

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780283

研究課題名(和文) 加齢性神経原線維変化のモデル動物としてのイエネコの有用性

研究課題名(英文) The domestic cat as an animal model for age-related neurofibrillary tangles

研究代表者

チェンバース ジェームズ (Chambers, James K.)

東京大学・農学生命科学研究科・助教

研究者番号：00621682

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：イエネコを含む一部のネコ科動物の脳では、ヒトのアルツハイマー病で見られる神経原線維変化が形成されることを明らかにした。これらのネコ科動物では、アルツハイマー病の発病に關与する アミロイドのアミノ酸配列が他の多くの哺乳動物(イヌ、サル)と異なっており、脳における アミロイドの沈着パターンも異なっていた。また、神経原線維変化の程度が重度のイエネコでは、海馬の神経細胞が有意に減少していた。イエネコは、ヒトのアルツハイマー病の病態、特にA β とタウ蛋白質の關係と神経細胞変性に関する研究に有用な動物モデルと考えた。

研究成果の概要(英文)：The present study revealed that neurofibrillary tangles, one of the hallmark lesions of Alzheimer's disease in humans, are also developed in brains of aged felidae species including the domestic cat. These cats have an altered amino acid sequence in the beta amyloid (a protein involved in the onset of Alzheimer's disease) compared to other mammalian animals such as the dog and the monkey. The deposition pattern of beta amyloid in the cat brains were also different from that of dogs and monkeys. In cats with severe neurofibrillary tangles, the number of neurons in the hippocampus was significantly decreased. In conclusion, the domestic cat is likely to be a useful animal model for studying the pathology of Alzheimer's disease, especially the relation between beta amyloid, tau protein, and neurodegeneration.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：アルツハイマー病 神経原線維変化 アミロイド 比較病理学 神経病理学

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病(AD)の病理組織学的診断基準は、大脳皮質と海馬における β アミロイド($A\beta$)凝集による老人斑(SP)、および異常リン酸化タウ蛋白質の凝集による神経原線維変化(NFT)の形成である。ヒトでは、まずSP形成が先行し、続いてタウ蛋白質がリン酸化されてNFTを形成し、神経細胞が変性すると考えられている。いくつかの高等哺乳類で加齢性にSPが形成されることが知られているが、ヒト以外の動物でのNFTはこれまで殆ど報告されていない。また、大部分のADは非家族性であり、加齢以外の明らかな原因は分かっていない。申請者は、一部のネコ科動物(チーター、ヤマネコ、イエネコ)の脳に、加齢性に過剰リン酸化タウが沈着することを発見したので、この病変がヒトのアルツハイマー病で形成される神経原線維変化と同質であるか検討した。

2. 研究の目的

ネコとヒトのNFTを病理学的に比較し、NFT研究のモデル動物としてのネコの有用性を評価することを目的として、以下のことを研究した。

(1) 様々な年齢のネコの脳におけるタウ蛋白質分子種(3リピータウ、4リピータウ)の発現パターンを解析。NFTの病理組織学的特徴(分布、細胞種)を解析。凝集した高リン酸化タウ蛋白質の分子種を特定。

(2) ネコ $A\beta$ N末端領域のアミノ酸配列の同定、およびネコ型 $A\beta$ の凝集性評価。 $A\beta$ オリゴマーの検出。細胞内の局在解析。

(3) ネコNFTによる海馬神経細胞傷害の有無および程度を評価。

3. 研究の方法

(1) 材料

イエネコ24頭(胎子から20歳齢)の大脳ホルマリン固定材料および凍結材料を用いた。また、動物種差を比較する目的で、イエネコの近縁種であるツシマヤマネコ14頭(3日齢から15歳以上)の大脳パラフィンブロックを用いた。ツシマヤマネコの材料については環境省の許可のもと鹿児島大学獣医病理学研究室および山口大学獣医病理学研究室からサンプル提供を受けた。

(2) 方法

免疫染色により、様々な年齢の脳におけるタウ蛋白質の発現アイソフォームを調べた。また、過剰リン酸化タウおよび $A\beta$ が沈着する年齢および分布を調べた。過剰リン酸化タウについては、ユビキチンおよびGSK3 β との共局在を蛍光二重染色により検討した。 $A\beta$ については、C末端とN末端を認識する抗体による染色性を確認した。また、ギ酸処理と熱処理による染色性の違い、および細胞内の局在を検討した。

イエネコのゲノムデータベースを参考に、 $A\beta$ 領域のプライマーを設計し(foward

primer 5'- AGATCCGGTCCCAGGTTATG-3'
reverse primer 5'-

GTCGACCTCCACGACACC-3')、ツシマヤマネコの大脳パラフィンブロックから抽出したtotal RNAから $A\beta$ の塩基配列を解読した。

ツシマヤマネコのパラフィンブロックから電顕標本を作成し、超微形態を観察した。

イエネコの脳凍結サンプルからタウ蛋白質と $A\beta$ を抽出し、ウェスタンブロッティングおよびドットプロットを行った。様々な年齢で生理的に発現されているタウ蛋白質のアイソフォームを同定した。さらにサルコシル不溶性の高リン酸化タウを構成するアイソフォームを同定した。 $A\beta$ については、oligomerの検出を試みた。

イエネコの海馬錐体細胞の数を計測し、加齢およびNFT形成による神経細胞の傷害程度を評価した。

4. 研究成果

(1) イエネコとツシマヤマネコの両方において、老齢個体の一部で高リン酸化タウの沈着がみられた。軽度の個体は主に嗅内野に、重度の個体は嗅内野から海馬および側頭葉皮質に高リン酸化タウが沈着していた。沈着物はガリアスブランク染色陽性。ツシマヤマネコの脳において、超微形態学的に直線状または捻れた線維状構造物が神経細胞体に観察された。蛍光二重染色により、高リン酸化タウは主に神経細胞に沈着し、一部で稀突起膠細胞にも沈着していることを確認した。星状膠細胞には高リン酸化タウは観察されなかった。高リン酸化タウに一致してユビキチンおよび非リン酸化型GSK3 β が陽性。イエネコの脳凍結サンプルのサルコシル不溶分画のウェスタンプロットでは、高リン酸化タウ(AT8抗体およびAT100抗体)バンドの分子量と一致して3リピータウ(RD3抗体)および4リピータウ(RD4抗体)陽性バンドが検出された。以上の結果から、老齢ネコの脳に沈着する高リン酸化タウは、嗜銀性NFTを形成する、沈着する細胞種および脳内の分布がADと同じ、凝集性タウ(サルコシル不溶分画)を構成するタウアイソフォームがADと同じであることを明らかにした。

(2) イエネコの $A\beta$ は、N末端7番目のアミノ酸がヒト型 $A\beta$ と異なることに着目した(ネコ:グルタミン酸、ヒト:アスパラギン酸、UniProtデータベースより)。本研究では、ツシマヤマネコの $A\beta$ のmRNAから塩基配列を解読し、イエネコと同じアミノ酸配列を有することが分かった。また、これらのネコ科動物の脳に沈着する $A\beta$ は、ヒト型 $A\beta$ のN末端に対する抗体($A\beta$ N1および $A\beta$ pN3)で染色されなかった。ネコ型 $A\beta$ はヒト型 $A\beta$ と比べて凝集性が乏しく、微細顆粒状に沈着する。嗜銀性SPは形成されなかった。in vitroの凝集性試験についてのデータは、現段階で公表できない。また、ギ酸処理をせずに免疫

染色をした場合、海馬の錐体細胞に Aβ 凝集物が観察され、同凝集物は late endosome マーカーである Rab9 と一部で共局在した。Aβ オリゴマーの解析結果については、論文執筆のため公表できない。

以上の結果から、これらのネコ科動物は他の哺乳類と Aβ のアミノ酸配列が異なり、沈着パターンが異なることが分かった。

(3) 若齢イエネコ (Aβ 沈着なし、高リン酸化タウ沈着なし、平均年齢 3.7 歳、n=3)、老齢イエネコ (Aβ 沈着あり、海馬に高リン酸化タウ沈着なし、平均年齢 18 歳、n=3)、老齢イエネコ (Aβ 沈着あり、海馬に高リン酸化タウ沈着あり、平均年齢 17.6 歳、n=3) を比較したところ、海馬にタウ沈着がみられる老齢ネコでは海馬 CA1 錐体細胞が有意に減少していることが分かった。

以上の結果をまとめると、ネコ科動物の Aβ はヒト型 Aβ (サル、イヌなどの高等哺乳類はヒト型 Aβ を保有する) とアミノ酸配列が異なり、凝集性が弱いことが示唆された。一方で、ネコ科動物では AD と同質の NFT が形成され、NFT の形成にともなって海馬の神経細胞が脱落する。ネコ科動物の NFT はヒトの AD と類似しており、NFT 研究のモデルとして応用可能である。また、少なくとも一部のネコ科動物は進化の過程で他の動物種と異なる Aβ のアミノ酸配列を獲得したと考えられる。これらの動物で NFT が高頻度に形成されることを考慮すると、ネコ型 Aβ が NFT の形成に関与している可能性が考えられた。

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 2 件)

Chambers JK, Uchida K, Harada T, Tsuboi M, Sato M, Kubo M, Kawaguchi H, Miyoshi N, Tsujimoto H, Nakayama H. Neurofibrillary tangles and the deposition of a beta amyloid peptide with a novel N-terminal epitope in the brains of wild Tsushima leopard cats. PLoS One. 2012;7(10):e46452. doi: 10.1371/journal.pone.0046452. 査読有

チェンバース ジェームズ, 内田和幸, 中山裕之, ツシマヤマネコの脳におけるアルツハイマー病関連病変, 遺伝, 2013, 67 巻, 4 号, 425-430, 査読無

[学会発表](計 6 件)

高橋映里佳, 鳥山理恵子, チェンバース ジェームズ, 亀谷富由樹, 宇根有美, 老齢ネコ科動物の脳における アミロイド沈着と高リン酸化タウ蓄積, 第 156 回日本獣医学会学術集会 日本獣医病理学会, 2013 年 9 月 21 日, 岐阜大学

渡邊謙一, 内田和幸, チェンバース ジェームズ, 鄭明奈, 中山裕之, 獣医学領域におけるアミロイドーシス, 第 1 回日本アミロイドーシス研究会学術集会, 2013 年 8 月 30 日, 東京 (KKR ホテル)

チェンバース ジェームズ, 高齢ネコの脳における高リン酸化タウ沈着, 2013 タウ研究ミーティング, 2013 年 8 月 9 日, 愛知 (あいち健康プラザ), 招待講演

チェンバース ジェームズ, 日本獣医病理学会優秀論文賞受賞講演, 第 155 回日本獣医学会学術集会 日本獣医病理学会, 2013 年 3 月 29 日, 東京大学, 招待講演
チェンバース ジェームズ, アルツハイマー病関連病変の比較動物学, 第 155 回日本獣医学会学術集会 生理学・生化学分科会シンポジウム, 2013 年 3 月 28 日, 東京大学, 招待講演

チェンバース ジェームズ, 内田和幸, 坪井誠也, 久保正仁, 川口博明, 三好宣彰, 中山裕之, ツシマヤマネコの脳に認められた神経原線維変化およびベータアミロイド沈着, 第 53 回神経病理学会総会学術研究会, 2012 年 6 月 28-30 日, 新潟 (朱鷺メッセ), 優秀ポスター受賞

[図書](計 0 件)

[産業財産権]
出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

チェンバース ジェームズ (CHAMBERS, James)

東京大学大学院・農学生命科学研究科・助教
研究者番号：00621682

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：