2. プレセニリン異常によるアルツハイマー病発症機序の解明

瓦林 毅

〈要 約〉 家族性アルツハイマー病の原因遺伝子であるアミロイドβ蛋白前駆体 (βAPP) およびプレセニリン1 (PS-1) 遺伝子変異を組み込んだトランスジェニックマウス (Tg) を用いて脳アミロイド沈着機序の検討を行った。変異βAPP (K670N, M671L) を発現する Tg2576では, Aβ40および Aβ42が脳アミロイドとして沈着し, アルツハイマー病 (AD) 患者脳の老人斑と酷似した光顕および電顕像を呈した。脳を2% SDSと70%ギ酸の二段階で抽出し Sandwich ELISA による Aβ 測定を行うと, 8月齢以前では Aβ は SDS 分画のみに認められ, 8月齢では SDS 可溶性 Aβ が一時的に減少すると共にギ酸可溶性 Aβ が出現した。この時期に組織学的にも脳アミロイド沈着が出現した。それ以降ではギ酸分画中に Aβ が急増した。この Aβ の SDS 不溶性分画への移行がアミロイド沈着の重要な step と考えられた。一方, 血漿中の Aβ は Tg2576では非トランスジェニックマウスの約100倍に増加していたが, 脳 Aβ 沈着の出現以降は経時的に減少した。以上の検討より βAPP の過剰発現は AD 脳と同様の脳アミロイド沈着を生じることが示され, Tg2576はアミロイド沈着機序を解明するモデルになりうると考えられた。新たに作成した変異 PS-1 (M146L, C410Y) を発現する Tg では, 脳に24kD の N 末断片と16kD の C 末断片が増加し, 脳および血漿中に Aβ の増加が認められた。これより変異 PS-1が *in vivo* で Aβ の増加を起こして, AD を発症させる可能性が明らかにされた。

Key words: アルツハイマー病, アミロイド, トランスジェニックマウス, プレセニリン

(日老医誌 2000; 37: 454—457)

緒 言

アルツハイマー病 (AD) の特徴的な病理的所見は, アミロイドβ蛋白 (Aβ) を主成分とする老人斑, 異常リン酸化タウを主成分とする神経原線維変化 (PHF), そして広範な神経細胞死である。そのうち約1割を占める家族性 AD の原因遺伝子としてアミロイドβ蛋白前駆体 (βAPP), プレセニリン1 (PS-1) およびプレセニリン2 (PS-2) の遺伝子変異が知られているが, これら既知の遺伝子変異のすべてが Aβ42の生成を増加させることが知られている。そのため, Aβ の凝集沈着による脳アミロイド形成が以後の PHF 形成および神経細胞死を導くというアミロイドカスケード説が有力視されている。AD の大部分を占める弧発型 AD では Aβ42の産生増加は認められていないが, その病理像は FAD と同一であり, Aβ 沈着以後は共通の病理機序が考えられている。近年 βAPP の遺伝子異常を組み込んだトランスジェニックマウス (Tg) が AD の病理所見を再現すること

が報告され, AD 解明のモデル動物として注目されている^{1)~3)}。Karen Hsiao が作製した Tg2576マウスは, hamster prion protein promotor のもとで Swedish mutation (K670N, M671L) を有するヒト βAPP695を発現し, 加齢により AD 脳と同様の脳アミロイドの蓄積を認める²⁾。Aβ の *in vivo* の沈着過程の解明を行うために, このマウスを用いて Aβ 沈着を組織学的および生化学的に経時的に検討した。さらに変異 PS-1の *in vivo* の作用を検討するために, hamster prion protein promotor のもとに PS-1の遺伝子変異 (M146L あるいは C410Y) を発現する Tg を新たに作製した。

方 法

1. Tg2576マウスの検討

系統の維持は C57B6SJL F1とかけ合わせて行い, F6までを1カ月から25カ月 (Tg: 115; Non-Tg: 31) で解剖した。血漿は0.1%EDTAを抗凝固剤として用いて採血した。脳は正中より二分割し, 原則として一方の脳は凍結保存後に生化学的検討を行い, もう一方は組織学的に検討した。一部のマウスでは還流固定後に電顕および免疫電顕による検討を行った。

組織学的検討

片脳を4% paraformaldehyde にて固定し、5 μ m 厚の paraffin 切片を作製した。免疫染色は抗 A β 抗体にはすべて70%ギ酸による前処理を行い、第2抗体には peroxidase-conjugated 抗ウサギ又は抗マウス抗体を用い、0.03% 3, 3'-diaminobenzidine, 0.065% sodium azide および0.02% H₂O₂ で発色を行った。抗 A β 抗体には BA-27 (A β 40 を特異的に認識)、BC-05 (A β 42 (43) を特異的に認識)、4G8 および BAN-50 を用いた。 β APP の染色には抗 C 末抗体 (Saeko) を用いた。老人斑の染色には Congo red および Methenamine-Silver を用いた。さらに異常リン酸化 tau の有無を調べるため PHF-1 による染色を行った。

生化学的検討

もう一方の脳は凍結して保存した後に2% SDS にて超音波破碎し、100,000g, 4 $^{\circ}$ C で1時間遠心した。SDS 可溶性分画の採取後に沈殿を70%ギ酸で超音波破碎し、同じ条件で遠心してギ酸可溶性分画を採取した。この SDS 分画およびギ酸分画を用いて Western blotting および A β の sandwich ELISA assay を行った。A β の Sandwich ELISA は A β 1-40 に対する polyclonal 抗体 3160 で capture し、A β 40 特異認識抗体 BA-27 または A β 42 特異的認識抗体 BC-05 による detection を行い、A β 1-40 と A β 1-42 を測定した。血漿の A β 40 および A β 42 の測定には BAN-50/BA-27 および BNT-77/BC-05 を用いた⁴⁾。

2. PS-1 トランスジェニックマウスの検討

hamster prion protein promoter のもとに PS-1 M146 L 又は PS-1 C410Y の mutant type cDNA を繋いで cloning 後、制限酵素処理し、それぞれマウス受精卵に microinjection し Tg (F0) を作成した (PrpPS-1M146L, PrpPS-1C410Y)。生後1カ月後に尾から genomic DNA を抽出し制限酵素処理後、PCR および特異的 probe を用いて Southern blot 解析で transgene の有無を確認した。F1の誕生後、F0マウスの脳で PS-1 の発現量を Western blot で確認し高発現系を選択した。マウスの眼窩静脈より血液を採取し血漿中 A β 40, 42 を測定した。8~11 カ月齢のマウスを解剖し、脳の一部を70%ギ酸で抽出し前述の ELISA 系で A β 40, A β 42 を測定した。対側脳は4% paraformaldehyde で固定後 paraffin 切片を作成した。 β APP の C 末端抗体 Saeko, A β 抗体 (Ab9204, S40, S42, Mizuho), 抗 tau 抗体, PS-1 の N 末端抗体, C 末端抗体を用いて ABC 法により染色した。

結果および考察

1. Tg2576 マウス

Fig. 1 Immunostaining of Tg2576 brain : a, c, e, g : BA-27, b, d, f, h : BC-05.

In 6M (a, b), no staining was observed. In 8M (c, d), there was a small dot-like staining with both BA-27 and BC-05 (upper right). In 12M (e, f), there were core plaques which were stained by both BA-27 and BC-05, and diffuse plaques which were stained only by BC-05. In 19M (g, h), there were many core plaques and diffuse plaques.

β APP 抗体による免疫染色でごく初期より神経細胞に顆粒状の強い染色を認めた。脳以外の組織には染色の増加を認めなかった。Western blot では Tg 脳で full-length の β APP および11.4kD の C 末断片 (CTF) の有意の増加を認めた。 β APP と CTF は加齢による著変を認めなかった。以上より、transgene の発現は神経細胞にあり、加齢による変化は少ないと考えられた。加齢により、6~7 カ月齢よりごく一部のマウスに、8 月齢からはすべてのマウスで大脳皮質に A β の染色が認められた (Fig. 1)。この沈着は A β 40, A β 42 の両方の抗体によって染色された。その後加齢により A β 沈着は徐々にその数と大きさを増したが、これらは Congo red 陽性の core plaque の形で認められ、diffuse plaque を認めなかった。12月齢で A β 42 のみに陽性の diffuse plaque の出現を認め、以後 core plaque, diffuse plaque 共にその数と大きさを急増した。19月齢以降では AD 脳とほぼ同程度の沈着を認めた。sandwich ELISA による脳 A β の測定では、8 月齢以前では A β はほとんど SDS 分画のみに検出され、ギ酸分画中には認めなかった。組織学的に A β 沈着を認める 8 月齢で、A β は SDS 分画で一時的に減少すると共にギ酸分画中に出現した。以後、A β はギ酸分画中に急増した (Fig. 2)。生化学的に認められた SDS 不溶性 A β への移行は組織への A β 沈着の時期に一致しており、この critical period における A β の変化が脳アミロイド沈着を解明する上で重要と考えられた。

A β 沈着を電顕で検討すると、amyloid core には AD 脳に類似した amyloid fibril が集積し、この fibril は 4G8 による免疫電顕で明瞭に染色された。core の周囲には多数の dystrophic neurite が認められた。

脳アミロイド沈着が異常リン酸化 tau からなる

Fig. 2 ELISA assay of Tg2576 brain; A β 40 (left) and A β 42 (right). Before 8M, A β was detected only in SDS fraction. In 8M, SDS-soluble A β transiently decreases, and SDS-insoluble, formic acid (FA)-soluble A β appears. After 8M, A β was detected mainly in FA-soluble fraction.

Fig. 3 ELISA assay of Tg2576 plasma; A β 40 (left) and A β 42 (right). Plasma A β decreases with aging after the appearance of SDS-insoluble, FA-soluble A β .

paired helical filament (PHF) の形成を導くかどうかはアミロイドカスケード説でまだ証明されていない部分である。Tg2576の脳では、amyloid core 周囲の dystrophic neurite 内に異常リン酸化 tau 抗体 PHF-1 による染色を認め、経時的にこの染色は増加した。免疫電顕では dystrophic neurite 内に PHF-1 による染色を認めたが、明らかな PHF はまだ認められていない。ヒトと異なりマウスの tau は 4 repeat のみであるが、AD の PHF は 3 repeat tau より形成されるため、この差が PHF 形成を妨げる可能性がある⁶⁾。今後はヒト tau トランスジェニックマウスと Tg2576 との掛け合わせが必要と考えられた。

血漿中の A β を測定すると、Tg2576 では A β 40、A β 42 とも NonTg と比べて約百倍の増加を認めた。経時的には血漿 A β は脳 A β 沈着の出現する 8 月齢以降で減少し

た。一方、NonTg では血漿 A β は加齢と共に増加傾向を示した (Fig. 3)。最近家族性 AD で発症前の carrier で血漿 A β が高く、発症後の患者で血漿 A β が低いことから、血漿 A β が脳 A β 沈着を反映するマーカーとして注目されている⁵⁾。Tg2576 では血漿 A β は脳 A β と逆相関を示し、この説を支持するものであった。

以上の検討より β APP の過剰発現は AD 脳と同様の脳アミロイド沈着を生じることが示され、Tg2576 はアミロイド沈着機序を解明するモデルになりうると考えられた。

2. PrpPS-1M146L, PrpPS-1 C410Y マウスでは、PCR-southern blot による検討から、それぞれ F0 27匹中18匹、19匹中12匹が Tg であった。Western blot では 24kD の N 末断片 (NTF) と 16kD の CTF が認められたが、full PS-1 は認められなかった。血漿中ではいずれの Tg も、

Aβ40の増加がみられたが、Aβ42に著変はみられなかった。脳内 Aβ 量も同様の結果であった。病理学的検索では現在までのところ、明らかな変化はみられていない。これまで、変異 PS-1マウスでは、脳内 Aβ42の絶対的あるいは相対的増加が報告されている^{7,8)}。今回の我々の検討では PS-1の NTF, CTF の 1 アミノ酸置換はともに 血漿・脳内 Aβ40の量を増加させたが、Aβ42の増加については確認できなかった。これは βAPP の遺伝子変異に比べると PS-1遺伝子変異による Aβ42の増加率は軽度であり、その変化を我々の ELISA 系では完全にはとらえることができなかったと思われる、今後の検討が必要であると思われる。

以上のトランスジェニックマウスの検討から家族性 AD の原因遺伝子変異は Aβ の増加を引き起こして脳 Aβ アミロイドーシスを発症させると考えられる。今後、これらのモデルマウスで再現された Aβ アミロイドーシスを阻止する治療薬の開発が望まれる。

文 献

- 1) Games D, Adams D, Alessandrini R, Barbour R, Berthelotte P, Blackwell C, et al.: Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F β-amyloid precursor protein. *Nature* 1995; 373: 523—527.
- 2) Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, et al.: Correlative memory deficits, Aβ elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 1996; 274: 99—102.
- 3) Sturchler-Pierrat C, Abramowski D, Duke M, Wiederhold K-H, Mistl C, Rothacher S, et al.: Two amyloid precursor transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 13287—13292.
- 4) Suzuki N, Cheung TT, Cai XD, Okada A, Otvos JrL, Eckman C, et al.: An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. *Science* 1994; 264: 1335—1340.
- 5) Younkin SG, Eckman CB, Ertekin Taner N, Kawarabayashi T, Yager D, Baker M, et al.: *Society for Neuroscience* 1998; 24: 263.
- 6) Spillantini MG, Goedert M: Tau protein pathology in neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci* 1998; 21: 428—433.
- 7) Duff K, Eckman C, Zehr C, Yu X, Prada CM, Perez-Tur J, et al.: Increased amyloid-beta 42 (43) in brains of mice expressing presenilin 1. *Nature* 1996; 383: 710—713.
- 8) Borchelt DR, Thinakaran G, Eckman CB, Lee MK, Davenport F, Ratovitski T, et al.: Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Aβ1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron* 1996; 17: 1005—1013.