

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23300155

研究課題名(和文) アルツハイマー病モデルサル、脳におけるヒト変異型APP強制発現と老人斑形成

研究課題名(英文) Model animals by nonhuman primate for Alzheimer disease, hyper expression of mutant amyloid precursor protein and formation of senile plaques in the brain

研究代表者

中村 紳一郎(Nakamura, Shinichiro)

滋賀医科大学・動物生命科学研究センター・准教授

研究者番号：50307980

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,000,000円

研究成果の概要(和文)：サル類のアルツハイマー病関連病変は形成に20年以上を要するため、人為的作製モデルが必要である。そこでヒトでの発症に強く関わる遺伝子(スウェーデン型APP)をウイルスベクターに組換え、3ヶ月間マウス脳に強制的に発現させたところ、ベクター投与群は対照群に比べ、導入遺伝子産物であるアミロイド(A β)₁₋₄₀が多く検出された。この組換えウイルスベクターは、確かにアルツハイマー病の原因物質であるA β を強制的に作る能力を持っているので、サルに接種して効果を確認しているところである。

研究成果の概要(英文)：It takes more than 20 years to build up Alzheimer-related histological features in the brains of nonhuman primates. Therefore, an artificial primate model would be required to improve it. We planned that Adeno-associated virus vector recombined with a candidate gene (Sweden type APP) for onset of Alzheimer disease inoculated to 3 months old mice. As a result, the inoculated mice increased to secrete A β 1-40 more than control mice. Since this recombined viral vector possesses an ability of hyper expression of A β , we attempt now to inoculate the vector and are checking the effect of it using cynomolgus monkeys.

研究分野：実験動物学

キーワード：アルツハイマー病 アミロイド アデノ随伴ウイルス カニクイザル

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病 (AD) のモデル動物として高齢サルを用いるためには、長い時間とコストを要する。その弱点を克服するため、ヒトの家族性 AD の原因遺伝子であるアミロイド前駆体タンパク (APP) をウイルスベクターで組み換えたコンストラクトをサルの脳内に接種し、強制発現させる。これによって短期間で APP からアミロイドタンパク (A β) が多量に切り出され、脳内の A β 濃度が上昇、老人斑が形成されるようになることを目的とする。AD 研究におけるトランスレショナルリサーチにおいて、サル類は重要な位置づけにあり、特に新規治療法や治療薬に対する安全性試験には必須といわれているが、高齢サルの数は少ない。従って実験的かつ計画的に、明確な時間内にサル類で AD 関連病変をつくれるようにすれば、AD 研究に大きく貢献できる。

2. 研究の目的

AD は認知症の大部分を占める高次認知機能を侵す疾患である。患者の脳を死後、顕微鏡下で観察すると、斑状の異常構造物、老人斑が多量に観察される。この AD の主病変である老人斑は主にアミロイドタンパク (A β) から構成される。A β はアミロイド前駆体タンパク (APP) の加齢に伴う異常な酵素切断から産生され、その重度蓄積が結果的に老人斑形成へと繋がる。また APP 遺伝子の変異は、老人斑の早期ならびに多量の出現を引き起こされ、家族性 AD という病態を示す。

疾患のメカニズムを解明するために必要なモデル動物として、げっ歯類は基本的なメカニズム解明や複数検証による再現性の確保に用いられる。一方、サル類を含む中型動物は、治療法や治療薬などの安全性試験、その他、ヒトへの臨床に近い前臨床的試行に用いられる。

現在、AD 研究の代表的なモデル動物は、変異型 APP が導入された遺伝子改変マウスである。また AD が単一の因子だけで発症しないので、co-factor である Apolipoprotein E (ApoE) 及び Presenilin (PS) などとの二重改変マウスなども知られている。しかし、マウス APP はヒト APP とのホモロジーが低く、老人斑は自然発症しない。一方、サル類の APP はヒトと 100% ホモロジーで、老人斑が自然発症する。しかし老人斑の形成に時間を要し、病変出現の予測も不可能である。

サル類の老人斑はヒトと同様に成熟型老人斑が多く観察され、co-factor のホモロジーが高い (ヒトに対してマカク属サル: マウス、PS-1 は 99.4%:93.1%, apoE は 92%:50%以下) ため、よりヒトに近い環境を反映しながら老人斑が形成されていることが予測される。ところが A β ワクチンが開発されている中、遺伝子改変マウスの結果のみを拠り所にヒトへの臨床試験を行ったところ、重篤な肉芽腫性脳脊髄炎が起こった。結果的にワクチ

ンではなく、アジュバントに原因のあることがわかったが、マウスでは予測できない事象を、サル類による前臨床試験で確認する必要性が叫ばれるようになった。しかしサル類が老人斑を標榜するようになるには 20 年以上を要する。

医薬基盤研霊長類医科学研究センター (霊長類センター: つくば市) は国立感染症研究所として設立されてから 30 年以上経ち、安楽殺に処されなかった高齢カニクイザルが aging colony として約 100 頭飼育されていたが、近年の不景気による経費削減で aging colony のサル数は激減している。他に高齢サルを系統立てて維持している施設はなく、日本では高齢サルという貴重なバイオリソースが枯渇状態にある。

AD 研究において、創薬やワクチン開発の分野は急激な進展を見せている。アメリカでは国単位で各研究施設のサル類をバイオリソースとして囲い、研究用的高齢サルを確保している。このように財政的、制度的にも不利な日本では実験的かつ計画的な AD サルモデルを作製することが現実的である。その方法の一つとして、遺伝子組換えサル類の作製が計画されているが、実用化するまでの時間が必要である。

そこでウイルスベクターに家族性 AD の原因となる変異型 APP (swAPP) を組換えたコンストラクトをカニクイザルの脳内に接種、A β を強制的に産生させ、早期に老人斑として描出させる。これによってカニクイザルで老人斑ができるまでの時間を克服し、新しい動物モデルを確立するのを最終目的とする。

3. 研究の方法

導入コンストラクトの作製

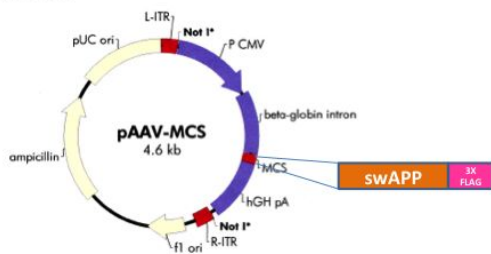
swAPP にタグとなる FLAG を結合させたコンストラクトをアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターに組換える。

・実験 1: サイトメガロウイルス (CMV) ・プロモーター、アンピシリン耐性遺伝子などが入った p3XFLAG-CMV-TM-14 ベクター (Sigma 社、図 1) のマルチクロニングサイト (MCS) に swAPP を組換える。これを大腸菌に組み込み、アンピシリン混和選択培地上で増殖させ、耐性コロニーとしてクローニングされた大腸菌から swAPP とタグとして用いる FLAG の結合したプラスミドを単離される。

・実験 2: 実験 1 で得られたプラスミドを鋳型にして、両端へ制限酵素の認識配列を PCR を用いて付加する。得られた PCR 産物を CMV プロモーター、アンピシリン耐性遺伝子などが入った pAVV-MCS ベクター (Agilent 社、添付図 2) の MCS へ導入する。これを大腸菌に組み込み、アンピシリン混和選択培地によってクローニングされたコロニーの大腸菌から pAVV-MCS ベクターへの細胞における swAPP が導入された AVV-1 作製用プラスミドを単離する。

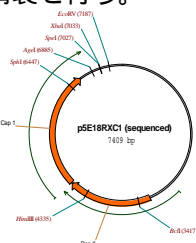
さらに AAV-1 粒子の形成に必要な配列を持つ p5E18RXC1 ベクター、AAV-1 の複製を供与する pHelper ベクターを大腸菌で増殖させ、それぞれのプラスミドを単離する。

pAAV-MCS Vector

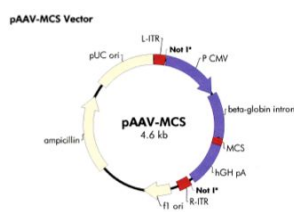


(図1)

・実験3: 1) 実験2で得た AAV に組換える目的遺伝子 (swAPP + FLAG + AAV-1 inverted terminal repeat) さらに AAV 粒子を形成させるために、2) AAV の骨格を形成する遺伝子 (図2: AAV-1 rep, AAV-1 cap) 3) AAV の複製に関わる Adeno virus の遺伝子 (図3: adeno E2A, adeno E4) 各プラスミドを大腸菌で増殖させる。精製された各プラスミドを、Adeno virus 由来遺伝子 (Adeno E1A, Adeno E1B) が導入された HEK293 細胞 (AAV293 細胞: ヒト胎児腎由来) へトランスフェクトし、AAV293 細胞内で swAPP と FLAG が組換えられた AAV-1 の骨格蛋白が発現、粒子が形成される (AAV-1_swAPP)。その後、塩化セシウム密度勾配によるウイルスベクター液の、濃縮、精製を行う。



(図2)



(図3)

・実験4: HEK293 細胞での FLAG 発現を抗 FLAG 抗体による蛍光抗体法で確認する。また細胞破砕物をポリアクリルアミドで電気泳動し、抗 FLAG 抗体に対するイムノプロットングを行った。

動物実験と材料の採取

・実験1: AAV-1_swAPP を乳のみマウスおよび6週マウスの脳内へ接種する (1群5例、週齢2群、観察時期2群、計20例)。陰性対照には PBS を接種する。1ヶ月後、および3ヶ月後にペントバルビタールナトリウムの過剰麻酔で安楽死とし、脳を採取する。

・実験2: この実験には基本的には老人斑が観察されない4~7歳のカニクイザル5例 (実験群3例、対照群2例) を用いる。サル用頭部定位固定装置にて脳を固定し、カニクイザル脳マップを参考にしながら頭頂頭蓋骨をドリルで切開し、線条帯に AAV-1_swAPP を接種する。6ヶ月後にペントバルビタールナトリウムの過剰麻酔で安楽死し、脳を採取する。
実験3: いずれの動物も左脳は組織学的解析

のためパラホルムアルデヒドで固定、パラフィンで包埋した。マウス右脳はすべてを、カニクイザルは前頭、扁桃体を含む側頭葉、海馬を含む側頭葉、後頭葉、小脳に分け、蛋白分解酵素阻害剤を加えたトリスバッファ内で破碎、ナイロンメッシュで濾過した後、超遠心分離し、可溶分画、不溶分画に分離した。

解析方法

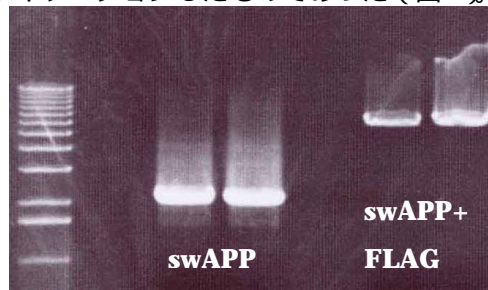
実験1 (組織学的解析): パラフィン切片を用いてヘマトキシリンエオジン (HE) 染色を行った。また抗 APP 抗体、抗 swAPP 抗体、抗 A 抗体および抗 FLAG 抗体による免疫染色を行った。いずれもマウスモノクローナル抗体なので、マウスグロブリンが吸収してある2次抗体 (ニチレイ、マウス組織用ヒストファイン) を用いた。

実験2 (生化学的解析): 脳破碎物のうち、可溶分画をポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、PVDF膜に泳動蛋白を転写、抗 APP 抗体、抗 swAPP 抗体、抗 A 抗体および抗 FLAG 抗体によるイムノプロットングを行った。可溶分画、不溶分画、毛細血管分画を用いて、げっ歯類 A 1-40、A 1-42 およびヒト A 1-40、A 1-42 に対する ELISA を行った。

4. 研究成果

導入コンストラクトの性状

最初に p3XFLAG-CMV14 ベクターの MCS に swAPP を組換え、大腸菌で増殖させた。アンピシリン耐性コロニーから得られた大腸菌のプラスミドから制限酵素で切り出されたものの PCR 産物は確かに FLAG と swAPP がライゲーションしたものであった (図4)。

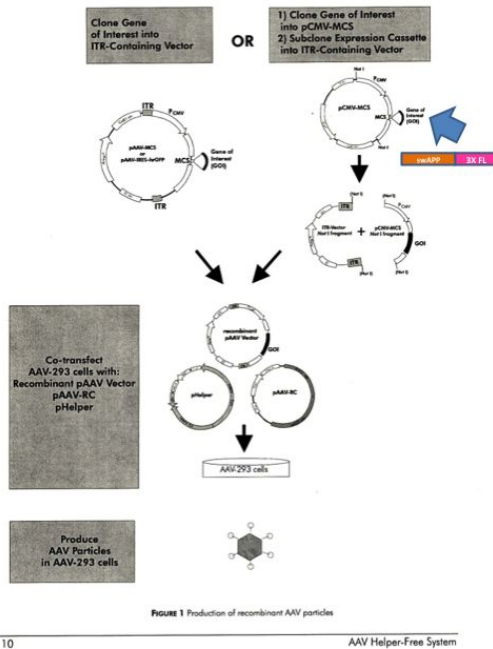


(図4)

次にこの産物を pAAV-MCS ベクターの MCS に組換え、同様の方法で得て、制限酵素サイトで切り出された塩基の PCR 産物はサイズ、塩基配列ともに適切のものであった (図5)。同様に p5E18RXC1 ベクターと pHelper ベクターを大腸菌で増やした産物もサイズ、塩基配列ともに適切のものであった。 (図5)

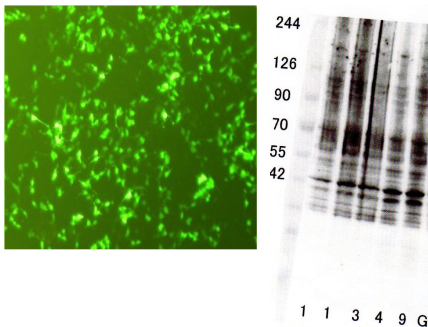


そして AAV293 細胞の培地に pAVV-MCS、p5E18XCI、pHelper3 種のプラスミドベクターを混和して培養した (図 6)



(図 6)

培地から精製した AAV-1_swAPP を再び培養液に感染させ、1 日後に抗 FLAG 抗体で免疫染色したところ多くの細胞に陽性像が確認できた (図 7)。また同抗体によるイムノプロットングを行うと多くの陽性バンドが検出された (図 8)。プロセッシングを受けたいくつかの種類の swAPP に FLAG が結合していたため、このように描出されたと思われる。



(図 7)

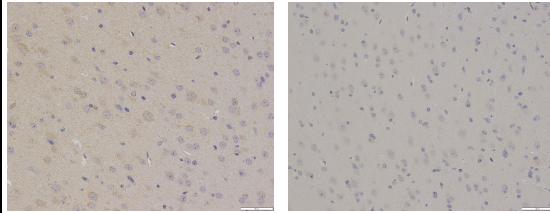
(図 8)

組織学的解析

マウスの脳は HE 染色で炎症などの組織学的変化はなく、両群の差も見られなかった。免疫染色を行ったところ、抗 APP 抗体は両群のすべての神経細胞、神経網、一部のグリア細胞の細胞質に顆粒状の陽性像を認めた。一方、抗 FLAG 抗体は AAV-1_swAPP が接種された群の神経細胞と神経網に陽性像を認め (図 9) 対照群は弱い神経網の顆粒状陽性像が見られたが、神経細胞、グリア細胞ともに陰性だった (図 10)。抗 A 抗体、抗 swAPP 抗体は両群ともに陰性だった。

カニクイザル脳での解析は本執筆時が接種後 2 ヶ月で、まだ材料採取ができておらず、

解析も実施していない。



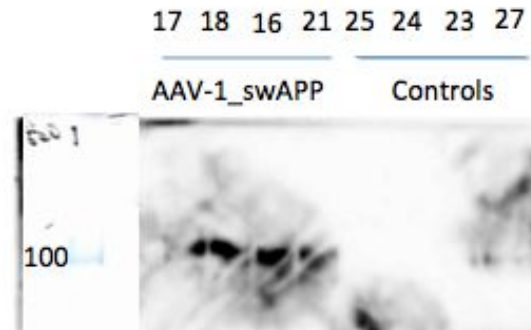
(図 9)

(図 10)

生化学的解析

マウス脳から抽出した蛋白のうち、可溶分画でイムノプロットングを行ったところ、抗 FLAG 抗体は AAV-1_swAPP を接種した群で約 100kd に陽性のバンドを認めたが、対照群にはバンドを認めなかった (図 11)。抗 APP 抗体は約 40kd~130kd に複数のバンドが見られ、両群の間でバンドの位置、強さに差は見られなかった。抗 A 抗体では両群に約 4kd の部分にバンドが見られ、強さの差は見られなかった。抗 swAPP 抗体は両群ともにバンドは見られなかった。

FLAG



(図 11)

可溶分画と不溶分画で ELISA を行ったところ、AAV-1_swAPP を接種した群の可溶分画でヒト A 1-40 が対照群より高く、ヒト A 1-42 もやや高い傾向にあったが、不溶分画ではヒト A 1-40 および 1-42 ともに差がみられなかった。またマウス A 1-40 および 1-42 の可溶分画、不溶分画ともに大きな差は見られなかった (表 1)。

表 1:

	ヒトAβ40	ヒトAβ42	マウスAβ40	マウスAβ42
AAV 可溶	1497.8	312.1	259.4	46.9
Cont. 可溶	832.5	211.1	245.8	37.5
AAV 不溶	550.8	234.1	121.4	26.9
Cont. 不溶	534.0	202.7	123.5	24.8

単位(pM)

カニクイザル脳での解析は本執筆時が接種後 2 ヶ月で、まだ材料採取ができておらず、解析も実施していない。

①~③の結果から適切な導入コンストラクト AAV-1_swAPP を作製することができ、哺乳類培養細胞およびマウスで目的の蛋白質を産生されていることが明らかになった。ただし実験の進捗が遅れ、サルでの解析が行われておらず AAV-1_swAPP の脳内への導入が老

人斑形成に寄与するか否かは現在試験中のサルでの解析を待ちたい。

考察

導入コンストラクト AAV-1_swAPP については問題なく目的の蛋白の産生まで至ったが、最近プロモーター部位の改良による新規 AAV が開発され、導入効率の改善とともに、脳内接種のような侵襲性の施術をせず、静脈接種で脳へ到達させることも可能である。動物への負荷を少なく、効率よく目的蛋白質を産生させるために、今後の改善が必要だろう。

免疫染色とイムノプロットングで FLAG のシグナルが検出されたことから同部位では swAPP が産生されているのは明らかだ(抗 swAPP 抗体は特異性に問題があったと思われる)。swAPP 産生の上昇の結果として ELISA でのヒト A 1-42 が A 1-40 の上昇として現れた。A 分子種として A 1-42 が A 1-40 よりも凝集しやすく、不溶性 A 1-42 が核となって他の A 分子種を巻き込むことが老人斑形成の誘因といわれている。今回のマウスの結果では可溶性分画の上昇しか見られなかったため、不溶性分画の差を見いだすにはさらに観察時間を必要とするのかもしれない。swAPP が酵素切断されて A 1-40 ならびに A 1-42 となるプロセスに種差がある可能性も否定できず、サルでのデータ解析が必須である。

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 8 件)

Hasegawa H, Liu L, Tooyama I, Murayama S, Nishimura M. The FAM3 superfamily member ILE1 ameliorates Alzheimer's disease-like pathology by destabilizing the penultimate amyloid- precursor. Nat Commun. 2014. 5:3917. 査読有

DOI: 10.1038/ncomms4917.

Shimizu K, Sakurai F, Tomita K, Nagamoto Y, Nakamura S, Katayama K, Tachibana M, Kawabata K, Mizuguchi H. Suppression of leaky expression of adenovirus genes by insertion of microRNA-targeted sequences in the replication-incompetent adenovirus vector genome. Mol Ther Methods Clin Dev. 2014. 1:14035. 査読有

DOI: 10.1038/mtm.2014.35.

Nishimura M, Nakamura S, Kimura N, Liu L, Suzuki T, Tooyama I. Age-related modulation of -secretase activity in non-human primate brains. J Neurochem. 2012. 123: 21-28. 査読有

DOI: 10.1111/j.1471-4159.2012.07884.x.

Saito T, Suemoto T, Brouwers N, Slegers K, Funamoto S, Mihira N, Matsuba Y,

Yamada K, Nilsson P, Takano J, Nishimura M, Iwata N, Van Broeckhoven C, Ihara Y, Saido TC. Potent amyloidogenicity and pathogenicity of A 43. Nat Neurosci. 2011. 14: 1023-1032. 査読有

DOI: 10.1038/nn.2858.

Ueda M, Ageyama N, Nakamura S, Nakamura M, Chambers JK, Misumi Y, Mizuguchi M, Shinriki S, Kawahara S, Tasaki M, Jono H, Obayashi K, Sasaki E, Une Y, Ando Y. Human Neural Stem Cells Overexpressing Choline Acetyltransferase Restore Cognitive Function of Kainic Acid-Induced Learning and Memory Deficit Animals. Lab. Invest. 2012: 92: 474-484. 査読有

DOI: 10.1038/labinvest.2011.195.

Park D, Joo SS, Kim TK, Lee SH, Kang H, Lee HJ, Lim I, Matsuo A, Tooyama I, Kim YB, Kim SU. Human neural stem cells overexpressing choline acetyltransferase restore cognitive function of kainic acid-induced learning and memory deficit animals. Cell Transplant. 2012. 21: 265-371. 査読有

DOI: 10.3727/096368911X586765

西村正樹. セクレターゼ複合体に作用し A 産生を制御する内在性タンパク質. Dementia Japan. 2012. 26: 44-50. 査読無

Hata S, Fujishige S, Araki Y, Taniguchi M, Urakami K, Peskind E, Akatsu H, Araseki M, Yamamoto K, Martins RN, Maeda M, Nishimura M, Levey A, Chung KA, Montine T, Leverenz J, Fagan A, Goate A, Bateman R, Holtzman DM, Yamamoto T, Nakaya N, Gandy S, Suzuki T. Iterative processing of -secretase substrates in common forms of mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: Evidence for -secretase dysfunction. Ann Neurol. 2011. 69: 1026-1031.

DOI: 10.1002/ana.22343. 査読有

[学会発表](計 3 件)

1. 中村紳一郎. 霊長類特有の加齢性病変- 霊長類が背負った加齢の代償-. 第 30 回日本霊長類学会大会(公開シンポジウム). 2014 年 7 月 6 日. 大阪市

2. 中村紳一郎、松本 信英、鳥居 隆三、田平 武. アルツハイマー経口ワクチン接種の老齢カニクイザルにおけるアミロイド タンパクの画像解析. 第 152 回日本獣医学会学術集会. 2011 年 9 月 19 日. 堺市

3. Nishimura M, Liu L, Hasegawa H. Interaction of p24a2 with -secretase complex attenuates -cleavage of APP. Alzheimer's Association International 2011 Conference on Alzheimer's Disease.

2011年7月18日. Paris.

〔図書〕(計 1件)

1. Nakamura S, Ueda M, Ageyama N, Ando Y, Torii R, AMYLOIDOSIS (Sarantseva S. ed.); Transthyretin amyloidosis in aged vervet monkeys, as a candidate for the spontaneous animal model of senile systemic amyloidosis. 2011. 181-190.

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等：該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 紳一郎 (NAKAMURA Shinichiro)
滋賀医科大学・動物生命科学研究センター・
准教授
研究者番号：50307980

(2) 研究分担者

岡田 尚巳 (OKADA Takashi)
日本医科大学・医学研究科・教授
研究者番号：00326823

西村 正樹 (NISHIMURA Masaki)
滋賀医科大学・分子神経科学研究センター・
教授
研究者番号：40322739

松尾 明典 (MATSUO Akinori)
滋賀医科大学・分子神経科学研究センター・
助教
研究者番号：20324585
(研究期間：平成23年4月1日～平成25年
3月31日)

(3) 連携研究者
該当者なし

()

研究者番号：