

るが、CAA の臨床像は出血ばかりでなく、痴呆等の非出血性の症候を呈することも多いことを示している。高血圧が CAA 関連脳出血の誘因となることを予想したが、出血群と非出血群とで高血圧の頻度に有意差を認めなかった。一方、軽微な頭部外傷が CAA 関連脳出血の誘因になる可能性が考えられた。

また、CAA 関連血管変化（内膜肥厚/血管壁重複/微小動脈瘤形成/フィブリノイド壊死など）を病理学的基盤とし、CAA 関連の大出血のみならず皮質の微小出血や小梗塞を生ずるものと考えられた。こうした皮質の小血管性病変を画像上で検出することは、診断や脳出血発症を予測する上で有用と考えられる。

APOE 遺伝子型の関連では、欧米で報告されている脳出血へのε2 アリルの関与は明らかではなかった。日本人一般人口においてε2 アリルの頻度は欧米と比較して低く、ε2 アリルの出血への影響を日本人において検証するためには、更に多数例での検討が必要と思われる。

E. 結論

頭部外傷は CAA 関連脳出血の誘因になる可能性がある。脳出血群では CAA 関連血管変化を共通の基盤として皮質微小出血や小梗塞が高率にみられ、これらの画像上の検出は診断や脳出血発症を予測する有用なマーカーとなりうる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamada M, Sodeyama N, Itoh Y, Suematsu N, Otomo E, Matsushita M, Mizusawa H. No association of paraoxonase genotype or atherosclerosis with cerebral amyloid angiopathy. *Stroke* 33:896-900, 2002.
- 2) Nishida Y, Yamada M, Hara K, Tsunemi T, Yamawaki M, Shimokawa R, Okeda R, Tsutsumi T, Mizusawa H. Creutzfeldt-Jakob disease after Janneta's operation with cadaveric dura mater graft: initial manifestations related to the grafted site. *J*

Neurol 249:480-483, 2002.

- 3) Nanri K, Utsumi H, Yamada M, Takada Y, Matsumura A, Kougo K, Sekine S, Ogawa D, Toyoda M. Transthyretin Val 107 in a Japanese patient with familial amyloid polyneuropathy. *J Neurol Sci* 198:93-96, 2002.

- 4) Yamada M. Risk factors for cerebral amyloid angiopathy in the elderly. *Ann N Y Acad Sci* 977:37-44, 2002.

- 5) Shiraishi A, Mizusawa H, Yamada M. Early and persistent sensory-psychiatric symptoms in an inherited prion disease with a PrP P105L mutation. *J Neurol* 249:1740-1741, 2002.

- 6) Yamada M, Sodeyama N, Itoh Y, Takahashi A, Otomo E, Matsushita M, Mizusawa H. Association of neprilysin polymorphism with cerebral amyloid angiopathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* (In Press).

- 7) 山下真理子、山本 徹、山田正仁、沖野惣一、藤田拓司：痴呆を呈し、毛細血管に高度のβアミロイド沈着をみとめた孤発性脳アミロイドアンギオパチーの1剖検例。 *臨床神経* 42:530-535, 2002.

- 8) Grammas P, Yamada M, Zlokovic B. The cerebrovasculature: a key player in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Alzheimer Dis* 4:217-223, 2002.

- 9) Yamada M. Cerebral amyloid angiopathy: clinicopathological features with molecular basis. In: Sinha KK, Chandra P, ed. *Advances in Clinical Neuroscience*, Vol. 12, Ranchi, Catholic Press, pp.193-217, 2002

2. 学会発表

- 1) Yamada M. Risk factors for cerebral amyloid angiopathy in the elderly. Third World Congress on Vascular Factors in Alzheimer's disease. Kyoto, April 7 - 10, 2002.

- 2) Yamada M, Sodeyama N, Mizusawa H, Itoh Y, Takahashi A, Otomo E, Matsushita M. Risk factors for sporadic cerebral amyloid angiopathy. The 8th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders. Stockholm, July 20-25, 2002.

3) Yamada M. Pathomechanisms of Neuromuscular Disorders in AL and TTR amyloidoses. The 5th International Symposium on Familial Amyloidotic Polyneuropathy and Other Transthyretin Related Disorders. Matsumoto, September 24-27, 2002.

4) Yamada M. Risk factors for sporadic cerebral amyloid angiopathy in the elderly. The 2nd International Conference on Cerebral Amyloid Angiopathy (CAA). Newcastle upon Tyne, UK,

December 4 - 6, 2002.

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。

厚生労働科学研究費補助金 (特定疾患対策研究事業)
 アミロイドーシスに関する調査研究 分担研究報告書

ニコチンによるアルツハイマー病 β アミロイド線維の分解作用

分担研究者 山田正仁 金沢大学大学院脳老化・神経病態学 (神経内科)

共同研究者 小野賢二郎*、長谷川一浩**、内木宏延**

*金沢大学大学院脳老化・神経病態学 (神経内科)、

**福井医科大学第2病理学

研究要旨 β アミロイド線維 (fA β) 形成・分解に対するニコチンの作用を明らかにする目的で、ニコチンの試験管内における fA β 形成及び線維伸長の抑制作用、既存の fA β に対する分解作用を蛍光色素チオフラビン T (ThT) 法および電顕を用いて調べた。ニコチンは、濃度依存性に fA β 形成及び線維伸長を抑制し、さらに既存の fA β に対する分解作用を認めた。また、ニコチンと N-メチルピロリジンがほぼ同等に濃度依存性に fA β の形成抑制及び分解作用を示した。ニコチンは、アルツハイマー病における神経細胞変性、特に A β 蓄積の防御に向け、有力な基本分子となる可能性がある。

A. 研究目的

近年、喫煙のアルツハイマー病に対する保護効果が多く臨床研究で報告されている。今回我々は、タバコの主成分であるニコチンの A β 蛋白からの fA β 形成や伸長の抑制作用だけでなく、既存の fA β に対する分解作用も明らかにし、さらにその作用は N-メチルピロリジンに起因することを明らかにした。

B. 研究方法

pH 7.5、37°Cにおいて、ニコチン、ピリジン、及び N-メチルピロリジンが示す fA β (1-40) および fA β (1-42) の形成・伸長抑制作用、並びに分解作用を、ThT を用いた分光蛍光定量法、及びネガティブ染色後の電顕観察を用いて経時的に観測し、上記 3 分子の線維形成抑制・分解作用の強さを比較解析した。

C. 研究結果

ニコチンは、10mM 以上の濃度から濃度依存性に A β 蛋白からの β アミロイド線維形成、線維伸長を抑制し、さらに既存の fA β に対しても分解作用を認めた。電顕観察においても、反応時間に依存した fA β の線維形成・伸長抑制や線維分解を確認

した。また、ニコチンと N-メチルピロリジンがほぼ同等に濃度依存性に A β 蛋白からの線維形成を抑制し、既存の fA β を分解した。一方、ピリジンは A β 蛋白からの線維形成を抑制せず、既存の fA β の分解作用も示さなかった。

D. 考察

今回の実験でわれわれは、ニコチンの fA β の線維形成抑制、及び分解作用を調べた。Salomon らは、ニコチンが 50 μ M の濃度で 50 μ M の A β 蛋白からの fA β 形成を抑制することを報告した。ただ、彼らの測定方法は、遠心後の上清における A β 蛋白を測定することで間接的に fA β の量を測定している。一方、我々は ThT を用いた分光蛍光定量法、及び電顕を用いて直接的に fA β の線維形成抑制、分解効果を観察した。我々の実験結果ではニコチンの抑制、及び分解効果は、Salomon らの報告の 200 倍の濃度、すなわち 10mM 以上の濃度で認められたが、これは測定方法の相違によると考えられる。

機序に関して Zeng らはニコチンは小さな可溶性の β -sheet aggregate に結合することで fA β 形成を阻害するのではないかと推測している。また、これまでの報告と合わせ、ニコチンは、A β 蛋白あ

るいは $fA\beta$ と特異的に結合し線維形成の阻害作用、あるいは線維分解作用を発揮していると推定される。

さらに、今回われわれは、ニコチンの anti-amyloidogenic な効果が、N-メチルピロリジンと同程度であることを明らかにした。このことはニコチンの効果は N-メチルピロリジンに起因していることを示唆している。これらの結果は、Salomon らのニコチンの $A\beta$ 蛋白への結合は、ニコチンのピロリジンのモチーフと $A\beta$ 蛋白のヒスチジン残基との間で起こるとした報告と一致している。

E. 結論

ニコチンは、 $fA\beta$ 形成・伸長の抑制作用及び $fA\beta$ 分解作用を有し、アルツハイマー病における $fA\beta$ 沈着阻害剤の開発に向け、有力な基本分子となる可能性がある。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Ono K, Hasegawa K, Yoshiike Y, Takashima A, Yamada M, Naiki H. Nordihydroguaiaretic acid potently breaks down pre-formed Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro. *J Neurochem* 81: 434-440, 2002.

2) Ono K, Hasegawa K, Yamada M, Naiki H. Nicotine breaks down preformed Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro. *Biol Psychiatry* 52: 880-886, 2002

3) Hasegawa K, Ono K, Yamada M, Naiki H. Kinetic modeling and determination of reaction

constants of Alzheimer's beta-amyloid fibril extension and dissociation using surface plasmon resonance. *Biochemistry* 41: 13489-13498, 2002.

2. 学会発表

1) Ono K, Hasegawa K, Naiki H, Yamada M. Nordihydroguaiaretic acid potently breaks down preformed Alzheimer's β -amyloid fibrils in vitro. The 8th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders. Stockholm, July 20-25, 2002.

2) 小野賢二郎、長谷川一浩、吉池裕二、高島明彦、内木宏延、山田正仁：抗酸化剤 NDGA によるアルツハイマー病 β アミロイド線維の強力な分解作用。第 43 回日本神経学会総会。札幌。2002 年 5 月 29-31 日。

3) 小野賢二郎、長谷川一浩、内木宏延、山田正仁：ニコチンはアルツハイマー病 β アミロイド線維の分解作用を有する。第 21 回日本痴呆学会。大阪。2002 年 10 月 3-4 日。

4) 内木宏延、長谷川一浩、小野賢二郎、山田正仁：開放反応系を用いたアルツハイマー病 β アミロイド線維の試験管内形成及び分解機構の解明。文部科学省特定領域研究「先端脳」。東京。2002 年 12 月 19-20 日。

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

厚生労働科学研究費補助金 (特定疾患対策研究事業)
アミロイドーシスに関する調査研究 分担研究報告書

ラット慢性脳虚血モデルにおける脳内アミロイドβ蛋白の解析

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 松野佐好子*、石井一弘*、庄司進一*、山本和央**、永田博司**
筑波大学臨床医学系神経内科*、茨城県立医療大学神経内科**

研究要旨 アルツハイマー病 (AD) 脳に沈着するアミロイドβ蛋白 (Aβ) と虚血との関連を検討するために、ラット慢性脳虚血モデルを用いて脳内Aβの定量を行ない、脳虚血と脳内Aβの関連を解析した。両側総頸動脈結紮後3時間、1、2週間後のラット脳では虚血群とシャム群でAβ分子種に有意差を認めなかったが、2週以前では虚血群において不溶性画分のAβ42が増加傾向を示した。4週後では虚血群において可溶性画分、不溶性画分ともに有意にAβ40とAβ42が増加していた。ラット慢性脳虚血モデルにおいても不溶性画分中にAβ42がまず増加し、その後Aβ40、Aβ42の両分子種が蓄積することが明らかにされ、Aβ42のシード仮説が成り立つことが示された。慢性脳虚血はAD脳に沈着するAβの生成・蓄積を促進し、AD発症の要因の一つとなる可能性が示唆された。

A. 研究目的

アルツハイマー病 (AD) における血管性因子の関与の可能性は諸種の臨床病理学的な観点から示唆されてきた。本研究ではAD脳に沈着するアミロイドβ蛋白 (Aβ) と虚血との関連を検討するために、ラット慢性脳虚血モデルを用いて脳内Aβの定量を行ない、脳虚血と脳内Aβの関連を解析した。

B. 研究方法

300-400gの雄のWistarラットを用いた。ラットはエチルエーテルにて吸入麻酔し、頸部を正中切開して両側総頸動脈を露出した後、素早くナイロン糸(5-0号)で結紮し、これらをCCAO Ratとした。シャムラットは、頸部を正中切開して両側総頸動脈を露出した後、ナイロン糸を潜らすだけで結紮せず、皮膚を縫合して閉じた。

両側総頸動脈処置後3時間、1週間、2週間、4週間後に断頭し、脳を摘出した (CCAOラット数=2、2、2、8匹、シャムラット数=1、1、1、8匹)。

ラット脳に含まれるAβの抽出法は以下のように行なった。ラット脳にまず3倍量のRIPAバッファーを加えホモジネートし、超音波破碎を

施行した。超遠心後の上清をAβのRIPA可溶性画分とした。沈渣にRIPAと同量の5モル塩酸グアニジンを加えて再びホモジネートし、超音波破碎を行ない、超遠心後、上清をRIPA不溶性塩酸グアニジン可溶性画分とした。両画分をサンドイッチELISA法にてAβ40とAβ42の分別定量を行なった。

免疫組織化学法に供したラット大脳はホルマリン固定し、パラフィン包埋後6マイクロm切片にした。脱パラ後アルコール親水し、H₂O₂処理後正常馬血清にてブロッキングした。1次抗体としてAβ40を認識するBA27およびAβ42を認識するBC05を用い、2次抗体としてビオチン化抗マウスIgG抗体を用いた。ABC法にて処理後DAB発色し、顕微鏡下で観察した。

C. 研究結果

両側総頸動脈結紮後3時間、1、2週間後のラット脳では虚血群とシャム群でAβ分子種に有意差を認めなかったが、2週以前では虚血群において不溶性画分 (RIPA不溶性塩酸グアニジン可溶性画分) のAβ42が増加傾向を示した。4週後では虚血群において可溶性画分 (RIPA可溶性画分)、不溶性画分 (RIPA不溶性塩酸グアニジン

可溶性画分)ともに有意にA β 40とA β 42が増加していた(表)。

4週後のA β 40、A β 42の免疫組織化学では、CCAO4週後のラット脳においてはA β プラーク様の細胞外のA β の沈着は認められず、いずれのラットにおいても海馬や皮質においてニューロンや一部グリア細胞様の染色が認められた。CCAOラット脳及びシャムラット脳では、染色様態に明らかな差はみられなかった。

D. 考察

ADは神経変性疾患であり、脳虚血や血管性要因とは全く別の機序で発症・進展するものと考えられてきたが、近年ADと血管性痴呆とを互いに全く別の、除外しあうべき疾患であるとする考え方は修正を迫られてきた。その根拠としては、虚血性脳血管障害の危険因子の一部がアルツハイマー病発症の危険因子でもあるという疫学調査の結果が報告されている。また、脳血管性痴呆の純粋なものは意外に少なく潜在性のAD病変が認められる例が多いこと、痴呆を示さなかった高血圧や冠動脈疾患患者の脳では対照例に比して神経原線維変化や老人斑がみられる頻度が高いこと、ADにおける毛細血管の変化、微小循環障害、虚血性白質病変の合併がみられること、高度の脳虚血では主幹脳動脈の境界域にA β が沈着すること、ADでは対照群に比してアミロイドアンギオパチーの合併頻度が高いこと、などの臨床病理学的知見が報告されている。

脳虚血・慢性低灌流動物モデルにおけるA β やAPPを解析した動物実験では、一過性脳虚血をきたした砂ネズミ脳において、APPの蓄積が海馬や大脳皮質の一部に認められること、APPの蓄積するニューロンは虚血後も生存すること、免疫電顕的所見よりAPPの蓄積が産生増加以外に軸索輸送の障害に由来する可能性が示唆されたことが報告されている。また、慢性低灌流ラットでAPP陽性神経線維の増加が報告されており、ウェスタンにて大脳皮質に約12kDのA β 様免疫活性が増加することやAPPがニューロンから細胞外に局在の変化を示すことが明らかにされている。

本研究では、サンドイッチELISAによるA β 分別定量にて、CCAO後4週のラット脳でシャム

に比べ有意に増加していた。これは慢性脳血流低下状態においては脳内A β 量が増加することを示し、さらにこの結果はAD患者脳において脳虚血があるとさらにA β が増加することを示唆するものである。また、A β の分子種別の検討にて、CCAOラットの不溶性画分中にA β 42がまず増加し、その後A β 40、A β 42の両分子種が蓄積することが明らかになった。このことは、A β 42のシード仮説がラット慢性脳虚血モデルにおいても成り立つことを示唆するものと考えられた。

免疫組織化学では、CCAO後4週のラット脳でシャムラット脳で有意差が認められなかったことはELISAの結果と乖離するものであったが、これはA β のエピトープの一部がマスクされた可能性が考えられ、今後さらに検討する必要がある。

E. 結論

慢性脳虚血モデルラット脳におけるELISAによるA β の分別定量の結果は、慢性脳虚血がA β の生成・蓄積を促進する可能性を示唆するものと考えられた。慢性脳血流低下によるA β の増加は、AD患者における脳A β 沈着促進、神経細胞死、ひいては症状の進行に影響を与えることが推測された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ishii K, Klunk WE, Arawaka S, Debnath ML, Furiya Y, Sahara N, Shoji S, Tamaoka A, Petegrew JW, Mori H. Chrysamine G and its derivative reduce amyloid beta-induced neurotoxicity in mice. *Neurosci Lett.* 2002 Nov 15;333(1):5-8.
- 2) Watanabe M, Yamamoto N, Ohkoshi N, Nagata H, Kohno Y, Hayashi A, Tamaoka A, Shoji S. Corticosteroid- responsive asymmetric neuropathy with a myelin protein zero gene mutation. *Neurology* 2002, 59(5):767-9
- 3) Matsumo S, Watanabe M, Ohkoshi N, Anno I,

- Matsumaru Y, Tamaoka A, Shoji S. Enhanced magnetic resonance angiography of a spinal dural arteriovenous fistula. *Arch Neurol* 2002;59(7):1185.
- 4) Takahiko Tokuda, Takashi Oide, Akira Tamaoka, Kazuhiro Ishii, Sayoko Matsuno, Shu-ichi Ikeda: Moderate or high doses of prednisolone (30-60 mg/day) for diseases other than AD decreases amyloid β peptides in CSF. *Neurology* 58(9):1415-8, 2002.
- 5) Fujita Y, Yoshizawa T, Sakata N, Okoshi N, Yamamoto N, Tamaoka A, Hommura S, Shoji S. Pictures in clinical medicine. Fungal endophthalmitis and Churg-Strauss syndrome. *Intern Med* 41(2):167, 2002.
- 6) Kyoko Miyawaki, Hiroyuki Nakamura, Sayoko Matsuno, Akira Tamaoka, Kunio Doi: Three-dimensional and fractal analyses of assemblies of amyloid β protein subtypes (A β 40 and A β 42(43)) in canine senile plaques. *Acta Neuropathol (Berl)* 103(3):228-36, 2002
- 7) 玉岡 晃：知の螺旋. 茨城県医師会報 589:47-48, 2003.
- 8) 松下正明, 今井幸充, 玉岡 晃, 鳥羽研二：痴呆における精神症状のコントロール. *Cognition and Dementia* 1(1):75-83, 2002.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 玉岡 晃：痴呆症状, CLINICAL NEUROSCIENCE (in press)

2. 学会発表

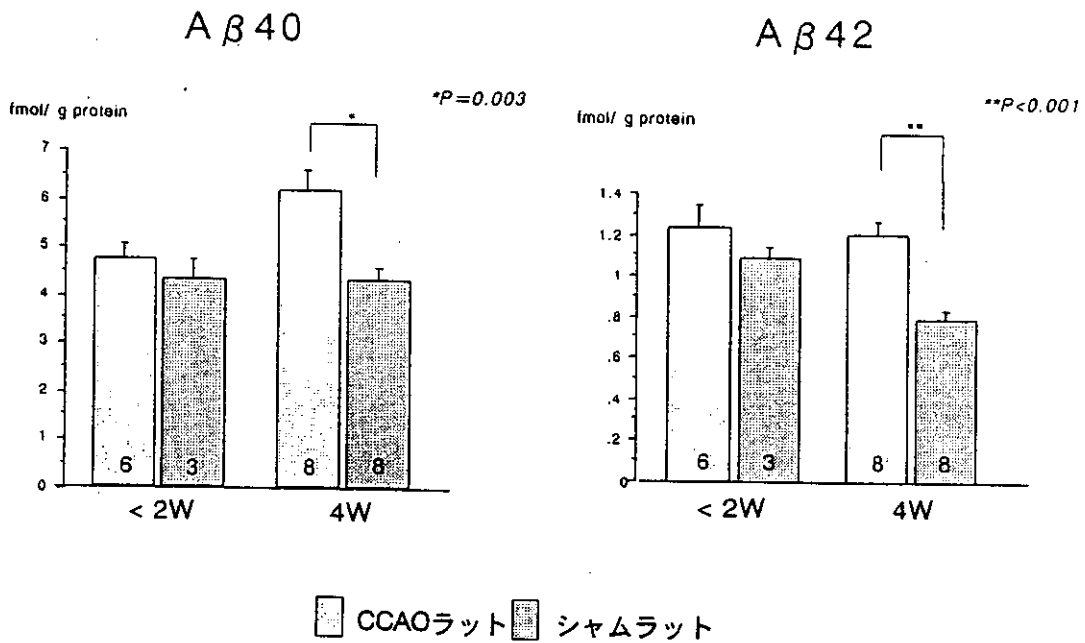
- 1) A Tamaoka, K Ishii, F Miya, S Matsuno, A Mochizuki, S Shoji, and S Harada. Analyses on correlations between oxidative stresses and various risk factors for Alzheimer's disease. Society of Neuroscience 32 nd Annual Meeting, (Orland) November 6, 2002.
- 2) K Ishii, F Miya, T Shimizu, S Shoji, T Shirasawa, N Okada, and A Tamaoka. NSAIDs decreasing microglia activation induced by amyloid- β . Society of Neuroscience 32 nd Annual Meeting, (Orland) November 6, 2002.
- 3) H. Yoshida, A. Hayashi, T. Yoshizawa, A. Tamaoka, S. Shoji: Case Report; Clavicle Brace Improves Motor and Pulmonary Function in the Patient with Amyotrophic Lateral Sclerosis. Xth International Congress on Neuromuscular Diseases. July 8, 2002.
- 4) 玉岡 晃：痴呆症の原因(もの忘れはなぜおこる?). 平成14年度筑波大学付属病院公開講演会『市民公開健康講座』. 10月11日, 2002.
- 5) 松野佐好子, 玉岡 晃, 石井一弘, 庄司進一, 山本和央, 永田博司: ラット慢性脳血流低下モデルにおける脳内アミロイド β 蛋白の解析. 第21回日本痴呆学会(大阪), 10月3日, 2002.
- 6) 玉岡 晃, イゴール クロチキン, 松野佐好子, 石井一弘, 原田祐嗣, 庄司進一: アルツハイマー病脳におけるインスリン分解酵素の定量と可溶性 A β や年齢との相関- 非痴呆对照脳との比較検討-. 第21回日本痴呆学会(大阪), 10月3日, 2002.
- 7) 石井一弘, 徳田隆彦, 松島照彦, 宮 冬樹, 原田祐嗣, 池田修一, 玉岡 晃, 庄司進一: 血漿中 A β 分子種に及ぼす Pravastatin の効果. 第21回日本痴呆学会(大阪), 10月4日, 2002.
- 8) 松野佐好子, 玉岡 晃, 石井一弘, 庄司進一, 山本和央, 永田博司: ラット慢性脳虚血モデルにおける脳内アミロイド β 蛋白の解析. 第43回日本神経学会総会, 5月29日, 2002.
- 9) 玉岡 晃, Igor Kurochkin, 松野佐好子, 石井一弘, 原田祐嗣, 庄司進一: アルツハイマー病脳におけるインスリン分解酵素の解析- 正常对照脳との比較検討-. 第43回日本神経学会総会, 5月30日, 2002.
- 10) 石井一弘, 佐原成彦, 加藤一郎, 玉岡 晃, 荒若繁樹, 降矢芳子, 庄司進一, 吉本高志, 森啓: ヒト SOD1 遺伝子導入マウスにおける A β 神経細胞毒性の減弱効果. 第43回日本神経学会総会, 5月30日, 2002.
- 11) 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.

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。

RIPA可溶性画分



RIPA不溶性-塩酸グアニジン可溶性画分

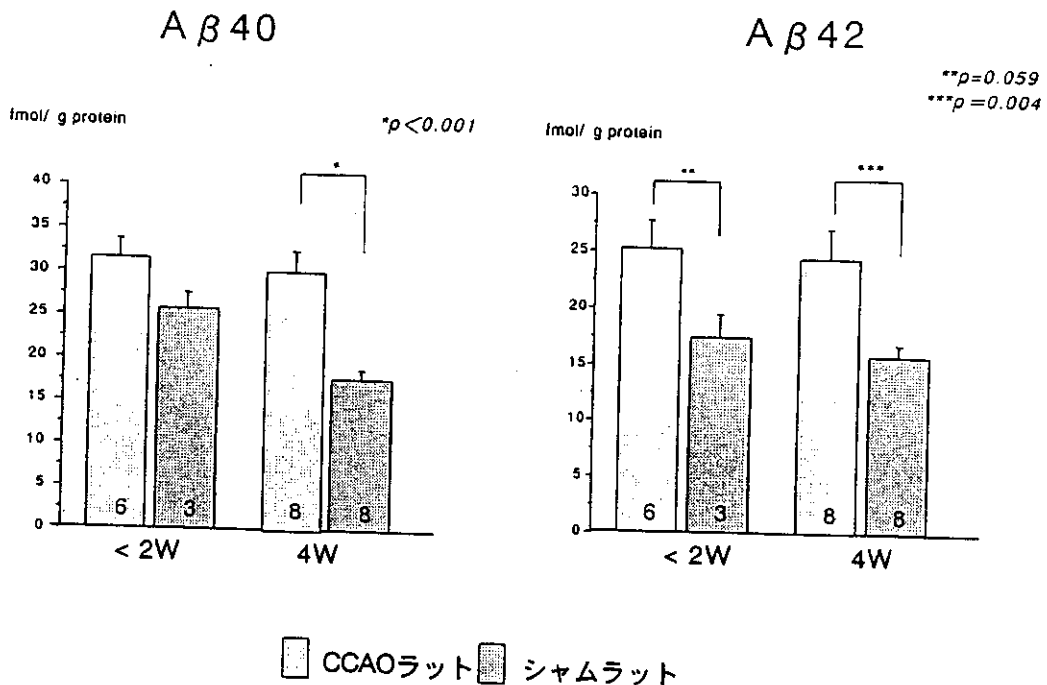


表. ラット脳の Aβ 分子種の定量

両側総頸動脈結紮後3時間、1、2週間後のラット脳では虚血群とシャム群でAβ分子種に有意差を認めなかったが、2週以前では虚血群において不溶性画分（RIPA不溶性塩酸グアニジン可溶性画分）のAβ42が増加傾向を示した。4週後では虚血群において可溶性画分（RIPA可溶性画分）、不溶性画分（RIPA不溶性塩酸グアニジン可溶性画分）ともに有意にAβ40とAβ42が増加していた。

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調査研究 分担研究報告書

血漿 A β 分子種に及ぼす pravastatin の効果

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、松島照彦、徳田隆彦、原田祐嗣、池田修一、庄司進一
 1) 筑波大学 臨床医学系 神経内科、2) 筑波記念病院 代謝内分泌内科、
 3) 信州大学 医学部 第3内科

研究要旨 pravastatin 10mg 内服した高コレステロール血症患者における血漿 A β 40 および A β 42 濃度を内服後 6 ヶ月まで、経時的に測定した。また、これら血漿中 A β 分子種と脂質関連因子 (T-chol, TG, LDL, HDL, ApoE サブタイプ) 間の関連を調べた。T-chol や LDL は pravastatin 投与前に比べ、投与後 1 ヶ月より有意に低下したが、血漿 A β 40 および A β 42 濃度は低下しなかった。疫学的研究でのスタチン内服者における AD 罹患率の有意な低下は A β 産生系にスタチンが影響を与えるのではなく、スタチンのラジカル消去効果や微小循環改善効果が関与している可能性が考えられた。

A. 研究目的

HMG Co A還元酵素阻害薬であるスタチン系薬剤はコレステロール合成細胞内に取り込まれ、コレステロールの合成を直接抑制し、血中コレステロールを低下させる作用の他に、動脈硬化抑制作用、冠動脈疾患予防、脳卒中予防、糖尿病の予防効果などが知られている。近年、疫学的研究にてスタチン内服者はアルツハイマー病の罹患率が有意に低下するとの報告がなされた。In vitroの実験ではスタチンが細胞内コレステロール代謝を変えて、A β 産生量を低下させるとの報告 (Wolozin B, 2000, Jick H, 2000) もあり、さらに guinea pigs を用いた実験ではスタチンを内服により脳内 A β 量が低下したとの結果 (Fassbender K, 2001) も示された。臨床的研究では simvastatin または pravastatin は血漿 A β 濃度を低下させなかった (Tokuda T, 2001) との報告や、lovastatin は濃度依存的に血清 A β 濃度を低下させた (Lawrence TF, 2001) とする報告もあり、結論が出ていない。

スタチンがコレステロール代謝を介して、A β 産生系に影響を与えるならば、スタチン投与により血漿 A β 量も変化すると推察される。今回、我々は pravastatin を内服した高コレステロール血症患者において、血漿 A β 濃度の経時変化を明らかにし、血中脂質関連因子との関連も調べた。

B. 研究方法

高コレステロール血症患者 46 人 (女性 27 人: 36-83 歳, 平均年齢 64 歳, 男性 19 人: 33-75 歳, 平均年齢 55.1 歳) に pravastatin 10 mg を投与した。血中の脂質関連因子として総コレステロール (T-chol), 中性脂肪 (TG), 高密度リポ蛋白 (HDL), 低比重リポ蛋白 (LDL) を測定した。statin 投与前と投与後月 1 回、採血して、6 ヶ月まで追跡した。血漿 A β 40, A β 42 濃度は固相化抗体 BNT77、HRP 標識抗体 BA27 (抗 A β 40 抗体)、BC05 (抗 A β 42 抗体) を用いた、サンドイッチ ELISA 法にて測定した。ApoE の型決定は患者血漿から等電点電気泳動法を用いて決定した。

C. 研究結果

ApoE サブタイプは E2/E3 が 2 人、E3/E3 が 32 人、E3/E4 が 10 人、E4/E4 が 2 人であった。T-chol および LDL は pravastatin 投与、1 ヶ月後から投与前と比較して有意に低下しているが、血漿 A β 40、A β 42 濃度は投与前と比較して、6 ヶ月後においても有意な変化がなかった。(Fig1 a,b) また、T-chol の変化量 (投与前の値 - 投与後の値: Δ T-chol) と A β 分子種の変化量 (投与前の値 - 投与後の値: Δ A β 40 または Δ A β 42) の相関関係を調べた。

Δ T-cho— Δ A β 40間 ($r=0.04$, $n=185$, $p=0.26$)、 Δ T-cho— Δ A β 42間 ($r=0.018$, $n=185$, $p=0.813$)で各パラメーター間において相関関係が認められないT-choと血漿A β 40またはA β 42濃度の投与前後の変化量を調べたが相関はなかった。(Fig2 a,b) 同様にTG、LDL、HDLまたは ApoEサブタイプと血漿A β 分子種との相関関係を調べたところ、A β 40とA β 42 ($r=0.71$, $P=0.0001$)、LDLとT-cho ($r=0.75$, $P=0.0001$)および Δ LDLと Δ T-cho ($r=0.51$, $P=0.001$)に正の相関が認められ、T-choと年齢($r=-0.37$, $P=0.01$)、HDLとTG($r=-0.65$, $P=0.0001$)、HDLとLDL($r=-0.40$, $P=0.005$)に負の相関関係が認められた。

D. 考察

水溶性スタチンである、pravastatin は主に肝臓などに特異的なトランスポーターを介して細胞内に取り込まれ、HMG Co A還元酵素を阻害し、コレステロール合成を低下させる。本研究では、血中T-choやLDLを有意に低下させるpravastatin量を投与しても血漿A β 40、A β 42濃度は低下しなかった事実から、pravastatinが取り込まれる細胞においてA β 産生が変化しなかったと思われる。疫学的研究でスタチンがADの罹患率を低下させた機序として、A β 産生や分解を含めた代謝に直接影響を与えるのではなく、スタチン自らによるラジカル消去効果や微小循環改善効果などが神経細胞保護的に作用として関与している可能性も考えられる。水溶性スタチンは血液—脳関門を通過しないが、脂溶性スタチンは血液—脳関門を容易に通過し、脳内のA β 代謝に影響を与える可能性がある。今後、脂溶性スタチン服用者と非服用者での髄液中A β 分子種濃度の比較、脂溶性スタチン服用者と水溶性スタチン服用者で髄液中A β 分子種濃度の比較、A β 濃度に対する各種スタチンの濃度依存性を調べ、スタチン系薬剤のアルツハイマー病予防薬または治療薬の可能性を検討したい。

E. 結論

Pravastatin 10mg 内服により血漿中A β 42およびA β 40は低下しない。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Tokuda T, Oide T, Tamaoka A, Ishii K, Matsuno S, Ikeda S. Moderate or high doses of prednisolone (30-60 mg/day) for diseases other than AD decreases amyloid β peptides in CSF. *Neurology* 58(9):1415-8, 2002.

2) K.Ishii, WE. Klunk, S.Arawaka, ML.Debnath, Y.Furiya, N.Sahara, S.Shoji, A. Tamaoka, JW. Pettegrew and H. Mori. Chrysamine G and its derivative reduce amyloid β -induced neurotoxicity in mice. *Neuroscience Letter*. Nov 15;333(1):5-8, 2002

2. 学会発表

1) 石井一弘、佐原成彦、加藤一郎、玉岡 晃、荒若繁樹、降矢芳子、庄司進一、吉本高志、森 啓、ヒトSOD1遺伝子導入マウスにおけるA β 神経細胞毒性の減弱効果. 日本神経学会総会 札幌. 5月29,30,31日2002年

2) 玉岡 晃、Kurochikin Igor、松野佐好子、石井一弘、庄司進一 アルツハイマー病脳におけるインスリン分解酵素の解析—正常対照脳との比較検討—日本神経学会総会 札幌 5月29,30,31日2002年

3) 松野佐好子、玉岡 晃、石井一弘、庄司進一、山本和央、永田博司、ラット慢性虚血モデルにおける脳内アミロイド β 蛋白の解析. 日本神経学会総会 札幌. 5月29,30,31日2002年.

4) 玉岡 晃、イゴール・クロチキン、松野佐好子、石井一弘、原田祐嗣、庄司進一. アルツハイマー病脳におけるインスリン分解酵素の定量と可溶性A β な年齢との相関—非痴呆対照脳との比較検討— 日本痴呆学会総会 大阪 平成14年10月5日、6日

5) 松野佐好子、玉岡 晃、石井一弘、庄司進一、山本和央、永田博司. ラット慢性脳血流低下モデルにおける脳内アミロイド β 蛋白の解析. 日本痴呆学会総会 大阪 平成14年10月5日、6日

6) 石井一弘、徳田隆彦、松島照彦、宮 冬樹、原田祐嗣、池田修一、玉岡 晃、庄司進一. 血漿

A β 分子種に及ぼす Pravastatin の効果. 日本痴呆学会総会 大阪 平成 14 年 10 月 5 日、6 日

7) A Tamaoka, K Ishii, F Miya, S Matsuno, A Mochizuki, S Shoji, and S Harada. Analyses on correlations between oxidative stresses and various risk factors for Alzheimer's disease. Society of Neuroscience 32 nd Annual Meeting, (Orlando) November 6, 2002.

8) K Ishii, F Miya, T Shimizu, S Shoji, T Shirasawa, N Okada, and A Tamaoka. NSAIDs decreasing microglia activation induced by amyloid- β . Society

of Neuroscience 32 nd Annual Meeting, (Orlando) November 6, 2002.

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。

Fig. 1 (a)

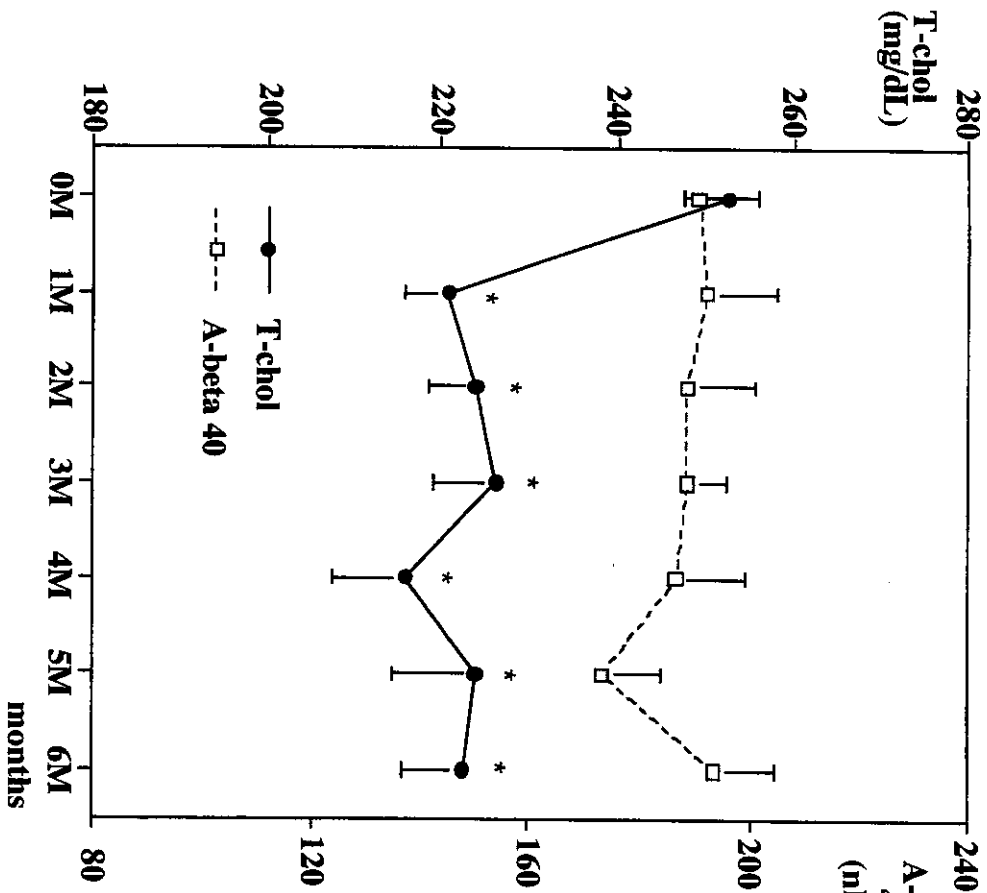


Fig.1 (b)

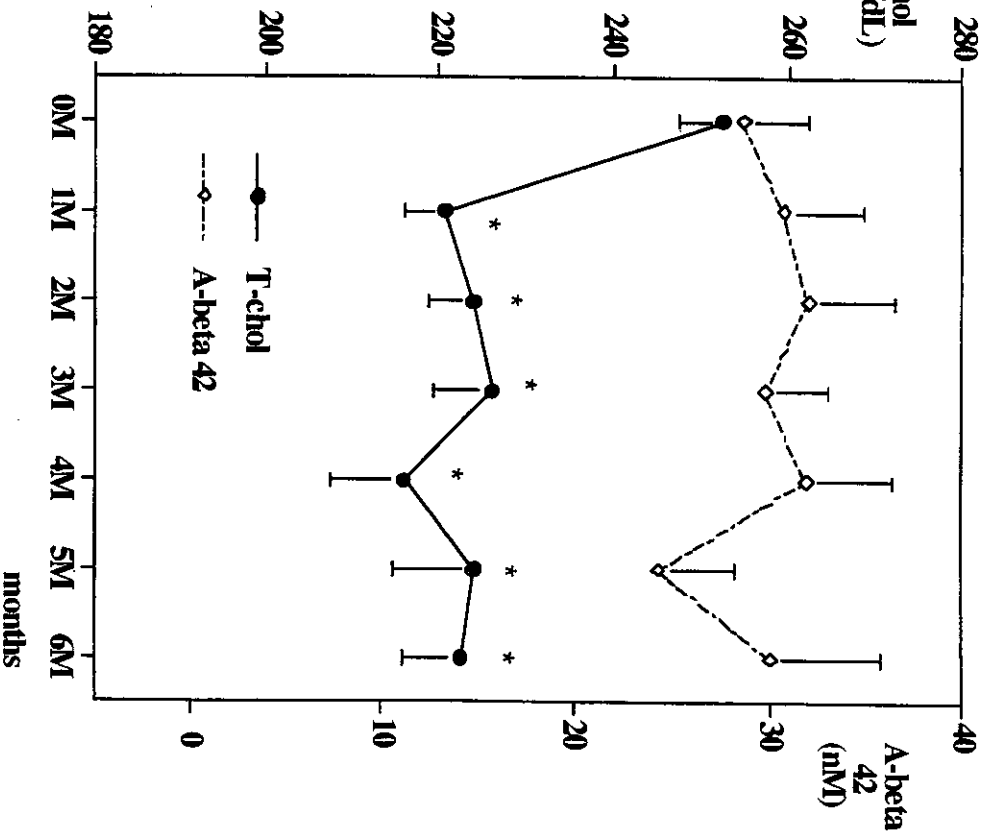


Fig.2 (a)

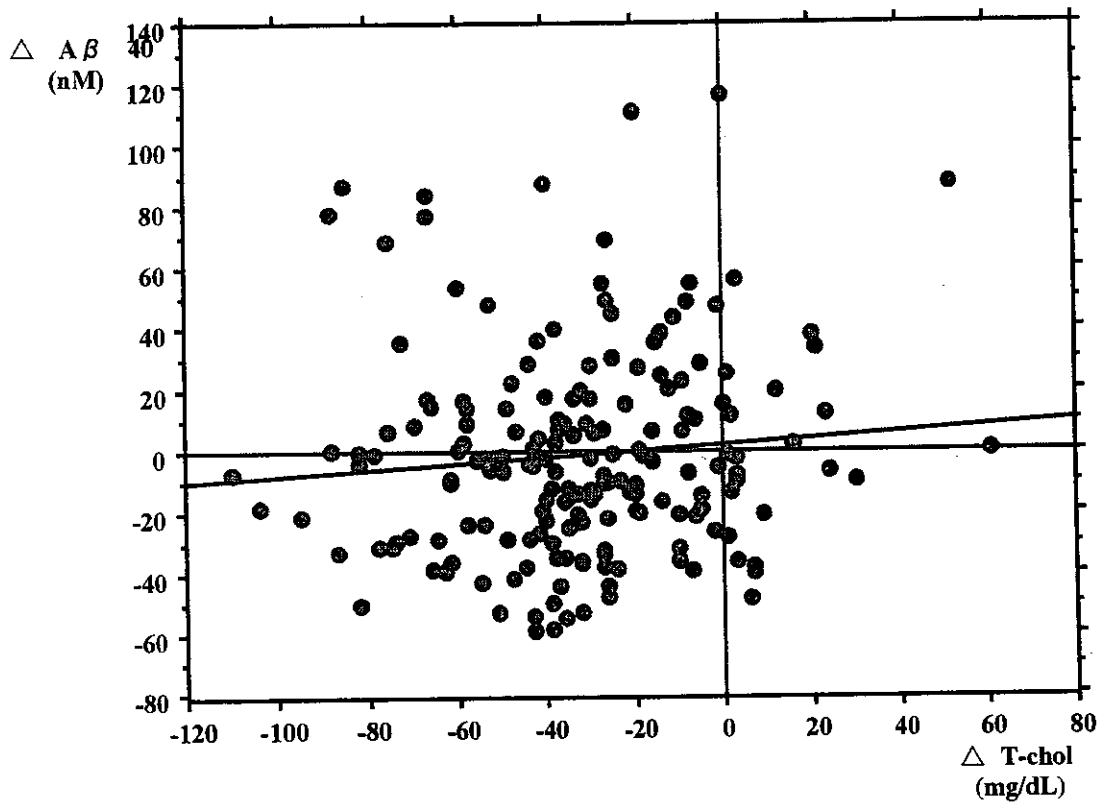
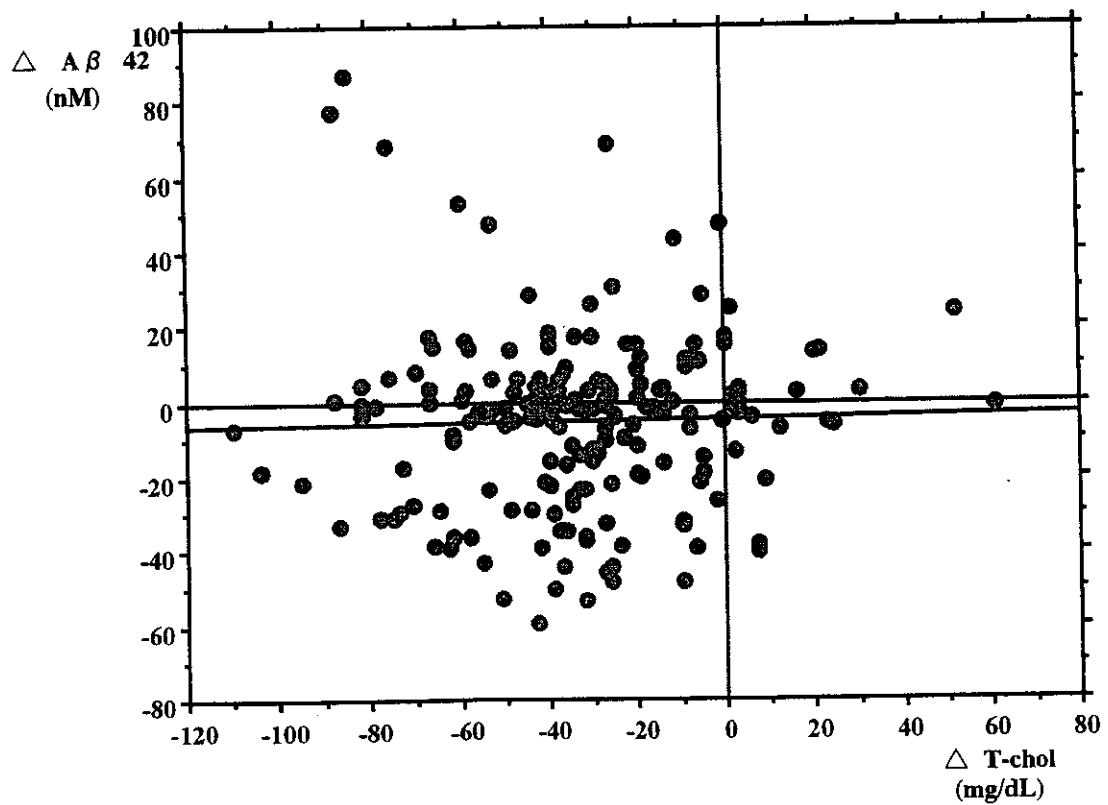


Fig.2 (b)



厚生労働科学研究費補助金 (特定疾患対策研究事業)
 アミロイドーシスに関する調査研究 分担研究報告書

紀伊半島の筋萎縮性側索硬化症／パーキンソン痴呆複合脳 および脳脊髄液のβアミロイド定量

分担研究者 葛原茂樹 三重大神経内科

共同研究者 伊藤伸朗*、成田有吾*、小久保康昌*、佐々木良元*、
 森島真帆**、井原康夫**、玉岡晃***

*三重大神経内科、**東大大学院医学研究科神経病理学

***筑波大学医学部臨床系神経内科

研究要旨 アルツハイマー病の病理学的特徴である老人斑の出現を伴わずに、神経原線維変化の広範な出現を示す、紀伊半島の筋萎縮性側索硬化症／パーキンソン痴呆複合のβアミロイドに関する生化学的分析を行った。アミロイドカスケード仮説に従わないと想定される本疾患の病態解明は、アルツハイマー病の病態機序を解明するうえで、貴重な示唆を与える可能性がある。5例の本疾患患者の剖検脳と、13例の脳脊髄液のβアミロイド x-40, x-42 をELISA法で定量した。いずれも正常高齢者と有意差を認めなかった。この結果は、アルツハイマー病と異なり、本疾患においてはβアミロイドは病態に関与していないことを示唆した。

A. 研究目的

アルツハイマー病では脳内βアミロイド(Aβ)沈着から神経原線維変化(NFT)出現(tau蛋白変性)、神経細胞死に至るアミロイドカスケード仮説が病態機序として推定されている。紀伊半島の筋萎縮性側索硬化症／パーキンソン痴呆複合(Kii ALS/PDC)は、地域性、家族性の痴呆性神経変性疾患であり、神経病理学的にNFTの広範な出現と、一方で正常高齢者と比較しても老人斑出現が少ないことが特徴である。本疾患はアミロイドカスケード仮説に従わないと想定されるが、Aβに関する生化学的分析はこれまで行われていなかった。脳内および脳脊髄液内のAβ量を測定することにより本疾患におけるAβの動態の確認を行ない、ADとの異同を考察する。

B. 研究方法

対象；Kii ALSは三重県南部の本疾患多発地域において発生した、ALSが主たる臨床症状である症例、Kii PDCは同様にパーキンソン症状と痴呆症状の合併が主たる臨床症状である症例とした。これら症例の多くは家族内発症である。

1. 脳内Aβ定量；Kii ALS/PDC患者剖検脳の-80℃凍結標本(Kii PDC 4例、Kii ALS 1例)の前頭葉からguanidine HClによりAβを可溶化、固層にBNT77(抗Aβ11-28抗体)、検出抗体にBA27(抗Aβ1-40抗体)とBC05(抗Aβ35-43抗体)を用いたsandwich ELISA法でそれぞれAβx-40、Aβx-42(43)を定量し、132例の非痴呆コントロール脳と比較した。(Morishima-Kawashima M et al. Am J Pathol 2000, 157:2093)

2. 脳脊髄液Aβ定量；臨床的に診断したKii ALS/PDC13例(Kii PDC 11例、Kii ALS 2例、平均63.5歳)の脳脊髄液を先述のELISA系にて脳脊髄液Aβx-40(Aβ40)、Aβx-42(43)(Aβ42)を定量し、AD 53例、正常コントロール 21例と比較した(Tamaoka A et al. J Neurol Sci 1997, 148:41)。

C. 研究結果

1. 脳内Aβ定量 (Figure1)；髄液Aβは加齢とともに増加し、Aβ40よりもAβ42でより急峻であった。Kii PDCおよびALSでは高齢コントロールと比較してAβ40、Aβ42とも上昇もしくは低下

を認めなかった。 (Kii ALS/PDC 脳 A β (平均 \pm 1SD pmol/ml) ; 脳 A β 40 1.63 \pm 0.21, 脳 A β 42 0.77 \pm 0.34)

2. 脳脊髄液 A β 定量 ; AD では正常コントロールに比較して A β 42 量は低下しているが (AD219 \pm 101pg/ml, NC 332 \pm 178 pM; p<0.001), Kii ALS/PDC では有意差は認めなかった (482 \pm 279 pM) (Figure2A). また, Kii PDC と ALS の差も認めなかった。 A β 40 は各群で差はなかった (AD 2390 \pm 1030 (平均 \pm 1SD pM), NC 2560 \pm 1420, Kii ALS/PDC 2332 \pm 1544) (Figure2B).

D. 考察

脳内 A β 沈着から NFT 出現 (tau 蛋白変性)、神経細胞死に至るアミロイドカスケード仮説と呼ばれる病態機序が AD で推定されており、とくに近年、脳内 A β 沈着は AD 治療のアプローチポイントとして重要視されている。 tau 蛋白変性を伴う痴呆性神経変性疾患群 (タウオパチー) には AD で必発である老人斑出現 (A β 沈着) を伴わない疾患が存在し、AD との病態の相違が注目されている。 Kii ALS/PDC は、Guam 島の ALS/PDC と臨床的、病理学的に酷似した地域性、家族性のタウオパチーであり、現時点で原因は不明である。 ALS/PDC と類似点の多い frontotemporal dementia with parkinsonism linked to chromosome 17 (FTDP-17) にみられる tau 遺伝子変異は認めない。 当科の検討では、本疾患の NFT に含まれる過リン酸化 tau 蛋白の生化学的性質 (リン酸化部位, tau protein isoform profile) および超微形態は AD の PHF tau との相違を認めない。 一方、AD 発症の危険因子のひとつである ApoE 遺伝子多型は、本疾患では AD 発症に予防的働きをもつとされている ApoE2 アレルの保有率が高いことが確認されている (Kii ALS/PDC 9 例で E2 アレル 頻度 16.7%, E4 アレル 保有率 5.6%。 日本人でそれぞれの保有率はおよそ 5%, 9%)。 本疾患には脳 A β 沈着の抑制機序が存在する可能性もあり、その病態解明が、A β の役割も含めた AD の病態解明にも有用と考えられるが、本疾患の A β に関する生化学的分析はこれまで行われていなかった。 今回、5 例の本疾患患者の脳内 β アミロイド x-40, 42 と、13 例の脳脊髄液 β アミロイド x-40, 42 を定量し正常高齢者、AD 患者検体と比較したが、いずれも正常高齢者と有意

差を認めなかった。 脳内 A β 42/40 比率がコントロールに比して本疾患で若干高い傾向がみられたが、測定方法の問題の可能性も含めてその理由は不明であり今後検討を要する。

これらの結果は、 β アミロイドは、AD と異なり本疾患においては病態に関与しないことを示唆するものである。

今後、遺伝子解析などのアプローチから本疾患特有の病態を明らかにしながら、AD の A β に関する病態解明にも応用してゆく。

E. 結論

1. 紀伊半島の筋萎縮性側索硬化症 / パーキンソン痴呆複合の脳、脳脊髄液 A β x-40, x-42 を ELISA 法で定量した。 2. いずれも正常高齢者と有意差を認めなかった。 3. A β は本疾患の病態機序に関与しないことが示唆された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kuzuhara S, Kokubo Y, Sasaki R, Narita Y, Yabana T, Hasegawa M, Iwatsubo T: Familial amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia complex of the Kii peninsula of Japan: clinical and neuropathological study and tau analysis. *Ann Neurol* 49:501-511, 2001
- 2) Kuzuhara S, Sasaki R, Kokubo Y, Narita Y: Amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism-dementia complex of the Kii peninsula of Japan (Kii ALS/PDC) may be a familial tauopathy. *Epidemiological trends, clinical features, neuropathology and molecular genetics*. In: *Neuroscientific basis of dementia (Proceedings of the International Symposium on Dementia. From molecular biology to therapeutics, held in Kobe in 1999)*, ed by Tanaka C, McGeer PL, Ihara Y, Birkhaeuser, Basel, 2001, P85-93
- 3) Kokubo Y, Kuzuhara S, Narita Y: Geographical distribution of amyotrophic lateral sclerosis with neurofibrillary tangles in the Kii peninsula of Japan. *J*

Neurol 415: 850-852,2000

2. 学会発表

1) 伊藤伸朗, 小久保康昌, 佐々木良元, 石黒幸一, 安武かおり, 長谷川茂人, 荒井啓行, 石津秀樹, 片山禎夫, 葛原茂樹. 紀伊半島の筋萎縮性側索硬化症/パーキンソン痴呆複合のタウ蛋白の生化学的分析. 第 42 回日本神経学会総会. 2001. June 11-13

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

Aβ 40,42 in Kii PDC brains

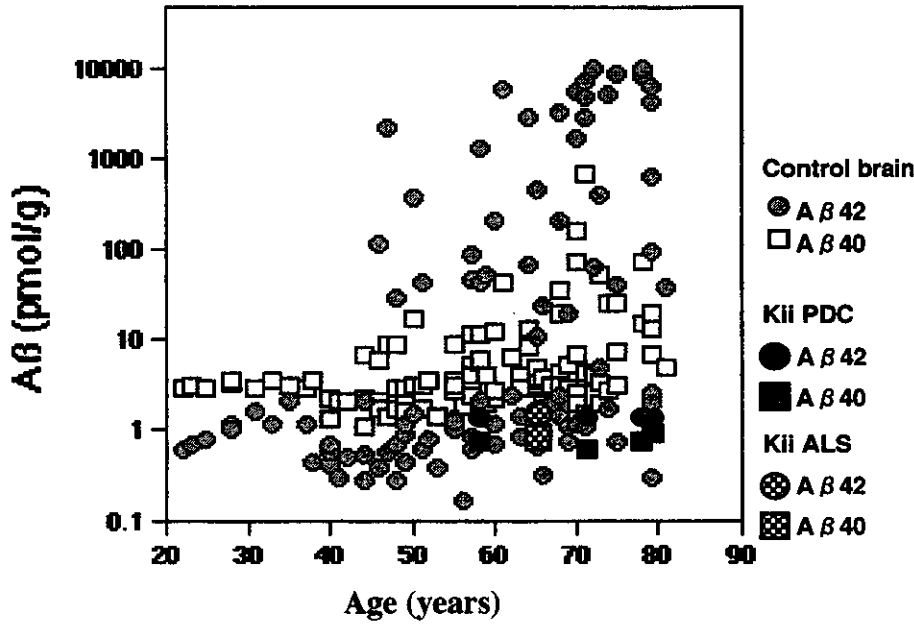


Figure1. 脳内Aβ 40,42.
 加齢に従って脳内Aβは増加傾向があり、Aβ 42でより急峻である。Kii PDC,ALSはいずれも高齢正常コントロールと差はなかった。

CSF Aβ 42

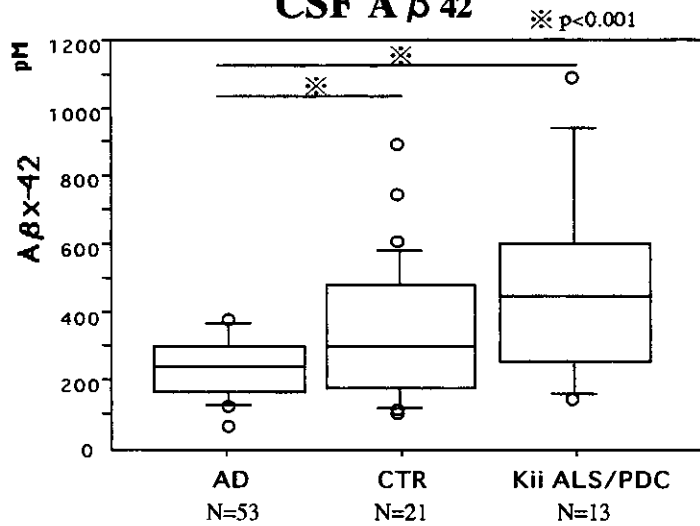


Figure2A. 脳脊髄液Aβ 42.
 脳脊髄液Aβ 42濃度はAD群で高齢コントロール群(CTR),Kii ALS/PDC群に対して有意に低値である。Kii ALS/PDC群(およびALS群, PDC群それぞれも)はいずれも高齢コントロールと有意差はなかった。

CSF Aβ 40

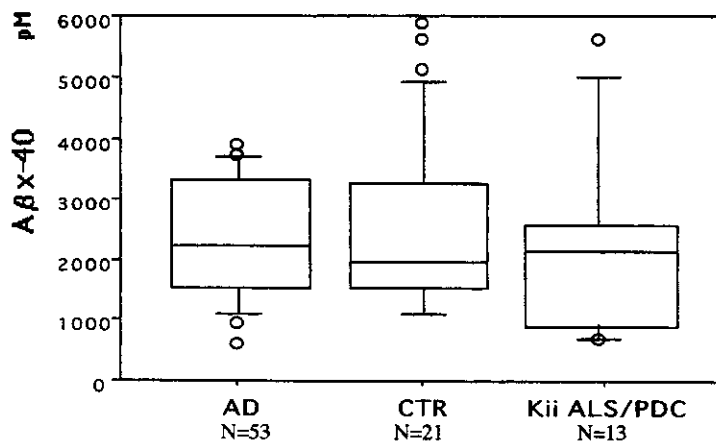


Figure2B. 脳脊髄液Aβ 40.
 脳脊髄液Aβ 40濃度はAD群, 高齢コントロール群(CTR),Kii ALS/PDC群とも有意差はなかった。

[Ⅲ] 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻	ページ	出版年
Gono T, Matsuda M, Dohi N, Sekijima Y, Tada T, Sakashita K, Koike K, Kadosaka S, Ikeda S	Gastroduodenal lesions in primary AL amyloidosis	Gastrointestinal Endoscopy	56	503	2002
Ikeda S	Clinical picture and outcome of transthyretin-related familial amyloid polyneuropathy(FAP) in Japanese patients	Clin Chem Lab Med	40	1257-1261	2002
Ikeda S, Nakazato M, Ando Y, Sobue G	Familial transthyretin-type amyloid polyneuropathy in Japan	Neurology	58	1001-1007	2002
Ikegami T, Kawasaki S, Ohno Y, Chisuwa H, Urata K, Nakazawa Y, Hashikura Y, Terada M, Miyagwa S, Takei Y, Tokuda T, Ikeda S	Temporary auxiliary liver transplantation from a living donor to an adult recipient with familial amyloid polyneuropathy	Transplantation	73	628-630	2002
Oide T, Ohara S, Yazawa M, Inoue K, Itoh N, Tokuda T, Ikeda S	Progressive supranuclear palsy with asymmetric tau pathology presenting with unilateral limb dystonia	Acta Neurol	104	209-214	2002
Oide T, Tokuda T, Takei Y, Takahashi H, Ito K, Ikeda S	Serial CT and MRI findings in a patient with isolated angiitis of the central nervous system associated with cerebral amyloid angiopathy	Amyloid : J Protein Folding Disord	9	256-262	2002
Takei Y, Hattori T, Gono T, Tokuda T, Saitoh S, Hoshii Y, Ikeda S	Senile systemic amyloidosis presenting as bilateral carpal tunnel syndrome	Amyloid : J Protein Folding Disord	9	252-255	2002
Kotani N, Hattori T, Yamagata S, Tokuda T, Shirasawa A, Yamaguchi S, Kobayashi S, Ikeda S	Transthyretin Thr60Ala Appalachian-type mutation in a Japanese family with familial amyloidotic polyneuropathy.	Amyloid: J Protein Folding Disord	9	31-34	2002
Tokuda T, Oide T, Tamaoka A, Ishii K, Matsuno S, Ikeda S	Prednisolone (30-60 mg/day) for diseases other than AD decreases amyloid β peptides in CSF.	Neurology	58	1415-1418	2002
池田修一	アミロイドーシス, Fabry 病(FAP)	Modern Physician	22	607-612	2002
池田修一	アミロイドニューロパチー	脳と神経	54	657-665	2002
池田修一	脳アミロイド・アンギオパチー	分子脳血管病	2	61-67	2003
Ohno S, Yoshimoto M, Honda S, Miyachi S, Ishida T, Itoh F, Endo T, Chiba S, Imai K	The antisense approach in amyloid light chain amyloidosis: identification of monoclonal Ig and inhibition of its production by antisense oligonucleotides in in vitro and in vivo models	J Immunol	169	4039-4045	2002