

厚生労働科学研究費補助金

認知症対策総合研究事業

『認知症治療を目的とした変異型オリゴマーアミロイドペプチドを抗原とする神経免疫療法の開発』に関する研究

平成21年度～23年度 総合研究報告書

研究代表者 森 啓  
大阪市立大学・大学院医学研究科・教授

平成24（2012）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

『認知症治療を目的とした変異型オリゴマーアミロイドペプチドを抗原とする神経免疫療法の開発』に関する研究

平成21年度～23年度 総合研究報告書

研究代表者 森 啓  
大阪市立大学・大学院医学研究科・教授

平成24（2012）年 3月

# 目 次

I. 総合研究報告 認知症治療を目的とした変異型オリゴマーアミロイド ペプチドを抗原とする神経免疫療法の開発に関する研究 研究代表者 森 啓	-----	1
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	10
III. 研究成果の刊行物・別刷	-----	13

# I . 総合研究報告

厚生労働科学研究費補助金（認知症対策総合研究事業）  
（総合）研究報告書

認知症治療を目的とした変異型オリゴマーアミロイドペプチドを抗原とする  
神経免疫療法の開発に関する研究

研究代表者 森 啓 大阪市立大学・大学院医学研究科・教授

研究要旨

アルツハイマー病の発症原因として注目されているA $\beta$ オリゴマーの実験的モデルマウスを作製した。本モデルは、8ヶ月齢よりニューロン内にA $\beta$ オリゴマー異常蓄積を示し、老人斑は形成されないにもかかわらず空間認知能力の低下とシナプス学習機能である長期増強能（LTP）作用の障害を示した。脳病変としては、老化に伴い異常リン酸化タウ、ミクログリアの活性化、アストログリアの増生が観察されたが、老人斑は形成されなかった。脳萎縮の分子背景であるニューロン細胞脱落の有意な増加も再現されたことより、ほぼすべてのAD脳病変を再現できた。本モデルマウスを標的としたA $\beta$ オリゴマー抗体ワクチンを実施したところ脳病変が軽減した。異常のことよりA $\beta$ オリゴマーを対象とした根本治療薬の有効性が強く示唆される結果を得ることができた。

研究分担者氏名・所属研究機関名及び所属研究機関における職名

富山 貴美・大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

A. 研究目的

認知症の大部分を占めるアルツハイマー病（AD）の対策には、より確かで先進性のある「予防」、「診断」、「治療」面の証拠が必要とされている。このためは個別研究を推進することではなく、国際的な議論の中で高い評価を得る内容でなければならない。すなわち根本治療薬開発のための確実な研究成果によって、国民の福祉医療の大きな課題である高齢者の認知症対策が顕著に改善されることとなる。本研究は国際的に高い競争力と評価を備えた実施内容を推進することで、真摯な国民の期待に応えようとするものであり、最終ゴールを外すことを排除した方向性の上にある。具体的には、本研究は、わが国内で発見された遺伝変異を基に極めて独創性の高い内容を出発点としていることを強調しておきたい。

現在、世界的なアルツハイマー病研究の主流は、治療薬開発の標的のための病因解明に集中しつつあるが、その中でも、A $\beta$ オリゴマーと呼ばれるアミロイド集合体が病因分子として中心的な議論の標的となっている。つまり、A $\beta$ オリゴマーを正確に捉えることが、直接的な診断法と治療薬開発につながると考えられている。問題点は、A $\beta$ オリゴマーとは何かについての国際的な共通認識が結論されていないことにある。

このような問題点があることを踏まえつつA $\beta$ オリゴマーについての知識については徐々に整理されようとしている。まず、1998年にノースウェスタン大学のKlein博士によりADDLsと呼ばれる可溶性のA $\beta$ オリゴマーが発見された。これは、分子量17kDaおよび27kDaと発表された。A $\beta$ 一分子の分子量が約4.5kDaとして3分子あるいは6分子からなる会合体と推測できる。さらに2002年には、ハーバード大学のSelkoe博士によってdimerあるいはlow-nA $\beta$ オリゴマーが同定されている。2003年には、Klein博士がADDLsには分子量56kDaの高分子成分を同定しているが、同じ分子量をもつA $\beta$ オリゴマー

は、2006年にミネソタ大学のAshe博士によってA $\beta$ \*56の別称で議論されたことでA $\beta$ オリゴマーの意義がほぼ定着したと云える。本研究では、発症・進行過程におけるA $\beta$ オリゴマーの病理学的役割を、我々が家族性AD患者から同定したアミロイド前駆体蛋白質（APP）の新しい変異E693 $\Delta$ を発現するトランスジェニックマウス（Tgマウス）を確立させた。

まず、このマウスでの老人斑形成やA $\beta$ オリゴマーの蓄積、シナプス機能や学習記憶機能の変化を生化学、組織化学、電気生理学、行動試験などの手法を用いて調べ、A $\beta$ オリゴマーモデルマウスとしての妥当性を検証する。次に、A $\beta$ オリゴマーの蓄積によって、老人斑の形成なしに、シナプスの消失やタウの異常リン酸化、グリア細胞の活性化、ニューロンの消失などのADの病理変化が起こるかどうかを組織化学的に調べ、神経免疫療法開発のための具体的な証拠を提示することを研究目的とする。

## B. 研究方法

### (1)

#### 1. トランスジェニックマウスの作製

大阪市立大学医学部附属病院にて見出された家族性ADのAPPの新変異（E693 $\Delta$ ）は、老人斑の形成なしに、A $\beta$ のオリゴマー化を促進することで病気を発症させていると考えられた。この変異型遺伝子を発現するモデルマウスは、可溶性A $\beta$ オリゴマーによるシナプス機能障害で始まると考えられ、現在もっとも議論の集中している可溶性A $\beta$ オリゴマー解析に有用と考えられたために、トランスジェニック（Tg）マウスを作製することにした。プリオンプロモーター下に新変異（E693 $\Delta$ ）を組み込んだヒトAPPcDNA遺伝子コンストラクトのベクター部分を排除した後、顕微鏡下で受精卵前核へDNAをマイクロインジェクションした。数時間培養後、DNAを注入した受精卵は偽妊娠状態にした雌マウスの卵管に移植し自然分娩で出産した仔マウスをC57BL/6にて少なくとも10世代以上戻し交配したものを確立した。

#### 2. 生化学的解析

A $\beta$ の単量体および多量体形成はウェスタンブロットにより、 $\beta$ 001抗体、4G8抗体、6E10抗体により検出を試みた。

#### 3. 免疫組織学的解析

マウス脳組織におけるA $\beta$ は $\beta$ 001抗体、4G8抗体、6E10抗体、GFAP抗体、Iba1抗体、リ

ン酸化タウ抗体（PHF1）、NeuN抗体により検出を試みた。

#### 4. 電気生理学的解析

シナプス機能を検討するためにLTP測定を実施した。

#### 5. 行動科学的解析

Tgマウスの表現型を調べることで、A $\beta$ オリゴマーの病理学的役割を探ることにした。

#### 6. 細胞死検出分析

ミトコンドリアレポーター分子（JC-1）染色により、生細胞と死細胞を判別することにした。同時に、ミトコンドリア細胞分画により、細胞質へのチトクロームC漏出を生化学的および組織染色による観察した。

#### 7. 脳PET解析

マウス個体での脳炎症反応を検出するために、末梢系ベンゾジアゼピン受容体に結合する放射能標識リガンドを使用して活性化ミクログリアの脳画像PETを撮像することにした。

アミロイドイメージングには、PiBを標識し、島津製PETカメラにて撮像した。画像は、PiB注入後30分から60分のデータを処理して得ることとした。

### (2)

#### （倫理面への配慮）

臨床研究ではない、組み換え動物実験を使用した基礎医学的研究であるために、倫理面での配慮は不必要である。ただし、DNA組み換え、動物実験についての承認は取得済みである。

## C. 研究結果

### 1. トランスジェニックマウスの作製

マウスプリオンプロモーター下でE693 $\Delta$ 変異APPを発現するTgマウスを作製した。対照として、同じプロモーター下で野生型APPを発現するTgマウスおよびnon-Tg兄弟マウスを用いた。変異型APPの発現量は、野生型APPの約1/2であった。

様々な月齢でマウスの脳切片を作製し、A $\beta$ やA $\beta$ オリゴマーに対する抗体（ $\beta$ 001およびNU-1抗体）で免疫染色を行ったところ、この変異型APP-Tgマウスは、8カ月齢頃より大脳皮質や海馬のニューロン内にA $\beta$ オリゴマーが蓄積し始めることがわかった（図1）。

しかし、細胞外の老人斑は、24カ月齢においても検出されなかった<sup>3)</sup>。前シナプスのマーカーであるシナプトフィジンに対する抗体で染色したと



ころ、この変異型 APP-Tg マウスは、8 カ月齢頃より海馬のシナプスが消失し始めることが確認された。

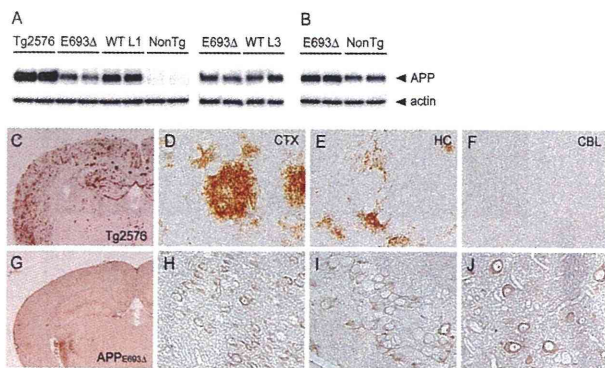


図1. 新しいAβオリゴマーモデル(APPE693Δ)マウスの脳病理組織像

(A,B) 既存老人斑 (Tg2576) モデルマウス、野生型 APP モデルマウス、新しいAβオリゴマー(APPE693Δ)モデルマウス、非 Tg マウスのウェスタンブロット分析。(C-F) Tg2576 マウス (G-J) APPE693Δ マウス。CTX、HC、CBL は各々脳皮質、海馬、小脳をしめす

モデルマウス脳内では、Aβオリゴマーが8カ月齢頃より大脳皮質や海馬のニューロン内に蓄積し、さらにシナプス障害が生じることも示した(図1)。このニューロン内蓄積が、Aβ<sub>1-40</sub>あるいはAβ<sub>1-42</sub>に依るものかについては決着しておらず推測の域が出ない。

細胞内蓄積Aβは、細胞外へ分泌されるAβと、ある意味で逆比例の関係にある。蓄積が増加するということは、分泌量低下になることが示唆されるが、大阪変異をもつ遺伝子発現をする細胞では、Aβオリゴマーが増加するという特徴の他に、細胞内Aβオリゴマーの蓄積と細胞外への分泌低下が観察されている。細胞外への分泌には、細胞内コレステロールが重要である。これには、Aβ<sub>1-40</sub>あるいはAβ<sub>1-42</sub>の化学的な性質が大きく関係することが *in vitro* の系で示唆された<sup>3)</sup>。

## 2. 空間認知障害

そこで、8カ月齢でこのマウスのシナプス機能および学習記憶機能を電気生理学(図2)。および行動試験(図3)。により調べた。その結果、海馬シナプスの長期増強の抑制およびモリス水迷路での空間参照記憶の低下が認められた。

このマウスがAβオリゴマーのモデルマウスとして妥当であることが示された。

次に、病理タウに対する抗体(PHF-1およびMC1抗体)、アストロサイトのマーカーGFAPに

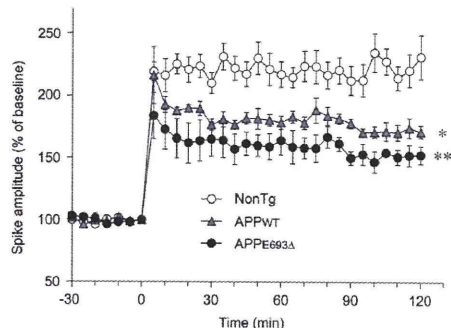


図2. モデルマウスにおける長期増強作用でのシナプス機能 (○非 Tg マウス、△野生型 Tg マウス、●Aβオリゴマーマウス)

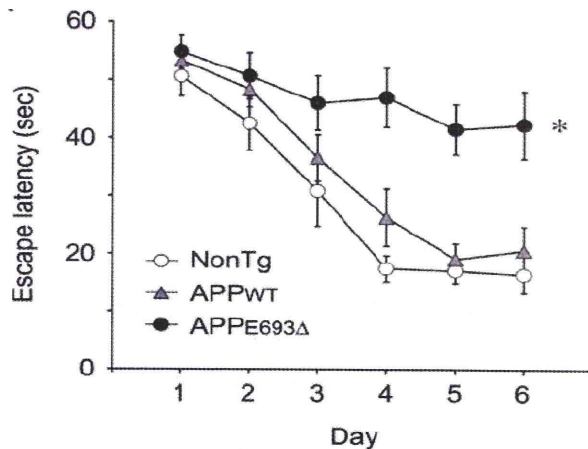


図3. モリス水迷路での空間参照記憶試験 Aβオリゴマーモデル(APPE693Δ: 黒丸)、野生型ヒト APP マウス(黒三角)、非 Tg マウス(白丸)。

対する抗体、ミクログリアのマーカー (Iba-1) 抗体、成熟ニューロンのマーカー (NeuN) 抗体を用いて、このマウスの脳に AD の病理変化が起こっているかどうかを免疫組織化学により調べた。その結果、このマウスは、8カ月齢でタウの異常リン酸化、12カ月齢でミクログリアの活性化、18カ月齢でアストロサイトの活性化、そして24カ月齢で海馬ニューロンの消失を示した。

以上の結果より、Aβオリゴマーだけで AD の主な病理変化が引き起こされること、すなわち、Aβオリゴマーだけで AD が発症・進行し得ることが示唆された。

アストログリア、ミクログリアの経時的増加も観察されたことから脳内炎症を示唆する免疫反応

に關与する生体変化が細胞内A $\beta$ オリゴマー蓄積と同期していることが觀察された。これはマウスの生体レベルでのPETを使用した脳画像(図4)でも確認することが出来る。この結果より、脳神経炎症のトリガーは、アミロイド老人斑だけでなく、非線維性A $\beta$ オリゴマーも脳炎症の原因と成ることが示された。更なる考慮のために、ヒト型タウ遺伝子を発現するモデルマウスとの交配を計画している。

### 3. 細胞死分子機構

小胞体でのA $\beta$ オリゴマー蓄積は、小胞体ストレスを介して細胞死を誘導する事が知られているが、細胞死におけるミトコンドリアの關与は老化における酸化ストレスの議論を考慮した場合重要なファクターとなる。そこで、A $\beta$ オリゴマーによるミトコンドリア機能への影響について検討した(図4)。ミトコンドリア内膜成分として電子伝達系作用を担っている機能性チトクロームC(赤色)がAPPE693 $\Delta$ 発現をした細胞では機能低下が示唆されている。実際、ミトコンドリア画分から細胞質画分への漏出があることを確認をしている(図5. B, C)。これらの培養細胞を用いた結果は、

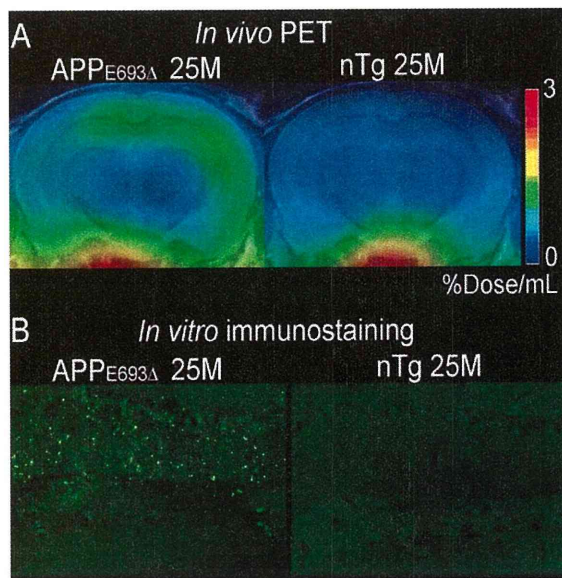


図4. A $\beta$ オリゴマーモデル(APPE693 $\Delta$ )マウスの脳内炎症変化  
A:活性化ミクログリア反応は、18kDaの輸送分子として知られる末梢系ベンゾジアゼピン受容体に結合する放射能標識リガンドを使用して活性化ミクログリアの脳画像PETをしめす。B:リガンド抗体(NP155)による海馬CA1染色。生体脳画像と脳組織標本の一致が確認されていることがわかる

A $\beta$ オリゴマーモデル(APPE693 $\Delta$ )マウス脳内においても検証された。以上を総合して、A $\beta$ オリゴマーの細胞内発現と蓄積によって、ミトコンドリアの形態はチューブ状からドット状もしくは

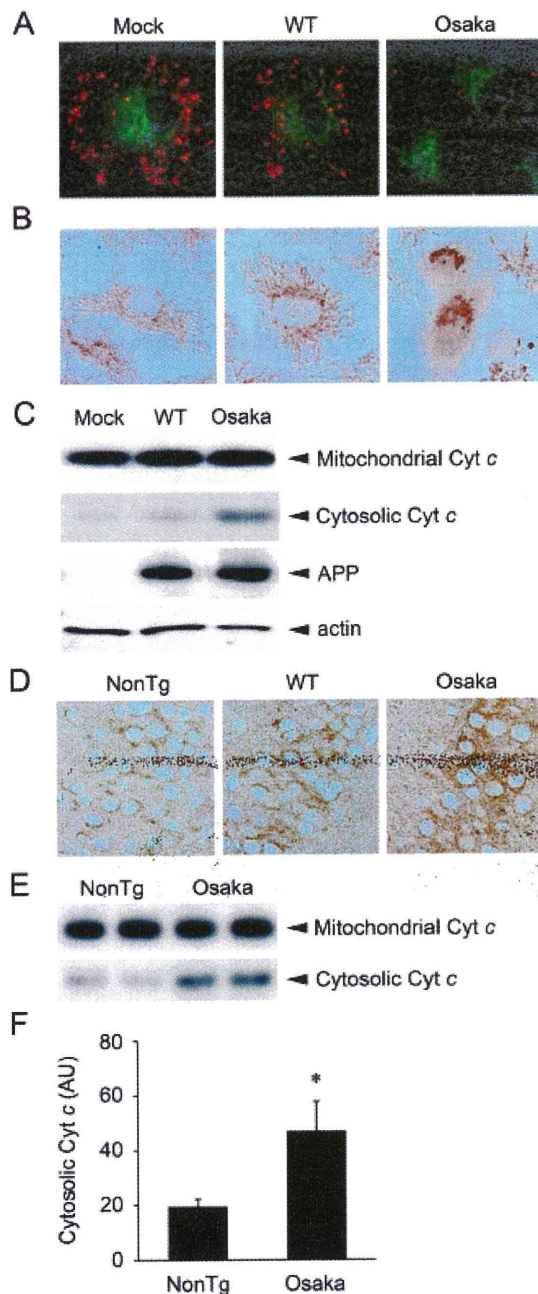


図5 A $\beta$ オリゴマーによるミトコンドリア機能への影響

A:ミトコンドリアのCOS細胞内分布。ミトコンドリアレポーター分子(JC-1)染色したもの。B:同細胞のDAB染色像。C:チトクロームC染色が細胞質にあることを、細胞分画した後にウェスタンブロットにより検出。D-F: A $\beta$ オリゴマーモデル(APPE693 $\Delta$ )マウス脳におけるミトコンドリア觀察。D:脳組織の免疫染色像。E:ミトコンドリアを脳組織から細胞分画したウェスタンブロット像、F: Eを定量。



凝集体へと変化するだけでなく、ミトコンドリア内膜のチトクローム C 分子の細胞質への漏出が生じることが明らかとなった。抗オリゴマー抗体 (NU-1) による免疫組織化学的検索した結果、APP E693Δ マウスでは A $\beta$  オリゴマーのニューロン細胞内の異常蓄積が加齢と共に、行動異常の出現時期と同じくして確かめられた。

脳萎縮は、神経脱落に起因するニューロン細胞死が原因で生じることが知られている。本研究では、その原因が細胞内 A $\beta$  オリゴマーの異常蓄積であることを示し、その作用機構が、小胞体ストレス、細胞器の輸送機構の破綻だけではなく、ミトコンドリア機能障害に由来する可能性を強く示唆することができた。さらに、記憶障害という臨床症状については、同じく細胞内 A $\beta$  オリゴマーの異常集積によってシナプス機能の破綻が生じることが原因であることを示した。このことは、シナプス特異分子であるシナプトフィジン免疫染色によって形態学的に、準定量的に示すことができた。最後に最近、生活習慣病によってアルツハイマー病の発症リスクが上昇することが議論されはじめ、いくらかの疫学的調査は脂質異常症、高血圧、糖尿病のリスクを示唆してきている。本研究では、アルツハイマー病モデルマウスに高コレステロール食餌を与えた場合、アルツハイマー病の最初期変化である細胞内 A $\beta$  オリゴマーの異常蓄積が加速されることを示すことができた。その結果、記憶障害のテストである空間学習能力、シナプスフィジン低下、異常リン酸化タウの上昇が生じることを明らかにした。

#### 4. モデルマウスの免疫療法による認知症治療法の開発検討

今回開発された A $\beta$  オリゴマーモデルマウスの病因である A $\beta$  オリゴマーを除去する治療法の 1 つとして、免疫療法が考えられている。現在我々が手にすることができる A $\beta$  オリゴマー抗体である NU-1 モノクローナル抗体を投与したマウス脳に蓄

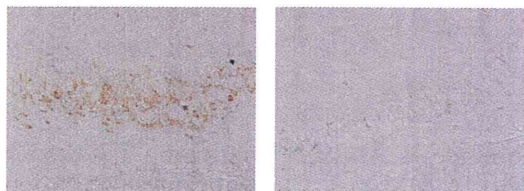


図 6. モデルマウスを用いた免疫療法の試行実験

積する A $\beta$  オリゴマーが抗体投与によって減弱し

ていることがわかる (図 6)。つまり、間接免疫療法が有効であることが示唆された。ただ、この結果には、空間認知能力の試験、シナプス増強反応などの複合的な検索が必要であるし、今後より多数のマウスによる確認作業が必要である。

#### D. 考察

A $\beta$  オリゴマーのみを蓄積し、フィブリルや老人斑を形成しない AD のモデルマウスとしては、本モデルが初めてである。現時点でオリゴマー仮説の問題点を解明することのできる唯一の動物モデルであると考えている。すなわち、従来の AD モデルマウスについても、A $\beta$  オリゴマーが証明されたり、議論されたりした例はあるが、老人斑の再現を視野においたモデルであることから、A $\beta$  オリゴマーについての議論は不十分であり、さらには A $\beta$  オリゴマーと老人斑の共存であるために評価を絞る事ができなかった。

さらに、これまで提唱されてきた A $\beta$  オリゴマーの役割、作用については主としてシナプス障害が注目されてきており、発症初期に特化した病因として理解されてきた。しかしながら、本研究により脳病態後期反応であるグリア反応、異常リン酸化反応、さらにはニューロンの脱落をも本モデルで観察することができたことは、A $\beta$  オリゴマーが単独で、老人斑の存在から独立して作用することを直接的に証明するもので老人斑を対象とした研究の意義については大きな再考を促すこととなると考えられる。また、A $\beta$  オリゴマー蓄積、シナプス機能障害、シナプス変性、グリア反応、タウの異常リン酸化、神経細胞死という一連の病理変化が、加齢変化にともなって現れることも AD が老化に伴って増加する疫学調査とも矛盾しないことは強調するに値する。

本モデルマウスは、いわゆるアルツハイマー神経原線維変化 (NFT : neurofibrillary tangles) を認めなかった。異常リン酸化タウから NFT へ移行する過程に老人斑が必要なのか、あるいはヒト型タウ分子の発現が必要なのかは不明である。さらに、マウス寿命が約 2 年であるが、NFT 形成に必要な歳月がさらに長いことも考えられる。この点については今後の課題として残されている。

最近、アミロイド老人斑を消去させる治療薬候補のヒト臨床試験が失敗に終わっているが、これは A $\beta$  オリゴマーを標的としていないことが原因ではないかと推察することができる。本モデルマウスは、A $\beta$  オリゴマーをターゲットとする AD の

新しい診断・治療薬の開発のための有用なツールとなると期待される。

本研究により、ADの発症・進行過程におけるA $\beta$ オリゴマーの病理学的役割を明らかにすることができた。また同時に、本研究により、老人斑はADの進行に必ずしも必要ではない可能性が強く示唆された。このことは、老人斑の病理学的意義やADの定義を考える上で重要な情報になると考えられる。

A $\beta$ オリゴマーの蓄積は、ニューロン内に観察されたが、細胞外濃度の高進については決着していない。これには、脳PETリガンドの開発あるいは、髄液等における水溶液中の可溶性A $\beta$ オリゴマー定量測定計の開発が必要である。この目的のためにも、標準物質と成るA $\beta$ オリゴマーの再構成は、必須の課題であることがわかる。

細胞外のA $\beta$ オリゴマーについての議論を深めるまでもなく、細胞内A $\beta$ オリゴマーの存在と異常蓄積は、特筆すべき脳変化である。その根拠は、モデルマウスに特異的に出現したこと、加齢に伴う蓄積であること、さらには蓄積時期と行動異常あるいは学習障害の時期が一致していることが指摘される。これらをさらに補強するために、電気生理学的な長期増強（Long-term potentiation: LTP）の低下が確認されていることは強調しておかなければならない。現在の処、モデルマウス脳から抽出するA $\beta$ オリゴマーは、dimerあるいはtrimerといったlow-n A $\beta$ オリゴマーであるが、高分子量域にあるADDLsやA $\beta$ \*56様A $\beta$ オリゴマーを追試できていない。おそらくは、実験条件による相違であるか、発表されていないノウハウがある可能性を否定できない。Ashe自身も、恒常的に高分子A $\beta$ オリゴマーを再現していない点でも明らかのように、高分子オリゴマーの安定性を担保するファクターについては、未だ解明されていないことは特筆しておきたい。

本研究により、ADの発症・進行過程におけるA $\beta$ オリゴマーの役割を明らかにすることができた。同時に、本研究により、A $\beta$ オリゴマーの病理学的意義やADの定義を考える上で重要な情報になると考えられる。

今回確立したA $\beta$ オリゴマーモデルマウスは、現在考えられているAD所見を、ほぼ満たしていると考えられる。ただし、老人斑が存在しない点は、このモデルマウスに導入した大阪変異特有の性質であることを念頭に考慮しなければならない。同時に、大阪変異モデルマウスであっても、野生型

A $\beta$ オリゴマーに対する抗体であるNU-1抗体などのアミロイド抗体との交差反応も確認されていることから、大阪変異に特異的なモデルではなく、A $\beta$ オリゴマーモデルマウスとして考えることができる結論した。

このモデルマウスは、その発現量は、生理的発現量に近く過剰発現による異常性がない点で、大きな意味がある。また、アミロイドタンパクによる病態変化が、アミロイド繊維老人斑に起因するのか、A $\beta$ オリゴマーに起因するのかについて考える上で有力なモデルであることがわかる。今後、ノックインマウスの開発により、さらに生理的な条件での検討も必要であると考えられる。

残された課題は、免疫療法を実施する対象としてのモデルマウスの確立は解決したが、治療薬となるワクチンと抗体の開発が待たれている。さらに、A $\beta$ オリゴマーから異常リン酸化タウ反応が惹起されているが、神経原線維変化の形成には至っていない理由の解明がある。

数多くの課題の底流には、A $\beta$ オリゴマーの脳内分子の単離精製という単純かつ本質的な問題を解決しなければならないことは、言うまでもない。

## E. 結論

AD発症原因分子として注目されているA $\beta$ オリゴマーに特化した実験的モデルマウスを作成した。本モデルの解析により、AD病態を発症するには、A $\beta$ オリゴマーだけでも十分であることが強く示唆され、アミロイド老人斑の病態の意義について疑問を投げかけることができた。A $\beta$ オリゴマー抗体を用いた免疫療法の有効性を示唆する前向きな実験結果を得ることができたことで、今後のADの診断と根本治療薬開発の標的モデルマウスとして今後の研究に有用であることを示した。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Shimada H, Ataka S, Tomiyama T, Takeuchi H, Mori H, & Miki T. Clinical Course of Patients with Familial Early-Onset Alzheimer's Disease Potentially Lacking Senile Plaques Bearing the E693 $\Delta$  Mutation in Amyloid Precursor Protein. *Dement Geriatr Cogn Disord* 32:45-54(2011)

Shimada H, Ataka S, Takeuchi J, Mori H, Wada Y, Watanabe Y, & Miki T. Pittsburgh Compound B-Negative Dementia—A Possibility of Misdiagnosis of Patients With Non-Alzheimer Disease-Type Dementia as Having AD. *Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology* 24:123-126(2011)

Suzuki T, Murakami K, Izuo N, Kume T, Akaike A, Nagata T, Nishizaki T, Tomiyama T, Takuma T, Mori H, Irie K. E22 $\Delta$  Mutation in amyloid beta-protein promotes beta-sheet transformation, radical production, and synaptotoxicity, but not neurotoxicity. *International Journal of Alzheimers Disease*. 2011;431320-7 (2011)

Maeda J, M-R Zhang, Okauchi T, Bin Ji, Ono M, Hattori H, Kumata K, Iwata N, Saido T, Trojanowski J, Lee V, Staufenbiel M, Tomiyama T, Mori H, Fukumura T, Suhara T, Higuchi M. In vivo positron tomographic imaging of glial responses to amyloid- $\beta$  and tau pathologies in mouse models of Alzheimer's disease and related disorders. *J Neurosci*. 31(12):4720-4730 (2011)

Umeda T, Tomiyama T, Sakama N, Tanaka S, Lambert MP, L.Klein W, Mori H. Intraneuronal amyloid  $\beta$  oligomers cause cell death via endoplasmic reticulum stress, endosomal/ lysosomal leakage, and mitochondrial dysfunction in vivo. *J Neurosci Res*. 89:1031-1042(2011)

Mori H, Tomiyama T, Ishibashi K, Ohnishi K, Teraoka R, Fukushima A, Takuma H, Shimada H, Ataka S, Umeda T, Kitajima E, Fujita Y, Yamashita Y, Yamamoto K, Miki T, Matsuyama S, Iso H, Nagata T, Nishizaki T, Wada Y, Yoshioka E, Watanabe Y. Oligomeric Ab is the sole culprit molecule to cause Alzheimer's disease? *Hirosaki Med J* 61(Suppl.): S105-S110(2010)

Umeda T, Mori H, Zheng H, Tomiyama T. Regulation of cholesterol efflux by amyloid  $\beta$  secretion. *J Neurosci Res*. 88: 1985-1994 (2010)

Tomiyama T, Matsuyama S, Iso H, Umeda T, Takuma H, Ohnishi K, Ishibashi K, Teraoka R, Sakama N, Yamashita T, Nishitsuji K, Ito K, Shimada H, Mary P.Lambert, William L.Klein, & Mori H. A mouse model of amyloid  $\beta$  oligomers: Their contribution to synaptic alteration, abnormal tau phosphorylation, glial activation, and neuronal loss in vivo" *J. Neurosci*. 30: 4845-4856(2010)

Nagata T, Tomiyama T, Mori H, Yaguchi T, Nishizaki T. DCP-LA neutralizes mutant amyloid  $\beta$  peptide-induced impairment of long-term potentiation and spatial learning. *Behavioural Brain Research* 06: 151-154 (2010)

梅田知宙, 富山貴美, 森啓. 新しい APP 変異の同定による A $\beta$  オリゴマー仮説の検証. *神経内科* 72(suppl.6)248-252(2010)

Ito K, Ishibashi K, Tomiyama T, Umeda T, Yamamoto K, Kitajima E, Idomoto T, Nagatomo T, & Mori H. Oligomeric Amyloid  $\beta$ -Protein as a Therapeutic Target in Alzheimer's Disease: Its Significance Based on its Distinct Localization and the Occurrence of a Familial Variant Form. *Current Alzheimer Research* 6 : 132-136(2009)

Nishitsuji K, Tomiyama T, Ishibashi K, Ito K, Teraoka R, Mary P.Lambert, William L. Klein, & Mori H. Amyloid Oligomers and Causes Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Apoptosis in Cultured Cells. *American J Pathol* 174(3): 957-969(2009)

V.L. Villemagne, Ataka S, Mizuno T, William S.Brooks, Wada Y, Kondo M, Gareth Jones, Watanabe Y, Rachel Mulligan, Nakagawa M, Miki T, Shimada H, G.J. O'Keefe, C.L. Masters, Mori H, C.C. Rowe. High striatal amyloid  $\beta$ -Peptide deposition across different autosomal Alzheimer disease mutation types. *Arch Neurol* 66(12):1537-1544 (2009)

山川義宏, 安宅鈴香, 森啓. アルツハイマー病の分子病態入門—実地医家に必要な知識. *Medical Practice* 26:2033-2036(2009)

## 2. 学会発表 (国内)

梅田知宙, 野村幸子, 富山貴美, 森啓. The E693 $\Delta$  mutation in amyloid precursor protein impairs A $\beta$ -mediated cholesterol efflux from cells in vitro. 第30回日本認知症学会,(タワーホール船堀・東京都, 2011.11.13)

森啓. アルツハイマー病再考: 新たな到達点と治療の展望 (特別講演). 第12回日本早期認知症学会(練馬文化センター・東京, 2011.1.30.)

森啓. アルツハイマー型認知症の根本治療薬開発の現状と展望 (特別講演). 2010年度認知症ケア学会中国四国地方会(米子コンベンションセンター・鳥取, 2010.12.5)

梅田知宙、富山貴美、坂間直美、Lambert Mary P、Klein William L、森啓. Subcellular localization and toxicity of intracellular A $\beta$  oligomers in APP transgenic mice with the E693 $\Delta$  (Osaka) mutation. 第 29 回日本認知症学会学術集会(ウイנקあいち・愛知県名古屋市, 2010.11.5-7)

富山貴美、梅田知宙、坂間直美、田中沙弥、Mary P. Lambert、William L. Klein、森啓. Intracellular A $\beta$  oligomers cause cell death via ER stress, lysosomal leakage, and mitochondrial dysfunction in cultured cells. 第 29 回日本認知症学会学術集会(ウイנקあいち・愛知県名古屋市, 2010.11.5-7)

Mori, H., "A $\beta$  monomer, oligomer and fibril in Alzheimer's disease", The International Symposium on Early Detection and Rehabilitation Technology of Dementia (DRD2009), (Okayama Univ 2009.12.11-12)

富山貴美、松山正剛、磯博行、梅田知宙、詫間浩、大西紀陽久、石橋謙一、寺岡理恵、坂間直美、西辻和親、伊藤和博、David R. Borchelt, Mary P. Lambert, William L. Klein, 森啓. 「A transgenic mouse model of amyloid  $\beta$  oligomers」、第 28 回日本認知症学会 (仙台, 2009.11.19-22)

藤田 有紀、岡橋 要、梅田 知宙、山本 圭一、森 啓. 「高齢ホッキョクグマの脳神経病理学的剖検報告」、第 28 回日本認知症学会 (仙台, 2009.11.19-22)

梅田知宙、森啓、Hui Zheng、富山貴美. 「Regulation of cholesterol efflux by amyloid  $\beta$  secretion」、第 28 回日本認知症学会 (仙台, 2009.11.19-22)

森啓、「アルツハイマー病はアミロイドが原因でおこる」、日本女性薬剤師会 (星薬科大学メインホール, 2009.6.21)

森啓、「老人斑を越えて」、第 24 回日本老年精神医学会 (横浜, 2009.6.19-20)

(国外)

Nomura S, Umeda T, tomiyama T, Lambert M.P, Klein W.L & Mori H. The E693  $\Delta$  mutation in amyloid precursor protein impairs A $\beta$ -mediated cholesterol efflux from cells, leading to accelerated accumulation of Intraneuronal A $\beta$  oligomers and memory disturbance in mice with hypercholesterolemia. Neuroscience 2011, (Washington DC, USA, 2011.11.14)

Mori H. Perspective on the role of oligomer

in Alzheimer's disease. International Conference on Alzheimer's disease (AAICAD) 2011, (Paris, France, 2011.7.16-21(招待基調講演))

Umeda T, Tomiyama T, Sakama N, Tanaka S, Lambert M.P, L.Klein W & Mori H. Intraneuronal amyloid  $\beta$  oligomers cause cell death via endoplasmic reticulum stress, endosomal/lysosomal leakage, and mitochondrial dysfunction in vivo International Conference on Alzheimer's disease (AAICA) 2011 (Paris, France, 2011.7.16-21)

Tomiyama T, Umeda T, Sakama N, Lambert MP, Klein WL, Mori H. Intraneuronal accumulation of Abeta oligomers causes abnormal tau phosphorylation, glial activation, and neuronal loss in transgenic mice with APP E693 $\Delta$  mutation. International Conference on Alzheimer's disease (ICAD) 2010. (Honolulu, USA, 2010.7.10-15.)

Kitajima E, Umeda T, Idomoto T, Lambert MP, Klein WL, Tomiyama T, Mori H. Hypercholesterolemia accelerates memory impairment in a transgenic mouse model of Abeta oligomers. International Conference on Alzheimer's disease (ICAD) 2010. (Honolulu, USA, 2010.7.10-15.)

Umeda T, Mori H, Zheng H, Tomiyama T. Regulation of cholesterol efflux by amyloid beta secretion. International Conference on Alzheimer's disease (ICAD) 2010. (Honolulu, USA, 2010.7.10-15.)

Mori, H., "Homozygous APP mutations and Alzheimer's disease", 12th International Conference on Alzheimer's Disease (ICAD)(Vienna, 2009.7.11-16)

Tomiyama T, Matsuyama S, Iso H, Takuma H, Umeda T, Ohnishi K, Teraoka R, Ishibashi K, Nishitsuji K, Ito K, Borchelt D.R, Lambert M.P, Klein W.L, Mori H., "A transgenic mouse model of amyloid  $\beta$  oligomers. Pathological effects of the E693 $\Delta$  mutation in amyloid precursor protein in vivo." 12th International Conference on Alzheimer's Disease (ICAD) (Vienna, 2009. 7.11-16)

Mori, H., "Beyond amyloid  $\beta$  fibrils", Wenner-Gren Foundations International Symposium "Alzheimer therapy: still a challenge", (Stockholm Sweden, 2009.5.6-9)



## 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

テレビ・新聞報道

2010年4月8日 NHK「おはよう日本」(午前6時)

2010年4月8日 NHK「おはよう関西」(午前7時45分)

2010年4月8日 朝日新聞(朝刊)

2010年4月8日 読売新聞(朝刊)

2010年4月8日 日本経済新聞(朝刊)

2010年4月8日 日刊工業新聞(朝刊)

2010年4月8日 日経産業新聞(朝刊)

2010年4月13日 毎日新聞(夕刊)

## II. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Shimada H, Ataka S, Tomiyama T, Takeuchi H, Mori H, & Miki T.	Clinical Course of Patients with Familial Early-Onset Alzheimer's Disease Potentially Lacking Senile Plaques Bearing the E693Δ Mutation in Amyloid Precursor Protein.	Dement Geriatr Cogn Disord	32	45-54	2011
Shimada H, Ataka S, Takeuchi J, Mori H, Wada Y, Watanabe Y, & Miki T.	Pittsburgh Compound B-Negative Dementia-A Possibility of Misdiagnosis of Patients With Non-Alzheimer Disease-Type Dementia as Having AD.	Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology	24	123-126	2011
Suzuki T, Murakami K, Izuo N, Kume T, Akaike A, Nagata T, Nishizaki T, Tomiyama T, Takuma T, Mori H, Irie K.	E22Δ Mutation in amyloid β-protein promotes β-sheet transformation, radical production, and synaptotoxicity, but not neurotoxicity.	International Journal of Alzheimers Disease	2011	431320 - 431327	2011
Maeda J, M-R Zhang, Okauchi T, Bin Ji, Ono M, Hattori H, Kumata K, Iwata N, Saido T, Trojanowski J, Lee V, Staufenbiel M, Tomiyama T, Mori H, Fukumura T, Suhara T, Higuchi M.	In vivo positron tomographic imaging of glial responses to amyloid-β and tau pathologies in mouse models of Alzheimer's disease and related disorders.	Journal of Neuroscience	31(12)	4720-4730	2011
Umeda T, Tomiyama T, Sakama N, Tanaka S, Lambert MP, L.Klein W, Mori H.	Intraneuronal amyloid β oligomers cause cell death via endoplasmic reticulum stress, endosomal/ lysosomal leakage, and mitochondrial dysfunction in vivo.	Journal of Neuroscience Research	89	1031-1042	2011
Mori H, Tomiyama T, Ishibashi K, Ohnishi K, Teraoka R, Fukushima A, Takuma H, Shimada H, Ataka S, Umeda T, Kitajima E, Fujita Y, Yamashita Y, Yamamoto K, Miki T, Matsuyama S, Iso H, Nagata T, Nishizaki T, Wada Y, Yoshioka E, Watanabe Y.	Oligomeric Aβ is the sole culprit molecule to cause Alzheimer's disease?	Hirosaki Medical Journal	61 (Suppl)	S105 - S110	2010
Umeda T, Mori H, Zheng H, Tomiyama T.	Regulation of cholesterol efflux by amyloid β secretion.	Journal of Neuroscience Research	88	1985-1994	2010

Tomiyama T, Matsuyama S, Iso H, Umeda T, Takuma H, Ohnishi K, Ishibashi K, Teraoka R, Sakama N, Yamashita T, Nishitsuji K, Ito K, Shimada H, Mary P.Lambert, William L.Klein, & Mori H.	A mouse model of amyloid $\beta$ oligomers: Their contribution to synaptic alteration, abnormal tau phosphorylation, glial activation, and neuronal loss in vivo"	Journal of Neuroscience	30	4845-4856	2010
Nagata T, Tomiyama T, Mori H, Yaguchi T, Nishizaki	T. DCP-LA neutralizes mutant amyloid $\beta$ peptide-induced impairment of long-term potentiation and spatial learning.	Behavioural Brain Research	06	151-154	2010
梅田知宙, 富山貴美, 森啓.	新しいAPP変異の同定によるA $\beta$ オリゴマー仮説の検証.	神経内科	72 (suppl.6)	248-252	2010
Ito K, Ishibashi K, Tomiyama T, Umeda T, Yamamoto K, Kitajima E, Idomoto T, Nagatomo T, & Mori H.	Oligomeric Amyloid $\beta$ -Protein as a Therapeutic Target in Alzheimer's Disease: Its Significance Based on its Distinct Localization and the Occurrence of a Familial Variant Form.	Current Alzheimer Research	6	132-136	2009
Nishitsuji K, Tomiyama T, Ishibashi K, Ito K, Teraoka R, Mary P.Lambert, William L. Klein, & Mori H.	Amyloid Oligomers and Causes Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Apoptosis in Cultured Cells.	The American Journal of Pathology	174(3)	957-969	2009
V.L. Villemagne, Ataka S, Mizuno T, William S.Brooks, Wada Y, Kondo M, Gareth Jones, Watanabe Y, Rachel Mulligan, Nakagawa M, Miki T, Shimada H, G.J. O'Keefe, C.L. Masters, Mori H, C.C. Rowe.	High striatal amyloid b-Peptide deposition across different autosomal Alzheimer disease mutation types.	Archives of Neurology	66(12)	1537-1544	2009
山川義宏, 安宅鈴香, 森啓.	アルツハイマー病の分子病態入門ー実地医家に必要な知識.	Medical Practice	26	2033-2036	2009



書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

### III. 研究成果の刊行物・別刷

# Clinical Course of Patients with Familial Early-Onset Alzheimer's Disease Potentially Lacking Senile Plaques Bearing the E693Δ Mutation in Amyloid Precursor Protein

Hiroyuki Shimada<sup>a</sup> Suzuka Ataka<sup>a</sup> Takami Tomiyama<sup>b,c</sup> Hajime Takechi<sup>d</sup>  
Hiroshi Mori<sup>b,c</sup> Takami Miki<sup>a</sup>

Departments of <sup>a</sup>Geriatrics and Neurology and <sup>b</sup>Neuroscience, Osaka City University Graduate School of Medicine, Osaka, <sup>c</sup>Core Research for Evolutional Science and Technology, Japan Science and Technology Agency, Tokyo, and <sup>d</sup>Department of Geriatrics, Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto, Japan

## Key Words

Alzheimer's disease · Clinical features · Amyloid β · Magnetic resonance imaging · Positron emission tomography · Mutation

## Abstract

**Background/Aims:** Oligomeric amyloid β (Aβ) is currently considered to induce Alzheimer's disease (AD). We examined 2 patients with familial AD who possessed the Osaka (E693Δ) mutation in amyloid precursor protein. To the best of our knowledge, these patients are the first AD cases presumably affected with Aβ oligomers in the absence of senile plaques, and they support the Aβ oligomer hypothesis. **Methods:** We evaluated the clinical course, neuropsychological data, cerebrospinal fluid biomarker levels, magnetic resonance imaging (MRI) scans, fluorodeoxyglucose-positron emission tomography (PET) scans, and Pittsburgh compound B (PiB)-PET images of these patients. **Results:** In the early stages, these patients developed memory disturbances in a similar rate to patients with sporadic AD. Despite their memory disturbances, both patients showed only limited brain atrophy on MRI and little amyloid accumulation on PiB-PET. Subsequent to the development of memory disturbances, both

patients suffered from motor dysfunction, probably due to cerebellar ataxia, and, within a few years, the patients fell into an apallic state. **Conclusions:** Familial AD patients with Osaka (E693Δ) mutation show severe dementia, cerebellar ataxia, and gait disturbances. Copyright © 2011 S. Karger AG, Basel

## Background

The oligomer hypothesis of AD suggests that the soluble oligomers of amyloid β (Aβ), but not the amyloid fibrils, initiate synaptic and cognitive dysfunction in patients with Alzheimer's disease (AD) [1–6]. However, there is no direct evidence that these mechanisms cause dementia in humans. Recently, we identified E693Δ, which is a novel amyloid precursor protein (APP) mutation, in patients with AD and of Japanese lineage [7]. This mutation consists of the deletion of codon 693 (GAA) in the APP gene, which encodes glutamate-22 in the Aβ sequence. The resultant mutant Aβ (E22Δ) showed a unique aggregation property of enhanced oligomerization but no fibrillization. In support of the finding that the mutant Aβ failed to form a fibrillar structure, patients with this

## KARGER

Fax +41 61 306 12 34  
E-Mail karger@karger.ch  
www.karger.com

© 2011 S. Karger AG, Basel  
1420–8008/11/0321–0045\$38.00/0

Accessible online at:  
www.karger.com/dem

Hiroyuki Shimada, MD  
Department of Geriatrics and Neurology  
Osaka City University Graduate School of Medicine  
1-4-3 Asahimachi, Abeno-ku, Osaka 545-8585 (Japan)  
E-Mail h.shimada@med.osaka-cu.ac.jp

mutation were amyloid-negative on Pittsburgh compound B (PiB)-positron emission tomography (PET) imaging. In addition, the mutant A $\beta$  inhibited hippocampal long-term potentiation more potently than did wild-type A $\beta$  in rats *in vivo*. These findings suggest that the Osaka (E693 $\Delta$ ) mutation contributes to AD by enhancing the formation of synaptotoxic A $\beta$  oligomers, and not of amyloid fibrils, providing genetic evidence for the oligomer hypothesis described above.

In our opinion, patients with the Osaka (E693 $\Delta$ ) mutation are therefore expected to exhibit pure features of the A $\beta$  oligomer-induced neuropathology in their brains and of the A $\beta$  oligomer-associated clinical symptoms because the pathophysiology underlying their disease is free from the influence of amyloid plaques. However, the patients with this mutation presented in this paper are still alive, and, therefore, no autopsy data is available to date. Thus, in the present study, we describe the detailed clinical features of these patients and discuss the possible contribution of A $\beta$  oligomers to the clinical symptoms of AD. We believe that the precise clinical description of these patients will provide useful insights into dementia.

## Methods

### *Positron Emission Tomography*

[<sup>11</sup>C]PiB was synthesized using 2-(4'-aminophenyl)-6-hydroxybenzothiazole as the labeled precursor molecule. After an intravenous injection of [<sup>11</sup>C]PiB (150–300 MBq), a dynamic 60-min list-mode emission scan was acquired in the three-dimensional mode without arterial sampling using an Eminence-B PET scanner (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan).

Magnetic resonance imaging (MRI) scans were coregistered with the respective PET images using the PMOD image-fusion tool (PMOD Technologies Ltd., Zurich, Switzerland). The PET images were reconstructed using a filtered back-projection algorithm for attenuation and scatter corrections. According to the study performed by Lopresti et al. [8], in which the frame summation of the dynamic images was recorded for 40–60 min, Logan graphical analysis was used for determining the regional counts (distribution volume ratio, DVR = binding potential + 1) using the cerebellum as the reference region. For this purpose, the cortical lesions occurring in the frontal, parietal, and lateral temporal lobes, the gyrus rectus, and the precuneus regions were selected. The mean cortical DVR (MCDVR) was the mean of the DVR values of these lesions [9]. Positive PiB binding indicated that the visible cortical PiB accumulation was higher than that of the white matter or that the MCDVR of the cortex was larger than the cutoff index obtained at our institute.

### *Neuropsychological Evaluations*

Neuropsychologists administered a set of neuropsychological test batteries that included a Mini-Mental State Examination (MMSE), a Rivermead Behavioral Memory Test (RBMT), a Clock

Drawing Test (CDT) [10], a Category Cued Memory Test (CCMT) [11], a Verbal Fluency Test (VFT) [12], a Scenery Picture Memory Test (SPMT) [13], a Block Design Test (BDT), a subtest of the Wechsler Adult Intelligence Scale-Revised, and the Trail Making Test (TMT) part A and B. For the CDT, the subject was asked to draw a clock with all of its numbers on a blank piece of paper and indicate the time as 10 after 11. We used the 10-point scoring system by Rouleau et al. [10] to score the exam. The CCMT, a modified version of Buschke's Double Memory Test that was reported previously, is a verbal memory test that contains 16 words from 8 categories and uses category cues during encoding and recall. In the CCMT, only cued recall, and not free recall, was tested. The score consisted of the number of items recalled correctly with the maximum score being 16. In the VFT, the subject was instructed to name as many vegetables, animals, and words that start from the letter 'ka' as possible, each within 1 min. The score was the total number of items mentioned. The SPMT is a newly developed, quick, and effective memory test that uses a line drawing of a scene of a living room in a house where 23 objects that are commonly observed in daily life are drawn on a piece of A4-sized paper. The test consisted of 2 trials (Pict-1 and Pict-2).

## Results

### *Patient 1*

Patient 1 was a Japanese woman who was the proband of a highly consanguineous pedigree with hereditary dementia (fig. 1). She first experienced memory disturbances at the age of 55 and visited our hospital at the age of 57. Her MMSE scores (fig. 2) and MRI (fig. 3) and fluorodeoxyglucose (FDG)-PET (fig. 4a) images were rather normal. However, the three-dimensional stereotactic surface projection (3D-SSP) analysis showed hypometabolism of FDG in the posterior cingulate cortex, which is similar to that seen in patients with sporadic AD (fig. 4a) [14]. The levels of A $\beta$ 1–42 and A $\beta$ 1–40 in the patient's cerebrospinal fluid (CSF) were 22 and 390 pg/ml, respectively (normal values in our institute: A $\beta$ 1–42, >450 pg/ml). Based on a very small drop in her MMSE score and her own claims, the patient was diagnosed with mild cognitive impairment.

However, familial AD was suspected in the patient because of her pedigree's history of hereditary dementia. We therefore performed a genetic analysis on her and her family members under the agreement of informed consent and identified a novel mutation (E693 $\Delta$ ) in APP. She had homozygous alleles of this mutation, whereas her unaffected elder and younger sisters, who were 62 and 53 years old, respectively, bore heterozygous alleles.

At the age of 59, patient 1's MMSE score decreased to 22. According to the Diagnostic and Statistical Manual for Mental Disorders, 3rd edition-revised, and the Na-