

- 5) 浦上克哉. アルツハイマー病の原因遺伝子ならびに遺伝的危険因子の解析. ノバルティス老化および老年医学研究基金 1999年度 研究助成受賞者講演第 22 回日本老年学会総会 第 43 回日本老年医学会学術集会 6月 13・15 日 2001.
- 6) 伊藤伸朗, 荒井啓行, 石黒幸一, 大野英人, 浦上克哉, 今川正樹, 葛原茂樹. 脳脊髄液 Serine199 部位リン酸化タウ;新しいアルツハイマー病の生物学的診断マーカー. 第 20 回日本痴呆学会 津 10 月 3-4 日 2001.
- 7) 和田健二, 田中稔久, 涌谷陽介, 浦上克哉, 山形薫, 中島健二, 武田雅俊. Singlet Oxygen 酸化ストレスによるタウ蛋白リン酸化の検討. 第 20 回日本痴呆学会 津 10 月 3-4 日 2001.
- 8) 涌谷陽介, 石崎公郁子, 足立芳樹, 森昌忠, 森望美, 齋嶋美佳, 和田健二, 浦上克哉, 中島健二. 鳥取県大山町における 2000 年度痴呆性疾患疫学調査. 第 20 回日本痴呆学会 津 10 月 3-4 日 2001.
- 9) 山形薫, 涌谷陽介, 浦上克哉, 和田健二, 荒井啓行, 佐々木英忠, 樋口進, 杠岳文, 中島健二. アルツハイマー病と 8-オキシグアニン DNA グリコシラーゼ(hOGG1)遺伝子多型. 第 20 回日本痴呆学会 津 10 月 3-4 日 2001.
- 10) 涌谷陽介, 浦上克哉, 和田健二, 山形薫, 荒井啓行, 佐々木英忠, 樋口進, 中島健二. アルツハイマー型痴呆症剖検脳における Tau 遺伝子の異常スプライシングの解析 第 22 回日本老年学会総会 第 43 回日本老年医学会学術集会 大阪 6 月 13-15 日 2001
- 11) 荒井啓行, 岡村信行, 丸山将浩, 佐々木英忠, 浦上克哉, 中島健二. Alzheimer 病の論理的 bio-marker としての脳脊髄液リン酸化タウ. 第 22 回日本老年学会総会 第 43 回日本老年医学会学術集会 大阪 6 月 13-15 日 2001.
- 12) 山形薫, 涌谷陽介, 浦上克哉, 中島健二. アルツハイマー病における Brain Mitochondria Carrier Protein 1(BMCP1) 遺伝子多型のスクリーニング. 第 22 回日本老年学会総会 第 43 回日本老年医学会学術集会 大阪 6 月 13-15 日 2001
- 13) 浦上克哉, 古和久典, 山形薫, 和田健二, 涌谷陽介, 中島健二. 日本人の脳血栓症および脳血管性痴呆における Activated Protein C-resistance の意義. 第 22 回日本老年学会総会 第 43 回日本老年医学会学術集会 大阪 6 月 13-15 日 2001.
- 14) 浦上克哉. アルツハイマー病—診断のポイントと薬物療法—. 第 10 回日本総合診療医学会モーニングセミナー 高松 2 月 17 日 2002.
- 15) Urakami K, Wakutani Y, Wada K, Yamagata K, Nakashima K. Cerebrospinal fluid tau protein as a diagnostic marker in corticobasal degeneration and progressive supranuclear palsy. The 5th International Conference on Progress in Alzheimer's and Parkinson's Disease. The 9th International Catecholamine Symposium March 31-April 5, 2001 Kyoto, Japan.
- 16) Urakami K, Arai H, Ito N, Ishiguro K, Oono H, Kohno H, Kuzuhara S, Sasaki H, Imahori K, Nakashima K. CSF tau protein phosphorylated at serine 199 in Alzheimer's disease-A large scale and

multi-center study. World Biol Psychiatry  
(2001) 2, 118S CLINICAL  
PSYCHIATRY-Symposia July1-7, 2001,  
Berlin, Germany.

厚生科学研究費補助金（21世紀型医療開拓推進研究事業）  
分担研究報告書

アルツハイマー病生物学的診断マーカーの確立に関する臨床的研究

分担研究者 千葉 茂 旭川医科大学医学部精神医学講座教授

研究要旨

アルツハイマー病(AD)の早期診断を可能にする生物学的診断マーカーの確立のためには、ADの病理学的カスケードの最上流に位置する変化を解明することが必須である。AD脳の神経細胞内で酸化傷害のマーカーである8-hydroxyguanosine (8OHG)やNitrotyrosineが対照脳に比べて増加していることが既に明らかにされている。そこで本研究では、ADの早期の病態における酸化傷害の関与について解明することを目的に、AD剖検脳を用いて、神経細胞の酸化傷害と $\beta$ アミロイド(A $\beta$ )沈着、神経原線維変化ならびにAD罹病期間との関連性について検討した。AD脳の神経細胞内8OHGおよびNitrotyrosine免疫反応性の増強は、老人斑(神経細胞外A $\beta$ )沈着の軽度な例でより顕著であった。また、神経細胞内8OHG免疫反応性の増強は、AD罹病期間の短い例においてより顕著であり、神経原線維変化を伴わない神経細胞で高度であった。さらに、神経細胞内A $\beta$ 沈着は老人斑沈着に先行する早期変化と考えられるが、同一の神経細胞内にA $\beta$ 沈着と8OHGの出現が観察された。以上の結果から、AD脳における酸化傷害は、ADの神経細胞変過程の早期段階に生じることが示唆された。したがって、酸化傷害のマーカーは、AD早期診断マーカーの候補として重要なもののひとつであることが明らかになった。

キーワード：アルツハイマー病、 $\beta$ アミロイド、8-hydroxyguanosine、Nitrotyrosine、酸化傷害

A. 研究目的

アルツハイマー病(AD)の早期診断を可能にする生物学的診断マーカーの確立のためには、ADの病理学的カスケードの最上流に位置する変化を解明することが必須である。従来、ADの生物学的診断マーカーとしては、AD脳で観察される老人斑や神経原線維変化の主要構成蛋白である $\beta$ アミロイド(A $\beta$ )やタウに注目が集まっていた。もしAD脳において老人斑や神経原線維変化の形成に先行する普遍的な変化を見出すことができれば、早期診断や発症前診断法の確立に大いに寄与することになる。

近年、ADの病態に酸化ストレスが関与していることを示唆する報告が相

次いでおり、AD 脳の神経細胞内で核酸やタンパク質の酸化的傷害のマーカーである 8-hydroxyguanosine (8OHG)や Nitrotyrosine が対照脳に比べて増加していることが明らかにされている。そこで本研究では、AD の早期の病態における酸化的傷害の関与について解明することを目的に、AD 剖検脳を用いて、神経細胞内 8OHG および Nitrotyrosine の免疫反応強度と A $\beta$  沈着、神経原線維変化ならびに AD 罹病期間との関連性について検討した。

## B. 研究方法

材料として剖検により確定診断されたAD脳22例、対照高齢者脳17例を用い、Methacarn 固定(16h)後に海馬を含む切片を作製し、1F7(抗 8OHG 抗体; Trevigen, 1:30)、7A2(抗 Nitrotyrosine 抗体; Dr. Beckman JS より 供与, 1:100)、4G8(抗 A $\beta$  抗体; Senetek, 1:1000)、および AT8(抗リン酸化タウ抗体; Biosource, 1:500)を一次抗体として免疫染色(PAP法)を行った。また、神経細胞内 A $\beta$  蓄積を検出するために、全長 A $\beta$  前駆体蛋白質とは交差反応性を示さない A $\beta$  40 および A $\beta$  42 の C 末端に特異的な抗体 (QCB-Biosource; 順に 1:100, 1:250) による免疫染色も行った。二重染色法あるいは、連続切片法によって A $\beta$  やタウと 8OHG の免疫反応を観察した。つづいて、海馬支脚における錐体細胞の 8OHG 免疫反応強度 (Optical density)ならびに A $\beta$  沈着量(% area)を Quantimet 570C Image Analysis System (Leica)を用いて解析した(計測方法の詳細は、Nunomura A. et al. J. Neurosci. 19(6):1959-1964, 1999 参照)。

(倫理面への配慮)

本研究に用いる剖検脳材料は、米国 Case Western Reserve University Brain Bank の倫理基準に従って採取された脳組織であり、同大学病理学研究所の George Perry 教授の厚意によって分担研究者に提供されたものである。

## C. 研究結果

海馬支脚における錐体細胞の8OHG免疫反応強度は、AD脳において対照脳に比べて有意に増加していた。8OHG 免疫反応の出現は、別な酸化的傷害のマーカーである Nitrotyrosine の免疫反応と一致して観察された。AD 脳における錐体細胞の 8OHG および Nitrotyrosine の免疫反応性の増強は、老人斑として観察される A $\beta$  沈着の軽度な例でより顕著であった。また、錐体細胞の 8OHG 免疫反応性増強は、AD 罹病期間の短い例においてより顕著であった。画像解析によって 8OHG 免疫反応強度と A $\beta$  沈着量 (% area) を計測したところ、両者の間に逆相関が認められ (Spearman の順位相関検定で  $p < 0.001$ )、8OHG 免疫反応強度と罹病期間との間にも逆相関が認められた (Spearman の順位相関検定で  $p < 0.05$ )。また、AD 脳海馬錐体細胞の 8OHG 免疫反応強度は、神経原線維変化を伴う錐体細胞に比べて神経原線維変化を伴わない錐体細胞でより高度であった (Mann-Whitney の U 検定で  $p < 0.01$ )。さらに、AD 海馬の 8OHG 陽性神経細胞群の一部に細胞内 A $\beta$  42 の蓄積が認められた。

#### D. 考察

以上の結果から、AD 脳における酸化損傷は、老人斑形成の早期段階、すなわち、AD の神経細胞変性過程の早期段階に生じることが示唆された。このことは、AD 脳の病理学的モデルであるダウン症候群の脳や家族性 AD の原因遺伝子を導入したモデル動物脳において酸化損傷が老人斑形成に先行するという報告によっても支持される(Nunomura A. et al. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 59(11):1011-1017, 2000; Pratico D. et al. J. Neurosci. 21(12):4183-4187, 2001)。

したがって、酸化損傷のマーカーは、AD 早期診断マーカーの候補として重要なもののひとつであることが明らかになった。酸化損傷のマーカーを AD 患者や AD の前段階と考えられている Mild Cognitive Impairment(MCI)症例の生体材料、すなわち髄液、血液、あるいは尿などにおいて検出することが可能であれば、AD の早期診断・発症前診断方法の開発に寄与することが期待される。酸化損傷は多くの生活習慣病やパーキンソン病などの神経疾患の発症要因としても関連することが知られているため、酸化損傷マーカーが AD に特異的な診断マーカーとは言えないかもしれない。しかし、酸化損傷マーカーが、AD 早期診断の補助的役割や発症前診断に役立つことは十分に期待される。

#### E. 結論

酸化損傷のマーカーは、AD 早期診断マーカーの候補として重要であることが、死後脳の検討から示唆された。今後、AD や MCI 症例の髄液、血液、尿などを用いて AD の早期診断・発症前診断における酸化損傷マーカーの有用性が検討されるべきである。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Nunomura A, Perry G, Aliev G, Hirai K, Takeda A, Balraj EK, Jones PK, Ghanbari H, Wataya T, Shimohama S, Chiba S, Atwood CS, Petersen RB, Smith MA. Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 60(8):759-767, 2001

##### 2. 学会発表

42<sup>nd</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of Neuropathology (24-26 May 2001, Tokyo)

Nunomura A, Chiba S, Kosaka K, Castellani RJ, Smith MA, Perry G. Oxidative damage to neuronal RNA in the cerebral cortex of dementia with Lewy bodies. *Neuropathology* 21 (Suppl.): A22, 2001

4th International Neurodegeneration in Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease, and Related Disorders (23-24 July 2001, Princeton, New Jersey)

Nunomura A, Chiba S, Kosaka K, Castellani RJ, Smith MA, Perry G. Widespread oxidative damage to neuronal RNA in dementia with Lewy bodies. Poster Abstracts p 4-5, 2001

第 20 回日本痴呆学会 (平成 13 年 10 月 4-5 日、津)

布村明彦、千葉 茂. アルツハイマー病脳における神経細胞内  $\beta$  アミロイド蓄積と RNA の酸化. *Dementia Japan* 15(2):127, 2001

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

厚生科学研究費補助金（21世紀型医療開拓推進研究事業）

分担研究報告書

研究課題名：アルツハイマー病生物学的診断マーカーの確立に関する臨床研究

（分担研究課題名：アルツハイマー病生物学的診断マーカーの確立に関する臨床研究）

分担研究者 服部英幸 金沢医科大学老年病学助教授

研究要旨：本研究では口腔粘膜上皮を擦過し、その細胞内の tau 蛋白量を測定することによりアルツハイマー病の診断を容易に行うことを目的とする。採取法と前処置法を確立した後、ウェスタンブロット法にて tau 蛋白の同定を行い、ELISA 法で定量化した。非リン酸化タウに対する抗体である BT-2 を用いたウェスタンブロットでは 65kDa および 110kDa に陽性のバンドを認めた。他のリン酸化、非リン酸化タウ蛋白に対する抗体でも陽性バンドを認めた。ELISA 法を用いた測定ではアルツハイマー病例では血管性痴呆例、対照例に比し tau 蛋白量が有意に高値を示し ( $p < 0.05$ )、発症年齢が低いほど高値であることを認めた ( $r = -0.45$ ,  $p < 0.05$ )。口腔粘膜上皮のタウ蛋白をマーカーとして測定することにより簡便にアルツハイマー病の診断を行える可能性が示唆された。

キーワード：口腔粘膜上皮、タウ蛋白、アルツハイマー病

A. 研究目的

近年、アルツハイマー病の病態に関する知見が飛躍的に増加し、より病態を忠実に反映した生物学的マーカー診断が可能となりつつある。中でも、脳組織中の主要な病理学的所見である老人斑と神経原線維変化を形成する tau 蛋白と A $\beta$  蛋白はマーカーとして極めて有望視されている。しかしながら脳は biopsy を行なうことが困難であり、脳の病態を反映する体液や組織を採取しマーカーとなる物質を測定する必要がある。現段階では脳脊髄液中の tau 蛋白、A $\beta$  蛋白を測定する方法が臨床に応用されてきているが、腰椎穿刺を行なう必要があり侵襲性の問題がある。一方、アルツハイマー病では非神経組織に

も病変が存すること報告され、それを診断に応用する試みもなされている。皮膚生検により線維芽細胞を採取し tau 蛋白、A $\beta$  蛋白の測定がおこなわれているがこれも侵襲性において問題がある。本研究においてはアルツハイマー病の病態を忠実に反映しながらも非侵襲的な方法で行なえる生物学的マーカー診断法の確立を目的として口腔粘膜剥離上皮の tau 蛋白の同定と測定を行なう。これは口腔粘膜の擦過という非侵襲的な方法で得られた上皮中の蛋白を測定するものであり、手技がたやすく患者への負担が軽微でありスクリーニング法として適している。

B. 研究方法

対象はアルツハイマー病例 (AD) 37 例、血管性痴呆例 (VD) 32 例、65 歳以上の高齢対照例 (OC) 36 例、65 歳以下の若年対照例 (YC) 35 例である。

#### (1) 口腔粘膜上皮採取

被検者に 0.1% povidone iodine 溶液にてうがいを繰り返してもらい、食物残渣を除去した後金属製の舌圧子にて頬部粘膜を擦過することにより上皮を採取した。採取後 5% antibiotic antimycotic solution を加えた DMEM に浮遊させて殺菌後、0.4% povidone iodine 溶液を加えて洗浄した。Phosphate buffer で洗浄後、遠心して pellet をとり 1% SDS400  $\mu$ l を加えて蛋白融解をおこなった。遠心後の上澄み液を western blot, ELISA, 蛋白量測定を試料とした。

#### (2) Western blot

口腔粘膜タウ蛋白の性状を調べる目的で、抗タウ蛋白抗体を用いた western blot を行った。用いた抗体は BT-2, HT-7, TAU1, TAU2, TAU5, AT180, AT270, tau C terminal である。このうち非リン酸化タウ蛋白に対する抗体は TAU1, TAU2, TAU5, tau C terminal である。リン酸化タウ蛋白に対する抗体は AT180, AT270 である。

#### (3) ELISA

脳脊髄液タウ蛋白を測定するキットであるフィノスカラー h TAU (ニプロ) を用いて口腔上皮タウ蛋白を測定した。一次抗体として AT-120 を用い、二次抗体として HT-7, BT-2 を用

いた。

#### (4) 蛋白定量

採取される上皮の量は個人差があるため、BCA protein Assay Kit (PIERCE) を用いて蛋白定量を行い、上皮の総蛋白量を測定した。

#### (5) 脳脊髄液タウ蛋白の測定

口腔粘膜上皮を採取しえた症例のうち同時に脳脊髄液を採取した 29 例 (AD14 例、VD9 例、OC6 例) についてはフィノスカラー h TAU キットを用いて脳脊髄液タウ蛋白濃度を測定し、口腔粘膜上皮タウ蛋白濃度との相関性を検討した。

#### (倫理面への配慮)

すべての対象例について本人または家族に守秘義務について十分な説明を行い、承諾を得た上で上皮の採取を行った。

### C. 研究結果

#### (1) 上皮の殺菌と洗浄

採取直後の上皮と、殺菌・洗浄後の上皮を Giemsa 染色して比較したところ採取直後の上皮には多数の細菌が付着しているのが観察されたが、殺菌・洗浄後の上皮にはきわめてわずかの細菌を認めるのみであった。

#### (2) Western blot

ELISA 測定でもちいる BT-2 によるウェスタンブロットでは 110 kDa および 65 kDa に陽性バンドを認めた。TAU1, TAU2, AT270, では陰性であったが、TAU5, AT180, anti-TAU C-terminal では陽性バンドをみとめた。非リン酸化タウに対する抗体



だけでなく、リン酸化タウに対する抗体でも陽性像を認めた。

(3) 脳脊髄液タウ蛋白と口腔  
粘膜上皮タウ蛋白との関  
連

脳脊髄液タウ蛋白と口腔上皮タウ蛋白を同一例で比較すると、有意な正の相関をみとめた。(r=0.43, p=0.011)

(4) タウ蛋白濃度測定・群間比  
較

ELISA で測定したタウ蛋白量を総蛋白量で除した値をタウ蛋白濃度としてこれを指標として各疾患、対照例との比較を行った。アルツハイマー型痴呆では血管性痴呆、高齢対象例、若年対象例に比し有意に高値を示した (AD 0.93(0.11), VD 0.49(0.06), OC 0.53(0.06), YC 0.52(0.05), p<0.01)。カットオフポイントを 0.8 とした場合、sensitivity 50.0%, specificity 83.3%であった。

(5) 対象例での年齢との関連

若年および高齢対象例 72 例について年齢とタウ蛋白濃度との関連を検討したが有意な相関は認められなかった (r=0.06, NS)。

(6) アルツハイマー病例の発  
症年齢、重症度との関連

アルツハイマー病例 37 例において発症年齢との関連を検討したところ有意な負の相関を認めた (r=-0.45, p=0.014)。MMS E を指標として重症度との関連を検討したところ有意な相関は認められなかった (r=0.08,

NS)。

D. 考察

生物学的マーカーを用いたアルツハイマー病の診断法はさまざまに行われているが、特に脳脊髄液のタウ蛋白および A $\beta$  蛋白の測定が多くの施設で試みられている<sup>1</sup>。その他に非神経組織の病変を検出する試みもなされており、皮膚より採取した線維芽細胞を培養した実験<sup>2</sup>や、血清中のアンチキモトリプシン 測定<sup>3</sup>、血小板のアミロイド前駆蛋白測定<sup>4</sup>、などが行われている。培養した皮膚線維芽細胞においてタウ蛋白が増加しているという報告<sup>5</sup>があり、このことは脳以外の組織でタウ蛋白を測定することによりアルツハイマー病の診断が可能になることを示唆している。

我々はこれまでにアルツハイマー病において口腔粘膜上皮細胞内のタウ蛋白が血管性痴呆や対象例に比し有意に増加していることを報告してきた。今回の交付申請以後更に症例数を増加させ、新たな抗体を用いて口腔上皮のタウ蛋白の性質を明らかにした。

その結果、アルツハイマー病で有意な増加はみられるものの現段階における症例数の範囲では sensitivity と specificity の値は未だ臨床応用には遠い段階であった。この原因として高値を示した若年から初老期にかけてのアルツハイマー病の検討例が少ないことも考慮する必要がある。今後更に症例を増やし

て検討したい。

次に各種の抗タウ蛋白抗体を用いたウェスタンブロットの結果からは中枢神経系とおなじく口腔上皮内にもリン酸化および非リン酸化タウ蛋白が存在することを示しておりアルツハイマー病の病理変化が口腔上皮に反映されている可能性が示唆される。口腔上皮タウ蛋白の性状についてはさらにくわしく検討していきたいと考えている

文献

1. Andreasen N. Vanmechelen E. Vand de Voorde A. et al. Cerebrospinal fluid tau protein as a biochemical marker for Alzheimer's disease: a community based follow up study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998; 64: 298-305.
2. Gibson G. Martins R. Blass J. Gandy S. Altered oxidation and signal transduction systems in fibroblasts from Alzheimer patients. *Life Science* 1996; 59: 477-489.
3. Matsubara E. Hirai S. Amari M. et al.  $\alpha$ 1-antichymotripsin as a possible biochemical marker for Alzheimer-type dementia. *Ann Neurol* 1990; 28: 561-567.
4. Baskin F. Rosenberg RN.

Iyer L. Hynan L. Cullum CM. Platelet APP isoform ratios correlate with declining cognition in AD *Neurology* 2000; 54: 1907-1909.

5. Blass JP. Baker AC. Ko L. Sheu RKF. Black RS. Expression of 'Alzheimer antigens' in cultured skin fibroblasts *Arch. Neurol* 1991; 48: 709-717.

#### E. 結論

脳脊髄液タウ蛋白測定用の ELIZA キット（フィノスカラー-hTAU、ニプロ）を用いてタウ蛋白量の測定を試みたところ測定可能であることが判明した。そこで、各年代の対照例、アルツハイマー病例、血管性痴呆例について検討したところ、次のような結果を得た。

1. 対照例では年齢によるタウ蛋白量の差はなかった。
2. アルツハイマー病では血管性痴呆, 対照例に比し有意に高値を示した。
3. アルツハイマー病例について長谷川式スケールを指標として重症度との相関を検討したが有意な相関は得られなかった。
4. 同じくアルツハイマー病例について発症年齢との相関を検討したところ、発症年齢が低いほどタウ蛋白が高値となった。

5. 口腔上皮タウ蛋白測定はアルツハイマー病の非侵襲的かつ簡便な測定法として有望であると考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

服部英幸、土屋 博、高崎幹裕、宮内英二、宗平純一、星野智子、村井裕、紙野晃人、松本正幸、吉田 博：アルツハイマー型痴呆の口腔粘膜上皮タウ蛋白定量に関する検討（第3報）。第43回日本老年医学会学術集会、大阪、2001年6月

Hideyuki Hattori, Masayuki Matsumoto, Hiroshi Tsuchiya, Kunimitsu Iwai, Eiji Miyauchi, Mikihiro Takasaki, Kouzin Kamino, Junichi Munehira, Yasuhiro Kimura, Kenichi Kawanishi, Tomoko Hoshino, Hiroshi Murai, Hajime Ogata, Hidemichi Maruyama. : Tau protein of oral epithelium increases in Alzheimer' s disease. The 17<sup>th</sup> Congress of the International Association of Gerontology, Vancouver, Canada, July, 2001

H Hattori, M Matsumoto, K Iwai, H Tsuchiya, E Miyauchi, M Takasaki, K Kamino, J Munehira, Y Kimura, K Kawanishi, T Hoshino, H Murai, H Ogata, H Maruyama, H Yoshida: The

tau protein of oral mucosa increases in Alzheimer' s disease. J Gerontology, Medical Science, 57(1), 64-70, 2002

研究課題名：アルツハイマー病生物学的診断マーカーの確立に関する臨床研究

(分担研究課題名：アルツハイマー病髄液マーカーの確立に関する研究)

分担研究者 田中稔久 大阪大学大学院医学系研究科・精神医学  
分担研究協力者 和田健二 鳥取大学医学部・脳神経内科  
分担研究協力者 山森英長 大阪大学大学院医学系研究科・精神医学

#### 研究要旨

高齢化社会にいたる現代は早期診断・早期治療のためにアルツハイマー病の生物学的診断マーカーの確立はきわめて重要である。今回の研究では、酸化ストレスに注目し、髄液中の酸化成分のひとつであるカルボニル化蛋白の検出を考えた。アルツハイマー病患者および正常圧水頭症患者から採取した脳脊髄液を用いて検討をおこなったところ、アルツハイマー病患者の脳脊髄液中には約 30 kDa のカルボニル化蛋白が正常圧水頭症患者に比べて多量に含まれていることが判明した。

キーワード：アルツハイマー病、正常圧水頭症、タウ蛋白、カルボニル化、酸化ストレス

#### A. 研究目的

我が国の痴呆性高齢者は現時点で 130 万人を数えるが、この数は今後も増加し続けており 2035 年には 300 万人に達するものと予想されている。このうちの約半数はアルツハイマー病(AD)とされており、AD の早期診断法の確立は社会的急務ともいえる。アルツハイマー病の早期診断には、臨床症状、神経心理学的検査、生理学的検査、脳機能画像検査などが考えられるが、早期に、多人数をスクリーニングするという目的のためには、生物学的診断マーカーが最も有効と考えられる。

生物学的診断マーカーの必要性は、AD 治療薬が開発されつつあることを考えると、AD の確定診断に基づいた投薬や治療的介入を計画し、さらに、発症前段階の AD を的確に診断することにより AD の予防への道を切り開くために必要である。AD の生物学的診断マーカーの確立により、AD の早期診断、発症前診断が可能となれば、AD の発症を防ぐことができ、これは AD 患者の医療と介護に必要な多大の費用を抑えることが期待されることは言うまでもない。

国内外の多くのグループにより AD の生物学的診断マーカーの研究が進められている。例えば、糖鎖化アセチルコリンエステラーゼ、インターロイキン-6、サブスタン-P、シスタチン C などの上昇が AD 脳脊髄液で検討されてきた。末梢血では、血清アポリポ蛋白レベル、血清ホモシステイン、APP アイソフォーム、IL-6、

$\alpha 1$  アンチキモトリプシン、オキシゲナーゼ-1、24S-ヒドロキシコレステロールのレベルなどが検討されてきた。現時点で临床上の有用性が確認とされている診断マーカーとして脳脊髄液中のタウ蛋白とアミロイド  $\beta 42$  とがあるが、未だ生前診断を簡易に確定できるものではない。

今回、我々は酸化ストレスに注目し、髄液中の酸化成分の検出を考えた。酸化にはいくつかのもの形態があるが、蛋白のカルボニル化は酸化のひとつの形態であり、過酸化脂質と蛋白との結合やアマドリ反応を介した蛋白の非酵素的糖化 (glycation) などによって形成されることが知られている。このカルボニル基は酸性条件のもとでジニトロフェニル(Dinitrophenol: DNP)と結合し、この DNP は特異抗体によって検出できることから、ウエスタンブロットを用いてアルツハイマー病患者および正常圧水頭症患者から採取した脳脊髄液を用いて検討をおこなった。

#### B. 研究方法

サンプルはアルツハイマー病患者および正常圧水頭症患者から採取した脳脊髄液を用いて検討をおこなった。1 ml のサンプルに 10  $\mu$ l の 500 mM PMSF、2.5 mg/ml aprotinine、2.5 mg/ml leupeptine を添加し (最終濃度 5 mM PMSF、25  $\mu$ g/ml aprotinine、25  $\mu$ g/ml leupeptine) 、それを 100 度で 5 分間ボイルしたあと 200K x G にて遠心し凝固物を遠沈して可

溶性画分(supernatant)を得た。このステップはタウ蛋白などの熱耐性の蛋白を収拾するためのものである。この supernatant をセントリカット超ミニ (分子量 10,000 画分) を用いて 300  $\mu$ l まで濃縮し、それを氷冷アセトンによって蛋白沈降をかけてたあと、SpeedVac によって乾燥させた。この蛋白をポリアクリルアミドゲルにアプライして通常のウエスタンブロット解析と同様に、PVDF 膜に転写した。転写後、カルボニル化蛋白の検出のために、PVDF 膜をジニトロフェニル (DNP) 溶液 (0.2% DNP、2N HCl) に 5 分間浸潤させたあと転写溶液にて洗浄し、そこからブロッキングを開始して、抗体をアプライした。1 次抗体は抗 DNP 抗体 (Vector laboratory) を用い、検出は ECL システムをもちいた。また、同様の検討をアルツハイマー病脳由来のリン酸化タウ蛋白 AD p-tau (Dr. Iqbal, K. (NYS Institute for Basic Research, NY, U.S.A.)より供与) を用いて検討した。また、DNP 溶液の処理をおこなわないものを、抗タウ蛋白抗体(Sigma)にて検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は人体サンプルをもちいたものであるが、脳脊髄液採取においては本人または家族の同意をいただいているので、倫理面への配慮はなされているものとする。

### C. 研究結果

アルツハイマー病患者 (AD) および正常圧水頭症 (NPH) 患者から採取した脳脊髄液を用いて検討をおこなったが、今までの検討から両者はともにタウ蛋白濃度が高いことが判明している (AD :  $430.6 \pm 74.7$  pg/ml, NPH :  $665.4 \pm 329.7$  pg/ml)。このサンプルをポリアクリルアミドゲルにアプライして PVDF 膜に転写し、DNP 溶液に浸潤後、抗 DNP 抗体を用いてウエスタンブロットをおこなうと、AD 患者のサンプルでは約 30 kDa のところにバンドが染色されたが、NPH 患者のサンプルではその染色性が薄かった。この染色性の程度をデンストメトリーにて測定すると、AD 患者のサンプルでは  $5.5 \pm 1.1$  units であったが、NPH 患者のサンプルで  $1.6 \pm 0.8$  units であり、値は有意に低かった。この、約 30 kDa のバンドが何であるかを詳しく検討するために、AD 患者の脳脊髄液サンプルを DNP 溶液による処理なしで抗タウ蛋白抗体によって染色すると約 30 kDa のところにバンドが染色され、抗 DNP 抗体による染色とほぼ同じ位置にバンドがあることが確認された。さらに、AD 脳由来の

リン酸化タウ蛋白 AD p-tau を用いて、DNP 溶液処理をおこなって検討したところ、約 60 kDa の AD p-tau も抗 DNP 抗体によって染色されることが確認された。よって、この約 30 kDa の抗 DNP 抗体反応性のバンドはタウ蛋白である可能性が示唆された。

### D. 考察

神経原線維変化はアルツハイマー病の病理学的特徴のひとつであり、それを構成するタウ蛋白はアルツハイマー病の発症メカニズムの探求において重要であると同時に、診断においてもその重要性が高いと考えられている。脳脊髄液中のタウ蛋白の定量によりアルツハイマー病を診断する試みは数多くの施設にておこなわれており、その知見も多い。結果としては、脳脊髄液中のタウ蛋白の増加はアルツハイマー病に確実に認められる変化であるが、アルツハイマー病以外の変性性神経疾患においても認められており、例えば皮質基底核変性症・前頭側頭葉型痴呆や正常圧水頭症においてはアルツハイマー病と同様にタウ蛋白が増加する。しかし、神経病理学的にタウ蛋白の蓄積のない脳血管性痴呆または神経原線維変化の発現範囲の狭い進行性核上性麻痺の場合は脳脊髄液中のタウ蛋白の増加は認められない。このように痴呆症状をきたす疾患の中で、広い意味で鑑別に用いることができる可能性が高い。それでは、脳脊髄液中のタウ蛋白の増加が認められる痴呆性疾患の中での鑑別はどのようにすればよいのであろうか？これが、今回の研究の基礎となるテーマであった。タウ蛋白はいくつかの蛋白修飾を受けるが、このような変化が鑑別点になるのではないかと考えた。タウ蛋白の修飾は、まず第一にはリン酸化が重要であり、次にはユビキチン化が重要と考えられている。リン酸化タウ蛋白のアッセイをおこなってアルツハイマー病の鑑別に用いる試みはすでに先行する研究があるが、我々の研究グループではまだその追試がおこなわれていない。ユビキチン化に関しては、可溶性分画にあるタウ蛋白 (例えば AD p-tau など) は、ユビキチンが結合しておらず、ユビキチン化タウ蛋白の検出は原理的に難しいと考えられる。アルツハイマー病の病的過程は酸化ストレスの関与が推定されているが、この酸化ストレスは蛋白の修飾に関与することも知られている。今回我々が検討したカルボニル化は、酸化ストレスによって生成された過酸化脂質が蛋白の中のヒスチジン、システイン、リジンなどに結合した場合や、非酵素的糖化のメカニズムによってアマドリ反応が起きた場合に認められ

る。このような酸化物は長い時間がかかってできたものと想定されるので、経過のきわめて長いアルツハイマー病と、他の疾患との鑑別に役立つのではないかと考えた。例として、我々の研究室で今まで検討してきた正常圧水頭症とアルツハイマー病との鑑別が可能かどうかについて検討をおこなった。結論としては、アルツハイマー病患者の脳脊髄液中には約 30 kDa のカルボニル化蛋白が正常圧水頭症患者に比べて多量に含まれていることが判明した。この約 30 kDa のカルボニル化蛋白が、通常認められているタウ蛋白フラグメントかどうかについては完全には結論付けはできないが、今回までの検討ではタウ蛋白であるとして矛盾する所見が得られていない。今後はその十分な同定をおこなう予定でいる。また、このようなカルボニル化蛋白の増加が、病気の重症度（ステージ）とどのように関係するのか、他の疾患ではどうなのかというところが問題となってくる。この点も、今後の検討課題としたいと考えている。

## E. 結論

高齢化社会にいたる現代は早期診断・早期治療のためにアルツハイマー病の生物学的診断マーカーの確立はきわめて重要である。今回の研究では、酸化ストレスに注目し、髄液中の酸化成分のひとつであるカルボニル化蛋白の検出を考えた。アルツハイマー病患者および正常圧水頭症患者から採取した脳脊髄液を用いて検討をおこなったところ、アルツハイマー病患者の脳脊髄液中には約 30 kDa のカルボニル化蛋白が正常圧水頭症患者に比べて多量に含まれていることが判明した。今後はその約 30 kDa のカルボニル化蛋白がタウ蛋白であるかどうかの十分な同定をおこなうと同時に、病気の重症度（ステージ）とどのように関係するのか、他の疾患ではどうなのかという点を、今後検討する必要がある。

## F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Fukusyo, E., Nakamura, Y., Kashiwagi, Y., Kudo, T., Tanaka, T., Matsumoto, N., Kida, T., Nakano, Y., Shinosaki, K. and Takeda, M. Effects of presenilin 1 missense mutation and aluminum on early neuronal development of

mouse brain. *Psychogeriatrics* 1,126-132, 2001.

Takeda, M., Tanaka, T., Arai, H., Sasaki, H., Shoji, M., Okamoto, K., Urakami, K., Nakashima, K., Matshubayashi, T., Sugita, M., Yoshida, H. Basic and clinical studies on the measurement of  $\beta$ -amyloid(1-42) in cerebrospinal fluid as a diagnostic marker for Alzheimer's disease and related disorders: Multi study in Japan. *Psychogeriatrics* 1,56-63,2001.

田中稔久、武田雅俊 シリーズ精神医学用語解説 タウオパチー、臨床精神医学 30,80-82,2001.

田中稔久、武田雅俊 文献抄録「アミロイド  $\beta$  ペプチドの免疫はアルツハイマー病モデルマウスの行動障害および老人斑を減少させる」「変異タウ蛋白(P301L)を発現するマウスにおける神経原線維変化、筋萎縮、進行性運動障害」老年精神医学雑誌 12, 305, 2001.

田中稔久、山森英長、和田健二、辻尾一郎、工藤喬、中村祐、柏木雄次郎、車谷隆宏、田上真次、森裕、小池裕子、神野由華、松本均彦、瀬川優子、福所英理子、武田雅俊 一次変性痴呆治療のためのタウ蛋白重合阻害についての研究 精神薬療研究年報 33,2-10,2001

田中稔久、武田雅俊 タウ蛋白の異常リン酸化機構 先端医療シリーズ 14 神経・筋疾患 杉田秀夫、福内靖男、柴崎浩監修 先端医療技術研究所 190-194,2001

### 2. 学会発表

田中稔久、和田健二、山森英長、武田雅俊 リチウムによるタウ蛋白のリン酸化誘導 第 21 回リチウム研究会 2001.04.21 東京経団連会館

Yamamori H., Tanaka T., and Takeda M. Changes of Phosphorylation Level of Tau Protein in Cultured Cells by Cytotoxic Reagents. 5th International Conference on Progress in Alzheimer's and Parkinson's Disease (ADPD 2001), 2001.03.31-04.05., Kyoto International Conference Hall (KICHD).

Tanaka T., Yamamori H., Wada K., Nakashima K. and Takeda M. Phosphorylation of Tau Protein in Cultured

Cells by Polyinosinic-Polycytidylic Acid. 5th International Conference on Progress in Alzheimer's and Parkinson's Disease (ADPD 2001), 2001.03.31-04.05., Kyoto International Conference Hall (KICH).

田中稔久、山森英長、和田健二、中島健二、武田雅俊 2本鎖 RNA によるタウ蛋白リン酸化への影響の検討 第 42 回日本神経学会総会 2001.5.11-13、東京国際展示場（東京ビッグサイト）

和田健二、田中稔久、中島健二、武田雅俊 Ribotoxic stress 応答におけるタウ蛋白リン酸化の検討 第 42 回日本神経学会総会 2001.5.11-13、東京国際展示場（東京ビッグサイト）

Takeda M., Tanaka T, Arai H, Sasaki H, Shoji M, Okamoto K, Urakami K, Nakashima K, Katsubayashi T, Sugita M, Yoshida H. Basic and clinical studies on the measurement of  $\beta$ -amyloid (1-42) in cerebrospinal fluid as a diagnostic marker for Alzheimer's disease and related disorders : Multi center study in Japan. (Abst.) Tenth Congress of the International Psychogeriatric Association Sept, 9-13, 2001. (Nice in France)

Tanaka T, Yamamori H, Takeda M Effects of lithium on phosphorylation levels of tau protein (Abst.) Tenth Congress of the International Psychogeriatric Association Sept, 9-13, 2001. (Nice in France)

田中稔久、和田健二、山森英長、武田雅俊 アルツハイマー病のリン酸化調節異常 第 44 回日本神経化学・第 24 回日本神経科学合同大会 (Neuro2001)、2001.9.26、京都国際会議場

田中稔久、山森英長、和田健二、中島健二、武田雅俊 タウ蛋白リン酸化と結合蛋白 第 20 回日本痴呆学会、2001.10.4 アスト津（三重県）

和田健二、田中稔久、涌谷陽介、浦上克哉、山形薫、中島健二、武田雅俊 酸化ストレスによるタウ蛋白リン酸化の検討 第 20 回日本痴呆学会、2001.10.4 アスト津（三重県）

山森英長、田中稔久、武田雅俊 カスパーゼ阻害とタウ蛋白リン酸化について 第 20 回日本痴呆学会、2001.10.4 アスト津（三重県）

田中稔久、山森英長、和田健二、田中修二、

鈴木英雄、工藤喬、紙野晃人、大河内正康、谷井久志、小池裕子、安田由華、貴田智之、松本均彦、福森亮雄、武田雅俊 タウ蛋白重合蓄積への結合因子の関与とその阻害剤開発についての研究 第 34 回精神神経系薬物治療研究報告会、2001.12.7、千里ライフサイエンスセンター

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

##### 1. 特許取得

なし。

##### 2. 実用新案登録

なし。

##### 3. その他

なし。

アルツハイマー型痴呆と遺伝子多型との関連

分担研究者 谷向 知 国立療養所中部病院 精神科 医師

研究要旨

アポリポ蛋白 E 遺伝子 (apoE) ε4 多型がアルツハイマー型痴呆 (DAT) と深く関連していることは知られている。今回、DAT を含む痴呆性疾患について改めて ε4 アリルとの関連を検討した。ε4 アリルは DAT、レビー小体を伴う痴呆で高頻度に認め、この 2 疾患における危険因子であることが判明した。

apoE プロモーター領域の多型によりプロモーター活性が異なるとの報告から、軽度認知障害レベルでもこの多型を調べることにより DAT への進行が予測可能かを検討する目的で 491A/T 多型について検討した。A アリルは DAT において有意差を持って高頻度に認められたが、ε4 の有無には影響されず発症年齢との関連も否定的であった。

また、DAT が症候群であるという仮説に基づき apoE 多型と DAT の側頭葉内側面の体積を比較した。DAT の海馬・扁桃体体積と ε4 アリル数には負の相関を認めた。

キーワード：アルツハイマー型痴呆、アポリポ蛋白 E 遺伝子多型、アポリポ蛋白 E 遺伝子プロモーター領域 491A/T 多型、海馬・扁桃体体積

研究協力者

保田 稔、数井裕光、橋本 衛、博野信次、森 悦郎  
(兵庫県立高齢者脳機能研究センター)

今村 徹 (新潟医療福祉大学)

A. 研究目的

軽度認知障害 (mild cognitive impairment ;MCI) の約半数は 3 年以内にアルツハイマー型痴呆 (DAT) を発症するといわれている。DAT の危険因子としてアポリポ蛋白 E 遺伝子 (apoE) ε4 アリルの関与が広く認められている。しかし、診断マーカーとしての感度や特異性は決して高いものではなく、DAT 以外の痴呆性疾患においても apoE の関与が報告されている。

本研究では、apoEε4 が DAT およびその他の痴呆性疾患の発症危険因子になりえるかを検

討する目的で apoE 多型の同定を行った。

さらに、apoE には発症に関連する生理機能を有する可能性があることから、apoE のプロモーター領域の活性が発症年齢に何らかの影響を及ぼす可能性が考えられるため、MCI の段階での DAT 発症の可能性を検出できるかを検討する目的で apoE プロモーター領域 491A/T 多型について検討を行った。

また、DAT の中には記憶障害だけが緩徐に進行していくタイプ、精神症状などで発症するタイプなど様々な臨床経過をたどるものがあるような印象を受ける。そこで、DAT を一つの症



候群であると仮定し、このような臨床経過の違いに apoE 多型が関与しているかを検討する目的で、apoE 多型別に側頭葉内側面の体積を計測し比較を行った。

apoE 多型は危険因子ではあるが鑑別診断に用いるべきマーカーとしては適さないが、DAT の臨床経過を予測する生物学的診断マーカーとして有用である可能性が示唆された。

## B. 研究方法

### 【対象】

兵庫県立高齢者脳機能研究センターに痴呆の精査目的で入院し、神経心理学検査 (MMSE, ADAS, WAIS-R など)、神経所見、形態画像 (MRI)、機能画像 (PET, SPECT) のすべてを行い、遺伝子解析に関して説明を行い、文書による同意が得られた患者で以下の診断基準を満たすもの。

### 【診断基準】

1. アルツハイマー型痴呆 (DAT) : NINCDS-ADRDA の probable AD
2. レビー小体を伴う痴呆 (DLB) : DLB international workshop による probable DLB
3. 前頭側頭型痴呆 (FTD) : Lund-Manchester group の criteria、
4. 正常圧水頭症 (NPH) : 3 症候のうち少なくとも 1 つを有し画像により NPH が疑われ髄液排除試験に反応
5. 進行性核上性麻痺 (PSP) : NINDS-SPSP の criteria
6. 皮質基底核変性症 (CBD) : Lang らの criteria

### 【遺伝子多型の同定】

研究の目的と方法を十分説明し、同意が得られた患者から採血を行い遺伝子を抽出した。apoE 多型、apoE 遺伝子プロモーター領域 -491A/T は PCR-RFLP 法を用いて同定した。

有意検定はカイ二乗検定を用いた。

### 【海馬・扁桃体体積の計測】

対象は年齢、性差、教育歴、MMSE を 1 対 1 で対応させた apoEε4/4、ε4/3、ε3/3 の probable AD 患者各 46 名。海馬、扁桃体を画像解析ソフト上でトレースして体積を計測した。その体積を頭蓋内容量で補正した左右の平均値を海馬、扁桃体体積として用いた。有意検定は Spearman correlation coefficient を用いた。

(倫理面への配慮)

遺伝子収集に関しては倫理委員会を設け承認を受けた。

## C. 研究結果

### 【アポリポ蛋白 E 遺伝子多型解析】

DAT 211 例、DLB 68 例、FTD 62 例、NPH 25 例、PSP 21 例、CBD 19 例における apoE ε4 アリルの出現率はそれぞれ、0.332、0.281、0.140、0.140、0.102、0.121 であった。それぞれの apoE 多型と健常対象者 211 例のデータ (ε4 アリルの出現率 : 0.111) との間で行った検定の結果、DAT および DLB で有意 ( $p < 0.001$ ) であった。

### 【apoE 遺伝子プロモーター領域 -491A/T 多型解析】

DAT 213 例、DLB 39 例の apoE 遺伝子プロモーター領域 -491A/T 多型 A アリルの出現率はそれぞれ 0.891、0.886 であった。それぞれの疾患と健常対象者 221 例 (A アリル出現率 : 0.801) との間で検定を行った結果、DAT では有意 ( $p < 0.001$ )、DLB では有意差は認めなかった ( $p = 0.057$ )。

発症年齢による A アリルに出現は 65 歳未満発症群 0.904、65 歳以降発症群 0.888 であったが差異は認めなかった。

さらに DAT の発症は ε4 アリルの有無と A アリルの存在に影響されなかった ( $p = 0.356$ )。

#### 【apoE 多型による海馬・扁桃体体積の相違】

年齢、性別、教育歴、MMSE を 1 対 1 で対応させた apoEε3/3 群、ε4/3 群、ε4/4 群の海馬体積はそれぞれ 2,526±400、2,401±412、2,249±390 (mm<sup>3</sup>) であった。また扁桃体体積は 1,437±279、1,372±299、1,309±267 (mm<sup>3</sup>) であった。Spearman correlation coefficient を用いた検定により、海馬体積は apoEε4 アリルに容量依存的に減少を認めた (r=-0.285、p=0.0007)。また、扁桃体体積においても同様な結果であった (r=-0.178、p=0.037)。

#### D. 考察

DAT 発症の危険因子として apoEε4 は広く認められている。しかし、先行研究の中には DAT ほどではないにしろ、健常対象者と比較するとその他の変性性痴呆症でも ε4 が有意に存在するという報告も散見されていた。本研究では DAT と DLB でのみ ε4 の存在が有意に増加していた。apoE の E4 は E3 に比べアミロイド β 蛋白との結合が強いことが報告されており、アミロイド沈着との関与が示唆されている。今回 ε4 の増加を認めた DLB 脳においても老人斑が多数認められるとの報告があり、整合性のある結果であると考えられる。

apoE のプロモーター領域には少なくとも 5 箇所が多型が存在することが知られている。その中で-491A/T に関しては A アリルが高頻度で出現しているという報告がみられたが、それを否定する報告も多く人種間差も少なくない。基礎研究ではプロモーター領域のいろいろな多型を組み込んだ HepG2 細胞の apoE 蛋白の転写活性をみた報告がある。-491T アリルを組み込んだ細胞では A アリルを組み込んだ細胞に比べ、プロモーター活性は 63% に減少していた。この結果から apoEε4 を持つ DAT 患者では発症年齢が低下している可能性が示唆された。しかし、本研究では A アリルの出現は DAT で有

意に増加は認められたものの ε4 アリルの有無では発症年齢には関連しない結果であった。プロモーター領域の-219G/T 多型において G アリルを組み込んだ細胞でプロモーター活性が増加するという報告がある。-219G/T 多型あるいは-491 と-219 多型の組み合わせにより DAT の発症や発症年齢に影響している可能性があり、これらについてさらに検討を行う必要があると考える。

DAT は MCI を経て発症していくとの考えがあるが、アルツハイマーの第一報告例は嫉妬妄想から始まる。また、記憶障害は目立たず視空間認知障害から発症する DAT も存在することなどから、日常生活に支障をきたさず記憶検査上異常を認めるという MCI を経ずに DAT を発症するケースも存在するものと考えられる。また、日常診療においてはほかの認知機能障害はあまり目立たずに記憶障害のみが緩徐に進行する DAT を経験する。本研究では年齢、性差、教育歴、MMSE を合致させた DAT の側頭葉内側面の体積は ε4 アリル数に対して負の相関を認めるという結果を得た。側頭葉内側面は近時記憶に関与する部位であることから考えると記憶障害が緩徐に進行する経過をたどる DAT は apoEε4 を多く持つ可能性が示唆された。これまでに DAT の病期判定や臨床経過を推し量る適切なマーカーは存在しない。本研究の結果、apoE 多型は DAT 脳における萎縮の仕方に関与している可能性を示すものであり、DAT の臨床経過を予測する生物学的マーカーになる可能性があると考えられた。

#### E. 結論

- ① apoEε4 アリルは DAT および DLB の危険因子である。
- ② apoE プロモーター領域-491A アリルは DAT においてのみ有意に高頻度に認められた。

- ③ A アリルは  $\epsilon 4$  の存在による発症促進効果（発病の若年化）は認めなかった。
- ④ DAT の海馬・扁桃体体積は apoE $\epsilon 4$  アリルの数に対して負の相関を認めた。
- ⑤ apoE 多型により脳萎縮の様式が異なることから、apoE は DAT の臨床経過を予測する上での生物学的診断マーカーとして有用である可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

特になし

2. 学会発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

研究成果の刊行に関する一覧表

| 発表者氏名  | 論文タイトル名  | 発表誌名   | 巻名    | ページ     | 出版年  |
|--|--|--|-------|---------|------|
| Takeda, M.,<br>Tanaka, T.,<br>Arai, H.,<br>Sasaki, H.,<br>Shoji, M.,<br>Okamoto, K.,<br>Urakami, K.,<br>Nakashima, K.,<br>Matshubayashi,<br>T., Sugita, M.,<br>Yoshida, H.                                 | Basic and clinical studies on the measurement of $\beta$ -amyloid(1-42) in cerebrospinal fluid as a diagnostic marker for Alzheimer's disease and related disorders: Multi study in Japan. | Psychogeriatrics                                     | 1     | 56-63   | 2001 |
| 田中稔久、山森英長、和田健二、辻尾一郎、工藤喬、中村祐、柏木雄次郎、車谷隆宏、田上真次、森裕、小池裕子、神野由華、松本均彦、瀬川優子、福所英理子、武田雅俊  | 一次変性痴呆治療のためのタウ蛋白重合阻害についての研究  | 精神薬療研究年報   | 33    | 2-10    | 2001 |
| Nunomura A,<br>Perry G, Aliev G,<br>Hirai K, Takeda A, Balraj EK,<br>Jones PK,<br>Ghanbari H,<br>Wataya T,<br>Shimohama S,<br>Chiba S, Atwood CS, Petersen RB, Smith MA.                                   | Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease.   | Journal of Neuropathology and Experimental Neurology | 60(8) | 759-767 | 2001 |
| H Hattori, M<br>Matsumoto, K<br>Iwai, H<br>Tsuchiya, E<br>Miyouchi, M<br>Takasaki, K<br>Kamino, J<br>Munehira, Y<br>Kimura, K<br>Kawanishi, T<br>Hoshino, H<br>Murai, H Ogata,<br>H Maruyama, H<br>Yoshida | The tau protein of oral mucosa increases in Alzheimer's disease.   | J Gerontology, Medical Science                       | 57    | 64-70   | 2002 |