

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2010

課題番号：19300122

研究課題名（和文）Alzheimer病：脳βアミロイド沈着防止方法の神経病理学的検討

研究課題名（英文）Pathology of the Alzheimer disease: prevention of cerebral β-amyloid deposition

研究代表者

山口 晴保 (YAMAGUCHI HARUYASU)

群馬大学・医学部・教授

研究者番号：00158114

研究成果の概要（和文）：

本研究の目的は、Alzheimer 病の原因として重要な脳βアミロイド沈着を低減する効果を示す物質を探すことにある。有望なポリフェノールとして、脳βアミロイド沈着を来すトランスジェニックマウスにタンニン酸を投与して神経病理学的行動生理学的に解析し、βアミロイド沈着の減少や認知機能低下軽減効果を示した。このほか、βタンパクの沈着病態に関して、①シナプスと protofibril、②ganglioside とアミロイド沈着、③類人猿でのβアミロイド沈着などの成果を示した。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of the study is to find polyphenol, which reduce cerebral β-amyloid deposition, a causative factor of the Alzheimer disease. We administrated tannic acid to transgenic mice which develop cerebral β-amyloid deposition, and examined neuropathologically and behavior-physiologically. We found that tannic acid reduce cerebral β-amyloid deposition and also reduce mental deficit. Moreover, we demonstrated new findings as follows: accumulation of protofibril at synaptic area; influence of ganglioside on amyloid angiopathy; and β-amyloid deposition in tamarin.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2008年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
年度			
総計	11,400,000	3,420,000	14,820,000

研究分野：神経病理学

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：Alzheimer 病、βアミロイド、認知症、ポリフェノール

1. 研究開始当初の背景

老化により脳βアミロイド沈着からニューロンネットワークが崩壊して Alzheimer 病発症に至る仕組みが、徐々に解明されている。その結果、Alzheimer 病の成因に基づく治療法

が射程に入る時代を迎え、治療に結びつく研究が社会から強く望まれている。そこで、本研究では、これまで25年に亘って培ってきた神経病理学的手法を用いた研究により、脳βアミロイド沈着を防いで Alzheimer 病の発

症・進行を阻止する治療法の開発を行った。

脳βアミロイド沈着が Alzheimer 病の原因であることは、1) 家族性 Alzheimer 病の原因となる遺伝子変異 (βタンパク前駆体 (APP) や presenilin) がβアミロイド沈着を引き起こすこと、2) ダウン症では APP 遺伝子が 1.5 倍量となることで 10 歳代から脳βアミロイド沈着を引き起こし、50 代には Alzheimer 病の病理を示すこと、3) ApoE4 型遺伝子多型が、脳βアミロイド沈着を促進して Alzheimer 病の危険因子となること、4) 脳βアミロイドを欠く Alzheimer 病はないこと、などから示されている。

研究代表者の山口は、1988 年に diffuse plaque を報告して以来、その超微形態や、膜結合βタンパクとしての沈着様式、βタンパクオリゴマーの局在と脂質ラフトの関係などを研究してきた。さらに、Alzheimer 病発症前段階の病態検索を進め、非認知症でも diffuse plaque が加齢に伴って 40 代から出現する例があること (40 代では約 5% の prevalence)、そして、その頻度が加齢とともに上昇し、80 代では 7 割の高齢者の脳にβアミロイド沈着があることを示してきた。

Alzheimer 病は予防・治療法のない疾患と見なされてきたが、Alzheimer 病の原因として重要な脳βアミロイド沈着の要因が少しずつ明らかになってきている。1) カレー色素のクルクミン (ポリフェノール) が、Alzheimer 病動物モデル (家族性 Alzheimer 病変異 APP 遺伝子を導入した Tg2576 トランスジェニックマウス) で、脳βアミロイド沈着を抑制すること (Lim GP: J Neurosci 2001, 21:8370-7)、ワインに含まれるポリフェノールのミリセチンなどが試験管内でβタンパクの重合・線維化を阻害すること (Ono K: J Neurochem 2003, 87:172-81)、など、ポリフェノール類にβアミロイド沈着阻害作用が示されている。2) Alzheimer 病モデルマウスを、廻り車やトンネルなどの遊具を入れて広い飼育箱で飼うと、脳βアミロイド沈着が抑制されることから、飼育環境や運動量が脳βアミロイド沈着に影響を与えることが示されている (Lazarov O: Cell 2005, 120:701-13)。3) DHA をたくさん含む食事やカロリー制限食が、Alzheimer 病モデルマウスの脳βアミロイド沈着を抑制するなど、食事内容も脳βアミロイド沈着に影響を与えることが示されている (Lim GP: J Neurosci 2005, 25: 3032-40)。また、高脂肪食 (脂質がカロリーの 60% を占める) で作られる糖尿病モデルマウスでも脳βアミロイド沈着が増加することが示されている (Ho L: FASEB J 2004, 18: 902-4)。さらに高齢者を

対象にした疫学研究から、肉より魚の食事、赤ワイン、運動、肥満や糖尿病の予防が Alzheimer 病のリスクを低減することが示されている。脂質に関しては、動物性の油脂に多い飽和脂肪酸やオメガ 6 不飽和脂肪酸よりも、魚に多いオメガ 3 不飽和脂肪酸 (DHA など) の摂取が Alzheimer 病のリスクを低減すると報告されている。また、トランス脂肪酸摂取のリスクも疫学的に疑われている。これらより、脳βアミロイド沈着を防ぐライフスタイルの開発が急がれている。4) βタンパク免疫療法も有望なβアミロイド沈着防止法の一つで、副作用 (脳炎) を低減する投与方法の開発が競われている。研究代表者の山口らは、受動免疫による方法を検討し、βタンパクモノクロナル抗体投与を報告した (Horikoshi Y: Biochem Biophys Res Commun 2004, 325: 384-7)。5) βタンパクを分解する酵素としてネプリライシンやアンギオテンシン変換酵素 (ACE) が見いだされている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、Alzheimer 病の原因として重要な脳βアミロイド沈着を低減する効果を示す物質を探すことにある。有望と思われるポリフェノール類を脳βアミロイド沈着を来すトランスジェニックマウスに投与して、その効果を神経病理学的に解析する。その成果が Alzheimer 病の予防や治療に役立つことを願っている。

3. 研究の方法

1) βアミロイド沈着を低減するポリフェノールの投与実験

Tg2576 APP トランスジェニックマウスを購入・飼育した。脳βアミロイド沈着が始まる 9 か月齢よりも 3 か月遡り、6 か月齢から 19 か月齢までの長期投与の効果を検討した。これまでの検討から、19 か月齢では多量の老人斑が出現することと、対照群ではどの程度に出現するかのデータを掴んでいるので (Horikoshi Y: Biochem Biophys Res Commun 2004, 325:384-7)、比較しやすい 19 か月齢とした。ポリフェノールとしては、タンニン酸とフェルラ酸を予定した。投与方法は、エサに 0.1% 程度混入して投与した。解析は、半脳を病理組織検索に、半脳を ELISA などのタンパク解析に用いた。病理組織検索は、βタンパク関連抗体による免疫染色を行い、画像解析装置で沈着部位の定量的解析を行った。また、星形グリアやミクログリアの染色も行い、グリアの反応を検索した。ELISA などの

タンパク解析は、IBL の堀越（研究協力者）にて委託して行った。また、水迷路試験により記憶学習能力の評価も実施した。

2) PD-APP マウスの繁殖

Jackson 社より PD-APP トランスジェニックマウスを導入し、繁殖して利用できる環境を整えた。繁殖を禁じられている Tg2576 の購入は費用がかかりすぎるので、これからの治療研究を進めやすくする環境を整えた。

3) 脳のβアミロイド沈着に伴って活性化するミクログリアの動態を、病理学的に解析した。

4. 研究成果

脳βアミロイド沈着を防止する方法を検討するための基盤となる研究を進めた。

森は、遺伝子操作マウスを用いた研究が遂行できるように、厳格な管理体制の元で良好な飼育環境が整っている動物施設（SPF 飼育施設）から動物を供する体制を確立した。即ち、Taconic 社より 10 週齢で購入した全ての Alzheimer 病モデルマウス（Tg2576 マウス）に対して、導入遺伝子の確認（genotyping）そして導入されている遺伝子コピー数の確認（Real-time PCR 法）を行い、19 ヶ月齢までの長期飼育動物を安定供給できるシステムを確立した。

理研の西道グループとは、βタンパク前駆体トランスジェニック+ネプリライシンノックアウトマウスでシナプスのβタンパクオリゴマーがどのように変化するか検討を続けた。さらに、βタンパクの特殊なオリゴマーである protofibril を特異的に認識する抗体を用いた免疫電顕を行い、シナプスに蓄積する所見を得た。

長寿研のグループとは、ガングリオシド欠損マウスにおける脳βアミロイド沈着の変化を形態学的に検討した。ganglioside の GM1 を欠損し GM3 が蓄積するトランスジェニックマウスを APP トランスジェニックマウスと掛け合わせて、ganglioside がβアミロイド沈着に及ぼす効果をみた。その結果、GM1 欠損/GM3 蓄積マウスではβアミロイドが血管に多量に蓄積することを示した。

米ハーバード大との共同研究では、サル仲間であるタマリン（寿命 15 年程度）の脳を検索し、12 歳以上で老人斑が出現することを示した。

Alzheimer 病の脳βアミロイド沈着機序を検討するため、新たに作成したβタンパクの

C 末断端43および38特異抗体を用いて Alzheimer 病および健常高齢者脳を検索した。βタンパク42は非認知症脳の沈着初期から蓄積することが知られているが、βタンパク43が42とほぼ同時期から一緒に沈着し始めることを40~50歳代の非認知症脳で示した。また、βタンパク38が血管平滑筋で産生され、アミロイド・アンギオパチーには初期から多量に沈着することを示した。βタンパクの長さにより、沈着開始部位が異なるので、βタンパクのγ切断部位が脳βアミロイド沈着に大きく関係することを示した（投稿中）。

さらに、タンニン酸（植物由来のポリフェノール）を Alzheimer 病の病態モデルマウス（PSAPPマウス；APPsw, PSEN1dE9）に経口投与し、認知機能障害と Alzheimer 様病態（脳アミロイド症・グリオシス）に対する効果を検討した。胃ゾンデを用いた経口投与は、6ヶ月齢より開始し6ヶ月間行った。タンニン酸の長期経口投与により、PSAPPマウスで観察される過活動、物体認識障害、空間認知機能障害などの行動学的障害が有意に改善した。さらに、タンニン酸を投与された PSAPPマウスでは、脳実質・脳血管のアミロイドβ蛋白沈着および脳内アミロイドβ蛋白レベルの有意な減少が観察された。タンニン酸が、脳βアミロイド沈着を押さえ、認知症の発症を遅らせる物質になる可能性を示した。

ポリフェノールとしては、さらにフェルラ酸の投与を開始している。また、Alzheimer 病の新規根本的治療薬として注目されているメチレンブルーも投与し終わり、効果を解析中である。

共同研究者の森は、ヒト S100B 蛋白を過剰発現させた遺伝子改変動物と Alzheimer 病の病態モデル動物を交配させ、病態進展における S100B 蛋白の関与を明らかにすることを目的として研究を行った。その結果、S100B 蛋白の遺伝的過剰発現が Alzheimer 病の神経病理学的な病態 [脳アミロイドーシス（老人斑形成）とグリオシス] を進展（増悪）させることを明らかにした。

佐々木は、Alzheimer 病の脳βアミロイド沈着防止法の発展の基礎研究として、培養ミクログリア活性化機構の解析と非 Alzheimer 型脳疾患でのミクログリア/脳内マクロファージの病理を含む神経病理学的検討を行い、IFNγないし LPS の刺激でミクログリアが活性化されることや、認知症を来たす Nasu-Hakola 病（N-H-D）例では、大脳白質変性部だけでなく、大脳皮質、視床、基底核においても、MHC II, CD163, CD204などを発現する活性化ミクログリア（activated microglia, phagocytic

microglia)が増加していることを示し、認知症発症へのミクログリアの関与を示唆する知見を得た。

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15件)

1. Oikawa N, Ogino K, Masumoto T, Yamaguchi H, Yanagisawa K. Gender effect on the accumulation of hyperphosphorylated tau in the brain of locus-coeruleus-injured APP-transgenic mouse. 査読有、Neurosci Lett 468(3):243-247, 2010
2. Nunomura A, Tamaoki T, Tanaka K, Motohashi N, Nakamura M, Hayashi T, Yamaguchi H, Shimohama S, Lee HG, Zhu X, Smith MA, Perry G. Intraneuronal amyloid Beta accumulation and oxidative damage to nucleic acids in Alzheimer disease. 査読有、Neurobiol Dis. 37(3):731-737, 2010
3. Attems J, Yamaguchi H, Saido TC, Thal DR. Capillary CAA and perivascular A β -deposition: two distinct features of Alzheimer's disease pathology. 査読有、J Neurol Sci 299(1-2):155-162, 2010
4. Mori T, Asano T, Town T. Targeting S100B in Cerebral Ischemia and in Alzheimer's Disease. 査読有、Cardiovasc Psychiatry Neurol. pii: 687067, 2010
5. Mori T, Koyama N, Arendash GW, Horikoshi-Sakuraba Y, Tan J, Town T. Overexpression of human S100B exacerbates cerebral amyloidosis and gliosis in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. 査読有、Glia. 58(3):300-14, 2010
6. Zhang S, Salemi J, Hou H, Zhu Y, Mori T, Giunta B, Obregon D, Tan J. Rapamycin promotes beta-amyloid production via ADAM-10 inhibition. 査読有、Biochem Biophys Res Commun. 398(3):337-41, 2010
7. Oikawa N, Yamaguchi H, Ogino K, Taki T, Yuyama K, Yamamoto N, Shin RW, Furukawa K, Yanagisawa K. Gangliosides determine the amyloid pathology of Alzheimer's

disease. 査読有、Neuroreport. 20(12):1043-1046. 2009

8. Oue M, Mitsumura K, Torashima T, Koyama C, Yamaguchi H, Furuya N, Hirai H. Characterization of mutant mice that express polyglutamine in cerebellar Purkinje cells. 査読有、Brain Res. 1255:9-17, 2009
9. Kokubo H, Kaye R, Glabe CG, Staufenbiel M, Saido TC, Iwata N, Yamaguchi H. Amyloid Beta annular protofibrils in cell processes and synapses accumulate with aging and Alzheimer-associated genetic modification. 査読有、Int J Alzheimers Dis. pii: 689285, 2009.
10. Lemere CA, Oh J, Stanish HA, Peng Y, Pepivani I, Fagan AM, Yamaguchi H, Westmoreland SV, Mansfield KG. Cerebral amyloid-beta protein accumulation with aging in cotton-top tamarins: a model of early Alzheimer's disease? 査読有、Rejuvenation Res. 11(2):321-32, 2008
11. Torashima T, Koyama C, Iizuka A, Mitsumura K, Takayama K, Yanagi S, Oue M, Yamaguchi H, Hirai H. Lentivector-mediated rescue from cerebellar ataxia in a mouse model of spinocerebellar ataxia. 査読有、EMBO Rep. 9(4):393-9, 2008
12. Mori T, Tan J, Arendash GW, Koyama N, Nojima Y, Town T. Overexpression of human S100B exacerbates brain damage and periinfarct gliosis after permanent focal ischemia. 査読有、Stroke 39(7): 2114-21, 2008
13. Sasaki A, Kawarabayashi T, Murakami T, Matsubara E, Ikeda M, Hagiwara H, Westaway D, George-Hyslop PS, Shoji M, Nakazato Y. Microglial activation in brain lesions with tau deposits: comparison of human tauopathies and tau transgenic mice TgTauP301L. Brain Res. 査読有、1214:159-68, 2008
14. Cracchiolo JR, Mori T, Nazian SJ, Tan J, Potter H, Arendash GW. Enhanced cognitive activity--over and above social

or physical activity--is required to protect Alzheimer's mice against cognitive impairment, reduce Abeta deposition, and increase synaptic immunoreactivity. 査読有、Neurobiol Learn Mem. 88(3):277-94, 2007

15. Nikolic WV, Bai Y, Obregon D, Hou H, Mori T, Zeng J, Ehrhart J, Shytle RD, Giunta B, Morgan D, Town T, Tan J. Transcutaneous beta-amyloid immunization reduces cerebral beta-amyloid deposits without T cell infiltration and microhemorrhage. 査読有、Proc Natl Acad Sci U S A. 104(7): 2507-12, 2007.

〔図書〕（計2件）

1. 山口晴保：認知症の正しい理解と包括的医療・ケアのポイントー快一徹！脳活性化リハビリテーションで進行を防ごうー。（2版）著 協同医書出版、2010、全350ページ

2. 山口晴保：認知症予防ー読めば納得！脳老化を防ぐライフスタイルの秘訣、協同医書出版、2008、全256ページ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 晴保 (YAMAGUCHI HARUYASU)
群馬大学・医学部・教授
研究者番号：00158114

(2) 研究分担者

森 隆 (MORI TAKASHI)
埼玉医科大学・医学部・准教授
研究者番号：60239605

佐々木 惇 (SASAKI ATSUSHI)
埼玉医科大学・医学部・教授
研究者番号：80225862