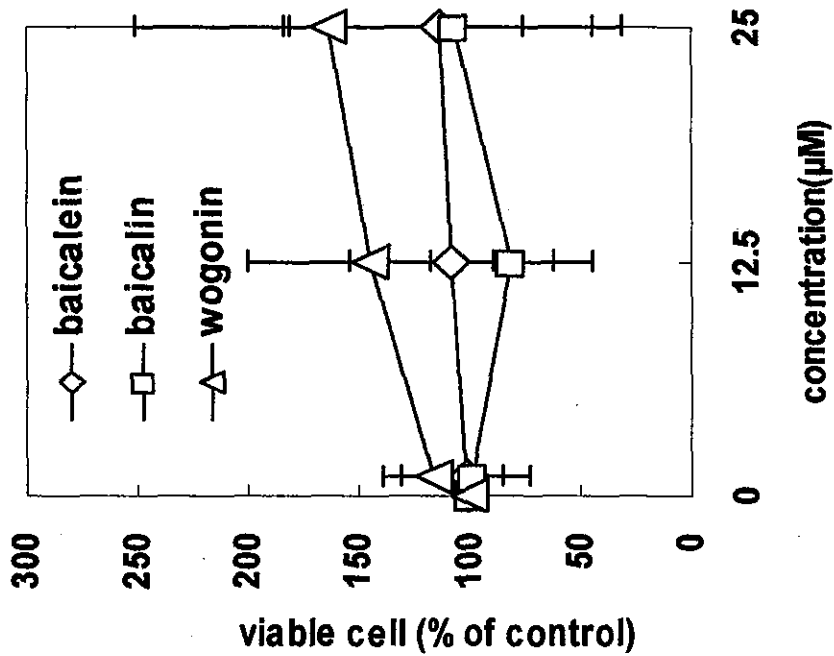
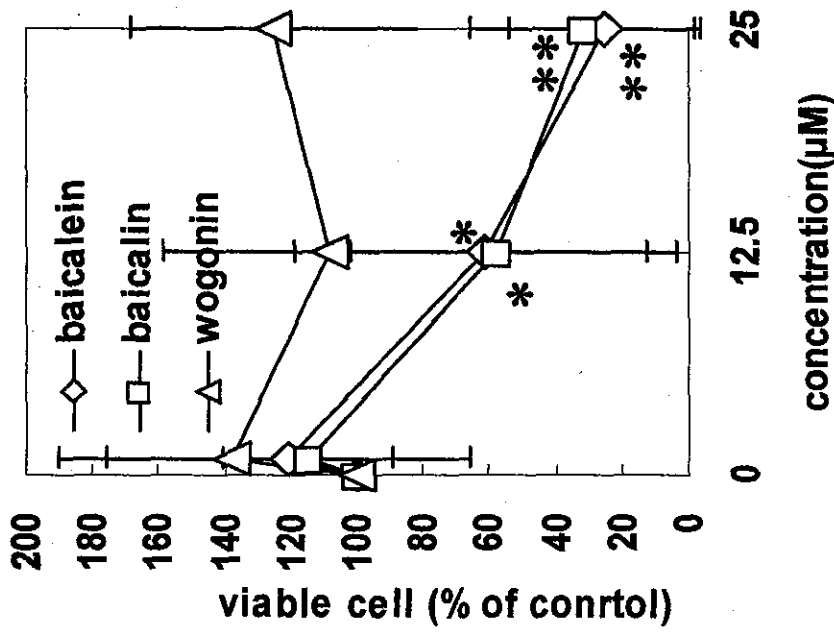


CD38++



CD38++MPC-1-



CD38++MPC-1+

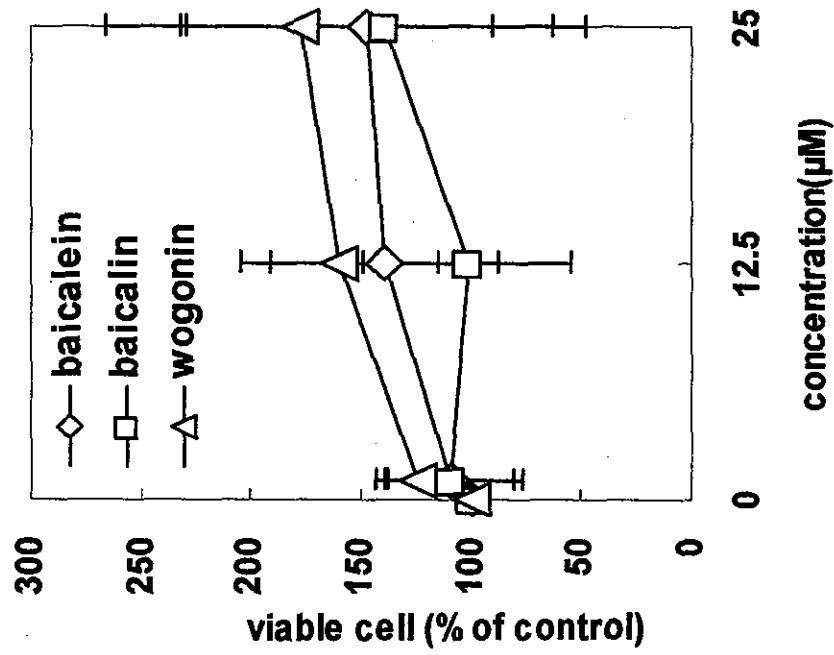
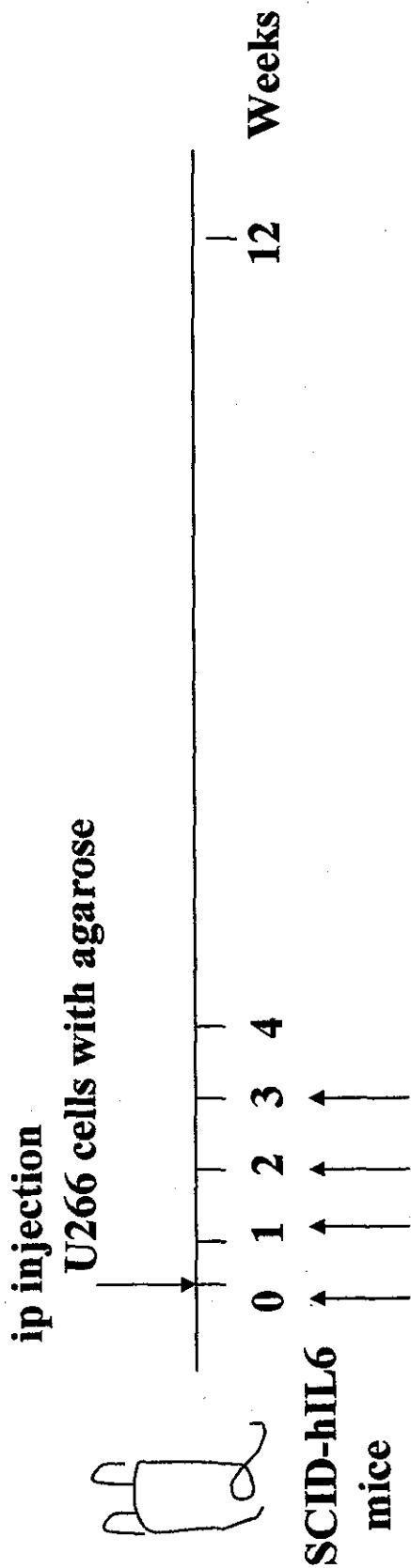


Fig. 1 ALアミロイドーシスを合併している患者骨髄腫細胞(9症例)に対して、バicalein (baicalein)は増殖抑制作用が強い。特に、MPC-1-未熟型骨髄腫細胞に感受性が高い。



sc injection
 1) DHEA (100 μg)
 2) baicalein (10 μg)
 Mass formation in the peritoneal cavity (12 weeks)

	DHEA(-)	DHEA(+)
1. Exp.1	4/5	1/5
Exp.2	5/5	0/5
Exp.3	5/5	2/5
2. Baicalein (-)		Baicalein (+)
Exp.1	5/5	0/5
Exp.2	5/5	0/5
Exp.3	5/5	0/5

Fig. 2 バイカレインのin vivo系での効果

平成 16 年度 アミロイド沈着による病的要素の検索に関する研究

[演題名] 酵母をモデル生物としたアミロイド型タンパク質の品質管理機構の解析
—酵母発現系でのアミロイド型リゾチーム、シスタチンの発現分泌—

[分担研究者] 氏名：加藤昭夫
所属：山口大学農学部生物機能科学科
[共同研究者] 氏名：阿座上弘行
所属：山口大学農学部生物機能科学科

研究要旨 酵母 *Saccharomyces cerevisiae* でアミロイド型リゾチーム及びシスタチンを発現分泌させ、アミロイド型タンパク質の分泌機構ならびにその抑制に関する研究を行った。小胞体膜結合型分子シャペロンカルネキシン及び PDI ホモログ Eps1 を欠損した酵母では不安定変異リゾチームやアミロイド型リゾチームやシスタチンの分泌量が著しく増大することが示された。この結果は、これらの分子シャペロンが不安定タンパク質の品質管理に関与しており、その機能低下がアミロイド型タンパク質などの不安定型タンパク質を細胞外へ分泌しやすくなることを暗示するものである。また、酵母でアミロイド型タンパク質を発現分泌する系を用いて、アミロイド形成ならびにその抑制機構を検討した。モデルタンパク質として、酵母での分泌量が多いアミロイド型シスタチン変異体 (I66Q) を用いた。酵母 *Pichia pastoris* で発現分泌させると培養中にアミロイド凝集型シスタチンが増加し、培地に低濃度のアルギニンの存在下では凝集が抑制された。今後、この系を用いてアミロイドシス抑制成分の検索することができる。

A. 研究目的 近年、真核生物は共通して小胞体でのタンパク質の品質管理により、正しく折りたたまれたタンパク質だけを細胞外に分泌し、不安定でアンフォールドしやすいタンパク質は ERAD (Endoplasmic Reticulum Associated Degradation) システムにより、分解される分子機構が明らかにされてきた^{1,2)}。この ERAD システムは老齢化とともに機能低下することが予想され、アミロイドシスを起しやすいタンパク質が細胞外へ分泌しやすくなると考えられる。我々はこの仮説を酵母 *Saccharomyces cerevisiae* をモデル生物として用いて証明しようとした。本研究ではアミロイド型変異リゾチーム、シスタチンを酵母で発現分泌するシステムを用いて、これらのアミロイ

ド型タンパク質の発現分泌が細胞内の品質管理機能の低下によってどのように変化するのかを明らかにすることを試みた。また、酵母発現系を用いて、*in vivo* でのアミロイド凝集体形成の可視化とその抑止成分の検索システムを作成することを目的とした。

B. 研究方法 酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の分子シャペロン (カルネキシンホモログ Cnelp 及び PDI ホモログ Eps1p) を欠損した変異株と野生株を用いて、アミロイド型リゾチーム、シスタチンの発現分泌を調べた。酵母 *Pichia pastoris* は高分泌性の異種蛋白質発現系であり、このシステムを用いてアミロイド型タンパク質を分泌させ、培養中におけるアミロイド凝集体形成の評価を行っ

た。ヒトリゾチームとニワトリリゾチームのアミロイド型変異体は部位指定変異により作成した。ニワトリリゾチームの方が酵母での発現分泌量が多いので、ニワトリリゾチームのアミロイド変異体 (I55T, D66H) を用いた。シスタチンの場合も同様に、ヒトシスタチンに比べニワトリシスタチンは酵母での発現分泌量が多く、またヒト型とのホモロジーが高く、アミロイド型が容易に得られるため、ニワトリシスタチンを用いた。アミロイド型シスタチンは 66 位の Ileu を Gln に置換した I66Q 変異体を部位指定変異により作成した。

C. 研究結果 動物細胞では小胞体膜結合型の糖タンパク質特異的分子シャペロンであるカルネキシンを欠損すると致死的であるが、酵母 *S. cerevisiae* はカルネキシンを欠損しても生育に影響しないため、カルネキシンの役割を正確に調べることが可能である。図 1 に示すように、野生型酵母及びカルネキシン欠損酵母を用いて、グリコシル型リゾチームのアミロイド型 (D66H) を含む種々の変異体を発現分泌させると、安定な野生型リゾチームなどは野生型およびカルネキシン欠損酵母で分泌量は変化なく多量分泌する。一方、野生型リゾチームに比べ、変性転移転が 15~19℃ 低下するアミロイド型リゾチーム (D66H) など不安定型リゾチームは野生型酵母では分泌が著しく抑制されるが、カルネキシン欠損酵母では 3~5 倍量多く分泌した。この現象はカルネキシン欠損により、品質管理されずに小胞体に蓄積した不安定変異体が蓄積し、小胞体内で Unfold Protein Response が生じ、他の分子シャペロンの著しい増加をもたらし、フォールディングが促進されるためと考えられる⁴⁾。

また、図 2 に示すように PDI ホモログ

のシャペロンである Eps1p を欠損した酵母を用いて、SS 欠損型不安定変異リゾチーム (C94A) を分泌させると著しく分泌量が増大した。現在、アミロイド型リゾチームやシスタチンの分泌を検討中である。表 1 に示すように、野生型酵母で分泌したリゾチームは SS 欠損リゾチームの活性は野生型リゾチームと同じ活性を示し、フォールディングしたものが分泌していることが示されるが、一方、Eps1 欠損酵母で分泌した SS 欠損変異リゾチームの活性は 34% に低下しており、正しくフォールディングしていないものの分泌が確認できた。これは Eps1 欠損により、前述のカルネキシン欠損の場合と同様に、Unfold Protein Response により、不安定なタンパク質のフォールディングが促進されたためと考えられる。これらの結果は分子シャペロンの機能低下がアミロイド型タンパク質の品質管理機能を低下させ、アミロイド型タンパク質を細胞外に分泌することを示している。

本研究のもうひとつの目的である酵母発現系で多量に分泌するアミロイド型タンパク質の作成について検討した。そのモデルとして、ヒトの脳出血の原因となるアミロイド型シスタチンを用いた。図 3 に示すように、ヒトシスタチンとニワトリシスタチンはホモロジーが高く、ヒトのアミロイド変異体 L68Q に相当する I66Q ニワトリ変異体を作成した。この部位は β 構造を分子内でパックするのに重要な疎水残基であり、親水性アミノ酸に置換すると分子内にパックされていた β シート構造が分子の外側に露出しやすくなり、この β シートを介して二量体を形成し、引き続き多量体を形成し、アミロイド線維形成を考えると考えられる。酵母発現系で I66Q を分泌させると *Saccharomyces cerevisiae* に比べ、*Pichia pastoris* で

発現させると著しく分泌することが明らかになった(図4)。また、ヒトのアミロイド型シスタチンに比べ著しく多量に得ることができた。この酵母でのアミロイド型シスタチンの発現系を用いて、アミロイド型シスタチンを分泌させると培養液にアミロイド型凝集体オリゴマーが経時的に増加し、モノマーは増加しないことが示され、*in vivo* システムでアミロイドシスを追跡できることが示された(図5)。モノマー、オリゴマー、ポリマー凝集体は培養液の硫酸分画により調製し、電気泳動で確認したものである。このアミロイド型変異体 I66Q は二量体形成に引き続き多量体を形成することは SH プロテアーゼの阻害活性が著しく低下することからも確認された。図6に示したように、このアミロイド型変異体のアミロイド形成長時間(1ヶ月)を要するが、典型的なアミロイドシスを観察できた。酵母の培養中に得られる凝集体は条件を選べば規則的なアミロイド線維を形成すると考えられる。一般的に、生体内でのアミロイド形成機構として、シードの必要性や長時間を要するなどいろいろな因子が議論されており、今後の一層の研究が必要であろう。本研究者はこのアミロイドシス形成機構にヒントを与える高分泌型 I108T アミロイド変異体についても検討を加えており、N-型糖鎖導入がアミロイド形成を抑制することを観察しており、今後のアミロイドシス治療につながる情報を提供していくための研究を推進している。

D. 考察 酵母をモデル生物としてアミロイド型リゾチーム、シスタチンの分泌系を用いて小胞体内での品質管理に参与する分子シャペロンカルネキシンと PDI ホモログ Eps1 の役割を調べた。真核生物の中で、動物細胞ではこれらのシャペロン

を欠損すると致命的であり、酵母はこれらのシャペロンを欠損しても生育は影響を受けないためにモデル生物として最適である。本研究で明らかにしたように、カルネキシンや PDI ホモログ欠損により、アミロイド型変異体などアンフォールドしやすい不安定なタンパク質が数倍分泌しやすくなる。この結果は分子シャペロンなど新生タンパク質の品質管理に参与している成分の機能低下がアミロイド病の一つの要因となっていると予測される。実際にヒトの場合でも老齢化に伴い、カルネキシンなどのシャペロンの発現量が低下することが報告されている³⁾。本研究で作成したニワトリシスタチンのアミロイド型変異体は酵母で効率よく発現分泌するため、アミロイド形成機構を調べるのに都合のよい系である。

すなわち、アミロイド型シスタチンが分泌するとともに、そのアミロイド凝集過程が追跡できる。現在 A β ペプチドを用いて、アミロイド形成機構を研究できるが、タンパク質を用いたアミロイドシスを調べる系の確立が望まれている。この目的に、酵母でのアミロイド型シスタチンの発現分泌系は適した系であり、今後、アミロイド凝集阻害成分の評価システムに利用できると考えられる。

E. 結論 酵母をモデル生物として、アミロイド型タンパク質を分泌するシステムを用いて、アミロイドシスの分子機構を検討した。この結果、分子シャペロンの機能低下により、アミロイド型タンパク質の品質管理が抑制され、細胞外に分泌しやすくなることが証明された。また、酵母発現系を用いて、アミロイド凝集体形成を経時的に調査できることが示され、アミロイド抑制成分の検索に有効な手段となるであろう。

[引用文献]

1. R. Sitia & I. Braakman. Quality control in the endoplasmic reticulum protein factory. *Nature*, 426, 891-894 (2003).
2. Y. Oda, N. Hosokawa, I. Wada and K. Nagata. EDEM as an acceptor of terminally misfolded glycoproteins released from calnexin. *Science*, 299, 1394-1397 (2003).
3. B.H. Choi and J.S. Kim. Age-related decline in expression of calnexin. *Exp. Mol. Med.* 36, 499-503 (2004).
- 4) Y. Song, H. Azakami, B. Shamima, J. He and A. Kato. Different effects of calnexin deletion in *Saccharomyces cerevisiae* on the secretion of two glycosylated amyloidogenic lysozymes. *FEBS Letters*, 512, 213-217 (2002)

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Y. Song, H. Azakami, B. Shamima, J. He, A. Kato: Different effects of calnexin deletion in *Saccharomyces cerevisiae* on the secretion of two types glycosylated amyloidogenic lysozymes. *FEBS Letters*, 512, 213-217 (2002)
- (2) Y. Song, J. Sakai, A. Saito, M. Usui, H. Azakami, and A. Kato: Relationship between the stability of lysozymes mutated at the inside hydrophobic core and secretion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nahrung*, 46, 209-213 (2002)
- (3) A. Saito, M. Usui, Y. Song, H. Azakami and A. Kato: Secretion of glycosylated α -Lactalbumin in yeast *Pichia pastoris*. *J. Biochem.* 132, 77-82 (2002)

- (4) S.T. Liu, A. Saito, H. Azakami and A. Kato: Expression, purification, and characterization of an unstable lysozyme mutant in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 27 304-312 (2003)
- (5) S. Begum, A. Saito, A. Kato, J. He and H. Azakami: Expression and characterization of chicken ovomucin inhibitor in *Pichia pastoris*. *Nahrung*, 47, 359-363 (2003)
- (6) A. Saito, Y. Sako, M. Usui, H. Azakami and A. Kato: Functional properties of glycosylated lysozyme secreted in *Pichia Pastoris*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 67, 2334-2343 (2003).
- (7) M. Usui, A. Saito, N. Taniguchi, N. Nishijima, H. Azakami and A. Kato: Reduction of antigenicity of Cryj1, major allergen of Japanese cedar pollen, by the attachment of polysaccharides. *Biosci. Biotech. Biochem.* 67, 2425-2430 (2003).
- (8) M. Usui, H. Tamura, K. Nakamura, T. Ogawa, M. Muroshita, H. Azakami, S. Kanuma and A. Kato: Enhanced bactericidal action and masking of allergen structure of soy protein by attachment of chitosan through Maillard-type protein-polysaccharide conjugation. *Nahrung*, 48, (2004).
- (9) M. Usui, T. Shimizu, Y. Goto, A. Saito and A. Kato: Effective reduction of antigenicity of hen lysozyme by site-specific glycosylation. *FEBS Letters* 557, 169-173 (2004)
- (10) X.H. Xu, O. Kashima, A.Saito, H. Azakami and A.Kato: Structural and functional properties of chicken lysozyme fused serine-rich heptapeptides at C-terminus. *Biosci. Biotech. Biochem.* 68, 1273-1278 (2004)
- (11) X.H. Xu, K. Kanbara, H. Azakami and A.Kato: Expression and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* Cne1p, a calnexin homologue. *J. Biochem.*, 135, 615-618 (2004)
- (12) X.H. Xu, H. Azakami and A.Kato: P-domain and lectin site are involved in the chaperone function of *Saccharomyces cerevisiae* calnexin homologue (Cne1p). *FEBS Letters* 570, 155-160 (2004)

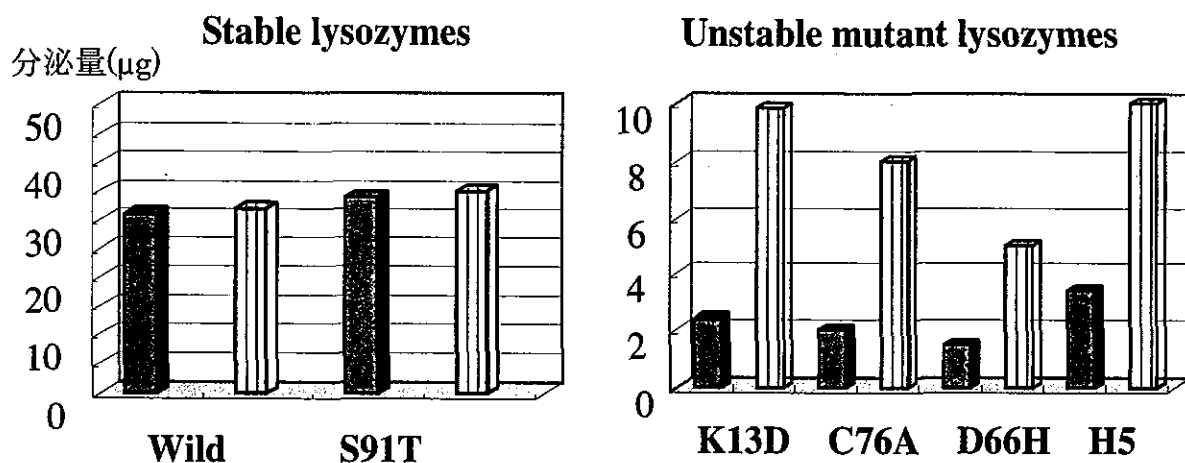


図1. 酵母 *Saccharomyces cerevisiae* での安定型リゾチーム(wild, S91T)および不安定型リゾチーム (K13D, C76A, D66H, S91T) の分泌。■, 野生型酵母; ▨, カルネキシン欠損酵母

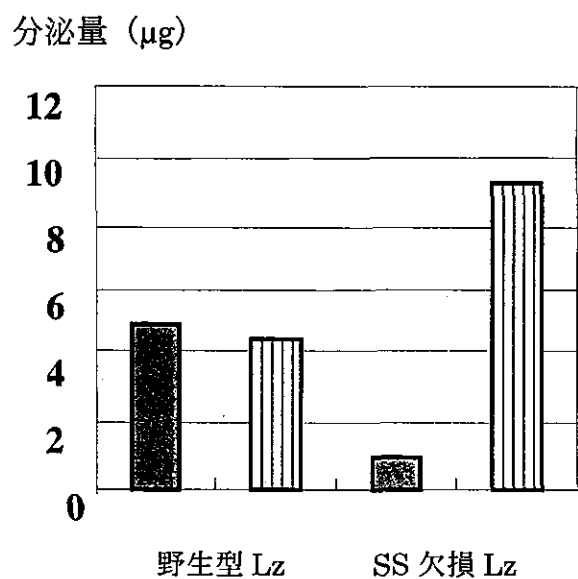
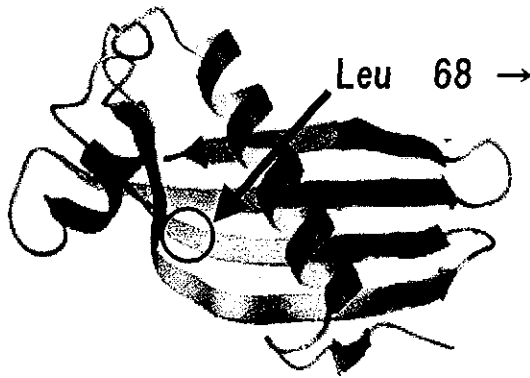


図2. PDI ホモログ Eps1 欠損酵母での野生型リゾチーム及び SS 欠損型リゾチーム変異体 (C94A) の分泌。■, 野生型酵母; ▨, Eps1 欠損酵母

表 1. PDI ホモログ Eps1 欠損酵母で分泌したリゾチームの溶菌活性

	野生酵母	Eps1 欠損酵母
野生型リゾチーム	100	100
SS 欠損型リゾチーム	100	34

Human cystatin C



Chicken cystatin

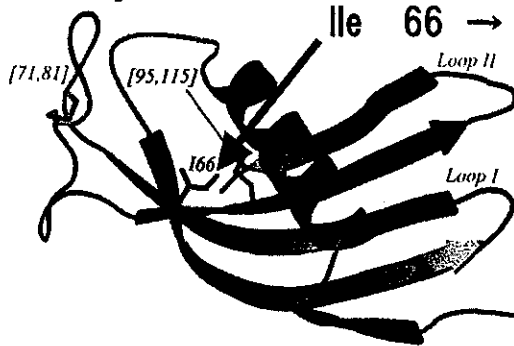


図3. ヒトシスタチンとニワトリシスタチンのアミロイド型変異部位

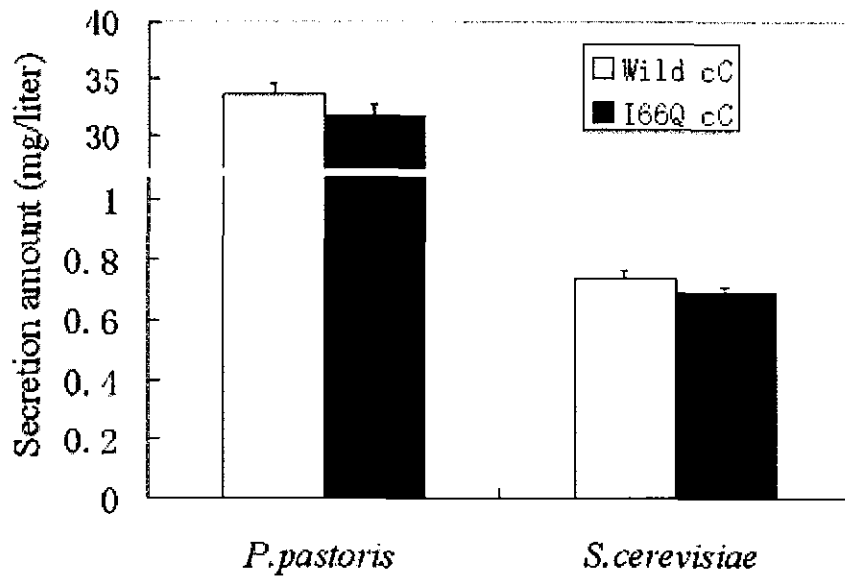


図4. アミロイド型シスタチンの酵母 *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* での発現分泌の比較

分泌量(mg/L)

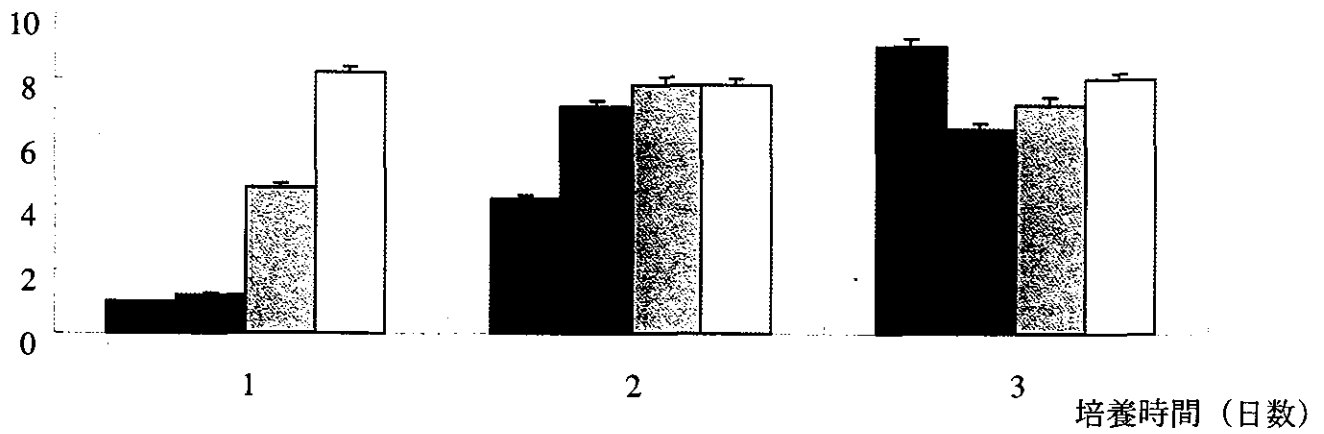


図5. アミロイド型シスタチンの酵母での分泌中における単量体、二量体、多量体、凝集体の経時的形成。■, 凝集体; ■, 多量体; □, 二量体; □, 単量体

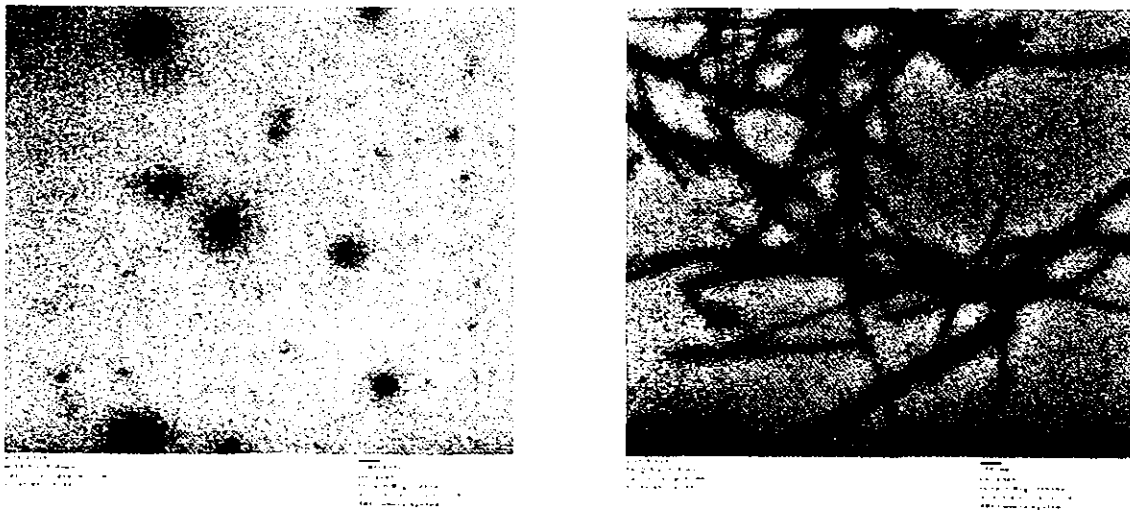


図6. アミロイド型シスタチンのアミロイド線維形成の電顕図。左図, 野生型シスタチン; 右図, アミロイド型シスタチン (I66Q)

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

アミロイド沈着による病的要素の検索に関する研究 分担研究報告書

腸管免疫によるアルツハイマー病のワクチン療法の開発

分担研究者 田平 武 国立長寿医療センター研究所 所長

共同研究者 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 アルツハイマー病に対する経口ワクチンの開発のため、効率よく A β 蛋白を分泌できるようなリコンビナントアデノ随伴ウイルスベクターを作成した。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マウスにウイルス粒子を1回のみ経口投与した。12~13 ヶ月齢の 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、治療したマウス脳において明らかにアミロイド沈着・老人斑形成がコントロールに比べ減少していた。アルツハイマー病患者脳においては、サイトカインの TGF- β が増加しているが、経口ワクチン投与により、血清中および脳内の TGF- β が減少した。これにより、アミロイドの血管沈着（アミロイドアンギオパチー）や血管周囲の炎症も改善する効果も期待される。

A. 研究目的

アルツハイマー病に対する経口ワクチン療法の開発を目的として、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マウスに分泌型 A β 発現アデノ随伴ウイルスベクター(rAAV/ A β)を経口投与し、脳におけるアミロイド沈着の変化について検索した。さらにアルツハイマー病患者脳において増加しているサイトカインの TGF- β についてワクチン投与したマウス脳・血清で測定し、病態に対する影響について考察した。

B. 研究方法

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、アデノ随伴ウイルスベクター (pXXUF1)に組み込み、効率よく A β が細胞外に分泌されるようにした。アルツハイマー病の動物モデルである APP transgenic mouse (Tg2576) に rAAV/ A β を経口投与し (15 週齢、30 週齢、45 週齢時)、腸管組織での A β 抗原の発現や抗体産生、脳におけるアミロイド沈着の変化を病理組織学的に検索した。

2. 免疫組織染色

1) 組織中の 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。

2) 中枢神経系にリンパ球の浸潤の有無を検索するため、抗 CD4 抗体、抗 CD86 抗体、抗 CD11b 抗体、抗 GFAP 抗体 (アストロサイト)、抗 Iba-1 抗体 (ミクログリア) などの抗体を用いて凍結切片を ABC 法にて染色した。

3. サイトカインの TGF- β の測定

rAAV/ A β を投与したマウスの脳組織切片を用いて抗 TGF- β 抗体により ABC 法にて染色した。

血清中の TGF- β については、ELISA kit を用いて測定した。

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、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

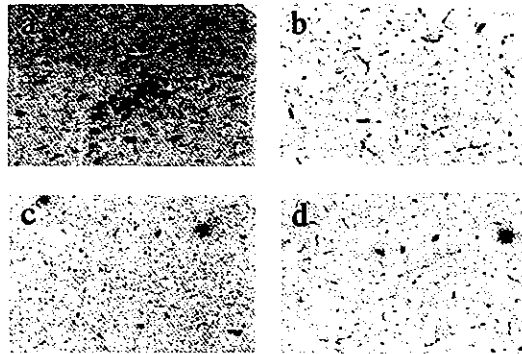
APP transgenic mouse (Tg2576) は、加齢と共にアミロイド沈着が進み、

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。APP transgenic mouse に対して、投与時期を 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 3 つのグループに分け、A β 1-43rAAV をそれぞれ 1 回のみ経口投与した。

A β 1-43rAAV 粒子を経口投与した APP-Tg マウスにおいて、12~13 ヶ月齢の脳を解析すると、コントロールに比べ明らかにアミロイド沈着が減少し、老人斑も激減していた (図 1)。アミロイド沈着を定量的に解析するため、脳の前頭葉、頭頂葉、海馬を 4G8 抗体で免疫染色し、各部位の組織画像を顕微鏡付き 3CCD カメラで撮影し、コンピューターに画像を取り込んだ。陽性部位 (アミロイド沈着) の面積を計測し、各部位の組織面積に対する比を計算した。未治療のコントロール群では、 $2.64 \pm 1.46\%$ に対し、A β 1-43rAAV 治療群では Group A ($0.55 \pm 0.5\%$, $P < 0.001$), Group B ($0.48 \pm 0.35\%$, $P < 0.001$) and Group C ($0.46 \pm 0.27\%$, $P < 0.001$) と有意差を持って減少していた。

他の臓器に炎症反応が起こってい

Frontal cortex



Parietal cortex

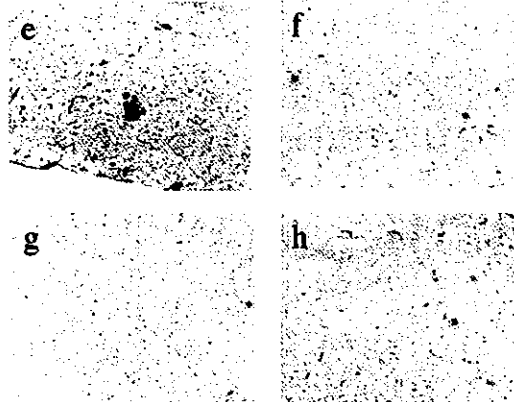


図1 A β 1-43rAAV 粒子を経口投与した APP-Tg マウス (13ヶ月齢) の脳 (前頭葉、頭頂葉) におけるアミロイド沈着。コントロールと比べ、治療群ではアミロイド沈着が著明に減少している。a,e; コントロール、b,f; 15週齢時投与、c,g; 30週齢時投与、d,h; 45週齢時投与。

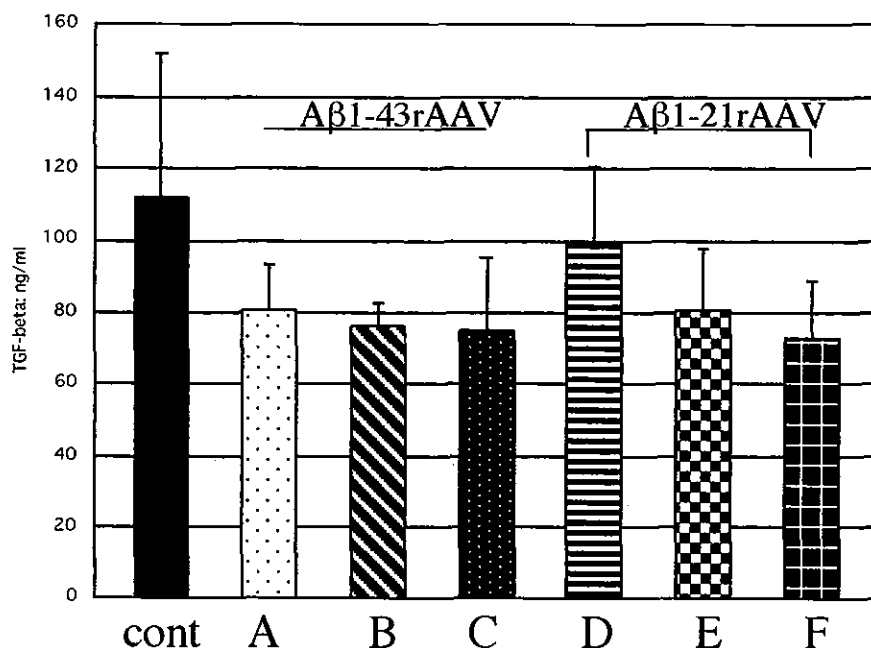
ないか、各臓器の組織を検索したが、どの臓器にも炎症所見は認められなかった。脳組織をT細胞マーカー (CD4)、T細胞活性化分子(CD86)で染色したが、陰性であった。前頭葉、側頭葉には活性化したミクログリア (Iba-1 陽性)の増加を認めた。

血清中の TGF- β について、ELISA kit を用いて測定した。A β 1-43rAAV 粒子を経口投与した APP トランスジ

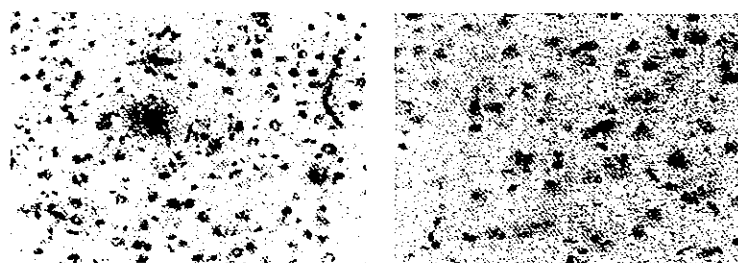
ェニックマウスにおいては、コントロールと比べ有意に TGF- β が低下していた。APP トランスジェニックマウス脳組織においても、免疫組織染色で TGF- β の発現が低下していた。

D. 考察

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マウスの腸管細胞に A β 抗原を強制発現させた場合に、脳アミロイド沈着に変化が



TGF-β1 stain



control

Treated mice

起こるか解析した。腸管に多くの抗原を発現させた場合、抗原に対する抗体産生が誘導され、逆に沈着したアミロイドを除去する現象が認められた。アルツハイマー病患者脳においては、サイトカインの TGF-βが増加しているが、TGF-βは脳ミクログリアを活性化し、Aβ貪食を促進する良い効果もあるが、一方では、アストログリアにおける Aβ産生を促進し、こにため血管壁にアミロイドが沈着するアミロイドアンギオパチーの原

因となっている。さらに TGF-βは、血管内皮細胞に作用し、炎症性サイトカインの IL-1β, TNF-αの産生を促進し血管周囲の炎症を引き起こす障害作用も報告されている。経口ワクチン投与により、血清中および脳内の TGF-βが減少した。これにより、アミロイドの血管沈着（アミロイドアンギオパチー）や血管周囲の炎症も改善する効果も期待される。

アミロイドーシスに対しては、ワクチン療法など抗体やアミロイドを可溶化する分子等を用いた治療の可

能性が示唆された。

E. 結論

アルツハイマー病の病因として amyloid cascade 仮説に基づき、経口ワクチン療法を開発した。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(障害)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。さらにアジュバントを必要としないため強い免疫反応を起こさず脳炎などの副作用も軽減できると考えられる。さらに経口ワクチン投与により、血清中および脳内の TGF- β が減少した。これにより、アミロイドの血管沈着(アミロイドアンギオパチー)や血管周囲の炎症も改善する効果も期待された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. Hideo Hara, Alon Monsonego, Katsutoshi Yuasa, Kayo Adachi, Shinichi Takeda, Xiao Xiao, Keikichi Takahashi, Howard L. Weiner and Takeshi Tabira. : Development of a safe oral A β vaccine using recombinant adeno-associated virus vector for Alzheimer's disease. J. Alz. Dis. 5:483-488, 2004.

2. 原 英夫 : Alzheimer 病に対する経口ワクチン療法の開発 医学のあゆみ 206: 990, 2003.
3. 田平 武、原 英夫 : アルツハイマー病のワクチン療法 updated 125回日本医学会シンポジウム記録集 54-60, 2003.
4. 原 英夫 : アルツハイマー病のワクチン療法 基礎老化研究 27 : 122-127, 2003.
5. 原 英夫 : アルツハイマー病のワクチン療法 Geriatric Medicine 42(4): 494-497, 2004.
6. 原 英夫 : Alzheimer 病のワクチン療法 日本臨床 62増刊号4 : 254-258, 2004.
7. 原 英夫 : アルツハイマー病-早期診断と治療研究の最前線、ワクチン療。カレントセラピー22: 71-75, 2004.
8. 原 英夫 : ワクチン療法 メディカル・サイエンス・ダイジェスト 30: 212-214, 2004.
9. 原 英夫 : アルツハイマー病のワクチン療法 Dementia Japan 18:80-83, 2004.
10. 原 英夫 : アルツハイマー病のA β ワクチン療法 最新医学別冊:新しい診断と治療のABC22、神経3「アルツハイマー病」、158-165, 2004.
11. 原 英夫、田平 武 : β アミロイ

ドワクチン療法。先端医療技術
研究所刊 先端医療シリーズ
30 : 「神経内科の最新医療」、
pp103-107、2004。

12. 原 英夫、田平 武：アルツハ
イマー病の A β ワクチン療法
「Annual Review 神経 2005」、中
外医学社刊、96-102、2004。
13. 原 英夫、田平 武：アルツハ
イマー病の A β ワクチン療法。
「病態の分子生物学 脳神経疾
患」南山堂、印刷中。

H.知的財産権の出願・登録状況

特許出願

アルツハイマー病の治療のための組
換えアデノ随伴ウイルスベクター；
出願番号2003-169714、
平成 15 年 6 月 13 日、PTC 出願（発
明者；原英夫、田平武）。

遺伝子改変マウスを用いた遺伝性アミロイドーシスの発症予防法の開発に関する研究：遺伝性アルツハイマー病モデルマウスを用いた解析

分担研究者 前田秀一郎 山梨大学・大学院・医学工学総合研究部・生化学
共同研究者 Henny Wati^{*}、河西あゆみ^{*}、伊藤禎洋^{*}、東海林幹夫^{**}、瓦林 毅^{**}、
Xiaoying Fu^{***}、樋口京一^{***}
^{*}山梨大学・大学院・医学工学総合研究部・生化学、
^{**}岡山大学・大学院・医歯学総合研究科・神経病態内科、
^{***}信州大学大学院・医学研究科加齢生物学

研究要旨

遺伝性アルツハイマー病のトランスジェニックマウスモデル (APPsw) と我々が作製した無トランスサイレチン (Ttr) マウス及び無血清アミロイドP成分 (Apcs; Sap) マウスを用いて、昨年度に引き続き、遺伝性アルツハイマー病での脳内 A β アミロイドの沈着に Ttr や Apcs がどう関与するかを解析し、以下の結果を得た。

1) 今年度は、6~18カ月齢の Ttr 欠損 APPsw 30 匹と対照ヘテロ接合体 APPsw 29 匹における脳内 A β アミロイド沈着を、抗 A β 抗体を用いて解析した。この結果、15~18カ月齢のマウスにおいて、Ttr が A β アミロイドの沈着を促進する傾向を認めた。

2) 一方、8~16カ月齢の Apcs 欠損 APPsw 22 匹につき、脳内 A β アミロイド沈着程度を、同月齢の野生型 APPsw またはヘテロ接合体 APPsw 合計 23 匹と比較解析した。この結果、両者に差異を認めなかった。

さらに、マウス老化アミロイド線維 (AApoAII) の投与や酸化ストレスが、このモデルマウスでのアミロイド沈着をどう変化させるかを明らかにするための予備実験を行った。

A. 研究目的

トランスサイレチン (TTR) は、アルツハイマー病の A β アミロイドの形成を、*in vitro* で抑制することが見出されているが、*in vivo* での証明はされていない。また、種々のアミロイドーシスで沈着する、異なるアミロイドに共通の微量成分、血清アミロイドP成分 (APCS; SAP) が、A β アミロイドの沈着にどう関与するかも明らかでない。そこで本研究は、この遺伝性神経難病の治療法や予防法を確立することを目的に次のように遂行する。

1) Hsiao 博士が作製した遺伝性アルツハイマー病のトランスジェニックマウスモデル (APPsw) と我々が作製した無 Ttr マウス及び無 Apcs マウスを用いて、遺伝性アルツハイマー病での A β アミロイドの沈着

に Ttr や Apcs がどう関与するかを明らかにする。

2) さらに、マウス老化アミロイド線維 (AApoAII) の投与や酸化ストレスが、このモデルマウスでのアミロイド沈着速度や程度をどう変化させるかを明らかにする。

B. 研究方法

1. マウス

Hsiao 博士から供与された、スウェーデンの早期発症型遺伝性アルツハイマー病の原因となるヒトの変異アミロイド前駆体蛋白 (APP) 遺伝子を運ぶトランスジェニックマウス (APPsw) と我々が確立した無 Ttr マウス株あるいは無 Apcs マウス株とを交配させて得た Ttr 又は Apcs 欠損 APPsw と対照野生型 APPsw または対照ヘテロ接合

体 APPsw とにおける脳内 A β アミロイド沈着の開始時期や程度を、月齢を追って比較解析し、A β アミロイドの沈着に Ttr や Apcs がどう関与するかを解析する。

脳内 A β アミロイドの沈着は、コンゴ赤染色法、および抗 A β 抗体 (A β 9204; A β の N 末端を認識するポリクローナル抗体) を用いて検出する。

2. 脳内 A β アミロイドの沈着程度の計測

1) 抗 A β 抗体 A β 9204 で染色されたマウス脳切片は AxioCam (Carl Zeiss) にて digitalize された。2) Image-Pro Plus Ver4.5 (Plantron) を用いて染色陽性部位 (アミロイド斑+血管アミロイド) の面積と大脳皮質全体の面積の比を計測した。計測はマウスあたり 4 切片で行った。

3. アミロイド線維の投与

AApoAII 画分を 1mg/ml の濃度で含む蒸留水 0.15ml を尾静脈から注入した。対照群として、同月齢のマウスに蒸留水のみを注入した。

4. 酸化ストレスの負荷

8 カ月齢の C57BL/6 マウスに体重当り 1 日 5 μ g/kg のダイオキシシン (TCDD) を 3 日連続して胃ゾンデで強制経口投与した

5. 実験動物および飼育条件

マウスは日本クレア株式会社から購入した。マウスの飼育およびマウスを用いた実験は、山梨大学の動物実験専門委員会の承認を得て行った。動物愛護の観点から倫理的に問題は無いと考えられる。

C. 研究結果

1) 今年度は 6~18 カ月齢の Ttr 欠損 APPsw 30 匹と同月齢の対照ヘテロ接合体 APPsw 29 匹とにおける脳内 A β アミロイド沈着程度 (アミロイド斑+血管アミロイド) を解析した。この結果、14 ヶ月齢以下の月齢では差異を認めなかったが、15~18 カ月齢では、Ttr 欠損マウスに比べ、ヘテロ接合体マウスにおいて、より高度の A β アミロイドが沈着する傾向を認めた (図 1)。

さらに、アミロイド斑と血管アミロイドの沈着程度を解析し、前者には、有意な差異を認めるが、後者には差異を認めないことを見出した。

2) 8~16 ヶ月齢の Apcs 欠損 APPsw 22 匹

と同月齢の対照野生型またはヘテロ接合体 APPsw 23 匹とにおける脳内 A β アミロイド沈着程度を解析した。この結果、両者の A β アミロイド沈着程度に差異を認めなかった。

3) 8~9 カ月齢の APPsw 7 匹に AApoAII 0.15 mg を投与し、4 カ月後に脳切片を作成した。今後、より多数のマウスに AApoAII 線維を投与し、アミロイド沈着程度を、非投与群と比較解析する。

4) 8 カ月齢の C57BL/6 マウスに体重当り 1 日 5 μ g/kg の TCDD を 3 日連続して胃ゾンデで強制経口投与したところ、その後 2 ヶ月間にわたり、尿中の酸化ストレスマーカー、8-OhdG 量が、非投与マウスの 2~3 倍に上昇した。一方、肝中の Ttr mRNA 量は、TCDD 投与後も減少を認めなかった。

D. 考察

15~18 カ月齢のマウスにおいて、Ttr が脳内 A β アミロイド斑の沈着を促進するが、血管アミロイドの沈着には、影響を与えないことを見出した。今後、より多くのマウスを解析し、結果を検証する。

一方、Apcs については、A β アミロイドの沈着を促進することを示す結果は得られなかった。

成体マウスでは、5 μ g/kg の低濃度の TCDD への 3 日間連続曝露は、肝機能に殆ど影響を与えずに、酸化ストレスを長期に負荷することが示唆された。そこで今後、この方法によって酸化ストレスが APPsw のアミロイド沈着にどう影響するかを検討する。

E. 結論

Ttr が遺伝性アルツハイマー病のモデルマウスにおける脳内アミロイド斑の沈着を促進することを示唆する結果を得た。また、モデルマウスを低濃度の TCDD に曝露させることで、酸化ストレスが脳内 A β アミロイドの沈着にどう影響するかを検討できることを示す結果を得た。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

I. 論文発表

- 1) Tamaoki T, Tezuka H, Okada Y, Ito S, Shimura H, Sakamoto M, Endo T, Ozaki Y, Kanba S, Maeda S: Avoiding the effect of linked genes is crucial to elucidate the role of *Apcs* in autoimmunity. *Nature Medicine* 11(1): 11-12, 2005.
- 2) Wei L, Kawano H, Fu X, Cui D, Ito S, Yamamura K, Ishihara T, Tokuda T, Higuchi K, Maeda S: Deposition of transthyretin amyloid is not accelerated by the same amyloid *in vivo*. *Amyloid* 11(2): 113-120, 2004.
- 3) Nakamura M, Ando Y, Nagahara S, Sano A, Ochiya T, Maeda S, Kawaji T, Ogawa M, Hirata A, Terazaki H, Haraoka K, Tanihara H, Ueda M, Uchino M, Yamamura K: Targeted conversion of the transthyretin gene *in vitro*

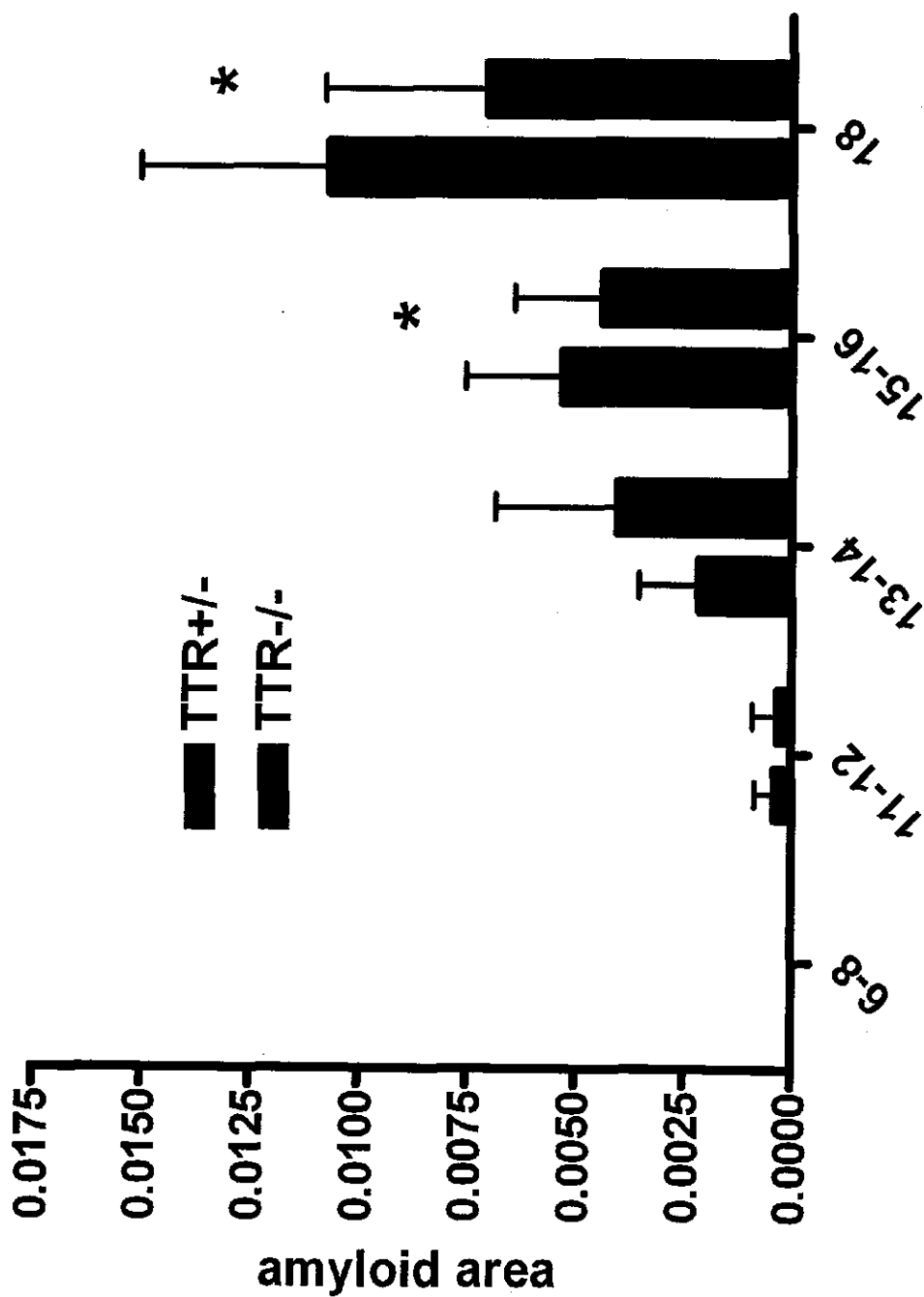
and *in vivo*. *Gene Therapy* 11(10): 838-846, 2004.

- ## 2. 学会発表
- なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

Tg2576/TTR KO



Age (months)

図1 : TTR+/-; 対照 Ttr ヘテロ接合体 APPsw、及びTTR-/-; Ttr欠損 APPswにおけるアミロイド沈着
アミロイド沈着程度は、抗Aβ抗体による染色陽性部位（アミロイド斑及び血管アミロイド）の面積と大脳皮質全体の面積の比で表記した。

脳アミロイドーシス惹起因子 AB オリゴマーの検討

分担研究者 東海林幹夫 岡山大学大学院医歯学総合研究科神経病態内科学

共同研究者 松原悦朗、瓦林毅、阿部康二

岡山大学大学院医歯学総合研究科神経病態内科学

研究要旨 アルツハイマー病(AD)患者脳において脳内リポ蛋白非結合型 amyloid β (A β)はダイマー形成能に富み、脳内アミロイドーシス惹起分子であることを示してきた。これには、1) AD 患者脳から抽出した A β オリゴマーがいったんマウス脳に入ると長期間分解されずに存在し、アミロイド原性に乏しいマウス A β ペプチドを巻き込みアミロイド形成を促進すること、2) 脳アミロイド沈着の超早期蓄積が lipid raft の A β オリゴマーであることを示してきた。本年度は、これらの A β ダイマーに特異的なモノクローナル抗体の性質を明らかにし、これまで明らかにしてきた、脳アミロイドに対するメラトニン療法の作用点が A β ダイマーをモノマーに解除して血液中に除去することであることを明らかにした。これらのことは、A β オリゴマーが脳アミロイド沈着を惹起する最も本質的な原因分子であり、この A β オリゴマーが治療によって除去可能であることを示すものと考えられた。

A. 研究目的

アルツハイマー病患者脳に存在する脳内リポ蛋白非結合型 A β はダイマー形成能に富み、血液中に存在する A β モノマーとは質的相違を持ったアミロイドーシス惹起分子であると考えられる。またアルツハイマー病患者脳 A β オリゴマーはいったんマウス脳に入ると長期間分解されずに存在し、アミロイド原性に乏しいマウス A β ペプチドをも巻き込みアミロイド形成を促進することから、A β ワクチン療法が逆に老人斑形成を促進する可能性が示唆されている。また、血液からマウス脳内、特に経静脈的な A β ペプチドの老人斑への移行が示されている。本研究においては A β ペプチドの

病的要素を明らかにするために、これまで報告してきた Tg2576 脳アミロイドモデルマウスで、行動異常が出現するが脳アミロイドが未だ組織学的に確認されない超早期の脳アミロイド蓄積形態を検討した。また、これまで報告してきた脳アミロイド治療薬としてのメラトニンの A β オリゴマー形成における作用を検討した。さらに、A β オリゴマー特異的除去療法・診断法開発を目的として開発した A β オリゴマー特異的モノクローナル抗体の検討を加えた。

B. 研究方法

Tg2576 マウス脳と AD 6 例、病的老化 2 例、コントロール 2 例を 1% Triton-X-100 を含