

平成21年 5 月 17 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590980
 研究課題名（和文） 神経原線維変化形成におけるシナプス障害と GSK-3 β に関する検討
 研究課題名（英文） Analysis of synaptic disorder and GSK-3 β in formation of neurofibrillary tangles
 研究代表者
 池田 将樹（IKEDA MASAKI）
 群馬大学・医学部・講師
 研究者番号：50222899

研究成果の概要：

1) アミロイド蓄積過程におけるタウ蛋白蓄積-神経原線維変化形成過程の研究基盤

・APP過剰発現TgマウスであるCRND8とPS1(L286V)Tgマウスを交配させ、超早期に老人斑が形成するマウスを確立した(St. George-Hyslop P, Westaway Dとの共同研究. Chishti MA et al. J Biol Chem. 2001)。Tau(R406W)マウスは神経細胞内の著明なタウ蛋白の蓄積、運動障害を示し、電顕にて神経細胞内に大量のstraight filamentと前頭葉・側頭葉・海馬・扁桃体に神経細胞死を確認した(Ikeda M. Am J Path. 2005)。更にtau(P301L)cDNA(4R2N)を用いた変異タウTgマウスを確立し、タウ蓄積、NFT、神経細胞死を呈し、電顕にてPHF形成を認めている高発現マウスである(Murakami T, Ikeda M. Am J Path. 2006)。Tau(P301L)TgXGSK-3 \cdot Tgマウス(Dieder Moechars博士、Johnson & Johnson製薬研究所)を解析している。

2) タウ、A \cdot の蓄積におけるシナプス障害の関与(特にシヌクレインの役割について)

我々が作製したTg \cdot SYNでは神経細胞内・核内封入体を示した。この \cdot SYNマウスは封入体形成前に2.5カ月の時点から運動障害を認めることから、 \cdot SYN蓄積の途中段階でシナプスの機能不全を来すものと思われる(Ikeda M et al, Brain Research 2008)。タウ蓄積、アミロイド蓄積において変異 \cdot SYN蓄積によるシナプス障害がアミロイド蓄積過程はAD発症機序を検討する上で極めて価値が高いと思われる。PS1CRND8マウスにおいても老人斑に関与する諸因子(PS1、 \cdot APP(A \cdot)、ApoE)と、タウ蓄積、アミロイド沈着の形成過程における \cdot SYNの関与の可能性が高いものと考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：

タウ、GSK-3 \cdot 、タウオパチー、アルツハイマー病

1. 研究開始当初の背景

神経原線維変化(NFT)はアルツハイマー病、前頭側頭型認知症にみられる主要な病理学的変化である。臨床的にも病理学的にも認知機能障害、神経細胞死と関連の高いNFTの形成メカニズムを明らかにすることは神経変性疾患の発生、治療薬開発を目指す上で大変重要な意味をもつ。我々は生体内でのNFTを中心とした神経変性・細胞死のメカニズムを明らかにする。

2. 研究の目的

タウ蛋白の蓄積には、GSK-3 \cdot の活性化によるリン酸化が関与し、AD、前頭側頭型認知症で出現するNFT形成には、Notchシグナル、GSK-3 \cdot を介してプレセニリンがA \cdot \cdot 産生増加と共にタウ蓄積を促進する可能性があるため各種トランスジェニックマウスに用いて神経原線維変化の形成メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

GSK-3 \cdot Tg、変異tau((R406W, P301L)Tg、GSK-3 \cdot (+)/tau(+)(R406W, P301L)ダブルTgについてCRMPs(特にCRMP2は神経突起と直接的に関連性が示されているので注目に値する)、GSK-3 \cdot 活性とタウ蛋白の発現・蓄積、NFT形成の機序を解明する。認知症を示す神経変性疾患の治療法および治療の開始時点の手がかりと成り得ると考える。

4. 研究成果

GSK-3 \cdot Tgマウスの解析を継続している。ヒト特異的GSK-3 \cdot 抗体を用い免疫細胞化学的検討を行い、中枢神経組織・細胞におけるGSK-3 \cdot の発現局在がより明確となり、広範な大脳皮質領域、海馬、扁桃体に分布が認められた。変異タウ/GSK-3 \cdot のダブルTgマウス脳においてELISAにてSer199、Ser396部位のリン酸化タウの増加を認めた。これらの所見から変異PS1はA \cdot 42の産生において \cdot セクレターゼの機能を示すと共に、リン酸化タウ構造物形成にも何らかの役割を果たす可能性が示唆された。

共同研究にてGSK-3 \cdot Tgマウスを作製・解析を行った。PCR/northern blotにて遺伝子発現を確認、Western blotにて蛋白発現を認めた。各種GSK-3 \cdot 抗体を用い免疫細胞化学的検討を行い、大脳皮質・海馬・扁桃体および脳幹・脊髄にGSK-3 \cdot の発現を認めた。変異タウ/GSK-3 \cdot のダブルTgマウス脳におい

てELISAにてThr181、Ser199、Ser214、Ser396のリン酸化タウの増加が認められた。

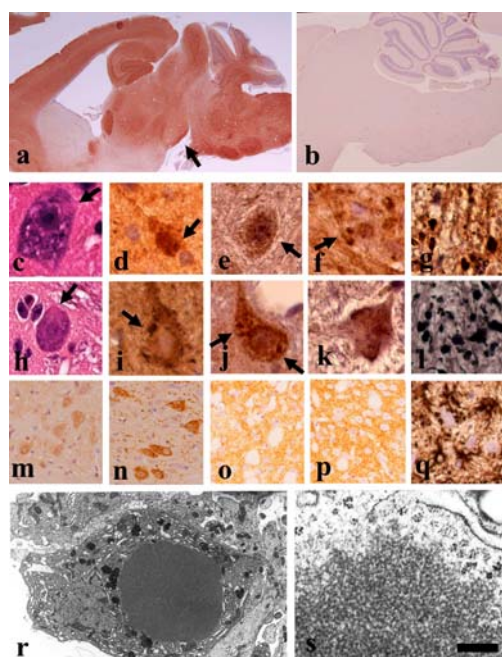
家族性パーキンソン病のContursi家系や \cdot SYN triplicationのIowa家系の病理学的分析ではLewy bodyとともにNFTの混在や共在が報告され、認知症出現に関与している可能性があること(Gwinn-Hardy K. Acta Neuropathol (Berl). 2000, Duda JE. Acta Neuropathol (Berl). 2002)から \cdot SYNによるシナプス障害が生じtau蓄積・NFT形成、すなわちtauと \cdot SYNにおける分子間相互作用が推測される。変異 \cdot SYN(A30P/A53T)を組み込んだ導入遺伝子を過剰発現させた独自のトランスジェニックマウスを作製し解析を進めているが(Ikeda M. Brain Research 2008)、ガリアス陽性構造を有し、神経細胞内・核内封入体を形成する \cdot SYNマウスは国内では報告が無く、シヌクレオパチーの発生機序を検討すると共に、tau蓄積およびアミロイド蓄積において \cdot SYNによるシナプス障害と神経細胞・突起の変性、ニューロンの機能不全から症状出現に如何に関与するか検討する。PS1CRND8マウスでは早期に老人斑が形成されており、タウ蓄積、アミロイド沈着・形成過程における変異 \cdot SYNによるシナプス障害の関与がより明らかに理解されるものと考ええる。

これら一連の本研究は、アルツハイマー病をはじめとした認知症性神経変性疾患の発生機序について原因遺伝子(分子)を導入した生体内における、老人斑、神経原線維変化、レビー小体形成機序を解明するにあるが、最も重要なことは、これら脳内異常構造物の形成機序及び形成前段階の状態から生ずるニューロンの機能不全を理解・解

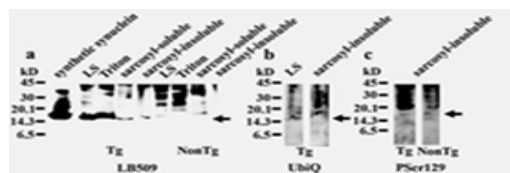
明し、それらを抑制すべく有効な治療法を一歩も早く開発することである。

本研究は認知症性神経変性疾患の発生機序を解明し、治療に繋がるトランスレーショナル研究という意味で、本邦において加速する高齢社会に向けて、公共の福祉に大いに貢献するものと思われる。また、今後、全世界的に進行する高齢化問題に対応するためにも、本邦における病態脳科学研究が世界の先駆的役割を果たす上で大変重要なものとする。

下図(原図一部, Brain Research 2008) : (a) $\cdot\cdot$ SYN Tg (LB509 染色)、(c)(h) 細胞質内封入体(HE 染色)、(d, e, i, j) 細胞質内封入体(LB509 染色)、(l) ガリアス染色、(r)(s) 電顕像(細胞質内封入体)。



下図: サルコシル不溶性画分にて 16kD の $\cdot\cdot$ SYN を確認した(a)。さらにユビキチン化(b)、p129 $\cdot\cdot$ SYN を確認した(c)。



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 3 件)

① Ikeda M, Kawarabayashi T, Harigaya Y, Sasaki A et al. Motor impairment and aberrant production of neurochemicals in human $\cdot\cdot$ -synuclein A30P+A53T transgenic mice with $\cdot\cdot$ -synuclein pathology. Brain Research 1250: 232-41, 2008, 査読有

② Sasaki A, Kawarabayashi T, Murakami T, Matsubara E, Ikeda M et al. Microglial activation in brain lesions with tau deposits: comparison of human tauopathies and tau transgenic mice TgTauP301L. Brain Research 1242: 159-68, 2008, 査読有

③ Xu W, Kawarabayashi T, Matsubara E, Harigaya Y, Ikeda M, et al. Plasma antibodies to Abeta40 and Abeta42 in patients with Alzheimer's disease and normal controls. Brain Research 1219: 169-79, 2008, 査読有

[学会発表] (計 6 件)

① 池田将樹, 藤田行雄, 橋本由紀子, 針谷康夫, 岡本幸市. 発病初期より精神症状・運動障害と前頭葉血流低下を示しPS1変異を認めたFADの3症例. 第27回日本認知症学会(前橋). 2008.10.10.

② Ikeda M, Harigaya Y, Yonemura K, Yoshida J, Fujita Y, Hashimoto Y, Oriuchi N, Ishiguro K, Okamoto K. Diverse neurological features presenting severe dementia, psychiatric symptoms and motor deficits in early onset familial Alzheimer's disease. ICAD2008. 2008.7.29. Chicago (USA)

③ 池田将樹，藤田行雄，橋本由紀子，針谷康夫，岡本幸市．PS1変異を認め、病初期より精神症状・運動障害と前頭葉血流低下を示したFADの3症例．第49回日本神経学会総会(横浜)．2008.5.17

④ Ikeda M, Goris I, Sasaki A, Kawarabayashi T, Ishiguro K, Shoji M, Harigaya Y, Westaway D, St George-Hyslop P, Moechars D, Okamoto K. Analysis of phosphorylation of tau in transgenic mice overexpressing GSK-3 β NEUROSCIENCE2007, 2007. 11. 17. San Diego (USA).

⑤ Ikeda M, Goris I, Sasaki A, Kawarabayashi T, Ishiguro K, Shoji M, Harigaya Y, Westaway D, St George-Hyslop P, Moechars D, Okamoto K. Analysis of transgenic mice overexpressing mutant tau and GSK-3 . . . 第26回日本認知症学会(大阪)．2007. 10. 15.

⑥ 池田将樹，牧岡幸樹，中曾根 愛，岡本幸市．ゲルゾリン遺伝子変異(D187N)を認め、大きく異なる臨床像を呈したIV型FAP の2家系の解析．第48回日本神経学会総会(名古屋)．2007.5.16

〔産業財産権〕

○取得状況(計1件)

名称：パーキンソン病モデルトランスジェニックマウス

発明者：池田将樹、山田秀一、東海林幹夫

権利者：池田将樹、山田秀一、東海林幹夫

種類：特許

番号：第4174212号

取得年月日：平成20年8月22日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 将樹 (IKEDA MASAKI)

群馬大学・医学部・講師

研究者番号：50222899

(2) 研究分担者

佐々木 惇 (SASAKI ATSUSHI)