

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 21 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23680039

研究課題名(和文)新規アルツハイマー病モデルマウスによるリソース基盤の確立と応用

研究課題名(英文)Establishment and application of novel type of Alzheimer's disease model mouse

研究代表者

斉藤 貴志(Saito, Takashi)

独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・副チームリーダー

研究者番号：90360552

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,400,000円、(間接経費) 5,820,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病(AD)研究でのモデルマウスの主流は、APPトランスジェニックマウス(APP-Tg)であった。しかし、APP過剰発現法に伴う様々な問題から、APP-Tgをモデルマウスとする研究の妥当性に疑問が生じている。

我々は、APP遺伝子にいくつかの家族性AD変異をノックイン手法により導入した、次世代型ADモデルマウス開発に成功した。このモデルマウスでは、蓄積するアミロイド斑は、AD患者の病理と類似しており、神経炎症、シナプスの脱落、記憶学習能の障害も伴っていた。新規マウスは、未だ解明されていないAD発症メカニズムを明らかにできる可能性があり、非常に有用なモデルマウスであると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Experimental studies of Alzheimer's disease (AD) have largely depended on transgenic (Tg) mice overexpressing amyloid precursor protein (APP). These mice, however, suffer from artificial phenotypes because not only amyloid beta peptide (Abeta) but also other APP fragments are overproduced. To overcome these drawbacks, we generated knockin mice that harbor Swedish and Iberian mutations in the APP gene, and demonstrated that these animals start accumulating Abeta at 6 months and show memory impairment at 18 months without APP overexpression.

We also generated mice containing an additional Arctic mutation; these started depositing Abeta at 2 months and showed memory impairment at 6 months with aggressive neuroinflammation. We provide the research community with these lines in order to distinguish facts from artifacts in APP-Tg mice and to identify pathological mechanisms upstream and downstream of Abeta deposition.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：アルツハイマー病 モデルマウス アミロイド ペプチド トランスレーショナルリサーチ

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病 (AD) 研究を推進するためには、“AD 患者の脳の病態を忠実に再現できるモデル動物”が必須である。そして、患者の病理とそのモデル動物の病態を比較検討することで、AD 発症の分子機構を明らかにし、AD の治療・予防・診断法の確立へ応用することが可能となる。しかしながら、既存のモデル動物には、根本的な問題が内在しているため、これまで正しい評価を行ってこれたのか？という疑問が生じており、既存のモデル動物を使用した研究に懸念が生じていた。

2. 研究の目的

本研究計画の目的は、蓋然性ある AD モデルマウスを作製し、これらモデルマウスが呈する病理形成の分子メカニズムを明らかにし、また、AD 患者の脳内病理と比較検討を行うことで、最終的に AD の予防・治療・創薬へ応用することを最大の目的とする。

3. 研究の方法

(1) 平成 19-21 年度科研費において作製に成功したプレセニン 1-R278I ノックイン (KI) マウスが、見過ごされてきたアミロイドペプチド (A β) の亜種・A β 43 を産生していることを明らかにしていた。A β 43 は、AD 患者のアミロイド病理を形成していることも明らかとなったため、A β 43 の病理形成能について解析を行った。研究開始時点では、適当な AD モデルマウスが存在していなかったため、既存の AD モデルマウスの一つ APP トランスジェニックマウス (A の前駆体蛋白 APP を過剰に発現したマウス：APP-Tg マウス) と交配を行い、その産仔の解析を行った。

(2) 一方、新規 AD モデルマウスの開発のために克服すべき課題は、APP を過剰発現させないモデルマウスの作製である。このために、家族性 AD 変異 (総 A β 産生能を増加する Swedish 変異、毒性 A β (A β 42) の産生比を増加する Iberian 変異、さらに A の凝集能を増加する Arctic 変異) を多重にノックイン手法により導入したマウスを開発する。

これら作製したマウスの解析法は、主として生化学的、分子生物学的、免疫組織化学的、細胞生物学的な手法に加え、行動学的解析を駆使して行った。

4. 研究成果

(1) A β 43 の AD 病理形成に対する役割 AD 発症と A β 43

孤発性 AD 患者の A β 種の存在率について免疫組織化学的解析を行った。その結果、AD 患者の脳内で、A β 43 が A β 40 よりも高頻度で存在していることが明らかとなった (図 1)。一方で、A β 40 はアミロイド斑には殆ど存在せず、これまでの A β 40 や A β 42 を中心とした研究で見過ごされていた、A β 43 という A

亜種の存在が明らかとなった。さらに解析を進めた結果、アミロイド斑のコア部分に A β 43 が局在していることが明らかとなった (図 2)。つまり、A β 43 の凝集が引き金となりアミロイド斑が形成されていることを示唆している。

図 1. AD 患者アミロイド斑における各 A β 種の占有率

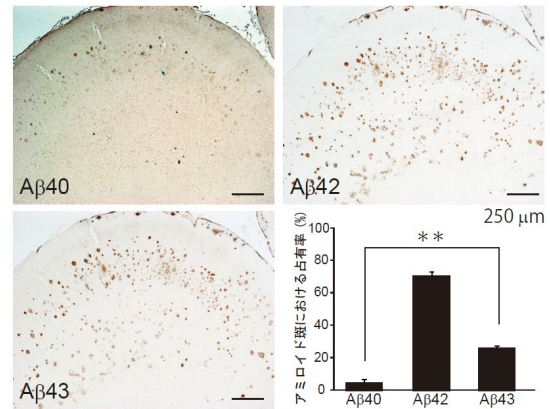
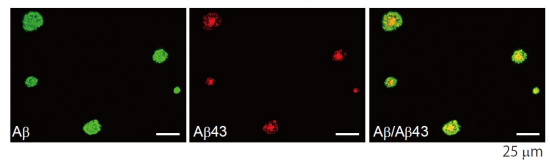


図 2. AD 患者のアミロイド斑における A β 43 の局在

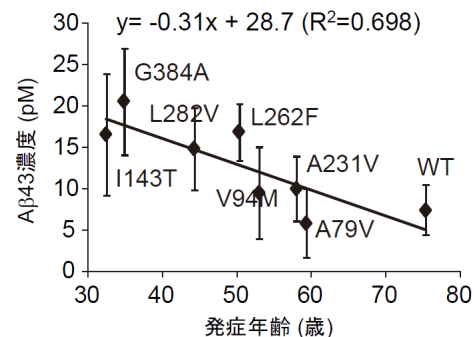


次に、A β 種の毒性の比較を行った。その結果、A β 43 が A β 42 より強い毒性を示したが、図 1 のように A β 43 の量比は A β 42 よりも少ないため、脳内では A β 42、A β 43 が同様に強い神経毒性を発揮していると考えられる。これまで、A β 42 が神経毒性の本体と考えられてきたが、A β 43 も見過ごしてはならない神経毒性の本体である可能性を強く示していた。

A β 43 と AD 発症年齢との関係

家族性 AD の原因遺伝子の 1 つプレセニン 1 の様々な変異を培養細胞に遺伝子導入し、A β 43 の産生能を比較した。その結果、A β 43 の産生能が高いほど、AD 発症年齢が早い家系 (I143T や G384A 変異など) であることが明らかになり、A β 43 の脳内存在量・比と発症年齢に高い相関関係が認められた (図 3)。

図 3. 家族性 AD の発症年齢と A β 43 産生能の相関



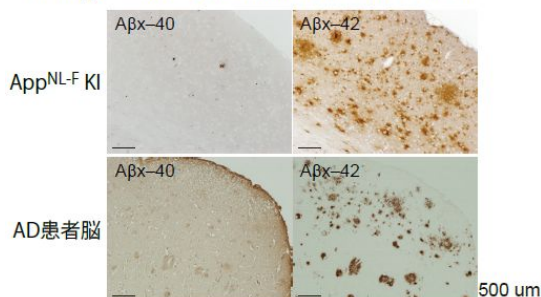
本報告で、これまで見過ごされていた A 43 が、AD の強力な病理形成促進因子であることが明らかとなった。これまで、AD 治療の有力候補だと期待されていた A 40 や A 42 に対する抗体を用いた A ワクチン法の臨床実験が失敗してきた背景には、A 43 の毒性を除去しきれていなかった可能性があり、A 40 と A 42 を中心とした研究を見直し、A 43 も対象にして A ワクチン法を展開していく必要があると考えられる。A の産生抑制を目的とした薬剤開発に関しても、A 43 を含めた指標作りが必要になるだろう。A 42 だけでなく、A 43 も含めて毒性本体として治療標的とすることで、新たな AD の根本治療や予防法の開発へ発展していくと期待される。さらに、A 43 の脳内濃度が AD 発症年齢を規定している可能性も示されたことで、A 43 が早期診断や老化のマーカーとなる可能性があり、A 43 を指標とした AD 早期診断法の確立が期待される。

これら成果は、Nature Neuroscience 誌に報告した(論文)。

(2) 新規 AD モデルマウスの開発と応用 第二世代 AD モデルマウス (App^{NL-F} KI マウス) の開発

既存の AD モデルマウスの最大の問題点は、APP を過剰発現させたトランスジェニック (Tg) マウスであったということである。この問題点を克服し、かつ過剰発現を行わずに A 、特に主要な神経毒性因子である A 42 を増加させる方法として、家族性アルツハイマー病変異の Swedish 変異、Iberian 変異をノックイン手法で導入することに成功した。完成したマウスは導入した変異から、App^{NL-F} KI マウスと名付けた。App^{NL-F} KI マウスは、既存のモデルマウスの問題点を克服したのみでなく、患者に酷似したアミロイド病理を呈し(図 4)、既存のモデルよりも病理を呈するのが早かった。神経炎症、シナプスの脱落、行動異常などのアミロイド病理に起因する症状も再現されていた。

図4. App^{NL-F} KIマウスとAD患者のアミロイド病理

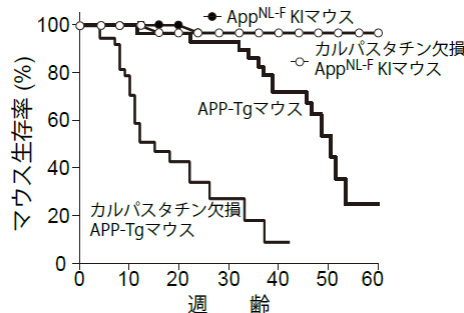


App^{NL-F} KI マウスの応用解析

App^{NL-F} KI マウスと他の遺伝子改変マウスとの交配を行い、解析を行った。過去の結果との整合性を図るために、交配相手には、カルパスタチン欠損マウスを選定した。カルパスタチンは、細胞内システインプロテアー

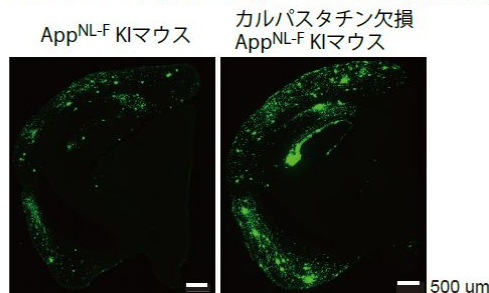
ゼ: カルパインの内在性阻害物質である。以前、APP-Tg マウスとカルパスタチン欠損マウスの交配種を用いた解析では、原因不明の短命化(10週齢でコロニーの約半数が死亡)を示した(図5)。一方、カルパスタチン欠損 App^{NL-F} KI マウスは、60週齢以上まで、野生型と同様の生存曲線を描いた(図5)。すなわち、本来は、APP 遺伝子に変異があっても、APP の発現量が正常であるモデルマウスとカルパスタチン欠損マウスを交配しても、突然死を起こすことなどないことを示しており、APP を過剰発現させた、前世代型の APP-Tg マウスが、人工的なモデルマウスであることを強く示している。

図5. カルパスタチン欠損によるADモデルマウスの寿命の変化



カルパスタチン欠損 App^{NL-F} KI マウスは、カルパスタチン欠損 APP-Tg マウスのように、早期突然死を示さないことから、交配種の老齢解析が可能となった。カルパスタチン欠損 App^{NL-F} KI マウスは、同月齢(図6は15ヶ月齢)の App^{NL-F} KI マウスよりも、アミロイド斑の蓄積が加速していた(図6)。それに伴い、

図6. カルパスタチン欠損によるApp^{NL-F} KIマウスの病態悪化



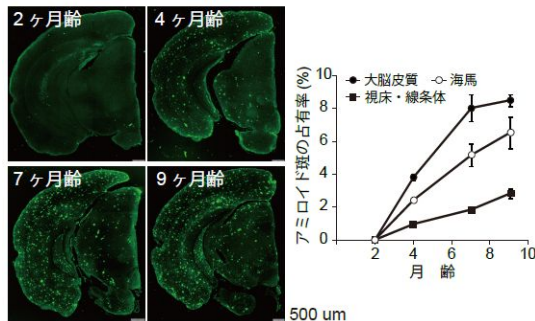
神経炎症も亢進しており、App^{NL-F} KI マウス単独より早く行動異常を示すことが明らかとなった。カルパスタチンを欠損させることで、アミロイド病理の加速が認められることから、カルパスタチンは、AD 病理形成における保護因子であることを示した。このように、他の遺伝子改変マウスと App^{NL-F} KI マウスを交配することで、AD 病態形成の分子メカニズムの一端を解明できると考えられる。

第三世代 AD モデルマウス (App^{NL-G-F} KI マウス) の開発

研究時間の短縮を狙って、App^{NL-F} KI マウスに対して、さらに Arctic 変異 (A の内部配列に存在する家族性 AD 変異で、A の凝集性

を高める効果がある)を導入した App^{NL-G-F} KI マウスの創出にも成功した。App^{NL-G-F} KI マウスは、Arctic 変異の効果により、わずか2か月齢からアミロイド斑の形成が始まっている

図7. App^{NL-G-F} KIマウスのアミロイド病理



た(図7)。

アミロイド斑の形成の加速に伴い、神経炎症やシナプスの脱落も加速しており、行動異常は6か月齢から認められた。すなわち、App^{NL-G-F} KI マウスは、研究時間の大幅な短縮にも成功した。

これまでのAD研究では、APP-Tgマウスのように、非常に人工的なモデルマウスを使用して、病態解析が進められてきた背景があるため、基礎研究から創薬などの応用研究において、正しい研究や薬物候補の評価がなされてきたのか不確定である。App^{NL-F} KI マウスや App^{NL-G-F} KI マウスを用いて研究を進めていくことで、今後、APP-Tgマウスにより得られた結果の一部は正を行う必要があり、また、AD病態形成の分子メカニズムの解明に向けた研究を推進することが可能となる。当該マウスは、日本から発信する、新たな世界基準となる重要な研究ツールとして大きく貢献することが期待できる。

これら成果は、Nature Neuroscience 誌に報告した(論文)。

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6件)

T. Saito, Y. Matsuba, N. Mihira, J. Takano, P. Nilsson, S. Itohara, N. Iwata, T.C. Saido: Single APP knockin mouse models of Alzheimer's disease. Nature Neuroscience 17, 661-663 (2014). (査読有り)

DOI: 10.1038/nn.3697

S. Funamoto, T. Sasaki, S. Ishihara, M. Nobuhara, M. Nakano, M. Takahashi, T. Saito, N. Kakuda, T. Miyasaka, K. Nishikawa, T.C. Saido, Y. Ihara: Substrate ectodomain is critical for substrate preference and inhibition of β -secretase. Nature Communications 4, 1-12 (2013). (査

読有り)

DOI: 10.1038/ncomms3529

P. Nilsson, K. Loganathan, M. Sekiguchi, Y. Matsuba, K. Hui, S. Tsubuki, M. Tanaka, N. Iwata, T. Saito and T.C. Saido: A secretion and plaque formation depend on autophagy. Cell Reports 5, 61-69 (2013). (査読有り)

DOI: 10.1016/j.celrep.2013.08.042

K.M. Sörgjerd, T. Zako, M. Sakono, P.C. Stirling, M.R. Leroux, T. Saito, P. Nilsson, M. Sekimoto, T.C. Saido, M. Maeda: Human prefoldin inhibits A β fibrillation and contributes to formation of non-toxic A β aggregates. Biochemistry 52, 3532-3542 (2013). (査読有り)

DOI: 10.1021/bi301705c

N. Kakiya, T. Saito, P. Nilsson, Y. Matsuba, S. Tsubuki, N. Takei, H. Nawa and T.C. Saido: Cell-surface expression of the major A β degrading enzyme, neprilysin, depends on phosphorylation by MEK and dephosphorylation by protein phosphatase 1a. J. Biol. Chem. 287, 29362-29372 (2012). (査読有り)

DOI: 10.1074/jbc.M112.340372

T. Saito, T. Suemoto, N. Brouwers, K. Sleegers, S. Funamoto, N. Mihira, Y. Matsuba, K. Yamada, P. Nilsson, J. Takano, M. Nishimura, N. Iwata, C.V. Broeckhoven, Y. Ihara and T.C. Saido: Potent amyloidogenicity and pathogenicity of A β 43. Nature Neuroscience 14, 1023-1032 (2011). (査読有り)

DOI: 10.1038/nn.2858

[学会発表](計10件)

齋藤貴志、松葉由紀夫、三平尚美、西道隆臣「新規アルツハイマー病モデルマウスの作製と応用」日本薬学会(熊本) 2014年3月29日(シンポジウム講演)

N. Kakiya, T. Saito, P. Nilsson, L. Auboyer, M. Madison and T.C. Saido: Identification of intracellular signal pathway of somatostatin-induced neprilysin activity. Society for Neuroscience 2013 (San Diego, USA) Nov. 12, 2013. (ポスター発表)

T. Saito, Y. Matsuba, N. Mihira, N. Iwata, J. Takano, P. Nilsson and T.C. Saido: Update of novel type and more relevant model mouse for Alzheimer's disease. Alzheimer Association of International Conference 2013 (Boston, USA) July 15, 2013

(口頭発表).

斉藤貴志「アルツハイマー病の治療・予防・診断法の確立を目指して」日本生化学会関東支部例会(甲府、山梨県)2013年6月15日(招待講演)

斉藤貴志「アミロイド 43 によるアルツハイマー病の病態発症・促進機構に関する研究」日本生化学会(福岡)2012年12月14日(日本生化学会奨励賞受賞講演)

垣矢直雅、**斉藤貴志**、Per Nilsson、松葉由紀夫、津吹聡、西道隆臣「The role of intracellular domain in neprilysin for the metabolic pathway and enzymatic activity of neprilysin.」日本生化学会(福岡)2012年12月15日(ポスター発表)

斉藤貴志、松葉由紀夫、三平尚美、岩田修永、高野二郎、Per Nilsson、西道隆臣「新規 APP ノックインマウスの作製と応用」日本認知症学会(つくば、茨城県)2012年10月26日(口頭発表)

T. Saito, Y. Matsuba, N. Mihira, N. Iwata, J. Takano, P. Nilsson and T.C. Saido: Novel type and more relevant model mouse for Alzheimer's disease. Society for Neuroscience 2012 (New Orleans, USA) Oct. 15, 2012 (ポスター発表)

T. Saito, Y. Matsuba, N. Mihira, N. Iwata, J. Takano, P. Nilsson and T.C. Saido: APP knock-in mouse: a novel type and more relevant model mouse for Alzheimer's disease. Alzheimer Association of International Conference 2012 (Vancouver, Canada) July 15, 2012 (ポスター発表)

T. Saito, N. Mihira, Y. Matsuba and T.C. Saido: A 43 is the potent pathological accelerator for Alzheimer's disease. Alzheimer Association of International Conference 2011 (Paris, France) July 18, 2011 (ポスター発表)

[その他]

<受賞>(計2件)

平成 25 年度 文部科学大臣表彰 若手科学者賞

平成 24 年度 日本生化学会奨励賞

<プレスリリース>(計2件)

発表論文 のプレスリリースを行った。

http://www.riken.jp/pr/press/2014/20140414_1/

発表論文 のプレスリリースを行った。

<http://www.riken.jp/r-world/info/release/press/2011/110704/detail.html>

<アウトリーチ活動>(計3件)

理研一般公開 2013 (2013年4月20日)

理研一般公開 2012 (2012年4月21日)

理研一般公開 2011 (2011年4月16日)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

斉藤 貴志 (SAITO, Takashi)

理化学研究所・神経蛋白制御研究チーム・

副チームリーダー

研究者番号: 9036055

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号: