2) 動物実験モデルの開発と治療法の開発

東海林幹夫

〈要 約〉 アルツハイマー病 (AD) における脳 A β アミロイドーシス (A β AM) の病的役割を明らかにし、治療法を開発するため、脳内に A β AM と Tauopathy を再現する Transgenic mice (TG) を確立し A β AM と Tauopathy のどちらが AD の本質的な病変であるのかを明らかにした。1) APPsw mice では加齢に伴って A β AM が再現され、神経細胞とシナプスの消失、リン酸化 Tau の蓄積、脳内アセチルコリンの低下および記憶学習障害が見られた。2) APPsw x Presenilin-1 L286V double TG では著明な A β AM の促進が認められ、変異 Presenilin-1 の病的役割は A β pathology の促進であることが明らかになった。3) 脳に Tauopathy を再現する Tau R406W mice では A β AM は認められなかった。4) APPsw x Tau R406W double TG では Tau 蓄積は促進されなかったが、一部 Gallyas 陽性の神経細胞が認められた。以上から、A β AM は AD の他の病理変化をも引き起こす早期の重要な病理変化であり、AD の根本的な治療のターゲットであると考えられた。

Key words: アルツハイマー病, トランスジェニックマウス, A β amyloidosis, tauopathy,

(日老医誌 2003; 40: 27-29)

はじめに

現在、アルツハイマー病 (AD) の発症機序として、まずアミロイド β 蛋白 (A β) が沈着して脳 A β アミロイドーシス (A β AM) が起こり、続いて Tau 蛋白からなる神経原線維変化 (Tauopathy) と神経細胞死などが出現してくるアミロイド・カスケード説が有力視されている。我々は、Initial event である脳 A β AM の生成機序の解明や予防が最も重要であると考え、これまで家族性 AD の原因遺伝子を発現する transgenic mice (TG) を作成解析することにより、これらの検討を行ってきた。

我々はこれまで報告してきた A β AM と記憶学習障害を認める TG (APPsw mice) の解析を進めるとともに、新たに Tauopathy を再現する動物モデルを確立し、治療法を開発をする上で A β AM と Tauopathy のどちらが AD の本質的な病変であるのかを明らかにした。

研究方法

APPsw mice の解析: 脳 A β AM を再現する APPsw mice における A β 沈着過程と引き続く病理変化 (特に神経細胞死、シナプスの減少、リン酸化 Tau の蓄積、

アセチルコリンの低下) を明らかにし、このマウスで記憶学習障害の評価を行った APPsw xPS-1 L286V double TG: 家族性アルツハイマー病で発見された原因遺伝子 Presenilin-1 (PS-1) の病的役割を明らかにするために L286V 変異を含む PS-1 を Prion promoter につなぎ TG (PS-1 L286V mice) を作製し、病理学的・生化学的に解析した。さらにこれらの mice と APPsw mice を掛け合わせ (APPsw xPS-1 L286V double TG), 変異 PS-1 の脳 A β AM に及ぼす効果を免疫染色を行い病理学的に検討した。Tau R406W mice: AD における神経原線維変化の形成機序と脳 A β AM との関係を明らかにするため Prion promoter を用いて変異 Tau R406W を過剰発現する TG を作製した。病理学的・生化学的に解析を行った。Tau R406W mice と APPsw mice を掛け合わせ、病理学的に検索を行い A β AM と Tauopathy のどちらが AD により本質的な病変であるかを明らかにした。

結 果

APPsw mice では ELISA で得られた結果と相関して 8 カ月齢から A β 40, 42 陽性の老人斑が出現し、加齢とともに増加した。TG でみられる老人斑の A β 分子種や電顕像は AD 脳の老人斑と同様であった。老人斑芯の部分には ApoE も沈着しており、神経細胞やシナプスの減少がみられ、周囲に変性神経突起を認めた。突起内には神経活性物質やリン酸化 Tau の蓄積が見られた。

表1 APP Tgを用いた治療法の開発

治療法	マウスモデル	結果	文献
A β ワクチン	PDAPP	脳アミロイド沈着の減少, 行動異常の改善	Schenk D, et al. Nature 1999; 400: 173—7
	Tg2576, Tg2576 $\times$ PS1 (M146V)	脳アミロイド沈着の減少, 行動異常の改善	Morgan D, et al. Nature 2000; 408: 982—985
	TgCRND8	脳アミロイド沈着の減少, 行動異常の改善	Janus C, et al. Nature 2000; 408, 972—82
女性ホルモン	Tg2576 $\times$ PS1 (M146V)	卵巣摘出による脳 A β 量の増加が estradiol の補充で改善	Zheng H, et al. J Neurochem 2002; 80: 191—6
非ステロイド抗炎症薬	Tg2576	ibuprofen の6カ月投与でグリオシスとアミロイド沈着の減少	Lim GP, et al. J Neurosci 2000; 20: 5709—14
		ibuprofen の短期投与で脳 A β 42 の39%の減少, A β 40 は変化なし	Weggen S, et al. Nature 2001; 414: 212—6
抗コレステロール薬	Tg2576 $\times$ PS1 (M146V)	高コレステロール血症による脳 A β 量とアミロイド沈着の増加が改善	Refolo LM, et al. Neurobiol Dis 2001; 8: 890—9
機能的 γ -secretase 阻害薬	PDAPP	投与3時間後に脳 A β の40%の減少	Dovey HF, et al. J Neurochem 2001; 76: 173—81
	PDAPP	長期投与により脳 A β 量およびアミロイド沈着の減少	May PC, et al. Soc Neurosci, 2001; 687.1
銅と亜鉛のキレート剤	Tg2576	cliquinol の9週間投与により脳 A β 沈着の49%の減少	Cherny RA, et al. Neuron 2001; 30: 665—76
カレースパイス (curcumin)	Tg2576	酸化蛋白, cytokine, グリオシス, 不溶性 A β とアミロイド沈着の減少	Lim GP, et al. J Neurosci 2001; 21: 8370—7

受動的回避試験では3カ月齢マウスでは記憶の獲得, 保持ともにTG・対照間で差はみられなかった. 7カ月齢TGでは36日以降で潜時が短縮し, 8.5カ月齢から記憶学習障害が出現増強した. このことは脳アミロイドの沈着にともなってこれらの記憶学習障害が現れてくることを示している. 試験終了後に脳内各部位毎のACh濃度を測定すると, 6カ月齢マウスではTG・対照間に差はみられなかったが, 記憶学習障害のみられた10カ月齢TGで大脳皮質, 海馬でAChが有意に低下していた. このことは脳アミロイドの蓄積が明らかに神経細胞やシナプスの障害をきたしてAChの低下を引き起こしていることを示している. APPsw x PS-1 L286V double TGの検討では, PS-1 L286V miceではアミロイド沈着や神経原線維変化などの病理所見は見られなかった. APPsw x PS-1 L286V double TGでは2カ月齢からA β 沈着が始まり, APPsw miceに比べて, 約4倍の速度で沈着した. 抗Tau抗体染色ではAPPsw mice同様, 老人斑周囲の変性神経突起にリン酸化Tauの蓄積が見られるのみであった. Tau R406W miceでは10カ月齢TGのヒト特異Tau154免疫染色では大脳皮質, 白質, 海馬, 扁桃体に広範なTauの沈着が見られた. 強拡大像では, 神経細胞胞体, 神経突起, 軸索内に大量のTau蛋白の蓄積が認められた. 同部位に著明なgliosisがみられ, 巨大なアストロサイトが多数認められた. TGの扁桃体では神経細胞の明らかな減少が認められた. A β アミロイドの沈着は認められなかった. APPsw x TauR 406W dou-

ble TGでは, 10カ月齢TGでみられたA β 42陽性の老人斑はAPPsw miceのものと比較して大きさ, 数ともに差は見られなかった. 連続切片を抗Tau抗体で染色すると周囲の変性神経突起や神経細胞が濃染したがGallyas染色では陰性であった. しかし, 老人斑とかけ離れた海馬の顆粒細胞の近傍にGallyas染色陽性の神経細胞や神経突起が観察された. A β やTauの蓄積の著明な促進はみられなかった.

考察と結論

APPsw miceではAD脳で見られるび慢性老人斑, 典型的老人斑, Amyloid angiopathyが再現され, AD脳と同じA β 分子種が蓄積していた. 老人斑芯では神経細胞とシナプスの有意の減少がみられた. 老人斑周囲の変性神経突起に神経伝達物質, 異常リン酸化Tauの蓄積が認められた. 神経原線維変化の再現にまで至ってはいないが, A β 蓄積が明らかな記憶障害や脳内ACh量の低下をも引き起こすことから, 脳A β AMはADにおける痴呆発症のもっとも重要なfactorであると考えられた. APPsw x PS-1 L286V double TGの結果は, 変異PS-1はA β カスケードを介してADを引き起こしているものであり, 神経細胞死やTau pathologyがprimaryな変化ではないことを示している. さらに, APPsw miceとTau R406W miceの掛け合わせると, A β アミロイドが老人斑周囲の変性神経突起にリン酸化Tauを蓄積させ, 海馬でGallyas染色陽性の神経細胞が認められたことか

ら、A β AMがADのより本質的な病理学的変化と考えられた。A β AMはADの他の病理変化をも引き起こす重要な早期の病理変化であり、ADの根本的な治療のターゲットであると考えられた。AD治療法開発への利用としては、現在考えられるAD治療のほとんどがAPP Tgで試されている。表1に主な報告をまとめた。特に注目されているのがABワクチン療法で、調べられたすべての系統で脳アミロイド沈着の予防または改善と行動異常の改善が認められている。他には女性ホルモン、非ステロイド抗炎症薬、コレステロール降下薬、機能的 γ -secretase阻害薬、銅と亜鉛のキレート剤、カレースパイスなどによる治療が試みられ、いずれも脳AB沈着の減少が示されている。今後は、約4倍の速さでA β アミロイド沈着を示すAPPsw xPS-1 L286V double TGを用いて、抗A β モノクローナル抗体による治療法の開発が急がれる。

文 献

- 1) Tomidokoro Y, Harigaya Y, Matsubara E, Ikeda M, Kawarabayashi T, Shirao T, et al.: Brain A β amyloidosis in APPsw mice induces accumulation of presenilin-1 and tau J pathol 2001; 194(4): 500—506.
- 2) Tomidokoro Y, Ishiguro K, Harigaya Y, Matsubara E, Ikeda M, Park J, et al.: A β amyloidosis induces the initial stage of tau accumulation in APP (Sw) mice Neurosci Lett 2001; 299: 169—172.
- 3) Kawarabayashi T, Younkin LH, Saido TC, Shoji M, Ashe KH, Younkin SG: Age-dependent changes in brain, CSF, and plasma amyloid β protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease J Neurosci 2001; 21: 372—381.
- 4) Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, et al.: Correlative memory deficits, A β elevation, and amyloid plaques in transgenic mice Science 1996; 274: 99—102.