

Fig. 3

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

脳アミロイドーシスは痴呆を引き起こす

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 針谷康夫*、富所康志*、池田将樹*、松原悦朗*、瓦林 毅*、
五十嵐 康**
群馬大学医学部、*神経内科、**神経精神薬理

研究要旨 アルツハイマー病における脳 A β アミロイドーシス(A β AM)の役割を明らかにするため、APPsw mice 脳で A β AM に誘発される変化を検討した。A β AM を ELISA と免疫染色で経時的に定量し、受動的回避試験を行った。各種リン酸化 tau 抗体染色で Tauopathy の出現と Acetylcholine (ACh)濃度の変化を検討した。神経細胞数とシナプスの低下を定量した。DAPI と TUNEL 法で Apoptosis を検討した。①8カ月齢から記憶学習障害が出現し、増強した。②大脳皮質・海馬で ACh が低下していた。③老人斑で神経細胞とシナプスの減少がみられ、周囲の神経変性突起にリン酸化 tau と神経ペプチドの蓄積がみられた。④Apoptosis は見られなかった。⑤これらの変化は A β AM の程度と相関していた。A β AM は神経細胞死とリン酸化 tau の蓄積を誘発し、学習障害を引き起こす。

A. 研究目的

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(A β)が沈着して脳 A β 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など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。しかしながら、この脳 A β アミロイドーシスがどのように痴呆を発症してくるのか未だ明らかではない。我々は、Initial event である脳 A β アミロイドーシスの生成機序の解明や予防が最も重要であると考え、これまで家族性 AD の原因遺伝子を発現する transgenic mice (TG)を作成解析することにより、これらの検討を行ってきた。

今回、我々は脳 A β アミロイドーシスと

記憶学習障害を認める TG (APPsw mice) を用いて、AD 脳でみられる secondary event すなわち神経細胞やシナプスの消失、グリア細胞の反応性や過剰リン酸化された tau の蓄積、神経原線維変化などの病理学的変化や Acetylcholine (ACh)の低下などの生化学的変化が認められるかどうかを明らかにした。

B. 研究方法

1. 神経病理学的検討

4, 8, 12, 18ヶ月齢の APPsw mice 脳の paraffin 切片を抗 A β 抗体で染色し経時的変化を明らかにした。Gallyas 染色で神経原線維変化を検索した。隣接切片を Nissl と Congo-red の2重染色を行い、ア

ミロイドコアを中心に同心円状に 4 つの領域に分け各々の領域に含まれる神経細胞・非神経細胞を計測し、単位面積あたりの細胞密度を求め比較検討した (図 1 a)。蛍光色素(DAPI)と TUNEL 法で染色し Apoptosis の有無を検討した。隣接切片を抗 β APP 末抗体、抗 ApoE 抗体、抗 GFAP 抗体、抗 Microglia 抗体、抗 Somatostatin 抗体、抗 Substance P 抗体、抗 Choline acetyltransferase 抗体で免疫染色を行った。プレシナプスマーカーである α -Synuclein、ポストシナプスマーカーである Drebrin に対する抗体を用いて免疫染色し、シナプス量を比較検討した。各種リン酸化部位特異 tau 抗体 (anti-PS199, anti-PS205, anti-PT231/PS235, anti-PS396, anti-PS413, AT8, Alz50, PHF1, CP13) および抗 ubiquitin 抗体、さらに tau 蛋白リン酸化酵素関連 (anti-act GSK3 β , anti-inact GSK3 β , anti-GSK3 α , anti-act CDK5, anti-MAPK, anti-fyn) に対する抗体を用いて免疫染色を行い tau の蓄積が認められるかどうか検討した。

2. 脳内 A β 蓄積量の測定

マウス脳の一部を 70%ギ酸で抽出し Sandwich ELISA 系 (BNT-77/BA-27, BNT-77/BC-05) を用いて経時的に脳内 A β 40, 42 量を測定した。

3. 受動的回避試験

7ヶ月齢の APPsw mice 5 匹、対照 7 匹に電気ショックに対する受動的回避試験を行った。具体的にはマウスを明室に入れ隣の暗室に入ると 3 秒間電気ショックを与えた。その後、毎日 1 回 5 日間連続で試験を施行し、明室から暗室へ入るまでの時間を反応潜時として測定した。5 分以上明室にいる場合は受動的回避反応を習得したものとみなした。その後は毎週 1 回検査を施行しその反応潜時を測定し比較した。

4. 脳内 Ach 濃度の測定

受動的回避試験終了後の 10ヶ月齢のマウス脳で各部位 (大脳皮質, 海馬, 線条体, 脳幹, 小脳) 毎に Ach 濃度を測定した。

C. 研究結果

1. APPsw mice 脳の経時的検討では 8ヶ月齢で巨大な Cored plaque が、12ヶ月齢で Diffuse plaque が大脳皮質, 海馬, 嗅脳に出現し、加齢とともに増加した。Amyloid Angiopathy は 10ヶ月齢からみられた。老人斑コアを含む領域 1 では神経細胞の密度が明らかに低下していた (図 1 b)。神経細胞以外の細胞密度では 4 領域間に差は見られなかった (図 1 c)。全細胞数でも領域 1 で有意に細胞密度が低下していた (図 1 d)。このマウスでは少なくとも老人斑コアの部分では神経細胞が消失していることが明らかとなった。Apoptosis の所見はみられなかった。免疫染色のまとめを表 1 に示す。抗 A β 抗体に陽性の老人斑は抗 ApoE 抗体でも染色された。抗 α -Synuclein 抗体, 抗 Drebrin 抗体による染色では老人斑の部位でいずれも染色性が低下しており、この部位ではシナプス消失があるものと考えられた。老人斑周囲には著明な astrogliosis, microgliosis がみられた。周囲には β APP 陽性の dystrophic neurites が多数認められ、一部は抗 Somatostatin 抗体, 抗 Substance P 抗体, 抗 Choline acetyltransferase 抗体で染色された。このことから dystrophic neurites にこれらの神経伝達物質が蓄積していることが明らかとなった。dystrophic neurite の一部は各種リン酸化部位特異 tau 抗体で染色され、経時的にこの染色性は増加した。このことは既に世界で確立されている各種リン酸化 tau 抗体を用いた検討でも確認された。Tau リン酸化酵素に対する抗体のうち、fyn によって活性化された GSK 3 β , GSK 3 α , CDK5,

MAPK に対する抗体が dystrophic neurites の一部を染色したことから、tau リン酸化酵素群の中で特に活性化 GSK 3 β が重要な役割をしていることが推察された。神経原線維変化は見出せなかった。

2. 脳内 A β を ELISA で定量すると、4ヶ月齢で既に A β 蓄積がみられ、8ヶ月齢から指数関数的に大量の A β の蓄積が確認された。組織学的に同定される脳アミロイドは生化学的な A β 蓄積量とよく相関していた。

3. 電気ショックによる受動的回避試験では、APPsw mice, 対照ともに1回の電気ショックで受動的回避反応を習得した。その後、いずれの群でも電気ショックの記憶を保持していたが、APPsw mice では3週後の32週齢(8ヶ月齢)から回避行動の潜時が短縮し始め、34週齢(8.5ヶ月齢)から有意差が認められ (P<0.05)、加齢とともに著明となった(P<0.01)。これらの結果は記憶障害が出現したことを意味している。

4. APPsw mice では大脳皮質、海馬で有意の Ach の低下が見られた (図2)。

D. 考察

この APPsw mice では AD 脳で見られるび慢性老人斑, 典型的老人斑, Amyloid angiopathy が再現され、AD 脳と同じ A β 分子種が蓄積していた。老人斑芯では神経細胞とシナプスの有意の減少がみられた。老人斑周囲の dystrophic neurites に β APP, 神経伝達物質, 異常リン酸化 tau の蓄積が認められた。神経原線維変化の再現にまで至っていないが、A β 蓄積が明らかな記憶障害や脳内 Ach 量の低下をも引き起こすことから、脳 A β アミロイドーシスは AD における痴呆発症のもっとも重要な factor であるとともに、治療の第一のターゲットであると考えられた。

E. 結論

A β アミロイドーシスは神経細胞死とリン酸化 tau の蓄積を誘発し、学習記憶障害を引き起こすものと考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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 β 40 and A β 42(43) are regulated age-dependently. *Neurobiol Aging* 22: 209-215, 2001.

2) Tomidokoro Y, Ishiguro K, Harigaya Y, Matsubara E, Ikeda M, Park J, Yasutake K, Kawarabayashi T, Okamoto K, Shoji M: A β amyloidosis induces the initial stage of tau accumulation in APP(Sw) mice. *Neurosci Lett* 299: 169-172, 2001.

3) 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.

4) Harigaya Y, Saido TC, Eckman CB, Prada CM, Shoji M, Younkin SG: Amyloid β 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.

5) Tomidokoro Y, Harigaya Y, Matsubara E, Ikeda M, Kawarabayashi T, Okamoto K, Shoji M: Impaired neurotransmitter systems by A β amyloidosis in APPsw transgenic mice overexpressing amyloid β protein precursor. *Neurosci Lett* 292: 155-158, 2000.

6) Wegiel J, Wisniewski HM, Muzylak M, Tarnawski M, Badmajew E, Nowakowski J, Wang KC, Shoji M, Mondadori C, Giovanni A: Fibrillar amyloid β production, accumulation, and recycling in transgenic mice pancreatic acinar cells and macrophages. **Amyloid** 7: 95-104, 2000.

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

2) Matsubara E, Ghiso J, Shizuka M,

Tomidokoro Y, Ikeda M, Harigaya Y, Frangione B, Shoji M: Increased level of lipoprotein-free amyloidogenic A β precede the appearance of amyloid deposition in Down's syndrome. 30th Annual Meeting of Society for Neuroscience, New Orleans, November 4-9, 2000.

3) Shizuka M, Kanai M, Matsubara E, Ikeda M, Harigaya Y, Tomidokoro Y, Okamoto K, Shoji M: Presenilin-1 increased A β 40/42(43) by binding C-terminal fragments of β APP. 30th Annual Meeting of Society for Neuroscience, 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

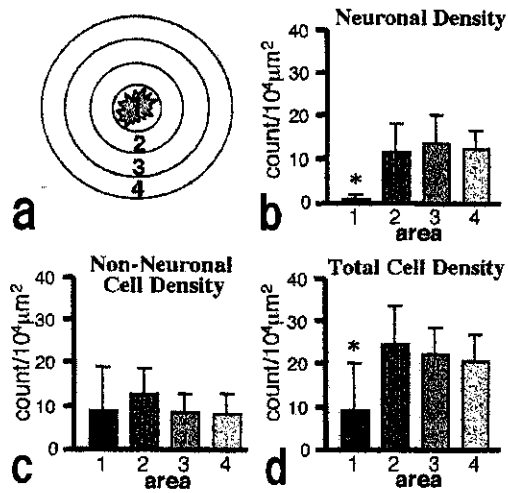


図 1. 神経細胞の消失

- アミロイドコアを中心に同心円状に内側から領域 1,2,3,4 の四つの領域に分ける。
- 領域 1 では領域 2-4 に比べて有意に神経細胞の密度の低下を認める。
- 非神経細胞の密度に明らかな差は認めない。
- 総細胞の密度でも領域 1 で有意の低下を認める。

表 1 免疫染色のまとめ

抗体	老人斑	変性神経突起
Aβ related		
anti-Aβ	++	
anti-C of βAPP		++
anti-ApoE	++	
synapse		
anti-α-synuclein		++
anti-Drebrin		+
Neurotransmitter		
anti-Somatostatin		+
anti-Substance P		+
anti-ChAT		+
Neurofibrillary tangles		
Site-specific p tau		
anti-PS199		+
anti-PS205		±
anti-PT231/PS235		+
anti-PS396		+
anti-PS413		+
AT8		+
Alz50		+
PHF1		+
CP13		+
Ubiquitin	++	++
Tau protein kinase		
anti-act GSK3β		+
anti-inact GSK3β		-
anti-GSK3α		+
anti-act CDK5		+
anti-MAPK		+
anti-fyn		+

Decrease of Acetylcholine Levels in APPsw Brains

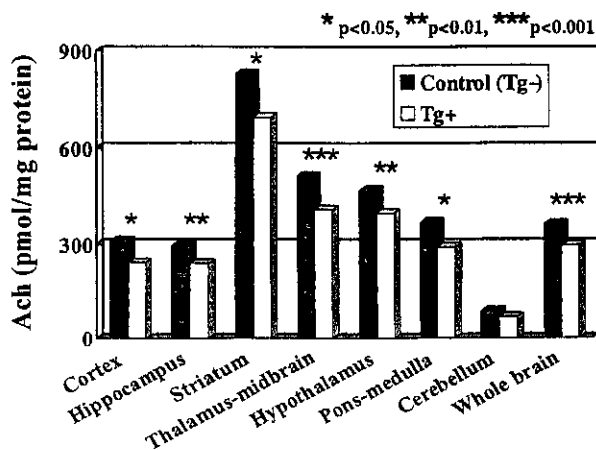


図 2. 脳内 Acetylcholine 濃度

大脳皮質や海馬では Acetylcholine 濃度の有意の低下を認める。

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

神経細胞内のタウ蛋白蓄積と記憶運動機能障害の低下を認めた 変異タウ(R406W)トランスジェニックマウスの検討

分担研究者 東海林幹夫 群馬大学医部神経内科

共同研究者 池田将樹*、針谷康夫*、瓦林 毅*、松原悦朗*、岡本幸市*、
平井俊策**

*群馬大学医学部神経内科、**都立神経病院

A. 研究目的

大脳にタウ蛋白からなる神経原線維変化が出現する種々の神経変性疾患は近年 tauopathy という疾患概念として理解されつつある。このうちアルツハイマー病では脳アミロイドーシスとともにタウ蛋白を主成分とする神経原線維変化の出現が特徴とされている。

家族性アルツハイマー病の原因遺伝子変異が A β を増加させ、A β 過剰発現マウスでは脳アミロイドが再現でき、タウ遺伝子変異はアルツハイマー病とは異なる parkinsonism を伴う家族性前頭側頭型痴呆 (FTDP-17)を引き起こすことから、アルツハイマー病では A β 増加が脳 A β amyloidosis を誘発し、二次的に tauopathy を発生させるものと考えられる。従来の A β 過剰発現マウスでは著明な神経細胞死や tauopathy を示さないため、脳 A β amyloidosis が tauopathy を誘発する機序は不明であった。家族性前頭側頭型痴呆 (FTDP-17)の原因遺伝子タウのミスセンス変異がタウ蓄積と神経細胞死を引き起こす機序を明らかにし、tauopathy と脳アミロイド関係を解明するため、ミスセンス変異および正常型タウ遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作製し、遺伝子

導入していないコントロールマウスも加えて検討を行った。

B. 研究方法

導入遺伝子として Hamster Prion Promoter と変異型タウ(R406W)遺伝子および正常型タウ遺伝子を用い、micro-injection 法にてマウス受精卵に注入し、成育したトランスジェニックマウスを解析した。変異型、正常型タウ遺伝子はいずれも four repeat tau cDNA を用いた。作製したトランスジェニックマウスと同月齢の遺伝子導入していないコントロールマウスについてはローターロッド(1 分間 16 回転)による運動機能測定、Passive avoidance test(受動的回避試験)による学習記憶機能測定、各種生化学的神経病理学的検討の解析を行った。

C. 研究結果

10 月齢タウ(R406W)トランスジェニックマウスの各種リン酸化タウ抗体、非リン酸化タウ抗体による免疫細胞学的検討では前頭葉、側頭葉の皮質と白質、海馬の神経細胞と神経突起に著明なタウ蛋白の蓄積を認めた。同マウスでは前頭葉、側頭葉では神経細胞数減少と GFAP 染色により

巨大なアストロサイトを伴う著明なグリオシスが認められた。6 月齢タウ(R406W)トランスジェニックマウスでは病理学的変化がみられなかった。A β による染色では陽性所見は得られなかった。電顕所見では細胞質内に無数の straight tubule(直径約 10nm)が確認された。

マウス脳サルコシル不溶分画を作製後、ヒト特異的タウ抗体である E1 による Western blotting では 68kD の four repeat tau とその代謝産物が認められた。コントロールマウスや低発現トランスジェニックマウスではタウのバンドは確認されなかった。

10 月齢および 12 月齢の変異型タウ(R406W)トランスジェニックマウスはローターロッドによる運動機能測定では運動機能の著明な低下を認めた(図 1)。10 月齢の変異型タウ(R406W)トランスジェニックマウスとコントロールマウスの逃避反応の学習到達度において差は認められなかったが(図 2(a))、7 週目以降にも明らかな学習記憶の保持障害が認められた(図 2(b))。

D. 考察

変異型タウ(R406W)蛋白の過剰発現はトランスジェニックマウス脳に tauopathy を引き起こし、前頭葉、側頭葉、海馬神経細胞内の変異タウ蛋白の蓄積と神経細胞死を誘導した。さらに、学習行動実験から変異型タウトランスジェニックマウスの運動機能の著明な低下、学習記憶保持機能障害が認められた。これらの所見は我々の開発した変異型タウ(R406W)トランスジェニックマウス(Tau_{RW})が家族性前頭側頭型痴呆(FTDP-17)の動物モデルとして疾患の発生機序と治療法を検討する上で有用であることを示している。今回の結果からは tauopathy が脳 A β amyloidosis を誘発することはなかったが、既に確立している変

異 APP マウス(APP_{sw})と交配させた変異 Tau_{RW} X APP_{sw}マウスを作製し解析することにより、A β amyloidosis による二次性 tauopathy の解明が期待される。

E. 結論

今回我々が開発した変異型タウ(R406W)トランスジェニックマウス脳においてtauopathyを認め、神経細胞内の変異型タウ蛋白の蓄積と神経細胞死が観察された。さらに、マウスの行動実験により運動機能の著明な低下も確認された。これらの所見より我々の開発した変異型タウ遺伝子(R406W)トランスジェニックマウスは前頭側頭型痴呆の疾患モデルとして疾患の発生機序を検討する上で有用である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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 β 40 and A β 42(43) are regulated age-dependently. *Neurobiol Aging* 22: 209-215, 2001.
- 2) Tomidokoro Y, Ishiguro K, Harigaya Y, Matsubara E, Ikeda M, Park J, Yasutake K, Kawarabayashi T, Okamoto K, Shoji M. A β amyloidosis induces the initial stage of tau accumulation in APP(Sw) mice. *Neurosci Lett* 299: 169-172, 2001.
- 3) 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.

4) Harigaya Y, Saido TC, Eckman CB, Prada CM, Shoji M, Younkin SG. Amyloid β 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.

5) Tomidokoro Y, Harigaya Y, Matsubara E, Ikeda M, Kawarabayashi T, Okamoto K, Shoji M. Impaired neurotransmitter systems by abeta amyloidosis in APPsw transgenic mice overexpressing amyloid beta protein precursor. **Neurosci Lett** 292: 155-158, 2000.

6) Wegiel J, Wisniewski HM, Muzylak M, Tarnawski M, Badmajew E, Nowakowski J, Wang KC, Shoji M, Mondadori C, Giovanni A. Fibrillar amyloid- β production, accumulation, and recycling in transgenic mice pancreatic acinar cells and macrophages. **Amyloid** 7: 95-104, 2000.

10) 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) Shoji M, Kanai M, Matsubara E, Ikeda M, Harigaya Y, Shizuka M, Okamoto K:

Cerebrospinal fluid tau in dementia disorders. 7th International conference on Alzheimer's disease and related disorders. Washington, July 9-8, 2000.

2) Matsubara E, Ghiso J, Shizuka M, Tomidokoro Y, Ikeda M, Harigaya Y, Frangione B, Shoji M: increased level of lipoprotein-free amyloidogenic A β precede the appearance of amyloid deposition in down's syndrome. 30th Annual meeting of society for Neuroscience, New Orleans, November 4-9, 2000.

3) Shizuka M, Kanai M, Matsubara E, Ikeda M, Harigaya Y, Tomidokoro Y, Okamoto K, Shoji M: Presenilin-1 increased A β 40/42(43) by binding C-terminal fragments of β APP. 30th Annual meeting of society for Neuroscience, 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

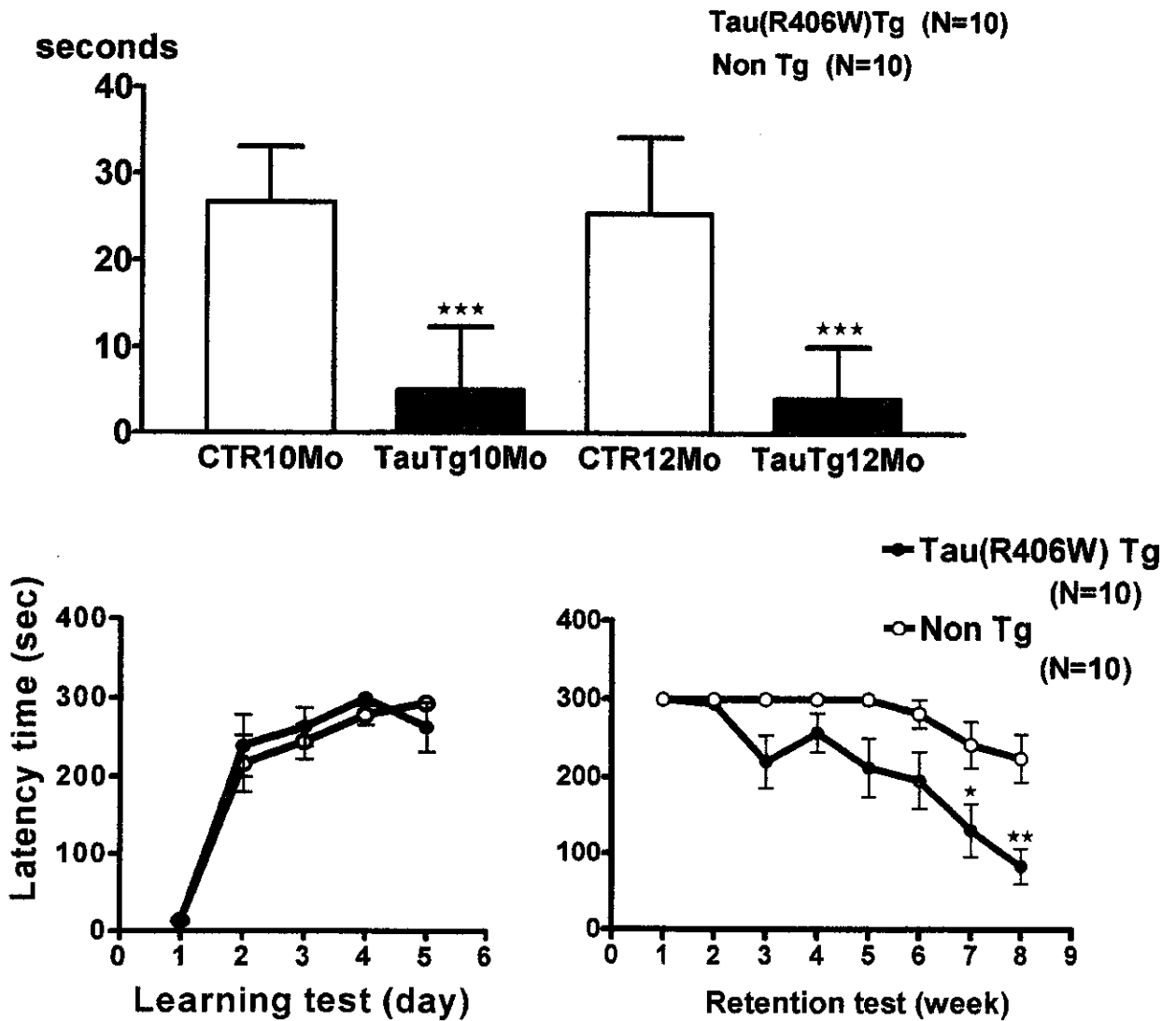
なし

図 1 (上段)

10 カ月齢の変異型タウ(R406W)トランスジェニックマウス(Tg)とコントロールマウス (Non Tg)のローターロッドによる運動機能測定

図 2 (下段左(a)、下段右(b))

10 カ月齢の変異型タウ(R406W) Tg と Non Tg の逃避反応の学習到達度 (図 2(a))、7 週目以降に明らかな学習記憶の保持障害が認められた(図 2(b))。



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

Aβアミロイドーシスは anti-amyloidogenic environment の再構築障害か？

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 松原悦朗、池田将樹、瓦林 毅、針谷康夫

群馬大学医学部神経内科

研究要旨 本研究では孤発性アルツハイマー病において明らかでない脳 Aβアミロイドーシス発症機序解明のため、リポ蛋白が可溶性 Aβ分子種の amyloidogenic potential の環境規定因子であるかどうかを検討をした。健常者においては60歳以降、全血漿中に占めるリポ蛋白フリーAβ42を低下させる anti-amyloidogenic environment の存在を認めた。アルツハイマー病では病初期より全血漿中に占めるリポ蛋白フリーAβ42が増加し痴呆の重症化に伴い低下した。さらにダウン症候群では10歳代よりその増加と、加齢に伴う低下が証明され、anti-amyloidogenic environment から pro-amyloidogenic environment への移行は痴呆発症前であり、全血漿中に占めるリポ蛋白フリーAβ42は病態把握に有用であることが示唆された。このリポ蛋白フリーAβ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、痴呆発症前に、Aβを anti-amyloidogenic な環境に留め置く、リポ蛋白に規定された年齢依存的制御機構に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Aβ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Aβ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。

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 Aβ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 Aβ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 の維持と血液中からのクリアランスがなされている。この可溶性 Aβ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同型 Aβは non-amyloidogenic、リポ蛋白フリーな可溶性 Aβは amyloidogenic な分子種に相当する。実際にアルツハイマー病やダウン症候群患者ではこの amyloidogenic なリポ蛋白フリーな可溶性 Aβが増加していることを我々は明らかとした。今回の研究では、孤発性アルツハイマー病においてまだ明らかでない脳 Aβアミロイド

ーシス発症機序解明のため、リポ蛋白が可溶性 A β 分子種の amyloidogenic potential の環境規定因子であるかどうかを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 100 例 (リポ蛋白 depletion は 100 例)、健常者 241 例 (リポ蛋白 depletion は 113 例)、さらに 178 例のダウン症候群患者 (リポ蛋白 depletion は 103 例) である。血漿中 A β 濃度、さらに血漿より超遠心にてすべてのリポ蛋白 (VLDL から 1.25g/L 密度の VHDL を含む全リポ蛋白) を depletion した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

1. リポ蛋白フリー可溶性 A β の生理的加齢変動

全血漿中に占めるリポ蛋白フリー可溶性 A β 42 量を検討すると、60 歳以降での加齢変動、年齢依存的な減少が明らかとなった (図 1)。この減少は生理的な条件下では、血漿中の amyloidogenic なリポ蛋白フリー A β 42 を減らす anti-amyloidogenic environment の再構築障害が存在すると推定された。

2. アルツハイマー病の痴呆重症度別リポ蛋白フリー可溶性 A β

生理的な anti-amyloidogenic environment の再構築障害が孤発性アルツハイマー病の病因であることを検証するため、孤発

生アルツハイマー病患者を mild AD (MMSE, >20, n=27), moderate AD (MMSE, 11-20, n=29), severe AD (MMSE, <11, n=44) と重症度分類し同様の検討を行った。全血漿中に占めるリポ蛋白フリーな A β 42 量は痴呆の軽度な時期から、有意に増加しており、痴呆の重症度に伴い低下する傾向にあった (図 2)。アルツハイマー病では生理的な anti-amyloidogenic environment の再構築障害に起因した pro-amyloidogenic environment への移行が病初期より既に存在していることが本検討から明らかとなった。

3. ダウン症候群におけるリポ蛋白フリー可溶性 A β

アルツハイマー病における検討から、anti-amyloidogenic environment から pro-amyloidogenic environment への移行時期が痴呆発症前の可能性も示唆されたため、アルツハイマー病の脳病変の経時的変化が明らかであるダウン症候群に着目し、同様の検討を行った。全血漿中に占めるリポ蛋白フリーな A β 42 量は痴呆を認めず、脳内に瀰漫生老人斑の出現する 10 歳代までに増加し、以後減少を認める (図 3)。以上の結果から、anti-amyloidogenic environment から pro-amyloidogenic environment への移行は痴呆発症前であり、脳におけるアルツハイマー病の on-going AD pathology を反映し低下することが明らかとなった。

D. 考察

可溶性 A β とリポ蛋白の相互作用は生理的には 60 歳以上で再構築を受け、アルツハイマー病にならぬよう環境変化 (anti-amyloidogenic environment) が認められることが本研究で明らかとなった。その主たる規定因子はリポ蛋白であり、アルツハイマー病はその再構築障害に起

因し、anti-amyloidogenic environment から pro-amyloidogenic environment への移行が加速され、その長期暴露下で発症する可能性が示唆された。さらにダウン症候群における検討から、anti-amyloidogenic environment から pro-amyloidogenic environment への移行は痴呆発症前であり、全血漿中に占めるリポ蛋白フリーA β 42はアルツハイマー病脳病変を反映し、その病態把握に有用であることが示唆された。髄液中でも可溶性A β はリポ蛋白と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。血液中ではA β にアミロイド線維形成が認められぬことから、血液中と脳内可溶性リポ蛋白フリーA β conformationには質的相違が存在し、血液中ではnon-amyloidogenic conformerが主体であり、脳内ではamyloidogenic conformerが増加する病態が想定される。

E. 結論

脳アミロイドーシスにおいては、痴呆発症前に、A β を anti-amyloidogenic な環境に留め置く、リポ蛋白に規定された年齢依存的制御機構に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 変化を起し、fibril 形成に至ると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shoji M, Kanai M, Matsubara E, Ikeda M, Harigaya Y, Okamoto K, Hirai S. Tapss to Alzheimer' s patients: A continuous Japanese study of cerebrospinal fluid biomarkers. *Ann Neurol* . 48: 402, 2000
- 2) Tokuda T, Calero M, Matsubara E, Vidal R, Kumar A, Parmanne B, Zlokovic B, Smith JD, Ladu MJ, Rostango A, Frangione B, Ghiso J. Lipidation of apolipoprotein E influences its isoform-specific interaction with Alzheimer' s amyloid beta peptides. *Biochem J* . 348: 359-365, 2000
- 3) Calero M, Rostango A, Matsubara E, Zlokovic B, Frangione B, Ghiso J. Apolipoprotein J (clusterin) and Alzheimer' s disease. *Microsc Res Tec* . 50:305-315, 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 β protein accumulation induces cellular death and macrophage activation in transgenic mice. *J Pathol* . 191: 93-101, 2000
- 5) Shoji M, Harigaya Y, Sasaki A, Ueda K, Ishiguro K, Matsubara E, Watanabe M, Ikeda M, Kanai M, Tomidokoro Y, Shizuka M, Amari M, Kosaka K, Nakazato Y, Okamoto K, Hirai S. Accumulation of NACP/alpha-synuclein in lewy body disease and multiple system atrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* . 68: 605-608, 2000
- 6) Shoji M, Kawarabayashi T, Matsubara E, Ikeda M, Ishiguro K, Harigaya Y, Okamoto K. Distribution of amyloid protein precursor in the Alzheimer' s brain. *Psychiatry and Clinical*

- Neurosciences 54: 45-54, 2000
- 7) Tomidokoro Y, Harigaya Y, Matsubara E, Ikeda M, Kawarabayashi T, Okamoto K, Shoji M. Impaired neurotransmitter systems by abeta amyloidosis in APPsw transgenic mice overexpressing amyloid beta protein precursor. *Neurosci Lett* 292: 155-158, 2000
 2. 学会発表
 1. Shizuka M, Kanai M, Matsubara E, Ikeda Y, Harigaya Y, Tomidokoro Y, Okamoto K, Shoji M: Presenilin-1 increased A β 40/42(43) by binding to C-terminal fragments of β APP. 30th Annual meeting of society for neuroscience, New Orleans, 2000.
 2. Matsubara E, Ghiso J, Shizuka M, Tomidokoro Y, Ikeda M, Harigaya Y, Frangione B, Shoji M: Increased levels of lipoprotein-free amyloidogenic A β precede the appearance of amyloid deposition in Down's syndrome. 30th Annual meeting of society for neuroscience, New Orleans, 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

Figure 1. Age-related change of the percentage of lipoprotein-free A β 42 relative to whole plasma sA β in normal controls

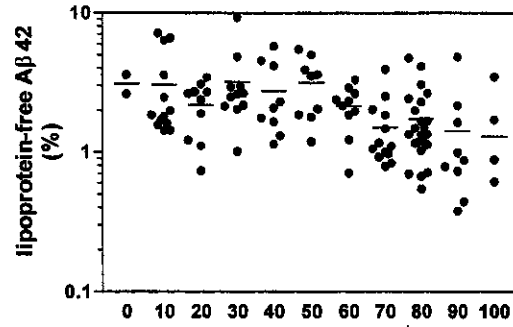


Figure 2. Age-related change of the percentage of lipoprotein-free A β 42 relative to whole plasma sA β in Alzheimer's disease

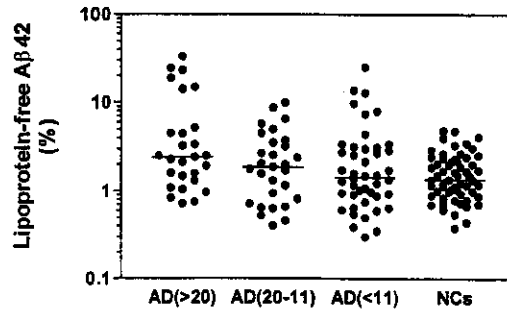
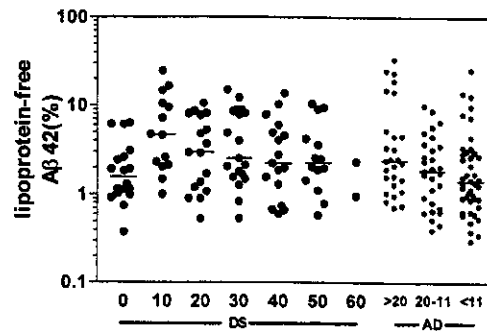


Figure 3. Age-related change of the percentage of lipoprotein-free A β 42 relative to whole plasma sA β in Down's syndrome



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

脳アミロイドーシスの治療法の検討

分担研究者 東海林幹夫 群馬大学医部神経内科

共同研究者 針谷康夫*、瓦林 毅*、松原悦朗*、池田将樹*、岡本幸市*、
平井俊策**

*群馬大学医学部神経内科、**都立神経病院

研究要旨 脳アミロイドーシスを再現する動物モデルの開発を行い、形成機序と治療法を検討した。本年度は神経原線維変化を出現するマウス (Tau R406W) と APPsw マウスより 4 倍の速度で脳アミロイド沈着を再現するマウス (APPswxPresenilin-1 L286V) を開発した。脳アミロイドーシスの根本的な治療法として注目されつつある Aβワクチン療法を本邦でも可能かどうか検討するため、APPsw マウスに 6 ヶ月齢 から 50μg の Aβ42 を皮下注射し、免疫を行った。全例に抗体価の上昇がみられ、小経の老人斑の生成が抑制されていた。ELISA では脳アミロイドとして沈着した Aβ42 の有意な減少がみられた。ヒト脳アミロイドの伝播性を検討するため、アルツハイマー病患者脳アミロイドを APPsw 脳に注入し、促進効果を検討した。ヒト Aβアミロイドは一旦脳内に存在すると代謝に抵抗性で長期間存在し、Aβアミロイドの形成を促進していた。ヒトに現実的に臨床応用するには、今後、さらに詳細な検討が必要と考えられた。

A. 研究目的

脳アミロイドーシスはアルツハイマー病と脳血管アミロイドアンギオパチーによる脳血管障害患者にみられる特徴的変化である。この 2 つの疾患は社会の高齢化とともに近年、急増しており、両者の疾患原因である脳アミロイドーシスの早急な治療法の確立が求められている。さらに、アルツハイマー病患者脳では脳アミロイドとともに神経原線維変化も出現するため、この 2 つの病理的変化の発現機序、関連と治療法の開発も求められている。我々はこの目的のために脳アミロイドーシスを再現する動物モデルの開発を行い、脳アミロイドの形成機序を解明してきた。本年度の研究ではさらに、脳アミロイドーシス

による痴呆の解明のために、神経原線維変化を出現するマウス (Tau R406W) の開発とともに、APPsw マウスより 4 倍の速度で脳アミロイド沈着を再現するマウス (APPswxPresenilin-1 L286V) を開発して、治療法の評価をより迅速に可能にするシステムの確立を先ず行った。さらに、脳アミロイドーシスの根本的な治療法として注目されつつある Aβワクチン療法を本邦でも可能かどうか検討するため、APPsw マウスを用いて Aβ42 ワクチンの効果を検討するとともに、この治療を行う場合に最も問題となると考えられる異常コンフォーメーションを有した Aβが近年問題となっているヒトプリオンと同様に伝播性を有するかどうか検討を加えた。

B. 研究方法

- 16 匹の APPsw マウス (7 male, 9 female) に、6 ヶ月齢 から 50 μ g の A β 42 をアジュバントとともに皮下注射し、免疫を行った。免疫は 1 回 / 月で行い、12 ヶ月齢で脳を検索した。対照として 18 匹の無処理 age-matched APPsw mice を用いた。半脳は 4%パラホルム固定パラフィン切片を作成し、Ab9201 および各種 A β に対する抗体で免疫染色を行った。A β 沈着の評価は海馬がみえる前額断大切片を NIH image を用いて免疫染色陽性面積の総計を計算するとともに、顕微鏡で同定された直径 50~150 μ m の大型の老人斑とそれ以下の老人斑、アミロイドアンギオパチーに分けて出現数を定量した。APPsw mice の半脳を TBS 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、脳検索時に同時に血液を採取し、A β 42 に対する抗体価の上昇を検討した。
- アルツハイマー病患者脳約 1g に 1ml の 2%SDS を加え、テフロンホモジェナイザーでホモジェナイズし、100,000xg で遠心した。沈査を 70%蟻酸をもちいて再度抽出して得られた脳 A β アミロイド凝集粗分画をさらに Superose 12 カラムを用いて、monomer (15 分画) と oligomer (13,14 分画) に分離して、それぞれの分画 5 μ g を 3.5~5 ヶ月齢 APPsw マウス計 32 匹の脳内に注入し、~3 ヶ月後に脳を組織学的に検索した。対照として同年齢の non-transgenic mice を検索した。

C. 研究結果

A β 42 免疫 APPsw mice は 16 匹の内 11 匹が経過中に死亡した。生存した 5 匹のす

べて(13-1, 13-2, 13-3, No6, No7)に対照マウス (cont1, cont2) に比べて x8,000 倍から x64,000 倍に投与した AB42 に対する抗体価の上昇がみられた。組織学的にはこのうち 4 匹に組織学的に老人斑蓄積の減少がみられた。海馬を含む前額断大切片で直径 50~150 μ m の大型の老人斑 (Large plaque: LP) とそれ以下の老人斑 (Small plaque: SP), アミロイドアンギオパチー (Amyloid angiopathy: AA) に分けて出現数を計算し、免疫群 (Im) と対照群 (C) では 2.6 \pm 1.7(LPIIm), 8.6 \pm 5.9(LPC), 8.8 \pm 12.0(SPIIm), 47.3 \pm 34.7(SPC), 7.8 \pm 5.9(AAIm), 8.1 \pm 6.3(AAC)であり、免疫群で有意に小型の老人斑の抑制が認められた。(P<0.05)。同じ切片で NIH image を用いて A β 免疫染色陽性部位を定量すると、免疫群(Area Im)で 839 \pm 649 pixel で対照群では 1098 \pm 581pixel で、有意さはみられなかった。以上のことは、免疫群では小径の老人斑の生成を抑制することを示している。

次に、ELISA で A β 40 および A β 42 を測定した。TBS で抽出した可溶性 A β 分画では免疫群 A β 40 は 326 \pm 452fmol/ml(Im), A β 42 は 80 \pm 7fmol/ml(Im)であった。対照群 A β 40 は 1261 \pm 1204fmol/ml(Cont), A β 42 は 76 \pm 78fmol/ml(Cont)であった。蓄積したアミロイドを定量する蟻酸抽出分画では免疫群 A β 40 は 556 \pm 559pmol/ml(Im), A β 42 は 111 \pm 61pmol/ml(Im)であった。対照群 A β 40 は 1064 \pm 712pmol/ml(Im), A β 42 は 231 \pm 130pmol/ml(Im)であった。この蟻酸分画の免疫群で A β 42 の有意な蓄積の減少が認められた (P<0.05)。したがって、この A β 免疫療法で主に改善するのは脳アミロイドとして沈着した A β 42 と考えられる。

ヒト A β アミロイド注入実験では 32 匹の APPsw マウスの内、2 ヶ月後に生存したマウスでは 5 匹であった。死亡は注入一

週間後に多く、広範な炎症壊死像と注入した脳アミロイド沈着の代謝像が観察された。注入部位以外にも A β が染色された。経時的な検討では注入したヒト脳アミロイドは塊状となって、transgenic mice 群、対照群ともに認められ、3ヶ月後でも代謝されずに沈着していた。対照の生食群ではこのような変化はみられなかった。ヒト A β アミロイドを投与した transgenic mice で3ヶ月後に注入部位の対側に新たな老人斑の出現がみられた。以上のことは、ヒト A β アミロイドは一旦脳内に存在すると代謝に抵抗性で長期間存在し、A β アミロイドの形成を促進する可能性があることを示している。

D. 考察

以上のことから、A β 42 による免疫療法は明らかに脳アミロイド沈着を阻止することが可能であると思われた。ことから脳アミロイドーシスの根本的な治療は可能であると思われる。現実にはヒトに臨床応用するためには、これらの動物モデルを用いて、さらに大規模な基礎的検討の集積、投与方法の改善などが迅速に必要と思われる。さらに、脳アミロイドーシスの程度と治療法の効果をヒトで評価可能な臨床マーカーの確立も急がれる。経過中に多数の死亡例がみられたこと、効果が生き残ったマウスの約4割にしかみられなかったことから、今後、投与方法の改善や副作用の詳細な解明が必要であると思われた。ヒト A β アミロイド注入実験ではアミロイド沈着促進傾向がみられたことから、アルツハイマー病の素因のあるものに、もし、構造変異した A β が投与された時には逆に脳アミロイド形成を促進する可能性が考えられた。したがって、ヒトにヒト A β 42 を投与するワクチン療法で、もし、A β 42 が構造変化を起こした A β 42 が投与された場合、逆に A β アミロイド蓄積を促進する可能性があり、A β ワクチン療法で解決すべき重

要な課題と考えられた。今後、さらに詳細な検討とヒトへの現実的な臨床応用が望まれる。

E. 結論

A β 42 による免疫療法は明らかに脳アミロイド沈着を阻止することが可能であると思われた。ヒトにヒト A β 42 を投与するワクチン療法で、もし、A β 42 が構造変化を起こした A β 42 が投与された場合、逆に A β アミロイド蓄積を促進する可能性があり、A β ワクチン療法で解決すべき重要な課題と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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 β 40 and A β 42(43) are regulated age-dependently. *Neurobiol Aging* 22: 209-215, 2001.
- 2) Tomidokoro Y, Ishiguro K, Harigaya Y, Matsubara E, Ikeda M, Park J, Yasutake K, Kawarabayashi T, Okamoto K, Shoji M. A β amyloidosis induces the initial stage of tau accumulation in APP(Sw) mice. *Neurosci Lett* 299: 169-172, 2001.
- 3) 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.
- 4) Harigaya Y, Saido TC, Eckman CB, Prada CM, Shoji M, Younkin SG. Amyloid β 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.

5) Tomidokoro Y, Harigaya Y, Matsubara E, Ikeda M, Kawarabayashi T, Okamoto K, Shoji M. Impaired neurotransmitter systems by abeta amyloidosis in APPsw transgenic mice overexpressing amyloid beta protein precursor. **Neurosci Lett** 292: 155-158, 2000.

6) Wegiel J, Wisniewski HM, Muzylak M, Tarnawski M, Badmajew E, Nowakowski J, Wang KC, Shoji M, Mondadori C, Giovanni A. Fibrillar amyloid- β production, accumulation, and recycling in transgenic mice pancreatic acinar cells and macrophages. **Amyloid** 7: 95-104, 2000.

10) 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) Shoji M, Kanai M, Matsubara E, Ikeda M, Harigaya Y, Shizuka M, Okamoto K: Cerebrospinal fluid tau in dementia disorders.

7th International conference on Alzheimer's disease and related disorders. Washington, July 9-8, 2000.

2) Matsubara E, Ghiso J, Shizuka M, Tomidokoro Y, Ikeda M, Harigaya Y, Frangione B, Shoji M: increased level of lipoprotein-free amyloidogenic A β precede the appearance of amyloid deposition in down's syndrome. 30th Annual meeting of society for Neuroscience, New Orleans, November 4-9, 2000.

3) Shizuka M, Kanai M, Matsubara E, Ikeda M, Harigaya Y, Tomidokoro Y, Okamoto K, Shoji M: Presenilin-1 increased A β 40/42(43) by binding C-terminal fragments of β APP. 30th Annual meeting of society for Neuroscience, 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

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

ダウン症候群における血漿アミロイドβ蛋白の再検討 —精神遅滯を有する疾患対照群との対比も含めて—

分担研究者 玉岡 晃 筑波大学臨床医学系神経内科
共同研究者 松野佐好子*、石井一弘*、庄司進一*、森 啓**、
Tabaton, M***
*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、
***イタリア Genoa 大学

研究要旨 多数のダウン症候群 (DS) 患者、年齢を対応させた正常対照 (NR) 群、染色体異常のない非DSの精神遅滯 (MR) 患者より採血し、血漿中Aβ分子種 (Aβ40 とAβ42) を識別定量した。また、DSにおける血漿AβとAPOE遺伝子型や痴呆の程度との相関を解析した。Aβ40もAβ42もDS群ではNR群やMR群に対して有意な高値を示し、Aβ42/Aβ40がDS群においてやや増加傾向がみられたことより、DSではN末端の修飾されたAβも含めて測定するとAβ42が優位に増加していることが明らかとなった。一方、MR群では血漿Aβに有意な変化はみられず、血漿Aβの定量はDSの診断に有用であると考えられた。また、DSにおける血漿Aβ分子種とAPOE遺伝子型や知的機能との相関は認められず、DSの血漿Aβの増加と脳のAβの沈着には異なる機序が作用しているものと考えられた。

A. 研究目的

ダウン症候群 (DS) の血漿アミロイドβ蛋白 (Aβ) 分子種に関しては既に我々はAβ1-40およびAβ1-42が、特に前者が優位に増加していることを報告した (Tokuda T et al: Ann Neurol, 41:271-273, 1997)。その後DS、非DSの精神遅滯 (MR)、対照群で比較した場合、Aβ40はDSのみでなくMRでも上昇しており、Aβ42のみがDS特異的に増加している、との報告 (Mehta PD et al: Neurosci Lett 241: 13-16, 1998) もみられ、未だ一致した結論は得られていない。本研究では多数のDS、MR、対照例を用いて、各群における血漿Aβ分子種濃度をN末端

が修飾されたものも含めて測定し比較検討した。また、DSにおける血漿Aβと痴呆の程度やAPOE遺伝子型との相関を解析し、血漿中と脳内のAβの関係を考察した。

B. 研究方法

染色体分析にて診断した61例のDS患者 (17-58歳; 平均25.9±8.1)、77例の年齢を対応させた対照 (18-58歳; 平均32±11.1)、55例の染色体異常のない精神遅滯患者 (11-54歳; 31.8±10.9) よりEDTA入りチューブに採血し、4℃、3000回転、10分の遠心にて血漿を分離した。血漿中Aβ分子種はサンドイッチE