

19990376

厚生科学研究費補助金

脳科学研究事業

臨床応用可能なアルツハイマー病の生物学的マーカーの確立に

関する研究

平成11年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 難波 吉雄

平成12年3月

目次

I. 総括研究報告書	
臨床応用可能なアルツハイマー病の生物学的マーカーの確立に関する研究 難波吉雄	・・・ 1
II. 分担研究報告	
1. 要介護認定等における痴呆症の早期診断に関する研究 遠藤英俊	・・・ 4
2. 痴呆性疾患におけるタウアイソフォームに関する研究 森啓	・・・ 9
3. アルツハイマー病診断の生物学的物質と危険因子 宇野正威、朝田隆	・・・ 17
4. アルツハイマー病生物学的マーカーの確立に関する研究 難波吉雄、植木彰、池田和彦	・・・ 21
III. 研究成果の刊行物に関する一覧表	・・・ 24
IV. 研究成果の刊行物、別刷	・・・ 28

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）
（総括）研究報告書

臨床応用可能なアルツハイマー病の生物学的マーカーの確立に関する研究

主任研究者 難波吉雄 東京大学講師

研究要旨 痴呆症の早期診断の確立は早急に解決すべき課題である。現時点では神経心理テスト、生物学的マーカーの測定、画像診断の三つの組み合わせが最も合理的な早期診断の可能性がある。ドイツで開発された神経心理テスト、タウアイソフォームのアルツハイマー病脳における特性、食餌因子、痴呆性疾患で脳内に蓄積する種々の蛋白質、既知の危険因子とライフスタイルの関連等新たな生物学的マーカーの候補、あるいは痴呆予防の可能性に関する種々の環境因子の存在が本研究により明らかとなった。今後これら手法を組み合わせることによるシステムの構築、要介護認定等実際の現場での応用方法等が今後の検討課題と思われる。

分担研究者 遠藤英俊
国立療養所中部病院内科医長
分担研究者 森啓
大阪市大教授
分担研究者 宇野正威
国立精神・神経センター

は、アルツハイマー病の診断に、より客観性を持たせるだけではなく、アルツハイマー病の早期診断、早期治療を可能とする、痴呆の進行度や治療薬の効果判定に資する、要介護認定が行われる歳の痴呆の判定等に役立つといった点を可能とするべく、臨床応用可能なアルツハイマー病の生物学的マーカーを確立することを目的とする。

A. 研究目的

我が国では、最近公的介護保険制度が導入された。概ねその運営はスムーズに行われているが、痴呆の判定に関しては実際の状態よりも軽く判定されるといった問題点も指摘されている。また、DSM-IVなど通常使用されている痴呆の診断基準では、アルツハイマー病と診断される時点において記憶・認知機能障害は中等度以上であり、早期であるとは言い難い。そこで本研究で

B. 研究方法

アルツハイマー病の早期診断における生物学的マーカーには、神経心霊学的検査、生物学的マーカー、画像診断を組み合わせることが最も有効であると考えられる。そこで、これら3つの題について、それぞれ検討を行った。

神経心理学的検査では、ドイツのIhr氏が開発した痴呆症の早期診断テストを邦訳

した。この神経心理テストはアルツハイマー病の早期診断を目的に開発された新しいテストであり、点数は50点満点で、34点以下が痴呆症の疑いありと判定される。計91名（平均年齢78歳）を対象に検討を行った。

生物学的マーカーとしては、1つには既存のマーカーとしてその有効性について認識が確立されつつあるタウ蛋白について、新たな視点から検討を加えた。タウアイソフォーム特異抗体は、領域特異的な合成ペプチドを抗原とした6種類のタウアイソフォーム別抗体を作製した。本抗体を用いて生化学的、免疫細胞学的検討を行った。加えて、脳内アミロイドと深い関連を有するアミロイドP蛋白質のマーカーとしての可能性について検討した。また、アルツハイマー病患者ではその病態形成にアポEが関与していることが知られているがその機序は明らかでない。そこで、脂肪酸に着目してアルツハイマー病患者において、摂取栄養の詳細な検討を行った。また、新規アミロイド蛋白であるAbri蛋白については前駆体蛋白に対する抗体を作製し、免疫組織学的検討を行った。さらにアルツハイマー病予防に関するライフスタイルについても疫学的に研究を行った。

C. 研究結果

1hrの神経心理学的テストでは、91名の素点は17点から48点に分布し、平均点は34.3であった。MMSEは15点から30点に分布し、平均点は24.4であった。新テストはMMSEより加齢に伴う記憶障害の患者や痴呆でない患者の点が広く分布し、より鋭敏なテストであることが示された。基本的にはMMSEと本テストは相関することが明らかと

なった。6種類のタウ分子種を識別できる特異抗体を用いた検討によって、アルツハイマー病脳には6種類のすべてのタウ分子種が存在すること、さらに神経原線維変化は6種類のタウアイソフォームが等モル分子含まれているというより、不均衡な状態にあることが判明した。

脳脊髄液中のアミロイドPコンポーネントについてその濃度を測定し、痴呆の程度との関連を調べた。その結果、アルツハイマー病の重症化に伴ってアミロイドPコンポーネントの値が低値となることが明らかとなった。

栄養学的な解析によれば多価不飽和脂肪酸摂取比n-6/n-3比がアルツハイマー病患者群では有意に高いことが明らかとなった。また、Abri前駆体蛋白に対する特異抗体を用いた免疫細胞学的検討によって、神経細胞にその免疫原性が存在することが明らかとなった。

ライフスタイルの調査では、短時間の昼寝がアルツハイマー病の予防に効果がある可能性が示された。

D. 考察

本研究で用いられた新テストは軽度痴呆患者の鋭敏な診断補助ツールとして有用である可能性が示された。今後さらなる症例の蓄積が必要であると考えられる。

タウについては、従来タウの異常性がリン酸化の亢進にのみ焦点が当てられてきたが、本研究によってアルツハイマー病等痴呆性疾患脳内におけるタウの痴呆性疾患毎の検討を加えることが重要であることが示された。また、ライフスタイルについては、多価不飽和脂肪酸摂取比n-6/n-3比を適正に

する、短時間の昼寝をするといった環境因子もアルツハイマー病の予防において重要である可能性が示された。

アミロイドを構成する蛋白質について、疾患が異なってもその機能だけではなく、マーカーとしての可能性についても併せて検討する必要があると思われた。

E. 結論

アルツハイマー病の早期診断を行う際には生物学的マーカーを活用することが重要である。なかでも神経心理学的検査、生物学的マーカー、画像診断が有効であるがこれらの手法を効果に組み合わせていくシステムあるいはプロトコルを検討する必要がある。また、要介護認定における痴呆の判定のように多くの人数について短時間で検討する場合や実際の診療現場においても利用できる取った視点も考慮する必要があると思われる。

また、痴呆の予防にはcommon diseaseといわれる概念も有用であると思われた。

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）
（分担）研究報告書

要介護認定等における痴呆症の早期診断に関する研究

分担研究者 遠藤英俊 国立療養所中部病院 内科医長

研究要旨 痴呆の早期診断の重要性はいうまでもない。現時点では神経心理テスト、生物学的マーカー、画像診断のコンビネーションがもっとも合理的な早期診断の可能性を示している。ただし社会医学的、福祉の面からいうと介護保険における痴呆性老人の要介護認定という課題があり、緊急的に解決すべき課題である。この目的にそって「痴呆症と要介護認定方法に関する研究」以下の二つの研究を行った。はじめに要介護認定方法における痴呆症の診断ならびに早期診断の困難性について検討した。その結果早期診断に有効な新しい神経心理テストを日本に導入し、その有用性を確認した。

分担研究者 遠藤英俊
国立療養所中部病院内科医長

研究1：痴呆症と要介護認定方法に関する研究

A. 研究目的

平成12年4月から開始される介護保険法においては高齢者で長期ケアを必要とする要介護者を在宅や施設での介護を提供する新しいシステムを保険という枠組みで創設しようとしている。主な対象となる疾患は痴呆症や脳血管障害、骨折などで介護を必要としている高齢者である。そこで本研究班の目的でもある生物学的マーカーを利用して痴呆症の診断、経過観察、介護の必要度を推定する新たな方法を検討することを目的としている。

B. 研究方法

認定調査の質問項目における痴呆症に関連する項目の検討、痴呆の重症度と介護の必要度との関連、痴呆のスケールとの関連、ADLや手段的ADLとの関連で検討した。

C. 研究結果

認定調査は市町村の職員か介護支援専門員が行うことになっており、医師や看護婦とは限らない、そのため痴呆症の理解に乏しく、正確に調査が行われない場合がある。またまだら痴呆で調査時には質問に正確に応答し、調査結果が軽度もしくは痴呆なしと判定されるケースが存在する。認定調査そのものにも質問項目は85項目にかぎられており、このうち痴呆の症状に直接関連する項目はかぎられており、痴呆症を判断するには不十分である。さらに主治医は神

経内科や精神科の専門とはかぎらず、痴呆症の診断が正確にできるとは限らない。今後要介護者のそれぞれの主治医において痴呆症の理解が必要である。認定調査の概況調査と主治医意見書の両方に痴呆性老人の自立度判定基準がある。痴呆症の自立度判定基準にそって対象者を分類しようとしても種々の患者類型があるため、細かいところで分類できない患者群がどうしても出現する。推定したり、類推することによってしか判定ができない場合もある。また軽くても暴力や暴言などの問題行動がある場合がある。さらに詳細に検討すると、認定調査項目の中にいくつかの痴呆、記憶に関する質問項目がある。しかしその内容は日課の理解、生年月日、直前の行為、名前、季節、場所に関する質問が含まれており、中等症から重症で障害をきたす問のみが、抽出されている。この質問では早期の痴呆症が検出困難である。また種々の21に及ぶ問題行動に関する質問があるが、これも初期、早期、軽症痴呆にはほとんどみられず、中等症から重症患者にみられる症状である。早期さらに最も軽い認定である「要支援状態」は身体上、精神上の障害があるために日常生活を営むのに支障があると見込まれる状態を示しており、IADLの低下が初期に認められる状態を表しており、間接生活援助と機能訓練関連行為に関して特に算定が重くされており、IADLの分析が重要であることを示している。

そこで介護との関連で質問項目を検討すると、表1に家族が気づいた痴呆の初発症状の主なものを示した。このうち訪問調査の項目にあるのが、「日課を理解することができる」、「直前に何をしていたかを思

いだすことができる」「周囲への関心がなくなる」などの三項目のみである。それぞれ介護時間に換算すると8.1分、8.3分、4.5分であり、介護保険においては早期の痴呆患者は認定調査ではひろえないということができる。

痴呆症がさらにすすんで介護を必要とするのには家族が痴呆症ではないかと疑いをもった後にさらに1-2年の期間が必要であり、「金銭管理ができなくなる」とか「薬の内服ができなくなる」などの手段的ADLの低下などがでて始めて、要支援になっていく、つまり要介護認定で要支援以上の対象者は初期でなく、軽度から中期の痴呆患者となり始めて認定される状態となる。つまりミニメンタルステート検査は長谷川式簡易知能検査で22点前後以下にならないと痴呆症に伴う認定はできないことを意味している。結果的に自立か、要支援か要介護1のレベルの判定基準が問題となる。調査項目にこれらの質問がないため、リハビリテーションを必要とする軽症、初期の痴呆患者は含まれにくいという性質をもっている。せめて要支援ではこれらものことがひろえるような質問を入れたり、対象患者の医学的診断、さらに科学的な要介護の必要時間の算出が求められる。今後は現在の仕組みで認定された患者の状態と医学的な視点との相関について検討する必要がある。表1 家族が気づいた痴呆の初発症状（初診時の外来の訴えから）

1. 何度も同じことを聞く
2. 5分前のことをすぐ忘れる
3. 慣れているはずのところまで道がわからなくなった
4. 物の名前がでてこなくなった

5. 日課をしなくなった
6. 物事に対する関心や興味をなくした
7. 置き忘れやしまい忘れが目立った
8. 計算ができなくなった

D. 考察

これらの結果から介護保険の要介護認定においては軽度の痴呆症の患者、徘徊などがあるが身体機能の低下が著しくないものは要介護認定が軽くなる結果を得た。これに対して主治医意見書の重要性、生物学的マーカの導入など検討を要することが示唆された。

E. 結論

要介護認定方法は痴呆症の認定については今後検討が必要である。

研究2：早期診断を目的とした神経心理テストの開発に関する研究

A. 研究目的

痴呆症のスケールには現在長谷川式簡易知能スケールやミニメンタルステート検査、西村式などがあるが痴呆症の有無を推定するための補助診断であり、早期診断を目的するものではなかった。そこで今回ドイツで開発されたスケールを日本語訳し、その有効性について検討した。

B. 研究方法

Ihrらが開発した痴呆症の早期診断テストを日本語訳した。この神経心理テストはアルツハイマー病の早期診断を目的に開発された全く新しいテストであり、点数は50点満点であり、34点以下において痴呆症の疑いありとされている。本研究では (

MMSEの得点が20点以上の高齢者で27人を対象とした。対象者の平均年齢は78歳であり、男性11名、女性16名であった。

C. 研究結果

結果を図1に示す。テストの結果は32点から46点に分布し、MMSEより加齢に伴う記憶障害の患者や痴呆でない患者の点が広く分布し、より鋭敏なテストであることが示された。基本的にMMSEと本スケールは相関するが、MMSEが25点以上であっても3名がスケールでは34点を下回り、痴呆の存在を推定された。

D. 考察

本スケールはドイツで開発されたものであるが、日本での使用も可能であり、今後はさらに症例をふやし、本スケールの早期診断の補助診断としての可能性について検討する必要がある。また本スケールに生物学的マーカや画像診断を併用することにより早期診断のシステムを検討し、発症が2年以内であり超早期の診断を行うことを可能にする予定である。今後の発展の可能性としては、このスケールの生物学的マーカを併用し、早期診断の確率をあげることである。共同研究者らとの協力により、今後の研究の発展をはかる計画である。

E. 結論

我々が導入した新しい神経心理テストは早期診断に有効である可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Hiroyuki Umegaki, Hroyuki Ikari,

Hideki Nakahata, Juri Yoshimura,
Hidetoshi Endo, Takayuki Yamamoto,
Akihisa Iguchi, Low plasma epinephrine
in elderly female subjects of demantia
of Alzheimer type, BRAIN
RESEARCH16261, 7,12,1999.

2. Hidetoshi Endo, Toshihisa Tajima,
Hisayuki Miura, Keiko Inoue, Calorie
intake and the frail elderly with
dementia, Annals of the New York
Academy of Sciences (in press).

3. 遠藤英俊、特集－ぼけとのおつきあい
痴呆の状態を介護保険の訪問調査員にわか
ってもらうために、毎日ライフ、毎日新聞
社、31,1,55-58,2000,1.

4. 遠藤英俊、特集21世紀へ向けての老年
医学、国立療養所中部病院、Geriatric
Medicine (老年医学)、ライフサイエンス、
37(3),377-381,1999.

5. 遠藤英俊、松永恵子、益田雄一郎、在
宅高齢者の医療と介護－医師の役割 在宅
高齢者の研究、JIM、医学書院、
9,5,428-429,1999

6. 遠藤英俊、益田雄一郎、井口昭久、高
齢者医療－現状と展望 介護保険体制下
における高齢者のケア、介護保険体制下の高
齢者医療における医師の役割、medicina、
36,5,823-827,1999

7. 遠藤英俊、チーム医療が患者の自立を
支える高齢者医療のモデル病棟、暮らしと
健康、保健同人社、6-7,1999

8. 遠藤英俊、田島稔久、益田雄一郎、伊
莉弘之、井口昭久、長寿科学研究の将来の
展望・抗痴呆薬の未来、Geriatric
Medicine (老年医学) 36(1):65-68,1998.

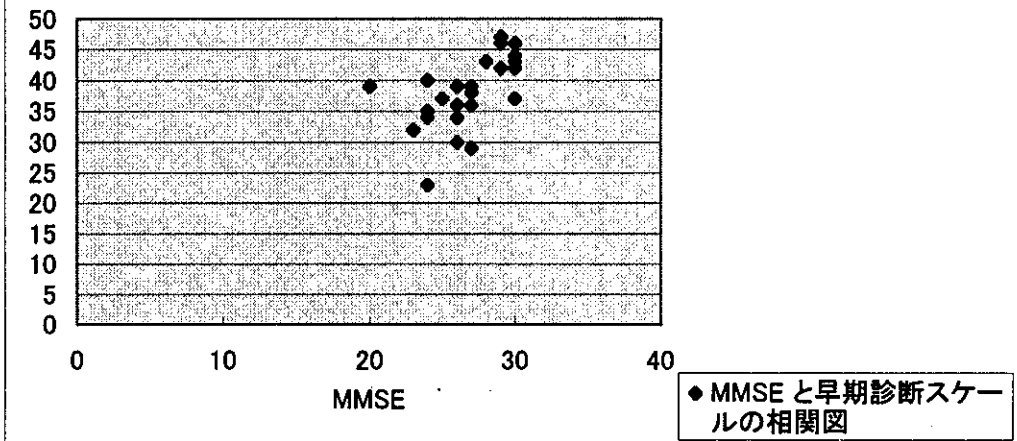
9. 遠藤英俊、介護保険標準テキスト、高

齢者ケアサービス体制委員会編、長寿開発
センター、東京、1998.

G. 知的所有権の取得状況

該当せず

図1 MMSE と早期診断スケールの相関



痴呆性神経疾患におけるタウアイソフォームに関する研究

分担研究者 森 啓 大阪市立大学医学部教授

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

A. 研究目的

＜目的＞アルツハイマー病を含む痴呆性神経疾患における脳病変である老人斑および神経原線維変化を構成する Abeta とタウは、病理学的診断だけでなく、生前の臨床診断にとっても有力なマーカー分子として広く認識され、その応用が期待されている。

髄液中に含まれる Abeta とタウ分子の定量についての研究が特に Abeta に集中してきた理由は、Abeta がアルツハイマー病に高い特異性をしめすことによる。しかしながら、Abeta はアルツハイマー病以外の痴呆症での関連性が低く、診断上での分子マーカーとしての有効性は低い。一方、タウはアルツハイマー病の診断には非特異的であるが、むしろ痴呆症という疾患群に直結する分子としての性格が注目されてきている。診断マーカーとしてのタウに関する問題点は広範な痴呆症を特異的に鑑別診断する方法の開発であり、そのための理論的、応用的研究が強く望まれている。

タウに関する病変として異常リン酸化が確立しており、リン酸化酵素とアミノ酸部位が詳細に検討されてきた。従来の研究ではタウのアイソフォームに関する視点が残されてきたであると言える。アイソフォームレベルでのリン酸化をはじめ病変担当分子としてのアイソフォームの同定に関する研究は、最近の FTDP-17 を始めとするタウオパチー研究の上からも最重要課題の1つであるといえる。本研究では、タウ分子を中心とした脳病変分子に注目し、痴呆症診断での臨床応用を目的とした場合の従来の問題点を解決し、診断マーカーとしての分子（及びその修飾）の確率をめざすものである。

B. 研究方法

(1) 生体試料 脳組織は凍結あるいはホルマリン固定後、5ミクロンに薄切したものをを用いた。Abeta およびタウに対する抗体を用いた免疫染色、HE 染色、生前の臨床経過から総合して確定診断された試料

を研究対象として用いた。

随液は、健常人あるいは患者と家族からインフォームドコンセントを得た場合に限って、研究対象とした。随液への多少の血液の混入は測定値に影響しないことを血液添加実験によって確かめておき、随液採取後は原則として室温にて3,000回転10分の遠心操作の上清を得、使用まで凍結保存する。

(2) タウアイソフォーム抗体の調製 全てのタウアイソフォーム特異抗体は各タウアイソフォームの領域特異的な合成ペプチドをデザインして免疫源とした。エクソン3と10の内部配列に対する抗体(E3、E10)は、ポリクローナル抗体のみを作製し、免疫に用いた合成ペプチドを結合させたカラムでアフィニティー精製した。

(3) ヒトタウアイソフォーム cDNAの大腸菌による発現 6種類のヒトタウアイソフォーム cDNAは以前クローニングしたものを使用した28-30。ヒトタウアイソフォーム cDNAは、全て大腸菌発現用のpETベクターに組み込み、大腸菌BL21に形質転換し終濃度0.3MのIPTGによってヒトタウアイソフォームタンパク質発現を誘導した。

(4) ウェスタンブロッティング ヒトタウアイソフォームを発現させた大腸菌を10%のポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、PVDF膜に転写した。転写した膜は、ブロッキング、一次抗体、ビオチン化2次抗体、アビチン-ビオチン複合体の

反応後、4-クロロ-1-ナフトールで発色させた。

(5) 免疫組織化学 ホルマリン固定、パラフィン包埋後、5ミクロン厚の脳切片を脱パラフィンした後、HE染色あるいは免疫組織染色をした。内因性ペルオキシダーゼ活性を阻害させる場合には、室温で30分間0.03%過酸化水素溶液中で処理した。

C. 研究結果

(1) これまでの脳病変(老人斑：図1、神経原線維変化：図2)と

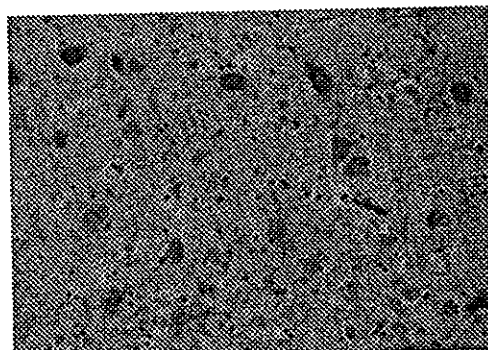


図1 神経原線維変化

アルツハイマー病側頭葉をホルマリン固定し、パラフィン包埋したものを脱パラ処理後、抗タウ抗体免疫染色した像である。x400で撮影。

痴呆症に関する研究成果は大きく2つに集約される。1つは、痴呆症とAbetaとの関係であり、他方は痴呆症におけるタウの分子解剖である。家族性アルツハイマー病の遺伝変異を持つ場合には、Abeta40、Abeta42/43が変異に応じて変化するが、孤発性アルツハイマー病患者の髄液におけるAbeta40、Abeta42/43

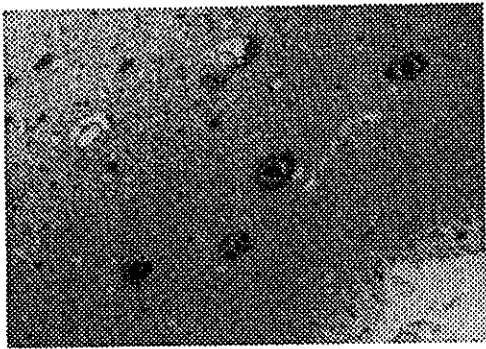


図2 老人斑

アルツハイマー病側頭葉をホルマリン固定し、パラフィン包埋したものを脱パラ処理後、蟻酸処理をして抗アミロイド抗体免疫染色した像である。x200で撮影。

に関する定量研究では、Abeta40は変化しないがAbeta42/43が低化することが示されてきている。さらにダウン症では、両Abeta分子種が共に上昇することが示されてきているが、臨床的痴呆症との関係についての研究が無かった。ここでは、染色体トリソミーを示すダウン症61例と染色体異常のない知的障害患者58例、健常人77例を用いて、その髄液中のAbetaタンパク定量を試みた。

ダウン症のAbeta40、Abeta42/43は、健常人あるいは知的障害患者のそれらと比較した場合、統計学的に有意差を持ってが上昇していた。しかしながら、知的障害患者と健常人では2種類のAbeta (Abeta40、Abeta42/43) について有意な差異は検出できなかった(表1)。この成果は統計学的にはネガティブではあるが、Abeta量が痴呆度とは相関

表1

ダウン症の血清中アミロイド蛋白の測定 (fmole/ml of plasma)

	Aβ40	Aβ42	Aβ42/Aβ40
ダウン症	306	62	0.21
正常	165	26	0.15
知的障害患者	191	28	0.15

しないことをしめす証拠として極めて重要な成果であると考えられる。つまり、痴呆症におけるAbetaは診断上、有意な場合においても臨床的には痴呆度を示す尺度としてはなり得ないことを示唆するものである。

本研究成果によって、Abetaを診断マーカーとする場合には、アルツハイマー病の場合に限って有効であり、しかもその定量的数値は痴呆臨床度をしめすものではないことを念頭に置くことがしめされた。

(2) 上記の結果からも、タウの重要性が少なくとも相対的に増加したと言える。ヒトタウはN末端側の45番目とチューブリン結合領域の275番目のアミノ酸の2カ所で、エクソン2、3、10領域挿入の有無によって6つのアイソフォーム(アミノ酸数352、381、383、410、412、441)に分けられる。本研究では各痴呆疾患でのタウ病変をタウアイソフォームレベルで診断しようとするもので、各アイソフォームを特異的に識別するように5種類の抗体がデザインした(図3)。6種類のタウを形成する違いを担う部位であるエクソン2、3を持たないア

イソフォーム特異抗体 (AJ)

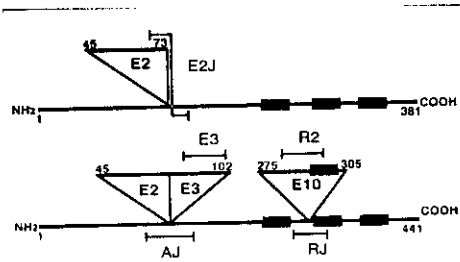


図3 抗原ペプチド

タウアイソフォーム抗体の抗原とする合成ペプチドはスプライシング部位を認識するようにデザインした。

は、エクソン1, 4を橋渡しするような抗原ペプチドを合成し、エクソン2だけを持つタウアイソフォーム特異抗体 (E2J) はエクソン2, 4を橋渡しするような抗原を合成した。エクソン3特異的ペプチドはエクソン2, 3をもつタウアイソフォーム特異抗体 (E3) 作成の抗原として合成した。エクソン10を持たない3リピートタウ特異的抗体 (RJ) は、エクソン9, 11を橋渡しするようにデザインし、エクソン10を持つ4リピートタウ特異的ペプチドはエクソン10もつ4リピートタウアイソフォーム特異抗体 (E10) 作成の抗原として合成した。

抗体の特異性の検討は、大腸菌を用いた非リン酸化タウ蛋白を用いて実証した (図4)。

次に、アルツハイマー病患者の海馬と前頭葉を対象として、作製した

タウアイソフォーム特異抗体を用いて免疫組織化学をおこなった。N末端側のタウアイソフォーム特異抗体であるAJ, E2J, E3こうたいとともに海馬と前頭葉に存在する神経原線維変化に明瞭な免疫染色が観察された。また、チューブリン結合領域に対する特異抗体であるRJ, R2抗体も同部位の神経原線維変化に強い免疫反応を認めた。抗体陽性

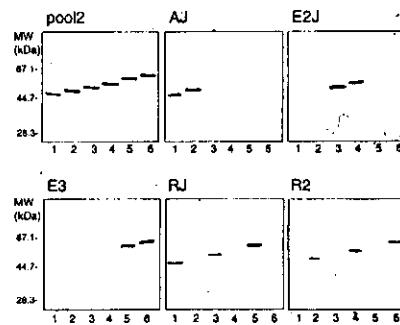


図4 タウアイソフォーム抗体

タウアイソフォーム抗体は大腸菌で発現させた6種類のヒト型タウ蛋白を用いてウェスタンブロットした。

の神経原線維変化数を観察すると、N末端側及びチューブリン結合領域に対するそれぞれの特異抗体間で認識される神経原線維変化数に大きな違いのあることを認めた。この結果より、アルツハイマー病の神経原線維変化は、大脳皮質の部位と関係なく6種類全てのタウアイソフォームが発現していることが示された。しかしながら、各抗体反応性の違いは極めて明瞭に認められている。この研究結果は神経原線維

変化におけるタウアイソフォームの不等量性を示唆するものであり、従来の PHF-tau での 6 種類のタウアイソフォームでの存在とは一致しない。

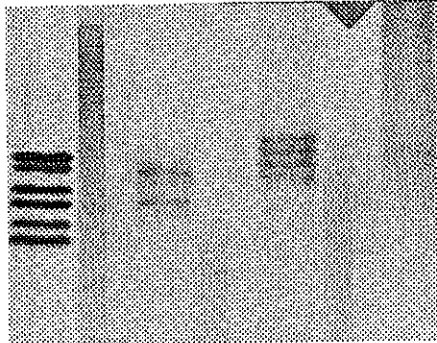


図5 PHF-tau

PHF-tau および smear-tau は正常人とアルツハイマー病凍結脳組織から調製した。左から、6種類の大腸菌発現タウ蛋白、正常タウ、PHF-tau、smear-tau を抗ヒトタウ抗体 (pool2) にてウェスタンブロット解析した。

すなわち、実際にアルツハイマー病患者脳組織から単離精製された PHF-tau では、5種類のアイソフォーム抗体とリピート特異的抗体 (pool2) とでは同様に等しく各タウアイソフォームを認識した (図5) が、本研究で調製した smear-tau は明らかに異なっていた。PHF-tau を除いた高度の不溶性タウを調製したところ、免疫組織化学的解析結果と一致する結果を観察することができた。これらの結果から、脳内病変として主要な神経原線維変化は6種類のタウアイソフォームが等モル分子含まれているというより、不均衡な状態にあることが判明した。

D. 考察

本研究では、アルツハイマー病神経原線維変化について集中して分析した結果を示している。ここで明らかになったことは、タウアイソフォームという視点で異常タウを見た場合、従来の異常タウとして知られる PHF-tau とは明らかに異なる smear-tau が生化学的に確立したことである。この smear-tau は神経病理学的な神経原線維変化 (アルツハイマー神経原線維) の主たる本体の構成成分であることが示唆されている。つまり、正常脳にある6種類のタウが異常リン酸化され PHF-tau が形成され、そのあとでアイソフォーム選別が生じて smear-tau が形成されると考えられる。この選別はタウ遺伝子に変異がないことからゲノム上での変化ではなく、post-translation の異常反応であると考えられる。この異常反応は今回初めてであり、従来から議論されてきた異

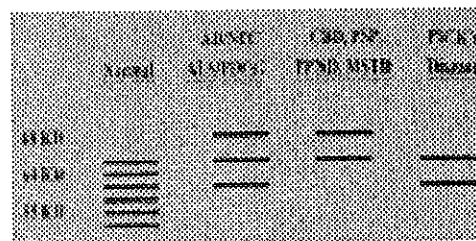


図6 タウオパチーにおけるタウアイソフォームの変化

各タウオパチー毎にタウアイソフォームが異なることが議論されている。図は Reed らの総説 (Reed, L.A. et al., (1998) J. Neuropathol. Exp. Neurol. 57, 588-601) より引用作成した。

常リン酸化とならび、アルツハイマー病を含む広範囲なタウオパチーで議論されていくことが要される。

ここで分析した異常タウはアルツハイマー病を用いた脳組織の結果であり、多くの痴呆症に見られるタウ封入体を含むタウの変化についてはこれからの課題である。この相違点を確立することが鑑別診断を進める上で有力な根拠になっていくものと期待される。事実、部分的ではあるが、タウアイソフォームの分析 (図6) が進みつつあり、疾患特異的な変化があることが有力になってきている。

E. 結論

6種類のタウアイソフォームを個別に認識する抗体を作成し、各抗体が免疫組織学的に、生化学的に特異的であることを見いだした。

F. 研究発表

1. 論文発表

原著論文

1) Arai, T., Ikeda, K., Akiyama, H., Haga, C., Usami, M., Sahara, N., Iritani, S., & Mori, H. (1999) *Acta Neuropathol.* 97, 82-84

A high incidence of apolipoprotein Eε4 allele in middle-aged non-demented subjects with cerebral amyloid β protein deposits.

2) Akiyama, H., Mori, H., Saido, T., Kondo, H., Ikeda, K., & McGeer, P.L. (1999) *Glia* 25, 324-331
Occurrence of the diffuse amyloid β-protein (Aβ) deposits with numerous Aβ-containing glial cells

in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease

3) Hong, C.-S., Caromile, L., Nomata, Y., Mori, H., Bredesen, D.E., & Koo, E.H. (1999) *J. Neurosci.* 19 (2): 637-643

Contrasting role of presenilin-1 and presenilin-2 in neuronal differentiation in vitro

4) Fukuda, H., Shimizu, T., Nakajima, M., Mori, H., & Shirasawa, T. (1999) *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 9 (7): 953-956

Synthesis, aggregation, and neurotoxicity of the Alzheimer's Aβ1-42 amyloid peptide and its isoaspartyl isoformers

5) Arai, T., Akiyama, H., Ikeda, K., Kondo, H., & Mori, H. (1999) *Brain Res.* 823 (1-2): 202-206

Immunohistochemical localization of amyloid beta-protein with amino-terminal aspartate in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease

6) Lippa, C. F., Ozawa, K., Mann, D. M., Ishii, K., Smith, T. W., Arawaka, S., & Mori, H. (1999) *Arch Neurol.* 56 (9): 1111-1118

Deposition of beta-amyloid subtypes 40 and 42 differentiates dementia with Lewy bodies from Alzheimer disease

総説

1) Tomiyama, T., Corder, E.H., & Mori, H. (1999) *Cellular and Molecular Life Sciences* 56, 268-279
Molecular pathogenesis of apoE-associated late-onset Alzheimer's disease

2) 佐原成彦, 森 啓 (1999) *医学のあゆみ* 189 (1), 37-42

系統学的見地からみたプレセニリンの蛋白構造

に関する生物学的意義

3) 村山繁雄、森 啓 (1999) Clinical Neuroscience 17 (8), 64-65

神経原線維変化型痴呆: Tauopathy とは

4) 森 啓 (1999) 神経研究の進歩 43 (6), 838-844. 特集: 第34回脳のシンポジウムー痴呆性疾患の細胞障害分子機構

アルツハイマー病とタウオパチー

5) 森 啓 (1999) 実験医学 17, 2224-2230. アルツハイマー病とその関連疾患

6) 新井哲明、森 啓 (2000) カレントセラピー 18 (4), 629-632.

神経原線維変化とタウ蛋白

2. 学会発表

国内学会

1) 森 啓 (1999) 第34回脳のシンポジウム・シンポジウム「痴呆性疾患の細胞障害分子機構」(東京; 杏林大学医学部臨床講堂, 3月19~20日)

「アルツハイマー病とその関連疾患」

2) 富山貴美、荒若繁樹、森 啓 (1999) 第22回日本神経科学大会・シンポジウム「変性性痴呆とタウ蛋白の病理」(大阪; 大阪南港・アジア太平洋トレードセンター, 7月6~8日)

「神経変性疾患とタウ蛋白アイソフォーム」

3) 富山貴美、森 啓 (1999) International Symposium on Dementia・Symposium 3 Pathogenesis of Dementia-Tau (神戸; International Conference Center Kobe, 9月

11~13日)

“The effect of tau mutations on cytoskeletal networks of microtubules and cell organelles”

4) 富山貴美、森 啓 (1999) 第42回日本神経化学会(広島; 広島国際会議場, 9月15~17日) シンポジウム: オーガナイザー「神経老化の最前線」

「D-アミノ酸と神経の老化」

5) 清水孝彦、福田宏之、中島光業、森 啓、白澤卓二 (1999) 第42回日本神経化学会(広島; 広島国際会議場, 9月15~17日)

異性化アミロイドβの凝集特性

6) 亀谷富由樹、田中喜久子、宇佐美美穂子、丸山敬、森 啓 (1999) 第42回日本神経化学会(広島; 広島国際会議場, 9月15~17日)

アルツハイマー病原因遺伝子産物プレセニリンとAβアミロイド前駆体タンパク質のC末断片の関係について

7) 森 啓 (1999) 第18回日本痴呆学会・シンポジウム: オーガナイザー「タウの変異と神経変性のメカニズム」(熊本; 熊本市産業文化会館, 10月7~8日)

タウオパチー研究に望んでいること

8) 亀谷富由樹、田中喜久子、関島良樹、徳田隆彦、池田修一、森 啓 (1999) 第18回日本痴呆学会(熊本; 熊本市産業文化会館, 10月7~8日)

脳膜確間のプレセニリン1およびアルツハイマーアミロイド前駆体タンパク

9) 玉岡晃、宮武史子、松野佐好子、石井一弘、

庄司進一、佐原成彦、森 啓 (1999) 第 18 回
日本痴呆学会 (熊本; 熊本市産業文化会館、10
月 7~8 日)

アルツハイマー病脳における脂質過酸化とアミ
ロイドβ蛋白やAPOE 遺伝子型との相関

10) 森 啓、富山貴美 (1999) 大阪大学蛋白質
研究所セミナー・シンポジウム「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」(大阪; 大阪大学微生物病研究所
講堂、11月25~26日)

「ニューロン内異常フォールディング蛋白の病
理的意義—アルツハイマー病神経原線維変化
を例として」

国外学会

1) Sahara, N., Arawaka, S., Tomiyama, T., Lee, G.,
Schellenberg, G.D. & Mori, H. (1999) Society for
Neuroscience 29th Annual Meeting for

Neuroscience (Miami Beach, Oct. 23-28)

The tau mutation (Val 337 Met) disrupts
cytoskeletal networks of microtubules

2) Tomiyama, T., Arawaka, S., & Mori, H. (1999)
Society for Neuroscience 29th Annual Meeting for
Neuroscience (Miami Beach, Oct. 23-28)

Molecular anatomy of tau inclusions in AD brain
using tau isoform-specific antibodies

3) Mori, H., Sahara, N., Tomiyama, T., Arawaka, S.,
Yamashita, T., Kosaka, S., Takuma, H., & Lee, G.
(1999) American Society for cell biology 39th
Annual Meeting for Cell Biology (Washington,
DC, Dec. 11-15)

The effect of tau mutation on cytoskeletal networks
of microtubules and cell organelles

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）
（分担）研究報告書

アルツハイマー病診断の生物学的物質と危険因子

分担研究者 宇野正威 国立精神神経センター武蔵病院 副院長

研究要旨 アルツハイマー病 (AD) 診断の生物学的物質としての脳脊髄液中のアミロイド P コンポーネント (APC) について、また AD 発症の危険因子についてアポリポ蛋白 E 遺伝子多型を踏まえて検討した。この結果、APC については疾患特異性はないものの AD の重症度とともに低下することが明らかになった。したがって診断マーカーとして従来から注目されてきたタウと組み合わせることで AD 早期診断の精度を向上しうるものと考えられる。危険因子研究では、新たな所見として、短時間の昼寝習慣をもつことが遺伝子多型を問わず AD 発症に予防的に働くという結果が得られた。

分担研究者 宇野正威
国立精神神経センター武蔵病院副院長

研究協力者 朝田隆
国立精神神経センター武蔵病院部長

A. 研究目的

アルツハイマー病 (AD) 診断の生物学的マーカーとして今日ほぼ評価の定まったものに脳脊髄液中のタウがある。またアミロイド β 42 についても多くの検討がなされ、重症度との逆相関を指摘するものが多い。アミロイド P コンポーネント (APC) はアポリポ蛋白 E と同様に AD 脳の病理学的ハルマーカーとされる老人斑に存在する物質である。ところが従来、AD 診断指標としての脳脊髄液中の APC の意義は十分に検討されていない。この点を明らかにすることを研究目的の 1 つとした。

次に AD 発症の危険因子 (RF) については近年多くの研究がなされてきた。ところが AD 発症におけるアポリポ蛋白 E 遺伝子多型 (APOE) の意義が確立したことで RF 研究も大きく変化しつつある。

つまり APOE のタイプを踏まえた上で RF を評価するの でなければ臨床的有用性は乏しい。つまりこれまで注目されてきた RF は一律に効果を発揮するのではなく、遺伝子型によってもたらす効果も違うのかもしれない。このような観点から代表的とされる RF の候補ならびに、短時間の昼寝について検討することを第 2 の目的とした。

B. 研究方法

1) APC

対象は平均年齢 71.8 (SD8.8) 歳、72 名 (男性 31 名) の AD 患者 (NINCDS-ADRDA criteria) である。

全てのAD患者に対してCT, MRI, SPECT検査を行い、MMSEを始めとする各種の神経心理学的検査も行った。対照として11名の前頭葉痴呆患者、9名の正常者を設定した。

脳脊髄液中のAPCはRIA法により定量した。またタウと β 42についても測定した。その結果からAPCが疾患特異性をもつか否か、MMSEの得点を基準とした重症度と相関するか否かを検討した。

2) 危険因子 (RF)

武蔵病院のもの忘れ外来を受診したAD患者401名を対象にした。また対照として主に患者の配偶者からなる健常者315名を設定した。RFの候補としては従来から検討、報告されてきたものの中から17要因を選んだ。回答は患者の子に依頼した。予備的に回答の信頼性検討を行い、それが確認された17の項目を実際に検討した。またこれらの対象と対照の全てにおいてAPOE検査を行った。

以上の研究は武蔵病院倫理委員会の承認を得て、患者、対照から書面によるインフォームドコンセントを得た上で行った。

C. 研究結果

1) APC

APCの測定値は3つのグループ間で差異を認めなかった。ところがMMSEの得点をADの重症度の指標としたとき、得点と測定値の間には正の相関が認められた。すなわちADの重症化に伴ってAPCは低値となる。

なお従来報告と同様にタウはADに特異的であったが β 42については特異性は認められなかった。

2) RF

まず16項目にAPOEを加えた17要因についてロジスティックリグレッション解析を行った。結果概要では従来からの報告と同様に年齢が高いこと、女性であること、家族歴があることが危険因子として指摘された。またAPOEが4型であれば危険性がますますも確認された。さらに30分以内の昼寝の習慣があることが発症に対して予防的に働くという結果が得られた。

APOEが4であるか否かで危険因子は異なるかを検討したところ、昼寝はいずれの群でも予防的に働くことがわかった。また4でないグループでは教育も予防効果をもつことが示唆された。

個別には世界的に注目されてきた喫煙の予防効果および今回明らかになった昼寝の予防効果について詳しく検討した。喫煙については最近オランダのグループがAPOE遺伝子が4の者にとっては予防的に、そうでない者にとっては促進的に働くと報告した。そこでオランダの報告と同様の統計手法を用いて、喫煙の影響を検討した¹⁾。その結果、我々の対象においてはAPOE遺伝子が4であるか否かを問わず喫煙とAD発症との間には何らの関係もないことが明らかになった。

次に短時間の昼寝習慣は、高齢者の心身の健康に貢献するのではないかと近年注目されるようになったものである。従来うたた寝が多くなることは医学的には心身機能衰退の兆しとされた。そこで昼寝の長さも重要と考え、30分まで、60分まで、60分以上と分類して検討した。なおここでいう昼寝はAD発症の5から10年前のものを