20030487

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 15 年度 総括研究報告書

主任研究者　　武田　雅俊

平成 16 年（2004 年）3 月

目　次

Ⅰ.総括研究報告書
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・・・・・・・・・・・・・・・ 1

Ⅱ.分担研究報告書
1. メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素のC677T多型と高齢発症型アルツハイマー病発症との関連・・・ 9
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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 12
田中　稔久

3.アルツハイマー病診断マーカーとしてのWGAにおける結合糖タンパク・・・・・・・・・・・ 18
〜リン酸化タウタンパクとの検討〜
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
（酸化ストレスに関連するアルツハイマー病診断マーカーの研究）・・・・・・・・・・・・・ 24
千葉　茂

5.遺伝子多型を用いたアルツハイマー病痴呆の特徴に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・ 27
谷向　知

Ⅲ.研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 31

Ⅳ.研究成果の刊行物・別刷・・ 32

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）

総括研究報告書

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

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　筑波大学臨床医学系　精神医学

研究要旨

高齢化社会にいたる現代は早期診断・早期治療のためにアルツハイマー病の生物学的診断マーカーの確立はきわめて重要である。アルツハイマー病(AD)生物学的診断マーカーの確立するにあたり、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、そして神経変性メカニズムに関与した髄液マーカーの開発といった 3 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-e4 非キャリヤーで MTHFR-T アレルによる LOAD 発症のリスク効果と促進効果を認め、LOAD 患者で血漿ホモシステイン濃度が MTHFR 遺伝子の C677T 多型で遺伝的影響を受けることを示した。すなわち、血漿ホモシステイン濃度上昇の遺伝的リスクのある患者についてホモシステイン濃度をコントロールすることが発症リスクを下げる可能性が示唆された。また、AD と鑑別が重要となる DLB と皮質基底核変性症(corticobasal degeneration;CBD)との遺伝的背景について apoE 遺伝子、α 1 アンチキモトリプシン（ACT）遺伝子多型、ブチルコリンエステラーゼ K（BChE-K）変異遺伝子について検討した。ACT 多型 T アリルは AD で高頻度に認められる傾向は認めたが apoE 多型との促進効果はみられなかった。CBD では BChE-K 変異型の出現頻度が有意に増加しており、パーキンソン症状がみられる DLB において BChE-K 変異型との関連が認められた。

次に、酸化ストレス関連因子からの検討においては、尿や血清中で測定可能な酸化ストレス (Oxidative Stress, OS) マーカーの測定値が AD 患者で変化しているかどうかを検討した。14 例の AD 群（平均 69 歳）および 39 例の健常対照群（平均 65 歳）を対象に、OS 強度の指標として尿中 8-hydroxydeoxyguanosine（8-OHdG）および血清 ubiquinol に対する ubiquinone の比（CoQ10 酸化率）を測定し、OS に対する防御能力の指標として serum total antioxidant status（STAS）を測定した。AD 群における尿中 8-OHdG および血清 CoQ10 酸化率は対照群に比較して有意に高く（いずれも $p < 0.05$）、AD 群の STAS は対照群に比較して有意に低かった（$p < 0.001$）。以上の結果から、AD 患者では尿および血清を用いて OS の増加が検出され得ることが明らかになった。

そして、神経変性メカニズムに関与した髄液マーカーの開発といった点では、特異的な糖鎖を認識して結合するレクチンの一種である WGA (小麦胚芽レクチン, Wheat Germ Agglutinin)結合糖タンパクが AD の髄液中で減少しているという報告より、アルツハイマー病（AD）の髄液中診断マーカーとしての有用性を検討した。また、髄液中のリン酸化タウタンパク（pS199）を測定し、WGA 結合糖タンパクとの関連性を検討した結果、リン酸化タウタンパク-WGA 結合糖タンパクの指標は、WGA 結合糖タンパク単独よりもよりも特異度の高い診断マーカーとなりうる可能性が示唆された。さらに、アポトーシス阻害蛋白である X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP)との関連では、低濃度の Aβ によってアポトーシス阻害蛋白である XIAP の発現が抑制され、更に、XIAP の強制発現により、低濃度の Aβ によって引き起こされている酸化ストレスへの脆弱性が、回復することを見出した。そしてまた、この XIAP とタウ蛋白の結合に重要なタウ蛋白第 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いくつかの神経疾患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。以上のことより、XIAP の発現が AD の病理過程において重要なこと、タウ蛋白過剰に起因するアポトーシスはこの第 1 メチオニン切断に密接に関与すること、および生物学的診断マーカーとして使用できる可能性が示唆された

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、α1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β42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、そして神経変性メカニズムに関与した髄液マーカーの開発といった3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

患者は NINCDS-ADRDA の診断基準により probable AD と診断した。採血した患者196人の年齢は65から98歳平均79.2歳、発症年齢は65から94歳で、平均74.7歳で、年齢をマッチさせた正常対照者385人は65から92平均75.4歳であった。MTHFRのC677TはPCR-RFLP法で同定し、CBS遺伝子の31塩基VNTR領域はエクソン13内にフォワード、イントロン13内にリバースのプライマーを設計し、それを用いてPCR増幅し、視覚的に確認した。これのもっとも多い頻度の18リピートで得られるPCR断片長796塩基を基準としてPCR産物のサイズを比較することによって同定した。また、LOADのリスクとして知られているアプリポ蛋白E（以下APO Eと略す）との関連をみるために、ApoE遺伝子の遺伝子型をWenhamらの報告したPCR-RFLP法にて同定した。血漿ホモシステイン濃度はABD-Fで誘導体化しHPLCカラムを通したあと蛍光検出で測定した。

またAD以外の疾患では、DLBはDLB international workshop 1995のprobable DLB、CBDはLitvan (1997)が提唱する臨床症状の特徴に加え、MRI・PETによる画像検査を使用、健常者は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とした。apoE多型、ACT遺伝子多型、BChE-K変異型はPCR-RFLP法を用いて同定した。

酸化ストレス関連因子の検討では、臨床的に診断（ICD-10）された14例のAD群（男5例、女9例、年齢57-82歳、平均69歳）、および39例の健常対照群（男24例、女15例、年齢60-77歳、平均65歳）を対象に、朝食前に尿および静脈血を採取し（尿および血清を解析まで−70℃で保存）、OSマーカーについて検討した。すなわち、OS強度の指標として尿中8-hydroxydeoxyguanosine（8-OHdG; ELISA法）および血清ubiquinolに対するubiquinoneの比（CoQ10酸化率; HPLC法）を測定し、OSに対する防御能力の指標としてserum total antioxidant status（STAS; 比色法）を測定した。

脳脊髄液の検討では、対象はAD 58例(男/女:19/39)、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31例（20/11）、コントロールとして痴呆のない症例50例（28/22）の髄液において、レクチンブロット法を用いて検討を行った。総タンパク5μg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。リン酸化タウタンパク(Tau pS199)の測定は、ヒトリン酸化タウ(pS199) ELISAキット(BioSource社)を用いて測定した。

培養細胞に対するXIAPの発現の検討をおこなうため $A\beta_{25\text{-}35}$(部分ペプチド)、$A\beta_{35\text{-}25}$(逆配列部分ペプチド)、$A\beta_{1\text{-}42}$(全長フィブリル化ペプチド)の存在下にて48時間まで経過を追った後細胞を集めた。そして、抗XIAP抗体を用いたウエスタンブロットにより、actinの発現を内部コントロール指標としてXIAPの発現を検討した。そして、XIAPの過剰発現によってこの酸化ストレス脆弱性がどのようになるかを検討するために、COS 7細胞株にXIAP遺伝子(Dr. Ashwell JD.(National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA.)より供与)を一過性に強制発現させた。この、XIAP遺伝子のトランスフェクション24時間後に、500nM $A\beta_{1\text{-}42}$の存在下でさらに48時間培養し、そして、0.5μM H_2O_2 および 5 nM 4-hydroxynonenal を添加して3時間後の細胞死のレベルについてLive and Dead Assayを用いて検討した。

最後に、脳脊髄液サンプルはAD患者および神経疾患コントロール(くも膜下出血、統合失調症、神経症)から採取した脳脊髄液を用いて検討をおこなった。抗体は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。

(倫理面への配慮)

ヒト遺伝子を扱う総ての研究は各大学倫理委員会の承認(のもとに研究を行った。各対象例からの採血・採尿にあたっては、文書にて本研究の趣旨を患者および保護者(対照群は本人のみ)に説明し、研究に対する協力の同意を得た。協力の同意の有無によって、患者が臨床上、不利益を被ることがないように配慮した。

C. 研究結果

MTHFR多型の遺伝子型頻度は患者群/正常群cc型64人/144人[33.0%/38.0%],ct型98/193[50.5/50.9],tt型32/42[16.4/11.1]で、アレル頻度はcアレル226/481[58.2/63.5%],tアレル162/277[41.8/36.5%]であった。MTHFR-C677T多型の遺伝子頻度は患者群と正常群とで有意差を検出できなかった。しかし患者群でTアレルの多い傾向がみられたため、ApoE4キャリヤーとノンキャリヤーで分けて再検討した。ApoE4(+)ではcc型38/25[37.3/41.7],ct型52/30[51.0/50.0],tt型12/5[11.8/8.3]で、アレル頻度はcアレル128/80人[62.7/66.7],tアレル76/40[37.3/33.3]で、またApoE4(-)ではcc型26/119[28.2/37.3],ct型46/163[50.0/51.1],tt型20/37[21.7/11.6]で、アレル頻度はcアレル98/401人[53.3/62.9],tアレル86/237[46.7/37.1]であった。ApoE4ノンキャリヤーでは正常群より患者群でMTHFR-Tアレルは $p<0.02$ で有意に頻度が高く、同様の傾向をApoE4キャリヤーでも認めたが、有意ではなかった。すなわち、APOE 4ノンキャリヤーでのMTHFR-Tアレルのリスク効果を示した。

MTHFRの発症年齢への影響を調べるために、遺伝子頻度の高いCC型と低頻度のTT型とで年齢別LOAD発症率を比較したところ、。TT群ではCC群に比べてLOADの発症が早くなる傾向がみられ、有意差はApoE4ノンキャリヤーでのみ($p<0.05$)認めた。すなわち、MTHFR-TT多型がApoE4ノンキャリヤーでADの発症促進効果を示した。

また、DLB、CBDとの比較検討においては、apoE ε4アリルの出現頻度はAD群で0.332およびDLB群で0.281、健常対象者(Cont)群0.111と比べ有意な増加(それぞれ $p<0.001$)がみられた。一方、CBD群では0.121とCont群と同程度であった。ACT遺伝子Tアリルの出現頻度は、AD群ではCont群と比較してTアリルの増加傾向($p=0.06$)がみられたが有意ではなかった。BChE-K変異型の出現頻度は、AD群、DLB群、Cont群の3群間に差は認められなかった。しかし、CBD群ではBChE-K変異型の出現頻度がCont群と比較して有意に増加($p=0.038$)していた。

次に、AD群における尿中8-OHdG[13.2(9.0) ng/ml,平均(標準偏差)]は対照群[7.9(4.2) ng/ml]に比較して有意に高く($p<0.05$、Wilcoxon/Kruskal-Wallisの検定)、AD群の血清CoQ10酸化率[7.5(2.1)]も対照群[4.8(0.9)]に比較して有意に高かった($p<0.05$)。一方、AD群のSTAS[1186(96)μM]は対照群[1398(129)μM]に比較して有意に低かった($p<0.001$)。以上の結果から、AD患者では尿および血清を用いてOSの増加が検出され得ることが明らかになった。

ADで低値を示すWGA結合糖タンパクは3種を候補としており、これらのうち多症例での検討によりさらに約75kDaと約25kDaの2種のタンパク(それぞれa, cとする)が診断マーカーとして有用であることが示唆された。いずれのタンパクも、AD群とnon-AD群と比較して検討すると、有意に($p<0.001$)低値を示した。さらにリン酸化タウタンパクを同症例にて測

定し、比較検討した。その結果2種のタンパクのうち、WGA 結合糖タンパク-a は、AD で減少し、リン酸化タウタンパクは増加していたため、WGA 結合糖タンパク-a に対するリン酸化タウタンパクの比を検討したところ、AD 群で non-AD 群よりも明らかに高値を示し（$p < 0.001$）、この指標は WGA 結合糖タンパク単独よりもさらに精度の高いマーカーとなる可能性が示唆された。さらにレビー小体病では、AD 群と比較して明らかに低値を示していた。

培養細胞に対する Aβの細胞死毒性に関して検討したところ、5μM および 500 nM のフィブリル化 $Aβ_{1-42}$ には細胞死として直接確認されるレベルでの細胞毒性がないことが確認された。そこで、培養細胞に対する XIAP の発現の検討をおこなったところ、5μM の $Aβ_{25-35}$、500nM の $Aβ_{1-42}$ の添加により、XIAP の発現が減少し続けていた。このような影響は逆配列部分ペプチドである $Aβ_{35-25}$ の添加では認められなかった、さらに、これらのペプチドによって誘導される酸化ストレス脆弱性のレベルについて検討するために、SY5Y 神経芽細胞腫を 5μM $Aβ_{25-35}$、5μM $Aβ_{35-25}$、500nM $Aβ_{1-42}$ の存在下で 48 時間培養したあと、2 種類の薬剤によって酸化ストレスを与え、細胞死への影響を検討した。5μM $Aβ_{25-35}$ または 500nM $Aβ_{1-42}$ を添加してあった細胞では酸化ストレスへの脆弱性が増加しており、酸化ストレスを誘導する物質をさらに添加しなければ細胞死は増加しないが、H_2O_2 の添加または 4-hydroxynonenal の添加によって、3 時間後の細胞死の増加が確認された。そして、このような細胞死脆弱性を惹起する効果が XIAP の発現減少によるものかどうかを確認するために、XIAP を一過性に強制発現させた細胞を用いて検討をおこなったところ、コントロールとして用いた mock vector をトランスフェクトした細胞では $Aβ_{1-42}$ の添加によって細胞死脆弱性が増加し、H_2O_2 の添加あるいは 4-hydroxynonenal の添加によって細胞死の増加が確認されたが、この効果は XIAP を一過性に強制発現させた細胞では有意に減少していた。

最後に、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、反応陽性のバンドが AD 患者脳脊髄液中に強く染色された。

D. 考察

遺伝的解析においては、AD においてはホモシステインの代謝で葉酸サイクルに依存したホモシステイン濃度の増加が LOAD のリスクとなっていると考えられる。

また、ACT 多型と DAT との関連いついては統一的な見解が得られていない。BChE-K 変異型と AD 発症との関連についても統一的な見解が得られていない。しかし、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が知られており、DLB でみられるパーキンソン症状や幻覚・妄想などの臨床症状や、DAT と比較してアセチルコリンエステラーゼ阻害薬使用による効果が期待できるといった報告などからの違いについて検討するに値すると考えられる。

酸化ストレス関連因子による解析では、AD 患者の尿および血清において OS 強度の増加や OS に対する防御能力の低下が認められた。すなわち、AD 患者では尿および血清を用いて OS の増加が検出され得ることが明らかになった。AD の前段階である Mild Cognitive Impairment 症例における尿および血清中 OS マーカーの変化を経時的に追跡することによって、OS マーカーが AD 発症危険度を予測する尺度となり得るかどうかについて検討することも、今後の重要な課題である。

脳脊髄液マーカーに関しては、WGA 結合糖タンパクがマーカーとなり、レビー小体病と区別できる可能性が示唆されたが、WGA が認識する糖鎖のうち、*O*-GlcNAc よる糖鎖修飾（グリコシル化）は、タンパクの転写・翻訳に関与したり、タンパクの輸送、シグナル伝達に関与していると報告されている。APP、タウタンパクも *O*-GlcNAc によってグリコシル化されるタンパクであり、AD に関与するタンパクにおいてグリコシル化は何らかの役割を担っていると考えられる。

Aβは、培養神経細胞に添加されると、細胞に障害を与え、アポトーシスによる神経細胞死を引き起こすことがよく知られており、その作用メカニズムに関してはカルシウムイオノフォア仮説、酸化ストレス仮設などいくつか知られているが、低濃度の Aβの作用機序は明らかではない。今回の結果としては、低濃度の Aβによってアポトーシス阻害蛋白である XIAP の発現が抑制され、さらに XIAP の強制発現により、低濃度の Aβによって引き起こされている酸化ストレスへの脆弱性が、回復することを見出した。これにより、生体内濃度に近い低濃度の Aβによる XIAP の発現抑

制により、酸化ストレスへの脆弱性が引き起こされるメカニズムの存在が示唆された。また、XIAPとN末端のMetの除かれたタウ蛋白との特異的な結合が見出されているが、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も重要と考えられた。

E. 結論

遺伝学的解析では、ApoE-e4非キャリヤーでMTHFR-Tアレルによる LOAD 発症のリスク効果と促進効果を認め、LOAD患者で血漿ホモシステイン濃度がMTHFR遺伝子のC677T多型で遺伝的影響を受けることを示した。すなわち、血漿ホモシステイン濃度上昇の遺伝的リスクのある患者についてホモシステイン濃度をコントロールすることが発症リスクを下げる可能性を示した。また、apoE ε 4アリルは、DATとDLBで有意に高頻度に出現した。ACT 多型は、いずれの疾患群、Cont群と之間で差は認めず、apoE ε 4アリルの有無にも関連はみられなかった。BChE-K変異型は、cont群と比べCBDで有意に増加していた。そして、BChE-K変異型は、パーキンソン症状と関連している可能性があった。

酸化ストレス関連因子に基づく解析では、AD患者の尿および血清において、OS 強度の増加やOSに対する防御能力の低下が認められ、AD患者では尿および血清を用いて OS の増加が検出され得ることが明らかになった。

脳脊髄液関連では、WGAによって、ADに関連があると思われる糖タンパクを2種検出し、これらのWGAと結合する髄液中糖タンパクは、リン酸化タウタンパクとともに用いることによってADの有効な診断マーカーとなりうることが示された。また、低濃度のAβによってアポトーシス阻害蛋白であるXIAPの発現が抑制されること、第1メチオニンの切断を受けたタウ蛋白はXIAPと特異的な結合をすること、そして第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患者脳脊髄中に多く存在することが判明した。

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

Tomoyuki Kida, Kouzin Kamino, Toshihisa Tanaka, Takashi Kudo, Masatoshi Takeda. Genetic association analysis of the MTHFR and the CBS gene in late-onset Alzheimer's disease in a Japanese population. Neurobiology of Aging, 23(1S), S345, 2002

Tomoyuki Kida, Kouzin Kamino, Mitsuko Yamamoto, Daisuke Kanayama, Toshihisa Tanaka, Takashi Kudo, Masatoshi Takeda. PSYCHOGERIATRICS 3, 2004（掲載予定）

Pei JJ, Khatoon S, An WL, Nordlinder M, Tanaka T, Braak H, Tsujio I, Takeda M, Alafuzoff I, Winblad B, Cowburn RF, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Role of protein kinase B in Alzheimer's neurofibrillary pathology. Acta Neuropathol (Berl) 105:381-92,2003.

Matsumoto N, Nakamura Y, Kashiwagi Y, Hashimoto R, Kudo T, Tanaka T, Shinoasaki K, Takeda M. Involvement of Rho-associated kinase in neurite sprouting and amyloid beta production of rat cortical neurons in insulin-free medium. Psychogeriatrics 3, 29-38,2003.

田中稔久、武田雅俊　文献抄録「治療的に有効なアミロイドβペプチドに対する抗体はアミロイドβの4〜10残基をターゲットとし、細胞毒性と線維形成を阻害する。」「アルツハイマー病患者へのワクチン療法によるβ-アミロイドβに対する特異的な抗体産生。」老年精神医学雑誌 14,251,2003.

田中稔久、和田健二、山森英長、工藤喬、田中修二、武田雅俊　アルツハイマー病診断に対する生物学的マーカー　精神神経学雑誌 105, 387-392, 2003

田中稔久、武田雅俊　シリーズ精神医学用語解説 254. プロテオームとプロテオミクス　臨床精神医学 32,345-347,2003.

田中稔久、武田雅俊　What's New in Top Journal 話題の論文 「モデルマウスにおいて検討されたアミロイドワクチン療法における有効な抗体の特性と、ヒト臨床治験において検討された産生抗体の特性」「ポリグルタミン病への治療戦略：オリゴマー化阻害とヒストン脱アセチル化阻害」Cognition and Dementia 2, 144-148, 2003.

田中稔久、山森英長、田中修二、和田健二、鈴木英鷹、紙野晃人、工藤喬、大河内正康、谷井久志、以倉康充、貴田智之、松本均彦、福森亮雄、金山大祐、武田雅俊　アポトーシス阻害蛋白とタウ蛋白との相互作用と神経細胞死に関する研究　精神薬療研究年報 35,63-73,2003.

田中稔久、武田雅俊　アルツハイマー病における新しい治療の試み Aβワクチンによる治療の現況　老年精神医学雑誌 14,556-561,2003.

田中稔久、武田雅俊　講座：老年精神医学の専門医のために-14　アルツハイマー型痴呆　老年精神医学雑誌 14,783-794,2003.

田中稔久、武田雅俊　4.　タウ　2) タウのリン酸化とリン酸化の調節機構　日本臨床 61,.増刊号9　痴呆症学（Ⅰ）,66-72,2003

Watanabe Y, Shimizu Y, Urakami K, Matsushima E, Nakashima K : Vertical ophthalmoplegia in a demented patient with striatopallidodentate calcification. Psychiatry Clin Neurosci. Aug ; 57(4) : 447－450, 2003

Inoue M, Suyama A, Kato T, Urakami K, Nakashima K, Meshitsuka S: Development of computerized Kana Pick out test for the neuropsychological examination. Comput Meth Programs Biomed 70: 271-276, 2003.

Takeshima T, Ishizaki K, Fukuhara Y, Ijiri T, Kusumi M, Wakutani Y, Mori M, Kawashima M, Kowa H, Adachi Y, Urakami K, Nakashima K: Population based door-to-door survey of migraine in Japan: the Daisen Study. Headache 44: 8-19, 2004.

Wakutani Y, Kowa H, Kusumi M, Nakaso K, Yasui K, Wada-Isoe K, Urakami_K, Takeshima T, Nakashima K. The regulatory region polymorphisms of the MTHFR gene are not associated with Alzheimer's disease. Dement Geriatr Cogn Disord 17: 147-150, 2004.

Wakutani Y, Kowa H, Kusumi M, Nakaso K, Yasui K, Wada-Isoe K, Urakami K, Takeshima T, Nakashima K. A haplotype of the methylenetetrahydrofolate reductase gene is protective against late-onset Alzheimer's disease. Neurobiol Aging, 25: 291-294, 2004.

Wakutani Y, Watanabe K, Adachi Y, Isoe-Wada K, Urakami K, Ninomiya H, Hashimoto H, Saido TC, Iwatsubo T, Nakashima K. Novel amyloid precursor protein gene missense mutation (D678N) in probable familial Alzheimer's disease. J Neurol Neurosurg Psychiatr (in press).

Wada-Isoe K, Wakutani Y, Urakami K, Nakashima K. Elevated interleukin-6 levels in cerebrospinal fluid of vascular dementia patients. Acta Neurol Scand (in press)

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, 2004 (in press)

布村明彦、千葉　茂、Smith MA、Perry G. アルツハイマー病脳における酸化的傷害とアミロイドβ沈着. 老年期痴呆研究会誌 13: 43-45, 2004

布村明彦、千葉　茂、Smith MA、Perry G. アルツハイマー病と酸化的ストレス. 老年期痴呆研究会誌 13: 83-85, 2004

谷向　知、朝田　隆. 痴呆. *日本臨床* 40 145-148, 2003

谷向　知, 三浦利奈, 有園陽子. 痴呆の認知障害. 新世紀の精神科治療「認知の科学と臨床」, 武田雅俊編, 中山書店, 東京, pp103-115,2003

遠藤英俊、三浦久幸、谷向　知、上村和正高齢者の生活管理とケア. *ダイナミックメディシン* 7, 下条文武,斎藤康監修, 西村書店, 東京、pp30-20-22、2003.

有園陽子, 谷向　知. 言語障害を伴う痴呆性高齢者のRorschach法反応－思考言語カテゴリーを用いて－. *ロールシャッハ法研究* 7: 51-61, 2003

谷向　知. 家族性アルツハイマー病ApoE. *老年精神医学雑誌* 14(11); 1354-1360, 2003

谷向　知、朝田　隆. 初期アルツハイマー病と軽度認知障害. *こころの臨床ア・ラ・カルト* 22(4) 435-442, 2003

谷向　知, 水上勝義, 朝田　隆. 物忘れ外来.

「頭痛外来から女性外来まで人気の専門外来を知るガイド」，朝倉書店，東京，pp131-144，2004

谷向　知. 痴呆の早期診断における精神科医の役割. *日本精神神経学会誌* 106(1) 2004（印刷中）

谷向　知、久米明人、荒井啓行. 学会印象記 第1回 Mild Cognitive Impairment シンポジウム. *Dementia Japan* 18(1) 2004　(印刷中)

2. 学会発表

貴田智之、紙野晃人、工藤喬、武田雅俊 MTHFR, CBS 遺伝子多型の血漿総ホモシステイン濃度およびアルツハイマー病に対する影響　第18回日本老年精神医学会 2003. 6. 18-20、名古屋国際会議場.

田中稔久、山森英長、武田雅俊　リチウムによるタウ蛋白のリン酸化制御について　第23回リチウム研究会 シンポジウム「リチウムの新たな作用を求めて」2003.04.26　東京経団連会館

Tanaka T, Yamamori H, Wada K., Takeda M. Phosphorylation of tau protein at Ser 214 induced by lithiumThe 6th　International Conference AD/PD, 2003.5.9 Seville(Spain)

Yamamori H, Tanaka T, Takeda M. Amyloid β downregulats X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) expression in cultured cells The 6th　International Conference AD/PD, 2003.5.9, Seville(Spain)

Tanaka T, Yamamori H, Takeda M..Modified tau protein in CSF for diagnosis of Alzheimer disease　The 11th Congress of the International Psychogeriatrics Association, 2003.8.21, Chicago(U.S.A.)

田中稔久、山森英長、ヌルンネッサベグム、武田雅俊　リチウムによるカスパーゼ阻害蛋白発現への影響　第22回日本痴呆学会、2003.10.3、太田区産業プラザ（東京）山森英長、田中稔久、武田雅俊アミロイドβ蛋白のアポトーシス阻害蛋白発現への影響　第22回日本痴呆学会、2003.10.4、太田区産業プラザ（東京）

Tanaka T, Yamamori H, Begum NN, Takeda M..Downregulation of expression of X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) by amyloid β, is reverted by lithium.　The 1st Conference of Brain Aging, 2003.10.7, Bucharest (Romania)

田中稔久、山森英長、Begum Nurun Nessa、紙野晃人、工藤喬、大河内正康、田上真次、以倉康充、福森亮雄、金山大祐、武田雅俊　タウ蛋白誘導性アポトーシスによる神経変性に対する抑制剤開発研究　第36回精神神経系薬物治療研究報告会、2003.12.5、千里ライフサイエンスセンター

谷口美也子、和田健二、涌谷陽介、中島健二、浦上克哉：アルツハイマー病診断マーカーとしての髄液中 WGA 結合糖たんぱく質の有用性。第22回日本痴呆学会総会　大田区産業プラザ　コンベンションホール　2003年10月3日

浦上克哉、谷口美也子、井上仁、涌谷陽介、和田健二、中島健二：アルツハイマー型痴呆早期発見のための簡易スクリーニング法の検討。第22回日本痴呆学会総会　大田区産業プラザ　コンベンションホール　2003年10月3日

涌谷陽介、和田健二、楠見公義、浦上克哉、中島健二：アルツハイマー型痴呆症における Human Aph-1 alpha、Aph-1 beta、PEN2 遺伝子変異のスクリーニング。大田区産業プラザ　コンベンションホール　2003年10月3日

綱分信二、木村有希、中村真由子、室谷裕子、紙野幸子、谷口美也子、浦上克哉：痴呆症へのアロマテラピーの有用性の検討。第22回日本痴呆学会総会

大田区産業プラザ　コンベンションホール 2003年10月3日

浦上克哉：タッチパネル式コンピューターを用いた痴呆症スクリーニング法の検討. 文部科学省「先端脳」平成15年度班会議　砂防会館　2003年12月19-20日

Urakami K, Arai H, Itoh N, Ishiguro K, Oono H, Nakashima K : CSF tau protein is a useful diagnostic biomarker in Alzheimer's disease and related disorders. 6th International Conference AD/PD 2003 Spain May 8-12, 2003

Chairs : Katsuya Urakami, Louise Poulin de Courval, Poster Presentations Dementia I : The7th　Asia/Oceania Regional Congress of Gerontology　Tokyo International Forum November24-28, 2003

Wakutani Y, Kowa H, Kusumi M, Nakaso K,

Yasui K, Isoe-Wada K, Fukuhara Y, Urakami K, Takeshima T, Nakashima K: A protective haplotype of the methylenetetrahydrofolate reductase gene against late-onset Alzheimer's disease. Society for Neuroscience (New Orleans) 2003.

44th Annual Meeting of the Japanese Society of Neuropathology (29-31 May 2003, Nagoya)

Nunomura A, Chiba S, Lippa CF, Cras P, Kalaria RN, Smith MA, Perry G. Increased neuronal RNA oxidation in familial Alzheimer disease. Neuropathology 23 (2): A53, 2003

田村義之、千葉　茂、高崎英気、滝沢修一、白濱靖幸、田端一基、土田英文、石丸雄二、石本隆広、尾森伸行、布村明彦. せん妄に対して塩酸ドネペジルが著効したアルツハイマー病の 1 例. 老年精神医学雑誌 14(5): 672, 2003　第 18 回日本老年精神医学会 (平成 15 年 6 月 18-20 日、名古屋)

Nunomura A, Chiba S, Smith MA, Perry G. Oxidative damage to neuronal RNA shows age-dependent increases in human brain. Brain Pathology Supplement: S101, 2003 XVth International Congress of Neuropathology (14-18 September 2003, Turin, Italy)

布村明彦. シンポジウム 1 変性疾患における神経細胞死 アルツハイマー病における酸化ストレスと神経細胞死. アルツハイマー病における酸化ストレスと神経細胞死 Dementia Japan 17(2): 145, 2003　第 22 回日本痴呆学会 (平成 15 年 10 月 3-4 日、東京)

Tabata K, Nunomura A, Chiba S, Takeuchi M, Ochi H. Urinary and serum biomarkers of oxidative stress in Alzheimer disease. Geriatrics Gerontology 3 Supplement 1: S121, 2003 7th Asia/Oceania Regional Congress of Gerontology (24-28 November, 2003, Tokyo)

谷向　知. 痴呆の早期診断における精神科医の役割. 第 99 回日本精神神経学会総会 シンポジウム 東京 2003.05.28-30

谷向　知. 痴呆症の診断におけるビタミン B1 の意義. 第 18 回日本老年精神医学会 名古屋 2003.06.18-20

石井竜介, 谷向　知, 水上勝義, 朝田　隆主症状の出現前に抑うつ状態を呈したレビー小体を伴う痴呆の 3 例. 第 69 回東京精神医学会学術集会　東京 2003.11.08

谷向　知, 飯島佳路, 小倉宏三, 堀　孝文, 朝田　隆. 双極性障害への無けいれん性通電療法の是非を考える－5 例の躁転例を通して－. 第 2 回 Bipolar Disorder 研究会　東京　2003.11.08

谷向　知, 有園陽子, 奥村由美子, 久世淳子. 心理検査を用いた作話の判定と家族指導への試み. 第 4 回日本痴呆ケア学会 総会　仙台 2003.11.22-23

三浦利奈, 服部英幸, 谷向　知. 発症から 8 年が経過した語義失語の 1 例. 第 27 回日本高次脳機能障害学会　東京　2003.12.04-05

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1．特許取得

第 3515988 号　発明の名称：物忘れ自己診断システムおよびその装置　出願番号:特願 2001-281442　出願年月日:平成 13 年 9 月 17 日　登録日：平成 16 年 1 月 30 日

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：メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素のC677T多型と高齢発症型アルツハイマー病発症との関連

研究者　武田雅俊　大阪大学大学院医学系研究科・精神医学
分担研究協力者　紙野晃人　大阪大学大学院医学系研究科・精神医学
分担研究協力者　貴田智之　大阪大学大学院医学系研究科・精神医学

研究要旨

近年血漿ホモシステイン濃度が独立したアルツハイマー病（AD）の発症リスクとして知られている。血漿ホモシステインはメチオニンからシステインにかわる代謝経路の中間産物の含硫アミノ酸で、動脈硬化などの血管性病変に関連する。ホモシステインはADの血管性の一因子と考えられ、酸化ストレスを惹起するものである。血漿ホモシステイン濃度の上昇は加齢や性差が関与し、それは代謝経路の影響が要因と思われる。そこで、われわれはホモシステイン代謝酵素の遺伝子多型がADの発症リスクとホモシステイン濃度への影響を解析し、診断マーカーとしての可能性を検討した。今回のわれわれの研究で、ApoE-e4非キャリヤーでMTHFR-Tアレルによる LOAD発症のリスク効果と促進効果を認め、LOAD患者で血漿ホモシステイン濃度がMTHFR遺伝子のC677T多型で遺伝的影響を受けることを示した。すなわち、血漿ホモシステイン濃度上昇の遺伝的リスクのある患者についてホモシステイン濃度をコントロールすることが発症リスクを下げる可能性が示唆された。

キーワード：アルツハイマー病、メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素、遺伝子多型解析

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、α1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β42とがあるが、未だ生前診断を簡易に確定できるものではない。

今回、我々はアルツハイマー病の遺伝的因子を検索し、それを診断の補助に結び付けられないかと考え検索をおこなった。血漿ホモシステインはメチオニンからシステインにかわる代謝経路の中間産物の含硫アミノ酸で、動脈硬化などの血管性病変に関連する。ホモシステインはADの血管性の一因子と考えられ、酸化

ストレスを惹起するものである。血漿ホモシステイン濃度の上昇は加齢や性差が関与し、それは代謝経路の影響が要因と思われる。そこで、われわれはホモシステイン代謝酵素の遺伝子多型がADの発症リスクとホモシステイン濃度への影響を解析し、診断マーカーとしての可能性を検討した。

B. 研究方法

患者は NINCDS-ADRDA の診断基準により probable AD と診断した。正常対照の高齢者は大阪府吹田市内に在住し、見当識や病歴などに関する質問によって認知障害のないことを確認した。研究への参加に対して文書で同意を得た後、末梢血を採取した。この研究は大阪大学におけるヒトゲノム研究に関する規程に従っておこなった。

採血した患者196人の年齢は65から98歳平均79.2歳、発症年齢は65から94歳で、平均74.7歳で、年齢をマッチさせた正常対照者 385 人は 65 から 92 平均75.4歳であった。末梢血は EDTA を加え、血漿と血球は採血 6 時間以内に分離した。DNA はコマーシャル・キットを用いて血球成分から抽出し、4℃で保存し、血漿は使用するまで-80℃で保存した。

MTHFR の C677T は PCR－RFLP 法で同定し、CBS 遺伝子の 31 塩基 VNTR 領域はエクソン 13 内にフォワード、イントロン 13 内にリバースのプライマーを設計し、それを用いて PCR 増幅し、視覚的に確認した。これのもっとも多い頻度の 18 リピートで得られる PCR 断片長 796 塩基を基準として PCR 産物のサイズを比較することによって同定した。また、LOAD のリスクとして知られているアプリポ蛋白 E（以下 APO E と略しますが）との関連をみるために、ApoE 遺伝子の遺伝子型を Wenham らの報告した PCR-RFLP 法にて同定した。血漿ホモシステイン濃度はABD-Fで誘導体化しHPLCカラムを通したあと蛍光検出で測定した。また栄養摂取の効果を調べるために BCG 法を用いて血漿アルブミン濃度も測定した。

得られたデータを統計解析した。検定は 0.05 以下の p 値を有意と判定した。

（倫理面への配慮）

本研究は人の血液をもちいた遺伝子解析であるが、厚生労働省の提示する遺伝子解析ガイドラインに基づいたプロトコールを作成し、大阪大学倫理委員会での承認のうえで,本人の書面に基づく同意をいただいておこなった。よって、倫理面への配慮は十分になされているものと考える。

C. 研究結果

MTHFR 多型の遺伝子型頻度は患者群/正常群 cc 型 64 人 /144 人 [33.0 % /38.0 %],ct 型 98 /193[50.5/50.9],tt 型 32/42[16.4/11.1]で、アレル頻度は c アレル 226/481[58.2/63.5％],t アレル 162/277[41.8/36.5%]であった。MTHFR-C677T 多型の遺伝子頻度は患者群と正常群とで有意差を検出できなかった。しかし患者群で T アレルの多い傾向がみられたため、ApoE4 キャリヤーとノンキャリヤーで分けて再検討した。ApoE4(+)では cc 型 38/25[37.3/41.7],ct 型 52/30[51.0/50.0],tt 型 12/5[11.8/8.3]で、アレル頻度は c アレル 128/80 人[62.7/66.7],t アレル 76/40[37.3/33.3] で、また ApoE4(-) では cc 型 26/119[28.2/37.3],ct 型 46/163[50.0/51.1],tt 型 20/37[21.7/11.6]で、アレル頻度は c アレル 98/401 人[53.3/62.9],t アレル 86/237[46.7/37.1]であった。ApoE4 ノンキャリヤーでは正常群より患者群で MTHFR-T アレルは $p<0.02$ で有意に頻度が高く、同様の傾向を ApoE4 キャリヤーでも認めたが、有意ではなかった。すなわち、APO E 4 ノンキャリヤーでの MTHFR-T アレルのリスク効果を示した。

次に、CBS VNTR は 17,18,20 のリピート数のみを認め、遺伝子型、アレル頻度は、カイ二乗検定にて特に患者群と正常群との差を認めなかった。ApoE4 キャリヤーとノンキャリヤーでわけても差を認めなかった。

そこで発症リスク効果の相互作用を補正するために ApoE4 アレル量, MTHFR-T アレル量 ,CBS-20 リピートアレル量を LOAD 発症についてのロジスティック回帰分析をおこなった。ApoE4 はオッズ比（OR）5.2,95% 信頼区間（CI）3.51-7.59, $p<0.0001$、MTHFR-T アレルは OR1.4, 95%CI 1.02-1.85, $p=0.04$、CBS-20 アレルは OR0.8, 95%CI 0.55-1.27 であった。ApoE4 のリスク効果は以前から知られているように明らかに有意であった。さらに MTHFR-T アレルが ApoE4 と独立したリスク効果を持つことが示された。また、ApoE4 キャリヤーとノンキャリヤーでわけた場合も同様におこなった。ApoE4(-)のとき MTHFR-T アレルは OR1.5, 95%CI 1.04-2.14, $p=0.03$、CBS-20 アレルは OR0.7, 95%CI 0.37-1.16 であった。MTHFR-T アレルのリスク効果は ApoE4 ノンキャリヤーでより顕著であった。しかし CBS-20 リピートアレル量は有意な効果を認めなかった。すなわち、MTHFR の T アレルが ApoE4 と独立した AD 発症リスクであり、それは ApoE4 ノンキャリヤーで

顕著であることが示された。

MTHFR の発症年齢への影響を調べるために、遺伝子頻度の高いCC型と低頻度のTT型とで年齢別LOAD発症率を比較した。TT群ではCC群に比べてLOADの発症が早くなる傾向がみられた。ApoE4 キャリヤーとノンキャリヤーでわけてみても、この傾向はどちらにも共通した。しかしながら、有意差はApoE4 ノンキャリヤーでのみ(p<0.05)認めた。すなわち、MTHFR-TT 多型がApoE4 ノンキャリヤーで AD の発症促進効果を示した。またCBS で20 リピートのホモ接合型と 18 リピートのホモ接合型とではLOAD発症年齢に差はなかった。

一般的にホモシステイン濃度は男性で高く年齢に応じて上昇し、女性では閉経後に顕著に上昇することが知られている。血漿ホモシステイン濃度に対する年齢、性、栄養摂取、LOAD発症リスクアレルの効果を検討するために、患者についてこれらのパラメータを重回帰分析した。これらの中で、血漿ホモシステイン濃度と有意に相関したのは性別(係数 4.082, 標準化係数0.266、 t値2.560, p=0.01)と MTHFR-T アレル量(係数3.816, 標準化係数 0.404、 t値 3.925, p=0.0002)であった。CBS-20 リピートアレル量は血漿ホモシステイン濃度を増加させる傾向を示したが、わずかに有意ではなかった(係数2.574, 標準化係数0.185、t値1.754)。年齢、血漿アルブミン濃度、ApoE4 アレル量とは有意な効果を認めなかった。すなわち、血漿ホモシステイン濃度はこの高齢者群では年齢に相関せず、また、ApoE4 アレル量および栄養状態とも関係がなかった。CBS は有意ではなかったが、アレル量がホモシステインに影響する傾向を認めた。また、女性ではホモシステインが有意に少なく、MTHFR-T アレル濃度はホモシステインに有意に相関した。

D. 考察

ホモシステインの代謝で葉酸サイクルに依存したホモシステイン濃度の増加が LOAD のリスクとなっていると考えられる。最近の報告では、メチオニンからホモシステインを触媒するメチオニン・シンターゼのA2759G 多型の AA 型で、ApoE4 アレルと独立した AD のリスクと示されており、これを支持している。しかし、さらなる検討が必要と思われる。MTFHRc677t 多型の AD 発症リスクに関してのメタ解析をおこなったが、9 件(全2690例)の報告からの併合オッズ比(ORp) 1.035、95%信頼区間 (CI) 上限1.291 下限0.829 でリスク効果を検出できなかった。しかし、ApoE4 非キャリヤー集団でのメタ解析では、ORp 1.420、95%CI 上限2.169 下限0.930 で有意ではなかったがリスクの傾向を認めた。他施設でのさらなる解析を加えることでリスクは明らかになると思われる。

E. 結論

今回のわれわれの研究で、ApoE-e4 非キャリヤーでMTHFR-T アレルによるLOAD発症のリスク効果と促進効果を認め、LOAD 患者で血漿ホモシステイン濃度がMTHFR 遺伝子の C677T 多型で遺伝的影響を受けることを示した。すなわち、血漿ホモシステイン濃度上昇の遺伝的リスクのある患者についてホモシステイン濃度をコントロールすることが発症リスクを下げる可能性を示したので、今後その濃度に閾値が存在するか、その閾値がどのくらいなのか検討を加える余地がある。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

論文発表

Tomoyuki Kida, Kouzin Kamino, Toshihisa Tanaka, Takashi Kudo, Masatoshi Takeda. Genetic association analysis of the MTHFR and the CBS gene in late-onset Alzheimer's disease in a Japanese population. Neurobiology of Aging, 23(1S), S345, 2002

Tomoyuki Kida, Kouzin Kamino, Mitsuko Yamamoto, Daisuke Kanayama, Toshihisa Tanaka, Takashi Kudo, Masatoshi Takeda. PSYCHOGERIATRICS 3, 2004 (掲載予定)

学会発表

貴田智之、紙野晃人、工藤喬、武田雅俊 MTHFR,CBS 遺伝子多型の血漿総ホモシステイン濃度およびアルツハイマー病に対する影響 第 18 回日本老年精神医学会 2003.6.18-20、名古屋国際会議場.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 許取得

なし。

2. 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：アルツハイマー病髄液マーカーの確立に関する研究）

分担研究者　田中稔久　大阪大学大学院医学系研究科・精神医学
分担研究協力者　山森英長　大阪大学大学院医学系研究科・精神医学

研究要旨

高齢化社会にいたる現代は早期診断・早期治療のためにアルツハイマー病の生物学的診断マーカーの確立はきわめて重要である。今まで、我々はタウ蛋白がアポトーシス阻害蛋白である X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP)と結合することを報告してきた。一方、Aβは、培養神経細胞に添加されるとアポトーシスを引き起こすが、そのメカニズムは未だ完全には明らかではない。しかし、これまでに低濃度の Aβによってアポトーシス誘導蛋白の Bax の発現が誘導され、同時にアポトーシス阻害蛋白の Bcl-2 の発現が抑制されることが報告されている。今回我々は、低濃度の Aβによってアポトーシス阻害蛋白である XIAP の発現が抑制され、更に、XIAP の強制発現により、低濃度の Aβによって引き起こされている酸化ストレスへの脆弱性が、回復することを見出した。よって、XIAP が AD 脳における変性過程に密接に関連することが示唆された。さらに、この XIAP とタウ蛋白の結合に重要なタウ蛋白第 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いくつかの神経疾患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。以上のことより、タウ蛋白過剰に起因するアポトーシスは、この第 1 メチオニン切断に密接に関与すること、および生物学的診断マーカーとして重要であることが示唆された。

キーワード：アルツハイマー病、タウ蛋白、X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP)、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、サブスタンス-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、α1 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β42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。

内因性に細胞内に存在しカスパーゼを抑制する蛋白として、IAP (Inhibitor of Apoptosis)というものが知られており、その中でもXIAPは多くの組織に発現して最もアポトーシスを抑制する因子とされている。昨年我々は、このXIAPが過剰発現する細胞ではアポトーシスを誘導するような細胞死ストレスのもとでその細胞死を抑制すると同時にアポトーシスに伴うタウ蛋白の脱リン酸化を抑制すること、およびN末端のMetの除かれたタウ蛋白と特異的に結合し、その機能を抑制する可能性があることを報告してきた。そこで、今年度はタウ蛋白と同様にADの神経変性メカニズムにおいて重要な役割を持つAβとXIAPの発現に関する研究をおこなった。

Aβは、培養神経細胞に添加されると、細胞に障害を与え、アポトーシスによる神経細胞死を引き起こすことがよく知られている。そして、そのメカニズムに関してはカルシウムイオノフォア仮説、酸化ストレス仮設などいくつか知られているが、そのような理解における大きな問題点としては、Aβが障害作用を示すためには生体内濃度よりもはるかに高い濃度を添加する必要があることが知られている。これまでにこのような問題点をカバーする報告としては、低濃度のAβによってアポトーシス誘導蛋白のBaxの発現が誘導され、同時にアポトーシス阻害蛋白のBcl-2の発現が抑制されることが報告されている。今回我々は、低濃度のAβによってアポトーシス阻害蛋白であるXIAPの発現が抑制され、更に、XIAPの強制発現により、低濃度のAβによって引き起こされている酸化ストレスへの脆弱性が、回復することを見出した。

さらに、アルツハイマー病患者およびいくつかの神経疾患患者から採取した脳脊髄液を用いて検討をおこない、アルツハイマー病患者の脳脊髄液中の第1メチオニン切断化タウ蛋白の量について検討をおこなった。

B. 研究方法

まず、培養細胞に対するXIAPの発現の検討をおこなうためSY5Y神経芽細胞腫を5%ウシ胎児血清を含むD-MEM/F-12培地にて培養し[19,20]、5μMおよび500nMのAβ$_{25\text{-}35}$(部分ペプチド)、5μM Aβ$_{35\text{-}25}$(逆配列部分ペプチド)、500nM Aβ$_{1\text{-}42}$(全長フィブリル化ペプチド) (Sigma-Aldrichより購入)の存在下にて48時間まで経過を追った後細胞を集めた。但し、Aβ$_{1\text{-}42}$はフィブリル化のために培養細胞への使用前3日間1 mMの濃度で37℃でインキュベートおこなった。また、非神経系細胞における検討として293細胞およびCOS7細胞を10%ウシ胎児血清を含むD-MEM培地にて培養し、同様に500nM Aβ$_{1\text{-}42}$の存在下にて48時間まで経過を追った後細胞を集めた。そして、これらの細胞をバッファー(100 mM PIPES、pH6.8、2 mM $MgCl_2$、0.1 mM EDTA、1 mM EGTA、25 mM NaF、1 mM Na_3VO_4、1 mM PMSF、5 μg/ml aprotinine、5 μg/ml leupeptine、0.1% Triton-X100)にて溶解し、そのlysatesを200K x Gにて遠心し、supernatantを得た。このsupernatantの各50μgをポリアクリルアミドゲルの各レーンにアプライして、抗XIAP抗体(R&D社より購入)および抗actin抗体 (Sigma-Aldrichより購入)を用いたウエスタンブロットにより、actinの発現を内部コントロール指標としてXIAPの発現を検討した。

次に、これらのペプチドによって誘導される酸化ストレス脆弱性のレベルについて検討するために、SY5Y神経芽細胞腫を5μM Aβ$_{25\text{-}35}$、5μM Aβ$_{35\text{-}25}$、500nM Aβ$_{1\text{-}42}$の存在下で48時間培養した。そして、0.5μM H_2O_2および5 nM 4-hydroxynonenal (過酸化脂質の1種)を添加して3時間後の細胞死のレベルについてLive and Dead Assay (Molecular Probe社)を用いて検討した。

そして、XIAPの過剰発現によってこの酸化ストレス脆弱性がどのようになるかを検討するために、COS 7細胞株にFlag配列を接続したXIAP遺伝子 (Dr. Ashwell JD.(National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA.)より供与)をpcDNA3.1ベクター内に挿入したものを、Lipofectamine法を用いたトランスフェクションを施行してXIAPを一過性に強制発現させた。この、XIAP遺伝子のトランスフェクション24時間後に、500nM Aβ$_{1\text{-}42}$の存在下でさらに48時間培養し、そして、0.5μM H_2O_2および5 nM 4-hydroxynonenalを添加して3時間後の細胞死のレベルについてLive and Dead Assay (Molecular Probe社)を用いて検討した。

最後に、脳脊髄液サンプルはAD患者および神経疾患コントロール(くも膜下出血、統合失調症、神経症)から採取した脳脊髄液を用いて検討をおこなった。500 μlのサンプルに5 μl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 μg/ml aprotinine、25 μg/ml leupeptine）、それを 100 度で 5 分間ボイルしたあと 200K x G にて遠心し凝固物を遠沈して可溶性画分(supernatant)を得た。このステップはタウ蛋白などの熱耐性の蛋白を収拾するためのものである。この supernatant をセントリカット超ミニ（分子量 10,000 画分）を用いて 300 μl 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。抗体は 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。

（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

まず、培養細胞に対する Aβ の細胞死毒性に関して検討した。さまざまな濃度の $A\beta_{25\text{-}35}$ と $A\beta_{35\text{-}25}$ を SY5Y 神経芽細胞腫の培地に添加して 48 時間後の細胞死レベルを測定したところ、0μM から 5μM までの濃度の $A\beta_{25\text{-}35}$ では細胞毒性が観察されなかったのに対して、10μM から 50μM までの濃度の $A\beta_{25\text{-}35}$ では濃度依存的な細胞死の増加が観察された。一方、$A\beta_{35\text{-}25}$ では 0μM から 50μM まで細胞毒性が全く観察されなかった。次に、5μM の濃度の $A\beta_{25\text{-}35}$ および $A\beta_{35\text{-}25}$、そして 5μM と 500 nM のフィブリル化 $A\beta_{1\text{-}42}$ を用いて 48 時間後までの経時的変化を検討したところ、細胞毒性が観察されたのは 5μM のフィブリル化 $A\beta_{1\text{-}42}$ のみであった。よって、以後実験に用いる 5μM および 500 nM の $A\beta_{25\text{-}35}$ および 500 nM のフィブリル化 $A\beta_{1\text{-}42}$ には細胞死として直接確認されるレベルでの細胞毒性がないことが確認された。

次に、培養細胞に対する XIAP の発現の検討をおこなった。SY5Y 神経芽細胞腫では培地交換（control）後時間とともに XIAP の発現は徐々に増加していくことが観察された。この SY5Y 神経芽細胞腫に、500nM の $A\beta_{25\text{-}35}$ 部分ペプチドを添加したところ、12 時間後および 24 時間後において XIAP の発現が減少し 48 時間後には発現が少し改善していたものの control の 48 時間後に比べて少なく、5μM の $A\beta_{25\text{-}35}$ を添加したところ、12 時間後から 48 時間後に渡って XIAP の発現が減少し続けていた。このような影響は逆配列部分ペプチドである $A\beta_{35\text{-}25}$ の添加では認められず、また全経過において actin の発現は一定であった。さらに、フィブリル化 $A\beta_{1\text{-}42}$ を 500nM の濃度で SY5Y 神経芽細胞腫に添加したところ、5μM の $A\beta_{25\text{-}35}$ を添加した場合と同様に、12 時間後から 48 時間後に渡って XIAP の発現が減少し続けることが観察された。同様の実験を細胞を変えて、293 細胞および COS7 細胞にフィブリル化 $A\beta_{1\text{-}42}$ を 500nM の濃度で添加したところ、やはり 12 時間後から 48 時間後に渡って XIAP の発現が減少し続けることが観察された。よって、Aβ はその部分ペプチドでもフィブリル化した全長型でも XIAP の発現を減少させる作用を有することが判明し、またこの作用は神経系細胞および非神経系細胞でも確認された。

さらに、これらのペプチドによって誘導される酸化ストレス脆弱性のレベルについて検討するために、SY5Y 神経芽細胞腫を 5μM $A\beta_{25\text{-}35}$、5μM $A\beta_{35\text{-}25}$、500nM $A\beta_{1\text{-}42}$ の存在下で 48 時間培養したあと、2 種類の薬剤によって酸化ストレスを与え、細胞死への影響を検討した。$A\beta_{35\text{-}25}$ を添加してあった細胞には、0.5 μM H_2O_2 を添加した場合も、5 nM 4-hydroxynonenal を添加した場合も、3 時間後の細胞死の増加は確認されなかった。しかし、5μM $A\beta_{25\text{-}35}$ または 500nM $A\beta_{1\text{-}42}$ を添加してあった細胞では酸化ストレスへの脆弱性が増加しており、酸化ストレスを誘導する物質をさらに添加しなければ細胞死は増加しないが、H_2O_2 の添加または 4-hydroxynonenal の添加によって、3 時間後の細胞死の増加が確認された。そして、このような細胞死脆弱性を惹起する効果が XIAP の発現減少によるものかどうかを確認するために、293 細胞株に XIAP を一過性に強制発現させた細胞を用いて検討をおこなった。まず、XIAP の発現レベルを確認したところ、コントロールとして用いた mock vector をトランスフェクトした細胞では $A\beta_{1\text{-}42}$ の添加によって XIAP の発現は減少した。しかし、XIAP を一過性に強制発現させた細胞ではコントロールに比し数倍以上の XIAP が発現し、$A\beta_{1\text{-}42}$ の添加によってもその発現レベルに影響はなかった。この 2 種類の細胞を用い、前述の実験と同様に 500nM $A\beta_{1\text{-}42}$ の存在下で 48 時間培養したあと、2 種類の薬剤によって酸化ストレスを与えて細胞死への影響を検討した。

コントロールとして用いた mock vector をトランスフェクトした細胞では A$\beta_{1\text{-}42}$ の添加によって細胞死脆弱性が増加し、H_2O_2 の添加あるいは 4-hydroxynonenal の添加によって細胞死の増加が確認されたが、この効果は XIAP を一過性に強制発現させた細胞では有意に減少していた(Fig.4 B)。さらに、この現象が caspase-3 の活性の変化に依存しているかどうかを検討するために、caspase-3 活性を測定した。結果は、mock vector をトランスフェクトした細胞では A$\beta_{1\text{-}42}$ の添加後、H_2O_2 の添加あるいは 4-hydroxynonenal の添加によって caspase-3 活性が明らかに亢進していたが、XIAP を一過性に強制発現させた細胞ではこの caspase-3 活性の亢進が認められなかった。よって、このことから A$\beta_{1\text{-}42}$ の添加による細胞死脆弱性の亢進は、XIAP の発現減少に伴って caspase 活性が亢進しやすい状況に由来することが示唆された。

最後に、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、反応陽性のバンドが AD 患者脳脊髄液中に強く染色された。

D. 考察

Aβは、培養神経細胞に添加されると、細胞に障害を与え、アポトーシスによる神経細胞死を引き起こすことがよく知られており、その作用メカニズムに関してはカルシウムイオノフォア仮説、酸化ストレス仮説などいくつか知られている。しかし、そのような理解をする際に問題となる点は、Aβが障害作用を示すためには生体内濃度よりもはるかに高い濃度を添加する必要があることである。このような問題点をカバーする可能性としては、低濃度のAβによってアポトーシス誘導蛋白の Bax の発現が誘導され、同時にアポトーシス阻害蛋白の Bcl-2 の発現が抑制されることがこれまでに報告されている。アポトーシスはいくつかのステップで進行するので、促進因子と抑制因子のバランスで制御されており、この報告の趣旨は、そのバランスをアポトーシス促進側へ傾かせることで細胞脆弱性が誘導されていて、この脆弱性の誘導に関しては低濃度のAβによって可能となるということであった。今回我々は同様の現象が、Bcl-2 および Bax よりもアポトーシスシグナル伝達系において下流に存在する XIAP の発現制御部分でも起こっているのではないかと推測し、その検討をおこなった。結果としては、低濃度のAβによってアポトーシス阻害蛋白である XIAP の発現が抑制され、さらに XIAP の強制発現により、低濃度のAβによって引き起こされている酸化ストレスへの脆弱性が、回復することを見出した。これにより、生体内濃度に近い低濃度のAβによる XIAP の発現抑制により、酸化ストレスへの脆弱性が引き起こされるメカニズムの存在が示唆された。

XIAP は多くの組織に発現しアポトーシスを抑制する因子として重要視されているが、今回の検討から低濃度の Aβによって発現量が減少することが見出された。神経細胞をアポトーシスから保護する目的から、この XIAP の発現を増加させる機序や薬剤の開発も重要と考えられる。

また、一方我々はタウ蛋白がこの XIAP の機能を抑制する可能性を示唆するデータを見出してきた。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。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。この研究は、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 ^{1}Met－Ala－Glu－Pro－Arg^{5} であるが、このN末端の Met が切断されると、この配列みたすものとなる。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、我々の研究で明らかに示されている。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、示唆されている。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、低濃度の Aβ によってアポトーシス阻害蛋白である XIAP の発現が抑制され、更に、XIAP の強制発現により、低濃度の Aβ によって引き起こされている酸化ストレスへの脆弱性が、回復することを見出した。また、第1メチオニンの切断を受けたタウ蛋白は XIAP と特異的な結合をすることを見出した。よって、XIAP が AD 脳における変性過程に密接に関連することが示唆された。そして、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

Pei JJ, Khatoon S, An WL, Nordlinder M, Tanaka T, Braak H, Tsujio I, Takeda M, Alafuzoff I, Winblad B, Cowburn RF, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Role of protein kinase B in Alzheimer's neurofibrillary pathology. Acta Neuropathol (Berl) 105:381-92,2003.

Matsumoto N, Nakamura Y, Kashiwagi Y, Hashimoto R, Kudo T, Tanaka T, Shinoasaki K, Takeda M. Involvement of Rho-associated kinase in neurite sprouting and amyloid beta production of rat cortical neurons in insulin-free medium. Psychogeriatrics 3, 29-38,2003.

田中稔久、武田雅俊　文献抄録「治療的に有効なアミロイドβペプチドに対する抗体はアミロイドβの 4～10 残基をターゲットとし、細胞毒性と線維形成を阻害する。」「アルツハイマー病患者へのワクチン療法によるβ-アミロイドβに対する特異的な抗体産生。」老年精神医学雑誌 14,251,2003.

田中稔久、和田健二、山森英長、工藤喬、田中修二、武田雅俊　アルツハイマー病診断に対す

る生物学的マーカー　精神神経学雑誌 105, 387-392, 2003

田中稔久、武田雅俊　シリーズ精神医学用語解説 254. プロテオームとプロテオミクス　臨床精神医学 32,345-347,2003.

田中稔久、武田雅俊 What's New in Top Journal 話題の論文 「モデルマウスにおいて検討されたアミロイドワクチン療法における有効な抗体の特性と、ヒト臨床治験において検討された産生抗体の特性」「ポリグルタミン病への治療戦略：オリゴマー化阻害とヒストン脱アセチル化阻害」Cognition and Dementia 2, 144-148, 2003.

田中稔久、山森英長、田中修二、和田健二、鈴木英鷹、紙野晃人、工藤喬、大河内正康、谷井久志、以倉康充、貴田智之、松本均彦、福森亮雄、金山大祐、武田雅俊　アポトーシス阻害蛋白とタウ蛋白との相互作用と神経細胞死に関する研究　精神薬療研究年報 35,63-73,2003.

田中稔久、武田雅俊　アルツハイマー病における新しい治療の試み　Aβワクチンによる治療の現況　老年精神医学雑誌 14,556-561,2003.

田中稔久、武田雅俊　講座：老年精神医学の専門医のために-14　アルツハイマー型痴呆　老年精神医学雑誌 14,783-794,2003.

田中稔久、武田雅俊 4. タウ 2) タウのリン酸化とリン酸化の調節機構　日本臨床 61,.増刊号 9 痴呆症学（I）,66-72,2003.

2. 学会発表

田中稔久、山森英長、武田雅俊　リチウムによるタウ蛋白のリン酸化制御について　第 23 回リチウム研究会 シンポジウム「リチウムの新たな作用を求めて」2003.04.26　東京経団連会館

Tanaka T, Yamamori H, Wada K., Takeda M. Phosphorylation of tau protein at Ser 214 induced by lithiumThe 6th International Conference AD/PD, 2003.5.9 Seville(Spain)

Yamamori H, Tanaka T, Takeda M. Amyloid β downregulats X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) expression in cultured cells The 6th International Conference AD/PD, 2003.5.9, Seville(Spain)

Tanaka T, Yamamori H, Takeda M..Modified tau protein in CSF for diagnosis of Alzheimer disease The 11th Congress of the International Psychogeriatrics Association, 2003.8.21, Chicago(U.S.A.)

田中稔久、山森英長、ヌルンネッサベグム、武田雅俊　リチウムによるカスパーゼ阻害蛋白発現への影響　第 22 回日本痴呆学会、2003.10.3、太田区産業プラザ（東京）山森英長、田中稔久、武田雅俊アミロイドβ蛋白のアポトーシス阻害蛋白発現への影響　第 22 回日本痴呆学会、2003.10.4、太田区産業プラザ（東京）

Tanaka T, Yamamori H, Begum NN, Takeda M..Downregulation of expression of X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) by amyloid β, is reverted by lithium. The 1st Conference of Brain Aging, 2003.10.7, Bucharest (Romania)

田中稔久、山森英長、Begum Nurun Nessa、紙野晃人、工藤喬、大河内正康、田上真次、以倉康充、福森亮雄、金山大祐、武田雅俊　タウ蛋白誘導性アポトーシスによる神経変性に対する抑制剤開発研究　第 36 回精神神経系薬物治療研究報告会、2003.12.5、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：アルツハイマー病診断マーカーとしてのWGA結合糖タンパク
～リン酸化タウタンパクとの検討～）

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
WGA（小麦胚芽レクチン, Wheat Germ Agglutinin）は、特異的な糖鎖を認識して結合するレクチンの一種である。我々は、250kDaのWGA結合糖タンパクがADの髄液中で減少しているという報告より、アルツハイマー病（AD）の髄液中診断マーカーとしての有用性を検討したところ、WGA結合糖タンパクは新たな診断マーカーの候補となり得る可能性が昨年度までの研究によって示唆された。さらに症例を増やし検討した結果、2種のWGA結合糖タンパクが、有意にADの髄液中で低値を示した。また、髄液中のリン酸化タウタンパク（pS199）を測定し、WGA結合糖タンパクとの関連性を検討した結果、リン酸化タウタンパク-WGA結合糖タンパクの指標は、WGA結合糖タンパク単独よりもより特異度の高い診断マーカーとなりうる可能性が示唆された。リン酸化タウタンパクは、ADの診断マーカーとして感度・特異度共に高い優良な診断マーカーであるが、タウオパチーに関しては現在までにADとの鑑別が困難であるとされている。しかしWGA結合糖タンパクを併用することによって、例数が少ないが、レビー小体病がADよりも低値を示し、ADと鑑別できる可能性が示唆された。今後、診断マーカーの1つとして、WGA結合タンパクの測定の簡略化と正確さを検討する必要がある。また、WGAが認識するのは糖鎖であり、ADでこのような糖鎖修飾を受けたタンパクの減少が見られることは、何らかの意義がある可能性がある。

キーワード：アルツハイマー病、髄液、WGA、リン酸化タウタンパク、レビー小体病.

A. 研究目的

WGA結合糖タンパクは、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おり[1]、診断マーカーとして有用である可能性がある。昨年度までに、ADの髄液中で減少しているWGA結合糖タンパクは3種検索している。また、タンパクの糖鎖修飾のうち、WGAが認識する*O*-GlcNAcによる修飾は、タンパクのリン酸化と密接に関連していると考えられている[2]。現在までにADの優秀な診断マーカーとされるリン酸化タウタンパク[3]は、しかしタウオパチーとの鑑別診断が困難とされ、WGA結合タンパクとともに検討することによりさらに発展と改善が期待できる。

そこでWGA結合タンパクを、症例数を増やして検討し、またリン酸化タウタンパクとの関連を検討することによってADの診断マーカーとして確立することを目的として研究を行った。

B. 研究方法

対象は、AD 58例（男/女：19/39）、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31例（20/11）、コントロールとして痴呆のない症例50例（28/22）の髄液において、レクチンブロット法を用いて検討を行った。総タンパク5μg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