

研究種目：若手研究 (B)
研究期間：2007～2008
課題番号：19700333
研究課題名 (和文) $A\beta$ のN末端部の脳内アミロイド蓄積部位に与える影響
研究課題名 (英文) The effects of N-terminal region of Abeta-protein on the cerebral amyloid deposition.
研究代表者 武田 和也 (TAKEDA KAZUYA) 国立長寿医療センター(研究所)・血管性認知症研究部・特任研究員 研究者番号：40393160

研究成果の概要：アルツハイマー病 (AD) 患者脳において多量の蓄積が見られるアミロイド β タンパク質 ($A\beta$) について、その構造と蓄積部位との関連性を明らかにするため、特に、そのN末端の構造の違いに着目して、 $A\beta$ の前駆体タンパク質であるAPPを過剰発現しているトランスジェニック (Tg) マウス脳を解析した。また、N末端の短い分子種である $A\beta$ 5-40/42を脳で過剰に生成する、新たなタイプのTgマウスを作製し、解析した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	0	2,100,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	360,000	3,660,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：老化性痴呆疾患、アルツハイマー病、アミロイド

1. 研究開始当初の背景

(1) $A\beta$ の変異によるアミロイド沈着部位の変化

いくつかの変異型 $A\beta$ が家族性AD (FAD)あるいはAD様の疾患で見つかっているが、 $A\beta$ はその変異の種類により、異なる病理像、とりわけ脳実質と脳血管との間におけるアミロイド沈着に違いを示す。 $A\beta$ は、その前駆体タンパク質であるAPPより、プロテアーゼによるプロセッシングを経て産生されるが、この過程において $A\beta$ の変異による影響は殆ど見られないことから、変

異によるアミロイド沈着部位の変化は、 $A\beta$ の物性の変化によるものと考えられる。

(2) アミロイドの由来と $A\beta$ のC末端部の沈着部位への影響

近年、脳血管アミロイドと脳出血を再現する、変異型 $A\beta$ を過剰産生するTgマウスが作製された。このマウスは、APPが神経細胞に特異的に発現するよう、Thy-1プロモーター下でコントロールされており、神経細胞由来の $A\beta$ が血管アミロイドの形成に寄与することを明らかにした。さらに興味深いことには、 $A\beta$ のC末端には40残基

と 42 残基のアミノ酸の長さの違いがあるが、より不溶性が高く凝集しやすい A β 42 の生成を亢進する、変異型プレセニリン (PS) 1 Tg マウスとの交配の結果、アミロイド沈着が脳血管から脳実質へと変化することが示された。これらの結果は、A β の C 末端の形状の違いもまた、脳アミロイド蓄積部位に影響すること、同一由来の A β がその構造変化により異なる部位で蓄積することを明らかにし、そしてヒトの脳実質のアミロイド (老人斑) も脳血管アミロイドも、由来は同一である可能性を示唆している。

(3) 脳実質と脳血管のアミロイド

A β をターゲットにしたワクチン療法が現在、AD の治療法として、実用化に最も近いものと思われるが、副作用により中止された治験の結果では、実質のアミロイドが良く除去されている一方で、血管アミロイドが多く残っていることが判明した。この原因についてはまだ良く分かっていないが、このような事実は、脳実質と脳血管のアミロイドが異なるものであることを示唆しており、現在のワクチン療法は、脳血管アミロイドに対しては効果が無い可能性も考えられる。このアミロイド除去のメカニズムについては諸説あるが、いずれも抗体が重要である点で一致している。特に、A β の N 末端側に対する抗体がアミロイドの除去に効果的であることが示されていることから、脳実質と脳血管のアミロイドの除去効果の違いは、それぞれを構成する A β の N 末端の形状による可能性も考えられる。

(4) A β の N 末端部の多様性と新たな変異

AD 脳で見られる A β の N 末端部には、C 末端部と同じように長さの違いが見られているが、AD 発症における意義については不明である。一例として、3 番目の E がピログルタミル化された分子、A β pE3-40/42 が老人斑において見出されているが、筆者らは、A β 1-40/42 とは選択的に生成される、N 末端の短い A β (A β 5-40/42) が AD 脳において主に血管壁に蓄積していることを見いだしており、A β の N 末端部がアミロイド形成の部位、脳実質と脳血管との選択性に影響を与えている可能性を考えている。そこで、この分子種の動態を明らかにするため、筆者らは A β 5-X 特異的抗体を作製している。

また近年、A β 5 位付近にイギリス型および鳥取型 FAD 変異 (それぞれ 6, 7 位) が見出されており、これら変異の AD 発症における意義を明らかにする上でも、A β の N 末端部に着目した *in vivo* での解析が重要と考えている。

2. 研究の目的

以上のように、沈着部位の異なるそれぞれのアミロイドの関係を明らかにすることは、A β の脳内動態の解明や AD 治療法の開発・改良に繋がることを期待される。本研究では、アミロイドの蓄積部位と A β の分子種との関連性について明らかにするため、A β の N 末端部分の違い、特に A β 5-40/42 に着目して、APP Tg マウス脳解析を行う。さらに、A β 5-40/42 の生成を亢進する Tg マウスを作製し、脳アミロイド沈着における A β の N 末端部分の寄与について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) A β 5-40/42 を脳内で過剰に生成する Tg マウスの作製と解析

A β 5-40/42 をマウス脳内で過剰に生成させるための遺伝子を構築する。これを用いて Tg マウスを作製し、導入遺伝子の発現量の確認等を行い、繁殖、系統の維持および適切な月齢の加齢マウスを作製する。得られた加齢マウスの脳内 A β の蓄積部位、量、その分子種について、各種抗体を用いた免疫組織学的、また生化学的解析を行う。

導入遺伝子の作製においては、本研究では A β の N 末端部に注目するため、多くの APP Tg マウスで利用されている、A β の N 末端での切断を亢進し、A β 1-40/42 の生成量を増加させるスウェーデン型変異の使用は避ける。また A β の蓄積パターンに影響する可能性を考慮し、A β 42 の生成比率を増やす C 末端側の変異の使用も避ける。A β 5-40/42 生成亢進の方法としては、APP の C 末端側を欠失させることが有効であるが、APP のシグナル配列を付加した、A β の 5 番目のアミノ酸より始まる APP の C 末端断片を発現させる方法についても検討し、培養細胞を用いた実験系で効果を確認した上で Tg マウス作製に入る。

Tg マウス作製の上で重要であるプロモーターの選択については、血管アミロイドについての研究ではあるが、疾患の中樞神経系における特異性を考慮し、神経細胞特異的である Thy-1 を選択する。

Tg マウス作成後、その解析を通じて、必要であれば変異型 PS Tg マウスとの交配も検討する。

(2) AD モデルマウス脳における A β 5-40/42 の解析

A β 5-40/42 を特異的に検出するための抗体を用いて、APP Tg マウス脳における蓄積部位、時期などについて、免疫組織学的、生化学的解析を行い、A β 1-40/42 との比較、検討を行う。

4. 研究成果

(1) Tg マウス作成用ベクターの構築

N末端の短いA β 5-40/42の生成を亢進させる方法としては、APPのC末端31アミノ酸残基を欠失させた、APP Δ C31を発現させる方法や、N末端にシグナルペプチド(sp)を付加したAPPのC末端95アミノ酸残基(以下、spC95と記す)を発現させる方法、あるいは同じくN末端にspを付加したA β 5-40(またはA β 5-42)を直接発現させる方法などが考えられる。これらのうち、より目的分子の生成量の増大が見込め、且つC末端の形状の異なるA β 40およびA β 42両方を生成することが可能と考えられる、spC95を発現させる遺伝子を構築した。

この遺伝子の発現により、実際にA β 5-40/42が生じるかどうかを確認するため、これを培養細胞に導入して、その生成物をウェスタンブロット法、質量分析法などを用いて解析した。その結果、この遺伝子の導入によりspC95が発現すること、A β 5-40/42が培養上清へ分泌されることを確認した(図1下段; 培養上清より抗体を用いて回収したA β を質量分析計で測定、A β 5-40/42に相当するシグナルを検出した)。

この時、APPを発現させた場合(図1上段; 同様の方法にて各種A β を検出した)に見られる主要なA β は検出されなかった。特にA β 17-40/42については、APP Δ C31を発現させる方法において、A β 5-40/42と共に生成が亢進するため、今回構築した遺伝子は、A β 5-40/42による効果を検討するために、より適したものである。

また本法では、APPの細胞内領域が完全に保持されており、この領域の機能不全を考慮する必要がなく、変異型PSとの共発現によりA β 5-42の生成比率の増大も期待できる。

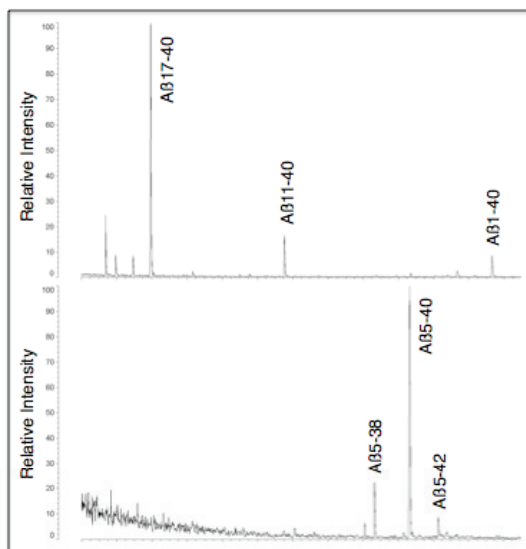


図1. 質量分析法による培養上清中A β の解析

この遺伝子をマウス神経細胞において特異的に過剰発現させるため、Thy-1プロモーターの下流に繋ぎ、Tgマウス作成用のベクターを構築した。

(2) spC95 Tgマウスの作成

構築したベクターを制限酵素処理により直鎖状の断片とし、これを精製してマウス受精卵にマイクロインジェクションした。これにより生まれたマウスの尻尾の一部を採取、ゲノムDNAを抽出し、導入遺伝子配列に特異的なプライマーを用いたPCR法にて、遺伝子を解析した。その結果、構築した目的遺伝子を持つ、数系統のファウンダーマウス(F0)が得られたことを確認した(図2; PCR産物をアガロースゲル電気泳動法で分析、ゲノムDNA上に目的遺伝子が導入された個体、TGでは、約700bpのDNA断片が増幅されている)。

得られたF0マウスを野生型マウスと交配し、生まれた子マウスの遺伝子を同様に解析して、Tgマウス(F1)の出現を確認した。以上の結果から、spC95 Tgマウス、数系統の樹立に成功した。

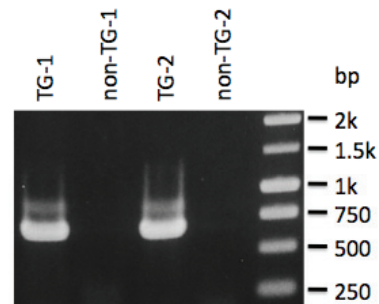


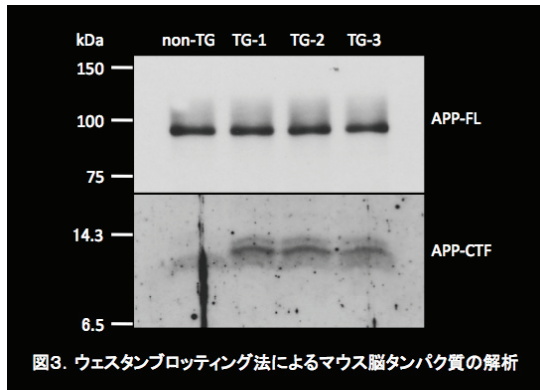
図2. PCR法によるマウス遺伝子型の解析

(3) spC95 Tgマウスの脳タンパク質の解析

得られたF1マウスの脳を摘出し、PBSなど、各種溶媒中にてホモジナイズして、タンパク質を抽出、分画した。これらをSDS-PAGE、ウェスタンブロッティング法により解析した結果、Tgマウスにのみ見られる、分子量の異なるAPPのC末端断片(CTF)を検出した(図3下段; APPのC末端を特異的に認識する抗体によるシグナル)。

一方、同画分におけるマウス内在性のAPP(全長、FL)について確認したところ、Tgと非Tgマウスとの間で量的変化は見られなかった(図3上段; APPのN末端を特異的に認識する抗体によるシグナル)。

以上の結果から、これらspC95 Tgマウスにおいて、導入された遺伝子が発現していることを確認し、本研究目的に合致したTgマウスの系統樹立に成功した。



(4) spC95 Tg マウスの脳アミロイドの解析
 これら Tg マウスの脳アミロイドについては、十分な加齢マウスが得られておらず、未検出であるので、今後も加齢マウスの作製と解析を継続していくこととした。

また変異型 PS との共発現により $A\beta$ 5-42 の生成を亢進させるため、得られた spC95 Tg マウスと変異型 PS1 Tg マウスとを交配した、ダブル Tg マウスも作製中であり、今後、これらについても解析を進めていく。

(5) AD モデルマウスの脳アミロイドの解析
 APP Tg マウスの一系統である、Tg2576 や 3xTg-AD マウスなどの脳アミロイドについての解析も進めており、今後、spC95 Tg マウスの解析結果と比較、検討して論文誌上で報告する予定である。

(6) 最後に

本研究で作製された spC95 Tg マウスは、 $A\beta$ の N 末端および C 末端の形状が脳アミロイドの形成においていかなる寄与をしているかを明らかにする上で、重要なモデルとなると思われる。これらの解析を通じて、AD などに見られるアミロイド蓄積部位の差異について新たな知見が得られ、 $A\beta$ の脳内動態について、さらに理解が深まるものと期待される。その理解は、AD のワクチン療法の改良や、同じく $A\beta$ を標的にした新たな AD 治療法の開発にも資するものである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

武田 和也、田平 武

「 $A\beta$ の N 末端部の脳内アミロイド蓄積部位に与える影響」

第 27 回日本認知症学会学術集会

平成 20 年 10 月 10 日

群馬県前橋市 前橋テルサ

〔図書〕(計 1 件)

武田 和也、吉崎 嘉一、田平 武

(株) アドスリー

「老化・老年病研究のための動物実験ガイドブック 日本基礎老化学会編」

2008, p. 218-223

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武田 和也 (TAKEDA KAZUYA)

国立長寿医療センター(研究所)・血管性認知症研究部・特任研究員

研究者番号：40393160

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し