

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

アルツハイマー病動物モデルマウスの高次脳機能解析
鍋島俊隆

名古屋大学大学院医学研究科医療薬学教授

研究要旨 アルツハイマー病の動物モデルマウス(Tg2576)は、prion promotor 下にヒト変異型 APP を発現するトランスジェニックマウスで、加齢と共にアミロイド沈着が進み、6ヶ月齢では脳に軽度の沈着を認めるのみであるが、10ヶ月齢になると、アミロイド沈着は著明になり、老人斑の形成も認められるようになる。このTg2576マウスが、どの月齢から高次脳機能の異常を示すのか検索するため6ヶ月齢（未治療）での学習機能の評価を行った。今後 A β を発現するアデノ随伴ウイルスベクターをアルツハイマー病のモデルマウスに投与し、高次脳機能の改善が見られるか検討する。

A. 研究目的

APP 過剰発現マウス（ヒト変異 Amyloid precursor protein 遺伝子導入マウス；Tg2576）の6ヶ月齢での学習機能の評価を行うため、以下の行動実験を行った。

B. 研究項目

1. 自発的交替行動試験（1日目）

実験装置・手順：1本のアームの長さが40cm、壁の高さ12cm、床幅3cm、上部幅10cmの3本のアームがそれぞれ120度の角度で接続されたY字迷路を用い、常時一定

の明るさになるように間接照明のみを当てた。マウスをアームの交差する位置に置き、その後8分間にわたって装置内を自由に散策させ、移動したアームの位置を移動した順に記録した。

2. 新規物質認識試験（1-5日目）

実験装置・手順：中央に2種類の異なったobjectを離して設置した装置（縦30cm、横30cm、高さ35cm）内にマウスを入れ、各objectに対する探索嗜好行動を5分間隔で10分間測定した（訓練試行）。訓練24時間後に、2種類のobjectのうち片方

のobjectを全く異なった新規objectと置換し、各objectに対する探索嗜好行動を5分間隔で10分間測定した(テスト試行)。

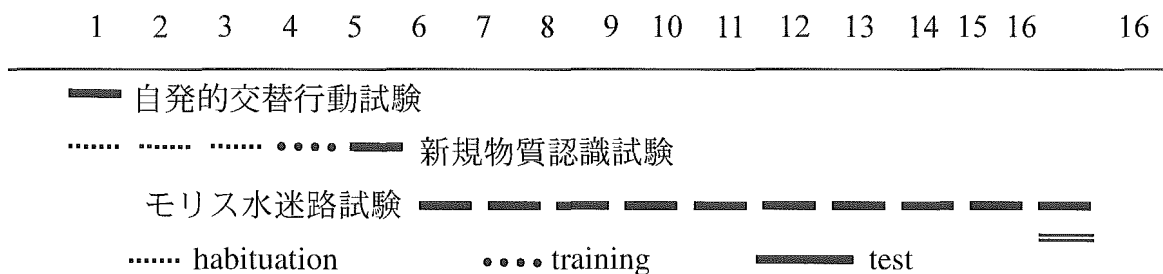
3. モリス水迷路試験

(陳述記憶試験 6-15日目 プローブテスト;15日目)

実験装置・手順：直径120cmのプ

ールに直径7cmのプラットホームを水面より1cm下に設置し、プールに入れられたマウスが周りの空間を手がかりにしてプラットホームに到達する時間(escape latency)および到達するまでの距離(swimming distance)を測定した。

研究スケジュール



検定

野生型マウス、APP過剰発現マウス間で一元配置分散分析(one-way ANOVA)により群間比較を行い、その後post-hockテスト(T-test およびScheffe's Ftest)を用い個々の比較を行った。

C. 研究結果

1. 自発的交替行動試験

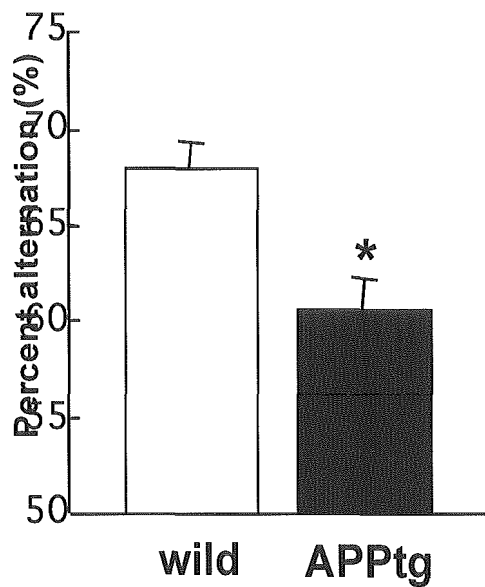
実験装置・手順：1本のアームの長さが40cm、壁の高さ12cm、床幅3cm、上部幅10cmの3本のアームがそれぞれ120度の角度で接続されたY字迷路を用い、常時一定の明る

さになるように間接照明のみを当てた。マウスをアームの交差する位置に置き、その後8分間にわたって装置内を自由に散策させ、移動したアームの位置を移動した順に記録した。マウスが測定時間内にアームに移動した回数をtotal arm entriesとした。つぎに、連続して異なる三つのアームを選択した組み合わせを調べ、この数をno. of alternationとした。No. of alternationをtotal arm entriesから2を引いた数で割り、それに100を掛けて求めた値をpercent alternationとし、これを自発的交替行動の指標とした。

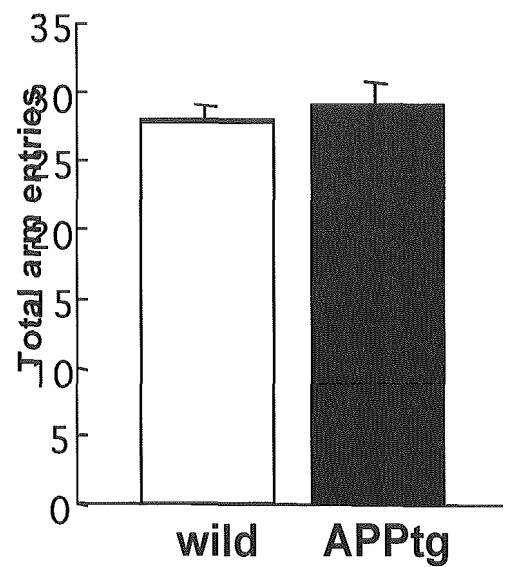
実験結果： APP過剰発現マウスの percent alternationは野生型に比べは有意に低下しており、自発交替行

動の障害が認められた。しかし、total arm entriesには差は認められなかった。

(A)



(B)

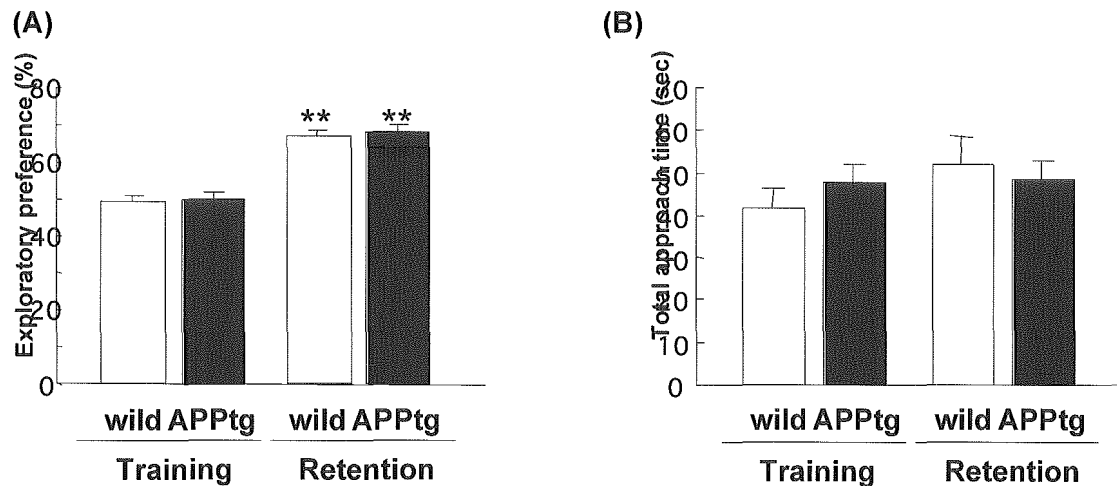


Cognitive function in APP-transgenic mice. Spontaneous alternation behavior in the Y-maze. Percent alternation (A) and total arm entries (B) during an 8-min session in the Y-maze task were measured on 6 months after birth. Values indicate means \pm s.e.mean (wild; n=36, APPtg; n=37). *P<0.05 vs wild type mice.

2. 新規物質認識試験

実験装置・手順：中央に 2 種類の異なったobjectを離して設置した装置（縦 30 cm、横 30 cm、高さ 35 cm）内にマウスを入れ、各objectに対する探索嗜好行動を 5 分間隔で 10 分間測定した（訓練試行）。訓練 24 時間後に、2 種類のobjectのうち片方のobjectを全く異なった新規objectと置換し、各objectに対する探索嗜好行動を 5 分間隔で 10 分間測定した（テスト試行）。

実験結果：訓練試行時において、いずれのマウスも各objectに対して約 50% の割合で探索嗜好行動（exploratory preference）を示した。テスト試行においてはAPP過剰発現マウスと野生型マウスにおける、新規objectに対する探索時間は有意に延長し、両マウス間には有意な差は認められなかった。また、全探索行動時間（total approach time）に有意な差は認められなかった。



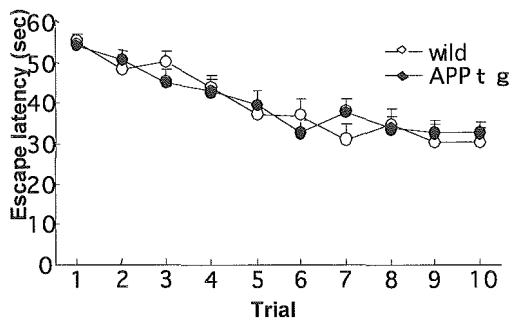
Cognitive function in APP-transgenic mice. Novel object recognition task. Retention session was carried out 24hr after the training. Exploratory preference (A) and total approach time (B) during an 10-min session in the novel object recognition task were measured on 6months after birth. Values indicate means \pm s.e.mean (wild; n=36, APPtg; n=37). **P<0.01 vs training mice respectively.

3.モリス水迷路試験（陳述記憶実験）
 実験装置・手順：直径 120cm のプールに直径 7cm のプラットフォームを水面より 1cm 下に設置し、プールに入れられたマウスが周りの空間を手がかりにしてプラットフォームに到達する時間（escape latency）および到達するまでの距離（swimming distance）を測定した。最大観察時間は 60 秒とし、1 日 2 試行で 10 日

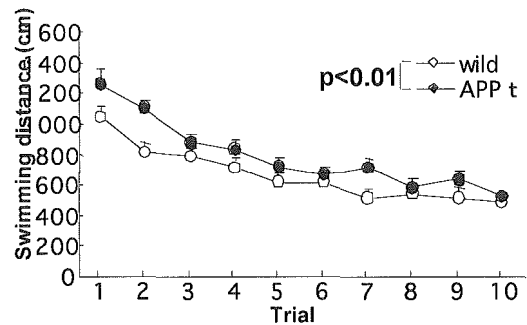
間行った。プラットフォームの位置は一定で、マウスを入れる位置は施行ごとに変えた。

実験結果：APP 過剰発現マウスの escape latency は、野生型マウスのそれに比べに有意な差は認められなかった。APP 過剰発現マウスの Swimming distance は野生型マウスのそれに比べ有意に延長していた。

(A)



(B)



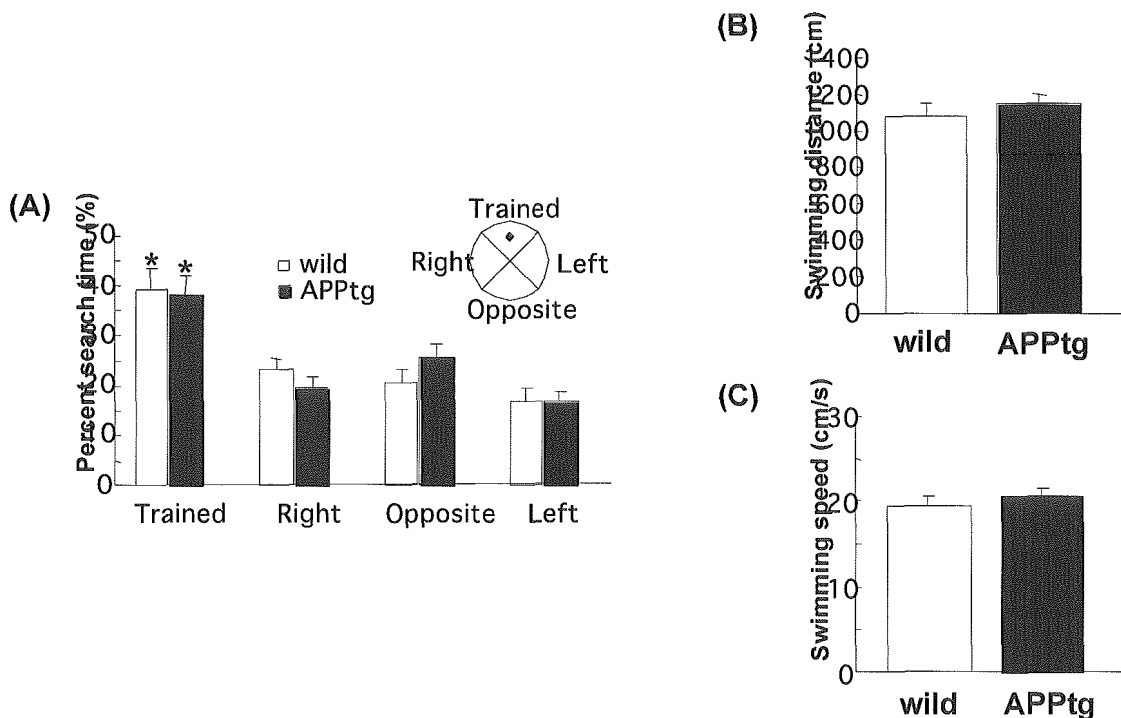
Cognitive function in APP-transgenic mice. Reference memory in morris water maze task Escape latency (A) swimming distance (B) during an 60-sec session in the Water maze task were masured on 6months after birth. Values indicate means \pm s.e.mean (wild; n=20, APPtg; n=33). * $P < 0.05$ vs training mice respectively.

3. モリス水迷路試験（プローブテスト）

実験装置・手順： 前述した水迷路試験 10 日目終了後にプールからプラットフォームを除去し、プールを 4 区画（Trained、Right、Opposite、Left）に分け、プールに入れられたマウスのプラットフォームが設置してあった区画（Trained）を探索する時間の割合（percent search time）を求めた。観察時間は 30 秒とした。また、各マウス群の遊泳速度（swimming

speed）および距離（swimming distance）を測定した。マウスを入れる位置はランダムに変えた。

実験結果：プラットフォームが設置してあった区画（Trained）における percent search time は、APP 過剰発現マウス、野生型マウス間に有意な差が認められなかった。また、swimming speed および swimming distance には差がなかったことから、両マウスの遊泳能力および意欲に差はないものと示唆される。



Cognitive function in APP-transgenic mice. Spatial memory for a platform location during the probe trial after training in reference memory of moris water maze task
Percent search time (A) swimming distance (B) swimming speed (c) during a 60-sec session in the Water maze task were measured on 6months after birth. Values indicate means \pm s.e.mean (wild; n=22, APPtg; n=30).

D. 考察

アルツハイマー病の動物モデルマウスである APP トランスジェニックマウス(Tg2576)は、prion promotor 下にヒト変異型 APP を発現するマウスで、10ヶ月齢頃より脳にアミロイド β 蛋白の沈着・老人斑形成が認められる。

アルツハイマー病の記銘力障害などの高次脳機能障害の原因は不明である。神経細胞の萎縮・脱落が起こる以前の軽度認知障害の時期より認められる事より、現在では A β オリゴマーによるシナプス障害という仮説が支持されつつある。

昨年、我々が開発した分泌型 A β cDNA を組み込んだアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを、APP トランスジェニックマウス(Tg2576)に経口投与したところ、脳組織のアミロイド沈着・老人斑形成がコントロールに比べ明らかに減少していた。今回さらに経口ワクチン投与により APP トランスジェニックマウスの高次脳機能が改善されるか検索している。

本年度は、この APP トランスジェニックマウスが、どの月齢から高次脳機能の異常を示すのか検索するため6ヶ月齢での学習機能の評価を行った。

本研究において3種の学習・記憶試験を行ったところ、新規物質認識

試験における新規 object に対する探索時間は、6ヶ月齢の野生型マウスおよび APP 過剰発現マウスのいずれにおいても有意に延長していた。したがって、6ヶ月齢の APP 過剰発現マウスは、野生型マウスと同程度の新規物質認識能力を有しているものと示唆される。一方、自発的交替行動試験において6ヶ月齢の APP 過剰発現マウスの percent alternation は、同月齢の野生型マウスのそれに比べ有意に低下しており、自発的交替行動の障害が認められた。自発的交替行動試験は、マウスの作業記憶を調べることができることから、APP 過剰発現マウスの6ヶ月齢の早期からこの記憶は障害されていることが示唆される。また、モリス水迷路を用いて6ヶ月齢の APP 過剰発現マウスの陳述記憶能を調べたところ、6ヶ月齢の APP 過剰発現マウスの escape latency は、同月齢の野生型のそれと差はなかったにもかかわらず、swimming distance は有意に延長していた。プローブテストにおいて両マウスの swimming speed および swimming distance に差はなかったことから、両マウスの遊泳能力には差がないものと示唆される。モリス水迷路を用いて陳述記憶試験を行った他の報告 (*Science* 274: 99-103)

において、3ヶ月齢の野生型マウスと APP 過剰発現マウスの両者の escape latency には有意な差がなかったが、最終実験日にのみ両マウスに差が認められ、10ヶ月齢においては両者の escape latency には有意な差が認められる。これは、APP 過剰発現マウスの3ヶ月齢の早期から認知障害を示す傾向が認められ、10ヶ月齢において顕著な障害が認められることを示す。したがって、6ヶ月齢の APP 過剰発現マウスは、軽微であるが作業記憶能および陳述記憶能が障害されているものと示唆される。以上の結果より、6ヶ月齢の APP 過剰発現マウスは一部ではあるが、軽微な認知障害が認められ、この結果は、以前の報告と一致したものでり、この月齢で既に A β オリゴマーによるシナプス障害が起こっている可能性が示唆された。

今後長い月齢での高次脳機能障害について順次解析し、さらに経口ワクチン投与による高次脳機能障害の改善の有無について、検索する予定である。

E. 結論

アルツハイマー病の動物モデルマウスである APP トランスジェニックマウス(Tg2576)は、6ヶ月齢で自発交替行動の障害が認められ、この月齢で既に A β オリゴマーによるシナプス

障害が起こっている可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

(学会発表)

1. 新田淳美, 曾南, 野田幸裕, 伊藤亜紀雄, 鍋島俊隆, 平松正行, 馬場章吾, 小島良二: 可塑的脳機能障害におけるニコチン性作動性神経系の役割第 19 回平成 15 年度喫煙科学財団助成研究発表会(東京, 2004. 7. 15)
2. 新田淳美, 本多裕之, 古川昭栄, 古川美子: タバコ成分中のカテコール化合物の神経栄養因子促進と神経保護効果—培養海馬神経細胞における4-メチルカテコールによる遺伝子発現調節
第 19 回平成 15 年度喫煙科学財団助成研究発表会(東京, 2004. 7. 15)
3. 鍋島俊隆 (ランチョンセミナー司会): アルツハイマー病治療戦略におけるニコチン性アセチルコリン受容体の重要性
第 34 回日本神経精神薬理学会/第 26 回日本生物学的精神医学会・合同年会(東京, 2004. 7. 21-23)

4.鍋島俊隆, 野田幸裕: 中枢神経系創薬のための行動科学研究ラインアップ

第 27 回日本神経科学大会・第 47 回日本神経化学会大会合同大会 (大阪, 2004. 9. 21-23)

5.新田淳美, 山田裕一郎, 丹羽美苗, 中島晶, Liya Shen, 鍋島俊隆: メタフェタミンの神経毒性に対する腫瘍壊死因子およびグリア細胞株由来神経栄養因子の影響

第 27 回日本神経科学大会・第 47 回日本神経化学会大会合同大会 (大阪, 2004. 9. 21-23)

6.小林香奈, 永井拓, 亀井浩行, 中野寛子, 東岸由里子, 田熊一敬, 鍋島俊隆, 山田清

文: 認知記憶における extracellular signal-regulated kinase の関与
第 106 回日本薬理学会近畿部会 (京都 2004.11.5.)

7.鍋島俊隆・野村康幸(オーガナイザー): <S - 21>中枢シグナル調節と疾患

第 78 回日本薬理学会年会 (横浜 2005.3.22-24)

論文

1.Urani A, Romieu P, Roman F. J, Yamada K, Noda Y, Kamei H, Tran H, Nagai T, Nabeshima T, Maurice T. Enhanced antidepressant efficacy of 1 receptor agonists in rats after chronic intracerebroventricular infusion of β -amyloid-(1-40) protein. Eur J Pharmacol. 486: 151-161 (2004).

2.Nitta A, Nishioka H, Fukumitsu H, Furukawa Y, Sugiura H, Shen L, Furukawa S. Hydrophobic dipeptide Leu-Ile protects against neuronal death by inducing brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor synthesis. J Neurosci Res. 78:250-258 (2004).

3.Hefco V, Yamada K, Hefco A, Hritcu L, Tiron A, Nabeshima T. The interaction between the cholinergic and dopaminergic system in learning and memory process in rats. Rom J Physiol. 41:21-30 (2004).

4.Jhoo J H, Kim H-C, Nabeshima T, Yamada K, Shin E-J, Jhoo W-K,

- Kim W, Kang K-S, Jo S A, Woo J I. β - Amyloid(1-42)-induced learning and memory deficits in mice: involvement of oxidative burdens in the hippocampus and cerebral cortex. *Behav Brain Res.*, 155,185-196(2004)
- 5.Olariu A, Yamada K, Nabeshima T. Amyloid pathology and protein kinase C(PKC):possible therapeutic effects of PKC activators. *J Pharmacol Sci.* 97: 1-5(2005)
- 6.Yamada, K., Nabeshima, T. Nitric oxide in learning and memory. in " Memories are made of These: From Messengers to Molecules" Ed. by Riedel, G. and Platt, B., Landes Bioscience, Texas, U.S.A., pp480-491(2004) .
- 7.鍋島俊隆：脳と心に効く薬を創る 岩波書店，東京(2004)
- 8.Hiramatsu, M., Watanabe, M., Baba, S., Kojima, R. and Nabeshima, T.: 7-type nicotine acetylcholine receptor and prodynorphin mRNA expression after administration of (-)-nicotine and U-50, 488H in β -amyloid peptide (25-35)-treated mice. in "Current Status of Drug Dependence/Abuse Studies" Ed. by Ali SF, Nabeshima T. and Yanagita T. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1025, 508-514 (2004)
- 9.Nabeshima T, Tran MH, Kim HC,Yamada K: Oxidative Stress Mechanism of Amyloid β - Peptide-Induced Impairment of Neurotransmission and Memory. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* (supple.2): 29-31(2004)
- 10.Yamada K, Mizuno M,Nabeshima T. Learning and Memory Alzheimer's Disease and Dementia. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* (supple.2) :55-64 (2004).
- 11.Yamada, K., Mizuno, M. and Nabeshima, T. Role for brain-derived neurotrophic factor in learning and memory. *Life Sci. Minireview*, 70:735-744(2004).
- 12.Yamada, K., and Nabeshima, T.: Interaction of BDNF/TRKB

signaling NMDA receptors in Learning and Memory.

Drug News Perspect 17:435-438(2004)

13.Yamada K, Takayanagi M., Kamei H, Nagai T, Dohniwa M., Kobayashi K., Yoshida S., Ohhara T., Takauma K. Nabeshima T.

Effects of memantine and donepezil on amyloid β -induced memory impairment in a delayed-matching to position task in rats.

Behav Brain Res., in press

14.Yamada K, Kim H-C, Nabeshima T. Molecular mechanism of amyloid- β peptide-induced impairment of neurotransmission and memory in relation to oxidative stress. in "Progress in Alzheimer's and Parkinson's Disease"

Ed by I. Hanin, R. Cacabelos and A. Fisher, The Parthenon Publishing Group, Lanlaster, in press

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

特になし

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

経口ワクチン（A β 発現アデノ随伴ウイルス）を投与した
APP トランスジェニックマウスの TGF- β 1 の変化

分担研究者 田平 武
国立長寿医療センター研究所 所長

研究要；TGF- β 1は、多機能を有するサイトカインで、アルツハイマー病においては、脳血管へのアミロイド沈着や微小血管変性などのアルツハイマー病脳病理の形成に深く関与している。A β を発現するアデノ随伴ウイルスベクターをアルツハイマー病のモデルマウスに投与し、血清及び中枢神経系組織中の TGF- β 1濃度について解析を行った。我々が開発した rAAV を用いたワクチン療法は、TGF- β 1を減少することにより、脳血管へのアミロイド沈着や微小血管変性等の病理を改善する可能性がある。

A. 研究目的

TGF- β 1は、多機能を有するサイトカインで、アルツハイマー病患者剖検脳において TGF- β 1mRNAがコントロール群より増加し、アミロイドの沈着と強い相関を示す。さらに TGF- β 1は、脳血管へのアミロイド沈着や微小血管変性などのアルツハイマー病脳病理の形成に深く関与している。我々は、A β を発現するアデノ随伴ウイルスベクターを用いた経口ワクチン投与により、アルツハイマー病のモデルマウス中の血清や脳組織の TGF- β 1が変化するか検索した。

B. 研究方法

1. アデノ随伴ウイルスベクターの構築
amyloid- β 1-43(A β 43) cDNA は、ヒト amyloid precursor protein (APP) 遺伝子を鋳型として PCR にて増幅した。APP の分泌シグナルである N 末の最初の signal sequence adaptor(18アミノ酸)を A β 1-43 cDNA の 5'側に結合させた fusion gene ; APP signal sequence+ A β 1-43 cDNA を作成し(図 1)、アデノ随伴ウイルスベクター(pXXUF1)に組み込んだ。次に、このベクターを HEK293 cell に XX2 (AAV packaging plasmid), XX6(adeno helper plasmid)と共に transfection し、recombinant adeno-associated

virus (rAAV)を得た。そしてセシウムクロライド超遠心にて精製した。

コントロールとして、GFP (Green fluorescence protein)を発現するアデノ随伴ウイルス (GFPPrAAV)を作成した。

2.アデノ随伴ウイルスの経口投与

アルツハイマー病の動物モデルである APP transgenic mouse (Tg2576)は、Taconic 社(Mayo Clinic)から購入した。Group A(15週齢時投与)、Group B(30週齢時投与)、Group C(45週齢時投与)の APP transgenic mouse に A β 1-43rAAV を各々 5×10^{11} genome、1回のみ経口投与した。別に A β 1-43の半分の長さの A β を発現する A β 1-21rAAV を、Group D(15週齢時投与)、Group E(30週齢時投与)、Group F(45週齢時投与)に分けた APP transgenic mouse に各々 5×10^{11} genome、1回のみ経口投与した。12-13ヶ月齢時のマウスの組織の凍結切片を用いて実験を行った。

3.免疫組織染色

中枢神経系組織中の TGF- β の発現を検索するために、凍結切片をポリクロナール・ウサギ抗 TGF- β 抗体で染色後、ABC法にて発色した。

4. TGF- β 1 ELISA

マウス血清中の TGF- β 1濃度は、R&D

systems社の ELISA kitを用いて測定した。

C. 研究結果

1.血清中の TGF- β 1濃度

A β 1-43rAAV または A β 1-21rAAV を経口投与した13ヶ月齢の APP トランスジェニックマウス(Tg2576)血清を用いて、TGF- β 1濃度を ELISA にて測定した(図1)。

A β 1-43rAAV 投与 Group A ; 80.5 ± 12.9 ng/ml, $p=0.09$, Group B; 76.0 ± 6.3 ng/ml, $p=0.06$, Group C; 74.3 ± 21.0 ng/ml, $p=0.07$ でコントロール群の TGF- β 1濃度 111.6 ± 40.0 ng/ml と比べ有意に減少していた。

A β 1-21rAAV 投与 Group D; 99.4 ± 21.2 ng/ml, Group E; 80.2 ± 17.2 ng/ml, $p=0.09$, Group F; 72.9 ± 15.8 ng/ml, $p=0.06$ の TGF- β 1濃度もコントロール群と比べ低下していた。

2.脳組織での TGF- β 1免疫組織染色

図2に示すように、コントロール群の APP トランスジェニックマウス脳では、TGF- β 1の発現が強く認められる。

一方、A β 1-43rAAV 経口投与した13ヶ月齢の APP トランスジェニックマウス脳では、有意に TGF- β 1の発現は減少していた。

D. 考察

脳血管へのアミロイド沈着や微小血管変性は、アルツハイマー病患者に高頻度で認められる病理所見である。TGF- β 1は、

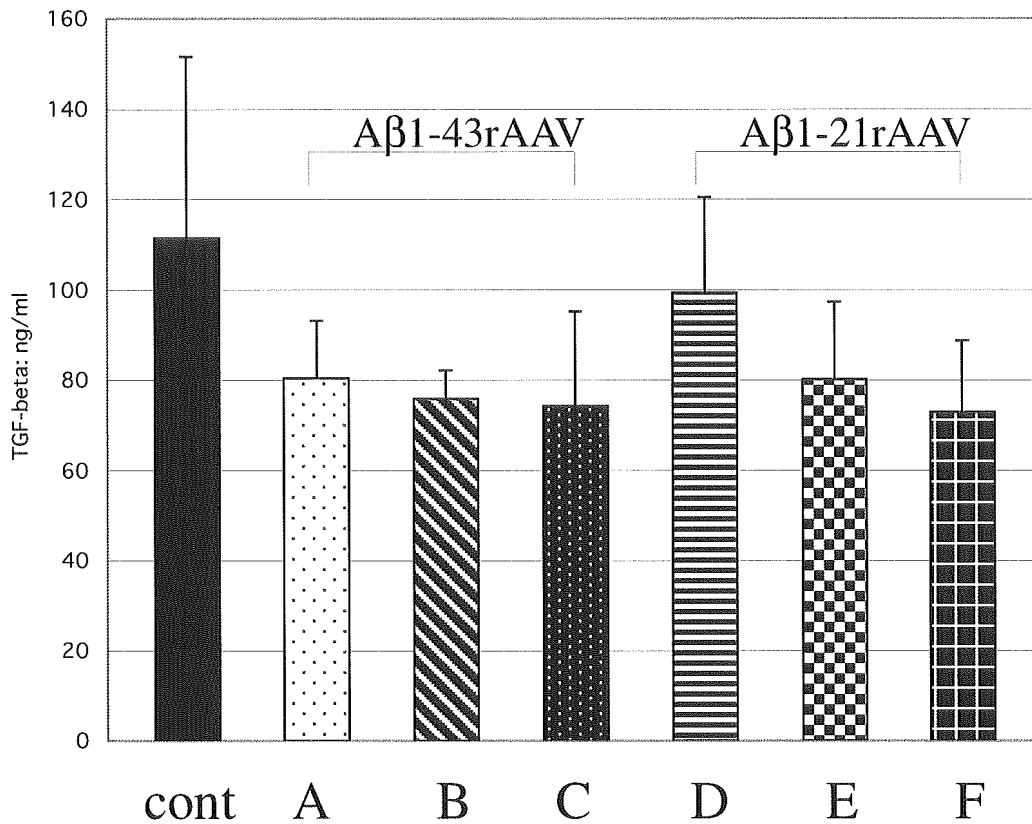


図1 血清中の TGF-β1 濃度。コントロール群と比べ Aβ1-43rAAV または Aβ1-21rAAV を経口投与した APP トランスジェニックマウスでは、有意に TGF-β1 濃度が低下している。

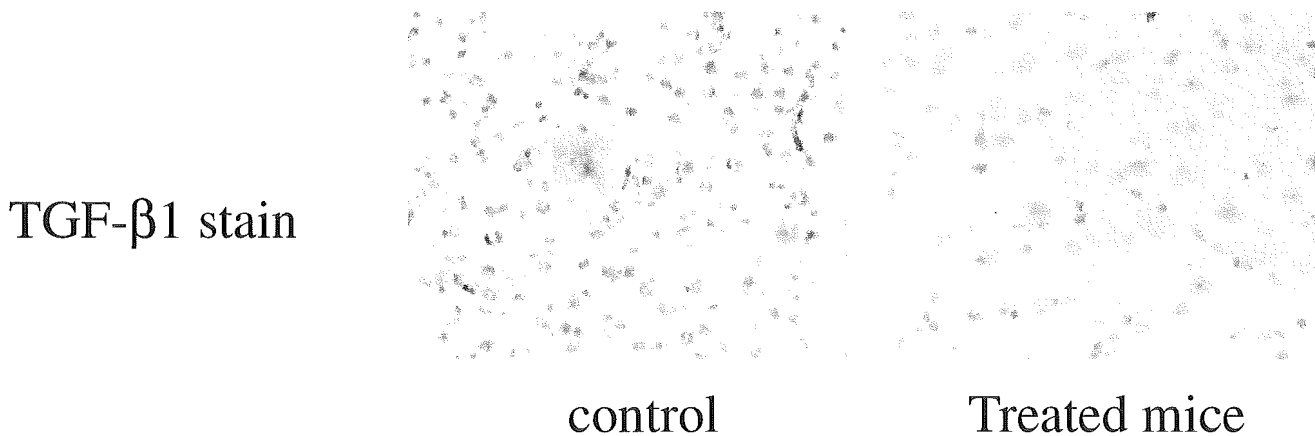


図2 APP トランスジェニックマウス脳組織での TGF-β1 免疫組織染色。

多機能を有するサイトカインで、アルツハイマー病においては、脳血管へのアミロイド沈着（アミロイドアンギオパチー）や微小血管変性などのアルツハイマー病脳病理の形成に深く関与している。

アルツハイマー病脳において TGF- β 1 は、ミクログリアを活性化し、A β 蛋白の取り込み・貪食を促進する良い効果もあるが、一方でアストロサイトを刺激し、アストロサイトでの A β 蛋白産生を亢進し、これにより脳血管へのアミロイド沈着（アミロイドアンギオパチー）が起こる。さらに TGF- β 1 が微小血管内皮細胞を刺激し、内皮細胞からの炎症性サイトカインの IL-1 β , TNF- α 産生を促進し、微小血管変性を引き起こすと考えられている（図3）。

今回我々は、A β を発現するアデノ随伴ウイルスベクターを用いた経口ワクチン投与により、アルツハイマー病のモデルマウス中の血清や脳組織の TGF- β 1 が変化するか検索した。

13ヶ月齢の APP トランスジェニックマウス(Tg2576)血清中の TGF- β 1 濃度 111.6 \pm 40.0ng/ml であったが、A β 1-43rAAV または A β 1-21rAAV を経口投与した APP トランスジェニックマウスでは、有意に TGF- β 1 濃度は低下していた。

さらに APP トランスジェニックマウス脳では、TGF- β 1 の発現が強く認められ

たが、A β 1-43rAAV 経口投与した13ヶ月齢の APP トランスジェニックマウス脳では、有意に TGF- β 1 の発現は減少していた。

この現象の理由は不明であるが、腸管粘膜免疫では、制御性のT細胞より TGF- β 1 が分泌されているが、経口ワクチン投与によるバランスの変化が起こった可能性や、経口ワクチン投与による脳組織での可溶性 A β 蛋白が減少したため、アストロサイトへの刺激も減り、アストロサイトでの TGF- β 1 産生が減少した可能性が考えられる。

我々が開発した rAAV を用いたワクチン療法は、1回の投与により、比較的長期（約6ヶ月間）に腸管において抗原提示ができ、細胞性免疫を惹起せず液性免疫（抗体）のみを誘導する利点がある。

今回のデータでさらに TGF- β 1の関与が深く示唆される脳血管へのアミロイド沈着や微小血管変性等のアルツハイマー病病理所見をも経口ワクチンにより改善される可能性が示唆された。

E. 結論

我々が開発した rAAV を用いたワクチン療法は、TGF- β 1を減少することにより、アルツハイマー病脳血管へのアミロイド沈着や微小血管変性等の病理を改善する可能性がある。

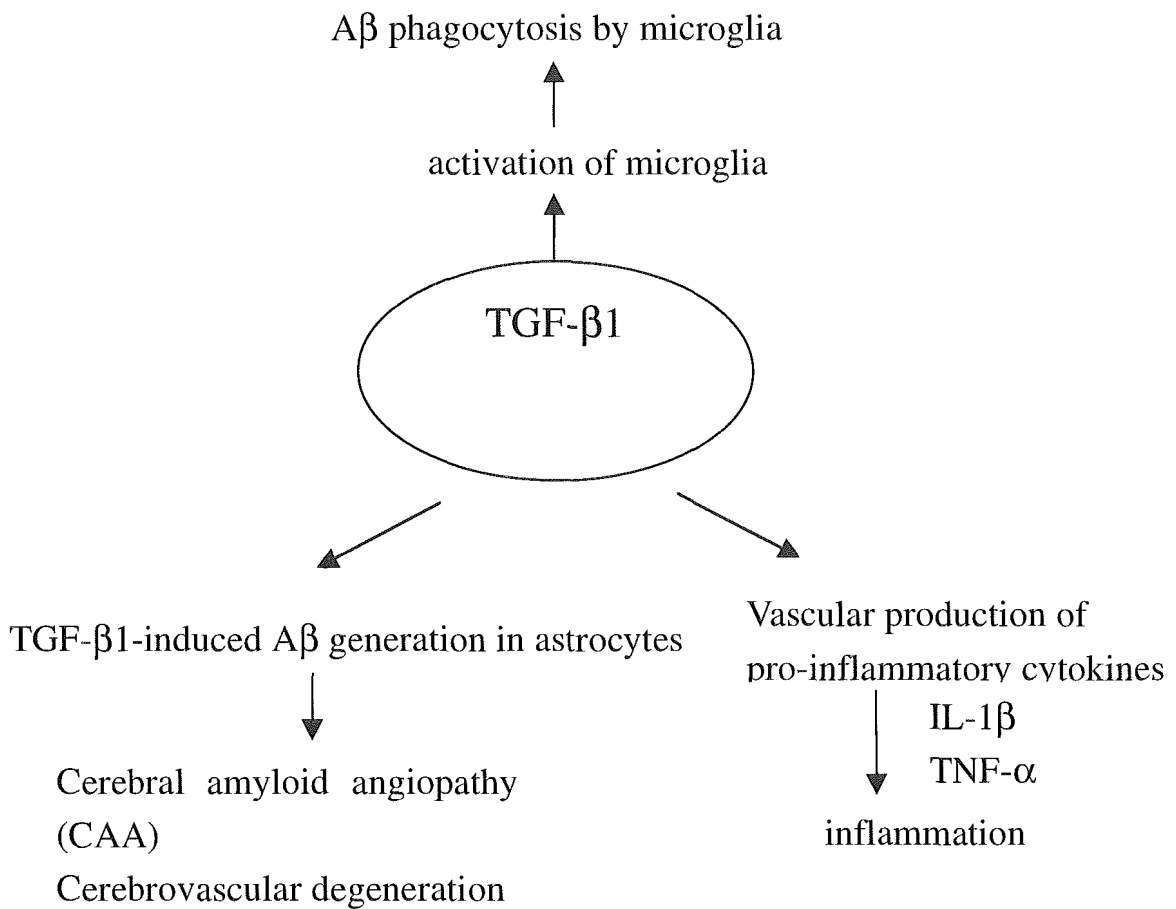


図3 アルツハイマー病脳病理における TGF-β1 の作用機構。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. Tabira T, Chui DH., Nakayama H, Kuroda S, Shibuya M: Alzheimer's disease with spastic paresis and cotton wool type plaques. J Neurosci Res. 70:367-372, 2002.
2. Tabira T. : Clinoquinol's return: caution from Japan. Science 292:2251, 2001.
3. Takeda K, Araki W, Tabira T: Enhanced generation of intracellular Ab42 amyloid peptide by mutation of presenilins PS1 and PS2. Eur J Neurosci 19:258-564, 2004.
4. Watanabe N, Arakki W, Chui D-H, Makifuchi T, Ihara Y, Tabira T: Glypican-1 as an Ab binding HSPG in the human brain: its localization in DIG

domains and possible roles in the pathogenesis of Alzheimer's disease. FASEB J 18:1013-1015, 2004.

一型痴呆の経口ワクチン療法。老年精神医学雑誌 15 : 7-17, 2004.

5. 田平 武、原 英夫：アルツハイマー病の治療：A β ワクチン療法。臨床神経学 44 : 778-780, 2004.
6. 田平 武、原 英夫：アルツハイマー

H. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得
特になし

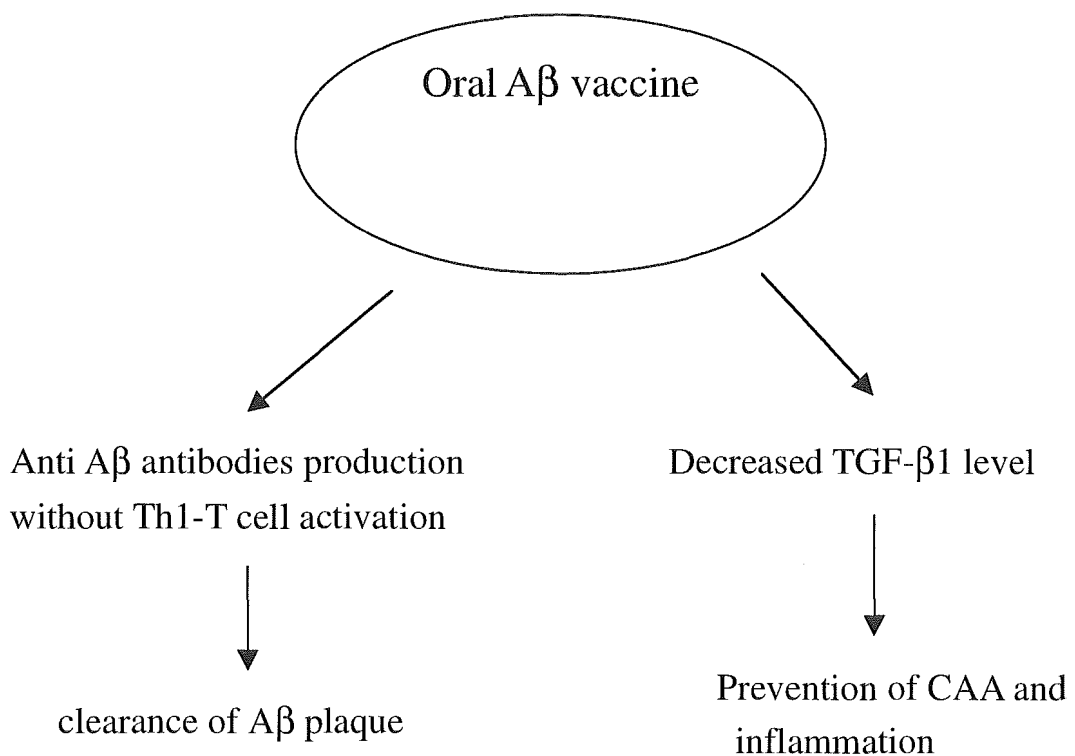


図4 A β を発現するアデノ随伴ウイルスベクターを用いた経口ワクチン作用機序。

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

経口ワクチン（A β 発現アデノ随伴ウイルス）を短期投与した老齡アフリカミドリザル脳の免疫組織学的解析

主任研究者 原 英夫

国立長寿医療センター研究所血管性痴呆研究部室長

研究要旨；これまで開発を行ってきた分泌型 A β cDNA を組み込んだアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターの経口ワクチン療法を老人斑形成が見られる老齡のアフリカミドリザルに行い、その効果を解析した。アフリカミドリザル脳には、成熟型老人斑とびまん型老人斑の両方の型が認められた。経口ワクチン投与によりアフリカミドリザルの脳老人斑は減少傾向を示した。さらに著明な変化は、神経細胞内 A β 蛋白に見られ、コントロール群では、神経細胞内 A β 蛋白沈着の所見が多く認められたが、治療群では激減していた。さらに小脳プルキンエ細胞層のアミロイド β 蛋白沈着や、プルキンエ細胞層・顆粒層の老人斑の形成は、経口ワクチン投与により改善を示した。

研究組織

分担研究者

高橋慶吉（国立長寿医療センター研究所血管性痴呆研究部部長）

A. 研究目的

我々はこれまで分泌型 A β cDNA を組み込んだアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターの経口ワクチン療法を開発してきた。昨年度は、アルツハイマー病の動物モデルである APP トラン

スジェニック(Tg2576)マウスに経口投与し、13 ヶ月齡の APP トランスジェニックマウス脳組織を免疫染色で詳細に検索した結果、経口ワクチンを投与したマウス脳においてアミロイド沈着・老人斑形成がコントロールに比べ明らかに減少していた。今回、老人斑形成が見られる老齡のアフリカミドリザルに経口ワクチンを投与し、短期間（3 ヶ月間）での効果を解析した。

B. 研究方法

1. アデノ随伴ウイルスベクターの構築

amyloid- β 1-43(A β 43) cDNA は、ヒト amyloid precursor protein (APP) 遺伝子を鋳型として PCR にて増幅した。APP の分泌シグナルである N 末の最初の signal sequence adaptor(18 アミノ酸)を A β 1-43 cDNA の 5' 側に結合させた fusion gene ; APP signal sequence+ A β 1-43 cDNA を作成し (図 1)、アデノ随伴ウイルスベクター(pXXUF1)に組み込んだ。次に、このベクターを HEK293 cell に XX2 (AAV packaging plasmid), XX6(adeno helper plasmid)と共に transfection し、recombinant adeno-associated virus (rAAV)を得た。そしてセシウムクロライド超遠心にて精製した。

コントロールとして、GFP (Green fluorescence protein)を発現するアデノ随伴ウイルス (GFP/rAAV)を作成した。

2. アデノ随伴ウイルスの経口投与

分泌型 A β 発現アデノ随伴ウイルスベクター(A β 1-43/rAAV)または GFP 発現アデノ随伴ウイルスベクター (GFP/rAAV) 1×10^{13} genome (1ml) 水溶液をゼラチン化し、腸溶剤カプセルに詰めた薬剤を 1 回のみサルに経

口投与し、3ヶ月後に解剖した。

3. アフリカミドリザル

野生型の年齢不詳 (推定年齢 20 歳以上) の雌サル 3 頭と 23 歳齢の雌サル 1 頭に経口ワクチンを投与した。分泌型 A β 発現アデノ随伴ウイルスベクター投与群 2 頭とコントロールの GFP 発現アデノ随伴ウイルスベクター (GFP/rAAV) 投与群 2 頭に分類した。アフリカミドリザルは、国立感染症研究所霊長類センターより入手した。

4. アフリカミドリザル血清中の抗 A β 抗体の検出

A β 42 ペプチド(5 μ g/ml)を 96 well plate (Nunc, MaxiSorp)の各 well に付着させ、5% non-fat milk/TBS-T buffer でブロック後、アデノ随伴ウイルスを投与したアフリカミドリザルより採取した血清 (前、4 週、8 週)を加え(1000 倍希釈)、peroxidase 標識抗サル IgG 抗体 (2000 倍希釈) で検出した。測定は、ELISA リーダーで吸光度(O.D.450)を測定した。

5. 免疫組織染色

凍結組織切片中の A β 蛋白や老人斑を検出するために、70% formic acid で処理し、5% H₂O₂ で内因性の peroxidase 活性を失活させた。抗 A β 抗体(4G8:1000 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。リンパ球の脳組織浸潤の有無は、HE 染色を行った。

倫理面への配慮

動物、特にマウスに対する実験は、当国立長寿医療センター研究所動物実験施設の倫理規定に基づき、動物に対して苦痛を軽減する投与方法、および安楽死後の処置を行った。遺伝子の構築および遺伝子導入した培養細胞の樹立に関する実験は、当国立長寿医療センター研究所の組み換え DNA 安全委員会の承認 (P2 規制レベル) を得た。

C. 研究結果

1. 各アフリカミドリザルの剖検所見を記す。

1) 動物番号 G-4 (体重: 2.60kg・脳重量: 48.581g)

- ・左腎: 白色結節 (5mm 程度、2 箇所) 及びのう胞 (1mm 程度)
- ・右腎: のう胞 (1-2mm 程度、表面に散在)

・左肺: 癒着 (左肺上部が胸膜と癒着)

・左右肺: 気腫

・右下顎リンパ節 (右下顎部に 10mm 程度の白色のう胞あり、内容液: 粘度なし)

・大脳: 黒色変 (左右月状溝に 1mm 程度の黒色変あり)

2) 動物番号 G-5 (体重: 2.36kg・脳重量: 49.518g)

・肝臓: 表面粗 (肝全体)

3) 動物番号 G-6 (体重: 2.42kg・脳重量: 55.491g)

・左右腎: 退色

・左腎: 桑実状変化

4) 動物番号 G-7 (体重: 2.44kg・脳重量: 53.934g)

・十二指腸: 水疱 (胃~十二指腸結合部 (十二指腸より) に存在、5mm 程度の透明水胞あり、内容液: 粘度あり)

2. アフリカミドリザル血清中の抗 A β 抗体価

経口ワクチン投与により、アフリカミドリザル血清中の抗 A β 抗体価は 2 つのパターンを示した。

1 つは、投与前に比べ著しい増加はないが、4 週後には上昇しており、8 週後には投与前の値に下降した。

2 番目のパターンは、投与群・コントロール群とも、開始前より既に高