

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25290018

研究課題名(和文)A オリゴマーに基づくアルツハイマー病の発症機序の解明

研究課題名(英文) The molecular action of Abeta oligomer on 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・特任教授

研究者番号：10159189

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病の治療薬開発のために、現在最も有望なAbetaオリゴマー仮説を検証した。オリゴマーマウスに、新たにヒト型タウを導入した結果、記憶障害などアルツハイマー病の諸要件を再現するモデルを作製した。さらに、同モデルを用いた薬剤投与実験によりリファンピシンに空間認知能力や病変に改善効果を見出した。これらにより、オリゴマー仮説を検証できたこと、今回得られた新モデルが今後の薬剤スクリーニングに最適モデルとなると考えている。

研究成果の概要(英文)：We examined the most promising Abeta oligomer hypothesis for therapeutic drug development of Alzheimer's disease. By additional introduction of human tau into an Abeta-oligomer mouse, we succeeded in making a new model to mimic Alzheimer's disease. Furthermore, we found an improvement effect with ability for space recognition or other pathological changes to rifampicin by the drug dosage experiment using the model. Hence, we believe that the Abeta oligomer is certificated with the new model, which are supposed to be suitable for future drug screening.

研究分野：認知症病態学

キーワード：脳神経疾患 痴呆 老化 アミロイド オリゴマー

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病脳病変の生化学的分析と家族性 AD の解析からアミロイド (・・) 仮説が提唱されてきたが、具体的にはアミロイド線維 (老人斑) 沈着を標的にした仮説であり、アミロイドワクチンの臨床治験から根拠を失ったといえる (Holmes et al (2008) *Lancet*)。一方、非線維性・・オリゴマー仮説が急速に普及し始めている (Selkoe (2002) *Science*)。Klein の ADDL (Lambert et al (1998) *PNAS*) や Ashe の ・・*56 (Lesne et al (2006) *Nature*) も同様に主張している。しかしながら、A・オリゴマー仮説が旧来のアミロイド仮説に取って代わるためには、クリアすべき課題として、人での検証、患者脳内での A・オリゴマーの確認が必要である。

申請者らは、家族性 AD 症例の分析 (*Arch Neurol.*, 2004; *Ann Neurol.*, 2008) から、・・オリゴマー病因説を支持するヒトでの証拠を世界で初めて提示することで、1つ目の課題をクリアした。さらに、この発見を強固にするために・・オリゴマー発現細胞やマウスモデル作製・解析にも成功している (*Am J Pathol.*, 2009

; *J Neurosci.*, 2010)。本研究課題では、2つ目の課題への正面からさらなる挑戦をする事とした。

2. 研究の目的

アルツハイマー病の発症にはアミロイド蛋白が鍵分子になっているが、従来のアミロイド仮説から脱皮した新しい Abeta オリゴマー仮説の検証は未だ不十分である。治療薬開発の為に、発症機構の解明は重要であり、本研究では、Abeta オリゴマー仮説の検証を基礎とした発想で、病因 Abeta 分子種を正面から取り上げたい。その研究成果を展開するために、まずアルツハイマー病を完全に再現する新モデルマウスの作成をすることにより、臨床診断と治療薬開発の現実化を目指した translational research と病因カスケードシグナルの解明と、具体的な治療薬候補による Abeta オリゴマー仮説の検証をすることが目的である。

3. 研究の方法

本研究は、独創性ある変異型・・オリゴマーを軸に、モデル動物などの研究資材の開発と、応用例による検証が重要な課題となっている。

(1)

(1) アルツハイマー病 (AD) のモデルマウスの作成、交配、繁殖、飼育

・・オリゴマー取り扱い技術 (電気泳動、特異的ではないが・・オリゴマーを検出できるポリクローナル抗体、免疫電顕、共焦 2) 点レーザー顕微鏡、LTP 神経興奮測定、モデルマウスの行動解析法) を、交配によって

作製する新たなモデルマウス解析に適用する。

今回 Abeta オリゴマーマウスは、プリオンプロモーター下流に大阪変異をもつヒト APP を発現する Abeta オリゴマーマウス (単に、オリゴマーマウス) に、ヒトタウ遺伝子を導入する事にした。タウ遺伝子は、タウ 441 型 cDNA であるが、エクソン 10 を挟むイントロン 9 とイントロン 10 を組み入れたミニゲノム型ヒトタウ遺伝子である。このイントロンの存在により、マウスの発達過程で、3 リpeat型タウから 3+4 型リpeatタウの発言を生理学的に再現する事ができた。従来のモデルでは、cDNA モデルであり、リpeat数が固定され、正常モデルとは言えなかった。一方、ヒトゲノム全体を導入したモデルも発表されていたが、発現変化は無く、正常な生理的遺伝子発現をする保証が示されていない。

これら両遺伝子を発現するモデルマウスは、マウス尻尾から抽出したゲノム DNA の制限酵素断片マップにより同定し、目的とするマウスだけを選別飼育し、実験に使用した。

(2) ヒト AD およびモデルマウス脳病変 Abeta オリゴマーの検証

脳組織は、TBS (50mM Tris-HCl, pH 7.6, 150mM NaCl)、1% Triton X-100/TBS、1% SDS/TBS により、磨砕、遠心後に上清画分と沈渣画分に分離し、沈渣は洗浄後、再度遠心後に上清画分と沈渣画分に分離される事で、順々に、不要成分を抽出した。これらの分画くに含まれる Abeta オリゴマーを電気泳動後、ドライプロットによる添書後、1% Skim ミルクを含む 1% Triton/TBS にてブロック処理を行い、一次抗体、洗浄、2 次抗体、洗浄化学発光を実施し、免疫反応した蛋白バンドを検出した。

(3) 認知症能力テスト

脳組織の組織染色、海馬 LTP 生理学検査、water maze による空間認知機能検査を実施した。

4. 研究成果

まずモデルマウスでの Abeta 作用の詳細な分析を展開し、次に、。

(1) アルツハイマー病 (AD) のモデルマウスの作成、交配、繁殖、飼育

Abeta オリゴマーマウスは、空間認知所為機能障害を引き起こすが、老人斑やタウ病は観察されなかった。そこで、ヒトタウ遺伝子を生理的に発言するモデルマウスを作成し、Abeta オリゴマーマウスとの交配マウスを作成した。

その結果、タウ遺伝子に変異の内野生型タウを発現するマウスは、2 年間の長期市域後においても、神経原線維変化などのタウ病変は

全く認められなかったが、Abeta オリゴマーによって、神経原線維変化が誘導される事が解明された。つまり、両病変の相互作用が示されたと結論した。

この変化は、まず Abeta オリゴマーが出現し、同時に空間認知機能が障害された。その後、タウの異常リン酸化が出現し、ミクログリアの活性化、アストログリアの活性化が惹起され、最終的に神経原線維変化とニューロン細胞死。細胞脱落が観察された。野生型アミノ酸配列での神経原性変化の形成は、我々の研究によって観察されたが、いわゆる非遺伝性の孤発性アルツハイマー病の病態を再現していると考えている。

(2) Abeta オリゴマーの作用

つぎに、これまで Abeta オリゴマー作用として、最も再現性良く証明されているのは、シナプスの生理機能である LTP 障害であるが、ここでは、さらに LTP 障害を裏打ちする形態変化について注目する事にした。

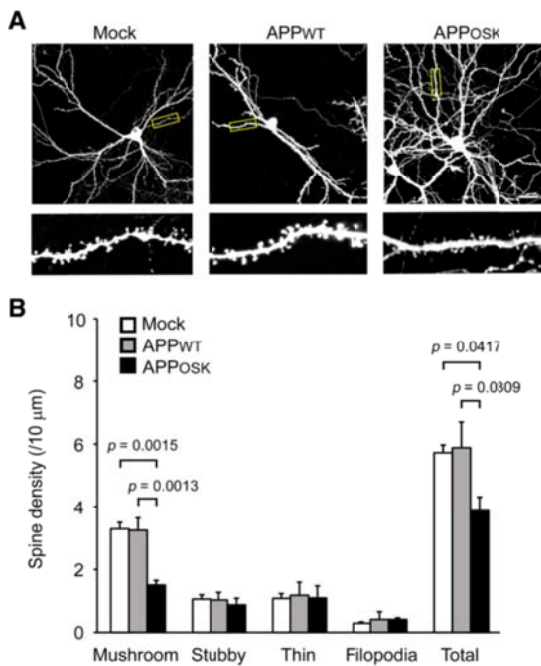


図 1 樹状突起須パインの形状

A. マウス胎児脳から調製した初期培養ニューロンに GFP と APP 遺伝子を導入した後の蛍光顕微鏡観察像。 B. 多様なスパイン分類と Abeta オリゴマーによる障害の比較。

ニューロンの電気信号の連絡は、軸索末端のプレ側と樹状突起のスパイン部にあるポスト側の結合部（シナプス）で化学伝達物質の放出と、受容によって成立する。とくに、ポスト側には、特別な形態学的特徴があり、様々な敬愛が報告されている（図 1A）。Abeta オリゴマーは、キノコ型および成熟型ポストシナプスの形態を著しく障害することが示された（図 1B、図 1C）。

次に、シナプス機能の活性維持に必要な細胞器のリサイクルについて検討したところ、とりわけ BDNF、ミトコンドリア、エンドソームの細胞内輸送が障害された（図 2）。

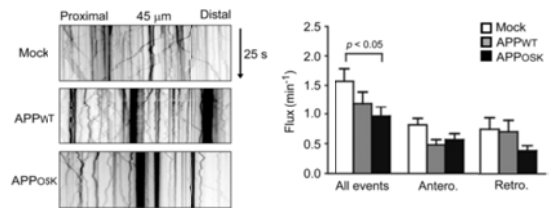


図 2 神経突起内での細胞輸送への Abeta オリゴマー作用

(左) 25 秒間の輸送レコード。(右) Abeta オリゴマーは輸送速度を低下させるように作用する。

(3) 新規モデルマウスによる薬剤スクリーニングの検証による Abeta オリゴマー仮説の検証

Abeta オリゴマーの実態は、なお結論されていないが現時点で 2 量体、3 量体をけんとうすることが認められている。

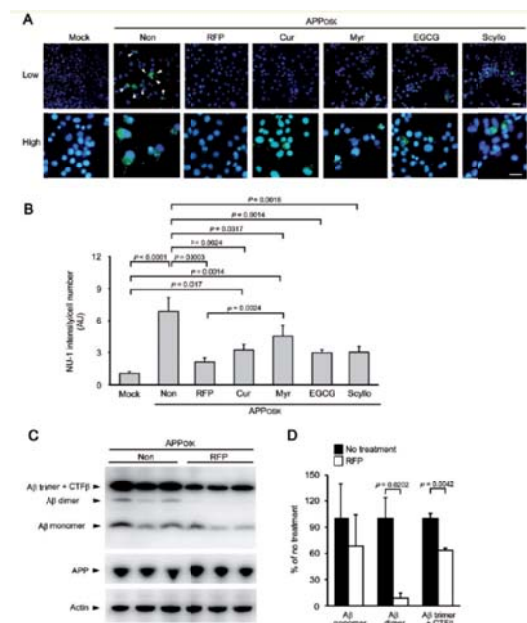


図 3 Abeta オリゴマー病因分子への薬剤効果

A. Abeta オリゴマーは NU-1 抗体によって蛍光検出した。B. Abeta 結合作用を持つ薬剤による Abeta オリゴマーへの作用。C. リファンピシンによる Abeta オリゴマー（特に、2 量体、3 量体/ β 断片）形成への作用。D. リファンピシンによる Abeta オリゴマーへの定量的な効果検定

ここでは、アルツハイマー病治療への薬剤候

補として注目されている化合物を Abeta 結合性から検討した。リファンピシン、クルクミン、EGCG (エピガロカテキン)、ミリセチン、シロイノシトールを検討したが、いずれも効果の大小はあるが Abeta オリゴマーを減少させる効果があったが、とくにリファンピシンが顕著な効果をもつこと確認された。

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 11 件)

- ① Umeda T., Ono K., Sakai A., Yamashita M., Mizuguchi M, Klein W.L., Yamada M., Mori H., Tomiyama T.*
Rifampicin is a candidate preventive medicine against amyloid β and tau oligomers. *Brain* 139(5):1568-1586(2016) 査読有り DOI: 10.1093/brain/aww042
- ② Kutoku Y, Ohsawa Y, Kuwano R, Ikeuchi T, Inoue H, Ataka S, Shimada H, Mori H & Sunada Y.
A Second Pedigree with Amyloid-less Familial Alzheimer's Disease Harboring an Identical Mutation in the Amyloid Precursor Protein Gene (E693 delta). *Internal medicine* 54(2):205-208(2015) 査読有り DOI:10.2169/internalmedicine.54.3021
- ③ Umeda T., Ramser E.M., Yamashita M., Nakajima K., Mori H., Silverman M.A., Tomiyama T.*
Intracellular amyloid β oligomers impair organelle transport and induce dendritic spine loss in primary neurons. *Acta Neuropathol. Commun.*, 3:51(2015) 査読有り doi: 10.1186/s40478-015-0230-2
- ④ Honjo Y., Ayaki T., Tomiyama T., Horibe T., Ito H., Mori H., Takahashi R., Kawakami K.*
Increased GADD34 in oligodendrocytes in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.*, 602:50-55(2015) 査読有り doi:10.1016/j.neulet.2015.06.052
- ⑤ Umeda T., Eguchi H, Kunori Y, Matsumoto Y, Taniguchi T, Mori H., Tomiyama T.
Passive immunotherapy of tauopathy targeting pSer413-tau: a pilot study in mice. *Ann Clin Transl Neurol.* 2(3):241-255(2015) 査読有り DOI: 10.1002/acn3.171
- ⑥ Honjo Y, Horibe T, Torisawa A, Ito H, Nakanishi A, Mori H., Komiya T, Takahashi R, Kawakami K.
Protein Disulfide Isomerase P5-Immuno-
- nopositive Inclusions in Patients with Alzheimer's Disease *J Alzheimer's Dis* 38:601-609(2014) 査読有り DOI: 10.3233/JAD-130632
- ⑦ Umeda T., Maekawa S, Kimura T, Takahima A, Tomiyama T., Mori H.
Neurofibrillary tangle formation by introducing wild-type human tau into APP transgenic mice *Acta Neuropathol* 127:685-698(2014) 査読有り DOI:10.1007/s00401-014-1259-1
- ⑧ Takano M, Yamashita T, Nagano K, Otani M, Maekura K, Kamada H, Tsunoda S, Tsutsumi Y, Tomiyama T., Mori H., Matsuura K, Matsuyama S.
Proteomic analysis of the hippocampus in Alzheimer's disease model mice by using two-dimensional fluorescence difference in gel electrophoresis. *Neurosci Lett* 534:85-89(2013) 査読有り doi.org/10.1016/j.neulet.2012.11.010
- ⑨ Kondo T, Asai M, Tsukita K, Kutoku Y, Ohsawa Y, Sunada Y, Imamura K, Egawa N, Yahata N, Okita K, Takahashi K, Asaka I, Aoi T, Watanabe A, Watanabe K, Kadoya C, Nakano R, Watanabe D, Maruyama K, Hori O, Hibino S, Choshi T, Nakahata T, Hioki H, Kaneko T, Naitoh M, Yoshikawa K, Yamawaki S, Suzuki S, Hata R, Ueno S, Seki T, Kobayashi K, Toda T, Murakami K, Irie K, Klein WL, Mori H., Asada T, Takahashi R, Iwata N, Yamanaka S, Inoue H.
Modeling Alzheimer's disease with iPSCs reveals stress phenotypes associated with intracellular A β and differential drug responsiveness. *Cell Stem Cell* 12:487-496(2013) 査読有り doi.org/10.1016/j.stem.2013.01.009
- ⑩ Umeda T., Yamashita T, Kimura T, Ohnishi K, Takuma H, Ozeki T, Takashima A, Tomiyama T., Mori H.
Neurodegenerative Disorder FTDP-17-Related Tau Intron 10 +16C \rightarrow T Mutation Increases Tau Exon 10 Splicing and Causes Tauopathy in Transgenic Mice. *Am J Pathol.* 183:211-225(2013) 査読有り doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.03.015
- ⑪ Nomura S , Umeda T., Tomiyama T., Mori H.
The E693D (Osaka) Mutation in Amyloid Precursor Protein Potentiates Cholesterol-Mediated Intracellular Amyloid β Toxicity Via Its Impaired Cholesterol Efflux. *J Neurosci Res* 91:1541-1550(2013) 査読有り DOI: 10.1

〔学会発表〕（計 12 件）

- ① **梅田知宙** Ser413 リン酸化タウを標的としたタウオパチーの受動免疫療法の開発. 第 88 回生化学会大会. 2015. 12. 4 神戸ポートピアホテル（兵庫県神戸市）
- ② **富山貴美** 認知症治療研究の新展開. 第 33 回日本神経治療学会総会. 2015. 11. 28. 名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）
- ③ **梅田知宙** Osaka mutation の発見と A β オリゴマーの毒性. 第 34 回日本認知症学会学術集会 2015. 10. 4. リンクステーションホール青森（青森県青森市）
- ④ **梅田知宙** Intracellular A β Oligomers Cause Tau-Independent Spine Alteration and Defect of Axonal and Dendritic Transport. 第 58 回日本神経化学会大会. 2015. 9. 13. 大宮ソニックシティ（埼玉県さいたま市）
- ⑤ **Takami Tomiyama** Passive immunization with a new monoclonal antibody to phosphor-Ser413-tau attenuates tauopathy phenotypes in mice. The 12th International Conference on Alzheimer's and Parkinson's Diseases and Related Neurological Disorders. 2015. 3. 21. Nice (France)
- ⑥ **Tomohiro Umeda** Intraneuronal amyloid β oligomers cause aberrant spine morphology and disrupt axonal and dendritic trafficking independently of tau. The 12th International Conference on Alzheimer's and Parkinson's Diseases and Related Neurological Disorders. 2015. 3. 18. Nice (France)
- ⑦ **森 啓** 神経変性疾患における記憶障害考. 第 18 回日本神経精神医学会. 2013. 12. 13. 千里ライフサイエンスセンター（大阪府吹田市）
- ⑧ **森 啓** 認知症医療施策オレンジプラン 2012 について. 第 7 回日本薬局学会学術総会・特別講演. 2013. 11. 24 大阪国際会議場（大阪府大阪市）
- ⑨ **森 啓** 脳神経外科医が支える認知症医療. 第 72 回日本脳神経外科学会学術総会・特別講演. 2013. 10. 16. パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）
- ⑩ **森 啓** 認知症の先進医療に必要な診断と戦略. 第 3 回日本認知症予防学会. 2013. 9. 27. 新潟朱鷺メッセ（新潟県新潟市）
- ⑪ **森 啓** 認知症医療の新展開：オレンジプラン施策考察. 第 46 回日本薬剤士会学術大会・特別講演. 2013. 9. 22 リーガロイヤルホテル（大阪府大阪市）
- ⑫ **森 啓** 日本における認知症医療の新展開：オレンジプランを踏まえて. 第 23 回日本医療薬学会 2013. 9. 21. 東北大学（宮城県仙台市）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：ノックインマウス
 発明者：森啓、富山貴美、梅田知宙、森田隆、吉田佳世
 権利者：公立大学法人大阪市立大学
 種類：特許
 番号：PCT/JP2014/53555
 出願年月日：2014 年 2 月 14 日
 国内外の別：外国

〔その他〕

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 啓 (Mori, Hiroshi)

大阪市立大学・大学院医学研究科・特任教授

研究者番号：10159189

(2) 研究分担者

富山 貴美 (Tomiyama, Takami)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：10305633

(3) 研究分担者

梅田 知宙 (Umeda, Tomohiro)

大阪市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：70549790