

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。ここからさらに、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かが、前年度からの研究のテーマであった。タウ蛋白はいくつかの蛋白修飾を受け、リン酸化は重要な修飾の1つであるが、リン酸化タウ蛋白のアッセイをおこないアルツハイマー病の鑑別に用いる試みは他施設にてすでに先行する研究がある。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、我々はこのN末端のMetの切断はリボソームなどに局在するメチオニンアミノペプチダーゼによって引き起こされているのではないかと想定している。リボソームは蛋白合成装置であるが、タウ蛋白のリン酸化を伴う神経細胞死を誘導するリボトキシックストレスの場であり、このリボソームへの酸化ストレスがADに特徴的な神経細胞死を引き出しているのではないかとという考えから、リボソームに局在するメチオニンアミノペプチダーゼが何らかの異常な活性化を引き起こされているのではないかと考えているためである。機序はともかく、AD脳内およびAD患者脳脊髄中にこのような切断を受けたタウ蛋白が存在することは極めて興味深く、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。今回の研究では、おそらくリボトキシックストレスに関連すると想定される第1メチオニンの切断を受けたタウ蛋白がAD脳内およびAD患者脳脊髄中に存在することが判明した。今後はその約30 kDaの切断を受けたタウ蛋白が、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

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

2. 学会発表

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 Worrd 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 fo mild cognitive dementia and Alzheimer disease Biological markers for Alzheimer disease (Abst.) XIIth Worrd 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

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。

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）

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：アルツハイマー病における髄液中 WGA を結合した糖たんぱく質の測定)

分担研究者 浦上克哉*

分担研究協力者：谷口美也子*、和田健二**、涌谷陽介**、中島健二**

* 鳥取大学医学部保健学科生体制御学

** 鳥取大学医学部脳神経内科

研究要旨

アルツハイマー病（AD）の髄液中診断マーカーとして、現在タウタンパク質、アミロイドβタンパク質（Aβ）、リン酸化タウタンパク質が用いられているが、我々は、さらに感度、特異性がともに高い診断マーカーとなり得る髄液中タンパク質の検索を行った。WGA（小麦胚芽レクチン, Wheat Germ Agglutinin）は特異的な糖鎖に結合するレクチンの一種であり、250kDa の WGA 結合糖タンパク質が AD の髄液中で減少しているという報告がある。そこで我々は、他の WGA 結合糖タンパク質においても検討した結果、AD の髄液中において、AD 以外の髄液に対して有意に減少している 2 種類の WGA 結合タンパク質と、減少している傾向が見られる 1 種の糖タンパク質を見いだした。そのうちの 1 種においては症例数は少ないが DLBD における糖タンパク量は、若干 AD よりも高値を示す傾向がみられ、鑑別診断が可能となり得る可能性が示唆された。これらの WGA 結合糖タンパクの減少は、タンパク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る。また、さらに症例数を増やして検討することによって、WGA 結合糖タンパクは感度・特異性の高い、AD の診断マーカーとして非常に有効なタンパクとなりうる可能性が考えられる。

キーワード：アルツハイマー病、診断マーカー、髄液、WGA、グリコシレーション
(グリコシル化)

A. 研究目的

アルツハイマー病（AD）の髄液中において、WGA に結合する 250kDa の糖タンパク質の減少が報告されている¹⁾。WGA は特異的な糖鎖に結合するレクチンの一種である。レクチン結合タンパクの減少は、そのタンパク自身が減少している、あるいはグ

リコシレーションが低下していると考えられる。後者の場合、他の WGA 結合糖タンパク質においても AD で減少している可能性がある。また最近、タウタンパクはそのリン酸化とグリコシレーションとの間にバランスが保たれているという報告がなされた²⁾。AD ではタウタンパクのリン酸化が亢

進していることから、グリコシレーションは低下していると考えられ、他のタンパクにおいてもグリコシル化が変化している可能性が考えられる。現在 AD の診断マーカーとしては、リン酸化タウタンパク³⁾、総タウタンパクとアミロイドβタンパク (Aβ)⁴⁾ が有効とされている。しかし、大脳基底核変性症 (CBD)・進行性核上性変性症 (PSP) との鑑別診断は難しく、より感度・特異性の高い診断マーカーの検討が必要とされている^{5, 6)}。そこで、我々は WGA 結合糖タンパクが有効な診断マーカーとなりうるのではないかと考え、AD の髄液中における WGA 結合糖タンパク量の検索を行った。

B. 研究方法

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。総タンパク 5mg にあたる髄液を 5-20% gradient gel にアプライして SDS-PAGE で電気泳動して PVDF メンブレンにブロッティングし、一次抗体に WGA-Biotin、二次抗体はアルカリホスファターゼ標識 Streptavidin を反応させ、Western Blue で発色したバンドを検討した。各疾患の診断は詳細な問診、内科学的診察、神経学的診察、高次機能検査、画像検査 (CT, MRI, SPECT) などを行い、以下の診断基準を参考にして行った。AD では DSM-IV および NINCDS-ADRDA の診断基準を、VD で NINDS-AIREN の診断基準

を、正常圧水頭症 (NPH)、レビー小体型痴呆 (DLBD) は、クロイツフェルトヤコブ病 (CJD)、PSP は NINDS-SPSP の診断基準、CBD では Rinne、森松らの診断基準を満足するものとした。

C. 結果および考察

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。

今回、ウエスタンブロット法により髄液中の WGA 結合糖タンパクを検出し、さらに AD 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、何らかの意義があるのかもしれない。

WGA 結合糖タンパクの検出の感度を上げるため、WGA アフィニティーカラムを用いて検出精度の向上を行う予定である。また症例を増やし、今回減少の見られた3種のタンパクにおいて、AD群と non-AD群との比較、さらにAD群とその他の痴呆症状を示す症例群との比較検討、さらにその糖タンパクの同定を行う予定である。

D. まとめ

髄液中 WGA と結合する糖タンパクの測定は感度・特異性の高い AD の診断マーカーとなりうる可能性が示唆された。

E. 健康危険情報

特記すべきことなし。

F. 文献

- 1) Lisa RF, et al: Wheat Germ Agglutinin-binding glycoproteins are decreased in Alzheimer's disease cerebrospinal fluid. *J. Neurochem.* 79: 1022-1026, 2001.
- 2) Tony L, et al: Evidence of balance between phosphorylation and O-GlcNAc glycosylation of Tau proteins – a role in nuclear localization. *Biochim. Biophys. Acta* 1619: 167-176, 2003.
- 3) Itoh N, et al: Large-scale, multicenter study of cerebrospinal fluid tau protein phosphorylated at serine 199 for the

antemortem diagnosis of Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 50: 150-156, 2001.

4) Takeda M, et al: Basic and clinical studies on the measurement of β -amyloid(1-42) in cerebrospinal fluid as a diagnostic maker for Alzheimer's disease and related disorders: Multi center study in Japan. *Psychogeriatrics* 1: 56-63, 2001.

5) Urakami K, et al: Diagnostic significance of tau protein in cerebrospinal fluid from patients with corticobasal degeneration or progressive supranuclear palsy. *J Neurol Sci* 183: 95-98, 2001.

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 浦上克哉, 谷口美也子, 涌谷陽介, 中島健二. アルツハイマー病研究の新展開. *現代医療* 34: 97-102, 2002.

2) 人見裕江, 岩崎尚子, 中村陽子, 小河孝則, 畝博, 郷木義子, 岡京子, 徳山ちえみ, 谷垣静子, 宮林郁子, 浦上克哉, 稲光哲明, 矢倉紀子. 地域で暮らしている痴呆性高齢者の生活の満足度. *米子医誌* 53: 79-88, 2002.

3) 人見裕江, 中村陽子, 小河孝則, 畝博, 森千佳, 浜田美穂, 岩崎祥子, 郷木義子, 岡京子, 徳山ちえみ, 谷垣静子, 宮林郁子, 浦上克哉, 稲光哲明, 矢倉紀子. 在宅痴呆性高齢者の介護負担感と介護保険サービス利用に関する研究. *米子医誌* 53: 89-97, 2002.

4) 浦上克哉. アルツハイマー病—診断のポイントと薬物療法—. *日本総合診療医学会会誌* 7: 37, 2002.

5) 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.

6) 浦上克哉、谷口美也子、佐久間研司、渡辺保裕、古和久典、和田健二、涌谷陽介、山形薫、田中弘道、中島健二：アルツハイマー病における塩酸ドネペジルの有効性とアセチルコリンレセプター遺伝子多型との関連の検討。内科専門医会誌 14: 424-428, 2002.

7) 浦上克哉、谷口美也子、佐久間研司、山形薫、和田健二、涌谷陽介、中島健二、井上仁：アルツハイマー型痴呆の遺伝子多型と簡易スクリーニング法。老年精神医学雑誌 13: 5-10, 2002.

8) 浦上克哉：アルツハイマー病の遺伝子多型と簡易スクリーニング法。Clinic Magazine 6: 50, 2002.

9) 浦上克哉、涌谷陽介、中島健二：アルツハイマー病の分子医学。Molecular Medicine 39(5): 556-561, 2002.

10) 浦上克哉、谷口美也子、山形薫、和田健二、涌谷陽介、中島健二：アルツハイマー病の遺伝素因の解析。クリニカ 29(3)

:53-57, 2002.

11) 笠木健、浦上克哉、上田悦子、谷口美也子、小島みどり、栗原昭一、森岡保、谷口治：乳果オリゴ糖配合即席みそが男子・女子学生の便通および腸内菌叢に及ぼす影響。米子医誌 53(2): 151-161, 2002.

12) 和田健二、涌谷陽介、浦上克哉、竹島多賀夫、中島健二：記銘力障害で発症し一側優位の失行が顕著化した進行性痴呆症の一例。分子精神医学 2: 85-86, 2002.

13) 古和久典、中曾一裕、涌谷陽介、安井健一、和田健二、足立芳樹、竹島多賀夫、浦上克哉、中島健二：痴呆症患者におけるメチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素遺伝子多型の検討。分子精神医学 2: 87-88, 2002.

14) 浦上克哉：アルツハイマー型痴呆患者の機能維持に関するドネペジル 1 年間によるプラセボ対象比較試験。Worldwide Evidence with Donepezil 4: 1-6, 2002.

15) 浦上克哉：日常診断に役立つアルツハイマー病の簡易診断法と治療。ふしみ医報 506(11): 106, 2002.

16) 浦上克哉：日常診断に役立つアルツハイマー病の簡易診断法と治療。徳山医師会報 482: 13, 2002.

17) 熊坂一成、杉原尚、木村素子、調輝男、作田建夫、松下明、尾鼻康朗、桑島実、松田信義、阿多雄之、浦上克哉、吉永泰彦、佐藤穰：第 24 回認定内科専門医会 中国支部教育セミナーのまとめ。内科専門医会誌 14(3): 2002

18) 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.

19) 浦上克哉、谷口美也子、石黒幸一、荒井啓行、伊藤伸朗、和田健二、涌谷陽介、中島健二：アルツハイマー病の生化学的検査—タウ蛋白—。診断と治療 91：269-272、2003.

20) 浦上克哉、谷口美也子、佐久間研司、和田健二、涌谷陽介、中島健二：アルツハイマー病へのアプローチ—内科的治療。J Clin Rehabilitation 12：116-119、2003.

2. 学会発表

国内学会

1) 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.

2) 浦上克哉、中島健二：生化学的パラメーター。シンポジウム S6 大脳皮質基底核編性症と進行性核上性麻痺をめぐって。第 43 回日本神経学会総会 札幌 2002 年 5 月 29-31 日

3) 浦上克哉、井上仁、谷口美也子、和田健二、涌谷陽介、中島健二：アルツハイマー病早期発見のためのコンピューター使用簡易スクリーニングテストの開発。第 43 回日本神経学会総会 札幌 2002 年 5 月 29-31 日

4) 谷口美也子、二宮治明、大野耕策、浦上克哉：ニーマンピック病 C 型モデルマウス脳におけるガングリオシド GM1・GM2 蓄積。第 43 回日本神経学会総会 札幌 2002 年 5 月 29-31 日

5) 涌谷陽介、和田健二、山形薫、足立芳樹、中島健二、荒井啓行、佐々木英忠、樋口進、浦上克哉：アルツハイマー型痴呆症におけるニカストリン遺伝子の検討。第 43 回日本神経学会総会 札幌 2002 年 5 月 29-31 日

6) 浦上克哉、谷口美也子、和田健二、涌谷陽介、中島健二：大脳皮質基底核変性症と進行性核上性麻痺の鑑別のための生物学的診断マーカーの検討。第 44 回日本老年医学会総会 東京 2002 年 6 月 12-14 日

7) 和田健二、田中稔久、竹島多賀夫、涌谷陽介、浦上克哉、武田雅俊、中島健二：神経栄養因子の peptidyltransferase 阻害剤誘発による神経細胞の抑制。第 44 回日本老年医学会総会 東京 2002 年 6 月 12-14 日

8) 遠藤英俊、難波吉男、数井裕光、櫻井孝、浦上克哉、梅垣宏行：一般病床における痴呆性高齢者のクリニカルパスに関する検討。第 4 回医療マネジメント学会学術総会 京都 2002 年 6 月 28-29 日

9) 浦上克哉：アルツハイマー病と鑑別を必要とする痴呆性疾患の髄液診断。第 21 回日本痴呆学会サテライトシンポジウム I 大阪 2002 年 10 月 3 日。

10) 浦上克哉、谷口美也子、井上仁、和田健二、涌谷陽介、中島健二：アルツハイマー病早期診断のためのタッチパネル式コンピューターを用いた簡易スクリーニング方の有用性。第 21 回日本痴呆学会 大阪 2002 年 10 月 3 日

11) 谷口美也子、二宮治明、大野耕策、浦上克哉：ニーマン・ピック C 型モデルマウス脳におけるガングリオシド GM1・GM2 蓄積。第 21 回日本痴呆学会 大阪 2002 年 10 月 3 日

12) 和田健二、田中稔久、竹島多賀夫、涌谷陽介、浦上克哉、武田雅俊、中島健二：神経栄養因子によるタウ蛋白過剰リン酸化抑制の検討。第 21 回日本痴呆学会 大阪 2002 年 10 月 4 日

13) 涌谷陽介、古和久典、楠見公義、和田健二、山形薫、中曾一裕、足立芳樹、竹島多賀

夫、浦上克哉、中島健二：アルツハイマー病
痴呆におけるメチレンテトラヒドロキシ葉
酸還元酵素（MRTFR）遺伝子多型の検討。第
21回日本痴呆学会 大阪 2002年10月4日
14) 井上仁、浦上克哉、長谷川伸作、陶山昭
彦、飯塚舜介：痴呆の早期発見のためのコン
ピュータスクリーニングシステムの開発とそ
の評価。第22回医療情報学連合大会 2002
年11月

国際学会

- 1) 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.
- 2) 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
- 3) Urakami K: Vascular factors in Alzheimer's disease. 1st French-Japan Alzheimer's disease meeting. Paris October 17, 2002.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

[発明の名称] 物忘れ自己診断システムおよびその方法、装置 [出願番号]特願
2001-281442 [出願日]平成13年9月17日

厚生労働科学研究費補助金（効果的医療技術の確立推進研究事業）
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
分担研究協力者 布村 明彦 旭川医科大学医学部精神医学講座講師

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普遍的な変化を解明することが重要である。われわれは、AD剖検脳を用いて、AD脳の神経細胞内で酸化傷害のマーカーである8-hydroxyguanosine (8OHG)が対照脳に比べて増加していることを明らかにし、また、神経細胞内8OHG免疫反応性増強が、老人斑沈着の軽度な例や罹病期間の短い例においてより顕著であることを報告した。さらに、AD脳のモデルであるダウン症候群脳において、神経細胞内8OHGの出現が老人斑沈着に先行することも報告した。これらに加えて、本年度は、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8OHGが増加していることを観察した。以上の結果から、神経細胞の酸化傷害は、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る。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。今後、AD患者の尿や血液を用いて酸化傷害マーカーの検出が可能かどうか検討を進める予定である。

キーワード：アルツハイマー病、8-hydroxyguanosine、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重要である。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 β 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い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いるが、われわれは、AD脳の神経細胞内で核酸の酸化傷害のマーカーで

ある 8-hydroxyguanosine (8OHG) が対照脳に比べて増加していることを明らかにした (Nunomura A. et al. *J Neurosci* 19:1959-64, 1999)。また、AD 脳および AD 脳のモデルであるダウン症候群脳を用いた検討から、神経細胞内 8OHG の増加は AD の変性過程の早期段階に生じることが示唆された (Nunomura A. et al. *J Neuropathol Exp Neurol* 59:1011-7, 2000; Nunomura A. et al. *J Neuropathol Exp Neurol* 60:759-7, 2001)。そこで、本研究では、神経細胞内 8OHG の増加が AD 型の脳病理に普遍的な変化であるかどうかを解明することを目的に、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ける神経細胞内 8OHG 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家族性 AD 脳 13 例 (年齢 47~81 歳、平均 58 歳; プレセニリン-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)、プレセニリン-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 8OHG 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 8OHG 免疫反応強度 (Optical density) 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):1959-64, 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

大脳皮質における神経細胞内 8OHG は、家族性 AD 脳およびレビー小体型痴呆脳において広範に出現していた。一方、対照群脳における神経細胞内 8OHG 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 8OHG 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、プレセニリン-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 8OHG 免疫反応が認められた。

D. 考察

以上の結果から、AD脳における酸化傷は、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、AD型の脳病理に普遍的な変化であると考えられる。家族性ADの遺伝子変異を有するが痴呆発症前に死亡した症例でも既に神経細胞内の酸化傷が認められたことは、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傷が老人斑形成に先行して認められるという報告(Pratico D. et al. J. Neurosci. 21(12):4183-4187, 2001)と合致しており、酸化傷はAD型の脳病理において普遍的かつ、早期の変化であることを強く示唆するものである。

したがって、酸化傷のマーカーは、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。酸化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(孤発性・家族性のAD脳、ダウン症候群脳、およびレビー小体型痴呆脳)の検討から示唆された。今後、ADやMCI症例の尿や血液などを用いてADの早期診断・発症前診断における酸化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, 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)

Nunomura A, Chiba S, Takeda A, Smith MA, Perry G. Oxidative stress in Alzheimer disease: the earliest cytological and biochemical feature. In: *Molecular neurobiology of Alzheimer diseases and related disorders*, Takeda M (Ed) Karger Japan, Tokyo, 2003 (in press)

布村明彦、千葉 茂、Smith MA、Perry G. アルツハイマー病と酸化ストレス. 老年期痴呆研究会誌 13: 2003 (in press)

2. 学会発表

43rd Annual Meeting of the Japanese Society of Neuropathology (15-17 May 2002, Tokyo)

Nunomura A, Chiba S, Kosaka K, Castellani RJ, Smith MA, Perry G. Neuronal RNA oxidation in dementia with Lewy bodies. *Neuropathology* 22 (2): A25, 2002

17th Annual Meeting of the Japanese Psychogeriatric Society (27-28 June 2002, Kanazawa, Japan)

Takada T, Tamura Y, Nunomura A, Chiba S. Long-term efficacy of donepezil in the treatment of Alzheimer's disease: a case with sustained improvement in the ADAS-Jcog. *Psychogeriatrics* 2(3): 206, 2002

17th Annual Meeting of the Japanese Psychogeriatric Society (27-28 June 2002, Kanazawa, Japan)

Tamura Y, Tabata K, Ishimaru Y, Ishimoto T, Takada T, Nunomura A, Inomata M, Naoe J, Chiba S. Effects of donepezil on quantitative EEG findings in patients with Alzheimer's disease. *Psychogeriatrics* 2(3): 221, 2002

12th World Congress of Psychiatry (24-29 August 2002, Yokohama, Japan)

Nunomura A, Chiba S, Kosaka K, Castellani R, Smith M, Perry G. Intraneuronal amyloid-beta and alpha-synuclein in dementia with Lewy bodies. *Abstracts Vol.2: p 273, 2002*

第21回日本痴呆学会 (平成14年10月3-4日、大阪)

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. *Dementia Japan* 16(2): 139, 2002

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

遺伝子多型を用いたアルツハイマー型痴呆の診断と評価の検討

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) ϵ 4 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。本年度は、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、apoE ϵ 4 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 apoE ϵ 4、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。

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多型、ブチルコリンエステラーゼ K 変異遺伝子

研究協力者

森 悦郎、橋本 衛 (兵庫県立姫路循環器病センター)
保田 稔 (神戸大学)
今村 徹 (新潟医療福祉大学)
博野信次 (看護大学)

A. 研究目的

昨年度の本研究では、①アルツハイマー型痴呆 (DAT) とレビー小体を伴う痴呆 (DLB) においてアポリポ蛋白 E 遺伝子(apoE) ϵ 4 アレルが有意に高頻度で出現すること、②apoE プロモーター領域-491A/T 多型の A アレルが DAT において有意に高頻度で認めること、③DAT の海馬・扁桃体体積は apoE ϵ 4 アレルの数に対

して負の相関が認められ 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あることなどを研究の成果として発表した。

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、本年度は-491A/T 多型以外の apoE プロモーター領域のほかの 3 箇所 (-427C/T、-219G/T、+113C/T) の遺伝子多型と DAT との関連について検討した。

また、日本で DAT に唯一適応のある塩酸ドネペジルにおいてアセチルコリン系が活性化した結果みられる副作用（消化器症状、循環器症状など）が 5%前後で出現することが知られている。これらの副作用の出現の有無を遺伝子多型の違いで投与前に診断できれば、患者への負担を軽減するばかりでなく、医療経済への効果をもたらせるものと考え、ブチルコリンエステラーゼ K 変異遺伝子 (BChE-K) と塩酸ドネペジル投与による DAT の生体反応・副作用出現との関連について検討した。

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】

- ・ アルツハイマー型痴呆 (DAT)
NINCDS-ADRDA の probable AD
- ・ 健常高齢者 (Cont) : MMSE 27 点以上で自由再生が 2/3 以上で再生できないものに関して 3 択による再認が可能であったもの

【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 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】

前記の諸検査を行い、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。

(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。

C. 研究結果

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

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。発症年齢別にみると、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 apoEε4 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 apoEε4 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。

【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。

D. 考察

DAT 発症の危険因子として apoEε4 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。

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くない。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 apoEε4 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。しかし、前年度の研究では A アリルの出現は DAT で有意に増加は認められたものの apoEε4 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みられたために、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 apoEε4 と密接な関係があることから、apoEε4 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、apoEε4 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。

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を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。今後は、症例を重ねながら BChE-K の用量依存性はないか、副作用の特徴はないか、認知機能改善への効果はどうかについて更なる検討を加えるとともに、BChE-K 以外の遺伝子や生物学的指標についても検討する必要があると考える。

E. 結論

- ① apoE プロモーター領域-219 T アリルは DAT において有意に高頻度に認めた。
- ② apoE プロモーター領域-219 T アリルは発症年齢 65 歳前後で比較すると、この傾向はより顕著に認めた。
- ③ DAT 発症は apoE プロモーター領域-491 で A アリルを、-219 で T アリルを homo で有する apoEε4 carrier において顕著であった。
- ④ apoE プロモーター領域-427C/T 多型、および+113C/T 多型の各アリルの頻度は DAT において差異を認めなかった。
- ⑤ 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により 27%で副作用を認めた。
- ⑥ BChE-K carrier であることと副作用の出現との関連は否定的であった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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) 谷向 知. 痴呆の鑑別診断. *BioClin* 17(9) 768-772, 2002
- 3) 谷向 知. 痴呆性疾患の診療の現状と展望. *医療* 56(10): 583-588, 2002

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

厚生科学研究費補助金（効果的医療技術の確立推進臨床研究事業）
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：前年度の研究においてアルツハイマー病例では血管性痴呆例、対照例に比し口腔上皮 tau 蛋白量が有意に高値を示し、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。今年度は更に症例を増やして検討を行った他、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 を行なった。その結果検討した 7 種類の神経細胞タウ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。非リン酸化タウに対する抗体は細胞体に陽性像をみとめ、リン酸化タウに対する抗体は核に陽性となった。培養角化細胞を用いて神経細胞タウ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。以上の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

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 β 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 β 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。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。

今年度は昨年の結果をうけて、より症例数を増やして検討を行なうとともに、中枢神経組織と上皮組織とのタウ蛋白の構造の共通性、一般臓器でのタウ蛋白の免疫組織学的検討をおこなった。

研究方法

口腔粘膜上皮タウ蛋白測定

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。前処置法は前年度の報告書に記したとおりである。ELISA キット (フィノスカラー hTAU, ニプロ) によりタウ蛋白量を測定し、BCA protein assay kit (PIERCE) にて総蛋白量を測定しタウ蛋白量の総蛋白量に対する比率をタウ蛋白濃度として各群間で比較した。

重層扁平上皮の免疫組織学的検討

口腔粘膜タウ蛋白の性状を調べる目的で、神経細胞タウ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。口腔上皮は重層扁平上皮 (角化細胞) よりなり、食道粘膜上皮と共通であるので代用することに支障はないと考えられる。剖検例より得られた食道粘膜を若年対照例、高齢の 2 群に分けてそれぞれについて LSAB 法にて免疫染色を行なった。さらにアルツハイマー例 2 例についても同様に食道粘膜を用いて検討した。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タウ蛋白に対する抗体は 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。

一般臓器組織の免疫組織学的検討

生前に痴呆の認められなかった剖検例より肺胞上皮、心筋、肝細胞、胃上皮のパラフィン切片に対して BT-2, AT270 を用いて免疫染色をおこなった。

RT-PCR 法による培養角化細胞タウ蛋白 RNA の検討

口腔上皮は角化細胞より形成されている。培養角化細胞を用いて神経細胞タウ蛋白と上皮内タウ蛋白の遺伝子レベルでの相同性について検討した。RNeasy mini kit (Qiagen) 培養角化細胞 (Cell system) の Total RNA を抽出した後、a First-Strand Synthesis kit for RT-PCR (Invitrogen) および Platinum PCR SuperMix (Invitrogen) を用いて RT-PCR をおこなった。プライマーは次のようなデザインでおこなった。

tau-1112 (Exon 11,12 の検出用)

5'-GCTCATTAGGCAACATCCATCA-3'
(sense)

5'-TCGACTGGACTCTGTCCTTGAA-3'
(antisense)

tau-rep (リポート部位の検出用)

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)

(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。

研究結果

タウ蛋白濃度測定・群間比較

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

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

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。

PCR の結果

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。

考察

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。今回は更に症例を増やして検討したところ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がえられた。

今年度は神経細胞タウ蛋白と口腔上皮タウ蛋白の共通性について検討した。その結果、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。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 Kenner¹, Luebke²らが報告しており、更に Gu³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³。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