいと考えられる。いずれにしても、ミドリザル新生子におけるこれらの出血はカニクイザル新生子と同様にほぼ 1 週齢で自然に消失することから、この時期においてはとくに注意すべき異常現象として取り扱う必要はないものと判断する。

著者が明らかにしたこれらの成績は今後のサル類飼育コロニーにおける疾病のチェック基準として役立つばかりでなく、遺伝性疾患の発見の基礎的資料として有用になると思われる。

(2) -1 : カニクイザル、ラットの種を問わず、ほとんどの視神経軸索は通常、リン酸化していることが確認された。また、緑内障においては、脱リン酸化が進行していること、また、脱リン酸化は、乳頭陥凹に先立つ形で起こっていること

から、中間径フィラメントの脱リン酸化が進行することが、軸索輸送を低下させ、RGC障害を引き起こしている可能性が示唆された。

(2) -2: 塩酸ブナゾシンは眼圧下降をラタノプロストとは異なる機序で示し、またラタノプロストと相加的作用を示すことから、臨床的に両者には併用効果があると考えられた。

(3): Amyloid P Component は炎症急性期に認めるタンパクであり、Apolipoprotein E は脳障害において発現が亢進するタンパクとして知られている。加齢性黄斑変性モデルにみられるドルーゼンに対する免疫組織化学的検索の結果、これら炎症に関与する分子がドルーゼン内に蓄積していることが明らかとなり、ドルーゼンの形成になんらかの免疫異常が関与していることが示唆された。補体系は活性化されるとC1からC9までの各要素が順に活性化され、最終的には膜侵襲複合体(C5b-9、MAC)を生成し生体膜を破壊する。補体活性化のカスケードの初期に位置するC3の活性化断片、中盤に位置するC5、さらに最終産物であるC5b-9がドルーゼン中に蓄積していることが明らかとなり、ドルーゼン内で補体系が活性化していることが示された。生体内には補体の活性化からホストの細胞を守るために抗補体因子として、Vitronectin、Clusterin、DAF(Decay Accelerating Factor)、MCP(Membrane Cofactor Protein)、Protectinといった分子が備わっている。Vitronectin、Clusterinは液性の抗補体因子であり、DAF、MCP、Protectinは細胞膜上に発現する抗補体因子として知られている。このうちのVitronectin、Clusterin、MCPについてドルーゼン内に強い陽性像が認められた。以上のことは、ドルーゼン内において慢

性的な補体活性化と抗補体反応が引き起こされていることを示している。

この補体系の活性化が引き起こされる要因を明らかにするため、アルツハイマー患者の老人斑において補体系の活性化を引き起こすことが知られている beta Amyloid について検討を行ったところ、ドルーゼン内のみならずでその上部に位置する RPE 細胞内においても陽性像が確認された。beta Amyloid は補体成分 C1、C3 に直接結合し補体古典経路および二次経路を活性化することが知られている。また Amyloid P Component は beta Amyloid の凝集を促進する働きを有することが in vitro で報告されている。これらのことから、RPE によって産生された beta Amyloid が Amyloid P Component の作用で凝集し、補体の活性化を引き起こしている可能性が考えられた。

以上のことから、RPE によって産生された beta Amyloid が補体の活性化を引き起こし、それによる慢性的な炎症刺激が Amyloid P Component や Apolipoprotein E などの炎症性タンパク、さらに Vitronectin、Clusterin、MCP といった抗補体因子の集積を惹起しドルーゼンが形成されている可能性が強く示唆され、免疫疾患としての AMD の側面が明らかとなった。

遺伝性黄斑変性モデルについては候補遺伝子として Sorsby's fundus dystrophy の原因遺伝子である TIMP3 のカニクイザルホモログをクローニングし変異解析を行った。結果、疾患群でエキソン1上流の非翻訳領域とエキソン3下流のイントロンにそれぞれインサートをヘテロでもつ個体が認められたが、アミノ酸コード領域における有意な多型は認められなかった。今回はプロモーター部分についての解析は行っていないため完全に除外は



できないが、本遺伝子が遺伝性黄斑変性の原因遺伝子である可能性は低いと考えられた。

#### E. 結論

(1)：本研究では、サル類の眼科領域疾患モデル開発のための基礎研究として、サル類眼底の臨床検査に関する基礎的研究を取り上げた。その結果、ミドリザル 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らかとなった。

(2)：サル類は人間に最も近い形態的特徴を示しており、種々の薬物に対する反応も、人間に近い、このため、疾患研究には最も有効性が高い。今回の研究においても、カニクイザル眼を用いたために、非常にその結果が人の疾患解明や、薬物作用機序の解明に有効であった。緑内障性神経障害はその疾患発症の首座が視神経乳頭部にあり、従来研究対象として用いられているラットなどの小動物、犬や猫などの哺乳類はその構造が人間のものと、大きく異なるため、研究結果の応用が困難であったが、カニクイザル眼の場合、非常に人間と近く、摘出眼などを用いた結果に近い。また、薬物に対する副作用発現に関しても、他の動物の場合、人間と大きく異なることが多いが、カニクイザル眼の場合、非常に近似している。今回の研究結果もカニクイザル眼を用いた有用性が強く認められており、今後もこのような形式の研究をさらに進めていく必要がある。

(3)：ドルーゼンの形成機序は不明であったが、今回、RPE によって産生された beta Amyloid が Amyloid P Component の作用で凝集して補体活性化を惹起し、それによる慢性的な炎症刺激が炎症性タンパクや抗補体因子の集積を

引き起こしドルーゼンの形成につながっている可能性が示唆された。これらの所見は一部ヒトでの報告と一致するものであり、改めて加齢性黄斑変性モデルの AMD モデルとしての有用性が確認された。今後、ドルーゼン組成について質量分析計を用いた生化学的検索を行う予定で、ドルーゼンの形成機序についてより詳細な情報が得られるものと期待される。

遺伝性黄斑変性モデルについては、ヒト遺伝性黄斑変性原因遺伝子 ELOVL4、TIMP3 を原因遺伝子として除外できた。今後、原因遺伝子の早期同定のため、家系を用いた連鎖解析を進めると同時に、ABCA4、VMD2、EFEMP1 といった他のヒト遺伝性黄斑変性原因遺伝子についても変異解析を行っていく必要があると考えられる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Kashiwagi K, Ou B, Nakamura S, Tanaka Y, Suzuki M, Tsukahara S. Increase in Dephosphorylation of the Heavy Neurofilament Subunit in the Monkey Chronic Glaucoma Model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003 Jan; 44(1):154-9
2. Kashiwagi K, Tsukamoto K, Suzuki M, Tsukahara S. Effects of isopropyl unoprostone and latanoprost on melanogenesis in mouse epidermal melanocytes. *J Glaucoma*. 2002 Feb;11(1):57-64.
3. Kashiwagi K, Kanai N, Tsuchida T, Suzuki M, Iizuka Y, Tanaka Y, Tsukahara S. Comparison between Isopropyl Unoprostone and Latanoprost by Prostaglandin E(2)Induction, Affinity to Prostaglandin Transporter, and

Intraocular Metabolism. Exp Eye Res.  
2002 Jan;74(1):41-49.

4. 柏木賢治、金明、鈴木通弘、田中祐子、飯塚洋子、塚原重雄：イソプロピルウノプロストンのサル眼毛様体筋におけるマトリックスメタロプロテナーゼ活性への影響、眼薬理雑誌 200247-48

- 5 Shinsuke Umeda, Radha Ayyagari, Michihiro T. Suzuki, Fumiko Ono, Fumino Iwata, Keiko Fujiki, Atsushi Kanai, Yuichiro Takada, Yasuhiro Yoshikawa, Yasuhiko Tanaka, and Takeshi Iwata.

Molecular Cloning of *ELOVL4* Gene from Cynomolgus Monkey (*Macaca fascicularis*).  
Exp. Anim. 2003 in press

ARVO2002 (2002年5月) フロリダ

4. S.Umeda, R.Ayyagari, M.T.Suzuki, Y.Yoshikawa, F.Iwata, K.Fujiki, A.Kanai, Y.Takada, Y.Tanaka, T.Iwata.

Molecular Cloning of *ELOVL4* Gene from Cynomolgus Monkey (*Macaca Fascicularis*).

ARVO2002 (2002年5月) フロリダ

G.知的所有権の獲得  
なし

## 2.学会発表

1. 西山隆恒、梅田慎介、鈴木通弘、吉川泰弘、藤木慶子、金井淳、田中靖彦、岩田岳

カニクイザルにみられるドルーゼンの病理組織学的検索

第106回日本眼科学会総会(2002年5月)仙台

2. 岩田岳、梅田慎介、吉川泰弘、Radha Ayyagari、鈴木通弘、岩田文乃、藤木慶子、

金井淳、田中靖彦

カニクイザル *ELOVL4* 遺伝子のクローニングと発現解析

第106回日本眼科学会総会(2002年5月)仙台

3. T.Nishiyama, S.Umeda, M.T. Suzuki, Y.Yoshikawa, A.Yasosima, F.Iwata, K.Fujiki, A.Kanai, Y.Tanaka, T.Iwata.

Histopathological Study of Drusen Observed in Cynomolgus Monkey (*Macaca fascicularis*).

# カニクイザルのパーキンソン病モデルにおける 認知・弁別機能の解析

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

パーキンソン患者では、運動機能障害の他に認知・弁別機能などの高次脳機能障害を伴うことが報告されている。昨年度確立した低濃度の MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) の連続投与により作成したカニクイザルの慢性型パーキンソンモデルにおいてもパーキンソン患者と同様な高次脳機能障害が生じているか否かを検討し、以下の結果を得た。

1、コンピュータによる色課題自動提示装置を開発した。本装置では対になる2色がディスプレイ上に提示され、一方の色を選択したときに報酬が得られる仕組みになっている。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、単純弁別課題および逆転弁別課題の異なった課題提示に対するカニクイザルの反応が評価できた。

2、この装置を用いて、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呈したサルでは、①色弁別の初期学習能の低下は見られるが、繰り返しにより弁別機能は向上した。②典型的な set-shifting 課題で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。この結果は、パーキンソン患者に見られる認知・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、認知弁別機能障害を評価する有用なモデルと判断できる。

**キーワード：**カニクイザル、パーキンソン病、MPTP、認知・弁別機能

## A. 研究目的

痴呆症、パーキンソン病、感覚器障害のような運動機能障害や高次脳機能障害をと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。昨年度の研究で、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、カニクイザルで運動機能障害をとともなうパーキンソン病に類似した慢性病態モデルを作成する方法を開発すると

もに、運動障害の程度を数値化できる重症度診断法を開発した。

パーキンソン患者では、四肢の振戦などの運動障害の他に、空間的ワーキングメモリーの障害、視覚刺激を抽象的カテゴリーに分類する機能の障害、記憶した反応法を課題の文脈に従って変更する (set-shifting) 機能の障害などの認知機能障害を伴うことが報告されている。そこで今年度は、昨年度確立したカニクイザルのパーキンソンモデルの有用性を評価する目的で、①サル類の認知・弁別機能を評価するシステムを開発するとともに、②MPTP 処理したカニクイザルについて認知・弁別機能を調査し、パーキンソン患者との類似性を検討した。

## 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 15

歳の雌カニクイザル (#39) 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、リン酸緩衝液 (PBS) に溶解した MPTP (Sigma) を週 1 回の割合で静脈内投与した。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 投与方法、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 の投与量は 0.25ug/Kg、0.125ug/Kg の 2 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。

MPTP 投与中止後 2 ヶ月を経過した時点で認知機能の解析をおこなった。解析には前述の疾患個体 (#39) と正常対照として 3~6 歳齢の雄ザル 3 頭 (#N2、#19、#N6) を供試した。

カニクイザルの認知機能解析を目的とした課題提示装置を開発した。図 1 に装置の前面と側面の写真を示す。サルの飼育ケージを装置前面に装着し、装置面に提示された 2 つの円形ボタン (30 mm) に刺激色を提示した。右下に餌受け皿を設置し、課題に正解した時のみに装置上部の給餌器から報酬 (リンゴ片) が餌受け皿に落とされる。刺激提示色および提示位置の順序、給餌などは全てパーソナルコンピュータによる自動制御で行った。実験装置内の被験体の様子をビデオカメラで観察、記録した。

認知機能解析のための課題を図 2 に示す。図に示すように、認知機能解析では単純弁別課題と逆転弁別課題の 2 種類の課題をそれぞれ 3 段階ずつおこなった。単純弁別課題では、それぞれの段階で正刺激 (S+ ; 正解色) を固定し、正刺激の提示されたボタンを押したときのみに報酬が与えられる。逆転弁別では、段階 1 の正刺激が段階 2 では負刺激 (S- ; 不正解色) に逆転し、さらに第 3 段階では第 2 段階の正刺激が負刺激に逆転する。逆転弁別課題の一部を除き、提示色はすべて異なる色とした。1 日の試行数は 100 試行とし、課題習得基準は 1 日

の総反応数が 80 試行以上で、かつその正反応率が 90%以上の日が 2 日間連続することとした。

### C. 結果と考察

図 1 に今回認知機能解析に供した雌カニクイザル (#39) の MPTP 投与期間中の臨床経過をしめす。この個体では、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。この時点で 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。

MPTP 処理により慢性パーキンソニズムを発症した #39 と無処理の 3 頭 (#N2、#19、#N6) の計 4 頭のカニクイザルに図 2 に示す単純弁別課題および逆転弁別課題を提示し、習得基準に達するまでの時間を比較した。図 4 は、単純弁別、逆転弁別のそれぞれ 3 段階の課題を習得するまでの日数をまとめたものである。図に示すように、3 頭の正常対照個体は単純弁別課題において第一段階の習得までの日数に個体差があり、3~8 日の試行が必要であったが、第二段階以降はいずれの個体も 4 日以内で課題を習得した。これに対し、MPTP 処理個体では第一段階の習得に 28 日を要し、第二段階においても正常個体の第一段階以上の 9 日の試行時間が必要であったが、第三段階では正常個体と同程度の 2 日間の試行で課題を習得した (図 5)。これに対し、典型的な set-shifting 課題である逆転弁別課題では、正常対照個体がいずれの段階も 3~7 日の試行で課題を習得したのに対し、MPTP 処理個体では、第一、第二、第三課題の習得にそれぞれ 28 日、31 日、24 日を必要とし、単純弁別課題でみられた繰り返しによる習得日数の短縮はみられなかった。

本研究では MPTP 処理で作成したカニク