

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）  
研究報告書

臨床応用可能なアルツハイマー病の生物学的マーカーの確立に関する研究

難波 吉雄（東京大学大学院医学系研究科老化制御講師）  
遠藤 英俊（国立療養所中部病院内科医長）  
宇野 正威（国立精神・神経センター武蔵病院副院長）  
森 啓（大阪市立大学医学部教授）

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）  
総括研究報告書

臨床応用可能なアルツハイマー病の生物学的マーカーの確立に関する研究

主任研究者 難波 吉雄 東京大学大学院医学系研究科講師

研究要旨 介護保険の導入などによって、アルツハイマー病の生物学的マーカーの確立が注目されている。本研究は、臨床現場においても有用となるアルツハイマー病の生物学的マーカーを確立することを目的としている。初年度の研究では、介護保険制度における痴呆症の認定については多くの課題があり、さらに多方面にわたる詳しい研究が必要でこと、脳血流検査による画像では帯状回後部の選択的血流低下を示し、縦断的变化では、左側海馬頭部、左側海馬傍回、前脳基底部に血流低下を認めたこと、脳脊髄液中のアミロイド前駆体（sAPP）、アミロイドPコンポーネント（APC）、タウタンパク（Tau）などの微量測定では APC、APP 値については3群間で有意差を認めなかったが、タウについては従来の報告と同様に AD で有意に高値であるだけでなく、タウアイソフォーム別の検討が診断に有効である可能性が示唆されたこと、欧米で AD の危険因子である可能性が指摘された ButyrylcholinesteraseK、Bleomycin hydrolase は、我が国における AD では危険因子でない可能性が指摘されたこと、環境要因の関与では、短時間の昼寝の習慣が ApoE 遺伝子型によらず AD 発生に対して予防的に働くという結果や食習慣において、魚を十分摂取し摂取した不飽和脂肪酸 n6/n3 比が AD において高いといったことなどが明らかとなった。新たなマーカーの検索及びこれらの陽性所見について、臨床応用の検討が必要と思われる。

分担研究者

遠藤英俊

国立療養所中部病院内科医長

宇野正威

国立精神・神経センター武蔵病院副院長  
森啓

大阪市大医学部教授

認知機能障害はすでに中等度以上と考えられ、早期軽症段階とは言い難い。

そこで本研究では、AD の生物学的マーカーを確立し、その診断に客観性を持たせるだけではなく、①発症前や早期の AD の可能性を検討することにより、早期治療効果が期待できる、②将来必要となる介護に備えて、家族に精神的・経済的準備期間が与えられる、③痴呆の進行度や治療薬の効果判定、要介護認定システムの構築に資する等の効果が期待される、等の効果を考え、AD の生物学的マーカーについて確立することを目的とする。

A. 研究目的

現在我が国では、介護体制の充実を目指して、介護保険が導入されようとしている。各地の保健所等を中心に、主に中等度から重度の AD 患者ならびにその介護者を対象として AD 患者に対する介護の相談、公的福祉サービス等の充実が図られつつあるが、地域によっては痴呆性高齢者がモデル事業対象者の60%を越えており、その判定結果に対して現場では混乱や不安が生じている。また DSM-IVをはじめ現在主に使用されている診断基準では、診断時点での記憶・

B. 研究方法

画像検査においては脳血流検査を行った。

生物学的マーカーとして

Bleomycin hydrolase、

Butyrylcholinesterase、

アミロイド前駆体蛋白、

アミロイドPコンポーネント、

タウ蛋白、等について検討を行った。タウ蛋白についてはタウアイソフォーム別特異抗体を作製し、特異性を検討した。あわせて環境因子についても検討を行った。

さらに、介護保険モデル事業等における痴呆性高齢者の問題についてもあわせて検討を行った。

### C.研究結果

#### 画像検査

脳血流検査では、初回時に帯状回後部の選択的血流低下を示し、縦断的变化では、左側海馬頭部、左側海馬傍回、前脳基底部に血流低下を認めた。

#### 生物学的マーカー

Bleomycin hydrolase および

Butyrylcholinesterase 遺伝子多型は日本人ADにおいては危険因子ではない可能性が示唆された。

脳脊髄液中のアミロイド前駆体蛋白、アミロイドPコンポーネント、タウ蛋白などの微量測定では前2者については有意差を認めなかったがタウについては従来の報告と同様ADで有意に高値であった。

タウ蛋白については、タウアイソフォームをそれぞれ認識可能な特異抗体が作製され、特異性についても確認された。

環境因子に関する検討では、短時間の昼寝が、また食事因子では魚等の摂取による多価不飽和脂肪酸n6/n3比を低下させることがAD発症に予防的な作用があることが明らかとなった。

モデル事業において一次判定と二次判定の違いが施設において痴呆性高齢者で67%も異なり、これに対して寝たきり高齢者では35%という結果を得た。またIADLの低下が初期に認められる状態を表しており、間接生活援助と機能訓練関連行為に関して特に

算定が重くされており、IADLば分析が重要である。

### D.考察

近年広義のADは、原因が単一ではなく、複数の原因からなるcommon diseaseである可能性が指摘されている。本研究ではAD発症に関わる遺伝因子や環境因子について明らかとし、それらの因子の中から生物学的マーカーとして有用な因子をマーカーとして確立していくこと、さらにそれらの相互作用についても考慮していく必要がある。

また、介護保険モデル事業においても痴呆性高齢者の診断が問題となっているが、このような現場においても用いることができる簡便な診断マーカーを確立することが重要である。

以上の点を考慮し、臨床症状、画像検査等と組み合わせることによって、簡便かつより早期診断が可能なマーカーの開発についてさらに検討を進める必要があると考えられる。

### E.結論

タウアイソフォーム等のいくつかの臨床応用可能なマーカーが確立されつつある。

これらのマーカーの現場での応用に関する検討も重要と考えられる。

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）  
分担研究報告書

日本人のアルツハイマー病（AD）における生物学的マーカーの検討

分担研究者 難波 吉雄 東京大学大学院医学系研究科講師

研究要旨 日本人 AD における生物学的マーカーについて、危険因子という観点から遺伝因子、環境因子の両者について検討した。その結果、欧米において遺伝的危険因子として報告された Bleomycin hydrolase および Butyrylcholinesterase 遺伝子多型は日本人 AD においては危険因子ではない可能性が、環境因子の検討では、食生活習慣とりわけ多価不飽和脂肪酸 n6/n3 比が AD の発症に関与している可能性が示唆された。AD の生物学的マーカーを検討する際には、遺伝因子、環境因子の両者の関係の関連についても考慮する必要があると考えられる。

A. 研究目的

近年広義の AD は、原因が単一ではなく、複数の原因からなる common disease である可能性が指摘されている。本研究では AD 発症に関わる遺伝因子や環境因子について明らかとし、それらの因子の中から生物学的マーカーとして有用な因子をマーカーとして確立していくことを目的とする。

B. 研究方法

Bleomycin hydrolase 遺伝子多型の検討  
Bleomycin hydrolase (BH) 遺伝子には 1450 番目の塩基に A/G の多型があり、443 番目のアミノ酸残基が I/V となる。AD では遺伝子型が G/G であるタイプが対照より有意に高く (0.127 vs 0.066)、また ApoEε4 を持たない群ではさらに高値であること (0.159 vs 0.047) が報告された。しかしながら、その後の報告では結果が一致していないため、我々は日本人において同様の検討を行った。BH 遺伝子多型については、DGGE 法により決定した。

Butyrylcholinesterase 遺伝子多型の検討  
Butyrylcholinesterase の遺伝子多型には制限酵素 MaeI で切断される Kvariant と呼ばれる変異がある (BchE-K)。75 歳以降発症の AD では BchE-K の頻度が高くしかもアポ E

ε4 と相乗作用を持つと報告されたが、その後の報告で結果は一致していないため、日本人で同様の検討を行った。

BchE 遺伝子多型は Jensen らの方法で決定した。

栄養調査

栄養調査では、Sasaki らが開発した自記式食事歴法調査票を用い、コンピューター自動プログラムにより各食品中の栄養素含有比率と摂取頻度をかけあわせた各栄養素を計算し、エネルギー摂取量 1000Kcal あたりに換算した。

C. 研究結果

Bleomycin hydrolase 遺伝子多型の検討  
G のアリル頻度は AD 群では 0.198、対照群では 0.226 と有意な差は認められなかった。

G/G 遺伝子頻度は全体の AD 群と対照群 (0.039 vs 0.040) 及び ApoEε4 非保有者における AD 群と対照群 (0.043 vs 0.033 ; p=0.421) とともに有意な差は認められなかった。

Butyrylcholinesterase 遺伝子多型の検討  
BchE-K 遺伝子 allele 頻度は・AD と対照で有意差を認めなかった。・対照群では日本人が Caucasian より高かった。ε4 保有者では AD と対照に有意差はなかった。ε4 非保有者では AD と対

照に有意差はなかった。75歳未満のADと75歳以上のAD有意差はなかった。BchE-Kはriskへの相乗効果は認められなかった。

#### 栄養調査

ADでは食品で見ると魚及び緑色野菜の摂取が少なかった。栄養素では、ADではカルシウム、ビタミンC、カロチンの摂取が優位に低かった。また多価不飽和脂肪酸 n6/n3 比が対照に比して優位に高かった。

#### D. 考察

日本人のADでは、BH遺伝子多型、BchE-KともADの危険因子である可能性は見いだすことができなかった。今後、欧米における報告との違いについて論ずる場合、我が国においてさらに多数例での検討が必要と思われる。

食事因子における多価不飽和脂肪酸の比が高いという結果は、欧米人と日本人のADの発症率の違いを考える上で非常に興味深い。さらに、この比を用いて予防・治療への応用についても検討が可能と考えられる。

#### E. 結論

今後、ADの生物学的マーカーについて検討する場合は、遺伝因子と環境因子の相互作用についても注目する必要があると思われる。

#### F. 発表論文

Namba Y, Ouchi Y, Asada T, Ueki A and Ikeda K.

Lack of association between bleomycin hydrolase gene polymorphism and Alzheimer's disease in Japanese people. *Ann Neurol* 46:136-137, 1999.

Motoi Y, Aizawa T, Haga S, Nakamura S, Namba Y and Ikeda K. Neuronal localization of a novel mosaic polipoprotein E receptor, LR11, in rat and human brain. *Brain Res* 833:209-15, 1999.

Namba Y, Ouchi Y, Takeda A, Ueki A and Ikeda K. Bleomycin hydrolase immunoreactivity in senile

plaque in the brains of patients with Alzheimer's disease. *Brain Res* 830:200-2, 1999.

Nakamura S, Todo T, Motoi Y, Haga S, Aizawa T, Ueki A, Ikeda K. Glial expression of fibroblast growth factor-9 in rat central nervous system. *Glia* 28:53-65, 1999.

Kunugi H, Nanko S, Ueki A, Isse K, Hirasawa H. DLST gene and Alzheimer's disease. *Lancet* 351:1584-1585, 1998.

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）  
分担研究報告書

介護保険制度における要介護認定と痴呆症の早期診断に関する研究

分担研究者 遠藤 英俊 国立療養所中部病院内科医長

研究要旨 本研究は生物学的マーカーを用いた早期診断の開発研究を行うことを目的としており、介護保険制度における要介護認定で有用となる地方の早期診断の開発と必要な科学的データを検討した。その結果介護保険制度における痴呆症の認定については多くの課題があり、さらに多方面にわたる詳しい研究が必要でことが示唆された。

A. 研究目的

介護保険における要介護認定は介護度を決定づける非常に重要なステップである。現在痴呆症の介護度がこのモデル事業で問題となっている。痴呆の度合いや症状や症候により当然介護負担度が異なることはいうまでもない。モデル事業では介護にかかる「ケアの時間」により介護度が決定されるが、実はケア時間が施設でのケアの総時間の調査に基づいているため、在宅の痴呆のケアと必ずしも一致しない。また痴呆症における早期診断の困難があり、痴呆の判定が要介護認定において問題がある。そこで介護保険における認定での痴呆の判定や早期診断との関係を明らかにするためにこの研究を行った。

研究（I）要介護認定モデル事業と痴呆症に関する研究

B. 研究方法

A 県 S 市における平成 9 年度のモデル事業の結果を分析し、モデル事業における痴呆性高齢者の問題について検討した。また介護保険における要介護認定調査項目の痴呆の早期診断との相関について検討した。

早期診断法の検討のために MMSE で 20 点以上で、物忘れを自覚または

客観的記憶障害を指摘された患者を対象に評価した。また早期の痴呆症における ADL 低下との関係を明らかにするために、入院時の早期痴呆症か加齢に伴う記憶障害患者の分析を行った。さらに MMSE と生活関連動作（instrumental ADL : IADL）との関連について検討した。

C. 研究結果

平成 9 年度の愛知県内のある地域のモデル事業において、100 例中痴呆性高齢者がモデル事業対象者の 60% をこえ、その判定結果により、現場では混乱や不安が生じている。すなわちモデル事業において一次判定と二次判定の違いが施設において痴呆性高齢者で 67% も異なり、これに対して寝たきり高齢者では 35% という結果を得た。その後平成 10 年度のモデル事業においては基準が変更され、最終判断をするにはその結果を待つ必要がある。しかし平成 9 年と 10 年度の違いでまた現場では混乱を来している。さらに現在プログラムの変更がなされている。

IADL については 120 例について MMSE と IADL の関係について分析したが、MMSE で 25 点以上の痴呆症の

ない高齢者でも身体機能の低下などにより IADL の低下を認めるが、ADL に比べ早期に機能低下が認められる。要介護認定においては生活機能低下の指標となる可能性がある。

#### D. 考察

現状では介護保険制度における要介護認定と痴呆症の診断とは概念や基準が異なり、医学的知識や社会的通念と制度とは異なる可能性があることが示唆された。

### 研究（Ⅱ）要介護認定と痴呆の早期診断との関係

#### B. 研究方法

介護保険の要介護認定とかかりつけ医（主治医）の意見書における痴呆症の評価に関する分析と早期診断に関する研究を行う。

#### C. 研究結果

介護保険の認定調査においてはまず痴呆性老人の自立度判定基準がある、さらに認定調査項目の中にいくつかの痴呆、記憶に関する質問項目がある。しかしその内容は日課の理解、生年月日、直前の行為、名前、季節、場所に関する質問が含まれており、中等度から重症で障害をきたす質問のみが、抽出されている。この質問では早期の痴呆症が検出困難である。また問題行動に関する 21 の質問があるが、これも初期、早期、軽症痴呆にはほとんどみられず、中等症から重症患者にみられる症状である。早期さらに最も軽い認定である「要支援状態」は身体上、精神上的の障害があるために日常生活を営むのに支障があると見込まれる状態を示しており、IADL の低下が初期に認められる状態を表しており、間接生活援助と機能訓練関連行為に関して特に

算定が重くされており、IADL ば分析が重要である。

#### D. 考察

痴呆症の要介護認定方法は現在の方法では限界があることが示唆されている。またかかりつけ医の意見書においても痴呆の有無という診断は困難な場合があり、痴呆症の診断における客観的な指標が望まれる。すなわち生物学的マーカや画像診断による客観的マーカの他、神経心理的診断の検討が痴呆症の要介護判定との関係で必要であることを示している。特にアルツハイマー型痴呆の診断において生物学的マーカに関する研究が必要であり、本研究は今後の医療、福祉の分野において診断の客観性や、痴呆症の進行度判定、要介護認定に関して重要であり研究に着手した。

#### E. 結論

痴呆症の早期診断は今後薬物療法にしろ、非薬物療法にしろ、重要な問題であり、早期に判断できる方法が確立する必要ある。つまり成人期に脳ドックなどで物忘れを検出する必要があり、危険因子がある場合に縦断的に経過観察と予防的な介入が必要である。その段階を考えると表 1 のようにステップ 1 から 4 にまとめられる。

将来的にはアルツハイマー病であれば発症を遅延させる薬剤や病気の進行を止める薬剤の開発により本研究の継続性、重要性は示されることとなる。さらに早期診断を行った後に、実際には薬物療法や非薬物療法である集団心理療法、回想法などを行うが、その認知機能の低下や生活機能障害や行動障害を縦断的に追跡する必要がある。表 2 に追跡調査すべき項目を示した。今後は非薬物療法についても根拠のある

実証的方法論に基づき、痴呆患者の治療法について検討し、新しい療法を完成させることが重要である。以上の考察をもとにさらに研究を継続させる計画である。

表1 早期診断のための4つのステップ

- ステップ1 物忘れの検出
- ステップ2 神経心理テストによる物忘れの科学的結果の入手
- ステップ3 画像診断による科学的結果の入手
- ステップ4 生物学的マーカーの入手

表2 診断後の追跡調査項目

- 1) 記憶障害
- 2) 神経心理検査
- 3) IADL と ADL の障害
- 4) 異常画像所見
- 5) 問題行動障害

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 遠藤英俊、痴呆の予防、高齢者総合診療、毎日ライフ、毎日新聞社、5.90.1998
- 2) 遠藤英俊、かかりつけ医の意見書と介護支援専門員の役割、月刊総合ケア、8(7),41-46,1998
- 3) 遠藤英俊、井口昭久、リハビリテーションと介護／介護保険とケアマネージャー、現代医学、46(1),125-129,1998
- 4) 遠藤英俊、加知輝彦、長屋政博、井形昭弘、在宅医療の進歩／我が国における在宅医療の展望、メディカルビュー社、16,13-16,1998
- 5) 遠藤英俊、各国の痴呆性老人に対する家族の態度 シンガポール シンガポールにおける痴呆性老人に対する

家族のケア、老年精神医学雑誌、9(2),143-145,1998

6) 遠藤英俊、長寿科学研究の将来の展望・抗痴呆薬の未来、Geriatric Medicine 36(1), 65-68, 1998

7) 遠藤英俊(共著)、介護保険標準テキスト、高齢者ケアサービス体制委員会編、長寿開発センター、東京,1998



厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）  
分担研究報告書

アルツハイマー病の生物学的指標に関する研究

分担研究者 宇野正威 国立精神・神経センター武蔵病院副院長

研究要旨 われわれのグループが追究している研究課題は、アルツハイマー病（AD）の画像上の特徴、とくに早期症例についてMRI 海馬などの容量およびSPECT 海馬領域などの局所脳血流の解析では、脳形態の標準化による画像統計解析（SPM96）による相対的脳血流分布の解析をこの研究課題に適用した。この方法によると、初回時に帯状回後部の選択的血流低下を示し、縦断的变化では、左側海馬頭部、左側海馬傍回、前脳基底部に血流低下を認めた。脳脊髄液中のアミロイド前駆体（sAPP）、アミロイドPコンポーネント（APC）、タウタンパク（Tau）などの微量測定ではAPC、APP値については3群間で有意差を認めなかったがTauについては従来の報告と同様にADで有意に高値であった。ADの遺伝要因と環境要因の関与では、短時間の昼寝の習慣がApoE遺伝子型によらずAD発生に対して予防的に働くという結果も得られた。

A. 研究目的

アルツハイマー病の生物学的指標を明らかとする目的から以下の研究を行った。

研究（I）アルツハイマー病の画像上の特徴に関する研究の特徴

B. 研究方法

早期AD症例群を対象として、Tc-ECによるSPECT画像から、その脳血流異常と経時的な局所脳血流の変化を解析した。とくに、海馬領域の脳局所血流を、SPECT画像とMRI画像重ね合わせによるROI測定を行い、さらにStatistical Parametric Mapping 96 (SPM96)による解析を行った。対象はDAT 17名（MMSE 17点以上、男性7名、女性10名、56～83歳）、および患者群と同年代の健常高齢者32名（男性13名、女性29名、50～87歳）である。

C. 研究結果

パトラックプロット法により求めた大脳平均血流量は、AD群は $38.6 \pm 4.7$  ml/100g/minで、対照群（ $42.0 \pm 3.8$ ）より軽度低下しており、平均1.4年後の縦断的变化では、 $-1.7 \pm 3.1$ ml/100g/minとさらに低下

する傾向を示した。両側海馬領域血流量は、右側 $26.8 \pm 4.7$ 、左側 $26.7 \pm 5.2$ と左右差なく、対照群の右側 $38.3 \pm 4.2$ 、左側 $38.4 \pm 3.8$ に比べて著しい低血流を認めた。縦断的变化では、初回に比べ、右側 $-3.8 \pm 3.3$ 、左側 $-4.4 \pm 3.2$ と軽度左側優位に低下した。その間、痴呆評価スケールの縦断的变化では、MMSEは $-2.1 \pm 2.6$ 点、HDS-Rは $-2.5 \pm 3.1$ 点と軽度の低下を示した。

上記ROI測定は研究者の主観が入りやすいという欠点がある。そ個で、脳形態の標準化による画像解析が行われるようになった。その手法の1つであるSPM96による相対的脳血流分布の解析をこの研究課題に適用した。この方法によると、初回時に帯状回後部の選択的血流低下を示し、縦断的变化で左側海馬頭部、左側海馬傍回、前脳基底部に血流低下を認めた。

D. 考察およびE. 結論

帯状回後部は大脳辺縁系の一部で、記憶の呼び出しに関与するとされている。早期ADにおいて、この部位の糖代謝率が低下していることは、PETでも明らかにされている。ADの初期に海馬だけで

なく、記憶のネットワークが広く機能低下していることは、アルツハイマー病の病態機序を追究する上で重要なことと思われる。

研究(Ⅱ) 脳脊髄液中の APC, sAPP, Tau の測定に関する研究

#### B. 研究方法

アルツハイマー病診断の生物学的マーカー候補として従来から検討されている脳脊髄液中の Tau, APP に加えて Amyloid P Component (APC) に注目した。また ApoE 遺伝子型にも注目し、これらの物質との関係を検討した。

対象は、AD 患者 72 名 (男性 31 名, 平均年齢 72 歳), 正常対照 9 名 (6 名, 52 歳), 神経学的対照として前頭側頭葉痴呆の患者 11 名 (8 名, 62 歳) である。APC 値は RIA 法により、対象における認知機能は MMSE により測定した。

#### C. 研究結果

APC 値については 3 群間で有意差を認めなかった。APP についても同様であったが、Tau については従来の報告と同様に AD で有意に高値であった。さらに、AD 患者では ApoE 遺伝子型に諸値が異なることが明らかになった。すなわち ApoE4 と ApoE3 の AD 患者とを比較すると前者において Tau は有意に高値であった。

一方、APC と MMSE による重症度との関係を AD 患者において検討したところ逆相関するという新たな所見が明らかになった。すなわち、重症化するほど APC 値は低くなる。このことから脳・血管関門を含む大脳構造の破壊が進むにつれて老人斑と神経原線維変化への APC 沈着が促進される可能性が考えられる。なお APC について検討した 3 群間で有意差が得られなかったことについては、対象とした

AD 患者の重症度が関与していると考えられる。

#### D. 考察および E. 結論

APC は単独では AD 診断マーカーになり得ないが、Tau や ApoE 遺伝子型と組み合わせることで診断マーカーならびに重症度の生物学的指標として有用になると考えられる。

研究(Ⅲ) 遺伝因子と環境因子の検討

#### B. 研究方法

ACT のシグナル遺伝子多型 (AA, AT, TT) のうち AA の頻度が AD では有意に高くしかも ApoE-e4 に対して相乗作用を持つと報告した。我々は同様な検討を行った。

環境因子については、喫煙の他に昼寝の習慣などライフスタイルに関連したものを中心に検討した。

対象は「もの忘れ外来」を受診している AD 患者で、対照としては痴呆のない配偶者を設定した。RF 候補要因については、17 項目について調査した。喫煙の評価は、調査参加者のうち 368 名の AD 患者と 338 名の正常対照のデータを用いて行い、1 日あたりの喫煙本数に喫煙年数を乗じた値を 20 で除した値を算出し、指標とした。

検討は ApoE4 遺伝子型と野性型である ApoE3 遺伝子型とに分けて別々に行った。

#### C. 研究結果

ACT-AA の保有者は AD で 16.7%, 対照で 12.4% と差がなかった。また AD と対照を e4 保有者と非保有者に分けたが ACT-AA の相乗作用はなかった。また、血清 ACT 濃度は AD では有意に高かったが、この場合にも ApoE 遺伝子型との関連は認められなかった。

喫煙に関する研究において、どの ApoE 遺伝子型においても喫煙は AD 発症に関係しなかった。

なおこれ以外に特記すべき所見として、短時間の昼寝の習慣が ApoE 遺伝子型によらず AD 発生に対して予防的に働くという結果も得られた。

#### D. 考察および E. 結論

RF としての喫煙の意義を ApoE 遺伝子型を踏まえて検討した報告はオランダでなされたものが 1 編あり、その報告は ApoE3 を有する者では喫煙は AD 発症を促進すると、結論している。それに対して ApoE4 を有する者では、予防的に働く傾向がみられるものの、統計学的に有意ではなかったとしている。のような彼我の差を生じた原因については、調査方法の相違ととに人種の違いにあるのかもしれない。

AD の危険因子研究においては、ApoE 遺伝子多型を考慮して要因を検討・吟味する必要があると思われる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Asada T, Yamagata Z, Motonaga T, Kimura M, Uno M :Smoking and risk of Alzheimer's disease. *Lancet* 1998,352: 819-819
2. Asada T, Kinoshita T, Morikawa S, Motonaga T, Kakuma T :A prospective 5-year follow-up study on the behavioral disturbances of community-dwelling elderly people with Alzheimer's disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* (inpress)
3. Endoh M, Ueki A, Takahashi K, Yamanaka H, Izumi S, and Tabira T : A lpha-1-antichymotrypsin is not associated with the increased frequency of apolipoprotein-E-epsilon-4 allele in elderly non-demented leprosy patients. *Dementia*, 1998;9:26-28

4.Kamimura K, Tanahashi H, Yamanaka H, Takahashi K, Asada T, Tabira T: Familial Alzheimer's disease in Japanese. *J Neurol Sci* 1998, 160:76-81

5.Kimura M, Asada T, Uno M, Machida N, Kasuya K, Taniguchi Y, Fujita T, Nishiyama E, Iwamoto N, Arai H: Assessment of CSF levels of serum Amyloid PComponent in Alzheimer's disease. *Dementia* (in press)

6.Ueki A, Otsuka M, Nakamura S, Namba Y, Manabe S, and Ikeda K: The TTgenotype of  $\alpha$  1-antichymotrypsin polymorphism protects apolipoprotein E-  $\epsilon$  4 carriers from developing Alzheimer's disease. In: Hanin I, Fisher A, and Yoshida M(eds); *Progress in Alzheimer's and Parkinson's Disease: Advances in Behavioral Biology* vol. 49, Plenum Press, New York, 1998,pp 757-764

7.Yamanaka H, Kamimura K, Tanahashi H, Takahashi K, Asada T, Tabira T: Genetic risk factors in Japanese Alzheimer's patient:  $\alpha$  1-ACT, VLDL,and ApoE. *Neurobiol Aging* 1998,19 (suppl) :43-46

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）  
分担研究報告書

痴呆性疾患におけるタウアイソフォームに関する研究

分担研究者 森 啓 大阪市立大学医学部教授

研究要旨 痴呆性神経疾患におけるタウアイソフォームの同定は疾患分類に大きく寄与することが期待される。最近の例では、従来のタウ分子の封入体形成という点で共通する側面が強調されてきたピック病とアルツハイマー病がアイソフォームという視点で区別されることが示された。我々は、アイソフォーム特異抗体を作成し、アルツハイマー病を含む広く痴呆症疾患を系統的分類することに着手した。

A. 研究目的

タウは神経細胞の軸索に存在する 微小管結合蛋白質の一種で、軸索輸送、軸索伸長や神経細胞内ネットワーク形成に参与している。タウはアルツハイマー病（AD）の特徴的病理学的構造物の一つである paired helical filament（PHF）の主要構成成分であり痴呆発症との関係が示唆されていることから AD の病因を探る上で重要な分子と考えられている。

タウは神経細胞の軸索に存在する シーとまとめることができる。SDS 電気泳動法による解析から、AD の異常タウは分子量 55,64,69KD の 3 本バンドを示し、進行性核上性麻痺で 64,69KD、ピック病では 55,64KD 本バンドを示すことがわかってきた。しかしこの方法では、リン酸化に代表される翻訳後修飾により泳動度が変わるため、疾患間のタウ分子の変化を正確に評価することが困難である。現状では、タウオパシー疾患間のタウバンドの違いが alternative splicing によって生じる 6 つのタウアイソフォームの発現の差異なのか、翻訳後修飾の影響なのか同定できない。この中で、新しい研究成果として、Delacourte らはタウアイソフォーム特異抗体を用いてピック

アミロイドβ蛋白質と異なりタウ封入体は AD 以外に進行性核上性麻痺 皮質基底核変性症、ピック病等のいくつかの神経変性症でも認められるので、これらタウ封入体をもつ疾患群をタウオパ

病を AD のタウ封入体で、初めてタウアイソフォームの発現形式が異なっていることを証明した。これは、タウアイソフォームの発現がタウオパシーの表現型に影響を及ぼす可能性を示唆している。我々は、タウオパシーのタウアイソフォーム発現を解析するため、すべてのタウアイソフォームを区別して認識する特異抗体の確立を試みた。さらに、作製されたタウアイソフォーム特異抗体を用いて免疫組織学的に AD 脳の神経原線維変化におけるタウアイソフォームの発現を解析した。

## B. 研究方法

### 抗体の調整

全てのタウアイソフォーム特異抗体は各タウアイソフォームの領域特異的な合成ペプチドをデザインして免疫源とした。エクソン 3 と 10 の内部配列に対する抗体 (E3,E10) は、ポリクローナル抗体のみを作製し、免疫に用いた合成ペプチドを結合させたカラムでアフィニティー精製した。N 末端側とチューブリン結合領域の接合部位を認識する抗体 (Amino-Junction, E2-Junction, Repeat-Junction) は、モノクローナル抗体も併せて作製した。ヒトタウアイソフォーム cDNA の大腸菌による発現 6 種類のヒトタウアイソフォーム cDNA は以前クローニングしたものを使用した。ヒトタウアイソフォーム cDNA は、全て大腸菌発現用の pET ベクター組み込み、大腸菌 BL21 に形質転換した。形質転換されたアンピシリン抵抗性クローンに終濃度 0.3 M の IPTG を添加して、37 °C 1 時間 LB 培地 (10%Tryptone, 5%Yeast extract, 10%NaCl) 中で組み替えヒトタウアイソフォーム蛋白質発現を誘導した。

### ウエスタンブロッティング

ヒトタウアイソフォームを発現させた大腸菌培養液を 4 °C で 20000 G X 10 分間遠心し集塊を得た。大腸菌塊を含んだ 2-メルカプトエタノールを含んだ SDS サンプルバッファー中で溶解した後、5 分間熱処理した。サンプルを 10%のポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、150MA 定電流で 2 時間 PVDF 膜に転写した。

### 免疫組織化学

ホルマリン固定、パラフィン包埋切片を用い、ABC 法によった。

## C.研究結果

### タウアイソフォーム特異抗体の特異性検討

ヒトタウは N 末端側の 45 番目とチューブリン結合領域の 275 番目のアミノ酸の 2 カ所で、エクソン 2,3,10 挿入の有無によって 6 のアイソフォーム (アミノ酸数 352,381,383, 410,412,441) に分けられる。全てのタウアイソフォーム特異抗体は、アイソフォームに特異的な領域に対する合成ペプチドをデザインして免疫源とした。エクソン 3 や 10 の内部配列を抗原エピトープとする E3,E10 の 2 つの抗体は比較的簡単に得ることができた。

一方、接合部位に対する Amino-Junction, E2-Junction, Repeat-Junction の 3 種類の抗体はその抗原エピトープの特異的配列の希少さから、モノクローナル抗体を含めて作製した。E2-Junction 抗体は、エクソン 2 を共有する 4 種類のタウアイソフォームを認識するのではなく、エクソン 2 のみを持った 381, 412 アミノ酸のタウアイソフォームを特異的に認識するように、エクソン 2 と 4 の接合部位を抗原エピトープとしてデザインした。Amino-Junction 抗体は、エクソン 2 と 3 を持たない 352,383 アミノ酸数のタウアイソフォームを特異的に認識させるために、エクソン 1 と 4 間の接合部位を抗原エピトープとしてデザインした。一方、C 末端側の Repeat-Junction 抗体は、抗原エピトープとして選択されるエクソン 9 と 11 の接合部位が、エク

ソン9と10からなる配列と極めてホモロジーが高いために、1アミノ酸の違いを区別して3リピート型のみを認識することが期待された。以上の抗原エピトープデザインの結果、計5種類のタウアイソフォーム特異抗体が得られた。

これらの抗体の特異性を組み替えタウアイソフォーム蛋白質を用いたウエスタンブロッティングで検討した。組み替え蛋白質を泳動してCBB染色と全てのタウアイソフォームに共通した抗原エピトープを認識する抗ヒトタウ抗体で免疫染色すると、6種類のタウアイソフォームが確認された。同じ膜を用いてN末端側のタウアイソフォーム特異抗体で免疫染色すると、Amino-Junction抗体はN末端側で挿入のないタウアイソフォームを特異的に認識し、エクソン2及び3の挿入されたタウアイソフォームと交差反応を示さなかった。E2-Junction抗体はエクソン2のみを持つ2つのタウアイソフォームを特異的に認識し、エクソン挿入のないものとは反応しなかった。E3抗体は、エクソン3をもつ2つのタウアイソフォームのみを認識した。C末端側の抗体ではRepeat-Junction抗体は、リピート型の3つのタウアイソフォームを特異的に認識し、4リピート型のタウアイソフォームと反応しなかった。またE10抗体は、4リピート型のタウアイソフォームを特異的に認識することが示された。全てのタウアイソフォーム特異的抗体の特異性が組み替えタウアイソフォーム蛋白質を用いたウエスタンブロッティングにより確認された。

タウアイソフォーム特異抗体によるAD脳の免疫組織学的解析

ADの海馬と前頭葉を対象として、作製したタウアイソフォーム特異抗体を用いて免疫組織化学を行った。N末

端側のタウアイソフォーム特異抗体であるAmino-Junction, E2-Junction, E3抗体ともに海馬と前頭葉に存在する神経原線維変化に明瞭な免疫染色が確認された。また、チューブリン結合領域に対する特異抗体であるRepeat-JunctionとE10抗体も同部位の神経原線維変化に強い免疫反応を認めた。抗体陽性の神経原線維変化数を観察すると、N末端側及びチューブリン結合領域に対するそれぞれの特異抗体間で認識される神経原線維変化に大きな違いのあることを認めた。この結果より、ADの神経原線維変化は、大脳皮質の部位に関係なく6種類全てのタウアイソフォームが発現していることが示された。さらに、ADの神経原線維変化には特異的なタウアイソフォームの発現様式があることが示唆された。

#### D. 考察

本研究は、タウ分子のN末端部とチューブリン結合領域の2カ所におけるエクソン挿入部位の有無を認識する特異抗体を作製することによって、6種類全てのヒトタウアイソフォーム発現をAD脳で解析した最初の報告である。このタウアイソフォーム特異抗体は、これまでの電気泳動では定量的解析が困難であったタウ封入体を構成する難溶性の異常タウアイソフォーム分子を免疫組織化学的に可視化して定量評価することができる利点を持つ。さらにピック病で証明され、その他のタウオパシーで推測されているタウ封入体のタウアイソフォーム発現の違いを明らかにすることが期待される。今回のAD脳の解析結果から、ADの神経原線維変化は全てのタウアイソフォームから構成されていることを証明した。またADの神経原線維変化では、特異的なタウアイソフォーム発現様式が存在することが示唆された。現在

免疫組織化学の結果を定量的に解析中である。さらに今後、AD以外のタウオパシーに対象を拡大して同様の検索を行う予定である。

我々は、ELISAによる脳脊髄液中のタウ測定系を確立し、正常人とAD患者間で異なることを以前報告した。

この結果は、多くの施設から同様の報告により裏付けされ、ADの診断法の1つとして高い可能性が指摘されている。しかし、脳脊髄液中のタウが高値になるのはADだけではなく、その他の神経疾患でも認められるため診断の特異性が問題であった。その1つの解決法として、脳脊髄液中のタウとアミロイドβ蛋白質の測定を組み合わせることで、ADの診断精度を上昇させる試みが行われている。今後、タウアイソフォームの発現に関する生化学及び免疫組織化学的解析を基礎としてタウアイソフォーム特異抗体のELISA系を開発することでタウオパシーの診断精度を上昇させることも可能である。また、別のタウアイソフォーム特異抗体の価値として、タウオパシーのモデル動物を作製する上で有用な情報を提供することが期待される。さらに家族性のタウオパシーの一種であるFTDP-17の原因遺伝子としてタウ遺伝子のミスセンス変異が同定された結果、タウ内部配列の異常の他に4リピートと3リピート型のタウアイソフォーム構成バランスの変化が発症に関与することが示唆された。よって、タウアイソフォーム発現の解析は、ADを含めたタウオパシー全般の発症機序の解明に重要かつ有用と考えられる。

#### E. 結論

6種類のタウアイソフォームを個別に識別する抗体を作製し、各抗体が免疫

組織学的に、生化学的に特異的であることを見いだした。

#### F. 発表論文

Zang J, Kang DE, Xia W, Okochi M, Mori H, Selkoe DJ, Koo H. Subacute distribution and turnover of presenilins in transfected cells. *L Biol Chem* 1998;273, 12436-12442

Mitani K, Furiya Y, Uchihara T, Ishii K, Yamamouchi H, Mizusawa H, Mori H. Increased CSF tau protein in corticobasal degeneration. *J Neurol* 1998;245,44-46

Arawaka S, Saito Y, Muiyarama S, Mori H. Lewy body in neurodegeneration with brain iron accumulation type (NBIA 1) is immunoreactive for a-synuclein. *Neurology* 1998;51,887-889

Lippa CF, Nee LE, Mori H, George-Hyslop P. Ab-42 deposition precedes other changes in PS-1 Alzheimer's disease. *Lancet* 1998;352, 1117-1118

Arai T, Ikeda K, Akiyama H, Haga C, Usami M, Sahara N, Iritani S, Mori H. A high incidence of apolipoprotein Eε4 allele in middle-aged non-demented subjects with cerebral amyloid b-protein deposit. *Acta Neuropathol* 1999;97, 82-84

Hong CS, Caromile L, Nomata Y, Mori H, Bredesen DE, Koo EH. Contrasting role of ps-1 and ps-2 in neuronal differentiation in vitro. *J Neurosci* 1999;19, 637-643