

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390271

研究課題名（和文） アルツハイマー病におけるオリゴマーアミロイド蛋白の病因論に関する
基礎研究研究課題名（英文） The molecular mechanism for A β oligomer hypothesis in Alzheimer's
disease

研究代表者

森 啓 (MORI HIROSHI)

大阪市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：10159189

研究成果の概要（和文）：アルツハイマー病の発症原因として議論されている A β オリゴマー仮説について検証した。A β オリゴマー仮説の病因論としての正当性と重要性について、遺伝性アルツハイマー病の分子基盤を解明し、分子機構について培養細胞やモデルマウスを作製して、神経細胞内に A β オリゴマーが異常蓄積することが発症原因である証拠を発見した。今後、A β オリゴマーの検査と治療薬開発によりアルツハイマー病医療が展開すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We here provided in vivo and in vitro evidence to support A β oligomer hypothesis that is widely believed to be the most reliable idea to understand Alzheimer's disease. To verify its certification, we examined not only patients with familial AD by clinical and brain imaging analyses but also a new mouse model bearing solely A β oligomer. We found the abnormal accumulation of intraneuronal A β oligomer as a beginning pathological change. Thus more concern must be concentrated on A β oligomer to develop its measurement for the precise diagnosis and the treatment for the proper medication.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2010年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2011年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度			
年度			
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学

キーワード：アミロイド、遺伝変異、モデルマウス、認知症

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病発症の仕組みについてアミロイド老人斑説が流布定着していたが、ワクチンの臨床治験により脳内老人斑の除去に成功したにもかかわらず病状が進行した事実から、病因論について根本的な見直しが必要と迫られていた。

アミロイドワクチンの挫折と平行して A β オリゴマーの存在が提唱され、新たな病因分子として注目が集まっていた。ただ、A β オリゴマーについては試験管あるいはマウスでの実験結果であり、疾患患者の証拠がなかったことから、臨床現場では注目されなかった。我々は、当付属病院での外来患者である家族

性アルツハイマー病患者を分析する過程で A β オリゴマーによってアルツハイマー病を発症していることを示唆する最初の症例となる証拠を発見した。

この背景から、アルツハイマー病における A β オリゴマーの病因論的意義を明らかにする目的で本研究の申請をした。

2. 研究の目的

A β オリゴマーについては、諸説が提唱され、その分子構成および意義については確定していなかった。1998年に Klein らによって発表された ADDLs の分子量は 34kDa と記載されていたが、2003年になると 55kDa と表記されるようになった。類似の分子量をもつ A β オリゴマーが Ashe らによって A β *56 と命名された。

2002年には、Selkoe らが A β オリゴマーは二量体であると発表し、シナプス障害からアルツハイマー病が生じるとした。

本研究課題は、A β オリゴマーの意義そのものを検証すること、その病理学的な意義を調べることが目的としているが、同時に猶お結論のついていない A β オリゴマーについての概念を整理することも視野においた研究とされた。

3. 研究の方法

(1) アミロイドイメージング

PiB を当医学部付属病院のサイクロトロンにて [¹¹C] 標識し、島津製 PET カメラにて撮像した。画像は、PiB 注入後 30 分から 60 分のデータを処理して得ることとした。

(2) A β オリゴマーモデルマウスの作製

A β オリゴマーをコードする大阪変異を持つ APPcDNA をマウスプリオンプロモーター下流に導入した遺伝子コンストラクトをもつ Tg モデルマウスを作製した。

(2) 培養細胞を用いた A β オリゴマー発現の分析

リポフェクトアミン法により上記の大阪変異をふくむ APP 遺伝子を培養細胞に導入した。

(3) 共焦点レーザー顕微鏡観察

培養細胞の固定後にブロッキング処理をし、1 次抗体処理をした。洗浄後、蛍光標識 2 次抗体処理をし、洗浄後に蛍光退色保護材の入った包埋剤で封入したプレパラートをライカ社製共焦点レーザー顕微鏡観察によって観察した。

(4) SDS 電気泳動とウェスタンブロット

12%アクリルアミドゲルにて電気泳動後に、PGDF 膜状にドライブロットした。PBS 中にて 10 分間の熱処理により抗原性の賦活化をさせ、3%ミルク、0.1%Triton、TBS にてブロッキングした。1 次抗体処理後に 0.1% Tween20 を含む TBS にて洗浄後、ペルオキ

シダーゼ標識 2 次抗体処理をし、蛍光基質による染色をイルミネーターにて検出した。

4. 研究成果

(1) アミロイドイメージング

健常人と孤発性アルツハイマー病患者間の比較検討を中心とした解析の上に、早期発症型家族性アルツハイマー病を対象とした脳画像を取り上げることで、早期脳画像変化に焦点を絞った検討を実施した。第 2 に臨床的認知症度と PiB シグナルに基づく脳内アミロイド蓄積量との関係を検討した。第 3 に、PiB シグナルと FDG-PET シグナルを比較検討することで、脳機能とアミロイド蓄積量との関係を調査した。その結果、現行でグローバルに試用されている化合物として米国で開発された PiB 化合物については、PET シグナルが意味する画像解析は未完成であることから、多様な臨床症例にて分析が進んでいる。本研究においては、正常例、孤発性アルツハイマー病症例をベースに、家族性アルツハイマー病を対象とした本 PiB-PET 研究を中心に実施した。

図 1 に示すように典型的な正常者、AD そして移行期とも考えられている中間相ともいえる MCI (mild cognitive impairment) のアミロイドイメージングをします。予想および期待通り AD に陽性の高信号シグナルがみられ、認知症を示していない正常者あるいは MCI は、低シグナルであった。

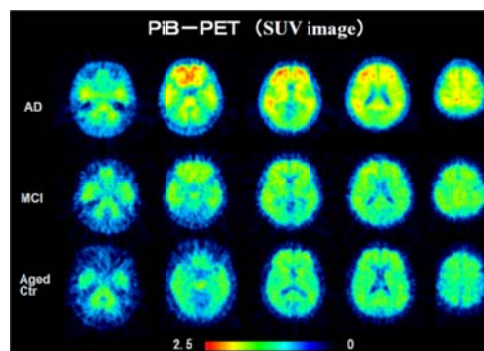


図 1 PiB-PET (脳アミロイドイメージング)

ただし、症例を重ねてに従い、正常者あるいは MCI にも PiB シグナル陽性が確認できることがおおく、診断面での特異性、優位性については課題が残ることが示された。カットオフ値、部位特異性などの議論で、さらなる詳細な検証が必要であり今後の改題であると結論された。

この特性について一定の制限があるものの、生前診断の初の試みとしての PiB-PET の可能性は少なくないと考えている。

次に、家族性アルツハイマー病の特徴として、線状体での高い PiB 保持率に対して皮質ではやや低い PiB 保持率であることが明らか

となった。しかも、臨床症状での多様性とは異なり、図2に示すようにPiBによる検討では脳内Aβ蓄積のパターンと程度は、各変異種によらないと結論した。孤発性ADと比較すると、皮質PiBシグナルがやや低く、対照的に線条体での高信号が特徴的であった(図2)。

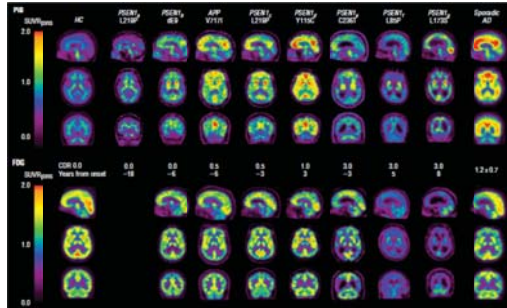


図2 家族性アルツハイマー病のPiB-PET

我々は、老人斑を持たないとされる家族性ADについても脳画像的、臨床的検討を進めたが、初期から中後期に至るまで予想通りPiBシグナルの陽性シグナルを検出できなかった。

(2) Aβオリゴマーマウスの作製

APP E693Δマウスは、現在主要原因分子として注目されているAβオリゴマーのみを発現するように工夫した新規アルツハイマー病モデルマウスである。これは、大阪変異(E693Δ)をもつ患者分析から得られた遺伝変異を、脳組織とりわけニューロン選択性の特異性が高いプリオンプロモーターの作用で発現するコンストラクトを作製し、マウスに導入したものである。

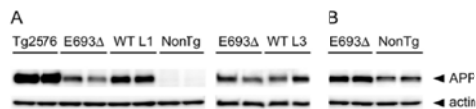


図3 Tgマウスに導入されたヒトAPP発現

図1にみられるようにアミロイド老人斑を形成しない大阪変異をもつAPPを導入されたモデルマウスにおけるAPP発現量は、通常のアミロイド老人斑モデルマウスTg2576や今回新たに作製した非変異型APPを導入された野生型モデルマウスよりも低い発原料であることがわかる。この低い発原料にもかかわらず、Aβオリゴマー系性能の高い大阪変異効果により、この新規モデルマウスは空間認知能力、学習の宇野展で、Tg2578に比べて、さらには野生型Tgマウスと比べても大きな認知症症状

を示すことが明らかとなった。

モデルマウスの認知諸機能、神経活動を実施した。まずwater mazeでの学習記憶試験をした結果、APP E693Δマウスでは記憶力の学習記憶障害が8ヶ月例以後に、経時的に顕著に確認された。また、記憶保持力に相当するプローブ試験でも有意に低下していることを観察した。

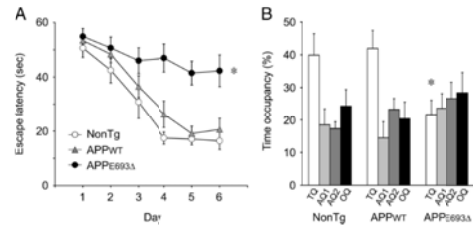


図4 Morris水迷路による認知機能テスト

ついで、姫路獨協大・薬・松山正剛先生との共同研究でシナプスでの長期増強作用(LTP)を検討した結果、non-Tgマウスでは正常であったLTP作用が、APP E693Δマウスではほぼ完全に障害されていることが観察された。

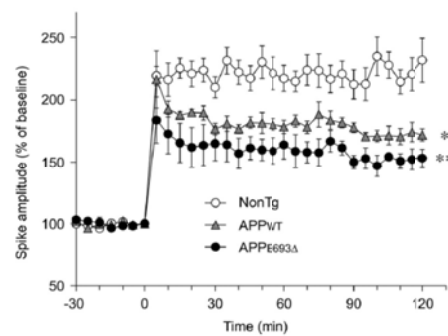


図5 モデルマウスにおける長期増強作用でのシナプス機能(○非Tgマウス、△野生型Tgマウス、●Aβオリゴマーマウス)

脳組織変化について脳病理学的検索をした。通常のアミロイド老人斑は、24ヶ月齢に至るまで観察できなかったし、micro-PETを用いたPiB-PETでも検出できなかった。一方、ニューロン内には、少ないAPP発現量にも関わらずAβの細胞内異常集積が観察された。しかも、この集積Aβは、Aβオリゴマー特異抗体(NU1;ノースウェスタン大学Klein博士よりご恵与)で認識されるADDLs様Aβオリゴマーであり、華麗に依存して蓄積することが判明した。

凍結脳組織を用いた生化学的検索であるSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動および転写後の抗体検出をしたところ、Aβオリゴマーの有意な上昇が認められた。脳神経病理で

も、ノースウェスタン大学Klein博士より供与された抗オリゴマー抗体による免疫組織化学的検索を実施した結果、APP E693 ΔマウスではAβオリゴマーのニューロン細胞内の異常蓄積が加齢と共に、行動異常の出現時期と同じくして確かめられた。

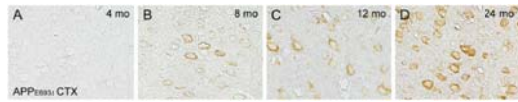


図6 ニューロンに異常蓄積するAβオリゴマー

脳萎縮は、神経脱落に起因するニューロン細胞死が原因で生じることが知られている。本研究では、その原因が細胞内Aβオリゴマーの異常蓄積であることをしめし、その作用機構が、小胞体ストレス、細胞内輸送機構の破綻だけではなく、ミトコンドリア機能障害に由来する可能性を強く示唆することができた。さらに、記憶障害という臨床症状については、同じく細胞内Aβオリゴマーの異常集積によってシナプス機能の破綻が生じることが原因であることを示した。このことは、シナプス特異分子であるシナプトフィジン免疫染色によって形態学的に、準定量的に示すことができた。最後に最近、生活習慣病によってアルツハイマー病の発症リスクが上昇することが議論されはじめ、いくらかの疫学的調査は脂質異常症、高血圧、糖尿病のリスクを示唆してきている。本研究では、アルツハイマー病モデルマウスに高コレステロール食餌を与えた場合、アルツハイマー病の最初期変化である細胞内Aβオリゴマーの異常蓄積が加速されることを示すことができた。その結果、記憶障害のテストである空間学習能力、シナプスフィジン低下、異常リン酸化タウの上昇が生じることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔原著論文〕(計 13 件)

- ① Umeda T, Tomiyama T, Kitajima E, Idomoto T, Nomura S, Lambert M.P, Klein W.L & Mori H. Hypercholesterolemia accelerates intraneuronal accumulation of Aβ oligomers resulting in memory impairment in Alzheimer's disease model mice. **Life Science** 90 (in press)(2012) 査読有り
- ② Shimada H, Ataka S, Tomiyama T, Takeuchi H, Mori H. & Miki T. Clinical Course of Patients with Familial Early-Onset Alzheimer's Disease Potentially Lacking Senile Plaques Bearing the E693delta Mutation in Amyloid Precursor Protein. **Dement Geriatr Cogn Disord** 32:45-54(2011) 査読有り
- ③ Shimada H, Ataka S, Takeuchi J, Mori H., Wada Y, Watanabe Y, & Miki T. Pittsburgh Compound B-Negative Dementia—A Possibility of Misdiagnosis of Patients With Non-Alzheimer Disease-Type Dementia as Having AD. **Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology** 24:123-126(2011) 査読有り
- ④ Umeda T, Tomiyama T, Sakama N, Tanaka S, Lambert MP, L.Klein W, & Mori H. Intraneuronal amyloid β oligomers cause cell death via endoplasmic reticulum stress, endosomal/lysosomal leakage, and mitochondrial dysfunction in vivo. **Journal of Neuroscience Research** 89:1031-1042(2011) 査読有り
- ⑤ Maeda J, M-R Zhang, Okauchi T, Bin Ji, Ono M, Hattori H, Kumata K, Iwata N, Saido T, Trojanowski J, Lee V, Staufenbiel M, Tomiyama T, Mori H., Fukumura T, Suhara T, & Higuchi M. In vivo positron emission tomographic imaging of glial responses to amyloid-β and tau pathologies in mouse models of Alzheimer's disease and related disorders. **Journal of Neuroscience** 31(12): 4720-4730(2011) 査読有り
- ⑥ Suzuki T, Murakami K, Izuo N, Kume T, Akaike A, Nagata T, Nishizaki T, Tomiyama T, Takuma T, Mori H., Irie K. E22delta Mutation in amyloid beta-protein promotes beta-sheet transformation, radical production, and synaptotoxicity, but not neurotoxicity. **International Journal of Alzheimers Disease** 2011: 431320-431327(2011) 査読有り
- ⑦ Mori H., Tomiyama T, Ishibashi K, Ohnishi K, Teraoka R, Fukushima A, Takuma H, Shimada H, Ataka S, Umeda T, Kitajima E, Fujita Y, Yamashita Y, Yamamoto K, Miki T, Matsuyama S. Iso H., Nagata T, Nishizaki T, Wada Y, Yoshioka E, Watanabe Y. Oligomeric Aβ is the sole culprit molecule to cause Alzheimer's disease? **Hirosaki Med Journal** 61(Suppl.): S105-S110(2010) 査読有り
- ⑧ Umeda T, Mori H., Zheng H, Tomiyama T. Regulation of cholesterol efflux by amyloid β secretion. **Journal of Neuroscience Research** 88:

- 1985-1994(2010)査読有り
- ⑨ Tomiyama T, Matsuyama S, Iso H, Umeda T, Takuma T, Ohnishi K, Ishibashi K, Teraoka R, Sakama N, Yamashita T, Nishitsuji K, Ito K, Shimada H, Mary Lambert, William Klein & Mori H. A mouse model of amyloid β oligomers: Their contribution to synaptic alteration, abnormal tau phosphorylation, glial activation, and neuronal loss in vivo. **Journal of Neuroscience** 30:4845-4856(2010)査読有り
- ⑩ Nagata T, Tomiyama T, Mori H, Yaguchi T & Nishizaki T. DCP-LA neutralizes mutant amyloid β peptide-induced impairment of long-term potentiation and spatial learning. **Behavioural Brain Research** 206: 151-154. (2010)査読有り
- ⑪ Villemagne V.L, Ataka S, Mizuno T, Brooks W. S, Wada Y, Kondo M, Jones G, Watanabe Y, Mulligan R, Nakagawa M, Miki T, Shimada H, O'Keefe G.J, Masters C.L, Mori H & Rowe C.C. High striatal amyloid β -Peptide deposition across different autosomal Alzheimer disease mutation types. **Archives of neurology** 66:1537-1544 (2009)査読有り
- ⑫ Nishitsuji K, Tomiyama T, Ishibashi K, Ito K, Teraoka R, Lambert MP, Klein WL & Mori H. The E693Delta mutation in amyloid precursor protein increases intracellular accumulation of amyloid beta oligomers and causes endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in cultured cells. **The American journal of pathology** 174:957-969(2009)査読有り
- ⑬ Ito K, Ishibashi K, Tomiyama T, Umeda T, Yamamoto K, Kitajima E, Idomoto T, Nagatomo T & Mori H. Oligomeric amyloid beta-protein as a therapeutic target in Alzheimer's disease: its significance based on its distinct localization and the occurrence of a familial variant form. **Current Alzheimer research** 6:132-136(2009)査読あり
- [学会発表] (計 19 件)
- ① Hiroshi Mori. Perspective on the role of oligomer in Alzheimer's disease. International Conference on Alzheimer's disease (AAICAD) 2011, Paris, France, 2011.7.16-21
- ② Tomohiro Umeda. Intraneuronal amyloid β oligomers cause cell death via endoplasmic reticulum stress, endosomal/lysosomal leakage, and mitochondrial dysfunction in vivo International Conference on Alzheimer's disease (AAICA) 2011 Paris, France, 2011.7.16-21
- ③ Sachiko Nomura. The E693 delta mutation in amyloid precursor protein impairs $A\beta$ -mediated cholesterol efflux from cells, leading to accelerated accumulation of Intraneuronal $A\beta$ oligomers and memory disturbance in mice with hypercholesterolemia. Neuroscience 2011, Washington DC, USA, 2011.11.14
- ④ 梅田知宙. The E693 Δ mutation in amyloid precursor protein impairs $A\beta$ -mediated cholesterol efflux from cells in vitro. 第 30 回日本認知症学会, タワーホール船堀(東京都), 2011.11.13
- ⑤ 森啓. アルツハイマー型認知症の根本治療薬開発の現状と展望. 第一回 認知症ケア学会・中国四国地方会, 米子コンベンションセンター(鳥取), 2010.12.5
- ⑥ 富山貴美. Intracellular $A\beta$ oligomers cause cell death via ER stress, lysosomal leakage, and mitochondrial dysfunction in cultured cells. 第 29 回日本認知症学会, ウィンクあいち(愛知県), 2010.11.5-7
- ⑦ 梅田知宙. Subcellular localization and toxicity of intracellular $A\beta$ oligomers in APP transgenic mice with the E693 Δ (Osaka) mutation. 第 29 回日本認知症学会, ウィンクあいち(愛知県), 2010.11.5-7
- ⑧ Takami Tomiyama. Intraneuronal accumulation of $A\beta$ oligomers causes abnormal tau phosphorylation, glial activation, and neuronal loss in transgenic mice with APP E693 Δ mutation. International Conference on Alzheimer's Disease (ICAD), ハワイコンベンションセンター(米国ホノルル), 2010.7.10-15
- ⑨ Tomohiro Umeda. Regulation of cholesterol efflux by amyloid β secretion. International Conference on Alzheimer's Disease (ICAD) ハワイコンベンションセンター (米国ホノルル) 2010.7.10-15
- ⑩ Erika Kitajima. Hypercholesterolemia accelerates memory impairment in a

transgenic mouse model of A β oligomers. International Conference on Alzheimer's Disease (ICAD) ハワイ コンベンションセンター(米国ホノルル) 2010.7.10-15

- ⑪ Hiroshi Mori. Beyond amyloid b fibrils. Wenner-Gren Foundations International Symposium "Alzheimer therapy: still a challenge" Wenner Gren Center, Stockholm, Sweden, 2009.5.6-9
- ⑫ 森 啓. 老人斑を越えて. 第24回日本老年精神医学会. パシフィコ横浜, 2009.6.19-20
- ⑬ 森 啓. アルツハイマー病はアミロイドが原因でおこる. 日本女性薬剤師会, 星薬科大学メインホール, 2009.6.21
- ⑭ Hiroshi Mori. Homozygous APP mutations and Alzheimer's disease. 12th International Conference on Alzheimer's Disease (ICAD) Vienna, Austria, 2009.7.11-16
- ⑮ Tomiyama Takami. A transgenic mouse model of amyloid β oligomers: Pathological effects of the E693A mutation in amyloid precursor protein in vivo. 12th International Conference on Alzheimer's Disease (ICAD) Vienna, Austria, 2009. 7.11-16
- ⑯ 富山貴美. A transgenic mouse model of amyloid β oligomers. 第28回日本認知症学会学術集会, 東北大学百周年記念会館・良陵会館, 2009.11.19-22
- ⑰ 梅田知宙. Regulation of cholesterol efflux by amyloid b secretion. (A β 分泌によるコレステロール efflux の制御) 第28回日本認知症学会学術集会, 東北大学百周年記念会館・良陵会館, 2009.11.19-22
- ⑱ 藤田 有紀. 高齢ホッキョクグマの脳神経病理学的剖検報告. 第28回日本認知症学会学術集会, 東北大学百周年記念会館・良陵会館, 2009.11.19-22
- ⑲ Hiroshi Mori. A β monomer, oligomer and fibril in Alzheimer's disease The International Symposium on Early Detection and Rehabilitation Technology of Dementia, Okayama Univ, 2009.12.11-12

[その他]

<http://www.med.osaka-cu.ac.jp/Neurosci/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 啓 (Mori Hiroshi)
大阪市立大大学院医学研究科・教授
研究者番号：10159189

(2) 研究分担者

松山 正剛 (Matsuyama Syogo)
姫路獨協大学・薬学部・教授
研究者番号：80243319

磯 博行 (Iso Hiroyuki)
神戸医療大学・共通教育センター・教授
研究者番号：80068585

(3) 連携研究者

該当なし