

厚生労働科学研究費補助金

効果的医療技術の確立推進臨床研究事業

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

平成 14 年度 総括研究報告書

主任研究者 武田 雅俊

平成 15 年 (2003 年) 3 月

目 次

I. 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	1
II. 分担研究報告書	
1. アルツハイマー病病態過程に関わる新規診断マーカー物質の検討	2
武田 雅俊	
2. アルツハイマー病髄液マーカーの確立に関する研究	17
田中 稔久	
3. アルツハイマー病における髄液中 WGA を結合した糖たんぱく質の測定	22
浦上 克哉	
4. 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	28
千葉 茂	
5. 遺伝子多型を用いたアルツハイマー病痴呆の診断と評価の検討	32
谷向 知	
6. 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	36
服部 英幸	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	41
IV. 研究成果の刊行物・別刷	42

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

主任研究者 武田雅俊 大阪大学大学院医学系研究科・精神医学
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
分担研究者 浦上克哉 鳥取大学医学部・保健学科
分担研究者 千葉 茂 旭川医科大学医学部・精神医学講座
分担研究者 谷向知 国立療養所中部病院 精神科
分担研究者 服部英幸 金沢医科大学・老年病学

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。アルツハイマー病生物学的診断マーカーの確立するにあたり、今回は遺伝的因子からの検討、酸化ストレス関連因子からの検討、そして簡便でかつ確実性の高いマーカーの開発、新規マーカーの開発といった4つのアプローチを用いた。

まず遺伝因子からの検討では、**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、**apoE** プロモーター領域の **-427C/T** 多型、**-219G/T** 多型、**+113C/T** 多型について検討した。**427C/T** 多型、**+113C/T** 多型では、**DAT** 群と健常対照者群との間に、各アレルの頻度に差は認められず、発症年齢との関連も否定的であった。一方、**-219G/T** 多型については、**DAT** において **T** アレルが有意差を持って高頻度に認められた。この傾向は、**apoEε4** の有無には影響を受けなかったが、発症年齢が **65** 歳以上の群との間でより顕著に認められた。**DAT** と **ブチルコリンエステラーゼ K** 変異遺伝子 (**BChE-K**) との関連は **apoEε4**、発症年齢を考慮しても有意差は認められなかった。**BChE-K** は **catalytic** 活性が通常のコリンエステラーゼよりも低下していることが知られていることから、**アセチルコリンエステラーゼ阻害薬**である塩酸ドネペジル投与によるコリン作動系の活性化による生体反応、副作用発現との関連について検討を行ったが、**BChE-K** の存在と副作用出現との間に関連はみられなかった。

次に、酸化ストレス関連因子からの検討においては、遺伝子変異を有する家族性 **AD** 脳や **AD** 型の脳病理が併存する **レビー小体型痴呆脳**においても神経細胞内 **8-hydroxyguanosine (8OHG)**が増加していることを観察した。神経細胞の酸化的傷害は、**AD** の変性過程の早期段階の変化であることが示唆され、**孤発性・家族性の AD** および **AD 近縁疾患**に共通の病態であると考えられた。

簡便でかつ確実性の高いマーカーの開発については、口腔粘膜上皮を擦過しその細胞内の **tau** 蛋白量をウェスタンブロット法にて同定し、口腔上皮および一般臓器の **tau** 蛋白と神経細胞 **tau** 蛋白の共通性についていくつかの抗体を用いて免疫組織学的に検討し、さらに培養上皮細胞を用いて神経細胞 **tau** 蛋白の **cDNA** による **PCR** を行なった。その結果検討した **7** 種類の神経細胞 **tau** に対する抗体のうち **4** 種類において免疫染色にて陽性となった。非リン酸化 **tau** に対する抗体は細胞体に陽性像をみとめ、リン酸化 **tau** に対する抗体は核に陽性となった。また、培養角化細胞を用いて神経細胞 **tau** 蛋白よりデザインされたプライマーによる **PCR** を行なったところ **リピート部位**において相同性のあるバンドが検出された。これらの結果より口腔上皮 **tau** 蛋白は神経細胞 **tau** 蛋白と少なくとも一部では共通の構造をもっていることと、口腔粘膜上皮の **tau** 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。

新規マーカーの開発には、**AD** における糖タンパク質、**Notch** 断片蛋白、**第1メチオニン切断化 **tau** 蛋白** について検討をおこなった。**AD** の髄液中の **WGA**(小麦胚芽レクチン, **Wheat Germ Agglutinin**)結合糖タンパク質では、有意に減少している **2** 種類の **WGA** 結合糖タンパク質と、減少している傾向が見られる **1** 種の糖タンパク質が見いだされた。これらの **WGA** 結合糖タンパク質の減少は、タンパク質のグリコシル化の減少を示

しており、ADにおけるグリコシレーション低下の可能性が考えられた。Notch-1 蛋白はタイプ1 膜蛋白型・細胞表面レセプターであり、胎生期や成長後の細胞分化特に神経細胞の分化調節に必須の Notch シグナル伝達を担っているが、今回 Notch-1 蛋白由来の新規ペプチド (Notch β -peptide; N β) が細胞外に分泌されることを明らかにした。そして、N β の放出を直接規定する Notch-1 の新たな膜内蛋白分解部位として膜貫通部分のほぼ中央に、A β を生成する切断と似ている Site-4 分解部位を同定した。プレセニリンの病原性突然変異体は A β のカルボキシル末端を延長するが、同じく変異型プレセニリンは Site-4 切断に同様の影響を及ぼすことも判明した。よって、AD 患者および正常者の N β の性質を検討することによって、A β 42の産生比率を算出し、AD の診断マーカーに用いる可能性が示唆された。そして最後に、アポトーシスに関連して、内因性アポトーシス阻害蛋白の機能抑制能を有する第1メチオニン切断化タウ蛋白に注目し、髄液中の切断されたタウ蛋白の検出を試みた。アルツハイマー病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 の第1メチオニン切断化タウ蛋白が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、アミロイド、タウ蛋白、酸化ストレス、脳脊髄液

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-

ハイ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。今回は遺伝的因子からの検討、酸化ストレス関連因子からの検討、そして簡便でかつ確実性の高いマーカーの開発、新規マーカーの開発といった4つのアプローチを用いて、AD の生物学的診断マーカー開発のための検討をおこなった。

B. 研究方法

遺伝因子からの検討では、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 NINCDS-ADRDA の probable AD の診断基準を満たすものと、健常高齢者を対象にした。遺伝子多型の同定は DAT 239 例、Cont 271 例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の-427C/T 多型、-219G/T 多型、+113C/T 多型と BChE-K 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。アセチルコリンエステラーゼ阻害薬内服による副作用出現のチェックに関しては、probable AD と診断され、アセチルコリンエステラーゼ阻害薬である塩酸ドネペジルの投与を通常の用法で開始した患者で、遺伝子解析の同意を得られた

37例を対象に薬物開始1ヶ月以内に出現したコリン系ニューロンが活性化した結果、引き起こされたと予想される副作用を記載し、BChE-Kとの関連を検討した。有意検定はカイ二乗検定を用いた。

剖検脳の検討では、材料として剖検により確定診断された家族性AD脳13例(年齢47~81歳、平均58歳;プレセニン-1遺伝子変異例11例、アミロイド前駆体蛋白遺伝子変異例2例)、プレセニン-1遺伝子変異を有するが痴呆発症前に死亡した1例(51歳)、および年齢を一致させた対照群脳17例(年齢31~82歳、平均62歳);レビー小体型痴呆脳8例(年齢68~85歳、平均76歳)および年齢を一致させた対照群脳17例(年齢62~86歳、平均74歳)を用いた。リン酸緩衝ホルマリン固定(家族性AD脳とその対照脳)あるいはメタカーン固定(レビー小体型痴呆脳とその対照脳)の後に側頭葉皮質(後頭側頭回)あるいは前頭葉皮質(上・中前頭回)を含むパラフィン包埋切片を作製し、1F7(抗80HG抗体; Trevigen, 1:30)を一次抗体として免疫染色(PAP法)を行った。つづいて、大脳皮質第3層における錐体細胞の80HG免疫反応強度(Optical density)をQuantimet 570C Image Analysis System (Leica)を用いて解析した。

簡便でかつ確実性の高いマーカーの開発については、口腔粘膜上皮を擦過しその細胞内のtau蛋白量をウェスタンブロット法にて同定し、口腔上皮および一般臓器のtau蛋白と神経細胞tau蛋白の共通性についていくつかの抗体を用いて免疫組織学的に検討し、さらに培養上皮細胞を用いて神経細胞tau蛋白のcDNAによるPCRを行なった。対象はアルツハイマー病例(AD)43例、血管性痴呆例(VD)32例、パーキンソン病例5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。ELISAキット(フィノスカラー-hTAU, ニプロ)によりtau蛋白量を測定し、BCA protein assay kit(PIERCE)にて総蛋白量を測定しtau蛋白量の総蛋白量に対する比率をtau蛋白濃度として各群間で比較した。そして、重層扁平上皮および一般臓器組織の免疫組織学的検討では、神経細胞tau蛋白に対する抗体を用いたwestern blotおよび食道粘膜上皮を用いた免疫組織学的検討を行なった。用いた抗体はBT-2, TAU2, TAU5, AT180, AT270, tau C terminalである。このうち非リン酸化tau蛋白に対する抗体はTAU2, TAU5, tau C terminalである。リン酸化tau蛋白に対する抗体はAT180, AT270である。さらに、RT-PCR法による培養角化細胞tau蛋白RNAの検討では口腔上皮由

来の培養角化細胞を用いて、神経細胞tau蛋白と上皮内tau蛋白の遺伝子レベルでの相同性について以下のプライマーを用いて検討した。

tau-1112 (Exon 11, 12の検出用)

5' -GCTCATTAGGCAACATCCATCA-3' (sense)

5' -TCGACTGGACTCTGTCTTGAA-3' (antisense)

tau-rep (リピート部位の検出用)

5' -GGGCTGATGGTAAAACGAAGA-3' (sense)

5' -CACTGGCGACTTGTACACGAT-3' (antisense)

tau-911 (Exon 9, 10, 11の検出用)

5' -AACCTCCAAAATCAGGGGAT-3' (sense)

5' -TTGCCTAATGAGCCACACTT-3' (antisense)

新規マーカーの開発においては、対象はAD 18例(男/女:6/12)、AD以外の痴呆:脳血管性痴呆(VD)、正常圧水頭症(NPH)、レビー小体型痴呆(DLBD)、クロイツフェルトヤコブ病(CJD)、PSP、CBDの計16例(10/6)、コントロールとして痴呆のない症例16例(9/7)の髄液において、ウエスタンブロット法を用いて検討を行った。

Notch-1蛋白およびCD44蛋白を発現するベクターを作成した。それらの細胞外シェディング後の産物でありプレセニン依存的蛋白分解の基質であるNEXTおよびCD44ΔEを作成後その5'末端にFLAGエピトープタグを持ち3'末端に6X mycタグを持つコンストラクトを遺伝子組み換え技術により作成した。これらをプレセニンの野生型、家族性アルツハイマー病の原因となる突然変異型、ドミナントネガティブ型を恒常的に発現させたK293細胞に安定的に発現させた。その細胞からのNotch-β peptideおよびCD44-β peptideの分泌をS35メチオニンを用いたパルスチェース法の上清を抗FLAG抗体で免疫沈降しSDSゲルで電気泳動法により分離後オートラジオグラフィで認識した。切断部位の特定はこの免疫沈降物をMALDI-TOF型質量分析器を用いて分子量を決定することで直接特定した。

tau蛋白とXIAPとの直接結合の可能性を調べるために、仮説のようにtau蛋白N末端のペプチドについて、1番目のMetから始まるペプチドN-tau(MAEP RQEF EVMED)と2番目のAlaから始まるペプチドN-tau-delM(AEP RQEF EVMEDH)(どちらもアミノ酸1文字表記)との2つ(どちらもC末端はCysを添加)を作成し、これらをCys残基を利用してアルブミン(Imjet Albumin (Pierce))と結合させてELISAの固層抗原として用いた。ポジティブコントロールとしては、XIAPに結合することが知られ

ている caspase-9 の部分ペプチド Casp9(ATPFQEGLRTRFDQLD)を作成し、同様にアルブミンと結合させてELISAの固層抗原として用いた。そして、固層ペプチドと XIAP との結合を、1次抗体に抗 XIAP 抗体を用い、2次抗体に FITC ラベルの抗ウサギ抗体を用いた ELISA 法にて検討した。また、固層ペプチドへの結合の特異性を調べるために、溶液層に同じペプチドを添加して XIAP と固層との結合が抑制されるかどうかについて検討をおこなった。

次に、ペプチド N-tau-delM をウサギに免疫して抗血清を回収し、ペプチド N-tau-delM を結合させたアフィニティカラムへの吸着させ、さらにペプチド N-tau を結合させたアフィニティカラムを通過させ、断端への特異性のあるポリクローナル抗体を作成した。500 μ l の脳脊髄液サンプルに 5 μ l の 500 mM PMSF、2.5 mg/ml aprotinin、2.5 mg/ml leupeptine を添加し(最終濃度 5 mM PMSF、25 μ g/ml aprotinin、25 μ 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收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 μ 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をおこなった。

(倫理面への配慮)

遺伝子収集に関しては兵庫県立高齢者脳機能センターにおいて倫理委員会を設け承認を受けた。そして、遺伝子検索においては、研究者が個人を特定できないようにし患者が不利益を被らないよう配慮した。遺伝子解析における血液採取、口腔上皮、および脳脊髄液の採取においては全て人体サンプルをもちいたものであるが、サンプル採取の際に患者および家族に検査の目的と内容等について十分な説明を行い、インフォームドコンセントを得たものである。

また、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

【遺伝子解析: apoE 遺伝子プロモーター領域-427C/T、-219G/T、+113C/T 多型】

apoE 遺伝子プロモーター領域-427C/T 多型では、C アリル出現率は DAT、Cont でそれぞれ 0.960、0.957 であり、65 歳未満発症群 0.980、65 歳以降発症群 0.955 であった。

apoE 遺伝子プロモーター領域-219G/T 多型では、G アリル出現率は DAT、Cont でそれぞれ 0.294、0.354 と有意差 ($p < 0.01$) を認めた。発症年齢別に見ると、65 歳未満発症群 0.260 (Cont 0.415)、65 歳以降発症群 0.302 (Cont 0.378) で 65 歳未満については、わずかに有意差を認めなかった ($p = 0.054$)。一方、65 歳以降発症群については有意差が認められた。 ($p < 0.05$)

apoE 遺伝子プロモーター領域+113C/T 多型では、C アリル出現率は DAT、Cont でそれぞれ 0.577、0.560 であった。DAT において 65 歳前後で C アリルの出現頻度に差異は認めなかったが、Cont 群では 65 歳前後で 0.632、0.507 と開きがみられたが、有意差は認められなかった ($p = 0.078$)。

apoE 遺伝子プロモーター領域で有意差のみられた -491 と -219 領域のタイプにより生体内においても apoE の発現に差があり、DAT 発症に影響を及ぼしている可能性がある。そこで apoE ϵ 4 を持つ対象群の中で、今回 DAT 群で高頻度に出現した -491 A アリルと -219 T アリルとを homo で持つ群とそれ以外の群との間で DAT 発症と何らかの関連がみられないかを検討した。対象群の中で apoE ϵ 4 の carrier は DAT 136 例、Cont 67 例で -491A で -219T の homo の出現率はそれぞれ 0.485 (Cont 0.269)、0.515 (同 0.713) で有意差 ($p < 0.032$) がみられた。

【遺伝子解析: BChE-K と塩酸ドネペジル服用によるアセチルコリン系の副作用出現との関連】

37 例の塩酸ドネペジル投与を行った DAT 対象者では、薬物投与 1 ヶ月以内に 10 例で 11 件の副作用が観察された。副作用の内訳は尿失禁 6 件、妄想 2 件、消化器症状 2 件、徐脈 1 件であった。これらの副作用のために薬物投与を減量・中止に至った症例はなかった。対象者の BChE-K を解析し、副作用出現の有無と BChE-K carrier であることとの関連について検討したところ、BChE-K carrier の中で副作用の出現の有無はそれぞれ 0.30、0.33 と同程度であった。

【剖検脳における検討】

大脳皮質における神経細胞内 80HG は、家族性 AD 脳およびレビー小体型痴呆脳において広範囲に出現していた。一方、対照群脳における神経細胞内 80HG 免疫反応は微弱であった。画像解析によって測定された大脳皮質第 3 層における錐体細胞の 80HG 免疫反応強度は、家族性 AD 群およびレビー小体型痴呆群で、それぞれの群と年齢を一致させた対照群に比べて有意に増加していた (Mann-Whitney の U 検定で順に $p < 0.05$, $p < 0.01$)。また、プレセニン-1 遺伝子変異を有するが痴呆発症前に死亡した 1 例でも、中等度の神経細胞内 80HG 免疫反応が認められた。

【口腔上皮内タウ蛋白に関する検討】

タウ蛋白濃度測定・群間比較をおこなうと、アルツハイマー病では他の 4 群に比し有意 ($p < 0.05$) に高値を示した。各群のタウ蛋白濃度の平均値はアルツハイマー病群 0.84、血管性痴呆群 0.45、パーキンソン病群 0.37、若年対照群 0.47、高齢対照群 0.46 であった。食道粘膜上皮に対する非リン酸化タウ蛋白抗体の反応性に関しては、非リン酸化タウに対する抗体では BT-2、TAU5、および C 末端に対する抗体において食道粘膜上皮の細胞体が陽性像を示した。核は染色されなかった。同時に比較した神経細胞においても細胞体での局在をみとめた。BT-2 においては強陽性を示したが、TAU5 では弱陽性であった。C 末端に対する抗体は上皮基底層の細胞体に陽性となった。今回の検討ではアルツハイマー病例と対照例との間に染色性の違いは認められなかった。BT-2 のエピトープ部位に相当するペプチドを用いて吸収試験を行なったところ染色性が失われ、本来のエピトープを認識していることが確認された。食道粘膜上皮に対するリン酸化タウ蛋白抗体の反応リン酸化タウに対する抗体では AT270 のみが陽性像を示した。非リン酸化タウに対する抗体の反応と対照的に上皮の核にのみ陽性像を示した。今回の検討ではアルツハイマー病例と対照例との間に染色性の違いは認められなかった。AT270 のエピトープ部位に相当するペプチドを用いて吸収試験を行なったところ染色性が失われ、本来のエピトープを認識していることが確認された。一般臓器におけるリン酸化、非リン酸化タウ蛋白の局在も併せておこなったところ、BT-2 では肺胞上皮、心筋、肝細胞、胃上皮および上皮下の線維芽細胞すべてにおいて陰性を示し、重層扁平上皮のみが陽性を示した。AT270 では肺胞上皮、心筋、肝細胞、胃上皮および上皮下の線維芽細胞すべてにおいて核が陽性を示した。さらに、神経細胞タウ蛋白のリピート部位を中心にデザインしたプライマーによる PCR の

結果、培養重層扁平上皮においても神経細胞タウ蛋白の exon に相同する RNA がバンドとして検出された。特に exon9 から 12 までについての検討において 3repeat, 4repeat 両方の存在が確認された。

【新規マーカーの開発 (1) WGA 結合糖タンパク】

WGA 結合糖タンパクは多数検出されたが、そのうち比較的量の多い 3 種類のタンパク (分子量の大きなものから a、b、c とする) において、AD の髄液中で減少している傾向が見られた。このうちタンパク a において、AD 群、AD 以外の痴呆群、コントロール群の 3 群に分けてバンドの比較を行うと、AD 群は他の群に比べ明らかに低値に集中していた。そこで、AD 群と non-AD 群として検討すると、有意に ($p < 0.01$) 低値を示した。さらに、タンパク b においても同様の検討を行ったところ、AD 群では non-AD 群と比較して、有意に ($p < 0.05$) 低値を示した。タンパク c は、有意差はなかったものの、non-AD 群と比較して AD 群において低値に集中していた。さらにタンパク a において、AD と AD 以外の痴呆症例群で比較検討したところ、例数は少ないが DLBD は若干 AD よりも高値を示す傾向が見られ、鑑別診断が有効である可能性が示唆された。

【新規マーカーの開発 (2) Notch- β (N β)】

PS 依存的 γ -secretase 蛋白分解の基質として知られていた Notch-1 あるいは CD44 の膜内蛋白分解を今までに詳細に検討したが、その過程で A β 類似の Notch-1 ペプチド (Notch-1 A β -like peptide; N β) あるいは CD44 ペプチド (CD44 A β -like peptide; CD44 β) がアミノ末端フラグメントとして細胞外に分泌されることが明らかになった。この事実は A β のような膜貫通部分を含むペプチドの分泌が β APP からの A β の切り出し以外に自然界に少なくともいくつか存在することを示しており、我々はこれらのペプチドをアミロイド β 様ペプチド (A β -like peptide) と名付けた。さらに重要なことに、細胞外に分泌される Notch-1 ペプチドである N β のカルボキシル末端を生成する γ 切断部位の正確さは A β の場合と同様に FAD を来す PS 突然変異体の影響を受け、2~4 残基カルボキシル末端側へ移動することがわかった。即ち、最も量の多い N β 分子である N β 1731 (1731 はマウス Notch-1 蛋白の N 端からのアミノ酸残基の順番をあらわす) 量に比較した N β 1733-5 量の増大が PS 突然変異体によって認められる。この事実は β APP から A β を生成する γ -secretase 機能と同じメカニズムの働きにより N β などのアミロイド β 様ペプチドの分泌が起こっているこ

とが強く示唆された。よって、AD 患者および正常者の N β の性質を検討することによって、A β 42の産生比率を算出し、AD の診断マーカーに用いる可能性が示唆された。

【新規マーカーの開発 (3) 第1メチオニン切断化タウ蛋白】

アポトーシスに関連して、内因性アポトーシス阻害蛋白の機能抑制能を有する第1メチオニン切断化タウ蛋白に注目し、髄液中の切断されたタウ蛋白の検出を試みた。まず、仮説に基づいてタウ蛋白の部分ペプチドと XIAP との結合を検討した。まず Casp9 ペプチドを固層抗原として用いたものでは、XIAP との結合の結果としての蛍光強度が XIAP の濃度依存的に増加した。次に、N-tau および N-tau-delM ペプチドを固層抗原として用いたものでは、N-tau では蛍光強度が低いままであったが、N-tau-delM では蛍光強度が XIAP の濃度依存的に増加し、Met の有無により結合が大きく変わることが示唆された。さらに、溶液層に同じペプチドを添加して XIAP と固層との結合が抑制されるかどうかについて検討をおこなった。Casp9 ペプチドを固層抗原として用いたものの溶液層に XIAP とともに Casp9 ペプチドを添加して固層への結合を検討したところ、溶液層に Casp9 ペプチドが存在しない場合は XIAP の濃度依存的に蛍光強度が増加する一方で、溶液層に Casp9 ペプチドが存在する場合は蛍光強度が変化せず低いままであった。そして、N-tau-delM ペプチドを固層抗原として用いたものの溶液層に XIAP とともに N-tau および N-tau-delM ペプチドを添加して固層への結合を検討したところ、溶液層にペプチドが何も存在しない場合および溶液層に N-tau ペプチドが存在する場合は XIAP の濃度依存的に蛍光強度が増加したが、一方溶液層に固層と同じ N-tau-delM ペプチドが存在する場合は蛍光強度の上昇は抑制された。以上のことから、明らかに XIAP は Met の除かれた N-tau-delM ペプチドと極めて特異的に結合することが示唆された。次に、作成した N-tau-delM ペプチドの N 末端を特異的に認識する抗体を用いたウエスタンブロット法によって、まず AD 脳およびコントロール脳における発現を確認したところ、双方に 50~60kDa のところにバンドが認められたが、AD 脳における発現はコントロールに比し比較的多かった。さらに、AD 患者およびコントロール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、約 30kDa のところにバンドが認められた。もともと AD 患者由来の脳脊髄液中には約 30kDa まで

部分分解されたタウ蛋白が存在しており、このバンドはこれに対応するものであった。この約 30kDa のバンドは AD 患者脳脊髄液中に強く染色され、AD 患者の脳脊髄液中には第1メチオニン切断化タウ蛋白が多量に含まれていることが示唆された。

D. 考察

DAT 発症の危険因子として apoE ϵ 4 は広く認められており、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、生化学的にも生理学的にも DAT 発症と強い関連があることが報告されている。遺伝子解析において、apoE のプロモーター領域には少なくとも4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い。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が、-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 apoE ϵ 4 を持つ A アリルの carrier は、DAT 発症の危険が増加する可能性が示唆された。前年度は A アリルの出現は DAT で有意に増加は認めなかったものの apoE ϵ 4 アリルの存在の有無は発症年齢と関連しない結果であった一方、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存在したため、本年度は apoE 遺伝子プロモーター領域の-427C/T、-219G/T、+113C/T の各多型についての検討を行ったところ-219領域でTアリルが DAT で有意に増加していた。プロモーター領域のタイプ別で遺伝子発現が異なり、DAT では apoE ϵ 4 と密接な関係があることから、apoE ϵ 4 の carrier で-491、-219 がそれぞれ A、T である homo 群とそれ以外の群とで有意差が認められたことは、生体内においてもプロモーター領域のタイプによって遺伝子発現量が異なり、apoE ϵ 4 の存在下で発症に関係している可能性があることを示唆している。apoE の表現形とプロモーター領域のタイピングを行うことによって軽度認知機能障害の人が DAT に進行していくものであるかの予測因子になる可能性が考えられた。さらに最近、BChE-K と DAT との関連は否定的なものが多いが、DLB では BChE-K のアリル頻度が高いと報告がある。また、DLB は DAT よりも塩酸ドネペジルによく反応することが知られて

いる。さらに、BChE-Kは正常なコリンエステラーゼに比べ、catalytic 活性が低下していることなどから、アセチルコリンエステラーゼ阻害薬使用による効果・副作用出現とBChE-Kの関連を検討することは、薬物反応を遺伝子レベルで事前に診断できる可能性を追求し、DAT患者に対して薬物投与による副作用出現を予測し患者に苦痛を与えることを未然に回避を図る、また医療経済の観点からも重要であると考えられる。本年度は、BChE-K carrier であることと副作用出現との間に何らかの関連性を追及したが、見出すことはできなかった。しかし、対象となった症例数が37例と少いために詳細な検討まで至らなかった。

剖検脳における検討では、AD脳における酸化的傷害は、孤発性AD脳のみならず家族性AD脳やレビー小体型痴呆脳にも認められた。よって、この酸化的傷害はAD型の脳病理に普遍的な変化であると考えられる。したがって、酸化的傷害のマーカーは、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。酸化的傷害のマーカーをAD患者やADの前段階と考えられているMild Cognitive Impairment (MCI)症例の尿や血液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。

口腔上皮内タウ蛋白に関する検討においては、前回と同じくアルツハイマー病において有意にタウ蛋白が増加している結果と、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しており、特に非リン酸化タウは細胞体にリン酸化タウ蛋白は核に局在している可能性が示唆された。また、メッセンジャーRNAのレベルにおいても神経細胞との共通性が示唆された。神経組織以外の細胞内のタウ蛋白の存在についてはKenner, Luebkeらが報告しており、更にGuらがラットの組織において広範に存在していることを報告している。こうした非神経組織のタウ蛋白の機能異常が疾患として表現されることも報告されている。一方で神経細胞と非神経細胞のタウ蛋白の構造の共通性に関する研究ではDanielらがヒト培養hepatoma cellおよびfibroblastを用いたmRNAレベルでの検討において神経細胞との共通性が認められると報告している。今回の我々の結果からも神経細胞と口腔上皮のタウ蛋白の構造の共通性が示唆された。

新規マーカーの開発として検討したWGA結合糖タンパクに関しては、AD脳脊髄液中において有意に減少しているタンパクを2種、減少している傾向のある

タンパクを1種、検出した。また1種のタンパクにおいては、AD以外の痴呆との鑑別診断に有用である可能性が示唆された。これらのWGA結合タンパクの減少は、タンパクのグリコシル化の減少である可能性が考えられ、ADにおけるグリコシレーション低下の可能性を示している。ADにおけるタンパクのグリコシレーションは、リン酸化との関わりから何らかの意義がある可能性が推測された。

新規マーカーの開発として検討したNotch- β ($N\beta$)に関しては、 $N\beta$ が $A\beta$ と異なって集積・線維化したりせず、AD脳に蓄積したりしにくい性質を持つ。したがって、末梢やCSF中の $A\beta$ の代わりに $N\beta$ あるいは $N\beta 1733-35/N\beta 1731$ を測定することにより、今まで不明であったSAD患者脳内 γ -secretase活性あるいは $A\beta 42/40$ 比率の増大を正確に推定できる可能性があると考えられる。ADを引き起こす脳内 $A\beta$ 蓄積は痴呆を発症する10年以上前から徐々に蓄積すると考えられており、その過程で脳内 γ -secretase活性が上昇する、または γ -切断部位の正確さが影響を受けている可能性が考えられることから、このアッセイを健常者に実施することで“痴呆を将来的に発症する可能性の高い人”をスクリーニングでき予期診断が可能になる可能性も考えられる。

新規マーカーの開発として検討した第1メチオンin切断化タウ蛋白に関しては、今回AD脳脊髄液中において多く存在していることが示唆された。タウ蛋白は、神経原線維変化の構成成分であり、AD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。前年度の我々の研究は、アルツハイマー病の病的過程には酸化ストレスが関与することから、カルボニル化蛋白を検出するものであった。今年度の研究は、AD

患者由来の脳脊髄液内における第1メチオニンの切断化されたタウ蛋白に関するものであり、この変化はアルツハイマーの病態過程に対する理解と深く関わっている。AD 脳内のタウ蛋白は高度にリン酸化しているが、以前からの我々の研究より、培養神経系細胞にアポトーシス誘導刺激を与えるとタウ蛋白は脱リン酸化することが見出されていた。ここからADの病態においてはアポトーシスのカスケードに加えてと非アポトーシスのカスケード存在して、これらが拮抗的に作用しているものと我々は考えていた。そこで、内因性のカスパーゼ阻害蛋白としてXIAPの検討をおこなったのだが、結果としてXIAPはAD脳に多く発現していることが見出されていた。このXIAPに結合してカスパーゼ阻害作用を阻害する、つまりアポトーシスを促進する蛋白(Smac/DIABLO)などが最近数種類発見され、その結合様式として蛋白のN末端にAla-X-Pro-X (Xは任意のアミノ酸)の配列が認められるというものであった。タウ蛋白のN末端は¹Met-Ala-Glu-Pro-Arg⁵であるが、このN末端のMetが切断されると、この配列みだすものとなる。理論的に想定されたXIAPとN末端のMetの除かれたタウ蛋白との特異的な結合は、今回の研究で明らかに示された。さらに、このような切断が実際にアルツハイマー病の脳内で起こっている現象であることも、今回の研究から示唆された。どのようなストレスに反応して、あるいはどのような機序でこの切断が引き起こされているかは、未だ明らかではないが、この切断化タウ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。アルツハイマー病生物学的診断マーカーの確立するにあたり今回の研究では、遺伝的因子からの検討、酸化ストレス関連因子からの検討、そして簡便でかつ確実性の高いマーカーの開発、新規マーカーの開発といった4つのアプローチを用いた。

まず遺伝因子からの検討では、apoEプロモーター領域の219G/T多型については、DATにおいてTアリルが有意差を持って高頻度に認められた。DATとブチルコリンエステラーゼK変異遺伝子(BChE-K)と

の関連およびBChE-Kの存在と副作用出現との間の関連はみられなかった。酸化ストレス関連因子からの検討においては、遺伝子変異を有する家族性AD脳やAD型の脳病理が併存するレビー小体型痴呆脳においても神経細胞内8-hydroxyguanosine (8OHG)が増加していることを観察した。簡便でかつ確実性の高いマーカーの開発については、口腔粘膜上皮を擦過しその細胞内のtau蛋白量をウェスタンブロット法にて同定し、口腔上皮および一般臓器のタウ蛋白と神経細胞タウ蛋白の共通性についていくつかの抗体を用いて免疫組織学的に検討し、さらに培養上皮細胞を用いて神経細胞タウ蛋白のcDNAによるPCRを行ない、結果より口腔上皮タウ蛋白は神経細胞タウ蛋白と少なくとも一部では共通の構造をもっていることと、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。

新規マーカーの開発には、ADにおける糖タンパク質、Notch断片蛋白、第1メチオニン切断化タウ蛋白について検討をおこない、ADの髄液中のWGA結合糖タンパク質が減少していること、Notch-1蛋白由来の新規ペプチド(Notch β -peptide; N β)が細胞外に分泌されること、AD脳脊髄液中には約30 kDaの第1メチオニン切断化タウ蛋白が多量に含まれていることが判明した。

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

Okochi, M., Steiner, H., Fukumori, A., Tanii, H., Tomita, T., Tanaka, T., Iwatsubo, T., Kudo, T., Takeda, M., Haass, C. Presenilins mediate a dual intramembranous gamma-secretase cleavage of Notch-1 EMBO J(2002) 21, 5408-5416.

Lammich, S., Okochi, M., Takeda, M., Kaether, C., Capell, A., Zimmer, A.K., Edbauer, D., Walter, J., Steiner, H., Haass, C. Presenilin dependent intramembrane proteolysis of CD44 leads to the liberation of its intracellular domain and the secretion of an Abeta-like peptide .J Biol Chem. (2002) 277, 44754-44759.

Yasuda, Y., Kudo, T., Katayama, T., Imaizumi, K., Yatera, M., Okochi, M., Yamamori, H., Matsumoto, N., Kida, T., Fukumori, A., Okumura, M., Tohyama, M., Takeda, M. FAD-linked presenilin-1 mutants impede translation regulation under ER stress. *Biochem Biophys Res Commun.* (2002) **296**(2):313

Fluhrer, R., Multhaup, G., Schlicksupp, A., Okochi, M., Takeda, M., Lammich, S., Willem, M., Westmeyer, G., Bode, W., Walter, J., Haass, C. Identification of a beta-secretase activity, which truncates amyloid beta-peptide after its presenilin dependent generation. *J Biol Chem.* 2002 Dec 5 [pub ahead of print]

Kudo, T., Katayama, T., Imaizumi, K., Yasuda, Y., Yatera, M., Okochi, M., Tohyama, M., Takeda M. The Unfolded Protein Response Is Involved in the Pathology of Alzheimer's Disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2002 Nov;977:349-355.

Kamino K, Kida T, Tanaka T, Tanii H, Ohkochi M, Kudo T, Kobayashi T, Takeda M. Apolipoproteins and β amyloid transport pathway *Psychogeriatrics* 2,149-155,2002.

田中稔久 学会印象記 第20回日本痴呆学会 臨床精神医学 31,221-222,2002

田中稔久 学会印象記 第10回国際老年精神医学会議 *Cognition and Dementia* 1,61,2002

田中稔久、山森英長、和田健二、田中修二、鈴木英鷹、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 *精神薬療研究年報* 34,21-27,2002.

田中稔久、武田雅俊 アルツハイマー病の診断の新機軸 *臨床と研究* 79,930-933,2002

田中稔久、武田雅俊 免疫療法の開発と問題点 *臨床精神医学* 31,1177-1180,2002.

田中稔久、武田雅俊 タウ蛋白の異常と痴呆症 - 神経変性メカニズムの理解 *脳と神経* 54,777-787,2002.

紙野晃人、田中稔久、貴田智之、大河内正康、谷井久志、工藤喬、武田雅俊 アルツハイマー病における脂質代謝の役割 *日本神経精神薬理雑*

誌 22,103-110,2002

Shoji M, Matsubara E, Murakami T, Manabe Y, Abe K, Kanai M, Ikeda M, Tomidokoro Y, Shizuka M, Watanabe M, Amari M, Ishiguro K, 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, Ichise K, Tanaka K, Hamamoto M, Yamamoto H, Matsubayashi T, Yoshida H, Toji H, Nakamura S, Hirai S. Cerebrospinal fluid tau in dementia disorders: a large scale multicenter study by a Japanese study group. *Neurobiol Aging* 23: 363-370, 2002.

Wakutani Y, Kowa H, Kusumi M, Yamagata K, Wada-Isoe K, Adachi Y, Takeshima T, Urakami K, Nakashima K: Genetic analysis of vascular factors in Alzheimer's disease. *Ann N Acad Sci* 977: 232-238, 2002

Nunomura A, Chiba S, Kosaka K, Takeda A, Castellani RJ, Smith MA, Perry G. Neuronal RNA oxidation is a prominent feature of dementia with Lewy bodies. *NeuroReport* 13(16): 2035-2039, 2002 (Erratum: *NeuroReport* 14(2): 293, 2003)

Tanimukai S, Hasegawa H, Nakai M, Yagi K, Hirai M, Saito N, Taniguchi T, Treashima A, Yasuda M, Kawamata T, Tanaka C. Nanomolar amyloid beta protein activates a specific PKC isoform mediating phosphorylation of MARCKS in Neuro2A cells. *Neuroreport* 13(4): 549- 553, 2002

2. 学会発表

Okochi, M., Takeda, M. γ -Cleavage, unusual intramembranous endoproteolysis. International Symposium "Molecular Neurobiology of Alzheimer's Disease and Related Disorders" Program and Abstracts *Dementia Japan*, (2002) 16, No. 2, pp 73.

Okochi, M., Takeda, M. Colorful functions of unusual intramembranous endoproteolysis

XII World Congress of Psychiatry, Abstract, Vol.1, (2002) 110.

Okochi, M., Fukumori, A., Steiner, H., Kudo, T., Haass, C., Takeda, M. A β 42/40 level upregulation and displacement level of endogenous presenilins by Alzheimer's disease associated mutants of artificial presenilin derivatives XII World Congress of Psychiatry, Abstract, Vol.2, (2002) 29.

Tanaka T., Tanaka S., Yamamori H, Wada K, Takeda M Phosphorylation of Tau Protein in Cultured Cells by Polyinosinic-Polycytidic Acid. The 8th international conference on Alzheimer disease and related disorders (Jul,20-25,2002, Stockholm, Sweden.) Neurobiol. Aging (Abst.) in press ,2002

Yamamori H, Tanaka T., Takeda M Changes of phosphorylation level of tau protein and inhibition of apoptosis The 8th international conference on Alzheimer disease and related disorders (Jul,20-25,2002, Stockholm, Sweden.) Neurobiol. Aging (Abst.) in press ,2002

Wada K, Tanaka T., Wakutani Y, Nakashima K, Takeda M Phosphorylation of tau protein and neuronal cell death induced by peptidyltransferase inhibitors apoptosis The 8th international conference on Alzheimer disease and related disorders (Jul,20-25,2002, Stockholm, Sweden.) Neurobiol. Aging (Abst.) in press ,2002

Tanaka T., Wada K., Yamamori H, Tanaka S., Kudo T., Takeda M Oxidized protein in CSF for diagnosis of Alzheimer disease (Abst.) XIIth World Congress of Psychiatry Aug 24-29, 2002 (Yokohama)

Tanaka T., Wada K., Yamamori H, Tanaka S., Kudo T., Takeda M Symposium S106 Early diagnosis and therapeutic strategy for mild cognitive dementia and Alzheimer disease Biological markers for Alzheimer disease (Abst.) XIIth World Congress of Psychiatry Aug 24-29, 2002 (Yokohama)

田中修二、田中稔久、山森英長、武田雅俊 2本鎖 RNA によるタウ蛋白リン酸化誘導 第 21

回日本痴呆学会 10,3-4,2002 (大阪)

鈴木英鷹、田中稔久、山森英長、田中修二、和田健二、武田雅俊 抗酸化物質によるタウ蛋白リン酸化亢進の抑制 第 21 回日本痴呆学会 10,3-4,2002 (大阪)

田中稔久 シンポジウム II タウ・シヌクレイン・ニューロフィラメントと神経変性メカニズム タウ蛋白と神経変性メカニズム 第 21 回日本痴呆学会 10,3-4,2002 (大阪)

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 21 回日本痴呆学会 10,3-4,2002 (大阪)

田中稔久、山森英長、田中修二、武田雅俊 リチウムのタウ蛋白リン酸化状態への影響 第 32 回日本神経精神薬理学会 10, 17-18, 2002 (前橋)

Tanaka T., Wada K., Yamamori H, Tanaka S., Kudo T., Takeda M. Detection of oxidized protein in CSF for diagnosis of Alzheimer disease IPA Asia Pacific Regional Meeting Oct,23-26,2002. (Hong Kong)

田中稔久、山森英長、田中修二、和田健二、鈴木英雄、紙野晃人、工藤喬、大河内正康、谷井久志、小池裕子、以倉康充、貴田智之、松本均彦、福森亮雄、金山大祐、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 35 回精神神経系薬物治療研究報告会、2002.12.6、千里ライフサイエンスセンター

Urakami K., Arai H, Itoh N, Ishiguro K, Oono H, Nakashima K: Biological Diagnostic Markers in Alzheimer's Disease, 12 World Congress of Psychiatry Yokohama, Aug 24-29, 2002.

Wakutani Y, Watanabe K, Wada-Isoe, K. Urakami K., Saido TC, Iwatsubo T, and Nakashima K: Novel amyloid Precursor protein mutation (D678N) in a Japanese familial Alzheimer's disease. Hotel Osaka Sun Palace, Orbit Hall, October 5-6,2002

Urakami K.: Vascular factors in Alzheimer's disease. 1st French-Japan Alzheimer's disease meeting. Paris October 17, 2002.

Nunomura A., Chiba S, Kosaka K, Castellani RJ, Smith MA, Perry G. Neuronal

RNA oxidation in dementia with Lewy bodies. 43rd Annual Meeting of the Japanese Society of Neuropathology (15-17 May 2002, Tokyo) Neuropathology 22 (2): A25, 2002

Nunomura A, Chiba S, Kosaka K, Castellani R, Smith M, Perry G. Intraneuronal amyloid-beta and alpha-synuclein in dementia with Lewy bodies. 12th World Congress of Psychiatry (24-29 August 2002, Yokohama, Japan) Abstracts Vol.2: p 273, 2002

布村明彦、千葉 茂、小阪憲司. レビー小体型痴呆脳における神経細胞内βアミロイドとα-シヌクレインの共存. 第21回日本痴呆学会(平成14年10月3-4日、大阪) Dementia Japan 16(2): 139, 2002

服部英幸、岩井邦充、土屋 博、村井 裕、緒方 肇、西村幸晴、能村幸司、尾張祐樹、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に関する検討(第4報)。第44回日本老年医学会学術集会。東京、2002年6月15日

服部英幸、森本茂人、松本正幸: アルツハイマー型痴呆の口腔粘膜上皮タウ蛋白測定に関する検討。第21回日本痴呆学会。大阪、2002年10月3日

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

【書類名】 特許願
【整理番号】 R6659
【発明の名称】 Notch由来新規ポリペプチドおよびそれを用いたバイオマーカー並びに試薬
【提出日】 平成14年 7月 日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C07C 239/14
【発明者】

【住所又は居所】 大阪府吹田市山田丘2-2、D3
大阪大学大学院医学系研究科・ポストゲノム疾患解析学講座・プロセッシング異常疾患分野(精神医学)内

【氏名】 大河内 正康

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府吹田市山田丘2-2、D3
大阪大学大学院医学系研究科・ポストゲノム疾患解析学講座・プロセッシング異常疾患分野(精神医学)内

【氏名】 武田 雅俊
【特許出願人】
【識別番号】 801000061
【氏名又は名称】 財団法人大阪産業振興機構
【代理人】
【識別番号】 110000040
【氏名又は名称】 特許業務法人池内・佐藤アンドパートナーズ
【代表者】 池内 寛幸
【電話番号】 06-6135-6051
【手数料の表示】
【予納台帳番号】 139757
【納付金額】 21000

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

新聞掲載

アルツハイマー病の関連蛋白質発見・阪大チーム、早期診断に道期待
朝日新聞(2002) 10月14日朝刊、p3

ノッチ・ベータ蛋白質 発症診断マーカーに アルツハイマー病 阪大、産生量測定で

2. 日刊工業新聞(2002) 10月16日、p5

分担研究報告書

研究課題名：アルツハイマー病の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：アルツハイマー病病態過程に関わる新規診断マーカー物質の検討)

主任研究者 武田雅俊 大阪大学大学院医学系研究科・精神医学
研究協力者 大河内正康 大阪大学大学院医学系研究科・精神医学

研究要旨

Notch-1 蛋白はタイプ1 膜蛋白型・細胞表面レセプターであり、胎生期や成長後の細胞分化特に神経細胞の分化調節に必須の Notch シグナル伝達を担っている。古典的なシグナル伝達パラダイムとは異なり、Notch シグナル伝達はリガンド結合に起因した Notch レセプター分子の段階的な蛋白分解の結果、その細胞内部分が核移行し直接転写調節因子として働くことでシグナル伝達が達成される。

即ち、リガンド結合により Notch レセプターの Site-2 での”細胞外シェディング”が誘導され、その結果生じる膜貫通フラグメントである NEXT (Notch extracellular truncation)は Site-3 で膜内蛋白分解を受ける。この切断はアルツハイマー病βAPP のγ切断と似通っている。これらの蛋白分解は家族性アルツハイマー病の病原性蛋白であるプレセニリンの機能に依存することがわかっている。しかしながら、アミロイドβ蛋白 (Amyloid β-peptide; Aβ)と NICD (Notch intracellular cytoplasmic domain)を生じる切断部位の膜内トポロジーに違いがあるため、これらの切断は二つの異なる蛋白分解酵素によるものではないかと考えられていた。

我々は Notch-1 蛋白由来の新規ペプチド (Notch β-peptide; Nβ)が細胞外に分泌されることを明らかにした。そして、Nβの放出を直接規定する Notch-1 の新たな膜内蛋白分解部位として膜貫通部分のほぼ中央に Site-4 分解部位を同定した。この Site-4 は Aβを生成する切断と似ている。すなわち、Notch-1 の膜貫通部分を膜から分離させるためには従来報告されていた Site-3 における蛋白分解だけではなく、少なくとも2つ以上の蛋白分解の結果生じることを明らかにし”dual intramembrabous cleavage”という概念を導入した。

プレセニリンの病原性突然変異体は Aβのカルボキシル末端を延長する。面白いことに、これらの変異型プレセニリンは Site-4 切断の正確さに同様の影響を及ぼす。したがって、プレセニリン変異体は2つの全く異なる基質(Notch/βAPP)の同じような部位 (S4/γ40)での切断の正確さに同じような影響 (切断をよりカルボキシル末端側へずらす)を示すことが明らかになった。

さらに、他のプレセニリン依存性蛋白分解の基質である CD44 でも膜内蛋白分解の結果 Aβ/Nβのようなペプチドが”dual intramembrabous cleavage”の結果分泌されることを明らかにした。これらの類似点を考慮すると Notch/βAPP/CD44 は共通のプレセニリン (γ-セクレターゼ) を蛋白分解酵素とするメカニズムですくなくとも2回膜内で切断されていると考えられる。

A. 研究目的

現在のところアルツハイマー(AD)病研究において <細胞外に分泌された可溶性のアミロイドβペプチド(Amyloid β-peptide; Aβ)が不溶化し集積・蓄積する過程に AD 病の本質がある>とする Aβ仮説は最も有

力な病態仮説である。1992-3年ごろ、もともと生化学的に老人斑(senile plaque; SP)のきわめて不溶性の分画にフィブリルを形成して存在することが知られていた Aβが、可溶性のペプチドとして正常な細胞から生理的に分泌されていることが明らかになりこの矛盾を説明する論理的帰結として提唱され始めた。

ADの神経病理学的所見としてSPおよび神経原線維変化(neurofibrillary tangles; NFT)が特徴的である。しかし、SPがADに特異的な所見であるのに対し、NFTは広く神経変性疾患一般に見られる病変であることが明らかになっている。この事実は、SPがADの特異的な病理過程を反映した結果であるのに対し、NFTは神経変性の病理過程を反映した構造物であることを示唆している。

Aβはβ-Amyloid precursor protein (βAPP)の段階的な蛋白分解により生成される。家族性AD(familial AD; FAD)患者の原因遺伝子がpresenilins (PSs)およびβAPPに同定されている。これらの蛋白質の機能としてPSsは蛋白分解酵素(γ-secretase)であり、βAPPはその基質であると考えられており、実際この蛋白分解が直接的にAβが生成に関与する。これらの事実は、現時点におけるAD病理過程理解の上でのAβペプチドの重要性を位置づけている。

特殊な事情のない限り、全てのPSおよびβAPPの病原性突然変異体はβAPP-CTFsのγ切断部位の正確さへ影響を及ぼす。即ち、γ切断部位を2~3残基カルボキシル末端側へ移動させる。その結果として、主要なAβ40に比較した相対的なAβ42の量を増大させる。(1) Aβ42は試験管内で線維形成がAβ40に比較して迅速であること、(2) SPではAβ42が優位な蓄積分子であることがわかっており、FADではこのAβ42の比較的上昇が“可溶性のAβが不溶化し集積・蓄積する”原因であることを示唆している。

このSPにおけるAβ42の蓄積はADの大多数を占める孤発性AD (sporadic AD; SAD)でも例外のない主要な病変である。しかし、Aβ42が生体内に蓄積しやすい性質を持っているため、SAD脳内での“βAPP-CTFsのγ切断部位の正確さ”は変化しているのか？即ち、Aβ42産生は増大しているのか？は今まで検討できなかった。

また、Aβ42ペプチドは上記のように病理過程を規定する物質であると同時に、細胞外に分泌されるため理論的には最高のADのバイオ・マーカーでもある。しかし、Aβ42ペプチドの集積・蓄積しやすい性質のため、末梢や脳脊髄液(CSF)中のAβ42量はその産生を直接反映せず結果的にその目的の利用が難しいことが明らかになっている。

我々は最近Aβと似たようなペプチド群がAβと同じγ-secretaseメカニズムにより生成されていることを明らかにした。そして、それらのペプチドをAβの代わりに測定することで上記の<SAD脳内で

の“βAPP-CTFsのγ切断部位の正確さ”は変化しているのか？>という問題を解決し、ひいては<ADの早期あるいは予期診断マーカーとして利用する>可能性を考え始めている。

B. 研究方法

Notch-1蛋白およびCD44蛋白を発現するベクターを作成した。それらの細胞外シェディング後の産物でありプレセニリン依存的蛋白分解の基質であるNEXTおよびCD44ΔEを作成後その5'末端にFLAGエピトープタグを持ち3'末端に6X mycタグを持つコンストラクトを遺伝子組み換え技術により作成した。これらをプレセニリンの野生型、家族性アルツハイマー病の原因となる突然変異型、ドミナントネガティブ型を恒常的に発現させたK293細胞に安定的に発現させた。その細胞からのNotch-β peptideおよびCD44-β peptideの分泌をS35メチオニンを用いたパルスチェース法の上清を抗FLAG抗体で免疫沈降しSDSゲルで電気泳動法により分離後オートラジオグラフィで認識した。切断部位の特定はこの免疫沈降物をMALDI-TOF型質量分析器を用いて分子量を決定することで直接特定した。

C. 研究結果

Aβ様のNotch-1断片であるNotch-β (Nβ)やAβ様のCD44断片であるCD44-βが細胞外に分泌される。

我々はPS依存的γ-secretase蛋白分解の基質として知られていたNotch-1あるいはCD44の膜内蛋白分解を詳細に検討した。そして、その過程でAβ類似のNotch-1ペプチド(Notch-1 Aβ-like peptide; Nβ)あるいはCD44ペプチド(CD44 Aβ-like peptide; CD44β)がアミノ末端フラグメントとして細胞外に分泌されることを明らかにした。この事実はAβのような膜貫通部分を含むペプチドの分泌がβAPPからのAβの切り出し以外に自然界に少なくともいくつか存在することを示しており、我々はこれらのペプチドをアミロイドβ様ペプチド(Aβ-like peptide)と名付けた。現在のところ、我々は膜貫通部分を含むペプチドの分泌がPS依存性膜内蛋白分解の基質全てについて共通の現象ではないかと推測している。

これらのペプチドに機能があるかどうかは不明であるが、Aβの明確な生物学的機能が未だに確立されて

いないことは機能がない場合もあることを示唆している。その場合このアミロイドβ様ペプチドの分泌は膜貫通蛋白の膜貫通部分ペプチド分解メカニズムの一部ということになる。しかし、このようなペプチドの細胞外放出はシグナル伝達機構の研究者は予想していなかったので、期待していないような働きが将来明らかになる可能性がある。例えば、Notchシグナル伝達で上記のNβの機能が明らかになればNotchは最早local cell signalingメカニズムの枠を超えるシグナル伝達機構であるといわざるを得ない。

面白いことに、これらのペプチドのC末端はシグナル伝達分子としての機能を持つ細胞内CTFのN末端とは一致せず、膜内のさらにN端側での切断が放出の直前の切断である。即ち、Aβ様のペプチドを細胞外に放出する膜内蛋白分解は基本的に2つの蛋白分解から構成されており、我々はこの共通点に注目しこのメカニズムを<dual cleavage mechanism>と名付けた。この結果は蛋白質の膜貫通部分の分解および膜からの分離にはひょっとすると2つの蛋白分解が必要であることを示しているのかもしれない。

最近、Notchシグナル伝達の情報の送り手側細胞に発現するDSLファミリー蛋白に属するDelta-1やJagged-2もまたプレセニリン依存的蛋白分解の基質であることが報告された¹⁶⁾。この事実はlocal cell signalingであるNotchではシグナルが伝わったかどうか送り手側の細胞が認識している可能性を示唆しており、local cell signalingはinteractive communicationであると考ええると面白い。

Nβのカルボキシル末端側切断の正確さはAβのそれと同じようにFADに付随するPSの病原性突然変異の影響を受ける。

重要なことに、細胞外に分泌されるNotch-1ペプチドであるNβのカルボキシル末端を生成するγ切断部位の正確さはAβの場合と同様にFADを来たすPS突然変異体の影響を受け、2~4残基カルボキシル末端側へ移動することがわかった。即ち、最も量の多いNβ分子であるNβ1731(1731はマウスNotch-1蛋白のN端からのアミノ酸残基の順番をあらわす)量に比較したNβ1733-5量の増大が認められる。この事実はβAPPからAβを生成するγ-secretase機能と同じメカニズムの働きによりNβなどのアミロイド様ペプチドの分泌が起こっていることが強く示唆している。

D. 考察

現時点までの実験結果ではNβはAβのように集積・線維化したり、AD脳に蓄積したりしにくい性質を持つことが明らかになりつつある(大河内、新井;未発表データ)。したがって、末梢やCSF中のAβの代わりにNβあるいはNβ1733-35/Nβ1731を測定することにより、今まで不明であったSAD患者脳内γ-secretase活性あるいはAβ42/40比率の増大を正確に推定できる可能性がある。ADを引き起こす脳内Aβ蓄積は痴呆を発症する10年以上前から徐々に蓄積すると考えられており、その過程で脳内γ-secretase活性が上昇する、またはγ切断部位の正確さが影響を受けている可能性が考えられる。その場合、このアッセイを健常者に実施することで“痴呆を将来的に発症する可能性の高い人”をスクリーニングでき予期診断が可能になるかもしれない。さらに、どのような因子が*in vivo*の<γ-secretase活性が上昇する、またはγ切断部位の正確さが影響をされる>現象に影響を及ぼしているかという未知の問題を追求する足がかりができ、このことは疾病の予防につながる可能性がある。

E. 結論

我々はNotch-1蛋白由来の新規ペプチド(Notchβ-peptide; Nβ)が細胞外に分泌されることを明らかにした。そして、Nβの放出を直接規定するNotch-1の新たな膜内蛋白分解部位として膜貫通部分のほぼ中央にSite-4分解部位を同定した。このSite-4はAβを生成する切断と似ている。すなわち、Notch-1の膜貫通部分を膜から分離させるためには従来報告されていたSite-3における蛋白分解だけではなく、少なくとも2つ以上の蛋白分解の結果生じることを明らかにし“dual intramembrabous cleavage”という概念を導入した。

プレセニリンの病原性突然変異体はAβのカルボキシル末端を延長する。面白いことに、これらの変異型プレセニリンはSite-4切断の正確さに同様の影響を及ぼす。したがって、プレセニリン変異体は2つの全く異なる基質(Notch/βAPP)の同じような部位(S4/γ40)での切断の正確さに同じような影響(切断をよりカルボキシル末端側へずらす)を示すことが明らかになった。

さらに、他のプレセニリン依存性蛋白分解の基質であるCD44でも膜内蛋白分解の結果Aβ/Nβのようなペプチドが“dual intramembrabous cleavage”の結果分泌

されることを明らかにした。これらの類似点を考慮すると Notch/bAPP/CD44 は共通のプレセニリン (γ -セクレターゼ) を蛋白分解酵素とするメカニズムです。少なくとも2回膜内で切断されていると考えられる。

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

Okochi, M., Steiner, H., Fukumori, A., Tanii, H., Tomita, T., Tanaka, T., Iwatsubo, T., Kudo, T., Takeda, M., Haass, C.

Presenilins mediate a dual intramembranous gamma-secretase cleavage of Notch-1

EMBO J (2002) 21, 5408-5416.

Lammich, S., Okochi, M., Takeda, M., Kaether, C., Capell, A., Zimmer, A.K., Edbauer, D., Walter, J., Steiner, H., Haass, C.

Presenilin dependent intramembrane proteolysis of CD44 leads to the liberation of its intracellular domain and the secretion of an Abeta-like peptide.

J Biol Chem. (2002) 277, 44754-44759.

Yasuda, Y., Kudo, T., Katayama, T., Imaizumi, K., Yatera, M., Okochi, M., Yamamori, H., Matsumoto, N., Kida, T., Fukumori, A., Okumura, M., Tohyama, M., Takeda, M.

FAD-linked presenilin-1 mutants impede translation regulation under ER stress.

Biochem Biophys Res Commun. (2002) 296(2):313

Fluhrer, R., Multhaup, G., Schlicksupp, A., Okochi, M., Takeda, M., Lammich, S., Willem, M., Westmeyer, G., Bode, W., Walter, J., Haass, C.

Identification of a beta-secretase activity, which truncates amyloid beta-peptide after its presenilin dependent generation.

J Biol Chem. 2002 Dec 5 [epub ahead of print]

Kudo, T., Katayama, T., Imaizumi, K., Yasuda, Y., Yatera, M., Okochi, M., Tohyama, M., Takeda, M.

The Unfolded Protein Response Is Involved in the Pathology of Alzheimer's Disease.

Ann N Y Acad Sci. 2002 Nov;977:349-355.

大河内正康、武田雅俊 アルツハイマー病の生物学的診断および根治療法への挑戦。

日本医事新報 (2002) No.4086, 1-5.

大河内正康、武田雅俊 8th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders, Stockholm, Sweden, July 20-25, 2002. <Oral Session>.

Cognition and Dementia (2002) 1, 246-247.

大河内正康、武田雅俊 アルツハイマー病・アミロイド β 蛋白を生成するメカニズムはいくつかの他のペプチドを同時に生成している—新規 Notch- β ペプチドの発見および、そのアルツハイマー病予期診断マーカーとしての応用の可能性について

精神神経学雑誌 *in press*.

大河内正康、武田雅俊 アミロイド前駆体蛋白遺伝子の点突然変異の家族性アルツハイマー病からの分離。

精神医学文献事典 弘文堂 (2002)

2. 学会発表

Okochi, M., Takeda, M.

γ -Cleavage, unusual intramembranous endoproteolysis. International Symposium "Molecular Neurobiology of Alzheimer's Disease and Related Disorders" Program and Abstracts

Dementia Japan, (2002) 16, No. 2, pp 73.

Okochi, M., Takeda, M.

Colorful functions of unusual intramembranous endoproteolysis

XII World Congress of Psychiatry, Abstract, Vol.1, (2002) 110.

Okochi, M., Fukumori, A., Steiner, H., Kudo, T., Haass, C., Takeda, M.

A β 42/40 level upregulation and displacement level of endogenous presenilins by Alzheimer's disease associated mutants of artificial presenilin derivatives

XII World Congress of Psychiatry, Abstract, Vol.2, (2002) 29.

Fukumori, A., Okochi, M., Tanii, H., Haass, C., Kudo, T., Takeda, M.

A comparative study of APP and Notch intramembrane presenilin-dependent proteolysis
XII World Congress of Psychiatry, Abstract, Vol.2, (2002) 29.

Tanii, H., Okochi, M., Fukumori, A., Takeda, M.
Characterization of the intramembrane γ -secretase processing of APP
XII World Congress of Psychiatry, Abstract, Vol.2, (2002) 220.

Fukumori, A., Okochi, M., Tanii, H., Haass, C., Kida, T., Yasuda, Y., Matsumoto, N., Yamamori, H., Kudo, T., Steiner, H., Haass, C., Takeda, M.

A comparative study of APP and Notch intramembranous presenilin-dependent proteolysis.
Neurobiol. Aging, (2002) 23, No. 1S, pp. S210.

Tanii, H., Fukumori, A., Okochi, M., Takeda, M.
Characterization of the intramembrane γ -secretase processing of APP
Neurobiol. Aging, (2002) 23, No. 1S, pp. S392.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

【書類名】 特許願
【整理番号】 R 6 6 5 9
【発明の名称】 N o t c h由来新規ポリペプチドおよびそれを用いたバイオマーカー並びに試薬
【提出日】 平成14年 7月 日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C 0 7 C 2 3 9 / 1 4
【発明者】

【住所又は居所】 大阪府吹田市山田丘2-2、D 3
大阪大学大学院医学系研究科・ポストゲノム疾患解析学講座・プロセッシング異常疾患分野(精神医学) 内

【氏名】 大河内 正康

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府吹田市山田丘2-2、D 3
大阪大学大学院医学系研究科・ポストゲノム疾患解析学講座・プロセッシング異常疾患分野(精神医学) 内

【氏名】 武田 雅俊

【特許出願人】

【識別番号】 8 0 1 0 0 0 0 6 1

【氏名又は名称】 財団法人大阪産業振興機構

【代理人】

【識別番号】 1 1 0 0 0 0 0 4 0

【氏名又は名称】 特許業務法人池内・佐藤アンドパートナーズ

【代表者】 池内 寛幸

【電話番号】 0 6 - 6 1 3 5 - 6 0 5 1

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 1 3 9 7 5 7

【納付金額】 2 1 0 0 0

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

新聞掲載

アルツハイマー病の関連蛋白質発見・阪大チーム、早期診断に道期待

朝日新聞(2002) 10月14日朝刊、p3

ノッチ・ベータ蛋白質 発症診断マーカーに アルツハイマー病 阪大、産生量測定で

日刊工業新聞(2002) 10月16日、p5

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、アポトーシスに関連するタウ蛋白第1メチオニンの切断に注目し、髄液中の切断されたタウ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 の第1メチオニン切断化タウ蛋白が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、タウ蛋白、脳脊髄液、プロテオリシス

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-

ハイ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。現時点で臨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。

前年度、我々は酸化ストレスに注目し、脳脊髄液中の熱耐性分画から酸化蛋白の 1 種であるカルボニル化蛋白の検出をおこない、AD 患者由来の脳脊髄液内にはカルボニル化蛋白が多いことを報告した。今年度は、第1メチオニンの切断化されたタウ蛋白がアポトーシスに関連することと、AD 患者由来の脳脊髄液内における切断されたタウ蛋白について検討をおこなった。AD 脳ではカスパーゼの活性化と同時に内因性のカスパーゼ阻害因子が存在しており、XIAP (X-chromosome linked Inhibitor of Apoptosis)はその 1 つである。XIAP は神経細胞を含めて多くの組織に発現する蛋白であり、caspase-9 と caspase-3 の両方の酵素活性を抑制することが報告されているが、逆にこの XIAP を阻害する Smac/DIABLO などの存在が報告され、この結合ペプチド配列が Ala-X-Pro-X (X は任意のアミノ酸) であることが知られるようになった。第1メチオニン(Met)の切断化されたタウ蛋白がこの配列をみ出すことから、このようなタウ蛋白の修飾について検討をおこなった。

B. 研究方法

タウ蛋白と XIAP との直接結合の可能性を調べるために、仮説のようにタウ蛋白N末端のペプチドについて、1 番目の Met から始まるペプチド N-tau (MAEPRQEFVEMED) と 2 番目の Ala から始まるペプチド N-tau-delM (AEPRQEFVEMEDH) (どちらもアミノ酸 1 文字表記) との 2 つ (どちらも C 末端は Cys を添加) を作成し、これらを Cys 残基を利用してアルブミン(Imjet Albumin (Pierce))と結合させて ELISA の固層抗原として用いた。ポジティブコントロールとしては、XIAP に結合することが知られている caspase-9 の部分ペプチド Casp9(ATPFQEGLRFTDQLD)を作成し、同様にアルブミンと結合させて ELISA の固層抗原として用いた。そして、固層ペプチドと XIAP との結合を、1 次抗体に抗 XIAP 抗体を用い、2 次抗体に FITC ラベルの抗ウサギ抗体を用いた ELISA 法にて検討した。また、固層ペプチドへの結合の特異性を調べるために、溶液層に同じペプチドを添加して XIAP と固層との結合が抑制されるかどうかについて検討をおこなった。

次に、ペプチド N-tau-delM をウサギに免疫して抗血清を回収し、ペプチド N-tau-delM を結合させたアフィニティカラムへの吸着させ、さらにペプチド N-tau を結合させたアフィニティカラムを通過させ、断端への特異性のあるポリクローナル抗体を作成した。

脳脊髄液サンプルは AD 患者およびコントロールから採取した脳脊髄液を用いて検討をおこなった。500 μ l のサンプルに 5 μ 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 μ g/ml aprotinine、25 μ 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收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 μ 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をおこなった。

(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
と考える。

C. 研究結果

仮説に基づいてタウ蛋白の部分ペプチドと XIAP との結合を検討した。まず Casp9 ペプチドを固層抗原として用いたものでは、XIAP との結合の結果としての蛍光強度が XIAP の濃度依存的に増加した。次に、N-tau および N-tau-delM ペプチドを固層抗原として用いたものでは、N-tau では蛍光強度が低いままであったが、N-tau-delM では蛍光強度が XIAP の濃度依存的に増加し、Met の有無により結合が大きく変わることが示唆された。さらに、溶液層に同じペプチドを添加して XIAP と固層との結合が抑制されるかどうかについて検討をおこなった。Casp9 ペプチドを固層抗原として用いたものの溶液層に XIAP とともに Casp9 ペプチドを添加して固層への結合を検討したところ、溶液層に Casp9 ペプチドが存在しない場合は XIAP の濃度依存的に蛍光強度が増加する一方で、溶液層に Casp9 ペプチドが存在する場合は蛍光強度が変化せず低いままであった。そして、N-tau-delM ペプチドを固層抗原として用いたものの溶液層に XIAP とともに N-tau および N-tau-delM ペプチドを添加して固層への結合を検討したところ、溶液層にペプチドが何も存在しない場合および溶液層に N-tau ペプチドが存在する場合は XIAP の濃度依存的に蛍光強度が増加したが、一方溶液層に固層と同じ N-tau-delM ペプチドが存在する場合は蛍光強度の上昇は抑制された。以上のことから、明らかに XIAP は Met の除かれた N-tau-delM ペプチドと極めて特異的に結合することが示唆された。

次に、作成した N-tau-delM ペプチドの N 末端を特異的に認識する抗体を用いたウエスタンブロット法によって、まず AD 脳およびコントロール脳における発現を確認したところ、双方に 50~60kDa のところにバンドが認められたが、AD 脳における発現はコントロールに比し比較的多かった。さらに、AD 患者およびコントロール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、約 30kDa のところにバンドが認められた。もともと AD 患者由来の脳脊髄液中には約 30kDa まで部分分解されたタウ蛋白が存在しており、このバンドはこれに対応するものであった。この約 30kDa のバンドは AD 患者脳脊髄液中に強く染色された。