

line of evidence, it is likely that the sequence of tau assembly, leading to the formation of pathological inclusions, is different between neurons and glial cells.

In the field of AD research, the amyloid cascade hypothesis has been widely accepted (Hardy and Higgins, 1992). In this hypothesis, it is argued that A $\beta$  as amyloid induces the subsequent pathological events, including synaptic dysfunction, accumulation of phosphorylated tau as neurofibrillary tangles, and neuronal death. In this study, the accumulation of phosphorylated tau, which was determined by the mobility shift of the bands that reacted with 2B11, did not temporally correlate with the accumulation of insoluble A $\beta$ , at least in the brains of animals younger than age 30. Thus, it is likely that the accumulation of phosphorylated tau merely reflects age-dependent perturbation of tau metabolism but not the amyloid-induced pathological sequence. However, Alzheimer-type tau pathology, including argyrophilic tangle formation and tau-accumulated dystrophic neurite formation, was observed in the neocortical areas of the advanced aged animals, which showed substantial amounts of insoluble A $\beta$  in the same areas, although this tau pathology appeared to be of lesser extent than that in the medial temporal areas, in which Alzheimer-type tau pathology initially and favorably

occurs (Braak and Braak, 1991). Thus, although further studies are required, it may be possible to assume that the emergence of intraneuronal tau pathology in the neocortices is a sequence downstream from the occurrence of extraneuronal A $\beta$  deposition, which may be potentially responsible for various biological events, including massive inflammatory responses (Leung et al., 2009; Sheng et al., 1997) and release of toxic A $\beta$  oligomers (Martins et al., 2008).

To date, substantial efforts have been paid to establish animal models to elucidate the pathogenesis of AD using transgenic and nontransgenic species, which likely complement each other. In nontransgenic models, it is interesting to note that age-dependent tau pathology such as the formation of argyrophilic inclusions was favorably observed in nonprimate species, such as sheep and bear. In contrast, primates are rather resistant to the development of tau pathology as long as the animals are allowed to age naturally without any insults to the brain (Table 3). To our knowledge, one of the exceptional primates, which develops significant tau pathology, is the baboon (Schultz et al., 2000a,b). Careful characterization of tau pathology in aged baboons was previously performed and provided evidence that abnormally phosphorylated tau accumulated in neurons, oligodendroglial cells, and

**Table 3 – Summary of the studies on Alzheimer's disease-related proteins, A $\beta$  and tau, in non human mammalian brains.**

Animal	A $\beta$ deposition	Tau accumulation	NFT formation <sup>a</sup>	References
Dog	+	+	ND	Braak et al., 1994; Cummings et al., 1993, 1996a,b; Czasch et al., 2006; Head et al., 2005; Papaioannou et al., 2001; Pugliese et al., 2006; Selkoe et al., 1987; Wegiel et al., 1998
Cat	+	+	ND	Braak et al., 1994; Cummings et al., 1996b; Head et al., 2005; Nakamura et al., 1996a,b
Rabbit	NE	+	NE	Härtig et al., 2000
Goat	ND	+	ND	Braak et al., 1994
Sheep	ND	+	+	Braak et al., 1994; Nelson et al., 1994
Bison	NE	+	+	Härtig et al., 2001
Guanaco	NE	+	NE	Härtig et al., 2000
Reindeer	NE	+	NE	Härtig et al., 2000
Bear	+	+	+	Cork et al., 1988; Härtig et al., 2000; Selkoe et al., 1987
Wolverine	+	+	NE	Roertgen et al., 1996
Lemurian	+	+	NE	Bons et al., 1991, 1995, 2006; Delacourte et al., 1995; Giannakopoulos et al., 1997; Härtig et al., 2000
Marmoset	+	+	ND	Geula et al., 2002; Palazzi et al., 2006; Ridley et al., 2006
Tamarin	+	ND	NE	Lemere et al., 2008
Squirrel monkey	+	ND	NE	Sawamura et al., 1997; Selkoe et al., 1987; Walker et al., 1987, 1990
Rhesus monkey	+	+	ND	Cork et al., 1990; Gearing et al., 1994, 1996; Geula et al., 1998; Härtig et al., 2000; Selkoe et al., 1987; Uno et al., 1996; Wisniewski et al., 1973
Cynomolgus monkey	+	+	+ <sup>b</sup>	Kiatipattanasakul et al., 2000; Kimura et al., 2003, 2007; Nakamura et al., 1995, 1996a,b, 1998; Podlisy et al., 1991
Velvet	+	+	NE	Lemere et al., 2004
Baboon	+	+	+	Härtig et al., 2000; Schultz et al., 2000a,b
Chimpanzee	+	+ <sup>c</sup>	+ <sup>c</sup>	Gearing et al., 1994, 1996; Rosen et al., 2008
Orangutan	+	ND	ND	Gearing et al., 1997; Selkoe et al., 1987
Cynomolgus monkey	+	+	+	Present study

ND, not detected; NE, not examined.

<sup>a</sup> NFT (neurofibrillary tangle) formation confirmed by Gallyas silver staining or electron microscopy observation.

<sup>b</sup> Some neurons and glial cells were Gallyas-silver-positive in subcortical regions of the brain of one aged monkey, which appeared to suffer from a neurodegenerative disease such as progressive supranuclear palsy.

<sup>c</sup> Tau accumulation and tangle formation were observed in the stroke-affected area.

astrocytes, which were not affected in the cynomolgus monkey brains as shown in this study (Schultz et al., 2000a). Importantly, medial temporal areas are preferable for the development of tau pathology whereas neocortical areas are devoid of it even in the aged baboon (Schultz et al., 2000b). Although the difference in cell specificity for the development of tau pathology between the two species remains to be determined, the predilection of tau pathology to the medial temporal area was also the case for the cynomolgus monkey brains. Thus, the development of tau pathology in the neocortical areas is not likely due to aging-induced perturbation of tau metabolism, which may be background to the development of tau pathology in particular regions such as medial temporal areas, but may be attributed to the significant A $\beta$  deposition in these areas.

In conclusion, the present study demonstrates the value of aged cynomolgus monkey brains to elucidate the *bona fide* sequence of Alzheimer-type pathology, including extraneuronal A $\beta$  deposition and intraneuronal tau accumulation, and furthermore to explore whether these two pathological events are related or independent of each other.

## 4. Experimental procedures

### 4.1. Animals

Thirty-four cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) brains, the ages at death were from 6 to 36 years, were examined in this study (Supplemental Table 1). Postmortem delay ranged from 1 to 2 h. The frontal, temporal, and occipital cortices, hippocampus, and cerebellum of the brains were used for biochemical analysis, and the temporal cortex and hippocampus were used for immunohistochemical analysis. All the brains were obtained from the Tsukuba Primate Research Center, National Institute of Biomedical Innovation, Japan. All the animals were housed in individual cages and maintained in accordance with the National Institute of Biomedical Innovation rules and guidelines for experimental animal welfare. Three monkeys (age: 26 (N=1) and 36 (N=2) years) died of natural causes. The remaining animals were deeply anesthetized with a lethal dose of pentobarbital prior to brain extraction. Supplemental Table 1 summarizes the profiles of the examined animals and indicates which subject was used for what analysis. Tissue blocks were fixed (see below) and embedded in paraffin for sectioning (for immunohistochemical studies) or snap frozen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use (for biochemical studies). Based on the fact that SP formation is naturally and consistently observed from age around 25 years (Nakamura et al., 1998) also regarding the life expectancy of this animal species, the animals over the age of mid-20s can be mentioned as aged ones. In addition to monkey samples, brain tissue of two APP-Tg (Tg2576) mice (age: 13.5 months) was subjected to the biochemical analysis of A $\beta$ .

### 4.2. Antibodies

We used the following antibodies: a mouse monoclonal anti-A $\beta$  antibody, 6E10 (epitope within residues 3–8) (Covance, Dedham, MA); a rabbit polyclonal anti-A $\beta$  antibody, anti-

human amyloid  $\beta$  (N) (raised against synthetic peptide of the amino-terminal part of A $\beta$ ) (IBL, Gunma, Japan); a mouse monoclonal anti-A $\beta$ 40 antibody, 1A10 (raised against synthetic peptide of the residues A $\beta$ 35–40) (IBL); a rabbit polyclonal anti-A $\beta$ 42 antibody (raised against synthetic peptide of the carboxy-terminal part of A $\beta$ 42) (IBL); a rabbit polyclonal anti-A $\beta$  (N3pE-42) antibody (raised against synthetic peptide of the amino-terminal part of A $\beta$  in which the third amino-terminal glutamate is converted to pyroglutamate) (IBL); three mouse monoclonal anti-tau antibodies, 2B11 (epitope, residues 301–312) (IBL), HT7 (epitope, residues 159–163) (Thermo Scientific, Rockford, IL); a monoclonal anti-phosphorylated tau antibody, AT8 (epitope, phosphoSer-202 and phosphoThr-205) (Innogenetics NV, Gent, Belgium); a rabbit polyclonal anti-GFAP antibody (Zymed, South San Francisco, CA); and a rabbit polyclonal anti-Olig2 antibody (IBL), which react with the nuclear protein, Olig2, of oligodendrocytes.

### 4.3. Sample preparation

Each of the frozen tissues was homogenized using a Dounce homogenizer with 30 strokes on ice in 19 volumes of Tris-buffered saline (TBS: 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl) containing Complete™ protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). The TBS-soluble fraction was collected by ultracentrifugation of the homogenate at  $436,000\times g$  for 15 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . For the detection of TBS-insoluble A $\beta$ , the pellet was washed twice with TBS by sonication, delipidated with chloroform/methanol (1:2; v/v) by brief sonication and then incubated for 15 min at room temperature (RT). After the centrifugation at  $20,400\times g$  for 20 min, the pellet was solubilized in 100% formic acid, followed by incubation for 1 h at RT. The supernatant, which was collected by the centrifugation of the homogenate at  $20,400\times g$  for 20 min, was dried using speed vac (TOMY SEIKO, Tokyo, Japan). The resultant pellet was used for the study of TBS-insoluble A $\beta$ . In the study of tau, the TBS-soluble fraction was prepared in the same manner as that for A $\beta$  except for the use of phosphatase inhibitors, including 20 mM NaF, 25 mM Na $_4$ P $_2$ O $_7$ , 1 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 1 mM Na $_3$ VO $_4$ , and 1  $\mu\text{M}$  okadaic acid, in homogenization buffer. In the Western blotting for TBS-soluble tau, the heat-stable fraction was collected by boiling the samples for 10 min at  $95^{\circ}\text{C}$  in 2%  $\beta$ -mercaptoethanol, 480 mM NaCl, followed by centrifugation at  $20,400\times g$  for 20 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . The resultant supernatants were subjected to Western blotting. The dephosphorylation of TBS-soluble tau was performed as previously described (Miyasaka et al., 2001). The samples were incubated in 50% ammonium sulfate for 30 min on ice. After the centrifugation of the samples at  $20,400\times g$  for 15 min at  $4^{\circ}\text{C}$ , the precipitated proteins were suspended in a buffer containing 50 mM Tris-HCl, pH 8.7, protease inhibitor cocktail, and 10 U/ml *E. coli* alkaline phosphatase (Type III, Sigma, St. Louis, MO). The samples were incubated at  $67^{\circ}\text{C}$  for 3 h. For the analysis of TBS-insoluble tau, TBS-insoluble materials were processed as described elsewhere (Lee et al., 1999) with some modifications. TBS-insoluble precipitate was homogenized in 20 volumes of Tris buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.8 M NaCl, 10% sucrose) containing Complete™ protease inhibitor cocktail and the phosphatase inhibitors with a motor-driven Teflon homo-

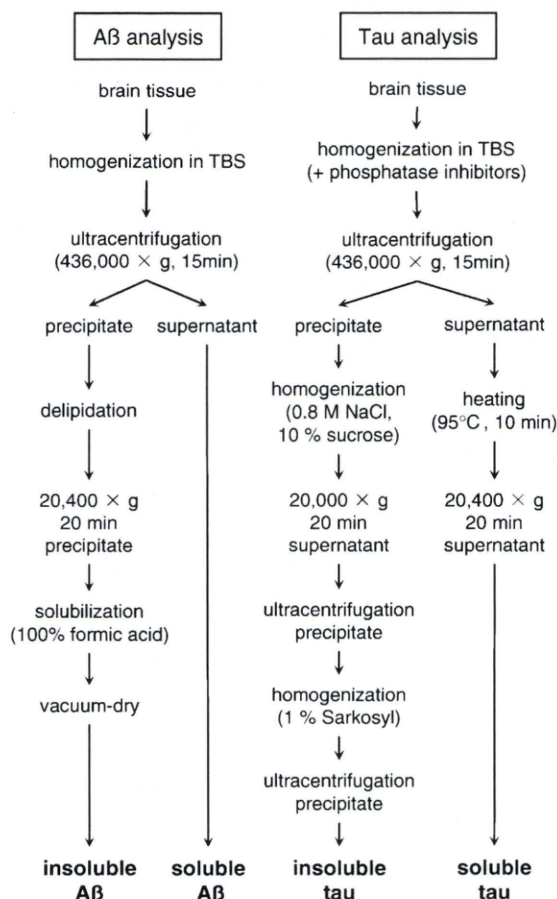


Fig. 5 – Flow chart of the biochemical analyses.

genizer (AS ONE, Osaka, Japan). After incubating the homogenate on ice for 10 min, the homogenate was centrifuged at 20,000×g for 20 min at 4 °C. The resultant precipitate was rehomogenized in the same fashion, and the supernatants were pooled. After ultracentrifugation at 436,000×g for 15 min at 4 °C, the resultant precipitate was homogenized in 20 volumes in 1% Sarkosyl (sodium *N*-dodecanoysarcosinate; Wako, Osaka, Japan) with a motor-driven Teflon homogenizer, followed by incubation for 1 h at RT with stirring every 10 min. The homogenate was ultracentrifuged, and the resultant precipitate was rehomogenized in the same fashion. The insoluble precipitate was resuspended in sodium dodecyl sulfate (SDS) sample buffer [62.5 mM Tris–HCl (pH 6.8), 2% SDS, 10% glycerol, and 5% 2-mercaptoethanol], and subjected to Western blotting (Fig. 5).

#### 4.4. SDS–PAGE and Western blotting

The protein concentration of the TBS-soluble fraction was determined by BCA assay (Thermo Scientific, Rockford, IL). The TBS-soluble and -insoluble samples dissolved in SDS sample buffer [62.5 mM Tris–HCl (pH 6.8), 2% SDS, 10% glycerol, and 5% 2-mercaptoethanol] were subjected to 4–20% (for A $\beta$ ) or 7.5% (for tau) polyacrylamide gel electrophoresis using Tris/tricine (for A $\beta$ ) or Tris/glycine (for tau) buffer. In the analysis of TBS-insoluble samples, the volume of each sample was

responsible for 0.3 mg (on the blots of Fig. 2), 0.08 mg (on the blot of Supplemental Fig. 1B), and 0.75 mg (on the blots of Supplemental Fig. 2) tissue wet weight, except 32-c (0.02 mg) on the blots of Supplemental Fig. 2. The separated proteins were electrotransferred onto nitrocellulose membrane (pore size 0.22  $\mu$ m, GE Osmonics Labstore, Minnetonka, MN). In the detection of A $\beta$  at the picogram scale, the blot was boiled in boiling buffer (8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 137 mM NaCl, and 2.7 mM KCl, pH 7.4) for 5 min (Ida et al., 1996). The blot was incubated in 5% skim milk in PBS-T (PBS buffer containing 0.05% Tween 20) for 1 h at 4 °C (for A $\beta$ ) or RT (for tau). After washing the blot with PBS-T, the proteins were probed with primary antibodies followed by an HRP-conjugated secondary antibody in PBS-T. Bound antibodies were visualized using Amersham ECL™ Western Blotting Detection Regents (GE Healthcare UK Ltd., Buckinghamshire, England). In the analysis of A $\beta$ , synthetic A $\beta$ 1–40, A $\beta$ 1–42, and pyroglutamate A $\beta$  (N3pE-A $\beta$ 3–42) (Peptide Institute Ltd., Osaka, Japan) were used as controls and internal standards.

#### 4.5. Histological analysis

Brain samples were immersion-fixed in 4% paraformaldehyde, embedded in paraffin, and cut into 4- $\mu$ m-thick sections. For immunohistochemistry, the sections were deparaffinized in 0.5% periodic acid for 15 min at RT followed by autoclaving for 5 min at 121 °C and then incubated by free floating (overnight at 4 °C) with each of the following primary antibodies: 2B11 (1:200), HT7 (1:200), AT8 (1:200), and anti-human amyloid  $\beta$  (N) (1:50). Following brief washing, the sections were sequentially incubated with biotinylated goat anti-mouse IgG (1:400) or anti-rabbit IgG (1:400) for 1 h at RT and then with streptavidin–biotin–horseradish peroxidase complex (DAKO, Glostrup, Denmark) for 1 h at RT. Immunoreactive elements were visualized by treating the sections with 3–3' diaminobenzidine tetroxide (Dojin Kagaku, Kumamoto, Japan). The sections were then counterstained with hematoxylin. For double immunohistochemistry, the deparaffinized sections were stained with 1% Sudan Black B to avoid autofluorescence. The sections were incubated by free floating (overnight at 4 °C) in solutions containing antibodies directed against tau [2B11 (1:100), AT8 (1:100)], GFAP (1:500), or Olig2 (1:200). The sections were then incubated with AlexaFluor 488-conjugated goat anti-mouse IgG (1:500; Invitrogen, Carlsbad, CA), AlexaFluor 555-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:500; Invitrogen), and DAPI nuclear stain (1:500; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) for 1 h at RT. All the sections were examined using a Digital Eclipse C1 confocal microscope (Nikon, Kanagawa, Japan). In some sections, we performed Gallyas silver staining. For the counting of tau-immunoreactive glial cells, three unselected areas, from the superficial layer to the deep layer with the width of 445  $\mu$ m per area, were analyzed in superior temporal cortices. In the analysis of the hippocampus, the pyramidal layers from CA1 to CA4 were analyzed.

#### Acknowledgments

The authors thank Dr. Tomohiro Miyasaka for helpful comments and suggestions. This study was supported by a Grant-

in-Aid for Scientific Research on Priority Areas “Research on Pathomechanisms of Brain Disorders” from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan (1700220004).

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.brainres.2009.12.005.

## REFERENCES

- Bons, N., Mestre, N., Petter, A., 1991. Senile plaques and neurofibrillary changes in the brain of an aged lemurian primate, *Microcebus murinus*. *Neurobiol. Aging* 13, 99–105.
- Bons, N., Jallageas, V., Silhol, S., Mestre-Frances, N., Petter, A., Delacourte, A., 1995. Immunocytochemical characterization of Tau proteins during cerebral aging of the lemurian primate *Microcebus murinus*. *C. R. Acad. Sci., III, Sci. Vie* 318, 741–747.
- Bons, N., Rieger, F., Prudhomme, D., Fisher, A., Krause, K.H., 2006. *Microcebus murinus*: a useful primate model for human cerebral aging and Alzheimer's disease? *Genes Brain Behav.* 5, 120–130.
- Braak, H., Braak, E., 1991. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 82, 239–259.
- Braak, H., Braak, E., Strothjohann, M., 1994. Abnormally phosphorylated tau protein related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads in the cerebral cortex of sheep. *Neurosci. Lett.* 171, 1–4.
- Cork, L.C., Powers, R.E., Selkoe, D.J., Davies, P., Geyer, J.J., Price, D.L., 1988. Neurofibrillary tangles and senile plaques in aged bears. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 47, 629–641.
- Cork, L.C., Masters, C., Beyreuther, K., Price, D.L., 1990. Development of senile plaques: relationships of neuronal abnormalities and amyloid deposits. *Am. J. Pathol.* 137, 1383–1392.
- Cummings, B.J., Su, J.H., Cotman, C.W., White, R., Russell, M.J., 1993.  $\beta$ -Amyloid accumulation in aged canine brain: a model of early plaque formation in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 14, 547–560.
- Cummings, B.J., Head, E., Ruehl, W., Milgram, N.W., Cotman, C.W., 1996a. The canine as an animal model of human aging and dementia. *Neurobiol. Aging* 17, 259–268.
- Cummings, B.J., Satou, T., Head, E., Milgram, N.W., Cole, G.M., Savage, M.J., Podlisny, M.B., Selkoe, D.J., Siman, R., Greenberg, B.D., Cotman, C.W., 1996b. Diffuse plaques contain C-terminal  $A\beta_{42}$  and not  $A\beta_{40}$ : evidence from cats and dogs. *Neurobiol. Aging* 17, 653–659.
- Czasch, S., Paul, S., Baumgärtner, W., 2006. A comparison of immunohistochemical and silver staining methods for the detection of diffuse plaques in the aged canine brain. *Neurobiol. Aging* 27, 293–305.
- Delacourte, A., Sautière, P.E., Watzte, A., Mourton-Gilles, C., Petter, A., Bons, A., 1995. Biochemical characterization of tau proteins during cerebral aging of the lemurian primate *Microcebus murinus*. *C. R. Acad. Sci., III Sci. Vie* 318, 85–89.
- Duyckaerts, C., Potier, M.C., Delatour, B., 2008. Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol.* 115, 5–38.
- Flament, S., Delacourte, A., Hémon, B., Défossez, A., 1989. Characterization of two pathological tau protein, variants in Alzheimer brain cortices. *J. Neurol. Sci.* 92, 133–141.
- Frank, S., Clavaguera, F., Tolnay, M., 2008. Tauopathy models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol.* 115, 39–53.
- Gearing, M., Rebeck, G.W., Hyman, B.T., Tigges, J., Mirra, S.S., 1994. Neuropathology and apolipoprotein E profile of aged chimpanzees: implications for Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 9382–9386.
- Gearing, M., Tigges, J., Mori, H., Mirra, S.S., 1996.  $A\beta_{40}$  is a major form of  $\beta$ -amyloid in nonhuman primates. *Neurobiol. Aging* 17, 903–908.
- Gearing, M., Tigges, J., Mori, H., Mirra, S.S., 1997.  $\beta$ -amyloid ( $A\beta$ ) deposition in the brains of aged orangutans. *Neurobiol. Aging* 18, 139–146.
- Geula, C., Wu, C.K., Saroff, D., Lorenzo, A., Yuan, M., Yankner, B.A., 1998. Aging renders the brain vulnerable to amyloid  $\beta$ -protein neurotoxicity. *Nat. Med.* 4, 827–831.
- Geula, C., Nagykerly, N., Wu, C.K., 2002. Amyloid- $\beta$  deposits in the cerebral cortex of the aged common marmoset (*Callithrix jacchus*): incidence and chemical composition. *Acta Neuropathol.* 103, 48–58.
- Giannakopoulos, P., Silhol, S., Jallageas, V., Mallet, J., Bons, N., Bouras, C., Delaère, P., 1997. Quantitative analysis of tau protein-immunoreactive accumulations and  $\beta$  amyloid protein deposits in the cerebral cortex of the mouse lemur, *Microcebus murinus*. *Acta Neuropathol.* 94, 131–139.
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Quinlan, M., Tung, Y.C., Zaidi, M.S., Wisniewski, H.M., 1986. Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J. Biol. Chem.* 261, 6084–6089.
- Hardy, J.A., Higgins, G.A., 1992. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256, 184–185.
- Härtig, W., Klein, C., Brauer, K., Schüppel, K.F., Arendt, T., Brückner, G., Bigl, V., 2000. Abnormally phosphorylated protein tau in the cortex of aged individuals of various mammalian orders. *Acta Neuropathol.* 100, 305–312.
- Härtig, W., Klein, C., Brauer, K., Schüppel, K.F., Arendt, T., Bigl, V., Brückner, G., 2001. Hyperphosphorylated protein tau is restricted to neurons devoid of perineuronal nets in the cortex of aged bison. *Neurobiol. Aging* 22, 25–33.
- Head, E., Moffat, K., Das, P., Sarsoza, F., Poon, W.W., Landsberg, C., Cotman, C.W., Murphy, M.P., 2005.  $\beta$ -amyloid deposition and tau phosphorylation in clinically characterized aged cats. *Neurobiol. Aging* 26, 749–763.
- Hosoda, R., Saido, T.C., Otvos, L., Arai, T., Mann, D.M.A., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., Iwatsubo, T., 1998. Quantification of modified amyloid  $\beta$  peptides in Alzheimer disease and Down syndrome brains. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 57, 1089–1095.
- Ida, N., Hartmann, T., Pantel, J., Schröder, J., Zerfass, R., Förstl, H., Sandbrink, R., Masters, C.L., Beyreuther, K., 1996. Analysis of heterogeneous  $\beta A4$  peptides in human cerebrospinal fluid and blood by a newly developed sensitive Western blot assay. *J. Biol. Chem.* 271, 22908–22914.
- Ihara, Y., Nukina, N., Miura, R., Ogawara, M., 1986. Phosphorylated tau protein is integrated into paired helical filaments in Alzheimer's disease. *J. Biochem.* 99, 1807–1810.
- Iwatsubo, T., Saido, T.C., Mann, D.M.N., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., 1996. Full-length amyloid- $\beta(1-42(43))$  and amino-terminally modified and truncated amyloid- $\beta(42(43))$  deposit in diffuse plaques. *Am. J. Pathol.* 149, 1823–1830.
- Jeganathan, S., Hascher, A., Chinnathambi, S., Biernat, J., Mandelkow, E.M., Mandelkow, E., 2008. Proline-directed pseudo-phosphorylation at AT8 and PHF1 epitopes induces a compaction of the paperclip folding of Tau and generates a pathological (MC-1) conformation. *J. Biol. Chem.* 283, 32066–32076.
- Kawarabayashi, T., Younkin, L.H., Saido, T.C., Shoji, M., Ashe, K.H., Younkin, S.G., 2001. Age-dependent changes in brain, CSF, and plasma amyloid  $\beta$  protein in the Tg2576 transgenic

- mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 21, 372–381.
- Kiatipattanasakul, W., Nakayama, H., Yongsiri, S., Chotiapisitkul, S., Nakamura, S., Kojima, H., Doi, K., 2000. Abnormal neuronal and glial argyrophilic fibrillary structures in the brain of an aged albino cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *Acta Neuropathol.* 100, 580–586.
- Kimura, N., Tanemura, K., Nakamura, S., Takashima, A., Ono, F., Sakakibara, I., Ishii, Y., Kyuwa, S., Yoshikawa, Y., 2003. Age-related changes of Alzheimer's disease-associated proteins in cynomolgus monkey brains. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 310, 303–311.
- Kimura, N., Imamura, O., Ono, F., Terao, K., 2007. Aging attenuates dynactin–dynein interaction: down-regulation of dynein causes accumulation of endogenous tau and amyloid precursor protein in human neuroblastoma cells. *J. Neurosci. Res.* 85, 2909–2916.
- Kuo, Y.M., Beach, T.G., Sue, L.L., Scott, S., Layne, K.J., Kokjohn, T.A., Kalback, W.M., Luehrs, D.C., Vishnivetskaya, T.A., Abramowski, D., Sturchler-Pierrat, C., Staufenbiel, M., Weller, R.O., Roher, A.E., 2001. The evolution of A $\beta$  peptide burden in the APP23 transgenic mice: implications for A $\beta$  deposition in Alzheimer disease. *Mol. Med.* 7, 609–618.
- Lee, V.M., Balin, B.J., Otvos, L., Trojanowski, J.Q., 1991. A68: a major subunit of paired helical filaments and derivatized forms of normal tau. *Science* 251, 675–678.
- Lee, V.M., Wang, L.J., Trojanowski, J.Q., 1999. Purification of paired helical filament tau and normal tau from human brain tissue. *Methods Enzymol.* 309, 81–89.
- Lemere, C.A., Beierschmitt, A., Iglesias, M., Spooner, E.T., Bloom, J.K., Leverone, J.F., Zheng, J.B., Seabrook, T.J., Louard, D., Li, D., Selkoe, D.J., Palmour, R.M., Ervin, F.R., 2004. Alzheimer's disease A $\beta$  vaccine reduces central nervous system A $\beta$  levels in a non-human primate, the Caribbean velvet. *Am. J. Pathol.* 165, 283–297.
- Lemere, C.A., Oh, J., Stanish, H.A., Peng, Y., Pepivani, I., Fagan, A.M., Yamaguchi, H., Westmoreland, S.V., Mansfield, K.G., 2008. Cerebral amyloid-beta protein accumulation with aging in cotton-top-tamarins: a model of early Alzheimer's disease? *Rejuvenation Res.* 11, 321–332.
- Leung, E., Guo, L., Bu, J., Maloof, M., Khoury, J.E., Geula, C., 2009. Microglia activation mediates fibrillar amyloid- $\beta$  toxicity in the aged primate cortex. *Neurobiol. Aging* (electronic publication ahead of print).
- Martins, I.C., Kuperstein, I., Wilkinson, H., Maes, E., Vanbrabant, M., Jonckheere, W., Van Gelder, P., Hartmann, D., D'hooge, R., De Strooper, B., Schymkowitz, J., Rousseau, F., 2008. Lipids revert inert A $\beta$  amyloid fibrils to neurotoxic protofibrils that affect learning in mice. *EMBO J.* 27, 224–233.
- Miyasaka, T., Morishima-Kawashima, M., Ravid, R., Kamphorst, W., Nagashima, K., Ihara, Y., 2001. Selective deposition of mutant tau in the FTDP-17 brain affected by the P301L mutation. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 60, 872–884.
- Mori, H., Takio, K., Ogawara, M., Selkoe, D.J., 1992. Mass spectrometry of purified amyloid  $\beta$  protein in Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* 267, 17082–17086.
- Nakamura, S., Tamaoka, A., Sawamura, N., Shoji, S., Nakayama, H., Ono, F., Sakakibara, I., Yoshikawa, Y., Mori, H., Goto, N., Doi, K., 1995. Carboxyl end-specific monoclonal antibodies to amyloid  $\beta$  protein (A $\beta$ ) subtypes (A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42(43)) differentiate A $\beta$  in senile plaques and amyloid angiopathy in brains of aged cynomolgus monkeys. *Neurosci. Lett.* 201, 151–154.
- Nakamura, S., Nakayama, H., Kiatipattanasakul, W., Uetsuka, K., Uchida, K., Goto, N., 1996a. Senile plaques in very aged cats. *Acta Neuropathol.* 91, 437–439.
- Nakamura, S., Kiatipattanasakul, W., Nakayama, H., Ono, F., Sakakibara, I., Yoshikawa, Y., Goto, N., Doi, K., 1996b. Immunohistochemical characteristics of the constituents of senile plaques and amyloid angiopathy in aged cynomolgus monkeys. *J. Med. Primatol.* 25, 294–300.
- Nakamura, S., Nakayama, H., Goto, N., Ono, F., Sakakibara, I., Yoshikawa, Y., 1998. Histopathological studies of senile plaques and cerebral amyloidosis in cynomolgus monkeys. *J. Med. Primatol.* 27, 244–252.
- Näslund, J., Haroutunian, V., Mohs, R., Davis, K.L., Davies, P., Greengard, P., Buxbaum, J.D., 2000. Correlation between elevated levels of amyloid  $\beta$ -peptide in the brain and cognitive decline. *JAMA* 283, 1571–1577.
- Nelson, P.T., Greenberg, S.G., Saper, C.B., 1994. Neurofibrillary tangles in the cerebral cortex of sheep. *Neurosci. Lett.* 170, 187–190.
- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J.D., Murphy, M.P., Golde, T.E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M.P., Akbari, Y., LaFerla, F.M., 2003. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles. *Neuron* 39, 409–421.
- Palazzi, X., Switzer, R., Gerge, C., 2006. Natural occurrence of amyloid-A $\beta$  deposits in the brain of young common marmosets (*Callithrix jacchus*): a morphological and immunohistochemical evaluation. *Vet. Pathol.* 43, 777–779.
- Papaioannou, N., Tooten, P.C.J., van Ederen, A.M., Bohl, J.R.E., Rofina, J., Tsangaris, T., Gruys, E., 2001. Immunohistochemical investigation of the brain of aged dog. I. Detection of neurofibrillary tangles and of 4-hydroxynonenal protein, an oxidative damage product, in senile plaques. *Amyloid* 8, 11–21.
- Podlisny, M.B., Tolan, D.R., Selkoe, D.J., 1991. Homology of the amyloid beta protein precursor in monkey and human supports a primate model for beta amyloidosis in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 138, 1423–1435.
- Pugliese, M., Mascort, J., Mahy, N., Ferrer, I., 2006. Diffuse beta-amyloid plaques and hyperphosphorylated tau are unrelated processes in aged dogs with behavioral deficits. *Acta Neuropathol.* 112, 175–183.
- Ridley, R.M., Baker, H.F., Windle, C.P., Cummings, R.M., 2006. Very long term studies of the shedding of  $\beta$ -amyloidosis in primates. *J. Neural Transm.* 113, 1243–1251.
- Roertgen, K.E., Parisi, J.E., Clark, H.B., Barnes, D.L., O'Brien, T.D., Johnson, K.H., 1996. A $\beta$ -Associated cerebral angiopathy and senile plaques with neurofibrillary tangles and cerebral hemorrhage in an aged wolverine (*Gulo gulo*). *Neurobiol. Aging* 17, 243–247.
- Roher, A.E., Lowenson, J.D., Clarke, S., Wolkow, C., Wang, R., Cotter, R.J., Reardon, I.M., Zürcher-Neely, H.A., Heinrikson, R.L., Ball, M.J., Greenberg, B.D., 1993. Structural alterations in the peptide backbone of  $\beta$ -amyloid core protein may account for its deposition and stability in Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* 268, 3072–3083.
- Rosen, R.F., Farberg, A.S., Gearing, M., Dooyema, J., Long, P.M., Anderson, D.C., Davis-Turak, J., Coppola, G., Geschwind, D.H., Paré, J.F., Duong, T.Q., Hopkins, W.D., Preuss, T.M., Walker, L.C., 2008. Tauopathy with paired helical filaments in an aged chimpanzee. *J. Comp. Neurol.* 509, 259–270.
- Saïdo, T.C., Iwatsubo, T., Mann, D.M.A., Shimada, H., Ihara, Y., Kawashima, S., 1995. Dominant and differential deposition of distinct  $\beta$ -amyloid peptide species, A $\beta$ <sub>N3(pE)</sub>, in senile plaques. *Neuron* 14, 457–466.
- Saïdo, T.C., Yamao-Harigaya, W., Iwatsubo, T., Kawashima, S., 1996. Amino- and carboxyl-terminal heterogeneity of  $\beta$ -amyloid peptides deposited in human brain. *Neurosci. Lett.* 215, 173–176.
- Sawamura, N., Tamaoka, A., Shoji, S., Koo, E.H., Walker, L.C., Mori, H., 1997. Characterization of amyloid  $\beta$  protein species in cerebral amyloid angiopathy of a squirrel monkey by immunocytochemistry and enzyme-linked immunosorbent assay. *Brain Res.* 764, 225–229.
- Schultz, C., Deghani, F., Hubbard, G.B., Thal, D.R., Struckhoff, G., Braak, E., Braak, H., 2000a. Filamentous tau pathology in nerve cells, astrocytes, and oligodendrocytes of aged baboons. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 59, 39–52.

- Schultz, C., Hubbard, G.B., Rüb, U., Braak, E., Braak, H., 2000b. Age-related progression of tau pathology in brains of baboons. *Neurobiol. Aging* 21, 905–912.
- Schwab, C., DeMaggio, A.J., Ghoshal, N., Binder, L.I., Kuret, J., McGeer, P.L., 2000. Casein kinase 1 delta is associated with pathological accumulation of tau in several neurodegenerative diseases. *Neurobiol. Aging* 21, 503–510.
- Selkoe, D.J., Bell, D.S., Podlisny, M.B., Price, D.L., Cork, L.C., 1987. Conservation of brain amyloid proteins in aged mammals and human with Alzheimer's disease. *Science* 235, 873–877.
- Sheng, J.G., Mrak, R.E., Griffin, W.S.T., 1997. Glial-neuronal interactions in Alzheimer disease: progressive association of IL-1 $\alpha$ <sup>+</sup> microglia and S100 $\beta$ <sup>+</sup> astrocytes with neurofibrillary tangle stages. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 56, 285–290.
- Tekirian, T.L., Saito, T.C., Markesbery, W.R., Russell, M.J., Wekstein, D.R., Patel, E., Geddes, J.W., 1998. N-terminal heterogeneity of parenchymal and cerebrovascular A $\beta$  deposits. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 57, 76–94.
- Uchihara, T., 2007. Silver diagnosis in neuropathology: principles, practice and revised interpretation. *Acta Neuropathol.* 113, 483–499.
- Uno, H., Alsum, P.B., Dong, S., Richardson, R., Zimbric, M.L., Thieme, C.S., Houser, W.D., 1996. Cerebral amyloid angiopathy and plaques, and visceral amyloidosis in aged macaques. *Neurobiol. Aging* 17, 275–281.
- Von Bergen, M., Friedhoff, P., Biernat, J., Heberle, J., Mandelkow, E.M., Mandelkow, E., 2000. Assembly of  $\tau$  protein into Alzheimer paired helical filaments depends on a local sequence motif (<sup>306</sup>VQIVYK<sup>311</sup>) forming beta structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 5129–5134.
- Walker, L.C., Kitt, C.A., Schwam, E., Buckwald, B., Garcia, F., Sepinwall, J., Price, D.L., 1987. Senile plaques in aged squirrel monkeys. *Neurobiol. Aging* 8, 291–296.
- Walker, L.C., Masters, C., Beyreuther, K., Price, D.L., 1990. Amyloid in the brains of aged squirrel monkeys. *Acta Neuropathol.* 80, 381–387.
- Wegiel, J., Wisniewski, H.M., Sołtysiak, Z., 1998. Region- and cell-type-specific pattern of tau phosphorylation in dog brain. *Brain Res.* 802, 259–266.
- Wisniewski, H.M., Ghetti, B., Terry, R.D., 1973. Neuritic (senile) plaques and filamentous changes in aged rhesus monkeys. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 32, 566–584.

## ALSの遺伝子治療

## はじめに

ALSは神経筋疾患の中で根本的治療法が期待される難病中の難病のひとつである。しかし、その原因・分子病態はまだ十分には解明されていないため、有効な治療法の確立には至っていない。このような現状の中、全体の10%未満ではあるものの家族性ALSの原因遺伝子がいくつか判明した。中でもその10~20%を占める superoxide dismutase 1 (SOD1) 遺伝子の変異遺伝子を発現するトランスジェニックマウスを用いた病態解明と治療法開発のアプローチがさかんに行われている。本稿ではALSに対する治療法の中でも遺伝子治療の試みについてわれわれの研究成果を含め概説したい。

## 遺伝子治療

ALSに対する遺伝子治療戦略は大きく2つの手法に分かれて研究が進められている。一つはALSの病因が明確でない中、運動ニューロンの保護・救済を目的に神経栄養因子・抗アポトーシス分子などの遺伝子を導入する方法、もう一つは家族性ALSに対しその原因となる変異遺伝子の発現をRNA干渉(RNAi)を用いて遺伝子レベルで抑制する方法である。

## 1. 神経保護を目的とした遺伝子治療

運動ニューロンの保護作用を有する神経栄養因子を治療薬として用いる試みは動物実験レベルから臨床試験まで精力的に行われてきた。しかし、それら栄養因子をリコンビナント蛋白としてALS患者に投与した試験では確固とした治療効果が認められたとはいえない。遺伝子治療はこれらの遺伝子をウイルスベクターを用いて障害されている運動ニューロンに導入しようというものであり、目的とする

久保寺 隆行 横田 隆徳 水澤 英洋

運動ニューロンに効率よく導入できれば栄養因子のもつ効果もより発揮できることが期待される。治療遺伝子を導入するには血液脳関門を通過する必要がある。その方法には主に、① 筋肉内にウイルスベクターを注入し逆行性軸索輸送によって運動ニューロンに導入する方法、② 運動ニューロンの存在する脊髄内に直接ウイルスベクターを注入する方法、の2つがある(図1)。ここで①の逆行性軸索輸送を用いる方法では運動ニューロンのみには遺伝子導入できない。最近の変異SOD1のモデルマウスの知見では、運動ニューロン以外のグリア細胞に発現した変異SOD1がALSの病態形成に重要な役割を果たしている(non-cell autonomous)ことが指摘されている<sup>1)</sup>。したがって導入する遺伝子がグリア細胞にも寄与するかなどの導入遺伝子の特徴に応じて①、②は使い分ける必要がある。

これまでの動物実験では、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、アデノ随伴ウイルス、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクターによって glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), vascular endothelial growth

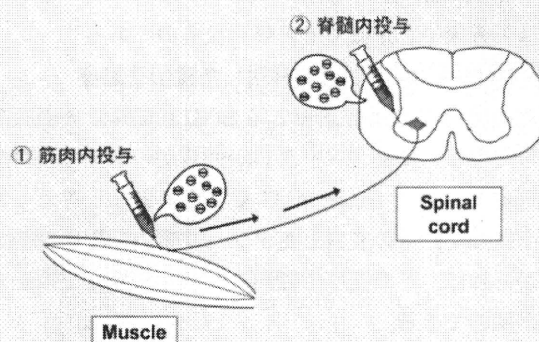


図1 運動ニューロンへの遺伝子導入法

治療遺伝子を組み込んだウイルスベクターを、① 筋肉内に注入し逆行性軸索輸送を利用して運動ニューロンへ導入する、または、② 脊髄内に直接注入して運動ニューロンへ導入する。

くぼら たかゆき 東京医科歯科大学大学院/医歯学総合研究科  
脳神経病態学

よこた たかのり 同 准教授

みずさわ ひでひろ 同 教授

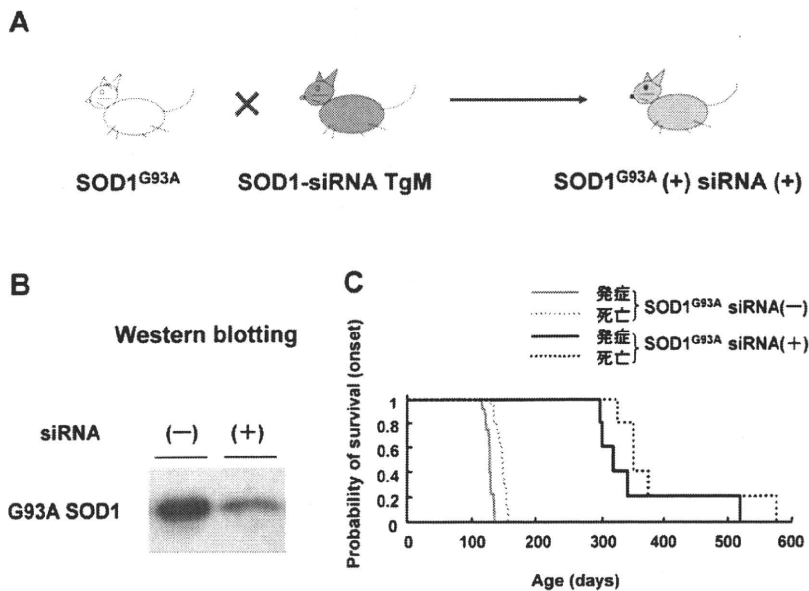


図2 siRNAを用いたALSモデルマウスの遺伝子治療 (Saitoら<sup>7)</sup>, Yokotaら<sup>8)</sup>より改変)

SOD 1に対する siRNA を過剰発現させたトランスジェニックマウスを、ALS のモデルマウスである G 93 A SOD 1 トランスジェニックマウスと掛け合わせることににより (A), 変異 SOD 1 の発現を著明に抑制することに成功した (B). その結果, ALS の発症時期を約 230 日遅延させ, さらに発症後の生存期間も約 18 日延長させることができた (C).

factor (VEGF), insulin-like growth factor (IGF) などの神経栄養因子の遺伝子が筋肉内または脊髄内投与され有効性が報告されている<sup>2~4)</sup>. 栄養因子以外では, 抗アポトーシス分子である Bcl-2 ファミリー, 抗アポトーシス阻害蛋白 (IAP) などの遺伝子を導入する試みもなされているがその効果は栄養因子と比較すると軽微なものである<sup>5)</sup>.

## 2. RNA 干渉 (RNAi) を利用した遺伝子治療

常染色体優性遺伝形式をとる SOD 1 変異では変異アレルから発現した変異タンパク質が何らかの毒性を獲得すること (gain of toxic function) により発症すると考えられている. 従って, その変異したタンパク質の発現を抑制する方法があれば, その機序の如何に関わらず発症を阻止することが期待できる.

RNAi は 2 本鎖 RNA によって配列特異的に mRNA が分解され, その結果遺伝子の発現が抑制される現象である. その標的遺伝子の発現抑制効果はこれまでのアンチセンスやリボザイムよりも高いとされ, さらにその配列特異性も高いことから医療分野における応用が発見当初から大きく

期待されている. 細胞内に導入された 2 本鎖 RNA は細胞質内で Dicer と呼ばれる RNase III ファミリーに属する酵素によって 3' 側が 2 塩基突出した長さ 21~23 塩基に短い 2 本鎖の small interfering RNA (siRNA) に分解される. その後 siRNA は 1 本鎖化され, 1 本鎖となった siRNA は他の因子を伴うことで RISC (RNA-induced silencing complex) を形成する. RISC は取り込まれた siRNA をガイド分子として相補的な配列をもつ標的 RNA を認識し切断する<sup>6)</sup>.

この RNAi によって変異 SOD 1 の発現を抑制するためには RNAi を目的の組織に誘導する必要がある. しかし, ここには siRNA の神経系へのデリバリーという大きなハードルがある. そこで, まずわれわれは SOD 1 に対する siRNA を過剰発現させたトランスジェニックマウスを作製し, これを ALS のモデルマウスである G 93 A SOD 1 トランスジェ

ニックマウスと掛け合わせることによって, デリバリーの問題を回避しつつ全身の変異 SOD 1 タンパク質の発現を抑制して ALS の発症を阻止できるかを検証した. まず, SOD 1 に対する siRNA を発現する DNA ベクターを ES 細胞に導入して内因性の SOD 1 が抑制された ES クローンを選択し, これを胚盤胞にマイクロインジェクションして siRNA トランスジェニックマウスを作製した. このマウスと G 93 A SOD 1 トランスジェニックマウスとを掛け合わせ, 脊髄における変異 SOD 1 タンパク質の発現を 80% 以上抑制することに成功した. この効果により, ALS の発症時期は大幅に抑制され, さらに発症後の生存期間も延長した (図 2)<sup>7,8)</sup>.

同様に SOD 1 に対する siRNA 発現レンチウイルス・アデノ随伴ウイルスベクターを骨格筋に注入もしくは直接脊髄内に注入して G 93 A SOD 1 トランスジェニックマウスの発症時期を遅延させたとの報告がなされた<sup>9~11)</sup>. しかし発症後の生存期間に関しては延長効果は認められていない. これは, 先程述べた運動ニューロンに発現する変異



SOD 1 は ALS の発症に、グリアに発現する変異 SOD 1 は ALS の進行に関与しているという non-cell autonomous に関する知見<sup>1)</sup>を反映した結果ともとれる。骨格筋にベクターを投与した場合は運動ニューロン特異的に変異 SOD 1 を抑制することで ALS の発症時期を遅延させることはできたが、非神経細胞の変異 SOD 1 の発現には変化を与えなかったために疾患の進行は抑制できなかったと考えられる。

一方、われわれの掛け合わせ実験では運動ニューロンおよびグリア細胞を含む中枢神経系の全ての細胞で siRNA を発現し変異 SOD 1 を抑制する結果、発症時期のみならず発症後の病勢の進行も抑制できることを示した。した

がって、たとえ発症後であっても siRNA によって変異遺伝子の発現を抑制することができれば疾患の進行を少しでも遅らせる効果が期待できるものと考えられる。

## むすび

ALS に対する遺伝子治療の試みに関して、運動ニューロン保護を目的とした治療法と変異遺伝子の発現を siRNA により抑制する治療法を紹介した。これらの遺伝子治療法はまだ動物実験の段階であり克服すべき課題も多いが、これを足掛かりに ALS 治療の研究開発が進展することを期待したい。

## 文 献

- 1) Boillée S, Yamanaka K, Lobsiger CS, et al. Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science*. 2006 ; 312 : 1389-92.
- 2) Kaspar BK, Llado J, Sherkat N, et al. Retrograde viral delivery of IGF-1 prolongs survival in a mouse ALS model. *Science*. 2003 ; 301 : 839-42.
- 3) Arrouz M, Ralph GS, Strokebaum E, et al. VEGF delivery with retrogradely transported lentivector prolongs survival in a mouse ALS model. *Nature*. 2004 ; 429 : 413-7.
- 4) Ascadi G, Anguelov RA, Yang H, et al. Increased survival and function of SOD 1 mice after glial cell-derived neurotrophic factor gene therapy. *Hum Gene Ther*. 2002 ; 13 : 1047-59.
- 5) Arrouz M, Hottinger A, Paterna JG, et al. Increased motoneuron survival and improved neuromuscular function in transgenic ALS mice after intraspinal injection of an adeno-associated virus encoding Bcl-2. *Hum Mol Genet*. 2000 ; 9 : 803-11.
- 6) Bumcrot D, Manoharan M, Koteliansky V, et al. RNAi therapeutics : a potential new class of pharmaceutical drugs. *Nat Chem Biol*. 2006 ; 12 : 711-9.
- 7) Saito Y, Yokota T, Mitani T, et al. Transgenic small interfering RNA halts amyotrophic lateral sclerosis in a mouse model. *J Biol Chem*. 2005 ; 280 : 42826-30.
- 8) Yokota T, Sasaguri H, Saito Y, et al. Increased of disease duration of amyotrophic lateral sclerosis in a mouse model by transgenic small interfering RNA. *Arch Neurol*. 2007 ; 64 : 145-6.
- 9) Ralph GS, Radcliffe PA, Day DM, et al. Silencing mutant SOD 1 using RNAi protects against neurodegeneration and extends survival in an ALS model. *Nat Med*. 2005 ; 11 : 429-33.
- 10) Miller TM, Kasper BK, Kops GJ, et al. Virus-delivered small RNA silencing sustains strength in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*. 2005 ; 57 : 773-6.
- 11) Raoul C, Abbas-Terki T, Bensadoun JC, et al. Lentiviral-mediated silencing of SOD 1 through RNA interference retards disease onset and progression in a mouse model of ALS. *Nat Med*. 2005 ; 11 : 423-8.

## 学術・技術ピックス

## アンチセンス研究入門 39

ウイルスベクターを用いた shRNA による  
遺伝子治療の現状と問題点

久保寺隆行, 横田隆徳

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 脳神経病態学  
(2008年10月20日 受理)

## 1. はじめに

RNA interference (RNAi)は2本鎖 RNA (double-stranded RNA: dsRNA)によって配列特異的に mRNA が分解され, その結果遺伝子の発現が抑制される現象である。その標的遺伝子の発現抑制効果は類似の機能核酸であるアンチセンスやリボザイムよりも高いとされ, さらにその配列特異性も高いことから医療分野における応用が発見当初から大きく期待され, 現在世界中で激しい医薬品開発の競争が展開されている。

RNAi を生体内に誘導するには化学合成 siRNA (small interfering RNA)を直接細胞内に導入するか, または, 発現ベクターを用いて細胞内で siRNA を産生させる方法がある。本稿では, 細胞内で siRNA を発現させる siRNA 発現ベクターとして最も多く用いられる発現ユニットである short-hairpin RNA (shRNA)を, ウイルスベクターを用いて生体へ導入する遺伝子治療の現状と問題点について概説したい。

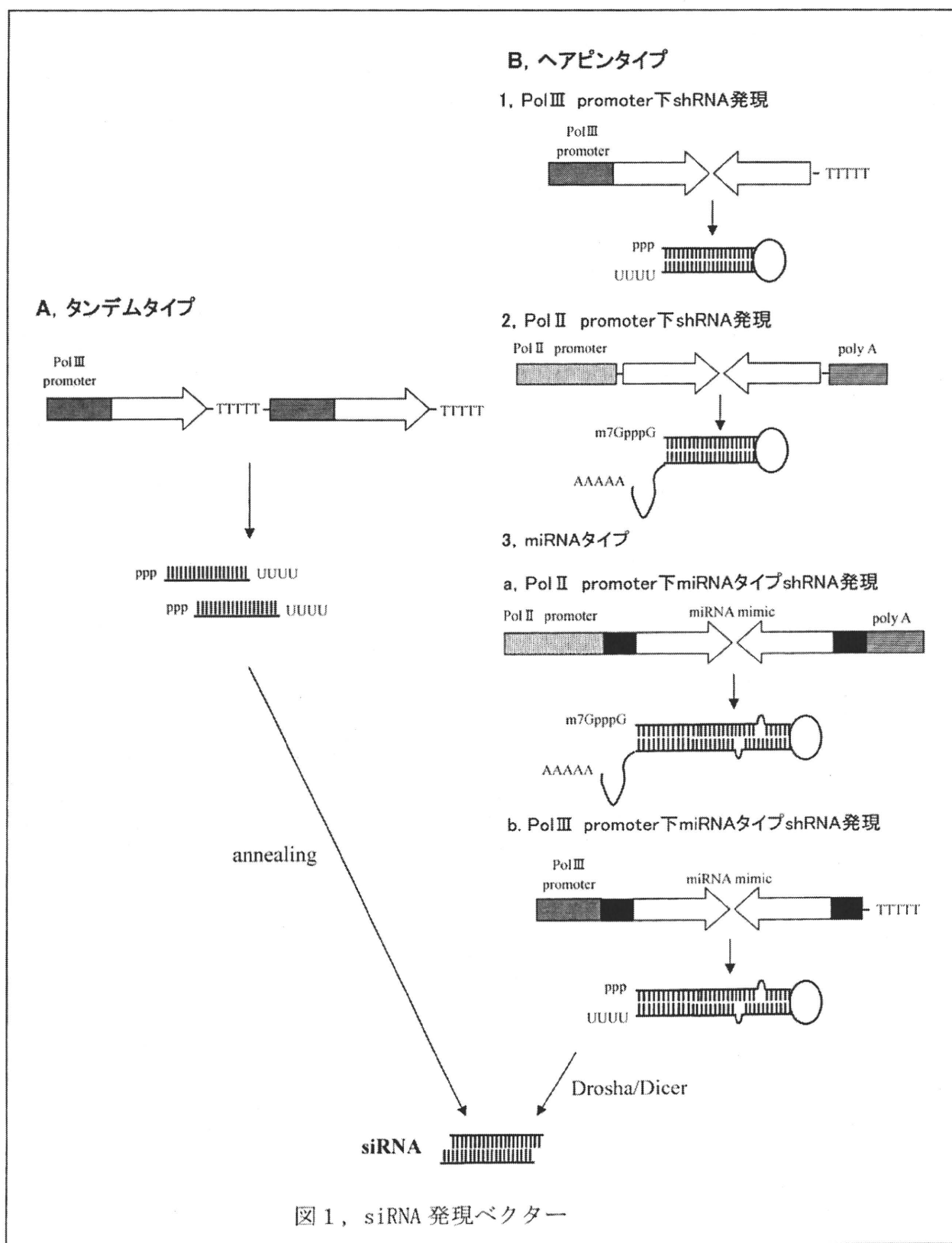
## 2. siRNA 発現ベクター

siRNA を細胞内で発現させるには siRNA 発現 DNA ベクターの作製が必要である。その発現システムは2002年に相次いで報告され<sup>1-4)</sup>主にタンデムタイプとヘアピンタイプの2つに大別される。タンデムタイプは2つの RNA polymerase III (pol III)系プロモーターからパッセンジャー鎖とガイド鎖に相当する RNA が別々に転写され, 細胞内でアニールして siRNA を産生する。一方, ヘアピンタイプは miRNA のプロセス機構をヒントに考えられた siRNA 発現法で, パッセンジャー鎖とガイド鎖がループを介してつながる shRNA が転写され, pre-miRNA と同じように細胞質で Dicer によってプロセッシングされて siRNA が切り出される (図1)。その有効性は, プラスミドの細胞内濃度が低濃度の場合ヘアピンタイプがタンデムタイプを上回っているとされ<sup>5)</sup>, ヘアピンタイプが現在最も多く使用されている。

ヘアピンタイプでは, shRNA を転写させるのに U6 RNA や H1 RNA などの短い

RNA を転写する pol III 系プロモーターが多く用いられている。ここで、pol III 系プロモーター下に 50–100 塩基の長いミスマッチ shRNA を転写させ、細胞内で Dicer によって複数の siRNA を発現させることで、ターゲットの変異に耐性を持たせる方法も考案されている<sup>6,7)</sup>。

一般に pol III 系プロモーターは、その転写量は pol II 系プロモーターよりも多く、また転写開始点が明確であり、転写の終結が 4 つ以上の T で決定されるといった特徴がある。しかしながら、pol III 系プロモーターはほとんどの細胞で活性化状態になっているため、標的遺伝子を組織特異的に抑制することが困難であり、また詳細は後述するが shRNA 転写量が多いために shRNA 毒性の副作用を生じる恐れがある。そこで、最近、pol II 系プロモーターを利用した shRNA 発現ベクターのシステムが報告されるようになってきた。実際に、比較できるようにエンジニアした Pol II 系が pol III 系プロモーターより shRNA の発現量が少ないことは示されている<sup>8)</sup>。pol II 系プロモーターを用いる場合にはプロモーターの下流に minipoly A などを用いるなどの工夫をして shRNA 配列を挿入する方法<sup>9-12)</sup>以外に、miRNA の多くが pol II 系プロモーターによって転写されることから pol II 系プロモーター下に配置した pri-miRNA の miRNA 配列を siRNA 配列に置き換えた miRNA タイプのベクターを構築する方法も考案されている<sup>13,14)</sup>。また、miRNA 発現タイプの shRNA を Cre-loxP システムに搭載して、かつ複数の shRNA を誘導的 (inducible) に発現させたトランスジェニックマウスの報告もされた<sup>15)</sup>。miRNA タイプのベクターは pol III 系プロモーター下で発現させることも可能で<sup>16,17)</sup>、内在性の miRNA と同じ機構でプロセッシングを受けることから細胞にとってはより生理的な状況下で siRNA を発現できると考えられ有効な RNAi 効果が期待できる。なお、ウイルスベクターを用いた shRNA の発現コンストラクトの詳細については Davidson らの総説<sup>18)</sup>もあるので照会されたい。



### 3. *in vivo*での shRNA 発現法

上記に挙げた shRNA 発現ベクターを *in vivo*に導入し、細胞内で shRNA を発現させるためには適当なデリバリー法を利用する必要があり、これまでマウスを中心とした齧歯類に対するアプローチがなされている。最初に *in vivo*に対する shRNA の導入に成功したのは、高用量の溶液に溶解した shRNA 発現プラスミドを高圧で短時間に経静脈的に注入するハイドロダイナミクス法でマウス肝臓に shRNA を導入した例である<sup>19)</sup>。しかし、この方法は主に肝臓、腎臓、肺などの血流の豊富な臓器に遺伝子を導入する方法であるため、それ以外の臓器に shRNA を導入することができない。その点ウイルスベクターは、全身投与もしくは局所投与のいずれのアプローチも可能であり、shRNA の *in vivo*への導入の成功例も報告されるようになってきた。現在、shRNA のデリバリー法として主に用いられているウイルスベクターはアデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクターの4種類があり、それぞれの特徴を理解し、目的に応じて使い分ける必要がある。以下にその4種類のウイルスベクターについて、遺伝子治療用ベクターとしての特徴、及び shRNA 導入ベクターとしての適応を示す。

#### a. アデノウイルスベクター

分裂細胞に加え神経細胞、肝細胞などの非分裂細胞への遺伝子導入も可能であり、感染する細胞の範囲が広く、発現効率も高い。しかし、導入遺伝子の宿主ゲノムへの挿入は起こらず染色体外にエピゾームとして存在するため、分裂・増殖する細胞では導入遺伝子の発現は細胞分裂ごとに弱くなる。また、*in vivo*投与を行った場合には、宿主側のアデノウイルスに対する免疫反応を生じやすいことが指摘されている<sup>20)</sup>。

遺伝子治療用の shRNA 発現ベクターとして対象となる疾患としては、悪性腫瘍が大きなターゲットとなる。そのストラテジーとして、腫瘍細胞のみで増殖可能な変異アデノウイルスをバックボーンとした制限増殖型アデノウイルスベクターを利用することで、腫瘍細胞内で選択的にベクター複製により導入した shRNA のコピー数が増加するのに加え、細胞内増殖したウイルスそのものが腫瘍溶解性を発揮する効果が期待できる。最近、VEGF に対する shRNA 発現制限増殖型アデノウイルスベクターを用いて、血管新生の抑制に加え腫瘍溶解性が発揮されることでより高い抗腫瘍効果が得られたと報告されている<sup>21)</sup>。

#### b. アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター

AAV ベクターは非病原性で安全性が高く、分裂細胞・非分裂細胞へ効率よく遺伝子導入することが可能である。導入遺伝子の宿主ゲノムへの挿入は起こらないが、アデノウイルスベクターと比較して、より安定した長期間の遺伝子導入が可能である。ここ数年、AAV ベクターの血清型と組織特異性の関係につい

ての理解が進展しており、標的組織の種類に応じて種々の血清型の AAV ベクターを使い分けることが可能である。

shRNA 発現 AAV ベクターとしては、AAV の標的細胞に遺伝子発現の持続期間が長期に及ぶ神経細胞・肝細胞などの非分裂細胞が適していることから、中枢神経・肝臓を主な対象にアプローチがなされている。神経変性疾患であるポリグルタミン病の一つ脊髄小脳萎縮症 1 型(SCA1)は、伸長したポリグルタミン鎖をもつ変異 ataxin-1 タンパク質が何らかの“gain-of-toxic function”を有するために発症すると考えられている。この変異 ataxin-1 の発現を抑制する shRNA 発現 AAV1 型ベクターをモデルマウス小脳に投与することで失調症状が改善したと報告された<sup>22)</sup>。また、最近単離された新規血清型である AAV8 型は肝臓に対する親和性が高く、B 型肝炎ウイルス(HBV)に対する shRNA 発現 AAV8 型ベクターの 1 回の静脈内投与で血中の HBV を長期間抑制することができたとする報告もある<sup>23)</sup>。

#### c, レトロウイルスベクター, レンチウイルスベクター

逆転写された導入遺伝子が宿主ゲノムへ挿入されるので遺伝子を安定に長期間発現させることが可能である。レトロウイルスベクターは非分裂細胞への遺伝子導入ができないが、レトロウイルスの一種で HIV(human immunodeficiency virus)を元に改変を施されたレンチウイルスベクターは非分裂細胞へも高効率に遺伝子を導入でき、特に VSV-G(vesicular stomatitis virus)のエンベロープタンパク質で pseudotype されたレンチウイルスベクターは造血幹細胞や ES 細胞など従来遺伝子を導入することが極めて難しかった細胞に遺伝子導入することが可能である。shRNA による発現ベクターとしてもレンチウイルスベクターを用いた報告が多く、感染症、特に HIV 感染において、リンパ球側に内在するウイルス受容体である CCR5、または HIV のアクセサリタンパク質である Rev をターゲットとして、造血幹細胞へ CCR5、Rev に対する shRNA を導入した成功例があり<sup>24, 25)</sup>、他に神経細胞への親和性が高いことからアルツハイマー病などの中枢神経疾患を対象とした報告もなされている<sup>26)</sup>。ただし、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクターでは細胞に導入される遺伝子のコピー数が少ないため、良好な RNAi 効果を発揮するためには抑制効率の優れた shRNA 配列をデザインする必要がある。

表, 各種ウイルスベクターの特徴

	アデノウイルスベクター	アデノ随伴ウイルスベクター	レンチウイルスベクター	レトロウイルスベクター
組み込み可能サイズ	—35kb	4.5kb	7—7.5kb	7—7.5kb
染色体への組み込み	なし	あり	あり	あり
非分裂細胞への遺伝子導入	可能	可能	可能	不可能
発現の持続性	短い	長い	長い	短い
安全性での問題	免疫原性	少ない	遺伝子挿入による遺伝子変異	遺伝子挿入による遺伝子変異

#### 4. 問題点

shRNA 発現ウイルスベクターの *in vivo* への投与にあたり主に3つの段階での副作用が予想される。第1は shRNA のデリバリーに用いるウイルスベクター自体の免疫原性の問題であり、第2は発現させた shRNA 自身による副作用で、これにはインターフェロン誘導と過剰な shRNA による細胞毒性の問題がある。第3は shRNA による標的遺伝子以外の遺伝子の発現抑制、つまり off-target 効果の問題である。ここでは shRNA 固有の問題点であるインターフェロン誘導と shRNA 毒性に関して紹介する。

##### a, インターフェロン誘導

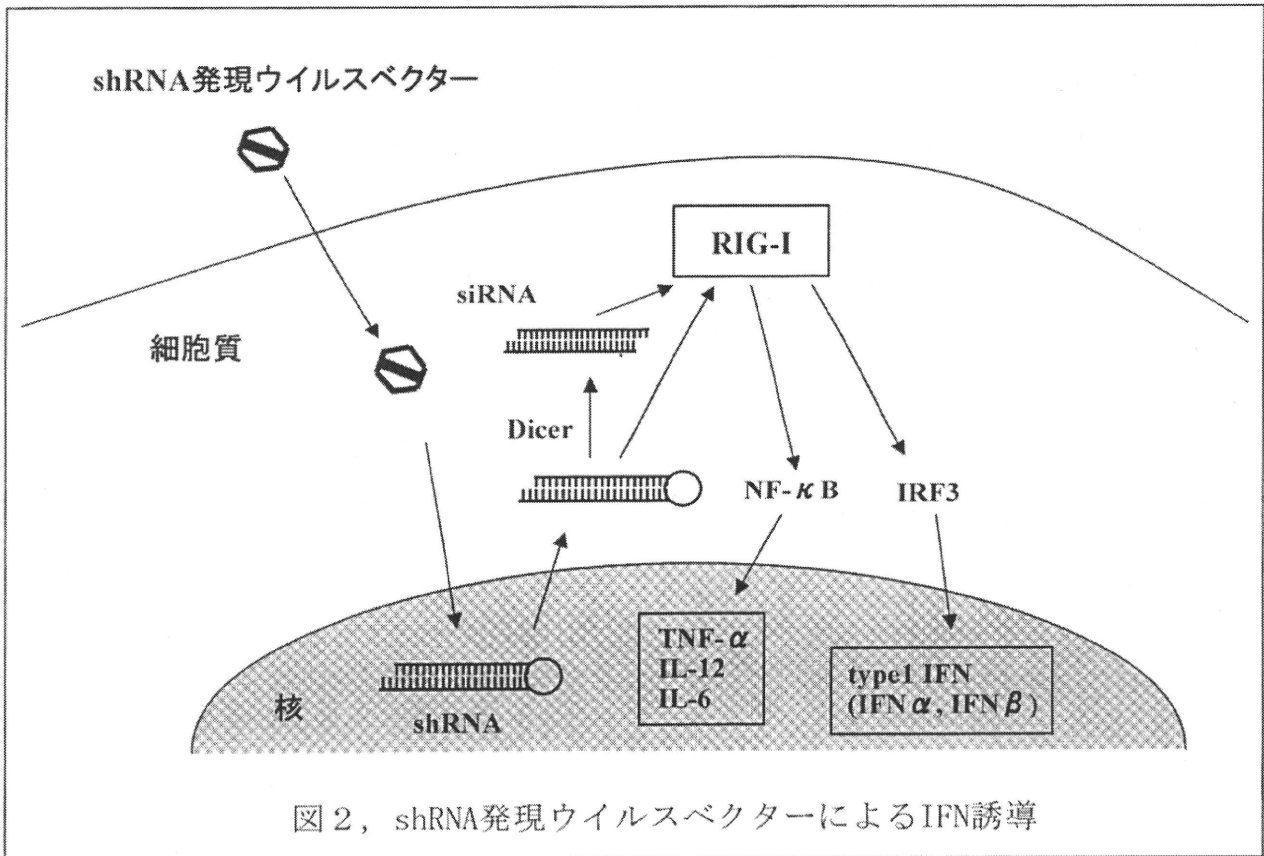
哺乳動物系では、30塩基を超える長さの2本鎖RNAの細胞内への導入はインターフェロン(IFN)応答遺伝子であるPKR(dsRNA-dependent protein kinase)やOAS(2' 5' -oligosynthetase)を活性化する結果、非特異的な翻訳抑制やRNAの分解を引き起こし、細胞障害をもたらしてしまうためRNAiの利用の大きな妨げとなっていた。しかし2001年にブレークスルーがあり、RNAi機構の中間産物である21塩基長の短いRNA(siRNA)を直接用いることでこれらのIFN応答を回避し、RNAi効果の特異的に得ることが可能となった<sup>27)</sup>、と従来考えられてきた。

ところが、そのような短い2本鎖RNAでも *in vitro*、さらに *in vivo* においてもIFN応答を誘導することが相次いで報告された<sup>28,29)</sup>。shRNA発現ベクターの場合には、培養細胞へのshRNAのDNA発現ベクター、レンチウイルスベクターを用いた導入系においてIFN応答を誘導し得るという報告<sup>30)</sup>がある一方、shRNA発現レンチウイルスベクターをCD34+の免疫細胞に導入した際にはIFN応答が

起こらなかったことが報告されており<sup>31)</sup>、見解には相違がある。細胞が短い2本鎖RNAを感知し免疫応答を誘導する機構には2種類知られており、1つはエンドソーム内のToll-like receptor (TLR)を介する経路<sup>32)</sup>、もう1つは細胞質内のretinoic acid inducible gene I (RIG-I)を介する経路<sup>33)</sup>により認識されIFN応答が誘導される。shRNA発現ベクターを用いた場合には、エンドソームを経由しないでshRNAが細胞内に発現してsiRNAが生成されると予想されることからTLRの活性化が回避できると考えられる。ベクターを利用したshRNA発現系でのIFN応答は、細胞内に発現したshRNAもしくはshRNAから生成されるsiRNAが細胞質内のRIG-Iにより認識されて誘導されるものと推察される(図2)。

RIG-Iは、細胞質内でのウイルスの侵入を察知する分子として近年発見され、ウイルス感染後、ウイルスの複製過程でできる2本鎖RNAを認識しIFNを誘導する<sup>33)</sup>。また、最近では、5'末端の三リン酸化されたRNAがRIG-Iのリガンドになることが報告された<sup>34)</sup>。pol III系プロモーターにより転写されたshRNAの5'末端は三リン酸化されておりRIG-Iを活性化し、IFNを誘導する恐れがある。そこで、IFN応答を回避する方法としてpol II系プロモーターを用いてshRNAを発現させれば、その転写物は5'末端にキャップ構造を持つためRIG-Iの活性化を防げる可能性が期待できる。



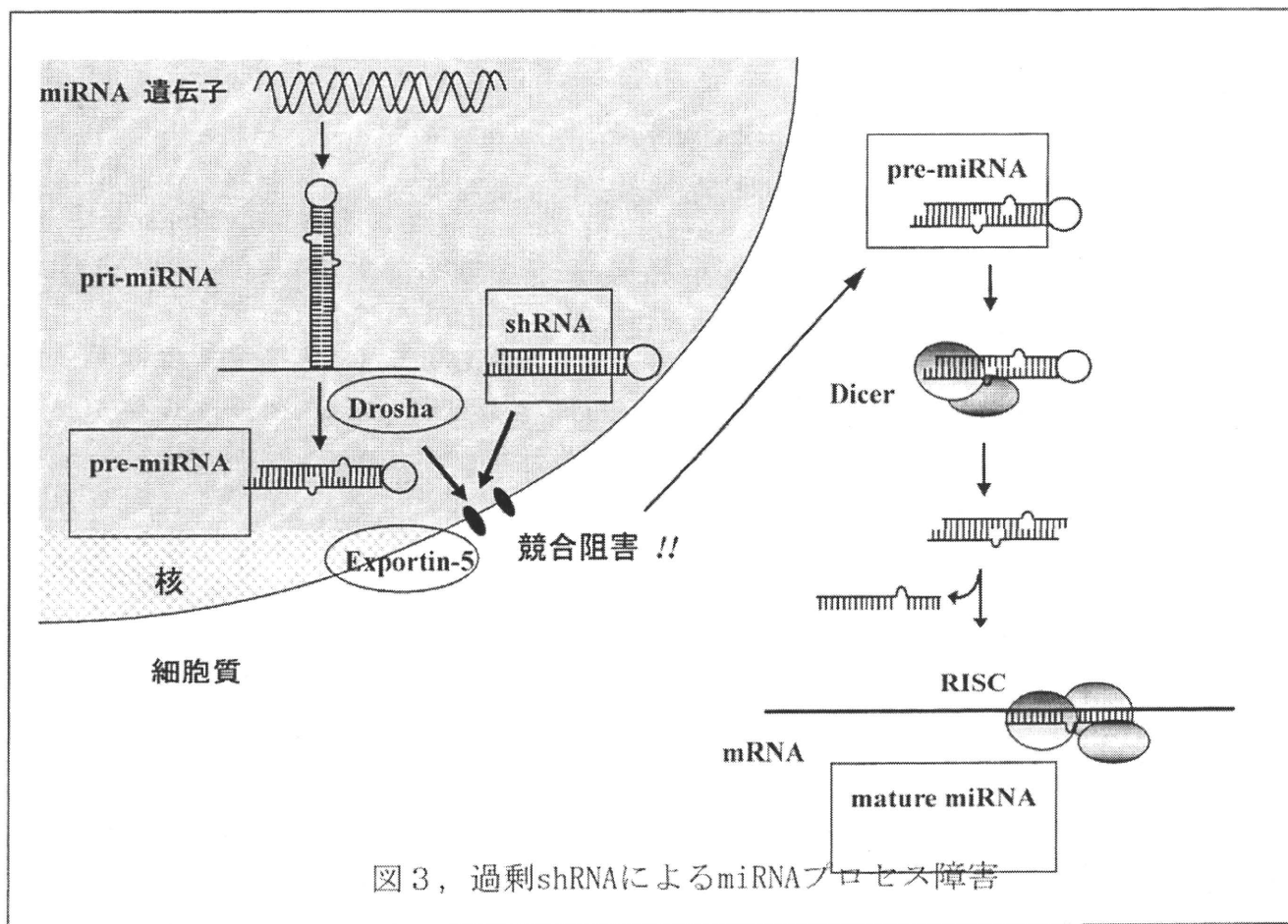


### b, shRNA 毒性

shRNA 発現 AAV ベクターを経静脈的にマウスに全身性投与する実験系において致命的な肝障害が認められたという報告が 2006 年になされた<sup>35)</sup>。この肝障害には配列依存性はなく、導入した shRNA の発現量との間に相関が認められ、障害を受けた肝臓では複数の miRNA の発現が低下していた。また、最近 shRNA 発現 AAV ベクターをマウス脳実質内に局所注入した場合でも細胞障害を生じることが報告された<sup>17)</sup>。

ほ乳動物において、miRNA の前駆体(pre-miRNA)と shRNA は exportin-5 という共通の担体を通じて核から細胞質へ移行するため、核内に過剰に発現した shRNA が exportin-5 による pre-miRNA の細胞質への移行を競合的に阻害する結果 miRNA へのプロセスが障害され、肝毒性に関与したことが示唆された<sup>35)</sup> (図 3)。我々も shRNA 発現 AAV8 型ベクターのマウスへの全身性投与により過剰な shRNA を発現した場合には、血中で肝逸脱酵素が著明に上昇し、組織学的に肝細胞の腫大化・巣状壊死が認められるなど重篤な肝障害が生じることを確認している。また、shRNA 発現 AAV2 型ベクターのマウス脳実質内への局所投与で注入部位の神経細胞脱落とミクログリアの活性化などの神経毒性が認められた<sup>17)</sup>。

shRNA 毒性の機序の詳細は明らかでないが、過剰な shRNA の発現は細胞毒性を誘導する可能性があるため、あえて shRNA 発現効率の悪い Pol II 系プロモーターや miRNA タイプの shRNA 発現ベクターを用い、抑制効率の優れた shRNA をデザインして有効な RNAi 効果を発揮することで、shRNA 毒性を回避できる可能性が最近示された<sup>12, 17)</sup>。



#### 4. おわりに

shRNA 発現ベクターにはプロモーター、shRNA 発現方式などの組み合わせに幾通りかの選択肢がある。shRNA 発現ベクターの *in vivo* でのアプローチにおいて本稿で挙げたいくつかの問題点はあるが、適切な発現様式を選択することで、それら問題点を回解決する方法も提案されてきており、今後 shRNA 発現ウイルスベクターの遺伝子治療への応用を目指した研究が進展していくことが非常に期待される。

## 文献

- 1) Brummelkamp, T.R., Belnards, R., Agami, R. *Science.*, 296, 550-553 (2002)
- 2) Miyagishi, M., Taira, K. *Nat. Biotech.*, 20, 497-500 (2002)
- 3) Lee, N.S., Dohjima, T., Bauer, G., Li, H., Li, M.J., Ehsani, A., Salvaterra, P., Rossi, J.J. *Nat. Biotech.*, 20, 500-505 (2002)
- 4) Paul, C.P., Good, P.D., Winer, I., Engelke, D.R. *Nat. Biotech.*, 20, 505-508 (2002)
- 5) Miyagishi, M., Sumitomo, H., Miyoshi, H., Kawakami, Y., Taira, K. *J. Gene Med.*, 6, 715-723 (2004)
- 6) Akashi, H., Miyagishi, M., Yokota, T., Watanabe, T., Hino, T., Nishina, K., Kohara, M., Taira, K. *Mol. Biosyst.*, 1, 382-390 (2005)
- 7) Watanabe, T., Sudoh, M., Miyagishi, M., Akashi, H., Arai, M., Inoue, K., Taira, K., Yoshiba, M., Kohara, M. *Gene Ther.*, 13, 883-892 (2006)
- 8) Boudreau, R.L., Monteys, A.M., Davidson, B.L. *RNA*, 14, 1834-1844 (2008)
- 9) Xia, H., Mao, Q., Paulson, H.L., Davidson, B.L. *Nat. Biotech.*, 20, 1006-1010 (2002)
- 10) Denti, M.A., Rosa, A., Standier, O., De Angelis, F.G., Bozzoni, I. *Mol. Ther.* 10, 191-199 (2004)
- 11) Unwalla, H.J., Li, H.T., Bahner, I., Li, M.J., Kohn, D., Rossi, J.J. *J. Virol.*, 80, 1863-1873 (2006)
- 12) Giering, J.C., Grimm, D., Storm, T.A., Kay, M.A. *Mol. Ther.*, 16, 1630-1636 (2008)
- 13) Zeng, Y., Wagner E.J., Cullen, B.R. *Mol. Cell.*, 9, 1327-1333 (2002)
- 14) Ely, A., Naidoo, T., Mufamadi, S., Crowther, C., Arbuthnot, P. *Mol. Ther.*, 16, 1105-1112 (2008)
- 15) Stern, P., Astrof, S., Erkeland, S.J., Schustak, J., Sharp, P.A., Hynes, R.O. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 105, 13895-13900 (2008)
- 16) Chang, K., Eledge, S.J., Hannon, G.J. *Nat. Methods.*, 3, 707-714 (2006)
- 17) McBride, J., Boudreau, R.L., Harper, S.Q., Staber, P.D., Monteys, A.M., Martins, I., Gilmore, B.L., Burstein, H., Peluso, R.W., Polisky, B., Carter, B.J., Davidson, B.L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 105, 5868-5873 (2008)
- 18) Davidson, B.L., Harper, S.Q. *Methods Mol. Biol.*, 309, 219-235 (2005)
- 19) Mccaffrey, A.P., Meuse, L., Pham, T.T., Conklin, D.S., Hannon, G.J.,

- Kay, M.A. *Nature.*, 418, 38-39 (2002)
- 20) Raper, S.E., Chirmule, N., Lee, F.S., Wivel, N.A., Bagg, A., Gao, G.P., Wilson, J.M., Batshaw, M.L. *Mol. Genet. Metab.*, 80, 148-158 (2003)
- 21) Yoo, J.Y., Kim, J.H., Kwon, Y.G., Kim, E.C., Kim, N.K., Choi, H.J., Yun, C.O. *Mol. Ther.*, 15, 295-302 (2007)
- 22) Xia, H., Mao, Q., Eliason, S.L., Martins, I.H., Orr, H.T., Paulson, H.L., Yang, L., Kotin, R.M., Davidson, B.L. *Nat. Med.*, 10, 816-820 (2004)
- 23) Chen, C.C., Ko, T.M., Ma, H.I., Wu, H.L., Xiao, X., Li, J., Chang, C.M., Wu, P.Y., Chen, C.H., Han, J.M., Yu, C.P., Jeng, K.S., Hu, C.P., Tao, M.H. *Gene Ther.*, 14, 11-19 (2007)
- 24) Qin, X-F., An, D.S., Chen, I.S.Y., Baltimore, D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 100, 183-188 (2003)
- 25) Banerjea, A., Li, M.J., Bauer, G., Remling, L., Lee, N.S., Rossi, J., Akkina, R. *Mol. Ther.*, 8, 62-71 (2003)
- 26) Singer, O., Marr, R.A., Rockenstein, E., Crews, L., Coufal, N.G., Gage, F.H., Verma, I.M., Masliah, E. *Nat. Neurosci.*, 8, 1343-1349 (2005)
- 27) Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., Tuschel, T. *Nature.*, 411, 494-498 (2001)
- 28) Hornung, V., Guenther-Biller, M., Bourquin, G., Ablasser, A., Schlee, M., Uematsu, S., Noronha, A., Manoharan, M., Akira, S., Fougerolles, A., Endres, S., Hartmann, G. *Nat. Med.*, 11, 263-270 (2005)
- 29) Judge, A., Sood, V., Shaw, J.R., Fang, D., McClintock, K., MacLaclan, I. *Nat. Biotech.*, 23, 457-462 (2005)
- 30) Bridge, A.J., Pebernard, A., Ducraux, A., Nicoulaz, A.L., Iggo, R. *Nat. Genet.*, 34, 263-264 (2003)
- 31) Robbins, M.A., Li, M., Leung, I., Li, H., Boyer, D.V., Song, Y., Behlke, M.A., Rossi, J.J. *Nat. Biotech.*, 24, 566-571 (2006)
- 32) Akira, S., Takeda, K. *Nat. Rev. Immunol.*, 4, 499-511 (2004)
- 33) Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S., Fujita, T. *Nat. Immunol.*, 5, 730-737 (2004)
- 34) Hornung, V., Ellegast, J., Kim, S., Brzozka, K., Jung, A., Kato, H., Poeck, H., Akira, S., Conzelmann, K.K., Schlee, M., Endres, S., Hartmann, G. *Science.*, 314, 994-997 (2006)
- 35) Grimm, D., Streetz, K.L., Jupling, C.L., Storm, T.A., Pendey, K., Davis, C.R., Marion, P., Salazar, F., Kay, M.A. *Nature.* 25, 537-541 (2006)