

とするよりAPPCTFの輸送を担い、輸送に障害が生じるとA β 42活性が上昇すると推定された。今回の実験結果では突然変異自身の効果というより遺伝子発現量効果が示された内容になっている。このことは、細胞内のプレセニリン1代謝回転が変異によって変化する事を示唆しており、最近のERストレス説で唱えられているプレセニリン1, APPタンパクのER滞留延長病因論とも一致した結果であると考えられる。

E. 結論

PS1の変異効果は、小胞体分画におけるアミロイド蛋白を産生するAPP断片の濃度上昇を引き起こす。その結果、特にA β 1-42/43の産生の亢進をもたらすことが明らかとなった。

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 E ϵ 4 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 (A β) deposits with numerous A β -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 A β 1-42 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

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)

脳膜確聞のプレセニリン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ー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学的意義ー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

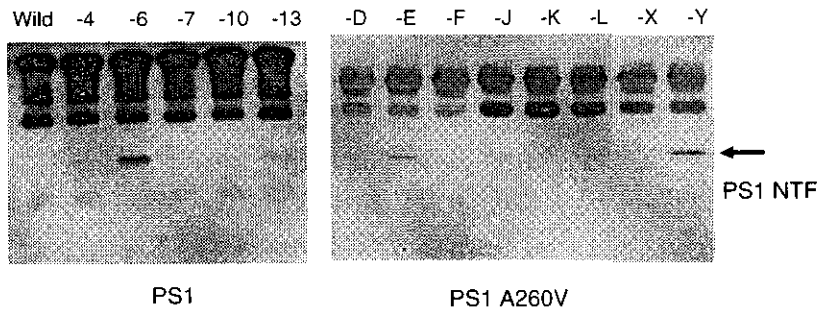


図1 ヒトプレセニリン1 (PS1) および変異型プレセニリン1 (PS1A260) 導入PC12D安定株におけるPS1蛋白の同定

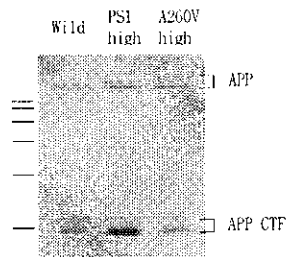


図2 PC12D細胞におけるアミロイド蛋白前駆体 (APP) およびその分解産物 (CTF) full-sizeのAPPからAPP CTFを経てアミロイド蛋白が産生される

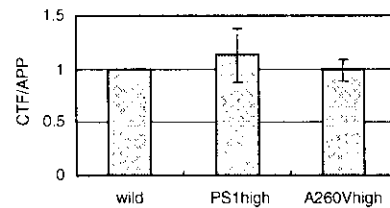


図3 ヒトプレセニリン1 (PS1) を導入したPC12D細胞におけるアミロイド蛋白前駆体 (APP) と分解産物 (CTF) 比の解析

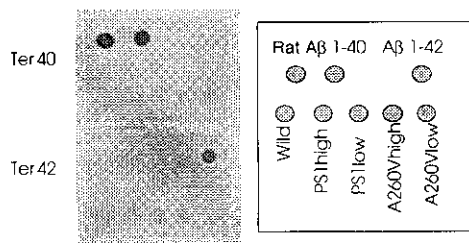


図4 PC12D細胞におけるアミロイド蛋白の反応性
ドットプロットによるPC12D細胞における2種類のアミロイド蛋白 ($A\beta$ 1-42/43, $A\beta$ 1-40) をアミロイド蛋白カルボキシル末端特異抗体 (Ter-42、Ter-40) によって検出した。

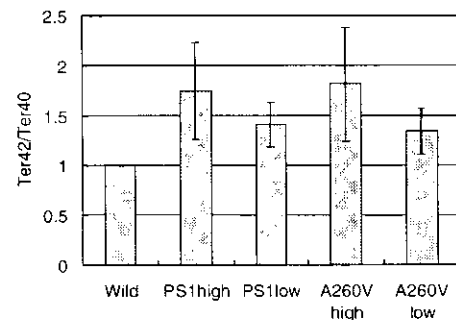


図5 PC12D細胞におけるアミロイド蛋白の解析

厚生省科学研究費補助金 (特定疾患対策研究事業)
 アミロイドーシスに関する研究 分担研究報告書

アルツハイマー病 β アミロイド線維の試験管内形成反応 における β ペプチド 1-42 と 1-40 の相互作用

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 アルツハイマー病 β アミロイド線維形成について、 $A\beta(1-42)$ が核になり、これに $A\beta(1-40)$ が結合して線維を形成すると言う仮説が提唱されている。我々は今回、 β アミロイド線維形成過程における $A\beta(1-42)$ と $A\beta(1-40)$ の相互作用の速度論的解析を、重合核依存性重合モデルに基づいて行った。 $A\beta(1-42)$ と $A\beta(1-40)$ が共存する場合、核形成過程では互いに抑制的に作用し、反応を遅らせた。同種の核とモノマーによる伸長反応は迅速に進行したが、異種の核とモノマーによる伸長反応はラグタイムを伴い、平衡に達するまで長時間を要した。 $A\beta(1-42)$ と $A\beta(1-40)$ の混合溶液中では、 $A\beta(1-42)$ が核形成を行い、 $A\beta(1-40)$ のアミロイド線維形成を開始させることが示された。これらの反応は重合核依存性重合モデルを用いて説明可能であった。今回の研究より、 $A\beta(1-42)$ が脳内 β アミロイド線維形成に重要な役割を果たしていることが示唆された。

A. 研究目的

アルツハイマー病患者脳に蓄積する β アミロイド線維形成について、 β ペプチド 1-42 [$A\beta(1-42)$]と β ペプチド 1-40 [$A\beta(1-40)$]が重要であることが示されている。脳内の $A\beta(1-42)$ の濃度は $A\beta(1-40)$ に比較して少ないにもかかわらず、 $A\beta(1-42)$ の方が早期に脳に沈着し、後期に $A\beta(1-40)$ が沈着することが報告されている。以上の事実より $A\beta(1-42)$ 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言う説が提唱されている。我々は、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。今回我々はこのモデルを用い、 $A\beta(1-42)$ と $A\beta(1-40)$ の線維形成を速度論的に解析し、核形成過程と線維伸長過程における相互作用を明らか

かにしたので報告する。

B. 研究方法

化学合成した $A\beta(1-42)$ の1ロット(自発重合性)と、 $A\beta(1-40)$ の2ロット(自発重合性と非自発重合性)を用いた(Bachem AG, Bubendorf, Switzerland)。核形成過程と線維伸長過程の両方を含む線維形成反応では、0~60 μ Mの $A\beta(1-42)$ と $A\beta(1-40)$ の一方または両方を50mMリン酸緩衝液(pH 7.5)、100mM NaCl中37 $^{\circ}$ Cでインキュベートし、経時的にアミロイド線維量を定量した。線維伸長反応では上記の反応系に、あらかじめ形成した線維の5~20ng/ μ lを核として添加した。反応溶液は4 $^{\circ}$ Cで調製し、37 $^{\circ}$ Cに温度を上昇させることで反応を開始し、4 $^{\circ}$ Cに温度を低下させることで反応を停止した。アミロイド線維量は、チオフラビン T を用いた分光蛍

光法により定量した。アミロイド線維形態は、ネガティブ染色後、電子顕微鏡により観察した。

C. 研究結果

1) $A\beta(1-42)$ と自発重合性 $A\beta(1-40)$ をそれぞれ単独でインキュベートし線維形成反応を測定した。いずれも自発的に核形成を行い、アミロイド線維を形成した。この時アミロイド線維形成のタイムコースはシグモイド型であった。 $A\beta(1-42)$ は重合速度が速く、1時間程度で平衡に達するのに対し、 $A\beta(1-40)$ は重合速度が遅く、平衡に達するまでに5時間以上を要した。電子顕微鏡による形態観察では、 $A\beta(1-42)$ 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) $A\beta(1-42)$ と自発重合性 $A\beta(1-40)$ 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(図 1 A, B)。線維伸長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線維伸長反応では、タイムコースはラグタイムのない双曲線を描いて迅速に進行し、30分以内に平衡に達した。

4) $fA\beta(1-42)$ と非自発重合性 $A\beta(1-40)$ モノマーによる異種の線維伸長反応を検討した。反応速度は同種の場合に比較して遅く、平衡に達するまでに1~2日を要した。この時、タイムコースはシグモイド曲線を描いた。また、電子顕微鏡観察により $fA\beta(1-40)$ の形成を確認した。

5) 脳内で生じていると考えられるアミロイド線維形成過程モデルを構築した。すなわち、非自発重合性 $A\beta(1-40)$ に、 $A\beta(1-42)$ を添加しインキュベートした。混合比は脳内での濃度比に合わせて、5:1あるいは10:1で添加した。この時先程の抑制効果とは反対に、数日かかってではある

が、アミロイド線維量がシグモイドカーブを描いて増加した(図 2)。また、ラグタイムは $A\beta(1-42)$ の濃度に依存して短縮された。電子顕微鏡観察により $fA\beta(1-40)$ の形成を確認した。従って、 $A\beta(1-42)$ と非自発重合性 $A\beta(1-40)$ の混合溶液中では、 $A\beta(1-42)$ が核形成を行い、これに $A\beta(1-40)$ が重合して $fA\beta(1-40)$ が形成されることが示された。

D. 考察

脳内でのアミロイド形成モデル、すなわち、 $A\beta(1-42)$ と $A\beta(1-40)$ が相互作用してアミロイド線維を形成する過程を重合核依存性重合モデルを用いて示す(図 3)。

1) 核形成過程。 $A\beta(1-42)$ は一種類の時、相互作用をして核を形成すると考えられる(図 3 A)。ここに $A\beta(1-40)$ が混入すると、抑制的な相互作用により核形成過程の速度は遅くなるが、数日後には核が形成されると推定される(図 3 B)。

2) 線維伸長過程。核あるいは線維断端とモノマーが同種の場合にはモノマーが速い速度で順次結合していくと考えられる(図 3 C)。これに対し $A\beta(1-42)$ 型線維断端と $A\beta(1-40)$ モノマーの異種の組み合わせの場合には、初期には異なった構造のものが結合するため反応が遅く、その後ある程度の $A\beta(1-40)$ が結合すると同じ構造の断端が形成され、急速に反応が進むと推定される(図 3 D)。

E. 結論

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、脳内における β アミロイド線維形成において、 $A\beta(1-42)$ が核形成を行い、アミロイド線維形成反応全体の速度を決めていることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

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

2. 学会発表

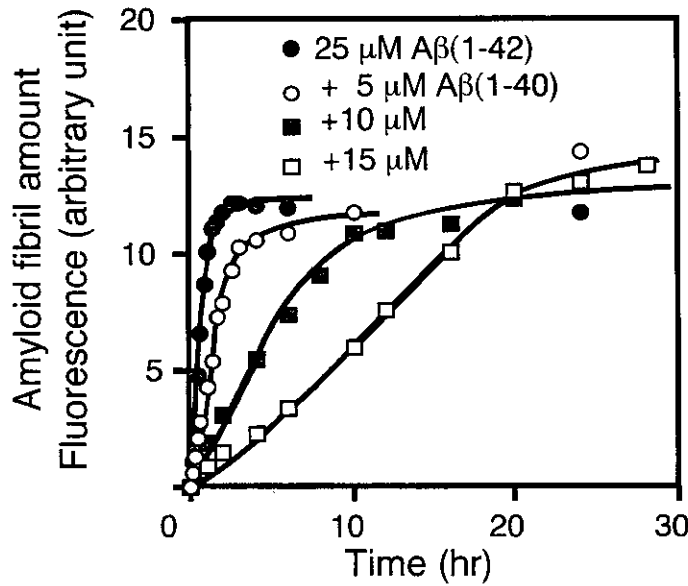
1)長谷川一浩、小俣三郎、内木宏延、アルツハイマー病 β アミロイド線維の試験管内伸長反応における β ペプチド 1-42 と

1-40 の相互作用の検討、第 88 回日本病理学会総会(平成 11 年 4 月)。

2)長谷川一浩、内木宏延、アルツハイマー病 β アミロイド線維の試験管内伸長反応における β 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(平成 11 年 6 月)。

3)長谷川一浩、小俣三郎、内木宏延、アルツハイマー病 β アミロイド線維の試験管内伸長反応における β ペプチド 1-42 と 1-40 の相互作用解析、日本生物物理学会第 37 回年会(平成 11 年 10 月)。

A. $A\beta(1-42)$ ペプチドからの $A\beta(1-42)$ 型線維形成反応に対する $A\beta(1-40)$ の抑制効果.



B. $A\beta(1-40)$ ペプチドからの $A\beta(1-40)$ 型線維形成反応に対する $A\beta(1-42)$ の抑制効果.

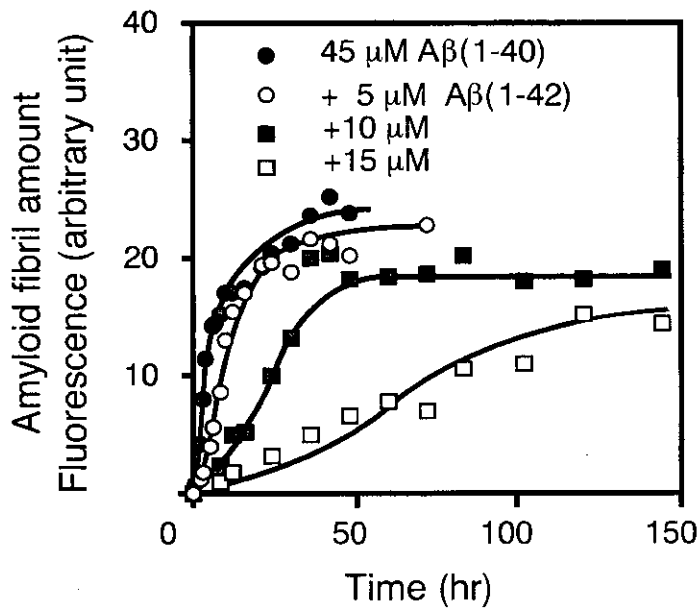


図 1. $A\beta$ 線維形成反応速度に対する $A\beta(1-42)$ と $A\beta(1-40)$ の相互作用

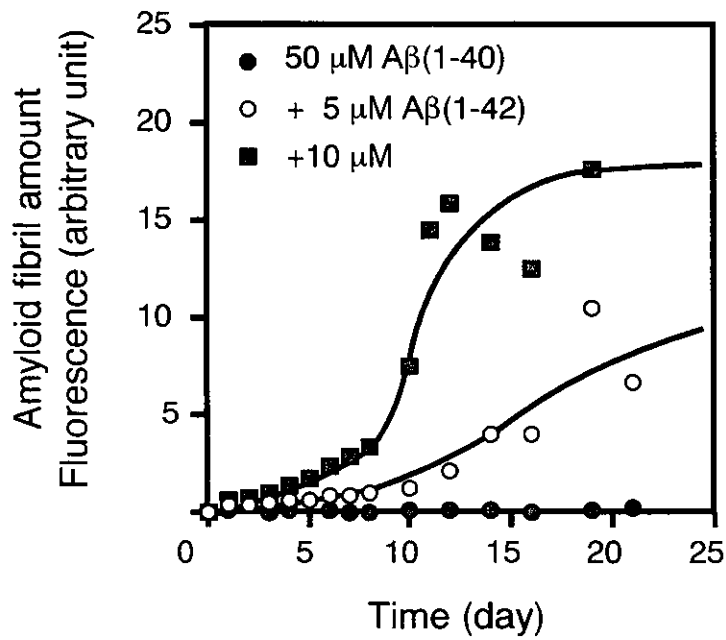
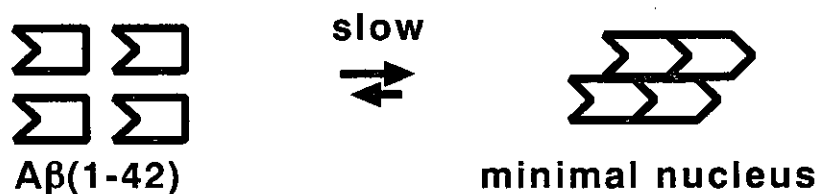
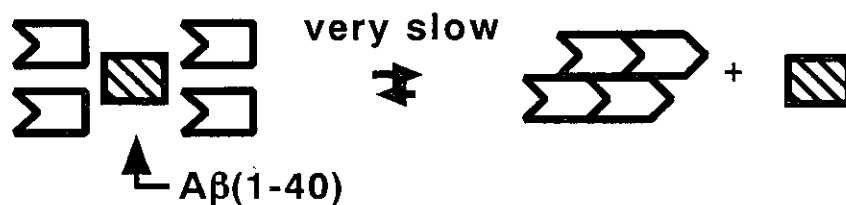


図 2. $\text{A}\beta(1-42)$ と非自発重合性 $\text{A}\beta(1-40)$ のアミロイド線維形成における相互作用

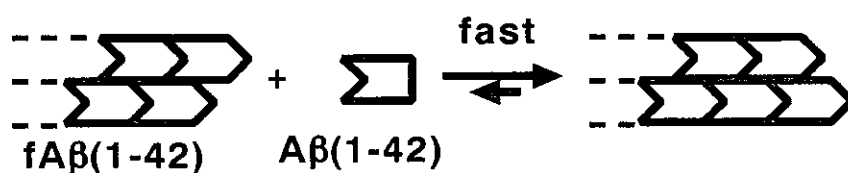
A 核形成過程



B 核形成過程における抑制的相互作用



C 同種の線維とペプチドによる伸長過程



D 異種の線維とペプチドによる伸長過程

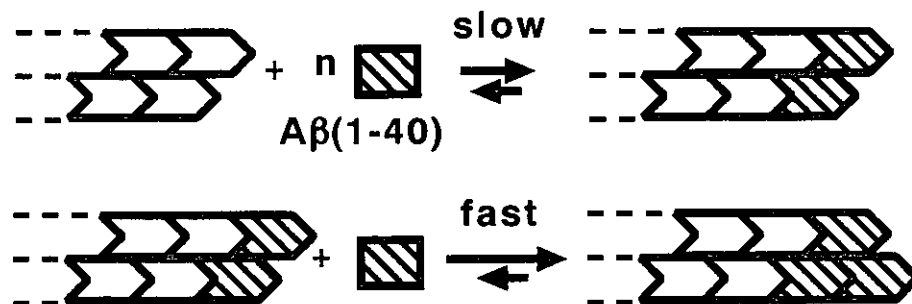


図 3. $A\beta(1-42)$ と $A\beta(1-40)$ の核形成過程と伸長過程における相互作用のモデル

厚生省科学研究費補助金 (特定疾患対策研究事業)
 アミロイドーシスに関する研究 分担研究報告書

脳アミロイド沈着におけるリポ蛋白フリー A β の役割

分担研究者 東海林幹夫 群馬大学神経内科 講師

研究要旨 本研究ではアルツハイマー病における病態として可溶性 A β とリポ蛋白の相互作用バランス障害に注目して、その可能性を検証した。健常者においてはリポ蛋白結合型、非結合型 A β は 9:1 の平衡状態にあるが、アルツハイマー病においてはこのバランスが崩れ、リポ蛋白フリー A β 42 の質的増加をきたしていることが明らかとなった。さらにダウン症候群ではこのリポ蛋白フリー A β の量的増加を明らかとした。本研究から脳アミロイドーシスにおいては、可溶性 A β とリポ蛋白の相互作用バランス障害が生じ、何らかの機序でリポ蛋白から過量の A β が release される状態に至り、正常のリポ蛋白に追従した catabolic pathway が障害される結果、フリー A β は様々な chemical modification を受ける中で conformation 変化を起こし、fibril 形成に至ると考えられた。

A. 研究目的

アルツハイマー病脳の amyloidogenic pathway においては可溶性 A β が、何らかの機序で β シート構造をとり、アミロイド線維形成がなされると考えられている。一方、血液中での可溶性 A β は、HDL 粒子上のアポリポ蛋白 J と結合し、単に水溶化された形でなく脂溶化された状態で存在し、その solubility の維持と血液からのクリアランスがなされている。この可溶性 A β の尿中排泄量は全流血中の 1% 以下であり、その主たる catabolic pathway としては肝臓が key organ であると考えられる。従ってリポ蛋白結合型 A β は non-amyloidogenic、リポ蛋白フリーな可溶性 A β は amyloidogenic な分子種に相当する。リポ蛋白と可溶性 A β の結合解離は、その clearance 障害の結果、血液中での amyloidogenic な可溶性 A β 分子種の増加、ひいては血液脳関門を介した脳内可溶性 A β の濃度増加をきたし、脳内

での amyloidogenic pathway 促進に貢献すると考えられる。本研究では、こうした可溶性 A β の異化過程の障害がアルツハイマー病の A β アミロイド線維形成に果たす役割を明らかにするため、実際の amyloidogenic なリポ蛋白フリー可溶性 A β 分子種がどの程度生体内に存在し、生理的また病的な条件下で、その質的、量的相違が見られるかどうかの検討を本研究の目的とした。

B. 研究方法

検討対象は孤発性アルツハイマー病患者 42 例、健常者 88 例、さらに 39 例のダウン症候群患者である。血漿中 A β 濃度、さらに血漿より超遠心にて分離したリポ蛋白(VLDL から 1.25g/L 密度の VHDL を含む全リポ蛋白)とリポ蛋白フリー血漿中の A β 濃度は、武田薬品の鈴木先生が開発された A β 40/42 を高感度特異的に認識する sandwich ELISA(A β 40: BNT77/BA27;

A β 42: BNT77/BC05) を用いて行った。血中 A β 全分子種定量を目的とし、さらに血中に認められるマウス IgG と非特異的に反応する抗体の干渉を避けるため、capture 用抗体は A β 11-16 を特異的に認識する BNT77(IgA)を用いた。

C. 研究結果

リポ蛋白結合型およびリポ蛋白フリーな可溶性 A β の生理的加齢変動：30 歳を区切りに若年、中年、高年の 3 群に分け、リポ蛋白結合型およびリポ蛋白フリーな可溶性 total A β (=A β 40+A β 42) を検討すると、両者に 60 歳以降での加齢変動が明らかとなった(表 1)。この増加は A β 40 によるものであり、A β 42 にはこうした生理的な加齢変化は認められなかった。全血漿中に占めるリポ蛋白フリー A β の割合を求めると、興味深いことに、年齢に関わらず約 10%がリポ蛋白フリーな状態で存在していた。すなわち生理的な条件下では、血漿中の A β は 90%がリポ蛋白結合型、残り 10%がリポ蛋白フリーな状態で存在しそのバランスが保たれていることが明らかとなった。

アルツハイマー病におけるリポ蛋白結合型およびリポ蛋白フリーな可溶性 A β ：次に、病的な条件下ではこのバランスにいかなる変化が生じているのかを明らかにする目的で、孤発性のアルツハイマー病患者にて同様の検討を加えた。表 1 に示したようにアルツハイマー病患者においては、リポ蛋白結合型とフリーな A β の双方でそのトータル量が増加している傾向が認められた。全血漿中に占めるリポ蛋白フリーな total A β の割合の増加は age-match させた健常老年者の 10% に対し 12%と軽度にとどまり、両群間で大きな量的な相違はみられなかった。しかしながら、全血漿中に占めるリポ蛋白

フリーな A β 42 に目を転じると、健常者では 1.8%のところ、アルツハイマー病では 5.9%と 3 倍以上の優位な上昇を認めた。その絶対量の比較でも、リポ蛋白フリーな total A β 量は健常老年者の 1.2 倍に対し、リポ蛋白フリーな A β 42 の場合は 3.6 倍と著明な上昇が認められた。これに伴う相補的なフリー A β 40 減少もアルツハイマー病患者で明らかとなった。従って、アルツハイマー病では健常老年者と異なり、よりアミロイドジェニクな A β 42 の増加という質的な相違の存在がその病態形成に特徴的な所見と考えられた。実際にどの程度質的相違が存在するのかを比較検討した結果を表 2 に提示する。健常対照者ではリポ蛋白フリーな A β 42 はそのトータル量の約 18%を占めているのに対して、アルツハイマー病患者では約 44%と増加し、リポ蛋白フリー分画での両者の構成比率の相違が明らかである。

以上の結果は、生理的な条件下では厳密に保たれている可溶性 A β とリポ蛋白の相互作用のバランスが、アルツハイマー病では amyloidogenic なリポ蛋白フリー可溶性 A β 42 の増加という質的障害として確かに存在していることを示したものである。

ダウン症候群におけるリポ蛋白結合型およびリポ蛋白フリーな可溶性 A β ：こうした可溶性 A β とリポ蛋白の相互作用のバランス障害が、脳 A β アミロイドシスの基本的な病態であることを検証するため、ダウン症候群 39 例にて同様の検討を行った。脳内に老人斑として congo-red 陽性の fibrillar deposit が出現し始める 30 歳を critical age とし、30 歳未満(5 例)および 30 歳以上(34 例)で分けた 2 群とこれに age-match した健常対照群(30 歳未満 21 例および 30 歳以上 32

例)との間でリポ蛋白結合型、非結合型 A β の検討を行った。表 3 に示したごとく、リポ蛋白フリー A β 40 は約 4 倍、42 では約 2.5 倍の増加が認められ、全血漿濃度の約 2 倍増加を有に上回った。この増加に一致して、全血漿中に占めるリポ蛋白フリー A β の割合も 30 歳未満では 21.8%、30 歳以上でも 16.1%と著明な上昇を認めた。この結果はダウン症候群でも可溶性 A β とリポ蛋白の相互作用のバランスの障害が確かに存在し、しかも脳内で congo-red 陽性の fibrillar deposit の出現する以前から認められることから、リポ蛋白フリー A β はダウン症候群で認められる早期アルツハイマー病脳病変出現に密接に関わっている可能性を示唆するものと考えられた。

D. 考察

可溶性 A β とリポ蛋白の相互作用のバランス障害がアルツハイマー病ではリポ蛋白フリー A β 42 の増加という質的な変化で、ダウン症候群では量的な変化という形で存在していることが、本研究で明らかとなった。アルツハイマー病患者およびダウン症候群における脳アミロイドーシスでは、何らかの機序でリポ蛋白から可溶性 A β の release が誘発され、結果的にフリー A β が増加する病態が想定された。こうした条件下では、可溶性 A β のクリアランス障害が引き起されるばかりではなく、A β 自身がよりアミロイドジェニクな conformation への移行を促される環境下にさらされていると推測される。髄液中でも可溶性 A β はリポ蛋白と大多数が結合して存在しているため、脳内の可溶性 A β にも同様な機序の存在が想定され、こうしたリポ蛋白フリーな脳内 A β こそがアミロイド線維の前駆体と考えられる。猿においては動注されたフリー A β が選択的に老人斑に結合するこ

とが示されており、血漿中リポ蛋白フリー A β の増加は血液中での異化障害を誘発し、結果的にその血液脳関門を介した脳へのエントリーを増加させ、脳内可溶性 A β 濃度増加をきたし、脳内のアミロイド線維形成に貢献すると考えられる。

E. 結論

脳アミロイドーシスにおいては、可溶性 A β とリポ蛋白の相互作用バランス障害を生じ、何らかの機序でリポ蛋白から過量のフリー A β が release されている状態に至り、正常のリポ蛋白に追従した catabolic pathway が障害される病態と相まって、フリー A β は様々な chemical modification を受ける中で conformation 変化を起こし、fibril 形成に至ると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shoji M, Kawarabayashi T, Sato M, Sasaki A, Saido TC, Matsubara E, Tomidokoro Y, Kanai M, Shizuka M, Ishiguro K, Ikeda M, Harigaya Y, Okamoto K, Hirai S: Age-related amyloid _ protein accumulation induces cellular death and macrophage activation in transgenic mice. **J Pathol** (in Press)
- 2) Shoji M, Harigaya Y, Sasaki A, Ishiguro K, Matsubara E, Watanabe M, Ikeda M, Kanai M, Tomidokoro Y, Shizuka M, Amari M, Kosaka K, Nakazato Y, Okamoto K, Shunsaku Hirai S: Accumulation of NACP/ α -synuclein in Lewy body disease and multiple system atrophy. **J Neurol Neurosurg Psychiatry** (in press)
- 3) Shoji M, Kawarabayashi T, Matsubara E, Ikeda M, Ishiguro K, Harigaya Y, Okamoto K: The distribution of the

- amyloid _ protein precursor in the Alzheimer's disease brain. **Psychiat Clin Neurosci** 2000;54:45-54
- 4) Ikeda Y, Shizuka M, Watanabe M, Okamoto K, Shoji M: Molecular and clinical analysis of spinocerebellar ataxia type 8 in Japan. **Neurology** 2000;54:950-55
 - 5) Matsubara E, Ghiso J, Frangione B, Amari M, Tomidokoro Y, Ikeda Y, Harigaya Y, Okamoto K, Shoji M: Lipoprotein-free amyloidogenic peptides in plasma are elevated in patients with sporadic Alzheimer's disease and Down's syndrome. **Ann Neurol** 1999; 45: 537-41
 - 6) Tomidokoro Y, Ishiguro K, Igeta Y, Matsubara E, Kanai M, Shizuka M, Kawarabayashi T, Harigaya Y, Kawakatsu S, Ii K, Ikeda M, St George-Hyslop PH, Hirai S, Okamoto K, Shoji M: Carboxyl-terminal fragments of presenilin-1 are closely related to cytoskeletal abnormalities in Alzheimer's brains. **Biochem Biophys Res Commun** 1999; 256: 512-8
 - 7) Hu J, Miyatake F, Aizu Y, Nakagawa H, Nakamura S, Tamaoka A, Takahashi R, Urakami K, Shoji M: Angiotensin-converting enzyme genotype is associated with Alzheimer disease in the Japanese population. **Neurosci Lett** 1999; 277: 65-7
 - 8) Lin C, Numakura C, Ikegami T, Shizuka M, Shoji M, Nicholson G, Hayasaka K: Deletion and nonsense mutations of the connexin 32 gene associated with Charcot-Marie-Tooth disease. **Tohoku J Exp Med** 1999; 188: 239-44
 - 9) Shizuka M, Ikeda Y, Watanabe M, Okamoto K, Shoji M, Ikegami T, Hayasaka K: A novel mutation of the myelin P(o) gene segregating Charcot-Marie-Tooth disease type 1B manifesting as trigeminal nerve thickening. **J Neurol Neurosurg Psychiatry** 1999; 67: 250-1
 - 10) Kanai M, Shizuka M, Urakami K, Matsubara E, Harigaya Y, Okamoto K, Shoji M: Apolipoprotein E4 accelerates dementia and increases cerebrospinal fluid tau levels in Alzheimer's disease. **Neurosci Lett** 1999; 267: 65-8
 - 11) Mizushima K, Watanabe M, Kondo I, Okamoto K, Shizuka M, Abe K, Aoki M, Shoji M: Analysis of spinocerebellar ataxia type 2 gene and haplotype analysis:(CCG)1-2 polymorphism and contribution to founder effect. **J Med Genet** 1999;36:112-4
 - 12) Urakami K, Mori M, Wada K, Kowa H, Takeshima T, Arai H, Sasaki H, Kanai M, Shoji M, Ikemoto K, Morimatsu M, Hikasa C, Nakashima K: A comparison of tau protein in cerebrospinal fluid between corticobasal degeneration and progressive supranuclear palsy. **Neurosci Lett** 1999;259: 127-9
- 追加分
- 13) Shizuka M, Watanabe M, Ikeda Y, Mizushima K, Okamoto K, Shoji M: Molecular analysis of a de novo mutation for spinocerebellar ataxia type 6 and (CAG)_n repeat units in normal elder controls. **J Neurol Sci** 1998; 161: 85-7
 - 14) Watanabe M, Sugai Y, Concannon P, Koenig M, Schmitt M, Sato M, Shizuka M, Mizushima K, Ikeda Y, Tomidokoro Y, Okamoto K, Shoji M: Familial spinocerebellar ataxia with cerebellar atrophy, peripheral neuropathy, and elevated level of serum creatine kinase, gamma-globulin, and alpha-fetoprotein.

- Ann Neurol** 1998; 44: 265-9
- 15) 東海林幹夫：物忘れ。老年医学 1999;37:280-282
 - 16) 金井光康、東海林幹夫：Alzheimer 病を脳脊髄液で診断する。医学のあゆみ 1999;189:73-78
 - 17) 東海林幹夫：アミロイドアンギオパチー。ドクターサロン 1999;43:353-356
 - 18) 東海林幹夫：アルツハイマー病における脳脊髄液 Tau, A₁₋₄₀, A₁₋₄₂(43)の経時的変化：日本における大規模多施設追跡調査結果。Medical briefs in brain & nerve 1999;9(4): 5
 - 19) 東海林幹夫：Alzheimer 病の原因と治療。別冊・医学のあゆみ神経疾患—state of arts (Ver.1) (中村重信編), pp504-506, 医歯薬出版, 東京, 1999
 - 20) 東海林幹夫：アルツハイマー病の客観的マーカー。老年期痴呆診療マニュアル (第 2 版) (長谷川和夫監修), pp237-242, 日本医師会, 東京, 1999
 - 21) 東海林幹夫, 瓦林毅, 針谷康夫：アルツハイマー病の動物モデル—解明点と問題点。アルツハイマー病の新しい展開。分子メカニズムから今日の臨床研究まで (井原康夫編), pp128-137, 羊土社, 東京, 1999
2. 学会発表
- 1) Shizuka M, Kanai M, Ikeda Y, Tomidokoro Y, Matsubara E, Harigaya Y, Okamoto K, Shoji M: γ -secretase activity is enhanced in neuroblastoma cells expressing mutant presenilin-1. 29th Annual meeting of society for neuroscience, Florida, 1999.
 - 2) Kanai M, Shizuka M, Urakami K, Matsubara E, Igeta Y, Tomidokoro Y, Ikeda M, Ishiguro K, Harigaya Y, Okamoto K, Shoji M: Apolipoprotein E4 accerelaates dementia and increases cerebrospinal fluid tau levels in Alzheimer's disease. 29th Annual meeting of society for neuroscience, Florida, 1999.
 - 3) Tomidokoro Y, Ishiguro K, Igeta Y, Matsubara E, Kanai M, Shizuka M, Kawarabayashi T, Harigaya Y, Okamoto K, Shoji M: Carboxyl-terminal fragments of presenilin-1 are closely related to cytoskeletal abnormalities in Alzheimer's brains. 29th Annual meeting of society for neuroscience, Florida, 1999.
 - 4) 藤田行雄、櫻井篤志、東海林幹夫、岡本幸市、平野朝雄、Leigh PN：痴呆を伴う筋萎縮性側索硬化症(DALS)における黒質病変の検討。第 40 回日本神経学会、東京、1999
 - 5) 東海林幹夫、富所康志、池田将樹、松原悦朗、針谷康夫、岡本幸市、平井俊策：A β 過剰生成 transgenic mice の検討。第 40 回日本神経学会、東京、1999
 - 6) 松原悦朗、甘利雅邦、針谷康夫、東海林幹夫、岡本幸市：リポ蛋白フリー可溶性 A β 42 がアルツハイマー病、ダウン症の血漿中で上昇している。第 40 回日本神経学会、東京、1999
 - 7) 富所康志、石黒幸司、井桁之総、松原悦朗、針谷康夫、東海林幹夫、岡本幸市、平井俊策：Presenilin-1 C 末端分画の AD 患者脳における細胞骨格異常への関与。第 40 回日本神経学会、東京、1999
 - 8) 藤田行雄、櫻井篤志、東海林幹夫、岡本幸市：多系統萎縮症(MSA)の抗 α -synuclein 抗体による検討。第 40 回日本神経病理学会、横浜、1999
 - 9) 富所康志、石黒幸司、井桁之総、松原悦朗、針谷康夫、東海林幹夫、岡本幸市、平井俊策：Presenilin-1 C 末端分画は AD 患者脳の細胞骨格異常

- へ関与する。第 41 回日本老年医学会、
京都、1999
- 10) 東海林幹夫、金井光康、静雅美、松
原悦朗、針谷康夫、岡本幸市、平井

俊策：Alzheimer 病の脳脊髄液マーカ
ーの検討。第 18 回日本痴呆学会、熊
本、1999

表 1. Lipoprotein-associated Aβ versus lipoprotein-free Aβ.

Groups	Cases (n)	Age (yr)	Lipoprotein-associated	Lipoprotein-free		Lipoprotein-free Aβ (%)		
			tAβ	tAβ	Aβ40	Aβ42	tAβ	Aβ42
Normal donors	21	<30	70.2±21.0	7.8± 3.0	6.1	1.9	10.7	2.5
	24	30-59	70.6±29.0	7.8± 3.7	5.7	2.2	10.1	2.7
(Age-matched)	43	≥60 (78.1± 7.7)	103.1±35.6	11.8± 5.4	10.0	2.1	10.8	1.8
Alzheimer's Dis.	42	77.0±11.1	113.2±35.3	15.3±13.5	7.7	7.5	12.0	5.9

表 2. Quantitation of Aβ40 and Aβ42 in lipoprotein-depleted plasma in Alzheimer's disease.

Groups	Cases (n)	Age (yr)	Lipoprotein-Depleted Plasma	
			Aβ40	Aβ42
Age-matched normal controls	43	78.1± 7.7	81.0±11.3	18.0± 9.0
Alzheimer's disease patients	42	77.0±11.1	56.2±22.7	43.8±22.7

表 3. Quantitation of Aβ40 and Aβ42 in lipoprotein-depleted plasma in Down's syndrome.

Groups	Cases (n)	Age (yr)	Whole Plasma	Lipoprotein-Depleted Plasma		Lipoprotein-free Aβ (%)
			tAβ	Aβ40	Aβ42 (pM)	tAβ
Normal donors	21	<30	72.7±23.3	7.2± 3.9	2.6±2.1	10.7± 4.0
	32	≥30	76.1±40.6	6.7± 4.1	2.4±1.7	10.0± 3.7
Down's syndrome	5	<30	153.0±75.0	27.7±11.6	7.2±3.7	21.8±11.5
	34	≥30	192.4±85.2	20.0±11.6	5.3±3.7	16.1±13.7

厚生省科学研究費補助金 (特定疾患対策研究事業)
 アミロイドーシスに関する研究 分担研究報告書

アルツハイマー病(AD)脳におけるアミロイドβ蛋白(Aβ42) 分子種の沈着に関する神経病理学的検討

分担研究者 玉岡 晃 筑波大学臨床医学系神経内科 助教授
 共同研究者 望月昭英, 下畑充志, 庄司進一
 筑波大学臨床医学系神経内科

研究要旨 AD 脳における Aβ 沈着の初期過程を明らかにするために, Aβ 分子種を識別染色可能なモノクローナル抗体を用いて Aβ の局在を検討した. 初期沈着分子種である Aβ42 は, 老人斑のほかに AD 脳の一部の神経細胞に強く発現しており, AD の発症病態に関与していると考えられた.

A. 研究目的

AD 脳のニューロピルに最初に沈着する Aβ 分子種は Aβ42 であると考えられている. AD 脳における Aβ 沈着の初期過程を明らかにするために, Aβ 分子種を識別染色可能なモノクローナル抗体を用いて脳切片内の Aβ の局在を検討した.

胞の胞体および突起に微細顆粒状に強く染色された (図). この細胞はグリアマーカーでは染色されず, 小型神経細胞と考えられた. 正常対照脳では老人斑は観察されず, Aβ42 強陽性の神経細胞も認められなかった.

結論: Aβ42 は AD 脳の一部の神経細胞に強く発現し, これが Aβ の発症病態に関与していると考えられた.

B. 研究方法

ホルマリン固定した孤発性 AD 脳 4 例と正常対照脳 2 例の中前頭回皮に対して Bielschowsky 銀染色を施行して老人斑の有無, 型を観察した. 凍結切片に対して Aβ の C 末端断端特異抗体 (BA27: 抗 Aβ40, BC05: 抗 Aβ42) を用いて free-floating 下で免疫組織染色を施行した. 前処置としてギ酸処理を行った

D. 考察

Aβ42 は AD 脳の細胞外に沈着する Aβ のうちの初期分子種とされている. 一方, 遺伝子導入した培養神経細胞および動物脳に関する研究において, 神経細胞内に Aβ42 の生成・存在が報告されている. AD 脳においても Aβ42 の神経細胞内蓄積が認められ, これが AD の発症病態に強く関連していると考えられる.

C. 研究結果

AD 脳では, Aβ40 は非びまん性老人斑内に染色された. Aβ42 はびまん性および非びまん性老人斑内のほか, 一部の小型細

F. 研究発表

1. 論文発表

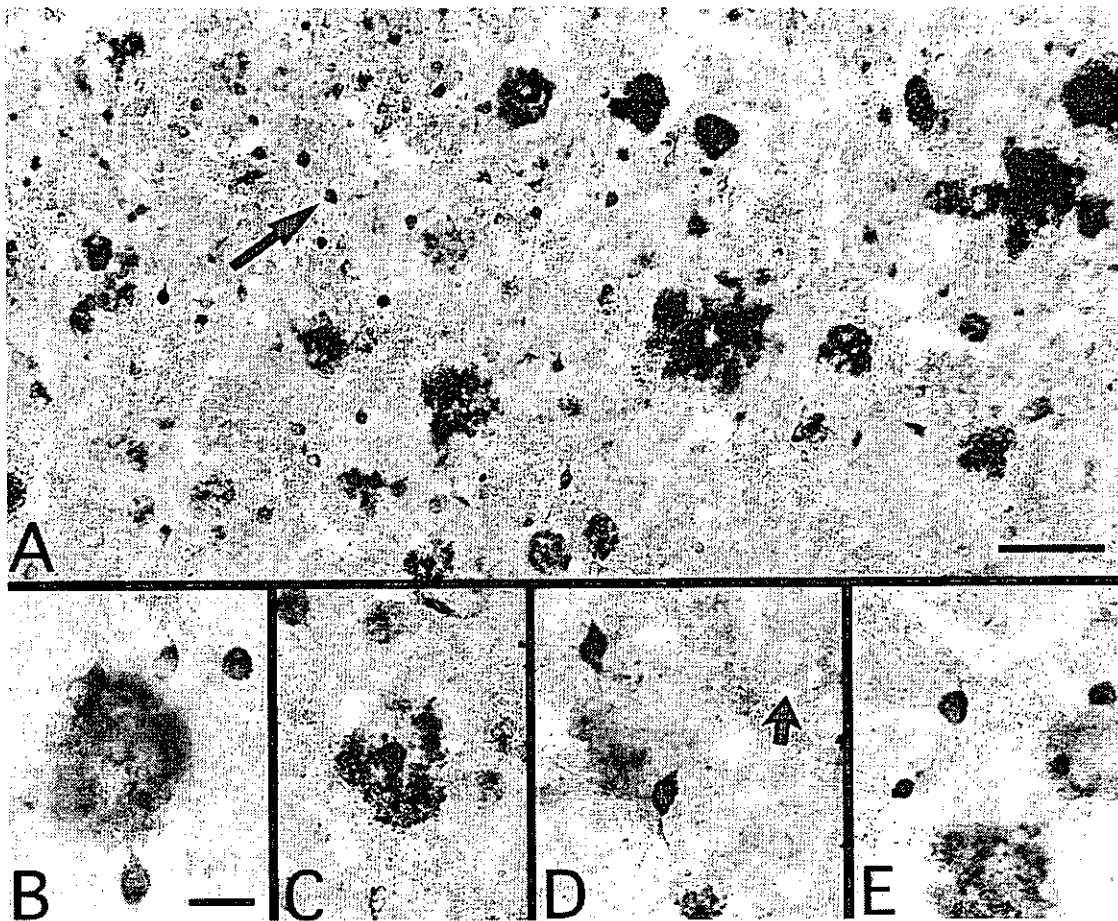
Mochizuki A, Tamaoka A, Shimohata A, Komatsuzaki Y, Shoji S : A β 42-positive non-pyramidal neurons around amyloid plaques in Alzheimer's disease. Lancet 2000; **355**: 42-43.

2. 学会発表

望月昭英, 玉岡晃, 下畑充志, 小松崎八寿子, 庄司進一 : アルツハイマー病 (AD) におけるアミロイド β 蛋白 (A β) の沈着過程についての検討. 第 40 回日本神経学会総会, 1999 年 5 月, 東京.

☒ A β 42-positive neurons in the cortex of AD brains

A β 42-positive cytoplasm was easily recognizable (A, arrow). A β 42-positive neurons adjacent (B) or inside the senile plaque (C) with small and round body (D, E) in comparison with pyramidal neuron (D, arrow). The Bar in A=100 μ m, in B=30 μ m.



☒

厚生省科学研究費補助金 (特定疾患対策研究事業)
 アミロイドーシスに関する研究 分担研究報告書

ヒト血小板に含まれるアミロイドβ蛋白 (Aβ) 分子種の定量と アポリポ蛋白E (APOE) - E4アイソフォームとの 相関関係の解析

分担研究者 玉岡 晃 筑波大学臨床医学系神経内科 助教授
 共同研究者 松野佐好子 筑波大学臨床医学系神経内科
 庄司進一 筑波大学臨床医学系神経内科

研究要旨 アルツハイマー病 (AD) 脳に沈着するアミロイドβ蛋白 (Aβ) は血液中でも検出され、その前駆体APPは、血球中では血小板に最も多く含まれることが知られている。血小板はセロトニン、モノアミン酸化酵素、種々のシグナル伝達系、神経伝達物質受容体などの点から神経細胞との類似性が認められており、ADでは以前より血小板の異常が報告されきた。本研究では、ADと対照群間で血小板に含まれるAβ分子種を定量して比較検討した。Aβ40に有意差はみられなかったが、Aβ42はADで有意に増加していた。また、アポリポ蛋白E (APOE) の多型の影響を解析すると、AD群ではAPOE-E3/4では3/3に比して有意にAβ42が増加しており、対照群ではAβ40が有意に増加していた。ADの危険因子の一つであるAPOE-E4はADの血小板においてAβ42を増加させる方向に作用している可能性があり、ADの血小板におけるAβ代謝の解析がADの病態の解明に有用であることが示唆された。

A. 研究目的

アルツハイマー病 (AD) 脳に沈着するアミロイドβ蛋白 (Aβ) はその疾患特異性や前駆体APPの突然変異を有する家族性ADの存在などから、ADの病態機序において重要な意義を有すると考えられている。Aβは可溶状態で血液中でも検出され、その前駆体APPは、血球中では血小板に最も多く含まれることが知られている。血小板はセロトニンやモノアミン酸化酵素を含む点、神経伝達物質によって活性化される種々のシグナル伝達系を有すること、アドレナリン、アンギオテンシン、バソプレッシンなどの神経伝達物質の受

容体が認められる点などから、神経細胞との類似性が指摘されている。また、ADでは以前より、膜流動性の低下、APPアイソフォームの変化など血小板の異常が報告されきた。本研究では、血小板が神経細胞のモデルとなり得ることを想定し、ADと対照群間で血小板に含まれるAβ分子種を定量して比較検討した。また、ADの危険因子の一つであるアポリポ蛋白E (APOE) の多型が血小板Aβにどのような影響を与えるかも解析した。

B. 研究方法

AD例21名 (年齢77.2 ± 11.9歳