

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究(A)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19689009
 研究課題名（和文） 次世代型アルツハイマー病モデルマウスの作製及びその応用
 研究課題名（英文） Generation and application of the novel mouse model for Alzheimer's disease
 研究代表者
 齊藤 貴志 (Saito Takashi)
 独立行政法人理化学研究所・神経蛋白制御研究チーム・研究員
 研究者番号：90360552

研究成果の概要（和文）：

我々は、新規アルツハイマー病(AD)モデルマウスとして、2種類のノックインマウスの作製に成功した。これらマウスは、既存のADモデルマウスの問題点を精査して作製しており、既存のADモデルマウスでは得られなかった、実際のAD病理により忠実表現型が認められており、さらなる解析が望まれている。今後は、本研究で作製したADモデルマウスを用いて、ADの予防・治療・創薬のための研究基盤を再構築する研究へ発展すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

We generated two lines of the novel mouse model for Alzheimer's disease (AD), amyloid precursor protein (APP) knock-in (KI) mouse and presenilin1(PS1)-KI mouse. Each KI mice has the familial AD mutations. The mice showed relevance phenotypes rather than previous AD model mouse. These mice would be a useful tool for the prevention, the treatment and the drug discovery of AD.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
2008年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2009年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：アルツハイマー病、モデルマウス、アミロイド前駆体蛋白、アミロイドβペプチド、プレセニン1

1. 研究開始当初の背景
 少子高齢化が進む我が国において、迅速に解

決すべき課題の一つが、アルツハイマー病(AD)の克服である。世界中で行われてきた解析により、

AD を克服するために重要なポイントが大きく以下の3点に絞られてきた。(1) AD 病理を忠実に再現したモデル動物が存在しないこと。(2) 早期(発症前)診断法が確立されていないこと。(3) 予防・治療法(薬)が確立されていないことである。特に、AD 研究を進める上で最も重要な問題は、AD の病理・病態を忠実に再現した、蓋然性のあるモデル動物が存在していないことに集約される。即ち、AD モデル動物の欠落は、AD の克服のための最大の障壁と言える。蓋然性のある AD モデル動物を作製するためには、これまで明らかになって来た事実に基づき、既存の AD モデル動物の問題点を精査して、より良いモデル動物を作製する必要がある。

家族性および孤発性 AD 共にその発症機構は、脳内でのアミロイドβペプチド(Aβ)の蓄積に起因していると考えられている。これは、アミロイド仮説に則していると考えられており、家族性 AD の原因遺伝子が、Aβの前駆体蛋白(APP)または、Aβ産生に関与する酵素複合体の構成因子であるプレセニリン1(PS1)に同定されたという遺伝学的事実に基づいている。このため、これまでに用いられてきた AD モデル動物の主流は、Aβではなく、その前駆体である APP を非生理的に過剰発現させた APP-トランスジェニックマウス(APP-Tg マウス)が主流であった。しかしながら、解析技術の向上・進歩に伴い、実際の AD 病理と APP-Tg マウスとは、かけ離れた病理を解析している事が示され始めており、APP-Tg マウスの限界、すなわち既存の AD モデルマウスの使用に懸念が生じてきた。

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、AD の予防・治療・創薬へ応用することである。そこで我々は、次世代型 AD モデルマウス作製に取りかかった。コンセプトは、既存のマウス同様アミロイド仮説に則りつつも、非生理的な過剰発現法を用いずに、ノックイン法を主体とすることで、Aβの蓄積を促進させるマウスである。このために利用した変異は、家族性 AD 変異である APP-Sweden 変異 (Aβ産生量を増加させる) と APP-Beyreuther 変異 (Aβ42 産生比率を増加させる) である。Aβは、その構成アミノ酸の数によって種類が異なり、Aβ40 と Aβ42 が主に解析されてきた経緯があり、特に疎水性の強い Aβ42 が病因性であると考えられてきた。我々は、上記二つの変異を同時に APP 遺伝子に導入し、ノックインする着想に至った。(このマウスは、APP-NL/Bey-KI マウスと表記する。)

一方で、AD 病理を再度精査した結果、APP-Tg マウスで集中的に解析が行われていた Aβ40 と Aβ42 以外にも Aβ43 の存在が明

らかとなってきた。Aβ43 は、Aβ42 よりも疎水性が高く、凝集性も高いと考えられることから我々は、Aβ43 の病態生理学的な役割も明らかにすることを目的として、Aβ43 の産生比率を増加する家族性変異 PS1-R278I 変異をノックインしたマウスの作製も行った。(このマウスは、PS1-R278I KI マウスと表記する。) これらマウスが完成した後には、各マウスを交配させることでより AD 病態に忠実なモデルマウスの創出に貢献し、今後の AD 研究を推進することが可能になるであろう。

3. 研究の方法

まず、次世代型 AD モデルマウス作製のために APP-NL/Bey-KI マウス、PS1-R278I KI マウス作製のためのターゲティングベクターを構築し、定法に従い、遺伝子操作(遺伝子の導入、クローンの選別、マイクロインジェクション等)を行うことでマウスの作製に成功した。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、行動学的解析を行った。

4. 研究成果

まず APP-NL/Bey-KI マウスに関しては、マウス作製時の遺伝子操作において、相同組み替え効率が極めて悪く、マウスの作製が困難を極めた。一端は作製に成功したものの、導入遺伝子の発現量が低下してしまい、再作製を余儀なくされた。最近になりようやく作製に成功し、まだ若齢ではあるが、解析を始めたばかりである。この APP-NL/Bey-KI マウスは、若齢(2ヶ月齢)であるにもかかわらず、オリゴマーAβの存在も確認されており、今後の迅速な解析が非常に望まれている。少なくとも、既存の APP-Tg マウスでは得られなかった実の結果が得られると推察される。

PS1-R278I KI マウスに関しては、非常に興味深い結果が得られた。PS1-R278I KI マウスは、これまでに報告されている PS1 変異マウスとは異なり、ホモ接合体が胎生致死を示した。この胎児は、短尾や脳内出血などの表現型を示し、PS1 欠損マウスや Notch1 シグナルに異常をきたすマウスの表現型と類似していた。これまでに、様々な PS1 遺伝子の変異導入マウスが作製されてきたが、胎児発生に影響した前例は認められていない。このことから、PS1-R278I 変異は loss of function を示すことが明らかとなった。

また、PS1-R278I は、γセクレターゼ複合体の形成には異常を示さないものの、PS1 の内部切断障害およびγセクレターゼ活性に変化を起こしており、Notch1 の正常なプロセッシング阻害が、胎生致死の原因である可能性が示唆された。一方、PS1-R278I KI マウスのヘテロ接合体は、形態学的な異常は認められていないが、その老齢マウスの脳内では、Aβ40 産生の有意

な減少とそれに伴う Aβ43/Aβ40 比の有意な増加が認められた。これは、PS1-R278I KI マウスホモ接合体由来の胎児線維芽細胞(MEF)で、Aβ40 産生が有意に減少し、逆に Aβ43 の産生が有意な増加を示すことも相関している。また、PS1-R278I KI マウスと APP-Tg マウスとの交配によりアミロイド病理の形成が加速され、そのアミロイド斑のコア部に Aβ43 の蓄積が顕著に認められた。さらに、チオフラビン S 陽性アミロイド斑の割合も有意に増加していた。これらの結果で初めて、Aβ43 が病態生理的に非常に重要な作用を示していることが明らかとなった。Aβ43 は、Aβ42 以上に強い凝集能を持つことも示されており、実際に AD 患者の脳内での蓄積率も高いことが知られていることから、アミロイド病理形成の initiation factor である可能性が示唆された。そのため、Aβ43 の生物学的役割を詳細に解析することは、今後の AD 研究においてさらに重要な意義を持つと思われる。また本結果は、PS1 による Aβ産生機序を明らかにするためにも非常に興味深いものであり、今後解析を進める上で、PS1-R278I KI マウスが有益なツールになりえることを示している。本研究成果は現在、筆頭著者として Nature Neuroscience 誌の revision のため、追加実験を行っている。

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 1 件)

Y. Tachida, K. Nakagawa, T. Saito, T. Saido, T. Honda, Y. Sato, S. Murayama, T. Endo, G. Sakaguchi, A. Kato, S. Kitazume, Y. Hashimoto: Interleukin-1β up-regulates TACE to enhance α-cleavage of APP in neurons: resulting in Aβ production. *Journal of Neurochemistry* 104, 1387-1393 (2008). (Equal Contribution). (査読有)

[学会発表] (計 8 件)

①斎藤貴志 (以下 7 名): R278I-プレセニン1 家族性変異による新知見 第 28 回日本認知症学会学術集会 (2009 年 11 月 20 日: 仙台)

②斎藤貴志 (以下 7 名): R278I-プレセニン1 変異が持つユニークな機能 第 82 回日本生化学会大会合同大会 (2009 年 10 月 24 日: 神戸)

③Takashi Saito (以下 7 名) The biological

effects of R278I-Presenilin-1 familial mutation on γ-secretase activity and amyloid pathology. International Conference for Alzheimer's Disease 2009 (2009 年 7 月 15 日: Vienna, Austria)

④Takashi Saito (以下 4 名) The 2nd generation mouse model for Alzheimer's disease. International Conference for Alzheimer's Disease 2008 (2008 年 7 月 27 日: Chicago, USA)

⑤Takahiro Suemoto, Takashi Saito (以下 6 名) Accelerated Aβ plaque formation by low level expression of presenilin-1 with R278I mutation in knock-in mouse. International Conference for Alzheimer's Disease 2008 (2008 年 7 月 27 日: Chicago, USA)

⑥末元隆寛, 斎藤貴志 (以下 6 名): R278I変異プレセニン1 ノックインマウスにおけるアミロイドプラーク形成の促進 第 31 回日本神経科学大会 (2008 年 7 月 9 日: 東京)

⑦斎藤貴志 (以下 4 名): 次世代型アルツハイマー病モデルマウスの作製及びその解析 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会 (2007 年 12 月 14 日: 横浜)

⑧Takashi Saito (以下 4 名): APP-KI, a novel type mouse, for Alzheimer's disease. The 37 th annual meeting of the Society for Neuroscience (2007 年 11 月 7 日: San Diego, USA)

<招待講演> (計 4 件)

①熊本大学薬学部若手研究者シンポジウム「家族性アルツハイマー病変異 R278I-Presenilin1 がもたらす新知見」(2009 年 10 月 16 日: 熊本)

②グローバルCOEリエゾンラボ研究会「A new aspect for the prevention and therapeutic strategy for Alzheimer's disease」(英語講演) (2008年7月9日: 熊本)

③第一回熊本創薬シンポジウム「アミロイドβペプチド分解機構から探るアルツハイマー病の創薬標的」(2008年2月14日: 熊本)

④特定領域研究「生体膜トランスポートソームの分子構築と生理機能」「細胞情報ネットワークを統合するG蛋白質シグナル研究の新展開」合同若手ワークショップ「アルツハイマー病原因物質アミロイドβ分解におけるソマトスタチンの役割」(2008年1月28日: 箱根)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：アルツハイマー病モデル動物およびその用途

発明者：西道隆臣、斉藤貴志、岩田修永、高野二郎、末元隆寛

権利者：同上

番号：特許出願 2006-170776

出願年月日：2006年6月20日

国内外の別：国内

〔その他〕

<ホームページ>

所属研究室ホームページ

<http://www.brain.riken.go.jp/labs/pns/index/html>

<アウトリーチ活動> (計2件)

理研一般公開 2009 (2009年4月18日)

理研一般公開 2008 (2008年4月19日)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

斉藤 貴志 (Saito Takashi)

独立行政法人理化学研究所・神経蛋白質制御研究チーム・研究員

研究者番号：90360552