

図1 プレセニリン1 蛋白の同定  
ヒトAPP695を安定発現しているPC12細胞にヒトプレセニリン1 遺伝子を発現させた場合のプレセニリン1 蛋白を各種抗体で同定した。詳細は方法を参照。

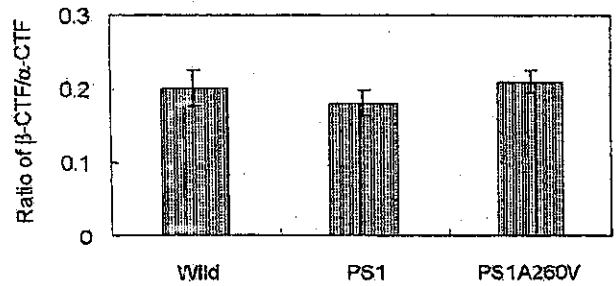


図2 APPおよびカルボキシル末端断片蛋白の同定  
ヒトAPP695を安定発現しているPC12細胞にヒトプレセニリン1 遺伝子を発現させた場合のヒトAPP695およびその断片蛋白を各種抗体で同定した。詳細は方法を参照。

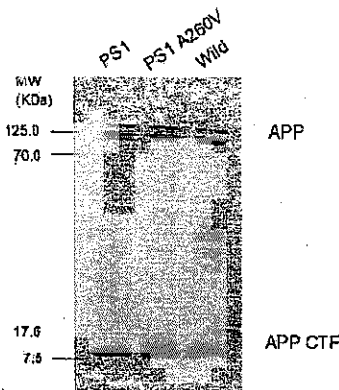


図3 プレセニリン1遺伝子発現による2種類のAPPカルボキシル末端断片の量比への影響  
 $\alpha$ -および $\beta$ -切断されて生じるAPPカルボキシル末端CTFの比を検討した結果、ヒトプレセニリン1 遺伝子の発現によっては変化がなかった。

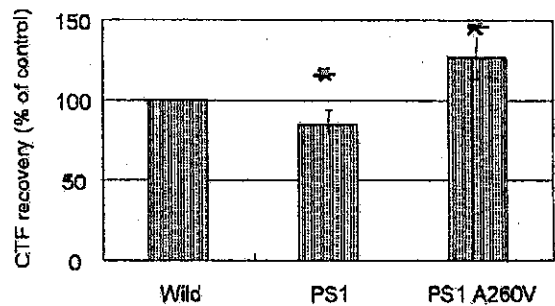


図4 プレセニリン1遺伝子発現によるAPPカルボキシル末端断片への影響  
APPのCTF量はプレセニリン1の発現によって変化し、野生型プレセニリン1では低下し、逆に変異型プレセニリン1では上昇した。

### 結果及び考察

プレセニリン1の導入されたPC12D細胞における発現を検討したのが図1である。この図から分かるように、プレセニリン1は分子量28kDaのアミノ末断片NTFと分子量18kDaのカルボキシル末断片CTFとして存在する。PC12細胞はラット由来細胞であるので、外来性のヒトと内在性のプレセニリン1はNTFに関しては区別できるが、CTFに関しては区別できない。これらの実験条件下で少なくとも外来のプレセニリン1遺伝子が確かに蛋白発現していることが確認された。

次にプレセニリン1導入PC12D細胞と未導入細胞から得られたAPPおよびその誘導体を比べてみると $\alpha$ および $\beta$ 分泌酵素による切断およびその割合について差は見られなかった(図2)。これらのことからプレセニリン1が直接APPの $\alpha$ -および $\beta$ -分泌酵素による切断に参与する可能性は低いと考えられた。少なくともAPP発現とおよその代謝には影響がないといえる。ただ、APPの $\gamma$ -分泌酵素については直接間接にその関与が想像される。図2はまた、プレセニリン1点突然変異A260Vを導入したAPPの断片も示している。この図から明らかな

ように、点突然変異による効果は明らかでない。ここで、 $\alpha$ -および $\beta$ -切断されて生じるAPPカルボキシル末端断片の比較をしたところ、有意な差が得られなかった(図3)。

しかしながら、これら両APPのCTFはプレセニリン1の遺伝子発現によって大きく変化することが見出された(図4)。コントロールに比較して野生型プレセニリン1が強制発現している細胞ではAPPのCTFは有意に減少すること、逆に点突然変異A260Vをもつプレセニリン1が導入された場合、APPのCTFは有意に上昇することが見出された。APPのCTFは $A\beta$ 42、 $A\beta$ 40を問わずp4、p3のアミロイド分子種の直接の前駆体であるamyloidogenic断片であることを考えると、野生型プレセニリン1はアミロイド蛋白産生抑制系に、逆に変異型プレセニリン1はアミロイド蛋白産生促進系に作用していると結論した。ここで得られた研究結果はプレセニリン1欠損マウスあるいは培養細胞を用いた実験系<sup>56)</sup>において得られたアミロイド蛋白の分析成果と矛盾しないばかりか同じ方向性を示唆しているといえる。

以上のことからプレセニリン1および突然変異プレセニリン1はAPPカルボキシル末端断片の代謝に重要な関与をしていることが見出された。

## 結 論

培養細胞に導入した野生型プレセニリン1および突然変異プレセニリン1は膜面に存在するAPPカルボキシル末端断片の代謝に影響を与え、野生型プレセニリン1と突然変異プレセニリン1は各々アミロイド断片を低下、高進させる生理機能があることを明らかにした。

## 参 考 文 献

- 1) Lemere CA, et al. The E280A presenilin 1 Alzheimer mutation produces increased  $A\beta$ 42 deposition and severe cerebellar pathology. *Nature* 1996;2: 1146-1150.
- 2) Mann DMA, et al. Amyloid  $\beta$  protein ( $A\beta$ ) deposition in chromosome 14-linked Alzheimer's disease; predominance of  $A\beta$ 42(43). *Ann Neurol* 1996;40: 149-156.
- 3) Ishii K, et al. Increased  $A\beta$ 42 (43)-plaque deposition

in early-onset familial Alzheimer's disease brains with the deletion of exon 9 and the missense point mutation (H163R) in the PS-1 gene. *Neurosci Lett* 1997;228: 17-20.

- 4) Tamaoka A, et al. Amyloid- $\beta$ -protein isoforms in brain of subjects with PS1-linked,  $\beta$  APP-linked and sporadic Alzheimer's disease. *Mol Brain Res* 1998;56: 178-185.
- 5) De Strooper B, et al. Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature* 1998;391: 387-390.
- 6) Davis JA, et al. An Alzheimer's disease-linked PS1 variant rescues the developmental abnormalities of PS1-deficient embryos. *Neuron* 1998;20: 603-609.

Presenilin 1 affects the metabolism of C-terminal fragment derived from Alzheimer's amyloid precursor protein (APP) in PC12 cells

by

Hiroshi MORI \*

Fuyuki KAMETANI \*\*, Kikuko TANAKA \*\*, Mihoko USAMI \*\*,

Masayasu OKOCHI \*\*, Naruhiko SAHARA \*

from

\*Department of Neuroscience, Osaka City University

\*\*Department of Molecular Biology, Tokyo Institute of Psychiatry

Most cases with familial early-onset Alzheimer's disease is caused by mutations in presenilin-1. Increased  $A\beta 42$  concentration have been found in plasma of FAD patients as well as in media from cultured cells and in brains carrying PS1 mutations. However, the mechanism underlying the increase in  $A\beta 42$  remains unclear. To see the effect of PS1 and mutated PS1 variants on amyloid precursor protein (APP) metabolism, we have analyzed APP and its derivatives in the membrane fraction from several PC12 cell lines that express human PS1 and mutated PS1. Despite of no change in the ratio of  $\beta$ -APP CTF/ $\alpha$ -APP CTF amongst cells without human PS1, with human wild PS1 and human PS1 variant with the A260V missense point mutation, we found the significant increased CTF of APP in PC12 cells expressing human wild PS1 but decreased CTF of APP in PC12 cells expressing human mutated PS1 variant as compared with that in non-transfected PC12 cells. Hence, the PS1 mutation is concluded to fail to decrease  $A\beta$  resulting in  $A\beta 42$  upregulation in FAD brains.

プレセニリン1 (PS1)・A $\beta$ 前駆体 (APP) 変異を有する  
 家族性アルツハイマー病 (FAD) 脳における  
 アミロイド $\beta$ 蛋白 (A $\beta$ ) 分子種の免疫組織化学的解析

研究者 玉 岡 晃\* 石 井 一 弘\* 宮 武 史 子\*  
 庄 司 進 一\* 森 啓\*\*

目 的

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease; AD) 脳の病理学的特徴の一つである脳血管・老人斑アミロイドの主要構成成分はアミロイド $\beta$ 蛋白 (Amyloid  $\beta$  protein; A $\beta$ ) であるが<sup>1,2)</sup>, A $\beta$ にはC末端の異なる2種類の主な分子種 (A $\beta$ 40とA $\beta$ 42) が知られている<sup>3)</sup>。また, A $\beta$ 42はA $\beta$ 40より重合しやすく<sup>4)</sup>, 重合したA $\beta$ 42が核となってA $\beta$ 42のみならずA $\beta$ 40も凝集し, アミロイド線維として増生していくという, "nucleation-dependent polymerization 仮説", いわゆる"seeding仮説"が提唱された<sup>5)</sup>。その後, AD脳におけるA $\beta$ が少量の場合はA $\beta$ 1-42が, 多くなればA $\beta$ 1-40が総A $\beta$ 量と正の相関を示すことやA $\beta$ 1-42はA $\beta$ 1-40より溶出しにくい状態で存在することが明らかにされ, "seeding仮説"が*in vivo*でも適用できることが証明された<sup>6)</sup>。また, 家族性AD (FAD) で見いだされたA $\beta$ 前駆体 (APP) 717のVal $\rightarrow$ Ileの変異がA $\beta$ 1-42の割合を増加させることが*in vitro*, *in vivo*で明らかにされ<sup>7,8)</sup>, AD脳の最初期病変である瀰漫性老人斑が主にA $\beta$ 42から構成されることが免疫組織化学やELISAにて示された<sup>9-11)</sup>。以上の一連の研究によってADの発症機序におけるA $\beta$ 42の意義が注目されているが, 本研究では孤発性AD脳, PS1

やAPPに突然変異を有する早期発症型FAD脳の老人斑や脳血管に沈着した各A $\beta$ 分子種の割合を免疫組織化学的に解析し, 各群間での差異を比較検討した。PS1やAPPの変異が, 老人斑や脳血管に沈着するA $\beta$ 分子種にどのような影響を与えることによって早期にADを発症するかを明らかにすることが, 本研究の目的である。

対象・方法

PS1変異9種類23例, APP717変異2種類6例及び孤発性AD14例の大脳皮質のホルマリン固定パラフィン包埋切片を用い, ABC法による免疫組織化学を施行した。各群のAD発症年齢(平均 $\pm$ 標準偏差; 歳)は, 孤発性AD群 (60.4 $\pm$ 9.4), PS1変異群 (48.3 $\pm$ 7.2), APP717変異群 (49.6 $\pm$ 8.0) であり, FADの早期発症が確認できた。また, 罹病期間は3群とも約10年であった。変異の内訳はPS1変異ではE120K 1例, M139V 2例, I143F 1例, M143L 2例, H163R 1例, A246E 8例, L286V 1例,  $\Delta$  exon9 2例, C410Y 5例であり, APP717変異ではV717G 1例, V717L 5例であった。一次抗体としてはA $\beta$ 40・A $\beta$ 42のC末端特異的なモノクローナル抗体, 即ちそれぞれBA27 (A $\beta$ 1-40に対するモノクローナル抗体), BC05 (A $\beta$ 35-43に対するモノクローナル抗体) を用いた<sup>12)</sup>。免疫反応陽性の老人斑の一定面積内の個数(密度)ならびに面積比率 (%area)をNIH imaging 1.52, Adobe Photoshop

\*筑波大学臨床医学系神経内科

\*\*大阪市立大学医学部老年医学研究部門脳・神経系分野

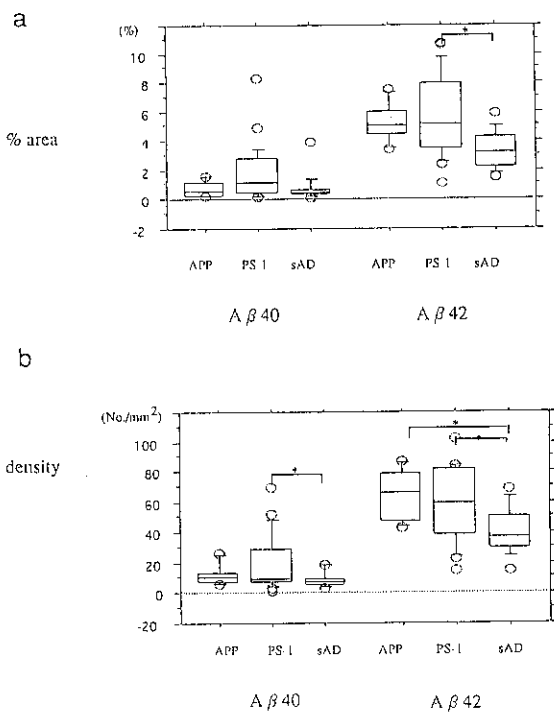


図1. 老人斑におけるAβ分子種  
APP：APP717変異群，PS1：PS1変異群，  
sAD：孤発性AD群

3.0Jを用いて画像解析し，統計学的に比較検討した。また，Aβが沈着した髄膜血管数について，大脳皮質表層の単位長さ当たりにおいて比較検討した。統計学的に解析には，Fisher's PSLD ( $P < 0.001$ )を用いた。

## 結 果

老人斑の面積比率 (%area) については，Aβ42ではPS1変異において孤発性ADより有意に増加しており，APP717変異においても増加傾向が認められた(孤発性AD群： $3.30 \pm 0.34$ ，PS1変異群： $5.66 \pm 0.56$ ，APP717変異群： $5.22 \pm 0.57$ ；平均±標準偏差)。Aβ40については各群において有意差は認められなかったが，孤発性ADやAPP717変異に比べPS1変異では増加傾向がみられた(孤発性AD群： $0.72 \pm 0.96$ ，PS1変異群： $1.75 \pm 0.39$ ，APP717変異群： $0.71 \pm 0.60$ ) (図1.a)。また，老人斑の密度 (density；個数/mm<sup>2</sup>) については，Aβ42ではPS1変異，APP717変異ともに孤発性ADに比して有意に増加していた(孤発性AD群： $40.4 \pm 3.99$ ，

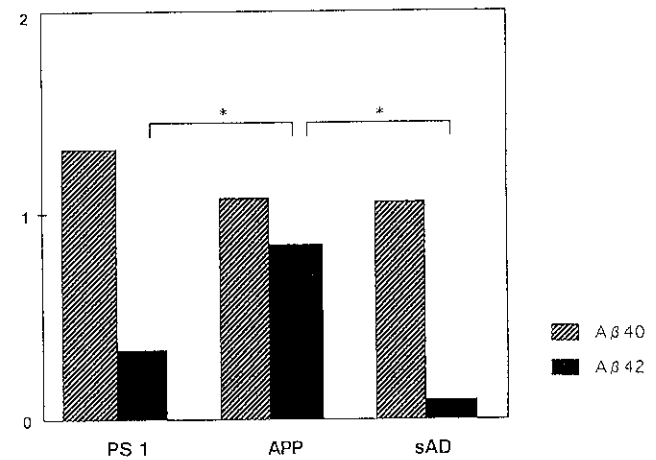


図2. 髄膜血管におけるAβ分子種  
APP：APP717変異群，PS1：PS1変異群，  
sAD：孤発性AD群

PS1変異群： $57.7 \pm 5.09$ ，APP717変異群： $64.5 \pm 7.53$ )。Aβ40についてはPS1変異が孤発性ADに対して有意に増加していた(孤発性AD群： $8.65 \pm 1.28$ ，PS1変異群： $19.1 \pm 3.76$ ，APP717変異群： $12.2 \pm 3.08$ ) (図1.b)。PS1変異のAβ分子種に対する作用は，部位によって多少異なる傾向が見られ，H163RやΔexon9，C410YではAβ40の増加傾向が目立った。Aβ42に特異的な増加作用を検討するために，老人斑のAβ42/Aβ40を算出すると，密度については各群において有意差がみられなかった(孤発性AD群： $5.27 \pm 0.56$ ，PS1変異群： $15.6 \pm 0.89$ ，APP717変異群： $6.55 \pm 1.41$ ) が，面積比率についてはAPP717変異がPS1変異や孤発性ADよりも有意に増加していた(孤発性AD群： $7.58 \pm 1.15$ ，PS1変異群： $6.47 \pm 1.20$ ，APP717変異群： $15.0 \pm 5.46$ )。Aβ沈着髄膜血管数 (個数/mm surface length) においては，Aβ40陽性血管数は，孤発性AD，PS1変異，APP717変異において有意差が認められなかった(孤発性AD群： $1.05 \pm 0.277$ ，PS1変異群： $1.30 \pm 0.289$ ，APP717変異群： $1.07 \pm 0.404$ ) が，Aβ42陽性血管数は，APP717変異においてPS1変異や孤発性ADに比べて有意に増加していた(孤発性AD群： $0.082 \pm 0.059$ ，PS1変異群： $0.316 \pm 0.090$ ，APP717変異群： $0.850 \pm 0.363$ ) (図2)。

## 考 察

本研究で得られた結果より、PS1変異では老人斑のA $\beta$  42を、APP717変異では老人斑や脳血管のA $\beta$  42を増加させる方向に作用し、アミロイド線維形成を促進することによって、早期発症のFADを生じる可能性が高いと考えられた。また、APP717変異はA $\beta$  42特異的に増加作用が認められたが、PS1変異では変異部位によってはA $\beta$  40の増加作用も示す結果が得られ、A $\beta$ 分子種に対する作用は両者の間で異なる可能性が示唆された。また、老人斑におけるA $\beta$  42に対する影響では、PS1変異では面積比率、密度ともに有意な増加を示したが、APP717変異では密度の増加のみが有意差が見られ、PS1変異では老人斑の平均的な面積が増加していることが示唆され、PS1変異とAPP717変異との間ではA $\beta$ 分子種に対する影響が異なるものと考えられた。

LemereらのPS1変異 (E280A) 脳の免疫組織化学的研究<sup>13)</sup>ではA $\beta$  42陽性老人斑の孤発性ADに対して有意な増加が認められたが、Mannらの種々の部位でのPS1変異脳における同様な検討ではA $\beta$  42が優位ながらも、A $\beta$  40の増加も示されている<sup>14)</sup>。Sheunerらの様々のPS1変異を有する患者の検討<sup>15)</sup>では、血漿A $\beta$  1-42(43)、培養線維芽細胞上清A $\beta$  42の有意な増加がみられ、後者の一部ではA $\beta$  1-10の増加も認められた。DuffらのPS1変異のトランスジェニックマウス脳A $\beta$ の定量<sup>16)</sup>ではA $\beta$  42(43)の有意な増加が示されたが、CitronらのPS1変異を強制発現させた細胞の培養上清やトランスジェニックマウス脳の定量でもA $\beta$  42の全A $\beta$ に占める割合は増加していたが、その%はPS1の変異部位によって増減がみられた<sup>17)</sup>。これらの知見と、本研究にてPS1変異の一部においてA $\beta$  40の増加傾向がみられたことと考え合わせると、PS1変異は単純にA $\beta$  42を増加するのみではない可能性が考えられる。この問題の解明には、今後PS1とAPPの相互作用に関する検討が益々重要になっていくものと考えられる。

APP717変異に関しては、*in vitro*, *in vivo*にてA $\beta$  42(43)の割合が増加することが報告されてきた<sup>18,19)</sup>が、Mannらは免疫組織化学的検討によって、この変異を有するAD脳ではA $\beta$  42(43)の沈着の孤

発性ADに比して有意な増加がみられ、A $\beta$  40の沈着は比較的少量にとどまることを明らかにした<sup>20)</sup>。Kosakaらは、APP717変異を有する患者や無症候性キャリアーの血漿中A $\beta$ 分子種を測定し、孤発性AD例に比してA $\beta$  42(43)の増加とA $\beta$  40の減少が認められることを示した<sup>21)</sup>。本研究でもAPP717変異では孤発性AD脳に比べてA $\beta$  42の有意な増加が認められたが、A $\beta$  40は比較的low値であり、過去の報告と一致していた。

以上の報告と、ELISAを用いたA $\beta$ 分子種の定量によって、PS1変異ではA $\beta$  1-42、A $\beta$  X-42の、APP717変異ではA $\beta$  X-42の有意な増加を明らかにした解析<sup>22)</sup>、更に本研究の結果は全て、これらの早期発症型FADの原因となる変異がA $\beta$  42の増加を促進することによって、ADを早期に発症させる可能性を支持するものである。

## 結 論

PS1やAPP717の突然変異は脳のA $\beta$ 代謝に影響し、前者では老人斑において、後者では老人斑と髄膜血管において、より重合しやすいA $\beta$  42の増加を促進させることによってアミロイド線維形成を促進し、早期発症のFADを生じる可能性が高い。老人斑A $\beta$  42の面積比率や密度および髄膜血管A $\beta$ 分子種に対する影響はPS1変異とAPP717変異間で異なっており、また、PS1変異の部位によってはA $\beta$  40の増加作用も示唆する結果が得られたことより、PS1変異とAPP717変異のA $\beta$ 分子種に対する作用機序は異なる可能性が示唆された。

## 謝 辞

トロント大学 Peter St. George-Hyslop 先生から脳の御供与を受けたことに対し、ここに深謝いたします。

## 参考文献

- 1) Glenner GG, Wong CE. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;120: 885-890.
- 2) Masters CL, Simms G, Weinman NA, et al. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82: 4245-

- 4249.
- 3) Mori H, Takio K, Ogawara M, et al. Mass spectrometry of purified amyloid  $\beta$  protein in Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 1992;267: 17082-17086.
  - 4) Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PTJr. The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: Implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* 1993;32: 4693-4697.
  - 5) Jarrett JT, Lansbury PTJr. Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism of Alzheimer's disease and scrapie? *Cell* 1993;73: 1055-1058.
  - 6) Tamaoka A, Kondo T, Odaka A, et al. Biochemical evidence for the long-tail form (A  $\beta$  1-42/43) of amyloid  $\beta$  protein as a seed molecule in cerebral deposits of Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;205: 834-842.
  - 7) Suzuki N, Cheung TT, Cai X-D, et al. An increased percentage of long amyloid  $\beta$  protein secreted by familial amyloid  $\beta$  protein precursor ( $\beta$  APP717) mutants. *Science* 1994;264: 1336-1340.
  - 8) Tamaoka A, Odaka A, Ishibashi Y, et al. APP717 missense mutation affects the ratio of amyloid  $\beta$  protein species (A  $\beta$  1-42/43 and A  $\beta$  1-40) in familial Alzheimer's disease brain. *J Biol Chem* 1994;269: 32721-32724.
  - 9) Iwatsubo T, Odaka A, Suzuki N, et al. Visualization of A  $\beta$  42(43) and A  $\beta$  40 in senile plaques with end-specific A  $\beta$  monoclonals: evidence that an initially deposited species is A  $\beta$  42(43). *Neuron* 1994;13: 45-53.
  - 10) Tamaoka A, Sawamura N, Odaka A, et al. Amyloid  $\beta$  protein 1-42/43 (A  $\beta$  1-42/43) in cerebellar diffuse plaques: enzyme-linked immunosorbent assay and immunocytochemical study. *Brain Res* 1995;679: 151-156.
  - 11) Tamaoka A, Sawamura N, Asami A, et al. Amyloid  $\beta$  protein 42/43 (A  $\beta$  42/43) in cerebellar diffuse plaques: enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) and immunocytochemical study. *Neurobiol Aging* 1996;17: S171.
  - 12) Asami-Odaka A, Ishibashi Y, Kikuchi T, et al. Long amyloid  $\beta$ -protein secreted from wild-type human neuroblastoma IMR-32 cells. *Biochemistry* 1995;34: 10272-10278.
  - 13) Lemere CA, Lopera F, Kosik KS, et al. The E280A presenilin 1 Alzheimer mutation produces increased A  $\beta$  42 deposition and severe cerebellar pathology. *Nature Med* 1996;2: 1146-1150.
  - 14) Mann DMA, Iwatsubo T, Cairns NJ, et al. Amyloid  $\beta$  protein (A  $\beta$ ) deposition in chromosome 14-linked Alzheimer's disease: predominance of A  $\beta$  42(43). *Ann Neurol* 1996;40: 149-156.
  - 15) Scheuner D, Eckman C, Jensen M, et al. Secreted amyloid  $\beta$ -protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nature Med* 1996;2: 864-870.
  - 16) Duff K, Eckman C, Zehr C, et al. Increased amyloid- $\beta$  42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature* 1996;383: 710-713.
  - 17) Citron M, Westaway D, Xia W, et al. Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid  $\beta$ -protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nature Med* 1997;3: 67-72.
  - 18) Suzuki N, Cheung TT, Cai X-D, et al. An increased percentage of long amyloid  $\beta$ -protein is secreted by familial amyloid  $\beta$ -protein precursor ( $\beta$  APP717) mutants. *Science* 1994;264: 1336-1340.
  - 19) Tamaoka A, Odaka A, Ishibashi Y, et al. APP717 missense mutation affects the ratio of amyloid  $\beta$  protein species (A  $\beta$  1-42/43 and A  $\beta$  1-40) in familial Alzheimer's disease brain. *J Biol Chem* 1994;269: 32721-32724.
  - 20) Mann DMA, Iwatsubo T, Ihara Y, et al. Predominant deposition of amyloid- $\beta$  42(43) in plaques in cases of Alzheimer's disease and hereditary cerebral hemorrhage associated with mutations in the amyloid precursor protein gene. *Am J Pathol* 1996;148:1257-1266.
  - 21) Kosaka T, Imagawa M, Seki K, et al. The  $\beta$  APP717 Alzheimer mutation increases the percentage of plasma amyloid- $\beta$  protein ending A  $\beta$  42(43). *Neurology* 1997;48: 741-745.
  - 22) Tamaoka A, Fraser PE, Ishii K, et al. Amyloid- $\beta$ -protein isoforms in brain of subjects with PS1-linked,  $\beta$  APP-linked and sporadic Alzheimer disease. *Mol Brain Res* 1998;56: 178-185.

Distinguishable effects of presenilin-1 and APP717 mutations on cerebral A  $\beta$  42 and A  $\beta$  40 deposition  
in seniles plaque and meningeal vessels

by

Akira TAMAOKA\*  
Kazuhiro ISHII\*, Fumiko MIYATAKE\*,  
Shin-ichi SHOJI\*, Hiroshi MORI\*\*

from

\*Department of Neurology, Institute of Clinical Medicine, University of Tsukuba

\*\*Department of Neuroscience, Osaka city University

Both presenilin 1 (PS-1) and  $\beta$ -amyloid precursor protein (APP) are causal genes for early-onset familial Alzheimer's disease (FAD) and produce an increase in the long-tail form of A  $\beta$  42, the earliest demonstrable A  $\beta$  deposition in brains. To determine whether both PS-1 and APP mutations show the same effect on cerebral A  $\beta$  deposition, we examined immunohistochemically A  $\beta$  deposition in senile plaques and meningeal vessels in brains of 29 familial AD (23 PS-1, 6 APP) cases and 14 sporadic AD cases using two monoclonal antibodies which recognize either the carboxyl terminus of the long-tailed form (A  $\beta$  42) or the short-tailed form (A  $\beta$  40). We observed that mutations in both PS-1 and APP717 mutations were associated with a significant increase of A  $\beta$  42 in plaques, and the latter mutations also linked to increased A  $\beta$  42 in meningeal vessels. Furthermore, we found an unexpected differential effect of PS-1 and APP717 mutations on A  $\beta$  42- and A  $\beta$  40-plaque deposition. In comparison to sporadic AD cases, APP717 mutation cases had an increased density of A  $\beta$  42 plaques (measured as the number of plaques/mm<sup>2</sup>), while PS-1 mutation cases had an increased density and area occupied by A  $\beta$  42-plaques. PS-1 but not APP717 mutation cases also had a significantly increased density of A  $\beta$  40-plaques. Effects of PS-1 mutations on A  $\beta$  40 deposition could be site-dependent, indicative of site-dependent multiple functions in PS-1. Our results suggest that APP717 mutations affect the increase of A  $\beta$  42 species but PS-1 mutations cause multiple dysfunction including the fundamental increase of A  $\beta$  42 in familial AD brains.



## アルツハイマー型痴呆を伴うダウン症候群脳における プレセニン1の発現様式の検討

研究者 池田 修一\* 関島 良樹\*\* 亀谷 富由樹\*\*\*  
田中 喜久子\*\*\* 森 啓\*\*\*\*

### はじめに

ダウン症候群は21番染色体のトリソミーによりアミロイド前駆体蛋白(以下APP)が過剰産生され、50歳以降に高率にアルツハイマー型痴呆を発症することが知られている<sup>1,2)</sup>。一方、プレセニン1(以下PS-1)遺伝子は早期発症型家族性アルツハイマー病の原因遺伝子であり、現在までに家族性アルツハイマー病の発症と連鎖したPS-1遺伝子の変異が40種類以上報告されている<sup>3)</sup>。PS-1は広く全身臓器で発現しているが、脳では主にニューロンで強く発現し、グリアでは発現が弱い。最近、PS-1が細胞内では主として約28kDaのN末端断片と約18kDaのC末端断片に分解されて小胞体およびゴルジ小体に存在していることが明らかにされたが<sup>4,5)</sup>、PS-1の生理的機能については不明な点が多い。また、ダウン症候群脳におけるPS-1の発現についてはこれまで報告されていない。本研究では、これらの点を明らかにする目的で、ダウン症候群脳および非痴呆患者脳を皮質、白質、軸索分画に分離し、各分画におけるPS-1の存在様式について生化学的に検討した。

### 対象および方法

対象として、高度のアルツハイマー型痴呆を認めたダウン症候群患者2名(56歳男性, 51歳女性)、および非痴呆疾患患者2名(73歳男性, 42歳女性)の剖検脳を用いた。ダウン症候群患者は2名とも典型的なアルツハイマー病の脳病理所見を呈していた。

方法は、まず各剖検脳の前頭葉を皮質と白質に分離し、各々に10倍量のRIPA緩衝液(500 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS)を加えポケッター型ホモジナイザーを用いてホモジネートした。これを10700Gで30分間遠心し、上清をPS-1のN末抗体AD3NおよびC末抗体CC3<sup>6)</sup>を用いてPS-1を免疫沈降させた。免疫沈降物をSDS電気泳動後にPVDF膜に転写し、PS-1のN末抗体PSN2およびループ部抗体AD3L<sup>7)</sup>を用いて皮質全体および白質全体のPS-1を解析した。

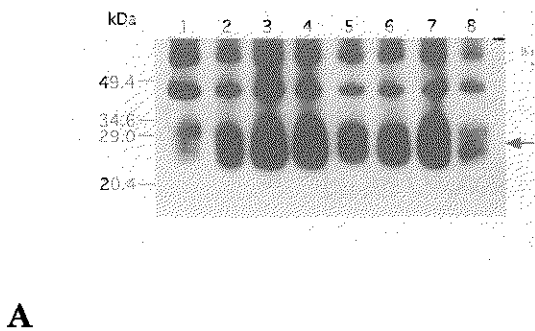
更に白質からaxonal flotation method<sup>10,11)</sup>を用いて軸索分画を分離した。即ち、白質部分をPBS/S緩衝液(10 mM phosphate buffer at pH 6.5/0.1 M NaCl/1 mM EDTA/0.85 M sucrose)中でポケッター型ホモジナイザーを用いてホモジネートし、10700Gで30分間遠心した。この操作により白質は有髄神経線維を含むfloatと有髄神経線維以外の部分を含むpelletに分離される。この有髄神経線維を含むfloat分画を1%トライトンを含むPBS/S緩衝液中で超音波ホモジナイザーを用いてホモジネート

\*信州大学医学部第三内科

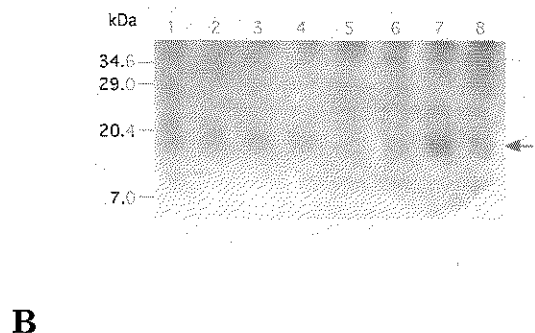
\*\*豊科赤十字病院神経内科

\*\*\*東京都精神医学総合研究所分子生物研究部門

\*\*\*\*大阪市立大学老年医学研究部門脳神経系分野



A



B

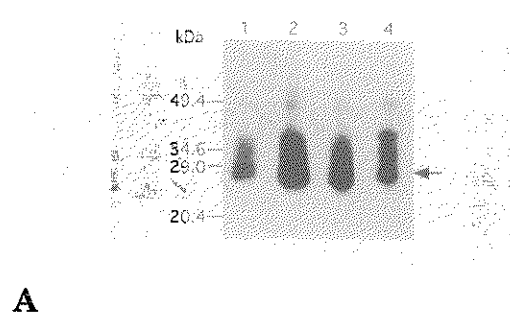
図1 (A) 大脳皮質分画 (lanes 1-4), 大脳白質分画 (lanes 5-8) のPS-1 N末端断片のイムノプロットティング。ダウン症候群脳 (lanes 1,2,5,6), 非痴呆患者脳 (lanes 3,4,7,8)。全ての分画で約28kDaのPS-1 N末端断片が認められる (矢印)。ダウン症候群脳では非痴呆患者脳に比べ、皮質でのPS-1 N末端断片の発現が低下している傾向がある。

(B) 大脳皮質分画 (lanes 1-4), 大脳白質分画 (lanes 5-8) のPS-1 C末端断片のイムノプロットティング。ダウン症候群脳 (lanes 1,2,5,6), 非痴呆患者脳 (lanes 3,4,7,8)。全ての分画で約18kDaのPS-1 C末端断片が認められる (矢印)。ダウン症候群脳と非痴呆患者脳との間でPS-1 C末端断片の発現量に明らかな差は認められない。

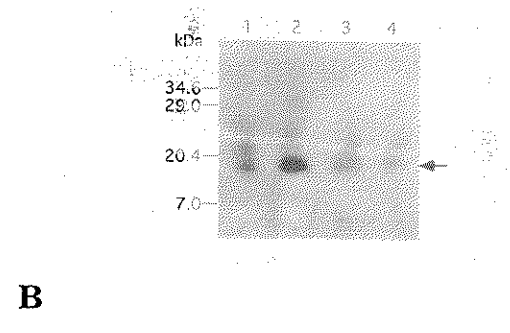
し、10700Gで30分間遠心した。遠心後、浮遊したミエリンを除去した上清が軸索分画である。これらを皮質分画および白質分画と同様に免疫沈降後、電気泳動、イムノプロットティングを用いて解析した。更に、APPに対する抗体であるR37を用いてAPPとPS-1との結合の有無についても検討した。

## 結 果

ダウン症候群脳および非痴呆患者脳の皮質、白



A



B

図2 (A) ダウン症候群脳 (lanes 1,2,) および非痴呆患者脳 (lanes 3,4) の軸索分画のPS-1 N末端断片のイムノプロットティング。全ての分画で約28kDaのPS-1 N末端断片が認められる (矢印)。ダウン症候群脳と非痴呆患者脳との間でPS-1 N末端断片の発現量に明らかな差は認められない。

(B) ダウン症候群脳 (lanes 1,2) および非痴呆患者脳 (lanes 3,4) の軸索分画のPS-1 C末端断片のイムノプロットティング。全ての分画で約18kDaのPS-1 C末端断片が認められる (矢印)。ダウン症候群脳と非痴呆患者脳との間でPS-1 C末端断片の発現量に明らかな差は認められない。

質双方で約28kDaのPS-1 N末端断片および約18kDaのPS-1 C末端断片が検出された。全長型のPS-1は検出されなかった。ダウン症候群脳の皮質ではPS-1 N末端断片の発現が非痴呆患者脳に比べて低下している傾向があったが、白質でのPS-1 N末端断片、皮質および白質でのPS-1 C末端断片はダウン症候群脳と非痴呆患者脳との間で発現量に明らかな差は認められなかった (図1)。

軸索分画のイムノプロットティングの検索でも、

ダウン症候群脳および非痴呆患者脳双方で約28kDaのPS-1 N末端断片および約18kDaのPS-1 C末端断片が検出された。全長型のPS-1は検出されなかった。軸索分画では、PS-1 N末端断片およびPS-1 C末端断片ともにダウン症候群脳と非痴呆患者脳との間で発現量に明らかな差は認められなかった(図2)。

各分画をAD3N (PS-1のN末抗体)で免疫沈降を行った後、AD3L (PS-1のループ部抗体)を用いて解析したがPS-1 C末端断片は検出できなかった。一方、CC3 (PS-1のC末抗体)で免疫沈降を行った後、PSN2 (PS-1のN末抗体)を用いて解析したところ、約28kDaのPS-1 N末端断片が検出された。また、R37 (抗APP抗体)で免疫沈降を行った後にPSN2およびAD3Lを用いて解析したが、PS-1のN末端断片およびC末端断片は検出されなかった。

## 考 察

近年、PS-1遺伝子のmutationを有する家族性アルツハイマー病患者の血清中のA $\beta$ 1-42(43)、および患者皮膚培養線維芽細胞が分泌するA $\beta$ 1-42(43)が増加していることが報告された<sup>12)</sup>。更に、PS-1を完全にノックアウトしたマウスの初代培養神経細胞では、A $\beta$ の総分泌量が高度に低下していることが明らかになった<sup>13)</sup>。これらは、PS-1が神経細胞内でAPPの代謝(特に $\gamma$ セクレターゼ作用部位における代謝)に深く関与していることを示す所見である。

神経細胞の胞体で合成されたAPPは順行性の軸索輸送によって軸索末端に運ばれ、多くは細胞膜に組み込まれ軸索上に存在する。軸索上のAPPの一部はエンドサイトーシスされて逆行性の軸索輸送を受け胞体へと戻り、ライソゾームでの分解やトランスサイトーシスを受けることが知られている<sup>14,15)</sup>。我々もこれまでに、今回の検討と同様にaxonal flotation methodを用いて軸索中に存在する種々の分子種のAPPおよびA $\beta$ を証明し、軸索輸送の過程でAPPが代謝分解されA $\beta$ が産生されていることを報告してきた<sup>11)</sup>。

一方、PS-1は神経細胞内では主として小胞体およびゴルジ小体に局在していることが報告されているが<sup>5,6)</sup>、PS-1の神経細胞内のトラフィックに

ついては不明である。今回の我々の検討で軸索中にもPS-1のN末端断片およびC末端断片が一部は互いに複合体を形成して多量に存在していることが明らかになったが、これはPS-1がAPPやA $\beta$ と同様に軸索輸送に関与している可能性を示唆している。今回の検索結果からはPS-1とAPPが軸索内で結合している可能性は否定的であるが、PS-1 N末端断片およびC末端断片は軸索内で何らかの物質を介して間接的にAPPの代謝および輸送、A $\beta$ の産生に影響を及ぼしていると考えられた。PS-1は電位依存性カルシウムチャンネルの $\alpha$ サブユニット、Caenorhabditis eleganceのSPE-4、Caenorhabditis eleganceのSEL-12と相同性を有している。この中で、SPE-4はゴルジ由来の小胞の構成成分となり、物質の細胞内トラフィックに関与している可能性が考えられており、PS-1も同様の機能を有しているのかも知れない。

ダウン症候群脳と非痴呆患者脳とのPS-1の存在様式の比較では、ダウン症候群脳で非痴呆患者脳に比べ、皮質でのPS-1 N末端断片の発現が低下している傾向があったが、皮質でのPS-1 C末端断片、白質でのPS-1 N末端断片およびC末端断片、軸索でのPS-1 N末端断片およびC末端断片には明らかな発現量や発現パターンの違いは認められなかった。これらの点については今後症例を増やして検討する必要がある。

## 結 論

1. ダウン症候群脳および非痴呆患者脳において、軸索分画に多量のPS-1が存在していた。
2. PS-1は生理的機能として軸索輸送に関与している可能性が考えられた。
3. ダウン症候群脳では非痴呆患者脳に比べ、皮質でのPS-1 N末端断片の発現が低下している傾向があり、今後症例を増やして検討する必要がある。

## 参考文献

- 1) Lai F, Williams RS. A prospective study of Alzheimer disease in Down syndrome. Arch Neurol 1989; 46: 849-853.
- 2) Sekijima Y, Ikeda S, Tokuda T, et al. The prevalence of dementia of Alzheimer-type and the apolipoprotein E phenotypes in aged patients with

- Down's syndrome. *Eur Neurol* 1998; 39: 234-237.
- 3) Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, et al. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 1995; 375: 754-760.
  - 4) Thinakaran G, Borchelt DR, Lee MK, et al. Endoproteolysis of presenilin 1 and accumulation of processed derivatives in vivo. *Neuron* 1996; 17: 181-190.
  - 5) Okochi M, Sahara N, Kametani F, et al. Presenilin 1 cleavage is a universal event in human organs. *Neurobiol Aging* 1998; 19: S3-10.
  - 6) Kovacs DM, Fausett HJ, Page KJ, et al. Alzheimer-associated presenilins 1 and 2: neuronal expression in brain and localization to intracellular membranes in mammalian cells. *Nature Med* 1996; 2: 224-229.
  - 7) De Strooper B, Beullens M, Contreras B, et al. Phosphorylation, subcellular localization, and membrane orientation of the Alzheimer's disease-associated presenilins. *J Biol Chem* 1997; 272: 3590-3598.
  - 8) Zhang J, Kang DE, Xia W, et al. Subcellular distribution and turnover of presenilins in transfected cells. *J Biol Chem* 1998; 273: 12436-12442.
  - 9) Sahara N, Yahagi Y, Takagi H, et al. Identification and characterization of presenilin I-467, I-463 and I-374. *FEBS Lett* 1996; 381: 7-11.
  - 10) Yen SH, Dahl D, Schachner M, Shelanski ML. Biochemistry of the filaments of brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976; 73: 529-533.
  - 11) Tokuda T, Kametani F, Tanaka K, Sahara N, Ikeda S, Yanagisawa N. Amyloid beta protein and its 3-kDa fragment are present in the axoplasm fraction of the white matter in human brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 223: 165-169.
  - 12) Scheuner D, Eckman C, Jensen M, et al. Secreted amyloid  $\beta$ -protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nature Med* 1996; 2: 864-870.
  - 13) De Strooper B, Saftig P, Craessaerts K, et al. Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature* 1998; 22: 387-390.
  - 14) Yamazaki T, Selkoe DJ, Koo EH. Trafficking of cell surface beta-amyloid precursor protein: retrograde and transcytotic transport in cultured neurons. *J Cell Biol* 1995; 129: 431-442.
  - 15) Amaratunga A, Fine RE. Generation of amyloidogenic C-terminal fragments during rapid axonal transport in vivo of beta-amyloid precursor protein in the optic nerve. *J Biol Chem* 1995; 270: 17268-17272.

Expression of presenilin-1 in brains of aged Down's syndrome patients  
with dementia of Alzheimer's type.

by

Shu-ichi IKEDA\*

Yoshiki SEKIJIMA\*\*, Fuyuki KAMETANI\*\*\*, Kikuko TANAKA\*\*\*, Hiroshi MORI\*\*\*\*

from

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

\*\*Department of Neurology, Toyoshina Red Cross Hospital

\*\*\*Department of Molecular Biology, Tokyo Institute of Psychiatry

\*\*\*\*Department of Neuroscience, Osaka City University Medical School

To investigate the localization and functions of presenilin-1 (PS-1) in the human brain, we separated the gray matter, white matter, and axoplasm fractions from the cerebral white matters of Down's syndrome patients with Alzheimer's disease pathology and non-demented individuals, and immunocytochemically analyzed them.

Cerebral gray matter and white matter of the DS patients and non-demented individuals contained 28kDa amino-terminal fragments (NTFs) and 18kDa carboxy-terminal fragments (CTFs) of the PS-1 respectively. Expression of NTFs of the PS-1 in the gray matter of DS patients was relatively decreased in comparison to that of non-demented individuals. In the axoplasm fractions obtained from the brains of DS patients and non-demented individuals immunochemical reactivities to PS-1 were clearly identified, showing 28kDa NTFs and 18kDa CTFs. There was no significant difference in the expression of PS-1 between DS patients and non-demented individuals.

Our study has added that PS-1 peptide is present in the axoplasm fraction of human brains. This finding indicates that there is intracellular trafficking of the PS-1 through the axons in the brain. APP and A $\beta$  are located intracellularly in the ER, Golgi and axoplasm fraction, where direct or indirect interaction between APP and PS-1 may occur in relation to the production of A $\beta$ .

## アミロイドβ蛋白沈着機序の研究—家族性アルツハイマー病の原因 遺伝子を発現するトランスジェニックマウスによる検討

研究者 東海林 幹 夫\* 針 谷 康 夫\* 金 井 光 康\*  
松 原 悦 朗\* 瓦 林 毅\* 池 田 将 樹\*  
岡 本 幸 市\* 平 井 俊 策\*\*

### 目 的

現在、アルツハイマー病(AD)の発症機序として、まずアミロイドβ蛋白(Aβ)沈着すなわち脳Aβアミロイドーシスが起こり、続いて神経原線維変化と神経細胞死が出現してくるアミロイド・カスケード説が有力視されている。近年、同定された家族性アルツハイマー病(FAD)の原因遺伝子(アミロイドβ蛋白前駆体(βAPP), presenilin-1(PS-1), presenilin-2(PS-2)の変異はいずれもAβ42の生成を増加させて、脳Aβアミロイドーシスを引き起こすことが報告されている。この脳Aβアミロイドーシスを引き起こす機序を明らかにするためhamster prion protein promoterのもとにそれぞれβAPP751DNL+I, 変異PS-1 M146LあるいはC410Yを発現するトランスジェニックマウス(Tg)を作製し解析を行った。既に確立されたPrion promoter+βAPP695DNLマウス(Tg2576)<sup>1)</sup>についても検討を加えた。

### 方 法

hamster prion protein promoterのもとにβAPP751DNL+IあるいはPS-1 M146L, PS-1 C410Yそれぞれのmutant type cDNAを繋いでcloning後、制限酵素処理し、それぞれマウス受精卵に

microinjectionしTg(F0)を作成した(Prp βAPP751DNL+I, PrpPS-1M146L, PrpPS-1C410Y: 図1)。生後1ヶ月後に尾からgenomic DNAを抽出し制限酵素処理後、PCRおよび特異的probeを用いてSouthern blot解析でtransgeneの有無を確認した。Tg(F0)が成熟したら、交配を行った。F1が誕生後、F0マウスの脳でβAPPの発現量をWestern blotで確認し高発現系を選択した。マウスの眼窩動脈より血液を採取し、血漿分離後Sandwich ELISA系(BNT-77/BA-27, BNT-77/BC-05)<sup>2,3)</sup>を用いて血漿中Aβ40, 42を測定した。8~11ヶ月齢のマウスを解剖し、脳の一部を70%ギ酸で抽出し前述のELISA系でAβ40, 42を測定した。対側脳は4%paraformaldehydeで固定後paraffin切片を作製した。βAPPのC末端抗体Saeko<sup>4)</sup>, Aβ抗体(Aβ9204<sup>5)</sup>, S40<sup>6,7)</sup>, S42<sup>6,7)</sup>, Mizuho<sup>4)</sup>, 抗Tau抗体, PS-1のN末端抗体<sup>8)</sup>, C末端抗体<sup>9)</sup>を用いてABC法により染色した。

### 結果および考察

1)Tg2576マウスではWestern blotで11.4kDのC末断片(CTF)の有意の増加を認めた。血漿中Aβを測定すると、Aβ40は26pmols/ml, Aβ42は4pmols/mlと高値であった。脳内では、老人斑出現以前はAβ40は26pmols/g brain, Aβ42は13pmols/g brainで、老人斑の沈着とともに著明な増加を示した。免疫細胞化学的検討では、15ヶ月齢

\*群馬大学医学部神経内科

\*\*都立神経病院

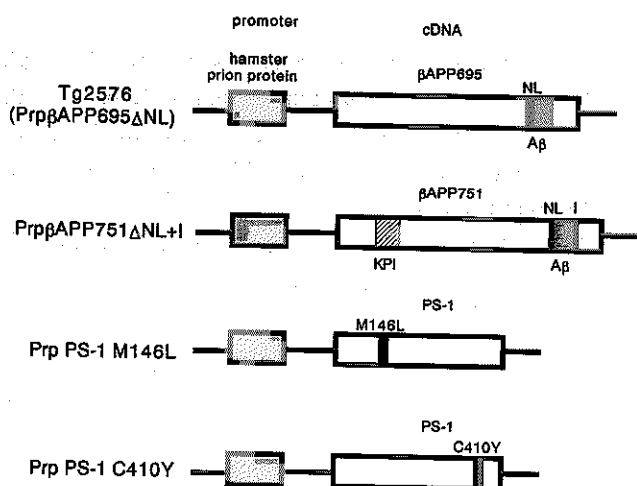


図1. トランスジェニックマウス作製に用いたtransgene construct

マウスの大脳皮質では典型的老人斑とびまん性老人斑がAb9204とS42で染色された(図2.A)。S40は老人斑のアミロイドコアのみを染色した。皮質内血管壁にはamyloid angiopathyの所見も認められた(図2.B)。βAPPのC末端抗体Saekoでは神経細胞の胞体が染色され、蛋白発現は良好であった。老人斑周囲のdystrophic neuriteも染色された。このdystrophic neuriteは抗Tau抗体でも染色された。

以上のことから、このマウスではAD脳で見られるびまん性老人斑、典型的老人斑、amyloid angiopathyが再現され、dystrophic neuritesにβAPP、Tauの蓄積が認められた。しかし、大型錐体細胞における神経原線維変化は認められなかった。

2) PrpβAPP751DNL+Iマウスでは、F0の21匹中18匹がTgであった。Western blotによる蛋白発現の検討では、対照と比べて11.8~8.7kDのCTFの有意の増加がみられた。血漿中Aβ40は14pmols/ml、Aβ42は5pmols/mlで、ともに有意の上昇がみられ、特にAβ42の増加が顕著であった。脳内では、Aβ40は16pmols/g brain、Aβ42は8pmols/g brainで、対照と比較して増加していた。免疫細胞化学的検討ではβAPPのC末端抗体では神経細胞胞体が染色され、発現が確認された。S42に

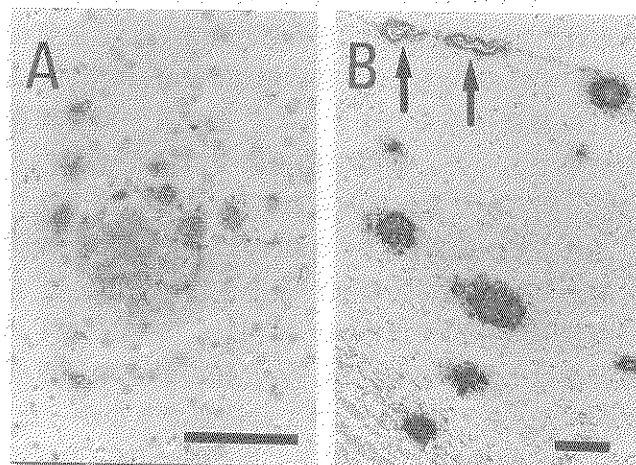


図2. Tg2576の免疫細胞化学

- A. S42染色。びまん性老人斑、典型的老人斑様のAβ沈着を認める。  
 B. S40染色。典型的老人斑のコアのみならずamyloid angiopathy(矢印)も染色されている。  
 Bar=100 μm

よる染色では軟膜下と脳幹の実質内に老人斑様のAβ沈着を認めた。神経原線維変化、神経細胞の消失などはみられなかった。

以上の結果は、変異βAPPの過剰発現はマウスの脳と血液中のAβを上昇させ、脳にAβの蓄積を引き起こすことを示している。しかしながら、PrpβAPP751DNL+Iマウスでは、717にIsoleucineの変異を導入した結果、Aβ42の割合が増加したが、βAPPの発現量が十分でなかったためにAβ産生効率はTg2576の1/2から1/3であったと考えられた。Sturchler-PierratらはThy-1 promoterにβAPP751DNLあるいはβAPP751DNL+IのcDNAを繋ぎ二種類のTgを作製し報告している<sup>9)</sup>。彼らのβAPP751DNLマウスではβAPPの発現は対照の7倍であり、6ヶ月後にAβ沈着を認めている。一方、彼らのβAPP751DNL+IマウスではβAPPの発現は2倍で、Aβ沈着には18ヶ月を要している。したがって、Aβ沈着開始時期は発現量の程度に依存すると考えられ、今回我々の作製したPrpβAPP751DNL+Iマウスでも18ヶ月以上経過すればAβ沈着はより顕著になると期待している。

3) PrpPS-1M146L、PrpPS-1C410Yマウスでは、PCR-southern blotによる検討から、それぞれF0 27匹中18匹、19匹中12匹がTgであった。Western

blotでは24kDのN末断片(NTF)と16kDのCTFが認められたが, full PS-1は認められなかった。血漿中ではいずれのTgも, A $\beta$ 40の増加がみられたが, A $\beta$ 42に著変はみられなかった。脳内A $\beta$ 量も同様の結果であった。病理学的検索では現在までのところ, 明らかな変化はみられていない。

これまで, 変異PS-1マウスでは, 脳内A $\beta$ 42の絶対的あるいは相対的増加が報告されている<sup>10-13)</sup>。今回の我々の検討ではPS-1のNTF, CTFの1アミノ酸置換はともに血漿・脳内A $\beta$ 40の量を増加させたが, A $\beta$ 42の増加については確認できなかった。これは $\beta$ APPの遺伝子変異に比べるとPS-1遺伝子変異によるA $\beta$ 42の増加率は軽度であり, その変化を我々のELISA系では完全にはとらえることができなかつたと思われ, 今後の検討が必要であると思われた。

## 結 論

家族性ADの原因遺伝子変異はA $\beta$ の増加を引き起こして脳A $\beta$ アミロイドーシスを発症させると考えられる。今後, これらのモデルマウスで再現されたA $\beta$ アミロイドーシスを阻止する治療薬の開発が望まれる。

## 文 献

- 1) Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, et al. Correlative memory deficits, A $\beta$  elevation, amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 1996;274:99-102.
- 2) Scheuner D, Eckman C, Jensen M, et al. Secreted amyloid  $\beta$ -protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nature Med* 1996;2: 864-870.
- 3) Kanai M, Matsubara E, Isoe K, et al. Longitudinal study of cerebrospinal fluid levels of Tau, A $\beta$ 1-40, and A $\beta$ 1-42(43) in Alzheimer's disease: A study in Japan. *Ann Neurology* 1998;44:17-26.
- 4) Kawarabayashi T, Shoji M, Sato M, et al. Accumulation of  $\beta$  amyloid fibrils in pancreas of transgenic mice. *Neurobiology Aging* 1996;17: 215-222.
- 5) Saido TC, Iwatsubo T, Mann DMA, et al. Dominant and differential deposition of distinct  $\beta$ -amyloid peptide species, A $\beta$ N3(pE), in senile plaques. *Neuron* 1995;14:457-466.
- 6) Harigaya Y, Shoji M, Kawarabayashi T, et al. Modified amyloid  $\beta$  protein ending at 42 or 40 with different solubility accumulates in the brain of Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;211:1015-1022.
- 7) Iizuka T, Shoji M, Harigaya Y, et al. Amyloid  $\beta$ -protein ending at Thr43 is a minor component of some diffuse plaques in the Alzheimer's disease brain, but is not found in cerebrovascular amyloid. *Brain Res* 1995;702:275-278.
- 8) Tomidokoro Y, Ishiguro K, Igeta Y, et al. Carboxyl-terminal fragments of presenilin-1 are closely related to cytoskeletal abnormalities in Alzheimer's brains. *Biochem Biophys Res Commun* (in press).
- 9) Sturchler-Pierrat C, Abramowski D, Duke M, et al. Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proc Natl acad sci USA* 1997;94:13287-13292.
- 10) Duff K, Eckman C, Zehr C, et al. Increased amyloid- $\beta$ 42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature* 1996;383: 710-713.
- 11) Thinakaran G, Borchelt DB, Lee MK, et al. Endoproteolysis of presenilin 1 and accumulation of processed derivatives in vivo. *Neuron* 1996;17:181-190.
- 12) Borchelt DR, Thinakaran G, Eckman CB, et al. Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate A $\beta$ 1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron* 1996;17:1005-1013.
- 13) Citron M, Westaway D, Xia W, et al. Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase the production of 42-residue amyloid  $\beta$ -protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nature Med* 1997;3: 67-72.



Study of mechanism of amyloid  $\beta$  protein amyloidosis  
-Analysis of transgenic mice overexpressing genes cause familial Alzheimer's disease.

by

Mikio SHOJI\*

Yasuo HARIGAYA\*, Mitsuyasu KANAI\*, Etsuro MATSUBARA\*, Takeshi KAWARABAYASHI\*,  
Masaki IKEDA\*, Koichi OKAMOTO\*, Shunsaku HIRAI\*\*

from

\*Department of Neurology, Gunma University School of Medicine

\*\*Tokyo Metropolitan Neurological Hospital

To examine the mechanism of amyloid  $\beta$  protein (A $\beta$ ) amyloidosis in brains with Alzheimer's disease (AD), we developed three transgenic mice (Tg) expressing human  $\beta$  APP751 with the KM670/671N and the V717I mutations (Prp  $\beta$  APP751  $\Delta$ NL+I), human presenilin-1 with the M146L or C410Y mutation (PrpPS-1 M146L, PrpPS-1 C410Y) under hamster prion protein promoter. We also examined the Tg2576 (K Hsiao et al. Science 1996) expressing human  $\beta$  APP695 $\Delta$ NL under the same promoter.

In the brain of Tg2576, expression of 11.4 kD carboxyl-terminal fragment (CTF) of  $\beta$  APP was increased. The concentrations of A $\beta$  40 and A $\beta$  42 in plasma were 26 and 4 pmols/ml, respectively. The levels of A $\beta$  40 and A $\beta$  42 in the brain were 26 and 13-pmols/g brain, respectively and remarkably increased with the evolution of A $\beta$  amyloidosis. Diffuse, typical plaques and amyloid angiopathy were immunostained with several site-specific antibodies against A $\beta$ . Accumulation of Tau as well as  $\beta$  APP were observed in dystrophic neurites surrounding plaques.

In Prp  $\beta$  APP751  $\Delta$ NL+I, plasma concentrations of A $\beta$  40 and A $\beta$  42 were 14 and 5 pmols/ml, respectively. The levels of A $\beta$  40 and A $\beta$  42 in the brain were 16 and 8-pmols/g brain, respectively. In subpial space and parenchyma of brain stem, tiny A $\beta$  deposits were observed.

In brains of both PrpPS-1 M146L and PrpPS-1 C410Y, amino-terminal fragment (24kD) and CTF(16kD) of PS-1, but not full-PS-1 were recognized by Western blot. The levels of A $\beta$  40 in plasma as well as brain were increased. No neuropathological changes were found.

These findings suggest that mutant genes of familial AD cause increase in concentration of A $\beta$ , consequently develop A $\beta$  amyloidosis. These mice are useful for examining the mechanism of AD pathology, and developing drugs, which inhibit evolution of A $\beta$  amyloidosis.

## アルツハイマー病の診断および治療法の研究 - 2つの大規模多施設共同研究結果の解析 -

研究者 東海林 幹 夫\* 金 井 光 康\* 松 原 悦 郎\*  
針 谷 康 夫\* 岡 本 幸 市\* 平 井 俊 策\*\*

### はじめに

アルツハイマー病 (AD) の発症機序として、initial event としてのA $\beta$ 脳アミロイドーシスとsecondary eventとしての神経原線維変化の出現 (tauopathy) の重要性が明らかになりつつある。A $\beta$ 42の生成亢進から脳アミロイド形成にいたる機序は家族性ADにおける遺伝子変異やモデル動物を用いた研究によって次第に明らかにされつつある。しかし、臨床では現在ほぼ70万人のAD患者が現実存在し、その根本的な治療の確立が望まれている。この治療の開発を最終的な目標と考えた場合、確実に診断し、開発されつつある治療法を客観的に評価できる生物学的マーカーの開発が必要である<sup>1)</sup>。われわれはこのためにA $\beta$ 40, 42, tau というAD脳に特徴的な蓄積物質を脳脊髄液で同定し、定量することにより、臨床的に有用なADの生物学的マーカーとなりうることを示してきた<sup>2)</sup>。昨年の本研究班で報告した結果は1998年、夏にJapan groupの大規模多施設追跡調査結果として発表された(Gunma-Tottori-Tohoku study Japan 1: GTT1)。これは東北大学、鳥取大学および群馬大学関連施設の協力によるもので、93例のAD、54例の正常対象、33例のnon-Alzheimer type dementia、56例の神経疾患の合計236例がエントリーし、Tau

とA $\beta$ 40とA $\beta$ 42の比を掛け合わせるという簡単なindexで71%、80%の診断感度と診断特異性が得られ、さらにfollow upすると診断感度91%にまで改善するため、現実の臨床応用が可能であることが示された<sup>3)</sup>。この結果は今年の夏にアメリカのRegan instituteによる専門家会議が提唱したADのマーカーの厳密な基準である80~90%の診断感度・特異性と多施設共同追跡調査の必要性を世界で初めて満たしており、GTT1は国際的にも重要な成果と考えられる<sup>4)</sup>。

本研究ではさらに我々のマーカーの世界的な使用を目指して、さらに多くのどここのどの検体でも同様な結果が出ることを明らかにするため新たに多施設から得られた92検体を追加して検討し、この結果をGunma-Tottori-Tohoku study Japan 2: GTT2として明らかにした。さらに現在Tauopathyとしてまとめられつつある神経原線維変化を有し、tauの蓄積する疾患でCSFtauが上昇するかどうか明らかにして、ADの診断マーカーとしてのCSFtauの意義について再検討した<sup>5,10)</sup>。

### 対象と方法

群馬大学病院、鳥取大学病院、東北大学病院、大阪大学病院および関連施設から同一の診断基準で集められた328例 (AD116例、正常対照71例、non-AD type dementia48例、痴呆のない神経疾患93例) A $\beta$ 1-40/42(43)とTauを測定した。この内、

\*群馬大学医学部神経内科

\*\*都立神経病院

Table 1. Subject of GTT2 and GTTO

	GTT2			GTTO		
	number	gender(M/F)	age(range)	number	gender(M/F)	age(range)
Alzheimer's disease	116	43/73	70(40-92)	281	92/189	71(40-92)
Normal control	71	36/35	53(13-89)	107	51/56	55(13-89)
non-Alzheimer type dementia	48	27/21	67(46-84)	121	70/51	66(28-90)
Other Neurological disease	93	53/40	51(13-81)	195	111/84	55(13-87)
Total	328	159/169	62(13-92)	704	324/380	63(13-92)

Table 2. Diagnostic sensitivity and specificity of GTT2

Markers	Cut off value	sensitivity (%)	specificity (%)
tau	464pg/ml (474)	50(40)	81(86)
A $\beta$ ratio (A $\beta$ 1-40/A $\beta$ 1-42(43))	13.1(13.3)	56(56)	75(73)
tau and A $\beta$ ratio	464pg/ml, 13.1	77(70)	72(72)
AD index (tau x A $\beta$ ratio)	3367(3483)	78(71)	80(83)
Follow-up AD index (35 AD cases)	3367(3483)	93(91)	80(83)

35例では経時的な変化についても検討し、診断感度と特異性を統計学的に検討した(表1: GTT2)。さらに、704例(AD281例, 正常対照107例, non-AD type dementia121例, 痴呆のない神経疾患195例)の脳脊髄液でTauのみを検討し、ADおよびTauopathyにおける脳脊髄液Tauの変化を検討した(表1: GTTO)。脳脊髄液A $\beta$ 1-40/42(43)はSuzukiらの高感度ELISAで測定し、CSF tauはInnogenetics社製測定キットを用いて測定した。

### 結果および考察

脳脊髄液A $\beta$ 1-40とA $\beta$ 1-42(43)は若年者で上昇、20歳から59歳までは低い値で、60歳から再度上昇を示した。A $\beta$ 1-40とA $\beta$ 1-42(43)は加齢によってU字型の生理的変動パターンを示すものと思われた。A $\beta$ 1-40とA $\beta$ 1-42(43)のどの年齢でも一定であり、正常者ではA $\beta$ 1-40とA $\beta$ 1-42(43)の生成とクリアランスが厳密に制御されていることが示唆された。脳脊髄液Tauは若年での上昇はなく加齢とともに直線的な上昇が認められた。ADでは老年期のA $\beta$ 1-42(43)の再上昇が抑制されており、A $\beta$ 1-40とA $\beta$ 1-42(43)の厳密に制御された比率に障害がみられた。ADではA $\beta$ 1-42(43)の加齢に伴う上昇が抑制されており、A $\beta$ 1-40/42の生成代謝の一定の割合が破壊され、CSF tauでは生理的な加齢に伴う増加をはるかに超えて上昇していた。このようにAD

ではCSF A $\beta$ とtauが加齢に伴う生理的変動から逸脱していることが、これらの脳脊髄液のマーカーがADの診断マーカーとして有用である生物学的根拠と思われた。A $\beta$ 1-42(43)がなぜ低下するかは、今後、解明すべき点と考えられるが、可能性のある仮説としては、A $\beta$ 1-42(43)のAD脳からのくみ出し障害、あるいはA $\beta$ 1-42(43)が難溶性のオリゴマーを形成して測定不能になるなどの機序が考えられる。

脳脊髄液tauはAD群で $531 \pm 26.6$ pg/ml, 正常対照群で $217 \pm 18.1$ pg/ml, 非AD型痴呆群で $330 \pm 33.3$ pg/ml, 痴呆のない神経疾患群で $214 \pm 14.0$ pg/mlであった。脳脊髄液A $\beta$ 1-40はAD群で $1790 \pm 99.5$ fmol/ml, 正常対照群で $1474 \pm 140$ fmol/ml, 非AD型痴呆群で $1994 \pm 189$ fmol/ml, 痴呆のない神経疾患群で $1448 \pm 89.4$ fmol/mlであった。脳脊髄液A $\beta$ 1-42はAD群で $139 \pm 10$ fmol/ml, 正常対照群で $271 \pm 30.2$ fmol/ml, 非AD型痴呆群で $302 \pm 34.4$ fmol/ml, 痴呆のない神経疾患群で $291 \pm 21.4$ fmol/mlであった(図1)。統計処理を行うとAD群でtauの上昇, A $\beta$ 1-40とA $\beta$ 1-42(43)の比A $\beta$  ratioの増加, 我々が設定した診断指標であるAD index (Tau $\times$ A $\beta$ 1-40 $\times$ A $\beta$ 1-42(43))の上昇が有意であった( $p < 0.001$ )。カットオフ値を正常対照の平均 $\pm 2$ SDとすると、最も高い診断感度と特異性はAD indexで得られ、診断感度は78%, 特異性は

80%であった。さらに、19ヶ月の追跡調査結果を同様に検討すると、診断感度は78%から93%へと改善した。脳脊髄液tauは臨床症状 (MMS, FAST) と相関し、 $A\beta$  1-42(43)は早期から低下していた。これらのGTT2 studyで得られたカットオフ値とそれぞれの診断感度と特異性を表2にまとめた。括弧内に示したGTT1 studyの結果と比較するとカットオフ値、診断感度と特異性ともにGTT1 studyと同様な結果が得られた。当初予想されたごとく、数を増やしてもほぼ同様の有用性が得られた。このことは今後これらの測定を広く臨床応用したり、世界的に普及する場合に大きな利点と考えられた。

次にGTTO studyでは704例 (AD281例, 正常対照107例, non-AD type dementia121例, 痴呆のない神経疾患195例) の脳脊髄液Tauが検討された。脳脊髄液tauはAD群で $473 \pm 15.9$ pg/ml, 正常対照群で $190 \pm 11$ pg/ml, 非AD型痴呆群で $261 \pm 15.7$  pg/ml, 痴呆のない神経疾患群で $225 \pm 15.5$ pg/mlで

あった。Tau単独での診断感度は53%, 特異性は80%であり, GTT2で得られた値と同様であった。非AD型痴呆群ではTauopathyに含まれる frontotemporal dementia, corticobasal degeneration, diffuse neurofibrillary tangle with calcification, progressive supranuclear palsyで正常対照の平均 $\pm 2$ SDで設定したカットオフ値を超えなかった。Creutzfeldt-Jacob disease, ALS dementia, Diffuse Lewy body diseaseなどでも同様な結果が得られた。痴呆のない神経疾患で大脳疾患, 基底核疾患, 小脳疾患, 脊髄疾患, 末梢神経・筋疾患の障害部位ごとに検討すると, いずれもカットオフ値中に入り, 時に増加を示すのはいずれも大脳の疾患であった。このことからTauopathyでは正常対照の平均 $\pm 2$ SDをこえるtauの増加はみられなかった。したがって, GTT2で得られたADの診断感度や特異性などは変更なく使用可能であり, GTT2の結果をこれらの疾患の鑑別

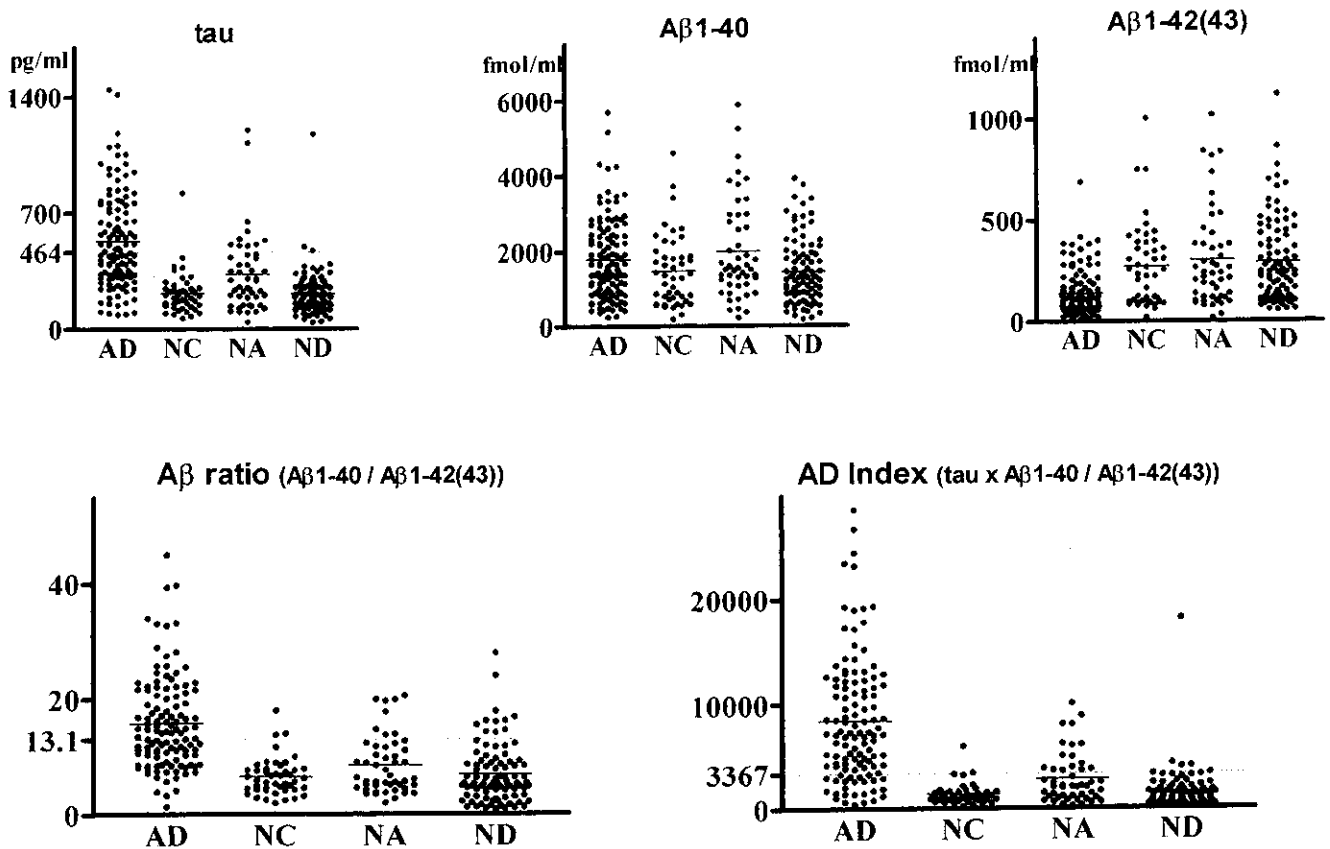


図1. Gunma-Tottori-Tohoku study in Japan2 (GTT2)

AD:Alzheimer's disease; NC:normal controls; nAD:non-Alzheimer type dementia; ND:Neurological disease. 464pg/ml(tau) カットオフ値。13.1(A $\beta$  ratio)および3367(AD index)はカットオフ値。