The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Accumulation of murine amyloid β42 in a gene-dosage-dependent manner in PS1 'Knock-in' mice
Author(s)	中野, 有香
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41852
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

氏　　名　中野有香（なかの ゆか）
博士の専攻分野の名称　博　士（医　学）
学位記番号　第　15286　号
学位授与年月日　平成12年3月24日
学位授与の要件　学位規則第4条第1項該当
医学系研究科内科系専攻

学位論文名　Accumulation of murine amyloid β42 in a gene-dosage-dependent manner in PS1 'Knock-in'mice
（変異プレセニリン1遺伝子ノックインマウスにおける変異アレル数に比例したアミロイドβ42蛋白の上昇）

論文審査委員　（主査）
教授　武田　雅俊

（副査）
教授　杉田　義郎　　教授　竹田　潤二

論文内容の要旨

【目的】

家族性アルツハイマー病原因遺伝子としてアミロイド前駆体蛋白質遺伝子、プレセニリン1遺伝子、プレセニリン2遺伝子がクローニングされているが、その中でもプレセニリン1遺伝子変異によるものが1番多く報告されている。家族例と孤発例では臨床症状・病理学的特徴に差はなく、家族例の発症機構を解明することで孤発例の原因にアプローチできるという観点から、アルツハイマー病研究においてこれらの遺伝子を中心としたモデルマウスが作製されてきたが、それらはノックアウトマウスならびにトランスジェニックマウスが中心であった。

このような背景に基づき本研究では、我々の教室で経過観察している家族性アルツハイマー病家系で見つかったプレセニリン1遺伝子I213Tミスセンス変異と同じ変異をもつノックインマウスを作製することにより、より患者の病態生理に近いアルツハイマー病モデルマウスを樹立し、アルツハイマー病の病態解明・治療に役立てることを目的とした。

【方法ならびに成績】

マウス129SVJライブラリーよりプレセニリン1遺伝子のエクソン7領域を含むフラグメントをクローニングし、in vitro mutagenesis法によりエクソン7にI213T変異を導入した。またこの変異のすぐとなりに、genotypingのための制限酵素MboIサイトも同時に導入した。このMboIサイト導入に関しては、内在性のアミノ酸残基がかわることのないようにトリプレットの3番目の塩基のみを入れ替えた。また、イントロン6にセレクションマーカーであるネオマイシン耐性遺伝子を挿入し、これは後に除去できるようにloxP配列ではさんでおいた。このようにして作製したターゲッティングコンストラクトをES細胞にトランスフェクションしネオマイシンにてセレクション後、PCR法・サザン法にてポジティブクローンを同定した。このうち核型が正常のものを用いてアグリゲーション法にてキメラマウスを作製し、胎生初期からCre蛋白を発現しているCAG－Creトランスジェニックマウスと交配させることによりネオマイシン耐性遺伝子を除去し、ノックインマウスを作製した。

ノックインマウス脳におけるプレセニリン1遺伝子のmRNAの発現レベルをノーザンブロット法・RT－PCR法にて検討したところ、ワイルド、ヘテロ、ホモマウスにおいて差は認められなかった。また、各々のgenotypeの胎児脳から初代培養を行いプレセニリン1蛋白量を比較したが、発現量は同じであった。

老人斑の主成分であるアミロイドβ蛋白には、アミノ酸が42個からなるアミロイドβ42蛋白と40個からなるアミロ

イドβ40蛋白の2種類があり、プレセニリン1遺伝子ミスセンス変異はこのうちアミロイドβ42蛋白の比率を上昇させることが患者のfibroblastを用いた研究から知られている。そこで、次にノックインマウス脳におけるアミロイドβ蛋白量を検討した。ワイルド、ヘテロ、ホモマウス20週齢の脳をギ酸処理してホモジネートを得た後ELISA法にてアミロイド蛋白量を調べたところ、アミロイドβ40蛋白量は一定であったが、アミロイドβ42蛋白は変異アレル数に比例して上昇していることが確認された。またそれぞれのgenotypeのマウス胎児脳の初代培養を行い上清中に分泌されるアミロイド蛋白量を調べたところ、脳ホモジネートと同様に変異アレルの量に応じてアミロイドβ42蛋白の上昇が確認された。ノックインマウスのヘテロならびにホモマウスにおいて組織学的変化は32週齢の時点ではみられていない。

【総括】

家族性アルツハイマー病のモデルマウスを作製する目的で、その原因遺伝子であるプレセニリン1遺伝子ミスセンス変異をもつノックインマウスを作製した。このノックインマウスにおいて、変異プレセニリン1蛋白ならびにメッセージ量は、正常プレセニリン1遺伝子と同じであった。

本マウスの脳におけるアミロイドβ蛋白の量を検討したところヘテロ、ホモマウスにおいてアミロイドβ42蛋白が変異アレル数に比例して増加していることが確認された。またノックインマウス胎児脳の初代培養上清中に分泌されるアミロイドβ蛋白でも同様のことが観察されたので、プレセニリン1遺伝子変異はアミロイド前駆体蛋白質からアミロイドβ42蛋白の産生を促進していることが考えられた。以上の結果より、本研究で作製した変異プレセニリン1遺伝子ノックインマウスは、アミロイドβ42蛋白の産生促進に関して実際の症例の病態をよりよく反映していることから、老人斑形成の初期段階を解析するのに有用なモデルであることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究では、発生工学的手法を用いてプレセニリン1遺伝子変異を導入したノックインマウスを作成し、家族性アルツハイマー病モデルマウスの樹立に成功した。このノックインマウスにおいて、変異アレルの発現レベルは正常アレルと同じであることが示され、変異アレル数に比例してアミロイドβ42蛋白が有意に上昇していることが確認された。

アルツハイマー病の病理学的特徴である老人斑の形成に関しては、アミロイドβ42蛋白が重要な役割を果たすことが知られており、また家族性アルツハイマー病患者の血漿並びに線維芽細胞では、正常コントロールと比較してアミロイドβ42蛋白の分泌が上昇することが知られている。この知見を踏まえて本研究を振り返ると、ここで作成されたノックインマウスはアミロイドβ42蛋白の上昇というアルツハイマー病の病態の初期変化を再現しており、老人斑形成にいたるメカニズムを解析するのに非常に有用であるといえる。

以上のことから、本研究は博士（医学）の学位授与に値すると考えられる。