

## 学内グラント 報告書

## 平成27年度 学内グラント終了時報告書

自然老化モデル *O. degus* を用いたアルツハイマー病病変形成メカニズムの解明

研究代表者 丸山 敬 (医学部 薬理学)

## 緒言

代表的な認知症であるアルツハイマー病 (Alzheimer disease; AD) は、老年性認知症を起こす疾患の一つであり、脳における細胞外の老人斑 (アミロイドβタンパク質Aβの凝集物) および神経細胞内のタンゲル (リン酸化されたタウの凝集物) の出現を特徴とする。しかし、これらの病理的变化がADの原因なのか結果なのか、発症メカニズムの根本的な理解、それに基づいた予防・治療薬開発には至っていない。その現状を打破するためには、ADの最重要危険因子である老化との関連性を明らかにすることが必要である。ADの発症の根底では通常の老化で起きる現象が増幅されていると提唱されているが<sup>1)</sup>、通常の老化の範囲とは何か、どの段階を越えたら認知症に至る (異常) 老化になるのか、その詳細は分かっていない。そのため、現在のAD研究においては、ヒトの老化や病態をより反映したモデルの創出が求められている<sup>2)</sup>。

新しいモデルに求められる条件として以下が必要と考えられる。

- ① 遺伝子改変 (例えば、マウスにヒト遺伝子の導入) に依らない、自然なものである。
- ② Aβやタウの蓄積が見られる。
- ③ 認知機能障害を起こす (観察できる)。

例えば、野生型のマウスやラットでは、加齢に伴った認知機能障害こそ起こるが、老人斑やタンゲルの形成は認められず (Aβやタウの配列の違いや短い寿命が関与していると考えられている)、病理像がヒトと乖離している。非ヒト霊長類に関しては、分類学的にヒトに近い、ということでの利点はあるものの、寿命が長いことから、実験室レベルでの飼育・解析には限界があると考えられる (研究者のほうが先に認知症になる)。そこで、我々は *Octodon degus* (*O. degus*, 右写真参照) を新しいADモデルとして提唱すべく、基礎的なデータの集約を行うこととした。

*O. degus* は、チリ原産の齧歯類で、平均寿命は8年ほど、3年程度でタンゲルや老人斑が形成されることが報告されている<sup>3)</sup>。また、認知機能障害も呈する。それだけでなく、下記のような観点から、非常にヒトに近い齧歯類で

あることが知られている。

- 夜行性のマウスとは異なり、*O. degus* はヒトと同じ昼行性である。
- 社会性が高く、単独で飼育することによりストレス反応が増強される。
- 夜間の睡眠妨害によって記憶障害が生じる。この記憶障害にADの対症療法として臨床的に汎用されているメマンチンが有効である<sup>4)</sup>。
- 道具を使って餌をとることを覚えられる。このことから、かなり高次脳機能が発達していることが知られている<sup>5)</sup>。

欠点としては、近交系が確立していないこと、研究者が少ないためにその生態が十分に解明されていないことがある。本研究ではADモデルとして確立するための準備を主目的とした。

## 材料と方法

## (1)材料

京都橋大学・上北朋子准教授の飼育していた *O. degus* の脳サンプルを用いた。年齢としては、10ヶ月齢および60ヶ月齢のものを用いた。

## (2)サンプルの調整

脳組織は、タンパク質分解酵素阻害剤を含む Tris-buffered saline (TBS) 中で破碎し、低速遠心 (1000 x g,



5 min, 4°C) で未破碎細胞の除去および脱核を行った. その上清を超遠心に供し, TBS-soluble画分(上清)を得た. 沈殿を, 1% TritonX-100を含むTBS中で破碎し, 超遠心を行ってTx-soluble画分(上清)を得た. 沈殿は, 超音波破碎し, Tx-insoluble画分とした. これらの画分は, SDS, 2-メルカプトエタノール存在下で96°Cにて煮沸し, 電気泳動のサンプルとした.

### (3) ウェスタンブロッティング

タウについては, 一般的なウェスタンブロッティングによって解析した. A $\beta$ については, Tris/Tricine系の電気泳動システムもしくは8M尿素を含むTris/Tricine系の電気泳動システムを利用した<sup>6)</sup>. シグナルの検出は, 本学共通機器室のChemi-Docを用いて行った.

## 結果

### (1) A $\beta$ の解析

脳内のA $\beta$ を検出できるかどうかを調べた. A $\beta$ は40数残基のタンパク質であるが, *O. degus*とヒトとでは, アミノ酸配列が1カ所異なることが分かっている. ヒトA $\beta$ に対する抗体は多く作られているが, それらが正しく*O. degus*のA $\beta$ を認識するかは不明である.

A $\beta$ には長さの違ういくつかの分子種のあることが知られている. そこでまず, C末端側に対する抗体(A $\beta$ 40およびA $\beta$ 42)が使えるか検討したが, 検出できなかった(data not shown). 次に, A $\beta$ のN末端側を認識する抗体82E1が使えるかどうかを検討した. その結果, Tx-soluble画分においてA $\beta$ を検出することができた(Fig. 1A, Monomer). やや高分子側にもバンドを認められた(Fig. 1A, 2-3 mer, 4 mer). 年齢によるA $\beta$ 量に特に差はなかった. またTx-insoluble画分でもわずかにA $\beta$ を認めたものの, 大部分はTx-soluble画分に存在するものと考えられた.

なお, 82E1はA $\beta$ のN末端側から5残基目までを認識する抗体である. この部分はヒトと*O. degus*とで共通の配列であるため, 82E1で同定できたことは妥当な結果である.

次に, ヒトA $\beta$ を一残基毎に分離できる電気泳動システムを用いた検討を行った(Fig. 1B). ヒトのA $\beta$ 40およびA $\beta$ 42と移動度が一致するバンドは認められなかった(Fig. 1B, 矢印). これには2つの理由が考えられる. 1つは, ヒトA $\beta$ と配列が異なるために移動度が異なるということ, もう1つはC末端側の抗体の検討より, A $\beta$ 40およびA $\beta$ 42とは異なる長さのものが産生されている可能性がある, ということである.

### (2) タウタンパク質の解析

次に, タウについても同様に検出できるか調べた. タウのリン酸化状態に依存しない抗体(Total tau)や個々のリン酸化部位に対する抗体を複数種検討したが, これらはヒト, ラット, マウスをまたいで使用できる抗体である. Fig. 2に示すように, *O. degus*においても使用できることが確かめられた.

まず, TBS-soluble画分に含まれるタウについて解析した(Fig. 2A, B). まずTotal tauを見てみると, 10ヶ月齢と60ヶ月齢とでパターンが違うことが分かった. 10ヶ月齢では47kDa付近の低分子側にもタウが見られるが, 60ヶ月齢ではその量が減少し, 60kDa付近のタウが増加する傾向が見られた(Fig. 2A, Total Tauを参照). この違いは, リン酸化に伴う移動度の違いだけではなく, 発現しているアイソフォームの違いも含まれている可能性があり, 年齢依存的なスプライシング制御が行われている可能性が示唆された. 次に, リン酸化タウの違いを見るため, 5種類のリン酸化タウ抗体を用いて解析をした. Total tauの量で補正した結果, 60ヶ月齢において, いずれのリン酸化タウも増加する傾向が確認できた(Fig. 2A, B). 更に, Tx-soluble, Tx-insoluble画分にタウが含まれるかを確認した(Fig. 2C). 60ヶ月齢の方が多いと考えられた. 10ヶ月齢でも60ヶ月齢でもTx-soluble画分にタウを認めた. バンドのパターンもTBS-soluble画分の結果を踏襲するものであった. Tx-insoluble画分については, 60ヶ月齢で顕著なタウの存在を認めた. これらの結果から, *O. degus*では, 年齢依存的なリン酸化タウの増加, 界面活性剤不溶性タウの増加が起きていると考えられた.

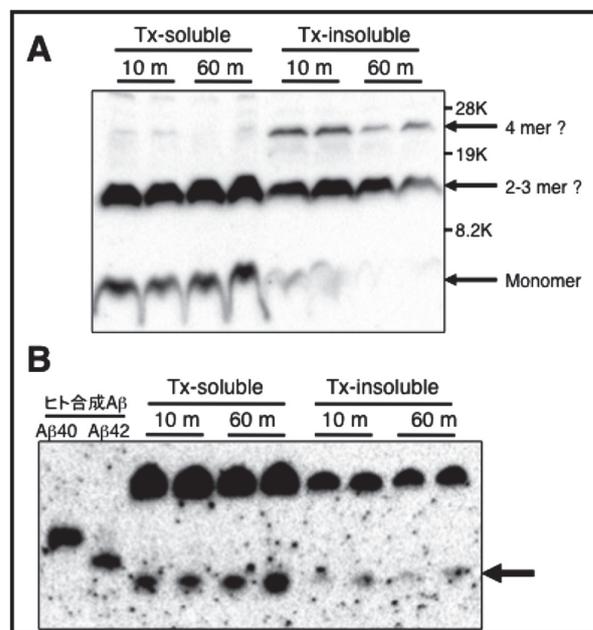
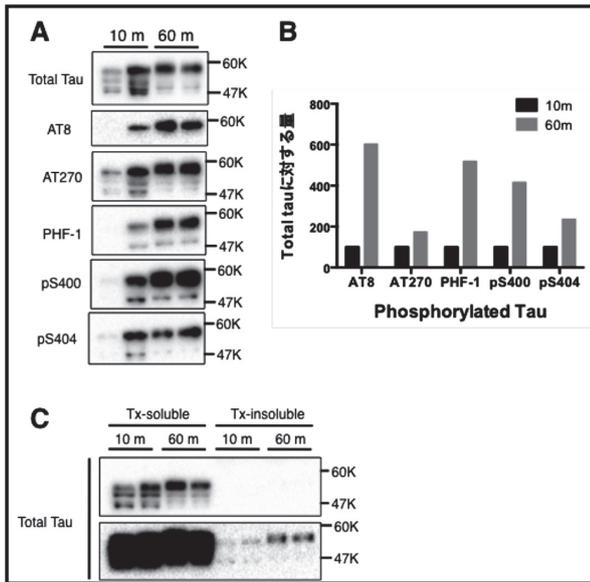


Fig. 1. *O. degus* 脳のA $\beta$ の解析. (A) Tx-soluble, Tx-insoluble各画分に含まれるA $\beta$ を16.5% Tris/Tricineゲルを用いて泳動し, 抗A $\beta$ 抗体82E1によって検出した. 矢印はA $\beta$ を示す. (B) Tx-soluble, Tx-insoluble各画分に含まれるA $\beta$ を, 8M尿素を含む11% Tris/Tricineゲルを用いて泳動し, 抗A $\beta$ 抗体82E1によって検出した. 左側にはヒト合成A $\beta$ 40およびA $\beta$ 42を泳動マーカーとして流した(各々20 pg). 矢印はA $\beta$ を示す.



**Fig. 2.** *O. degus* 脳のタウの解析. (A) TBS-soluble画分に含まれるタウの解析. Total tauはリン酸化状態に依存しない抗体. 他はタウのリン酸化に依存した抗体を用いた結果である. AT8はpS199, pS202, pT205のリン酸化を認識, AT270はpT1810のリン酸化を認識, PHF-1はpS396, pS404のリン酸化を認識する抗体である. (B) (A)のプロット結果の測定結果. グラフはTotal tauで補正した各リン酸化タウの量の平均値を表す. (C) Tx-soluble, Tx-insoluble画分に含まれるタウの解析結果. 下のパネルは長時間露光したもの.

**考 察**

ヒトに近い加齢過程を示すと考えられる齧歯類 *O. degus* において, アルツハイマー病のマーカータンパク質とも言えるAβおよびタウの解析を実施した. なお, まだ標本数が十分ではなく, 今回は2個体ずつでの検討結果を示した.

本研究により, 従来の研究で使用されてきた抗体が *O. degus* にも適用できることが確認できた. また, Aβに関しては特に加齢に依る変化は認められなかったが, タウについては年齢依存的な発現アイソフォームの変化, リン酸化の変化, 可溶性の変化を示唆する結果となった. 近年,

加齢に依存したタウの蓄積を中心に据えた認知症の定義も提案されており<sup>7)</sup>, *O. degus*での検討結果は, ヒトの老化に伴って起きる脳内の変化を考える上で重要な示唆を提供するものとなろう. これらの研究をもとに公的資金を獲得して, 近交系を確立して, 埼玉医大に *O. degus* コロニーを構築して, 各研究者に提供できるようにしていきたい.

**謝 辞**

*O. degus*をご提供していただいた京都橘大学・上北先生に深く感謝します. 薬理学教室, 動物施設, 中央機器施設関係者各位と助成をしていただいた埼玉医科大学に感謝します.

**参考文献**

- 1) Mattson MP & Magnus T. Ageing and neuronal vulnerability. *Nat Rev Neurosci.* 2006; 7(4): 278-94.
- 2) Medina M & Avila J. The need for better AD animal models. *Front Pharmacol* 2014; 5: 227.
- 3) Inestrosa NC, et al. Human-like rodent amyloid-beta-peptide determines Alzheimer pathology in aged wild-type *Octodon degu*. *Neurobiol Aging* 2005; 26(7): 1023-8.
- 4) Tarragon E, et al. Memantine prevents reference and working memory impairment caused by sleep deprivation in both young and aged *Octodon degus*. *Neuropharmacology* 2014; 85: 206-14.
- 5) Okanoya K, Tokimoto N, Kumazawa N, Hihara S, & Iriki A. Tool-use training in a species of rodent: the emergence of an optimal motor strategy and functional understanding. *PLoS One* 2008; 3(3): e1860.
- 6) Yagishita S, Morishima-Kawashima M, Tanimura Y, Ishiura S, & Ihara Y. DAPT-induced intracellular accumulations of longer amyloid beta-proteins: further implications for the mechanism of intramembrane cleavage by gamma-secretase. *Biochemistry* 2006; 45(12): 3952-60.
- 7) Crary JF, et al. Primary age-related tauopathy (PART): a common pathology associated with human aging. *Acta Neuropathol* 2014; 128(6): 755-66.