

LISA法により、A β 40とA β 42を識別定量した。具体的にはBNT 77(A β 25-35に対するモノクローナル抗体)を固相化し、BA27(A β 1-40に対するモノクローナル抗体)、BC05(A β 35-43に対するモノクローナル抗体)を標識抗体として用い、それぞれによりN末端の修飾されたものも含めてA β 40、A β 42を測定した。また、白血球より抽出したDNAを用いて、APOEの遺伝子型を同定した。DS患者の知的機能はWAISやMMEを用いて定量した。

(倫理面への配慮)

血液の採取に際しては、対象者本人あるいはその保護者に研究内容を説明し、同意を得ており、倫理的に何ら問題はなかった。

C. 研究結果

血漿A β 分子種の平均値は、A β 40もA β 42もDS群[A β 40; 305.7 \pm 194.3 pmol/l, A β 42; 62.3 \pm 68.8 pmol/l]では正常対照群(NC)[A β 40; 165.3 \pm 110.7 pmol/l, A β 42; 27.0 \pm 43.1 pmol/l]や染色体異常のない精神遅滞患者群(MR)[A β 40; 190.6 \pm 65.7pmol/l, A β 42; 28.1 \pm 37.7 pmol/l]A β 40もA β 42に対して有意な高値を示した。A β 42/A β 40はDS群において増加傾向がみられ[0.21 \pm 0.17]、NC[0.15 \pm 0.14]に比べて有意に増加していたが、MR[0.15 \pm 0.24]との間では有意差は認められなかった。また、DSにおいて血漿A β 分子種とAPOE遺伝子型やIQ、MMEスコアとの相関は認められなかった。

D. 考察

DSの血漿A β 分子種に関するこれまでの報告は必ずしも一致したものではなかったが、この不一致の要因の少なくとも

も一部は測定したA β 分子種の違いや用いた抗体の特性の差異に由来するものであろうと推測された。本研究では多数のDS、MR、対照例を用いて、N末端の修飾されたものも含めた血漿A β 分子種を比較検討したが、DSでは血漿A β 40、A β 42の両者が有意に増加し、N末端の修飾されたものも含めるとA β 42の優位な増加が認められることが明らかとなった。非DSの染色体異常のない精神遅滞患者群では血漿A β に有意な変化はみられなかったことより、血漿A β の定量はDSの診断に有用であると考えられた。DSの血漿A β 分子とAPOE遺伝子型や痴呆の程度との相関は認められず、DSの血漿A β の増加と脳のア β の沈着とは異なる機序・要因が関与しているものと考えられた。

E. 結論

DSでは血漿A β 40、A β 42の両者が有意に増加し、A β 42の優位な増加が認められた。非DSの染色体異常のない精神遅滞患者群では血漿A β に有意な変化はみられず、血漿A β の定量はDSの診断に有用であると考えられた。DSの血漿A β 分子とAPOE遺伝子型や痴呆の程度との相関は認められず、DSの血漿A β の増加と脳のア β の沈着とは異なる機序・要因が関与しているものと考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Sayoko Matsuno, Akira Tamaoka, Kazuo Yoshizawa, Masahiko Watanabe and Shin'ichi Shoji. A case with mysthenia gravis (MG)

- emerging after splenectomy for idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP): possible effects of thymectomy on autoantibodies. *J Med* (in press).
- 2) Takahiko Tokuda, Akira Tamaoka, Sayoko Matsuno, Shunpei Sakurai, Hirohide Shimada, Hiroshi Morita, Shuichi Ikeda. Plasma levels of amyloid b proteins did not differ between subjects with and without taking statins. *Ann Neurol* (in press)
- 3) Kazuhiro Ishii, Carol Lippa, Takami Tomiyama, Fumiko Miyatake, Kazuharu Ozawa, Akira Tamaoka, Takashi Hasegawa, Peter E Fraser, Shin'ichi Shoji, Linda E Nee, Dan A Pollen, Peter H. St. George-Hyslop, Kunio Ii, Toshiyuki Ohtake, Rajesh N. Kalaria, Martin N. Rossor, Peter L. Lantos, Nigel J. Cairns, Lindsay A. Farrer, and Hiroshi Mori. Distinguishable effects of presenilin-1 and APP717 mutations on amyloid plaque deposition. *Neurobiol Aging* (in press)
- 4) Hoshi K, Yoshida K, Nakamura A, Tada T, Tamaoka A, Ikeda S. Cessation of cerebral hemorrhage recurrence associated with corticosteroid treatment in a patient with cerebral amyloid angiopathy. *Amyloid*. 2000 Dec;7(4):284-8.
- 5) Cavani S, Tamaoka A, Moretti A, Marinelli L, Angelini G, Di Stefano S, Piombo G, Cazzulo V, Matsuno S, Shoji S, Furiya Y, Zaccheo D, Dagna-Bricarelli F, Tabaton M, Mori H. Plasma levels of amyloid beta 40 and 42 are independent from ApoE genotype and mental retardation in down syndrome. *Am J Med Genet* 2000 Nov 27;95(3):224-8
- 6) Tamaoka A, Matsuno S, Ono S, Shimizu N, and Shoji S: Increased amyloid b protein in the skin of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurology* 247(8): 633-635, 2000.
- 7) Tamaoka A, Miyatake F, Matsuno S, Ishii K, Nagase S, Sahara N, Ono S, Mori H, Wakabayashi K, Tsuji S, Takahashi H, and Shoji S: Apolipoprotein E allele-dependent antioxidant activity in brains with Alzheimer's disease. *Neurology* 54(12): 2319-2321, 2000.
- 8) Minoru Yausda, Sakan Maeda, Toshio Kawamata, Akira Tamaoka, Yasuji Yamamoto, Shigetoshi Kuroda, Kiyoshi Maeda, and Chikako Tanaka: Novel presenilin-1 mutation with widespread cortical amyloid deposition but limited cerebral amyloid angiopathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 68(2):220-223, 2000.
- 9) Mochizuki A, Tamaoka A, Shimohata A, Komatsuzaki Y, Shoji S: Abeta42-positive non-pyramidal neurons around amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Lancet* 355(9197):42-3, 2000
- 10) 玉岡 晃: アポE isoform と脳内過酸化脂質、*Dementia Japan* (in press)
- 11) 玉岡 晃: アルツハイマー病、*スズケンメディカル* (in press)
- 12) 玉岡 晃: アルツハイマー病、*スズケンファーマ* (in press)
- 13) 玉岡 晃: 脳出血と髄液中の cyctatin C. *臨床検査* 44 (13) : 1668-1670、2000.
- 14) 玉岡 晃: ApoE の抗酸化作用からみた Alzheimer 病発症誘導機構. *最新医学* 55 (7) : 95-103、2000.
- 15) 玉岡 晃: 髄液・血液検査. *脳の科学* (2000年臨時増刊号) 22巻(通巻245号) : 185-189、2000.
2. 学会発表
- 1) 玉岡 晃: 神経難病の診断と治療について. 下館保健所難病に関する講演会、

2月27日、2001.

- 2) 石井一弘、玉岡 晃、庄司進一、Klaus Fassbender、Tobias Hartmann、Konrad Beyreuther : A β 1-42によるミクログリアの活性化とNSAID及びL-Nilの効果. 第19回日本痴呆学会(木更津)、9月28日、2000.
- 3) 望月昭英、下畑充志、玉岡 晃、庄司進一 : アルツハイマー病脳における神経細胞内アミロイド β 蛋白についての病理学的検討. 第19回日本痴呆学会(木更津)、9月28日、2000.
- 4) 玉岡 晃、松野佐好子、宮武史子、石井一弘、庄司進一、成田正明、池田修一、森 啓 : 脳内過酸化脂質とアポリポ蛋白E (APOE) の遺伝子多型との相関. 第19回日本痴呆学会(木更津)、9月28日、2000.
- 5) 青木一泰、樋口 修、玉岡 晃、榎本貴夫 : アリセプト中毒にて救急搬送されたアルツハイマー型痴呆の一例. 第22回茨城てんかん懇話会、7月1日(水戸)、2000.
- 6) 大出貴士、徳田隆彦、池田修一、松野佐好子、玉岡 晃、庄司進一 : 免疫性神経疾患における副腎皮質ステロイド投与前後での髄液中 β 蛋白(A β)分子種の定量. 松野佐好子、玉岡 晃、庄司進一 第41回日本神経学会総会(松本)、5月24日、2000.
- 7) 石井一弘、玉岡 晃、庄司進一、Tobias Hartmann、Konrad Beyreuther : A β 1-42のミクログリア活性化に対するNSAID及びL-Nilの抑制効果. 第41回日本神経学会総会(松本)、5月24日、2000.
- 8) 松野佐好子、玉岡 晃、庄司進一 : アルツハイマー病(AD)患者における血小板アミロイド β 蛋白(A β)分子種の定量とApoEアイソフォームとの相関に

についての解析. 第41回日本神経学会総会(松本)、5月24日、2000.

- 9) 佐村英里子、吉川泰弘、中村紳一郎、松野佐好子、玉岡 晃、庄司進一 : 老齡リスザル脳に沈着するアミロイド β 蛋白(A β)の免疫組織化学的検討およびELISAによる定量. 第41回日本神経学会総会(松本)、5月25日、2000.
- 10) 望月昭英、下畑充志、玉岡 晃、庄司進一 : アルツハイマー病(AD)小脳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41回日本神経学会総会(松本)、5月25日、2000.
- 11) 下畑充志、望月昭英、玉岡 晃、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)と神経原線維変化(NFT)の関係についての病理学的検討. 第41回日本神経学会総会(松本)、5月25日、2000.
- 12) 玉岡 晃、松野佐好子、宮武史子、石井一弘、庄司進一、森 啓 : アルツハイマー病(AD)脳における脂質過酸化とアポリポ蛋白E (APOE)のアイソフォーム依存的抗酸化作用に関する研究. 第41回日本神経学会総会(松本)、5月26日、2000.
- 13) 佐村英里子、松野佐好子、中村紳一郎、玉岡 晃、庄司進一、吉川泰弘 : リスザル脳に沈着する老人斑およびアミロイド β 蛋白(A β)についての検討. 日本獣医病理学会、4月4日、2000.
- 14) 玉岡 晃 : 高齢者に多い神経疾患. 日立内科医会学術講演会、3月15日、2000.
- 15) 玉岡 晃 : アルツハイマー病の発症機序と治療薬の開発. きぬ薬剤師会学術研修会、3月7日、2000.
- 16) A Tamaoka, F Miyatake, S Matsuno, K

Ishii, S Shoji, S Sahara and H Mori. Apolipoprotein E allele-dependent antioxidant activity in brains with Alzheimer's disease. Society of Neuroscience 30 th Annual Meeting, November 8, 2000.

17) T Tokuda, T Oide, A Tamaoka, S Matsuno, T Hashimoto, S Shoji and S Ikeda. Treatment with glucocorticoids decreases both A β _x-40 and A β _x-42 in cerebrospinal fluids. Society of Neuroscience 30 th Annual Meeting, November 5, 2000.

18) S Matsuno, A Tamaoka, K Ishii, S Shoji, Y Sekijima, T Tokuda, and SI Ikeda. Apolipoprotein E phenotypes have no effect on

plasma levels of amyloid β protein species in Alzheimer's disease, Down's syndrome, and control subjects. Society of Neuroscience 30 th Annual Meeting, November 5, 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

Chrysamine G (CG)は線維性 A β の神経毒性を抑制する

分担研究者 森 啓 大阪市立大学医学部脳神経科学

共同研究者 石井一弘*、降矢芳子**、玉岡 晃*、庄司進一*、

Klunk WE***、

*筑波大学臨床医学系神経内科、**大阪市立大学医学部脳神経科学、***ピッツバーク医科大学

研究要旨 Congo red 誘導体である Chrysamine G (CG)による線維性アミロイド β (A β) 蛋白の神経細胞毒性抑制効果を明らかにすることを目的とした。マウス初代神経細胞培養系を用い、線維性 A β 1-40, A β 25-35 を CG と同時投与したところ、A β 神経細胞毒性に対する減弱効果を見られた。線維性 A β 蛋白と結合能の低い hCG においても CG と同様の神経細胞毒性減弱効果が見られたことから、CG の線維性 A β 蛋白に対する効果は Congo red で従来いわれている、線維性 A β 蛋白上の神経細胞死を誘導する活性化部位やレセプター結合部位のブロックではなく、線維性 A β 蛋白によって生じる酸化ストレスを消去する抗酸化作用が考えられた。

A. 研究目的

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease : AD) は脳内に多量の老人斑が出現し、神経細胞死が起こる疾患であり、老人斑の主構成蛋白である線維性 A β 蛋白が神経細胞毒性を示すと考えられている。線維性 A β 蛋白が神経細胞死を誘導する機序として、線維性 A β 蛋白が神経細胞に直接または間接的に酸化的ストレスを与え、細胞死を誘導するとの多数の報告がある。近年、過剰産生された A β 蛋白を無害化するために、線維化阻害物質や抗酸化剤の開発が始まった。今回、我々は A β 高結合分子化合物として開発され、Congo red 類似構造体である Chrysamine G (CG) の A β 神経細胞毒性 (以下 A β 毒性) 減弱効果を調べ、CG の作用機序を明らかに

することを目的とした。

B. 研究方法

1. 初代神経細胞培養系の確立

胎生 16 日齢マウスの大脳皮質から初代神経細胞を 5%FBS, 5%HS/DMEM 培養液を用いて分散させ、6.25 X 10⁵/cm² で播種した。24 時間培養後に神経細胞の接着を確認し、N2 と B27 (還元剤なし)を加えた DMEM 培養液に完全に置換し、さらに 3 日間培養し、様々な実験に用いた。

2. アミロイド β (A β) の線維化

A β 1-40、A β 25-35 (Bachem) は 2mM HCL に溶解し、凍結乾燥後、滅菌蒸留水にて溶解した。メッシュ (#400) に A β 溶液をのせ、2%酢酸ウランにて negative stain 後に電子顕微鏡にて A β 線維を観察

し、線維化が確認されたものだけを使用した。

3. CG および hCG の定量および投与

CG および hCG は Klunk WE から供給されたものを用いた。まず、50% ethanol / PBS(pH7.4) に溶解し、吸光度から CG および hCG の濃度を求めた。^(1, 2) CG、hCG 単独投与の実験では最終濃度 10^{-1} – 10^4 nM の希釈系列を作成し、培養 4 日目の神経細胞に添加した。A β 蛋白と CG または hCG の同時投与実験では最終濃度 10^2 , 10^3 nM に調製し同じく培養 4 日目の神経細胞に投与した。さらに 2 日間培養を続け、MTT 還元反応または MAP2 陽性細胞計測法を用いて生存細胞率を求めた。

細胞上清に線維性 A β 1-40 または線維性 A β 25-35 を添加し、2 日後の残存神経細胞数を MAP2 陽性細胞数計測にて調べた。また CG 添加の有無による A β 毒性抑制効果を見た。CG の作用機序を明らかにするために A β 結合能の低い half Chrysamine G (hCG; CG の半量体) を線維性 A β と同時に添加して、A β 毒性の抑制効果を判定した。さらに CG または hCG 単独添加時の MTT 還元反応と神経細胞数計測の結果を比較した。

4. MTT 還元反応、MAP2 陽性細胞数計測

MTT/PBS 溶液(5mg/mL)を神経細胞に添加し、37°C で 3 時間反応させた後、酸性アルコールでホルマザンを溶解した。可溶化ホルマザンの 570 nm での吸光度を測定した。抗 MAP2 抗体による神経細胞の免疫細胞染色は、神経細胞を 0.3% Triton-X 100、4% ホルムアルデヒド溶液で固定し、ブロッキング後、1 次抗体の抗マウス MAP2 抗体(1:200)で 4°C 終夜反応させた。次にビオチン化抗マウス IgG 抗体を反応させ、ABC 法で発色させた。各 well の任意 3 カ所の部分を写真に撮影し、MAP2 陽性神経細胞の個数を 1 カッ

トごと計測した。コントロールとの比を求め、% of control (神経細胞生存率) として算出した。独立に 3 実験を行い、各実験で最低 3 well を同一条件にした。

5. 統計処理

図 1 の統計処理には T 検定を図 2、図 3 では同一 A β 濃度内の CG(または hCG) 0, 0.1, 1 μ M の 3 群間での検定に Scheffe test を用いた。統計ソフトは JMP ver. 4 (SAS institute)を使用した。

C. 研究結果

CG または hCG 単独投与による神経細胞への効果を 2 つのアッセイ系を用いて調べたところ、MTT 還元反応による生存細胞数測定の結果と MAP2 陽性細胞数計測による結果に違いが見られた。すなわち、MTT 還元反応法は CG または hCG 濃度依存的に生存細胞数が増加する結果であった。一方、MAP2 陽性細胞数計測法では、変化なかった。(図 1) 以降の全ての実験は MAP2 陽性細胞計測法にて評価することとした。

線維性 A β 1-40 および線維性 A β 25-35 共に濃度依存的に神経細胞毒性がみられた。また CG だけでなく hCG にも線維性 A β 1-40 および線維性 A β 25-35 による A β 毒性抑制効果がみられた。しかも、この A β 毒性抑制効果は CG、hCG 濃度依存性があった。(図 2、3)

D. 考察

MTT 還元反応法では、還元剤(抗酸化剤)の存在により、細胞数を正確に反映しない可能性があり、抗酸化剤を用いた生存神経細胞数計測には MAP2 陽性細胞計測法が使用すべきであると考えられた。

CG の A β 蛋白に対する作用機序として、線維形成阻止、凝集抑制、A β 蛋白上の活性部位遮断など Congo red 類似の A β 毒性抑制効果が考えられた。しかし、A β に結

合しない hCG においても A β 毒性抑制効果がみられたこと、CG や hCG 単独添加で MTT 還元反応が陽性になること、また CG および hCG は脂質過酸化を抑制すること⁽³⁾ から、CG および hCG の A β 毒性に対する主効果は抗酸化作用であると考えられる。CG および hCG は脳血流関門の通過が良好で、急性毒性がないとの報告もあり^(1, 2)、アルツハイマー病の神経細胞死を防ぐ治療薬としての応用が期待される。

E. 結論

CG および hCG は線維性 A β 蛋白による神経細胞毒性を抑制する。この A β 毒性抑制効果は CG、hCG の抗酸化作用が考えられた。

参考文献

- 1) Klunk WE, Debnath ML, Pettegrew JW: Development of small molecule probes for the beta-amyloid protein of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 15:691-8, 1994.
- 2) Klunk WE, Debnath ML, Pettegrew JW: Chrysamine-G binding to Alzheimer and control brain: autopsy study of a new amyloid probe. *Neurobiol Aging* 16:541-8, 1995.
- 3) Walter MF, Klunk WE, Giovanni A et al. : Chrysamine G inhibits lipid peroxidation and the insertion of amyloid β into model membranes. *Soc.Neurosci.Abstr.* 23, 1663, (1997).

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ishii K, Muelhauser F, Liebl U, Picard M, Kuhl S, Penke B, Bayer T, Wiessler M, Hennerici M, Beyreuther K, Hartmann T, Fassbender K. Subacute NO generation

induced by Alzheimer's beta-amyloid in the living brain: reversal by inhibition of the inducible NO synthase. *FASEB J.* 14 : 1485-1489, 2000.

- 2) Tamaoka A, Miyatake F, Matsuno S, Ishii K, Nagase S, Sahara N, Ono S, Mori H, Wakabayashi K, Tsuji S, Takahashi H, Shoji S. Apolipoprotein E allele-dependent antioxidant activity in brains with Alzheimer's disease. *Neurology* 54:2319-21, 2000.

- 3) Ishii K, Lippa CF, Tomiyama T, Miyatake F, Ozawa K, Tamaoka A, Hasegawa T, Fraser PE, Shoji S, Nee LE, Pollen DA, St. George-Hyslop PH, Li K, Ohtake T, Kalaria RN, Rossor MN, Lantos PL, Cairns NJ, Farrer LA, and Mori H, Distinguishable effects of Presnilin-1 and APP717 mutations on amyloid plaque deposition. *Neurobiol Aging*, 2001 (in press).

2. 学会発表

- 1) A β 1-42 のマイクログリア活性化に対する NSAIDs 及び L-Nil の抑制効果. 石井一弘, 玉岡 晃, 庄司進一, T Hartmann, K. Beyreuther. 第 41 回日本神経学会総会 松本 2000.

- 2) アルツハイマー病 (AD) 脳における脂質過酸化とアポリポ蛋白 E (ApoE) のアイソフォーム依存的抗酸化作用に関する解析. 玉岡 晃, 松野佐好子, 宮武史子, 石井一弘, 庄司進一, 森 啓 第 41 回日本神経学会総会 松本 2000.

- 3) A β 1-42 によるマイクログリアの活性化と NSAID 及び L-nil の効果. 石井一弘, 玉岡 晃, 庄司進一, Klaus Fassbender, Tobias Hartmann, Konrad Beyreuther, 日本痴呆学会, 木更津, Sep. 28,29, 2000.

- 4) 玉岡 晃, 宮武史子, 松野佐好子, 石井一弘, 庄司進一 日本痴呆学会, 木更津, Sep. 28,29, 2000.

H. 知的所有権の取得状況

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

図1 MTT還元反応法またはMAP2陽性細胞計測法による
Chrysamine G(CG), halfChrysamineG(hCG)の効果。

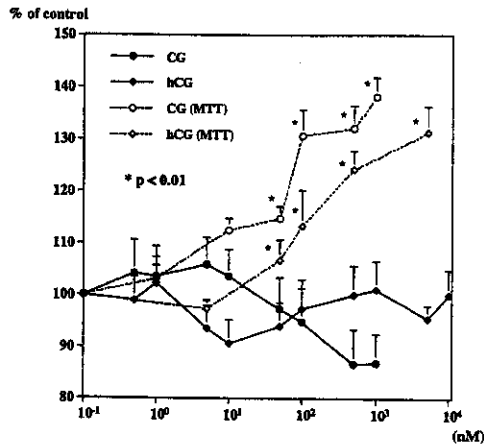


図2 Aβ神経細胞毒性に対するChrysamine G(CG)の効果。

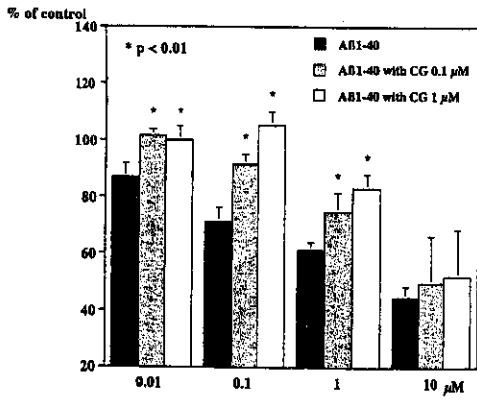
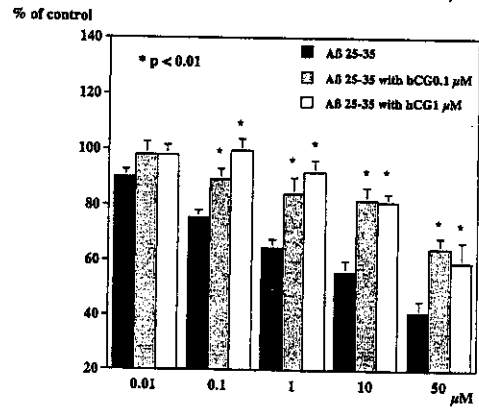
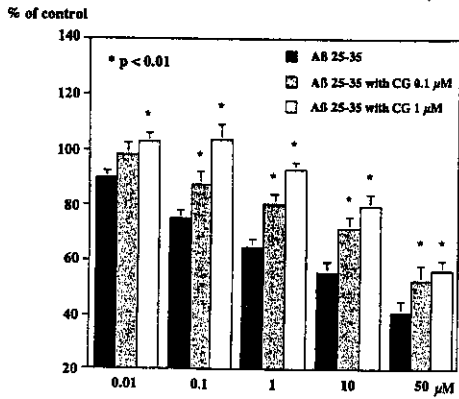
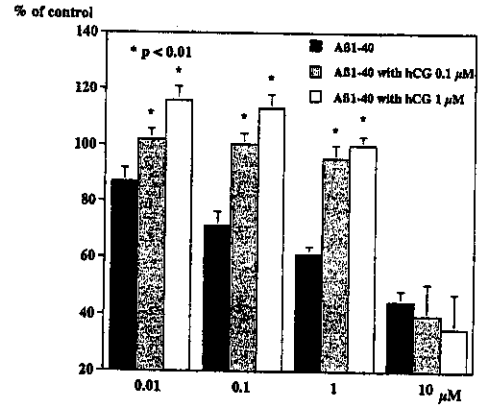


図3 Aβ神経細胞毒性に対するhalf ChrysamineG(hCG)の効果。



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

PC12D 細胞中に安定的に導入したヒトプレセニン 1 の作用

分担研究者 森 啓、大阪市立大学医学部神経科学

共同研究者 亀谷富由樹、田中喜久子、宇佐美美穂子、丸山 敬

東京都精神医学総合研究所、分子生物

研究要旨 アルツハイマー病 (AD) 原因遺伝子産物プレセニン 1 (PS1) はアミロイド前駆体タンパク質 (APP) 代謝に関与し、 $A\beta$ 産生を制御していることが知られている。我々はこれまで PS1 と APP 代謝との関連性を解析してきた。本研究ではヒト PS1 および突然変異型 PS1 を安定的に発現するラット由来の PC12D 細胞を用いて、プレセニンの細胞内の分布について解析した。ラットの細胞ではヒト正常プレセニンは異常プレセニンとして認識され、通常とは異なる細胞内分布をすることが判明した。特に比重の重い膜画分に分布し、この画分にはアミロイド前駆体タンパクの C 末断片も分布しているため、この分画でのプレセニンの作用と病因との関係が示唆された。

A. 研究目的

アルツハイマー病 (AD) 脳ではアミロイド線維が広範囲に沈着し、その主要構成成分は $A\beta$ (とくに化学的に凝集しやすく、アミロイド線維化しやすい $A\beta_{42}$) であることが知られている。また、遺伝性アルツハイマー病の原因遺伝子産物がプレセニン (PS1 および PS2) であることが明らかにされ、その突然変異が脳内の $A\beta_{42}$ を増加させることが報告された。これらのことから、 $A\beta$ ($A\beta_{42}$) の増加をもたらす $A\beta$ 前駆体 (APP) の代謝機序解明が、AD の予防、治療法の確立に必須であると考えられている。最近、PS1 は APPC 末断片 (APPCTF) から $A\beta$ が生じる際に必要な γ 分泌酵素そのもの、あるいは γ 分泌酵素が活性を持つための補助因子であると報告されているが、確証を得るにはいたっていない。本研究では、PS1 と APP 代謝との関連性を明らかにす

るために、PC12D 細胞に安定的に導入したヒト PS1 およびヒト突然変異 PS1A260V と PC12D 細胞が持っているラット PS1 との生理作用等の違いについて解析した。

B. 研究方法

ヒト PS1 およびヒト突然変異 PS1 を安定的に発現する PC12D 細胞を RIPA 溶液でホモゲナイズあるいはシヨ糖溶液を用いて膜画分を、5,000 x g 沈殿 (P2a 画分)、8,000 x g 沈殿 (P2b 画分)、100,000 x g 沈殿 (P3 画分) に分画した。各画分に含まれるオルガネラを、電気泳動およびイムノブロットング等分析した。導入したヒトのプレセニン 1 (PS1)、ヒト突然変異プレセニン (PS1A260V)、および、この細胞が本来もっているラット PS1 を免疫沈降し、電気泳動およびイムノブロットング等で解析した。

C. 研究結果

ヒトPS1および突然変異PS1を安定的に発現するPC12D細胞(図1)をRIPA溶液でホモゲナイズあるいはシヨ糖溶液を用いて膜画分を、5,000 x g 沈殿 (P2a画分)、8,000 x g 沈殿 (P2b画分)、100,000 x g 沈殿 (P3画分)に分画した。P2a画分にはMAO、Rab8が含まれ、P3画分にはsynaptophysin、Bip、golgi58、acid phosphataseが主として分布し、ミトコンドリア、分泌顆粒は比重の重いP2a画分に、小胞体、ゴルジ体、リソソーム、シナプトソーム等は比重の軽いP3画分に存在していた(図2)。

安定的に導入したヒトのプレセニリン1 (PS1)、ヒト突然変異プレセニリン (PS1A260V)、および、この細胞が本来もっているラットPS1を免疫沈降し、電気泳動およびイムノブロットング等で解析した(図3)。未導入細胞のラット由来PS1のN末断片はP2aおよびP3に回収され、分布の割合は、P2a画分42%、P2b画分16%、P3画分42%であった。一方、ヒトPS1導入細胞のヒトPS1およびヒト突然変異PS1のN末断片は比重の重い膜画分に主として回収され、それら分布は、どちらもほぼP2a画分60%、P2b画分20%、P3画分20%であった。また、これらのヒトPS1導入細胞中の全PS1N断片量(ラットおよびヒト)の50-70%がP2a画分に存在し、未導入細胞の42%と比べて明らかに増加していた(図4)。

D. 考察

導入したヒトPS1においては突然変異の有無の差はみられず、ラットPC12D細胞にとっては共に変異PS1として認識され、本来のPS1の細胞内分布とは異なる分布をしていることが判明した。すでに報告したように、Aβ42の割合がヒトPS1およ

びヒト突然変異PS1を導入した細胞で有意に増加しており、また、ヒトPS1およびヒト突然変異PS1を導入したPC12D細胞の比重の重い膜画分でAPPのC末断片の存在割合も増加していた。これらのことと合わせて考えると、比重の重い膜画分で異常PS1とAPPC末断片とが作用し、Aβ42の産生割合が増加したものと考えられた。

E. 結論

ヒトPS1はヒト突然変異PS1と同様に、ラットPC12D細胞では異常PS1として認識された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kametani F, Tanaka K, Usami M, Maruyama K, Mori M: Alzheimer's amyloid precursor protein and its derivatives in PC12D cells transfected presenilin-1 with and without a missense point mutation. *Frontiers of the Mechanism of Memory and Dementia*, pp143-144, 2000.

学会発表

1) 亀谷富由樹, 田中喜久子, 宇佐美美穂子, 丸山 敬, 森 啓: プレセニリン1を安定的に導入したPC12D細胞中のAβについて. 日本痴呆学会, 9月27-28日, 2000.

2) 亀谷富由樹, 田中喜久子, 宇佐美美穂子, 丸山 敬, 森 啓: PC12D細胞に安定的に導入したプレセニリン1および突然変異プレセニリンの作用. 日本神経学会, 10月18-20日, 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

ヒト PS1 (PS1wt および PS1A260) を安定的に導入した PC12D 細胞におけるヒト PS1N 端断片 (左) および全 PS1 (ラットおよびヒト) の N 端断片 (右)。PSN2 はヒト PS1 を特異的に認識する。H70 はラットおよびヒトの PS1 を認識する。

図2

各膜画分におけるマーカートンパクの分布。

図3

ヒト PS1 (PS1wt および PS1A260) を導入した PC12D 細胞の各膜画分におけるヒト PS1 の N 末断片の分布および全 PS1 (ラットおよびヒト) の N 末断片の分布。

図4

(A) 各膜画分に含まれるラット PS1 およびヒト PS1 の N 末断片の存在比。膜画分全体で 100%とした。(B) 各膜画分に含まれる全 PS1 (ラットおよびヒト) の存在比。膜画分全体で 100%とした。

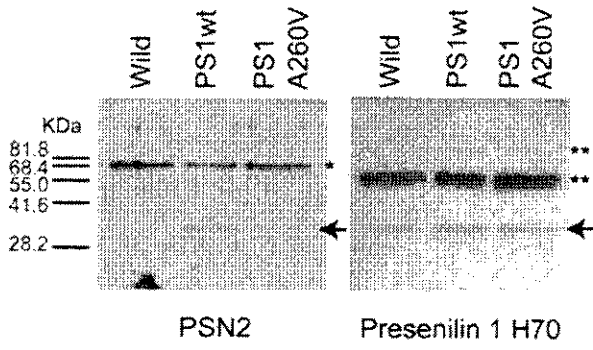


図1

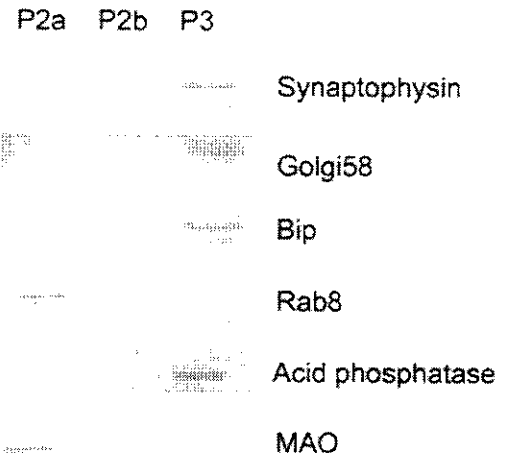


図2

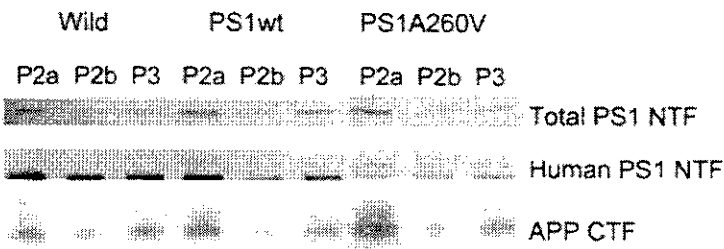


図3

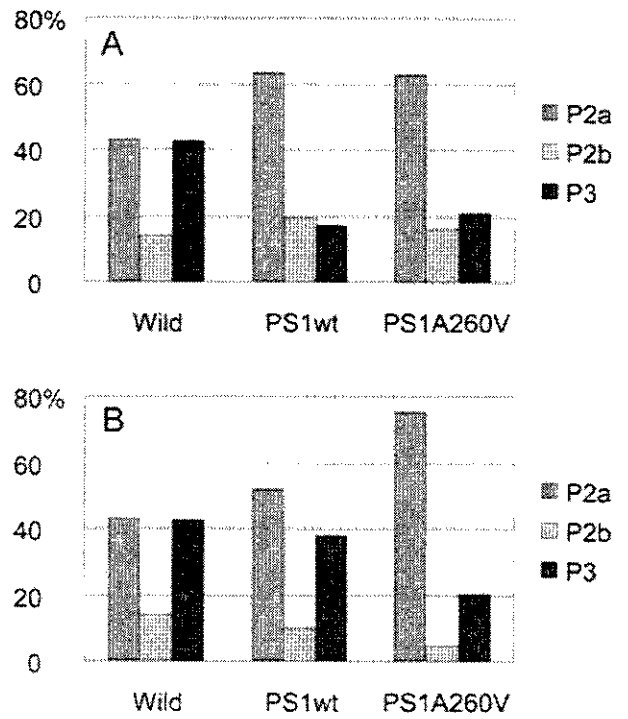


図4

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

脳アミロイドアンギオパチー：paraoxonase 遺伝子多型、 血清脂質、動脈硬化との関連

分担研究者 山田正仁 金沢大学医学部神経内科

共同研究者 袖山信幸*、伊藤嘉憲**、大友英一**、松下正明***、
水澤英洋*

*東京医科歯科大学大学院脳神経機能病態学 (神経内科)、

浴風会病院内科、*東京都精神医学総合研究所神経病理

研究要旨 脳アミロイドアンギオパチー (CAA) と paraoxonase は共に脂質代謝や動脈硬化に関連していることが報告されている。Paraoxonase 遺伝子(*PONI*)多型、血清脂質、動脈硬化が CAA の危険因子であるかどうかを明らかにする目的で、154 例の日本人高齢者を対象に、*PONI* 多型、血清脂質レベル (総コレステロール、HDL コレステロール、総コレステロール/HDL コレステロール比)、大動脈、冠動脈、脳動脈の粥状硬化の程度と CAA の程度との関連を検討した。*PONI* 多型、血清脂質、粥状動脈硬化のいずれもが CAA と関連しなかった。以上の結果から、*PONI* 多型、血清脂質、粥状動脈硬化は CAA の主要な危険因子ではないと考えられた。

A. 研究目的

脳アミロイドアンギオパチー (CAA) は高齢者にしばしばみられる脳血管へのアミロイド沈着症であり、高齢者の脳血管障害の原因として重要である。

CAA おける脳血管アミロイド沈着の機序として、アミロイドβ蛋白がリポ蛋白との複合体としてリポ蛋白受容体を介して中膜平滑筋細胞にとりこまれることが報告されている (Urmoneit et al.1997)。また、脳動脈の粥状硬化が CAA の程度と関連することが報告されている (Ellis et al. 1996)。さらに、脂質代謝 (特にコレステロール代謝) に重要な役割を有するアポリポ蛋白 E の遺伝子型が、アルツハイマー病ばかりでなく、CAA の独立した危険因子であると

する報告がある (Greenberg et al. 1995 ほか)。これらのことから、CAA が脂質代謝や粥状動脈硬化と関連する可能性が示唆される。

Paraoxonase は肝臓で合成され、有機リン化合物やサリンなどの神経毒の解毒作用を有するばかりでなく、脂質代謝に関連しており、リポ蛋白の酸化を防ぎ、抗粥状動脈硬化作用を有する。

Paraoxonase 遺伝子 (*PONI*) には 192 位のアミノ酸置換 (Gln/Arg) をもたらす遺伝子多型 (A/G) が知られており、この多型は血中の paraoxonase 活性の主要な決定因子であり、冠動脈硬化と関連することが報告されている。

今回、脂質代謝や動脈硬化が CAA の危

険因子であるかどうかを明らかにするため、CAA と *PON1* 遺伝子多型、血清脂質、粥状動脈硬化との関連を検討した。

B. 研究方法

アルツハイマー病 (AD) 47 例を含む日本人高齢者 154 例 (62-103 歳、平均 85.1 歳) について、*PON1* の 192 位のアミノ酸置換をもたらす多型、アポリポ蛋白 E (ApoE) 遺伝子型、血清総コレステロールおよび HDL コレステロール値、総コレステロール/HDL 比 (血清脂質は死亡前の全身状態が不良の時期を除く安定期のデータ)、脳動脈、大動脈、冠動脈の粥状硬化の程度 (剖検時、スコア 0-3 で半定量的評価)、CAA の程度 (髄膜・皮質血管の CAA があるパーセント) を評価し、これらの関連を統計学的に検討した。

(倫理面への配慮)

剖検材料等の研究への利用については剖検時承諾を得た。また、遺伝子解析研究の実施について研究施設の倫理委員会の承認を得た。

C. 研究結果

CAA は *PON1* 多型とは関連しなかった。この結果は、AD 群と non-AD 群に分けて検討しても同様であった。また、ApoE 遺伝子型別に検討しても同様の結果であった。

総コレステロールあるいは HDL コレステロール値、総コレステロール/HDL 比は CAA の程度と相関しなかった。また、脳動脈、大動脈、冠動脈の粥状動脈硬化のいずれも CAA の程度と関連しなかった。この結果は AD 群と non-AD 群に分けて検討しても同様であった。

CAA による脳出血は中等度ないし高度の CAA を有する例 (CAA スコア $\geq 40\%$) の一部にのみ認められる。そこで、中等度以上の CAA を有する群 (n=32) と軽度の

CAA あるいは CAA を欠く群 (n=122) の 2 群の間で、AD の診断、*PON1* 遺伝子型、ApoE 遺伝子型、血清総コレステロールおよび HDL コレステロール値、総コレステロール/HDL 比、大動脈、冠動脈、脳動脈の動脈硬化のスコアを比較した。中等度以上の CAA を有する群では AD の診断が高率であったが (p=0.0009)、他の項目では有意差はなかった。

また、*PON1* 多型と血清脂質あるいは粥状動脈硬化の程度との間にも関連は認めず、高齢者では *PON1* 多型は血清脂質や粥状動脈硬化の主要な決定因子ではないことが示唆された。

D. 考察

今回の検討結果では、CAA は *PON1* 多型、総コレステロールあるいは HDL コレステロール値、総コレステロール/HDL 比、脳を含む全身血管の粥状硬化の程度とは関連せず、それらは CAA の主要な危険因子ではないことが示唆された。

PON1 多型と CAA の関連については統計学的なパワー不足の可能性は否定できないため、さらに症例数を増やして検討する必要がある。また、血清脂質に関しては、CAA との因果関係を論ずるためには、それぞれの症例の老年期以前のデータが必要である。

Ellis ら (1996) は CAA の程度と脳の粥状動脈硬化との間に関連を認めているが、我々の検討結果はそれに一致しなかった。CAA や粥状動脈硬化の評価法の違い、民族差、対象群の年齢の違いの影響などの可能性が考えられる。

今回検討した脂質代謝の指標は、いずれも脳血管関門外の脂質代謝を反映しているものと考えられる。脳内の脂質代謝は脳血管関門によって全身の循環から隔てられており独立している。髄液内の各種脂質濃度は血漿中と相関しないことが報告さ

れている。今後、髄液サンプルを用いた脂質代謝の検討も必要と思われる。

E. 結論

PON1 多型、血清脂質、粥状動脈硬化はいずれも CAA に関連しないことが示唆される。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sodeyama N, Yamada M, Itoh Y, Suematsu N, Matsushita Y, Otomo E, Mizusawa H. alpha2-macroglobulin polymorphism is not associated with AD or AD type neuropathology in Japanese. *Neurology* 54:443-446, 2000.
- 2) Orimo S, Ozawa E, Uematsu M, Yoshida E, Hino H, Yamada M, Okeda R, Mizusawa H. A case of Creutzfeldt-Jakob disease presenting with auditory agnosia as an initial manifestation. *Eur Neurol* 44:256-258, 2000.
- 3) Yamada M, Itoh Y, Sodeyama N, Suematsu N, Otomo E, Matsushita M, Mizusawa H. Senile dementia of the neurofibrillary tangle type: a comparison with Alzheimer's disease. *Dementia Geriat Cog Disord* 12:117-126, 2001.
- 4) Kimura K, Nonaka A, Tashiro H, Yaginuma M, Shimokawa R, Okeda R, Yamada M. Atypical form of dural graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease: report of a postmortem case with review of the literature. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* (In Press).
- 5) Irioka T, Yamada M, Yamawaki M, Saito H, Mizusawa H, Miura H. Acute autonomic and sensory neuropathy after interferon alpha-2b therapy for chronic hepatitis C. *J Neurol*

Neurosurg Psychiatry (In Press).

2. 学会発表

- 1) Yamada M, Itoh Y, Shiraishi A, Inaba A, Wada Y, Okeda R, Sumematsu N, Kitamoto T, Otomo E, Matsushita M, Mizusawa H. An inherited prion disease with a PrP P105L mutation: report of two families showing clinicopathological and PrP heterogeneity. The XIVth International Congress of Neuropathology, Birmingham, UK, September, 2000. (Abstract: *Brain Pathol* 10:671, 2000)
- 2) Kanda T, Ohkoshi N, Hayashi M, Yamada M, Mizusawa H. Changes of unmyelinated fibers in pure autonomic failure, pandysautonomia, and acute sensory and autonomic neuropathy. The XIVth International Congress of Neuropathology, Birmingham, UK, September, 2000. (Abstract: *Brain Pathol* 10:549-550, 2000)
- 3) 坂本昌己、山田正仁、入岡 隆、神田隆、水澤英洋。AL アミロイドーシスに対する大量デキサメサゾン・ α -インターフェロン療法の経験。第 41 回日本神経学会総会。松本。2000 年 5 月 24-26 日。
- 4) 南里和紀、内海裕也、関根成郎、松村敦、向後かずさ、林 徹、豊田充康、山田正仁。トランスサイレチン遺伝子 107Ile Val 変異を示した家族性アミロイドポリニューロパチー II 型の一例。第 41 回日本神経学会総会。松本。2000 年 5 月 24-26 日。
- 5) 白石 淳、山田正仁、水澤英洋。プリオン蛋白(PrP)遺伝子コドン 105 変異に伴う Gerstmann-Straussler-Scheinker 病 (GSS105) の精神症状の検討。第 41 回日本神経学会総会。松本。2000 年 5 月 24-26 日。
- 6) 袖山信幸、山田正仁、水澤英洋、伊藤嘉憲、大友英一、末松直美、松下正明。 α 2-マクログロブリン遺伝子多型とアルツハイマー病およびアルツハイマー型病

理変化との関連。第41回日本神経学会総会。松本。2000年5月24-26日。

7) 山田正仁、西田陽一郎、原 健、水澤英洋、下川怜子、桶田理喜、伊藤嘉憲、市岡 修、末松直美、木村京子、野中暁子、柳沼将公、北本哲之、松下正明。硬膜移植後の Creutzfeldt-Jakob 病：中枢神経系および非神経系組織におけるプリオン蛋白の検討。第41回日本神経学会総会。松本。2000年5月24-26日。

8) 山田正仁、伊藤嘉憲、袖山信幸、末松直美、大友英一、松下正明、水澤英洋。神経原線維変化型老年痴呆の海馬病変：アルツハイマー病との比較。第41回日本神経病理学会学術研究会。米子。2000年6月1-3日。

9) 神田 隆、叶内 匡、三浦義治、入岡隆、山田正仁、水澤英洋。Acute sensory and autonomic neuropathy にみられる無髄線維の病理学的変化。第41回日本神経病理学会学術研究会。米子。2000年6月1-3日。

10) 前島友紀、神田 隆、山田正仁、宮本

和人、水谷俊雄、水澤英洋。慢性炎症性脱髄性多発根神経炎 (CIDP) の1剖検例。

第41回日本神経病理学会学術研究会。米子。2000年6月1-3日。

11) 山田正仁、伊藤嘉憲、大友英一、水澤英洋、桶田理喜、松下正明。プリオン蛋白斑の形成機序に関する検討。日本痴呆学会。かずさアカデミアパーク。2000年9月29-29日。

12) 石田和之、竹内博明、高橋良輔、吉村和法、山田正仁、水澤英洋。末梢神経障害を呈するリンパ腫患者血清の自己抗体が認識する抗原の検討。日本分子生物学会。神戸、2000年12月13-16日。

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

開放反応系を用いたアルツハイマー病 β アミロイド線維形成 及び分解機構の解明

分担研究者 内木宏延 福井医科大学第2病理

共同研究者 小野賢二郎^{*,**}、長谷川一浩^{*}、山田正仁^{**}

^{*}福井医科大学第2病理、^{**}金沢大学神経内科

研究要旨 われわれはこれまでに、アルツハイマー病 β アミロイド線維 (fA β) の試験管内形成過程を、チオフラビンT分光蛍光定量法及び閉鎖反応系により速度論的に解析し、重合核依存性重合モデルにより説明してきた。このモデルは重合核形成過程と線維伸長過程より成り、後者は一次反応形式に従う。今回、より生体に近いモデルとして、系外から A β 蛋白を連続的に供給する開放反応系を構築し、fA β の伸長及び脱重合反応を解析した。測定には表面プラズモン共鳴法を原理とするピアコアを用いた。その結果、fA β 伸長反応の初速度は、添加した A β 蛋白濃度に比例し、開放反応系でも一次反応形式に従った。さらに、A β 蛋白を含まない緩衝液を添加すると、脱重合が観測された。また、重合速度と脱重合速度が均衡する A β 蛋白濃度は約 0.2 μ M であった。このように、線維伸長は重合と脱重合の動的平衡過程であることが示された。

A. 研究目的

われわれはこれまでに、アルツハイマー病 β アミロイド線維 (fA β) の試験管内形成過程を、チオフラビン T を用いた分光蛍光定量法、及び閉鎖反応系を駆使して速度論的に解析して来た。その結果、A β 蛋白からの線維形成過程が重合核依存性重合モデルで説明出来ることを明らかにした。このモデルは重合核形成過程、及び線維伸長過程より成るが、後者の過程は一次反応速度論形式に従う。これは、線維伸長が重合と脱重合の動的平衡過程であること、すなわち fA β の伸長・短縮が、A β 蛋白の重合核あるいは fA β 断端への step by step な重合、あるいは fA β 断端からの step by step な脱重合により起こ

ることを示している。今回、より生体に近いモデルとして、系外から A β 蛋白が供給され続ける開放反応系を構築し、fA β の伸長、及び脱重合機構を解析した。

B. 研究方法

1. 測定方法

測定には表面プラズモン共鳴法 (SPR) を測定原理とする BIAcore 1000 (ピアコア)を用いた。最初に、重合核となる fA β を超音波破碎後、センサーチップ上にアミノ基カップリング法を用いて共有結合により固定化した。次いで、リン酸緩衝生理食塩水 (pH 7.5) に溶解した 0-30 μ M の A β 蛋白溶液を流速 10 μ l/min で連続的に添加し、37°Cにおける fA β の伸長過程及

び脱重合過程をリアルタイムで測定した。

2. 測定原理

ピアコアでは金の薄膜を張ったセンサーチップ上のフローセルでの反応を観測する。センサーチップの金膜の裏側から光をあてると、表面プラズマ共鳴のシグナル (SPR シグナル) がある反射角度に検出される。SPR シグナルはセンサーチップ溶液側の表面に近い部分での質量によって変化する。従って、アミロイド線維が伸長、脱重合することで SPR シグナルの変化が観測される。

C. 研究結果

1. 線維を固定化して伸長反応を行った際のタイムコースの検討

センサーチップ上のフローセルに A β 40 線維の 1000 レスポンスユニット (RU) 相当を固定化した。尚、1000RU はセンサーチップの面積 1 平方 mm 当たり 1ng の蛋白量に相当する。このフローセルに、リン酸緩衝生理食塩水 (pH 7.5) のみを流したときには、シグナルは安定しており、特に増減は認められなかった。次いで、3 μ M の A β 40 を 5 分間添加すると、SPR シグナルが 110RU 直線的に増加した。次いで、A β 40 の供給を停止し、緩衝液のみを流すと緩やかな減少が認められ、線維の脱重合に相当すると考えられる。

2. 開放反応系における一次反応形式の確認

fA β を約 1000RU センサーチップ上に固定し、0–30 μ M の A β 蛋白溶液を流速 10 μ l/min で 10 μ l 連続的に添加して、fA β 伸長反応に相当する SPR シグナル変化を測定した。その結果、fA β 伸長反応の初速度は、添加した A β 蛋白の濃度に比例した (図 1)。これは、開放反応系においても、fA β 伸長過程が一次反応速度論形式に従うことを示している。次いで、重合速度と脱重合速度が均衡する濃度 (臨界モ

ノマー濃度) を直接測定した。3 μ M の A β 蛋白溶液を 10 μ l 添加後、直ちに 0–0.5 μ M の A β 蛋白を 100 μ l 添加した。この時、追加した A β 蛋白が 0 μ M では、図 2 に示すように SPR シグナルは減少した。ところが、0.5 μ M では、SPR シグナルは増加した。この中間の濃度、約 0.2 μ M では、増加も減少も認められなかった。この濃度は、重合速度と脱重合速度が均衡する濃度、即ち、臨界モノマー濃度であると考えられる。閉鎖反応系による測定でも臨界モノマー濃度は μ M オーダー以下と推定されていたが、SPR を用いた測定系により直接測定できた。

D. 考察

従来我々が検討を行ってきた閉鎖反応系では、遊離の A β 蛋白が重合して無くなると線維の伸長は平衡に達する。これに対して、この開放反応系では外から A β 蛋白を供給し続けることが可能なため、A β 線維は限りなく伸長を続ける。また、閉鎖系では観測不可能であった解離反応に相当する SPR シグナルの減少をリアルタイムで観測できた。さらに、線維伸長過程は重合と脱重合の動的平衡過程であることを示し、臨界モノマー濃度を直接求めることが初めて可能となった。本測定法はマイクロモラー以下の濃度の A β 蛋白の反応を測定することが可能な高感度測定法であり、また、リアルタイム測定を行うため、反応速度を直接求めることができる。従って、各種反応速度論的パラメータを求めることができ、A β アミロイド線維形成機構を解明するために有用である。また、アポ E 等の生体分子や種々の有機化合物が上記過程に及ぼす効果の解析にも使用可能と考え、現在検討を進めている。

E. 結論

SPR 法を用いた開放反応系によって fA