

---

平成 11 年度  
厚生省厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

---

老化とヒトアミロイドーシス：加齢依存性の分子機構解明  
(H11-長寿-019)

研究報告書

主任研究者 柳澤 勝彦

総括研究報告書

老化とヒトアミロイドーシス：加齢依存性の分子機構解明

主任研究者 柳澤勝彦 国立療養所中部病院・長寿医療研究センター 痴呆疾患研究部部長

研究要旨 老化に関連したアミロイドーシス（アルツハイマー病、透析アミロイドーシス、全身性 AL アミロイドーシス）に共通する分子機構を探ることから、本疾患群の病態生理を理解することを目的に研究を開始した。本年度の研究において、アルツハイマー病に関してはアミロイド $\beta$ 蛋白の凝集および線維化の分子過程について試験管内での検討を行い、透析アミロイドーシスおよび全身性 AL アミロイドーシスに関しては、アミロイド原性蛋白の調整を行うとともに、蛋白修飾およびシャペロン分子の役割等の視点から反応速度論的検討を加えた。

分担研究者

|      |                      |
|------|----------------------|
| 下条文武 | 新潟大学医学部<br>内科学第二講座   |
| 内木宏延 | 福井医科大学<br>医学部病理学第二講座 |

B. 研究方法

アルツハイマー病（AD）アミロイドーシス、透析アミロイドーシスおよび全身性 AL アミロイドーシスを対象に、これらのアミロイドーシスに共通するアミロイド線維形成の分子機構を解明するため、初年度は以下の方法により各アミロイドーシスにおけるアミロイド形成機構を検討した。（1）アミロイド原性蛋白の重合過程を試験管内で反応速度論的に評価する解析系を構築する。（2）A $\beta$ 凝集開始に関わると考えられる seeding A $\beta$ の産生機構を細胞内コレステロール代謝動態から検討する。また、A $\beta$ の重合、アミロイド線維形成機構を A $\beta$ の分子種別に反応速度論的に検討する。（3）透析アミロイド沈着軟部組織および関節周囲軟部組織より $\beta$ 2-ミクログロブリン（ $\beta$ 2-m）を精製し、その蛋白修飾を生化学的に検討するとともに、これらの蛋白修飾のアミロイド線維形成における意義を明らかにする。

A. 研究目的

我が国をはじめとした先進諸国においては急速に人口の高齢化が進み、その結果、様々な社会的課題が生じている。医学・医療面では老年人口の増加に伴い高齢者特有の疾患に対する予防法ならびに治療法の早急な確立が求められている。本研究は老化関連疾患の中からアミロイドーシス（アルツハイマー病、透析アミロイドーシスおよび全身性 AL アミロイドーシス）に焦点を当て、その発症機構を、これらのアミロイドーシスに共通する分子機構を探ることによって解明し、疾患克服に有用な基礎的情報を提供することを目的とする。

## C. 研究結果

### AD アミロイドーシス

Seeding A $\beta$ の産生が、細胞内においてコレステロールを多く含む特異な膜ドメイン (DIG) を構成する脂質分子 (コレステロールおよび GM1 ガングリオシド) の存在に依存することから、A $\beta$  前駆体蛋白 (APP) の DIG における局在について生化学的な検討を加えた。ヒト APP 遺伝子を導入した上皮細胞 (MDCK 細胞)、P19 細胞、およびラット 大脳皮質を対象にシヨ糖密度勾遠心分離法等により細胞画分を行った。MDCK 細胞において APP は Triton X-100 可溶性画分に回収され、Triton X-100 不溶性画分における免疫反応性は極めて弱かった。一方、神経系の培養細胞である P19 細胞およびラット 大脳皮質における検討では、APP の大部分は MDCK 細胞同様 Triton X-100 可溶性画分に回収されたが、一部は Triton X-100 不溶性画分に回収された。この神経系 (細胞および組織) における Triton X-100 不溶性画分 APP の局在を、免疫生化学的にさらに検討することを目的にシヨ糖密度勾遠心分離法によって APP が回収される画分の特性解析を行った。その結果、この画分に回収される膜成分は従来報告されている細胞膜および DIG とは異なる特異な脂質組成を示すことが明らかになった。

AD アミロイド線維の試験管内形成反応における A $\beta$ 1-42 と A $\beta$  1-40 の相互作用の検討においては、試験管内アミロイド線維の形成反応を説明するモデルとして、核形成過程と線維伸長過程から構成される重合核依存性重合モデルを用い速度論的に解析した。その結果、(1) 電子顕微鏡による形態観察で、A $\beta$ 1-42 型線維 (fA $\beta$  (1-42)) と A $\beta$  1-40 型線維 (fA $\beta$  (1-40)) は異なった

形態を示した。(2) A $\beta$ 1-42 と A $\beta$  1-40 が共存する場合、線維形成反応では互いに抑制的に作用し、反応を遅らせた。(3) 同種の核とモノマーによる伸長反応では、タイムコースはラグタイムのない双曲線を描き、迅速に進行した。(4) fA $\beta$  (1-42) と自らアミロイド線維を形成できない A $\beta$  1-40 モノマーによる異種の伸長反応の場合、反応速度は同種の場合に比較して遅くシグモイド曲線を描いた。この時、fA $\beta$  (1-40) が形成された。(5) A $\beta$ 1-42 と自らアミロイド線維を形成できない A $\beta$ 1-40 の混合溶液中では、A $\beta$ 1-42 が A $\beta$ 1-40 の抑制的相互作用に打ち勝って核形成を行い、これに A $\beta$ 1-40 が重合して形成された。

### 透析アミロイドーシス

$\beta$ 2-ミクログロブリン ( $\beta$ 2-m) の線維化したアミロイド線維 (fA $\beta$ 2-m) における  $\beta$ 2-m の蛋白修飾の検討を行う為、fA $\beta$ 2-m polymerization model を使って fA $\beta$ 2-m extension に対する AGEs modified  $\beta$ 2-m の効果を調べ、以下の結果を得た。1) AGEs modified  $\beta$ 2-m によるの fA  $\beta$ 2-m extension は pH2.5 で最大を示した。2) AGEs modified  $\beta$ 2-m を用いたの fA $\beta$ 2-m extension time course は native  $\beta$ 2-m より早くプラトーとなり、ThT の蛍光量増加も僅かであった。3) fA $\beta$ 2-m polymerization model へ高濃度から低濃度までの AGEs modified  $\beta$ 2-m を反応させたところ fA $\beta$ 2-m extension に対する阻害反応が認められた。

### 全身性 AL アミロイドーシス

3 例の全身性 AL アミロイドーシス剖検例よりアミロイド線維 (fAL) を精製し、蛍光色素チオフラビン T (ThT) を用いたアミロイド線維定量の至適条件を確立した。3 種のアミロイド線維間で、

ThT の至適励起・蛍光波長、及び ThT との親和性に違いが認められた。それぞれのアミロイド線維を 6M 尿素にて可溶化後、アミロイド線維を構成する AL 蛋白を精製し、fAL と AL 蛋白を 37°C で反応させることにより、fAL の伸長を、ThT 法および電子顕微鏡による形態観察によりモニターした。その結果、(1) いずれの症例においても、fAL の伸長は一次反応速度論モデル、すなわち既に存在する線維断端に前駆蛋白である AL 蛋白が、コンフォメーションを変化させながら次々に結合することにより起こるというモデルで説明できることを証明した。(2) 伸長の至適 pH は 2.5~3.5 と著しい酸性域にあった。上記透析アミロイド線維 (fAβ2M) 伸長の至適 pH も著しい酸性域(pH 2.5)にあり、免疫グロブリンスーパーファミリーに属するアミロイド前駆蛋白に共通する現象として興味深い。(3) 予備的 CD スペクトル分析により、β2-m は、線維伸長の起こらない pH 7.5 ではβシートから成るコンパクトなコンフォメーションをとっているが、伸長速度が最大となる pH 2.5 では比較的ランダムなコンフォメーションをとっていることが明らかになった。

#### D. 考察

Aβの凝集開始の分子過程に Aβ以外の分子が深く関わり、Aβの構造変化ならびに可溶性 Aβ凝集促進作用 (seeding 活性) が生じていることが初めて明らかになった。アルツハイマー病以外のアミロイドーシスにおいても、それらの疾患におけるアミロイド原性蛋白が存在する組織内あるいは細胞内の環境が、これらの蛋白の構造変化に重要な役割を担っているものと考えられる。また、透析アミロイドーシスに関しては、アミロイド蛋

白の代表的分子修飾である AGE 化の意義について検討を加え、透析アミロイドーシスにおいて蓄積するβ2-m を精製し、試験管内で重合過程を議論した結果、AGE 化のアミロイド線維形成後に生じた二次的現象であることを示唆する結果が得られた。このように、本研究において確立したアミロイド原性蛋白の試験管内における polymerization model は、アミロイドーシスの剖検組織より精製したアミロイド原性蛋白にみられる様々な分子修飾の意義を分子レベルで検討する上で、極めて強力な武器となるものと考えられた。

#### E. 結論

老化関連アミロイドーシスの中から、アルツハイマー病、透析アミロイドーシス、および全身性 AL アミロイドーシスに焦点をあて、これらのアミロイドーシス成立に共通する分子機構として、アミロイド原性蛋白の構造変化、蛋白修飾等の役割を議論した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Michikawa M and Yanagisawa K. Apolipoprotein E4 isoform-specific actions on neuronal cells in culture. Mechanisms of Ageing and Development 107:233-243,1999.

Komano H, Sudoh S, Kawamura Y, Wang R and Yanagisawa K. Implications of *presenilin 1* mutations in Alzheimer's disease. Mechanisms of Ageing and Development 107:281-298,1999.

Mizuno T, Nakata M, Naiki H, Michikawa M, Wang R, Haass C and Yanagisawa K. Cholesterol-dependent generation of a seeding amyloid β-protein in cell culture. J. Biol. Chem. 274:15110-15114,1999.

Michikawa M and Yanagisawa K.  
Inhibition of cholesterol production, and not of nonsterol isoprenoid products induces neuronal cell death. *J. Neurochem.* 72:2278-2285,1999.

Isobe I, Michikawa M and Yanagisawa K.  
Enhancement of MTT, a tetrazolium salt, exocytosis by amyloid  $\beta$ -protein and chloroquine.  
*Neurosci. Lett.* 266:129-132,1999.

Kawamura Y, Fan Q-W, Hayashi H, Michikawa M, Yanagisawa K and Komano H. Expression of the mRNA for two isoforms of neural plakophilin-related arm-repeat protein/ $\delta$ -catenin in rodent neurons and glial cells. *Neurosci. Lett.* 277: 185 -188,1999.

Imura T, Kimura H and Gejyo F.  
Apolipoprotein E phenotypes in hemodialysis patients. *Kidney International* 56 (supple) : 245-247, 1999.

Odani S, Komori Y and Gejyo F.  
Structural analysis of the amyloidogenic  $\kappa$  Bence Jones protein (FUR). *Amyloid* 6:77-88, 1999.

Hasegawa K, Yamaguchi I, Omata S, Gejyo F and Naiki H. Interaction of A $\beta$ (1-42) and A $\beta$ (1-40) in Alzheimer's  $\beta$ -Amyloid fibril formation. *Biochemistry* 38:15514-15521,1999.

Hashimoto N, Naiki H and Gejyo F.  
Modification of  $\beta$ 2-microglobulin with D-glucose or 3-deoxyglucosone inhibits A $\beta$  2M amyloid fibril extension in vitro. *Amyloid* 6:256-264,1999.

Hayashi H, Mizuno T, Michikawa M, Haass C and Yanagisawa K.  
Amyloid precursor protein in unique cholesterol-rich microdomains different from caveolae-like domains. *Biochim. Biophys. Acta* 1483:81-90,2000.

Michikawa M, Fan Q-W, Isobe I and Yanagisawa K.  
Apolipoprotein E exhibits isoform-specific promotion of lipid efflux from astrocytes and neurons in culture. *J. Neurochem.* 74:1008-1016, 2000.

Sudoh S, Hua G, Kawamura Y, Maruyama Y, Komano H and Yanagisawa K. Intracellular site of  $\gamma$ -secretase cleavage for A $\beta$ 42 generation in Neuro 2a(N2a) cells harboring *presenilin 1* mutation. *Eur. J. Biochem.* (in press)

Isobe I, Yanagisawa K and Michikawa M.  
A possible model of senile plaques using synthetic

amyloid  $\beta$ -protein and rat glial.  
*Exp. Neurol.* (in press)

Fukuyama R, Mizuno T, Mori S, Yanagisawa K, Nakajima K and Fushiki S.  
Age-dependent decline in the apolipoprotein E level in cerebrospinal fluid from control subject, and its increase in cerebrospinal fluid from patients with Alzheimer's disease. *Eur. Neurol.* (in press)

Gejyo F.  
 $\beta$ 2-Microglobulin amyloid. *Amyloid* (in press)

## 2. 学会発表

柳澤勝彦  
Molecular mechanism underlying initiation of amyloid fibril formation.  
International Symposium on Dementia from Molecular Biology to Therapeutics  
1999年9月11日 神戸

柳澤勝彦  
Cholesterol-dependent generation of seeding amyloid  $\beta$ -protein in cell culture.  
第42回日本神経化学会 合同公開シンポジウム  
アルツハイマー病をどう治すか  
ー神経化学からのアプローチー  
1999年9月15日 広島

道川 誠、范 企文、磯部一郎、柳澤勝彦  
アポリポ蛋白 E のアイソフォーム特異的作用の検討:培養神経細胞及びアストロサイトにおけるコレステロール efflux に及ぼす影響 第42回日本神経化学会 1999年9月15-17日 広島

磯部一郎、柳澤勝彦、道川 誠  
合成 amyloid  $\beta$ -蛋白を用いたラットグリア細胞培養系における老人斑モデル  
第42回日本神経化学会 1999年9月15-17日 広島

川村勇樹、范 企文、林 秀樹、道川 誠、柳澤勝彦、駒野宏人  
中枢神経系細胞における2種の NPRAP/ $\delta$ -catenin アイソフォームの発現解析  
第42回日本神経化学会 1999年9月15-17日 広島

林 秀樹、水野哲也、道川 誠、柳澤勝彦  
カベオラとは異なるコレステロール高含有ドメインにおけるアミロイド前駆体蛋白  
第42回日本神経化学会 1999年9月15-17日 広島

島

柳澤勝彦

Seeding amyloid  $\beta$ -protein :そのコレステロール依存性と病的意義について

第 18 回日本痴呆学会 シンポジウム アルツハイマー病の分子機構 1999年10月6-8日 熊本

川村勇樹、范企文、林秀樹、道川誠、柳澤勝彦、駒野宏人 神経細胞およびグリア細胞における NPRAP/ $\delta$ -catenin mRNA の発現 第 72 回 日本生化学会 1999年10月8日 横浜

華 剛、須藤慎治、川村勇樹、柳澤勝彦、駒野宏人 プレセニリン1 ミスセンス変異によって促進される $\gamma$ -セクレターゼ活性の細胞内存在部位について 第 72 回 日本生化学会 1999年10月9日 横浜

柳澤勝彦

アルツハイマー病の病態 -アミロイド $\beta$ 蛋白を中心に-

第 115 回日本医学会シンポジウム 1999年12月2日 東京

Hua G, Sudoh S, Kawamura Y, Yanagisawa K and Komano H.

Intracellular site of A $\beta$ 42- $\gamma$ -secretase cleavage enhanced by presenilin1 mutation. 29th Society for Neuroscience Annual Meeting, October 23-28, 1999, Miami Beach, USA.

Kawamura Y, Fan Q-W, Hayashi H, Michikawa M, Yanagisawa K and Komano H. Expression of the gene for  $\delta$ -catenin/NPRAP in neurons and glial cells.

29th Society for Neuroscience Annual Meeting, October 23-28, 1999, Miami Beach, USA.

Fan Q-W, Isobe I, Asou H, Yanagisawa K and Michikawa M.

Expression and regulation of apolipoprotein E receptors in the central nervous system cells in culture. 29th Society for Neuroscience Annual Meeting, October 23-28, 1999, Miami Beach, USA.

Michikawa M, Fan Q-W and Yanagisawa K.

Apolipoprotein E-mediated lipid efflux from neurons and astrocytes is isoform-specific.

29th Society for Neuroscience Annual Meeting, October 23-28, 1999, Miami Beach, USA.

Isobe I, Michikawa M and Yanagisawa K.

Enhancement of MTT exocytosis by amyloid  $\beta$ -

protein and chloroquine in rat glial cells.

29th Society for Neuroscience Annual Meeting, October 23-28, 1999, Miami Beach, USA.

Hayashi H, Mizuno T, Michikawa M, Haass C and Yanagisawa K.

Diversity of the localization of amyloid precursor protein in detergent-insoluble glycopingolipid-rich microdomains. 29th Society for Neuroscience Annual Meeting, October 23-28, 1999, Miami Beach, USA.

分担研究報告書

βアミロイド線維形成に関する細胞生物学的研究

主任研究者 柳澤勝彦 国立療養所中部病院・長寿医療研究センター・痴呆疾患研究部部長

研究要旨 アルツハイマー病（AD）におけるアミロイドβ（Aβ）の凝集過程を、我々が最近見出した特異な Aβ（seeding Aβ）の産生機構から検討した。Seeding Aβの産生にはコレステロールに富む膜ドメイン（DIG）が深く関与することが示唆されているにもかかわらず、Aβの前駆体 APP は DIG には存在しないことが種々の培養細胞ならびにラット大脳皮質を対象に検討した本研究の結果明らかとなった。脳内においては Aβの産生、輸送、ないしは膜ドメインの脂質組成の何等かの異常により、産生後 DIG に運ばれた Aβが病的な特性を獲得することが示唆された。

A. 研究目的

我々は先に可溶性 Aβの凝集ならびにアミロイド線維化を促進する作用をもつ Aβ（seeding Aβ）の産生が細胞内コレステロールに依存して産生され、上皮細胞においては頂端部方向に極性分泌されることを明らかにした。本研究は、Aβの凝集の分子機構を、Aβと細胞内コレステロールとの分子相関、特に細胞内においてコレステロールを多く含有する特異な膜ドメイン（DIG）における Aβの前駆体（APP）の局在を検討することから解明することを目的とする。

B. 研究方法

ヒト APP 遺伝子を導入したイヌ腎尿細管由来の上皮細胞（MDCK 細胞）、マウス奇形芽細胞種（P19 細胞）およびラット大脳皮質を対象にシヨ糖密度勾配遠分画法による細胞画分画を行った。P19 細胞に関してはレチノイン酸を投与し、

神経細胞へ分化させ、神経細胞と非神経細胞との比較を行った。P19 細胞の神経細胞への分化に関しては、アセチルコリンエステラーゼの測定を行うとともに、神経突起の極性分化を、樹状突起ならびに軸索をそれぞれ、MAP2、tau に対する抗体を用いて免疫細胞化学的に評価した。DIG の分離調整には界面活性剤である Triton X-100 を用いた。また得られた画分の評価にあたっては、細胞膜および DIG マーカーとして、integrin および caveolin に対する抗体を用い、また特に神経系の DIG マーカーとしては GM1 ガングリオシドを特異的に認識するコレラ毒素を用いた。さらに、得られた画分の脂質組成を定量的に評価するため、コレステロール、リン脂質ならびにスフィンゴミエリンを測定した。

C. 研究結果

検索した全ての培養細胞ならびにラット大脳

皮質において、大部分の APP は Triton X-100 可溶性画分に回収された。MDCK においては、Triton X-100 可溶化に連続して行ったシヨ糖密度勾配遠心分離において、APP は全て高密度の Triton X-100 可溶性画分に回収され、その回収パターンは細胞膜のマーカである integrin と一致した。一方、DIG のマーカである caveolin は低密度の Triton X-100 不溶性画分に回収された。Caveolin が回収された画分中には高濃度のコレステロールが観察された。以上より、MDCK 細胞において、APP は DIG には存在しないものと結論した。これに対して、神経系の細胞およびラットと大脳皮質では、少量の APP は Triton X-100 不溶性画分に回収された。これらの画分内の脂質濃度を測定したところ、コレステロールおよび GM1 ガングリオシドの両者とも、細胞膜における濃度よりも高く、DIG における濃度よりも低い中間的な値を示した。また、興味深いことに、これらの画分に回収される APP の分子量は、Triton X-100 可溶性画分に回収される大部分の APP よりも高く、成熟型 APP と考えられた。

#### D. 考察

APP の分解ならびに A $\beta$  の産生が細胞内コレステロールに影響されることが次第に明らかになり、また AD 発症の最強の危険因子であるアポリポ蛋白 E の生理的機能がコレステロール輸送にあることなどから、AD 病態生理の研究においてコレステロール代謝が注目されている。また、近年の細胞生物学的研究の発展により、細胞内にはコレステロールに富み多くのシグナル伝達分子をも含む、DIG と称される特異な膜ドメインが存在することが知られるようになった。これまで DIG における APP の局在に関しては、複数の研

究グループにより検討がなされたが、その結果は一致していない。我々は、この問題に結論を出すべく、複数の種類の培養細胞ならびにラット大脳皮質を対象するとともに、DIG モニタリングの精度を高める為、複数の蛋白マーカとともに、直接的な脂質組成の評価をも行った。その結果、上記結果を得ることができた。本研究によってコレステロール高含有ドメインは多様であることが初めて明らかとなったが、今後このドメインの生理的役割を APP 代謝の視点で検討する必要があると考えられる。また、今回の結果からは細胞内コレステロールに依存して産生される A $\beta$  は、DIG 以外の細胞内部位で APP から産生された後、DIG に運ばれ異常な分子特性を獲得したものと考えられる。DIG には生理的に多くの A $\beta$  が存在することが最近報告されており、DIG は生理的な A $\beta$  輸送と異常な A $\beta$  産生の両者の側面で今後重要な研究対象になると考えられる。

#### E. 結論

APP の DIG における局在に関して培養細胞およびラット大脳皮質を対象に検討した結果、DIG は APP 局在首座ではないこと、神経系細胞（組織）においては成熟型 APP が DIG とは異なるコレステロール高含有膜ドメインに存在することを確認した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Michikawa M and Yanagisawa K.  
Apolipoprotein E4 isoform-specific actions on neuronal cells in culture. *Mechanisms of Ageing and Development* 107:233-243,1999.

Komano H, Sudoh S, Kawamura Y, Wang R and Yanagisawa K.  
Implications of *presenilin 1* mutations in Alzheimer's



disease. *Mechanisms of Ageing and Development* 107:281-298,1999.

Mizuno T, Nakata M, Naiki H, Michikawa M, Wang R, Haass C and Yanagisawa K. Cholesterol-dependent generation of a seeding amyloid  $\beta$ -protein in cell culture. *J. Biol. Chem.* 274:15110-15114,1999.

Michikawa M and Yanagisawa K. Inhibition of cholesterol production, and not of nonsterol isoprenoid products induces neuronal cell death. *J. Neurochem.* 72:2278-2285,1999.

Isobe I, Michikawa M and Yanagisawa K. Enhancement of MTT, a tetrazolium salt, exocytosis by amyloid  $\beta$ -protein and chloroquine. *Neurosci. Lett.* 266:129-132,1999.

Kawamura Y, Fan Q-W, Hayashi H, Michikawa M, Yanagisawa K and Komano H. Expression of the mRNA for two isoforms of neural plakophilin-related arm-repeat protein/ $\delta$ -catenin in rodent neurons and glial cells. *Neurosci. Lett.* 277: 185 -188,1999.

Hayashi H, Mizuno T, Michikawa M, Haass C and Yanagisawa K. Amyloid precursor protein in unique cholesterol-rich microdomains different from caveolae-like domains. *Biochim. Biophys. Acta* 1483:81-90, 2000.

Michikawa M, Fan Q-W, Isobe I and Yanagisawa K. Apolipoprotein E exhibits isoform-specific promotion of lipid efflux from astrocytes and neurons in culuter. *J. Neurochem.*74:1008-1016, 2000.

Sudoh S, Hua G, Kawamura Y, Maruyama Y, Komano H and Yanagisawa K. Intracellular site of  $\gamma$ -secretase cleavage for A $\beta$ 42 generation in Neuro 2a(N2a) cells harboring *presenilin 1* mutation. *Eur. J. Biochem.* (in press)

Isobe I, Yanagisawa K and Michikawa M. A possible model of senile plaques using synthetic amyloid  $\beta$ -protein and rat glial. *Exp. Neurol.* (in press)

Fukuyama R, Mizuno T, Mori S, Yanagisawa K, Nakajima K and Fushiki S. Age-dependent decline in the apolipoprotein E level in cerebrospinal fluid from control subject, and its increase in cerebrospinal fluid from patients with Alzheimer's disease.

*Eur. Neurol.* (in press)

## 2. 学会発表

柳澤勝彦  
Molecular mechanism underlying initiation of amyloid fibril formation.  
International Symposium on Dementia from Molecular Biology to Therapeutics  
1999年9月11日 神戸

柳澤勝彦  
Cholesterol-dependent generation of seeding amyloid  $\beta$ -protein in cell culture.  
第42回日本神経化学会 合同公開シンポジウム  
アルツハイマー病をどう治すか -神経化学からのアプローチ  
1999年9月15日 広島

道川 誠、范 企文、磯部一郎、柳澤勝彦  
アポリポ蛋白 E のアイソフォーム特異的作用の検討:培養神経細胞及びアストロサイトにおけるコレステロール efflux に及ぼす影響 第42回日本神経化学会 1999年9月15-17日 広島

磯部一郎、柳澤勝彦、道川 誠  
合成 amyloid  $\beta$ -蛋白を用いたラットグリア細胞培養系における老人斑モデル  
第42回日本神経化学会 1999年9月15-17日 広島

川村勇樹、范 企文、林 秀樹、道川 誠、柳澤勝彦、駒野宏人  
中枢神経系細胞における2種の NPRAP/ $\delta$ -catenin アイソフォームの発現解析  
第42回日本神経化学会 1999年9月15-17日 広島

林 秀樹、水野哲也、道川 誠、柳澤勝彦  
カベオラとは異なるコレステロール高含有ドメインにおけるアミロイド前駆体蛋白  
第42回日本神経化学会 1999年9月15-17日 広島

柳澤勝彦  
Seeding amyloid  $\beta$ -protein :そのコレステロール依存性と病的意義について  
第18回日本痴呆学会 シンポジウム アルツハイマー病の分子機構 1999年10月6-8日 熊本

川村勇樹、范企文、林秀樹、道川誠、柳澤勝彦、駒野宏人  
神経細胞およびグリア細胞における NPRAP/ $\delta$ -

catenin mRNA の発現 第 72 回日本生化学会  
1999 年 10 月 8 日 横浜

華 剛、須藤慎治、川村勇樹、柳澤勝彦、  
駒野宏人 プレセニリン 1 ミスセンス変異によ  
って促進される $\gamma$ -セクレターゼ活性の細胞内  
存在部位について 第 72 回日本生化学会 1999 年  
10 月 9 日 横浜

柳澤勝彦  
アルツハイマー病の病態 -アミロイド $\beta$ 蛋白を  
中心に-  
第 115 回日本医学会シンポジウム  
1999 年 12 月 2 日 東京

Hua G, Sudoh S, Kawamura Y, Yanagisawa K and  
Komano H.  
Intracellular site of  $A\beta_{42}$ - $\gamma$ -secretase cleavage  
enhanced by presenilin1 mutation.  
29th Society for Neuroscience Annual  
Meeting, October 23-28, 1999, Miami Beach, USA.

Kawamura Y, Fan Q.-W, Hayashi H, Michikawa M,  
Yanagisawa K and Komano H. Expression of the  
gene for  $\delta$ -catenin/NPRAP in neurons and glial cells.  
29th Society for Neuroscience Annual  
Meeting, October 23-28, 1999, Miami Beach, USA.

Fan Q-W, Isobe I, Asou H, Yanagisawa K and  
Michikawa M.  
Expression and regulation of apolipoprotein E  
receptors in the central nervous system cells in culture.  
29th Society for Neuroscience Annual Meeting,  
October 23-28, 1999, Miami Beach, USA.

Michikawa M, Fan Q-W and Yanagisawa K.  
Apolipoprotein E-mediated lipid efflux from neurons  
and astrocytes is isoform-specific.  
29th Society for Neuroscience Annual Meeting,  
October 23-28, 1999, Miami Beach, USA.

Isobe I, Michikawa M and Yanagisawa K.  
Enhancement of MIT exocytosis by amyloid  $\beta$ -  
protein and chloroquine in rat glial cells.  
29th Society for Neuroscience Annual Meeting,  
October 23-28, 1999, Miami Beach, USA.

Hayashi H, Mizuno T, Michikawa M, Haass C and  
Yanagisawa K.  
Diversity of the localization of amyloid precursor  
protein in detergent-insoluble glycoprotein-rich  
microdomains. 29th Society for Neuroscience Annual  
Meeting, October 23-28, 1999, Miami Beach, USA.

分担研究報告書

透析アミロイドーシスに関する臨床病態学的研究

分担研究者 下条文武 新潟大学医学部内科学第二講座 教授

研究要旨 1044 例の慢性透析患者を対象として、透析アミロイドーシスの典型的症状である手根管症候群の発症時期と透析導入年齢について Cox モデルにより分析したところ、加齢が発症に及ぼす危険率は 1.042/year であった。透析アミロイド線維が加齢環境によって起こる advanced glycation end product(AGE)化現象を起こしていることから、試験管内アミロイド線維伸長現象に及ぼす AGE- $\beta$ 2-m の影響を検討した。Native- $\beta$ 2-m が線維伸長促進的に反応するのに反して、AGE- $\beta$ 2-m は抑制的に作用することが示され、AGE 化現象は線維形成後に起こった可能性が考えられた。

A. 研究目的

血液透析を受けている腎不全患者に合併する  $\beta$ 2-m（ミクログロブリン）タイプのアミロイドーシスは、QOL の低下をもたらすばかりでなく、長期の透析治療による延命をも阻む重大な問題である。しかしながら、本症の発症機序をはじめ、基本的対策の面でなお未解決の部分が多い。本アミロイドーシスは、透析導入時の年齢が高い者ほど発症が早いこと、また透析歴が長い者に発症することから、加齢環境要因が大きく作用していると考えられる。そこで、本研究では、先ず臨床的に透析アミロイドーシスの代表的関節症状である手根管症候群の発症と加齢との関係を調査した。次に、前駆蛋白である  $\beta$ 2-m に起こる加齢環境効果である AGE(advanced glycation end products)修飾現象を取り上げ、アミロイド線維形成と伸長効果に及ぼす影響を検討した。

B. 研究方法

1)加齢と透析アミロイドーシス発症に関する臨床解析

8 透析施設で維持血液透析治療をうけている 1044 症例を調査して透析アミロイドーシス発症時期（手根管症候群の手術時）と年齢との関係を検討した。すなわち透析導入時年齢の手根管症候群の手術時期に及ぼす危険率(RR)を Cox モデルにより分析した。

2) $\beta$ 2-m アミロイド線維伸長に及ぼす AGE 現象効果

透析アミロイド線維 (f $\beta$ 2m) は手根管滑膜から Pras らの方法で粗抽出後、105xg 超遠沈、及び不連続ショ糖密度勾配超遠沈により精製した。f $\beta$ 2m を構成する単体前駆蛋白質 (native- $\beta$ 2m) は、腎不全患者尿より生化学的方法で精製した。AGE- $\beta$ 2-m は、glucose 処理と 3-deoxyglucosone 処理の両者を調整した。f $\beta$ 2m

の定量はアミロイド線維を含む反応溶液を蛍光色素チオフラビン T (ThT)を含む溶液と混合し、極大励起・蛍光波長、至適 pH にて分光蛍光光度計を用いて測定した。 $\beta 2m$  をアミロイド線維と共に 37°Cで反応させ、アミロイド線維の形成・伸長を、電顕を用いた形態的観察、及び上記分光蛍光法によりモニターし、アミロイド線維伸長の反応速度論的解析をおこなった。

### C. 研究結果

#### 1)加齢と透析アミロイドーシス発症に関する臨床解析

対象症例の平均透析年齢は 47.4+16.0 歳、手根管症候群の手術例は 112 例であった。手術時を発症時として透析導入年齢が及ぼす効果を Cox ハザードモデルによる発症危険率を求めたところ 1.042/年であった。すなわち導入年齢が 10 年高いと手根管発症リスクは 10.42 倍であることが示された。

#### 2) $\beta 2-m$ アミロイド線維伸長に及ぼす AGE 現象効果

まず、 $\beta Af$  定量の至適条件を確立するとともに、 $\beta Af$  の重合速度を測定、同線維形成機構を反応速度論的に解析した。試験管内 $\beta Af$  重合の反応速度論的解析により、内木らは、 $\beta Af$  伸長が一次反応速度論、つまりすでに存在する線維の端に、前駆蛋白質が次々と結合することにより起こることを証明した。本モデルは、透析アミロイドーシスにも当てはまることが証明された。一定濃度のチオフラビン (ThT) に対しアミロイド線維濃度を変化させたところ、蛍光強度は、アミロイド線維濃度に比例して直接的に増加した。この特性より、個々のアミロイド線維定量のための標準曲線を作成した。アミロイド線維伸長の反応速度論的解

析が $\beta 2-m$  の存在で成立した。f  $\beta 2-m$  では pH2.5 付近で極大となった。f  $\beta 2-m$ 、およびその構成蛋白である $\beta 2-m$  のいずれも生体材料から精製したものであり、酸性領域に至適 pH を認めたこと理由は明らかでない。次に、このモデルを用いて AGE 修飾現象がアミロイド線維に如何なる役割を持つかを検討した。その結果、透析アミロイド線維(fA  $\beta 2-m$ )形成・伸長に対し AGE- $\beta 2-m$  の効果は、native-  $\beta 2-m$  に比較して反応が乏しく、native-  $\beta 2-m$  による重合モデルに対しては伸長反応を阻害する性質が明かとなった。Native-  $\beta 2-m$  とアミロイド線維による重合モデルへ高濃度から低濃度までの AGEs 化  $\beta 2-m$  を反応させたところアミロイド線維伸長反応に対する反応阻害が認められた。このことは、AGE 修飾は線維化に必須となる立体構造にマイナスの因子を与えると考えられ、透析アミロイドーシスで認められる AGEs は、アミロイド沈着後に二次的に発生したもので、アミロイド形成に直接関与している可能性は低いと予想された。

### D. 考察

本研究により、加齢が透析アミロイドーシスの重要な発症リスクであることが示されたが、近年の透析導入患者平均年齢は急速に高齢化していることを考えると、加齢と透析アミロイドーシス発症の関係は重要視しなければならない。透析患者のアミロイド沈着が AGE 化修飾していることは剖検例の病理組織学的検討からすでに報告されている。虎ノ門病院病理部の原らはアミロイド沈着の AGE 化現象を免疫組織科学的に検討したところ、初期透析アミロイドーシス群では AGE 化が陰性あるいは弱陽性であるが、長期透析アミロイドーシス群では AGE 陽性であるが、組織に

沈着したアミロイドは AGE 抗体反応が均一に陽性でなく、斑紋状に陽性のところや陰性のところが混在していたという。AGE 化がアミロイド線維形成過程に如何に関わるかは重要な課題である。今回の検討では試験管内のアミロイド線維伸長反応において、AGE 化修飾をうけた $\beta$ 2-m が抑制的になる事実が示された。このことはアミロイド線維化に必須なる立体構造にマイナスの因子になるためと考えられる。以上の病理組織学的所見と本研究でのアミロイド線維伸長実験結果から、透析アミロイドーシスで認められる AGE 化現象は、アミロイド沈着後に二次的に発生するものと考えられる。

#### E. 結論

加齢による透析アミロイドーシスの発症危険率は 1.042/年 (年齢) である。加齢環境としての AGE 現象は発症の初期あるいはアミロイド線維形成自体には関与しないが、アミロイド沈着後にの病態に関与する可能性がある。今後、透析アミロイドーシスに関する病態解析のうえで加齢現象についてはなお解明しなければならない課題が多い。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Imura T, Kimura H and Gejyo F.  
Apolipoprotein E phenotypes in hemodialysis patients.  
*Kidney International* 56 (suppl) : 245-247, 1999.

Odani S, Komori Y and Gejyo F.  
Structural analysis of the amyloidogenic  $\kappa$  Bence Jones protein (FUR). *Amyloid* 6:77-88, 1999.

Hasegawa K, Yamaguchi I, Omata S, Gejyo F and Naiki H. Interaction of  $A\beta$ (1-42) and  $A\beta$ (1-40) in Alzheimer's  $\beta$ -Amyloid fibril formation. *Biochemistry* 38:15514-15521,1999.

Hashimoto N, Naiki H and Gejyo F.  
Modification of  $\beta$ 2-microglobulin with D-glucose or 3-deoxyglucosone inhibits  $A\beta$  2M amyloid fibril extension in vitro. *Amyloid* 6:256-264,1999.

Gejyo F.  
 $\beta$ 2-Microglobulin amyloid. *Amyloid* (in press)

##### 2. 学会発表

Gejyo F.  $\beta$ 2-microglobulin adsorption in chronic hemodialysis patients associated with dialysis-related amyloidosis. 2nd International Congress of the International Society for Apheresis (ISFA), April 1999, 15-18, Saarbrucken

Gejyo F, Naiki H and Hashimoto N.  
Modification of  $\beta$  2-microglobulin with advanced glycation end products (AGEs) inhibits amyloid fibril polymerization in a first order kinetic model. International Society of Nephrology, May 2-6, 1999, Buenos Aires, Argentina

Kazama J, Gejyo F, Horwood N, Martin T.J., Soullis T and Cooper M. E.

Advanced Glycation end products (AGEs) indirectly promotes osteoclastogenesis through monocyte activation in vitro. International Society of Nephrology. May, 2-6, 1999, Buenos Aires, Argentina

Aoike I, Gejyo F, Arakawa M, Kataoka H, Kunitomo T and Hakim R.M. Ten years follow up multicentre clinical trial of PMMA membrane dialysis. European Dialysis and Transplant Association Annual Congress. September 5-8, 1999, Madrid

分担研究報告書

アミロイド線維形成に関する試験管内反応速度論的研究

分担研究者 内木宏延 福井医科大学病理学第二講座 教授

研究要旨 透析アミロイドーシス、アルツハイマー病、及び全身性 AL アミロイドーシスにおけるアミロイド線維形成の反応速度論的解析を並行して遂行し、個々のアミロイドーシスの特殊性と共に、ヒトアミロイドーシス全般に共通する発症機構・因子を明らかにすることを旨とした。(1) 透析アミロイドーシスでは、AGE 化などの修飾を受けていない $\beta 2$ -ミクログロブリンのみで構成された純粋なアミロイド線維を得る手法を確立した。同線維が中性 pH 反応液中で、オリゴマー以下まで脱重合を起こすとともに、アミロイド関連共存蛋白であるアポリポ蛋白 E がその脱重合反応を濃度依存性に抑制することを明らかにした。(2) アルツハイマー病では、試験管内で  $A\beta(1-42)$  と  $A\beta(1-40)$  が共存する場合、相互作用をした上で $\beta$ アミロイド線維形成を行うことを明らかにした。(3) 全身性 AL アミロイドーシスでは、3 例の剖検症例のいずれにおいても、AL アミロイド線維伸長が一次反応速度論モデルで説明できることを証明した。伸長の至適 pH は、いずれも 2.5~3.5 と著しい酸性域にあった。上記結果はいずれも、重合核依存性重合モデルで説明可能であった。

A. 研究目的

本分担研究は、ヒトアミロイドーシスの中から $\beta$ アミロイドーシス（アルツハイマー病）と透析アミロイドーシスを取り上げ、これらの発症に共通する分子機構、特にアミロイド前駆蛋白の代謝環境の加齢変化の実体を、試験管内反応速度論的解析系を駆使し明らかにすることを旨とする。

一方われわれは、試験管内アミロイド線維の形成反応を説明するモデルとして、核形成過程と線維伸長過程から構成される重合核依存性重合モデルを構築している。このモデルに基づき、透析アミロイドーシス、アルツハイマー病、及び AL アミロイドーシスにおけるアミロイド線維形

成の反応速度論的解析を並行して遂行し、各々の成果を他のアミロイドーシス研究にフィードバックすることにより、個々のアミロイドーシスの特殊性と共に、ヒトアミロイドーシス全般に共通する発症機構・因子を明らかにすることをグループの主要な研究目標としている。

まず透析アミロイドーシスの領域では、アミロイド線維の脱重合機構を解析した。次にアルツハイマー病 $\beta$ アミロイド線維形成について、 $A\beta(1-42)$  が核となり、これに  $A\beta(1-40)$  が次々に重合して線維を形成するとの説が提唱されているが、今回われわれは、 $A\beta(1-42)$  と  $A\beta(1-40)$  の線維形成における相互作用を速度論的に解析した。さ

らに病理解剖で得られたアミロイド沈着臓器を用い、AL アミロイド線維伸長の反応速度論的解析を行った。

## B. 研究方法

透析アミロイドーシス: 精製した透析アミロイド線維 (fA $\beta$  2M)、及びリコンビナントヒト $\beta$ 2-ミクログロブリン ( $\beta$ 2-m) を用いて線維伸長反応を繰り返すことにより、透析アミロイド線維をその基本構築を保持したまま増幅した。次に増幅線維を種々の条件でインキュベートし、脱重合過程を電顕を用いた形態的観察、及び蛍光色素チオフラビン T (ThT)を用いた分光蛍光定量法により解析した。

アルツハイマー病 アミロイドーシス: 合成 A $\beta$ (1-42)及び A $\beta$ (1-40)、及びそれぞれを重合させて作成した $\beta$ アミロイド線維を様々な組み合わせでインキュベートし、線維形成速度・形態を電顕を用いた形態的観察、及び ThT を用いた分光蛍光定量法により解析した。

AL アミロイドーシス: 3 例の全身性 AL アミロイドーシス剖検例よりアミロイド線維(fAL)、及び AL 蛋白を精製し、ThT を用いたアミロイド線維定量の至適条件を確立後、fAL と AL 蛋白による線維伸長反応を電顕を用いた形態的観察、及び ThT を用いた分光蛍光定量法により解析した。

## C. 研究結果

透析アミロイドーシス: (1) AGE 化などの修飾を受けていない $\beta$ 2-m のみで構成された純粋な fA $\beta$ 2M を得る手法を確立した。(2) この fA $\beta$ 2M が中性 pH 反応液中で、オリゴマー以下まで脱重合を起こすとともに、アミロイド関連共存蛋白であるアポリポ蛋白 E (ApoE) がその脱重合反応

を濃度依存性に抑制することを見いだした。

アルツハイマー病 アミロイドーシス: (1) 電子顕微鏡による形態観察で、A $\beta$ (1-42)型線維 (fA $\beta$ (1-42))と A $\beta$ (1-40)型線維 (fA $\beta$ (1-40))は異なった形態を示した。(2) A $\beta$ (1-42)と A $\beta$ (1-40)が共存する場合、線維形成反応では互いに抑制的に作用し、反応を遅らせた。伸長反応過程における抑制効果は顕著ではない為、核形成過程における抑制が主因と考えられる。(3) 同種の核とモノマーによる伸長反応では、タイムコースはラグタイムのない双曲線を描き、迅速に進行した。これらのタイムコースは、一次反応速度論モデル、すなわち既に存在する線維断端に、A $\beta$ 蛋白がコンフォーメーションを変化させながら次々に結合することにより起こるというモデルで説明できる。(4) fA $\beta$ (1-42)と自らアミロイド線維を形成できない A $\beta$ (1-40)モノマーによる異種の伸長反応の場合、反応速度は同種の場合に比較して遅く、タイムコースはシグモイド曲線を描いた。この時、fA $\beta$ (1-40)が形成された。(5) A $\beta$ (1-42)と自らアミロイド線維を形成できない A $\beta$ (1-40)の混合溶液中では、A $\beta$ (1-42)が A $\beta$ (1-40)の抑制的相互作用に打ち勝って核形成を行い、これに A $\beta$ (1-40)が重合して fA $\beta$ (1-40)が形成された。

AL アミロイドーシス: (1) 3 例の全身性 AL アミロイドーシス剖検例より精製した 3 種のアミロイド線維間で、ThT の至適励起・蛍光波長、及び ThT との親和性に違いが認められた。(2) それぞれのアミロイド線維を 6M 尿素にて可溶化後、アミロイド線維を構成する AL 蛋白を精製し、fAL と AL 蛋白を 37°C で反応させることにより、fAL の伸長を、ThT 法および電顕観察によりモニターした。その結果、(a) いずれの症例においても、fAL の伸長は一次反応速度論モデルで説明

できることを証明した。(b) 伸長の至適 pH は 2.5~3.5 と著しい酸性域にあった。上記透析アミロイド線維 (fA $\beta$ 2M) 伸長の至適 pH も著しい酸性域(pH 2.5)にあり、免疫グロブリンスーパーファミリーに属するアミロイド前駆蛋白に共通する現象として興味深い。(c) 予備的 CD スペクトル分析により、 $\beta$ 2-m は、線維伸長の起こらない pH 7.5 では $\beta$ シートから成るコンパクトなコンフォーメーションをとっているが、伸長速度が最大となる pH 2.5 では比較的ランダムなコンフォーメーションをとっていることが明らかになった。このことは、前駆蛋白がアミロイド線維を形成するためには、ある生体内代謝環境中でいったん生理的コンフォーメーションがほぐれることが不可欠のステップであることを示唆しており極めて興味深い。

#### D. 考察

透析アミロイドーシス : AGE 化などの修飾を受けていない $\beta$ 2-m のみで構成された純粋な fA $\beta$ 2M を得る手法を確立したことにより、ApoE、AGE 化などの生体分子が線維形成に及ぼす影響を精密に解析することが可能になると共に、NMR を用いた fA $\beta$ 2M の立体構造解析等にも役立つことが考えられる。また、ApoE が fA $\beta$ 2M の脱重合反応を濃度依存性に抑制することは、ApoE が組織に沈着した fA $\beta$ 2M の安定化に関与している可能性を示唆している。われわれはこれまでに、ApoE がアルツハイマー病 A $\beta$ 蛋白と高親和性複合体を形成し、試験管内における A $\beta$ 蛋白からのアミロイド線維形成を抑制することを報告している。この様に、二種類のヒトアミロイドーシスから得られた ApoE の線維形成に及ぼす効果は明らかに矛盾しているが、実際の線維沈

着の場合においては、個々の患者の病態を反映した ApoE の線維形成抑制・促進効果の総和が、線維沈着量を修飾しているのではないかと考えられる。

アルツハイマー病 アミロイドーシス : 試験管内で A $\beta$ (1-42)と A $\beta$  (1-40)が共存する場合、相互作用した上でアミロイド線維形成を行うことが示された。これらの反応は重合核依存性重合モデルに適合すると考えられる。また、脳内 $\beta$ アミロイド線維形成において、A $\beta$ (1-42)が主要な役割を果たしていることが示唆された。

ALアミロイドーシス : 3 種の AL アミロイド線維は、いずれも酸性域に伸長の至適 pH があり、線維伸長が一次反応速度論モデルに従うことなど、単一の疾患単位としての共通点を備えている。一方線維構成 AL 蛋白組成、ThT の至適励起・蛍光波長、ThT との親和性、及び伸長反応の至適 pH に違いが認められ、個々の症例における線維形成機序の多様性も同時に存在し、興味深い。

#### E. 結論

(1) AGE 化などの修飾を受けていない $\beta$ 2-m のみで構成された純粋な fA $\beta$ 2M を得る手法を確立した。(2) 試験管内で A $\beta$ (1-42)と A $\beta$ (1-40)が共存する場合、相互作用をした上で $\beta$ アミロイド線維形成を行うことを明らかにした。(3) 3 例の全身性 AL アミロイドーシス剖検症例のいずれにおいても、AL アミロイド線維伸長が一次反応速度論モデルで説明できることを証明した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Mizuno T, Nakata M, Naiki H, Michikawa M, Wang R, Haass C and Yanagisawa K.  
Cholesterol-dependent generation of a seeding amyloid



$\beta$ -protein in cell culture.  
J. Biol. Chem. 274:15110-15114, 1999.

Hashimoto N, Naiki H and Gejyo F.  
Modification of  $\beta$ 2-microglobulin with D-glucose or 3-deoxyglucosone inhibits  $\beta$ 2M amyloid fibril extension in vitro.  
Amyloid 6:256-264, 1999.

Hasegawa K, Yamaguchi I, Omata S, Gejyo F and Naiki H.  
Interaction between  $A\beta(1-42)$  and  $A\beta(1-40)$  in Alzheimer's  $\beta$ -amyloid fibril formation in vitro.  
Biochemistry 38:15514-15521, 1999.

## 2. 学会発表

長谷川一浩、小俣三郎、内木宏延  
アルツハイマー病 $\beta$ アミロイド線維の試験管内伸長反応における $\beta$ ペプチド1-42と1-40の相互作用の検討 第88回日本病理学会総会 1999年4月 東京

長谷川一浩、内木宏延  
アルツハイマー病 $\beta$ アミロイド線維の試験管内形成反応における $\beta$ ペプチド1-42と1-40の相互作用 日本基礎老化学会第22回大会 1999年6月 京都

内木宏延  
アミロイド線維形成機構の反応速度論的解析 第42回日本神経化学会大会 1999年9月 広島

長谷川一浩、小俣三郎、内木宏延  
アルツハイマー病 $\beta$ アミロイド線維の試験管内伸長反応における $\beta$ ペプチド1-42と1-40の相互作用解析 第37回日本生物物理学会総会 1999年10月

内木宏延  
アミロイド線維形成機構の反応速度論的解析—アルツハイマー病 $\beta$ アミロイドを中心に—大阪大学蛋白質研究所セミナー—タンパク質のフォールディング問題—その物理学的基礎と生物学的意義 1999年11月 大阪

高橋直生、長谷川一浩、山口 格、下条文武、上田孝典、内木宏延  
試験管内ALアミロイド線維形成機構の反応速度論モデルの開発、および生理的重合阻害分子ならびに非ペプチド性重合阻害剤の探索 II—試験管内線維伸長の反応速度論的解析— 厚生省特定

疾患対策研究事業アミロイドーシスに関する研究班平成11年度研究報告会 2000年2月 東京

山口 格、長谷川一浩、高橋直生、下条文武、内木宏延  
 $\beta$ 2-ミクログロブリン関連アミロイド線維(f $A\beta$ 2M)の中性pH反応液における脱重合反応とアポリipoprotein E (ApoE)のf $A\beta$ 2M安定化作用 厚生省特定疾患対策研究事業アミロイドーシスに関する研究班平成11年度研究報告会 2000年2月 東京

長谷川一浩、山口 格、下条文武、内木宏延  
アルツハイマー病 $\beta$ アミロイド線維の試験管内形成反応における $\beta$ ペプチド1-42と1-40の相互作用. 厚生省特定疾患対策研究事業アミロイドーシスに関する研究班平成11年度研究報告会 2000年2月 東京