

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、プレセニリンをキーワードに研究を行い、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。さらに、(3) 老人性痴呆症を引き起こす素過程としての脳老化について検討を加え、脳老化決定因子の検索を行う。

1. β -アミロイドの生成機序 (高島, 佐藤)

(1) アデノウイルスを用いた遺伝子発現系の確率

本年度では神経細胞へ遺伝子発現を可能にするためアデノウイルスベクターを用いた遺伝子発現系を構築した。さらにマウス脳内各部位で発現を可能にするように脳内へのインジェクション系を確立した。

(2) $A\beta$ 産生における GSK-3 β の関与 (高島, 孫)

これまでの研究から、プレセニリンと GSK-3 β の関係が示されている。プレセニリンの機能の1つが $A\beta$ の産生に関与することから、まず、サンドイッチ ELISA 法を用いて $A\beta$ の定量系を構築し、GSK-3 β による $A\beta$ 産生調節を検討した。その結果、APPC 末 100 残基を発現させた細胞に GSK-3 β の活性阻害剤である LiCl を添加すると、用量依存的に $A\beta$ 産生抑制が観察された。この $A\beta$ 産生抑制は、LiCl の GSK-3 β 以外の作用点である IMPase を阻害しても観察されなかったが、他の GSK-3 β 抑制剤で観察することができた。本年度では、アデノウイルスによって GSK-3 β を過剰発現すると $A\beta$ 産生の亢進が観察された。このことから、GSK-3 β が $A\beta$ 産生に関与することが明らかになった。

(3) APP の細胞内輸送 (高島, 村山 (洋); 中野 (生体膜研))

APP の細胞内輸送は明らかになっていない。本年度、APP 配列内に細胞内輸送に関与する新規のモチーフの存在を明らかにした。現在、細胞内輸送機構が最も明らかになっている yeast を用いて研究を進めるため、生体膜研と共同で yeast における APP 発現系を構築している。

2. β -アミロイドの毒性 (吉池, 高島)

(1) アミロイド凝集における金属イオンの効果

アルツハイマー病の脳で見られる不溶性沈着物の形成に Al などの金属イオンが関与することが示唆されている。老人斑で見られる β -シート構造を持つアミロイド会合体を定量的に検出するため、チオフラビン T を用いてアミロイドの会合に

与える金属イオンの効果を調べた。その結果は、既報通り金属イオンの存在はアミロイドの会合を促進するのだが、 β -シート構造を持つアミロイド会合は Zn や Cu によって減少することが明らかになった。さらに、Zn の存在は $A\beta$ の β -会合を阻止するため β -アミロイドの細胞毒性を減弱した。Cu の存在は Zn に比べて細胞毒性の阻止効果は少なかった。これは、Cu- β アミロイド結合による活性酸素発生によるものと考えられた。

3. 神経原線維変化形成機序 (高島, 種村, 村山 (美))

(1) タウと相互作用するタンパク質の検索

アルツハイマー病では、タウタンパクがリン酸化によって細胞質に蓄積し、神経原線維変化と神経細胞死を引き起こすと考えられる。また、一連の家族性のタウオパチーからタウタンパクに変異が見いだされており、タウタンパクが単なる微小管結合タンパクとしてのみではなく、他の機能も有していることが考えられた。そこで、本年度ではタウが相互作用するタンパク質をイースト two hybrid cloning によりヒト脳 cDNA ライブラリーから検索を行った。その結果、タウが結合するタンパク質として PAX6 と Jab1 が得られた細胞内での役割を検討中である。

(2) 神経原線維変化を示すマウス

FTDP17 変異のうち、アミノ酸 V337M 変異を持つヒトタウ cDNA を用いてトランスジェニックマウスを作製し解析した。この cDNA は、PDGF プロモーターの下流につながれ、5-10 コピー遺伝子導入されたトランスジェニックマウスが 3 ライン確定した。タンパク質の発現量は内在性タウに対して 1/10 程度であった。発現部位は海馬および大脳皮質のいくつかの神経細胞に局限されていた。これらの神経細胞は、リン酸化タウ抗体、ユビキチン抗体に陽性に染色され、神経原線維変化の1つの目安である PHF-epitope を有していることが明らかになった。さらに、ガリアス銀染色では、これらの神経細胞が特異的に染色され、これらの神経細胞ではタウタンパクが凝集していることが示された。一方、神経原線維変化は、タウタンパクが β -シート構造をとった繊維状となっていることを示すため、Congo red 染色を行い偏光顕微鏡で観察したところ、4 か月令では複屈折性は見いだされなかったが、10 か月令では複屈折性を持つ神経細胞が海馬大脳皮質に多数観察されるようになった。FTDP17 変異を持たないタウのトランスジェニックマウスでは、これらの所見は見いだせなかった。すなわち、FTDP17 変異特異的に加齢によって神経原線維変化を示すマウスを作製することに成功した。この神経原線維は、電顕で観察すると直経約 15 nm の straight filament と呼ばれる構造をした繊維であることが判明した。行動学的検討を行ったところ、高架式十字迷路を用いた実験で神経原線維

が生じる10か月令で野生型マウスと比べて有意な異常を示した。このことは、神経原線維変化形成が神経機構に何らかの以上を示した結果であると推測された。

4. プレセニリン変異によるアルツハイマー病発症機構 (高島, 種村)

プレセニリン変異のノックインマウスを入手し、組織化学的に検討を行っている。

5. モデル動物の作成 (高島, 村山 (美), 菊池, 中尾, 朴, 溝呂木)

野生型3リピート, 4リピートタウ, 変異型3リピート, 4リピートタウを発現するタウトランスジェニックマウスがそれぞれ数ラインずつ確定したため現在, 病理学的, 生化学的検討を行っている。

6. 脳老化決定因子の同定 (高島, 種村)

36か月令のマウスを入手し, 生化学・組織学的に若齢マウスとの比較を行っている。脳老化のマーカーの1つとして神経原線維変化を捉え, 脳老化を調節する環境因子を調べるため, 先に述べた神経原線維変化を示すトランスジェニックを用いて, 異なる環境で飼育して神経原線維変化発症の時期を調べている。

誌上発表 Publications

(原著論文) *印は査読制度がある論文誌

Saura C. A., Tomita T., Soriano S., Takahashi M., Leem J.-Y., Honda T., Koo E. H., Iwatsubo T., and Thinakaran G.: "The nonconserved hydrophilic loop domain of presenilin (PS) is not required for PS endoproteolysis or enhanced A β 42 production mediated by familial early onset Alzheimer's disease-linked PS variants", *J. Biol. Chem.* **275**, 17136–17142 (2000). *

Song S. C., Ohba M., Saito Y., Honda T., Takashima A., and Takahashi H.: "Proteolytic processing and degradation of human presenilin-1 expressed in yeast", *Neurosci. Lett.* **282**, 65–68 (2000). *

Honda T., Nihonmatsu-Kikuchi N., Yasutake K., Ohtake A., Sato K., Tanaka S., Murayama O., Murayama M., and Takashima A.: "Familial Alzheimer's disease-associated mutations block translocation of full-length presenilin 1 to the nuclear envelope", *Neurosci. Res.* **37**, 101–111 (2000). *

(総説)

村山洋, 高島明彦: "特集 痴呆研究の最前線 変異タウ蛋白の細胞内動態", *Dementia Japan* **14**, 61–70 (2000).

高島明彦: "プレセニリンと GSK3 β 結合の役割", *最新医学* **55**, 1649–1655 (2000).

(単行本)

Takashima A., Murayama O., Honda T., and Sun X.: "Mechanism of neuron death in Alzheimer's disease", *Neuroscientific Basis of Dementia*, edited by C. Tanaka, P. L. McGeer, and Y. Ihara, Birkhäuser, Verlag, pp. 201–207 (1999).

口頭発表 Oral Presentations

(国際会議等)

Takashima A.: "Reduced A β secretion by LiCl in APP C100 transfected cells: Implication for GSK-3 β in regulating A β secretion", 2nd Natl. Meet. on Dementia and Depression and Int. Symp. on Alzheimer's Disease, (Society of Geriatrics of China), HuangShan, China, May–June (2000).

Takashima A.: "Association of PS-1 with GSK-3 β ", World Alzheimer Congr. 2000, (Alzheimer's Association), Washington D. C., USA, July (2000).

Takashima A.: "Formation of neurofibrillary tangles in transgenic mice expressing V337M human tau", World Alzheimer Congr. 2000, (Alzheimer's Association), Washington D. C., USA, July (2000).

Sun X., Murayama O., Yamaguchi H., and Takashima A.: "Possible involvement of GSK-3 β in regulation of A β metabolism in transfected cell lines", World Alzheimer Congr. 2000, (Alzheimer's Association), Washington D. C., USA, July (2000).

Murayama O., Sun X., and Takashima A.: "Regulation of amyloidogenesis and β APP trafficking", World Alzheimer Congr. 2000, (Alzheimer's Association), Washington D. C., USA, July (2000).

Takashima A., Tanemura K., Murayama O., Murayama M., and Nihonmatsu-Kikuchi N.: "Characterization of transgenic mice expressing V337M human tau", 30th Ann. Meet. Soc. for Neuroscience, New Orleans, USA, Nov. (2000).

Sun X., Murayama O., Murayama M., Xia W., Savage M., Selkoe D., Yamaguchi H., and Takashima A.: "Involvement of GSK-3 beta in amyloid production", 30th Ann. Meet. Soc. for Neuroscience, New Orleans, USA, Nov. (2000).

Murayama O., Sun X., Matsuda K., Murayama M., Matsuda M., and Takashima A.: "A novel motif involved in a metabolism of β -amyloid precursor protein", 30th Ann. Meet. Soc. for Neuroscience, New Orleans, USA, Nov. (2000).

Yoshiike Y., Takahashi M., Tanemura K., Murayama O., Tanaka N., and Takashima A.: "Suppression of amyloid β -aggregation through association with metals", 30th Ann. Meet. Soc. for Neuroscience, New Orleans, USA, Nov. (2000).

(国内会議)

村山洋: "アルツハイマー病における神経細胞死シグナル", 第2回先端技術セミナー, (第一化学薬品試薬統括部), 東京, 6月(2000).

孫小燕, 村山洋, 山口晴保, 高島明彦: "Involvement of GSK-3 beta in amyloid production", 第19回日本痴呆学会, 木更津, 9月(2000).

村山美由紀, 村山洋, 石黒幸一, 高橋浩士, 横山峯介, 安武かおり, 高島明彦: "P25 トランスジェニックマウスの作製と解析", 第19回日本痴呆学会, 木更津, 9月(2000). 村山洋, 孫小燕, 松田恵子, 村山美由紀, 松田基夫, 高島

明彦: “アミロイド前駆体蛋白質の代謝調節に関わる新規モチーフ”, 第19回日本痴呆学会, 木更津, 9月(2000).
高島明彦: “Mutant tau TG miceにおけるNFT形成”, 第4回アルツハイマー病ミニシンポジウム, (東京大学), 東京, 2月(2001).

Research Subjects and Members of Laboratory for Alzheimer's Disease

1. Roles of β -Amyloid on the Development of Alzheimer's Disease
2. Toxicity of β -Amyloid
3. Molecular Mechanisms of Neurofibrillary Tangles Formation
4. Development of Alzheimer's Disease through Presenilin Mutations
5. Production of Model Animals
6. Determination of the Factors for Ageing Brain

Laboratory Head

Dr. Akihiko TAKASHIMA

Research Scientists

Dr. Xiaoyan SUN
Dr. Kentaro TANEMURA
Dr. Shinji SATO

Technical Staffs

Ms. Miyuki MURAYAMA
Ms. Naomi KIKUCHI
Ms. Keiko MATSUDA
Mr. Shinobu NAKAO
Ms. Jung-Mi PARK
Mr. Tatsuya MIZOROKI

Assistants

Ms. Junko MIZUNO

Junior Research Associates

Mr. Yuji YOSHIIKE

Visiting Members

Dr. Ohoshi MURAYAMA (Azabu Univ.)