

200922002A

厚生労働科学研究費補助金

認知症対策総合研究事業

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 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 鈴木 登

平成 22 (2010) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

認知症対策総合研究事業

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 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 鈴木 登

平成 22 (2010) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告	1
研究代表者 鈴木 登	
II. 分担研究報告	
1. 神経心理学上の認知機能と海馬体積および大脳皮質下病変との関係 —物忘れ外来受診者の解析—	5
聖マリアンナ医科大学 神経精神科 山口 登	
2. 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	7
聖マリアンナ医科大学 大学院アイソトープ研究施設 松井宏晃	
3. 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	10
聖マリアンナ医科大学 神経精神科 長田賢一	
4. アルツハイマー病に関与する血清ペプチドの深索	15
聖マリアンナ医科大学 疾患プロテオーム ・分子病態治療学 黒川真奈絵	
5. タウオパチーに起因する認知症に随伴するパーキンソニズムに 関する研究	20
聖マリアンナ医科大学 免疫学・病害動物学 千葉俊明	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	22
IV. 研究成果の刊行物・別刷	26
V. 平成 21 年度班員名簿	108

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（認知症対策総合研究事業）

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

研究代表者 鈴木 登 聖マリアンナ医科大学医学部免疫学・病害動物学教室

研究要旨：アルツハイマー型認知症はタウ蛋白異常およびアミロイド蛋白異常の両方の病態を持つ疾患である。ヒトタウ異常蛋白発現トランスジェニックマウスとアミロイドトランスジェニックマウスを用いて胚性幹(ES)細胞から分化誘導した神経細胞の移植を行った。

ES細胞を骨髄間質細胞由来の前脂肪細胞で、造血支持能を有するPA6細胞と共培養後、線維芽細胞増殖因子とさらに培養して神経幹細胞を増殖させた。この細胞を直接海馬に移植した。

GFP陽性の移植細胞は海馬内で生着した。移植細胞は海馬内でVGAT陽性、Synapsin1陽性PSD95陽性となり、海馬神経の性質を持つGABAergicな細胞に分化した後、シナプス形成と神経ネットワークの再構築が起こることが明らかになった。

今後、長期の観察を行い、行動評価を行う予定である。

研究分担者

山口 登 聖マリアンナ医科大学
神経精神科学 教授
松井 宏晃 聖マリアンナ医科大学
大学院アイトップ 研究施設 教授
長田 賢一 聖マリアンナ医科大学
神経精神科学 講師
黒川真奈絵 聖マリアンナ医科大学
疾患プロテオーム
・分子病態治療学 講師
千葉 俊明 聖マリアンナ医科大学
免疫学・病害動物学 講師

スであるSJLBマウスの皮質および海馬を中心にタウ異常蛋白の蓄積をヒトタウ特異的抗体を用いて組織学的に解析した。Luxsol first blue-bodian染色にて同部の神経線維変性を評価した。

2. タウ異常蛋白がCaspase-3を介したアポトーシスをきたし、細胞死および機能異常をきたす報告を基に、12ヶ月齢SJLBマウスの皮質、海馬においても同様であるか組織学的に解析した。アポトーシスはTUNEL法にて、Caspase-3には活動型Caspase-3のみを認識する抗体による組織染色を施行した。

3. 電子顕微鏡による神経変性を確認した。1.-3.において治療における標的は蓄積した異常蛋白であることが確認できる。

4. 移植治療

a) 移植細胞の同定および追跡のためのGFP発現胚性幹細胞の作製と神経幹細胞の分化誘導。

b) 3ヶ月齢および4ヶ月齢SJLBマウスの線条体（中心部と後方の海馬近傍）の2ヶ所にGFP強陽性神経幹細胞を移植し、1ヶ月後の組織評価を施行。

A. 研究目的

アルツハイマー型認知症はタウ蛋白異常およびアミロイド蛋白異常の両方の病態を持つ疾患である。両方の側面から治療を検討するため、タウ蛋白異常モデルマウスとアミロイド蛋白異常モデルマウスに移植治療を行ったものの組織学的変化を検討した。

B. 研究方法

1. ヒト異常(N279K)タウ遺伝子改変マウ

c) アミロイド蛋白異常 (PDGFB-APPSwInd) マウスの米国からの搬入および繁殖。3ヶ月齢および4ヶ月齢のアミロイド蛋白異常マウスの海馬に同様にGFP強陽性神経幹細胞を移植し、2週から5週後の組織評価を施行。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては当大学実験動物取り扱い規約に則り、また苦痛軽減措置も適切に行った。遺伝子組み換え実験においても、当大学に申請し許可された実験計画に基づいて適切に行っている。

C. 研究結果

1. ヒトタウ異常蛋白は月齢依存性に皮質および海馬の神経細胞に蓄積していた。

また同部では神経突起の変性がみられた。

2. 1.の結果と同様に変性のみられた神経細胞は Caspase-3 を介したアポトーシスが顕著であり、また、アポトーシスは皮質で早くおこり、その後に海馬での細胞死が盛んになるという、先行する性格変化とその後の認知症という臨床経過に合致した結果が得られた。

3. 12ヶ月齢 SJLB の特に海馬において、アポトーシスを起こした核をもつ変性した神経細胞が確認された。

4.

a) Nucleofector による pmaxGFP 遺伝子導入マウス胚性幹細胞株を G418 抗生剤にて選択し、homogeneous な GFP 強発現株を3株作製。その後 PA6 細胞との共培養にて6日目には約80%の細胞が神経幹細胞になることを確認した。その後 bFGF を添加し neurosphere 法で神経幹細胞を増殖させた。

b) 移植後の組織評価では GFP 陽性細胞が海馬内で容易に特定でき、生着していることが確認された。GFP 陽性細胞はニューロンマーカー (Tuj)、節前シナプス (synapsinI)、節後シナプス (PSD95) の発現を認めた。

c) GFP 陽性細胞が海馬内で海馬神経の性質を持つ GABAergic なニューロン (vesicular GABA transporter; VGAT 陽性) に分化していた。

D. 考察

組織学的な評価からタウ異常蛋白の蓄積に対する治療および蓄積を予防するような治療が重要であることがわかった。海馬特異的神経細胞の in vitro での分化誘導法は未だ確立していないため、遊走能および分化能の高い神経幹細胞を移植群として使用した。この細胞は DOPAminergic な細胞への分化能を持つことは既に報告されているが、今回、移植部位に対応して GABAergic なニューロンへも分化できる事が明らかになった。

E. 結論

アミロイド蛋白異常マウスにおいては海馬内への神経幹細胞の移植で、海馬神経の性質を持つ GABAergic なニューロンに分化し生着し、シナプス形成を行い神経ネットワークを再構築することが示された。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kayama M, Kurokawa MS, Ueda Y, Ueno H, Kumagai Y, Chiba S, Takada E, Ueno S, Tadokoro M, Suzuki N. Transfection with pax6 gene of mouse ES cells and subsequent cell cloning induced retinal neuron progenitors, including retinal ganglion cell-like cell, in vitro. *Ophthalmic Research* 15:43(2): 79-91, 2009.
2. Fujii A, Chiba S, Takada E, Ueda Y, Shimizu J, M Beppu, Suzuki N. Generation

- of Spinal Motoneurons from Mouse Induced Pluripotent Stem Cells. *St. Marianna Medical journal* 37(5): 327-336, 2009.
3. Kumagai Y, Kurokawa MS, Ueno H, Kayama M, Tsubota K, Nakatsuji N, Kondo Y, Ueno S, Suzuki N. Induction of corneal epithelium-like cells from cynomolgus monkey embryonic stem cells and their experimental transplantation to damaged cornea. *Cornea*, in press
 4. Shimizu J, Yoshikawa H, Takada E, Hirose C, Suzuki N. Skewed helper T cell function in Behcet's disease. *Inflammation and Regeneration*, in press
 5. Kurokawa MS, Suzuki N. Behcet's Disease. *Current Research in Immunology*, in press
 6. Hazama Y, Kurokawa MS, Chiba S, Tadokoro M, Imai T, Kondo Y, Nakatsuji N, Suzuki T, Hashimoto T, Suzuki N. SDF1/CXCR4 Contributes to Neural Regeneration in Hemiplegic Mice with a Monkey ES-cell-derived Neural Graft Inflammation and Regeneration, in press
2. 学会発表
 1. Shimizu J, Yoshikawa H, Suzuki N, Kaneko F, Kaneko S. Accelerated expression of TGF-beta receptor and Smad2 mRNA in Behcet's disease. 第39回日本免疫学会総会・学術集会 2009.
 2. Shimizu J, Suzuki N, Kaneko F, Kaneko S. Accelerated expression of interleukin-23 and SMAD2 mRNA in Behcet's disease. The 9th World Congress on Inflammation. Tokyo 2009.
 3. Taniguchi T, Kadoyama K, Takenokuchi M, Chiba S, Suzuki N, Matsumoto A, Matsuyama S. PARKINSONISM INDUCED BY TAUOPATHY: ANALYSIS OF SJLB MICE. The 22nd Biennial Meeting of the ISN/APS Joint Meeting. Korea 2009.
 4. Taniguchi T, Chiba S, Kadoyama K, Nagata D, Tanaka S, Kawakami T, Suzuki N, Sagara E, Matsuyama S. Parkinsonism in Tauopathy: analysis of SJLB mice. 日本動物学会. 静岡 2009.
- H. 知的財産権の出願、登録状況
特記事項なし

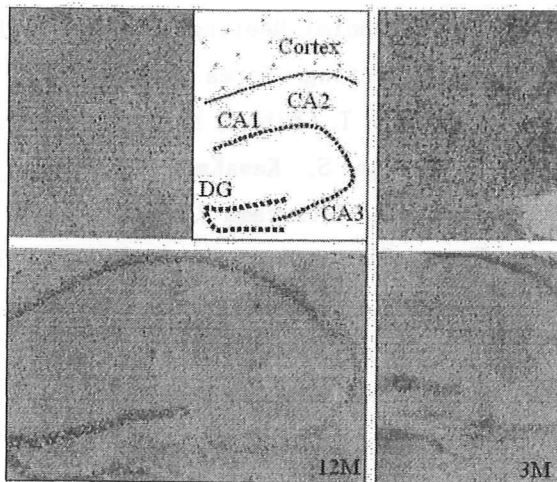


図1. SJLB マウスでの TUNEL 法を用いた海馬周囲の神経細胞死の検出。

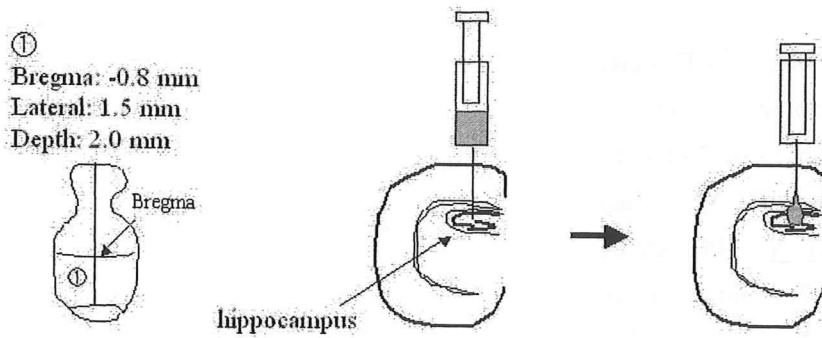


図2. 海馬への神経幹細胞移植法。定位的に直接海馬内へ移植を行った。

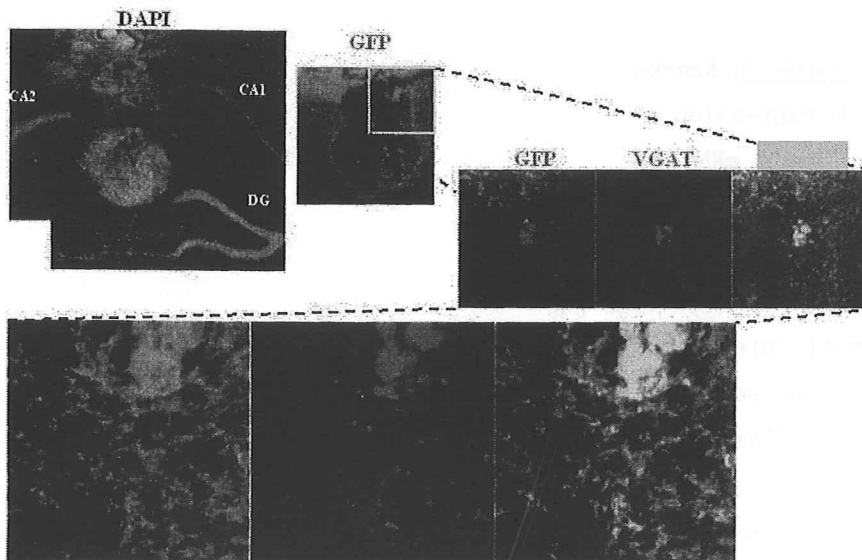


図3. アミロイドトランスジェニックマウスでの神経細胞移植 2 週後の海馬周囲の組織像。
GFP 陽性の移植細胞は VGAT 陽性の GABAergic な海馬神経に分化して生着している。

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（認知症対策総合研究事業）

分担研究報告書

神経心理学上の認知機能と海馬体積および大脳皮質下病変との関係

—物忘れ外来受診者の解析—

研究分担者 山口 登 聖マリアンナ医科大学神経精神科学教室教授

研究要旨：認知機能検査所見と頭部 MRI 所見との関係を検討する。結果：①海馬体積は認知機能と強い相関が示され、特に見当識・言語記憶機能（再生機能と遅延再認機能）と関連する。②大脳皮質下病変のうち脳質周囲病変は言語記憶機能及び精神的敏捷性の低下と関連する。しかし、いずれの関連性も海馬体積より低い。③大脳皮質下病変のうち大脳深部白質病変は認知機能と関連しない。

以上より、海馬萎縮性変化が特徴的なアルツハイマー病では認知機能障害が顕著に認められ、脳室周囲病変が併存することで、より記憶機能・認知機能低下は重症化する事が示唆される。

A. 研究目的

老年期を代表する認知症であるアルツハイマー病（AD）患者では、病初期から海馬など大脳皮質の萎縮性変化が見られる。それに加え、大脳皮質下に脳室周囲病変（PVH）や大脳深部白室病変（DSWMH）が併存する症例が多く認められ、各々が相加的に認知機能に影響を及ぼす可能性が推測される。そこで、神経心理学上の認知機能と MRI 画像上での海馬体積及び大脳皮質下病変との関係について検討した。

B. 対象と方法

対象は、物忘れを主訴に外来受診し、頭部 MRI 検査を施行された 92 名（男性 29 名、女性 63 名、平均年齢 76.6 ± 7.3 歳）、Functional Assessment Staging (FAST) 2~5（境界状態~AD）である。MRI 画像より、海馬体積(H)、頭蓋内体積(C)を測定し、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)とした。大脳皮質下病変の評価については、『脳ドックのガイドライン 2008』の頭部 MRI の大脳白室病変の評価方法を使用した。認知機能評価は Mini-mental State Examination:MMSE と St. Marianna University' s Computerized Memory Test : STM-COMET を使用し

た。H/C・PVH・DSWMH を説明変数とし回帰分析を施行した。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. 結果

①H/C は認知機能と強い相関が示され、特に見当識・言語記憶機能（再生機能と遅延再認機能）と関連する。また、精神的敏捷性、注意持続性も関連するが、見当識・言語記憶機能と比べ、弱い。②PVH は言語記憶機能および精神的敏捷性と関連する。しかし、いずれの関連性も H/C より弱い。③DSWMH は認知機能と関連しない。

D. 考察

脳室周囲には皮質と皮質下・皮質下核など脳の他領域への長い繊維連絡が認められ、ヒトには高齢となっても神経新生する神経幹細胞が海馬および脳室壁下層に多く潜んでいる。したがって、脳室周囲は記憶ならびに認知機能と密接に係ることが推測される。一方、皮質下深部白質領域はより短い神経繊維や隣接する脳回への線維連絡が主な神経経路であり、記憶機能、特に言語記憶機能との関連は乏しいと考えられる。

E. 結論

海馬萎縮性変化が特徴的なADでは認知機能障害が顕著に認められ、脳室周囲病変が併存することで、より記憶機能・認知機能低下は重症化する事が示唆される。

F 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 山口登. 老年期うつ病と認知症の共存と連続性, 神経心理学 2009; 25(3): 177-181.
2. 山口登. 高齢者のうつ病の症候学と診断学, Geriatric Medicine 2009; 47(11): 1427-1430.
3. 山口登. 認知症の診断と治療, 神経精神医学雑誌 2009; 111(1): 108-113.
4. 三宅誕実, 宮本聖也, 竹内愛, 山田聡子, 田所正典, 大迫直子, 塚原さち子, 穴井己理子, 遠藤多香子, 諸川由実代, 山口登, 統合失調症患者の認知機能障害に対する blonanserin の効果: risperidone との無作為化二重盲検比較, 臨床精神薬理 2008; 11: 315-326.
5. 中野三穂, 宮本聖也, 関野敬子, 三宅誕実, 富永桂一郎, 新妻聖子, 竹内愛, 加藤文太, 山田浩史, 平山俊和, 山口登, パーキンソニズムを呈する若年発症前頭側頭型認知症の1症例, 精神科, 13巻3号, p257-261, 2008
6. 渡部廣行, 山口登. 【高齢者のめまい診断における pitfall】 高齢者の精神障害とめまい, ENTONI, 87号, p130-135, 2008
7. 関野敬子, 山口登. 高齢者認知症の薬物治療の効果, 日本医事新報 2008; 4380: 94-95
8. 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: 197-199
9. 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

10. 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
11. 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
12. 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
13. 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. M.Okazaki, I Utagawa, C Hashimoto, A Tanaka, E Nakamura, K Sekino, K Tominaga, M Tadokoro, S Tsukahara, N Yamaguchi. Hypercholesterolemia in alzh-eimer' s disease reduces the effects of donepezil hydrochloride. Collegium international neuropsychopharmacology-cum, Munich Germany July 2008 .
2. 田中絢子, 岡崎味音, 中村悦子, 富永桂一郎, 関野敬子, 荻野あずみ, 穴井理巳子, 塚原さち子, 田所典, 山口登. 認知機能と海馬体積及び大脳皮質下病変との関係, 第23回老年精神医学会, 神戸 2008年6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

分担研究報告書

新規アルツハイマー病治療戦略：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

研究分担者 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

研究要旨： α セクレターゼ活性化機構に共役するセロトニン4(5-HT4)受容体遺伝子は、全長約700kb(38エクソン)で5番染色体上(5q31-q33)に存在する。転写開始部位マッピング方法を用い、脳特異的プロモーター領域の同定を試みた。その結果、イントロン25内に新規の海馬特異的プロモーター領域および新規のエクソン25.5を同定した。転写開始部位近傍には、TATA box、CCAAT boxを認めず、複数のSp/Krüppel-like factor family 転写因子、CREB、EGR、AP-2に加え、神経特異的抑制因子(NRSF)結合部位が存在する。海馬特異的5-HT4受容体遺伝子プロモーターは、これらの転写因子間の相互作用により、複雑な活性制御を受けていることが推測された。

A. 研究目的

アルツハイマー病(Alzheimer's disease;AD)の主たる病因は、脳内における神経細胞障害性のアミロイド β (amyloid β ;A β)ペプチドの産生・蓄積と考えられる。A β は、アミロイド前駆体タンパク質 (amyloid precursor protein;APP)から、 β 、 γ セクレターゼによる切断を受け生成する。しかし、通常は、 α セクレターゼの作用により、A β 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 は細胞外へ分泌され、神経細胞保護作用をもたらす。

セロトニン(5-HT)4受容体(5-HT4R)活性化は、cAMP上昇→Epac1活性化→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。従って、5-HT4R作動薬はAD治療薬としての可能性を有する。ヒト5-HT4R遺伝子は、全長約700kb(38エクソン)で、翻訳開始部位は、エクソン26に存在する。極めて長いヒト5-HT4Rの5'非翻訳領域(5.2kb)の複雑な2次構

造や多数存在するATG配列により、ヒト5-HT4R mRNAからヒト5-HT4Rタンパク質への翻訳は抑制されており、その結果ヒト脳5-HT4R発現レベルは極めて低い(他の神経伝達物質受容体の1/10~1/20)。従って、エクソン1からの転写を制御するプロモーターの活性化は、必ずしもヒト5-HT4Rタンパク質の増加には繋がらない可能性がある。一般に、遺伝子の5'非翻訳領域の長さが短いほど、翻訳活性は高いとされる。そこで、本研究では、ヒト5-HT4R遺伝子翻訳開始コドンが存在する、エクソン26の5'上流に、脳特異的新規プロモーター領域の存在を仮定し、転写開始部位マッピング法を用い、その同定を試みた。

B. 研究方法

(1)ヒト5-HT4R 遺伝子翻訳開始部位を含むプライマーを用い、ヒト海馬 cDNA library から、PCR 法にてエクソン26に連続するエクソン25以外の配列を有するクローンを選別する。(2)(1)の操作を繰り返し、目的のエク

ソンの 5'近傍までの構造を解析する。(3)5'端近傍の配列を基に inverse PCR 法にて転写開始部位を決定する。(4)PCR 増幅した新規エクソン全域断片を用い、ヒト genomic library から新規エクソン含むゲノムクローンを単離する。(5)得られたゲノムクローンの構造解析に基づき、制限酵素切断部位を利用してプロモーター活性測定用の 5'欠失変異体を順次作成する。(6)ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞へ transfection し、基本プロモーター活性を担う領域を決定し、同領域に結合する転写因子を同定する。

C. 研究結果

ヒト 5-HT4R 遺伝子イントロン 25 内に、海馬特異的新規プロモーター領域と新規エクソン 25.5(5'非翻訳領域~800 塩基)を同定した。転写開始部位は複数存在した。この領域には TATA、CCAAT box 配列を認めず、複数の Sp/Krüppel-like factor family 転写因子、CREB、EGR、AP-2、神経特異的抑制因子(NRSF)結合部位が存在した。海馬特異的 5-HT4 受容体遺伝子プロモーターは、これらの転写因子間の相互作用により、複雑な活性制御を受けていることが推測された。

D. 考察

本研究では、海馬特異的なプロモーター領域および、それに駆動されるエクソン25.5を同定した。同領域に結合部位を認めた Sp/Krüppel-like factor familyは、Sp1、Sp3など比較的組織非特異的な発現様式を示す転写因子に加え、組織特異的な発現様式を示す、類似の構造を有する20種類もの転写因子から構成される。従って、これらの転写因子単独あるいは、転写因子間相互作用により、エクソン25.5転写活性が調節されるものと推

定される。さらに、2か所にNRSF結合配列を同定した。NRSFは、発見当時は非神経細胞に発現し神経細胞特異的遺伝子の発現を抑制する転写因子と考えられたが、その後の研究から、神経細胞にも発現を認めること、ならびに神経活動依存性にNRSFの転写抑制作用が減弱することなどが報告された。従って、海馬において、神経活動依存的にヒト 5-HT4R遺伝子転写活性が増大する可能性が考えられる。一般に、バルプロ酸はHDAC I 阻害作用を有し、NRSFの転写抑制作用に拮抗的に作用する。従って、バルプロ酸投与により海馬5-HT4R発現量が増加する可能性がある。このことは、バルプロ酸の併用により、海馬5-HT4R発現量を増加させた条件下で5-HT4R作動薬を治療に使用すれば、治療有効性が、より増加する可能性がある。なお、本研究で用いた、SH-SY5Y細胞は、神経細胞のモデル細胞ではあるが、海馬由来の培養細胞ではない。従って、今後は、海馬由来の培養細胞を用い、新規プロモーター領域の機能解析を行い、真に海馬特異的なヒト5-HT4R遺伝子転写制御機構を明らかにすることが重要な課題である。

E. 結論

神経細胞活動依存的にヒト5-HT4R遺伝子発現を調節する可能性のある新規プロモーター領域を同定した。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

T. Hiroi, S. Tatsunami, T. Yamamoto, R. Kuwabara, H. Kouyama, H. Matsui.

Preventative maintenance of drainpipes in radiisotope facility using flexible hose. Radiation Safety Management, 8, 14-18, 2010.

2. 学会発表

1. Y. Inoue, T. Hiroi, Y. Okada, R. Kuwabara, H. Kouyama, H. Hasegawa, S. Maruta, A. Adachi, K. Osada, M. Asakura, N. Yamaguchi, H. Matsui. Regulation of the human tryptophan hydroxylase-2 (TPH2) gene promoter activity by CCAAT enhancer-binding protein alpha in RN46A cells. Neuroscience 2009 Annual Meeting, 2009, 10
2. K. Osada, Y. Ogawa, T. Haga, H. Matsui, K. Takahashi, Y. Sasuga, D. Tanaka, S. Kanai, M. Nakano, T. Yanagida, K. Fujiwara, M. Asakura. Chronic trifluoperazine treatment increased P-glycoprotein in the rat brain. neuroscience 2009, Annual Meeting 2009, 10
3. Haga, Y. Ogawa, H. Matsui, K. Takahashi, D. Tanaka, S. Kanai, Y. Sasuga, M. Nakano, T. Yanagida, K. Fujiwara, M. Asakura, K. Osada. Validation of a fluorescence-NBD-F high-throughput method for the cellular noradrenaline uptake activity. Neuroscience 2009 Annual Meeting, 2009, 10
4. Y. Ogawa, K. Osada, T. Haga, H. Matsui, M. Nakano, S. Kanai, D. Tanaka, T. Yanagida, K. Fujiwara, Y. Sasuga, K. Takahashi, M. Asakura. Milnacipran, one of antidepressant, bound with fluorescence-NBD-F passed and accumulated into HT22 cell. Neuroscience 2009 Annual Meeting, 2009, 10

5. Y. Inoue, T. Hiroi, Y. Okada, R. Kuwabara, Kouyama H, Matsui H. Regulation of the human tryptophan hydroxylase 2 (TPH2) gene promoter activity by CCAAT-enhancer binding protein. 第32回 日本分子生物学会年会、2009, 12

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（認知症対策総合研究事業）
分担研究報告書

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

研究分担者 長田賢一 聖マリアンナ医科大学医学部神経精神科教室

研究要旨

アルツハイマー病では tau の過剰なリン酸化による蓄積が報告されている。この tau の蓄積はユビキチン化により調節されており、Akt が重要な役割を果たしていることが近年明らかになった。

Wistar 系雄性ラットに Fluvoxamine, milnacipran を各 5 mg/kg、3 週間皮下投与後の大脳皮質において、Akt-Ser473 リン酸化抗体、Akt-Thr308 リン酸化抗体を用いたイムノプロットの結果では、Akt の Ser473 リン酸化、Thr308 リン酸化が亢進し、さらにリン酸化された Akt が細胞質から核へ移行していると考えられた。

さらに、PC12 細胞での fluvoxamine の作用機序に対する検討から、fluvoxamine は BDNF と同様に Trk 受容体を介して PI3 kinase を活性化し Akt をリン酸化するだけでなく、sigma-1 受容体を介しても PI3 kinase を活性化し Akt をリン酸化していることが判明した。また、本研究から、sigma-1 受容体刺激薬なども Akt をリン酸化していることが判明した。

Fluvoxamine, milnacipran の抗うつ薬、DHEA-sulfate などの sigma-1 受容体刺激薬が Akt のリン酸化を亢進していることは、tau の過剰なリン酸化を抑制する可能性が考えられ、アルツハイマー病の治療薬となりうる可能性が示唆された。

A. 研究目的

アルツハイマー病では tau の過剰なリン酸化による蓄積が報告されている。この tau の蓄積はユビキチン化により調節されており、Akt が重要な役割を果たしていることが近年明らかになった (Dickey CA, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 ;105:3622)。Akt は CHIP (carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein) /Hsp90 (heat shock protein 90) 複合体を調節し tau の過剰なリン酸化による蓄積に大きく影響している。CHIP はユビキチン酵素であり、Akt をユビキチン化し変性させる。また Akt が tau の S262/S356 のリン酸化を誘導し、CHIP を介する tau のユビキチン化による変性を減少させることが報告されている

Glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) もアルツハイマー病での tau の過剰なリン酸化に関与する重要な酵素である。この GSK-3 β も

Akt によりリン酸化されることにより酵素の活性を調節されている。

従って、アルツハイマー病において Akt の役割は重要である。今回は現在臨床でも多く使用されている抗うつ薬である SSRI である fluvoxamine と SNRI である milnacipran の Akt のリン酸化に対する作用を検討した。

B. 研究方法

【Fluvoxamine, milnacipran のラットへの投与】

Wistar 系雄性ラット (150-300g) に fluvoxamine, milnacipran を各 5 mg/kg、3 週間皮下投与した。大脳皮質をホモジネートし、遠心分離により細胞質成分を分離した。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の実験を施行した。また大脳皮質切片を作成し avidin-biotin complex method を用い免疫染色を施行した。

(倫理面への配慮)

実験動物に関しては、聖マリアンナ医科大学中央実験動物委員会の指針に基づき、倫理的配慮をふまえた上で実験を行った。

【FluvoxamineのPC12細胞への投与】

3-6x10⁵個 PC12 細胞を Hank's balanced buffer/ 2% fetal bovine serum で24時間培養後に 10 μM, 100 μM fluvoxamine 投与後、Phospho-Akt (Ser473)抗体、Akt-1抗体を用いてイムノブロットを施行した。

C. 研究結果

【ラット大脳皮質における fluvoxamine, milnacipran によるAktのリン酸化について】

Phospho-Akt (Ser473)、phospho-Akt (Thr308)抗体を用いて大脳皮質の切片を免疫染色した結果は、fluvoxamine, milnacipran を3週間投与後、リン酸化 Akt-Thr はそれぞれ 25%, 42%の増加を認めた。同様にリン酸化 Akt-Ser は fluvoxamine, milnacipran 投与後、それぞれ 17%, 20%の増加を認めた。さらに強拡大では、ラット大脳皮質内にて、抗うつ薬投与後の核内での Akt リン酸化の増加とリン酸化された Akt の核への移行認められた。

Fluvoxamine, milnacipran を3週間投与後の大脳皮質において、Akt 抗体を用いてのイムノブロットの結果は、Akt は細胞質成分では、22%、32%の減少を認め、核蛋白においては、130%、150%の増加を認めた。Fluvoxamine, milnacipran 投与後、リン酸化 Akt-Thr の変化は細胞質成分では、180%、190%の増加を認め、核蛋白においても、111%、130%の増加を認めた。リン酸化 Akt-Ser の変化は細胞質成分では、145%、150%の増加を認め、核蛋白においても、173%、150%の増加を認めた。従って、対照群と比較して Akt-Ser473 リン酸化抗体、Akt-Thr308 リン酸化抗体を用いてのイムノブロットの結果では、Akt の Ser473 リン酸化、Thr308 リン酸化が亢進し、

さらにリン酸化された Akt が細胞質から核へ移行していると考えられた。

【PC12 細胞での fluvoxamine による Akt のリン酸化機構の検討】

PC12 細胞の培地に通常培養に使用する 10% serum だと、Akt のリン酸化が serum により引き起こされるため、今回は薬物添加 24 時間前に 2% serum に変え実験を試行した。

10 μM fluvoxamine により 2.4 倍 Akt-Ser473 のリン酸化が 40 分後増加し、100 μM fluvoxamine では 3.8 倍 Akt-Ser473 のリン酸化が 40 分後増加していた。

次に、fluvoxamine の薬理作用が BDNF をし、Trk 受容体を刺激し PI3 kinase を介して Akt のリン酸化がおこるかを検討した。50 ng/ml BDNF を PC12 細胞に投与 5 分後に 2.6 倍 Akt-Ser473 のリン酸化が増加していた。Fluvoxamine と BDNF による Akt-Ser473 のリン酸化は PI3 kinase inhibitor である LY294002 を前処置すると対照と同程度に抑制されたことから fluvoxamine による Akt-Ser473 のリン酸化は PI3 kinase を介すると考えられた。

さらに、近年 fluvoxamine が sigma-1 受容体を刺激するとの報告があり、sigma-1 受容体も PI3 kinase を刺激する受容体であるため、sigma-1 受容体刺激薬が Akt-Ser473 のリン酸化させるかを検討した。sigma-1 受容体刺激薬である 10 μM DHEA-sulfate 投与後、2.1 倍 Akt-Ser473 のリン酸化が増加した。従って、fluvoxamine が sigma-1 受容体を介して Akt-Ser473 のリン酸化が増加した可能性も示唆した。sigma-1 受容体刺激後も PI3 kinase を介して Akt-Ser473 のリン酸化を起こすことが確認された。

D. 考察

今回の研究結果からは、fluvoxamine, milnacipran を3週間投与後の大脳皮質におい

て、Akt-Ser473 のリン酸化、Akt-Thr308 のリン酸化が亢進していると考えられた。これは抗うつ薬がBDNFを介してPI3 kinaseを活性化し、Akt-Ser473、Thr308 のリン酸化を増加させる作用と考えられる。AktはThr308とSer473の2箇所でもリン酸化が行われ活性化される。活性化されたAktとアポトーシスとの関係については研究されてきたが、抗うつ薬との関係の報告はいまだ認められない。Aktのセロトニン系に対する作用としては、セロトニン自体がプロテインキナーゼC、PI3 kinaseを活性化し、さらにAktも活性化するとの報告がある。またセロトニンの分泌にもG蛋白を介してAktが関与している事を示唆する報告もある。Aktの上流にはPI3 kinaseがあり、PI3 kinaseはAktのPHドメインに結合しAktを活性化しAktを細胞膜に結合させる(R.Meier)。この段階でPKDがAktをリン酸化する。PKDにはtype1とtype2の2種類のサブタイプがありPDK1はThr308、PDK2はSer473をリン酸化する。

Fluvoxamine, milnacipranを3週間投与後、大脳皮質の核内でのAktリン酸化の増加とリン酸化されたAktの核への移行認められた。核内に移行したAktは転写因子をリン酸化し、転写因子とコファクターの結合を調節し、転写を制御しているという報告がある(Vojtek B.A., Taylor J. 2003, Mol Cellular Bio. 23: 4417.)。よって抗うつ薬の可塑性が、Aktを介して、転写因子へ影響を及ぼす可能性が示唆された。

本結果から、fluvoxamine, milnacipranの抗うつ薬がAktのリン酸化を亢進させていることは、tauの過剰なリン酸化を抑制する可能性が考えられ、アルツハイマー病の治療薬となりうる可能性が示唆された。Aktの活性化がセロトニンの分泌にも関与している可能性があり、今後Aktのリン酸化とセロトニン作用との関係について検討する必要があると思われる

る。

さらに、PC12細胞でのfluvoxamineの作用機序に対する検討から、fluvoxamineはBDNFと同様にTrk受容体を介してPI3 kinaseを活性化しAktをリン酸化するだけでなく、sigma-1受容体を介してもPI3 kinaseを活性化しAktをリン酸化していることが判明した。また、本研究から、sigma-1受容体刺激薬などもAktをリン酸化していることが判明した。従って、DHEA-sulfateなどのsigma-1受容体刺激薬もAktのリン酸化を亢進させていることが判明したので、アルツハイマー病の治療薬となりうる可能性が示唆された。

E. 結論

Fluvoxamine, milnacipranの抗うつ薬、DHEA-sulfateなどのsigma-1受容体刺激薬がAktのリン酸化を亢進していることは、tauの過剰なリン酸化を抑制する可能性が考えられ、アルツハイマー病の治療薬となりうる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakano M, Osada K, Misonoo A, Fujiwara K, Takahashi M, Ogawa Y, Haga T, Kanai S, Tanaka D, Sasuga Y, Fluvoxamine and sigma-1 receptor agonists dehydroepiandrosterone (DHEA)-sulfate induces the Ser473-phosphorylation of Akt-1 in PC12 cells. Life Sciences 2010; in press.
2. Osada K, Ogawa Y, Haga T, Nakano M, Tanaka D, Sasuga Y, Asakura M, Yamaguchi N. Chronic trifluoperazine

- treatment increased P-glycoprotein in the rat brain. *J. St. Marianna Univ* 2010; 1: in press.
3. Takahashi K, Miyoshi H, Otomo M, Osada K, Yamaguchi N, Nakashima H. Suppression of dynamin GTPase activity by sertraline leads to inhibition of dynamin-dependent endocytosis. *Biochem Bio Res Comm* 2010; 391: 382-387.
 4. 長田賢一. Blonanserin の長期投与試験の臨床評価、臨床精神薬理、2009; 12(12): 2622-2629.
 5. 長田賢一、宮本聖也、丸田智子、三宅誕実、中野三穂、山口登. 統合失調症に対する blonanserin の長期投与試験、臨床精神薬理、2009; 12(11): 2337-2351.
 6. Otomo, M., Takahashi, K., Miyoshi, H., Osada, K., Nakashima, H., and Yamaguchi, N. (2008) Some selective serotonin reuptake inhibitors inhibit dynamin I GTPase, *Biol. Pharm. Bull.* Vol. 88, p1489-1495, 2008,
 7. 長田賢一、高橋清文、小川百合子、芳賀俊明、中野三穂、大友雅広、藤原圭亮、柳田拓洋、金井重人、田中大輔、貴家康男、長谷川 浩、朝倉幹雄、向精神薬の脳内濃度の調節する P 糖蛋白質について、精神科、12(5),434-439, 2008,
 8. A. Misonoo, K. Osada, M. Nakano, (1 番目、他 4 名), Chronic treatment with fluvoxamine stimulates phosphorylation of Ser473 and Thr308 of AKT in the rat cerebral cortex, 36(3), 207-214, 聖マリアンナ医科大学大学雑誌、2008,
 9. 長田賢一、中野三穂、大友雅広、高橋清文(4 番目、他 2 名), P 糖蛋白質 - 向精神薬の脳内濃度の調節について -, 分子精神医学 2008 年 8 巻 4 号 p83-85,
 10. 長田賢一、富永桂一郎、岡 寛、西岡久寿樹、磯村達也、中村郁朗、高橋忍、小島綾子、日本語版 Fibromyalgia Impact Questionnaire (JFIQ) の開発: 言語的妥当性を担保した翻訳版の作成、臨床リウマチ、20 ; 19-28、2007、
 11. 金井重人、朝倉幹雄、中野三穂、田中大輔、菱沼拓児、御園生篤志、長田賢一、慢性ストレスによる聴性驚愕反応のストレス感受性亢進の持続、日本神経精神薬理学雑誌、27,13-18, 2007,
2. 学会発表
 1. 高橋清文、三好洋、大友雅広、長田賢一、山口登、中島秀喜. Sertaraline inhibit dynamin-dependent endocytosis by suppressing dynamin GTPase activities, 第 32 回日本分子生物学会、2009 年 12 月.
 2. Y. Ogawa, H. Matsui, K. Osada, T. Haga, M. Nakano, K. Takahashi, K. Fujiwara, T. Yanagida, S. Kanai, D. Tanaka, Y. Sasuga, M. Asakura. Milnacipram of antidepressant bound with fluorescence-NBD-F passed and accumulated into HT22 cell. 40th Annual Meeting of Neuroscience, 2009. 10.
 3. K. Osada, Y. Ogawa, H. Matsui, T. Haga, M. Nakano, K. Takahashi, K. Fujiwara, T. Yanagida, S. Kanai, D. Tanaka, Y. Sasuga, M. Asakura. Chronic trifluoperazine treatment increased P-glycoprotein in the rat brain. 40th Annual Meeting of Neuroscience , 2009.10.
 4. T. Haga, Y. Ogawa, H. Matsui, K. Takahashi, D. Tanaka, S. Kanani, Y. Sasuga, M. Nakano, T. Yanagida, K. Fujiwara, M. Asakura, K. Osada. Validation of a fluorescence-NBD-F high-throughput method for the cellular noradrenaline uptake activity. 40th Annual Meeting of Neuroscience, 2009.10.
 5. 長田賢一、抗うつ薬を含めた精神科薬物療法、第 2 回繊維筋痛症研究会、2008.10,

6. K. OSADA, M. NAKANO, A. MISONO, S. KANAI, D. TANAKA, M. OOTOMO, Y. SASUGA, K. TAKAHASHI, Y. OGAWA, HAGA, M. ASAKURA, Antidepressants induces phosphorylation of Akt in PC12, Neuroscience 2008 meeting, 2008,11,
7. Y.Ogawa, H.Matsui, K.Osada, T.Haga, M.Nakano, A.Misonoo, M.Ootomo, K.Takahashi, K.Fujiwara, T.Yanagida, S.Kanai, D.Tanaka, Y.Sasuga, M.Asakura Fluorescence-based high-throughput method for milnacipran in vivo cells, Neuroscience 2008 meeting, 2008,11,
8. T.Haga, K.Osada, Y.Ogawa, M.Nakano, A.Misonoo, M.Ootomo, K.Takahashi, K.Fujiwara, T.Yanagida, S.Kanai, D.Tanaka, Y.Sasuga, M.Asakura Validation of a fluorescence-based high-throughput method for the cellular serotonin uptake activity, Neuroscience 2008 meeting, 2008,11,

H. 知的財産権の出願、登録状況

1. 特許取得
特記事項なし。
2. 実用新案登録
特記事項なし。
3. その他
特記事項なし。

厚生労働科学研究費補助金（認知症対策総合研究事業）
分担研究報告書

アルツハイマー病に関与する血清ペプチドの探索

研究分担者 黒川 真奈絵 聖マリアンナ医科大学 疾患プロテオーム・分子病態治療学 講師
共同研究者 加藤 智啓 聖マリアンナ医科大学 疾患プロテオーム・分子病態治療学 教授
同 野口 美和 聖マリアンナ医科大学 神経精神科 大学院生
同 宇田川 至 聖マリアンナ医科大学 神経精神科 講師
同 山口 登 聖マリアンナ医科大学 神経精神科 教授

研究要旨

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease, AD) の診断および病状評価は記憶・認知機能等の臨床的評価項目や画像診断を中心に行われているが、より簡便・確実な疾患マーカーの確立が求められている。我々は血清中の主に 10kD 以下の小蛋白質 (ペプチド) を網羅的に解析し、AD の疾患マーカーとなるペプチドの検出を試みた。AD 患者と健常人の血清よりペプチドを抽出し、質量分析により個々のペプチドをイオン化して測定したところ、1 症例あたり 100 本のペプチドイオンピークを検出した。そのうち両群間でイオン強度に有意差を認めるペプチドを 18 個検出した。また検出した全ペプチドのイオン強度を用いて、AD 群と健常群を判別するモデルを作製した ($R^2=0.999$, $Q^2=0.324$)。今後、AD の診断および病状評価のマーカーとなる、或いは病因に関与する、血清ペプチドを同定できる可能性が示された。

A. 研究目的

現在 65 歳以上の人口における認知症の罹患率は 10% に達し、アルツハイマー病 (Alzheimer's disease, AD) はその約 2/3 を占める。AD の確定診断は脳組織の病理学的検査によってのみ可能なため、通常診療においては記憶障害・失行等の症状、改訂長谷川式簡易知能評価スケール等の認知機能検査、頭部 CT や MRI、SPECT 等の画像評価により総合的に診断されている。血液検査等の簡便で客観的な検査が求められているが、AD の血液マーカーは未だ確立されていない。

ペプチドミクスは、検体中の主に 10kD 以下の小蛋白質 (ペプチド) を質量分析により網羅的に解析する新しい手法であり、血液マーカーの探索に有用と考えられる。昨年度我々は、標的的血清ペプチドのアミノ酸配列を同定する方法を確立し報告した。本年度は AD 患者血清中

のペプチドを網羅的に検出し、AD の血液マーカーの候補となるものを選定した。また、検出した全ペプチドの定量結果を用いて疾患判別モデルの作製を試みた。

B. 研究方法

聖マリアンナ医科大学病院神経精神科外来を受診した AD 患者 14 例から血清を採取した。対照群として年齢・性別をほぼ一致させた健常人 14 例の血清を用いた。

血清ペプチド解析の具体的な方法は以下の通り行った。1) 弱陽イオン交換体を搭載した磁気ビーズを用い、血清からペプチドを単離精製する。2) 単離したペプチドを、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法飛行時間型質量分析器を用い、各ペプチドの質量電荷比およびイオン強度を測定することにより網羅的・定量的に検出する。3) 検出された全ペプチドの