

アルツハイマー病研究チーム

Laboratory for Alzheimer's Disease

チームリーダー 高島 明彦

TAKASHIMA, Akihiko

アルツハイマー病は脳血管性痴呆と並ぶ代表的な老人性痴呆疾患の1つである。この病気は進行に伴って記憶認知障害を引き起こし末期には高度の痴呆状態となる。高齢化時代を迎えた現在、アルツハイマー病を含めて老人性痴呆症疾患の成因解明と治療法の確立は社会的に重要な問題である。当研究チームでは(1)痴呆症の原因となっている神経変性、すなわち神経細胞死や神経原線維変化の成因について β -アミロイド、タウ、プレセニリンのキーワードから研究を行い動物モデルの作製を行う。(2)この動物モデルを用いて治療法確立へ向けて検討を行う。更に(3)老人性痴呆症を引き起こす素過程としての脳老化の実体を明らかにし、その分子機構を解明する。

1. β -アミロイドとアルツハイマー病の関係

酵母を用いた APP 代謝系の構築 (村上, 高島)

生体膜研究室 (中野明彦主任) との共同研究により、タンパク質の細胞内輸送について研究が最も進んでいる出芽酵母を用い、APP の輸送を詳細に解析する系を構築した。ヒト APP cDNA に酵母の性フェロモン α 因子のシグナル配列を付与した酵母発現用ベクターを作製した。この発現系を用いて APP 代謝を検討したところ、APP は酵母内でも α -セクレターゼによって切断が起こり N 末端フラグメント、C 末端フラグメントが生成されることを確認した。さらに酵母温度感受性分泌変異株 *sec12*, *sec7*, *sec4* を用いてタンパク質輸送を小胞体、ゴルジ体、細胞膜でそれぞれ停止させると、*sec12* では APP 代謝は完全に阻止され、ゴルジ体 (*sec7*)、細胞膜 (*sec4*) で輸送をブロックすると APP 代謝の減少が観察された。つまり、酵母において α -切断はゴルジ体以降で生じている。このように、APP の輸送と代謝の関係を明確にする上で、酵母分泌変異株の利用は極めて有効であることが明らかになった。

また、APP は酵母においてもゴルジ型の糖鎖修飾を受けていることが分かった。O 結合型糖鎖修飾の変異株では APP の C 末端フラグメントの生成が減少していることが確認され、現在 APP の輸送/プロセッシングと糖鎖修飾の関係を検討中である。これらのことより、APP は酵母内でも糖鎖修飾を受け、ほ乳動物細胞の場合と同様に α -セクレターゼにより代謝されると結論した。今後、ヒトの β -セクレターゼ (BACE) および γ -セクレターゼに関与が示唆されているプレセニリン (PS1) を発現する酵母を作製し、さらに APP 代謝を検討していく予定である。

2. $A\beta$ と細胞毒性 (吉池, 高島)

$A\beta$ には大きく分けて $A\beta$ 40, と $A\beta$ 42 が細胞から分泌されている。家族性アルツハイマー病の研究からは $A\beta$ 42 の増大がアルツハイマー病発症に大きく関与すると考えら

れている。 $A\beta$ 42 は $A\beta$ 40 と比べて疎水性が高く凝集しやすいことが知られている。しかしながら、分泌量は $A\beta$ 40 の 10%以下であり家族性の遺伝子変異によってもそれらが 2~3 倍増大する程度である。この様な $A\beta$ 40/42 の割合の変化が細胞毒性に与える影響を *in vitro* モデルを用いて調べた。その結果 $A\beta$ 42 だけでは $A\beta$ が毒性を持つ凝集体形成は同濃度の $A\beta$ 40 と比べて少なかった。 $A\beta$ 40/42 が 50-20 という混合比では凝集体形成は $A\beta$ 40 のみの場合よりも早い。トータルの Aggregation は $A\beta$ 40 の場合と同じであった。 $A\beta$ 40/42 が 10 から 3 では凝集体形成の亢進と神経毒性の増大が観察された。すなわち、家族性アルツハイマー病での $A\beta$ 42 の増大は $A\beta$ 42 そのものが細胞毒性を示すわけではなく、 $A\beta$ 40 と共に毒性を持つ凝集体形成を増大させることによることが明らかになった。

3. $A\beta$ と神経原線維変化 (崔, 朴, 吉池, 村山, 高島)

$A\beta$ が脳で本当に神経細胞に作用するのかどうかをタウ Tg mouse を用いて調べた。繊維化した $A\beta$ を海馬 CA1 領域へインジェクションし経時的に神経原線維変化形成を観察した。インジェクション後 3 日目では溶媒のみインジェクションしたものとは比べて大きな差は観察されなかった。7 日目以降 21 日目までの観察では CA3, 4 および扁桃体に嗜銀性でリン酸化タウが蓄積した神経原線維変化を示す神経細胞を観察することができた。このことは、繊維化した $A\beta$ が神経細胞に作用し神経原線維変化形成を引き起こすことを示している。

4. 神経原線維変化形成から神経細胞死 (楯林, 宮坂, 村山, 高島)

(1) R406W Tau Transgenic Mouse の解析

ヒト型 R406W 変異タウを前頭部の神経細胞特異的に過剰発現したマウス (Tg マウス) を組織病理学および行動学的に解析した。組織病理学的には、約 18ヶ月齢の Tg マウスにおいて、タウタンパクの蓄積を伴う変性神経細胞を海馬を中心とした領域に認めた。これらの変性神経細胞は、Thioflavin S でも認識され神経原線維変化が生じている可能性を示唆した。これらの変性細胞はヒト型変異タウに加え野生型のマウスタウも蓄積しており、それらのタウは染色上、高度にリン酸化されていた。また、同時に細胞骨格系の異常も認められた。行動学的には他のヒト型タウを発現したマウスの多くに認められる神経原性の運動障害は全く認められない一方で、海馬および扁桃体依存性と考えられる恐怖記憶に異常が認められることを発見した。現在、異常リン酸化タウの蓄積のメカニズムをリン酸化、脱リン酸化酵素を中心に検討すると共に、行動異常の発症メカニズムを細胞内輸送系に対する変異タウの影響という方

向から検討中である。

(2) 変異タウトランスジェニックマウスの解析

R406W 変異タウを発現させたマウスについて、生化学的、病理学的解析を行った。初めに、これらマウス脳における変異タウの発現部位について、ウェスタンブロット法、免疫組織染色法により解析した。その結果、海馬、大脳皮質を中心とした、前脳領域に局限して発現していることを確認した。もっとも強く発現しているのは海馬で、その発現量は内在性のタウの約 20%程度であった。また、これら外来性のタウは生後から 1ヶ月齢にかけて徐々に発現が増加し、その後老齢まで安定して発現していた。次に、これら変異タウと、野生型タウのリン酸化状態について検討した。その結果、多くのリン酸化部位について野生型タウに比べ R406W 変異タウはリン酸化されにくいことが確認された。一方、内在性のマウスタウとリン酸化状態について比較したところ、外来性のタウは Ser-262 が強くリン酸化されていた。このリン酸化の違いについては、野生型タウ、V337M タウを発現させたタウについても保存されていた。18ヶ月齢以後のトランスジェニックマウス脳における生化学的解析の結果、サルコシルなどの界面活性剤に不溶性なタウの蓄積を認めた。さらに電子顕微鏡を用いた観察の結果、これらの画分中に抗タウ抗体に陽性な繊維を認めた。現在、その他のタウトランスジェニックマウスについても、同様な解析を進行中である。

5. タウ異常リン酸化機構とその役割(佐藤、楯林、高島)

アルツハイマー病(AD)の主要な病理学的所見として神経原線維変化が挙げられ、この構成成分であるタウは高度にリン酸化されている。しかし、異常なタウのリン酸化に関与するキナーゼが特定されるには至っていない。そのような見地から、我々はアデノウイルスベクターシステムを構築し、COS-7 細胞を用いてタウの異常リン酸化を Δ MEKK JNK3 と GSK-3 β を用いて AD 脳でリン酸化されている、Ser202Thr205(AT8 epitopes), Thr212Ser214(AT100 epitopes), Thr231Ser235(AT180 epitopes) およびその他の 12 部位において 2~3.4 倍のリン酸化の増加が認められた。さらに、この協調的なタウリン酸化は、ThioflavinS 陽性の不溶化したタウの凝集を引き起こした。電子顕微鏡による観察では、不溶化したタウは短い線維を形成し、pretangle 様の形態を示していた。以上の結果から AD タイプのタウの異常リン酸化は GSK-3 β 、および活性化 JNK によって引き起こされることが、さらにこの過剰なリン酸化はタウの凝集を促進することが示された。

6. プレセニリン変異によるアルツハイマー病発症機構

(1) 変異プレセニリン遺伝子改変マウスの解析(種村、高島)

変異プレセニリン・ノックイン(mPSki)マウスを長期飼育し、神経細胞におけるタウの動態を、形態学的手法、生化学的手法、行動学的手法を用いて、経時的に解析した結果、生後 7ヶ月齢 mPSki マウス脳において神経原線維変化の特徴である SDS 不溶タウ線維の確認に成功し、学習・記憶能力の低下が生じていることを明らかにした。また生後 15ヶ月齢 mPSki マウス脳においていくつかの神経原線維変化の特徴を合わせ持った変性神経細胞を同定し、さらに生

後 24ヶ月齢 mPSki マウス脳にて、調べる範囲における全ての神経原線維変化の特徴を備えた変性神経細胞の確認に至った。

(2) プレセニリンによる APP 代謝(孫、高島)

プレセニリンはガンマセクレタース活性に関与することが知られている。PS1 ノックアウト細胞を用いた実験から PS1 はガンマセクレタースの不活性化と共にアルファセクレタースを活性化していることを示す結果を得た。

7. 脳老化の解明

(1) 神経細胞におけるテロメア動態の解析(種村、高島)

細胞の老化と深く関わりがあるテロメア動態について、老若マウス神経細胞について比較検討したが、特に差異は認められなかった。しかしながら、上記の遺伝子改変マウスにおける変性神経細胞におけるテロメア動態は、核内テロメア配置並びにテロメア長に差異が生じていることを示す所見が得られた。

(2) 環境因子による脳老化促進(Planel, 崔, 朴, 種村, 高島)

低温刺激によってタウが過剰にリン酸化することを見だし、その機構を検討した結果、グルコース濃度の低下による脱リン酸化酵素の活性低下が起こることを見いだした。これは、AD におけるグルコース代謝低下がタウリン酸化亢進に関与することを説明することができる。

タウ Tg mouse を用いて、食餌(低グルコース、不飽和脂肪酸)を与えて神経原線維変化が亢進するかどうかを検討している。

(3) 遺伝因子による脳老化促進(種村、高島、村山、溝呂木、二本松、朴、中尾)

変異プレセニリンの脳老化へ影響を調べるために、mPSki マウスとタウ・トランスジェニックマウスをかけ合わせた産子をした。アミロイドが脳老化を加速し得るかを検討するために APP・トランスジェニックマウスをかけ合わせた産子を作出した。DNA 修復酵素の影響を調べるため OGG1 ノックアウト動物との掛け合わせを行っている。現在、飼育・観察中である。

Research Subjects and Members of Laboratory for Alzheimer's Disease

1. Role of β -Amyloid on the Development of Alzheimer's Disease
2. Cascade from Formation of Neurofibrillary Tangles to Neuron Death
3. Development of Alzheimer's Disease through Presenilin Mutations
4. Determine the Factors for Brain Aging

Laboratory Head

Dr. Akihiko TAKASHIMA

Research Scientists

Dr. De-Hua CHUI

Dr. Xiaoyan SUN

Dr. Yoshitaka TATEBAYASHI
Dr. Kentaro TANEMURA
Mr. Emmanuel PLANEL
Dr. Akiko MURAKAMI
Dr. Tomohiro MIYASAKA

Technical Staffs

Ms. Miyuki MURAYAMA
Ms. Naomi KIKUCHI (NIHONMATSU)
Mr. Shinobu NAKAO
Ms. Jung-Mi PARK
Mr. Tatsuya MIZOROKI

Assistants

Ms. Junko MIZUNO

Junior Research Associates

Mr. Yuji YOSHIIKE

Visiting Scientists

Dr. Ohoshi MURAYAMA (Azabu Univ.)

Trainees

Mr. Sumihiro MAEDA (Tokyo Inst. Technol.)
Ms. Hitomi UENO (Azabu Univ.)
Mr. Nobuyuki KIMURA (Univ. Tokyo)

誌 上 発 表 Publications

[雑誌]

(原著論文) *印は査読制度がある論文誌

- Yoshiike Y., Tanemura K., Murayama O., Akagi T., Murayama M., Sato S., Sun X., Tanaka N., and Takashima A.: "New insights on how metals disrupt amyloid β -aggregation and their effects on amyloid- β cytotoxicity", *J. Biol. Chem.* **276**, 32293–32299 (2001). *
- Tanemura K., Akagi T., Murayama M., Kikuchi N., Murayama O., Hashikawa T., Yoshiike Y., Park J., Matsuda K., Nakao S., Sun X., Sato S., Yamaguchi H., and Takashima A.: "Formation of filamentous tau aggregations in transgenic mice expressing V337M human tau", *Neurobiol. Dis.* **8**, 1036–1045 (2001). *
- Takashima A., Murayama M., Yasutake K., Takahashi H., Yokoyama M., and Ishiguro K.: "Involvement of cyclin dependent kinase5 activator p25 on tau phosphorylation in mouse brain", *Neurosci. Lett.* **306**, 37–40 (2001). *
- Tanemura K., Murayama M., Akagi T., Hashikawa T., Tominaga T., Ichikawa M., Yamaguchi H., and Takashima A.: "Neurodegeneration with tau accumulation in a transgenic mouse expressing V337M human tau", *J. Neurosci.* **22**, 133–141 (2002). *
- Sun X., Cole G. M., Chu T., Xia W., Galasko D., Yamaguchi H., Tanemura K., Frautschy S. A., and Takashima A.: "Intracellular A β is increased by okadaic acid exposure in transfected neuronal and non-neuronal

cell lines", *Neurobiol. Aging* **23**, 195–203 (2002). *

Sun X., Sato S., Murayama O., Murayama M., Park J., Yamaguchi H., and Takashima A.: "Lithium inhibits amyloid secretion in COS7 cells transfected with amyloid precursor protein C100", *Neurosci. Lett.* **321**, 61–64 (2002). *

(総 説)

Murayama M., Sun X., and Takashima A.: "Synthesis of the His₆-tagged recombinant proteins APPC99-His and His-PS1 using the RTS 500 instrument", *Biochemica*, No. 4, pp. 24–26 (2001).

高島明彦: "前頭側頭型痴呆症", *最新医学* **56**, 1579–1587 (2001).

榎林義孝, 高島明彦: "小胞体, 細胞内蛋白質輸送とアルツハイマー病", *細胞* **33**, 173–176 (2001).

榎林義孝, 高島明彦: "タウ蛋白とアルツハイマー病", *分子精神医学* **1**, 251–257 (2001).

[単行本・Proc.]

(総 説)

高島明彦: "アルツハイマー病における神経細胞死", *神経・筋疾患の最新医療*, 糸山泰人, 小林祥泰, 祖父江元 (編), 先端医療技術研究所, 東京, pp. 16–22 (2001).

口 頭 発 表 Oral Presentations

(国際会議等)

Tanemura K., Akagi T., Murayama M., Kikuchi N., Murayama O., Hashikawa T., Yoshiike Y., Park J., Matsuda K., Nakao S., Sun X., Sato S., Yamaguchi H., and Takashima A.: "Degenerating neurons in transgenic mice expressing V337M human tau", 5th Int. Conf. on Progress in Alzheimer's and Parkinson's Disease, Kyoto, Mar.–Apr. (2001).

Sun X., Murayama O., Sato S., Murayama M., Yamaguchi H., and Takashima A.: "Possible involvement of GSK-3 beta in amyloid production", 5th Int. Conf. on Progress in Alzheimer's and Parkinson's Disease, Kyoto, Mar.–Apr. (2001).

Murayama O., Sun X., Murayama M., Ito Y., Matsuda M., and Takashima A.: "Regulation of APP trafficking and processing", 5th Int. Conf. on Progress in Alzheimer's and Parkinson's Disease, Kyoto, Mar.–Apr. (2001).

Tatebayashi Y., Takashima A., Haque N., Iqbal K., and Grundke-Iqbal I.: "Role of tau phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 β in tau-dominated small caliber neurites", 5th Int. Conf. on Progress in Alzheimer's and Parkinson's Disease, Kyoto, Mar.–Apr. (2001).

Takashima A., Tanemura K., Akagi T., Murayama M., Kikuchi N., Murayama O., Hashikawa T., Yoshiike Y., Park J., Matsuda K., Nakao S., Sun X., Sato S., and Yamaguchi H.: "Tau transgenic mice", 5th Int. Conf. on Progress in Alzheimer's and Parkinson's Disease, Kyoto, Mar.–Apr. (2001).

Murayama O., Murakami A., Sun X., Sato S., Matsuda, and Takashima A.: "Di-acidic motif in the cytoplasmic region of amyloid precursor protein", 31st Ann. Meet. of

- Soc. for Neuroscience, San Diego, USA, Nov. (2001).
- Takashima A., Tanemura K., Murayama M., Akagi T., Hashikawa T., Tominaga T., and Ichikawa M.: “Mechanism of neurodegeneration through tau accumulation in transgenic mouse expressing human tau”, 31st Ann. Meet. of Soc. for Neuroscience, San Diego, USA, Nov. (2001).
- Sun X., Murayama O., Sato S., Yamaguchi H., and Takashima A.: “PS1 regulates the alpha-pathway of APP processing in the stable cell lines and PS1 deficient fibroblasts”, 31st Ann. Meet. of Soc. for Neuroscience, San Diego, USA, Nov. (2001).
- Tanemura K., Akagi T., Miyasaka T., Tatebayashi Y., Hashikawa T., Yamaguchi H., and Takashima A.: “Ultrastructural study of degenerating neurons in transgenic mice expressing V337M human tau”, 31st Ann. Meet. of Soc. for Neuroscience, San Diego, USA, Nov. (2001).
- (国内会議)
- 吉池裕二, 種村健太郎, 村山洋, 赤木巧, 村山美由紀, 田中信夫, 高島明彦: “金属のアミロイド線維形成抑制効果とその $A\beta$ 神経毒性における影響”, 第 74 回日本生化学会大会, 京都, 10 月 (2001).
- 村上明子, 高島明彦, 中野明彦: “酵母ガゼインキナーゼ I, Hrr25p と結合し *sec12* 変異を抑圧する新しい因子”, 第 74 回日本生化学会大会, 京都, 10 月 (2001).
- 崔得華, 田平武, 中山宏, 黒田重利, 巻淵隆夫, 有馬邦正, 川勝忍, 高島明彦: “Cotton Wool Plaques 型 Alzheimer 病脳組織における $A\beta$ 陽性神経細胞の分布について”, 第 20 回日本痴呆学会, 津, 10 月 (2001).
- 佐藤慎二, 楢林義孝, 宮坂知宏, 種村健太郎, 高島明彦: “JNK (c-Jun N-terminal kinase) による Tau リン酸化”, 第 20 回日本痴呆学会, 津, 10 月 (2001).
- 宮坂知宏, 楢林義孝, 種村健太郎, 赤木巧, 高島明彦: “R406W 変異タウ発現マウスの解析”, 第 20 回日本痴呆学会, 津, 10 月 (2001).
- 楢林義孝, 高島明彦, Lee M., Inge G., Khalid I.: “アルツハイマー病における成人海馬神経細胞新生現象の異常”, 第 20 回日本痴呆学会, 津, 10 月 (2001).
- 吉池裕二, 種村健太郎, 村山洋, 赤木巧, 村山美由紀, 佐藤慎二, 孫小燕, 田中信夫, 高島明彦: “亜鉛による β アミロイド線維化およびその毒性の阻害”, 第 20 回日本痴呆学会, 津, 10 月 (2001).
- 崔得華, 田平武, 巻淵隆夫, 黒田重利, 川勝忍, 秋山治彦, 高島明彦: “神経細胞内 $A\beta_{42}$ の局在と病的意義”, 平成 13 年度厚生科学班会議 (脳科学研究), 名古屋, 3 月 (2002).