

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16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 水澤 英洋

平成17(2004)年4月

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：慢性酸化ストレス状態にある 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) と掛け合わせるにより、アルツハイマー病症状の増悪、老人斑の増加がみられ、これらは A β の産生や分解の異常ではなく血液脳関門を介する排出機構の障害であることを世界で初めて明らかにした。酸化ストレスの老化への影響については 500 匹を超える大型コホートにて観察を続け、神経症状の発現促進への関与とともに、死亡については他の要因も存在する可能性があることを明らかにした。基礎研究では肝細胞内での α TTP のビタミン E の輸送機構の解明を進め、妊娠における α TTP の役割やビタミン E により変動する遺伝子についても明らかにした。

分担研究者

横田 隆徳 東京医科歯科大学大学院医
歯学総合研究科助教授
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

本研究の目的は、まず α TTP 遺伝子変異が直接あるいは生体内で最強の抗酸化物質の α トコフェロールすなわちビタミン E (VE) の欠乏を介して著明な酸化ストレスをきたす動物モデルである α TTP ノックアウトマウスを用いて、老化およびアルツハイマー病などの神経変性疾患における酸化ストレスの関与を解明することである。具体的には 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) とを掛け合わせるにより、老人斑の出現、A β 蛋白蓄積などの Tg2576 の表現型に及ぼす影響を検索する。また、 α TTP ノックアウトマウスを、さらに食餌中の VE 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。

基礎的研究として、肝細胞における α TTP を介するビタミン E 輸送機構の詳細を解明する。

B. 研究方法

α TTP ノックアウトマウスと Tg2576 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

マウスでモリス型水迷路試験を用いた学習記憶能力を解析した。脳内に沈着した Aβ は ELISA と Western blot にて定量した。また、脳内にラジオアイソトープでラベルした Aβ を注入してその消失速度や分解酵素であるネプリライシン活性を測定した。

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、前年度までに雌個体 (α TTP +/-, α TTP -/-) を多数作出し、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, α-tocopherol acetate) 群に分けて SPF 環境下で長期飼育し観察を行った。

肝細胞における α TTP を介する VE の輸送機構の基礎的研究では、1. アミノ酸変異リコンビナント α-TTP の VE 結合能の測定、ヘパトーマ細胞における VE 放出活性の測定、VE とフォスファチジルイノシトールリン酸 (PIP) などの結合能などの分析を行った。

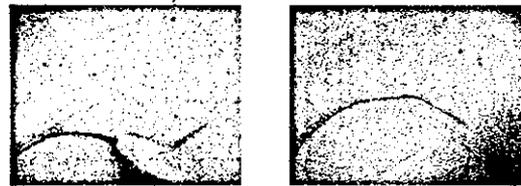
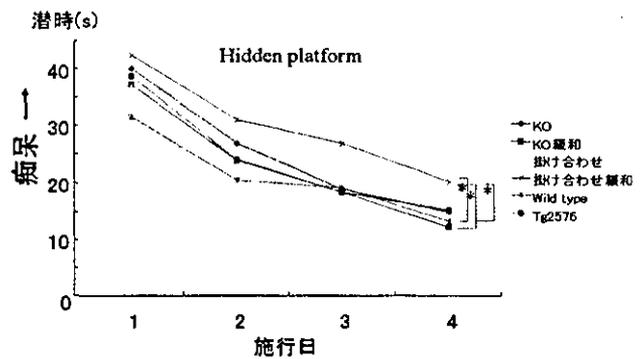
(倫理面への配慮)

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) × (TTP +/+) 正常食群に比し (APP hetero) × (TTP -/-) VE 欠乏食群は platform 到達潜時が長く、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。一方 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) × (α TTP -/-) VE 欠乏食群、(APP hetero) × (α TTP +/+) 正常食群、(APP WT) × (α TTP +/+) 正常食群の順で学習記憶能力が劣っていることを示唆する。脳の SDS 可溶性分画での Aβ 1-40, 1-42 はそれぞれ掛け合わせ群で増加し、病理学的に老人斑の数も増加していた。この Aβ 蓄積の原因として、α TTP ノックアウトマウスの脳に [¹²⁵I] Aβ 1-40 を注入してその消失速度定数を測定したところ、野生型と比し 27.6% の減少を示した。この消失速度の低下は加齢によっても生じるが、8 週齢から 14 週齢までの低下の約 3~4 倍の低下が認められた。この変化が Aβ 分解亢進によるかどうかを検索するために、脳のネプリライシン活性を測定したが遺伝子型による差は認めなかった。



掛け合わせ 10 months ♀ Tg2576 10 months ♀

大脳皮質での老人斑
銀染色 (Campbell-Switzer 法) × 400

長期酸化ストレスに関する研究では、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 匹を得て、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。これまで遺伝子改変群(0, 1)では VE⁻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た(別添)。これらの症状は 0-, 1-群で生後 4 ヶ月頃から出現しはじめる。その増加は 0-群で最も早く、生後 15~6 ヶ月頃には全ての例で同様の症状を呈する。1-群では有症状個体の増加率が 0-群に比して緩徐で全個体が症状を呈するのは 20 ヶ月前後である。VE 添加食群では症状の発現開始時期は生後 8~10 ヶ月頃と遅れるが、一旦症状が出現し始めると有症状個体が急速に増加し 17~8 ヶ月頃には全ての個体が症状を呈するようになる。1+群では発症時期は 10 週以降となり、その後の有症状個体の割合の増加も緩徐である。遺伝子改変を行っていない野生型では VE 摂取量に拘らず症状の発現は見られない。

死亡についてはその期日を比較的に正確に同定できるため、死亡を点事象としてとらえ Kaplan-Meier 法による生存率を計算した(別添)。標本採取のために用いた例を打ち切り例とした。遺伝子改変をした欠乏食群(0-, 1-)では allele の数とは無関係に生後 5 ヶ月以内に約 2 割の個体が症状を呈した後に死亡する。これに対して VE 添加食(0+, 1+)群ではこの時期に症状を呈する例もなく、死亡例も少ない。生後 10 週を過ぎる頃から添加食(0+, 1+)群でも死亡個体が増え始めるが、これらの群でこの時期の死亡個体は神経症状を呈さないまま死に至る例が大部分という点で、VE 欠乏食群とは異なる。生後 15~20 週の時点で 0-, 0+, 1-, 1+群の累積死亡率は 2 割を超え、以後増加していく傾向にあるが、各群間の差異については今後さらに長期に検討を続ける必要がある。

肝細胞内での α TTP の研究では、1 アミノ酸変異リコンビナント α TTP と VE との結合について、H101Q α TTP で著しく低下するのに対して、R59W α TTP は野生型とほぼ同様であった。ヘパトーマ細胞における VE 放出活性は野生型 α TTP では非常に高かったが、H101Q および R59W α TTP ではほとんど見られなかった。PI(3, 4)P₂ およびリコンビナント α TTP の結合については、donor 側に PI(3, 4)P₂ を加えた場合、野生型 α TTP でも R59W α TTP でも変化は見られなかったが、acceptor 側に PI(3, 4)P₂ を加えた場合は、野生型 α TTP では VE の輸送が促進されたのに対して、R59W α TTP においては VE の輸送が逆に阻害されることが分かった。七種類ある PIPs、PI および PS の中では PI(4, 5)P₂ が最も VE の輸送促進効果が高かった。

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 Tg2576 の学習記憶能力がより低下すること明らかになった。酸化ストレスによる A β 蓄積の増加が示され、A β 分解低下よりも血液脳関門(BBB)を介した排泄低下が関与していた。加齢でも類似の A β 排泄低下があることを示したが、 α TTP^{-/-}の脳ではその影響がはるかに大きかった。これは、慢性的酸化ストレスにより、加齢にて生じる脳から血中への A β 排泄の低下が著明に増強されることを世界で初めて示したものである。この α TTP^{-/-}と Tg2576 の掛け合わせマウスは孤発性アルツハイマー病の新しいモデルマウスとして有用と思われる。

α TTP 遺伝子を改変した雌個体を多数作製し、食餌中の VE を欠乏させて両者の影響を観察する総個体数 532 匹という大きな実験コホートを構築し解析した。遺伝子改変動物は、VE の摂取量に拘わらずいずれの群も後肢のひきずり、小刻み歩行、運動量の低下などを呈し、症状

をもつ個体の割合が次第に増加する。 α TTP 遺伝子 allele の欠失のみでも症状の発現時期は早まるが、VE 摂取量の減少により更に早まるので、 α TTP 遺伝子の欠失と、VE 摂取量の減少は、相加的に作用して神経症状の発現を早めていると解釈できる。 α TTP 遺伝子の欠失も、VE 摂取量の減少も体内の VE 含量を減少させる方向に作用するので、生下時に体内に残された VE の補給が充分でないまま成長すると、ある段階でその不足が神経症状の発現という形で顕在化するものと予想される。

変異 α TTP を用いた研究から、H101Q 変異体については *in vitro* でのビタミン E との結合能が著しく低下しており、細胞からの放出活性を持たないのはこのためであるが、R59W 変異型 α TTP の場合は PIPs への結合能が無いことを示した。すなわち、肝細胞からの VE の放出には α TTP と PIPs との相互作用が重要であることが初めて示された。*in vitro* での VE 輸送促進活性は PI(4,5) P_2 が最も高く、形質膜上に多く存在する PI(4,5) P_2 に R59 を介して α TTP が結合し、そこで VE を形質膜に受け渡し、続いて細胞膜上に存在する何らかの ABC transporter によって VE を細胞外へと放出すると考えられる。脂質は水に非常に溶けにくい物質であり、細胞内のオルガネラ間という微小環境の中でも、その輸送には何らかのマシナリーが必要であり本研究の成果はこの一つを示すものと思われる。

E. 結論

α TTP ノックアウトマウスとの掛け合わせという自然に近い状態で慢性酸化ストレスをかけることにより、アルツハイマー病モデルマウス Tg2576 の学習記憶能力が増悪することを初めて明らかにした。さらにその機序として A β 分解の低下よりも、BBB を介した脳から血中への

A β 排泄の低下が原因と考えられることも世界で初めて明らかにした（論文投稿準備中）。このことは、アルツハイマー病の発症機序やその治療研究に新しい視点を与えるとともに、我々が作製した α TTP ノックアウトマウスと Tg2576 の掛け合わせマウスは孤発性アルツハイマー病の新しいモデルマウスとなると期待される。

α TTP 遺伝子数と VE 量を様々に組み合わせた 532 匹の多数のマウスの行動観察から、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欠失と食餌中の VE 欠乏状態の両者に相加的に依存して発現している。他方、死亡個体は欠乏食群 (0-, 1-) で 4~5 ヶ月齢の早期に神経症状を有する個体に多くみられ、逆に添加食群 (0+, 1+) では神経症状を呈さないまま 10 週齢以降に死亡する齢が多かった。この結果は、現時点では酸化ストレスは神経症候の発現には直接的に関係している可能性があるものの、死因としては別の要因も考慮すべきであることを多数例を用いて世界で初めて示したものである（論文投稿準備中）。今後、より長期の観察を続け病理学的・生化学的検索により酸化ストレスの存在と別の要因の究明が進むことが期待される。

肝細胞における α TTP を介した VE の輸送・放出については、 α TTP と VE との結合の他に、PIPs との結合性も重要であることを初めて示した。

以上、本研究においては α TTP ノックアウトマウスを用いることにより、慢性酸化ストレスがアルツハイマー病の発症を促進している可能性を世界で初めて明らかにするとともに、アルツハイマー病の新しい発症機序を示唆し、その動物モデルを作製した。また、500 匹を超える

大きなコホートを構築し、慢性酸化ストレスが恐らく運動失調症状の増悪に関与し、寿命にはそれ以外の要素も関与している可能性を初めて示した。さらに、その背景となる α TTPの基礎的な作用機構についても多くの新知見を明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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 2004;7:87-92
- 2) 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 2004;61:784-790
- 3) Nakamura A, Uchihara T, Dual enhancement of triple immunofluorescence using two antibodies from the same species. J Neurosci Methods 2004;135:67-70
- 4) Umahara T, Uchihara T, Tsuchiya K, et al. 14-3-3 proteins and zeta isoform containing neurofibrillary tangles in patients with Alzheimer's disease. Acta Neuropathol 2004;108:279-286
- 5) Umahara T, Uchihara T, Tsuchiya K et al. Immunolocalization of 14-3-3 isoforms in brains with Pick body disease. Neurosci Lett 2004;371:215-219
- 6) Amino T, Orimo S, Itoh Y et al. Profound cardiac sympathetic denervation occurs in Parkinson's disease. Brain Pathol 2004;15:29-34.
- 7) Uchihara T, Duyckaerts C, Seilhean D et al. Exclusive induction of tau2 epitope in microglia/macrophages in inflammatory lesions -tauopathy distinct from degenerative tauopathies-. Acta

Neuropathol 2005;109:159-164

- 8) Uchihara T, Shibuya K, Nakamura A, Yagishita S. Silver stains distinguish tau-positive structures in corticobasal degeneration / progressive supranuclear palsy and in Alzheimer's disease-Comparison between Gallyas and Campbell-Switzer methods-. Acta Neuropathol, in press
- 9) Uchihara T, Tsuchiya K, Nakamura A, Akiyama H. Silver staining profiles distinguish Pick bodies from neurofibrillary tangles of Alzheimer type -Comparison between Gallyas and Campbell-Switzer methods-. Acta Neuropathol, in press
- 10) Uchihara T, Sanjo N, Nakamura A et al. Transient abundance of presenilin 1 fragments / nicastrin complex associated with synaptogenesis during development in rat cerebellum. Neurobiol Aging, in press
- 11) Orimo S, Kanazawa T, Amino T, Uchihara T. et al. Preserved Cardiac Sympathetic Nerve Accounts for Normal Cardiac Uptake of MIBG in PARK2. Mov Disord, in press
- 12) Orimo S, Amino T, Ito Y, Uchihara T. et al. Cardiac sympathetic denervation precedes neuronal loss in the sympathetic ganglia in Lewy body disease. Acta Neuropathol, in press
- 13) 内原俊記. 原発性進行性失語. Clin Neurosci 2005;23(3):294-296
- 14) 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 2004;48:334-345
- 15) Inoue T, Arai H. Lipid transfer proteins. Seikagaku 2004;76:553-561

2. 学会発表

- 1) 横田隆徳. 家族性特発性ビタミンE欠乏症のモデルマウスの作製・治療法の確

立. 第 15 回ビタミン学会シンポジウム
2004. 1. 23

2) 渋谷克彦、内原俊記、中村綾子、山岡恵子、高橋竜哉、柳下三郎. 皮質基底核変性症(CBD)と進行性核上性麻痺(PSP)の tau2 陽性構造物に対する界面活性剤の影響. 第 4 5 回日本神経病理学会総会学術研究会, 前橋 2004. 5. 26. [Neuropathology, 24(2004)62]

3) 中村綾子、内原俊記、渋谷克彦、柳下三郎. タウ陽性構造物の嗜銀性について免疫染色/銀染色の多重染色による検討. 第 45 回日本神経病理学会総会学術研究会, 前橋 2004. 5. 26. [NEUROPATHOLOGY, 24(2004)63]

4) 内原俊記、渋谷克彦、中村綾子、柳下三郎. タウ陽性構造物の嗜銀性の違い -Gallyas 法と Campbell-Switer 法の比較. 第 45 回日本神経病理学会総会学術研究会, 前橋 2004. 5. 26. [NEUROPAHOLOGY, 24(2004)64]

5) 馬原孝彦、内原俊記、土谷邦秋、中村綾子、小山俊一、岩本俊彦、高橋 優、池田研二、Pick 嗜銀球における 14-3-3 蛋白および isoform の局在. 第 45 回日本神経病理学会学術研究会. 前橋 2004. 5. 26. [NEUROPATHOLOGY, 24(2004)66]

6) 内原俊記、中村綾子、三條伸夫、セントジョージヒスロップピーター. 生後ラット小脳におけるニカストリンとプレセニン 1 の発現, 第 45 回日本神経病理学会学術研究会, 前橋 2004. 5. 26. [NEUROPATHOLOGY, 24(2004)68]

7) 児矢野繁、黒岩義之、柳下三郎、岩淵 繁、内原俊記. SCA2 おける病変の分布及び病理学的特徴 (ataxin-2, polyglutamine および ubiquitin 蛋白の分布. 第 45 回日本神経病理学会学術研究会, 前橋 2004. 5. 28. [NEUROPATHOLOGY, 24(2004)150]

8) 内原俊記、武田嘉恵、小林高義、春日 孟、石川欽也、姜 喜玲、水澤英洋、遠藤太嘉志、広川勝イク、黒岩俊彦. SCA1

遺伝子に軽度の延長を認めた脊髄小脳変性症の一剖検例. 第 45 回日本神経病理学会学術研究会, 前橋 2004. 5. 28 [NEUROPATHOLOGY, 24(2004)151]

9) 児矢野繁、黒岩義之、柳下三郎、岩淵 潔、内原俊記, SCA2 における病変の分布および病理学的特徴 (ataxin-2, polyglutamine および ubiquitin 蛋白の分布), 第 45 回日本神経病理学会総会学術研究会, 前橋 2004. 5. 28. [NEUROPATHOLOGY, 24(2004)150]

10) 内原俊記、武田嘉恵、小林高義、春日 孟、石川欽也、姜 喜玲、水澤英洋、遠藤太嘉志、広川勝いく、黒岩俊彦. SCA1 遺伝子に軽度の延長を認めた脊髄小脳変性症の一剖検例. 第 45 回日本神経病理学会総会学術研究会, 前橋 2004. 5. 28. [NEUROPAHOLOGY, 24(2004)151]

11) 古城徹、内原俊記、高橋敦、網野猛志、織茂智之. パーキンソン病の交感神経障害は心臓に特異的か? 第 4 回 Parkinson's disease Forum, 浦安 2004. 8. 28.

12) 織茂智之、金澤俊郎、篠栗弘貴、網野猛志、高橋敦、古城徹、内原俊記、若林孝一、高橋均. パーキンソン病の心臓交感神経変性は病早期から逆行性に進行する. 第 4 回 Parkinson's disease Forum, 浦安 2004. 8. 28.

13) 金澤俊郎、網野猛志、水澤英洋、織茂智之、横地正之、古城徹、内原俊記、若林孝一、高橋均、服部信隆. PARK2 では心臓交感神経は障害されず心臓の MIBG 集積は保たれる. 第 4 回 Parkinson's disease forum, 浦安 2004. 8. 28.

14) 内原俊記、池田研二、中村綾子、土谷邦秋. Pick 小体の嗜銀性の特徴 - Alzheimer 病との違い -. 第 23 回日本痴呆学会, 東京 2004. 9. 30. [Dementia Japan, 18(2004)156]

15) 町田 明、小林 禅、三明裕知、綿引定清、内原俊記. 随意呼吸障害、運動

性失語、軟口蓋挙上障害を伴い進行性の発語失行を呈した一例. 第 171 回日本神経学会関東地方会, 2004. 11. 27.

16) 内原俊記、中村綾子、三條伸夫、St. George-Hyslop, P., Fraser, P. 生後ラット小脳におけるニカストリンの発現, 第 45 回日本神経学会総会, 東京 2004. 5. 11. [臨床神経, 44(2004)1043]

17) 小林高義、秋本秀昭、小松清秀、遠藤太嘉志、内原俊記. ペニシリン耐性肺炎連鎖球菌による重症髄膜農園 (PRME) の臨床的病理学的研究. 第 45 回日本神経学会総会, 東京 2004. 5. 11. [臨床神経, 44(2004)1061]

18) 児矢野繁、黒岩義之、岩淵潔、柳下三郎、内原俊記. 遺伝性脊髄小脳変成症における橋神経細胞の病理学的特徴. 第 45 回日本神経学会総会, 東京 2004. 5. 11. [臨床神経, 44(2004)1067]

19) 織茂智之、網野猛志、古城徹、内原俊記、高橋敦、若林孝一、高橋均. パーキンソン病 (PD) の心臓交感神経病変はごく早期に始まる可能性がある. 第 45 回日本神経学会総会, 東京 2004. 5. 14. [臨床神経, 44(2004)1150]

20) 古城徹、内原俊記、高橋敦、網野猛志、織茂智之. パーキンソン病 (PD) に伴う交感神経障害の各種臓器における免疫組織化学的検討. 第 45 回日本神経学会総会, 東京 2004. 5. 14. [臨床神経, 44(2004)1150]

21) 馬原孝彦、内原俊記、土谷邦秋、中村綾子、小山俊一、岩本俊彦、高崎優. Pick 嗜銀球における 14-3-3 蛋白の免疫染色性. 第 45 回日本神経学会総会, 東京 2004. 5. 14. [臨床神経, 44(2004)1174]

22) 金澤俊郎、網野猛志、織茂智之、横地正之、内原俊記、若林孝一、高橋均、服部信隆、水澤英洋. PARK2 では心臓交感神経は障害されず心臓の MIBG 集積は保たれる. 第 45 回日本神経学会総会, 東京 2004. 5. 14. [臨床神経,

44(2004)1185]

23) 網野猛志、金澤俊郎、島津誠一郎、内原俊記、織茂智之、水澤英洋. 正常 mouse における心臓交感神経の分布—パーキンソン病の自律神経障害の解明に向けて—. 第 45 回日本神経学会総会, 東京 2004. 5. 14. [臨床神経, 44(2004)1185]

24) 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、東京、2004. 1. 23.

25) 斎藤尚子、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、東京 2004. 1. 23.

26) 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 15 回ビタミン E 研究会、東京 2004. 1. 23.

27) Hiroyuki Arai. α -TTP, a cytosolic protein that facilitates the excretion of vitamin E from hepatocytes. The 5th International Conference on Lipid Binding Proteins, Zao, 2004. 9.

28) Tatsufumi Hiramatsu, Takao Inoue, Hiroyuki Arai. Mechanisms of α -tocopherol transfer protein-dependent α -tocopherol secretion from hepatocytes. The 5th International Conference on Lipid Binding Proteins, Zao, 2004. 9.

29) Hiroyuki Arai. α -TTP, a cytosolic protein that facilitates the excretion of vitamin E from hepatocytes. The 77th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society, Yokohama, 2004. 10.

30) 平松達史、井上貴雄、新井洋由. AVED の原因となる変異 R59W を用いた α -TTP

の機能解析

第16回ビタミンE研究会、山口
2005. 1.

31) 竹中麻子、坂本真理子、野田香織、
新井洋由、木村久美. インスリンによる
 α -TTP の合成制御. 第16回ビタミン
E研究会、山口 2005. 1.

G. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得

・アルツハイマー病の発症機序の動物モ
デルとしての α TTP ノックアウトマウス
(特許申請手続き中)

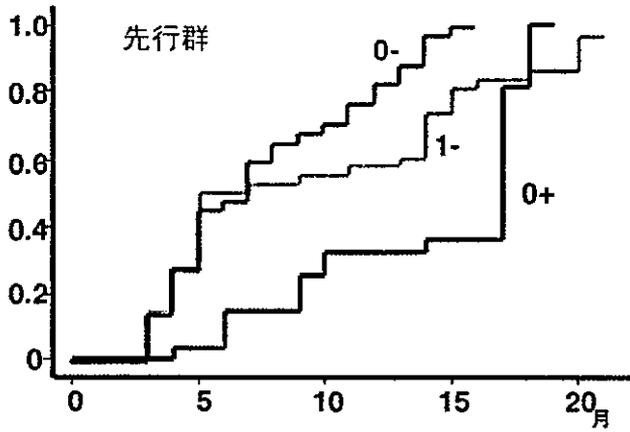
実用新案登録

なし

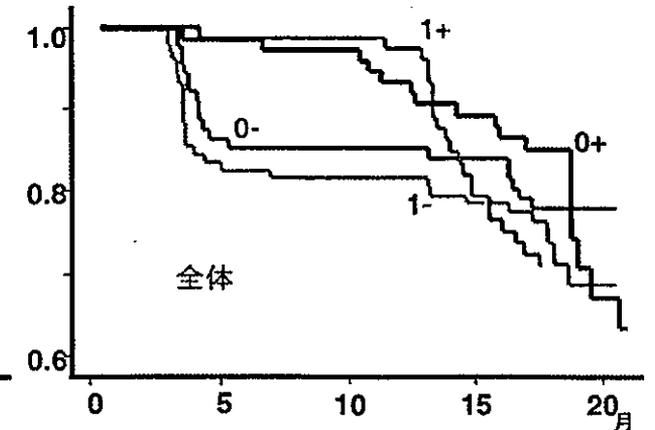
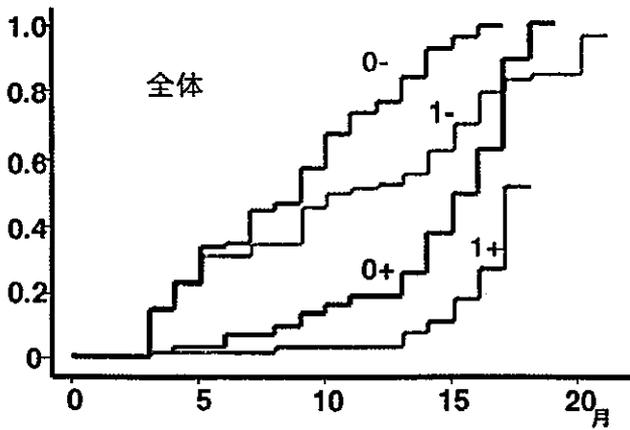
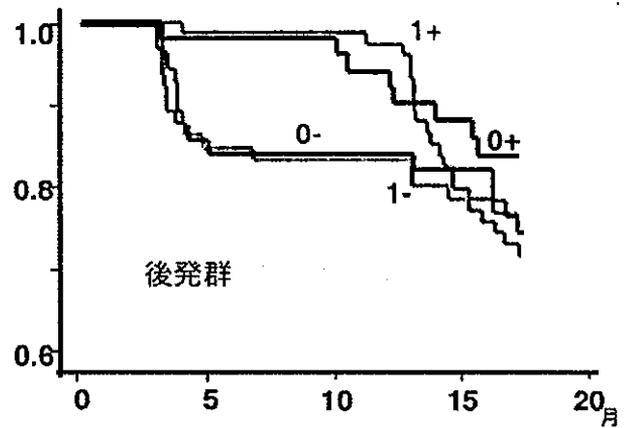
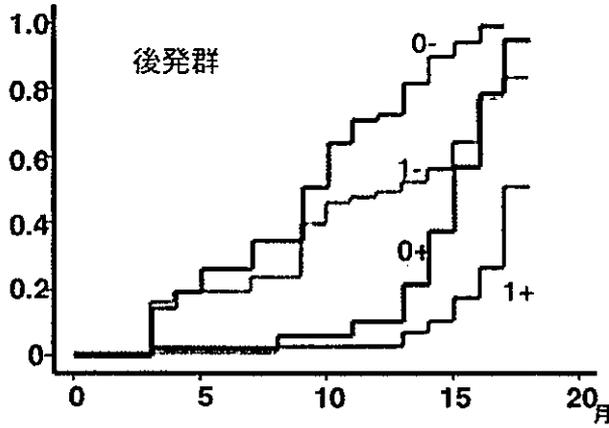
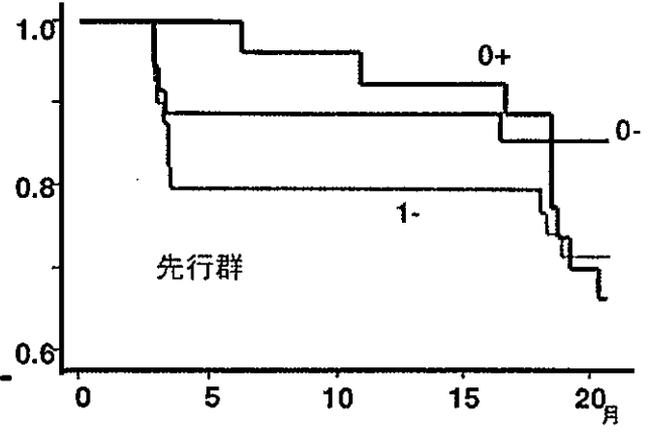
3. その他

2003 年6月 横田隆徳. 日本ビタミン学
会 学会賞受賞

症状発現率曲線(生命保険数理法)



生存率曲線(Kaplan-Meier法)



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) の発症機序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病態

研究要旨 α -tocopherol transfer protein ノックアウトマウス (α TTP KO) と掛け合わせをすることによる慢性酸化ストレス負荷によりアルツハイマー病モデルマウス (Tg 2576) の学習記憶能力障害は増悪し、脳内 A β 量および老人斑の数は増加した。さらに α TTP KO において A β の排泄機能が障害されていることを示した。これらの結果から酸化ストレスにより脳から血中への A β の排泄が低下することがアルツハイマー病の原因の 1 つである可能性が示された。作製された α TTP KO と Tg 2576 の掛け合わせマウスは孤発性アルツハイマー病発症の新しいモデルマウスとなるかも知れない。

A. 研究目的

変異 APP トランスジェニックマウス (Tg2576) と中枢神経系に慢性酸化ストレスのかかったモデルマウスである α -tocopherol transfer protein ノックアウトマウス (α TTP KO) とを掛けあわせることにより、認知障害・A β 代謝・老人斑の出現などの Tg2576 の表現型に及ぼす影響を検索し、その機序を検討する。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、孤発性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 KO と Tg2576 を交配し、(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 種の遺伝子型の個体を得る。 α TTP KO の遺伝子型をもつもの一部はビタミン E 過剰食により部分的に酸化ストレスを緩和させた群も作成する。10 ヶ月齢オスマウスでモリス型水迷路試験を用いて学習記憶能力を解析し、脳内 A β を ELISA, Western blot にて定量する。

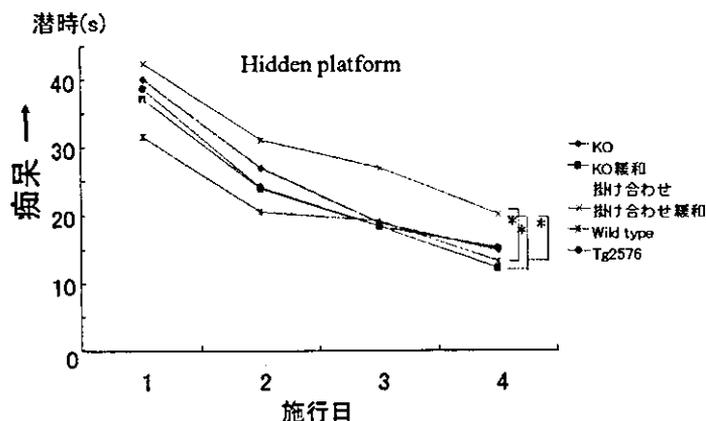
また α TTP KO の大脳 S2 領域に [125 I]A β 1-40 を注入して投与し、その消失速度を調べ飽和性の有無も検討した。さらにその変化が A β 分解速度の変化であるかを検索する目的で α TTP KO マウスの大脳のネプリライシン活性を定量した。

すべての動物実験は東京医科歯科大学動物実験倫理委員会の審査と許可を得て行ない、動物の苦痛を除く最大限の努力をした

C. 研究結果

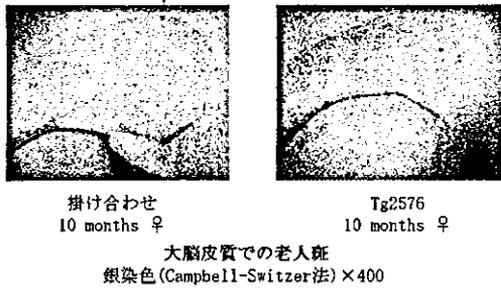
(APP hetero) \times (α TTP KO) は (APP hetero)

\times (α TTP WT) と比べ hidden platform test での platform 到達潜時が長く、probe test での target quadrant 滞在時間も短かった (下図)。Annulus crossing index [= (target quadrant の platform 位置の通過回数) - (他の 3 つの quadrant の platform 位置の通過回数の平均)] も同様の傾向を認めた。全ての群において swimming speed、visible platform test での platform 到達潜時に差は認めず、動機づけや運動能力には群間での差を認めなかった。

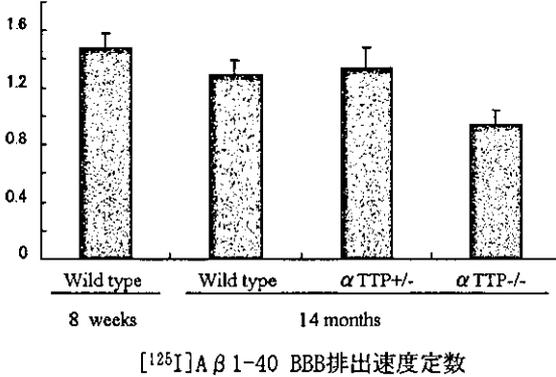


ビタミン E 過剰食の緩和群で治療効果を認めなかったのは、血中のビタミン E が効率よく脳内に入らないためと考えられた。

大脳 SDS 可溶性分画での Aβ 1-40, 1-42 はそれぞれ掛け合わせ群で増加の可能性が示唆され、病理学的に老人斑の数も増加していた。

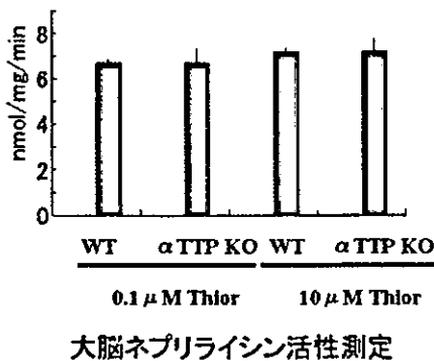


この Aβ 蓄積の原因として、αTTP KO の大脳に [¹²⁵I]Aβ 1-40 を注入してその消失速度定数を測定したところ、αTTP KO は WT と比し 27.6%減少した。この消失速度の低下は加齢によっても生じるが、8週齢から14週齢までの低下の約 3-4 倍の低下が認められた (下図)。



また、消失には非ラベル Aβ 投与により飽和性を認めたため、この変化は競合性の変化であることが示された。

さらにその変化が Aβ 分解速度の変化であることを検索する目的で αTTP KO マウスの大脳のネプリライシン活性を測定したが遺伝子型による差は認めなかった。



D. 考察

大脳への慢性酸化ストレスにより Tg2576 の学習記憶能力はより低下した。酸化ストレスによる Aβ 蓄積の増加が示され、一因として、Aβ 分解低下よりも BBB を介した排泄低下が関与していた。加齢でも類似の Aβ 排泄低下があることを示したが、αTTP KO の大脳ではその影響ははるかに大きかった。

孤発性アルツハイマー病では、Aβ の蓄積が病因となるという Aβ 仮説が有力だが、その原因として Aβ の産生が増加しているという根拠はない。今回の我々の実験結果は、慢性の酸化ストレスにより、加齢にておこる脳から血中への Aβ の排泄の低下が著明に増強されることが示された。したがって、作製された αTTP KO と Tg 2576 の掛け合わせマウスは孤発性アルツハイマー病発症の新しいモデルマウスとなるかも知れない。

今後、Aβ の排泄輸送に関わる転送蛋白を特定し、その発現量と機能を解析し、いかに酸化ストレスがこの排泄輸送機能に影響したかを明らかにしたい。これらの研究より孤発性アルツハイマー病発症機序を明らかにして、有効な治療薬の創薬を目指したい。

E. 結論

慢性酸化ストレスにより Tg2576 の学習記憶能力障害は増悪する。これには Aβ 分解よりも BBB を介した脳から血中への Aβ 排泄の低下が原因と考えられた。作製された αTTP KO と Tg 2576 の掛け合わせマウスは孤発性アルツハイマー病発症の新しいモデルマウスとなる可能性がある。

F. 研究発表

- 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 2003;21:177-179.
 - 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;91:687-690.
 - 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 2004;7:87-92.

2. 学会発表

- 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および治療法の確立、第 55 回ビタミン学会学会賞受賞講演。2003.5.29
- 横田隆徳: 家族性特発性ビタミン E 欠乏症のモデルマウスの作製、治療法の確立、第 15 回ビタミン学会シンポジウム、2004.1.23

G. 知的財産権の出願・登録状況

- 特許取得; アルツハイマー病の発症機序の動物モデルとしての αTTP ノックアウトマウス (特許申請手続き中)

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

α-tocopherol輸送蛋白質（α-TTP）の肝細胞内でのα-tocopherol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

これまでにα-TTPの生理的機能については比較的良く解析されていたが、実際に肝細胞において、細胞質に存在するα-TTPが、エンドサイトーシスにより取り込まれたキロミクロンから、どのようにα-tocopherolを受け取り、さらにそれをどのようにVLDLへと受け渡しているかについては、殆ど明らかになっていない。我々は肝細胞内で、α-TTPがどのような分子メカニズムでα-tocopherolを輸送しているかについて、ヒトの先天性ビタミンE欠乏症で見つかった一アミノ酸変異を利用して解明することを試みた。

A. 研究目的

1) これまでにα-TTPの生理的機能については比較的良く解析されていたが、実際に肝細胞において、細胞質に存在するα-TTPが、エンドサイトーシスにより取り込まれたキロミクロンから、どのようにα-tocopherolを受け取り、さらにそれをどのようにVLDLへと受け渡しているかについては、殆ど明らかになっていない。我々は肝細胞内で、α-TTPがどのような分子メカニズムでα-tocopherolを輸送しているかについて、ヒトの先天性ビタミンE欠乏症で見つかった一アミノ酸変異を利用して解明することを試みた。

正常人では、血中のα-tocopherol濃度は、約9μg/mlだが、486番目のTが欠損してα-TTPをほとんど失うような変異を持つ患者の血中α-tocopherol濃度は、0.3μg/ml以下と非常に低い。一方、R59W点変異の患者は一アミノ酸変異であるにも関わらず、α-tocopherol濃度は、同様に非常に低く、また、我々が日本で発見したH101Q点変異の場合では、血中濃度はそれよりやや高い値を示した。そこで、R59WおよびH101Q点変異が、α-TTPの機能に関してどのような影響を及ぼすか、解析を行った。

2) α-TTPは、食餌由来のα-tocopherolの肝臓から全身への供給量を規定する重要な因子である。我々はストレプトゾトシン（STZ）誘発糖尿病ラット中のα-TTP量が減少すること、さらにラット初代培養肝細胞では培地中のインスリン濃度の変化に应答してα-TTP量が変動することを見だし、α-TTPの翻訳以降の合成過程あるいは安定性にインスリンが関与している可能性を示していた。本研究では糖尿病時の肝臓α-TTP量の変動が肝臓中および血中のα-tocopherol濃度に与える影響について検討を行った。

B. 研究方法

1) a) α-TTPおよび変異型のリコンビナント蛋白質を作製した。このリコンビナント蛋白質と

放射標識したα-tocopherolを37°Cでインキュベーションした後、ゲル濾過カラムで分画し、各フラクションのα-TTPおよびα-tocopherolの放射性活性を調べることによってwild-typeおよび変異型α-TTPのα-tocopherolに対する結合能を検討した。

b) 細胞レベルでα-TTPの機能を解析する目的で、次のような系を用いて解析を行った。ラットヘパトーマMcARH7777細胞に細胞外から放射標識したα-tocopheryl acetateを加えると、細胞内の非特異的エステラーゼにより細胞内にα-tocopherolが生成されるが、α-TTPはこのα-tocopherolを細胞外へ放出する。そこで、McARH7777細胞にmyc-tagをつけたwild-typeおよび変異型のα-TTPを定常的に発現させ、細胞外に放出されるα-tocopherolを測定することによって細胞レベルでのα-TTPの機能を評価した。

c) 2002年にホスファチジルイノシトールリン酸（PIPs）を解析していたイギリスのグループが、PIPsに結合する分子を網羅的に検索する過程で、偶然にもPI(3,4)P₂のbeadsにα-TTPが特異的に結合することを報告した（C. Krugman *et al.* Mol. Cell. 9, 95 (2002)）。我々はこのbeadsを入手し、α-TTPとPI(3,4)P₂のbeadsの結合を検討した。続いて*in vitro*で、α-TTPによるα-tocopherolの膜間の輸送能に対するPI(3,4)P₂の効果について解析した。膜間の輸送はacceptor liposomeおよびdonor liposomeという二つのliposomeを用いて、次のように行った。Acceptor側のliposomeはPC及びPEを加えて作製し、donor側のliposomeには、それらの他にlactosylceramide及び基質となる放射標識されたα-tocopherolを加えた。これらにα-TTPを加え、一定時間incubationした後、RCA-120を加え、lactosylceramideを含むdonor側のliposomeのみを特異的に沈殿させ、上清中のacceptor liposomeに移行したα-tocopherol量を測定した。

2) 初体重100g前後のWistar系雄ラットを2

群に分け、一方には 45mg/kg 体重の STZ を腹腔内投与して糖尿病を誘発し（糖尿病群）、もう一方にはクエン酸バッファーを投与した（対照群）。糖尿病群と対照群の摂食量を pair-feeding により合わせて 21 日間飼育した。投与 22 日目に 12 時間絶食後解剖し、肝臓、血清サンプルとして得た。肝臓、血中の各脂質濃度、 α -tocopherol 濃度、肝臓 α -TTP の mRNA 量およびタンパク量を測定した。

C. 研究結果

1) a) R59W および H101Q α -TTP は、wild-type の α -TTP と同様にリコンビナント蛋白質がとれることが分かった。したがって、これらの一アミノ酸変異によっても、蛋白質の安定性が大きく損なわれているのではないことが示唆された。次に結合性について検討したところ、void に溶出される放射活性に加えて、リコンビナント α -TTP が溶出される 30kDa の位置に、放射標識された α -tocopherol が同時に溶出されてきた。次に、H101Q α -TTP で同様の実験を行ったところ、蛋白質は分子量 30kDa の位置に溶出されるにも関わらず、この位置に溶出される α -tocopherol のピークは非常に低くなっており、H101Q α -TTP は、 α -tocopherol との結合能が著しく低下していることが示唆された。一方、R59W α -TTP では、興味深いことに、wild-type とほぼ同様の α -tocopherol のピークが観察され、wild-type と R59W α -TTP では α -tocopherol に対する結合能にほとんど差がないことが明らかとなった。

b) 細胞レベルでの解析を行ったところ、親株の McARH7777 細胞でもある程度 α -tocopherol が細胞外へと放出されたが、そこに wild-type の α -TTP を導入することによって α -tocopherol の細胞外への放出が著しく促進された。一方、H101Q および R59W 変異型の α -TTP を導入した場合、蛋白質はほぼ同程度発現しているにも関わらず、放出の促進活性はほとんどみられなかった。

c) α -TTP と PI(3,4)P₂との結合を解析するために、まず、 α -TTP と PI(3,4)P₂ beads の結合を検討する実験を行った。 α -TTP と PI(3,4)P₂の beads をインキュベーションすると、確かに結合がみられ、さらにこの結合は α -TTP と PI(3,4)P₂をプレインキュベーションすることで阻害されることがわかった。次に、R59W α -TTP が PI(3,4)P₂ beads に結合できるかどうか同様に検討したところ、beads への結合が全くみられないことが明らかになった。

Acceptor あるいは donor 側の liposome に PI(3,4)P₂を加えた場合の、 α -TTP による α -tocopherol の輸送活性に対する影響を調べた。まず、PI(3,4)P₂を全く加えない場合、R59W α -

TTP は wild-type α -TTP より輸送活性はむしろ高かった。次に、donor 側に PI(3,4)P₂を加えた場合、wild-type の α -TTP でも R59W α -TTP でも変化は見られなかったが、acceptor 側に PI(3,4)P₂を加えた場合は、wild-type の α -TTP では α -tocopherol の輸送が促進されたのに対して、R59W α -TTP においては、 α -tocopherol の輸送が逆に阻害されることが分かった。次に、この促進効果に対する他の PIPs の特異性を検討した。七種類ある PIPs、PI および PS について輸送活性に対する影響を調べたところ、PI(3,4)P₂より PI(4,5)P₂の方が促進活性は高く、ほかに PI(4)P、PI(3,5)P₂にも促進活性があることが分かった。

2) 肝臓 α -TTP の mRNA 量には両群で差がみられなかった。 α -TTP タンパク量は糖尿病群で対照群と比べて有意に減少した。肝臓トリグリセリド濃度、総脂質濃度は糖尿病群で対照群と比べて有意に減少したが、 α -tocopherol 濃度は有意に増加した。血清中の α -tocopherol 濃度は両群で有意差はみられなかった

D. 考察

1) 解析を行った遺伝病を起こす一アミノ酸変異体、R59W および H101Q のどちらも細胞からの α -tocopherol 放出活性を持たなかったが、H101Q 変異体については *in vitro* での α -tocopherol との結合能が著しく低下しており、細胞からの放出活性を持たないのは、この変異体が α -tocopherol と結合できないためであると考えられた。一方、R59W 変異体においては、 α -tocopherol との結合能は wild-type と同等であったが、PIPs との結合能が著しく低下していることが明らかになった。これらのことから、R59W 変異型 α -TTP が、肝細胞からの α -tocopherol を放出する活性を示さないのは、この変異体が PIPs への結合能が無いことが原因であると考えられ、言い換えれば、肝細胞からの α -tocopherol の放出には、 α -TTP と PIPs との相互作用が重要であることがはじめて示唆された。

これまでの解析から、 α -TTP による肝細胞からの α -tocopherol の放出は、VLDL の放出を阻害する brefeldin A という試薬では全く阻害されず、ABC トランスポーターの阻害剤である glyburide で有意に阻害される。このことから、肝細胞において、 α -TTP は、分泌過程にある VLDL に α -tocopherol を受け渡しているのではなく、まず形質膜に α -tocopherol を輸送し、そこで何らかの ABC トランスポーターを介して細胞の外側で α -tocopherol を VLDL へと受け渡していることが当教室の研究によって示唆されていた。

本研究において、肝細胞からの α -TTP による α -tocopherol の放出には PIPs の重要性が示された。また、*in vitro* での α -tocopherol 輸送促進活

性は PI(4,5)P₂ が最も高かった。PIPs の中で定常状態の細胞においては PI(4,5)P₂ が最も多く、そのほとんどが形質膜に存在している。我々は、形質膜上に多く存在する PI(4,5)P₂ に R59 を介して α-TTP が結合し、そこで、α-tocopherol を形質膜に受け渡し、続いて細胞膜上に存在する何らかの ABC transporter によって α-tocopherol を細胞外へと放出する、というメカニズムを考えている。

ABC transporter ファミリーに属する分子のうち、α-tocopherol の血中への排出にどの分子が関わっているのかはまだ明らかになっていない。ABCA1 ノックアウトマウスにおいて血中 α-tocopherol 濃度が著しく低下すること、また、ABCA1 蛋白質が sinusoidal 側に特異的に発現していることから、α-TTP による α-tocopherol の放出には ABCA1 が関わっているのではないかと考え、現在解析を進めているところである。

2) これまでに、生体内で α-tocopherol 量の維持に重要な役割を果たしている α-TTP について、その発現を制御する因子やメカニズムについては全く明らかになっていなかった。今回の我々の結果から、インスリン分泌不全型糖尿病ラットでは肝臓の α-TTP 蛋白質量が減少し、肝臓中には α-tocopherol が蓄積していることが示された。

また、我々は、ABCA1 ノックアウトマウスにおいて肝臓 α-TTP 発現量が減少することやマラリア感染マウスにおいて、肝臓の α-TTP 発現量が減少するというような α-TTP が個体レベルで変動する現象を見出している。

これらの解析を進め、α-TTP の発現量制御のメカニズムをさらに詳細に解析していきたい。

E. 結論

1) ヒトの先天性ビタミン E 欠乏症を引き起こす一アミノ酸変異のうち、H101Q 変異体においては α-tocopherol との結合能が低下することによって肝細胞からの α-tocopherol の放出ができなくなると考えられた。

一方、ヒトの先天性ビタミン E 欠乏症を引き起こす一アミノ酸変異のうち、R59W 変異体においては α-tocopherol との結合能は wild-type と同等であったが、PIPs との結合性がなくなること、また、PIPs を含有するリポソームに対する α-tocopherol 輸送の選択性が減少することが明らかとなり、このことにより肝細胞からの α-

tocopherol の放出できなくなることが考えられた。

2) 糖尿病モデルマウスにおいて α-TTP の発現量が有意に減少し、一方で、肝臓中の α-tocopherol 量が増加していることが明らかとなり、糖尿病における α-TTP の関与が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) T. Inoue, H. Arai
Lipid transfer proteins.
Seikagaku 76, 553-561 (2004)

2. 学会発表

1) α-TTP, a cytosolic protein that facilitates the excretion of vitamin E from hepatocytes

Hiroyuki Arai

The 5th International Conference on Lipid Binding Proteins, Zao, Japan.
(2004.9)

2) Mechanisms of α-tocopherol transfer protein-dependent α-tocopherol secretion from hepatocytes

Tatsufumi Hiramatsu, Takao Inoue, Hiroyuki Arai

The 5th International Conference on Lipid Binding Proteins, Zao, Japan.
(2004.9)

3) α-TTP, a cytosolic protein that facilitates the excretion of vitamin E from hepatocytes

Hiroyuki Arai

The 77th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society, Yokohama, Japan.
(2004.10)

4) AVEDの原因となる変異R59Wを用いたα-TTPの機能解析

平松達史、井上貴雄、新井洋由

第 16 回 ビタミン E 研究会、山口
(2005.1)

5) インスリンによるα-TTPの合成制御

竹中麻子、坂本真理子、野田香織、新井洋由、木村久美

第 16 回 ビタミン E 研究会、山口
(2005.1)

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(αTTP)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。昨年度作製したこれらのマウスを先行群 105 匹、後発群 246 匹を対照群 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)に分けて飼育し先行群は生後 20 ヶ月まで、後発群は生後 17 ヶ月まで観察した。後肢のひきずりや小刻み歩行を呈する個体はホモノックアウト欠乏食群(0-)で生後 4 ヶ月頃から出現し、次第にその割合が増加生後 16 ヶ月頃にすべての個体で類似の症状を認めたが、ホモノックアウト添加食群(0+)では発症の時期が平均で 1 ヶ月以上遅延した。ヘテロノックアウト個体では欠乏食群(1-)、添加食群(1+)共にホモノックアウト群に比較して症状の発現が 1 ヶ月以上遅延した。これらの症状は遺伝子改変しない正常対照では欠乏食群(2-)でも添加食群(2+)でも殆ど認められない。αTTP 遺伝子の欠失数と、VE 摂取量の減少が加算的に上記神経症状の発現時期を早めており、両者が VE の欠乏状態を相乗的に惹起し、神経症状発現にいたる可能性が示唆される。一方、個体の死亡率は遺伝子改変した個体の欠乏食群では allele の数に拘わらず生後 4-5 ヶ月で約 2 割の個体が症状を呈した後死亡する。添加食群でも allele 数に拘わらず生後 11-16 ヶ月の間に比較的急激に個体数の減少がおこるが、症状を呈さないまま死亡する点で欠乏食群とは異なる。αTTP 遺伝子欠失により早期の死亡または寿命の短縮が起こり、VE の摂取によりこれらが緩和される。神経症状の発現は同遺伝子の改変 allele 数と VE 摂取量の両者に依存するが、死亡の起こる時期は VE 摂取量に依存し、改変 allele 数には依存しない点で異なり、両者の機序は一部異なることが示唆される。今後正常個体の死亡時期を念頭に観察を続け、組織中の VE 量、酸化ストレスの状態などを比較し、老化過程における寿命制御メカニズムを解明する。

A.研究目的

ビタミン E (VE)は生体内で最も強力な抗酸化物質であり、その投与が酸化ストレスを緩和することを通して老化、変性、発癌等の過程に拮抗することが期待されている。しかし、実際の生体内で長期にその影響を観察した実験は比較的乏しく、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 (αTTP)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αTTP 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、その制御を通じ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

B.研究方法

a. αTTP 遺伝子改変個体の飼育、観察
多数のαTTP 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αTTP 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。

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。

第 1 回目の作出で十分な個体数が得られなかったので、2 回目の作出を行い、それぞれ先行群(第 1 回目作出個体)、後発群(第 2 回目作出個体)とした。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 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。

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("+")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。

症状は後ろ足のひきずり、小刻み歩行、運動量の低下である。

平成 17 年 2 月末までの総計を示す

先行群 (生後 20 ヶ月)		遺伝子個体数			
	死亡	残	有症状		
0-	36 (13.8%)	27	27(100%)		
0+	30 (30.0%)	18	18(100%)		
1-	41 (26.8%)	27	24(88.9%)		
2-	40 (7.5%)	34	0(0%)		
2+	40 (10.0%)	33	0(0%)		

後発群 (生後 15 ヶ月)		遺伝子個体数			
	死亡	残	有症状		
0-	54 (22.6%)	39	39(100%)		
0+	50 (16.0%)	39	36(92.3%)		
1-	65 (23.1%)	47	36(76.6%)		
1+	76 (27.6%)	52	18(34.6%)		
2-	50 (2.0%)	46	0(0%)		
2+	50 (2.0%)	46	0(0%)		

b.有症状個体の経時的変化について

遺伝子改変群で後ろ足の引きずり、小刻み歩行、運動量の低下などが観察された。症状を呈し始めた正確な期日を同定することは困難なので、毎月末に症状の有無を全例で確認しその月に症状を呈するようになった個体を同定した。即ち、一定の時間幅内に症状を呈した例をまとめ、症状を呈さずに死亡した個体や標本採取のために用いた例を打ち切り例として生命保険数理法による症状発現率の変化を先行群、後発群、およびこれらを合わせた全体で算出した。同症状を有する個体は欠乏食飼育の 0-,1-群で生後 4 ヶ月頃から出現しはじめる。その増加は 0-群で最も早く、生後 15-6 ヶ月頃には全ての例で同様の症状を呈する。1-群では有症状個体の増加率が 0-群に比して緩徐で全個体が症状を呈するのは 20 ヶ月前後である。

VE 添加食群では症状の発現開始時期は生後 8-10 ヶ月頃と遅れるが、一旦症状が出現し始めると有症状個体が急速に増加し 17-8 ヶ月頃には全ての個体が症状を呈するようになる。1+群では発症時期は 10 週以降となり、その後の有症状個体の割合の増加も緩徐である。遺伝子改変を行っていない wild type では VE 摂取量に拘らず症状の発現は見られない。

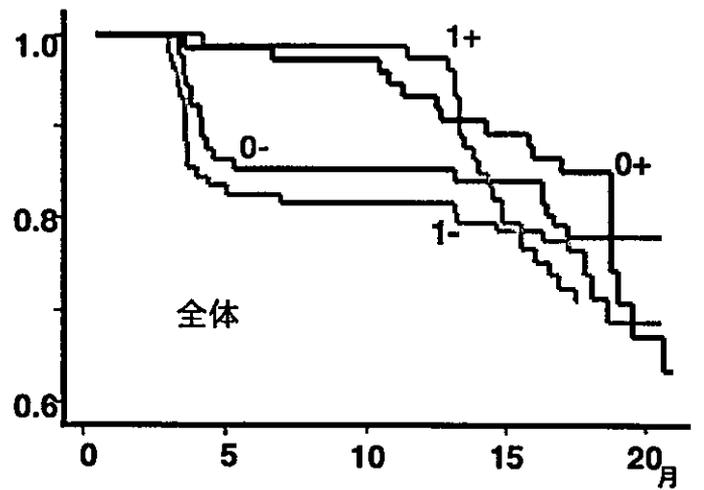
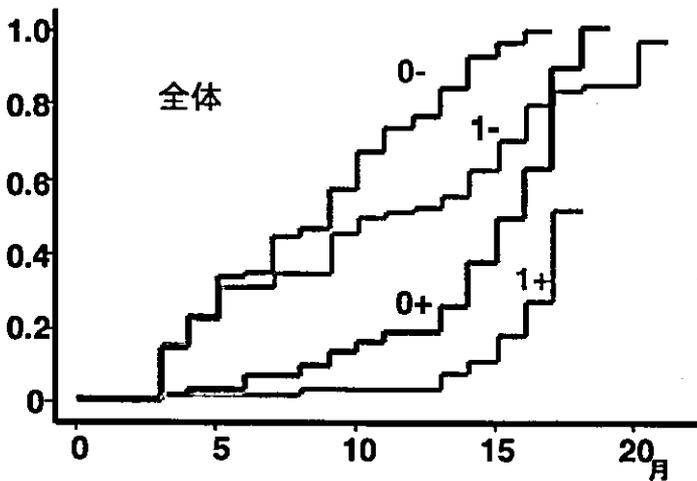
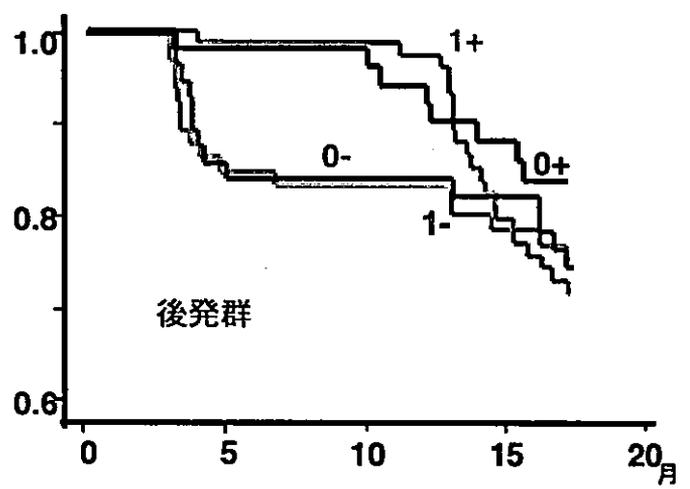
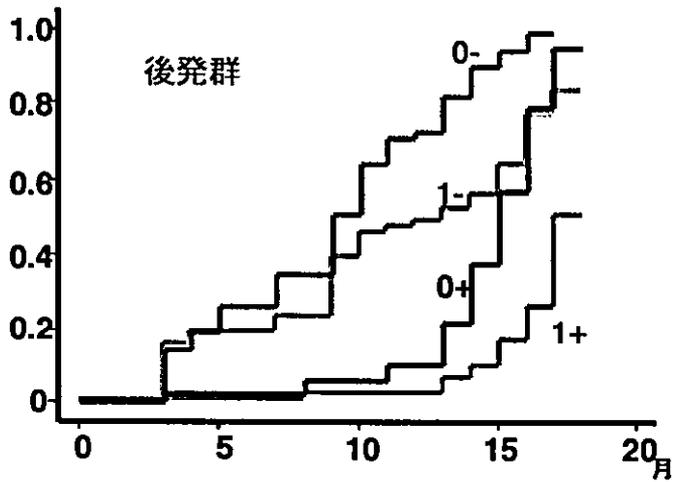
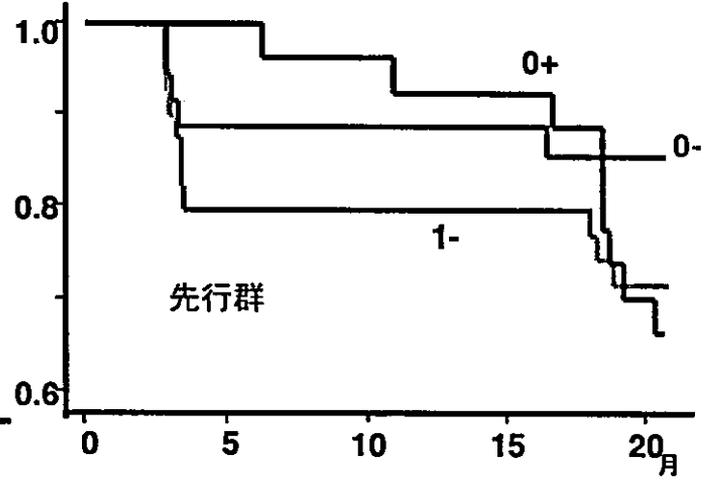
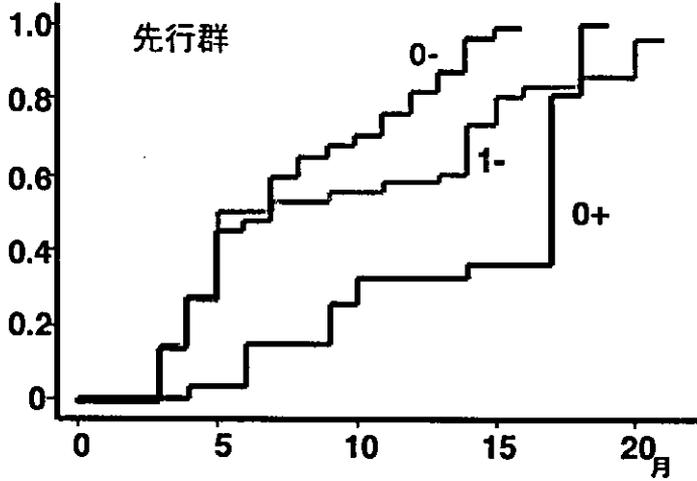
以上より α TTP 遺伝子の allele 数の減少と、VE 摂取量の減少が加算的に上記神経症状の発現時期を早めており、両者が VE の欠乏状態を相乗的に惹起し、神経症状発現にいたる可能性が示唆される。

c.死亡率の経時的変化について

症状の発現期日を正確に同定するのが実際的には困難であるのに対して、死亡の期日は比較的正確に同定できる。したがって死亡を点事象としてとらえ Kaplan-Meier 法による生存率を計算した。標本採取のために用いた例を打ち切り例とした。遺伝子改変をした欠乏食群(0-, 1-)では allele の数とは無関係に生後 5 ヶ月以内に約 2 割の個体が症状を呈した後に死亡する。これに対して VE 添加食(0+,1+)群ではこの時期に症状を呈する例もなく、死亡例も少ない。生後 10 週を過ぎる頃から添加食(0+,1+)群でも死亡個体が増え始めるが、これらの群でこの時期の死亡個体は神経症状を呈さないまま死に至る例が大部分という点で、VE 欠乏食群とは異なる。生後 15 週-20 週の時点で 0-, 0+, 1-, 1+群の累積死亡率は 2 割を超え、以後増加していく傾向にあるが

症状発現率曲線(生命保険数理法)

生存率曲線(Kaplan-Meier法)



各群間の差異については今後さらに長期に検討を続ける必要がある。

D. 考察

遺伝子改変動物は、VE の摂取量に拘わらずいずれの群も後肢のひきずり、小刻み歩行、運動量の低下などを呈し、症状をもつ個体の割合が次第に増加する。 α TTP 遺伝子 allele の欠失のみでも症状の発現時期は早まるが、VE 摂取量の減少により更に早まるので、 α TTP 遺伝子の欠失と、VE 摂取量の減少は、相加的に作用して神経症状の発現を早めていると解釈できる。 α TTP 遺伝子の欠失も、VE 摂取量の減少も体内の VE 含量を減少させる方向に作用するので、生下時に体内に残された VE の補給が充分でないまま成長すると、ある段階でその不足が神経症状の発現という形で顕在化するものと予想される。ここに介在する VE の作用が抗酸化作用であるとすれば、組織内の酸化ストレスマーカーは VE の欠乏に伴って上昇していることが予想され、今後組織中の VE 濃度や各種のマーカーを用いた検索を進める必要がある。

これに対して生存曲線は全く異なる様相を呈した。即ち、遺伝子改変個体の VE 欠乏群(0-,1-)では生後 45 ヶ月の早期の段階で症状を呈した後死亡する個体が allele 数に拘わらず 2 割に近い。しかし遺伝子改変個体の VE 添加群(0+,1+)ではこの早期死亡はおこらず、10-14 週頃に死亡例が増える。さらに VE 欠乏群の早期死亡が症状の発現後であったのに対し、VE 添加群に起こった 10 週以降の死亡は神経症状を伴わなかった例が殆どであることが特徴である。また allele 数の違い(0 または 1)が死亡個体の割合に殆ど影響を与えていない点も症状発現を指標にした場合とは異なる。以上より個体の死亡に対する α TTP 遺伝子と VE の役割は必ずしも相加的でなく、遺伝子の gene dosage による影響も明らかでない。また早期死亡が神経症状に続発することが多いのに対し、その後の死亡は神経症状が無いまま起こる場合があり、両者の死亡を同一の end point として算定すること自体に問題がある可能性が残る。いずれにしても α TTP 遺伝子の欠失と、VE 摂取量の減少に関連して死亡に至る病態は、神経症状の発症機序とは異なるものと言わざるを得ない。

現在死亡個体が各群 2-3 割に達しており、今後の死亡状況により、上記の解釈に大幅な変更を迫られる可能性がある。今後その根底にあるメカニズムを解明するために、

組織学的検索や生化学的検索をすすめて、 α TTP 遺伝子と VE の寿命に関連した役割を解明したい。

E. 結論

α TTP 遺伝子を改変した雌個体を多数作製し、食餌中の VE を欠乏させて両者の影響を観察する総個体数 532 匹の実験コホートを確立し、解析した。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、死亡する個体が見られた。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欠失と食餌中の VE 欠乏状態の両者に相加的に依存して発現している。一方死亡個体は欠乏食群(0-,1-)で 45 ヶ月齢の早期に神経症状を有する個体に多くみられる。しかし添加食群 (0+, 1+) では神経症状を呈さないまま 10 週齢以降に死亡する個体が多い点で欠乏食群とは異なる。

α TTP 遺伝子と VE の寿命に関連した役割はこれまでの抗酸化作用を介したものの以外にも想定したほうが理解しやすい。

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 la Salpêtrière hospital. Arch Neurol 2004;61:784-790
2. Nakamura A, Uchihara T, Dual enhancement of triple immunofluorescence using two antibodies from the same species. J Neurosci Methods 2004;135:67-70
3. Umahara T, Uchihara T, Tsuchiya K et al. 14-3-3 proteins and zeta isoform containing neurofibrillary tangles in patients with Alzheimer's disease. Acta Neuropathol. 2004;108:279-286
4. Umahara T, Uchihara T, Tsuchiya K et al. Immunolocalization of 14-3-3 isoforms in brains with Pick body disease. Neurosci. Lett. 2004;371:215-219
5. Amino T, Orimo S, Itoh Y et al. Profound cardiac sympathetic denervation occurs in Parkinson's disease. Brain Pathol. 2004;15:29-34.
6. Uchihara T, Duyckaerts C, Seilhean D et al. Exclusive induction of tau2 epitope in