

低下が目立った。一方、70%蟻酸可溶性アミロイド画分の解析では、AD 脳にのみ A β モノマーばかりでなくオリゴマーの高度蓄積が認められ、A β 42 の蓄積がその主体であった。この結果はインビボにおいて、脳内リポ蛋白非結合型 A β 42 はきわめてアミロイド形成能にとみ、リポ蛋白フリー分子となった途端、アミロイド形成に至りうる可能性を強く示唆するものである。さらに TBS 可溶性画分のリポ蛋白非結合型 A β では AD 脳でのみダイマー形成を認める点から、脳内リポ蛋白非結合型 A β は血液中に存在する同分子種とは質的相違を持った脳内アミロイドーシス惹起分子であると考えられる。

D. 考察

以上の結果から、脳内においても可溶性リポ蛋白非結合型 A β が A β アミロイドーシス惹起分子種であることが明らかとなった。特に脳内リポ蛋白非結合型 A β 42 はきわめてアミロイド形成能にとみ、インビボにおいては、リポ蛋白フリー分子となった途端、アミロイド形成に至ると考えられた。一方、血液中の同分子種ではアミロイド形成が認められぬことから、脳内リポ蛋白非結合型 A β にはアミロイド線維形成に富む分子種とアミロイド形成能に乏しい分子種の 2 種類が存在すると推測され、血液中リポ蛋白非結合型 A β は後者の脳内 A β 分子種に相当すると考えられた。血液中におけるこの病的分子種のみを選択的な定量結果から、アルツハイマー病 (AD) では A β アミロイド沈着を予防する防御的代謝系の活性化機能不全が認められ、病初期よりその増加が認められることを既に報告した。ダウン症候群での検討から、この変化は、痴呆発症前段階から存在する超早期病態であること、ダウン症候群脳における on-going AD pathology を反映することも明らかとし、リポ蛋白非結合型 A β は、脳内アミロイドーシス惹起分子であると同時に AD 予防治療の確実なターゲットであり、AD 発

症予測、治療効果判定に重要であると考えられた。

E. 結論

リポ蛋白非結合型 A β は、脳内アミロイドーシス惹起分子であると同時に AD 予防治療の確実なターゲットであり、AD 発症予測、治療効果判定に重要であると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shoji M, Matsubara E, Murakami T, Manabe Y, Abe K, Kanai M, Ikeda M, Tomidokoro Y, Shizuka M, Watanabe W, Amari M, Ishiguro K, Takeshi Kawarabayashi T, Harigaya Y, Okamoto K, Nishimura T, Nakamura Y, Takeda M, Urakami K, Adachi Y, Nakashima K, Arai H, Sasaki H, Kanemaru K, Yamanouchi H, Yoshida Y, Ich K, Yoshida H, Toji, H Nakamura S, Hirai H. Cerebrospinal fluid tau in dementia disorders: A large scale multicenter study by a Japanese study group. *Neurobiol Aging* (in press)
- 2) Shoji M and Kanai M. Cerebrospinal fluid A β 40 and A β 42: natural course and clinical usefulness. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2001 3: 313-321
- 3) 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*. 2001 Mar-Apr;22(2):209-15.
- 4) Wahrle S, Kawarabayashi T, McLendon C, Das P, Nyborg AC, Shoji M, Younkin LH, Younkin SG, Golde TE. Cholesterol Dependent γ -Secretase Activity in a Lipid

- Raft Microdomain. *Neurobiol disease* (in Press)
- 5) Murakami T, Iwatsuki K, Hayashi T, Sato K, Matsubara E, Nagano I, Manabe Y, Shoji M, Koji Abe. Two Japanese CADASIL Families With a R141C Mutation in the Notch3 Gene. *Internal Medicine* Nov;40(11):349-52
 - 6) Manabe Y, Murakami T, Iwatsuki K, Narai H, Warita H, Hayashi T, Shoji M, Imai Y, Abe K. Nocturnal blood pressure dip in CADASIL. *J Neurol Sci.* 2001 Dec 15;193(1):13-6.
 - 7) Takeda M, Tanaka T, Arai H, Sasaki H, Shoji M, Okamoto K, Urakami K, Nakashima K, Matsubayashi T, Sugita M, Yoshida H. Basic and clinical studies on the measurement of β -amyloid(1-42) in cerebrospinal fluid as a diagnostic marker for Alzheimer's disease and related disorders: multi center study in Japan. *Psychogeriatrics* 2001; 1: 56-63
 - 8) Dobrogowska DH, Vorbrodth AW, Wegiel J, Wang KC, Shoji M, Mondadori C, Polatis G, Giovanni A, Wisniewski HM. Cytochemical study of the involvement of cell organelles in formation and accumulation of fibrillar amyloid in the pancreas of NORbeta transgenic mice. *Histol Histopathol.* 2001 Oct;16(4):1047-56.
 - 9) Manabe Y, Warita H, Murakami T, Shiote M, Hayashi T, Nagano I, Shoji M, Abe K. Early decrease of redox factor-1 in spinal motor neurons of presymptomatic transgenic mice with a mutant SOD1 gene. *Brain Res.* 2001 Oct 5;915(1):104-7.
 - 10) Manabe Y, Wang JM, Murakami T, Warita H, Hayashi T, Shoji M, Abe K. Expressions of nitrotyrosine and TUNEL immunoreactivities in cultured rat spinal cord neurons after exposure to glutamate, nitric oxide, or peroxyxynitrite. *J Neurosci Res.* 2001 Sep 1;65(5):371-7.
 - 11) Paganelli AR, Ocana OH, Prat MI, Franco PG, Lopez SL, Morelli L, Adamo AM, Riccomagno MM, Matsubara E, Shoji M, Affranchino JL, Castano EM, Carrasco AE. The Alzheimer-related gene presenilin-1 facilitates sonic hedgehog expression in *Xenopus* primary neurogenesis. *Mech Develop.* 2001 Sep; 107(1-2):119-31.
 - 12) Tomidokoro Y, Harigaya Y, Matsubara E, Ikeda M, Kawarabayashi T, Shirao T, Ishiguro K, Okamoto K, Younkin SG, Shoji M. Brain Abeta amyloidosis in APPsw mice induces accumulation of presenilin-1 and tau. *J Pathol.* 2001 Aug;194(4):500-6.
 - 13) Murakami T, Nagano I, Hayashi T, Manabe Y, Shoji M, Setoguchi Y, Abe K. Impaired retrograde axonal transport of adenovirus-mediated *E. coli* LacZ gene in the mice carrying mutant SOD1 gene. *Neurosci Lett.* 2001 Aug 10;308(3):149-52.
 - 14) Urakami K, Wada K, Arai H, Sasaki H, Kanai M, Shoji M, Ishizu H, Kashihara K, Yamamoto M, Tsuchiya-Ikemoto K, Morimatsu M, Takashima H, Nakagawa M, Kurokawa K, Maruyama H, Kaseda Y, Nakamura S, Hasegawa K, Oono H, Hikasa C, Ikeda K, Yamagata K, Wakutani Y, Takeshima T, Nakashima K. Diagnostic significance of tau protein in cerebrospinal fluid from patients with corticobasal degeneration or progressive supranuclear palsy. *J Neurol Sci.* 2001 Jan 15;183(1):95-8.
 - 15) Tomidokoro Y, Ishiguro K, Harigaya Y, Matsubara E, Ikeda M, Park JM, Yasutake K, Kawarabayashi T, Okamoto K, Shoji M. Abeta amyloidosis induces the initial stage of tau accumulation in APP(Sw) mice. *Neurosci Lett.* 2001 Feb 23;299(3):169-72.

- 16) Kawarabayashi T, Younkin LH, Saido TC, Shoji M, Ashe KH, Younkin SG. Age-dependent changes in brain, CSF, and plasma amyloid (beta) protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2001 Jan 15;21(2):372-81.
- 17) Takenoshita H, Shizuka-Ikeda M, Mitoma H, Song S, Harigaya Y, Igeta Y, Yaguchi M, Ishida K, Shoji M, Tanaka M, Mizusawa H, Okamoto K. Presynaptic inhibition of cerebellar GABAergic transmission by glutamate decarboxylase autoantibodies in progressive cerebellar ataxia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2001 Mar;70(3):386-9.
- 4) Ikeda M, Kawarai T, Harigaya Y, Kawarabayashi T, Matsubara E, Okamoto K, Sasaki A, Davies P, Chishti A, Westaway D, St. George-Hyslop P, Shoji M. Memory loss and parkinsonism with severe Tauopathy in the fronto-temporal lobe of transgenic mice expressing R406W mutant human Tau. 31th Annual meeting of American society for neuroscience, San Diego, 2001.
- 5) Kawarabayashi T, Shoji M, Wahrle S, Younkin LH, Younkin SG. Amyloid β protein accumulates in lipid rafts. 31th Annual meeting of American society for neuroscience, San Diego, 2001.
- 6) Harigaya Y, Tomidokoro Y, Ikeda M, Kawarabayashi T, Kanai M, Okamoto K, Matsubara E, Shoji M. Brain A β Amyloidosis in APPsw mice induces memory impairment with decrease of Acetylcholine, focal loss of neurons with accumulation of phosphorylated Tau. 31th Annual meeting of American society for neuroscience, San Diego, 2001.

2.学会発表

1.一般演題

- 1) Shoji M, Matsubara E, Kawarabayashi T, Ikeda M, Harigaya Y, Okamoto K, Abe K. The effect of A β 42 vaccine on Tg2576 Alzheimer model mice. 31th Annual meeting of American society for neuroscience, San Diego, 2001.
- 2) Matsubara E, Sasaki A, Kawarabayashi T, Ikeda M, Harigaya Y, Kanai M, Abe K, Frangione B, Ghiso J, Shoji M. Platelets A β as a potential source of amyloid deposits in the wall. 31th Annual meeting of American society for neuroscience, San Diego, 2001.
- 3) Kanai M, Ikeda M, Kawarabayashi T, Harigaya Y, Okamoto K, Shoji M. A study of cerebrospinal fluid as biomarkers of Alzheimer's disease. 31th Annual meeting of American society for neuroscience, San Diego, 2001.

2.シンポジウム, 教育講演

- 1) Shoji M. The study of Alzheimer's disease using transgenic mouse models. 2001 Collegium Internationale Neuro-Phychopharmacologium regional meeting, Hiroshima, 2001

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

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 岡山大学大学院医歯学総合研究科神経病態内科学
 共同研究者 松原悦朗*, 針谷康夫**, 瓦林毅**, 池田将樹**, 平井俊策***,
 阿部康二*

*岡山大学大学院医歯学総合研究科神経病態内科学,

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, 脳アミロイドーシスの治療法を検討した. 脳アミロイドーシスを再現する APPsw マウスを用いて, 1) Aβ42ワクチン療法の効果, 2) ワクチン療法における最も危険な副作用と考えられる構造変化を来した Aβの混入によるアミロイド沈着促進効果, 3) メラトニンによる Aβ凝集抑制による脳アミロイド抑制作用を検討した. Aβ42ワクチン療法では脳アミロイドとして沈着している不溶性 Aβ42 の 43%を抑制していた. 投与されたマウスに死亡例がみられ副作用の詳細な検討が必要と思われた. ヒト脳アミロイドから抽出した Aβ oligomer は一旦脳内に注入されると代謝に抵抗性で3ヶ月以上存在し, Aβアミロイドの形成を促進していた. メラトニンは8ヶ月齢から11ヶ月齢まで脳アミロイド沈着を抑制した. メラトニンは現実に使用されている薬剤であり, 現実の臨床応用に向けたさらなる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や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や神経原線維変化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. 結果は脳アミロイドーシスがより本質的な治療の対象である

ことが明らかとなったため, 本年度は脳アミロイドーシスを再現する APPsw マウスを用いて, 1) Aβ42ワクチン療法の効果のさらなる検討, 2) ワクチン療法における最も危険な副作用と考えられる構造変化を来した Aβの混入によるアミロイド沈着促進効果の検討, 3) Aβ凝集抑制作用を有するメラトニンが現実に動物モデルレベルでも脳アミロイドを抑制可能であるかを検討した.

B. 研究方法

1. 22匹の APPsw マウスに6ヶ月齢(16匹), 9ヶ月齢(6匹) から 50μg の Aβ42 をアジュバントとともに皮下注射し, Aβ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20匹の無処理

age-matched APPsw mice を用いた。半脳は 4%パラフォ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 A β 40, A β 42 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。

2. 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%蟻酸で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 11 匹を検索した。12 ヶ月齢の APPsw マウス 5 匹と 2 匹の Non-transgenic マウス脳に同様の分画を打ち込んで、対照としてそれぞれ 2 匹の APPsw マウスと Non-transgenic マウスと比較した。
3. メラトニンのモデル動物レベルでの脳アミロイドの蓄積抑制作用を検討するため、24 匹の APPsw マウス (melatonin group) に 4 ヶ月齢から 0.5mg/ml の melatonin を投与した。対照として 20 匹の無処理 APPsw マウスを用いて、それぞれ 8, 9.5, 11, 15.5 ヶ月齢で脳の A β 40 と A β 42 の蓄積量を ELISA で測定して比較した。

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 6 ヶ月開始群と 9 ヶ月開始群で検討した。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) に分けて免疫群 (Im) と対照群 (C) で出現数は 3.6 \pm 1.7 (LPIm), 8.8 \pm 5.4 (LPC), 7.7 \pm 9.5 (SPIm), 47.9 \pm 31.7 (SPC), 6.6 \pm 4.9 (AAIm), 7.9 \pm 6.4 (AAC) であり、免疫群で有意に大型 (P=0.0058) と小型の老人斑の抑制 (P=0.0008) が認められた。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 592 \pm 184 pixel で対照群では 1028 \pm 162 pixel で有意が認められた (p=0.0467)。

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 289 \pm 355 fmol/ml (Im), A β 42 は 122.3 \pm 66.6 fmol/ml (Im) であった。対照群 A β 40 は 1357 \pm 1447 fmol/ml (Cont), A β 42 は 120.5 \pm 147.1 fmol/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 690.9 \pm 618.6 pmol/ml (Im), A β 42 は 140 \pm 78.7 pmol/ml (Im) であった。対照群 A β 40 は 1076 \pm 990.1 pmol/ml (Im), A β 42 は 246.3 \pm 165.5 pmol/ml (Im) であった。この蟻酸分画の免疫群で A β 42 は 43%減少しており、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 免疫療法は脳アミロイドとして沈着した A β 42 を改善すると考えられた。

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か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。12ヶ月齢の5匹の APPsw マウスと2匹の non-Tg マウスに A β oligomer を打ち込んだ群では、対照の2匹の APPsw マウスと2匹の non-Tg マウスに比較して、急性期死亡例では、マクロファージ A β 、A β 沈着同様に観察された。15か月齢 Tg では注入部にマクロファージ A β と A β 沈着が残存しており、5例のうち3例で老人斑 A β の出現が亢進していた。15か月齢 non-Tg では注入部マクロファージ A β 、A β 沈着がみられ、1例で老人斑様構造物が観察された。15か月齢 Tg と non-Tg ではマウス 3pyro A β が蓄積していた。以上のことは AD 患者 A β oligomer は一度脳内に入ると分解されずに長期間脳内に存在して、マウス A β を巻き込んで成長することを示している。したがって、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が示唆される。A β ワクチンの臨床応用には、以上のことより A β oligomer の危険性についてのさらに厳密な検討が必要であると考えられた。

つぎに、メラトニンのアミロイド抑制効果を APPsw mice で検討した結果では、対照 APPsw マウスに比べて8ヶ月から15.5ヶ月まで有意に脳アミロイド蓄積を抑制した。SDS 抽出 soluble A β 40 (P=0.0068), soluble A β 42 (P=0.0366) 分画とギ酸抽出 A β 40 (P=0.0026), soluble A β 42 (P=0.0108)分画共に有意に抑制されていた。これを、便宜的にヒト脳 A β アミロイド蓄積抑制期間に換算するとほぼ15年から30年に匹敵するため、メラトニンは今後、臨床応用に向けた検討が必要と考えられた。

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。しかし、現実にはヒトに臨床応用するためには、我々の検討では途中死亡例があること、抑制効果は訳43%とそれほど大きいものではないことから、これらの動物モデルを用いて、さらに大規模な副作用や投与方法の改善などが迅速に検討されるべきと考えられる。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。さらに、ヒト A β アミロイド注入実験では予想されたごとく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、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。また、A β が構造変化を起こして正常 A β を巻き込んでアミロイドとして成長するプリオンと同様な構造変化病としての基本的性格を有しているとする、さらに問題は重要であり、今後、副作用の検討と厳密なヒト伝播に対する検討が必要とされる。メラトニンはこれに比べて、現在、不眠症などに臨床応用されており、A β の凝集阻止がその主要な作用であることから、A β ワクチンに比べて、脳アミロイドを促進する可能性はない。一刻も早い臨床応用が期待される。

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。ヒト脳 A β アミロイドに A β アミロイド形成促進作用がある。メラトニンが、脳アミロイド蓄積を動物レベルで抑制した。

F. 健康危険情報

一度脳内に入った脳アミロイド Aβは長期間代謝されずに存在し、アミロイド形成を促進する可能性がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shoji M, Matsubara E, Murakami T, Manabe Y, Abe K, Kanai M, Ikeda M, Tomidokoro Y, Shizuka M, Watanabe W, Amari M, Ishiguro K, Takeshi Kawarabayashi T, Harigaya Y, Okamoto K, Nishimura T, Nakamura Y, Takeda M, Urakami K, Adachi Y, Nakashima K, Arai H, Sasaki H, Kanemaru K, Yamanouchi H, Yoshida Y, Ich K, Yoshida H, Toji, H Nakamura S, Hirai H. Cerebrospinal fluid tau in dementia disorders: A large scale multicenter study by a Japanese study group. *Neurobiol Aging* (in press)
- 2) Shoji M and Kanai M. Cerebrospinal fluid Aβ40 and Aβ42: natural course and clinical usefulness. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2001 3: 313-321
- 3) 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 Aβ40 and Aβ42(43) are regulated age-dependently. *Neurobiol Aging*. 2001 Mar-Apr; 22(2): 209-15.
- 4) Wahrle S, Kawarabayashi T, McLendon C, Das P, Nyborg AC, Shoji M, Younkin LH, Younkin SG, Golde TE. Cholesterol Dependent γ -Secretase Activity in a Lipid Raft Microdomain. *Neurobiol disease* (in Press)
- 5) Murakami T, Iwatsuki K, Hayashi T, Sato K, Matsubara E, Nagano I, Manabe Y, Shoji M, Koji Abe. Two Japanese CADASIL Families With a R141C Mutation in the Notch3 Gene *Internal Medicine* (in press)
- 6) Manabe Y, Murakami T, Iwatsuki K, Narai H, Warita H, Hayashi T, Shoji M, Imai Y, Abe K. Nocturnal blood pressure dip in CADASIL. *J Neurol Sci*. 2001 Dec 15;193(1):13-6.
- 7) Takeda M, Tanaka T, Arai H, Sasaki H, Shoji M, Okamoto K, Urakami K, Nakashima K, Matsubayashi T, Sugita M, Yoshida H. Basic and clinical studies on the measurement of β -amyloid(1-42) in cerebrospinal fluid as a diagnostic marker for Alzheimer's disease and related disorders: multi center study in Japan. *Psychogeriatrics* 2001; 1: 56-63
- 8) Dobrogowska DH, Vorbrodth AW, Wegiel J, Wang KC, Shoji M, Mondadori C, Polatis G, Giovanni A, Wisniewski HM. Cytochemical study of the involvement of cell organelles in formation and accumulation of fibrillar amyloid in the pancreas of NORbeta transgenic mice. *Histol Histopathol*. 2001 Oct; 16(4): 1047-56.
- 9) Manabe Y, Warita H, Murakami T, Shiote M, Hayashi T, Nagano I, Shoji M, Abe K. Early decrease of redox factor-1 in spinal motor neurons of presymptomatic transgenic mice with a mutant SOD1 gene. *Brain Res*. 2001 Oct 5; 915(1): 104-7.
- 10) Manabe Y, Wang JM, Murakami T, Warita H, Hayashi T, Shoji M, Abe K. Expressions of nitrotyrosine and TUNEL immunoreactivities in cultured rat spinal cord neurons after exposure to glutamate, nitric oxide, or peroxynitrite. *J Neurosci Res*. 2001 Sep 1;65(5):371-7.
- 11) Paganelli AR, Ocana OH, Prat MI, Franco PG, Lopez SL, Morelli L, Adamo AM, Riccomagno MM, Matsubara E, Shoji M, Affranchino JL, Castano EM, Carrasco AE. The Alzheimer-related gene presenilin-1 facilitates sonic hedgehog expression in *Xenopus* primary neurogenesis. *Mech Develop*. 2001 Sep; 107(1-2):119-31.
- 12) Tomidokoro Y, Harigaya Y, Matsubara E,

- Ikeda M, Kawarabayashi T, Shirao T, Ishiguro K, Okamoto K, Younkin SG, Shoji M. Brain Abeta amyloidosis in APPsw mice induces accumulation of presenilin-1 and tau. *J Pathol.* 2001 Aug; 194(4): 500-6.
- 13) Murakami T, Nagano I, Hayashi T, Manabe Y, Shoji M, Setoguchi Y, Abe K. Impaired retrograde axonal transport of adenovirus-mediated E. coli LacZ gene in the mice carrying mutant SOD1 gene. *Neurosci Lett.* 2001 Aug 10; 308(3):149-52.
- 14) Urakami K, Wada K, Arai H, Sasaki H, Kanai M, Shoji M, Ishizu H, Kashihara K, Yamamoto M, Tsuchiya-Ikemoto K, Morimatsu M, Takashima H, Nakagawa M, Kurokawa K, Maruyama H, Kaseda Y, Nakamura S, Hasegawa K, Oono H, Hikasa C, Ikeda K, Yamagata K, Wakutani Y, Takeshima T, Nakashima K. Diagnostic significance of tau protein in cerebrospinal fluid from patients with corticobasal degeneration or progressive supranuclear palsy. *J Neurol Sci.* 2001 Jan 15;183(1):95-8.
- 15) Tomidokoro Y, Ishiguro K, Harigaya Y, Matsubara E, Ikeda M, Park JM, Yasutake K, Kawarabayashi T, Okamoto K, Shoji M. Abeta amyloidosis induces the initial stage of tau accumulation in APP(Sw) mice. *Neurosci Lett.* 2001 Feb 23;299(3):169-72.
- 16) Kawarabayashi T, Younkin LH, Saido TC, Shoji M, Ashe KH, Younkin SG. Age-dependent changes in brain, CSF, and plasma amyloid (beta) protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 2001 Jan 15;21(2):372-81.
- 17) Takenoshita H, Shizuka-Ikeda M, Mitoma H, Song S, Harigaya Y, Igeta Y, Yaguchi M, Ishida K, Shoji M, Tanaka M, Mizusawa H, Okamoto K. Presynaptic inhibition of cerebellar GABAergic transmission by glutamate decarboxylase autoantibodies in progressive cerebellar ataxia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2001 Mar;70(3):386-9.
2. 学会発表
- 1) Shoji M, Matsubara E, Kawarabayashi T, Ikeda M, Harigaya Y, Okamoto K, Abe K. The effect of Aβ42 vaccine on Tg2576 Alzheimer model mice. 31th Annual meeting of American society for neuroscience, San Diego, 2001.
- 2) Matsubara E, Sasaki A, Kawarabayashi T, Ikeda M, Harigaya Y, Kanai M, Abe K, Frangione B, Ghiso J, Shoji M. Platelets Aβ as a potential source of amyloid deposits in the wall. 31th Annual meeting of American society for neuroscience, San Diego, 2001.
- 3) Kanai M, Ikeda M, Kawarabayashi T, Harigaya Y, Okamoto K, Shoji M. A study of cerebrospinal fluid as biomarkers of Alzheimer's disease. 31th Annual meeting of American society for neuroscience, San Diego, 2001.
- 4) Ikeda M, Kawarai T, Harigaya Y, Kawarabayashi T, Matsubara E, Okamoto K, Sasaki A, Davies P, Chishti A, Westaway D, St. George-Hyslop P, Shoji M. Memory loss and parkinsonism with severe Tauopathy in the fronto-temporal lobe of transgenic mice expressing R406W mutant human Tau. 31th Annual meeting of American society for neuroscience, San Diego, 2001.
- 5) Kawarabayashi T, Shoji M, Wahrle S, Younkin LH, Younkin SG. Amyloid β protein accumulates in lipid rafts. 31th Annual meeting of American society for neuroscience, San Diego, 2001.
- 6) Harigaya Y, Tomidokoro Y, Ikeda M, Kawarabayashi T, Kanai M, Okamoto K, Matsubara E, Shoji M. Brain Aβ Amyloidosis in APPsw mice induces

memory impairment with decrease of Acetylcholine, focal loss of neurons with accumulation of phosphorylated Tau. 31th Annual meeting of American society for neuroscience, San Diego, 2001. (一般演題)

- European Patent No: 94117512.7 (94.11.07)
- 2) Transgenic mouse β -amyloid transgene; US patent No: 6,037,521 (March 14, 2000)
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
- 1) Transgenic animal for Alzheimer's disease;

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

アルツハイマー病脳におけるミクログリア活性化経路と 活性化阻害物質の検索

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 石井一弘*、宮 冬樹*、清水孝彦**、岡戸信男***、
庄司進一*、白澤卓二**

*筑波大学 臨床医学系 神経内科、

**東京都老人総合研究所 分子遺伝学

***筑波大学 基礎医学系 解剖学

研究要旨 アルツハイマー病の原因蛋白質である A β 蛋白質によるミクログリア(MG)活性化機序を明らかにし、その阻害物質を発見することを目的とした。マウスミクログリア初代培養系を用い、線維型、非線維型の A β 1-40、A β 1-42 を投与し、細胞培養上清中の nitrite 濃度を測定して MG の活性化指標とした。A β 蛋白質には活性型と非活性型があり、従来いわれている直線状の線維形態をとる必要はなく、むしろ小凝集塊状の A β 蛋白質が MG を活性化させることが明らかとなった。さらに直線状の A β 線維を破壊し、小凝集塊にしても活性化能はなかった。以上のことから、活性型 A β 蛋白質の作用には線維形成過程で重要であることが示唆された。

A. 研究目的

アルツハイマー病(AD)脳の特徴的な病理所見は、神経細胞死、神経原線維変化、老人斑であるが、なかでも老人斑は A β 蛋白質を主要構成成分とし、周囲に活性化したミクログリア (MG) を認める。また MG はサイトカイン分泌の中心であり、ラジカルの主たる発生源なので、AD 脳において MG の活性化を抑制することは、神経細胞死を抑制する上で重要と考えられる。A β 蛋白質による MG 活性化の研究が多数行われているが、A β 蛋白質が MG を活性化させるか否かについて、未だに一定の見解が得られていない。さらに MG 細胞内での A β による活性化経路についての知見は皆無である。今回、われわれは A β 蛋白質

の線維形態と MG の活性化の関係を明らかにし、MG 活性化経路の解明を目的とした。

B. 研究方法

1. ミクログリア初代培養系の確立

ミクログリアは生後 1-3 日齢マウス (Bulb/c) の大脳細胞を 14-21 日間培養したものを使用した。この培地から振盪法にて分離してきた MG を 3.5×10^5 個/cm² で播種し、さらに 24 時間培養した 2 次培養細胞を種々の実験に用いた。

2. A β ペプチドの調製

A β ペプチドは次のものを使用した。① A β 1-40 (Bachem 社, Lot510206), ② A β 1-42 (Bachem 社, Lot545639), ③ A β 1-42 (ペプチド

研, Lot510523), ④A β 1-40 (合成ペプチド, 武田薬品), ⑤A β 1-42 (合成ペプチド, 武田薬品), ⑥A β 1-42 (合成ペプチド, by T.S.)である。この6種類のうち、②, ③, ⑥は7日間 37°C、5%CO₂濃度で incubation(=線維化)させ、①, ③, ④, ⑤は incubation させずに溶解後、直ちに MG 活性化実験に使用した。

3. ミクログリアの活性化実験

A β ペプチドと IFN- γ を MG 培養上清に投与し、24, 48時間後の上清中 nitrite 濃度にて MG 活性化の指標とした。また、MG を活性化させる positive control に Lipopolysaccharide (LPS : 1 μ g/mL)を用いた。

3. A β 蛋白線維構造解析

電子顕微鏡用の銅グリッド(#400)にコロジオン膜を張り、カーボンコーティング、エッチング処理を行い、実験に使用した。2% シリコタングステン酸による negative stain 法にて、MG 活性化実験に用いた A β 蛋白の超微細線維構造を電子顕微鏡、倍率 6.6 万倍および 10 万倍で調べた。

4. Nitrite 測定

MG 培養上清中の nitrite 濃度を Griess 変法にて測定した。すなわち、A 液 1% sulfanilamide / 30% acetic acid B 液 0.1% N-1-Naphthyl-ethylen diamin – dihydrochloride / 60%acetic acid の等量混合液 50 μ L を細胞上清 50 μ L に加え、1分間反応させた後 550nm の吸光度を測定した。NaNO₂ を positive control として、細胞上清の nitrite 濃度を定量した。

5. 線維構造の破壊 (凍結・融解法)

電子顕微鏡にて線維構造を示していた⑥の A β 蛋白を液体窒素と 37°C water bath へ交互に浸し、凍結・融解を 30, 60, 90 回行った。線維構造破壊の確認で、凍結・融解後の A β 蛋白を電子顕微鏡にて確認した。

C. 研究結果

A β ペプチドの中には MG を活性化させるもの (活性型 A β) と活性化させないもの

(非活性型 A β) があり、必ずしも A β ペプチドの incubation を必要としなかった。非活性型 A β は直径約 10nm の線維よりなる数本の長い straight fiber または比較的短い straight fiber が集束した線維凝集塊であった。一方、活性型 A β は直径 10nm 以下の短い糸くず状の線維が塊状構造 (<20~30nm) が認められた。この A β 凝集塊は LPS による凝集塊に類似していた。次に電子顕微鏡で A β 線維が確認された⑥の長い straight fiber を凍結・融解法にて破壊して小凝集塊作成を試みた。この凝集塊は 20~40nm であり、活性型 A β と大きさは近似していたが、MG を活性化させることができなかった。また、凍結・融解 30, 60, 90 回により作成された A β 凝集塊の MG 活性化能に違いはなかった。MG 活性化線維形成後に人工的破壊で作成した凝集塊は集束した数本の線維が切断され凝集しているが、線維形成過程で生じた凝集塊は 1~2 本程度の比較的短く細い線維が高次構造をとり、凝集塊を作っていることが解った。

D. 考察

活性型 A β は、線維形成段階での条件が重要であると考えられ、至適条件にて形成された短い糸くず状の A β 小凝集塊が MG を活性化させると推察される。この活性型 A β 形成を阻害する物質は MG 活性化を抑制でき、更には AD の治療薬開発につながると思われる。

E. 結論

A β ペプチドには MG を活性化させる活性型 A β と非活性型 A β があり、straight fiber を形成してする A β は活性型でなかった。活性型 A β は線維形成過程で生じた protofibril 様の小凝集塊であった。

謝辞: A β 1-40 ならびに A β 1-42 を快く提供していただきました。武田薬品工業株式会社創薬第二研究所 伊井雅幸博士、北田千恵子博士に深謝いたします。

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, Ii 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*, 22,367-376, 2001.
- 4) Pettegrew JW, Mori H. Chrysamine G decreasing the neurotoxicity of fibrillar amyloid β . The 5th international conference on progress in Alzheimer's and Parkinson's disease. 31 Mar-5 Apr, 2001, Kyoto
- 5) 石井一弘、玉岡 晃、庄司進一、Klunk WE、森啓. Chrysamine G (CG) は線維性 A β の神経毒性を抑制する. 日本神経学会総会、東京、May 11-13, 2001.
- 6) 松野佐好子、玉岡 晃、宮 冬樹、石井一弘、庄司進一、関島良樹、徳田隆彦、池田修一. アルツハイマー病(AD)及びダウン症候群(DS)の血漿アミロイド β 蛋白(A β)分子種とアポリポ蛋白 E(APOE)表現型との相関解析. 日本神経学会総会、東京、May 11-13, 2001.
- 7) 玉岡 晃、石井一弘、宮 冬樹、松野佐好子、望月昭英、庄司進一、原田勝二. アルツハイマー病(AD)脳における過酸化脂質とアポリポ蛋白 E(APOE)、トランスフェリン(Tf)、ミトコンドリア・アルデヒド脱水素酵素 2(ALDH2)の遺伝子多型. 日本神経学会総会、東京、May 11-13, 2001.
- 8) 石井一弘、宮 冬樹、清水孝彦、岡戸信男、庄司進一、白澤卓二、玉岡 晃. 線維性 A β 1-42 によるミクログリア活性化機序の解明. 日本痴呆学会, Oct 4-5, 2001.
- 9) 玉岡 晃、石井一弘、宮 冬樹、松野佐好子、望月昭英、庄司進一、原田勝二、宮武史子、胡 建国. アルツハイマー病脳における過酸化脂質とトランスフェリン、ミトコンドリア型アルデヒド脱水素酵素、アンギオテンシン変換酵素の遺伝子多型との相関関係について. 日本痴呆学会, Oct, 4-5, 2001.
- 10) Tamaoka A, Miyatake F, Matsuno S, Ishii K, Shoji S, Narita M, Sahara N, Mori H. Apolipoprotein E(ApoE) Allele -dependent Antioxidant activity:-Analyses on brains from Alzheimer's disease(AD) patients and ApoE-deficient mice-The 5th international conference on progress in Alzheimer's and Parkinson's disease. 31 Mar-5 Apr, 2001, Kyoto
- 11) Ishii K, Klunk WE, Arawaka S, Debnath ML, Sahara N, Shoji S, Tamaoka A,

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

アルツハイマー病(AD)脳におけるアミロイド β 蛋白(Aβ)と酸化ストレスの相関 - 血漿 Aβ に対するスタチン作用の解析も含めて -

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 石井一弘*、宮 冬樹*、松野佐好子*、本村香織*、
望月昭英*、庄司進一*、松島照彦**、徳田隆彦***、
池田修一***、
筑波大学臨床医学系神経内科*、筑波記念病院内科**、
信州大学第三内科***

研究要旨 アルツハイマー病 (AD) 脳におけるアミロイド β 蛋白 (Aβ) と酸化ストレスの相関を検討するとともに、血漿 Aβ に対するスタチン作用の解析も行なった。まず AD 脳や非 AD 対照脳の側頭葉皮質を切り出し、過酸化脂質の指標として、thiobarbituric acid-reactive substance (TBARS)を測定した。また、分別遠心により可溶性画分と不溶性画分に分離し、それぞれに含まれる Aβ 分子種を識別定量した。不溶性画分の Aβ42 のみが TBARS と有意な正の相関を示し、酸化ストレスにより細胞内 Aβ42 が増加したという報告や Aβ がフリーラジカルの産生に関与するという知見を支持する結果であった。次に、血清コレステロール低下作用以外に抗酸化作用や抗炎症作用を有するスタチンの血漿 Aβ に対する効果を検討した。通常量のプラバスタチンの投与によって、血清コレステロールは有意に低下していたが、血漿 Aβ40、42 ともに有意な変化は認められなかった。スタチンの AD に対する作用については、疫学的にも、生物学的にも、更なる検討が必要であると考えられた。

A. 研究目的

AD 脳では酸化ストレスの亢進が報告されているが、その機序に関しては明らかではない。AD 脳に沈着する Aβ がミクログリア等の活性化を介してフリーラジカルの生成に関与することが示唆されており、酸化刺激によって *in vitro* で細胞内 Aβ、特に Aβ42 の増加も報告されている。従って、酸化的ストレスは AD の一次的な病因ではないにしても、その病像の形成に関与している可能性は高い。本研究では、AD 脳に含まれる Aβ 分子種と酸化ストレスとの相関を解析した。また、抗酸化作用を有す

るスタチン類の AD 治療薬としての可能性を検討するために、スタチンの血漿 Aβ に対する影響を解析した。

B. 研究方法

1. 対象

凍結保存した孤発性 AD 脳 21 例、対照脳 16 例より大脳皮質を切り出し、thiobarbituric acid-reactive substance (TBARS) を指標として過酸化脂質を測定した。脳内に蓄積した Aβ は、トリス生食抽出画分とその沈渣の蟻酸抽出画分に含まれるものをそれぞれ可溶性 Aβ、不溶性 Aβ として、

サンドイッチELISAを用いてA β 40とA β 42を分別定量した。次に、スタチンの血漿A β に対する影響を検討するため、10mgのpravastatinあるいは5mgのsimvastatinを服用している22名の高コレステロール血症患者群と年齢、性をマッチさせた対照群より一晩絶食後採血し、血漿中A β 40、A β 42をサンドイッチELISAにて定量した。また、高コレステロール血症患者39名に10mgあるいは20mgのpravastatinを投与し、服用前と服用後の血漿A β を経時的に測定した。

(倫理面への配慮)

剖検脳を得るに際しては、家族にその目的を十分説明した後了承を得ており、倫理的には何ら問題がない。また、血液採取に際しても本人よりインフォームドコンセントを得ている。

2. 過酸化脂質の測定

ヒト脳より側頭葉大脳皮質から小片を切りだし、氷冷0.9% NaClで洗浄後、20倍容量の50mM トリス生食緩衝液、pH7.6 (TS)にてホモジェナイズし、thiobarbituric acid-reactive substance(TBARS)としての過酸化脂質を測定した。即ち、FeSO₄とH₂O₂で酸化刺激する系としない系を調製し、37°Cで90分間インキュベートした後、それぞれにSDS、酢酸、thiobarbituric acidを加え、95°C1時間反応させた。冷却後、ブタノール・ピリジン混合液を加え、攪拌した後3000rpm、15分間遠心し、上層を採取し532nmの吸光度を測定し(HITACHI U-1100 Spectrophotometer)、TBARS値を求めた。

3. A β 分子種の定量

ヒト脳や血漿に含まれるA β 分子種の定量のために、サンドイッチELISAを行なった。ELISA(サンドイッチ法)には、A β

のN末端部に対する抗体BNT77(合成 β ペプチド11-28に対するモノクローナル抗体)を一次抗体として96穴マイクロプレートに固定し、A β のC末端認識抗体BA27(合成 β ペプチド1-40に対するモノクローナル抗体)、BC05(合成 β ペプチド35-43に対するモノクローナル抗体)のそれぞれを西洋ワサビパーオキシダーゼ(HRP)で標識したものを二次抗体として用い、A β 40とA β 42を識別定量した。脳のA β は、脳をTSおよび99%蟻酸にて順次抽出し、TS抽出画分中のA β を可溶性A β 、蟻酸抽出画分中のA β を不溶性A β とした。

C. 研究結果

脳内A β とTBARSとの相関の検討では、不溶性のA β 42とのみ過酸化脂質は有意な正の相関が認められた。血漿A β に対するスタチンの作用に関しては、両A β 分子種ともに服用・非服用群間で有意差が認められなかった。また、服用5ヶ月後まで追跡した範囲内では、A β 40、A β 42ともに、服用前と有意な変化が認められなかった。通常量のstatinの服用では血漿A β 量に変化はみられないものと考えられた。

D. 考察

酸化ストレスとは、活性酸素や活性窒素などによる酸化的障害とこれから生体を防御する抗酸化作用とのバランスが崩れて、前者が優勢になった状態であるが、AD脳においては脂質、蛋白、核酸の酸化的障害が認められ、ADの病態において酸化ストレスが注目されている。本研究においてAD脳共通の特徴である不溶性A β 42と過酸化脂質に有意な正の相関が認められたことは、酸化ストレスによりA β 42の発現が誘導されるという報告を支持するとともに、A β 42がフリーラジカルのより強力な発生源として作用する可能性を示唆していた。

従って、酸化ストレスはA β の沈着と相互に影響しながら、ADの病態カスケードの進展に関与している可能性が高いと考えられた。

以上、本研究で得られた知見の他にも、ADの危険因子として酸化ストレスに関連した遺伝子多型が知られていることなど、酸化ストレスはADの本質的な原因ではないとしても、その病態に深く関わっていることが示唆されている。従って、抗酸化物質によるADの予防治療の展望が開ける可能性があるが、現在のところビタミンEやCなどの抗酸化物質によるADの治療の有効性に関しては、未だ明確な結論が出ていない。最近、血清コレステロール低下作用を有するスタチン系薬剤の服用により、ADや痴呆の罹患率が低下するという疫学的な調査結果が相次いで報告された。また、スタチンの一つであるシンバスタチンによりモルモット脳や髄液中のA β が減少し、ロバスタチンによりヒト血清中のA β が低下するという報告もなされた。しかしながら、本研究におけるプラバスタチン投与の結果は血漿A β に有意な変化は認められなかった。今後スタチンのA β やADに対する作用については、疫学的にも、生物学的にも、更なる検討が必要であると考えられた。

E. 結論

脳内不溶性A β 42 と過酸化脂質は有意な正の相関が認められた。また、通常量のstatinの服用では血漿A β 量を減少させないものと考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kyoko Miyawaki, Hiroyuki Nakamura, Sayoko Matsuno, Akira Tamaoka, Kunio Doi: Three-dimensional and fractal analysis of assemblies of amyloid b protein subtypes (Ab40 and Ab42(43)) in canine senile plaques. *Acta Neuropathol* (in press)
- 2) Kazuhiro Ishii, Akira Tamaoka and Shin'ichi Shoji: A case of primary focal lingual dystonia induced by speaking. *Eur J Neurol* 8(5): 507, 2001.
- 3) Ishii K, Lippa C, Tomiyama T, Miyatake F, Ozawa K, Tamaoka A, Hasegawa T, Fraser PE, Shoji S, Nee LE, Pollen DA, St George-Hyslop PH, Ii K, Ohtake T, Kalaria RN, Rossor MN, Lantos PL, Cairns NJ, Farrer LA, Mori H. Distinguishable effects of *presenilin-1* and *APP717* mutations on amyloid plaque deposition. *Neurobiol Aging* 22(3):367-76,2001.
- 4) Sayoko Matsuno, Akira Tamaoka, Kazuo Yoshizawa, Masahiko Watanabe and Shin'ichi Shoji. A case with myasthenia gravis (MG) emerging after splenectomy for idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP): possible effects of thymectomy on autoantibodies. *J Med* 31: 327-332, 2001.
- 5) 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* 49: 546-547, 2001.
- 6) 玉岡 晃:医薬ジャーナル 新薬展望 2002(増刊号)アルツハイマー病治療薬 .38(S1):119-126,2002.
- 7) 玉岡 晃:アルツハイマー病の抗体療法、現代医療、34(1):237-244,2002.
- 8) 玉岡 晃:痴呆症になり易いひとはいますか、一般的な気質や遺伝的にはどうです

- か. CLINICIAN 506(48):40-43, 2001
- 9) 玉岡 晃: 痴呆症 早期発見と対処法、わくわくライフ いばらき、63:16-17, 2001
 - 10) 玉岡 晃: パーキンソン病と痴呆性疾患の最近の話題をめぐって -臨床的側面を中心に- 真壁都市医師会報 105:8-9, 2001
 - 11) 玉岡 晃: アポ E isoform と脳内過酸化脂質、Dementia Japan 15(1):47-55, 2001
 - 12) 玉岡 晃: アルツハイマー病. スクエンメディカル 4(2):4-6, 2001
 - 13) 玉岡 晃: アルツハイマー病. スクエンファーマ 4(2):6, 2001
2. 学会発表
- 1) 玉岡 晃: アルツハイマー病のトピックス. 下館医師会研修会、1月23日、2002.
 - 2) A Tamaoka, K Ishii, S Matsuno, F Miyatake, and S Shoji. Analyses on correlations between oxidative stress and amyloid beta protein in Alzheimer's disease and control brains. Society of Neuroscience 31 st Annual Meeting, (San Diego) November 13, 2001.
 - 3) K Ishii, WE Klunk, S Arawaka, ML Debnath, N Sahara, S Shoji, A Tamaoka, T Shirasawa, JW Pettegrew and H Mori. Neurosurvival effect of chrysamine G against amyloid beta toxicity. Society of Neuroscience 31 st Annual Meeting, (San Diego) November 12, 2001.
 - 4) 玉岡 晃: 難病患者の在宅における療養生活を支えるために地域に望むこと. 平成13年度地域ケアシステム支援専門研修会、10月29日、2001.
 - 5) 玉岡 晃、石井一弘、宮 冬樹、松野佐好子、望月昭英、庄司進一、原田勝二、宮武史子、胡 建国: アルツハイマー病脳における過酸化脂質とトランスフェリン、ミトコンドリア型アルデヒド脱水素酵素、アンギオテンシン変換酵素の遺伝子多型との相関関係について. 第20回日本痴呆学会、10月5日、2001.
 - 6) 石井一弘、宮 冬樹、清水孝彦、岡戸信男、庄司進一、白澤卓二、玉岡 晃: 線維性 β 1-42によるミトコンドリア活性化機序の解明. 第20回日本痴呆学会、10月4日、2001.
 - 7) 玉岡 晃: 痴呆の早期発見と対処法. 在宅介護支援センターそよかぜ講演会、7月14日、2001.
 - 8) 玉岡 晃: アルツハイマー病の発症機構と危険因子. 第2回 CLINICAL UPDATE FORUM(大阪市立大学)、5月31日、2001.
 - 9) 石井 一弘、玉岡 晃、庄司 進一、Klank WE、森 啓: Chrysamine G (CG) は線維性A β の神経毒性を抑制する. 第41回日本神経学会総会(東京)、5月11日、2001.
 - 10) 松野 佐好子、玉岡 晃、宮 冬樹、石井 一弘、庄司 進一、関島 良樹、
 - 11) 徳田 隆彦、池田 修一: アルツハイマー病(AD)及びびグアン症候群(DS)の血漿アミロイド β 蛋白(A β)分子種とアポリポ蛋白 E(APOE)表現型との相関解析第41回日本神経学会総会(東京)、5月12日、2001.
 - 12) 望月 昭英、下畑 充志、玉岡 晃、庄司 進一: アルツハイマー病における神経細胞内アミロイド β 蛋白(A β)と神経細胞死について. 第41回日本神経学会総会(東京)、5月12日、2001.
 - 13) 玉岡 晃、石井 一弘、宮 冬樹、松野 佐好子、望月 昭英、庄司 進一、原田 勝二: アルツハイマー病(AD)脳における過酸化脂質とアポリポ蛋白 E(APOE)、トランスフェリン(Tf)、ミトコンドリア・アルデヒド脱水素酵素 2(ALDH2)の遺伝子多型第41回日本神経学会総会(東京)、5月13日、2001.
 - 14) 宮脇京子、中山裕之、玉岡 晃、松野佐好子、土井邦夫: 犬老人斑における A β 分子腫(A β 40 と A β 42(43))の三次元解析およびフラクタル解析. 日本獣医病理学会、4月、2001.
 - 15) K Ishii, WE Klank, S arawaka, ML Debnath, N Sahara, S Shoji, A Tamaoka, JW

Pettegrew and H Mori. Chrysamine G decreasing the neurotoxicity of fibrillar amyloid b. The 5 th international conference on progress in Alzheimer's and Parkinson's disease. April 5, 2001.

- 16) A Tamaoka, F Miyatake, S Matsuno, K Ishii, S Shoji, N Sahara and H Mori. Apolipoprotein E (APOE) allele-dependent antioxidant activity - analyses on brains from Alzheimer's disease (AD) patients and APOE-deficient mice-. The 5 th international conference on progress in Alzheimer's and Parkinson's disease. April 5, 2001.

- 17) 玉岡 晃:痴呆とパーキンソン病の最近の話題

について.下館医師会学術講演会、3月28日、2001.

- 18) 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.

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

変異型プレセニリン1を発現する PC12D 細胞中に安定的に導入したヒトプレセニリン1の作用

分担研究者 森 啓 大阪市立大学大学院医学研究科脳神経科学

共同研究者 亀谷富由樹*、田中喜久子*、宇佐美美穂子*、富山貴美**

*東京都精神医学総合研究所、分子神経生物

**大阪市立大学医学部、脳神経科学

研究要旨 アミロイド蛋白 ($A\beta$) の細胞内代謝を明らかにする上で、プレセニリン1 (PS1) は最も重要な役割を担っている。ヒト野生型および変異型 PS1 を安定に導入した PC12D 細胞を用いて、PS1 および $A\beta$ の断片についての生化学的な解析と細胞生物学的な視点からの検討をおこなった。PC12D 細胞に導入したヒト変異型 PS1 は膜蛋白機能として示唆されている γ セクレターゼ活性を変化させるばかりでなく、細胞運動の異常高進を誘導することが観察された。

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リン (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。 $A\beta$ の細胞内代謝を明らかにする上で、PS1 は最も重要な役割を担っている。そこで本研究では、ヒト野生型および変異型 PS1 を安定に導入した

PC12D 細胞を用いて、PS1 および $A\beta$ の断片についての生化学的な解析と細胞生物学的な視点からの検討をおこなった。

B. 研究方法

ヒト PS1 および突然変異 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ョ糖溶液を用いて膜画分を細分し、含まれるヒトおよびラット PS1 およびその誘導体を電気泳動およびイムノプロットで解析した。さらに、このホモゲナートをギ酸処理し、抗 $A\beta_{40}$ および 42 抗体等を用いて $A\beta$ 半定量解析を行なった。神経分化は NGF によって誘導し、経時的な観察をした。

C. 研究結果

ラット由来 PS1 の N 末断片は免疫沈降により、どの膜画分にも回収されたが、ヒト PS1 および突然変異 PS1 の N 末断片は比重の重い膜画分に主として回収された (図1)。またこ

の画分ではAPPのC末断片の存在割合も増加していた(図2)。さらに、A β 42の割合がPS1および突然変異PS1を導入した細胞で有意に増加し、ヒト正常PS1および突然変異PS1の発現量に依存して変動した(図3)。NGFによる分化誘導条件下では、変異型PS1においては、PC12D細胞の突起伸長に伴い細胞運動も大きく高進していることが観察された(図4)。

D. 考察

ラット細胞では、導入したヒトPS1における突然変異有無は γ セクレターゼ活性に影響せず、共に変異PS1と同等の効果をもたらすと考えられた。また導入したヒトPS1の細胞内分布はラットPS1とは異なり、トランスゴルジネットワークから細胞表面への輸送系顆粒が存在する画分に多く存在し、また、ヒトPS1を導入した細胞ではAPPのC末断片もこの画分に分布するようになり、細胞内の輸送とPS1との関連性が示唆された。NGF存在下で分化させると、特に突然変異PS1を導入した細胞では細胞の凝集が起こり、PS1が細胞接着因子複合体に影響を与え、細胞膜での分子構造の変化が起こっていることが示唆された。

E. 結論

PC12D細胞に導入したヒト変異型PS1は膜蛋白機能として示唆されている γ セクレターゼ活性を変化させるばかりでなく、細胞運動の異常高進を誘導することが観察された。

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. Human wild presenilin-1 mimics the effect of the mutant

presenilin-1 on the processing of Alzheimer's amyloid precursor protein (APP) in PC12D cells. *J. Neurol. Sci.* 188:27-31, 2001.

- 2) Pigino G, Pelsman A, Mori H, Busciglio J. Presenilin 1 mutations reduce cytoskeletal association, deregulate neurite growth and potentiate neuronal dystrophy and tau phosphorylation. *J. Neurosci.* 21: 834-842, 2001.
 - 3) Ishii K, Lippa C, Tomiyama T, Miyatake F, Ozawa K, Tamaoka A, Hasegawa T, Fraser PE, Shoji S, Nec LE, Pollen DA, St. George-Hyslop PH, Ii K, Ohtake T, Kalaria RN, Rossor MN, Lantos PL, Cairns NJ, Farrer LA, and Mori H. Distinguishable effects of Presenilin-1 and APP717 mutations on amyloid plaque deposition. *Neurobiol. Aging* 22: 367-376, 2001.
 - 4) Takahashi K, Kamiya K, Urase K, Suga M, Takizawa T, Mori H, Yoshikawa Y, Ichimura K, Kuida K, Momoi T. Caspase-3-deficiency induces hyperplasia of supporting cells and degeneration of sensory cells resulting in the hearing loss. *Brain Res.* 894: 359-367, 2001.
 - 5) Park I-H, Jung MW, Mori H, Inhee M-J. Zinc enhances synthesis of presenilin 1 in mouse primary cortical culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285: 680-688, 2001
 - 6) 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 b40 and 42 are independent from apoE genotype and mental retardation in Down syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 95: 224-228, 2000
- ##### 2. 学会発表
- 1) 亀谷富由樹, 田中喜久子, 宇佐美美穂子,