

- and Phosphorylated Tau as Memory is Impaired in the Tg2576 Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Journal of Neuroscience* (in Press)
4. Matsubara E, Sekijima Y, Tokuda T, Urakami K, Amari M, Shizuka-Ikeda M, Tomidokoro Y, Ikeda M, Kawarabayashi T, Harigaya Y, Ikeda S, Murakami T, Abe K, Otomo E, Hirai S, Frangione B, Ghiso J, Shoji M, Soluble A β homeostasis in AD and DS: impairment of anti-amyloidogenic protection by lipoproteins, *Neurobiology of Aging* (in press)
 5. Ikarashi Y, Harigaya Y, Tomidokoro Y, Kanai M, Ikeda M, Matsubara E, Kawarabayashi T, Kuribara H, Younkin SG, Shoji M, Decreased level of brain acetylcholine and memory disturbance in APPsw mice, *Neurobiology of Aging* (in press)
 6. Imai Y, Soda M, Murakami T, Shoji M, Abe K, Takahashi R, A product of the human gene adjacent to parkin is a component of Lewy bodies and suppresses Pael receptor-induced cell death, *Journal of Biological Chemistry*, 278: 51901-910, 2003
 7. Matsubara E, Bryant-Thomas T, Pacheco J, Henry TL, Poeggeler B, Manjon M, Herbert D, Cruz-Sanchez F, Chyan Y-J, Shoji M, Abe K, Leone A, Grundke-Ikbal I, Wilson G, Ghiso J, Williams C, Refolo LM, Pappolla MA, Melatonin increases survival and inhibits oxidative and amyloid pathology in a transgenic model of Alzheimer's disease, *Journal of Neurochemistry* 85, 1101-1108, 2003
 8. Kamada H, Sato K, Zhang WR, Omori N, Nagano I, Shoji M, Abe K, Spatiotemporal changes of apolipoprotein E immunoreactivity and apolipoprotein E mRNA expression after transient middle cerebral artery occlusion in rat brain, *Journal of Neuroscience Research*, 73, 545-556, 2003
 9. Ilieva H, Nagano I, Murakami T, Shiote M, Shoji M, Abe K, Sustained induction of survival p-AKT and p-ERK signals after transient hypoxia in mice spinal cord with G93A mutant human SOD1 protein, *Journal of the Neurological Sciences*, 215, 57-62, 2003
 10. Wang SJ, Omori N, Li F, Jin G, Hamakawa Y, Sato K, Nagano I, Shoji M, Abe K, Functional improvement by electro-acupuncture after transient middle cerebral artery occlusion in rats, *Neurological Research*, 25, 516-521, 2003

11. Murakami T, Ilieva H, Shiote M, Nagata T, Nagano I, Shoji M, Abe K, Hypoxic induction of vascular endothelial growth factor is selectively impaired in mice carrying the mutant SOD1 gene, *Brain Research*, 989, 231-237, 2003
12. Manabe Y, Wang JM, Shiote M, Murakami T, Nagano I, Shoji M, Abe K, Glutamate enhances caspase-3 immunoreactivity in cultured spinal cord neurons of newborn rats, *Neurological Research*, 25, 312-316, 2003
13. Omori N, Maruyama K, Jin G, Li F, Wang SJ, Hamakawa Y, Sato K, Nagano I, Shoji M, Abe K, Targeting of post-ischemic cerebral endothelium in rat by liposomes bearing polyethylene glycol-coupled transferring, *Neurological Research*, 25, 275-279, 2003
14. Jin G, Omori N, Li F, Nagano I, Manabe Y, Shoji M, Abe K, Protection against ischemic brain damage by GDNF affecting cell survival and death signals, *Neurological Research*, 25, 249-53, 2003
15. Manabe Y, Nagano I, Gazi MS, Murakami T, Shiote M, Shoji M, Kitagawa H, Abe K, Glial cell line-derived neurotrophic factor protein prevents motor neuron loss of transgenic model mice for amyotrophic lateral sclerosis, *Neurological Research*, 25, 195-200, 2003
16. Iwai M, Sato K, Kamada H, Omori N, Nagano I, Shoji M, Abe K, Temporal profile of stem cell division, migration, and differentiation from subventricular zone to olfactory bulb after transient forebrain ischemia in gerbils, *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 23, 331-341, 2003
17. Sato K, Iwai M, Nagano I, Shoji M, Abe K, Temporal and spatial changes of highly polysialylated neural cell adhesion molecule immunoreactivity in amygdala kindling development, *Neurological Research*, 25, 79-82, 2003
18. Li F, Omori N, Jin G, Wang SJ, Sato K, Nagano I, Shoji M, Abe K, Cooperative expression of survival p-ERK and p-Akt signals in rat brain neurons after transient MCAO, *Brain Research*, 962, 21-26, 2003
19. Ohta K, Iwai M, Sato K, Omori N, Nagano I, Shoji M, Abe K, Dissociative increase of oligodendrocyte progenitor cells between young and aged rats after transient cerebral ischemia, *Neuroscience Letters*, 335, 159-162, 2003
20. Kamada H, Sato K, Iwai M, Zhang WR, Nagano I, Manabe Y, Shoji M, Abe K, Temporal and spatial changes of free cholesterol and

neutral lipids in rat brain
after transient middle
cerebral artery occlusion,
Neuroscience Research, 45,
91-100, 2003

2. 学会発表
3. Matsubara E, Shoji M, Murakami T, Kawarabayashi T, Abe K, Brain to CSF clearance of lipoprotein-free A β amyloidogenic A β was impaired in Alzheimer's disease, Society for Neuroscience 33rd Annual Meeting, New Orleans USA, 2003
4. Kawarabayashi T, Samura E, Shoji M, Sasaki A, Matsubara E, Murakami T, Ikeda M, Harigaya Y, Abe K, Enhanced tau pathology in TG2576 and Presenilin-1 L286V double transgenic Alzheimer model mice, Society for Neuroscience 33rd Annual Meeting, New Orleans USA, 2003
5. Nishimura M, Nakaya Y, Yamane T, Wang H, Matsubara E, Shoji M, Mutagenesis study for presenilin endoproteolysis and γ -secretase activity, Society for Neuroscience 33rd Annual Meeting, New Orleans USA, 2003

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

AB ペプチドの病原性検討と病原性 A β オリゴマー除去療法開発

分担研究者 東海林幹夫 岡山大学大学院医歯学総合研究科神経病態内科学

共同研究者 松原悦朗、瓦林毅、阿部康二

岡山大学大学院医歯学総合研究科神経病態内科学

研究要旨 アルツハイマー病(AD)患者脳において脳内リポ蛋白非結合型 amyloid B(A β)はダイマー形成能に富み、血液中に存在する同分子種とは質的相違を持った脳内アミロイドーシス惹起分子であると考えられる。一昨年度は AD 患者脳から抽出した A β オリゴマーがいったんマウス脳に入ると長期間分解されずに存在し、アミロイド原性に乏しいマウス A β ペプチドをも巻き込みアミロイド形成を促進することを報告した。昨年度はこの A β オリゴマーに焦点を絞り、まず A β モノマーとの分別 new ELISA 定量法を新たに開発し AD 脳にのみ A β ダイマーを検出した。本年度は、A β ダイマー特異的モノクローナル抗体作製に成功し、また血液中に存在する A β が脳内移行し、選択的に老人斑と血管アミロイドに結合することを明らかとした。A β ダイマーは病原性を持ち、transmissibility の元凶をなすと考えられ、現在血液などのヒト体液中に、こうした A β ダイマーが存在するか本年度開発した A β ダイマー特異的モノクローナル抗体を用いて検討中である。また、A β ダイマー特異的除去が脳内アミロイドーシス治療として有用であるかどうかも検討してゆく予定である。

A. 研究目的

アルツハイマー病患者脳に存在する脳内リポ蛋白非結合型 A β はダイマー形成能に富み、血液中に存在する同分子種とは質的相違を持ったアミロイドーシス惹起分子であると考えられる。またアルツハイマー病患者脳 A β オリゴマーはいったんマウス脳に入ると長期間分解されずに存在し、アミロイド原性に乏しいマウス A β ペプチドをも巻き込みアミロイド形成を促進することから、A β ワクチン療法が逆に老人斑形成を促進する可能性も危惧される。本研究においては A β ペプチドの病原性検討を主眼と

し、血液中からマウス脳内、特に経静脈的な老人斑への移行を検証した。またリポ蛋白非結合型 A β オリゴマー制御が最も重要なアルツハイマー病治療のターゲットであるため、A β オリゴマー特異的除去療法・診断法開発目的に A β オリゴマー特異的モノクローナル抗体を作製した。

B. 研究方法

12 ヶ月齢の APPsw mice の頸静脈より Fluorescein・Biotin 二重標識 A β 1-42(400 μ g/400 μ l)を投与した。6 時間、リン酸緩衝液にて灌流後凍結しクリオスタツ

ト切片を作成し、経静脈投与された AB 1-42 による老人斑標識の有無を蛍光顕微鏡にて観察した。同切片は、biotin 標識化抗体でも老人斑標識 AB ペプチドの有無を観察した。

リン酸緩衝液中でオリゴマー化させた AB 1-42 ペプチドから SDS-PAGE にて分離した AB 1-42 テトラマーを mouse pad に免疫し、AB オリゴマー特異的モノクローナル抗体を作製した。抗体のオリゴマー特異性の検討は、アルツハイマー病患者脳より抽出したアミロイドの免疫沈降法と APPsw マウス脳の免疫組織化学的検討により行った。

C. 研究結果

AB の病原性検討のため、血中投与した AB がマウス脳内老人斑に結合するか否かを検討するため、Fluorescein・Biotin 二重標識 AB 1-42 (400 μ g/400 μ l) を 12 ヶ月齢の APPsw mice の頸静脈より投与した。投与 6 時間後、結合 AB は蛍光及び Biotin 検出で行った。マウス脳内の老人斑と血管アミロイドの両者は蛍光および Biotin 標識により描出され、AB 1-42 ペプチドは、マウス脳内に移行し老人斑と血管アミロイドに選択的に結合することが明らかとなった。血中の AB 1-42 ペプチドは経静脈的にも脳内老人斑に選択的に移行し、アルツハイマー病変を増悪させる可能性が示唆された。

AB オリゴマー特異的モノクローナル抗体のスクリーニングは ELISA と APPsw マウス脳の免疫組織化学的検討により行った。ELISA 陽性で老人斑を認識するクローンを選択後、特異性の検討をトリス緩衝液可溶性画分と蟻酸抽出アミロイド画分における免疫沈降法で行った。免疫組織学的に老人

斑アミロイドコアのみを認識するクローンでも、コアは認識せず他のアミロイドを認識するクローンでも、今回検討したクローンは蟻酸抽出 AB ダイマーを主に選択的に検出することが明らかとなった。AB ダイマーの認識能は老人斑アミロイドコアのみを認識するクローンの法が高かった。一方、トリス緩衝液可溶性画分を免疫沈降した結果、我々の得たクローンは可溶性 AB モノマーや、AB 前駆体、AB 前駆体 C 末フラグメントとは全く反応せず、AB アミロイドダイマー特異的抗体であることが明らかとなった。

D. 考察

本年度の検討で、脳内 AB アミロイドーシス惹起分子種である AB ダイマー特異的抗体が得られた。今後、AB アミロイドーシス惹起分子種特異的な ELISA 開発や AB アミロイドーシス病的分子特異的除去療法開発に向け、極めて重要な病態特異的ツールになると期待される。

一方、血液中に存在する AB が選択的に老人斑に結合することが明らかとなった本年度の結果は、血液中にこれまでその存在は証明されていないものの、仮に AB アミロイドーシス惹起分子種である AB ダイマーなどが存在すれば、いわゆる AB の transmissibility の元凶になりうる可能性を問題提議する点で、きわめて重要な所見と考えられる。脳内ばかりでなく、血液や、脳脊髄液などのヒト体液中における AB ダイマーなどの病的 AB アミロイドーシス惹起分子種探索は AB の transmissibility 検証に際し、極めて重要な課題で、今回我々が開発した AB ダイマー特異的抗体はこの重要

な解析ツールとなりうると考えられる。

E. 結論

血液中のアミロイドジェニックな A β は脳内移行し、老人斑形成を促進しうる傍証が得られた。またアミロイドダイマー特異的抗体の作製に成功し、今後 A β オリゴマー特異的除去療法・診断法開発に有力なツールとなることが期待された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究結果発表

1. 論文発表

1) Moreira MC, Klur S, Watanabe M, Nemeth AH, Ber IL, Moniz JC, Tranchant C, Aubourg P, Tazir M, Schols L, Pandolfo M, Schulz JB, Pouget J, Calvas P, Shizuka-Ikeda M, **Shoji M**, Tanaka M, Izatt L, Shaw CE, M'Zahem A, Dunne E, Bomont P, Benhassine T, Bouslam N, Stevanin G, Brice A, Guimaraes J, Mendonca P, Barbot C, Coutinho P, Sequeiros J, Durr A, Warter JM, Koenig M. Senataxin, the ortholog of a yeast RNA helicase, is mutant in ataxia-ocular apraxia 2. **Nature Genetics** 2004 Feb 8 [Epub ahead of print]

2) Murakami T, **Shoji-M**, Imai Y, Inoue H, Kawarabayashi T, Matsubara E, Harigaya Y, Sasaki A, Takahashi R and Abe K, Pael-R is accumulated in Lewy bodies of Parkinson's disease. **Annals of Neurology** (in Press)

3) Kawarabayashi T, **Shoji M**, Younkin L, Wen-Lang L, Dickson DW, Murakami T,

Matsubara E, Abe K, Ashe KH and Younkin SG, Dimeric A β Rapidly Accumulates in Lipid Rafts Followed by ApoE and Phosphorylated Tau as Memory is Impaired in the Tg2576 Mouse Model of Alzheimer's Disease. **Journal of Neuroscience** (in Press)

4) Matsubara E, Sekijima Y, Tokuda T, Urakami K, Amari M, Shizuka-Ikeda M, Tomidokoro Y, Ikeda M, Kawarabayashi T, Harigaya Y, Ikeda S, Murakami T, Abe K, Otomo E, Hirai S, Frangione B, Ghiso J, **Shoji M**, Soluble A β homeostasis in AD and DS: impairment of anti-amyloidogenic protection by lipoproteins, **Neurobiology of Aging** (in press)

5) Ikarashi Y, Harigaya Y, Tomidokoro Y, Kanai M, Ikeda M, Matsubara E, Kawarabayashi T, Kuribara H, Younkin SG, **Shoji M**, Decreased level of brain acetylcholine and memory disturbance in APPsw mice, **Neurobiology of Aging** (in press)

6) Imai Y, Soda M, Murakami T, **Shoji M**, Abe K, Takahashi R, A product of the human gene adjacent to parkin is a component of Lewy bodies and suppresses Pael receptor-induced cell death, **Journal of Biological Chemistry**, 278: 51901-910, 2003

7) Matsubara E, Bryant-Thomas T, Pacheco J, Henry TL, Poeggeler B, Manjon M, Herbert D, Cruz-Sanchez F, Chyan Y-J, **Shoji M**, Abe K, Leone A, Grundke-Ikbal I, Wilson G, Ghiso J, Williams C, Refolo LM, Pappolla MA, Melatonin increases survival and inhibits

oxidative and amyloid pathology in a transgenic model of Alzheimer's disease, **Journal of Neurochemistry** 85, 1101~1108, 2003

8) Kamada H, Sato K, Zhang WR, Omori N, Nagano I, **Shoji M**, Abe K, Spatiotemporal changes of apolipoprotein E immunoreactivity and apolipoprotein E mRNA expression after transient middle cerebral artery occlusion in rat brain, **Journal of Neuroscience Research**, 73, 545~556, 2003

9) Ilieva H, Nagano I, Murakami T, Shiote M, **Shoji M**, Abe K, Sustained induction of survival p-AKT and p-ERK signals after transient hypoxia in mice spinal cord with G93A mutant human SOD1 protein, **Journal of the Neurological Sciences**, 215, 57~62, 2003

10) Wang SJ, Omori N, Li F, Jin G, Hamakawa Y, Sato K, Nagano I, **Shoji M**, Abe K, Functional improvement by electro-acupuncture after transient middle cerebral artery occlusion in rats, **Neurological Research**, 25, 516~521, 2003

11) Murakami T, Ilieva H, Shiote M, Nagata T, Nagano I, **Shoji M**, Abe K, Hypoxic induction of vascular endothelial growth factor is selectively impaired in mice carrying the mutant SOD1 gene, **Brain Research**, 989, 231~237, 2003

12) Manabe Y, Wang JM, Shiote M, Murakami T, Nagano I, **Shoji M**, Abe K, Glutamate enhances caspase-3 immunoreactivity in cultured spinal cord neurons of newborn rats, **Neurological Research**, 25, 312~316, 2003

13) Omori N, Maruyama K, Jin G, Li F, Wang SJ, Hamakawa Y, Sato K, Nagano I, **Shoji M**, Abe K, Targeting of post-ischemic cerebral endothelium in rat by liposomes bearing polyethylene glycol-coupled transferring, **Neurological Research**, 25, 275~279, 2003

14) Jin G, Omori N, Li F, Nagano I, Manabe Y, **Shoji M**, Abe K, Protection against ischemic brain damage by GDNF affecting cell survival and death signals, **Neurological Research**, 25, 249~53, 2003

15) Manabe Y, Nagano I, Gazi MS, Murakami T, Shiote M, **Shoji M**, Kitagawa H, Abe K, Glial cell line-derived neurotrophic factor protein prevents motor neuron loss of transgenic model mice for amyotrophic lateral sclerosis, **Neurological Research**, 25, 195~200, 2003

16) Iwai M, Sato K, Kamada H, Omori N, Nagano I, **Shoji M**, Abe K, Temporal profile of stem cell division, migration, and differentiation from subventricular zone to olfactory bulb after transient forebrain ischemia in gerbils, **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, 23, 331~341, 2003

17)Sato K, Iwai M, Nagano I, Shoji M, Abe K, Temporal and spatial changes of highly polysialylated neural cell adhesion molecule immunoreactivity in amygdala kindling development, **Neurological Research**, 25, 79~82, 2003

18)Li F, Omori N, Jin G, Wang SJ, Sato K, Nagano I, Shoji M, Abe K, Cooperative expression of survival p-ERK and p-Akt signals in rat brain neurons after transient MCAO, **Brain Research**, 962, 21~26, 2003

19)Ohta K, Iwai M, Sato K, Omori N, Nagano I, Shoji M, Abe K, Dissociative increase of oligodendrocyte progenitor cells between young and aged rats after transient cerebral ischemia, **Neuroscience Letters**, 335, 159~162, 2003

20)Kamada H, Sato K, Iwai M, Zhang WR, Nagano I, Manabe Y, Shoji M, Abe K, Temporal and spatial changes of free cholesterol and neutral lipids in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion, **Neuroscience Research**, 45, 91~100, 2003

2.学会発表

1. 一般演題

1)Matsubara E, Shoji M, Murakami T, Kawarabayashi T, Abe K, Brain to CSF clearance of lipoprotein-free A β amyloidogenic A β was impaired in Alzheimer's disease, Society for Neuroscience 33rd Annual Meeting, New Orleans USA, 2003

2)Kawarabayashi T, Samura E, Shoji M, Sasaki A, Matsubara E, Murakami T, Ikeda M, Harigaya Y, Abe K, Enhanced tau pathology in TG2576 and Presenilin-1 L286V double transgenic Alzheimer model mice, Society for Neuroscience 33rd Annual Meeting, New Orleans USA, 2003

3)Nishimura M, Nakaya Y, Yamane T, Wang H, Matsubara E, Shoji M, Mutagenesis study for presenilin endoproteolysis and γ -secretase activity, Society for Neuroscience 33rd Annual Meeting, New Orleans USA, 2003

2. シンポジウム, 教育講演

1)東海林幹夫, アルツハイマー病研究の治療法開発, 老年病学会プレナリーレクチャー, 第45回 日本老年医学会総会, 2003

2)東海林幹夫, A β アミロイドーシス: 免疫療法の可能性, 第22回 日本痴呆学会総会, 2003

3)東海林幹夫, アルツハイマー病研究の進歩: 診断の進歩: バイオマーカーと画像, 新潟大学脳研究所 第33回 新潟神経学夏期セミナー, 2003

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）

アミロイド沈着による病的要素の検索に関する研究 分担研究報告書

各種生体分子のアルツハイマー病 β アミロイド線維およびA β 蛋白に
対する親和性の定量的解析-伝播機構解析の為の基礎的検討-

分担研究者 内木 宏延 福井大学医学部病因病態医学講座・分子病理学領域
共同研究者 長谷川一浩 福井大学医学部病因病態医学講座・分子病理学領域

研究要旨 脳内においてアルツハイマー病 β アミロイド線維(fA β)形成・沈着・伝播を引き起こす複雑な分子間相互作用を解明するため、表面プラズモン共鳴法測定装置（ピアコア）を用いて網羅的解析を試みた。A β 蛋白およびfA β をセンサーに固定し、各種生体成分を添加して親和性を解析した。その結果、fA β 及びA β 蛋白に対する各種生体分子（血漿蛋白質、細胞外基質成分等）の親和性は広い範囲に分布した。さらに、既に求めたアミロイド線維形成の反応パラメータを組み合わせることで数値シミュレーションを行い、各成分の効果を比較解析する手法を開発した。本方法により、A β 蛋白質動態とfA β 形成に重要な影響を及ぼす生体成分を特定し、それらの反応機構を解析できると考える。また、本解析法を各種アミロイド線維に応用し、沈着・伝播に係わる生体成分を同定することも可能と考えられる。

分担研究者氏名・所属機関名及び所属機関における職名：内木宏延・福井大学医学部・教授

A. 研究目的

われわれはこれまでに、各種前駆体蛋白質からのアミロイド線維形成過程を、チオフラビン T を用いた閉鎖反応系、さらには表面プラズモン共鳴装置を用いた開放反応系を駆使して速度論的に解析してきた。その結果、同過程が重合核依存

性重合モデルで説明できることを明らかにした。このモデルは、A β 蛋白からの重合核形成過程及び線維伸長過程より成るが、後者の過程は一次反応速度論形式に従い速やかに進行する。一方、核形成過程は熱力学的に起こりにくく、全体の律速過程になっている。アミロイドの伝搬は、核としてのアミロイド線維の伝搬により線維形成が誘発される現象と考えられる。

一方、生体内における、アミロイド線

維形成あるいは、前駆体蛋白質の産生、代謝過程を検討する上で、生体分子との相互作用を考慮することは不可欠である。実際に、われわれは β 2ミクログロブリンアミロイド線維形成において、アミロイド共存蛋白質として知られるapoEや、ヘパリン等がアミロイド線維を安定化させ、線維形成を促進することを示した。実際にはアミロイド線維形成に関与する生体成分は、様々な機構で促進的・抑制的に作用すると予想される。例えば(a)アミロイド前駆体蛋白質が各種の生体成分と相互作用し複合体を形成し、線維伸長過程において結合しうる前駆体蛋白質の実効濃度が増加する、(b)アミロイド線維が好発部位に存在する特定の生体成分と強く相互作用して沈着する、(c)形成されたアミロイド線維に共存物質が作用して線維の組織に対する親和性を修飾する等の機構が考えられる。生体内におけるこのような前駆体蛋白質の代謝・分解、アミロイド形成さらにアミロイドの伝搬の機構を解析する為、アミロイド前駆体蛋白質とアミロイド線維に対する各種生体成分の親和性を網羅的かつ定量的に解析し比較する。また、これらの成分を制御することで、 β アミロイド線維形成・沈着・伝搬を抑制することも目標とする。

B. 研究方法

測定には表面プラズモン共鳴法を測定原理とする BIAcore 3000 (ピアコア)を

用いた。反応のモデルケースとして、A β 40 蛋白、および、 β アミロイド線維 (fA β 40) の系を用いた。センサーチップ上の別々のフローセルに、A β 蛋白モノマー、及び fA β を固定化し、これに各種生体分子 (精製蛋白質) を含む緩衝液を添加し、A β 蛋白、fA β それぞれに対する結合並びに解離速度定数、更に解離平衡定数 (K_D) を求めた。この方法により、平衡状態での親和性のみならず、動的な反応性を定量化した。

倫理面への配慮

本研究は試薬を用いての試験管内実験であり、倫理面での問題はない。

C. 研究結果

1. 血漿蛋白質 (血清アルブミン、フィブリノーゲン、IgG、IgM、 β 2ミクログロブリン、apoE、トランスフェリン等)、および、細胞外マトリックス成分 (collagen 類、フィブロネクチン、ラミニン等) について、反応を測定した。その結果、これまで検討した生体成分中で、特異抗体 (K_D ; 0.1 nM オーダー以下) を除くと、A β 蛋白・fA β 共に apoE が最も強く反応した (K_D ; 0.1 nM オーダー)。その他の成分の殆どは K_D で micro~nM 程度の弱~中程度の親和性を示したが、A β 蛋白と fA β に対する親和性はそれぞれ特徴的な値を示している。例えば、血清アルブミンは A β 蛋白に対する親和性は弱い (K_D ; 1 microM オー

ダー)が、fA β に対しては多少強く反応する。コラーゲン type4 (トリプシン処理標品) も同様に、fA β に対しては比較的強く反応するが、A β 蛋白には殆ど反応しない。このような親和性の違いが線維の沈着の程度の差を生みだし、好発部位の差などに影響を及ぼす可能性がある。

2. 上記の様に求めた速度定数を基に、脳内における A β 蛋白の動態、及び β アミロイド線維形成の数値モデルの構築を試みた。脳実質を一つのコンパートメントと見なし、A β 蛋白は輸送、あるいは産生により流入し、輸送、あるいは異化により除去されるという開放反応モデルを構築した。さらに A β 蛋白はコンパートメント内で他の生体分子と結合し、一方で β アミロイド線維形成に消費されるように設定した。例として、生体分子に apoE と HSA を選び、脳脊髄液中の濃度を基に設定した初期濃度(apoE 250nM, HSA 5 microM)と実測した反応定数を用いてシミュレーションを行った。その結果、フリーの A β 蛋白は速やかに apoE と高親和性複合体を形成する。また、線維形成は apoE に影響を受け、進行が遅れる。一方、親和性が弱い HSA では、初期濃度は apoE の 25 倍高いにもかかわらず、A β 蛋白との複合体形成量はわずかであった。この様に、apoE の様な強い親和性を有する分子が共存すると A β 蛋白動態及び fA β 線維形成に影響を及ぼし得ることが示された。

D. 考察

本研究では、前駆体蛋白の代謝・分解・アミロイド形成の各経路を解析するために、A β 蛋白およびfA β に対する各種生体分子の親和性を網羅的かつ定量的に解析し、モデルを構築することを最終目標とする。親和性解析には酵素免疫測定法、ウエスタンブロット法などが一般的に用いられており、親和性の高い分子同士の反応の検出には有効である。しかし、これらの方法では親和性の弱い分子同士の反応の場合、複合体を分離している間に解離するため測定が困難である。ところが、例えば反応が弱くても高濃度に存在する成分は総体として影響を与えている可能性がある。この上、A β 蛋白の生体内濃度はnMオーダーであるため、この濃度で直接相互作用を測定することは困難である。この様な問題点に対しては、リアルタイムかつ無標識で反応を高感度に測定できる表面プラズモン共鳴法により結合速度定数を測定し、数値モデルによる定量的シミュレーションを行うことが一つの解決法であると考えられる。

今後は今回示したような数値モデルをさらに精緻にし、 β アミロイド線維形成を脳内の一つのシステムとして再構成する試みを行う。また、各種のアミロイド線維と細胞外マトリックス成分などとの親和性を比較したり、生体成分による線維の安定化を解析することで、重合核と

しての線維の沈着・伝播に関する基礎的解析を展開することを計画している。

E. 結論

A β 蛋白および fA β に対する各種生体分子の親和性を比較し、線維の沈着機序に及ぼす生体分子の効果を解析する方法を開発した。また、A β 蛋白および fA β に対する各種生体分子の反応速度定数を測定し、生体を模倣する開放反応数値モデルを用いたシミュレーションを行った。この方法により、これらの共存分子が A β 蛋白の動態にどのような影響を及ぼすのかを推定することが可能と思われる。また、複数の反応を統合し定量的に評価することで、A β 蛋白の動態および fA β 形成過程の全体をシステムとして解析できる可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Direct observation of amyloid fibril growth monitored by thioflavin T fluorescence. Ban, T., Hamada, D., Hasegawa, K., Naiki, H., Goto, Y. J. Biol. Chem. 278(19):16462-16465, 2003
- (2) Amyloidogenic synthetic peptides of β 2-microglobulin: a role of the disulfide bond.

Hasegawa, K., Ohhashi, Y., Yamaguchi, I., Takahashi, N., Tsutsumi, S., Goto, Y., Gejyo, F., Naiki, H. Biochem. Biophys. Res. Commun. 304(1):101-106, 2003

(3) Glycosaminoglycan and proteoglycan inhibit the depolymerization of β 2-microglobulin amyloid fibrils *in vitro*. Yamaguchi, I., Suda, H., Tsuzuike, N., Seto, K., Seki, M., Yamaguchi, Y., Hasegawa, K., Takahashi, N., Yamamoto, S., Gejyo, F., Naiki, H. Kidney Int. 64(3): 1080-1088, 2003

(4) Potent anti-amyloidogenic and fibrildestabilizing effects of polyphenols *in vitro*: Implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease. Ono, K., Yoshiike, Y., Takashima, A., Hasegawa, K., Naiki, H., Yamada, M. J. Neurochem. 87(1): 172-181, 2003

(5) Glycosaminoglycans enhance the trifluoroethanol-induced extension of beta 2-microglobulin-related amyloid fibrils at a neutral pH. Yamamoto S, Yamaguchi I, Hasegawa K, Tsutsumi S, Goto Y, Gejyo F, Naiki H. J Am Soc Nephrol. 2004 Jan; 15(1): 126-33.

(6) Optimum amyloid fibril formation of a peptide fragment suggests the amyloidogenic preference of beta 2-microglobulin under physiological conditions. Ohhashi Y, Hasegawa K, Naiki H., Goto Y. J Biol Chem. 2004, in press

2. 学会発表

(1) 内木宏延：アミロイド線維形成・沈着の分子機構—アルツハイマー病、透析アミロイドーシスを中心に。第3回日本蛋白質科学会年回，2003,6,23-25，札幌。プログラム・要旨集。32，2003,5.

(2) Hironobu Naiki: Molecular mechanism of amyloid fibril formation and destabilization: Implication in the thrapeutics of Alzheimer disease and β 2-microglobulin-related amyloidosis, 第76回 生化学会大会, 2003, 10, 15-18, 横浜. 生化学 75(8), 712, 2003, 8.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

AL アミロイドーシス発症骨髄腫細胞の *in vivo* 増殖を調節し得る因子の検討

— 副腎皮質ホルモン DHEA の骨髄腫細胞に及ぼす作用について —

分担研究者 河野 道生

山口大学・大学院医学研究科・生体シグナル解析医学講座

共同研究者 石川 秀明、津山 尚宏、小幡雅則

山口大学・大学院医学研究科・生体シグナル解析医学講座

研究要旨 骨髄腫に由来する AL アミロイド沈着には骨髄腫細胞の増殖が背景にある。AL アミロイドーシスを惹起する骨髄腫細胞の増殖をいかにして抑制するかは、AL アミロイドーシスの治療に極めて重要である。本年度では、高齢において極端に低下する副腎皮質ホルモン DHEA(dehydroepiandrosterone)に注目して、骨髄腫細胞の増殖に及ぼす作用について *in vitro* 及び *in vivo* で検討した。 *in vitro* にて DHEA は骨髄ストローマ細胞株からの IL-6 産生を抑制し、骨髄腫細胞株 U-266 の増殖も直接に抑制した。更に、骨髄腫細胞株 U-266 を SCID-hIL6 Tg mice へ移植する系において、DHEA 皮下注射は骨髄腫細胞株の *in vivo* 増殖を著明に抑制した。DHEA の作用機序として、主に PPAR(peroxisome proliferators-activated receptor) β を活性化し、NF- κ B 活性を抑制することであると考えられた。以上より、DHEA を含め PPAR β の agonist 等が *in vivo* での骨髄腫細胞の増殖抑制を誘導し得る因子であることが明らかとなった。

A. 研究目的

AL アミロイドーシスを惹起する骨髄腫細胞の *in vivo* 増殖を調節し得る因子を明らかにして、アミロイド沈着の惹起を予防しようとするものである。特に、骨髄腫が高齢者に多く発症することから、加齢とともに大きく変化するものに注目して、骨髄腫細胞の増殖あるいは増殖因子インターロイキン 6 (IL-6) 産生に及ぼす観点から検討する。本研究では、高齢者

で極めて低下する副腎皮質ホルモン DHEA(S)に注目して、骨髄腫細胞の *in vivo* 増殖に及ぼす作用を検討する。

B. 研究方法

1. 対象

1) ALアミロイドーシス合併を含む骨髄腫 55 例及びMGUS 患者 50 例からの骨髄穿刺液から骨髄単核球分画を分離した。骨髄腫細胞株として、U-266 を使用し

た。2) 骨髄液中の DHEA-S 値は、大塚アッセイ(RIA 法)に依頼した。IL-6 活性は高感度 ELISA(Immunotech)で測定した。細胞表面抗原解析は、既報のごとく抗 CD38, CD19, MPC-1, CD49e, CD126(IL-6R α)あるいは CD45 抗体で多重染色後、フローサイトメーター(Epics Elite, Coulter)にて行った。3) 患者からの骨髄腫細胞あるいは骨髄腫細胞株 U-266 を *in vitro* 培養し、DHEA 添加の増殖および IL-6 産生に及ぼす効果を検討した。骨髄ストローマ細胞株 KM-102 においても同様の実験を行った。4) SCID-hIL6 Tg mice の腹腔内に骨髄腫細胞株 U-266 をアガロースとともに注射移植する系で、DHEA を皮下注射(100 ug/mice)の効果を検討した。5) 骨髄腫細胞株 U-266 および骨髄ストローマ細胞株 KM-102 を DHEA 存在下で培養後、PPAR, I κ B α 等の遺伝子発現を RT-PCR で検討した。合わせて、I κ B α 蛋白の発現もウエスタンブロットで検討した。

C. 研究結果

アミロイドーシス合併を含む骨髄腫患者の骨髄中の DHEA-S 値は同年齢のそれに比して男女とも有意に低下していた(P<0.01)。骨髄腫の前癌病変と考えられている良性M蛋白血症(BMG, MGUS)の患者においても、骨髄中の DHEA-S 値は低下していた。逆に、骨髄中の IL-6 値は有意に上昇していた(P<0.01)。IL-6 値の上昇は骨髄中の未熟型骨髄腫細胞、特に CD45+ 未熟型骨髄腫細胞の比率とよく相関していた(P<0.05)。DHEA は、*in vitro* では骨髄ストローマ細胞株 KM-102 及び患者骨髄

単核球からの IL-6 産生を抑制し、骨髄腫細胞株 U-266 及び患者骨髄腫細胞の増殖を抑制した。特に、未熟型骨髄腫細胞の増殖抑制が著明であった。更に、*in vivo* 系において、DHEA 投与は骨髄腫細胞株 U-266 の増殖生存を著明に抑制した。DHEA は骨髄腫細胞株 U-266 の PPAR β 遺伝子発現を亢進させ、更に I κ B α 遺伝子及び蛋白の発現を上昇させ、結果として NF- κ B 活性を抑制した。

D. 考察

AL アミロイドーシスを含む骨髄腫及び前癌病変 MGUS の進展例において、血清及び骨髄中の副腎皮質ホルモン DHEA(S)は、有意に低下していることを本年度も例数を増やして確認した。DHEA は直接的に骨髄腫細胞、と特に未熟型骨髄腫細胞に働き、その増殖を抑制した。*in vivo* 系においても、DHEA 投与は骨髄腫細胞株 U-266 の増殖を著明に抑制した。また、骨髄ストローマ細胞株および患者骨髄単核球からの IL-6 産生を抑制した。その作用機序として、PPAR β 遺伝子の発現誘導が明らかとなった。DHEA および PPAR β の agonist の投与は、骨髄腫細胞の *in vivo* 増殖を著明に抑制し得ることが明らかになった。このことは、AL アミロイドーシス発症の発症を抑制する上でも極めて有効な治療となり得る。今後、マウスの移植系で DHEA および PPAR β の agonist 投与による更なる検討が必要である。

E. 結論

1. アミロイドーシス合併骨髄腫及び

MGUS 患者において、血清及び骨髄中の DHEA-S 活性を測定した。進展性 BMG 及び骨髄腫では、同年齢のそれに比して男女とも有意に低下していた。

2. DHEA は、in vitro にて骨髄腫細胞株及び患者骨髄腫細胞の増殖も抑制し、骨髄ストローマ細胞および患者骨髄単核球からの IL-6 産生を抑制した。
3. 骨髄腫細胞株 U-266 を SCID-hIL6 Tg mice へ移植生存させる系でも、DHEA はその増殖・生存を著明に抑制した。
4. DHEA(S)は、骨髄腫細胞に直接的に作用して、PPAR β 遺伝子の発現誘導し、更に I κ B α 遺伝子及び蛋白の発現を上昇させ、結果として NF- κ B 活性を抑制した。
5. DHEA 及び PPAR β の agonist が、骨髄腫細胞の in vivo 増殖を抑制し得る因子であることが明らかになった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Abroun S, Ishikawa H, Tsuyama N, Liu S, Li F, Otsuyama K, Zheng X, Obata N, Kawano MM: receptor synergy of interleukin-6(IL-6) and insulin-like growth factor-I in the IL-6 receptor α highly expressing myeloma cells. Blood (in press, 2004)
- 2) Tsuyama N, Ishikawa H, Abroun S, Liu S, Li F, Otsuyama K, Zheng X, Obata M,

Kawano MM: The regulatory mechanism of IL-6-dependent proliferation of human myeloma cells. Hematology 8:409-411, 2003.

2. 学会発表

- 1) 河野道生: 多発性骨髄腫の臨床: MGUS から myeloma まで 教育講演、第 45 回日本臨床血液学会総会、大阪、2003 年 8 月 29 日
- 2) Kawano MM, Ishikawa H, Tsuyama N, Abroun S, Liu S, Li F, Otsuyama K, Zheng X, Obata M: Phenotypic heterogeneity of myeloma cells and its biological significance. (invited speaker) 9th International Workshop of Multiple Myeloma, Salamanca, Spain, May 23-27, 2003.
- 3) Liu S, ishikawa H, Tsuyama N, Abroun S, Li F, Otsuyama K, Zheng X, Obata M, Kawano MM: CD45+ myeloma cells accompanied by VDAC-1 expression are sensitive to apoptosis. 45th annual meeting of American Society of Hematology, San Diego, U.S.A., December 6-9, 2003.

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

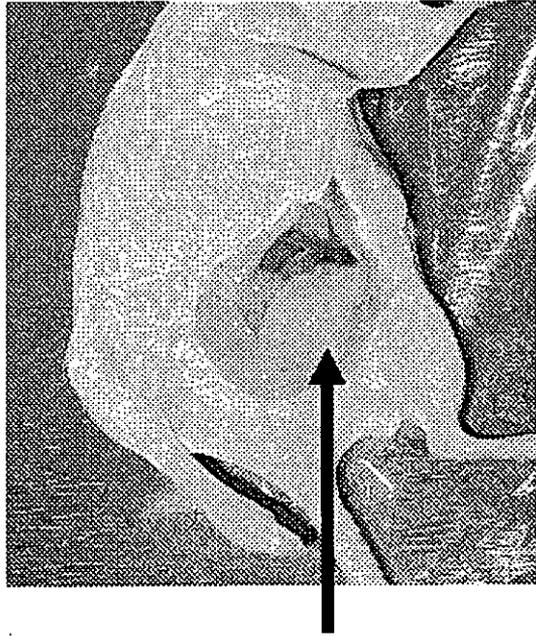
2. 実用新案登録

なし

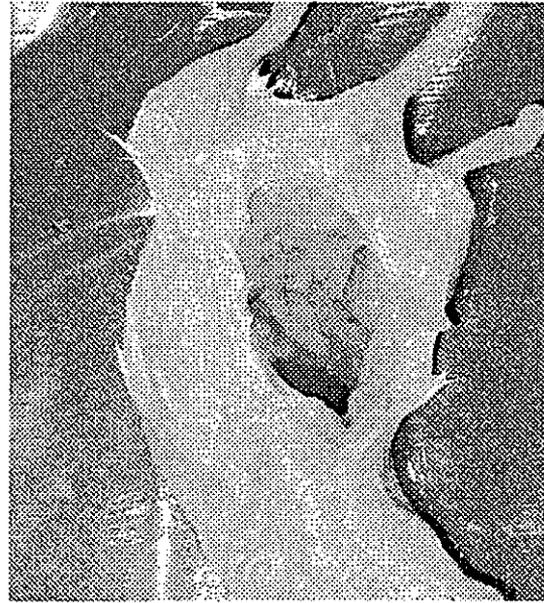
3. その他

なし

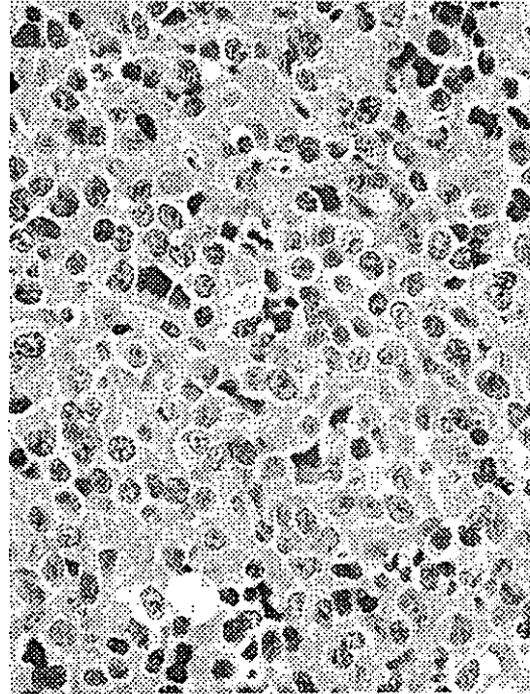
DHEA(-)



DHEA(+)



mass from DHEA(-) (HE, x100)



Mass formation 12 W after injection

	DHEA(-)	DHEA(+)
Exp.1	4/5mice	1/5
Exp.2	5/5	0/5
Exp.3	5/5	2/5

図-1 DHEA 投与による腹腔内骨髄腫細胞の移植・増殖の抑制

骨髄腫細胞株 U-266 を SCID-hIL6 Tg mice の腹腔内へ移植・増殖する系において、DHEA(100 ug/mouse)を皮下注射する(週1回 X3 週)と、骨髄腫細胞の移植が著明に抑制された。

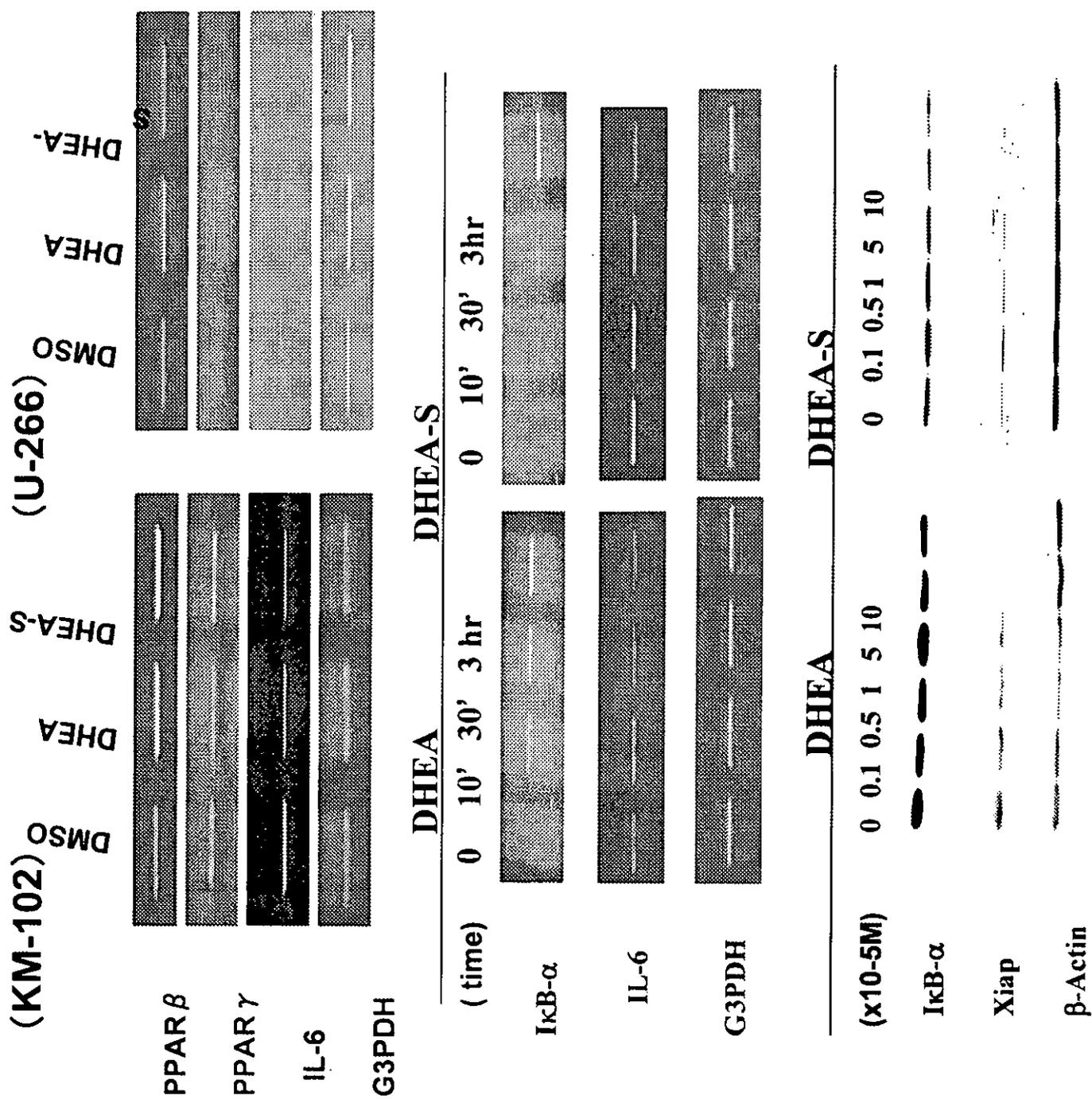


図-2 DHEA は骨髄腫細胞に直接的に作用して、PPAR β 発現を亢進させる。

酵母発現系でのアミロイド型シスタチンの分泌とその特性
—分子シャペロン欠損酵母でのアミロイド型タンパク質の分泌—

分担研究者 加藤昭夫 山口大学農学部教授
共同研究者 阿座上弘行 山口大学農学部助手

研究要旨 酵母でアミロイド型シスタチンを発現分泌させ、アミロイド形成の機構ならびにその抑制に関する研究を行った。アミロイド型シスタチン変異体 (I66Q) を酵母 *Pichia pastoris* で発現分泌させると培養中に凝集型シスタチンが増加し、培地に低濃度のアルギニンの存在下では凝集が抑制された。酵母をモデル生物としてアミロイドシスの形成機構を解明することができることを示した。また、分子シャペロンである PDI ホモログ (Eps1) を欠損した酵母で野生型シスタチンを分泌させると分泌量が著しく増加し、オリゴメリックな凝集体を形成することが示された。この結果は分子シャペロンの機能低下がアミロイドシスを引き起こす要因の一つであることを暗示している。

A. 研究目的 これまでにアミロイド型モデルタンパク質として、シスタチンやリゾチームのアミロイド型変異体を酵母で発現分泌させる系を作成してきた。この系を用いてアミロイド形成 (沈着) のモデル生物として酵母が利用できることを明らかにすること、ならびに、アミロイド形成 (沈着) に及ぼす分子シャペロン (カルネキシン、PDI ホモログ) の役割について明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法 酵母 *Pichia pastoris* を用いてアミロイド型シスタチンを分泌させ、培養中におけるアミロイド型シスタチンの沈着様式を検討した。シスタチン cDNA はヒトシスタチンとホモログのニワトリシスタチンを用いた。ヒトシスタチンに比べ、ニワトリシスタチンは酵母での発

現分泌量が多く、またヒト型とのホモロジーが高く、アミロイド型が容易に得られる。アミロイド型シスタチンは 6.6 位のイソロイシンをグルタミンに置換した I66Q 変異体を部位指定変異により作成した。また、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の小胞体膜に結合している PDI ホモログ (Eps1) をノックアウトした酵母を作成し、この酵母を用いて、シスタチンならびにそのアミロイド型タンパク質を分泌させた。酵母分泌液を低速で遠心分離 (3000rpm) し、菌体を除去した後に 8000rpm で再度遠心分離し、得られた沈殿物 (アミロイド型シスタチン凝集体) と上澄液に分離した。上澄液に 0.4 飽和硫酸を加え得られる沈殿 (オリゴマーシスタチン) を遠心分離し、さらに、得られた上澄液に 0.6 飽和になる

ように硫酸を加え、モノマーのアミロイド型シスタチン沈殿を集めた。

さらに、酵母 *S. cerevisiae* を用いて、分子シャペロン Eps1 欠損がシスタチンの分泌に及ぼす影響を調べた。上記の酵母 *Pichia pastoris* では分子シャペロン Eps1 の存在が確認されていないため、また、たとえ存在していてもその欠損により、酵母が生育できない可能性があり、*Saccharomyces cerevisiae* を用いて SS 結合をもつタンパク質に特異的な分子シャペロン Eps1 の欠損がシスタチンの品質管理に及ぼす影響を調べた。

C. 研究結果 図1に酵母から分泌する野生型シスタチンとアミロイド型シスタチンの SDS-PAGE パターンを示した。野生型シスタチンは 14 kDa に単一のバンドが見られるが、アミロイド型変異体 (I66Q) は monomer と dimer ならびにオリゴメリックなバンドが存在し、凝集体を形成しやすいことが示される。図2は野生型シスタチンとアミロイド型シスタチンのウェスタンブロットを示した。培養液から0.6飽和硫酸沈殿で得られる野生型シスタチンは単一バンドを示すが、アミロイド型シスタチンは dimer の存在が示される。さらにアミロイド型シスタチンは培養液中に多量の沈殿を生じ、monomer, dimer, oligomer の存在が確認された。図3は3日間酵母培養中に分泌するアミロイド型シスタチンの SDS-PAGE パターンから測定したモノマー、ダイマー、オリゴマー、アミロイド凝集型の分泌量を示してい

る。培養時間に伴い、モノマー型は増加せずに、オリゴマー型、アミロイド凝集型が増加することが明らかになった。この酵母発現分泌系を用いて、アミロイド凝集体形成を抑制する成分の検索ができるかどうかを検討した。図4にアルギニンの存在下で、アミロイド型シスタチン凝集体の形成が抑制できることが示された。今後、この酵母発現系を用いて、種々の成分によるアミロイド凝集の抑制を評価できると考えられる。

また、酵母 *S. cerevisiae* を用いて、小胞体膜に結合しているシャペロン PDI ホモログ (Eps1) 欠損酵母を用いてシスタチンの分泌を調べた。図5は野生型シスタチンの酵母 *S. cerevisiae* での分泌に及ぼす分子シャペロン Eps1 欠損の影響を示す。野生型酵母に比べ、Eps1 欠損酵母では凝集体シスタチン、可溶性シスタチンともに分泌量が著しく増加することが確認された。シスタチンは SS 結合が2箇所あり、その構造形成に重要な役割を果たしている。したがって、SS 結合が正しく形成されないシスタチン分子は Eps1 による品質管理により、分解系に導かれるが、一方、Eps1 欠損酵母ではこの品質管理が行われなため構造形成が不十分なアンフォールド体がオリゴメリックな形でアSEMBルされ、分泌すると考えられる。図6に野生型酵母と Eps1 欠損酵母の培養液に分泌される野生型シスタチンの SDS-PAGE パターンを示した。図から明らかなように、Eps1 欠損酵母で