

アルツハイマー病モデルマウスの作成、解析と治療への応用

Mouse Models for Alzheimer's Disease

研究代表者 群馬大学生体調節研究所細胞構造分野 教授 原田 彰宏

Laboratory of Cellular and Molecular Morphology,
Department of Cell Biology,
Institute for Molecular and Cellular Regulation,
Gunma University, Professor, Akihiro HARADA

和文アブストラクト

本研究では、アルツハイマー病において如何にして神経原線維変化、細胞死が生じるかを解明するため、下記の2種類のモデルマウスを作製し、その解析を行った。

A) 遺伝性痴呆症 FTDP-17 と同様の変異タウ cDNA を持つノックインマウス、および変異タウ cDNA を過剰発現するトランスジェニックマウスを作製し、その解析を行った。

B) 樹状突起に存在する微小管関連蛋白 MAP2 のノックアウトマウスを作製し、アルツハイマー病との関連を調べた。その結果ノックアウトマウスでは、樹状突起内の微小管の本数および樹状突起の長さが減少した。また、海馬や大脳皮質等において PKA が樹状突起から選択的に失われ、これによる長期記憶の異常も認められた。同様の役割をタウが担っており、それがアルツハイマーの発症メカニズムに関わっている可能性もあるため、タウのノックアウトマウス等でも同様の解析を行うことを予定している。

Abstract

In a hereditary neuronal disease called FTDP-17, clinical features (dementia) and pathological features (neurofibrillary tangles and neuronal cell death) similar to Alzheimer's disease are observed. The gene of tau protein, one of microtubule-associated proteins, have missense mutations or splice-donor site mutations in these patients. To make the model mice for human dementia, we made 'knockin' mice which have a mutated human tau cDNA on the mouse tau locus, and 'transgenic' mice which overexpress mutated human tau cDNA. We are now analysing the mutant mice to see if they have similar phenotype as human patients. We have

also generated mice deficient of MAP2, a microtubule-associated protein whose function is similar to tau protein. In MAP2-deficient mice, a reduction of dendritic length and a reduction of the amount PKA in dendrites was observed. Defect in long-term memory was also detected, suggesting that microtubule-associated proteins is highly associated with dementia.

1. 研究目的

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease, AD) は老年期痴呆の主な原因であり、その病因の解明及び治療法の開発は医学上極めて重要である。ADの神経病理学的特徴は、老人斑と神経原線維変化 (PHF (paired helical filament) から成る) であり、その結果、皮質の神経細胞死がおこると考えられる。最近、ADと同様の病理学的特徴 (神経原線維変化と神経細胞死) をもつ遺伝性痴呆症 FTDP-17 がタウ遺伝子の変異によって生じることが判明し、タウの異常自身が神経原線維変化の必要十分条件であることが明らかとなった。FTDP-17 ではタウ遺伝子はアミノ酸の置換やスプライシング異常をきたす変異を生じている。その結果、変異型タウや4リピートタウの割合が増加し、この異常なタウ蛋白の蓄積 (gain of function) が神経原線維変化を引き起こし、細胞死を生じる原因となっていると考えられる。そこで本研究では、変異型タウ蛋白や、タウ蛋白と同様の機能を有する微小管関連蛋白 MAP2 が、如何にして痴呆症と関連しているかを解明するため、

A) タウノックインマウス及びタウを神経特異的に過剰発現するマウス

B) MAP2 ノックアウトマウス
を作製し、その解析を行った。

2. 研究経過

A) タウノックインマウス及びタウを神経特異的に過剰発現するマウスの作成及び解析について

A-1) これらの変異 (特に337番目のバリンがメチオニンに変化したもの) を持つヒトのタウ cDNA をジーンターゲティング法によってマウスのタウ遺伝子座に導入する (「ノックイン」) (図1)。現在、ヒトのタウ cDNA を両方のタウ遺伝子座に導入したマウス (ホモ接合体) の作製が終了し、長期飼育、解析中である。現在2ヶ月齢まで解析しており、ホモでその遺伝子を持つマウスではマウスの内在性のタウ蛋白は存在しない一方、変異を持つヒトのタウ蛋白はマウスのタウ蛋白の70%程まで発現していた。しかし、このマウスにおいては神経原線維変化等の神経病理学的所見や神経学的な異常が認められなかったため、更に症状の時間経過を促進するため、このマウスを、ヒトでADをおこすアミノ酸の置換を持つ変異型 APP (amyloid precursor protein) のトランスジェニック

マウス等と交配中である。

今後、これらのマウスを解析して FTDP-17 さらには AD 発症におけるタウの役割を解析する予定である。

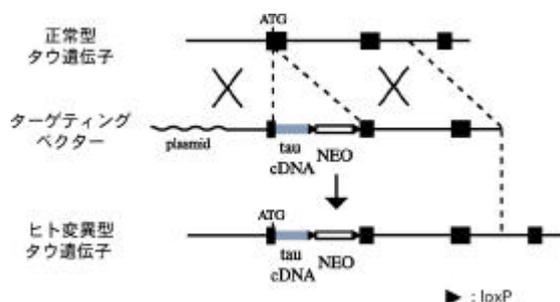


図 1

ヒトの変異型タウ遺伝子 (cDNA) をマウスのタウ遺伝子座に挿入した図

導入した変異としては

V337M (337 番目のバリンをメチオニンに置換)

P301L (301 番目のプロリンをロイシンに置換)

R406W (406 番目のアルギニンをトリプトファンに置換)

等である。

A-2) 変異を持つヒトのタウ cDNA を神経細胞特異的に過剰発現させるトランスジェニックマウスを作製する。

ヒトの FTDP-17 の発症には 30 年以上かかるため、A のノックインマウスでは痴呆が発症しない可能性もある。しかし、タウを培養細胞で過剰発現させると細胞分裂の異常が見られるため、単にタウを過剰発現するトランスジェニックマウスは致死になる可能性が高い。そこで、ヒトのタウ cDNA の発現レベルをさらに上げて神経原線維の形成を促進するために、強力

な CAG プロモーターとヒトのタウ cDNA の間に、loxP 配列で挿入し、蛋白をコードしない DNA 断片を挿入し、Cre recombinase を発現する組織や細胞だけでヒトのタウ cDNA を過剰発現できるトランスジェニックマウスを作製し、そのマウスと、神経細胞特異的に Cre recombinase を発現するマウスを交配することも試みている。

前者のトランスジェニックマウスは既に作製が終了しており、それだけでは特に異常は認められない。現在、後者の神経細胞特異的に Cre recombinase を発現するマウスを、Cre 遺伝子をマウスのタウ遺伝子座にノックインすることによって作製中である。作製が終わり次第、A と同様の手法を用いて解析する予定である。

B) MAP2 ノックアウトマウスの作成と解析

タウは微小管関連蛋白の 1 つであり、神経は他にも構造の類似した微小管関連蛋白をもち、その役割はタウの役割を知るために非常に参考になる。そのため、我々は樹状突起に存在する微小管関連蛋白 MAP2 のノックアウトマウスを作成し、解析を行った。MAP2 ノックアウトマウスでは、樹状突起内の微小管の本数および樹状突起の長さが減少していた。海馬、大脳皮質等においては PKA (A キナーゼ) が樹状突起から選択的に失われていた。さらに、PKA の量の減少により、PKA の基質の 1 つである転写因子 CREB のリン酸化に異常がおきていた。また、樹状突起の形態や PKA のシグナル伝達異常によると思われる長期記憶の異常も認められ、MAP2 が

単なる細胞骨格としてだけでなく、神経のシグナル伝達にも重要な役割を果たしていることが示唆された。

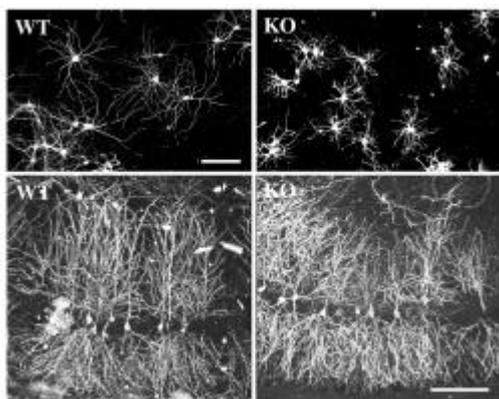


図2 MAP2 ノックアウトマウスにおける樹状突起の形成不全

上. 3週間培養した海馬神経細胞の樹状突起を rhodamine-phalloidin で染色したもの (WT: 野生型、KO: MAP2 ノックアウトマウス)

樹状突起の長さが減少しているのが明らかである。

下. マウス成体の海馬組織を単離し、ゴルジ (鍍銀) 染色で染めたもの

やはり樹状突起の長さが減少している。

3. 研究成果

タウのノックインマウス及びトランスジェニックマウスを作製し、ヒトのアミノ酸変異を持つマウスの作製に成功した。

またタウの類縁分子 MAP2 のノックアウトマウスを作製し、その樹状突起の形態や神経細胞内のシグナル伝達の異常を認め、更に長期記憶の異常を認めた。

4. 今後の課題と発展

タウのノックインマウス及びトランスジェニックマウスでアルツハイマー病の病理所見は得られなかったため、更に他のマウスと交配して病理症状を呈するマウスを作製する。

また、MAP2と同様に、タウが神経内での情報伝達に関与しており、それがアルツハイマーの発症メカニズムに関わっている可能性もあるため、タウのノックアウトマウスや FTDP17 で生じている変異を導入したノックインマウスでも MAP2 のノックアウトマウスと同様の解析を行うことを予定している。

5. 発表論文リスト

1. MAP2 is required for dendrite elongation, PKA anchoring in dendrites, and proper PKA signal transduction. Harada A., Teng J., Takei Y., Oguchi K., Hirokawa N. *J. Cell Biol.* 2002, 158, 541-549