

200718072A

厚生労働科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

霊長類胚性幹細胞をもちいた認知症、アルツハイマー病に対する

新規治療法開発に関する研究

平成 19 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 鈴木 登

平成 20 (2008) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告	1
主任研究者 鈴木 登	
II. 平成 19 年度班会議議事録	4
III. 分担研究報告	
1. 霊長類胚性幹細胞をもちいた認知症、アルツハイマー病に対する 新規治療法開発に関する研究	5
聖マリアンナ医科大学 免疫学・病害動物学 鈴木 登	
聖マリアンナ医科大学 免疫学・病害動物学 千葉俊明	
2. アルツハイマー病の重症度と左右海馬体積との関係	10
聖マリアンナ医科大学 神経精神科 山口 登	
3. 新規アルツハイマー病治療戦略:5-HT ₄ 受容体/ α セクレターゼ/A β 生成抑制系に関する研究	12
聖マリアンナ医科大学 大学院アイトープ研究施設教授 松井宏晃	
4. 霊長類胚性細胞をもちいた認知症、アルツハイマー病に対する 新規治療法開発に関する研究	14
聖マリアンナ医科大学 神経精神科 長田賢一	
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	16
V. 平成 19 年度班員名簿	21

I. 総括研究報告

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

霊長類胚性幹細胞をもちいた認知症、アルツハイマー病に対する

新規治療法開発に関する研究

(H19-長寿-一般-021)

主任研究者 鈴木 登 聖マリアンナ医科大学免疫学・病害動物学教授

研究要旨:急速な高齢化により、認知症は大きな社会問題となっている。認知症の治療薬は現在のところ進行を遅らせる対症療法のみであり、画期的な治療法の開発は緊急の課題である。アルツハイマー病は認知症の中核的疾患である。アルツハイマー病ではその分子病態に着目し、病因タンパク質 β アミロイドの産生、凝集、クリアランスの分子機構、Tau沈着と神経細胞死の誘導のメカニズムを解明して新規治療法の開発を目指す必要がある。我々はこれらの各段階を改善する種々の手法を組み合わせ、さらに胚性幹細胞から分化誘導した神経細胞移植を行うことで新機軸の治療法を検討している。本年度は β アミロイドの産生抑制に働く α セクレターゼの活性を亢進させる因子の同定、Tauのリン酸化を抑制するリチウムの作用メカニズムの解明、アルツハイマー病におけ

一分担研究者一

松井宏晃 聖マリアンナ医科大学・大学院アイソトープ研究施設教授

山口 登 聖マリアンナ医科大学神経精神科教授

長田賢一 聖マリアンナ医科大学医学部講師

一研究目的一

認知症患者は世界で数千万人に達し国内でも認知症患者は150万人以上と見られる。アルツハイマー病は老年期認知症の主な原因であり新規治療法の開発は極めて重要な意味を持つ。アルツハイマー病の特徴は病因タンパク質 β アミロイドの産生、凝集と老人斑とpaired helical filament (PHF)からなる神経原線維変化でありこれらの結果として神経細胞死が起こる。本研究ではモデル動物を用いて認知症の新規治療法としての胚性幹細胞由来神経細胞移植療法を確立する。本研究ではネプリライシ

ンや β セクレターゼ等の種々の蛋白分解酵素遺伝子の下流に免疫グロブリン定常部遺伝子を結合した、遺伝子組換え膜型蛋白分解酵素発現ベクターを作成してこれを移植神経細胞に発現させる。遺伝子組換え蛋白分解酵素を細胞膜上に発現した胚性幹細胞由来の神経細胞は、Tauやアミロイドなどの細胞死誘導蛋白を分解することで移植細胞が細胞死に陥ることを防ぐのみならず、宿主神経細胞の細胞死を防ぐことが可能である。神経細胞移植そのものは神経細胞を補充することで認知症の神経症状の軽快に働き、さらにTauやアミロイドを分解するという二重の利点を持つ。本研究の結果に基づき認知症の新規治療法が開発された暁には患者を含め社会的に大きな貢献をすることができる。

一研究方法一

5-HT₄受容体/ α セクレターゼ/ $A\beta$ 生成抑制

系に関する研究

ヒト脳内セロトニン4受容体(5-HT4R)遺伝子転写開始部位の5'上流~exon1を含む領域(-5712/+184)をルシフェラーゼベクターに接続後、順次5'端からの欠失変異体を作製し、内在性に5-HT4Rを発現するヒト神経芽細胞腫SH-SY5Y細胞に形質導入後、遺伝子発現調節領域を特定する。部位指向性突然変異導入法により一連の塩基置換変異体を作製し、遺伝子発現調節に関与するシス領域および同領域に結合する因子を同定する。転写因子発現ベクター共形質導入法により転写因子機能を解析する。

リチウムの神経保護作用に関する研究

Wistar系雄性ラット(150-300g)にカルバマゼピン50mg/kg/day, または3mM LiClを一日二回皮下投与を5週間腹腔内投与した。カルバマゼピンの平均血中濃度は、3.37mg/mlであった。大脳皮質をHomogenize Bufferを用いホモジネートし、遠心分離により細胞質成分を分離した。次に、1% NP40を含むsolubilize bufferで膜成分を可溶化し遠心分離後、可溶化膜成分を得た。さらにDEAEクロマトグラフィー施行後の各サンプルを用いイムノブロットを施行した。

アルツハイマー病の重症度と左右海馬体積との関係

物忘れを主訴に外来受診した80名(男性24名、女性56名、平均年齢76.2±9.7歳)をFASTの重症度により、FAST2(年齢相応、非認知症)17名、FAST3(境界状態)10名、FAST4(軽度AD)34名、FAST5(中等度AD)19名に分類した。対象者においてMRIにて得られた画像より、海馬体積(H)、頭蓋内体積(C)を測定した。H、CはそれぞれAC-PC lineに垂直なT1強調冠状断スライス及びAC-PC lineに水平なT2強調水平断スラ

イスにて手動測定した。画像解析ソフトウェアとして3D-Slicer ver. 1.3を用い、頭蓋内体積(C)にて補正した海馬体積(H)を補正海馬体積(H/C)とし、海馬体積の左右比較の指標として、左H/Cを右H/Cで除した値、左右比(L/R)を用いた。

霊長類胚性幹細胞をもちいた認知症、アルツハイマー病に対する新規治療法開発に関する研究

種々の月齢のヒト型Tau遺伝子トランスジェニックマウスの脳を回収した。抗Tau抗体、抗リン酸化Tau抗体、TuJ-1抗体を用いて免疫染色、およびアポトーシス細胞を同定するためTUNEL染色を行なった。

倫理面での配慮

動物実験に関しては実験前の飼育、実験中、実験後にいたるまで科学的かつ倫理的に対処し、動物の苦痛をを排除するために麻酔による安楽死などの方法を用いた。

臨床研究に関しては聖マリアンナ医科大学生命倫理委員会臨床試験部会の承認を得たのち、対象者には本研究の主旨を十分に説明し、文書にて同意を得てから解析を行った。

—結果と考察—

アルツハイマー病は大脳皮質の神経細胞の死滅により認知機能が進行性に傷害される。脳の神経細胞内に異常リン酸化Tau、細胞外にβアミロイドが蓄積する疾患ととらえることができる。βアミロイドの蓄積が老化とアルツハイマー病に特異的であるが、Tauの蓄積は様々な変性疾患に広く出現して神経変性と密接に関連する。Tauは中枢神経系に発現する微小管結合タンパク質の一種で、微小管の重合、安定

化に働く。アルツハイマー病脳では多数の部位が高度にリン酸化され、正常では見られない線維として細胞内に蓄積する。この構造は非常に安定で難溶性で、かつプロテアーゼにも抵抗性である。

この Tau が突然変異により構造変化し過剰になった Tau がリン酸化し蓄積する事で異常機能を示すことで神経細胞が変性する機序が考えられる。

さらに amyloid precursor protein (APP) transgenic mouse と変異 Tau transgenic mouse の掛け合わせ実験から β アミロイドの蓄積が Tau 沈着の促進に働くことが示唆されている。

α セクレターゼは APP を細胞膜から 12 アミノ酸外側で細胞外ドメインを切断することで Abeta の過剰産生・蓄積を抑制する。セロトニン 4 受容体は α セクレターゼを活性化することで β アミロイドの産生を抑制することから、セロトニン 4 受容体作動薬はアルツハイマー病治療薬としての可能性を持つ。今回 C/EBPa は Sp 因子との協調作用により脳内セロトニン 4 受容体の発現を促進することを見出した。グルコシルコリドが C/EBPa 遺伝子転写を亢進させることが知られているが、今後 C/EBPa 遺伝子転写を亢進させる小分子化合物の探索が望まれる。

近年リチウムがアポトーシス抑制作用を持ち神経保護作用を示すことが明らかになった。さらにリチウムは glycogen synthase kinase-3 β を抑制し、Tau のリン酸化を抑制することで臨床的にもアルツハイマー病に有効であると報告された。リチウム長期投与によりラット脳の神経保護作用を持つ GAP-43 タンパク量は著明に増加し、それに伴いリン酸化 GAP-43 も増加した。即ちリチウムはリン酸化 GAP-43 を増加させることでアルツハイマー病に有効である可能性が示された。

アルツハイマー病では、重症度とともに左右海馬の萎縮が顕著に認められるが、左海馬は認知機能の軽度障害時に著明に低下するのに対し、右海馬は中等度障害時に著明に低下し、左右海馬の萎縮に時間差があることが明らかとなった。よって、左右海馬体積の測定はアルツハイマー病早期発見のみならず、病態の進行状況の把握に有用であることが示唆された。

正常12カ月齢のマウスでは脳表を含めて、リン酸化ヒトTauの沈着は認められず、神経細胞の脱落・神経線維の走行異常は認めなかった。ヒトTauトランスジェニックマウスでは海馬CA1領域では3カ月齢では軽微な、12カ月齢では明瞭なリン酸化ヒトTauの沈着を認めた。正常マウスではTUNEL陽性細胞を殆ど認めなかったが、12カ月齢のヒトTauトランスジェニックマウスでは海馬を中心にTUNEL陽性細胞を多数認めた。ヒト型Tau遺伝子トランスジェニックマウスは海馬を中心にTauの沈着を認めアルツハイマー病のモデルマウスとして妥当であると考えられた。今後このマウスに神経細胞移植を行い、アルツハイマー病の新規治療法の開発につなげていく予定である。

Ⅱ. 平成 19 年度 班会議議事録

厚生労働科学研究費補助金(長寿科学総合研究事業)

霊長類胚性幹細胞をもちいた認知症、アルツハイマー病に対する
新規治療法開発に関する研究

平成19年度第1回研究班会議

日時 平成19年8月16日

場所 聖マリアンナ医科大学

事務局

聖マリアンナ医科大学

免疫学・病害動物学 内線 3547

— 研究組織 —

主任研究者

鈴木 登 聖マリアンナ医科大学 免疫学・病害動物学

分担研究者

山口 登 聖マリアンナ医科大学 神経精神科学

松井宏晃 聖マリアンナ医科大学 大学院脳情報制御医学分野

長田賢一 聖マリアンナ医科大学 神経精神科学

研究協力者

黒川真奈絵 聖マリアンナ医科大学 免疫学・病害動物学

千葉俊明 聖マリアンナ医科大学 免疫学・病害動物学

— 研究の概要 —

認知症モデルマウスを用いて新規治療法としての霊長類 ES 細胞由来神経細胞移植療法の有用性を評価する。

Ⅲ. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金(長寿科学総合研究事業)

主任研究報告書

霊長類胚性幹細胞をもちいた認知症、アルツハイマー病に対する
新規治療法開発に関する研究

主任研究者 鈴木 登 聖マリアンナ医科大学免疫学・病害動物学教授

研究協力者 千葉俊明 聖マリアンナ医科大学免疫学・病害動物学

研究要旨:アルツハイマー病に対する新規治療法としての細胞移植治療が有用と考えられる。細胞移植治療の研究においてヒト Tau 遺伝子導入トランスジェニックマウスがアルツハイマー病のモデルとして有用か検討した。このマウスではヒト Tau がリン酸化されており、それに伴い神経線維の現象と神経細胞死と行動異常の出現が一致した。今後の神経細胞移植におけるアルツハイマー病モデル動物として適切と考えられた。 研究要旨:近年注目されているリチウムの神経保護作用を、神経可塑性に関与する GAP-43 のリン酸化を中心に作用機序を解明し、さらにカルバマゼピンも同様の作用があることを証明した。

A. 研究目的

急速な高齢化により、認知症は大きな社会問題となっている。認知症の治療薬は現在のところ進行を遅らせる対症療法のみであり、画期的な治療法の開発は緊急課題である。我々はアルツハイマー病の Tau 沈着モデルマウスに対して、蛋白分解酵素を持つ胚性幹細胞から分化させた神経細胞を移植することが認知症の治療となる事を示し、画期的治療法を開発に結びつけることを目的に検討を行っている。本年度はヒト型 Tau 遺伝子のトランスジェニックマウスの神経病理学的検討を行い、このマウスが神経細胞移植を行う認知症のモデルマウスとして適切であるかを検討した。

B. 対象と方法

種々の月齢のヒト型Tau遺伝子トランスジェニックマウスの脳を回収した。抗Tau抗体、抗リン酸化Tau抗体、TuJ-1抗体を用いて免疫染色、およびアポトーシス細胞を同定するためTUNEL染色を行なった。

C. 研究結果

3カ月齢のヒト型Tau遺伝子トランスジェニックマ

ウスの海馬CA1領域、歯状塊領域をmouseTauに対する抗体で染色すると中等度のTau蛋白の沈着を認めるがTuJ-1陽性の神経繊維の走行に大きな変化はない。一方、12カ月齢のヒトTauトランスジェニックマウスではCA1領域に明確なTauの沈着と神経細胞の脱落・神経線維の走行異常を認めた。歯状塊領域でのTauの沈着は中等度であるが、神経細胞の脱落・神経線維の走行異常は明らかであった。

次にリン酸化ヒト Tau に特異的な抗体で染色を行った。正常 12 カ月齢のマウスでは脳表を含めて、リン酸化ヒト Tau の沈着は認められず、神経細胞の脱落・神経線維の走行異常は認めなかった。ヒト Tau トランスジェニックマウスでは CA1 領域では 3 カ月齢では軽微な、12 カ月齢では明瞭なリン酸化ヒト Tau の沈着を認めた。

それに伴い、TuJ-1陽性の神経細胞が減少し、軸索の短縮、走行異常が明らかになった。同様の所見はCA2領域、歯状塊領域でも認められた。

神経細胞のアポトーシスを知る目的で TUNEL

染色を行った。正常マウスでは TUNEL 陽性細胞を殆ど認めなかったが、12 カ月齢のヒト Tau 転スジェニックマウスでは海馬を中心に TUNEL 陽性細胞を多数認めた。

D. 考察

アルツハイマー病の新規治療法の開発を目指して胚性幹細胞から神経細胞を分化誘導しそれを移植することを目的に本研究を進めている。ヒト Tau 転スジェニックマウスがアルツハイマー病のモデルマウスとしての有用性を評価する目的で本研究を行った。その結果、12カ月齢ではリン酸化ヒトTauの沈着を認め、神経細胞の脱落・変性を認めそれはアポトーシスによることが示された。これらの結果はヒトTau転スジェニックマウスが認知症に類似した行動異常が顕著になる時期と良く一致している。この成績はこのマウスをアルツハイマー病のモデルとして使用することの妥当性を示している。

今後はこのマウスに種々の分化段階の或いは分化系列の神経細胞を移植して、長期間に観察した後に病理学的・行動学的改善を評価する。

E. 結論

ヒト型Tau遺伝子転スジェニックマウスは海馬を中心にTauの沈着を認めアルツハイマー病のモデルマウスとして妥当である。今後このマウスに神経細胞移植を行い、アルツハイマー病の新規治療法の開発につなげていく予定である。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Atoh K, Kurokawa MS, Yoshikawa H, Masuda C, Takada E, Kumagai N, Suzuki N. Induction of melanocyte precursors from neural crest cells surrounding the neural tube like-structures developed in vitro using mouse

ES cell culture. *Inflammation and Regeneration* 27(1): 45-52, 2007.

2. Maruyama T, Nara K, Yoshikawa H, Suzuki N. Txk, a member of the non-receptor tyrosine kinase of the Tec family, forms a complex with poly (ADP-ribose) polymerase 1 and elongation factor 1a and regulates interferon-g gene transcription in Th1 cells. *Clinical and Experimental Immunology* 147(1): 164-175, 2007.
3. Takenaga M, Ohta Y, Tokura Y, Hamaguchi A, Suzuki N, Nakamura M, Okano H, Igarashi R. Plasma as a scaffold for regeneration of neural precursor cells after transplantation into rats with spinal cord injury. *Cell Transplantation* 16(1): 57 -65, 2007.
4. Mihara S, Suzuki, N. Role of Txk, a member of Tec family tyrosine kinases, in immune-inflammatory diseases. *International Reviews of Immunology* (26): 1-15, 2007.
5. Ueno H, Kurokawa MS, Kayama M, Homma R, Kumagai Y, Masuda C, Takada E, Tsubota K, Ueno S, Suzuki N. Experimental transplantation of corneal epithelium-like cells induced by PAX6 gene transfection of mouse embryonic stem cells. *Cornea* 26(10): 1220-1227, 2007.
6. 黒川真奈絵、田子玲子、高田えりか、奈良和彦、鈴木登. マウス胚性幹細胞由来血管内皮細胞および壁細胞の分化誘導. 聖マリアンナ医科大学雑誌 35: 143-149, 2007.
7. 熊谷悠太、上野宏樹、鈴木登. 角膜再生治療の現状とカニクイザル胚性幹細胞を用いた角膜上皮細胞移植研究. 聖マリアンナ医科大学雑誌 35(2): 109-117, 2007.
8. 鈴木登、高井憲治. 基礎医学教育の現状と課題. 聖マリアンナ医科大学雑誌 35(増刊

- 号): S45-S47, 2007.
9. 吉川英志、鈴木登. ニコチンによる炎症メディエーターの産生抑制. 臨床免疫・アレルギー科 (48)2: 182-188, 2007.
 10. 黒川真奈絵、尾崎志雲、吉川英志、鈴木登. 阻血再灌流後の腎組織障害に対する Fas 依存性アポトーシス抑制による治療効果. *Inflammation and Regeneration* 27(2): 124-129, 2007.
 11. Kurokawa MS, Suzuki N. Behcet's Disease. *Current Research in Immunology* 2007, in press.
 12. Kayama M, Kurokawa MS, Ueno H, Suzuki N. Recent advances of corneal regeneration and possible application of embryonic stem (ES) cell derived corneal epithelial cells. *Clin Ophthalmol* 1(4): 373-382, 2007.
 13. 鈴木登. 免疫グロブリン. 臨床アレルギー学 改訂第 3 版. 南江堂. 15-27, 2007.
 14. 鈴木登. 在宅看護・介護のための難病ガイド 改訂第 2 版「原発性免疫不全症候群」. 日本医学出版. 印刷中
 15. 鈴木登. 在宅看護・介護のための難病ガイド 改訂第 2 版「特発性好酸球増多症候群」. 日本医学出版. 印刷中
 16. 鈴木登. 免疫不全の分子機構. わかりやすい内科学 第 3 版. 文光堂. 印刷中
2. 学会発表
1. Kurokawa MS, Suzuki N, Kato Tomohiro. ベーチェット病抹消血単核球における発現蛋白の網羅的検討. 第 37 日本免疫学会総会・学術集会. 2007.
 2. 奈良和彦、黒川真奈絵、松田隆秀、鈴木登. 神経ベーチェット病における炎症性サイトカイン産生とその責任細胞の検討. 第 37 日本免疫学会総会・学術集会. 2007.
 3. 嘉山真紀、黒川真奈絵、上野宏樹、熊谷悠太、千葉俊明、田所衛、上野聰樹、鈴木登. pax6 遺伝子導入によるマウス胚性幹細胞の網膜神経節細胞への分化誘導. 第 10 回日本組織工学会. 2007.
 4. 上野宏樹、黒川真奈絵、嘉山真紀、熊谷悠太、本間龍介、坪田一男、上野聰樹、鈴木登. マウス胚性幹細胞より分化誘導した角膜上皮様細胞の特徴と角膜損傷モデルへの移植. 第 10 回日本組織工学会. 2007.
 5. 熊谷悠太、黒川真奈絵、上野宏樹、嘉山真紀、坪田一男、中辻憲夫、仁藤新治、上野聰樹、鈴木登. 霊長類胚性幹細胞を用いた角膜上皮細胞の分化誘導と移植治療への応用. 第 10 回日本組織工学会. 2007.
 6. 間淑郎、黒川真奈絵、奈良和彦、千葉俊明、池田律子、仁藤新治、中辻憲夫、橋本卓雄、鈴木登. 片麻痺モデルマウスにおける霊長類胚性幹 (ES) 細胞由来神経細胞移植の有用性. 第 66 回日本脳神経外科学会総会. 2007.
 7. 嘉山真紀、黒川真奈絵、上野宏樹、熊谷悠太、千葉俊明、田所衛、上野聰樹、鈴木登. Pax6 遺伝子導入によるマウス胚性幹細胞の選択的網膜神経節前駆細胞への分化誘導. 第 28 回日本炎症・再生医学会. 2007.
 8. 熊谷悠太、黒川真奈絵、上野宏樹、嘉山真紀、坪田一男、中辻憲夫、仁藤新治、上野聰樹、鈴木登. カニクイザル胚性幹細胞の角膜上皮細胞への分化誘導及び移植治療への応用実験. 第 28 回日本炎症・再生医学会. 2007.
 9. 上野宏樹、黒川真奈絵、嘉山真紀、熊谷悠太、本間龍介、坪田一男、上野聰樹、鈴木登. マウス胚性幹細胞より分化誘導した角膜上皮様細胞の特性と角膜損傷モデルへの移植治療. 第 28 回日本炎症・再生医学会. 2007.

10. 間淑郎、黒川真奈絵、池田律子、仁藤新治、中辻憲夫、近藤靖、長田乾、橋本卓雄、鈴木登. カニクイザル ES 細胞からの運動神経分化誘導と脳損傷マウスへの移植応用. 第 28 回日本炎症・再生医学会. 東京 2007.
11. 黒川真奈絵、鈴木登. マウス胚性幹細胞からの血管内皮細胞の誘導. 第 28 回日本炎症・再生医学会. 2007.
12. Suzuki N. Immune and inflammatory responses in Behcet's Disease. Japan Korea Joint Meeting on Behcet's Disease. Yokohama 2007.
13. 黒川真奈絵、加藤智啓、鈴木登. ベーチェット病患者末梢血単核球における発現蛋白の網羅的解析. 厚生労働科学研究(難治性疾患克服研究事業)ベーチェット病に関する調査研究 平成 19 年度第 1 回研究班会議. 2007.
14. 黒川真奈絵、鈴木登. 胚性幹細胞由来血管内皮細胞および壁細胞の分化・増殖・維持に与える禁煙の影響. 第 22 回 平成 18 年度喫煙財団助成研究発表会. 2007.
15. Kayama M, Kurokawa MS, Ueda Y, Ueno H, Kumagai Y, Masuda C, Takada E, Ueno S, Tadokoro M, Suzuki N. Induction of Differentiation Into Retinal Ganglion Cells of Mouse Es Cells by Pax6 Gene Transfection. The Association for Research in vision and Ophthalmology 2007. 2007.
16. Kumagai Y, Kurokawa MS, Ueno H, Kayama M, Tsubota K, Nakatsuji N, Nito S, Ueno S, Suzuki N. Induction of Corneal Epithelium-Like Cells From Cynomolgus Monkey Embryonic Stem Cells and Their Experimental Transplantation to Damaged Cornea. The Association for Research in vision and Ophthalmology 2007. 2007.
17. Ueno H, Kurokawa MS, Kumagai Y, Kayama M, Homma R, Masuda C, Takada E, Tsubota K, Ueno S, Suzuki N. Characterization of Corneal Epithelium Like Cells Induced by Pax6 Gene Transfection of Mouse Embryonic Stem Cells. The Association for Research in vision and Ophthalmology 2007. 2007.
18. 黒川真奈絵、松田隆秀、鈴木登. 神経ベーチェット病の病態形成における炎症性サイトカインの役割. 第 51 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2007.
19. 奈良和彦、黒川真奈絵、金子栄、吉川英志、松田隆秀、鈴木登. ベーチェット病患者の病変局所における TLR を介した Th1 優位の免疫応答. 第 51 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2007.
20. 野中信宏、黒川真奈絵、池島秀明、松田隆秀、鈴木登. 神経ベーチェット病の病態形成における炎症性サイトカインの役割. 第 104 回日本内科学会総会・講演会. 2007.
21. 上野宏樹、黒川真奈絵、嘉山真紀、熊谷悠太、本間龍介、坪田一男、上野聰樹、鈴木登. マウス胚性幹細胞より分化誘導した角膜上皮様細胞の角膜損傷モデルへの移植. 第 6 回日本再生医療学会総会. 2007.
22. 嘉山真紀、黒川真奈絵、上野宏樹、熊谷悠太、田所衛、上野聰樹、鈴木登. Pax6 遺伝子導入によるマウス胚性幹細胞の網膜神経節前駆細胞への分化誘導. 第 6 回日本再生医療学会総会. 2007.
23. 熊谷悠太、黒川真奈絵、上野宏樹、嘉山真紀、本間龍介、坪田一男、上野聰樹、鈴木登. カニクイザル胚性幹細胞からの角膜上皮細胞の分化誘導と移植治療への応用. 第 6 回日本再生医療学会総会. 2007.
24. 間淑郎、黒川真奈絵、池田律子、仁藤新治、中辻憲夫、橋本卓雄、鈴木登. カニクイザル

ES 細胞からの運動神経分化誘導と脳損傷マウスへの移植応用. 第 6 回日本再生医療学会総会. 2007.

25. 黒川真奈絵、鈴木登、加藤智啓. ベーチェット病患者末梢血単核球における発現蛋白の網羅的検討. 厚生労働科学研究(難治性疾患克服研究事業)ベーチェット病に関する調査研究 平成 19 年度第 2 回研究会議. 2007.

26. 奈良和彦、黒川真奈絵、鈴木登、松田隆秀. 神経ベーチェット病における病態形成の検討. 厚生労働科学研究(難治性疾患克服研究事業)ベーチェット病に関する調査研究 平成 19 年度第 2 回研究会議. 2007.

H. 知的財産権の出願、登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

研究要旨:アルツハイマー病では、重症度とともに左右海馬の萎縮が顕著に認められるが、左海馬は認知機能の軽度障害時に著明に低下するのに対し、右海馬は中等度障害時に著明に低下し、左右海馬の萎縮に時間差があることが明らかとなった。よって、左右海馬体積の測定はAD早期発見のみならず、病態の進行状況の把握に有用であることが示唆された。

A. 研究目的

アルツハイマー病(AD)における認知症の重症度(Functional Assessment Staging:FAST)と海馬体積の関係および海馬体積の左右比との関係について検討した。

B. 対象と方法

物忘れを主訴に外来受診した 80 名(男性 24 名、女性 56 名、平均年齢 76.2±9.7 歳)を FAST の重症度により、FAST2(年齢相応、非認知症)17 名、FAST3(境界状態)10 名、FAST4(軽度 AD)34 名、FAST5(中等度 AD)19 名に分類した。対象者において MRI にて得られた画像より、海馬体積(H)、頭蓋内体積(C)を測定した。H、C はそれぞれ AC-PC line に垂直な T1 強調冠状断スライス及び AC-PC line に水平な T2 強調水平断スライスにて手動測定した。画像解析ソフトウェアとして 3D-Slicer ver.1.3 を用い、頭蓋内体積(C)にて補正した海馬体積(H)を補正海馬体積(H/C)とし、海馬体積の左右比較の指標として、左 H/C を右 H/C で除した値、左右比(L/R)を用いた。なお、本研究は聖マリアンナ医科大学生命倫理委員会の承認を得たものであり、対象者には本研究の主旨を説明し、文書にて同意を得ている。

C. 研究結果

1. 左右 H/C の重症度別比較について

1) 左右ともに H/C は、FAST 2>3>4>5 群

の順に高値であった。

2) 左 H/C は、FAST 2 群と FAST 3 群間で有意に低値($p<0.01$)を示し、FAST 3 群と FAST 4 群間ならびに FAST 4 群と FAST 5 群間ではそれぞれ有意差を認めなかった。

3) 右 H/C は、FAST 2 群と FAST 3 群間ならびに FAST 3 群と FAST 4 群間ではそれぞれ有意差を認めなかったが、FAST 4 群と FAST 5 群間で有意に低値($p<0.01$)を示した。

2. 重症度別の H/C 左右比(L/R)について

1) 全ての群で L/R は 1.0 未満であった。

2) L/R は、FAST3 群および FAST 4 群は、FAST 2 群および FAST 5 群に対して有意に低値(いずれも $p<0.01$)であった。

D. E. 考察・結論

1. 重症度とともに H/C は左右とも低値を呈した。

2. 左 H/C は認知機能の軽度障害時より著明に低値を呈し、右 H/C は中等度障害時に著明に低値を呈した。

3. H/C の左右差は AD の初期に顕著(左<右)となり、中期には消失する。

以上より、左右海馬体積の測定は AD 早期発見のみならず、病態の進行状況の把握に有用であることが示唆された。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 杉山恒之、中村悦子、山口登. 期待される新規作用機序の抗認知症薬. 臨床精神薬理 2007;10(11):2019-2026
2. 長谷川浩、中村悦子、朝倉幹雄、山口登. 塩酸ドネペジル中断後に幻視体験が悪化したレビー小体型認知症の一例. 精神医学 2008; 50: (印刷中)
3. 中村悦子、柳田浩、山口登. アルツハイマー病の重症度と海馬体積および海馬左右比との関係. 老年精神医学雑誌 2007;18:1217-1223
4. 長谷川浩、朝倉幹雄、中野三穂、長田賢一、山口登. 前頭側頭型認知症にパーキンソン症候群を合併した一例. 精神医学 2007; 49: 1129-1132
5. A. Ogino, T. Sugiyama, N. Yamaguchi, E. Morioka, K. Sekino, K. Tominaga, I. Utagawa, H. Yanagida, H. Watanabe, A. Aoba. The efficacy for cognitive function of donepezil hydrochloride in Alzheimer-type dementia and its related factors: comparison between medicated and non-medicated groups over 12 months. International Clinical Psychopharmacology 2006;21(4):A17
6. 関野敬子、渡部廣行、山口登. アルツハイマー型認知症の早期診断基準の検討—海馬萎縮と記憶機能障害についての3年間の縦断的研究— 老年精神医学雑誌 2006;17(8): 883-891
7. 杉山恒之、山口登. アルツハイマー型認知症の薬物療法—抗認知症薬の効能と限界— 臨床精神薬理 2006;9(9):1783-1791

8. 山口登. 認知症患者への病名告知に関する研究 公衆衛生 2006;70(9):690-691
9. 山口登. 認知症診断の要点と治療 町田市医師会報 2006;403:1-4
10. 荻野あずみ、杉山恒之、山口登. アルツハイマー型認知症の記憶・認知機能障害に対する donepezil の効果内容と効果出現の関連因子について 臨床精神薬理 2007;10(1): 93-101
11. 山口登. 塩酸ドネペジルの使い方—家族、介護者への説明の重要性の観点から— CLINICIAN 2007;558(54):430-449

2. 学会発表

1. 山口登. 臨床に役立つ認知症診療— Alzheimer 病の早期診断と薬物療法— 第16回日本臨床精神神経薬理学会, 北九州 2006年10月
2. 荻野あずみ、杉山恒之、宇田川至、佐藤良子、関野敬子、森岡悦子、田中絢子、岡崎味音、山口登. アルツハイマー型認知症の記憶・認知機能障害に対する塩酸ドネペジルの効果内容と効果出現の関連因子について 第16回日本臨床精神神経薬理学会, 北九州 2006年10月

H. 知的財産権の出願、登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
特になし

研究要旨： α セクレターゼ活性化を導く脳内セロトニン 4(5-HT4)受容体の遺伝子発現を促進する Sp 因子、C/EBP α 因子結合部位を同定した。Sp 因子は基本転写因子群を転写開始部位に誘引し、一方、C/EBP α は、Sp 因子との相互作用を介して遺伝子転写を促進することが明らかになった。この結果は、高 5-HT4 受容体発現量を維持することが可能であり、5-HT4 受容体作動薬のアルツハイマー病治療薬への応用可能性を示唆する。

A. 研究目的

アルツハイマー病(Alzheimer's disease;AD)はの主たる病因は、アミロイド β (amyloid β ; $A\beta$)ペプチドの脳内での産生・蓄積と考えられる。 $A\beta$ は、アミロイド前駆体タンパク質 (amyloid precursor protein;APP)と呼ばれる膜タンパク質が、細胞膜から28アミノ酸外側でAPP細胞外ドメインを切断する酵素(β セクレターゼ)および膜貫通部で切断を行う酵素(γ セクレターゼ)による切断を受け生成する(アミロイド産生経路)。しかし、通常は、細胞膜から12アミノ酸外側で細胞外ドメインを切断する酵素(α セクレターゼ)の作用により、 $A\beta$ の過剰産生が抑制されている。

α セクレターゼ切断を受けたsAPP α は神経細胞保護作用を有し、細胞外へ分泌される。

神経系由来培養細胞を用いた研究から、セロトニン(5-HT)4受容体(5-HT4R)活性化は、cAMP上昇 \rightarrow Epac1活性化 \rightarrow Rap1、Rac活性化を介して α セクレターゼを活性化し、sAPP α の細胞外への分泌を促進させることが報告された。従って、5-HT4R作動薬はAD治療薬としての可能性を秘めている。しかし、ヒト脳における5-HT4Rは極めて僅かな(他の神経伝達物質受容体の1/10 \sim 1/20)ため、5-HT4R作動薬をAD治療に用いるには、脳内5-HT4R発現レベルを高い状態に維持

することが必要である。そこで、本研究では、ヒト5-HT4R遺伝子プロモーター領域の機能解析を行い、促進性転写因子を同定し、脳内5-HT4R発現量を高レベルに維持する方法の開発を試みる。

B. 対象と方法

ヒト5-HT4R 遺伝子転写開始部位の5'上流 \sim exon1を含む領域(-5712/+184)をルシフェラーゼベクターに接続後、順次5'端からの欠失変異体を作製し、内在性に5-HT4Rを発現するヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞に形質導入後、遺伝子発現調節領域を特定する。部位指向性突然変異導入法により一連の塩基置換変異体を作製し、遺伝子発現調節に関与するシス領域および同領域に結合する因子を同定する。転写因子発現ベクター共形質導入法により転写因子機能を解析する。

C. 研究結果

ヒト5-HT4R遺伝子転写開始部位の5'上流-69/-39領域(Sp因子(Sp1、Sp3、Sp4)結合部位)および3'下流+75/+111(C/EBP α 結合部位)が共にヒト5-HT4R遺伝子基本転写活性に必要であることが明らかになった。Sp因子過剰発現は遺伝子転写活性影響を与えなかったが、C/EBP α 過剰発現は、遺伝子転写を促進した。C/EBP α の作

用は-69/-39領域除去では減弱し、+75/+111領域除去では完全に消失した。

D. 考察

-69/-39 に結合した Sp 因子は、基本転写因子を転写開始部位近傍へ誘引し、一方、C/EBP α は、+75/+111 への結合に加え、-69/-39 に結合した Sp 因子との相互作用を介し、5-HT4R 遺伝子発現を促進することが明らかになった。本研究の成果は、C/EBP α の操作により 5-HT4R 発現量を増加させた状況下で、5-HT4R 作動薬治療を行うという新規の AD 治療戦略の可能性を示唆している。従来、グルココルチコイド投与により C/EBP α 遺伝子転写が亢進することが報告されている。今後は C/EBP α 以外の、5-HT4R 遺伝子転写を促進する因子の探索と合わせて、C/EBP α 遺伝子発現を増加する小分子化合物の探索も必要である。さらに、5-HT4R/ α セクレターゼ活性化機構の全貌を明らかにするには、現在 α セクレターゼ候補と考えられる ADAM-9、ADAM-10、ADAM-17、ADAM-19 の中で、真に 5-HT4R と共役する酵素の同定が必要である。

E. 結論

C/EBP α が Sp 因子との協調作用により脳内 5-HT4R の遺伝子発現を促進した。本研究成果は、基礎的知見から、「新規 AD 治療戦略としての 5-HT4R 作動薬」の可能性を示唆している。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 丸田智子、岡田容子、廣井朋子、増田陽子、桑原理恵、神山廣司、長谷川浩、足立 淳、長田賢一、朝倉幹雄、山口 登、松井宏晃。ヒト脳型トリプトファン水酸化酵素遺伝子発現調節機構：転写抑制配列の同定と機能解析。日本神経精神薬理学会雑誌、27:322, 2007.

2. 学会発表

- T.Hiroi, Y.Okada, Y.Masuda, R.Kuwabara, H.Kouyama, H.Hasegawa, S.Maruta, A.Adachi, M.Asakura, N.Yamaguchi, H.Matsui. Regulation of the tryptophan hydroxylase-2 gene promoter activity in immortalized serotonergic RN46A cells. 37th Annual Meeting for Neuroscience Society, 2007.

H. 知的財産権の出願、登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

研究要旨:近年注目されているリチウムの神経保護作用を、神経可塑性に関与する GAP-43 のリン酸化を中心に作用機序を解明し、さらにカルバマゼピンも同様の作用があることを証明した。

A. 研究目的

近年リチウムの神経保護作用、特にアポトーシスに対する抑制作用が解明されてきている。大別すると Bcl-2/Bax を介する系と Glycogen synthase kinase-3 \cdot (GSK-3 \cdot)を介する系にまとめられる。リチウムが GSK-3 \cdot を抑制し、tau のリン酸化を抑制することがすでに報告されており、臨床的にもアルツハイマー病などの神経疾患に有効であるとの報告がある(Zhong J and Lee WH. Expert Opin Drug Saf. 2007, 6(4):375)。また、リチウムの慢性投与後、NMDA 受容体刺激後の Ca²⁺の上昇をリチウムが抑制すると報告している。Hough らはカルバマゼピンでもリチウムと同様に、グルタミン酸による NMDA 受容体刺激後の Ca²⁺の上昇を抑制するとの報告もある。

そこで本研究は、リチウム、カルバマゼピンをラットに長期投与後、神経保護作用に関与する GAP-43、MARKS のリン酸化について検討した。

B. 対象と方法

Wistar 系雄性ラット(150-300 g)にカルバマゼピン 50 mg/kg/day, または 3 mM LiCl を一日二回皮下投与を 5 週間腹腔内投与しました。カルバマゼピンの平均血中濃度は、3.37mg/ml であった。大脳皮質を Homogenize Buffer を用いホモジネートし、遠心分離により細胞質成分を分離した。次に、1% NP40 を含む solubilize buffer で膜成分を可溶化し遠心分離後、可溶化膜成分を得た。さらに DEAE クロマトグラフィー施行後の各サンプルを用

いイムノプロットを施行した。

C. 研究結果

我々は、ラットにリチウムを5週間投与後の大脳皮質を用い、界面活性剤で可溶化されなかった膜分画でアクチン結合型 ϵ -PKC を測定した。control を 100%とすると 1,2 週後は変化が認められなかったが、control と比較して 3 週後は 124%、4 週後は 134%、5 週後は 158%と有意に増加した。従って Prekeris らが提唱している持続的活性化を持ったアクチンと結合した ϵ -PKC がリチウム投与後増加していると考えた。

カルシニューリンは神経系に多量に存在し、カルシウム、カルモジュリンにより活性化されるセリン/スレオニンホスファターゼである。GAP-43 は PKC によりリン酸化されるが、カルシニューリンはリン酸化された GAP-43 を脱リン酸化するため、PKC とは正反対の作用を GAP-43 に対してすることになる。リチウム長期投与後のカルシニューリンは変化を認めなかったが、カルバマゼピン投与後 5 週までの膜成分のカルシニューリン A α の蛋白量は、1 週後より 125%の増加を示し 4 週まで増加を認めた。しかし、5 週後では対照の 70%に down regulation していた。

次に、カルバマゼピン投与後のカルシニューリンにより脱リン酸化される GAP-43 のリン酸化の程度を測定した。GAP-43 への [³²P]ATP の取り込みは、2 週後より次第に増加し、4 週後では対照と比較して 180%増加していた。GAP-43 の蛋白量

の変化がなかったため、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ の取り込みは、GAP-43 のリン酸化を反映していると考えられた。この GAP-43 のリン酸化の変化はカルシニューリンの変化とほぼ平行していた。

D. E. 考察・結論

Prekerisらは、1% Triton X-100 で可溶化されなかった分画に含まれる繊維状アクチンに ϵ -PKC が結合し、神経終末での神経伝達物質の放出を増強すると報告している。activator であるアラキドン酸とジアシルグリセロールは相乗的に ϵ -PKC とアクチンの結合を増加させ、 ϵ -PKC はアクチンと結合すると activator が必需なくなり持続的に活性を持つようになると報告している。リチウム長期投与後に、持続的活性化を持つ、アクチンと結合した ϵ -PKC が増加し、 ϵ -PKC は軸索及びプレシナプス神経終末に存在し、GAP-43 を持続的にリン酸化することにより神経可塑性に関与すると考えられる。リチウム長期投与後、大脳皮質の GAP-43 のイムノプロットによる定量は有意に 55% 増加していた。従ってリチウム長期投与後 GAP-43 蛋白量が増加しそれに伴いリン酸化された GAP-43 も増加したと考えられた。

また、カルバマゼピン長期投与後の脱リン酸化酵素のカルシニューリンが減少し、GAP-43 のリン酸化が亢進したため、GAP-43 の $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ の取り込みが増加したと考えられた。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 長田 賢一、御園生 篤志、中野三穂、大友 雅広、高橋 清文、高橋 美保、小川百合子、金井 重人、田中 大輔、貴家 康男、朝倉 幹雄、精神科医からみた薬物療法、繊維筋痛症ハンドブック、2007、121-129、
2. 長田賢一、うつ病患者における SSRI、SNRI 惹

起性機能障害への対策、精神科治療学、2007、22(11)、1265-1270

3. Hasegawa H, Osada K, Yamaguti N, Schizophrenia, Super Review、2007、25:1-10

2. 学会発表

1. Osada K, Misonoo A, Nakano M, Ootomo M, Ogawa Y, Takahashi K, Takahashi M, Kanai S, Tanaka D, Asakura M, Inoue Y, Yamaguchi N, Chronic trifluoperazine treatment increased P-glycoprotein in the rat brain. 37rd Annual Meeting of Neuroscience、2007.
2. Nakano M, Misonoo A, Osada K, Kanai S, Tanaka D, Ootomo M, Sasuga M, Takahashi K, Takahashi M, Ogawa Y, Asakura M, Fluvoxamine induces phosphorylation of Akt in PC12. 37rd Annual Meeting of Neuroscience、2007.
3. 長田賢一、御園生篤志、中野三穂、高橋清文、小川百合子、高橋美保、金井重人、田中大輔、貴家康男、宮本聖也、朝倉幹雄、山口登、Trifluoperazine のラット慢性投与後の脳内P糖蛋白質への影響、第 26 回躁うつ病の薬理・生化学的研究懇話会、2007.

H. 知的財産権の出願、登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし