

200400774A

厚生労働科学研究研究費補助金

こころの健康科学研究事業

アミロスフェロイド仮説によるアルツハイマー病病態解明と臨床応用に関する
研究

-高等動物モデル構築と生体リアルタイム観測法開発によるアプローチ

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 星 美奈子

平成17(2005)年 4月

目次

I. 総括研究報告書

- アミロスフェロイド仮説によるアルツハイマー病病態解明と-----1
臨床応用に関する研究
星 美奈子

II. 分担研究報告書

1. アミロスフェロイド特異的抗体作製と剖検脳の検証、毒性-----8
中和抗体、形成機序の解明に関する研究
星 美奈子
2. β アミロイド及びそのアナログの高純度合成と構造解析-----11
佐藤 一紀
3. 機能的蛍光標識導入による β アミロイド蓄積過程の分析-----13
手法開発に関する研究
菊地 和也
4. 蛍光相関法による抗体探索とタンパク質凝集リアルタイム-----15
測定に関する研究
金城 政孝
5. 霊長類モデルを用いたアルツハイマー病におけるアミロスフェロイド-----17
の病態形成機序の解明と治療法開発に関する研究
村松 慎一

III. 研究成果の刊行に関する一覧-----19

IV. 研究成果の刊行物・別刷り-----22

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
総合研究報告書

アミロスフェロイド仮説によるアルツハイマー病病態解明と臨床応用に関する研究
-高等動物モデル構築と生体リアルタイム観測法開発によるアプローチ

主任研究者 星 美奈子 三菱化学生命科学研究所 アルツハイマー病発症機序解明チームリーダー
東京工業大学 大学院生命理工学研究科 連携助教授

研究要旨

本研究は、新たに同定した、非常に強力な神経毒性を持つ球状A β 凝集体「アミロスフェロイド」を手がかりに、異分野横断による新たな測定手法開発により、アルツハイマー病の病態解明とそれに基づく臨床応用展開を目指している。そのために、(1)アミロスフェロイド特異的抗体による剖検脳の検証と早期診断への応用、並びにアミロスフェロイド特異的抗体による神経毒性の中和、(2)脳におけるアミロスフェロイド形成機構の解明と、そのために必要なA β 凝集体形成のリアルタイム観測法の確立と診断への応用、(3)霊長類を用いた病態モデルの開発とそれをを用いた治療薬開発の試み、を目的とした研究を展開し、今年度は以下の結果を得た。

- 1)モノマーや線維に反応しない、アミロスフェロイド特異的ポリクローナル抗体を得ることに成功した。抗体は患者脳に特異的染色を示し、さらにアミロスフェロイドによる神経細胞死を抑制する効果も持つことも明らかとなった。アミロスフェロイドに類似のA β 凝集体が患者の脳にも存在する可能性が示された。
- 2)上記抗体による高感度液相ELISAを確立した。さらに、蛍光相関分光法(FCS)、蛍光相互相関分光法(FCCS)を用い、より微量の試料でより高感度(2桁以上)に抗原抗体反応を検出出来ることを示した。
- 3)N端ないしはC端に蛍光ラベルを導入した蛍光標識A β の合成精製法の確立に成功した。これを未標識A β と一定の比率で混合させた場合でも、アミロスフェロイドが形成され、神経毒性を持つことを確認した上で、凝集プロセスをFCSにて観察可能であることを見出した。予備的ではあるが、A β 初期濃度と凝集プロセスの時間経過の関係は、以前、透過型電子顕微鏡観察により得た知見とほぼ相関していた。
- 4)家族性アルツハイマー病の原因遺伝子であるarcticやtottoriの突然変異を持つA β の化学合成方法を確立した。これら変異A β もアミロスフェロイドを形成することで神経毒性を発揮した。また、A β 部分ペプチドを全配列に亘り合成し、競合阻害実験によりアミロスフェロイド形成に必要なアミノ酸配列を決定した。
- 5)各種溶媒環境におけるアミロスフェロイド形成を検証した結果、アミロスフェロイドは生理的な溶媒環境下、特にリン酸緩衝液の存在下で回転攪拌することで最も良く形成される一方、線維は緩衝剤の有無を問わず酸性条件、即ちタンパク質の変性条件下で形成されることを明らかにした。従って、アミロスフェロイドは線維の中間体とは考えにくい。さらに、溶媒環境を問わず神経毒性は10-15nmのアミロスフェロイド形成量とのみ相関しており、今後の形成機構の解明が発症の起点を探る糸口となることが改めて示された。
- 6)初代培養神経細胞の入手が困難な霊長類の神経細胞を得るため、カニクイサルのES細胞から大量の神経幹細胞を分化誘導する方法を確立した。
- 7)定位脳手術により、サル、海馬、大脳皮質などにアミロスフェロイドを単回注入する実験を行った。単回注入だけでは、特に顕著な神経細胞死や老人斑の形成などは認められず、今後、注入濃度、回数などの検討が必要と考えられた。

分担研究者氏名・所属機関・職名

佐藤一紀 福岡女子大学 人間環境学部 教授
菊地和也 東京大学 大学院薬学系研究科 助教授
金城政孝 北海道大学 電子科学研究所 助教授
村松慎一 自治医科大学 内科学講座神経内科部門 助教授

A. 研究目的

本研究は、A β に由来する多様な凝集体の中で、非常に強力な神経毒性を持つ新たな球状A β 凝集体「アミロスフェロイド」を手がかりに、アルツハイマー病発症の開始点である異常A β 凝集体がいかに形成され、神経細胞死を引き起こすかを解明し、最終的にはそれを阻止しようとするものである。その

ために、(1)アミロスフェロイド特異的抗体による剖検脳の検証と早期診断への応用、並びにアミロスフェロイド特異的抗体による神経毒性の中和、

(2)脳におけるアミロスフェロイド形成機構の解明と、そのために必要なA β 凝集体形成のリアルタイム観測法の確立と診断への応用、(3)霊長類を用いた病態モデルの開発とそれをを用いた治療薬開発の試み、を目的とした研究を行った。

B. 研究方法

(1)アミロスフェロイド特異的抗体による剖検脳の検証と早期診断への応用、並びにアミロスフェロイド特異的抗体による神経毒性の中和
抗原として、化学合成した純粋なA β ₁₋₄₀ないしは

A β ₁₋₄₂から調製したアミロスフェロイドを用いポリクローナル抗体を作製した。また、アミロスフェロイドを高感度に検出する系を固相ELISA並びに液相ELISAにより構築した。

神経毒性は3重染色法 (propidium iodide, calcein-AM、ヘキスト)、またはcell death ELISA (ロッシュ社製の一部手法を改変) でアポトーシスを定量した。

(2) 脳におけるアミロスフェロイド形成機構の解明と、そのために必要なA β 凝集体形成のリアルタイム観測法の確立と診断への応用

a. A β 及びその部分配列、突然変異体の合成

ペプチドは全てFmoc法により化学合成後、HPLCにより高純度に精製し、構造を質量分析とアミノ酸分析により確認した。A β と突然変異体については、最近開発されたシュードプロリンジペプチドを用いたFmoc法を適用した。

b. 蛍光標識 A β の合成と精製

Fmoc-NH-SAL TentaGelを用いることで、A β のN端ないしはC端に、光褪色が小さいTetramethyl rhodamine 5-carboxylic acid (TMR)を導入した蛍光標識A β の合成と精製に成功した。

c. 蛍光相関分光法 (FCS) による抗原抗体反応の高感度検出とA β 凝集のリアルタイム観測

上記の蛍光標識A β を用いてもアミロスフェロイドが形成されることを確認した後、溶液中における凝集プロセスを蛍光相関分光法 (FCS) で観察可能であるかを予備的に検討した。

また、早期診断系の確立のために、上記ELISAに加えて、FCSによる系を検討した。そのため、緑色蛍光タンパク質GFPとGFP抗体をモデルとして、感度の比較を行った。さらに、プリオンタンパク質を用いた蛍光相互相関分光法 (FCCS) によってさらなる高感度化を目指した。測定方法はどれもConfoCor2 (カールツァイス社製) もしくは浜松ホトニクス製コンパクトFCS測定装置 (C9413) を用いて測定した。測定条件はとして; 試料量10 μ L、励起光514 nmもしくは532 nm、蛍光発光510 nmより長波長側、測定時間15秒x5回、解析2成分モデルによる解析を行った。レーザーパワーは蛍光発光が30 cps (1秒あたりの光子としてカウント) となるように調整した。

(3) 霊長類を用いた病態モデルの開発とそれを用いた治療薬開発の試み、を目的とした研究

a. アミロスフェロイド脳内投与

15歳のカニクイサルを使用して定位脳手術により海馬、被殻、大脳皮質にA β ₁₋₄₀ないしはA β ₁₋₄₂由来のアミロスフェロイドを直接注入する実験を行った。

b. 霊長類ES細胞の神経細胞への分化誘導

カニクイサルのES細胞から、効率よく大量の神経細胞を分化誘導する条件を検討した。ラット及びマウス胎児の初代培養神経細胞あるいはグリア細胞、ヒトグリア細胞腫瘍株などの条件培地を使用して、浮遊培養により分化誘導を行った。

c. 神経細胞に対する遺伝子導入ベクターの開発

マーカーとしてGFPあるいはLacZ遺伝子を発現す

るアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを作製して、マウスおよびラット神経への遺伝子導入の特性を検討した。2型(AAV-2)の他に、3型(AAV-3)、5型(AAV-5)、8型(AAV-8)のAAVベクターを作製した。

(倫理面への配慮)

各研究者は、総理府告示「動物の処分法に関する指針」(平成7年第40号)、法律第105号「動物の愛護及び管理に関する法律」、総理府「実験動物の飼養及び保管に関する基準」、文部省通知「大学等における動物実験について」、日本霊長類学会「サル類を用いる実験遂行のための基本原則」を遵守し、所属機関における動物実験指針、ヒトサンプルに関する倫理委員会の承認のもと研究を行っている。さらにインフォームドコンセントに基づいて得られたヒトサンプルのみを解析に供しているが、今後も倫理規定を遵守して研究を行う。

C. 研究結果

(1) アミロスフェロイド特異的抗体による剖検脳の検証と早期診断への応用、並びにアミロスフェロイド特異的抗体による神経毒性の中和

モノマーや線維に反応しない、アミロスフェロイド特異的ポリクローナル抗体を得ることに成功した。これらの抗体は、非常に高い抗体価を持ち、ヒト脳の免疫組織学的解析においても患者脳に特異的染色を示した。アミロスフェロイド特異的抗体のあるものは、アミロスフェロイドによる神経細胞死を抑制する効果も持つことが明らかとなった。

(2) 脳におけるアミロスフェロイド形成機構の解明と、そのために必要なA β 凝集体形成のリアルタイム観測法の確立と診断への応用

a. A β 及びその部分配列、突然変異体の合成

Fmoc固相法により、全配列に亘るA β 部分ペプチド36種類を合成精製し、競合実験により、アミロスフェロイド形成に必要なアミノ酸配列を決定した。さらに、フェムトmolレベルの定量的アミノ酸分析法と質量分析計を用いた構造変化部位の同定手法を確立し、アミロスフェロイド形成には特定の構造変化が伴うことを見出した。

最近、開発されたシュードプロリンジペプチドを用いたFmoc固相合成法により、A β とarcticないしはtottori突然変異を持つA β を合成し、より純度の高い粗ペプチドを得、逆相HPLCにより精製した。これら突然変異A β も回転攪拌することでアミロスフェロイドを形成することを初めて見出した。

各種溶媒環境におけるアミロスフェロイド形成を検証し、アミロスフェロイドは生理的な溶媒環境下、特にリン酸緩衝液の存在下で回転攪拌することで最も良く形成される一方、線維は緩衝剤の有無を問わず酸性条件、即ちタンパク質の変性条件下で形成されることを明らかにした。従って、アミロスフェロイドは線維の中間体とは考えにくい。さらに、溶媒環境を問わず神経毒性は10-15 nmのアミロスフェロイド形成量とのみ相関していることを明らかにした。

b. 蛍光標識 A β の合成と精製

蛍光標識 A β を合成した。Fmoc-NH-SAL TentaGel を担体とし、まず A β の N 端ないしは C 端に、光褪色が小さい Tetramethyl rhodamine 5-carboxylic acid (TMR) を導入し、測定に十分な蛍光量子収率 (Φ) を持つ蛍光標識 A β の合成精製法を確立した。さらに、A β 部分配列で得た知見を基に、アミロスフェロイド形成に直接影響しない部位を蛍光標識した。

c. 蛍光相関分光法 (FCS) による抗原抗体反応の高感度検出と A β 凝集のリアルタイム観測

蛍光標識 A β を用いて凝集プロセスの解析を行った。A β の凝集は、FCS 測定上は分子が大きくなることにより拡散時間と、1 分子あたりの蛍光強度が増大することで捉えることが期待出来る。予備的結果からは、非常に感度良く FCS で凝集体の形成が検出可能であることが明らかになった。また、未標識と蛍光標識 A β の比率を至適化することで、蛍光標識の影響を最小限にした状態で凝集プロセスを観察可能であることを見出した。予備的ではあるが、A β 初期濃度と凝集プロセスの時間経過の関係は、以前、透過型電子顕微鏡観察により得た知見とほぼ相関していた。また、一方で標識に用いた蛍光色素が遊離していることも示唆された。遊離色素は蛍光測定ではバックグラウンドの蛍光として影響がでる可能性があるため、今後の検討課題である。

アミロスフェロイド特異的抗体による高感度 ELISA 検出系を構築した。しかし、より少量の試料でより高感度な検出を可能にするため、GFP と GFP 抗体をモデルに、従来法 (ELISA) と FCS による抗原抗体反応の感度を比較した。その結果、FCS では、ELISA の 1/5 以下の量で 2 桁以上高感度 (ELISA が 10^{-9} M であるのに対し、およそ 10^{-12} M) の検出が可能であることを明らかにした。次に、アルツハイマー病と同様に、異常構造タンパク質の蓄積が病態と密接な関係を持つプリオンタンパク質に対する市販抗体を蛍光標識し、ELISA では必須の「結合・非結合分子の分離」が、FCS では不要であることを示した。蛍光相互相関法 (FCCS) を用いることで、検出感度をさらに 1 桁上げること成功した。

(3) 霊長類を用いた病態モデルの開発とそれを用いた治療薬開発の試み、を目的とした研究

a. アミロスフェロイド脳内投与

15 歳齢のカニクイサルにおいては、海馬、被殻、大脳皮質に A β_{1-40} ないしは A β_{1-42} 由来のアミロスフェロイドを単回注入した後の組織解析で、明らかな神経細胞死や老人斑の形成は誘発されなかった。

b. 霊長類 ES 細胞の神経細胞への分化誘導

ラット胎児の初代培養アストロサイトの条件培地を使用した浮遊培養により、未分化 ES 細胞から効率よく大量の神経幹細胞を得る方法を確立した。

c. 神経細胞に対する遺伝子導入ベクターの開発

AAV-3 ベクターは、培養神経細胞へ効率よく遺伝子導入した。AAV-5 ベクターは、マウスおよびラットの脳内で広範囲の遺伝子導入が可能であった。

AAV-8 は、マウスの尾静脈からの注入によって脳内の神経細胞に遺伝子発現が得られた。

D. 考察

(1) アミロスフェロイド特異的抗体が、ヒト脳においても疾患特異的染色を示すことから、アミロスフェロイド (類似) 構造が生体に存在する可能性が高まった。今回、アミロスフェロイド認識抗体だけではなく、機能的抗体、即ちアミロスフェロイド毒性中和抗体並びに形成阻害抗体も確立したため、今後治療への展開も期待出来る。アミロスフェロイド特異的抗体は、A β モノマーや線維にほとんど反応しないことから、アミロスフェロイドはこれらとは表面構造が異なることが示唆された。今後、この点を解明することが、なぜ特定の神経だけが死に至るのか、それをいかに阻止出来るかという基礎と応用の両観点で非常に重要である。

(2) 今回の検討から、アミロスフェロイドは病態解明のためのよい入り口であることが改めて示された。なぜなら、A β 内部配列に変異が生じる家族性アルツハイマー病原遺伝子 arctic, tottori 変異を持つ A β も、アミロスフェロイドを形成し毒性を発揮した。また、アミロスフェロイド形成は生理的環境下で最も促進されるが、その場合も溶媒環境を問わず、毒性は 10-15 nm のアミロスフェロイド存在量と相関していた。従って、アミロスフェロイドの形成機構と毒性発現機序の解明は、疾病への理解を促し、治療・予防などの応用につながることを期待される。現在進めている、構造変化部位の検証が今後鍵となる。

(3) 現在、タンパク質の自己凝集プロセスを溶液中でそのまま観測する手法は存在しない。ごく微量の試料を溶液中でそのまま観測可能であること、高感度であることから FCS は今回の目的に適切な手法である。最大の問題は、元々タンパク質が持つ自家蛍光だけでは感度が弱いため、人工的に蛍光標識を入れる必要があることであり、いかにタンパク質の機能を損なわずに蛍光を導入可能であるかが課題である。今回、我々はその問題をクリアし、アミロスフェロイドの構造と機能を損なうことなく、測定に十分な強さの蛍光標識を行うことに成功した。これを用いた FCS 測定では、回転攪拌時間に比例し大きな構造体が形成されていることが示され、今後、蛍光標識の手法や部位や蛍光標識体の存在比率を至適化することで、アミロスフェロイド形成過程を観察可能であると考えられた。

(4) 今回確立したアミロスフェロイド特異的抗体による高感度 ELISA 系を構築した。さらに、FCS を用いることでさらに 2 桁以上高感度化が可能であることを示した。今後、条件をさらに至適化することで高感度かつ安定な評価系を構築することで、生体試料を用いた早期診断系の開発や、治療用毒性中和モノクローナル抗体のスクリーニング系などの応用が期待出来る。

(5) 今回の予備的検討からは、霊長類モデルを用いる場合、まだ比較的若いサル脳(ヒトでは45歳ほど)への単回注入だけでは不十分であることが明らかとなった。アルツハイマー病が老化を背景とする疾病であることを考えると、やはり老齢のサルを用いることが必要であろう。一方で、投与のための手術操作が炎症を一過的に惹起し、投与したアミロスフェロイドを除去している可能性もあるため、注入方法を工夫し極力脳への傷害を抑えた手法によって再度実験を行う必要がある。現在、アミロスフェロイド形成機構について解析を進めつつあり、この知見に基づき、今後アミロスフェロイド形成促進因子を今回開発したAAVベクター等によって投与することで脳内でアミロスフェロイド形成を誘起することも検討していく。

(6) 今回の検討によって、サルES細胞から効率よく大量の神経細胞を分化誘導する手法を開発した。これによりアミロスフェロイド毒性を霊長類で容易に検討することが可能となり、今後、サルcDNAチップによるアレイ解析やプロテオミクス解析を実施し、アミロスフェロイド毒性発現機序に迫ることが可能になると期待される。その場合、今回開発した各種AAV神経遺伝子導入ベクターが有効なツールとして活用出来る。

(7) Aβによる神経毒性を解明するためには、in vitroとin vivoの双方を対比させることが重要である。そのためには、同一ロットの高純度なAβが必要となるが、Aβの化学合成と精製は、その配列の特異性もあり(疎水性残基が連続しているなど)、カラムに吸着する、精製過程で凝集するなど著しく回収率が低下する。今回導入したシュードプロリンジペプチドは確かに純度の改善につながったが、更なる条件の検討が必要である。

E. 結論

今年度の検討から、以下の結論が得られた。

(1) アミロスフェロイド特異的抗体による免疫染色の結果から、類似構造体がヒト脳にある可能性が高まった。

(2) 毒性は常にアミロスフェロイドに相關するため、その形成と毒性発現機序の解明は病態理解に非常に有効であることが示された。形成機構について重要な手がかりが得られた。

(3) FCSによるアミロスフェロイド形成のリアルタイム観測法構築の可能性が見えた。

(4) サルモデルを用いた神経毒性発現機序の解明に着手した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) D. Okada, C.C. Yap, H. Kojima, K. Kikuchi & T. Nagano. Distinct Glutamate Receptors Govern

Differential Levels of Nitric Oxide Production in a Layer-specific Manner in the Rat Cerebellar Cortex. *Neuroscience*, **125**, 461-472 (2004)

2) K. Hanaoka, K. Kikuchi, H. Kojima, Y. Urano & T. Nagano. Development of a Zinc Ion-selective Luminescent Lanthanide Chemosensor for Biological Applications. *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 12470-12476 (2004)

3) Y. Hu, K.N. Houk, K. Kikuchi, K. Hotta, & D. Hilvert. Nonspecific Medium Effects versus Specific Group Positioning in the Antibody and Albumin Catalysis of the Base-Promoted Ring-Opening Reactions of Benzisoxazoles. *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 8197-8205 (2004)

4) Asako Kamada, Hisao Nagaya, Taku Tamura, Masataka Kinjo, Hai-Ying Jin, Toshiharu Yamashita, Kowichi Jimbow, Hideo Kanoh and Ikuo Wada Regulation of immature protein dynamics in the endoplasmic reticulum *J Biol Chem* **279**, 21533-21542 (2004)

5) Kenta Saito; Ikuo Wada; Mamoru Tamura and Masataka Kinjo. Direct detection of caspase-3 activation in single live cells by cross-correlation analysis. *Biochem. Biophys. Res. Comm* **324/2** 849-854 (2004)

6) K. Kikuchi, K. Komatsu & T. Nagano. Zinc Sensing for Cellular Applications. *Curr. Opi. Chem. Biol.*, **8**, 182-191 (2004)

7) Lee C.-W., Lee, E.-H., Takeuchi, K., Takahashi, H., Shimada, I., Sato, K., Shin S.-Y., Kim, D.-H., and Kim, J.-I.: Molecular basis of the high-affinity activation of type 1 ryanodine receptors by imperatoxin A. *Biochem. J.*, **377**, 385-394 (2004)

8) Manita, S., Kawamura, Y., Sato, K., Inoue, M., Kudo, Y., and Miyakawa, H.: Adenosine A₁-receptor-mediated tonic inhibition of glutamate release at rat hippocampal Ca₃-CA1 synapses in primarily due to inhibition of N-type Ca²⁺ channels. *Eur. J. Pharmacology*, **499**, 265-274 (2004)

9) Nakamura, M., Ishida, Y., Kohno, T., Sato, K., Oba, Y., and Nakamura, H.: Effects of modification at the fifth residue of μ-conotoxin GIIIA with bulky tags in the electrically stimulated contraction of the rat diaphragm. *J. Peptide Res.*, **64**, 110-117 (2004)

10) Nakai H, Fuess S, Storm T A, Muramatsu S, Nara Y and Kay M A: Unrestricted hepatocyte transduction with AAV serotype 8 vectors in mice. *J Virol*, **79**(1):214-224, 2005.

11) Thwin M.-M., Douni, E., Aidinis, V., Kollias, G., Kodama, K., Sato, K., Satish, R. L., Mahendran, R., and Gopalakrishnakone, P.: Effect of phospholipase A₂ inhibitory peptide on inflammatory arthritis in a TNF transgenic mouse model: a time-course ultrastructural study. *Arthritis Research & Therapy*, **6**, 282-294 (2004)

12) T. Yogo, K. Kikuchi, K. Hirose, M. Iino & T.

Nagano. Modification of Intracellular Ca²⁺ Dynamics by Laser Inactivation of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Using Membrane-permeant Probes. *Chemistry & Biology*, **11**, 1053-1058 (2004)

13) E. Kawabata, K. Kikuchi, Y. Urano, H. Kojima, A. Odani & T. Nagano. Design and Synthesis of Zinc-Selective Chelators for Extracellular Applications. *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 818-819 (2005)

14) Sasaki K, Inoue M, Shibata H, Ueda Y, Muramatsu S, Okada T, Hasegawa M, Ozawa K and Hanazono Y: Efficient and stable Sendai virus-mediated gene transfer into primate embryonic stem cells with pluripotency preserved. *Gene Ther*, **12**(3):203-210, 2005.

15) 坂田啓司, 藤井文彦, 田村 守, 金城政孝: 「蛍光相関分光法 (FCS) を用いた抗原抗体反応解析および検体検出」 *バイオインダストリー* **4**, 52-59 (2004)

16) 村松慎一: パーキンソン病モデルサルへの ES 細胞由来神経幹細胞の移植: 日本再生医療学会雑誌 **3**:39-44, 2004

17) 村松慎一: 遺伝子治療. 特集 パーキンソン病 *日本臨床*, **62**(9): 1648-1652, 2004.

18) 星美奈子: 新規毒性物質「アミロスフェロイド」の形成と神経細胞死 *生化学 総説* **76**, 631-639, 2004

19) 星美奈子: 「かたち」が制御する神経の死: アミロスフェロイドから病態・老化の暗号を解く *蛋白質核酸酵素* **5**月号増刊「細胞における蛋白質の一生」生成・成熟・輸送・管理・分解・病態・編集 小椋光・遠藤遠藤斗志也・森正敬・吉田賢右、共立出版、東京

20) 星美奈子: 新規球状毒性会合体「アミロスフェロイド」の同定-アルツハイマー病発症に置ける神経細胞死機構の解明に向けて *Dementia Japan* **18**, 19-28, 2004

21) 星美奈子: β アミロイド自己組織化による神経毒性の発現-新規毒性物質「アミロスフェロイド」とアルツハイマー病: *化学と工業* **第57巻**, 第5号, 519-521, 2004

22) 星美奈子: *Bioindustry* 神経変性疾患研究の最前線 特集号監修: 特集にあたって **21**, 5-7:

アミロスフェロイド-タンパク質の自己組織化と神経変性疾患 **21**, 67-74, 2004

23) 星美奈子: 球状 β アミロイド凝集体アミロスフェロイド-蛋白質の自己組織化と神経細胞死 *Cognition and Dementia* **3**, 359-366, 2004

2. 学会発表

1) Fumihiko Fujii, Hiroshi Sakata, Masayoshi Ueno, Takayuki Yanagiya, Mamoru Tamura, and Masataka Kinjo, International Symposium of Prion Diseases, Sendai, JAPAN, October 31 to November 2, 2004 "Detection of recombinant bovine prion protein by fluorescence correlation spectroscopy"

2) Gopalakrishnakone, P., Thwin M.-M., and Sato, K.:

Anti-inflammatory peptides designed from phospholipase A₂ inhibitory protein from the serum of *Python reticulatus*., International Congress - Natural Peptides to Drugs, Nov.-Dec., 2004, Zermatt, Switzerland.

3) Hoshi, M.: Morpho-metabolism of β -amyloid: nano-fibers as natural defense against neurodegenerative diseases: Symposium on Dynamic Bio-Nano-Fibers in the Cells Focusing Human Body: Cells is being organized with nano-fibers, July 13-14, 2004, Tokyo

4) Iwata N, et al.: Therapeutic approach for Alzheimer's disease by neprilysin gene transfer, The 10th annual meeting of the Japan Society of Gene therapy, Tokyo, August 5, 2004.

5) K. Kikuchi, Gordon Research Conference, Bioanalytical Sensors, "Chemical Sensor Molecules Which Convert Cellular Biological Responses to Chemical Output", 2004年7月4日~9日, クイーンズカレッジ, オックスフォード市, 英国

6) Lee C.-W., Lee, E.-H., Takeuchi, K., Takahashi, H., Shimada, I., Sato, K., Shin S.-Y., Kim, D.-H., and Kim, J.-I.: Molecular basis of the high-affinity activation of skeletal ryanodine receptor Ca²⁺-release channel by imperatoxin A., 1st Asia-Pacific International Peptide Symposium, Oct.-Nov., 2004, Fukuoka, Japan.

7) Yuhe Liu, et al.: Specific and efficient transduction of the cochlear inner hair cells with recombinant Adeno-Associated virus type 3 vector. The American society of gene therapy's 7th annual meeting. Minneapolis, June 6, 2004..

8) Muramatsu S et al.: AAV- vector-mediated gene delivery of aromatic L-amino acid decarboxylase restored L-dopa efficacy in a primate bilateral model of Parkinson's disease. The American society of gene therapy's 7th annual meeting. Minneapolis, June 3, 2004.

9) Muramatsu S, et al.: A fail-safe system for gene therapy of Parkinson's disease; Application of removable expression cassette to prevent overproduction of dopamine in a rat model. The American society of gene therapy's 7th annual meeting. Minneapolis, June 4, 2004.

10) Muramatsu S, et al.: Transplantation of neural stem cells derived from primate ES cells in a primate model of Parkinson's disease. JMS 21st Century COE Program Nikko International Symposium, Nikko, September 25, 2004.

11) Muramatsu S, et al.: AAV vector-mediated gene delivery of aromatic L-amino acid decarboxylase restored L-dopa efficacy in a primate model of Parkinson's disease. Society for Neuroscience's 34th Annual Meeting, San Diego, October 23, 2004.

12) Muramatsu S, et al.: *In Vivo* monitoring of transgene expression in a primate model of Parkinson's disease; potential application of positron emission tomography in

gene therapy, The 10th annual meeting of the Japan Society of Gene therapy, Tokyo, August 5, 2004.

13) Nara Y, et al.: Migration into the neurogenic area promotes neuronal differentiation after intraventricular transplantation of neural stem cells derived from embryonic stem cells. Society for Neuroscience's 34th Annual Meeting, San Diego, October 26, 2004.

14) Hiroshi Sakata, Fumihiko Fujii, Mamoru Tamura and Masataka Kinjo: 7th International Carl Zeiss sponsored Workshop on Fluorescence Correlation Spectroscopy and Related Methods; Dresden / Germany, October 5th to 6th 2004, "Antigen-antibody reaction analysis with Fluorescence Correlation Spectroscopy"

15) Thwin M.-M., Douni, E., Aidinis, V., Kollias, G., Kodama, K., Sato, K., Satish, R. L., Mahendran, R., and Gopalakrishnakone, P.: Anti-inflammatory peptides designed from phospholipase A₂ inhibitory protein from the serum of *Python reticulatus*. 1st Asia-Pacific International Peptide Symposium, Oct.-Nov., 2004, Fukuoka, Japan.

16) Li Xg, et al.: Inducible reduction of transgene expression as a fail-safe system for gene therapy of neurodegenerative diseases, The 10th annual meeting of the Japan Society of Gene therapy, Tokyo, August 5, 2004.

17) K. Kikuchi, COE 国際シンポジウム "Metals in Biology" 名古屋大学 COE 拠点, "Zinc Sensing for Cell Biology" 2005年 1月11日~12日, 名古屋大学野依記念学術交流館

18) 菊地和也, 第78回日本薬理学会年会シンポジウム「ケモゲノミクスの新しい展開とゲノム創薬科学」「可視化プローブのデザインによるケモゲノミクス」2005年3月22日~24日, パシフィコ横浜, 横浜市

19) 菊地和也, 「ナノバイオ基礎から最前線」コース~バイオとナノテクの融合による新技術・新産業の創出~, (財)神奈川科学技術アカデミー, 「細胞を探るナノプローブ」2004年11月25日, かながわサイエンスパーク, 川崎市

20) 菊地和也, 京都大学21世紀COEプログラム「ゲノム科学の知的情報基盤・研究拠点形成」 「ファーマコゲノミクスの新展開:ゲノムとネットワークからケミカルゲノミクスへ」, 「可視化プローブで細胞機能を覗く」2004年10月5日, 京都大学薬学部記念講堂

21) 菊地和也, 分子研研究会「生体金属分子科学の展望」「錯体化学に基づく生体可視化蛍光センサー」2004年10月1日~3日岡崎コンファレンスセンター

22) 菊地和也, 第17回生物無機化学夏季セミナー, 「錯体化学に基づく生体可視化蛍光センサー—亜鉛イオンの生細胞内可視化とランタノイド蛍光錯体の蛍光強度制御」2004年8月7日~9日, シャレー中西, 岐阜県大野郡丹生川村

23) 菊地和也, 日本化学会生体機能関連化学部会若

手の会サマースクール, 「細胞機能の可視化と不活化のケミカルバイオロジー」, 2004年7月16日~17日, 三河ハイツ, 蒲郡市

24) 菊地和也, 第65回分析化学討論会・シンポジウム「バイオ分析化学の新潮流」, 「細胞機能を覗く分子デザイン」, 2004年5月15日~16日, 琉球大学千原キャンパス, 沖縄県西原町

25) 野口彰彦・佐藤道夫・松本紳一郎・佐藤一紀・星美奈子: 強力な神経毒性を持つ球状βアミロイド会合体「アミロスフェロイド」の同定: 第84回日本化学会春期年会 2004年3月(神戸)

26) 星美奈子 (2004年3月) アミロスフェロイドの発見-「かたち」が制御する神経細胞死: 第6回七隈アルツハイマー病研究会カンファランス: 福岡

27) 星美奈子 (2004年3月) アルツハイマー病とナノファイバー形成-ファイバー形成は生体防御反応か?: 第3回ナノファイバー技術戦略研究会「21世紀を拓くナノファイバーテクノロジー」-ナノファイバーとバイオの未来と新展開する高度ナノ測定技術の実際-: 大岡山(東京工業大学 百周年記念館)

28) 星美奈子 (2004年12月) 球状βアミロイド凝集体「アミロスフェロイド」-老化に伴うタンパク質の自己組織化と神経細胞死-第27回日本分子生物学会年会ワークショップ: 老化研究: 新たなパラダイム形成を目指して 神戸

29) 村松慎一, 他: 誘導的に Cre リコンビナーゼを活性化する AAV ベクターを応用したより安全なパーキンソン病の遺伝子治療の開発. 第25回日本炎症・再生医学会, 東京, 2004年7月13日.

30) 村松慎一: Gene therapy for Parkinson's disease; current strategies and future direction, 第16回機能回復神経学研究会, 2004年8月6日.

31) 村松慎一: パーキンソン病の遺伝子治療. 第1回革新脳科学 COE 国内シンポジウム, 金沢 2005年2月19日.

F. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

1) 抗体およびその利用

出願日: 平成16年8月11日

発明者: 星美奈子 出願人: 三菱化学株式会社

特願2004-234857

2) 蛍光相関分光法による抗原の迅速検出及び/又は測定法

出願日: 平成16年6月3日

特願2004-166440

発明者: 金城政孝, 堀内基広, 藤井文彦, 坂田啓司, 田村守, 上野雅由, 柳谷孝幸

出願人: 独立行政法人科学技術振興機構(代表者: 沖村憲樹), 富士レピオ株式会社(代表者: 鈴木博正)

3) 水溶性蛍光材料およびその製造方法

出願日: 平成16年9月22日

出願番号: 特願2004-275675

発明者: 神隆, 金城政孝, 田村守, 藤井文彦,

坂田 啓司

出願人：独立行政法人 科学技術振興機構 （代表者：沖村 憲樹）

国立大学法人 北海道大学 （代表者（学長）：中村 睦男）

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

アミロスフェロイド特異的抗体作製と剖検脳の検証、毒性中和抗体、形成機序の解明に関する研究

主任研究者 星 美奈子 三菱化学生命科学研究所 アルツハイマー病発症機序解明チームリーダー
東京工業大学 大学院生命理工学研究科 連携助教授

研究要旨

本研究では、(1) アミロスフェロイド特異的抗体による剖検脳の検証と早期診断への応用、並びにアミロスフェロイド特異的抗体による神経毒性の中和、(2) 脳におけるアミロスフェロイド形成機構の解明と、そのために必要な A β 凝集体形成のリアルタイム観測法の確立と診断への応用、を目的とした研究を展開し、今年度は以下の結果を得た。

(1) モノマーや線維に反応しない、アミロスフェロイド特異的ポリクローナル抗体を得ることに成功した。抗体は患者脳に特異的染色を示し、さらにアミロスフェロイドによる神経細胞死を抑制する効果も持つことも明らかとなった。アミロスフェロイドに類似の A β 凝集体が患者の脳にも存在する可能性が示された。

(2) 上記抗体による高感度液相 ELISA を確立した。

(3) 蛍光標識 A β を未標識 A β と一定の比率で混合させた場合でも、アミロスフェロイドが形成され、神経毒性を持つことを確認した。さらに、凝集プロセスを FCS にて観察可能であることを見出した。予備的ではあるが、A β 初期濃度と凝集プロセスの時間経過の関係は、以前、透過型電子顕微鏡観察により得た知見とほぼ関連していた。

(4) 家族性アルツハイマー病の原因遺伝子である arctic や tottori の突然変異を持つ A β もアミロスフェロイドを形成することで神経毒性を発揮することを明らかにした。また、A β 部分ペプチドの競合阻害実験によりアミロスフェロイド形成に必要なアミノ酸配列を決定した。

(5) 各種溶媒環境におけるアミロスフェロイド形成を検証した結果、アミロスフェロイドは生理的な溶媒環境下、特にリン酸緩衝液の存在下で回転攪拌することで最も良く形成される一方、線維は緩衝剤の有無を問わず酸性条件、即ちタンパク質の変性条件下で形成されることを明らかにした。従って、アミロスフェロイドは線維の中間体とは考えにくい。さらに、溶媒環境を問わず神経毒性は 10-15 nm のアミロスフェロイド形成量とのみ相関しており、今後の形成機構の解明が発症の起点を探る糸口となることが改めて示された。

A. 研究目的

本研究では、(1) アミロスフェロイド特異的抗体による剖検脳の検証と早期診断への応用、並びにアミロスフェロイド特異的抗体による神経毒性の中和、(2) 脳におけるアミロスフェロイド形成機構の解明と、そのために必要な A β 凝集体形成のリアルタイム観測法の確立と診断への応用、を目的に行った。

B. 研究方法

(1) アミロスフェロイド特異的抗体による剖検脳の検証と早期診断への応用、並びにアミロスフェロイド特異的抗体による神経毒性の中和

抗原として、化学合成した純粋な A β_{1-40} ないしは A β_{1-42} から調製したアミロスフェロイドを用いポリクローナル抗体を作製した。また、アミロスフェロイドを高感度に検出する系を固相 ELISA 並びに液相 ELISA により構築した。

神経毒性は 3 重染色法 (propidium iodide, calcein-AM, ヘキスト)、または cell death ELISA (ロッシュ社製の一部手法を改変) でアポトーシスを定量した。

(2) 脳におけるアミロスフェロイド形成機構の解明と、そのために必要な A β 凝集体形成のリアルタイム

観測法の確立と診断への応用

a. 突然変異体によるアミロスフェロイド形成、アミロスフェロイド形成機序の解明

A β 突然変異体を用いて回転攪拌法によりアミロスフェロイドを形成させ構造と毒性を検証した。また、過剰量の A β 部分配列 (佐藤の欄参照) 存在下で、A β を回転攪拌し、アミロスフェロイド形成の有無と毒性を検証した。さらに、グリセロール密度勾配法により各凝集体を沈降係数ごとに分画し、サイズ分布の変化を解析した。

b. 溶媒環境がアミロスフェロイド形成に与える影響

形成経路の解明を目的に、我々が確立した A β 凝集体の調製方法並びに評価方法を用い、各種溶媒環境の影響を評価した。1) 従来用いていた x 0.5 ダルベッコリン酸バッファー pH 7.5 を pH 3-11 に変えたもの、2) グッドバッファー各種 (pH 5-9)、3) 水 (pH 2-8)、によって 50 μ M A β 水溶液を調製・回転攪拌し、電子顕微鏡観察とラット初代培養神経細胞により毒性を評価した。

c. 蛍光標識 A β を用いたアミロスフェロイド形成

A β の N 端ないしは C 端に、光褪色が小さい Tetramethyl rhodamine 5-carboxylic acid (TMR) を導入した蛍光標識 A β (菊地の欄参照) を一定比率で未標

識 A β と混合し、回転攪拌によってアミロスフェロイドを形成させた。アミロスフェロイドの構造は透過型電子顕微鏡を用いたネガティブ染色により検証した。神経毒性は、cell death ELISA (ロッシュ社製の一部手法を改変) でアポトーシスを定量した。これを踏まえて、蛍光相関分光法 (FCS) で観察可能であるかを予備的に検討した。(詳細は金城の欄参照)

(倫理面への配慮)

各研究者は、総理府告示「動物の処分法に関する指針」(平成7年第40号)、法律第105号「動物の愛護及び管理に関する法律」、総理府「実験動物の飼養及び保管に関する基準」、文部省通知「大学等における動物実験について」、日本霊長類学会「サル類を用いる実験遂行のための基本原則」を遵守し、所属機関における動物実験指針、ヒトサンプルに関する倫理委員会の承認のもと研究を行っている。さらにインフォームドコンセントに基づいて得られたヒトサンプルのみを解析に供しているが、今後も倫理規定を遵守して研究を行う。

C. 研究結果

(1) アミロスフェロイド特異的抗体による剖検脳の検証と早期診断への応用、並びにアミロスフェロイド特異的抗体による神経毒性の中和

モノマーや線維に反応しない、アミロスフェロイド特異的ポリクローナル抗体を得ることに成功した。これらの抗体は、非常に高い抗体価を持ち、ヒト脳の免疫組織学的解析においても患者脳に特異的染色を示した。アミロスフェロイド特異的抗体のあるものは、アミロスフェロイドによる神経細胞死を抑制する効果も持つことが明らかとなった。得られた抗体を用いて、液相(サンドイッチ)ELISAの系を構築した。

(2) 脳におけるアミロスフェロイド形成機構の解明と、そのために必要なA β 凝集体形成のリアルタイム観測法の確立と診断への応用

a. 突然変異体によるアミロスフェロイド形成、アミロスフェロイド形成機序の解明

我々が確立した回転攪拌法により、arctic ないしは tottori 突然変異を持つ A β もアミロスフェロイドを形成し、初代培養神経細胞に対する毒性を獲得することを初めて見出した。

全配列に亘る A β 部分ペプチド 36 種類を合成精製し、競合実験により、アミロスフェロイド形成に必要なアミノ酸配列を決定した。グリセロール密度勾配法によって形成された凝集体を沈降係数に応じて分画したところ、競合阻害を受けた場合、アミロスフェロイドとは異なる沈降係数の凝集体が形成されていることが明らかとなった。さらに、フェムト mol レベルの定量的アミノ酸分析法と質量分析計を用いた構造変化部位の同定手法を確立し、アミロスフェロイド形成には特定の構造変化が伴うことを見

出した。

b. 溶媒環境がアミロスフェロイド形成に与える影響

今回の検討から、アミロスフェロイド形成の至適条件は線維とは異なること、毒性は 10-15 nm のアミロスフェロイド存在下で認められることがわかった。線維形成は、特に強酸性条件下 (pH2-3) では緩衝剤の有無を問わず非常に促進された。また各緩衝剤に固有な至適イオン強度の条件下では、グッドバッファー 11 種は必ず線維形成を促進した。一方、緩衝剤なしでは生理的 pH・イオン強度でのみアミロスフェロイド形成が認められた。グッドバッファーの場合、緩衝剤の特定の部分分子構造に相関して形成の有無が分かれ、特に tris(hydroxymethyl) 骨格を有するもので形成が促進されたが、その場合も生理的 pH・イオン強度が必要であった。この傾向はリン酸バッファーでも認められたが、グッドバッファーとは大きく異なり、生理的 pH ではアミロスフェロイドのみが形成され、線維はほとんどなかった。今回の結果から、アミロスフェロイド形成には少なくとも生理的溶媒環境が必要であること、一方、線維形成は強酸などの変性条件下でむしろ促進されることがわかり、その形成経路の違いが明確に示された。どのような溶媒環境でも毒性はアミロスフェロイド形成とのみ相関することから、同じ構造、あるいは毒性部位を持つアミロスフェロイドが形成されていると考えられ、アミロスフェロイドが毒性の鍵を握る分子であることが改めて示された。

c. 蛍光標識 A β を用いたアミロスフェロイド形成

蛍光標識 A β 存在下でもアミロスフェロイドは形成され、神経毒性を発揮することが明らかとなった。また、未標識と蛍光標識 A β の比率を至適化することで、蛍光標識の影響を最小限にした状態で凝集プロセスを観察可能であることを見出した。予備的ではあるが、A β 初期濃度と凝集プロセスの時間経過の関係は、以前、透過型電子顕微鏡観察により得た知見とほぼ相関していた。(詳細は金城の欄参照)

D. 考察

(1) アミロスフェロイド特異的抗体が、ヒト脳においても疾患特異的染色を示すことから、アミロスフェロイド(類似)構造が生体に存在する可能性が高まった。今回、アミロスフェロイド認識抗体だけではなく、機能的抗体、即ちアミロスフェロイド毒性中和抗体並びに形成阻害抗体も確立したため、今後治療への展開も期待出来る。アミロスフェロイド特異的抗体は、A β モノマーや線維にほとんど反応しないことから、アミロスフェロイドはこれらとは表面構造が異なることが示唆された。今後、この点を解明することが、なぜ特定の神経だけが死に至るのか、それをいかに阻止出来るかという基礎と応用の両観点で非常に重要である。また、得られた抗体を用いて液相(サンドイッチ)ELISAの系を構築し

た。今後、反応の安定性、感度などを検討し、実際に生体試料で検出可能なキット化を検討したい。

(2) 今回の検討から、アミロスフェロイドは病態解明のためのよい入り口であることが改めて示された。なぜなら、Aβ内部配列に変異が生じる家族性アルツハイマー病原因遺伝子 arctic, tottori 変異を持つ Aβも、アミロスフェロイドを形成し毒性を発揮した。また、アミロスフェロイド形成は生理的環境下で最も促進されるが、その場合も溶媒環境を問わず、毒性は 10-15 nm のアミロスフェロイド存在量と相関していた。従って、アミロスフェロイドの形成機構と毒性発現機序の解明は、疾病への理解を促し、治療・予防などの応用につながることを期待される。現在進めている、構造変化部位の検証が今後鍵となる。

(3) 現在、タンパク質の自己凝集プロセスを溶液中でそのまま観測する手法は存在しない。ごく微量の試料を溶液中でそのまま観測可能であること、高感度であることから FCS は今回の目的に適切な手法である。最大の問題は、元々タンパク質が持つ自家蛍光だけでは感度が弱いため、人工的に蛍光標識を入れる必要があることであり、いかにタンパク質の機能を損なわずに蛍光を導入可能であるかが課題である。今回、我々はその問題をクリアし、アミロスフェロイドの構造と機能を損なうことなく、測定に十分な強さの蛍光標識を行うことに成功した。これを用いた FCS 測定では、回転攪拌時間に比例し大きな構造体が形成されていることが示され、今後、蛍光標識の手法や部位や蛍光標識体の存在比率を至適化することで、アミロスフェロイド形成過程を観察可能であると考えられた。

E. 結論

今年度の検討から、以下の結論が得られた。

(1) アミロスフェロイド特異的抗体による免疫染色の結果から、類似構造体がヒト脳にある可能性が高まった。

(2) 毒性は常にアミロスフェロイドに相関するため、その形成と毒性発現機序の解明は病態理解に非常に有効であることが示された。形成機構について重要な手がかりが得られた。

(3) FCS によるアミロスフェロイド形成のリアルタイム観測法構築の可能性が見えた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 星美奈子：新規毒性物質「アミロスフェロイド」の形成と神経細胞死 生化学 総説 76, 631-639, 2004

2) 星美奈子：「かたち」が制御する神経の死：アミ

ロスフェロイドから病態・老化の暗号を解く 蛋白質核酸酵素 5月号増刊「細胞における蛋白質の一生」生成・成熟・輸送・管理・分解・病態、編集 小椋光・遠藤遠藤斗志也・森正敬・吉田賢右、共立出版、東京

3) 星美奈子：新規球状毒性会合体「アミロスフェロイド」の同定-アルツハイマー病発症に置ける神経細胞死機構の解明に向けて Dementia Japan 18, 19-28, 2004

4) 星美奈子：βアミロイド自己組織化による神経毒性の発現-新規毒性物質「アミロスフェロイド」とアルツハイマー病：化学と工業 第57巻、第5号、519-521, 2004

5) 星美奈子：Bioindustry 神経変性疾患研究の最前線 特集号監修：特集にあたって 21, 5-7: アミロスフェロイド-タンパク質の自己組織化と神経変性疾患 21, 67-74, 2004

6) 星美奈子：球状βアミロイド凝集体アミロスフェロイド-蛋白質の自己組織化と神経細胞死 Cognition and Dementia 3, 359-366, 2004

2. 学会発表

1) Hoshi, M.: Morpho-metabolism of β-amyloid: nano-fibers as natural defense against neurodegenerative diseases: Symposium on Dynamic Bio-Nano-Fibers in the Cells Focusing Human Body: Cells is being organized with nano-fibers, July 13-14, 2004, Tokyo

2) 野口彰彦・佐藤道夫・松本紳一郎・佐藤一紀・星美奈子：強力な神経毒性を持つ球状βアミロイド会合体「アミロスフェロイド」の同定：第84回日本化学会春期年会 2004年3月（神戸）

3) 星美奈子（2004年3月）アミロスフェロイドの発見-「かたち」が制御する神経細胞死：第6回七隈アルツハイマー病研究会カンファランス：福岡

4) 星美奈子（2004年3月）アルツハイマー病とナノファイバー形成-ファイバー形成は生体防御反応か？：第3回ナノファイバー技術戦略研究会「21世紀を拓くナノファイバーテクノロジー」-ナノファイバーとバイオの未来と新展開する高度ナノ測定技術の実際-：大岡山（東京工業大学 百周年記念館）

5) 星美奈子（2004年12月）球状βアミロイド凝集体「アミロスフェロイド」-老化に伴うタンパク質の自己組織化と神経細胞死：第27回日本分子生物学会年会ワークショップ：老化研究：新たなパラダイム形成を目指して 神戸

6) 星美奈子（2004年12月）球状βアミロイド凝集体「アミロスフェロイド」-老化に伴うタンパク質の自己組織化と神経細胞死：第27回日本分子生物学会年会ワークショップ：老化研究：新たなパラダイム形成を目指して 神戸

F. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

1) 抗体およびその利用

出願日：平成16年8月11日

発明者：星美奈子 出願人：三菱化学株式会社

特願2004-234857

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告書

βアミロイド及びそのアナログの高純度合成と構造解析

分担研究者 佐藤一紀 福岡女子大学人間環境学部環境理学科 教授

研究要旨

βアミロイド (Aβ) の構造と神経毒性の相関を調べるため Aβ(1-40)、D7N-Aβ(1-40)、E22G-Aβ(1-40)を合成した。また、金コロイドに結合させて特異抗体を作製するために遊離のSH基をもつAβ(1-39)-Cysを合成した。さらに、競合阻害実験に用いるためにAβ部分ペプチドを全配列にわたり合成した。

A. 研究目的

アミロスフェロイド仮説によるアルツハイマー病病態解明のためには、βアミロイド (Aβ) の構造と神経毒性の相関を明らかにする必要がある。そのためにはAβ及びそのアナログを大量に必要とする。本分担研究の役割は研究全体で使用するこれらペプチドを速やかに、かつ大量に合成することであり、また、必要に応じてそれらの物性を調べることである。

B. 研究方法

Aβ及びそのアナログの合成にはFmoc固相合成法を用い、装置としてABI社製431A型合成機を使用した。合成のプロトコールはFastMocプログラムを採用した。合成途中でのペプチドの会合を抑える効果があると言われるシュードプロリンジペプチド誘導体を適宜用いた。樹脂から切り出した粗ペプチドを逆相HPLCによる分取を繰り返すことにより精製した。合成ペプチドの純度はHPLCで確認し、構造は質量分析とアミノ酸分析により確認した。

C. 研究結果

Aβの構造活性相関を調べるためAβ(1-40)、D7N-Aβ(1-40)、E22G-Aβ(1-40)を合成した。目的物の純度改善をめざして、最近開発されたシュードプロリンジペプチドを採用した。その結果、通常のアミノ酸を用いた場合より純度の高い粗生成物が得られた。ペプチドの精製のために逆相HPLCにより分取を繰り返した。

次に、金コロイドに結合させて特異抗体を作製するために遊離のSH基をもつペプチドの合成を計画した。当初はAβ(1-40)-Cysの合成を試みたが、Aβ(1-40)から1残基の延長で、ペプチドの純度と溶解性が著しく低下し、精製は困難であった。そのため、Aβ(1-39)-Cysを合成することとしたが、精製

はAβ(1-40)に比較して困難であった。原因として、会合による分子間S-S結合形成の促進が考えられた。

Aβの会合部位あるいは受容体結合部位をスクリーニングするためAβ(1-40)のアミノ酸を1残基ずつ移動したペプチド36種 [Aβ(1-5)、Aβ(2-6)、Aβ(3-7)・・・] を合成した。合成ペプチドの物性はアミノ酸組成から予想した傾向とほぼ一致し、例えば疎水性の高い領域のペプチドは水に対して難溶であった。

D. 考察

Aβ(1-40)の溶解度はAβ(1-42)に比較すれば高く、逆相HPLCによる精製が可能であるが、カラム吸着によると思われる大幅な回収率の低下は避けられず、粗ペプチドの純度が低い場合には精製の繰り返しによる収率低下は避けがたい。シュードプロリンジペプチドの採用により純度の改善が見られたが、固相合成で高純度品を得るには、更なる条件の改良が必要である。

スクリーニング用ペプチドの合成に関しては、通常のコンプナトリアル合成と異なり、今回我々は36種のペプチドを個々に合成したので、それぞれ比較的大量の試料を所持している。これらは、今後様々な目的に使用可能と思われる。

E. 結論

アミロイドβ (Aβ) の構造と神経毒性の相関を明らかにするために種々のAβ及びそのアナログを合成した。これらのペプチドを用いて、多くの有益な情報が得られつつある。その内容については、他の分担研究者の報告及び総括研究報告を参照されたい。

F. 健康危険情報
該当なし。

G. 研究発表

Nov.-Dec., 2004, Zermatt, Switzerland.

1. 論文発表

- 1) Lee C.-W., Lee, E.-H., Takeuchi, K., Takahashi, H., Shimada, I., Sato, K., Shin S.-Y., Kim, D.-H., and Kim, J.-I.: Molecular basis of the high-affinity activation of type 1 ryanodine receptors by imperatoxin A. *Biochem. J.*, **377**, 385-394 (2004)
- 2) Thwin M.-M., Douni, E., Aidinis, V., Kollias, G., Kodama, K., Sato, K., Satish, R. L., Mahendran, R., and Gopalakrishnakone, P.: Effect of phospholipase A₂ inhibitory peptide on inflammatory arthritis in a TNF transgenic mouse model: a time-course ultrastructural study. *Arthritis Research & Therapy*, **6**, 282-294 (2004)
- 3) Nakamura, M., Ishida, Y., Kohno, T., Sato, K., Oba, Y., and Nakamura, H.: Effects of modification at the fifth residue of μ -conotoxin GIHA with bulky tags in the electrically stimulated contraction of the rat diaphragm. *J. Peptide Res.*, **64**, 110-117 (2004)
- 4) Manita, S., Kawamura, Y., Sato, K., Inoue, M., Kudo, Y., and Miyakawa, H.: Adenosine A₁-receptor-mediated tonic inhibition of glutamate release at rat hippocampal CA3-CA1 synapses is primarily due to inhibition of N-type Ca²⁺ channels. *Eur. J. Pharmacology*, **499**, 265-274 (2004)

2. 学会発表

- 1) Thwin M.-M., Douni, E., Aidinis, V., Kollias, G., Kodama, K., Sato, K., Satish, R. L., Mahendran, R., and Gopalakrishnakone, P.: Anti-inflammatory peptides designed from phospholipase A₂ inhibitory protein from the serum of *Python reticulatus*. 1st Asia-Pacific International Peptide Symposium, Oct.-Nov., 2004, Fukuoka, Japan.
- 2) Lee C.-W., Lee, E.-H., Takeuchi, K., Takahashi, H., Shimada, I., Sato, K., Shin S.-Y., Kim, D.-H., and Kim, J.-I.: Molecular basis of the high-affinity activation of skeletal ryanodine receptor Ca²⁺-release channel by imperatoxin A., 1st Asia-Pacific International Peptide Symposium, Oct.-Nov., 2004, Fukuoka, Japan.
- 3) Gopalakrishnakone, P., Thwin M.-M., and Sato, K.: Anti-inflammatory peptides designed from phospholipase A₂ inhibitory protein from the serum of *Python reticulatus*., International Congress - Natural Peptides to Drugs,

H. 知的財産の出願・登録状況

該当なし。

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告書

機能的蛍光標識導入によるβアミロイド蓄積過程の分析手法開発に関する研究

分担研究者 菊地和也 東京大学大学院薬学系研究科 助教授

研究要旨

蛍光標識化 Aβペプチドの合成について、種々の担体を原料として検討を行い、このうち Fmoc-NH-SAL TentaGel を用いることで効率的にアミノ酸残基つなげることに成功した。この担体を用いることでN末及びC末修飾Aβ TMR 誘導体、K¹⁶、K²⁸ TMR 誘導体を作製した。いずれの誘導体も蛍光量子収率が 0.1 以上と測定感度が十分高く、またレーザー照射によっても褪色しないため蛍光相関法の測定に用いることができる。また、末端に Cystein を導入した蛍光標識 Aβペプチド合成にも成功した。

A. 研究目的

溶液中におけるアミロスフェロイド (APSD) 形成の経時変化を測定するために、蛍光相関法 (Fluorescence Correlation Spectroscopy, FCS) を用いて、分子揺らぎを測定する。この結果、現在まで評価手法が存在しなかった溶液中における APSD 形成の系時変化を測定することが可能となる。この目的のため、FCS 測定に最適な蛍光修飾化βアミロイド(β-Amyloid, Aβ)を合成する。

B. 研究方法

レーザー照射可能な蛍光ラベルで標識した Aβ類縁体を合成する。この場合以下の条件をみたく修飾化の検討が必要である。

- 1) レーザー光照射によっても褪色しにくい色素を用いる。
 - 2) 導入した蛍光色素が FCS 測定を行い為に十分な量子収率を有する。
 - 3) 蛍光色素導入によっても APSD 形成が阻害されない。
- この条件をみたく蛍光色素修飾化ペプチドを Tetramethyl rhodamine 5-carboxylic acid (TMR) を Aβ₄₀ の C 末端、N 末端及び中間部位に修飾化し、蛍光強度測定を行った。

C. 研究結果

蛍光色素としては TMR を用いた。まず、ペプチド鎖の C 末と N 末のどちらか一方に TMR を導入したペプチドを合成した。以下には C 末に導入した場合の合成法を記す。

Fmoc-NH-SAL TentaGel を出発物質として HBTU/HOBt をカップリング試薬に用い、Aβ₁₋₄₀ の配列を固相合成した。固相からの切り出し及び脱保護のためレジンをカクテルで室温、3時間処理した。ろ液にエーテルを加えて粗ペプチドを得た後、これを C18 逆相 HPLC により精製した。メインピークを含むフラクションを濃縮した後、凍結乾燥した。

この結果、Aβ₁₋₄₀ の C 末端に lysine 残基が導入されたペプチドに lysine に TMR が修飾された蛍光性 Aβ類縁体を合成することができた。

N 末修飾化体については、まず N 末の aspartic acid にγアミノブチル酸をリンカーとして導入しアミノ基の求核性を確保した。このペプチドに TMR を反応させ修飾化した。N 末修飾化体についても上記同様の精製法を行った。この2つのペプチドの蛍光性質について下記の表に記した。

ペプチド	励起光 (nm)	蛍光 (nm)	量子収率 (Φ)
Aβ ₁₋₄₀ NTMR	552	574	0.41
Aβ ₁₋₄₀ CTMR	553	572	0.22

TMR 自身は蛍光量子収率(Φ)が 0.6 程度であるが、いずれのペプチドもこれより光りにくい性質を示した。これはペプチドにおいて蛍光色素が分子内会合を起こし、基底状態における蛍光消光が起きているためであると考えられる。しかし、いずれのペプチドも FCS に応用するために十分強く光ることが確認された。これら蛍光標識ペプチドの重合性質について FCS を用いて検討した (主任研究者の成果参照)。

今回の測定では修飾した Aβを用いて分子重合の仕方を調べている。この場合、導入する蛍光色素によって重合の仕方が影響される可能性がある。このため、C 末と N 末以外にも蛍光色素を導入することにした。そこでまず、Aβ₁₋₄₀ の中程に存在する lysine 残基に TMR を標識したペプチドを合成した。この場合、16番目の lysine と28番目の lysine に蛍光標識したペプチドを作製した。

また、重合との関連が高くないと考えられている C 末を短くしたペプチドも作製した。この場合37残基のものと35残基のものを合成した。

以上、6種類の蛍光基修飾化 Aβを作製し、いずれのペプチドも水溶液中で FCS 測定を行

うために十分な蛍光量子収率を有していることが確認された。

蛍光標識化したペプチドについては今後溶液中における Aβ の重合化を調べるために活用する。また、標識部位を異なるアミノ酸残基に導入したペプチドを用いて得られた成果より、Aβ のうち重合化に大きな影響を与えない配列部分が類推される。この結果を用いて今後重合化に影響を与えない標識部位についての最適化が可能となる。

D. 考察

FCS の結果より N 末修飾化を行っても C 末修飾化を行っても APSD 形成が確認された。この結果より、修飾部位や修飾蛋白の混入条件を最適化することにより、APSD 形成のタイムコースを詳細に検討することが可能となると考えられる。

E. 結論

FCS 測定に用いることができる Aβ の蛍光標識体合成に成功した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

- 1) E. Kawabata, K. Kikuchi, Y. Urano, H. Kojima, A. Odani & T. Nagano. Design and Synthesis of Zinc-Selective Chelators for Extracellular Applications. *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 818-819 (2005)
- 2) K. Hanaoka, K. Kikuchi, H. Kojima, Y. Urano & T. Nagano. Development of a Zinc Ion-selective Luminescent Lanthanide Chemosensor for Biological Applications. *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 12470-12476 (2004)
- 3) T. Yogo, K. Kikuchi, K. Hirose, M. Iino & T. Nagano. Modification of Intracellular Ca²⁺ Dynamics by Laser Inactivation of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Using Membrane-permeant Probes. *Chemistry & Biology*, **11**, 1053-1058 (2004)
- 4) Y. Hu, K.N. Houk, K. Kikuchi, K. Hotta, & D. Hilvert. Nonspecific Medium Effects versus Specific Group Positioning in the Antibody and Albumin Catalysis of the Base-Promoted Ring-Opening Reactions of Benzisoxazoles. *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 8197-8205 (2004)
- 5) D. Okada, C.C. Yap, H. Kojima, K. Kikuchi & T. Nagano. Distinct Glutamate Receptors Govern Differential Levels of Nitric Oxide Production in a Layer-specific Manner in the Rat Cerebellar

Cortex. Neuroscience, **125**, 461-472 (2004)

6) K. Kikuchi, K. Komatsu & T. Nagano. Zinc Sensing for Cellular Applications. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **8**, 182-191 (2004)

国内外の招待講演

- 1) K. Kikuchi, COE 国際シンポジウム“Metals in Biology”名古屋大学 COE 拠点, “Zinc Sensing for Cell Biology”2005年 1月 11日~12日, 名古屋大学野依記念学術交流館
- 2) K. Kikuchi, Gordon Research Conference, Bioanalytical Sensors, “Chemical Sensor Molecules Which Convert Cellular Biological Responses to Chemical Output”, 2004年7月4日~9日, クイーンズカレッジ, オックスフォード市, 英国
- 3) 菊地和也, 第78回日本薬理学会年会シンポジウム「ケモゲノミクスの新しい展開とゲノム創薬科学」「可視化プローブのデザインによるケモゲノミクス」2005年3月22日~24日, パシフィコ横浜, 横浜市
- 4) 「ナノバイオ基礎から最前線」コース~バイオとナノテクの融合による新技術・新産業の創出~, (財)神奈川科学技術アカデミー, 「細胞を探るナノプローブ」2004年11月25日, かながわサイエンスパーク, 川崎市
- 5) 京都大学 21 世紀 COE プログラム「ゲノム科学の知的情報基盤・研究拠点形成」「ファーマゲノミクスの新展開:ゲノムとネットワークからケミカルゲノミクスへ」, 「可視化プローブで細胞機能を覗く」2004年10月5日, 京都大学薬学部記念講堂
- 6) 分子研研究会「生体金属分子科学の展望」「錯体化学に基づく生体可視化蛍光センサー」2004年10月1日~3日岡崎コンファレンスセンター
- 7) 第17回生物無機化学夏季セミナー, 「錯体化学に基づく生体可視化蛍光センサーー一亜鉛イオンの生細胞内可視化とランタノイド蛍光錯体の蛍光強度制御」2004年8月7日~9日, シャレー中西, 岐阜県大野郡丹生川村
- 8) 日本化学会生体機能関連化学部会若手の会サマースクール, 「細胞機能の可視化と不活化のケミカルバイオロジー」, 2004年7月16日~17日, 三河ハイツ, 蒲郡市
- 9) 第65回分析化学討論会・シンポジウム「バイオ分析化学の新潮流」, 「細胞機能を覗く分子デザイン」, 2004年5月15日~16日, 琉球大学千原キャンパス, 沖縄県西原町

蛍光相関法による抗体探索とタンパク質凝集リアルタイム測定に関する研究

分担研究者 金城政孝 北海道大学 電子科学研究所 助教授

研究要旨 アミロスフェロイド特異的抗体を用いて、剖検脳におけるアミロスフェロイドの存在を検証と、特異的抗体による早期診断系を開発するために以下の研究を行った。まず、蛍光相関分光法 (FCS) による抗原抗体反応モデル系を構築して通常の ELISA 法との比較を行った。また、ローダミン標識 β アミロイドを用いた予備的 FCS 測定を行い、拡散時間の違いにより、凝集体の検出が可能であることをしめした。さらに、抗体のラベル化と FCS によるプリオン検出の可能について検討した。

A. 研究目的

アミロスフェロイド特異的抗体を用いて、溶液中におけるアミロスフェロイド形成過程を蛍光相関分光法 (FCS) を用いて検出する手法の確立を目指す。アミロスフェロイドは $A\beta$ が凝集して形成されているため、その凝集過程を拡散定数の変化としてとらえることが可能だと考え、そのための実証事件を行った。

B. 方法

本年はまず、予備的な測定として

- 1) これまでの蛍光測定法より FCS を用いた測定法が感度が高いことの実証
- 2) 蛍光標識 β アミロイドを用いた凝集過程の検出法の検討
- 3) モデル系による蛍光標識抗体抗原反応の検証を行った。

測定方法はどれも ConfoCor2 (カールツァイス社製) もしくは浜松ホトニクス製コンパクト FCS 測定装置 (C9413) を用いて測定した。測定条件はとして; 試料量 10 μ L、励起光 514nm もしくは 532nm、蛍光発光 510nm より長波長側、測定時間 15 秒 x 5 回、解析 2 成分モデルによる解析を行った。レーザーパワーは蛍光発光が 30 cps (1 秒あたりの光子としてカウント) となるように調整した。

C. 研究結果

1) 通常の抗原抗体反応の検出では蛍光色素の強度だけを測定している。すなわち実際の測定ではバックグラウンドと実際の蛍光色素の強度の差として 10^{-9} M が限界であった。一方、FCS を用いた測定では蛍光強度と蛍光強度の揺らぎの両方の情報をもとに目的分子からの蛍光強度なのか、バックグラウンドなのかを区別することができる。すなわち FCS では揺らぎの大きさからバックグラウンドからのノイズ (雑音) なのか、実際のシグナルなのかを区別することが可能である。その結果、 10^{-12} M

まで検出可能であることを確認した。

2) FCS 測定でアミロイド蛋白質が凝集することにより、拡散時間の延長が予想される。また、FCS では分子数変化も同時測定可能であり、それから、一分子あたりの蛍光強度の増加としてとらえることが可能かどうかを検討した。実際の測定は、蛍光標識アミロイド β を用い、50、200、350 μ M 濃度になるように調整し、回転攪拌をしながら 60、120、180、240min と時間経過による FCS 測定を行った。FCS での測定結果からは凝集体の検出は非常に感度よく測定可能であることが実証できた。

3) FCS 測定で得られる拡散速度 (又は拡散定数) は分子を球として過程した場合、その分子半径に依存する。従って分子量変化が大きいことが検出感度をあげるためには必須である。ところが抗原抗体反応では抗体の分子量が約 150 kDa であり、それより小さな分子は検出が困難になる。そこで、2 種類の蛍光色素で標識した別々の抗体を用いて感度の上昇が可能かどうか検討した。その結果、GFP と 2 種類の GFP 認識抗体を用いたモデル系では 10^{-12} M まで検出が可能であることが分かった。また、一方ではこの検出限界は抗体の結合力 (Kd) にも依存する事が分かった。

D. 考察

蛍光標識 β アミロイドを用いてゆるやかに回転攪拌をしたサンプルでは FCS の測定でかなりの拡散時間の延長が確認された。これは巨大な構造体が形成されているものと考えられる。FCS の拡散時間を指標とすることで凝集過程を直接検出することが可能であり、また、アミロスフェロイド形成過程を測定することも可能であることが示唆された。FCS を用いた抗原抗体反応の検出ではこれまでの ELISA 法と同等かそれ以上の検出感度があることが示された。

一方で標識に用いた蛍光色素が遊離していることも示唆された。遊離色素は蛍光測定ではバックグラ

ウンドの蛍光として影響がでる可能性があるので、今後の検討課題である。

E. 結論

蛍光相関分光法 (FCS) を用いたアミロスフェロイド形成過程は、蛍光標識アミロイドβや、蛍光標識得意抗体を用いることで高感度に検出可能であると思われる。特に、特に力価の強い抗体の開発は最も重要であるが、また一方では、遊離蛍光色素が検出感度の低下を招いたりするため、今度の研究において、蛍光プローブや標識法の開発 (菊地) と密接に連携しながら進めることが必要である。蛍光相関分光法とともに、蛍光相互相関分光法 (FCCS) に最適な蛍光色素や蛍光標識法を検討していくことが重要である。

G. 研究発表

1. 論文 (主要なもの)

Kenta Saito; Ikuo Wada; Mamoru Tamura and Masataka Kinjo
Direct detection of caspase-3 activation in single live cells by cross-correlation analysis. *Biochem. Biophys. Res. Comm* 324/2 849-854 (2004)

坂田啓司, 藤井文彦, 田村 守, 金城政孝: 「蛍光相関分光法 (FCS) を用いた抗原抗体反応解析および検体検出」 *バイオインダストリー* 2004 4, 52-59 (2004)

Asako Kamada, Hisao Nagaya, Taku Tamura, Masataka Kinjo, Hai-Ying Jin, Toshiharu Yamashita, Kowichi Jimbow, Hideo Kanoh and Ikuo Wada
Regulation of immature protein dynamics in the endoplasmic reticulum
J Biol Chem 279, 21533-21542 (2004)

2. 学会発表 (関連したもの)

7th International Carl Zeiss sponsored Workshop on Fluorescence Correlation Spectroscopy and Related Methods; Dresden / Germany, October 5th to 6th 2004, "Antigen-antibody reaction analysis with Fluorescence Correlation Spectroscopy"
Hiroshi Sakata, Fumihiko Fujii, Mamoru Tamura and Masataka Kinjo

International Symposium of Prion Diseases, Sendai, JAPAN, October 31 to November 2, 2004
"Detection of recombinant bovine prion protein by fluorescence correlation spectroscopy"
Fumihiko Fujii, Hiroshi Sakata, Masayoshi Ueno, Takayuki Yanagiya, Mamoru Tamura, and Masataka Kinjo

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

蛍光相関分光法による抗原の迅速検出及び又は測定法

出願日:平成16年6月3日

特願2004-166440

発明者:金城政孝, 堀内基広, 藤井文彦, 坂田啓司, 田村守, 上野雅由, 柳谷孝幸

出願人:独立行政法人科学技術振興機構 (代表者: 沖村憲樹), 富士テレビオ株式会社 (代表者: 鈴木博正)

発明の名称 : 水溶性蛍光材料およびその製造方法

出願日:平成16年9月22日

出願番号 : 特願2004-275675

発明者:神 隆, 金城 政孝, 田村 守, 藤井 文彦, 坂田 啓司

出願人:独立行政法人 科学技術振興機構 (代表者: 沖村 憲樹)

国立大学法人 北海道大学 (代表者 (学長) : 中村 陸男)

霊長類モデルを用いたアルツハイマー病におけるアミロスフェロイドの病態形成機序の解明と治療法の開発
に関する研究

分担研究者 村松慎一 自治医科大学・内科学講座神経内科部門 助教授

研究要旨

認知症（痴呆症）の主要な原因であるアルツハイマー病の発症には、球状のA β アミロイド蛋白（アミロスフェロイド）が関与していると推察されている。アミロスフェロイドの病態生理学的意義の解明と、診断・治療法開発への応用を目的として研究を行った。アミロスフェロイドの毒性を霊長類のモデルにおいて検証するために、カンクイサルを使用して定位脳手術により海馬、被殻、大脳皮質にA β 1-40またはA β 1-42由来のアミロスフェロイドを注入する実験を行った。単回注入では明らかな細胞死や老人斑の形成は認められなかったが、今後さらに検討を要する。初代培養細胞を入手することが難しい霊長類の神経細胞を簡単に得るために、カンクイサルのES細胞から大量の神経幹細胞を分化誘導する方法を確立した。また、神経細胞へ効率よく遺伝子を導入し長期間発現させることが可能なアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターを使用して、マーカーとして蛍光蛋白質を発現するベクターを開発した。今後、これらの系を使用して病態の解析を継続する。

A. 研究目的

アルツハイマー病は、近年の高齢化人口の増加に伴い重要な社会問題となっている認知症（痴呆症）の主要な原因である。アルツハイマー病では、脳内にA β アミロイド蛋白の蓄積が認められ、A β が神経細胞死を引き起こすと考えられている。A β の神経毒性の機序を解明することは、アルツハイマー病の発症予防および治療法の開発のために重要である。

本研究では、A β が球状の構造（アミロスフェロイド）をとることにより毒性を発揮するという星らの仮説を霊長類のモデルにより検証することを目的としている。

B. 研究方法

(1) アミロスフェロイドの*in vivo*での毒性

カンクイサルを使用して定位脳手術により海馬、被殻、大脳皮質にA β 1-40またはA β 1-42由来のアミロスフェロイドを注入する実験を行った。

(2) 霊長類ES細胞から神経細胞の分化誘導

カンクイサルのES細胞を使用して、効率よく大量の神経細胞を分化誘導するための条件を検討した。ラットおよびマウス胎児の初代培養神経細胞あるいはグリア細胞、ヒトグリア細胞腫瘍株などの条件培地を使用して、浮遊培養により分化誘導を行った。

(3) 神経細胞への遺伝子導入ベクターの開発

マーカーとしてGFPあるいはLacZ遺伝子を発現するアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを作製して、マウスおよびラットへの遺伝子導入の特性を検討した。2型(AAV-2)の他に、3型(AAV-3)、5型(AAV-5)、8型(AAV-8)のAAVベクターを作製した。

C. 研究結果

(1) アミロスフェロイドの*in vivo*での毒性

15歳齢のカンクイサルにおいては、海馬、被殻、大脳皮質にA β 1-40またはA β 1-42由来のアミロスフェロイドを単回注入した後の組織解析で、明らかな

神経細胞死や老人斑の形成は誘発されなかった。

(2) 霊長類ES細胞から神経細胞の分化誘導

ラット胎児の初代培養アストロサイトの条件培地を使用した浮遊培養により、未分化ES細胞から効率よく大量の神経幹細胞を得る方法を確立した。

(3) 神経細胞への遺伝子導入ベクターの開発

AAV-3ベクターは、培養神経細胞へ効率よく遺伝子導入した。AAV-5ベクターは、マウスおよびラットの脳内で広範囲の遺伝子導入が可能であった。AAV-8は、マウスの尾静脈からの注入によって脳内の神経細胞に遺伝子発現が得られた。

(倫理面への配慮)

動物個体での実験手法は、法律第105号「動物の愛護及び管理に関する法律」、総理府「実験動物の飼養及び保管に関する基準」、文部省通知「大学等における動物実験について」、日本霊長類学会「サル類を用いる実験遂行のための基本原則」を遵守し、当施設のガイドラインに従って行った。

D. 考察

アミロスフェロイドの脳内単回注入では、明らかな毒性は認められなかったが、その理由としては、使用したサルの年齢が比較的若かったこと（ヒトの45歳相当）、手術操作による一時的な炎症とそれによるアミロスフェロイド除去反応が生じた可能性など技術的な要因も考えられる。今後、さらに老齢のサルを使用して、注入装置の工夫などを行い侵襲の少ない定位脳手術により再度脳内投与実験を実施する。また、培養細胞を使用した*in vitro*実験により、A β 1-40またはA β 1-42をアミロスフェロイドに形態変化させる誘発因子の候補を探索し、AAVベクターにより当該因子を脳内で発現させて*in vivo*における病態への関与を検証する。

カンクイサルES細胞由来の神経細胞を大量に供給できる方法を確立したことにより、アミロスフェロイドの毒性を霊長類の神経細胞で検証することが

容易になった。今後、カニクイサルのcDNA tipを使用したDNA arrayおよびproteomix解析を行い、毒性の発現機序の解明を行う。

AAV3ベクターを使用すれば神経細胞にほぼ選択的に遺伝子導入できるが、さらに神経細胞特異的プロモーターによってマーカー蛋白質を発現するAAVベクターを使用することで、神経細胞に特異的な変化をreal timeで観察することができる。今後、アミロスフェロイドの細胞内動態を詳細に解析する。

E. 結論

アルツハイマー病におけるアミロスフェロイドの神経毒性発現機構の解明を目標として研究を行った。アミロスフェロイドの脳内単回投与では明らかな神経細胞死は誘発されなかった。今後、内在性のアミロイドがアミロスフェロイドに変化する要因を探求し、その結果を踏まえてモデル動物の作製を試みる。AAVベクターとES細胞を応用することにより霊長類の神経細胞における*in vitro*実験が可能になった。今後、この系を使用してアミロスフェロイドの毒性を検証する。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakai H, Fuess S, Storm T A, Muramatsu S, Nara Y and Kay M A: Unrestricted hepatocyte transduction with AAV serotype 8 vectors in mice. *J Virol*,79(1):214-224, 2005.
2. Sasaki K, Inoue M, Shibata H, Ueda Y, Muramatsu S, Okada T, Hasegawa M, Ozawa K and Hanazono Y: Efficient and stable Sendai virus-mediated gene transfer into primate embryonic stem cells with pluripotency preserved. *Gene Ther*, 12(3):203-210, 2005.
3. 村松慎一: パーキンソン病モデルサルへのES細胞由来神経幹細胞の移植. *日本再生医療学会雑誌*,3:39-44,2004.
4. 村松慎一: 遺伝子治療. 特集 パーキンソン病 *日本臨床*, 62(9): 1648-1652, 2004.

2. 学会発表

1. Muramatsu S et al.: AAV- vector-mediated gene delivery of aromatic L-amino acid decarboxylase restored L-dopa efficacy in a primate bilateral model of Parkinson's disease. The American society of gene therapy's 7th annual meeting. Minneapolis, June 3, 2004.
2. Muramatsu S, et al.: A fail-safe system for gene therapy of Parkinson's disease; Application of removable expression cassette to prevent overproduction of dopamine in a rat model. The American society of gene therapy's 7th annual meeting.

Minneapolis, June 4, 2004.

3. Yuhe Liu, et al.: Specific and efficient transduction of the cochlear inner hair cells with recombinant Adeno-Associated virus type 3 vector. The American society of gene therapy's 7th annual meeting. Minneapolis, June 6, 2004..
4. 村松慎一, 他: 誘導的に Cre リコンビナーゼを活性化する AAV ベクターを応用したより安全なパーキンソン病の遺伝子治療の開発. 第25回日本炎症・再生医学会, 東京, 2004年7月13日.
5. Iwata N, et al.: Therapeutic approach for Alzheimer's disease by neprilysin gene transfer, The 10th annual meeting of the Japan Society of Gene therapy, Tokyo, August 5, 2004.
6. Li Xg, et al.: Inducible reduction of transgene expression as a fail-safe system for gene therapy of neurodegenerative diseases, The 10th annual meeting of the Japan Society of Gene therapy, Tokyo, August 5, 2004.
7. Muramatsu S, et al.: *In Vivo* monitoring of transgene expression in a primate model of Parkinson's disease; potential application of positron emission tomography in gene therapy, The 10th annual meeting of the Japan Society of Gene therapy, Tokyo, August 5, 2004.
8. 村松慎一: Gene therapy for Parkinson's disease; current strategies and future direction,第16回機能回復神経学研究会, 2004年8月6日.
9. Muramatsu S, et al.: Transplantation of neural stem cells derived from primate ES cells in a primate model of Parkinson's disease. JMS 21st Century COE Program Nikko International Symposium, Nikko, September 25, 2004.
10. Muramatsu S, et al.: AAV vector-mediated gene delivery of aromatic L-amino acid decarboxylase restored L-dopa efficacy in a primate model of Parkinson's disease. Society for Neuroscience's 34th Annual Meeting, San Diego, October 23, 2004.
11. Nara Y, et al.: Migration into the neurogenic area promotes neuronal differentiation after intraventricular transplantation of neural stem cells derived from embryonic stem cells. Society for Neuroscience's 34th Annual Meeting, San Diego, October 26, 2004.
12. 村松慎一: パーキンソン病の遺伝子治療. 第1回革新脳科学 COE 国内シンポジウム, 金沢 2005年2月19日.

F. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
なし