

厚生労働科学研究費補助金
長寿科学総合研究事業

α トコフェロール転送蛋白遺伝子変異による
酸化ストレス病態の解明

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 水澤 英洋

平成16(2004)年4月

目 次

I. 総括研究報告

α トコフェロール転送蛋白遺伝子変異による酸化ストレス病態の解明
水澤英洋

II. 分担研究報告

1. α トコフェロール転送蛋白遺伝子変異による酸化ストレス病態の解明：分子生物学的研究
横田隆徳
2. α トコフェロール転送蛋白遺伝子変異による酸化ストレス病態の解明：分子生物学的・生化学的研究
新井洋由
3. α トコフェロール転送蛋白遺伝子変異による酸化ストレス病態の解明：神経病理学的研究
内原俊記

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

IV. 研究成果の刊行物・別刷

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

α トコフェロール転送蛋白遺伝子変異による酸化ストレス病態の解明に関する研究

主任研究者 水澤 英洋 東京医科歯科大学大学院教授

研究要旨：中枢神経系に酸化ストレス負荷のある α -トコフェロール輸送蛋白質(α -tocopherol transfer protein: α TTP)ノックアウトマウスをアルツハイマー病のモデルである変異 APP トランスジェニックマウス (Tg2576) とかけあわせた結果、Tg2576 の学習記憶能力障害の発症もしくは増悪に慢性酸化ストレスが関与することが示唆された。酸化ストレスの老化への影響については α TTP ノックアウトマウス(n=351)をビタミン E 欠乏食および添加食に分けて長期飼育しているが、すでに一部で運動量の低下や後肢の脱力がみられ老化促進の可能性がある。酸化ストレスが関与する脳虚血と多系統萎縮症で tau 蛋白が修飾を受け脳内に沈着することが明らかになった。基礎研究では、通常は細胞質に存在する α -TTP が N 末端近傍の極性アミノ酸領域を活用し後期エンドソーム内腔側 pH が酸性から中性化するのに伴い後期エンドソーム膜に局在化することを発見した。これはエンドサイトーシスによって肝細胞内に取り込まれたビタミン E を酸性コンパートメントから α -TTP へと受け渡す過程と考えられた。

分担研究者

横田 隆徳 東京医科歯科大学医学部講師
新井 洋由 東京大学大学院薬学系研究科教授
内原 俊記 東京都神経総合研究所神経病理
副参事研究員

A. 研究目的

中枢神経系の酸化ストレス負荷モデルである α TTP ノックアウトマウスとアルツハイマー病のモデルである変異 APP トランスジェニックマウス (Tg2576) とをかけあわせることにより、老人斑の出現、A β 蛋白蓄積などの Tg 2576 の表現型に及ぼす影響を検索する。アルツハイマー病の病態生理における酸化ストレスの及ぼす影響を明らかにするとともに、海馬の神経細胞死が伴うようなより良いアルツハイマー病のモデルマウスの作製を目指す。

生体内で最強の抗酸化物質のビタミン E を欠損する α TTP ノックアウトマウスを、さらに食餌中のビタミン E を厳密に管理した条件で長期飼育し、多数の個体で細胞、組織、さらには個体レベルでの変化を検索し、老化、発癌、寿命などへの酸化ストレスの関与を明らかにする。また、酸化ストレスの関与する病態である脳梗塞や多系統萎縮症(MSA)におけるタウ分子の変化についても検討する。

基礎的研究としては、 α -TTP は肝臓に取り込まれたビタミン E を積極的に血液中に再分泌することで生体内のビタミン E レベルを維持しているが、この再分泌がクロロキン処理により阻害されることを活用して α -TTP を介するビタミン E 輸送機構の詳細を解析する。

B. 研究方法

α TTP ノックアウトマウスと Tg 2576 を自然交配させ、(APP hetero) \times (α TTP -/-)、(APP hetero) \times (α TTP +/+)、(APP WT) \times (α TTP -/-)、(APP WT) \times (α TTP +/+) の 4 種の遺伝子型の産仔を得た。(APP hetero) \times (α TTP -/-) ビタミン E 欠乏食群、(APP hetero) \times (α TTP +/+) 正常食群、(APP WT) \times (α TTP +/+) 正常食群の表現型の解析として、4 ヶ月齢雄マウスで Morris 型水迷路試験を用いた学習記憶能力を解析した。

長期酸化ストレスの老化や寿命に及ぼす影響の研究には、既に C57/JB6line に 8 世代以上 back cross された α TTP 遺伝子ノックアウトマウス雄(α TTP-/-) 個体 3 匹より採取した精子を用いて C57/JB6 の wild type 雌(α TTP+/+) より採取した卵に体外受精を行う。卵割が確認できた受精卵を擬似妊娠状態にした別の雌の子宮内に着床させ妊娠を継続し、 α TTP+/- の雌個体を得て、再び採卵し、 α TTP-/- 雄より採取した精子を用いて体外受精を行い長期飼育に用いる雌個体(α TTP+/-, α TTP-/-) を得た。これらの個体を対照群 α TTP+/+ と共に精製飼料 (AIN-76) に基づくビタミン E 欠乏食群とビタミン E 添加食 (50IU/kg, α -tocopherol acetate) 群に分けて SPF 環境下で飼育し観察した。

酸化ストレスが病態に関与する脳梗塞やMSAの研究では、それぞれのヒト剖検脳を用いTris-buffered saline (TS), 1% sarkosyl/TS, 2%SDS/TS, formic acidで順に可溶化し別に抽出したPHF画分と一緒に10%SDS-PAGEで泳動後PVDF膜へ転写して種々の抗tau抗体でウエスタンブロットを行うとともにホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いて免疫組織化学的にも検索した。

肝細胞における α -TTPを介するビタミンEの輸送機構の研究では、 $[^3H]$ ビタミンE含有リポソームを作製しpcDNA3/mycキメラ蛋白質のビタミンE結合能を測定した。クロロキンの経口投与マウスを飼育し、血清中ビタミンE (α -トコフェロール)、コレステロール濃度を測定するとともに、テトラサイクリン-off システムを用いた α -TTPの発現誘導CHO-K1 培養細胞系とアデノウィルスを用いた α -TTPの発現系を用いて研究を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、三省の遺伝子研究の指針に基づいて発足した新しい倫理委員会において承認されており、遺伝子試料の管理など倫理面への配慮は十分になされている。また、動物実験は本学の規定にもとづき動物実験委員会の承認を得ており、動物愛護の観点から十分に配慮した研究を行っている。

C. 研究結果

Hidden platform test では(APP hetero) \times (TTP +/+) 正常食群に比し(APP hetero) \times (TTP -/-) ビタミンE 欠乏食群は platform 到達潜時が長かった。引き続いて行った transfer test での annulus crossing index [= (ターゲットクアドラントの platform 位置の通過回数) - (他の 3 つのクアドラントの platform 位置の通過回数の平均)] も低値であった。最後に行った visible platform test では各群で運動能力、視力や動機づけに差がないことが確認された。これは、(APP hetero) \times (α -TTP -/-) ビタミンE 欠乏食群、(APP hetero) \times (α -TTP +/+) 正常食群、(APP WT) \times (α -TTP +/+) 正常食群の順で学習記憶能力が劣っている傾向を示唆する。長期酸化ストレスに関する研究では、多数の個体を確保するため2回の作出作業を行い、総計で雌の α -TTP-/-個体 (以下 α -TTP 遺伝子の allele 数に従い"0"とする) 167 匹、 α -TTP+/-個体 (同様に"1"とする) 220 匹が得られ、 α -TTP+/+個体 (同様に"2"とする) 180 匹と共にビタミンE 欠乏食群("-"とする)、ビタミンE 添加食群("+")に分けて飼育した。ビタミンE+, ビタミンE- 飼料への変換は離乳直後より行った。長期飼育は先行群と後発群に分けて開始した。これまで遺伝子改変群(0, 1)ではビタミンE-欠乏食群に後肢の脱力、引きずり、

体幹の回旋、運動量の低下などの有症状例と死亡例が見られるが、 α -TTP allele の数(0- vs 1-)の間での差は明らかでない。これに比して0+群で死亡個体はないものより低い割合で有症状例がみられている。Wild type 群(2+, 2-)では食餌の ビタミンE 含有量に関わらず症状を有する例はこれまでに観察されていない。脳梗塞やMSA脳にみられるタウ蛋白は正常脳と同じ分子量でTris 可溶性画分に認められ、TritonX (Tx) 非存在下で見られた tau2 陽性のバンドは0.1%Tx 存在下では消失するが洗浄すると再び可視化できた。Tx 存在下でも抗ヒトタウ抗体では同様の陽性バンドが検出された。

肝細胞内での α -TTPの研究では、クロロキン処理により顆粒状に α -TTPの局在が変化し後期エンドソームに存在することが示唆されたが、脂質結合蛋白質ファミリーの中で α -TTPと最も高いホモロジー(約37%)を有するCRALBPと α -TTPのキメラ蛋白を合成し、局在化に必要なドメインの解析をした結果 α -TTPのN末端から21~50番目の極性アミノ酸の多いドメインが必要であった。非肝臓系の細胞株であるCHO細胞では α -TTPの恒常的な過剰発現株は樹立できず、 α -TTPの局在化は肝臓に特異的で非肝臓系細胞株では α -TTPの過剰発現は有害である可能性が示唆された。テトラサイクリン-offシステムで α -TTPの発現を誘導したCHO細胞は細胞形態が著しく細長く変化し細胞内に多数の空胞が出現、細胞増殖速度も著しく低下した。この形態変化には α -TTPのN末端側50アミノ酸は不要であり、ビタミンEの添加により完全に抑制された。なお、in vivoにおけるクロロキン投与は血清コレステロールは変化させずに血清ビタミンEのみを約50%に低下させることが明らかになった。

D. 考察

本研究により大脳の慢性的酸化ストレス負荷ではTg 2576の学習記憶能力がより低下する可能性があることが示された。今後、海馬や大脳新皮質で老人斑がより多く形成されているか、大脳組織中のA β 42/40の量がより増大しているか、Tg 2576では認め得なかった神経原線維変化の形成や海馬の明らかな神経細胞死をきたしているか、などの確認を進めていく予定である。確立された α -TTP ノックアウトマウス雄個体を用いた体外受精を2回繰り返すことにより、ほぼ同時期に多数の遺伝子改変個体 α -TTP+/-および α -TTP-/-を得て長期飼育を開始できた。この遺伝子破壊が個体の老化や寿命に及ぼす影響を知るには長期の観察が必要でSPF環境での飼育を行っている。SPFで用いる飼料は滅菌する必要があるが、 γ 線照射によるビタミンEに対する影響を

避けるため、基礎となる精製飼料に α -tocopherol の酢酸エステルを添加して飼料を作製した。これは SPF 環境下で飼料のビタミン E 含有量を正確に制御し得た初めての方法と思われる。病的変化は対照の wild type 群 (2+, 2-) ではみられていないが、 α TTP-/-では VE 添加群 (0+) でも有症状個体があり、ビタミン E 欠乏群 (0-, 1-) では有症状個体の割合がより高かった。遺伝子改変の影響は飼料中のビタミン E 欠乏状態と相乗的に作用しているとすれば説明できるが、ビタミン E 欠乏群では α TTP 遺伝子の allele 数 (0 または 1) による違いはこれまでの検討では明らかになっていない。今後長期飼育を継続していく過程で遺伝子の dosage effects のみならず他の指標も含めて観察する必要がある。このモデル系はかつて誰もしたことがない「正確な遺伝型とビタミン E 量を制御した酸化ストレス状態下で多数の哺乳類個体を長期観察する」というものであり、老化や寿命の研究としては最適なものの一つと期待される。

酸化ストレスモデルとしての脳梗塞、多系統萎縮症の研究ではこれらの疾患で脳に沈着した tau はリン酸化を受けていないが tau2 エピトープが TX 存在下で消失し洗浄で復活する conformational change などを来したものと推定される。これらは線維形成前の極めて初期のタウ沈着形態を反映している可能性があり、今後この状態からタウ蛋白の修飾がどのように分子全体に拡大して線維形成に至るのか研究を進めたい。

α -TTP の後期エンドソームへの局在化は α -TTP に特異的であり、 α -TTP の N 末端から 21~50 番目までのアミノ酸が必要である。この領域は立体構造上ビタミン E との結合に必要な領域の外側に存在しており後期エンドソーム上のターゲット分子との結合に必要なのかもしれない。 α -TTP の局在化は肝細胞に特異的であり肝臓の後期エンドソーム膜上には何らかの特異的な α -TTP の受容体が存在するものと思われる。さらに、非肝臓細胞に強制的に α -TTP を発現すると形態変化をきたすことが判明したが、これにはビタミン E と結合していない α -TTP が他の脂質や蛋白質と結合してしまったために細胞の形態変化が引き起こされる、あるいは肝細胞にはビタミン E と結合していない α -TTP を安定化させる因子が存在している可能性が考えられる。いずれにせよ、肝臓に取り込まれたビタミン E が効率よくリポ蛋白質へとリサイクリングされるには、 α -TTP の関与する特別なビタミン E 輸送機構が必要と考えられるが今回その一端を解明できた。なお、やはり今回初めて in vivo でクロロキンが血中ビタミン E レベルを低下させることが判明し、今後そのメカニズムの解明とともにクロロキンの副作用という観点でも注意が必要である。

E. 結論

行動解析により Tg2576 の学習記憶能力障害の発症もしくは増悪の機序に慢性酸化ストレスが関与することが示唆された。今後の生化学的・病理学的検索により酸化ストレスが Tg2576 の表現型に及ぼす影響がさらに明らかにされるものと期待される。

α TTP 遺伝子型とビタミン E レベルを正確に制御して、慢性的酸化ストレスの加齢や寿命に対する影響を観察する哺乳類であるマウスの多数個体からなる実験コホートを確立し解析を開始した。すでに症状を呈したり死亡した個体もあるが、今後できるだけ長期間観察を継続し時間依存的に出現する変化や影響を明らかにする。酸化ストレスが病態に関連するとされる脳梗塞と MSA 脳で tau2 に限局した変化が生じたタウ蛋白の沈着が起こることを明らかにし、いわゆるタウ沈着の初期像に対応している可能性が示された。

α -TTP が肝臓細胞内で ATP 依存性に後期エンドソームに局在化し、それには α -TTP の N 末端から 21~50 番目までの極性アミノ酸領域が必要であることを明らかにした。 α -TTP の局在化は肝細胞に特異的な現象であり、非肝臓細胞に強制的に発現させると細胞形態が変化することが判明、それがビタミン E で復活することも明らかとなった。また、in vivo においてクロロキンは血中ビタミン E レベルを約 50% に低下させることを明らかにした。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

横田隆徳, 水澤英洋. α tocopherol 転移タンパク遺伝子欠損マウスにおける遅発性運動失調症. Clin Neurosci 21(2):177-179(2003)

横田隆徳. 内科疾患に伴う神経症状. ビタミン E 欠乏症. 内科 91(4):687-690(2003)

横田隆徳. 家族性特発性ビタミン E 欠乏症の発見と発症機序解明及び治療法の確立. ビタミン 77(4):211-212(2003)

Horiguchi M, Arita M, Kaempf-Rotzoll DE, Tsujimoto M, Inoue K, Arai H. pH-Dependent translocation of α -tocopherol transfer protein (α -TTP) between hepatic cytosol and late endosomes. *Genes Cells* 8:789-800(2003)

Kaempf-Rotzoll DE, Traber MG, Arai H. Vitamin E and transfer proteins. *Curr Opin Lipidol* (review) 14:249-254(2003)

Kaempf-Rotzoll DE, Horiguchi M, Hashiguchi K, Aoki J, Tamai H, Linderkamp O, Arai H. Human placental trophoblast cells express α -tocopherol transfer protein. *Placenta* 24:439-444(2003)

Uchihara T, Duyckaerts C, Iwabuchi K, Iwata M, Yagishita S, Hauw J-J. Was Pierre Marie's ataxia Machado-Joseph disease? A reappraisal based on the last autopsy case from la Salpêtrière hospital. *Arch Neurol*(in press)

Nakamura A, Uchihara T. Dual enhancement of triple immunofluorescence using two antibodies from the same species. *J Neurosci Methods*(in press)

Uchihara T, Nakamura A, Arai T, Ikeda K, Tsuchiya K. Microglial tau undergoes phosphorylation-independent modification after ischemia. *Glia* 45:180-187(2004)

Uchihara T, Nakamura A, Nakayama H, Arima K, Ishizuka N, Mori H, Mizushima S. Triple immunofluorolabeling with two rabbit polyclonal antibodies and a mouse monoclonal antibody allowing three-dimensional analysis of cotton wool plaques in Alzheimer disease. *J Histochem Cytochem* 51:1201-6(2003)

Aoki K, Uchihara T, Sanjo N, Nakamura A, Ikeda K, Tsuchiya K, Wakayama Y. Increased expression of neuronal apolipoprotein E in human brain with cerebral infarction. *Stroke* 34(4):875-880(2003)

Uchihara T, Ikeda K, Tsuchiya K. Pick body disease and Pick syndrome. *Neuropathology* 23:318-326 (2003)

Takahashi J, Fujigasaki H, Iwabuchi K, Bruni AC, Uchihara T, El Hachimi KH, Stevanin G, Dürr A, Lebre A-S, Trotter Y, de The H, Tanaka J, Hauw J-J, Duyckaerts C, Brice A. PML nuclear bodies and neuronal intranuclear inclusion in polyglutamine diseases. *Neurobiol Dis* 13(3):230-237(2003)

Aoki K, Uchihara T, Nakamura A, Komori T, Arai N, Mizutani T. Expression of apolipoprotein E in ballooned neurons -comparative immunohistochemical study on neurodegenerative disorders and infarction-. *Acta Neuropathol* 106(5):436-440(2003)

Aoki K, Uchihara T, Tsuchiya K, Nakamura A, Ikeda K, Wakayama Y. Enhanced expression of aquaporin 4 in human brain with infarction. *Acta Neuropathol* 106:121-124(2003)

Nagaoka U, Uchihara T, Iwabuchi K, Konno H, Tobita M, Funata N, Yagishita S, Kato T. Attenuated nuclear shrinkage in neurones with nuclear inclusions of SCA1 brains. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74(5):597-601(2003)

Shibuya K, Uchihara T, Nakamura A, Ishiyama M, Yamaoka K, Yagishita S, Iwabuchi K, Kosaka K. Reversible conformational change of tau-2 epitope exposed to detergent in glial cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy. *Acta Neuropathol* 105(5):508-514(2003)

内原俊記, 岩淵潔. CAG リピート病 (ポリグルタミン病) の最近の話題. 共通の病態と手がかかり. *最新精神医学* 8:39-47(2003)

内原俊記. Angiotensin-converting enzyme (ACE). 痴呆症学 (1) 平井俊策編. *日本臨床* 61 増刊:49-53 (2003)

内原俊記. 封入体の神経病理-蛋白沈着の疾患特徴的様式と萎縮・変性との関係-. *神経進歩* (印刷中)

2. 学会発表

- Tatsufumi Hiramatsu, Daisy E. Kaempf-Rotzoll, Takao Inoue, Hiroyuki Arai : Purification of recombinant human α -tocopherol transfer protein (α -TTP) for crystallization 第 7 6 回日本生化学会大会, 横浜, (2003. 10. 18)
- 平松達史、井上貴雄、高根沢康一、新井洋由 : α -tocopherol非存在下での α -TTPの機能解析. 第 1 5 回ビタミンE研究会, 東京, (2004. 1. 23)
- 斉藤尚子、野口範子、清瀬千佳子、植田忠彦、近藤一雄、五十嵐脩、新井洋由 : ビタミンE過剰摂取時においてもCYP3Aは誘導されない. 第 1 5 回ビタミンE研究会, 東京, (2004. 1. 23)
- 寺社下浩一、立部貴典、柴田識人、伊藤恒夫、新井洋由、鈴木宏志 : 胎盤形成における α -tocopherol transfer proteinと α -tocopherolの役割. 第 1 5 回ビタミンE研究会, 東京, (2004. 1. 23)
- 内原俊記、中村綾子、Fraser P, Hyslop S-G: ラット小脳形成過程におけるプレセニリン NTF, CTF 発現の変化. 第 44 回日本神経学会総会, 横浜, (2003. 5. 17)
- 児矢野繁、黒岩義之、柳下三郎、内原俊記、岩淵潔 : 脊髄小脳変性症の小脳 Purkinje 細胞における PML 蛋白の役割. 第 44 回日本神経病理学会総会 学術研究会, 名古屋, (2003. 5. 29) [Neuropathology, 23:S70(2003)]
- 青木和子、内原俊記、林雅晴、中村綾子、水谷俊雄、若山吉弘 : 筋ジストロフィー症の脳における aquaporin-4 の発現. 第 44 回日本神経病理学会総会 学術研究会, 名古屋市, (2003. 5. 29) [Neuropathology, 23(2003)S83]
- 中村綾子、内原俊記 : CARD 法を用いた免疫蛍光三重染色の試み (rabbit polyclonal + 2 mouse monoclonals). 第 44 回日本神経病理学会総会 学術研究会, 名古屋, (2003. 5. 29) [Neuropathology 23(2003)S85]
- 岩淵潔、内原俊記、Duyckaerts C、柳下三郎、岩田誠、Hauw J-J : Marie 失調症の再評価-サルペトリエール病院で臨床病理診断された 1 剖検例を中心に-. 第 44 回日本神経病理学会総会 学術研究会, 名古屋, (2003. 5. 29) [Neuropathology 23(2003)S124]
- 馬原孝彦、内原俊記、中村綾子、土谷邦秋、池田研二、小山俊一、岩本俊彦、高崎優 : Alzheimer 病の神経原線維変化における 14-3-3 蛋白および Isoform の免疫組織化学的検討. 第 44 回日本神経病理学会総会 学術研究会, 名古屋, (2003. 5. 31) [Neuropathology 23(2003)S258]
- 内原俊記、中村綾子、中山宏、有馬邦正、石塚典生、森啓、水嶋節雄 : 三重免疫蛍光染色した cotton wool plaque の三次元再構築像の観察. 第 44 回日本神経病理学会総会 学術研究会, 名古屋, (2003. 5. 31) [Neuropathology 23(2003)S259]
- 内原俊記、前田淳子、中村綾子、Fraser P, Hyslop SG : ラット小脳・脊髄形成過程におけるプレセニリン NTF, CTF 発現の変化. 第 44 回日本神経病理学会総会 学術研究会, 名古屋, (2003. 5. 31) [Neuropathology 23(2003)S268]
- 織茂智之、網野猛志、田中宏明、伊藤嘉憲、高橋敦、土谷邦秋 : Lewy 小体病では心臓交感神経が障害され心臓の MIBG 集積が低下する. 第 100 回日本内科学会講演会, 福岡, (2003. 4. 3)
- 小林高義、武田嘉恵、内原俊記、遠藤太嘉志、石川欽也 : 進行性の筋萎縮、球麻痺を呈した核内封入体を伴った特異な脊髄小脳変性症の一剖検例. 第 165 回日本神経学会関東地方会, 東京, (2003. 6. 7)
- 網野猛志、織茂智之、伊藤嘉憲、高橋敦、内原俊記 : パーキンソン病(PD)の心臓 MIBG 集積低下に関する病理学的検討. Parkinson's disease forum, 舞浜, (2003. 8. 30)
- 織茂智之、金澤俊郎、網野猛志、古城徹、内原俊記、若林孝一、高橋均 : パーキンソン病初期にみられる心臓の MIBG 集積低下の責任病巣- Incidental Lewy body disease における検討-. Parkinson disease forum, 舞浜, (2003. 8. 30)
- 遠藤太嘉志、広川勝いく、黒岩俊彦、内原俊記、小林高義、武田嘉恵、春日孟、石川欽也 : SCA1 遺伝子に軽度の延長を認めた脊髄小脳変性症の一例. 第 75 回関東臨床神経病理懇話会, 東京, (2003. 7. 26)
- 内原俊記、池田研二、土谷邦秋 : ピック小体内のタウエピトープの三次元的観察. 第 22 回日本痴呆学会, 東京, (2003. 10. 4) [Dementia Japan, 17(2003)174]

Uchihara T, Iwabuchi K, Nagaoka U, Funata N, Konno H, Tobita M, Kato T, Yagishita S. Attenuated shrinkage of pontine neurons with nuclear aggregates in SCA1, SCA2, MJD, and DRPLA. XVth congress of the international society of neuropathology, Turin, (2003. 9.16) [Brain Pathol (2003)S74]

内原俊記、池田研二、土谷邦秋：ピック小体病とピック症候群（シンポジウム：神経変性疾患の病理診断基準とその問題点）。第44回日本神経病理学会学術研究会総会，名古屋，(2003. 5.30) [Neuropathology 23(2003)S36]

内原俊記：神経変性における核内封入体の役割-剖検脳にみられる共通性-。第26回神経研シンポジウム，東京，(2003. 10.31)

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学研究事業）
神経変性疾患に関する研究班
（分担）研究報告書

アルツハイマー病モデルマウス (Tg 2576) の表現型に対し慢性酸化ストレスが及ぼす影響

（分担）研究者 横田隆徳
東京医科歯科大学大学院脳神経機能病態

研究要旨 変異 APP トランスジェニックマウス (Tg2576) と中枢神経系に酸化ストレスのかかったモデルマウスである α -tocopherol transfer protein (α TTP) ノックアウトマウスとをかけた結果、行動解析上 Tg2576 におけるアルツハイマー病の学習記憶能力障害の発症もしくは増悪の機序に慢性酸化ストレスが関与することが示唆された。今後、生化学的、病理学的解析による確認を進める予定である。

A. 研究目的

変異 APP トランスジェニックマウス (Tg2576) と中枢神経系に酸化ストレスのかかったモデルマウスである α -tocopherol transfer protein (α TTP) ノックアウトマウスとをかけたことにより、老人斑の出現・A β 蛋白蓄積などの Tg 2576 の表現型に及ぼす影響を検索する。アルツハイマー病の病態生理における酸化ストレスの及ぼす影響を明らかにするとともに、海馬の神経細胞死が明らかにより良いアルツハイマー病のモデルマウスの完成を期待する。

B. 研究方法

α TTP ノックアウトマウスと Tg 2576 を自然交配させ、(APP hetero) \times (α TTP KO)、(APP hetero) \times (α TTP WT)、(APP WT) \times (α TTP KO)、(APP WT) \times (α TTP WT) の 4 種の遺伝子型の産仔を得る。

(APP hetero) \times (α TTP KO) ビタミン E 欠乏食群、(APP hetero) \times (α TTP WT) 正常食群、(APP WT) \times (α TTP WT) 正常食群の表現型の解析として、4 ヶ月齢オスマウスでモリス型水迷路試験を用いた学習記憶能力を解析する。

C. 研究結果

Hidden platform test では (APP hetero) \times (TTP WT) 正常食群に比し (APP hetero) \times (TTP KO) ビタミン E 欠乏食群は platform 到達潜時が長かった。引き続いて行った transfer test での annulus crossing index [= (ターゲットクアドラントの platform 位置の通過回数) - (他の 3 つのクアドラントの platform 位置の通過回数の平均)] も低値であった。最後に行った visible platform test では各群で運動能力、視力や動機づけに差がないことが確認された。これは、(APP hetero) \times (α TTP KO) ビタミン E 欠乏食群、(APP hetero) \times (α TTP WT) 正常食群、(APP WT) \times (α TTP WT) 正常食群の順で学習記憶能力が劣っている傾向を示唆する。

D. 考察

大脳に慢性酸化ストレスがかかっている状態では Tg 2576 の学習記憶能力がより低下する可能性がある。今後、海馬や大脳新皮質で老人斑がより多く形成されているか、大脳組織中の A β 42/40 の量がより増大しているか、Tg 2576 では認めえなかった神経原線維変化の形成や海馬の明らかな神経細胞死をきたしているか、などの確認を進めていく予定である。

E. 結論

行動解析により Tg 2576 の学習記憶能力障害の発症もしくは増悪の機序に慢性酸化ストレスが関与することが示唆された。今後さらに生化学的、病理学的検索を加え、酸化ストレスが Tg 2576 の表現型に及ぼす影響を検索したい。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 横田隆徳、水澤英洋. α tocopherol 転移タンパク遺伝子欠損マウスにおける遅発性運動失調症。

Clin Neurosci 2003; 21(2):177-179.

2) 横田隆徳. 内科疾患に伴う神経症状。ビタミン欠乏症。内科 2003;91(4):687-690.

3) 横田隆徳. 家族性特発性ビタミン E 欠乏症の発見と発症機序解明及び治療法の確立。ビタミン 2003;77(4):211-212.

2. 学会発表

なし。

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 2. なし

3. その他、2003年6月 横田隆徳、
日本ビタミン学会 学会賞受賞

厚生労働研究費補助金（長寿科学総合事業）
分担研究報告書

α トコフェロール転送蛋白質（ α -TTP）の肝細胞内でのビタミンE輸送機構の解明

分担研究者 新井洋由 東京大学大学院薬学系研究科 教授

ビタミンEは、小腸から吸収され、キロミクロンに結合してリンパ管を経て一旦肝臓に取り込まれる。その後、肝臓から再び超低密度リポ蛋白質（VLDL）に結合して血液中に再分泌され、血液中をリポ蛋白質が循環中にビタミンEは各組織へと供給されていく。 α -トコフェロール輸送蛋白質（ α -TTP）は肝臓に取り込まれたビタミンEを積極的に血液中に再分泌することで、生体内のビタミンEレベルを維持している。しかし、肝細胞内において、どのようにして α -TTPはビタミンEを再分泌しているのかについてはほとんど分かっていない。本研究では通常は細胞質に存在する α -TTPが、酸性コンパートメントである後期エンドソームの内腔側pHが中性化すると、後期エンドソーム膜に局在化するという非興味深い現象を見出し、さらに、この局在化には α -TTPのN末端から21~50番目までの極性アミノ酸に富んだ領域が必要であることが明らかになった。この現象は、エンドサイトーシスによって肝細胞内に取り込まれたビタミンEを酸性コンパートメントから α -TTPへと受け渡す過程を一過的に静止させた状態を見ているものと考えている。

A. 研究目的

ビタミンE（別名 α -トコフェロール）は、生体内の主要な脂溶性抗酸化物質で、生体にとって必須な栄養素である。ビタミンEは、主に生体膜やリポ蛋白質に存在し、これらが活性酸素等の攻撃を受けた際に生じる脂質ラジカルからラジカルを引き抜くことで、生体膜やリポ蛋白質の過酸化を防いでいる。食餌より摂取されたビタミンEは、小腸から吸収され、キロミクロンに結合してリンパ管を経て一旦肝臓に取り込まれる。その後、肝臓から再び超低密度リポ蛋白質（VLDL）に結合して血液中に再分泌され、血液中をリポ蛋白質が循環中にビタミンEは各組織へと供給されていく。

一方、我々は、ラット肝臓の可溶性画分にビタミンEと特異的に結合し、その膜間輸送を促進する活性を見出していた。更に、1993年、この因子の精製、クローニングに成功し、その結果278個のアミノ酸からなる分子量約30kDaの蛋白質であることを明らかにし、これを α -トコフェロール輸送蛋白質（ α -Tocopherol Transfer Protein； α -TTP）と命名した。また、 α -TTPの臓器分布を調べたところ、肝臓に非常に高い発現がみられ、その他の臓器にはほとんど発現していないことが分かった。

1995年、我々はヒト α -TTPのクローニングを行い、 α -TTPが先天性ビタミンE欠乏症（ataxia with isolated vitamin E deficiency；AVED）の原因遺伝子であることを初めて明らかにした。AVEDの患者では、血中ビタミンE値が健常人の1/10以下で、神経や筋肉組織に異常を生じ、歩行失調、反射消失、感覚異常、筋力低下などの症状が現れる。これら欠損者の解析から、

α -TTPは肝臓に取り込まれたビタミンEを積極的に血液中に再分泌することで、生体内のビタミンEレベルを維持していると考えられた。

このように α -TTPの個体レベルでの機能は明らかになっていたが、肝細胞内において、どのようにして α -TTPはビタミンEを再分泌しているのか、という疑問が残されていた。 α -TTPは肝臓に発現している蛋白質であるが、HepG2やMcARH7777などの肝細胞のモデルとしてよく使われている肝癌細胞株には α -TTPは発現していない。そこで、我々は、McARH7777細胞に α -TTPを恒常的に、実際の肝細胞と同程度に発現させた細胞株（以下McA-TTP細胞）を樹立し、肝細胞での α -TTPの機能について解析してきた。これまでに、 α -TTPを発現していないMcARH7777細胞では、細胞内に取り込ませたビタミンEの多くは細胞内に留まっているのに対し、 α -TTPを発現させたMcA-TTP細胞では、細胞内に取り込ませたビタミンEの多くが細胞外に放出されることが分かった。これにより、 α -TTPが肝細胞に取り込まれたビタミンEを再び血液中に分泌することで、体内のビタミンE量を規定していることが実証された。我々は、この系を用いて、 α -TTPによるビタミンE放出に対する様々な薬物の影響を調べたところ、クロロキシンという薬物で有意に阻害されることが分かった。クロロキシンは、疎水性アミンで細胞内の酸性コンパートメントに蓄積し、その内腔側の酸性pHを中性化することが知られている。更に、McA-TTP細胞において通常は細胞質に存在している α -TTPの局在が、クロロキシン処理すると顆粒状に変化すること、およびクロロキシンを除去すると再び細胞質に一樣に分布

することから、この α -TTPの局在化が可逆的であることを見出していた。

α -TTP が肝細胞において細胞質に存在する蛋白質でありながら、ビタミン E を細胞外に放出するには、何らかの因子との相互作用が必要であると考えられる。我々は、クロロキン処理による α -TTP の局在化の現象は、そのような因子の存在を示唆しており、 α -TTP を介するビタミン E 輸送機構を知るための手がかりとなりうると考えた。そこで我々は、このクロロキン処理による α -TTP の局在化現象について更に解析をした。

B. 研究方法

1. [3H] ビタミンE含有リポソームの作製
以下のように試薬をロータリーエバポレーターでとばして、lipid film を作製する。

eggPC : 750nmol DCP : 75nmol BHT : 40nmol
[3H] ビタミンE(1.5Ci/mmol) [14C] トリグリセリド (112mCi/mmol) 2) SET buffer を加え vortex し、Branson Sonifier で超音波処理する。10,000xg で10分間遠心し、その上清をリポソーム液として以下の実験に用いる。

2. キメラ蛋白質のビタミンE結合能の測定
pcDNA3/myc キメラ蛋白質 (or α -TTP、CRALBP) をMcARH7777細胞にトランスフェクションし、48時間培養して蛋白質を発現させる。細胞を回収してPBSにsuspendし、Branson Sonifier で超音波処理した後、100,000xg で1時間遠心する。その上清を上記のリポソーム20 μ l と混ぜ、37 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベーションする。10,000xg で20分間遠心し、上清 (200 μ l) をゲル濾過カラム Superose12 HR10/30 にかける。各フラクションをSDS-PAGE にかける、western blotting を行う。残りは液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定する。

3. マウスの飼育
マウス Jcl : ICR (雄、5週令 (体重約30g)) に、食餌として滅菌済CE2 を与えて、昼・夜12時間周期で飼育した。

4. クロロキンの経口投与
100mg/ml クロロキン in H₂O を作製し、午前10時にマウスの口に胃チューブを挿入し、吐き出さないように 300mg/kg weight になるように投与する。コントロール群には同量 (約 100 μ l 程度) の H₂O を経口投与した。この後、6時間絶食してから、血清中のビタミンE量、コレステロール量を測定する。

5. 血清中ビタミンE (α -トコフェロール) 濃度の測定

午前10時に絶食 (水のみ与える) したマウスを、6時間後に採血する。回収した血液は、3000rpm、4 $^{\circ}$ C、15分間遠心し、その上清 (血清) を回収後、窒素置換して測定まで-20 $^{\circ}$ Cで遮光保存する。血

清 50 μ l に 950 μ l の phosphate buffer (124mM NaCl、27mM EDTA \cdot 2Na、10mM NaHPO₄) を加えた後、6%ピロガロール in EtOH 1ml 及び内標準物質として PMC 50ng を加えて混合する。その他に血清の代わりにビタミンE (d- α -トコフェロール) を 50、100、250ng 加えた混合液を検量線用に作製する。60% KOH in H₂O を加え、70 $^{\circ}$ Cで30分間けん化する。氷水で急冷した後、n-hexane、H₂O を加えて混合する。3000rpm、室温、5分間遠心し、n-hexane 層 (上層) を回収する。エバポレーションした後、EtOH に溶かして HPLC で解析した

6. 血清中コレステロール濃度の測定
血清中コレステロール量の測定にはコレステロールC-テストキットを用いた。前述の血清 10 μ l をPBS 90 μ l と混合する。これに発色液を200 μ l 加えて混合し、37 $^{\circ}$ Cで15分間静置した後、OD505nm を測定する。

7. CHO-K1 細胞の培養
CHO-K1 細胞は、Ham-F12 に 10% FCS、10units/ml ペニシリン、100 μ g/ml ストレプトマイシン、2mM L-glutamine を加えた培地で培養した。

8. テトラサイクリン-off システムを用いた α -TTPの発現誘導細胞の樹立
CHO-K1 細胞にリポフェクトアミンを用いて (pT2/ α -TTP) をトランスフェクションを行った。細胞を PBS で 3回 wash し、medium を Ham-F12 10% FCS + 1 μ g/ml テトラサイクリンに change する。48時間後に細胞を10cmシャーレ x 2 枚にまき直す。この時 medium は、Ham-F12 10% FCS + 700 μ g/ml ハイグロマイシン、1 μ g/ml テトラサイクリンに change する。2~3日おきに medium change を行い、2週間培養し、薬剤耐性コロニーを単離する。薬剤耐性コロニーを 96well プレートにまき直し、シングルコロニーのうちテトラサイクリンを培地より除去したときに、 α -TTPの発現が誘導されてくるコロニーを免疫蛍光染色、およびウェスタンブロット法によりスクリーニングした。得られたコロニーは以降 Ham-F12 10% FCS + 200 μ g/ml ハイグロマイシン、1 μ g/ml テトラサイクリンで培養する。

8. アデノウイルスを用いた α -TTPの発現系
アデノウイルス DNA の 1~9 mu の領域を CMV プロモーターと α -TTPを組み込む。このウイルスを HEK293 細胞に感染させ、増殖させる。HEK293 細胞を回収し、-80 $^{\circ}$ Cと37 $^{\circ}$ Cに交互に20分ずつ静置する。これを繰り返し、細胞を破壊する。CsClで遠心して得られたウイルスを、Econo Pac 10DG chromatography column で精製する。

C. 研究結果

1. α -TTPの後期エンドソームへの局在化と局在化に必要なドメインの解析

これまでに我々は、McA-TTP細胞において、通常は細胞質に一樣に分布している α -TTPが、クロロキン処理により顆粒状にその局在が変化することを見出していた。そこで、この現象が α -TTPを介するビタミンE輸送機構を知る手がかりになると考え、更に解析を進めることにした。まず、この現象が実際の肝細胞でも起こりうるかどうかの検討を試み、また、 α -TTPの局在化部位が細胞内のどのオルガネラなのかについて検討した。

α -TTPは278個のアミノ酸からなり、その真ん中付近の約140アミノ酸がビタミンEとの結合ドメインであると考えられている。そこで我々は、脂質結合ドメイン以外の部位に局在化の領域があると考え、N末端あるいはC末端付近をdeletionしたコンストラクトを作製したが、ほとんどの場合安定に発現しなかった。次にキメラ蛋白質による方法を試みた。 α -TTPの属する脂質結合蛋白質ファミリーの中でも、CRALBPは α -TTPと最も高いホモロジー(約37%)を有する。そこで、CRALBPをMcARH7777細胞に一過性に発現させ、クロロキン処理した時の局在を調べた。その結果、CRALBPはクロロキン処理しても細胞質が一樣に染色されており、局在化は全く見られなかった。

そこで、 α -TTPとCRALBPとのキメラ蛋白質を作製し、後期エンドソームへの局在化に必要なドメインについて解析することにした。キメラ蛋白質の作製に際し、Sec14pの結晶構造解析の結果を参考にして α -TTPとCRALBPの高次構造を予測し、できるだけ α -helixや β -sheetの切れ目で α -TTPとCRALBPをつなぎ合わせるようにした。いくつか作製したキメラ蛋白質のうち、 α -TTPのN末端から21アミノ酸をCRALBPのN末端部分に置き換えたCT1と、 α -TTPのN末端から50アミノ酸をCRALBPに置き換えたCT6は細胞内で安定に発現していた。

まず、これらのビタミンE結合能について検討した。〔3H〕ビタミンE および〔14C〕トリグリセリドを組み込んだリポソームを作製し、これを各蛋白質を発現させたMcARH7777細胞のS100と混ぜ、ゲル濾過カラムSuperose12にかけた。 α -TTPをリポソームと混ぜると、ポイド画分に回収されるリポソームに残ったビタミンE以外に、 α -TTPの溶出位置に3Hラベルのピークが見られた。一方、CT6とリポソームを混ぜた場合も、 α -TTPとほぼ同様にCT6の溶出位置に3Hラベルのピークが見られた。また、結果には示していないが、どちらの場合も14Cのピークはポイド画分にのみ見られ、蛋白質の溶出位置にはピー

クは全く見られなかった。このことから、 α -TTPのN末端から50アミノ酸をCRALBPに置き換えたCT6は、 α -TTPとほぼ同様にビタミンE結合能を有することが明らかになった。

次にキメラ蛋白質のクロロキン処理による局在について検討した。McARH7777細胞に一過性に発現させ、クロロキン処理したところ、CT1では α -TTPと同様局在化がはっきりと見られるのに対し、CT6では細胞質が一樣に染色され、局在化は見られなかった。

このような結果から、 α -TTPのN末端から21番目から50番目までのドメインが、後期エンドソームへの局在化に必要なことが示唆された。

これまでに α -TTPのN末端側のドメインは機能が不明であったが、今回の結果からオルガネラへのターゲティングに関与している可能性が示唆された。この領域とそのすぐC末端側のアミノ酸配列を α -TTPとCRALBPで比較してみた。この領域のすぐC末端側はCRALBPと非常に高いホモロジーを示すのとは対称的に、この領域はほとんどホモロジーが見られなかった。 α -TTPのこの領域には、アルギニンやグルタミン酸といった極性の高いアミノ酸やプロリンに比較的富んでいるという特徴が見られる。このような特徴は種間でも保存されており、これらのアミノ酸が局在化に関係している可能性が考えられる。

Sec14pの結晶構造解析の結果から、 β -sheetの繰り返し構造の周りを α -helixが包み込むカゴのような構造が、リガンドとの結合部分であると考えられている。今回明らかになった局在化に必要なドメインは、 α -helix構造をとり、カゴの外側に位置していると予想される。

また、すぐC末端側のホモロジーの高い領域は、極性アミノ酸と非極性アミノ酸が交互に並んでおり、このような配列は脂質二重膜に埋まる性質がある。ここからは推測にすぎないが、 α -TTPは局在化に必要なドメインで後期エンドソームへとターゲティングし、そのすぐC末端側の領域が膜に埋まってビタミンEを受け取っている可能性が考えられる。

2. in vivo におけるクロロキンの血中ビタミンEレベルへの影響

これまでの検討により、クロロキンは培養肝細胞レベルで、 α -TTPを介するビタミンEの放出を阻害すること、およびその際に、通常は細胞質に存在している α -TTPが後期エンドソームへと局在化していることが分かってきた。そこで次に、クロロキンのin vivo における血中ビタミンEレベルへの影響について検討を試みた。

絶食6時間後の血清中のビタミンEレベルは、コントロール群が $732.8 \pm 47.8 \mu\text{g/ml}$ であるのに対し、300mg/kg weight のクロロキン投与群では $345.6 \pm 30.5 \mu\text{g/ml}$ であった。この結果から、

クロロキン投与群ではコントロール群に比べて、血清中のビタミンEレベルは約50%にまで低下していることが明らかになった。

先に述べたように、ビタミンEは血液中をリポ蛋白質に結合して循環している。1つの可能性として、クロロキンがリポ蛋白質レベルを変動させた結果、ビタミンEレベルが変動した可能性が考えられた。そこで次に、クロロキンの血清リポ蛋白質への影響についても同時に検討し、クロロキンの効果がビタミンEに選択的であるかを検討した。血清中のリポ蛋白質レベルの指標となるコレステロール量について測定した。その結果、血清中のコレステロールレベルはコントロール群が $195.4 \pm 10.2 \text{ mg/dl}$ であるのに対し、クロロキン投与群では $162.2 \pm 8.9 \text{ mg/dl}$ であった。このように、コレステロールレベルはクロロキン投与により約90%にしか低下しておらず、こちらの値はビタミンEほど影響を受けないことが分かった。

以上のような結果から、クロロキンは血清中のビタミンEレベルを選択的に低下させることが明らかになり、おそらく *in vivo* においても α -TTPの機能を阻害している可能性が示唆された。

3. 非肝細胞への α -TTPの強制発現とその作用についての解析

α -TTPは肝臓に特異的に発現している蛋白質である。肝臓はリポ蛋白質代謝の中核臓器であり、リポ蛋白質の取り込みや、合成、分泌が非常に盛んな臓器である。肝臓には、効率よくビタミンEを輸送、放出するために、 α -TTPの関与する特別な機構が備わっているのかもしれない。肝細胞と非肝臓系細胞を比較して解析した。そこで、非肝臓系細胞で α -TTPを恒常的に発現する細胞を樹立して、肝細胞における α -TTPの局在化という現象が、他の非肝臓系の細胞でも起こりうるかを調べることにした。

まず、非肝臓系の細胞株である CHO 細胞で、 α -TTPの恒常的な過剰発現株の樹立を試みた。しかし、そのような細胞株は全く得られず、非肝臓系の細胞株では、 α -TTPの過剰発現は細胞の生育に有害である可能性が考えられた。次に、目的とする遺伝子の発現を条件的に誘導できるテトラサイクリン-off システムを用いることにした。テトラサイクリン除去により応答配列 (TRE) に結合できるようになる転写因子 tTA を発現させる plasmid (pTA-Hyg) と、tTA が結合する応答配列 (TRE) の下流に α -TTPを組み込んだ plasmid (pT2/ α -TTP) を CHO 細胞に導入する。このような CHO 細胞において、テトラサイクリン存在下では tTA はテトラサイクリンと結合しており、応答配列 TRE には結合できない。しかし、テトラサイクリン除去により、応答配列 TRE に結合できるようになり、 α -TTPの発現誘導が可能になる。

実際の遺伝子導入の際には、pT2/ α -TTP : pTA-Hyg = 10 : 1 の割合で混ぜ合わせ、トランスフェクションを行った。最終的に3つのクローンを単離したが、以下はそのうちの代表的なクローン (A-14) の結果を示す。

得られた CHO 細胞でテトラサイクリン存在下、あるいは非存在下での α -TTPの発現を western blotting によって調べた。その結果、テトラサイクリン存在下では α -TTPの発現は全く見られないが、テトラサイクリン除去により α -TTPの条件的な発現が見られた。

テトラサイクリンを除去して α -TTPの発現を誘導し、クロロキンで処理した時の α -TTPの局在を調べた。その結果、CHO 細胞では α -TTPは細胞質に一様に分布しており、McA-TTP細胞で見られたような局在化は全く観察されなかった。そこで次に、アデノウィルスを用いて CHO 細胞、あるいは McARH7777 細胞に α -TTPを発現させてクロロキン処理したところ、やはり McARH7777 細胞では局在化が見られるものの、CHO 細胞では見られなかった。そこで、このアデノウィルスによる α -TTPの発現系を用いて、他の非肝臓系細胞株であるヒト子宮癌上皮細胞由来の HeLa 細胞でも検討したところ、局在化は全く見られなかった。またデータは示していないが L cell、COS-7 といった細胞株でも局在化は全く見られなかった。これらのことから、 α -TTPの局在化という現象は肝臓に特異的であることが示唆された。始めに述べたように、肝臓はリポ蛋白質代謝が非常に盛んな臓器であり、ビタミンEの取り込みや分泌も積極的に行われている。肝臓に取り込まれたビタミンEが効率よくリポ蛋白質へとリサイクリングされるには、 α -TTPの関する特別なビタミンE輸送機構が必要なのだろうと考えられる。後期エンドソーム膜上に想定される α -TTPのターゲット分子が、そのような肝臓特異的なビタミンE輸送機構に関わる因子の1つなのではないかと考えられる。

ところで、 α -TTPの発現を誘導した CHO 細胞では、48 時間後には予期せぬことに細胞の形態が著しく細長く変化することを見出した。また、同時に細胞内に多数の空胞が出現している様子が見られる。更に細胞増殖速度も著しく低下していた。このような現象は、同程度に α -TTPを発現している肝臓系の McA-TTP細胞では全く観察されなかった。このように、非肝臓系の CHO 細胞に α -TTPを強制発現させると形態変化を引き起こすことが明らかになった。

α -TTPという1つの可溶性蛋白質を CHO 細胞に強制発現させただけで形態変化が引き起こされるという現象は、全く予期せぬことであった。そこで、この現象について更に解析を加えることにした。CHO 細胞に α -TTPを一過性に発現さ

せ、48 時間後に免疫蛍光染色を行うと、テトラサイクリン-off システムで見られたのと同様の形態変化が観察された。そこで、作製したキメラ蛋白質を用いて、CHO 細胞の形態変化には α -TTPのどのドメインが必要か検討した。CRALBP はCHO 細胞に発現させても、 α -TTPのように細胞が細長く変化はしなかった。ただ、細胞の形がやや角張っており、また発現量の多い細胞は丸くなってしまっている様子が観察された。もしかしたら、 α -TTPの属する脂質結合蛋白質ファミリーは、もともとその蛋白質を発現している臓器以外の細胞に発現させると、何らかの細胞毒性を発揮するのかもしれない。 α -TTP の N 末端側21アミノ酸を CRALBP に置き換えたキメラ蛋白質 CT1、50アミノ酸を置き換えたCT6 では、 α -TTPと同様 CHO 細胞の形態が著しく細長く変化している様子が観察された。

以上の結果から、 α -TTP の強制発現によるCHO 細胞の形態変化には、 α -TTP の N 末端側 50 アミノ酸は必要でないことが示唆された。形態変化には、オルガネラへのターゲティングとは異なり、むしろ脂質結合領域のほうが必要なのかもしれない。

次に、形態変化に対し α -TTPのリガンドであるビタミンEの影響について調べた。テトラサイクリン除去による α -TTPの発現誘導と同時に、培地中に 50 μ M のビタミンEを添加し、48 時間培養した。その結果、ビタミンE の添加により、 α -TTPの発現量は同程度であるにも関わらず、 α -TTPによる形態変化は全く起こらないことが明らかになった。一方で、 α -TTPのリガンドでないコレステロールを同様に培地に添加しても、形態変化の抑制は全く観察されなかった。ビタミンEは生体内の主要な脂溶性抗酸化物質である。1つの可能性として、 α -TTPが CHO 細胞内のビタミンEを細胞外に放出してしまい、細胞内の脂溶性抗酸化物質が枯渇したことにより、形態変化が引き起こされた可能性が考えられる。そこで、ビタミンEと同等の抗酸化作用を示すBHT を培地に添加してみた。しかし、BHT ではビタミンEのような形態変化の抑制は全く観察されなかった (Fig.4-9)。また、BHT 以外にもBO-653 やプロブコールといった脂溶性抗酸化剤でも形態変化の抑制は全く観察されなかった。

これらの結果から、 α -TTPの強制発現によるCHO 細胞の形態変化は、単に α -TTPがビタミンEを放出して細胞内の脂溶性抗酸化物質が枯渇したために起こる現象ではないことが示唆された。おそらく、CHO 細胞に α -TTPを強制発現させると、ビタミンEを結合していない α -TTPが、細胞内の他の脂質や蛋白質と結合してしまったために細胞毒性が現れ、形態変化が引き起こされたのではないかと考えられる。

D. 考察

α -TTPと同じ脂質結合蛋白質ファミリーに属する蛋白質のうち、CRALBPは後期エンドソームへの局在化が起こらないことが明らかになった。また、SPFでも局在化が見られないことから、後期エンドソームへの局在化という現象は α -TTPに特異的であるといえる。更に、この局在化には α -TTPのN末端から21番目から50番目までのアミノ酸配列が必要であることが示唆された。この領域は立体構造上はビタミンEとの結合に必要な領域の外側に存在していると予想され、後期エンドソーム上のターゲット分子との結合に必要なのかもしれない。今後、この領域を手がかりとして、結合作用する分子の検索が期待される。

また、培養肝細胞レベルにおいて、キメラ蛋白質CT6は、細胞内に取り込ませたビタミンEを細胞外に放出する活性は持っていた。培養肝細胞の系では、実際の肝細胞のようにエンドサイトーシスによってではなく、おそらく形質膜を介してビタミンEが取り込まれていると考えられる。そのようにして取り込まれたビタミンEは、CT6によっても細胞外に放出することが可能なようである。培養肝細胞でもエンドサイトーシスによってビタミンEを細胞に取り込ませる系を確立できれば、 α -TTPとCT6でビタミンEの輸送に違いが見られる可能性が考えられる。 α -TTPの属する脂質結合蛋白質ファミリーにおいて、このN末端側の部分はほとんどホモロジーのない領域である。CT6とは逆にCRALBPのN末端を α -TTPのN末50アミノ酸に置き換えたキメラ蛋白質 (TC6) は安定に発現しなかった。SPFなどに α -TTPのN末50アミノ酸をくっつけたキメラ蛋白質でも、局在化が見られるかどうか試す必要がある。

今回、300mg/kg weight のクロロキン投与により血清中のビタミンEレベルが約50%に低下することを見出した。クロロキンには *in vitro* のコレステロール合成阻害作用も知られており、血清中のリポ蛋白質レベルに影響を与えている可能性が考えられた。しかし、血清中のリポ蛋白質レベル (コレステロールレベル) はビタミンEレベルほど影響を受けていなかった。このことから、クロロキンは血清中のリポ蛋白質レベルにはほとんど影響せず、ビタミンEレベルに選択的に影響を及ぼしていることが分かった。これまで、培養肝細胞ではクロロキンがビタミンEの放出を有意に阻害することが明らかになっていた。今回初めて *in vivo* でもクロロキンは肝細胞からのビタミンE放出を阻害している可能性が示唆された。クロロキン処理により、培養肝細胞でみられたような α -TTPの後期エンドソームへの局在化が肝臓内でも起こることによって、 α -TTPがビタミンEを血液中へと放出できなくなっている可能性が考

えられる。クロロキンは抗マラリア薬として古くから汎用されてきている薬物である。しかし、これまでにクロロキンは血中のビタミンEレベルを低下させようという報告はなく、今回が初めてである。今回用いたクロロキンは、マラリア患者に投与する量よりもかなり多量ではある。しかし、マラリアが多発する地域の多くは発展途上国であり、栄養状態の悪い患者が多い。このような環境下でのマラリア患者へのクロロキンの投与の際には、ビタミンEの補充療法も平行して行う必要があるのかもしれない。

今回、肝細胞で見られた α -TTPの局在化という現象が、非肝臓系のCHO細胞やHeLa細胞では起こらないことを見出した。肝臓の後期エンドソーム膜上には何らかの特異的な α -TTPの受容体が存在するものと思われる。肝臓と、非肝臓系の後期エンドソームの膜蛋白質を比較していくことで、この受容体のある程度絞り込むことができるものと考えている。また、ヒトの肝臓由来細胞であるHepG2細胞にアデノウィルスを用いて α -TTPを発現させても、クロロキン処理による局在化は見られなかった。HepG2細胞はMcARH7777細胞に比べてリポ蛋白質分泌能が低下しており、より脱分化がすすんだ細胞株のようである。 α -TTPの受容体は分化依存的に発現している蛋白質で、HepG2細胞には発現していない可能性が考えられる。更に、予期せぬことにテトラサイクリン除去により α -TTPを強制発現させたCHO細胞では、形態変化が観察された。この現象はHeLa細胞でも観察されたが、肝臓由来のMcARH7777細胞では観察されなかった。このような形態変化が起きたために、クロロキン処理しても局在化が起こらない可能性も考えられる。しかし、局在化は α -TTPの発現開始から24時間程度で観察されるのに対し、形態変化は48時間ほど経過しないと観察されない。このように形態変化が起こる前でも局在化は見られないことから、そのような可能性はないものと考えている。

このCHO細胞の形態変化という現象に対して、我々は現在以下のような2つの仮説を考えている。1つめの仮説は以下のとおりである。肝細胞では、エンドサイトーシスによって取り込まれたビタミンEが、後期エンドソーム膜上に想定される受容体を介して効率よく α -TTPに受け渡されている。一方、非肝臓系のCHO細胞には、この想定される受容体が存在しないため、エンドサイトーシスされたり蛋白質からの効率よいビタミンEの α -TTPへの受け渡しができないと考えられる。CHO細胞に α -TTPを強制発現させると、ビタミンEと結合していない α -TTPが他の脂質や蛋白質と結合してしまったために、細胞の形態変化が引き起こされたものと考えられ

る。従って、CHO細胞でも後期エンドソーム膜上の受容体があれば、 α -TTPにビタミンEが効率よく受け渡されるようになり細胞毒性が抑制されると想定される。後期エンドソーム膜上に想定される受容体の同定が今後の大きな課題であるが、このCHO細胞の形態変化を指標にして、肝臓由来の遺伝子をCHO細胞に導入することにより、形態変化を起さなくするような遺伝子をスクリーニングしていけば、この因子を同定できる可能性があると考えている。もう1つの仮説は以下のとおりである。肝臓ではビタミンE欠乏状態でも細胞の形態変化が生じる、というような現象は今までのところ知られていない。もしかすると、肝細胞には、ビタミンEと結合していない α -TTPと相互作用して安定化させることができる因子が存在している可能性が考えられる。このような因子も、前述の肝臓の遺伝子導入によって同定できる可能性が考えられる。

E. 結論

α -TTPは主に肝臓に発現しており、血液中から肝臓に取り込まれたビタミンEを再び血液中に分泌する過程に関与することが分かっている。ビタミンEを含む血漿リポ蛋白質が肝細胞にエンドサイトーシスされ、さらに後期エンドソームやライソソームといった酸性コンパートメントで分解された後、遊離したビタミンEが細胞質に存在する α -TTPへと受け渡される。その後、肝細胞内の何らかの輸送機構によって α -TTPに結合したビタミンEが血中へ分泌されるリポ蛋白質へと受け渡されると考えられるが、これまでのところ、その具体的なメカニズムについてはほとんど分かっていない。これまでに我々は、ラット肝臓癌由来細胞株McARH7777に α -TTPを発現させた細胞株(McA-TTP細胞)を用いて、 α -TTPがビタミンEの肝細胞からの放出を促進すること、この放出が細胞内酸性コンパートメントを中性化するクロロキンで阻害されること、及び、その際に通常は細胞質に一樣に分布している α -TTPが細胞内で局在化することを見出していた。そこで本研究では、 α -TTPの肝細胞内での挙動を解明する上でこの現象に着目し、クロロキン処理による α -TTPの細胞内局在化部位についてさらに検討した。McA-TTP細胞に蛍光標識蛋白質FITC-BSAをエンドサイトーシスさせ、経時的に α -TTPとの二重蛍光染色を行ったところ、エンドサイトーシス開始から4時間程度まではクロロキンによる α -TTPの局在化部位はFITC-BSAとは一致しなかったが、12時間後にはこれらがほぼ完全に一致してきた。こうした結果から、 α -TTPの細胞内局在化部位は後期エンドソームであることを明らかにした。次に α -TTPの後期エンドソームへの局在化の機構について解析したところ、細胞内のATP

を枯渇させると α -TTPの局在化が見られず、この現象がATP依存的であることを示唆した。

次に、 α -TTP分子中における後期エンドソームへの局在化に必要なドメインの同定を試みた。 α -TTP分子を単純にdeletionすると、ほとんどのコンストラクトが不安定になった。そこで、 α -TTPと相同性を持つクロロキン処理による局在化は起こらないレチナール結合蛋白質CRALBPとのキメラ蛋白質を作製して解析を行った。その結果、 α -TTPのN末端から21~50番目までの極性アミノ酸に富んだ領域が必要であることが明らかになった。また、この領域はビタミンEとの結合には必要でないことから、この領域よりもC末端側の疎水性アミノ酸に富んだ領域がビタミンEとの結合に必要なことが明らかになった。

肝細胞レベルでクロロキンが α -TTPを介するビタミンEの放出を阻害することから、クロロキンのin vivoにおける血中ビタミンEレベルへの影響について検討した。クロロキンをマウスに経口投与し、6時間後における血中ビタミンEレベルを測定したところ、正常値に比べて約半分に低下することが明らかになった。

通常 α -TTPを発現していない肝臓系以外の培養細胞で α -TTPの局在化が起こるかを、Tetracyclin-offシステムを用いて α -TTPの発現を条件的に誘導できるCHO細胞株を樹立して解析した。その結果、Tetracyclin除去によりCHO細胞に α -TTPの発現を誘導してクロロキン処理しても α -TTPの局在化は見られず、 α -TTPの局在化は肝細胞に特異的な現象であることが示唆された。更に、予期せぬことに、 α -TTPの発現により細胞の形態が細長く著しく変化することを見出した。このような形態変化は肝細胞系の培養細胞においては、全く観察されなかった。更に、CHO細胞における α -TTPによる形態変化は、リガンドであるビタミンEを培地中に添加することで完全に回復されたが、リガンドでない脂質や別の脂溶性抗酸化剤では回復されず、単に α -TTPがビタミンEを放出して細胞内の脂溶性抗酸化物質が枯渇したために起こる現象ではないことが示唆された。

以上、本研究では通常は細胞質に存在する α -TTPが、酸性コンパートメントである後期エンドソームの内腔側pHが中性化すると、後期エンドソーム膜に局在化するという非常に興味深い現象を見出した。この現象は、エンドサイトーシスによって肝細胞内に取り込まれたビタミンEを酸性コンパートメントから α -TTPへと受け渡す過程を一過的に静止させた状態を見ている可能性も考

えられる。本研究により、この過程における α -TTP分子上のドメインが特定されたことで、後期エンドソーム膜上の標的分子の同定の手がかりになるものと考えられる。また、今回樹立したCHO細胞への肝臓由来の遺伝子導入等の手法で、エンドソーム膜の α -TTPのターゲット分子を単離できる可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) pH-Dependent fluctuation of α -tocopherol transfer protein (α -TTP) between hepatic cytosol and late endosomes

M. Horiguchi, M. Arita, D. E Kaempf-Rotzoll, M. Tsujimoto, K. Inoue and H. Arai
Genes to Cells 8, 789-800 (2003)

2) Vitamin E and transfer proteins.

D.E.Kaempf-Rotzoll, M.G.Traber and H.Arai
Current Opinion in Lipidology (review) 14, 249-254 (2003)

3) Human placental trophoblast cells express α -tocopherol transfer protein.

D.E.Kaempf-Rotzoll, M.Horiguchi, K.Hashiguchi, J.Aoki, H.Tamai, O.Linderkamp and H.Arai
Placenta 24, 439-444 (2003)

2. 学会発表

1) Tatsufumi Hiramatsu, Daisy E. Kaempf-Rotzoll, Takao Inoue, Hiroyuki Arai : Purification of recombinant human α -tocopherol transfer protein (α -TTP) for crystallization 第76回日本生化学会大会、2003.10.18 横浜

2) 平松達史、井上貴雄、高根沢康一、新井洋由： α -tocopherol非存在下での α -TTPの機能解析 第15回ビタミンE研究会、2004.1.23 東京

3) 齊藤尚子、野口範子、清瀬千佳子、植田忠彦、近藤一雄、五十嵐脩、新井洋由：ビタミンE過剰摂取時においてもCYP3Aは誘導されない 第15回ビタミンE研究会、2004.1.23 東京

4) 寺社下浩一、立部貴典、柴田謙人、伊藤恒夫、新井洋由、鈴木宏志：胎盤形成における α -tocopherol transfer proteinと α -tocopherolの役割 第15回ビタミンE研究会、2004.1.23 東京

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

αトコフェロール転送蛋白遺伝子変異による酸化ストレス病態の解明

分担研究者 内原俊記 東京都神経科学総合研究所神経病理

研究要旨

既に報告したαトコフェロール転送蛋白遺伝子ノックアウトマウスをビタミン E (VE) 欠乏状態で飼育することにより、これまでの方法では達成できなかった著しい VE 欠乏状態を個体レベルで達成できる。本年度はこのマウスを先行群 105 匹、後発群 246 匹作製し対照群 180 匹とともに精製飼料による VE 欠乏食、および添加食(50IU/kg)に分けて飼育し観察した。遺伝子改変し、VE 欠乏食にて飼育した群で生後 10-12 週で運動量の低下、後肢の脱力を呈する個体が一部に認められた。その後同様の症状を呈する個体の割合は同群で次第に増加しており、上記症状が VE 欠乏食で遺伝子改変した個体で症状が時間依存的に出現することが示唆される。今回の実験条件では、これまでの欠乏実験に比して症状の発現時期が早く、経時的変化が早いとすれば老化、神経変性のモデルとしてさらに有用なものとなることが期待される。今後飼育群を選別した上で、更に長期の観察を継続する。酸化ストレスが役割を果たすとされる病態のうちで脳虚血、多系統萎縮症があるが、これらの疾患では tau 蛋白が修飾を受け、前者ではミクログリアに後者ではオリゴデンドログリアの Glial cytoplasmic inclusion に沈着することを明らかにした。両疾患では tau2 エピトープに変化が限局していること、免疫原性が界面活性剤の存在下で可逆的に消失すること等が共通しており線維形成には至らない tau 蛋白沈着の初期変化をあらわしている可能性が示唆される。

A.研究目的

酸化ストレスは老化・変性・発癌等広汎な生物学的プロセスに関与していると考えられている。従って酸化ストレスを軽減させることによって、これらの過程を遅延または逆行させることができるのではないかと期待のもとに、数多くの研究成果が積み重ねられてきた。ビタミン E(VE)は知られている生体内抗酸化物質のうちで、その活性が最も強いとされているが、個体内での抗酸化システムの構成と、そのシステム全体において VE がどのような役割を果たしているかについては不明の点も多く、ヒトにおける VE 投与の臨床的効果を統計的に明瞭な形で示した研究は殆ど無い。VE の正常または病態における機能を明らかにして治療に反映させるには、個体レベルでの VE の動態と酸化ストレスの変化を同時に観察することが必須である。実験動物の飼料中から VE を除去することで相対的 VE 欠乏状態を作りその結果を観察した研究は多いが、期待される程に激的な病変を呈したという報告は意外に乏しい。共同研究者の新井、寺社下らは VE の正常代謝の大部分に関与する *α-tocopherol transfer protein* (α TTP)に注目し、その欠損マウスを作製した。このマウスでは従来 VE 欠乏飼料でえられたよりも激しい VE 欠乏

状態を個体レベルで実現することができ、その一部の所見について少数例における結果を既に我々は報告した。本研究では α TTP 遺伝子および産物と VE の動態をさらに多数の個体でさらに詳細に観察し、少数例の検討ではえられなかった包括的情報を得ることを目標としている。また、並行して細胞や組織レベルで酸化ストレス病態を解明し、その制御を通したより合理的な治療法の開発を最終的な目標とする。本年度は以下の点について検討を行った

- a. α TTP 遺伝子改変個体の飼育、観察
- b. 脳梗塞、多系統萎縮症における tau2 エピトープの可逆的变化

B.研究方法

a. α TTP 遺伝子改変個体の飼育、観察
多数の α TTP 遺伝子ノックアウト個体をほぼ同時期に作出するために以下の方法を用いた。既に作製されて C57/JB6line に 8 世代以上 back cross された α TTP 遺伝子ノックアウト雄(α TTP^{-/-})個体 3 匹より採取した精子を用いて C57/JB6 の wild type 雌(α TTP^{+/+})より採取した卵に体外受精を行う。卵割が確認できた受精卵を擬似妊娠状態にした別の雌の子宮内に着床させ妊娠を継続させる。作出された個体は全て α TTP

遺伝子については hetero+/- の遺伝子型を有する。(以上平成 14 年度本研究事業にて終了)

こうして得られた hetero+/- 雌個体より再び採卵し、 α TTP 遺伝子ノックアウト雄 (α TTP-/-) 個体より採取した精子を用いて体外受精を行い長期飼育に用いる雌個体 (α TTP+/-, α TTP-/-) を得る。これらの個体を対照群 α TTP+/+ と共に精製飼料 (AIN-76) に基づく VE 欠乏食群と VE 添加食 (50IU/kg, alpha-tocopherol acetate) 群に分けて SPF 環境下で飼育し、観察した。

b. 脳梗塞、多系統萎縮症における tau2 エピトープの可逆的変化
酸化ストレスが病態に大きな影響を持つ脳梗塞や多系統萎縮症 (MSA) の組織を用いて、tau2 エピトープの変化を観察する。

ヒト脳梗塞、多系統萎縮症、正常脳を Tris-buffered saline (TS), 1% sarkosyl/TS, 2% SDS/TS, formic acid で順に可溶化し別に抽出した PHF 画分と一緒に 10% SDS-PAGE で泳動後 PVDF 膜へ転写した。
ヒト脳梗塞、多系統萎縮症脳病変部のホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いた。

上記の転写膜や組織切片を

- 0-0.1% Triton-X 存在下で Tau2 抗体 (mouse monoclonal IgG, Sigma)、または抗ヒトタウ抗体 (pool 2, rabbit polyclonal, 大阪市大森啓先生より御供与) でエピトープの可視化を試みた。
- 0.1% Triton X で incubate した後、Triton X を含まない緩衝液で洗浄し Triton X 非存在下でエピトープの可視化を試みた。

C. 研究結果

a. α TTP 遺伝子改変個体の飼育、観察
多数の個体を確保するため 2 回の作出作業を行い、総計で雌の α TTP-/- 個体 (以下 α TTP 遺伝子の allele 数に従い "0" とする) 167 匹、 α TTP+/- 個体 (同様に "1" とする) 220 匹が得られ、 α TTP+/+ 個体 (同様に "2" とする) 180 匹と共に VE 欠乏食群 ("-" とする)、VE 添加食群 ("+" とする) に分けて飼育した。VE+, VE- 飼料への変換は離乳直後より行った。

長期飼育は先行群と後発群に分けて開始した。

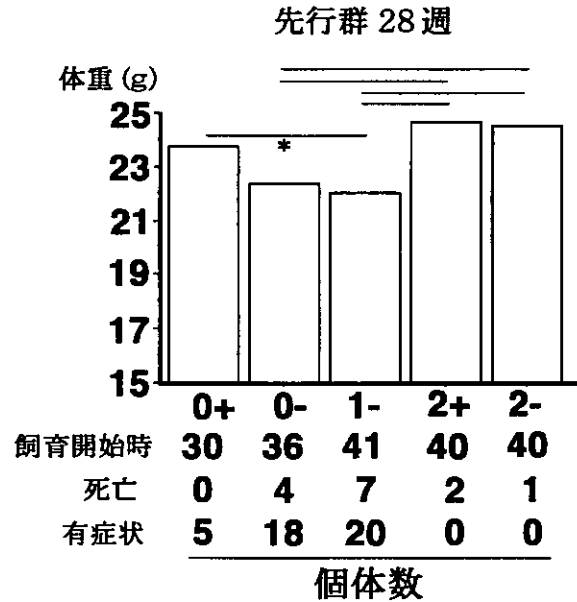


図 1 : 先行群 187 個体生後 6 ヶ月での各群の平均体重と体重差の有意水準 (*: p=0.05 他は 0.01)、死亡個体数、有症状例数を示す。

症状は後肢の脱力、引きずり、体幹の回旋、運動量の低下が主なものであり、生後 10-12 週にこれらを発現したのち、上記に示す数の個体が死亡した。

これ以降の死亡個体数は少ないが、同様の症状を発現する個体の割合が次第に増えている。

Wild type 群 (2+, 2-) では食餌の VE 含有量に関わらず症状を有する例はこれまでに観察されていない。

遺伝子改変群 (0, 1) では VE- 欠乏食群に有症状例と死亡例が見られるが、 α TTP allele の数 (0- vs 1-) の間での差は明らかでない。これに比して 0+ 群で死亡個体はないものより低い割合で有症状例がみられている。

b. 脳梗塞、多系統萎縮症における tau2 エピトープの可逆的変化

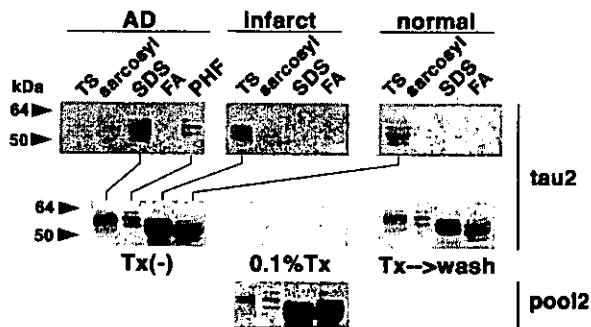


図 2 アルツハイマー病 (AD), 脳梗塞 (infarct), 正常(normal)脳の Tris (TS), sarkosyl, SDS, formic acid (FA)画分を tau2 で可視化した。TritonX 非存在下(Tx(-))で見られたバンドは存在下(0.1%Tx)では消失するが、Tx 暴露後洗浄すると再び可視化できる。Tx 存在下でも抗ヒトタウ抗体(pool2)では同様の陽性バンドが検出される。

脳梗塞 (Infarct) の tau は正常脳と同じ分子量で Tris 可溶性画分にみとめられ、SDS 画分により高い分子量で tau 蛋白が認められるアルツハイマー病 (AD) とは異なる。MSA 脳でも脳梗塞脳と同様の結果が得られた。

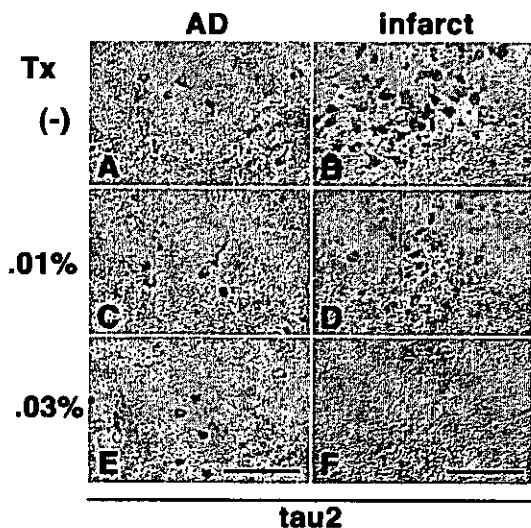


図 3: AD の神経原線維変化 (A-E; NFT) と脳梗塞のミクログリア (B) は TritonX 非存在下 (Tx(-)) で tau2 陽性となるが、Tx の濃度が上昇すると脳梗塞のミクログリアは可視化できなくなる (D, F)。

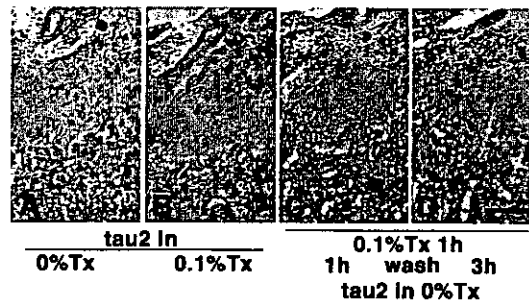


図 4: 免疫組織化学でも tau2 陽性像 (A) は Tx 存在下 (B) で消失するが、Tx 暴露後洗浄すれば、再び陽性像が観察される。

D. 考察

a. α TTP 遺伝子改変個体の飼育、観察

確立された α TTP ノックアウトマウス雄個体を用いた体外受精を 2 回繰り返すことにより、ほぼ同時期に多数の遺伝子改変個体 α TTP^{+/+} および α TTP^{-/-} を得て、長期飼育を開始できた。この遺伝子が個体の寿命にどのような影響をあたえるかを知るには長期の観察が必要で、今回得られた個体を SPF 環境での飼育を行っている。SPF で用いる飼料は滅菌する必要があるが、 γ 線照射による飼料の滅菌過程で起こる VE に対する影響を最低限に留めるため、基礎となる精製飼料 AIN76 に alpha-tocopherol の酢酸エステルを添加して飼料を作製した。照射後の VE 値は添加量と差がなく SPF 環境下で飼料の VE 含有量を正確に制御するのに適すると実証された初めての方法と思われる。

これまでの少数例での検討では、振るえなどの症状が発現するまでに生後 1 年以上の期間を要した。これに対し今回一部の個体ではあるが、より早い時期に振るえとは別の症状を呈する場合があり、症状の増悪から死亡に至る個体もみられた。これらの変化は対照の wild type 群 (2+, 2-) ではみられていないが、 α TTP^{-/-} では VE 添加群 (0+) でも有症状個体があり、VE 欠乏群 (0-, 1-) では有症状個体の割合がより高い。遺伝子改変の影響は飼料中の VE 欠乏状態と相乗的に作用しているとすれば説明できる。しかし VE 欠乏群を見た場合、 α TTP 遺伝子の allele 数 (0 または 1) による違いはこれまでの検討では明らかになっていない。今後長期飼育を継続していく過程で他のパラメータを通して遺伝子の dosage effects が明らかになる可能性を念頭に、観察する必要がある。しかし、 α TTP 遺伝子欠損の影

響は allele 数が 1 減少した段階で顕在化するに十分な実験条件が今回設定できた可能性もある。確かに α TTP+/+ 個体は食餌中の VE 欠乏状態のみでは上記の症状の発現に容易には至らないことは既に多くの報告があり、今回の実験経過も同様の傾向を示している。 α TTP 遺伝子欠損を背景としておこる VE 欠乏状態の強調が、どのような細胞・分子機構を介して個体に影響を与えるのかが本研究の中心的課題である。今後さらに検討を続けていくために、最適の実験系が実現できており、可能な限り長期に渉る飼育を続けていく予定である。

b. 脳梗塞、多系統萎縮症における tau2 エピトープの可逆的変化

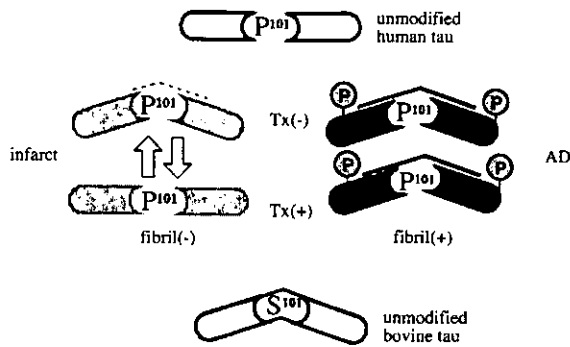


図 5 :tau2 エピトープの病的修飾と Triton X (Tx)による変化を模式的に示す。

タウ蛋白が沈着して免疫組織化学的に可視化されるには病的修飾を受けることが前提となるが、脳梗塞や MSA では沈着した tau は AD と異なり、リン酸化を受けていないことを初めて示した。Tau2 エピトープは 101 番目のプロリンを中心としているとされるが、脳梗塞や MSA ではこの部分に AD で見られると同様の conformational change があると推定される。リン酸化され、線維を形成する AD のタウとは異なり脳梗塞や MSA では tau2 エピトープの conformational change は組織標本中では TX 存在下で消失し、TX を洗浄することで再び復活する。リン酸化されずに沈着した tau は脳梗塞や MSA で見られるように線維を形成せず、その病的な conformation も TX 暴露によって容易に変化する。脳梗塞や MSA 病変は tau2 抗体以外の抗タウ抗体では染色されず、タウの病的修飾は tau2 エピトープ周辺に限局されていると思われる。これらは線維形成前の極めて初期のタウ沈着形態を反映している可能性があり、この状態からタウ

蛋白の修飾がどのように分子全体に拡大して、線維形成にいたるのかを解明できればタウ蛋白沈着から神経原線維変化の完成に至る過程を明らかにできると思われる。脳梗塞、MSA に限らず AD でも酸化ストレスが病態に関与しているとの報告は多数あり、酸化ストレスに関連したタウ蛋白の変化が神経疾患の病態に大きな役割を果たしている事が示唆される。

E. 結論

α TTP 遺伝子を改変した雌個体を多数 387 匹作製し、食餌中の VE を欠乏させて両者の影響を観察する実験コホートを確立し、解析を開始した。生後の早い時期に遺伝子改変個体の VE 欠乏食群で亜急性に進行する運動障害を呈し、死亡する個体がみられた。その後、より軽い症状を呈する個体の割合が次第に増加しており、これらの症状は遺伝子の変化と食餌中の VE 欠乏状態の相互作用の結果時間依存的に出現している可能性が示唆される。今後できるだけ長期に渉る観察を継続し、時間依存的に出現する変化を検討する。

酸化ストレスが病態に関連するとされる脳梗塞、MSA 脳で tau2 に限局した conformational change が起こり、タウ蛋白の沈着が起こることを初めて明らかにした。線維形成性に乏しいこれらのタウ陽性構造はタウ沈着の初期像に対応している可能性があり、今後 AD 等 degenerative tauopathies との異同を明らかにして、病態の特徴を解明する糸口となる事が期待される。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Uchihara T, Duyckaerts C, Iwabuchi K, Iwata M, Yagishita S, Hauw J-J, Was Pierre Marie's ataxia Machado-Joseph disease? A reappraisal based on the last autopsy case from the Salpêtrière hospital. Arch Neurol (in press)
2. Nakamura A, Uchihara T, Dual enhancement of triple immunofluorescence using two antibodies from the same species. J Neurosci Methods (in press)
3. Uchihara T, Nakamura A, Arai T, Ikeda K, Tsuchiya K, Microglial tau undergoes phosphorylation-independent modification after ischemia. Glia 2004;45:180-187
4. Uchihara T, Nakamura A, Nakayama H, Arima K, Ishizuka N, Mori H, Mizushima S, Triple immunofluorolabeling with two rabbit polyclonal antibodies and a mouse