

アミロイド線維形成機構の反応速度論的  
解析- 透析アミロイドーシスを中心とし  
て-

第 45 回日本透析医学会学術集会・総会  
シンポジウム 透析アミロイドーシス  
2000 年 6 月 16-18 日 福岡, 同プログラ  
ム・抄録集 598

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
なし。
2. 実用新案登録  
なし。
3. その他  
なし。

図1. fAβ<sub>2</sub>M形成反応に対するPGおよびヘパリンの効果

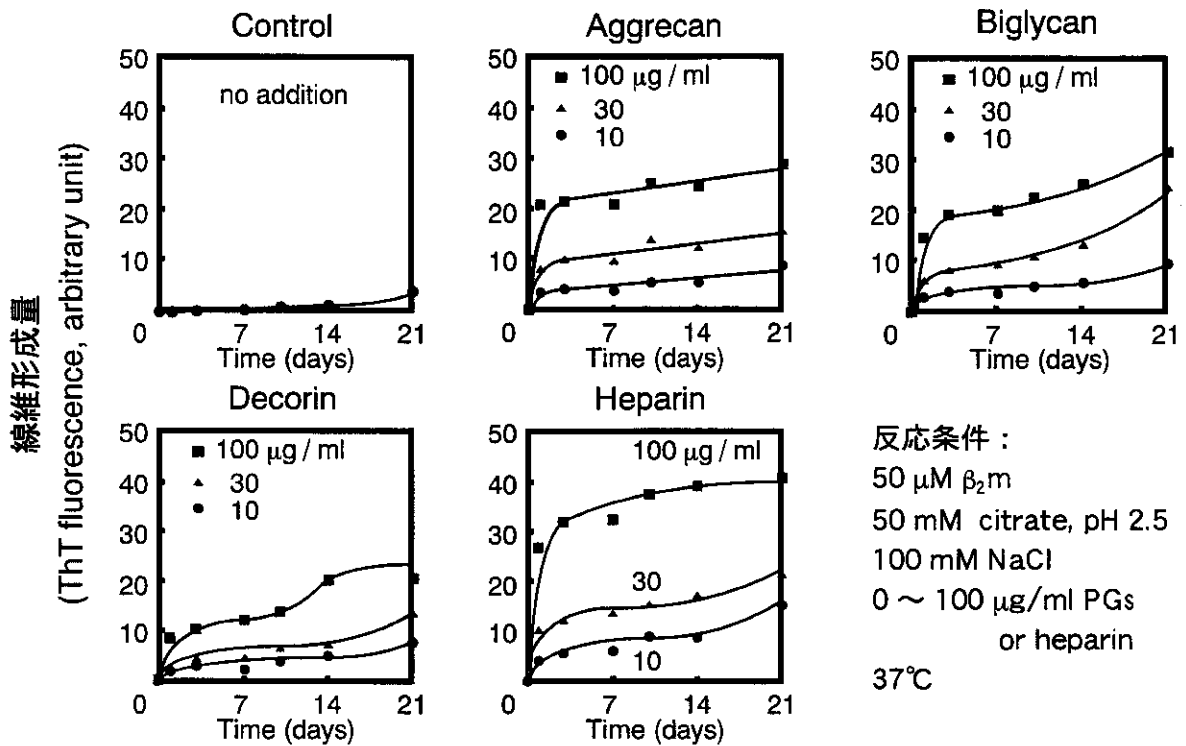
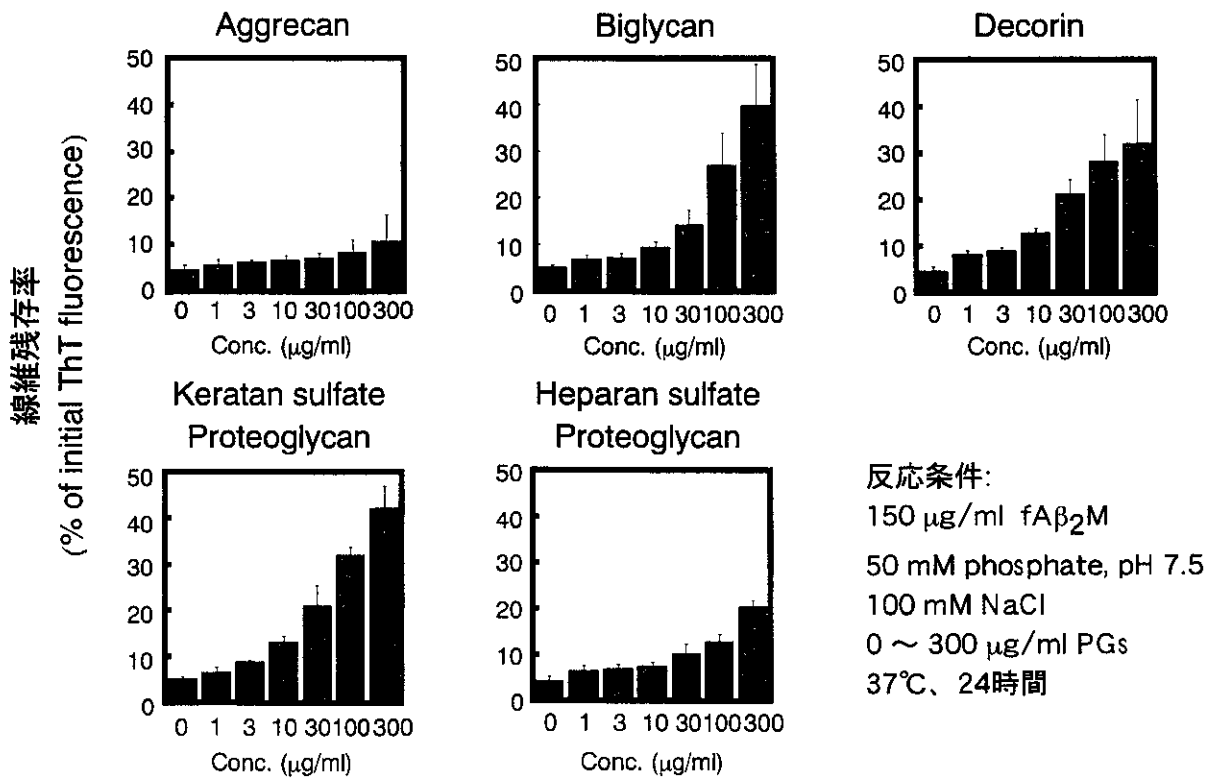


図2. fAβ<sub>2</sub>M脱重合反応に対するPGの効果



厚生科学研究補助金 (特定疾患研究事業)  
 アミロイドーシスに関する研究 分担研究報告書

長期透析例における透析アミロイドーシス発症・進展因子の検討

分担研究者 原 茂子 虎の門病院 腎センター  
 共同研究者 伏見智久\*、乳原善文\*、山田 明\*、塚田敏彦\*\*  
 虎の門病院 \*腎センター、\*\*同検体検査部

研究要旨 長期透析療法に伴う合併症である透析アミロイドーシスの発症・進展因子に関わる因子をあきらかにする目的で、透析療法導入後、維持透析を5年以上最長33年間(平均14.7年)当院で施行している112症例をretrospectiveに検討した。ダイアライザーの種類、腎不全の病態、年齢、性別、原疾患、透析期間、および活性酸素の処理機構に関与するextracellular superoxide dismutase (EC-SOD)の遺伝子多型などから解析した。透析アミロイドーシスによる手根管症候群への開放術に関与する因子としては、高齢者、透析期間、LFM(Low Flux Membrane)の使用であった。EC-SOD遺伝子多型ではRR型に比しRG/GG型が発症の危険因子であり、2回以上の頻回手術例では有意にRG/GG型が高頻度であった。透析アミロイドーシス発症の予防には、ダイアライザーとしてはHigh Flux Membraneの使用が必須であることが示唆された。遺伝子多型の検索からは、アミロイドーシス発症には体外循環中に用いるヘパリンの関与が推察された。ヘパリン以外の抗凝固剤の使用、抗酸化剤の使用が進展の予防に有効ではないかと考えられた。

A. 研究目的

透析アミロイドーシスは、長期透析例で高頻度にみられ、進行する合併症である。全身の諸臓器にもみられるが、主体の病変部位は椎間板、靭帯にみられ、 $\beta$ -2Microglobulin からなるアミロイドが沈着し、手根管症候群(CTS)、破壊性脊椎症、骨嚢胞がみられる。骨、関節症状は日常生活に支障をきたすのみならず、生命予後にも関わる。症例により発症や症状に差異がみられる。成因に関しては透析機器、透析液の汚染、酸化ストレスによる $\beta$ 2MicroglobulinのAGE化、遺伝因子など多岐にわたって検討されているが、その解決策はいまだない。今回の研究では、

一施設で透析導入から維持透析を長期に継続施行している症例で、CTSによる開放術施行例、非施行例において、透析機器、原疾患、年齢、透析期間、酸化ストレスの処理機構に関わる遺伝因子を検索し、その危険因子を明らかにすることを目的とした。同一施設で30年以上の透析下での検討は、透析液系など透析条件が画一化されており、アミロイドーシスの危険因子をより厳密に解析することが可能である。

B. 研究方法

1.対象

末期腎不全のために当院で透析導入し、

その後も維持透析を施行している 112 症例（男 66, 女 46 例で、透析期間は 5 年以上最長 33 年（平均 14.7 年）、年齢 23 歳から 86 歳（平均 60.4 歳）。112 例中、CTS 開放術施行例は 20 例で 1 回のみ施行例は 15 例で 5 例では 2 回以上の頻回に施行している。手術施行全例で、 $\beta$ 2Microglobulin によるアミロイドを組織学的に確認している。

## 2. アミロイドーシス発症の危険因子の検討の解析と方法

透析アミロイドーシスによる CTS にて開放術施行を透析アミロイドーシス発症とし、発症例と非発症例で年齢、透析期間、原疾患（糖尿病、非糖尿病）、ダイアライザー（Low Flux Membrane、High Flux Membrane）を対比した。さらに検索しえた症例で、細胞外型 Superoxidase Dismutase (EC-SOD) の遺伝子多型を検索し、遺伝因子の関しても検討した。EC-SOD 遺伝子多型の検出は、J.Sandstorm の Allele -specific PCR 法を応用し、mismatch-primer による簡易測定法を開発して測定した。統計学的処理は、ロジスティック重回帰分析および  $\chi^2$  検定を用いた。

## C. 研究結果

1. CTS 開放術に関与する因子の検討では、原疾患、性別には差はみられなかった（表-1）。年齢では、CTS 開放術例では  $p=0.0509$  で高齢であった。透析期間では  $P=0.0002$  で長期間の透析は危険因子であった。ダイアライザーでは、CTS 開放術例では全例で Low Flux Membrane 使用例であった（表-1）。

145 例中 24 例で CTS 開放術を施行しているが、施行例と非施行例で透析期間を対比すると、施行例で有意に透析期間は長期である（表-2）。2 回以上にわ

たり CTS 開放術施行例は 24 例中 10 例である。1 回のみ施行例と 2 回以上施行例での透析期間は、2 回以上例でやや長期ではあるが、有意差はみられなかった。

2. EC-SOD の遺伝子多型では、重回帰分析で RG/GG 型が RR 型に比し有意 ( $p=0.0068$ ) に危険因子であった（表-1）。手術回数と遺伝子多型との対比では 1 回のみ施行例と、2 回以上施行例では、表-3 に示すように、有意に RG/GG 型が施行頻度が高値であった。開放術施行例で、第 1 回目の手術までの透析期間、年齢と遺伝子多型との対比では、表-4 に示されるように、RR 型に比し TG/GG 型では導入時年齢は若年の傾向がある一方、手術までの期間では RR 型は  $18.8 \pm 5.7$  年、RG/GG 型では  $16.2 \pm 4.1$  年で後者でやや短期であるが有意差はみられていない。

## D. 考察

透析期間、ダイアライザーの種類が発症の危険因子であった。さらに危険因子としては EC-SOD の遺伝子多型 RG/GG 型であった。EC-SOD の遺伝子多型は、ヘパリン結合部の変異を検出するものであり、活性酸素の処理機構やヘパリン硫酸、ヘパリン結合性の差を示唆するものである。 $\beta$ 2Microglobulin からアミロイド繊維への形成過程で、ヘパリンの硫酸基によりアミロイド繊維の伸展反応が促進されるとの報告がみられている。これらの実験事実と、我々の臨床例での本研究結果から考えると、透析療法時の体外循環中の抗凝固剤として汎用されているヘパリンが、アミロイド形成の関与する可能性が強く示唆された。

## E. 結論

1. 透析アミロイドーシスの危険因子は、

透析期間、Low Flux Membrane のダイアライザー、および EC-SOD の遺伝子多型 RG/GG 型であった。

2. 遺伝子多型の検討からは、透析療法中の体外循環時に汎用しているヘパリンの関与が示唆された。ヘパリン以外の抗凝固剤の使用、さらには抗酸化剤の使用が発症進展への予防に有効ではないかと考えられた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) 原 茂子：透析アミロイドーシスの治療対策 腎と骨代謝 14(1)59-66,2001

##### 2. 学会発表

1) 原 茂子、乳原善文、山田 明：シン

ポジウム.透析アミロイドーシスー治療対策ー第 45 回日本透析医学会 2000.6.17,18 福岡にて

2) 原 茂子、田上哲夫、乳原善文、横田雅史、ほか：透析アミロイドーシスへの  $\beta$  2Microglobulin 吸着カラム併用下での Immunomodulation. 第 45 回日本透析医学会 2000.6.17,18 福岡にて

#### H. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

表-1 CTS開放術に関与する因子

因子	CTS(+) n:20	CTS(-) n:92	P
年齢	63.7±8.8	59.0±12.2	0.0509
性別 (男/女)	9/11	57/35	0.1051
原疾患 (non DM/DM)	18/2	74/18	0.519
透析期間 (年)	23.8±4.2	13.3±5.8	0.0002
EC-SOD遺伝子 (RR/RG+GG)	5/15	59/33	0.0068
LEPの'アライザ' 使用(+)/(-)	20/0	59/33	0.0075

表-2 CTS(手根管症候群)開放術と透析期間の対比

CTS開放術	透析期間(年)
(-) n:121	13.0±6.0
(+) n:24	23.3±4.7
1回のみ n:14	21.9±5.0
2回以上 n:10	25.4±3.6

p<0.001

表-3 EC-SOD遺伝子変異とCTS開放術の対比

術回数 \ 遺伝子	RR	RG/GG
1回のみ (n:12)	4例	8例
2回以上 (n:8)	1	7

$\chi^2=0.0038$

表-4 ecSOD遺伝子とCTS開放術症例の臨床所見

	RR (n:5)	RG/GG (n:15)
透析導入時年齢(歳)	47.0±8.0	37.0±9.8 p=0.081
第1回目手術までの 透析期間(年)	18.8±5.7	16.2±4.1
手術時年齢(歳)	62.7±9.9	56.0±7.9

厚生科学研究補助金 (特定疾患研究事業)  
 アミロイドーシスに関する研究 分担研究報告書

**β 2 Microglobulin 吸着器および小型化吸着器使用の臨床的検討**

分担研究者 原 茂子 虎の門病院 腎センター  
 共同研究者 田上哲夫、乳原善文、山田 明  
 虎の門病院 腎センター

研究要旨 透析アミロイドーシスがβ 2Microglobulin から構成されることから、長期透析合併症の透析アミロイドーシスへの内科的治療として、β 2Microglobulin の除去をはかることを目的で、吸着器（カラム）が開発された。特異的にβ 2Microglobulin を吸着する吸着療法を透析療法に併用することにより、除去のみならず透析アミロイドーシスによる骨、関節痛の軽減が認められ吸着療法の有効性が報告されている。我々は骨関節痛の軽減が、サイトカイン、補体がカラムにより吸着されることによる抗炎症効果であることを報告してきた。β 2Microglobulin 吸着器の容積が 350ml と大きく透析療法に併用することで、体外循環量が増大し透析療法中に血圧低下を合併する症例がみられる。さらに透析アミロイドーシス合併例は長期透析例であり、心血管系の合併症を有する症例も少なくない。そこで容積量が 150ml の小型化した吸着器が開発された。本研究では小型化吸着器（S15）と従来の吸着器（S35）とでβ 2Microglobulin 吸着能、骨関節痛への軽減効果およびサイトカインの動態からみた抗炎症効果に関して対比検討した。β 2Microglobulin の下降率には差はみられなかった。治療前後のβ 2Microglobulin 濃度では、S35 では S15 に比し治療後は低下傾向を示した。S15 でも骨関節痛のスコアは有意に軽減し、症状の軽快を認めたが、S35 の使用から S15 に移行した症例では、症状の再燃を認め、再度 S35 で軽減を認めた。疼痛の高度例では S15 では治療効果は不十分である。サイトカインの動態では S15 と S35 では差はみられなかった。

**A. 研究目的**

長期透析合併症の透析アミロイドーシスには手根管症候群、骨嚢胞、破壊性脊椎症などがみられ、骨関節症状を呈することから QOL の著しい低下の原因となっている。いまだ未解決合併症である。内科的治療として、β 2Microglobulin 吸着療法で臨床症状の軽快がえられている。本治療により我々は、骨嚢胞の進展増大が抑制されること、疼痛緩和には炎症作

用の抑制機序によるものであることを報告してきた。β 2Microglobulin 吸着器（S35）は容積が 350ml であり、体外循環量の増大から、透析療法との併用が困難な症例も少なくない。そこで小型化した容積 150ml のものが開発された。本研究では小型化吸着器（S15）と従来の吸着器（S35）とで、その治療効果を対比検討した。

## B. 研究方法

### 1. 対象

透析アミロイドーシスによる骨・関節痛を有し4年間にわたり S35 を併用した透析からの移行例4例と、新規に S15 を併用透析施行の6例での計10例である。

2.従来 $\beta$ 2Microglobulin 吸着器(S35)併用透析と小型化した吸着器 S15 併用透析で、 $\beta$ 2Microglobulin 下降率、骨関節痛の推移を検討した。さらに S15、S35 併用時での治療前後でのサイトカイン値を対比した。痛みの評価は関節部位9箇所でのレベルを、なし(0)から夜間疼痛で起床するほどの強い痛みを3までの4段階に分類してその総合点で0から27点までとした。サイトカインに関しては、TNF- $\alpha$ 、IL-1- $\beta$ 、IL-6を併用透析前後で測定した。s15 併用による透析期間は3ヶ月である。

## C. 研究結果

同一症例での S35 吸着器併用透析と S15 吸着器併用透析での治療前後での $\beta$ 2Microglobulin 濃度では表-1 に示すように治療前では S35 は  $36.2 \pm 17.2$ mg/dl、S15 は  $36.5 \pm 18.8$  で差はみられなかった。治療後 $\beta$ 2Microglobulin 濃度は S35 では  $6.85 \pm 2.6$ 、S15 では  $8.2 \pm 2.8$ mg/dl で、S35 併用透析で低値の傾向( $p=0.09$ )を示した。下降率では両者に有意差はみられなかった。

S15 吸着併用透析での臨床症状の推移(表-2)では痛みのスコアは  $9.7 \pm 2.0$  から  $7.7 \pm 2.4$  と有意に軽減がえられた。握力に関しては  $39.8 \pm 24.1$ kg から  $40.6 \pm 25.4$  と増加を認めたが有意差はみられなかった。関節痛のために鎮痛剤併用の頻度は減少を認めているが有意差はなし。S35 併用から S15 に移行した4例中3例では痛みが増強したために再度 S35 併用

透析とし、痛みの軽減がえられた。S35 と S15 併用透析での治療前後でのサイトカインの変化率では、TNF- $\alpha$  では、S15 で  $-27.5 \pm 10.8\%$ 、S35 では  $32.1 \pm 15.6\%$ であった。IL- $\beta$  では、S15 で  $35.2 \pm 36.7\%$ であり、S35 では  $36.1 \pm 58.6\%$ で差はみられなかった。IL-6 では S15 で  $83.4 \pm 149$  で S35 では  $76.8 \pm 64.7\%$ であった。S15 吸着器と S35 吸着器併用透析では、サイトカインの動態には差はみられなかった。

## D. 考察

透析アミロイドーシスによる骨関節痛症状は疼痛や可動域制限から日常生活活動性の低下をきたす重篤な合併症である。透析例にみられるアミロイドが $\beta$ 2Microglobulin から構成されることがあきらかとなつて以来、透析療法で除去することの対策がおこなわれてきている。 $\beta$ 2Microglobulin 吸着機器を透析療法時に併用し、除去とともに症状の軽減がえられ、有効であることが報告された。しかしながら吸着器の容積が350ml と大きく、体外循環量が増加し、透析療法中に血圧低下をきたす症例がすくなくない。体外循環量を減少させた小型化の吸着器が必要とされた。今回開発された小型化吸着器での臨床使用での検討では、疼痛の緩和には有効であるが、アミロイドーシスの程度によりことなり、軽度の疼痛例には有効であるが、高度例には不十分であった。早期のアミロイドーシス例への使用で進展が防止されうるかいは、今後長期使用での検討が必要と考えられた。

## E. 結論

体外循環量を減少させた小型化の $\beta$ 2Microglobulin 吸着器(S15)は S35 吸着器に比し $\beta$ 2Microglobulin の下降率には差



がみられなかったが、治療後の  $\beta$  2Microglobulin 濃度をより低下させた。サイトカインの動態には両者で差はみられなかった。臨床症状での対比では痛みスコアでは S15 でも低下がみられ症状の改善がえられた。一方 S35 で治療を施行していた症例では、S15 に移行後は再度痛みの増強を認め、S35 にもどした。透析アミロイドーシスによる骨関節痛が高度症例では、小型化吸着器併用は症状改善には不十分であり、S35 の吸着器の使用を要する。S15 の小型吸着器は症状の軽度例では有効であった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) 原 茂子：透析アミロイドーシスの

治療対策 腎と骨代謝 14(1)59-66,2001

##### 2. 学会発表

1) 原 茂子、乳原善文、山田 明：シンポジウム.透析アミロイドーシスー治療対策ー 第 45 回日本透析医学会 2000.6.17,18 福岡にて

2) 原 茂子、田上哲夫、乳原善文、横田雅史、ほか：透析アミロイドーシスへの  $\beta$  2Microglobulin 吸着カラム併用下での Immunomodulation. 第 45 回日本透析医学会 2000.6.17,18 福岡にて

#### H. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

表-1  $\beta$ 2Microglobulin 吸着カラム併用透析による  
 $\beta$ 2Microglobulin の動態

— S-35、S15 使用の同一例での対比 —

n: 4

	S - 15	S - 35	
血中 $\beta$ 2M 濃度 (mg/l)			
透析前	36.5 ± 18.8	36.2 ± 17.2	
透析後	8.2 ± 2.8	6.8 ± 2.6	p=0.09
$\beta$ 2M下降率 (%)	76.3 ± 4.3	80.6 ± 1.9	

表-2

小型化  $\beta$  2Microglobulin 吸着器 (リクセルS-15) 使用による  
臨床症状の推移

n: 10 新規 6例  
S35から移行 4例#

	痛みスコア	握力 (左右) (Kg)	鎮痛剤使用頻度
併用治療前	9.7 ± 2.0 *	39.8 ± 24.1	6 / 10 例
治療後	7.7 ± 2.4 **	40.6 ± 25.4	4 / 10

paired T P< 0.02

# 4例中3例では痛み  
増強にてS35に移行

厚生科学研究補助金 (特定疾患研究事業)  
アミロイドーシスに関する研究 分担研究報告書

## 骨格筋内にアミロイド沈着を認めた長期透析の一例

分担研究者 原 茂子 虎の門病院 腎センター  
共同研究者 原 重雄\*、松下 央\*、山田 明\*\*  
虎の門病院 \*病理部、\*\*同腎センター

**研究要旨** 慢性腎不全に伴う $\beta_2$ ミクログロブリン( $\beta_2$ MG)アミロイドーシスは関節周囲組織や椎間板に沈着しやすいことが知られている。今回、糖尿病性腎症による慢性腎不全で27年の透析歴を有する剖検例について、アミロイド沈着の分布を組織学的に検索したところ、 $\beta_2$ MGアミロイドの沈着は椎間板・関節周囲組織のほか、骨格筋にも見られた。このような通常沈着の見られない部位へのアミロイド沈着には、極めて長期間の透析が関与している可能性があるのではないかと推察される。

### A. 研究目的

慢性腎不全での長期透析に伴う $\beta_2$ MGアミロイドーシスでは、椎間板や滑膜、関節周囲靭帯、各内臓の小血管壁などが主なアミロイド沈着部位である。

今回、27年の長期透析歴を有する剖検例のアミロイド沈着の部位について組織学的に検索を行った。

### B. 研究方法

検討症例は56歳女性。1958年(14歳)でIDDMを発症し、1979年(35歳)に糖尿病性腎症による慢性腎不全で透析導入となった。2000年5月17日脳出血を起こし、同5月31日死亡。諸臓器のアミロイド沈着の有無をCongo Red染色並びに免疫組織化学的方法( $\beta_2$ MG, AA,  $\kappa$ ,  $\lambda$ , AP)を用いて検索した。

### C. 研究結果

以下の部位に $\beta_2$ MGアミロイド沈着が見られた。

；前頸筋、腹直筋、腸腰筋、滑膜、椎間板、小血管壁(顎下腺・心臓・腎臓)

### D. 考察

本症例は通常アミロイド沈着が起こりがたい部位にも沈着が見られた希な剖検例である。このようなアミロイド沈着は、27年間という極めて長期間にわたる透析管理が関与している可能性があるのではないだろうか。

### E. 結論

27年に及ぶ長期透析例では骨格筋にアミロイド沈着を来すことがあることを報告した。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

1.論文発表

なし

2.学会発表

なし

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

写真-1

腹壁

全体に硬さを増し、著明に肥厚している。濃い部分は褐色調でアミロイドの沈着部であり、地図状にひろがり、腹膜も同様である。

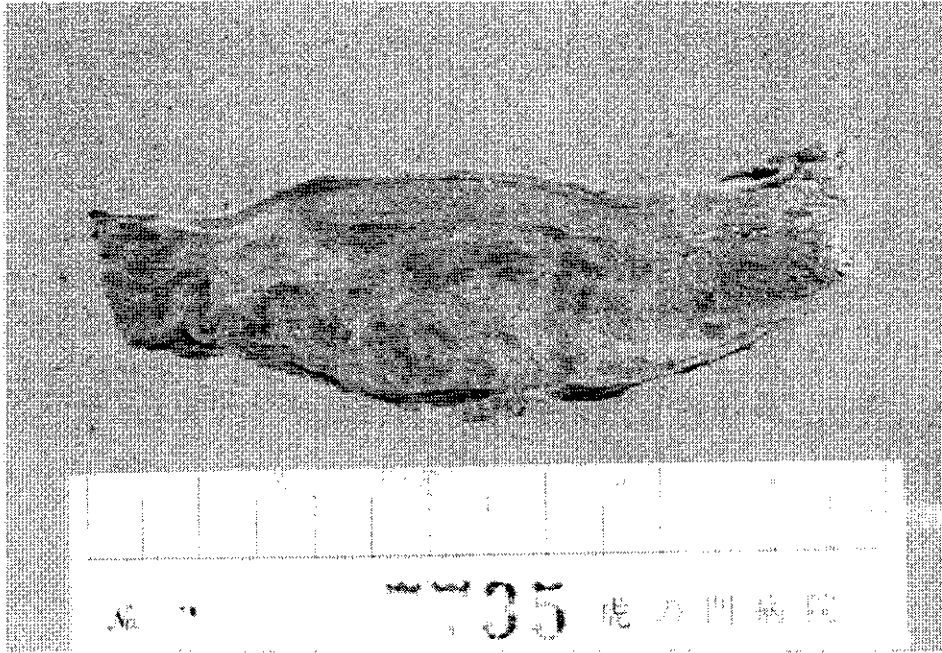


写真-2

腹壁組織

CR染色

x25

筋組織内や周囲脂肪組織内に広範なアミロイド沈着を認める



写真-3            CR染色   x100  
前頸筋

筋繊維の辺縁部にアミロイドの沈着を認める

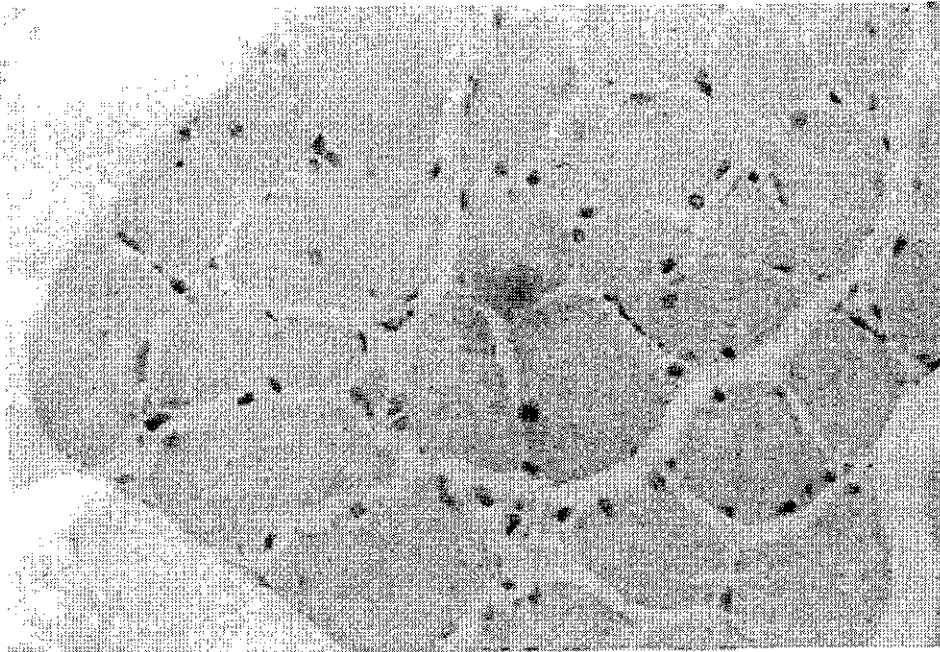


写真-4  
腹壁筋            CR染色            x100

筋繊維内にアミロイドの沈着を認める



厚生科学研究費補助金 (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

## AB アミロイドの APPsw mice における沈着機序

分担研究者 東海林幹夫 群馬大学医学部神経内科

共同研究者 瓦林 毅\*、針谷康夫\*、池田将樹\*、松原悦朗\*

群馬大学医学部、\*神経内科

**研究要旨** Sweden 型の突然変異をもつアミロイド前駆体タンパク (APP) を過剰産生する Alzheimer 病 (AD) モデルマウス APPsw mice を用いてアミロイド B 蛋白 (AB) 沈着を経時的に検討した。APP の発現は脳で正常の 7 倍の増加を認めた。8 月齢で脳 AB は SDS 可溶性から不溶性となり、この AB の不溶化獲得が脳アミロイド形成の誘因と考えられた。組織学的には neuritic plaque は 8 月齢から、diffuse plaque は 12 月齢から出現し、異なる老人斑の起源が想定された。脳 AB の蓄積に反比例して髄液・血漿 AB は減少し、この変化が AD の生化学的マーカーの根拠と考えられた。AB は早期から lipid rafts に特異的に増加し、脳アミロイドの超早期沈着部位であることが示された。以上より APPsw mice で AB の過剰産生が脳アミロイドを再現できることが示された。

### A. 研究目的

アルツハイマー病 (AD) の発症機序として、アミロイド B 蛋白 (AB) が沈着して脳 AB アミロイドーシスが起これ、続いて神経原線維変化と神経細胞死が出現するというアミロイド・カスケード説が有力視されている。この説に基づいてアミロイド前駆体タンパク (APP) を過剰産生する transgenic mouse が作成され、AD のモデル動物として期待されている。

Sweden 型の突然変異 APP を過剰産生する APPsw mice, Tg2576 は 1996 年に Karen Hsiao, 針谷康夫, Steven Younkin らによって確立された。我々は昨年度までの検討から、APPsw mice には脳 AB アミロイドーシスと行動異常が再現され、AD の有用なモデル動物であることを報告してきた。しかし、このマウスにおける変異 APP の過

剰発現がどのように AB を蓄積してくるかに関しては未だに不明な所が多い。また、従来 AB アミロイドは細胞外に蓄積するものと思われていたが、近年の培養細胞を用いた検討から細胞内でも AB 凝集が始まることが報告された。もし AD 脳においても細胞内で AB アミロイド形成が始まるとすれば、細胞外への AB 分泌を抑制するという従来の AD 治療の方法論は転換を迫られることとなる。

本年度我々は APPsw mice を用いて APP および AB の経時的発現を詳細に解析し、脳アミロイド沈着開始因子としての SDS 不溶性 AB の同定とこれに伴う脳アミロイド沈着の進展経過を明らかにした。また、髄液・血漿 AB の経時変化を測定することによって AD の診断マーカーとしての有用性の根拠を明らかにした。さらに脳ア

ミロイドの細胞内早期沈着部位としての lipid rafts を同定した。

## B. 研究方法

1. 1-25 月齢の APPsw mice の半脳を 2% SDS と 70%ギ酸で連続抽出し、鈴木らによって確立された Sandwich ELISA 系を用いて経時的に AB40, AB42 量を測定した。また、Aβ および APP を immunoblotting で検討した。半脳からは 4%パラフォルム固定パラフィン切片を作成し、AB40 および AB42 に対する抗体で経時的に免疫染色を行った。

2. APPsw mice から血漿と髄液を採取し、Sandwich ELISA 系を用いて経時的に AB40, AB42 量を測定し、脳 Aβ 量との比較検討を行った。

3. 一部の脳は 1% Triton-X で homogenize し、sucrose gradient による fractionation を行い、各 fraction にて Aβ を経時的に測定した。

## C. 研究結果

1. APPsw mice の発現蛋白を脳 SDS 分画の Western blotting で経時的に解析した。APP C 末抗体による染色では APPsw mice は nontransgenic mice の 7 倍の APP 増加を認めた。また amyloidogenic C-terminal fragment(CTF)の著明な増加を認めた。ヒト APP specific な抗体(6E10)で染色すると、ヒト APP および amyloidogenic CTF が Tg2576 のみで同定された。APP および CTF の発現自体は若年から Aβ が沈着する高齢まで変化を認めなかった。よって APPsw mice の Aβ 沈着には発現蛋白が 7 倍ほど恒常的に発現することが必要と思われた。

脳 Aβ の ELISA による測定では、SDS 分画中に可溶性 AB42, AB40 は若年から高濃度に認められた(図 1)。経時的には 9 月齢以降で上昇を認めた。それに比べてギ酸

分画中には当初は Aβ は認められず、7-8 月齢から指数関数的な蓄積を認めた。ギ酸分画中の SDS 不溶性 Aβ の出現と共に 8-9 月齢に SDS 可溶性 Aβ は一時的に低下を示した。この低下は AB42, AB40 とも有意であった(AB42,  $p=0.02$ ; AB40,  $p=0.003$ )。SDS 不溶性 Aβ の出現に伴う SDS 可溶性 Aβ の一時的低下は Western blotting でも 4kD のバンドの低下として確認された。よって Aβ が SDS 不溶性を獲得してギ酸でしか溶けない conformation に変化することが脳 Aβ アミロイド蓄積の誘因になると考えられた。

抗 AB42 抗体、抗 AB40 抗体による免疫染色では、ELISA の検討と同様に 8 月齢から老人斑が出現し、その数を増やした(図 2)。当初から出現するのは AB42, AB40 の両方で染まる neuritic plaque であった。一般的に早期老人斑と言われる AB42 のみに陽性の diffuse plaque はこのマウスでは 12 月齢からの後期に出現する老人斑であった。従来、diffuse plaque から neuritic plaque への移行が考えられてきたが、APPsw mice の所見からは 2 つの老人斑の起源は異なることが想定された。

2. 我々はこれまで AD 患者で早期から髄液および血漿 AB42 が低下することを示し、これらが AD の有用な診断マーカーであることを報告してきた。この髄液・血漿 Aβ の低下の根拠を APPsw mice において検討した(図 3)。脳 Aβ が蓄積し始める 8 月齢以降で脳 Aβ の蓄積に反比例して髄液 AB42, 血漿 AB42 とも有意に低下した(髄液 AB42,  $p=0.03$ ; 血漿 AB42,  $p=0.008$ )。AB40 は血漿のみで有意の低下を認めた( $p=0.006$ )。この減少が単に加齢に伴うものかどうか、脳 Aβ 蓄積を認めない nontransgenic mice で髄液・血漿 Aβ を測定したが、加齢による減少は認めなかった。よって APPsw mice の髄液・血漿 Aβ の低下は加齢でなく、脳 Aβ 蓄積と相関するこ



とが示された。これらが AD 脳患者で髄液・血漿 Aβ42 の低下が生化学的マーカーとなる理論的根拠であると考えられた。

3. 近年, lipid rafts と呼ばれる界面活性剤で不溶性の signal transduction molecule や receptor が集中する特殊な膜分画に Aβ が存在することが示されている。我々は lipid rafts が Aβ の早期沈着部位であるかどうかを APPsw mice を用いて経時的に検討した。4 月齢では全 Aβ の 4 分の 1 が lipid rafts に存在した。加齢と共に lipid rafts 中の Aβ は急速に上昇した。この増加は他の fraction には認められず, したがって lipid rafts が Aβ の超早期蓄積部位であると考えられた。高齢 APPsw mice の Western blotting では, Aβ は lipid rafts および分画の際の pellet に特異的に monomer および dimer のバンドとして認められた。電顕では pellet には amyloid fibril および amyloid core を認めたが, lipid rafts にも少量ながら amyloid fibril を認めた。したがって lipid rafts には amyloid fibril も形成されていることが示され, ここが Aβ の超早期の沈着部位と考えられた。

#### D. 考察

以上, APPsw mice では 7 倍の APP の過剰発現が恒常的に認められた。組織学的には neuritic plaque は 8 月齢から, diffuse plaque は 12 月齢から出現し, 異なる老人斑の起源が想定された。8 月齢で脳 Aβ は SDS 可溶性から不溶性となり, この Aβ の不溶化獲得が脳アミロイド形成の誘因と考えられた。脳 Aβ の蓄積に反比例して髄液・血漿 Aβ は減少し, この変化が髄液・血漿 Aβ の低下が AD の生化学的マーカーとなる根拠と考えられた。以上の検討より APPsw mice において Aβ の過剰産生こそが脳アミロイドを再現することが示され, APPsw mice は AD 病態の解明および治療法の開発に有用な動物モデルであると考

えられた。

APPsw mice では lipid rafts が脳 Aβ アミロイドの超早期沈着部位であることが示唆された。最近, 抗コレステロール薬が AD の発症を減らすこと, また AD マウスモデルで高コレステロール食が脳アミロイド沈着を促進することが示され, コレステロールが Aβ 沈着の危険因子として注目されている。lipid rafts は細胞内の主たるコレステロール含有部位であり, さらに *in vitro* で Aβ 凝集促進作用をもつ GM1 ganglioside の特異的な局在部位である。もう一つの脳アミロイドである prion 蛋白は lipid rafts 内で凝集性の高い scrapie 型に転換することが知られている。よって Aβ 沈着における lipid rafts の意義を明らかにすることが脳アミロイド沈着機序を解明する上で重要と考えられる。今後, APPsw mice の lipid rafts をさらに詳細に検討し, AD 脳でも lipid rafts 中の Aβ 蓄積が起こるかどうかを明らかにする予定である。

#### E. 結論

1. APPsw mice で Aβ を過剰産生すると脳アミロイドを再現できることが示された。APPsw mice は AD 病態の解明および治療法の開発に有用な動物モデルである。

2. Lipid rafts が脳 Aβ アミロイドの超早期沈着部位であることが示された。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Kawarabayashi T, Younkin LH, Saido TC, Shoji M, Ashe KH, Younkin SG: Age-dependent changes in brain, CSF, and plasma amyloid β protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 21: 372-381, 2001.

2) Shoji M, Kanai M, Matsubara E, Tomidokoro Y, Shizuka M, Ikeda Y, Ikeda M, Harigaya Y, Okamoto K, Hirai S: The levels of cerebrospinal fluid A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42(43) are regulated age-dependently. *Neurobiol Aging* 22: 209-215, 2001.

3) Harigaya Y, Saido TC, Eckman CB, Prada CM, Shoji M, Younkin SG: Amyloid  $\beta$  protein starting pyroglutamate at position 3 is a major component of the amyloid deposits in the Alzheimer's disease brain. *Biochem Biophys Res Commun* 276: 422-427, 2000.

4) 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  $\beta$  protein accumulation induces cellular death and macrophage activation in transgenic mice. *J Pathol* 191: 93-101, 2000.

## 2. 学会発表

1) Kawarabayashi T, Wahrle S, Younkin LH, Wen-Lang L, Dickson D, Younkin SG: Amyloid  $\beta$  protein accumulates in the detergent-insoluble membrane compartment. Society for Neuroscience 30<sup>th</sup> annual meeting, New Orleans, November 4-9, 2000

2) Kawarabayashi T, Wahrle S, Younkin LH,

Wen-Lang L, Dickson D, and Younkin SG: Accumulation of amyloid  $\beta$  protein in the detergent-insoluble membrane compartment. 7<sup>th</sup> International conference on Alzheimer's disease and related disorders. Washington, July 9-8, 2000.

3) Shoji M, Kanai M, Matsubara E, Ikeda M, Harigaya Y, Shizuka M, Okamoto K: Cerebrospinal fluid tau in dementia disorders. 7<sup>th</sup> International conference on Alzheimer's disease and related disorders. Washington, July 9-8, 2000

4) Shizuka M, Kanai M, Matsubara E, Ikeda M, Harigaya Y, Tomidokoro Y, Okamoto K, Shoji M: Presenilin-1 increased A $\beta$ 40/42(43) by binding C-terminal fragments of  $\beta$ APP. Society for Neuroscience 30<sup>th</sup> annual meeting, New Orleans, November 4-9, 2000

## H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

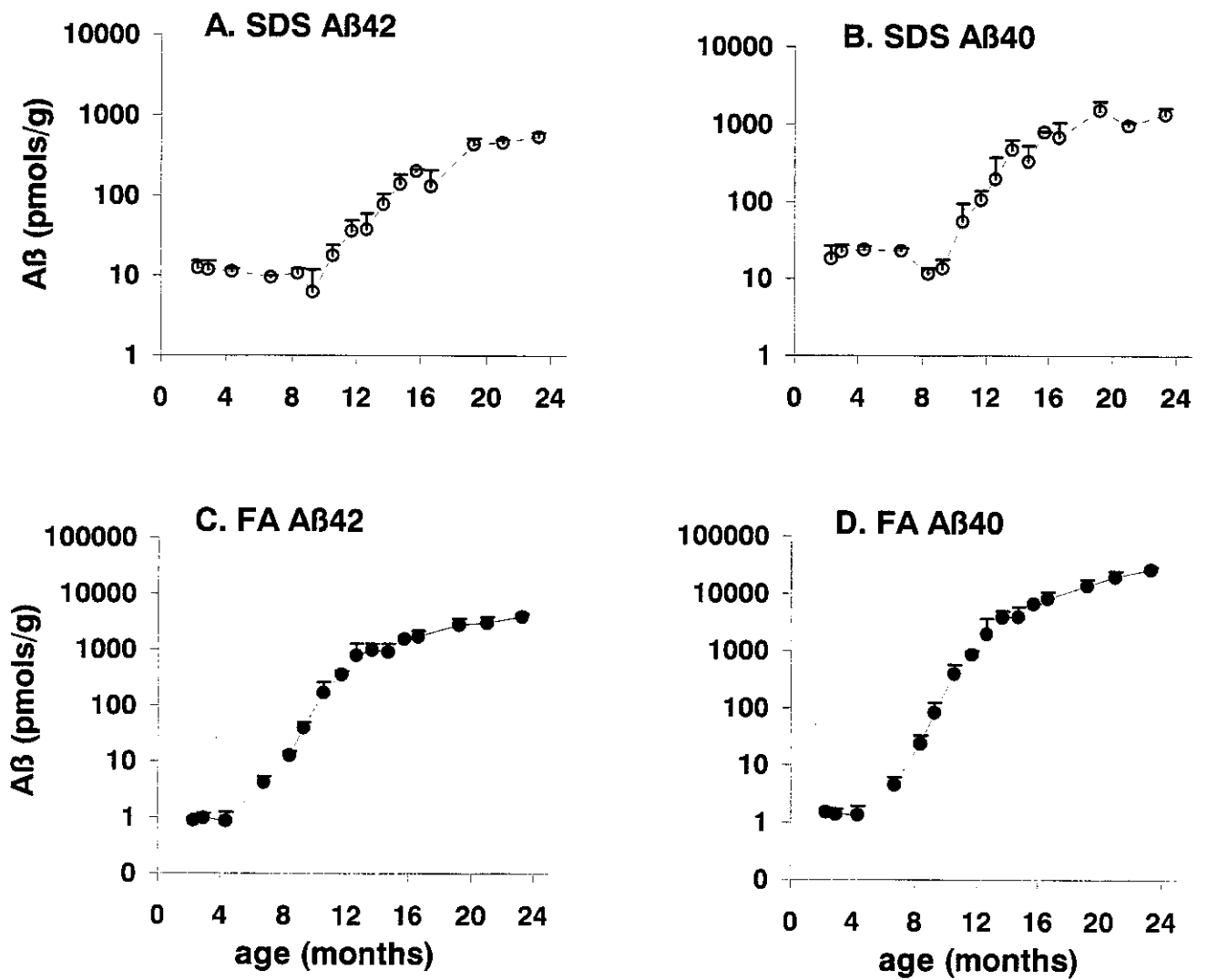


Fig. 1

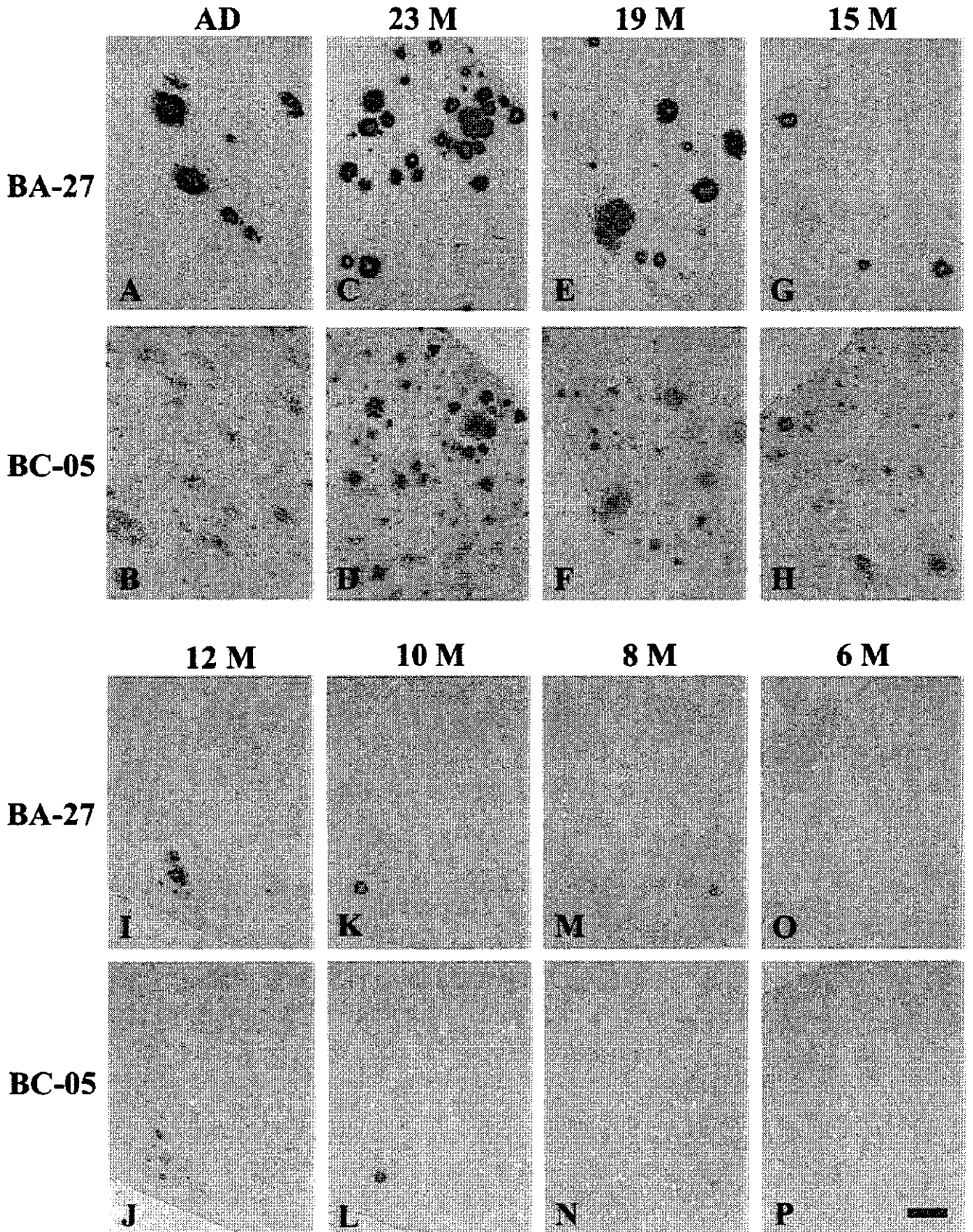


Fig. 2