

厚生労働科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

トランスジェニックマウスを用いた
ミトコンドリア酸化ストレスの抑制による
アルツハイマー病予防・治療法の開発
に関する研究

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 太田 成男

平成19（2007）年 4月

目 次

I. 総括研究報告

- トランスジェニックマウスを用いたミトコンドリア酸化ストレスの抑制によるアルツハイマー病予防・治療法の開発に関する研究報告 ----- 1
太田 成男

II. 分担研究報告

1. 「ALDH2酵素活性欠損トランスジェニックマウスの酸化ストレスに対する脆弱性」に関する研究 -----6
大澤 郁朗、太田 成男
(資料) 資料名
2. 「ALDH2酵素活性欠損トランスジェニックマウスの加齢に伴う脳変性」、に関する研究 ----- 11
北村 伸、大澤 郁朗、太田 成男
3. 「ALDH2酵素活性欠損トランスジェニックマウスの加齢に伴う認知障害」に関する研究 ----- 15
大澤 郁朗、太田成男
4. 「ALDH2酵素活性欠損トランスジェニックマウスとAPOE4ノックアウトマウスの掛け合わせによる認知障害の出現の加速化」に関する研究 ----- 19
大澤 郁朗、太田成男
5. 「水素分子による酸化ストレスの軽減」に関する研究 ----- 23
大澤 郁朗、太田成男
6. 「酸化ストレスが原因の虚血・再灌流障害を軽減する水素ガス」に関する研究 ----- 28
桂 研一郎、太田成男
7. 「A β 結合アルコール脱水素酵素の酸化ストレス防御機構」に関する研究」に関する研究 ----- 32
大澤 郁朗、太田成男
8. 「ミトコンドリアのシナプスへの輸送、及び、シナプスでの機能解析により、アルツハイマー病の発症とミトコンドリア量の関連性について解明する」に関する研究 ----- 36
上村 尚美、太田成男

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 39

- IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 40

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

「トランスジェニックマウスを用いたミトコンドリア酸化ストレスの抑制による
アルツハイマー病予防・治療法の開発」に関する研究

主任研究者 太田成男（日本医科大学大学院医学研究科 教授）

研究要旨：ミトコンドリア アルデヒド脱水素酵素 2 (ALDH2) 酵素欠損マウス(DAL マウス)を作製した。DAL マウスは、酸化ストレスに対し脆弱で、加齢にともなう、タウ蛋白質のリン酸化が顕著で神経変性と空間認知・学習記憶能力が低下した。さらに、アルツハイマー病と動脈硬化の危険因子である APOE 欠損と ALDH2 欠損が脳の機能障害進行に相乗効果を示した。以上の結果、DAL マウスは、酸化ストレスを軽減させ加齢に伴う認知症を予防する還元剤の評価に用いることが有効であることが示唆された。この酸化ストレスを軽減させるための還元剤を探索した。水素分子は有害な活性酸素を選択的に消去し、細胞を酸化ストレスから保護することを見出した。水素分子は特に急激な酸化ストレスに対して、培養細胞と実験動物に対し、極めて有効な保護作用を示した。水素分子には、副作用がないので長期服用によってアルツハイマー病を予防する可能性が示された。

分担研究者

大澤郁朗：日本医科大学老人病研究所講師

北村 伸：日本医科大学医学部助教授

桂研一郎：日本医科大学医学部助教授

A. 研究目的

アルツハイマー病患者脳では、酸化ストレスが亢進されていること、ミトコンドリアから発せられる活性酸素が酸化ストレスの主な発生源となっていることは、周知の事実となっている。ミトコンドリアとアルツハイマー病の関連について、多くの研究者から関心がもたれているのは、本年の Journal of Alzheimer's Disease にミトコンドリア特集が組まれたことなどからも明らかである。ミトコンドリアとアルツハイマー病の関連が今まで以上に注目されるようになったのは、アルツハイマー病の直接的原因とされるアミロイドβペプチド(Aβ)がミトコンドリア内にも存在し、Aβがミトコンドリアから発せられる活性酸素の原因となっているからという報告があいついだからである。ミトコンドリア内に存在する Aβ 結合性アルコール脱水素酵素 (ABAD) が Aβ の結合と活性酸素の発生を担うとされた。

本研究の目的は、脳の酸化ストレスを軽減し、神経を保護することによって、アルツハイマー

病の発症を遅延させること、すなわち予防すること、あるいは治療できるようにすることである。そのために、(A)アルツハイマー病を予防するに足る理想的な抗酸化物質を見いだすこと、(B)その抗酸化物質を評価できるモデル動物を作製することである。そのために、加齢に伴い認知障害を示すモデル動物を作製する。そして、(C)抗酸化剤による還元による効果を評価する。同時に、(D)酸化ストレスと Aβ の関連をより明確にすることが、この2年間の本研究の具体的目的である。

酸化ストレスは活性酸素の発生により亢進されるが、アルツハイマー病を予防するために活性酸素を還元して消去するには以下の条件が必要である。

①脳血液関門を通過できることが必要である。既知の多くの抗酸化物質は脳血液関門を通過できない。

②ミトコンドリアなどの活性酸素を発生させる場所に到達できることが必要である。抗酸化物質が目的の場所へ到達できなければ、効果的にはならない。

③活性酸素の中でも、superoxide($O_2^{\cdot-}$)、過酸化水素(H_2O_2)、一酸化窒素($NO\cdot$)は、生体内で重要な役割を果たす。特に、神経では、NO は神経伝達物質であり、血管拡張の働きをするので、

抗酸化物質によって消去されすぎてはならない。ヒドロキシルラジカル($\cdot\text{OH}$)とペルオキシナイトライト(ONOO^\cdot)が細胞障害生を示す有害物質であるので、この有害な活性酸素のみを消去することが重要である。

④ $\cdot\text{OH}$ を効果的に消去して、脳と細胞を実際の保護でいること。

⑤ Fe^{2+} と Cu^+ は、 H_2O_2 に触媒として作用し、有害な $\cdot\text{OH}$ を生成する。 Fe^{3+} や Cu^{2+} を還元すると Fe^{2+} と Cu^+ になる。アミロイドが沈着した老人斑などでは、鉄を含むヘムが結合していることが知られているので、アルツハイマー病では、 Fe^{3+} と Cu^{2+} を還元しない抗酸化物質がアルツハイマー病予防には必要である。

以上の条件を満たす抗酸化物質として、水素(H_2)が以上の条件をすべて満たす抗酸化物質であることを証明した。

B. 研究方法

(A) 水素(H_2)がアルツハイマー病を予防できるに足る抗酸化物質であることの証明の実験法。

①試験管内で各々の種類の活性酸素を発生させ、水溶液に溶かし込んだ水素と反応させ、活性酸素の濃度を測定した。

②培養細胞 PC12 にミトコンドリアの呼吸鎖阻害剤を加え、活性酸素を発生させ、蛍光色素で検出した。水素がどの活性酸素を消去するかを明らかにした。

③培養細胞を Cu^{2+} とビタミン C で処理し、 Cu^+ に還元して、 OH を発生させ、 H_2 がその細胞毒性を軽減するかどうかを調べた。

④初代培養細胞に虚血再灌流状態にし、活性酸素を発生させ、 H_2 が神経細胞死を軽減するかどうかを調べた。

⑤ラット脳の脳中大動脈を梗塞し、脳梗塞に陥らせ、水素ガスを吸引させることによって、脳梗塞障害を軽減するかどうかを調べた。

(B) 酸化ストレス亢進マウスの作製とその評価

(1) ALDH2 はミトコンドリア内に存在する酵素であり、酸化ストレス防御機構として働いていることを私たちは以前示した。ラット ALDH2 遺伝子の一塩基置換により活性が消失する ALDH2*2 遺伝子を作製し、マウスの受精卵に導入することにより、ALDH2 酵素活性欠損マウスを作製した。不活型 ALDH2*2 は活性型 ALDH2*1 と結合し、不活化するので、不活型

遺伝子を導入することによって、不活型マウスを作製した。筋肉の ALDH2 の活性を失った系統(DAL02)と脳の ALDH2 の活性を失った系統(DAL110)を作製した。DAL は dominant negative ALDH2 の意である。

(2) 酸化ストレスの指標として、4-ヒドロキシ-2-ノネナール(4-HNE)を測定した。4-HNE は過酸化脂質より生成される有毒な物質でアルデヒド基をもち、ALDH2 が分解に寄与していることを私たちが以前明らかにしている。そのため、DAL マウス(ALDH2 不活型マウス)では 4-HNE が蓄積し、酸化ストレスの指標を明確にできる。

(3) DAL02 マウスでは筋肉、DAL101 では脳の組化学的標本を作製し、加齢に伴う変化を評価した。アルツハイマー病の指標であるタウのリン酸化を調べた。

(4) DAL101 マウスと apoE(-/-)マウスを掛け合わせ、ALDH2 酵素欠損と apoE が同時に欠損した DAL(+/-)apoE(-/-)を作製した。

(5) DAL101 と DAL(+/-)apoE(-/-)を水迷路実験により、空間認知機能を評価した。

(6) さらに、WaterMaize により認知機能を評価した。

(C) 水素による DAL マウス等の酸化ストレス軽減による評価

①DAL02 に水素を溶かし込んだ水(以下水素水)を飲用させた。

②動脈硬化モデルとなる apoE(-/-)マウスに水素水を飲ませ、大動脈をオイルレッド染色により、動脈硬化軽減への効果を評価した。

③DAL(+/-)apoE(-/-)に水素ガス(2%)を吸引させ、水迷路実験による空間認知機能が改善するかどうかを調べた。

④apoE(-/-)マウスに水素ガスを吸わせる、あるいは水素水を飲ませてその表現型を調べた。

(D) 酸化ストレスとアミロイド β ペプチド(A β)の関連の研究手法

①A β 結合アルコール脱水素酵素(ABAD)を培養細胞に導入し、ABAD がミトコンドリアに局在していることを確認した。

②ABAD によって 4-HNE への耐性が上昇すること、ABAD によって 4-HNE が分解されることを確認した。

③ABAD の 4-HNE 分解能が A β によって阻害する

ことを調べた。

CとD. 研究成果と考察

(A) 水素の効果

①水素は、試験管内実験においても、培養細胞中においても、水素は $\cdot\text{OH}$ と ONOO^- のみを選択的に還元消去した。 O_2^- 、 H_2O_2 、 $\text{NO}\cdot$ を、水素は還元しなかつたので、水素は有害な活性酸素のみを消去し、生体にとって必要な活性酸素は消去しないことが明らかとなった。

②水素は、活性酸素をミトコンドリアから発生させたとき、ミトコンドリアの膜電位を低下させず、ATP合成能も低下させなかつた。また、核で生じた $\cdot\text{OH}$ を消去し、核酸の酸化を低下させた。したがって、水素は、細胞の至る所に拡散し、 $\cdot\text{OH}$ を消去して、細胞を護ることが示された。

③ Fe^{3+} や Cu^{2+} をはじめとする生体内で酸化還元反応を司る酸化物を還元せず、生体内反応を攪乱せず、 $\cdot\text{OH}$ 産生を引き起こす Cu^+ や Fe^{2+} を生成しないことを明らかにした。

H_2O_2 から発生させた時、

④脳虚血モデルラットの脳傷害を劇的に軽減した。脳梗塞巣を小さくし、予後の運動機能、体温、体重の改善が見られた。

以上の結果より、水素は脳神経を護り、副作用のない理想的な抗酸化物質であることが示唆された。

なお、この研究結果は、Nature Medicine 2007年5月号に掲載される。

(B) モデル動物

①DAL101マウスでは脳に、DAL02マウスでは筋肉に、加齢依存的に酸化ストレスマーカーの4-HNEが増加した。DAL02マウスでは加齢に伴い骨格筋にミトコンドリアの蓄積と異常が観察された。これは、軽度認知機能障害(MCI)に見られる現象である。

②DAL101の初代神経培養細胞は、4-HNEへの耐性が低下していた。

③DAL101では、加齢に伴って、海馬の神経変性とグリオシスが見られた。

④DAL101では、Tau蛋白質のリン酸化が見られた。

⑤DAL101では、水迷路試験で加齢に伴う空間認知機能が明らかに低下した。

⑥以上の現象は、apoE(-/-)と掛け合わせること

によって、表現型が生じるまでの時間が短縮された。

以上の結果は、ALDH2欠損により酸化ストレスが亢進し、加齢に伴う認知機能が低下したことを示す。さらにTau蛋白質のリン酸化が促進されたのでアルツハイマー病に類似の現象が生じていた。

(C) 水素によるDALマウス等の酸化ストレス軽減による評価

①DAL02に水素水を飲ませると血液中、筋肉中の4-HNEが減少し、酸化ストレスが軽減していることが示された。

②apoE(-/-)に水素水を飲ませると、動脈硬化が抑制された。

③水素の投与による認知機能の改善については、実験進行中である。

(D) (D) 酸化ストレスとアミロイド β ペプチド(A β)の関連の研究手法

①ABADはミトコンドリアに存在し、4-HNEを解毒する作用があり、A β によってその解毒作用が阻害される。結果的にA β によって、酸化ストレスが亢進することになることを明らかにした。

E. 結論

水素のOHラジカル消去能は顕著であり、かつ目的の項で示した

酸化ストレスの最終産物である4-HNEを蓄積させるマウスを確立し、加齢に伴う認知症モデル動物を作製した、同時にタウ蛋白のリン酸化、

なお、水素の選択的還元作用とその臨床への可能性についての論文は、Nature Medicine 2007年5月号に掲載される。また、ABADに関する論文は投稿中である。ALDH2欠損マウスに関しては、J. Alzheimer's Disease から総説の執筆を依頼されずに掲載された。詳しい論文は、投稿準備中である。

F. 健康危険情報

本研究において、健康危険情報はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

I. Ohsawa, I., Ishikawa, M., Takahashi, K., Watanabe, M., Nishimaki, K., Yamagata, K., KeKatsura, K.,

- Katayama, Y., Asoh, S. and Ohta, S.: Molecular hydrogen acts as a therapeutic antioxidant through the selective reduction of cytotoxic oxygen radicals. *Nat. Med.* 2007 in press.
2. Arakawa M., Yasutake M., Asoh S., Miyamoto M., Takano T., Ohta S. Transduction of anti-cell death protein FNK protects isolated rat hearts from myocardial infarction induced by ischemia/reperfusion. 2007 in press.
 6. Ohta, S.: Contribution of somatic mutations in the mitochondrial genome to the development of cancer and tolerance against anticancer drugs. *Oncogene* 2006 Aug.; 25: (34) 4768-4776.
 7. Ohta, S., Ohsawa, I.: Dysfunction of mitochondria and oxidative stress in pathogenesis of Alzheimer's disease: On defects in the cytochrome *c* oxidase complex and aldehyde detoxification. *J. Alzheimer's Disease* 2006 Jul.; 9(2):155-166.
 8. Suzuki, Y., Ando, F., Ohsawa, I., Shimokata, H., Ohta, S.: Association of alcohol dehydrogenase 2*1 allele with liver damage and insulin concentration in the Japanese. *J. Hum. Genet.* 2006 Jan.; 51(1):31-37.
 11. Nakashima-Kamimura, N., Asoh, S., Ishibashi, Y., Mukai, Y., Shidara, Y., Oda, H., Munakata, K., Goto, Y., Ohta, S.: MIDAS/GPP34, a nuclear gene product, regulates total mitochondrial mass in response to mitochondrial dysfunction. *J. Cell Sci.* 2005 Nov.; 118(Pt22): 5357-5367.
 12. Miyasaka, K., Kawanami, T., Shimokata, H., Ohta, S., Funakoshi, A.: Inactive aldehyde dehydrogenase-2 increased the risk of pancreatic cancer among smokers in a Japanese male population. *Pancreas* 2005 Mar.; 30(2): 95-98.
 13. Suzuki, Y., Atsumi, Y., Matsuoka, K., Nishimaki, K., Ohta, S., Taniyama, M., Muramatsu, T.: Mitochondrial tRNA (Leu (UUR)) Mutation at Position 3243 Detected in Patients with Type 1 Diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2005 Jan.; 67(1): 92-94.
 14. Yasukawa, T., Kirino, Y., Ishii, N., Lehtinen, SK., Jacobs, HT., Makifuchi, T., Fukuhara, N., Ohta, S., Suzuki, T., and Watanabe, K.: Wobble modification deficiency in mutant tRNAs in patients with mitochondrial diseases. *FEBS Lett.* 2005 May; 579(13):2948-2952.
 15. Shidara, Y., Yamagata, K., Kanamori, T., Nakano, K., Kwong, JQ., Manfredi, G., Oda, H., Ohta, S.: Positive Contribution of Pathogenic Mutations in the Mitochondrial Genome to the Promotion of Cancer by Prevention from Apoptosis. *Cancer Res.* 2005 Mar.; 65(5): 1655-1663.
 16. 太田成男：アルツハイマー病におけるミトコンドリア機能低下、酸化ストレスの役割；特集アルツハイマー病研究の最前線—基礎と臨床 神経研究の進歩 2005；49(3)：357-366.
 17. 大澤郁朗・太田成男：アルツハイマー病の危険因子である酵素活性欠損型アルデヒド脱水素酵素 2 遺伝子—その分子メカニズムとモデル動物の開発— 日本認知症学会誌 2005；19(3)(通巻 61)：284-295.
2. 学会発表
1. Ohsawa, I., Nishimaki, K., Murakami, Y., Suzuki, Y., Ishikawa, M., Ohta, S: Neurodegeneration in mice expressing a dominant negative form of mitochondrial aldehyde dehydrogenase. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. Kyoto, 2006. 6.
 2. Ohsawa, I.: Role of Mitochondrial aldehyde dehydrogenase in the onset of Alzheimer's Disease. The 10th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders. Madrid Spain, 2006. 7.
 4. 太田成男：ミトコンドリアから発せられる活性酸素の消去。第 11 回酸素ダイナミクス研究会，東京，2006. 9.
 5. 太田成男：ミトコンドリアから広がる事業の可能性。第 7 回川崎ライフサイエンスセミナー，2006.6.
 6. 太田成男：ミトコンドリアはどこまで病気と健康に関与するか？第 6 回日本ミトコンドリア学会年会，2006.12.
 7. Ohsawa, I., Nishimaki, K., Murakami, Y., Suzuki, Y., Ishikawa, M., Ohta, S.: Brain degeneration and decline in spatial cognitive ability in ALDH2-deficient mice. 第 25 回日本認知症学会学術集会，2006.10.
 8. Murakami, Y., Ohsawa, I., Kasahara, T., Ohta, S. : Detoxification of 4-hydroxy-2-nonenal by ABAD. 第 25 回日本認知症学会学術集会，2006.10.
 9. 大澤郁朗，石川正洋，高橋久美子，渡辺めぐみ¹，

- 西槇貴代美, 山縣久美, 桂研一郎¹⁾, 麻生定光, 太田成男: ヒドロキシラジカルの選択的消去による細胞死抑制. 第 6 回日本ミトコンドリア学会年会, 2006.12.
10. 西槇貴代美, 大澤郁朗, 村上弥生, 石川正洋, 太田成男: アルデヒド脱水素酵素 2 欠損マウスの加齢に伴う認知能力低下と脳の変性. 第 6 回日本ミトコンドリア学会年会, 2006.12.
11. 村上弥生, 大澤郁朗, 笠原 忠, 太田成男: ミトコンドリアに局在するアミロイドβ結合アルコール脱水素酵素のアルデヒド障害に対する細胞保護効果. 第 6 回日本ミトコンドリア学会年会, 2006.12.
12. Ohta, S. : Studies on multiple functional mitochondria from Basic aspects towards Medical applications. FinMIT/J-Mit Joint Meeting, 2005.11.
13. Nakashima-Kamimura, N., Asoh, S., Ishibashi, Y., Mukai, Y., Shidara, Y., Oda, H., Munakata, K., Goto, Y., and Ohta, S. : MIDAS, a nuclear gene product, that regulates total mitochondrial mass in response to mitochondrial dysfunction. FinMIT/J-Mit Joint Meeting, 2005.11.
14. Ohsawa, I., Nishimaki, K., Murakami, Y., Suzuki, Y., Ishikawa, M., Ohta, S.: Deficiency in a mitochondrial aldehyde dehydrogenase promotes oxidative stress and the onset of Alzheimer's disease: Its molecular mechanisms and animal models. International Conference on Mitochondria and Life 2005, 2005.12.
15. Nishimaki, K., Ohsawa, I., Suzuki, Y., Nukina, T., kodaira, E., Yagihashi, S., Ohta, S. Development of amyotrophy in mice overexpressing a dominant negative form of mitochondrial aldehyde dehydrogenase. International Conference on Mitochondria and Life 2005, 2005.12.
16. Murakami, Y., Ohsawa, I., Ihara, Y., Yamaguchi, H., Kasahara, T.¹⁾, Ohta, S.: Somatic mutations in mitochondrial DNA of the brain from Alzheimer's disease patients. International Conference on Mitochondria and Life 2005, 2005.12.
17. 太田成男: 多彩な機能をもつミトコンドリア. 第 23 回内分泌・代謝学セミナー. 2005. 8.
18. 太田成男: アルツハイマー病の危険因子としての ALDH2 遺伝子多型、脳梗塞の危険因子としての ADH2 遺伝子多型 第 40 回日本アルコール・薬物医学会総会. 特別講演 2005. 9.
19. 大澤郁朗, 太田成男: 水素分子(H₂)による酸化ストレス細胞死の抑制. 第 78 回日本生化学会大会, 2005. 10.
20. 石井徳恵, 西槇貴代美, 大澤郁朗, 太田成男: トランスジェニック DAL マウスで惹起される酸化ストレスの飽和水素水飲用による抑制. 第 78 回日本生化学会大会, 2005. 10.
21. 福田慶一, 麻生定光, 大澤郁朗, 山本保博, 太田成男: 水素ガスによる活性酸素フリーラジカルの除去—虚血再灌流傷害の軽減効果. 第 78 回日本生化学会大会, 2005. 10.
22. 大澤郁朗, 西槇貴代美, 鈴木悠子, 太田成男: ミトコンドリア型アルデヒド脱水素酵素活性抑制トランスジェニックマウスにおける中枢神経系の加齢に伴う変性. 第 24 回日本痴呆学会, 2005. 9.
23. 村上弥生, 大澤郁朗, 井原康夫, 山口晴保, 笠原 忠, 太田成男: アルツハイマー病患者脳におけるミトコンドリア DNA の体細胞変異解析. 第 24 回日本痴呆学会, 2005. 9.
- H. 知的財産の出願・登録状況
1. 特許出願
- (1)太田成男、大澤郁朗 PCT/JP2004/01797 酸化ストレスに伴う老化関連疾患を示すトランスジェニック動物
- (2)太田成男・大澤郁朗: 特願 2005-238572. 生体内の有害なフリーラジカル除去剤及びその吸引装置

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

「ALDH2 酵素活性欠損トランスジェニックマウスの酸化ストレスに対する脆弱性」に関する研究
（トランスジェニックマウスを用いたミトコンドリア酸化ストレスの抑制による
アルツハイマー病予防・治療法の開発の分担研究）

分担研究者 大澤郁朗（日本医科大学老人病研究所講師）
主任研究者 太田成男（日本医科大学大学院医学研究科 教授）

研究要旨：ALDH2（アルデヒド脱水素酵素 2）は疫学調査と培養細胞を用いた実験により酸化ストレスの防御機構として機能していることが示唆された。そこで、ALDH2 酵素活性の欠損が個体に及ぼす影響を直接調べることを目的に ALDH2 酵素活性欠損マウスを作製した。主に筋肉で ALDH2 活性を欠損させたマウスでは顕著な筋萎縮と異常ミトコンドリアの蓄積、酸化ストレスの増大が認められた。これは抗酸化剤であるビタミン E または水素を含む水を摂取することで抑制された。また、脳で ALDH2 活性を欠損させたマウスの大脳皮質初代培養細胞は、酸化ストレスによって脂質から生じる毒性の高いアルデヒド誘導体 4-ヒドロキシ-2-ノネナールに対して脆弱であった。以上の結果は、ALDH2 活性の欠損が、個体レベルで酸化ストレス増加による異常を引き起こすことを強く示唆している。

A. 研究目的

ALDH2 酵素活性の欠損は、アルツハイマー病をはじめ糖尿病、腫瘍、高血圧、心筋梗塞の危険因子であることが報告されている。しかし、そのメカニズムの解明にはまだ多くの研究が必要である。この欠損は、アジア系人種に特徴的なものであり、国民の健康維持の為には日本においてこの研究を進めることが極めて重要である。我々は疫学調査と培養細胞を用いた実験から、ALDH2 が酸化ストレスに対する防御機構の一部であることを報告してきた。そこで、ALDH2 酵素活性欠損マウスを作製し、この欠損が個体レベルで酸化ストレスに対する脆弱性を惹起するか検討した。ALDH2 のドミナント・ネガティブである ALDH2*2 を発現させた DAL (dominant-negative of ALDH2)マウスのうち、筋特異的に発現させたマウスについて、その発育過程での障害と酸化ストレス防御剤としてのビタミン E の効果について解析した。また、脳で ALDH2*2 を発現する DAL マウスを作製し、大脳皮質初代培養細胞をもちいて、酸化ストレスに対する脆弱性を調べた。

B. 研究方法

個体レベルにおいて ALDH2 活性の欠損が及

ぼす影響を調べるため、アクチン・プロモーター下にマウスの ALDH2*2 を挿入し、トランスジェニック (Tg) マウスを作製した。作製したマウスについては、主に骨格筋への影響を調べた。また、このマウスにビタミン E または水素を投与したときの病態改善効果について検討した。脳で ALDH2*2 を発現させるために汎用プロモーターを用いてマウスの ALDH2*2 を発現する Tg を作製した。このマウスについて胎児大脳皮質初代培養を行い、酸化ストレスによって脂質から生じる毒性の高いアルデヒド誘導体 4-ヒドロキシ-2-ノネナール(4-HNE)に対する脆弱性を調べた。

C. 研究成果

アクチン・プロモーター下にマウスの ALDH2*2 を挿入した 3 系統の Tg マウスについて解析したところ、全系統において心臓と筋肉で ALDH2*2 が高発現しており、心臓と筋肉での ALDH2 酵素活性も低下していた。もっとも発現量の高い DAL02 マウスについてさらに解析したところ、低体重、背骨の湾曲を認め、筋肉においては加齢に伴う筋繊維の萎縮、ragged-red-fiber の増加、ミトコンドリアの凝集および 4-HNE の蓄積を認めた。

次いで、DAL02 マウスにビタミンEを投与し、ALDH2 活性低下に伴う異常所見の改善が認められるか検討した。7 週齢の雄 DAL02 マウスに 25 週間にわたりビタミン E 添加食を自由摂取させた結果、体重の増加、筋萎縮の軽減、4-HNE 蓄積量の低下が認められた。さらに、水素を水に溶解して摂取させると血中および筋肉中の 4-HNE が減少した。

EF プロモーター下に *ALDH2*2* を挿入した Tg マウス DAL101 について ALDH2 の不活性化が中枢神経系に及ぼす影響について検討するため、DAL101 胎児大脳皮質初代培養細胞に 4-HNE を添加したところ、野生型 ALDH2 のみを発現する対照群に比べ、4-HNE の細胞内蓄積促進及び顕著な細胞死の促進が認められた。

D. 考察

DAL02 マウスでは、*ALDH2*2* により ALDH2 活性が抑制され、酸化ストレスによって生じる 4-HNE の解毒能が低下した結果として筋萎縮が生じたものと考えられる。ALDH2 はミトコンドリアで酸化ストレスを除去しており、その欠損はミトコンドリア機能の損傷をもたらし、その結果として異常ミトコンドリア増加が起こり、ミトコンドリア脳筋症様の症状を示したものと考えられる。

また、ビタミン E、水素などの抗酸化ストレス物質の摂取が個体レベルにおいて ALDH2 の活性低下による酸化ストレスの蓄積を軽減できることが示唆され、ALDH2 活性の欠損によりリスクの増大する種々の疾患についても日常生活における予防医学的対応が可能であることが示された。とくに、水素の摂取による改善は著しかった。

ALDH2 活性欠損マウス大脳皮質初代培養での 4-HNE に対する脆弱性が亢進されていた結果は、ALDH2 が酸化ストレスの除去、特に毒性の高いアルデヒド類の除去に関与していることを細胞レベルで示している。

E. 結論

ALDH2 活性の欠損が、個体レベルで酸化ストレス増加による異常を引き起こすこと、ALDH2 活性が欠損した DAL マウスは、酸化ストレス蓄積による病体モデル動物として有用であることを強く示唆している。

水素は酸化ストレスを改善するのに効果的である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Ohsawa, I., Ishikawa, M., Takahashi, K., Watanabe, M., Nishimaki, K., Yamagata, K., KeKatsura, K., Katayama, Y., Asoh, S. and Ohta, S.: Molecular hydrogen acts as a therapeutic antioxidant through the selective reduction of cytotoxic oxygen radicals. Nat. Med. 2007 in press.
2. Arakawa M., Yasutake M., Asoh S., Miyamoto M., Takano T., Ohta S. Transduction of anti-cell death protein FNK protects isolated rat hearts from myocardial infarction induced by ischemia/reperfusion. 2007 in press.
3. Ohta, S.: Contribution of somatic mutations in the mitochondrial genome to the development of cancer and tolerance against anticancer drugs. Oncogene 2006 Aug.; 25: (34) 4768-4776.
4. Ohta, S., Ohsawa, I.: Dysfunction of mitochondria and oxidative stress in pathogenesis of Alzheimer's disease: On defects in the cytochrome *c* oxidase complex and aldehyde detoxification. J. Alzheimer's Disease 2006 Jul.; 9(2):155-166.
5. Suzuki, Y., Ando, F., Ohsawa, I., Shimokata, H., Ohta, S.: Association of alcohol dehydrogenase 2*1 allele with liver damage and insulin concentration in the Japanese. J. Hum. Genet. 2006 Jan.; 51(1):31-37.
6. Nakashima-Kamimura, N., Asoh, S., Ishibashi, Y., Mukai, Y., Shidara, Y., Oda, H., Munakata, K., Goto, Y., Ohta, S.: MIDAS/GPP34, a nuclear gene product, regulates total mitochondrial mass in response to mitochondrial dysfunction. J. Cell Sci. 2005 Nov.; 118(Pt22): 5357-5367.
7. Miyasaka, K., Kawanami, T., Shimokata, H., Ohta, S., Funakoshi, A.: Inactive aldehyde dehydrogenase-2 increased the risk of pancreatic cancer among smokers in a Japanese male population. Pancreas 2005 Mar.; 30(2): 95-98.
8. Suzuki, Y., Atsumi, Y., Matsuoka, K., Nishimaki, K., Ohta, S., Taniyama, M., Muramatsu, T.: Mitochondrial tRNA (Leu (UUR)) Mutation at Position 3243 Detected in Patients with Type 1 Diabetes. Diabetes Res. Clin. Pract. 2005 Jan.; 67(1): 92-94.

9. Yasukawa, T., Kirino, Y., Ishii, N., Lehtinen, SK., Jacobs, HT., Makifuchi, T., Fukuhara, N., Ohta, S., Suzuki, T., and Watanabe, K.: Wobble modification deficiency in mutant tRNAs in patients with mitochondrial diseases. *FEBS Lett.* 2005 May; 579(13):2948-2952.
 10. Shidara, Y., Yamagata, K., Kanamori, T., Nakano, K., Kwong, JQ., Manfredi, G., Oda, H., Ohta, S.: Positive Contribution of Pathogenic Mutations in the Mitochondrial Genome to the Promotion of Cancer by Prevention from Apoptosis. *Cancer Res.* 2005 Mar.; 65(5): 1655-1663.
 11. 太田成男：アルツハイマー病におけるミトコンドリア機能低下、酸化ストレスの役割；特集アルツハイマー病研究の最前線－基礎と臨床 神経研究の進歩 2005；49(3)：357-366.
 12. 大澤郁朗・太田成男：アルツハイマー病の危険因子である酵素活性欠損型アルデヒド脱水素酵素 2 遺伝子－その分子メカニズムとモデル動物の開発－ 日本認知症学会誌 2005；19(3)(通巻 61)：284-295.
2. 学会発表
1. Ohsawa, I., Nishimaki, K., Murakami, Y., Suzuki, Y., Ishikawa, M., Ohta, S.: Neurodegeneration in mice expressing a dominant negative form of mitochondrial aldehyde dehydrogenase. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. Kyoto, 2006. 6.
 2. Ohsawa, I.: Role of Mitochondrial aldehyde dehydrogenase in the onset of Alzheimer's Disease. The 10th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders. Madrid Spain, 2006. 7.
 3. 太田成男：ミトコンドリアから発せられる活性酸素の消去。第 11 回酸素ダイナミクス研究会，東京。2006. 9.
 4. 太田成男：ミトコンドリアから広がる事業の可能性。第 7 回川崎ライフサイエンスセミナー，2006.6.
 5. 太田成男：ミトコンドリアはどこまで病気と健康に関与するか？第 6 回日本ミトコンドリア学会年会，2006.12.
 6. Ohsawa, I., Nishimaki, K., Murakami, Y., Suzuki, Y., Ishikawa, M., Ohta, S.: Brain degeneration and decline in spatial cognitive ability in ALDH2-deficient mice. 第 25 回日本認知症学会学術集会，2006.10.
 7. Murakami, Y., Ohsawa, I., Kasahara, T., Ohta, S. : Detoxification of 4-hydroxy-2-nonenal by ABAD. 第 25 回日本認知症学会学術集会，2006.10.
 8. 大澤郁朗，石川正洋，高橋久美子，渡辺めぐみ¹，西槇貴代美，山縣久美，桂研一郎¹⁾，麻生定光，太田成男：ヒドロキシルラジカルの選択的消去による細胞死抑制。第 6 回日本ミトコンドリア学会年会，2006.12.
 9. 西槇貴代美，大澤郁朗，村上弥生，石川正洋，太田成男：アルデヒド脱水素酵素 2 欠損マウスの加齢に伴う認知能力低下と脳の変性。第 6 回日本ミトコンドリア学会年会，2006.12.
 10. 村上弥生，大澤郁朗，笠原 忠，太田成男：ミトコンドリアに局在するアミロイドβ結合アルコール脱水素酵素のアルデヒド障害に対する細胞保護効果。第 6 回日本ミトコンドリア学会年会，2006.12.
 11. Ohta, S. : Studies on multiple functional mitochondria from Basic aspects towards Medical applications. FinMIT/J-Mit Joint Meeting, 2005.11.
 12. Ohsawa, I., Nishimaki, K., Murakami, Y., Suzuki, Y., Ishikawa, M., Ohta, S.: Deficiency in a mitochondrial aldehyde dehydrogenase promotes oxidative stress and the onset of Alzheimer's disease: Its molecular mechanisms and animal models. International Conference on Mitochondria and Life 2005, 2005.12.
 13. Nishimaki, K., Ohsawa, I., Suzuki, Y., Nukina, T., Kodaira, E., Yagihashi, S., Ohta, S. Development of amyotrophy in mice overexpressing a dominant negative form of mitochondrial aldehyde dehydrogenase. International Conference on Mitochondria and Life 2005, 2005.12.
 14. Murakami, Y., Ohsawa, I., Ihara, Y., Yamaguchi, H., Kasahara, T., Ohta, S.: Somatic mutations in mitochondrial DNA of the brain from Alzheimer's disease patients. International Conference on Mitochondria and Life 2005, 2005.12.
 15. 太田成男：多彩な機能をもつミトコンドリア。第 23 回内分泌・代謝学セミナー。2005. 8.
 16. 太田成男：アルツハイマー病の危険因子としての ALDH2 遺伝子多型、脳梗塞の危険因子としての ADH2 遺伝子多型 第 40 回日本

アルコール・薬物医学会総会。特別講演 2005. 9.

17. 大澤郁朗, 太田成男: 水素分子(H₂)による酸化ストレス細胞死の抑制. 第 78 回日本生化学会大会, 2005. 10.

18. 石井徳恵, 西槇貴代美, 大澤郁朗, 太田成男: トランスジェニック DAL マウスで惹起される酸化ストレスの飽和水素水飲用による抑制. 第 78 回日本生化学会大会, 2005. 10.

19. 福田慶一, 麻生定光, 大澤郁朗, 山本保博, 太田成男: 水素ガスによる活性酸素フリーラジカルの除去—虚血再灌流傷害の軽減効果. 第 78 回日本生化学会大会, 2005. 10.

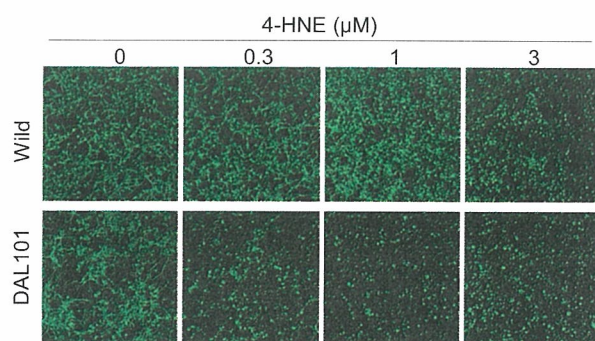
20. 大澤郁朗, 西槇貴代美, 鈴木悠子, 太田成男: ミトコンドリア型アルデヒド脱水素酵素活性抑制トランスジェニックマウスにおける中枢神経系の加齢に伴う変性. 第 24 回日本痴呆学会, 2005. 9.

21. 村上弥生, 大澤郁朗, 井原康夫, 山口晴保, 笠原 忠, 太田成男: アルツハイマー病患者脳におけるミトコンドリア DNA の体細胞変異解析. 第 24 回日本痴呆学会, 2005. 9.

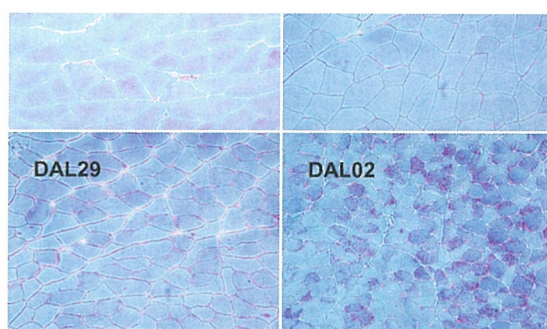
G. 知的財産の出願・登録状況

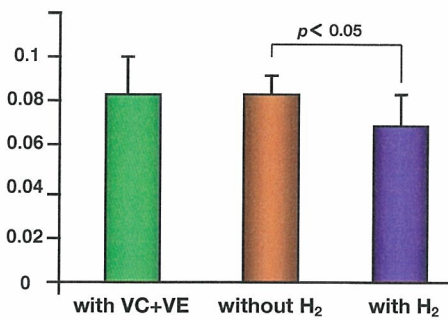
1. 特許出願

太田成男, 大澤郁朗 PCT/JP2004/01797 酸化ストレスに伴う老化関連疾患を示すトランスジェニック動物

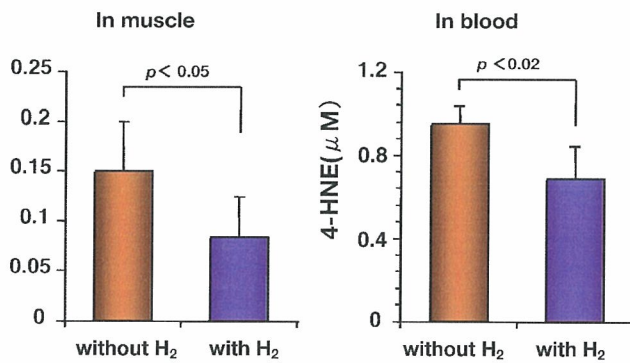


筋特異的に ALDH2 活性を欠損させたマウス (DAL35, 29, 02) では、筋の萎縮と異常ミトコンドリアの蓄積が見られる (左図: 下肢腓腹筋のゴモリ・トリクロム染色)。また、脳で ALDH2 活性を欠損させたマウス (DAL101) の大脳皮質初代培養細胞は酸化ストレスに脆弱である (右図: 4-HNE 添加 1 日後に神経特異的マーカーである抗 TUJ-1 抗体で染色)。





水素水の自然摂取による DAL マウスの筋肉の 4-HNE は 2 週間で減少した。ビタミン C と E の混合飼料による効果はほとんど認められなかった。ビタミン C と E の混合飼料の効果はなく、これらは自由に筋肉細胞へはいれないからだと思われた。これは、水素が効果的なのは、自由に細胞内へ出入りできる性質に基づく。



水素水の 1 ヶ月自然摂取による 4-HNE への効果。水素の摂取により酸化ストレスが軽減していた。

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

「ALDH2 酵素活性欠損トランスジェニックマウスの加齢に伴う脳変性」に関する研究
（トランスジェニックマウスを用いたミトコンドリア酸化ストレスの抑制による
アルツハイマー病予防・治療法の開発分担研究）

分担研究者 北村伸（日本医科大学医学部講師）
分担研究者 大澤郁朗（日本医科大学老人病研究所講師）
主任研究者 太田成男（日本医科大学大学院医学研究科 教授）

研究要旨：ALDH2 酵素欠損によって酸化ストレスに対する脆弱性が明らかとなった。そこで、脳で ALDH2 酵素活性が欠損したマウス(DAL101 マウス) を作製し、加齢とともに脳の変性が認められるかどうか調べた。0.5 年齢の DAL101 マウスでは同年齢のマウスの脳と違いは認められなかったが、1 年齢になると海馬領域で明らかな脳変性が認められ、1.5 年齢になると CA1 領域の神経細胞がほとんど認められない DAL101 マウスも出現した。さらに、変性神経の排除にかかわるグリオシスの程度を免疫染色で調べると、1 年齢の DAL101 では盛んなグリオシスが認められ、1.5 年齢では神経細胞の消失に伴って、グリオシスも認められなかった。さらに、アルツハイマー病の指標である tau 蛋白質のリン酸化が見られた。以上の結果より ALDH2 欠損により加齢に伴う神経変性が生じることがわかった。

A. 研究目的

ALDH2 は酸化ストレス防御機構のひとつとして機能している。この ALDH2 酵素活性の欠損は、アルツハイマー病の危険因子であることを疫学調査で明らかにしてきた。また、ALDH2 活性の欠損は酸化ストレスを増大させることも報告してきた。日本では約 40%の国民が ALDH2 不活性型の遺伝子を持つことから、ALDH2 活性の低下による神経変性疾患モデル動物を作製して、これを使った治療法の開発を進めることは高齢化社会における健全な老化の為に不可欠な課題である。そこで、脳で ALDH2 のドミナント・ネガティブである ALDH2*2 を発現する DAL マウスを作製し、加齢に伴う脳の変化を組織学的に解析した。

B. 研究方法

脳で ALDH2*2 を発現させるために汎用プロモーターを用いてマウスの ALDH2*2 を発現するトランスジェニック・マウス (DAL101) を作製した。このマウスについて、加齢に伴う脳の変化をヘマトキシリン・エオジン (H&E) 染色及びアストロサイトに特異的な抗 GFAP 抗体による染色で解析した。タウのリン酸化はリン酸化タウ特異的抗体で染色した。

C. 研究成果

DAL101 は、雄においては白髪と若干の筋力低下が認められた為、コントロールである

C57BL/6 との差が認められない雌について解析を行った。まず、6ヶ月齢のマウスについて脳の剖検を試みたが、C57BL/6 の脳と違いはなかった。しかし、18ヶ月齢の DAL マウスでは海馬の萎縮とそれに伴う錯体細胞の脱落（5例中4例）や CA1 領域でのグリア細胞の活性化といった神経変性の所見が認められた。また、嗅球の萎縮も一部のマウスで認められた。こうした所見は12ヶ月齢で散見されるようになり、加齢と共に増加していた。アルツハイマー病の指標のひとつである加齢に伴うタウの異常リン酸化の観察された。

D. 考察

脳における ALDH2 活性の低下は、加齢に伴う神経変性を引き起こした。これは脳での酸化ストレス増大が原因であるものと考えられる。

多くの疾患モデルマウスでは成長期から異常が現れて、加齢に伴う変化を解析することは不可能である。DAL101 マウスでは加齢に伴い、神経変性が徐々に進行した。その傾向は18ヶ月齢という高齢マウスで顕著であり、ヒトの病態に近いモデルマウスであると言える。とくに、タウのリン酸化が顕著に観察されたことは特筆すべきである。特に記憶の中樞である海馬での変性が認められることから、DAL101 マウスにおける認知障害などの加齢に伴う進行が予見される。

E. 結論

DAL101 マウスでは加齢に伴う神経変性が認められたことから、酸化ストレスの増大を病因とした神経変性疾患についてのモデル動物として有用である可能性が示された。

F. 研究発表

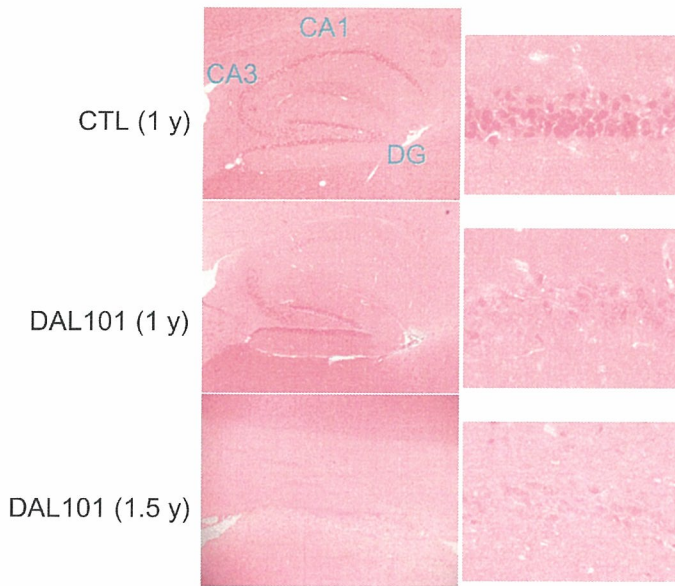
1. 論文発表

1. Ohsawa, I., Ishikawa, M., Takahashi, K., Watanabe, M., Nishimaki, K., Yamagata, K., KeKatsura, K., Katayama, Y., Asoh, S. and Ohta, S.: Molecular hydrogen acts as a therapeutic antioxidant through the selective reduction of cytotoxic oxygen radicals. *Nat. Med.* 2007 in press.
2. Arakawa M., Yasutake M., Asoh S., Miyamoto M., Takano T., Ohta S. Transduction of anti-cell death protein FNK protects isolated rat hearts from myocardial infarction induced by ischemia/reperfusion. 2007 in press.
3. Ohta, S.: Contribution of somatic mutations in the mitochondrial genome to the development of cancer and tolerance against anticancer drugs. *Oncogene* 2006Aug.; 25: (34) 4768-4776.
4. Ohta, S., Ohsawa, I.: Dysfunction of mitochondria and oxidative stress in pathogenesis of Alzheimer's disease: On defects in the cytochrome *c* oxidase complex and aldehyde detoxification. *J. Alzheimer's Disease* 2006 Jul.; 9(2):155-166.
5. Suzuki, Y., Ando, F., Ohsawa, I., Shimokata, H., Ohta, S.: Association of alcohol dehydrogenase 2*1 allele with liver damage and insulin concentration in the Japanese. *J. Hum. Genet.* 2006 Jan.;51(1):31-37.
6. Nakashima-Kamimura, N., Asoh, S., Ishibashi, Y., Mukai, Y., Shidara, Y., Oda, H., Munakata, K., Goto, Y., Ohta, S.: MIDAS/GPP34, a nuclear gene product, regulates total mitochondrial mass in response to mitochondrial dysfunction. *J. Cell Sci.* 2005 Nov.; 118(Pt22): 5357-5367.
7. Miyasaka, K., Kawanami, T., Shimokata, H., Ohta, S., Funakoshi, A.: Inactive aldehyde dehydrogenase-2 increased the risk of pancreatic cancer among smokers in a Japanese male population. *Pancreas* 2005 Mar.; 30(2): 95-98.
8. Suzuki, Y., Atsumi, Y., Matsuoka, K., Nishimaki, K., Ohta, S., Taniyama, M., Muramatsu, T.: Mitochondrial tRNA (Leu (UUR)) Mutation at Position 3243 Detected in Patients with Type 1 Diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2005 Jan.; 67(1): 92-94.
9. Yasukawa, T., Kirino, Y., Ishii, N., Lehtinen, SK., Jacobs, HT., Makifuchi, T., Fukuhara, N., Ohta, S., Suzuki, T., and Watanabe, K.: Wobble modification deficiency in mutant tRNAs in patients with mitochondrial diseases. *FEBS Lett.* 2005 May; 579(13):2948-2952.
10. Shidara, Y., Yamagata, K., Kanamori, T., Nakano, K., Kwong, JQ., Manfredi, G., Oda, H., Ohta, S.: Positive Contribution of Pathogenic Mutations in the Mitochondrial Genome to the Promotion of Cancer by Prevention from Apoptosis. *Cancer Res.* 2005 Mar.; 65(5): 1655-1663.
11. 太田成男：アルツハイマー病におけるミトコンドリア機能低下、酸化ストレスの役割；特集アルツハイマー病研究の最前線—基礎と臨床 神経研究の進歩 2005；49(3)：357-366.
12. 大澤郁朗・太田成男：アルツハイマー病の危険因子である酵素活性欠損型アルデヒド脱水素酵素 2 遺伝子—その分子メカニズムとモデル動物の開発—日本認知症学会誌 2005；19(3)(通巻 61)：284-295.

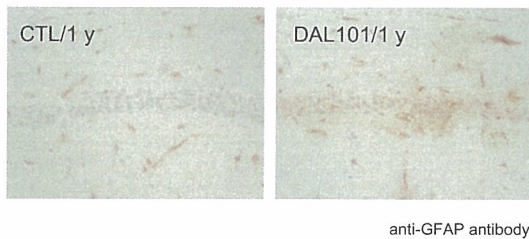
2. 学会発表

1. Ohsawa, I., Nishimaki, K., Murakami, Y., Suzuki, Y., Ishikawa, M., Ohta, S.: Neurodegeneration in mice expressing a dominant negative form of mitochondrial aldehyde dehydrogenase. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. Kyoto, 2006. 6.
2. Ohsawa, I.: Role of Mitochondrial aldehyde dehydrogenase in the onset of Alzheimer's Disease. The 10th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders. Madrid Spain, 2006. 7.
3. 太田成男：ミトコンドリアから発せられる

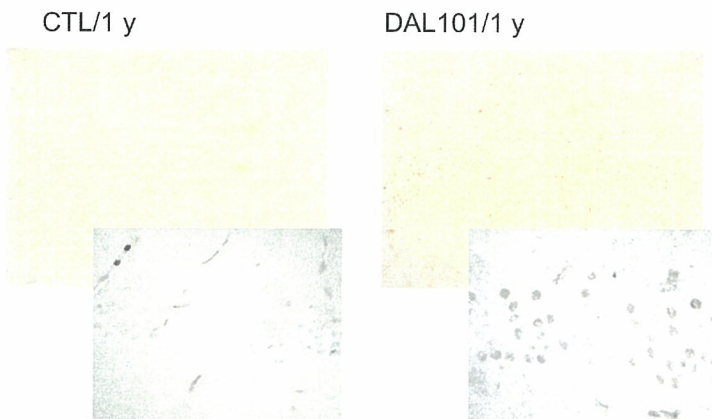
- 活性酸素の消去. 第 11 回酸素ダイナミクス研究会, 東京. 2006. 9.
4. 太田成男: ミトコンドリアから広がる事業の可能性. 第 7 回川崎ライフサイエンスセミナー, 2006.6.
 5. 太田成男: ミトコンドリアはどこまで病気と健康に関与するか? 第 6 回日本ミトコンドリア学会年会, 2006.12.
 6. Ohsawa, I., Nishimaki, K., Murakami, Y., Suzuki, Y., Ishikawa, M., Ohta, S.: Brain degeneration and decline in spatial cognitive ability in ALDH2-deficient mice. 第 25 回日本認知症学会学術集会, 2006.10.
 7. Murakami, Y., Ohsawa, I., Kasahara, T., Ohta, S.: Detoxification of 4-hydroxy-2-nonenal by ABAD. 第 25 回日本認知症学会学術集会, 2006.10.
 8. 大澤郁朗, 石川正洋, 高橋久美子, 渡辺めぐみ¹, 西槇貴代美, 山縣久美, 桂研一郎¹⁾, 麻生定光, 太田成男: ヒドロキシルラジカルの選択的消去による細胞死抑制. 第 6 回日本ミトコンドリア学会年会, 2006.12.
 9. 西槇貴代美, 大澤郁朗, 村上弥生, 石川正洋, 太田成男: アルデヒド脱水素酵素 2 欠損マウスの加齢に伴う認知能力低下と脳の変性. 第 6 回日本ミトコンドリア学会年会, 2006.12.
 10. 村上弥生, 大澤郁朗, 笠原 忠, 太田成男: ミトコンドリアに局在するアミロイドβ結合アルコール脱水素酵素のアルデヒド障害に対する細胞保護効果. 第 6 回日本ミトコンドリア学会年会, 2006.12.
 11. Ohta, S.: Studies on multiple functional mitochondria from Basic aspects towards Medical applications. FinMIT/J-Mit Joint Meeting, 2005.11.
 12. Ohsawa, I., Nishimaki, K., Murakami, Y., Suzuki, Y., Ishikawa, M., Ohta, S.: Deficiency in a mitochondrial aldehyde dehydrogenase promotes oxidative stress and the onset of Alzheimer's disease: Its molecular mechanisms and animal models. International Conference on Mitochondria and Life 2005, 2005.12.
 13. Nishimaki, K., Ohsawa, I., Suzuki, Y., Nukina, T., Kodaira, E., Yagihashi, S., Ohta, S.: Development of amyotrophy in mice overexpressing a dominant negative form of mitochondrial aldehyde dehydrogenase. International Conference on Mitochondria and Life 2005, 2005.12.
 14. Murakami, Y., Ohsawa, I., Ihara, Y., Yamaguchi, H., Kasahara, T., Ohta, S.: Somatic mutations in mitochondrial DNA of the brain from Alzheimer's disease patients. International Conference on Mitochondria and Life 2005, 2005.12.
 15. 太田成男: 多彩な機能をもつミトコンドリア. 第 23 回内分泌・代謝学セミナー. 2005. 8.
 16. 太田成男: アルツハイマー病の危険因子としての ALDH2 遺伝子多型、脳梗塞の危険因子としての ADH2 遺伝子多型 第 40 回日本アルコール・薬物医学会総会。特別講演 2005. 9.
 17. 大澤郁朗, 太田成男: 水素分子(H₂)による酸化ストレス細胞死の抑制. 第 78 回日本生化学会大会, 2005. 10.
 18. 石井徳恵, 西槇貴代美, 大澤郁朗, 太田成男: トランスジェニック DAL マウスで惹起される酸化ストレスの飽和水素水飲用による抑制. 第 78 回日本生化学会大会, 2005. 10.
 19. 福田慶一, 麻生定光, 大澤郁朗, 山本保博, 太田成男: 水素ガスによる活性酸素フリーラジカルの除去—虚血再灌流傷害の軽減効果. 第 78 回日本生化学会大会, 2005. 10.
 20. 大澤郁朗, 西槇貴代美, 鈴木悠子, 太田成男: ミトコンドリア型アルデヒド脱水素酵素活性抑制トランスジェニックマウスにおける中枢神経系の加齢に伴う変性. 第 24 回日本痴呆学会, 2005. 9.
 21. 村上弥生, 大澤郁朗, 井原康夫, 山口晴保, 笠原 忠, 太田成男: アルツハイマー病患者脳におけるミトコンドリア DNA の体細胞変異解析. 第 24 回日本痴呆学会, 2005. 9.
- G. 知的財産の出願・登録状況
1. 特許出願
太田成男・大澤郁朗: 特願 2005-238572.
生体内の有害なフリーラジカル除去剤及びその吸引装置



DAL101 マウスでは加齢に伴い神経変性が進行する。H&E 染色（上左図）で示すように海馬錐体細胞の変性が進行し、1.5 年齢では極度の萎縮が観察される。また、これに伴ってグリオシスが認められる（中図）。この時、アルツハイマー病脳に特異的な病変である Tau の異常リン酸化が認められる（下図）。



anti-GFAP antibody



AT8

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

「ALDH2 酵素活性欠損トランスジェニックマウスの加齢に伴う認知障害」に関する研究
（トランスジェニックマウスを用いたミトコンドリア酸化ストレスの抑制による
アルツハイマー病予防・治療法の開発分担研究）

分担研究者 大澤郁朗（日本医科大学老人病研究所講師）
主任研究者 太田成男（日本医科大学大学院医学研究科 教授）

研究要旨：脳で ALDH2 活性が低下したマウス(DAL101)では、剖検により加齢に伴う神経変性が海馬で認められた。運動機能や感覚機能については DAL101 マウスと C57BL/6 との間に雌では顕著な差はなかった。そこで、海馬が関与する空間認知・学習記憶能力の試験として多用されている水迷路学習の課題を試みた。その結果、DAL マウス6ヶ月齢では空間認知・学習記憶能力の低下は認められないが、12ヶ月齢以降では顕著な低下が見られた。こうした脳の変性と空間認知・学習記憶能力の低下は、酸化ストレスに対する抵抗性の低下によるものと考えられる。

A. 研究目的

神経変性疾患の進行に伴う記憶障害や認知障害は、患者本人のみならずその周囲の人々にとっても多大な負担となる。アルツハイマー病などの疾患において、この進行を抑制することは、社会的に極めて重要な課題である。現在までのところ、加齢に伴い緩やかに神経変性が進行し、記憶・認知障害を発症する有効な神経変性疾患モデル動物はほとんど無い。脳における ALDH2 活性欠損マウス (DAL101) は、剖検により加齢に伴う神経変性が海馬で認められた。DAL101 が、神経変性疾患モデル動物として適しているか、高次機能低下の有無を海馬が関与する空間認知能力の試験として多用されている水迷路学習の課題で解析した。

B. 研究方法

水迷路実験には、6、12、18ヶ月齢 DAL101 マウス（雌）と同齢の C57BL/6 マウス（雌）1群6匹以上を用いた。直径120 cm の白濁させたプールに直径10 cm のプラットフォームを水面下に置き、シュード・ランダムなスタート地点から60秒間プラットフォームを探索させた。プラットフォームまでたどり着いた時間と距離を計測した。これを30分の間隔を置いて一日4回、5日間試行した後、プラットフォームを取り除いて60秒間自由に泳がせるプローブテストを行った。さらに翌日、プラットフォームを水面上に見えるように設置し、視覚障害や動機付けの低下などが無いかを検証した。

C. 研究成果

DAL101 マウスは学習曲線もプローブテストでも、6ヶ月齢では C57BL/6 と差が認められなかった。しかし、12ヶ月齢ではいずれの試験でも DAL101 マウスで障害が認められた。この時、水面上に設置したプラットフォームによる試験では差が無かった。18ヶ月齢でも同様の障害が見られた。剖検では海馬の異常が12ヶ月齢以降で認められることから、DAL101 マウスの空間認知・記憶学習障害は海馬の変性に依存したものと考えられることができる。

D. 考察

脳における ALDH2 活性の低下は、加齢に伴う神経変性のみならず脳の高次機能障害も引き起こした。この結果は、ALDH2 活性の欠損が酸化ストレスの増大により脳に障害を与えた結果であり、また、この欠損がアルツハイマー病の危険因子であるという疫学レベルの研究成果を動物モデルとして裏付けている。

従来、多くの神経変性疾患は特定の分子種の異常が蓄積したものとして捕らえられてきた。アルツハイマー病においても家族性の場合には、APP やプレセニリンの変異などが特定され、原因遺伝子とされている。しかし、孤発的で晩期発症型のアルツハイマー病では特定の原因を探し出すことは困難である。これは、おそらくは疾患の発症が複合的な要因によるものであり、その一つは酸化ストレスの増大によるものと考えられる。今回、DAL101 マウスが加齢に伴う神経変性と空間認知・記憶学習障害を示したことで、このマウスを従来報告されているアルツハイマー病

の原因遺伝子に異常を持つマウスと組み合わせれば、より顕著な疾患の進行が認められるものと予測される。

E. 結論

DAL101 マウスは、加齢に伴う神経変性と空間認知・記憶学習障害が認められたことから、酸化ストレスの増大を病因の一つとした神経変性疾患のモデル動物として有用である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Ohsawa, I., Ishikawa, M., Takahashi, K., Watanabe, M., Nishimaki, K., Yamagata, K., KeKatsura, K., Katayama, Y., Asoh, S. and Ohta, S.: Molecular hydrogen acts as a therapeutic antioxidant through the selective reduction of cytotoxic oxygen radicals. *Nat. Med.* 2007 in press.
- Arakawa M., Yasutake M., Asoh S., Miyamoto M., Takano T., Ohta S. Transduction of anti-cell death protein FNK protects isolated rat hearts from myocardial infarction induced by ischemia/reperfusion. 2007 in press.
- Ohta, S.: Contribution of somatic mutations in the mitochondrial genome to the development of cancer and tolerance against anticancer drugs. *Oncogene* 2006 Aug.; 25: (34) 4768-4776.
- Ohta, S., Ohsawa, I.: Dysfunction of mitochondria and oxidative stress in pathogenesis of Alzheimer's disease: On defects in the cytochrome *c* oxidase complex and aldehyde detoxification. *J. Alzheimer's Disease* 2006 Jul.; 9(2):155-166.
- Suzuki, Y., Ando, F., Ohsawa, I., Shimokata, H., Ohta, S.: Association of alcohol dehydrogenase 2*1 allele with liver damage and insulin concentration in the Japanese. *J. Hum. Genet.* 2006 Jan.; 51(1):31-37.
- Nakashima-Kamimura, N., Asoh, S., Ishibashi, Y., Mukai, Y., Shidara, Y., Oda, H., Munakata, K., Goto, Y., Ohta, S.: MIDAS/GPP34, a nuclear gene product, regulates total mitochondrial mass in response to mitochondrial dysfunction. *J. Cell Sci.* 2005 Nov.; 118(Pt22): 5357-5367.
- Miyasaka, K., Kawanami, T., Shimokata, H., Ohta, S., Funakoshi, A.: Inactive aldehyde dehydrogenase-2 increased the risk of pancreatic cancer among smokers in a Japanese male population. *Pancreas* 2005 Mar.; 30(2): 95-98.
- Suzuki, Y., Atsumi, Y., Matsuoka, K., Nishimaki, K., Ohta, S., Taniyama, M., Muramatsu, T.: Mitochondrial tRNA (Leu (UUR)) Mutation at Position 3243 Detected in Patients with Type 1 Diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2005 Jan.; 67(1): 92-94.
- Yasukawa, T., Kirino, Y., Ishii, N., Lehtinen, SK., Jacobs, HT., Makifuchi, T., Fukuhara, N., Ohta, S., Suzuki, T., and Watanabe, K.: Wobble modification deficiency in mutant tRNAs in patients with mitochondrial diseases. *FEBS Lett.* 2005 May; 579(13):2948-2952.
- Shidara, Y., Yamagata, K., Kanamori, T., Nakano, K., Kwong, JQ., Manfredi, G., Oda, H., Ohta, S.: Positive Contribution of Pathogenic Mutations in the Mitochondrial Genome to the Promotion of Cancer by Prevention from Apoptosis. *Cancer Res.* 2005 Mar.; 65(5): 1655-1663.
- 太田成男：アルツハイマー病におけるミトコンドリア機能低下、酸化ストレスの役割；特集アルツハイマー病研究の最前線—基礎と臨床 神経研究の進歩 2005；49(3)：357-366.
- 大澤郁朗・太田成男：アルツハイマー病の危険因子である酵素活性欠損型アルデヒド脱水素酵素 2 遺伝子—その分子メカニズムとモデル動物の開発—日本認知症学会誌 2005；19(3)(通巻 61)：284-295.

2. 学会発表

- Ohsawa, I., Nishimaki, K., Murakami, Y., Suzuki, Y., Ishikawa, M., Ohta, S: Neurodegeneration in mice expressing a dominant negative form of mitochondrial aldehyde dehydrogenase. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. Kyoto, 2006. 6.
- Ohsawa, I.: Role of Mitochondrial aldehyde dehydrogenase in the onset of Alzheimer's

- Disease. The 10th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders. Madrid Spain, 2006. 7.
3. 太田成男: ミトコンドリアから発せられる活性酸素の消去. 第 11 回酸素ダイナミクス研究会, 東京, 2006. 9.
 4. 太田成男: ミトコンドリアから広がる事業の可能性. 第 7 回川崎ライフサイエンスセミナー, 2006.6.
 5. 太田成男: ミトコンドリアはどこまで病気と健康に関与するか? 第 6 回日本ミトコンドリア学会年会, 2006.12.
 6. Ohsawa, I., Nishimaki, K., Murakami, Y., Suzuki, Y, Ishikawa, M., Ohta, S.: Brain degeneration and decline in spatial cognitive ability in ALDH2-deficient mice. 第 25 回日本認知症学会学術集会, 2006.10.
 7. Murakami, Y., Ohsawa, I., Kasahara, T., Ohta, S.: Detoxification of 4-hydroxy-2-nonenal by ABAD. 第 25 回日本認知症学会学術集会, 2006.10.
 8. 大澤郁朗, 石川正洋, 高橋久美子, 渡辺めぐみ¹, 西槇貴代美, 山縣久美, 桂研一郎¹, 麻生定光, 太田成男: ヒドロキシラジカルの選択的消去による細胞死抑制. 第 6 回日本ミトコンドリア学会年会, 2006.12.
 9. 西槇貴代美, 大澤郁朗, 村上弥生, 石川正洋, 太田成男: アルデヒド脱水素酵素 2 欠損マウスの加齢に伴う認知能力低下と脳の変性. 第 6 回日本ミトコンドリア学会年会, 2006.12.
 10. 村上弥生, 大澤郁朗, 笠原 忠, 太田成男: ミトコンドリアに局在するアミロイドβ結合アルコール脱水素酵素のアルデヒド障害に対する細胞保護効果. 第 6 回日本ミトコンドリア学会年会, 2006.12.
 11. Ohta, S.: Studies on multiple functional mitochondria from Basic aspects towards Medical applications. FinMIT/J-Mit Joint Meeting, 2005.11.
 12. Ohsawa, I., Nishimaki, K., Murakami, Y., Suzuki, Y., Ishikawa, M., Ohta, S.: Deficiency in a mitochondrial aldehyde dehydrogenase promotes oxidative stress and the onset of Alzheimer's disease: Its molecular mechanisms and animal models. International Conference on Mitochondria and Life 2005, 2005.12.
 13. Nishimaki, K., Ohsawa, I., Suzuki, Y., Nukina, T., Kodaira, E., Yagihashi, S., Ohta, S.: Development of amyotrophy in mice overexpressing a dominant negative form of mitochondrial aldehyde dehydrogenase. International Conference on Mitochondria and Life 2005, 2005.12.
 14. Murakami, Y., Ohsawa, I., Ihara, Y., Yamaguchi, H., Kasahara, T.¹, Ohta, S.: Somatic mutations in mitochondrial DNA of the brain from Alzheimer's disease patients. International Conference on Mitochondria and Life 2005, 2005.12.
 15. 太田成男: 多彩な機能をもつミトコンドリア. 第 23 回内分泌・代謝学セミナー. 2005. 8.
 16. 太田成男: アルツハイマー病の危険因子としての ALDH2 遺伝子多型、脳梗塞の危険因子としての ADH2 遺伝子多型 第 40 回日本アルコール・薬物医学会総会. 特別講演 2005. 9.
 17. 大澤郁朗, 太田成男: 水素分子(H₂)による酸化ストレス細胞死の抑制. 第 78 回日本生化学会大会, 2005. 10.
 18. 石井徳恵, 西槇貴代美, 大澤郁朗, 太田成男: トランスジェニック DAL マウスで惹起される酸化ストレスの飽和水素水飲用による抑制. 第 78 回日本生化学会大会, 2005. 10.
 19. 福田慶一, 麻生定光, 大澤郁朗, 山本保博, 太田成男: 水素ガスによる活性酸素フリーラジカルの除去—虚血再灌流傷害の軽減効果. 第 78 回日本生化学会大会, 2005. 10.
 20. 大澤郁朗, 西槇貴代美, 鈴木悠子, 太田成男: ミトコンドリア型アルデヒド脱水素酵素活性抑制トランスジェニックマウスにおける中枢神経系の加齢に伴う変性. 第 24 回日本痴呆学会, 2005. 9.
 21. 村上弥生, 大澤郁朗, 井原康夫, 山口晴保, 笠原 忠, 太田成男: アルツハイマー病患者脳におけるミトコンドリア DNA の体細胞変異解析. 第 24 回日本痴呆学会, 2005. 9.
3. 学会発表
大澤郁朗, 西槇貴代美, 鈴木悠子, 太田成男: ミトコンドリア型アルデヒド脱水素酵素活性

抑制トランスジェニックマウスにおける中枢神経系の加齢に伴う変性. 第 24 回日本痴呆学会, 2005. 9.

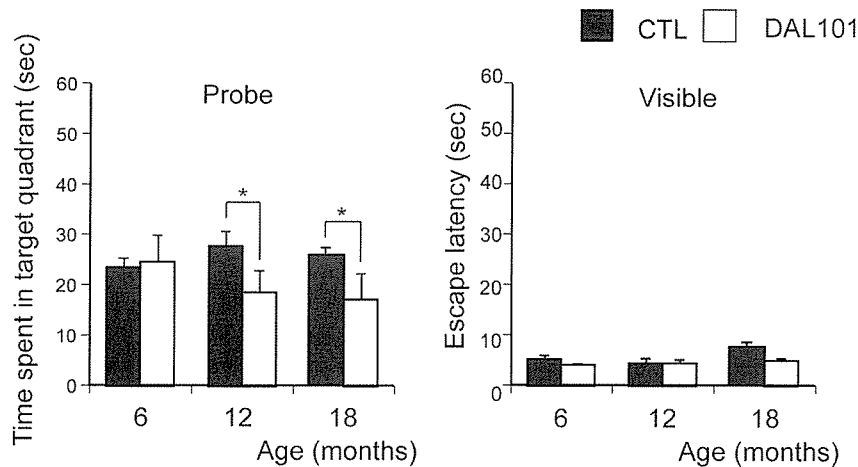
太田成男: アルツハイマー病の危険因子としての ALDH2 遺伝子多型、脳梗塞の危険因子としての ADH2 遺伝子多型 第 40 回日本アルコール・薬物医学会総会。特別講演 2005. 9.

G. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許出願

太田成男・大澤郁朗: 特願 2005-238572. 生体内の有害なフリーラジカル除去剤及びその吸引装置

DAL101 マウスは 12 ヶ月齢以上で学習曲線 (上図) でもプローブテスト (下左図) でも空間認知・記憶学習障害を示した。しかし、プレートが見える状態 (下右図) ではコントロールと差が無い。



DAL マウスの水回路解析の結果：加齢とともに空間認知機能、学習能力が低下する

