

図1 新鮮凍結血漿静注後の血中総TTR濃度と異型TTR濃度の変化

800 mlの新鮮凍結血漿静注後、血中総TTR濃度は25 mg/dlから27 mg/dlへ8%上昇が認められ、一方異型TTR濃度は8.6 mg/dlから6.1 mg/dlへ29%の減少が認められた。

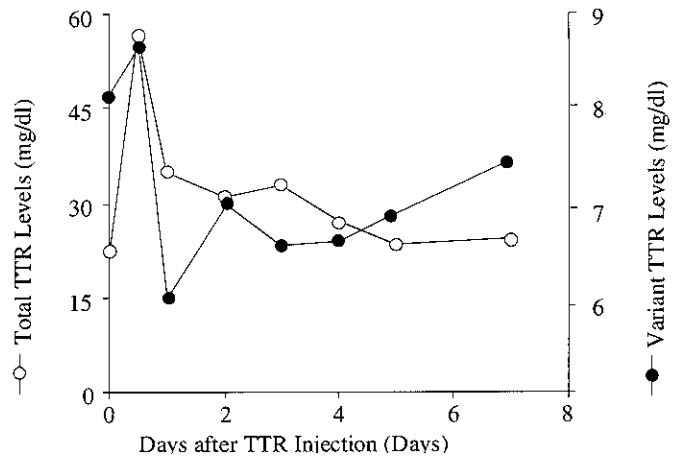


図2 正常TTR静注後の血中総TTR濃度と異型TTR濃度の変化

47才女性患者において、正常TTR 400 mg静注後、血中総TTR濃度は22.5 mg/dlから57.5 mg/dlへ上昇し、一方異型TTR濃度は8.4 mg/dlから6.2 mg/dlへと減少した。この異型TTR濃度の減少は7日間持続した。

注後、肝におけるTTR mRNA発現のb-actin発現に対する比は、6時間後、24時間後にそれぞれ3.4から2.6, 2.8となり、有意な減少が認められた。

3. 47才女性患者においては、ヒト血清より精製した正常TTR 400 mg静注24時間後、血中総TTR濃度は22.5 mg/dlから57.5 mg/dlへ上昇した。一方異型TTR濃度は8.4 mg/dlから6.2 mg/dlへと減少した。この異型TTR濃度の減少は7日間持続した(図2)。32才男性患者においても、正常TTR 400 mg静注24時間後、血中総TTR濃度は29.5 mg/dlから55.6 mg/dlへ上昇が認められた。一方異型TTR濃度は9.7 mg/dlから8.0 mg/dlへと減少が認められた。37才男性患者においては、正常TTR 400 mg静注24時間後、血中総TTR濃度は30.5 mg/dlから57.2 mg/dlへ上昇が認められた。一方異型TTR濃度は8.7 mg/dlから7.1 mg/dlへと減少が認められた。3例の平均では、正常TTR 400 mg静注24時間後、血中総TTR濃度は 27.5 ± 4.4 mg/dlから 56.8 ± 1.0 mg/dlへ上昇し、異型TTR濃度は 8.9 ± 0.7 mg/dlから 7.1 ± 0.9 mg/dlへと有意に減少していた ($P < 0.05$)。

以上のことより、FAP (TTR Met30) 患者に対す

る正常TTR大量投与には、異型TTR産生抑制効果があることが示された。正常TTR大量投与によるTTR遺伝子発現抑制も、ヒトと70%の相同性を有するマウスに対する正常ヒトTTR大量投与において認められた⁹⁾。

FAP (TTR Met30) 患者に対する正常TTR大量投与後、発熱、血沈亢進、CRP、IL-1, 6, 8の上昇は認められず、血中TTRの減少は炎症などによるものではないことが判明した。異型TTRの減少は、血中正常TTR濃度の上昇による肝臓におけるTTR産生に対するネガティブフィードバック(down regulation)によるものと考えられた。

FAP (TTR Met30) 患者に対する肝臓移植は、血中異型TTR濃度を移植前の1%以下に減少させ、症状の進行を停止あるいは改善させることが報告されており、異型TTRの産生抑制は、症状の進行を抑制する効果があると考えられている^{5,9)}。今回、アレルギー反応を避けるため、正常TTRの再投与は行わなかったが、FAP (TTR Met30) 患者に対し、頻回投与が可能となれば、血中異型TTR濃度の持続抑制により、アミロイドの臓器沈着、臓器障害の進行が抑制される可能性が考えられた¹⁰⁾。

結 論

FAP (TTR Met30) 患者に対する正常TTRの大量投与は、少なくとも一時的に異型TTR濃度を低下させる有効な手段である。

参考文献

- 1) Araki S. Type I Familial Amyloidotic Polyneuropathy (Japanese Type). *Brain Dev* 1984; 6: 128-133.
- 2) Tawara S, Nakazato M, Kangawa K, et al. Identification of amyloid prealbumin variant in familial amyloidotic polyneuropathy (Japanese type). *Biochem Biophys Res Commun* 1983;116: 880-888.
- 3) Ando Y, Ikegawa S, Miyazaki A, et al. Role of variant prealbumin in the pathogenesis of familial amyloidotic polyneuropathy: fate of normal and variant prealbumin in the circulation. *Arch Biochem Biophys* 1989; 274: 87-93.
- 4) Ando Y, Nyhlin N, Suhr O, et al. Oxidative stress is found in amyloidotic deposits in systemic amyloidosis. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;232: 497-502.
- 5) Ando Y, Tashima K, Tanaka Y, et al. Treatment of a Japanese patient with familial amyloidotic polyneuropathy with orthotopic liver transplantation. *Intern Med* 1994; 33: 730-732.
- 6) Ando Y, Tanaka Y, Ando E, et al. Effect of liver transplantation on autonomic dysfunction in familial amyloidotic polyneuropathy type I. *Lancet* 1995; 345: 195-196.
- 7) Ando Y, Tanaka Y, Nakazato M, et al. Changes in variant transthyretin levels in patient with familial amyloidotic polyneuropathy type I following liver transplantation. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 211: 354-358.
- 8) Bergethon PR, Sabin TD, Lewis D, et al. Improvement in the polyneuropathy associated with familial amyloid polyneuropathy after liver transplantation. *Neurology* 1996; 47: 944-951.
- 9) Wakasugi S, Maeda S, Shimada K. Structure and expression of the mouse prealbumin gene. *J Biochem* 1986; 100: 49-58.
- 10) Ando Y, Yamashita T, Nakamura M, et al. Down regulation of a harmful protein by replacement of its normal protein. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1362: 39-46.

Negative feedback for variant transthyretin (TTR) synthesis by administration of a large amount of normal TTR in familial amyloidotic polyneuropathy (FAP) (TTR Met30) patient

by

Naomi SAKASHITA*

Taro YAMASHITA**, Yukio ANDO***, Hisayasu TERAZAKI****, Konen OBAYASHI****,
Motonori HASHIMOTO*****, Yahiro UEMURA*****, Makoto UCHINO**, Masayuki ANDO****

from

*Second Department of Pathology, Kumamoto University School of Medicine

**Department of Neurology, Kumamoto University School of Medicine

***Department of Clinical Laboratory Medicine, Kumamoto University School of Medicine

****First Department of Internal Medicine, Kumamoto University School of Medicine

*****Yoshitomi Pharmacy Corporation

*****International Reagent Corporation

To compensate for the hypoproteinemia and hypoalbuminemia, 800 ml of fresh frozen plasma (FFP) was intravenously administered to a familial amyloidotic polyneuropathy (FAP) (TTR Met30) patients and changes in total and variant transthyretin (TTR) levels were measured in the plasma. After the administration, an increase in the total TTR and a decrease in the variant TTR were observed. To elucidate the mechanism of these phenomena, a large amount of purified normal TTR from normal human plasma was intravenously injected to mice and FAP patients. Injection of 3 mg of the purified TTR to C57BL/6 mice increased the plasma TTR levels. The expression of TTR mRNA decreased from 6 to 24 hr post-injection, and gradually increased up to 48 hr post-injection in mice. After injecting 400 mg of normal TTR in each of 3 FAP patients, total plasma TTR levels elevated and variant TTR levels decreased significantly 24 hr after TTR administration. These results suggest that down regulation of the harmful protein by replacement of its normal form of the protein occurred by this method. Since no essential therapy has been established in FAP and any other amyloidosis, this phenomenon should be applied as one of the effective methods for decreasing the harmful proteins in the circulation.

皮膚温ならびに末梢神経生検像から見たFAPに対する 肝移植の治療効果

研究者 池田修一 森田洋 武井洋一
佐藤俊一 矢崎正英 小林佐千夫

はじめに

家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) は多発神経炎と自律神経障害を主徴とする常染色体優性遺伝形式を示す全身性のアミロイドーシスである¹⁾。I型FAPのアミロイド前駆体は変異トランスサイレチンであり、今までに50種類以上の点変異が確認されている²⁾。この変異トランスサイレチンの97%以上が肝臓で産生されるために肝臓を移植することによりアミロイド前駆体が血中よりほとんど消失し、アミロイド沈着の停止が期待できる。FAP患者に対する肝移植は1990年にスウェーデンで開始され³⁾、以後欧米各国で一定の成果をあげている。本邦では我々は1993年31歳女性のFAP患者に生体部分肝移植を施行して以来⁴⁾、現在までに11名のFAP患者に肝移植を施行しており、FAP患者の肝移植後の経過はFAP発症から肝移植までの期間が短いほど良好であることを報告してきた⁵⁾。しかし罹病期間は病歴聴取に負う点で、客観的指標としては不十分である。また臨床症状の進行停止について報告されているが⁶⁻⁸⁾、組織での評価の報告は未だない。我々は腓腹神経生検に着目し、肝移植適応決定の指標として腓腹神経の有髄神経線維密度の減少の程度を評価した。また末梢の皮膚温について経過とともに検討し、さらに術後3年を経過した患者について対側の腓腹神経生検を施行し、生体肝移植の治療効果を判定した。そ

の上でFAP患者の肝移植の適応基準について述べる。

方 法

FAP患者はすべてFAPの家族歴を有しており、組織学的にアミロイド沈着が確認され、さらにDNA診断でFAP遺伝子が確認されている。術前および術後に末梢神経炎および自律神経障害について臨床所見、栄養状態、腎機能を含む臨床データを評価した。末梢神経伝導速度および皮膚温については熟練した神経内科医および技師が測定し、室温にて補正した。術後定期的に末梢神経伝導速度および皮膚温について評価した。

肝移植前に左腓腹神経生検を施行し、コンゴレッド染色でアミロイド沈着の程度を評価するとともにエポン包埋トルイジンブルー染色を行い、最終的に1000倍の倍率で髄神経線維密度の定量を行いヒストグラムを作成した。さらに肝移植後3年を経過した患者について右腓腹神経生検を施行した。肝移植前と同様にコンゴレッド染色およびトルイジンブルー染色を行い肝移植前の病理像と比較検討した。

11名の患者を臨床症状の程度に応じて三つのグループに分類した。グループ1は嘔吐、下痢、便秘などの自律神経障害のみの患者 (患者1~3)、グループ2は下肢のみに末梢神経障害を認める患者 (患者4~7)、そしてグループ3は上下肢ともに末梢神経障害を認める患者 (患者8~11) であ

表1 : Clinical and laboratory data, and prognosis of patients

Patients	Group I			Group II				Group III			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Preoperative examination											
Age / Sex	40/F	28/M	29/F	44/F	31/F	25/M	45/M	43/M	36/F	47/F	46/F
Duration of illness (year)	0.5	0.8	2	2	3	3.5	4	4	6	7	10
Body weight (kg)	42.0	56.5	42.4	59.0	40.0	63.3	56.6	54.0	44.7	46.0	42.0
Laboratory data											
Albumine (g/dl)	3.9	4.5	3.8	4.6	4.3	4.6	4.3	3.9	4.1	3.5	3.3
BUN (mg/dl)	13	20	10	17	11	12	16	22	14	10	15
Creatinine (mg/dl)	0.7	0.8	0.5	0.6	0.5	0.7	0.9	1.0	0.9	0.9	0.8
Proteinuria	-	-	-	-	-	-	-	-	0.3g/day	-	-
Ccr (ml/min.)	83.2	89.8	141	71.9	88.6	103	67.5	44.3	37.4	47.9	51.9
Nerve conduction velocity in tibial nerve (MCV/SCV, (m/s))	45/30	45/57	46/41	45/41	50/44	48/43	39/44	33/34	33/32	ND/ND	ND/ND
Density of myelinated fibers in sural nerve (/mm ²)	5440	5400	3749	5059	1326	1958	1820	1079	2162	158	151
Amyloid deposition on renal tissues	/	/	/	faint	/	faint	/	/	moderate	severe	severe
Follow up periods (yr)	3.0	2.4	1.7	0.8	5.0	0.6	2.0	3.5	1.5	1.75	0.25
Prognosis	good	good	good	good	good	good	good	good	bad	dead	dead

Ccr: creatine clearance, ND: not detectable

Group I: patients only suffering from autonomic disorders

Group II: patients showing polyneuropathy localized to lower limbs

Group III: patients showing polyneuropathy which involves both upper and lower limbs

る。以上の患者について、検査所見、神経生理検査所見、腓腹神経生検所見および予後について検討した。末梢神経伝導速度および下肢末梢の皮膚温について経時的に測定し、術前と肝移植一年後で比較した。

ドナーは生体部分肝移植のドナーとなることを自ら希望した患者の家族で、インフォームドコンセントをとった上でFAP遺伝子がないことを確認した。さらに数回のインフォームドコンセントを行った上でドナーとなることを希望したものについて肝移植を施行した。

結 果

1. 臨床所見および予後

臨床所見および予後は表1のとおりである。グループ1および2の患者では肝移植後の予後は良好であったが、グループ3では血清アルブミンの低下、下肢の神経伝導速度の低下を認める患者が多く、肝移植後の経過も不良であった。グループ1, 2に属する患者1~7のうち術後経過が短い患者

6は自宅療養中であるが、それ以外の患者は社会復帰している。またグループ3に属する患者8は自宅療養中、患者9は術後感染を繰り返し、さらに右大腿骨頸部骨折を起こし、現在も入院中である。患者10は術後長期臥床のため下肢の筋力が低下し、術後21ヶ月で脳梗塞のため死亡。患者11は術後腎不全、溶血性貧血を起こし3ヶ月で深在性真菌症のため死亡した。いずれの患者のドナーも術後重大な合併症もなく社会復帰している。

2. 末梢神経伝導速度

下肢の伝導速度について移植前と移植後1年で比較した。移植後1年の時点ではほとんどの患者で移植後の神経伝導速度の低下を認めた。しかし比較的長期に観察している患者では、その後も一定して低下するわけではなく、肝移植後2,3年後は神経伝導速度にほとんど変化は認めなかった。

3. 下肢の皮膚温

下肢末梢の皮膚温についても肝移植前と肝移植後1年で比較した。肝移植後1年の時点では検討した6名の患者いずれも皮膚温の上昇を認めた。

表2：FAP患者の生体肝移植適応基準

臨床所見：下肢に限局した感覚障害 自律神経障害のみ
罹病期間：5年以内
検査所見：血清アルブミン $\geq 3.8\text{mg/dl}$ クレアチニンクリアランス $\geq 70\text{ml/min}$
病理学的所見：腓腹神経有髄神経線維密度 (DMF) $\geq 2000/\text{mm}^2$ DMF 1000 - 2000/ mm^2 ：腎生検を施行

このことは術後、自律神経機能が改善して末梢循環がよくなっているためと推測され、肝移植の治療効果のひとつの指標と考えられた。

4. 腓腹神経生検

我々は肝移植前に左腓腹神経生検を施行し、その有髄神経線維密度(DMF)を測定した。横軸にFAP罹病期間、縦軸に有髄神経線維密度をとると、逆相関の関係を認め、特にFAP発症から5～6年の間に急激に有髄神経が脱落した。グループ1の患者は有髄神経が3000/ mm^2 以上残存していた。FAP罹病期間に注目すると、罹病期間が3年から6年の患者では有髄神経線維密度が1000～2000/ mm^2 の間であった。グループ3のうち患者10, 11は有髄神経がほとんど残存しておらず、いずれも200/ mm^2 以下であった。

さらに我々は肝移植後3年を経過した3名の患者について反対側の腓腹神経生検を施行し、術前の有髄神経線維密度と比較した。

患者1は40歳女性で、嘔吐でFAP発症後6ヶ月で肝移植を施行した患者である。術後早期に嘔吐発作はほぼ消失して家庭の主婦として社会復帰している。術前後のコンゴレッド染色の比較では、術前の生検組織の神経内膜へのアミロイド沈着の程度と術後のアミロイド沈着の程度にはほとんど変化がなかった。このことは肝移植によって臓器へのアミロイド沈着が停止したことを示していると考えられた。有髄神経線維は大径、小径とも術前から比較的保たれており術後3年を経過してもほとんど脱落が認められなかった。

FAP発症3年で肝移植を施行した患者5の場合、肝移植後3年で有髄神経の増加が認められた。ヒ

ストグラムでは小径線維を中心に増加しており、一部にsproutingも認められ、これは末梢神経の再生を示していると考えられた。従って、肝移植により術後アミロイドの沈着および末梢神経の脱落が停止するばかりでなく、患者によっては再生が起こることを示していると考えられた。術後5年を経過した現在も主婦として普通の生活を送っている。

患者8はFAP発症4年で肝移植を施行した疾患進行期のグループ3に属する患者である。術後も自宅療養中で社会復帰はまだできていない。術前から有髄神経の脱落は高度であったが、肝移植後3年を経過しても有髄神経病変はほとんど変化していなかった。このことより末梢神経障害が上下肢にわたる進行期の患者でも、肝移植により末梢神経病変の進行が停止することがわかった。

考 察

FAPの肝移植は1990年にスウェーデンで開始されたが、末梢神経症状の停止や術後早期に自律神経症状の改善を認めるといった報告が現在までになされている。また肝移植の適応についてはFAP発症後できるだけ早期に肝移植を施行するのが良いと考えられている。我々はこれらの臨床症状の進行停止および改善について、病理組織学的に明らかにし、また肝移植の適応を詳細に設定することが必要であると考え、腓腹神経に着目して病理組織学的に治療効果の判定を行った。その結果、肝移植によってアミロイド沈着の停止および末梢神経脱落の停止が確認されたが、さらに一部の患者では末梢神経の再生が認められた。これはFAPでアミロイド沈着が進行していく過程では神経の浮腫が起こり、虚血状態となり末梢神経脱落に関与していたが、術後アミロイド沈着の停止および免疫抑制剤としてステロイドを使用することにより神経の浮腫および虚血が改善し、神経再生が起こったものと推測される⁹⁾。一方末梢神経伝導速度については術後長期の観察でも変化を認めなかったが、これは病理学的に有髄神経、特に大径線維に変化を認めていないことと一致した所見と思われる。しかし末梢の皮膚温が上昇しており、自律神経線維を反映する無髄線維についての検討が今

後必要と考えられる。

アミロイドの沈着は全身諸臓器にわたっており、有髄神経線維密度が1000~2000/mm²の患者でも進行期の患者がおり、その適応の評価は慎重にする必要があると考えられる。術後免疫抑制剤をはじめとする種々の薬剤を使用するため腎機能の評価が必要である。このため一般臨床検査データにあわせて腎生検を施行し、腎臓へのアミロイド沈着の程度の評価も開始している。

現在我々はFAP患者に対する生体肝移植の適応基準を、臨床所見、罹病期間、検査所見、および病理学的所見より表2のように考えている。生体部分肝移植では再移植がなく、100%成功することを前提としている。こうした場合、有髄神経線維密度が1000~2000/mm²の患者では、実質臓器へのアミロイド沈着を詳細に検討する必要があり、腎生検を施行することとしている。

ま と め

1. FAP患者11名に生体部分肝移植を施行した。
2. 自律神経障害で発症した患者、または下肢に末梢神経障害が限局する患者では肝移植後の予後が良好であった。
3. 予後が良好な患者では術後下肢末梢の皮膚温が上昇した。
4. 肝移植術後、アミロイド沈着の停止、有髄神経の脱落停止が認められ、さらに有髄神経線維が増加する患者がおり、肝移植後に神経の再生が期待できる。
5. 肝移植後すべてのドナーは重大な合併症もなく、社会復帰した。

文 献

- 1) Ikeda S, Hanyu N, Hongo M, et al. Hereditary generalized amyloidosis with polyneuropathy. Clinicopathological study of 65 Japanese patients. *Brain* 1987; 110: 315-317.
- 2) Benson MD, Uemichi T. Transthyretin amyloidosis. *Amyloid: Int J Exp Clin Invest* 1996; 3: 44-56.
- 3) Holmgren G, Steen L, Ekstedt J, et al. Biochemical effects of liver transplantation in two Swedish patients with familial amyloidotic polyneuropathy (FAP-met30). *Clinical Genet* 1991; 40: 242-6.
- 4) Matsunami H, Makuuchi M, Kawasaki S, et al. A case of familial amyloid polyneuropathy treated with partial liver transplantation using a graft from a living related donor. *Transplantation* 1995; 60:301-3
- 5) Ikeda S, Takei Y, Yanagisawa N, et al. Partial liver transplantation from living donors in familial amyloid polyneuropathy. *Amyloid: Int J Exp Clin Invest* 1997; 4: 18-23.
- 6) Parrilla P, Ramirez P, Bueno FS, et al. Clinical improvement after liver transplantation for type I familial amyloid polyneuropathy. *Br J Surg* 1995; 82: 825-8.
- 7) Suhr OB, Holmgren G, Steen L, et al. Liver transplantation in familial amyloidotic polyneuropathy. Follow-up of the first 20 Swedish patients. *Transplantation* 1995; 60: 933-8.
- 8) Bergethon PR, Sabin TD, Lewis D, et al. Improvement in the polyneuropathy associated with familial amyloid polyneuropathy after liver transplantation. *Neurology* 1996; 46: 944-51.
- 9) Hanyu N, Ikeda S, Nakadai A, et al. Peripheral nerve pathological findings in familial amyloid polyneuropathy: a correlative study of proximal sciatic nerve and sural nerve lesions. *Ann Neurol* 1989; 25: 340-50.

Effect of liver transplantation for familial amyloid polyneuropathy: in the viewpoint of skin temperature and histopathological examination of sural nerve biopsies

by

Shu-ichi IKEDA

Hiroshi MORITA, Yo-ichi TAKEI, Shun-ichi SATOH, Masahide YAZAKI, Sachio KOBAYASHI

from

Department of Medicine (Neurology), Shinshu University School of Medicine

We have been performed partial liver transplantation for eleven patients with familial amyloid polyneuropathy (FAP). Nine patients are alive six to sixty months after transplantation. Seven patients who suffered from severe gastrointestinal symptoms alone or polyneuropathy localized to lower limbs followed good recovery courses after operation, and their duration of illness were less than five years. In four patients showing polyneuropathy which involved with upper and lower limbs, three patients resulted in bad outcomes including two deaths, and the duration of illness were more than six years. After transplantation, peripheral skin temperature of all patients improved within one year after transplantation. On the basis of the histopathological findings of sural nerve, the density of myelinated fibers well corresponded to the postoperative prognoses of the patients. And three years after liver transplantation, another side sural nerve biopsy was performed in three patients. In two patients, amyloid deposition and loss of myelinated nerve fibers stopped. And in one patient remyelination of nerve fibers were observed. When we consider liver transplantation for FAP patients, clinical picture and duration of illness are very important determinants. In addition, histopathological findings of sural nerve and renal tissue biopsies provide useful information in supposing the postoperative prognosis.

A β 沈着阻害 (Sequestration) 機構

— ヒト剖検腎におけるトランスサイレチンの役割に関する検討 —

研究者 今井浩三* 続佳代** 深津亮***
伊東文生* 藤井暢弘**

はじめに

アミロイドの沈着はアルツハイマー病(AD)脳を特徴づける代表的な神経病理学的変化である。アミロイドの主成分であるアミロイド β 蛋白(A β)は、アミロイド前駆体蛋白(APP)から分解処理を受けて生成されるが、C末端側の長さの異なる多様なA β 分子種が知られている^{1,3)}。そのうちA β 40, A β 42が主要な分子種であり、A β 40は不溶化しづらいのに対してA β 42は不溶化、重合化しやすいとされ、A β 沈着過程にはA β 42がより重要な役割を果たしていると考えられている。

一方、APP自体は脳、筋肉、腎臓などの臓器に広く発現されているが^{4,5)}、脳以外の組織にA β の沈着は見られない。ヒト髄液中にはA β に結合することにより、A β を可溶化し凝集を阻害する作用(sequestration)をもつ蛋白(sequestering蛋白)の存在することが知られている^{6,7)}。我々はSequestration機構に興味を持ち、APPの発現量が多いにもかかわらずA β の沈着の見られないヒト腎を対象に免疫病理学的検討を加えた⁸⁾。その結果、A β 40は近位、および遠位尿細管のいずれにも存在するが、A β 42および、髄液中にみられる代表的なsequestering蛋白であるトランスサイレチン(TTR)は近位尿細管にのみ存在した⁹⁾。ヒト腎ではTTRがsequestering蛋白としてA β に結合し、A

β の不溶化、重合化を阻害している可能性が示唆された。

本研究では各A β 分子種とTTRの関係を明らかにするために生化学的検討を加え、興味ある結果が得られたので報告する。

方 法

1) 対象：胃癌(2例)、大腸癌、癌性心外膜炎、C型慢性肝炎の5例の剖検腎を対象とした。腎には病理学的に特記すべき所見は見られなかった。

2) 抗体：A β 17-28の合成ペプチドに対するポリクローナル抗体(A β 17)を樹立して用いた⁹⁾。A β 40断端特異抗体(BC40)、A β 42断端特異抗体(BC42)は群馬大学医療技術短大 山口晴保博士より供与された⁹⁾。抗TTR抗体(EY Lab., Inc)は購入して使用した。

3) 免疫染色：ヒト剖検腎のホルマリン固定連続切片に上記の抗体(1:500~1:1000)を用いてABC法(PK-6100, Vector Lab)にて免疫染色を行った¹⁰⁾。

4) 免疫沈降：免疫病理学的にA β 、TTRの存在が確認された凍結腎を各種プロテアーゼインヒビター添加リン酸緩衝液中で遠心法にて粗抽出液を作成した。抗体結合Sepharose 4Bに粗抽出液を加え免疫沈降した後、0.2 M glycine-HClにて溶出された成分を10~20% SDSポリアクリルアミド電気泳動後、上記の抗体を用いてWestern-blottingにて解析した。

5) *in vitro* binding assay：合成A β 1-40, A β 1-42

*札幌医科大学医学部内科学第一講座

**札幌医科大学医学部微生物学講座

***埼玉医科大学精神医学講座

にTTRを加えて37°Cにてincubationした。混合物を電気泳動後Coomassie Brilliant Blue(CBB)にて染色した。また電気泳動後、PVDFメンブランに転写し、抗TTR抗体にて免疫反応を行った。

6) *in vitro* overlay binding assay: 合成A β 1-40, A β 1-42を電気泳動後、PVDF膜に転写し、膜上のA β 1-40, A β 1-42にTTRを反応させた。膜上の結合はBC40, BC42, および抗TTR抗体を用いた免疫反応にて検出した。

結 果

免疫病理学的検討: 尿細管上皮細胞にはA β 40, A β 42のいずれもが存在したが、局在に相違が見られた。A β 40はいずれの尿細管にも存在したが、A β 42は近位尿細管にのみ見られた。TTRはいくつかの近位尿細管に存在した。Sequestering蛋白であるTTRの局在はA β の局在と一部一致することを確認した。

免疫沈降: 腎臓内でTTRとA β が結合して存在するかどうかを明らかにするために、免疫病理学的にA β , TTRの存在が確認された凍結腎より遠心法にて粗抽出液を作成した。ヒト腎では分子量約15 kDaのmonomerと分子量約35 kDaのdimerのTTRが検出された。各抗体結合Sepharose 4Bにて免疫沈降を行うと、A β 17抗体で吸着・溶出された成分にはTTR-monomerが検出されたが、BC40抗体ではいずれのTTRも微量しか免疫沈降されなかった。BC42抗体ではTTR-monomer, -dimerのいずれもが免疫沈降された。腎臓内のTTRにはA β 42が選択的に結合していることが明らかとなった。

In vitro binding assay: 免疫沈降において見られた所見を確認するために、さらに*in vitro*における各A β 分子種とTTRの結合について検討を加えた。A β とTTRの反応産物を電気泳動すると、A β , TTR-monomer, およびTTR-dimerが染色された。A β 42とTTRを反応させたときには、TTRにA β 42が結合した反応産物が検出されたが、A β 40とTTRを反応させたときには、この結合物は認められなかった。

In vitro overlay binding assay: 膜上のA β 40, A β 42にTTRを反応させると、TTRはA β 42に結

合しやすかった。以上の結果、*in vitro*においてもTTRにはA β 42が結合しやすいことが明らかとなった。

考 察

APPから分解処理をうけて生成されたA β がAD脳でいかなる機序によって凝集し、アミロイドを形成するのかが未だに明らかではない。しかし、生成されるA β 分子種の種類やA β に結合し、可溶性ないしは不溶性させる種々の蛋白が沈着過程に関与していることが次第に明らかにされている。たとえば、Goldgaberらは髄液中でのA β とアミロイド関連蛋白の結合を生化学的に検討し、ヒト髄液中ではTTRがsequestration蛋白としてA β に結合しアミロイド形成を阻害しており、このsequestration機構が破綻することによって、A β の沈着過程が開始される可能性を示唆している⁶⁷。

前述のとおり、ヒト腎ではAPPの発現量が多く、尿細管上皮細胞にはA β 40, A β 42が存在するにもかかわらず、アミロイドの沈着が見られない。このことはヒト腎臓において、A β に対する何らかのsequestration機構が作動していることが示唆される。事実、免疫病理学的検討によって、腎にはA β が存在し、A β 40とA β 42の局在には明らかな相違が見られ、sequestering蛋白であるTTRの染色態度は、A β 40に比較するとA β 42の染色態度と一致することが示された。腎臓においては不溶型A β 42にsequestering蛋白であるTTRが結合することによりsequestration機構が働き、A β の不溶性、重合化が阻害されている可能性が考えられた。

そこで腎ではTTRがどのような形で存在するのか、A β の各分子種とTTRは実際に結合しているか否かを明らかにするために、生化学的検討を加えた。腎粗抽出液を用いた検討によって、正常な腎臓内でTTRは少なくとも分子量約15 kDaのmonomerと分子量約35 kDaのdimerの形で存在することが示された。また、免疫沈降法によると、BC42によってTTR-monomer, TTR-dimerが免疫沈降され、ヒト腎ではTTRがA β 42に比較的選択的に結合していることが明らかとなった。*in vitro*の結合実験においても腎でのA β とTTRの結合と同様に、TTRはA β 40に比べA β 42に強く結合し

ていることが示された。以上の結果から、アミロイドの沈着の見られないヒト腎臓においては、TTRが実際にsequestrating蛋白として機能しており、A β はsequestrationされて凝集・沈着を免れている可能性が示された。

しかしながら、A β の凝集・沈着にはTTR以外のアミロイド関連蛋白あるいはA β 結合蛋白が関与することが報告されており¹¹⁻¹³⁾、これらの蛋白のsequestration機構における役割を詳細に検討することが必要と考えられる。

AD脳ではAPPが発現された後amyloidogenicなprocessingによってA β が産生され、特に不溶化しやすいA β 42の産生が増加することにより、A β の凝集、アミロイドの形成が起こるとされている。しかし、AD脳においてA β が産生されてもsequestration機構が働き、A β の可溶化が維持され凝集が阻害されると、アミロイドの形成を免れることは可能と考えられる。このことは治療戦略を考えるうえで新たな視点を提供すると思われる。

結 論

TTRは不溶型A β 42に結合しやすく、アミロイドの沈着の見られない腎では、TTRが実際にsequestrating蛋白として働き、A β 42はsequestrationされて凝集・沈着を免れている可能性が示唆された。Sequestration機構を解明すること、またこれらに関係する分子を同定することはAD脳におけるA β の凝集・沈着を解明する上で重要な示唆を与えると考えられた。

文 献

- 1) Miller DL, Papayannopoulos IA, Styles J, et al. Peptide compositions of the cerebrovascular and senile plaque core amyloid deposits of Alzheimer's disease. Arch Biochem Biophys 1993;301: 41-52.
- 2) Mori H, Takio K, Ogawara M, Selkoe DJ. Mass spectrometry of purified amyloid beta protein in Alzheimer's disease. J Biol Chem 1992;267: 17082-17086.
- 3) Roher AE, Lowenson JD, Clarke S, et al. Structural alterations in the peptide backbone of β -amyloid core protein may account for its deposition and stability in Alzheimer's disease. J Biol Chem 1993;268: 3072-3083.
- 4) Goldgaber D, Lerman MI, McBride OW, Saffiot U, Gajdusek DC. Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease. Science 1987;235: 877-880.
- 5) Tanzi RE, Gusella JF, Watkins PC, et al. Amyloid β protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. Science 1987; 235: 880-884.
- 6) Goldgaber D, Schwartzman AL, Bhasin R, et al. Sequestration of amyloid beta-peptide. Ann NY Acad Sci 1993; 695: 139-143.
- 7) Schwartzman AL, Gregori L, Vitek MP, et al. Transthyretin sequesters amyloid β protein and prevents amyloid formation. Proc Natl Acad Sci USA 1994;91: 8368-8372.
- 8) Tsuzuki K, Fukatsu R, Hayashi Y, et al. Amyloid β protein and transthyretin, sequestering protein colocalize in normal human kidney. Neurosci Lett 1997;222: 163-166.
- 9) Yamaguchi H, Sugihara S, Ishiguro K, Takashima A, Hirai S. Immunohistochemical analysis of COOH-termini of amyloid beta protein (A β) and A β 42 in Alzheimer's disease and normal aging. Amyloid : Int J Exp Clin Invest 1995;2: 7-16.
- 10) Tsuzuki K, Fukatsu R, Takamaru Y, et al. Amyloid β protein in rat soleus muscle in chloroquine-induced myopathy using end-specific antibodies for A β 40 and A β 42: immunohistochemical evidence for amyloid β protein. Neurosci Lett 1995;202: 77-80.
- 11) Howlett D, Cutler P, Heales S, Camilleri P. Hemin and related porphyrins inhibit β -amyloid aggregation. FEBS Lett 1997;417: 249-251.
- 12) Janciauskiene S, Frutos PG, Carlemalm E, Dahlback B, Eriksson S. Inhibition of Alzheimer β -peptide fibril formation by serum amyloid P component. J Biol Chem 1995;270: 26041-26044.
- 13) Kudva YC, Hiddinga HJ, Butler PC, Mueske CS, Eberhardt NL. Small shock proteins inhibit in vitro A β 1-42 amyloidogenesis. FEBS Lett 1997;416:117-121.

Study of sequestration mechanism for amyloid β
-the role for transthyretin, sequestering protein in normal human kidney-

by

Kohzoh IMAI*

Kayo TSUZUKI**, Ryo FUKATSU***, Fumio ITOH*, Nobuhiro FUJII**

from

*The First Department of Internal Medicine, Sapporo Medical University School of Medicine

**Department of Microbiology, Sapporo Medical University School of Medicine

***Department of Neuropsychiatry, Saitama Medical School

The deposition of amyloid β protein ($A\beta$), a proteolytic cleavage product of amyloid precursor protein (APP), is one of the characteristics observed only the brain affected with Alzheimer's disease. The APP gene is widely expressed in all neuronal and non-neuronal tissues with the highest levels of expression in the brain, muscles, and kidney. Interestingly, no amyloid deposits have been observed in any organs but the brain. These facts prompted us to study sequestration mechanism for $A\beta$ in the kidney. Immunohistochemical studies demonstrated that both $A\beta 40$ and $A\beta 42$ were observed in the proximal tubules, while $A\beta 40$ was seen dominantly in the distal tubules. Transthyretin (TTR) was also observed in the proximal tubules, and colocalized with $A\beta 40$ and $A\beta 42$. To understand the role of TTR plays in the sequestration mechanism of $A\beta$ in the kidney, we have investigated interaction of TTR with $A\beta 40$ and $A\beta 42$ molecules by an immunoprecipitation method and *in vitro* binding studies. Immunoprecipitation experiments showed that TTR formed complexes with $A\beta$ in the normal human kidney *in vivo*. The TTR-monomer and -dimer were immunoprecipitated with an $A\beta 42$ specific immunocolumn, but to a lesser degree with an $A\beta 40$ specific immunocolumn. *In vitro* binding studies confirmed that TTR bound $A\beta 42$ preferentially, and $A\beta 40$ only to a limited extent, to form TTR- $A\beta$ complexes. We provide new evidence supporting the hypothesis that TTR, an $A\beta$ binding protein plays an important role in the modulation of $A\beta$ aggregation and prevents amyloid formation in the kidney in addition to CNS tissue. The tubular epithelial cells in the kidney may provide a useful experimental system to shed light on this issue.

α -synuclein (NACP) のプロセッシングとA β 線維化への影響

研究者 篠田 友孝* 武田 和也* HOSSAIN S.*
SADIK G.* 上田 健治**

はじめに

アルツハイマー病 (AD) 患者の脳内に大量に見られる異常構造物、老人斑はADにほぼ特異的な病変であり、その中心部を構成するアミロイド線維の形成機序を解明することが本疾患を真に理解し、治療策、予防策を立てる上で重要であると思われる。このアミロイドの主成分は β /A4タンパク質 (A β) である事が明らかにされているが、その生成と蓄積、アミロイド形成機構には依然として不明な点は多く、様々な他因子の関与があるものと考えられている。

NACP/ α -synucleinは、AD患者脳の前駆体タンパク質である。またNACPは主に中枢神経系で発現し、ADアミロイドの組織特異性を説明しうるものであることから、NAC/NACPはA β のアミロイド形成に何らかの関与を果たしていると考えられる。そのためNACPがどのような過程を経てNACとなり、A β 線維化においてどのような役割を果たすかを明らかにすることはADアミロイド形成の機序解明に重要な情報を与えると思われる。そこで本研究では、*in vitro*におけるNACPの、AD関連プロテアーゼによるプロセッシングとA β の線維化への影響を検討した。

方 法

NACPは、組み換え体として大腸菌を用いた系で発現させ、これを精製して用いた。AD関連プロテアーゼとしてはカテプシンDおよび α キモトリプシンを、A β は化学合成品を購入してこれを用いた。NACPのプロテアーゼによるプロセッシングは、各酵素で消化した後に、逆相HPLC、MALDI-TOF MSおよびプロテインシーケンサーを用いて各消化断片を分析して検討した。A β の線維化は、インキュベート後の遠心上清中の残存A β を、そのN末端部分を認識するモノクローナル抗体を用いて、ELISA法で定量することにより追跡した。さらに、この系にNACPを添加することにより、A β 線維化速度への影響を検討した。

結果及び考察

NACPは140アミノ酸残基からなり、1~60の繰り返し配列に富むN末端領域、61~95の疎水性の強いNAC領域および96~140の酸性アミノ酸に富むC末端領域に大きく分けられる。各酵素で消化し、生成する断片を経時的に追跡したところ、カテプシ

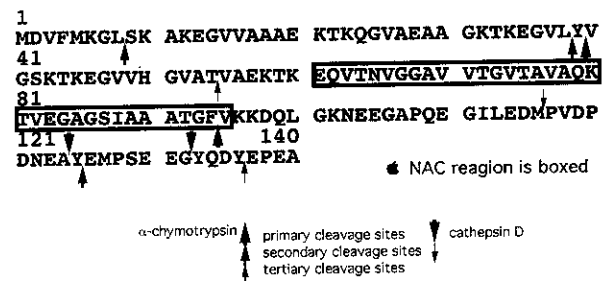


Fig 1 α -synuclein(NACP)

* 東京都立大学大学院理学研究科化学研究室

** 東京都立精神医学総合研究所神経化学

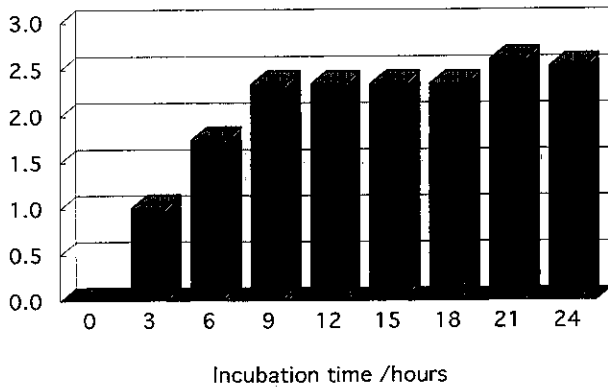


Fig 2 The ratio of β and NACP in the aggregates

NDによる消化では、C末端領域のG132-Y133, A124-Y125, M116-P117が切断され、N末端領域およびNAC領域は切断されなかった。また、 α キモトリプシンによる消化では、初めにY39-V40, F94-V95が切断され、続いてL89-S9, L38-Y39, Y125-E126の三カ所が、最後にT54-V55, Y136-E137が切断された(Fig 1)。以上の結果から、NACPはこれらのプロテアーゼにより、非常に限定された部位が切断されることが明らかとなり、生体内においてもNAC領域はほぼ保存される可能性が示唆された。

NACPとA β との混合溶液をインキュベート後、経時的に遠心上清中の各成分量を測定したところ、NACP共存下で、A β の減少速度が非共存下と比べて大きいことが明らかになった。また、遠心上清中のNACP量はA β 共存下で減少した(Fig 2)。これらの結果、NACPがA β の凝集・線維化速度を促進すること、NACPは凝集・線維化物と共に沈殿していることが明らかとなった。そして、各成分の減少量の比から、凝集・線維化物の組成比を求めたところ、NACP1に対してA β が約2.5であった。この結果から、NACPがA β と結合する複数の部位を持っていることが示唆された。

AD患者ではシナプス終末のNACP量が増大しているという報告もあるが、APPは膜貫通型タンパク質であり、A β 領域は細胞外から膜貫通領域に相当するため、細胞内に存在するNACPとどのような形で接触するのかは未だ明らかではない。また、老人斑上では免疫学的には全領域のNACPは検出されておらず、生化学的に単離同定されたNACの老人斑上での正確な形態は不明である。そ

れゆえ、NACPの代謝過程における何らかの異常、もしくはシナプス終末の膜構造の異常が両者の接触の機会を与え、アミロイド形成を促進している可能性がある。NACPの各種断片とA β との相互作用、線維化への影響についてもさらに解析、検討を進めてゆく必要がある。

Processing of NACP/ α -synuclein and effect on the A β fibril formation *in vitro*

by

Tomotaka SHINODA*

Kazuya TAKEDA* , Shahanara HOSSAIN* , Goram SADIK* , Kenji UEDA**

from

*Department of Chemistry, Graduate School of Science, Tokyo Metropolitan University

**Neurochemistry, Tokyo Institute of Psychiatry

NACP/ α -synuclein is the precursor protein of the NAC (non-A β component of Alzheimer disease (AD) amyloid) that has been isolated from and immunologically localized on brain amyloid of patients with AD. To elucidate the mechanism(s) of brain amyloid formation during the pathogenesis of AD, it may be of importance to clarify their roles on the fibril formation by A β . In this study, we examined the processing of NACP and its effect on the A β fibril formation *in vitro*.

NACP was expressed in *E. coli*, and purified. A β was purchased from Bachem. α -Chymotrypsin and cathepsin D are used as AD related proteases in this experiment. The processing of NACP was monitored by analyzing of cleaved fragments using RP-HPLC and MALDI-TOFMS after enzymatic digestion. In this experiment, cathepsin D cleaved NACP at only a limited positions leaving an intact NAC domain suggest that the partial processing might be taken place prior to form a complex with A β species. The two positions Ala124-Tyr125 and Gly132-Tyr133 were found as the major cleavage sites and Met116-Pro117 as the minor cleavage site for the enzyme. α -Chymotrypsin cleaved NACP at several positions. Two primary cleavage sites Tyr39-Val40 and Phe94-Val95 and three secondary cleavage sites Leu8-Ser9, Leu38-Tyr39 and Tyr125-Glu126 were found respectively in the sequence together with two tertiary cleavage sites at position Thr54-Val55 and Tyr136-Glu137.

When the fibril formation of β 1-40 was monitored by ELISA using a mouse anti- β /A4 monoclonal antibody, free β 1-40 was decreased with time. In the presence of NACP, however, the rate was accelerated. The composition between these components in the aggregates were calculated, the molar ratio of NACP and β 1-40 was 1:2.5. These results suggest that the rate of fibril formation *in vivo* of β /A4 is also regulated by NACP and/or its intermediates.

脳アミロイドアンギオパチーと butyrylcholinesterase遺伝子多型との関連

研究者 山 田 正 仁* 袖 山 信 幸* 伊 藤 嘉 憲**
末 松 直 美** 大 友 英 一** 松 下 正 明***
水 澤 英 洋*

目 的

脳アミロイドアンギオパチー(CAA)はアルツハイマー病(AD)や高齢者でしばしばみられる脳血管のアミロイド沈着症である。ADの危険因子であるアポリポ蛋白E遺伝子 (ApoE)遺伝子型がCAAにも関連することが報告され^{1,5)}, 更に我々はpresenilin-1, α 1-antichymotrypsin遺伝子多型とCAAとの関連を報告した^{6,7)}。今回、孤発性CAAの遺伝的危険因子を更に検討する目的で、CAAに存在し⁸⁾, ADとの関連⁹⁾が報告されているbutyrylcholinesterase (BChE)の遺伝子多型とCAAとの関連を検討した。

方 法

AD48例を含む日本人高齢者155剖検例(85.1 \pm 7.7歳)を対象とした。

CAAの好発部位である後頭葉におけるアミロイド沈着のある髄膜および皮質血管のパーセンテージ(CAAカウント)でCAAの程度を評価した。高度のCAAがある例についてはCAAが免疫組織化学的にアミロイド β 蛋白陽性であることを確認した。

CAAでは特徴的な脳葉型出血の合併が時にみられる。CAAの程度を軽度以下(CAA<40%), 中等度以上(40% \leq CAA)に分けた場合、脳出血を合併するのは中等度以上のCAAを有する例の一部に限ら

れる¹⁰⁾。そのため、CAAの臨床的なりスクという見地から、CAAの程度を軽度以下と中等度以上の2群に分けた検討も行った。

凍結脳より抽出したDNAを用い、BChE遺伝子(BCHE)のK variant (BCHE-K; 第539位のアミノ酸置換をおこす)(KあるいはN(normal)アリル), ApoE遺伝子型を決定し、CAAとの関連を統計学的に検討した¹¹⁾。

結果及び考察

(1) BCHE-KとAD: 155例中、BCHEのKK, KN, NN遺伝子型がそれぞれ4, 45, 106例みられた(遺伝子型頻度KK 0.03, KN 0.29, NN 0.68; アリル頻度K 0.17, N 0.83)。BCHE遺伝子型およびアリル頻度は、AD群(遺伝子型頻度KK 0.00, KN 0.31, NN 0.69; アリル頻度K 0.16, N 0.84)と非AD群(遺伝子型頻度KK 0.04, KN 0.28, NN 0.68; アリル頻度K 0.18, N 0.82)とで有意差はなかった。

ApoE ϵ 4アリル頻度は非AD群(0.08)と較べてAD群(0.21)で有意に高率であった(p=0.0012)。ApoE ϵ 4の有無で症例群を分割しても、BCHE遺伝子型およびアリル頻度にAD群と非AD群との間に有意差はみられなかった。更に、75歳以上の群で、ApoE ϵ 4の状態で分割しても、BCHE-KとADとの関連はみられなかった。

この結果は、BCHE-KがADと関連し、それは特に75歳以上のApoE ϵ 4保有者で強いとする

* 東京医科歯科大学神経内科

** 浴風会病院

*** 東京都精神医学総合研究所神経病理

LehmannらのOxford study⁹⁾の結果とは異なっていた。しかし、最近Singletonら¹²⁾は我々の結果と同様に、BCHE-KとADとの関連はないとの報告をしている。

(2)BCHE-KとCAA：全例，AD，あるいは非AD群における検討で，BCHE KK，KN，NNの各遺伝子型間に，CAAカウントに有意差を認めなかった。BCHE-K保有者，非保有者間でもCAAカウントに有意差を認めなかった。ApoE ε 4の有無で分割しても同様の結果であった。

高度ないし中等度のCAAはAD群の37.5%，非AD群の12.1%にみられ，AD群で有意に高率であった(p=0.0003)。BCHE遺伝子型およびアリル頻度は，高度ないし中等度のCAAを有する群(遺伝子型頻度KK 0.03, KN 0.33, NN 0.65; アリル頻度K 0.19, N 0.81)とCAAが軽度以下の群(遺伝子型頻度KK 0.02, KN 0.28, NN 0.69; アリル頻度K 0.17, N 0.83)との間に有意差はなかった。

これらの解析を75歳以上の群で行っても，BCHE-KとCAAの程度に関連を認めなかった。

これらの結果は日本人高齢者においてはBCHE-KがCAAの明らかな危険因子ではないことを示唆している。しかし，サンプルのサイズが比較的小さいことから，統計学的なエラーを除外するためには更に多数例での検討が必要である。たとえば，BCHE-Kアリルの頻度が比較的低いためKK遺伝子型を有する例の数が少なく，より多数例で検討すれば，KK遺伝子型がCAAの程度と関連してくる可能性は否定できない。

更に，我々の検討における日本人高齢者の非AD群のBCHE-Kアリル頻度0.18は，Lehmannら⁹⁾によるOxford studyにおける白人高齢者の正常対照群におけるBCHE-Kアリル頻度0.09より有意に高く(p=0.014)，彼らのAD群におけるBCHE-Kアリル頻度0.17と近似した値である。BCHE-KとADあるいはCAAとの関連には民族差がある可能性があり，様々な人種的背景を有する集団での検討が今後必要である。

結 論

BCHE-KとCAAの程度との間には有意な関連を認めなかった。これを確認するためにはさらに多

数例での検討が必要である。

文 献

- 1) Greenberg SG, Rebeck GW, Vonsattel JPG, Gomez-Isla T, Hyman BT. Apolipoprotein E ε 4 and cerebral hemorrhage associated with amyloid angiopathy. *Ann Neurol* 1995;38: 254-259.
- 2) Premkumar DRD, Cohen DL, Hedera P, Friedland RP, Kalaria RN. Apolipoprotein E ε 4 alleles in cerebral amyloid angiopathy and cerebrovascular pathology associated with Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 1996;148:2083-2095.
- 3) Itoh Y, Yamada M, Suematsu N, Matsushita M, Otomo E. Influence of apolipoprotein E genotype on cerebral amyloid angiopathy in the elderly. *Stroke* 1996;27:216-218.
- 4) Yamada M, Itoh Y, Suematsu N, Matsushita M, Otomo E. Lack of an association between apolipoprotein E ε 4 and cerebral amyloid angiopathy in elderly Japanese. *Ann Neurol* 1996;39:683.
- 5) Nicoll JAR, Burnett C, Love S, et al. High frequency of apolipoprotein E ε 2 in hemorrhage due to cerebral amyloid angiopathy. *Ann Neurol* 1997;41:716-721.
- 6) Yamada M, Sodeyama N, Itoh Y, et al. Association of presenilin-1 polymorphism with cerebral amyloid angiopathy in the elderly. *Stroke* 1997;28:2219-2221.
- 7) Yamada M, Sodeyama N, Itoh Y, et al. Association of α 1-antichymotrypsin polymorphism with cerebral amyloid angiopathy. *Ann Neurol* 1998;44:129-131.
- 8) Mesulam M, Carson K, Price B, Geula C. Cholinesterases in the amyloid angiopathy of Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1992;31:565-569.
- 9) Lehmann DJ, Johnston C, Smith AD. Synergy between the genes for butyrylcholinesterase K variant and apolipoprotein E4 in late-onset confirmed Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 1997;6:1933-1936.
- 10) Itoh Y, Yamada M, Hayakawa M, Otomo E, Miyatake T. Cerebral amyloid angiopathy: a significant cause of cerebellar as well as lobar cerebral hemorrhage in the elderly. *J Neurol Sci* 1993;116:135-141.
- 11) Yamada M, Sodeyama N, Itoh Y, et al. Butyrylcholinesterase K variant and cerebral amyloid angiopathy. *Stroke* 1998;(in press).
- 12) Singleton AB, Smith G, Gibson AM, et al. No association between the K variant of the butyrylcholinesterase gene and pathologically

confirmed Alzheimer's disease. Hum Mol Genet
1998;7:937-939.

Butyrylcholinesterase K Variant and Cerebral Amyloid Angiopathy

by

Masahito YAMADA*

Nobuyuki SODEYAMA*, Yoshinori ITOH**, Naomi SUEMATSU**,
Eiichi OTOMO**, Masaaki MATSUSHITA***, Hidehiro MIZUSAWA*

from

*Department of Neurology, Tokyo Medical and Dental University

**Yokufukai Geriatric Hospital

***Department of Neuropathology, Tokyo Institute of Psychiatry

Cholinesterases are found histochemically in the vessels affected with cerebral amyloid angiopathy (CAA). A gene for K variant of butyrylcholinesterase (BCHE-K) may be associated with late-onset Alzheimer's disease (AD). In search of genetic risk factors for CAA, we investigated association of BCHE-K with CAA. The association between the severity of CAA and BCHE-K was investigated in 155 autopsy cases of the elderly including 48 patients with AD. There was no significant association of BCHE-K with the severity of CAA in the total, AD, or non-AD cases. Status for ϵ 4 allele of apolipoprotein E gene did not influence the results. Our results suggest that BCHE-K is not a definitive risk factor of CAA in the elderly, although further study with larger samples with various ethnic backgrounds is necessary to confirm this.

アルツハイマー病原因遺伝子産物プレセニン1と A β アミロイド前駆体タンパクとの関連性について

研究者 森 啓* 亀谷 富由樹** 田中 喜久子**
大河内 正康** 佐原 成彦*

目 的

早期発症型家族性アルツハイマー病の原因遺伝子プレセニン1(PS1)は膜7回通過型の蛋白で467残基のアミノ酸からなることが知られている。その点突然変異により臨床的には早期痴呆発症となるが、神経病理学的にはアミロイド線維の主成分であるA β 42を増加させることが明らかとなっている^{1,4)}。事実、同遺伝変異をもった家族性アルツハイマー病患者の脳組織における老人斑アミロイドの直接的分析でもA β 42が上昇していることを示してきた。すなわち、これらの事実は、このプレセニン1がA β の前駆体タンパク質(APP)の代謝過程に関与していることを示唆している。そこで本研究では、その相互作用を調査することを目的としてプレセニン1とAPPの関連性について同遺伝子を人工的に導入された培養細胞を用いて解析した。

材料と方法

PC12D細胞は5%非動化胎児ウシ血清、5%ウマ血清を含むDMEM培地中で培養した。CHO細胞は10%非動化胎児ウシ血清を含むF12培地で培養した。これらの細胞が安定かつ高濃度のAPPを発現させる目的でヒト遺伝子の野生型APP695をリポソ

エクチン法によって遺伝子導入した。遺伝子移入安定株はG418(ネオマイシン)耐性を指標に選択した。

これらの細胞株にさらにヒト遺伝子であるプレセニン1遺伝子およびプレセニン1突然変異型遺伝子を導入し、各細胞内で相互作用を強調した実験系を用いた。培養細胞は10倍容量の0.32Mショ糖緩衝液(5mM Tris-HCl, pH7.2)にて破壊し、低速遠心操作(1,000 \times g for 60 min)し、その上清を高速遠心処理(18,000 \times g for 60 min)した沈査を得た。界面活性剤を含むRIPA緩衝液(22mM リン酸, pH7.5, 500mM, 0.1% SDS, 1% NP-40, 0.5% デオキシコール酸ナトリウム, 0.02% NaN₃)で処理後、再度高速遠心処理をした上清を膜蛋白画分として得た。蛋白定量はBCA蛋白定量キット(Pierce社)を用いた。

ウェスタンブロットは、野生型プレセニン1および突然変異プレセニン1のアミノ端部分を同定する場合はプレセニン1 N末抗体AD3NおよびPSN2を、カルボキシル端部分を同定する場合はループ部抗体AD3L、カルボキシル末端抗体CC3を用いて実施した。また遺伝子導入細胞の膜分画に存在するAPPおよびAPPカルボキシル末端断片を抗APP抗体22C11、抗A β 抗体6E10およびY27、およびAPPカルボキシル末端抗体R37を用いて解析した。これらの結果の定量にはNIH imagingソフトを用いて解析した。

*大阪市立大学医学部脳神経科学

**東京都精神医学総合研究所・分子生物学