
[総 説]

ヒトアミロイド β 過剰発現マウスを用いたアルツハイマー病研究

木村 良一

山陽小野田市立山口東京理科大学 共通教育センター 准教授

Studies of Alzheimer's disease in transgenic mice that overexpress the human mutant form of APP and PS1.

Ryoichi KIMURA

Associate Professor, Center for Liberal Arts and Sciences
Tokyo University of Science, Yamaguchi

Abstract

The super aging society advances in not only Japan but also the world, and dementia of the elderly person is causing a serious social issue. Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disorder, and accounts for half or more of dementia. As we are known for Beta-Amyloid ($A\beta$) Hypothesis, AD is characterized by senile plaques constituting extracellular deposits of $A\beta$ fibrils. However, interestingly, $A\beta$ of the mouse could not cause Alzheimer's disease. For that reason, human $A\beta$ was produced forcibly in the AD model mouse brain. In addition, for getting better model mice, the assorted gene harbored Familial Alzheimer's Disease (FAD) mutations. I'd like to introduce 5XFAD mice that is best AD model mice at present. 5XFAD APP/PS1 doubly transgenic mice is co-express and co-inherit FAD 3 mutant forms of human APP and 2 mutant forms of human PS1 transgenes. In the hippocampal dysfunctions as observed by reduced levels of baseline transmission and long-term potentiation at Schaffer collateral-CA1 synapses of hippocampal slice from 6-month-old 5XFAD mice. We also tested 5XFAD mice with Y-maze spontaneous alternation, contextual fear conditioning and Morris water maze. Those tests were impaired age-dependently in 5XFAD mice, as correlated with the onset of hippocampal synaptic failures. 5XFAD mice provide a useful model system to investigate the mechanisms and therapeutic interventions for multiple synaptic and memory dysfunctions associated with AD. This paper follows the article published in the previous issue by Kimura (2009-) and the purpose of these general remarks is inquiry of the superior AD model animals, 5XFAD mice. It could be help for treatment and the innovative drug development of the future Alzheimer's disease study.

キーワード：アルツハイマー病, モデルマウス, 5XFADマウス

1. アルツハイマー病とアミロイド仮説

我々が迎えている超高齢社会において、認知症の問題は避けては通れない重要な社会問題である。その認知症の半分以上がアルツハイマー型認知症であると言われており、アルツハイマー病克服に向けて、原因究明・予防・創薬などの多くの研究が行われている。しかし残念ながら、近年いずれにも大きな進展はない。

アルツハイマー病の原因としては、アミロイド・ベータ ($A\beta$) というタンパク質が記憶と学習の機能に携わる脳領域に沈着するためとする、アミロイド仮説が有力である (図1)。細胞膜には Amyloid Precursor Protein (APP) と呼ばれる $A\beta$ の前駆タンパク質があり、その一部が $A\beta$ として細胞外に放出される。 $A\beta$ はオリゴマーや老人斑を形成して認知機能を低下させたり、神経死を誘導したりする (アミロイドーシス) が起こるが、その全貌は明らかではない。

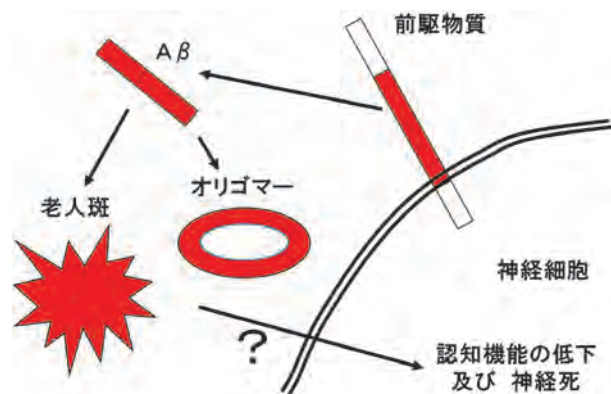


図1 アミロイド仮説

一方、近年のアメリカの DIAN レポートなどのコホート研究により、 $A\beta$ はアルツハイマー病の臨床症状が確認されるより20~30年も前の時点から、すでに脳内に過剰に発現し蓄積が始まっていることが明らかになっている¹⁾。しかしその原因も解明されていない。

$A\beta$ の脳内動態は未知な部分が多く、それがゆえにアルツハイマー病克服は困難を極めている。アルツハイマー病を知るには、まずは謎多き $A\beta$ の役割を知る必要がある。

2. 非臨床試験の重要性

新薬の有効性・安全性を評価する場合、疾患モデル動物を用いて前臨床試験を行い、その後ヒトを対象と

する臨床試験へと移行する。しかしながら現在では、遺伝学や行動実験の発展、様々な計測技術の開発により、前臨床試験の結果の詳細な解析そのものが、対象とする病気の本質を見抜く重要な手段となってきた。前臨床試験は、もはや臨床試験のためのただの前座ではなく、創薬の中心として位置づけられ、**非臨床試験**と呼ばれる (図2)。

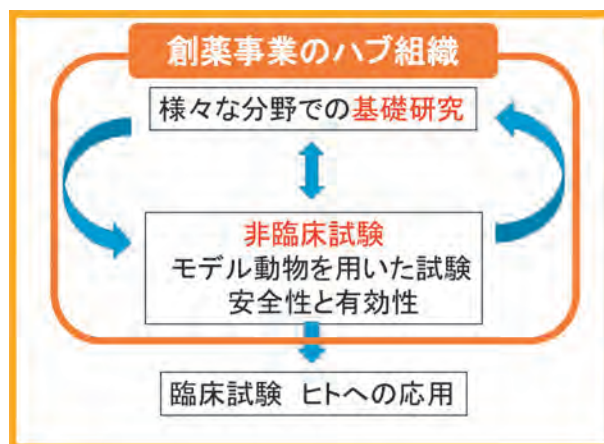


図2 非臨床試験

アルツハイマー病研究でもマウスを用いた非臨床試験が盛んに行われている。前項でも述べたように $A\beta$ に関する研究が重要であるため、ヒト $A\beta$ を過剰発現するモデルマウスが多く開発・改良され、研究に寄与してきた。

3. アルツハイマー病モデルマウスの開発の歴史

マウスの $A\beta$ はヒトの $A\beta$ と少しだけ構造が違い、アミロイドーシスを起こさない。したがってマウスがアルツハイマー病を呈するためにはヒトの $A\beta$ をマウス脳内に発現させる必要がある。

また、それだけではアルツハイマー病に見られるような急激なアミロイドーシスを起こさないため、遺伝的に過剰にヒト $A\beta$ を発現させる。アルツハイマー病は40代前後の早期に発病する先天性の事例が全体の1割ほど確認されている。その中で、 $A\beta$ の前駆たんぱく質 (APP) 上にある家族性優性遺伝の変異部分 (APP_{V717F} , APP_{SWE} , $APP_{Florida}$ など) が、 $A\beta$ 過剰発現の危険因子として同定されている。それらをモデルマウスに挿入し、ヒト $A\beta$ を過剰発現させることが試みられた。更に、APP から $A\beta$ が切り出されるときに主に $A\beta_{1-40}$ と $A\beta_{1-42}$ が産出されるが、より毒性の強い $A\beta_{1-42}$ の割合が多く産出されるようにプリセニン1

表1 ヒトAβ過剰発現マウスリスト (抜粋)

	変異部位もしくは配合	文献	備考
PDAPP	the Indiana mutation (APP ^{V717F})	2	初めてのヒトAβ 過剰発現マウス
Tg2576, APP23	the Swedish mutation (APP ^{SWE})	3, 4	
TgCRND8	APP ^{V717F} and APP ^{SWE}	5	複数の変異部位を挿入
PSEN1	PSEN1 ^{M146V} , PSEN1 ^{M146L}	6	PSEN1の変異がAβ ₁₋₄₂ を選択的に増加
PSAPP	Tg2576 X PSEN1 ^{M146V} など	7	複数の遺伝子変異部位を挿入
APP/PS1	APP ^{SWE} /PS1 ^{dE9}	8	
3xTg-AD	APP ^{SWE} , PSEN1 ^{M146V} , and tau ^{P301L}	9	tauのリン酸化を促進する変異部位を含む
5XFAD	APP ^{SWE} /V717F/FL and PSEN1 ^{M146V} /L286V	10, 11	

(PSEN1) というタンパク質の変異部位も挿入された。これらの挿入変異が多ければ多いほどアルツハイマー病は早期に呈する。

5XFAD マウス以外のモデルマウスでは生後8か月～1年経過しないとアルツハイマー病を発症しないが、5XFAD マウスは半年で発症し、様々な非臨床試験を比較的効率よく行うことができる。

4. 5XFADマウスを用いた非臨床試験

Aβ を早期に大量に細胞外に生成するのが優れたモデルマウスであるならば、5XFAD マウスは今現在も最も優れたモデルマウスである。発症が早ければ早いほど実験計画も立てやすく、実験自体も早く終わることができる。それだけでも非常に有益である。

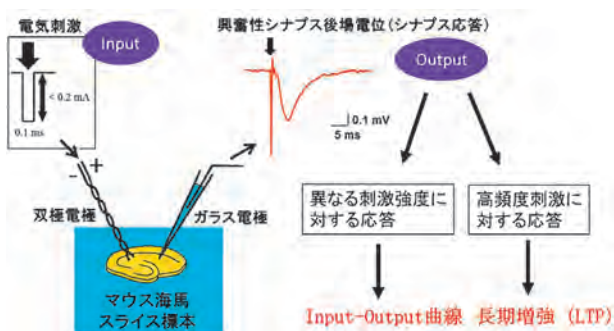
アルツハイマー病モデルマウスの認知機能測定は

i. 電気生理学的手法

ii. マウス行動実験

を行った。

i. 電気生理学的手法



(図3)。海馬CA1エリアのシェファー側枝(前シナプス側の軸索の束)を双極電極で電気刺激し、その応答として放線状層で観察される局所的な電位変化(興奮性シナプス後場電位)を、ガラス電極を用いて記録する。30秒に1回の刺激では、毎回同じ大きさのシナプス応答を安定に得ることができる。このシナプス応答は刺激の大きさに依存的であり、電気刺激(Input)に対するシナプス応答(Output)のグラフの傾きから、シナプス伝達効率を評価した。

一方、海馬の機能が活発なときに、脳波ではシータリズム(5 Hz)が観測されるが、シータリズムで短い100 Hzの高頻度刺激(バースト刺激)を与えるとシナプス応答が大きくなり、一時間以上経ってもその大きさは維持される。この現象は長期増強(LTP)と呼ばれ、応答の増加を神経回路の変化、その変化を学習もしくは記憶の結果と捉えることで、認知機能の指標として解析する。つまり、LTPが十分大きければ認知機能は正常だが、シータバースト刺激後も応答があまり変化せずLTPが小さいならば、認知機能が低下している可能性が高い。

5XFAD マウスにおけるシナプス応答の結果を表2に示す。

表2 5XFADマウスの野生型に対するシナプス応答の低下

	Input-Output曲線の傾き	長期増強(LTP)
4ヶ月齢	29% ↓ 2.1 → 1.5 [1/ms] *	4% ↓ 141 → 137 [%] *
6ヶ月齢	61% ↓ 1.8 → 0.7 [1/ms] *	30% ↓ 154 → 124 [%] *

*: 野生型の値 → 5XFADマウスの値

認知機能を中心に司る海馬を含んだ脳スライス標本を作製し、電気刺激によるシナプス応答を計測する

ii. マウス行動実験

マウスはラットなどに比べると高次脳機能が劣るので、認知機能実験を行う際はより緻密に計画し、引数も十分余裕を持って用意し、万全の準備が必要である。できれば複数の認知機能試験を実施し、詳細に解析・検討することが望まれる。本稿では海馬由来の認知機能の評価を、5XFAD マウスによる Y 迷路試験と恐怖条件づけ試験を行って評価した。

a. Y 迷路試験

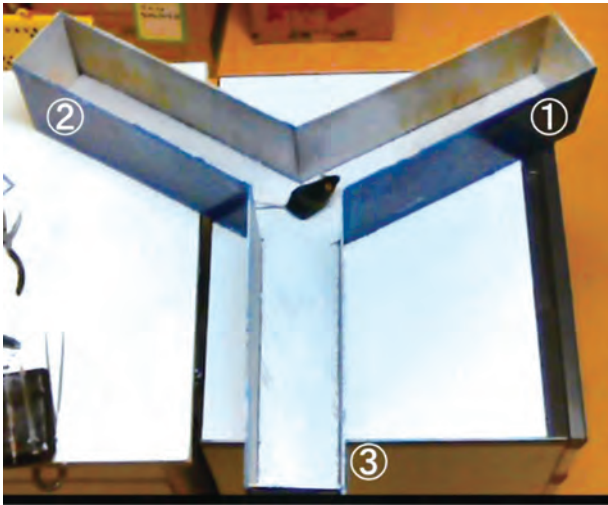


図4 Y迷路試験

Y 迷路実験装置の形状は図4の通りであり、3方のアームは違いが無いように作られている。実験では各アームに①②③と番号を付け、装置の真ん中に置かれたマウスがどのアームに探索に行ったかを記録した。マウスのアクティビティを示す何回アームに探索を行ったか（アーム侵入回数）を各群において変わらないことを確認したうえで、マウスが直近に探索したアームではないアームを選択した回数（アーム選択正答率）を調べた。例えば①→②と探索して中央に戻ってきたマウスは③のアームを探索しに行くのが正解で、もし①のアームに侵入したのならば、①を探索したのを忘れていたことになり不正解とした。つまりアーム選択正答率が高ければ高いほど、認知機能が高いと判断した。

6 か月齢の野生型マウスと5XFAD マウスの間に、アーム侵入回数の差は見られなかった（野生型 33 % - 5XFAD 35 %）。しかしアーム選択正答率は明かに5XFAD マウスの方が低かった（野生型71 % - 5XFAD 57 %）。よって5XFAD マウスは、6 か月齢ですでに認知機能の能力が落ちていることが示された。

b. 恐怖条件づけ試験

マウスを専用の箱に入れ電気刺激を与えた後、24時間後に同じ箱にマウスを入れると、マウスは恐怖で動けなくなる“すくみ反応”（Freezing）を起こす。一定時間内の総すくみ反応時間の割合を記憶能力の指標とした。

4 か月齢のマウスでは、電気刺激から24時間後の野生型マウスと5XFAD マウスには Freezing の差がほとんど見られなかった（野生型 35 % - 5XFAD 40 %）。しかし6 か月齢のマウスでは明かに5XFAD マウスの記憶能力が低下した（野生型32 % - 5XFAD 18 %）。

5. 次世代モデルマウス

このように5XFAD マウスは優れたアルツハイマー病モデルマウスではあるが、ヒト APP 遺伝子と PS1 遺伝子の2つをマウス遺伝子に挿入する発現法を採用しているため、それに起因する体質の弱さがある。モデルマウスとしてのフェノタイプとは別に考える必要があるが、明確に分けることは困難である。また、A β 1-42の量だけを多くすると、それに付随した A β 関連の短いペプチドも多く産出され、予期せぬ影響をもたらす危険が高くなる。

そこでヒト遺伝子をマウス遺伝子と置き換える「Knock-in (KI) 技法」を用いた次世代モデルマウスとして、KIAPP マウスが推奨されている。マウス A β は凝集性を示さないため、A β の配列をヒト化した上で更に

- ① A β 産生量を増加させる Swedish 変異
- ② A β の中でも毒性の強い A β ₁₋₄₂ の産生比率を増加させる Iberian 変異
- ③ A β が蓄積しやすくなる Arctic 変異

を導入し、APP 過剰発現マウスよりマウス本来の恒常性を保ち、ヒトのアルツハイマー病本来の病態に近いジェノタイプを呈することが期待できる¹²⁾。

5XFAD マウスも次世代モデルマウスも、他のアルツハイマー病モデルマウスと比較して早く、半年で強制的に発症する利点を持ち、行動実験、電気生理学的研究、イメージングにおいても個体差が少ないなど、その有用性は突出している。

6. 最後に

これまでアルツハイマー病新薬の最終的な臨床試験

が400以上も行われたが、成果があったものはごく僅かであり、いずれも対症療法の薬に留まる。それでも我々は地道に基礎研究と非臨床試験を繰り返して、アルツハイマー病克服に向けて進んで行くしかない。我々もアルツハイマー病と糖尿病との関連性から、二型糖尿病患者の隣ランゲルハンス島から最初に抽出されたアミリンという物質に注目し、研究している。¹³⁻¹⁶⁾

アルツハイマー病のような難治疾患において、非臨床試験は基礎研究の中心となってきた。それ故に疾患モデル動物は、これからも非常に重要な位置を占める。慎重に計画・実験し、創薬への大きな一歩へと繋げたい。

引用・参考文献

1. Randall J. Bateman, Chengjie Xiong, Tammie L.S. Benzinger, Anne M. Fagan, Alison Goate, Nick C. Fox, Daniel S. Marcus, Nigel J. Cairns, Xianyun Xie, Tyler M. Blazey, David M. Holtzman, Anna Santacruz, Virginia Buckles, Angela Oliver, R.N., Krista Moulder, Paul S. Aisen, Bernardino Ghetti, William E. Klunk, Eric McDade, Ralph N. Martins, Colin L. Masters, Richard Mayeux, John M. Ringman, Martin N. Rossor, Peter R. Schofield, Reisa A. Sperling, Stephen Salloway, and John C. Morris, "Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer's disease" *N Engl J Med* 367:795-804, 2012
2. Games, D. et al. Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F b-amyloid precursor protein. *Nature* 373, 523-527, 1995.
3. Hsiao, K. et al. Correlative memory deficits, Ab elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 274, 99-102, 1996
4. Sturchler-Pierrat, C. et al. Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 13287-13292, 1997
5. Janus, C. et al. Ab peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease. *Nature*, 408, 979-982, 2000
6. Duff, K. et al. Increased amyloid-b42 (43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature*, 383, 710-713, 1996
7. Holcomb, L. et al. Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes. *Nat. Med.* 4, 97-100, 1998
8. F. Trinchese, S. Liu, F. Battaglia, S. Walter, P. M. Mathews, and O. Arancio, "Progressive age-related development of Alzheimer-like pathology in APP/PS1 mice," *Annals of Neurology*, vol. 55, no. 6, pp. 801-814, 2004.
9. S. Oddo, A. Caccamo, J. D. Shepherd et al., "Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Aβ and synaptic dysfunction," *Neuron*, vol. 39, no. 3, pp. 409-421, 2003.
10. Kimura, R., Ohno, M. Impairments in remote memory stabilization precede hippocampal synaptic and cognitive failures in 5XFAD Alzheimer mouse model. *Neurobiol Dis.* (2):229-35, 2009
11. Kimura, R., Devi, L., Ohno, M. Partial reduction of BACE1 improves synaptic plasticity, recent and remote memories in Alzheimer's disease transgenic mice. *J Neurochem.* 113 (1):248-61, 2010
12. Saito T, Matsuba Y, Mihira N, Takano J, Nilsson P, Itohara S, Iwata N, Saido TC. Single App knock-in mouse models of Alzheimer's disease. *Nature Neuroscience*, (5):661-3, 2014
13. Kimura, R., MacTavish, D., Yang, J., Westaway, D., Jhamandas, J. H. Beta amyloid (Aβ)-induced depression of hippocampal long-term potentiation is mediated through the amylin receptor. *J Neurosci.* 32(48): 17401-17406, 2012
14. 木村良一：アルツハイマー病への新しいアプローチ - Amylin受容体の研究 -、*理大科学フォーラム*、380号2月号24-27頁、2016
15. Kimura, R., MacTavish, D., Yang, J., Westaway, D., Jhamandas, J. H. Pramlintide antagonizes beta amyloid (Aβ)- and human amylin-induced depression of hippocampal long-term potentiation. *Mol. Neurobiol.* 54(1):748-754, 2017.
16. Fu, W., Patel, A., Kimura, R., Soudy R., Jhamandas, J. H. Amylin Receptor: A Potential Therapeutic Target for Alzheimer's Disease. *Trends Mol Med.* 23(8):709-720, 2017