

200400340A

厚生労働科学研究費補助金

痴呆・骨折臨床研究事業

痴呆のスクリーニング及び早期診断法の確立に関する  
臨床研究

平成16年度 総括研究報告書

主任研究者 武田 雅俊

平成17年(2005年)3月

## 目 次

### I. 総括研究報告書

- 痴呆のスクリーニング及び早期診断法の確立に関する臨床研究……………1  
武田 雅俊

### II. 分担研究報告書

1. アルツハイマー病新規診断マーカーに関する研究……………5  
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……………9  
田中 稔久
3. アルツハイマー病診断マーカーとしての WGA 結合糖タンパクの同定と  
検査方法の確立……………16  
浦上 克哉
4. アルツハイマー病患者の尿および血清における酸化ストレスマーカーの検討……………22  
千葉 茂

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表……………26

### IV. 研究成果の刊行物・別刷……………28

研究課題名： 痴呆のスクリーニング及び早期診断法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・保健学科生体制御学

分担研究者 千葉 茂 旭川医科大学医学部・精神医学講座

#### 研究要旨

アルツハイマー病の生物学的診断マーカーの確立に関する臨床研究に関して、病態生理学的観点から、アミロイド産生に関わる $\gamma$ セクレターゼ活性、タウ蛋白の変化、糖化産物、および酸化ストレス産物の観点から研究をおこなった。

まず、 $\gamma$ セクレターゼ活性に関してはNotchシグナル伝達を併せて結果Notch-1やCD44発現細胞の上清中にA $\beta$ 様ペプチドが分泌されており、N $\beta$ などのA $\beta$ 様ペプチドはシグナル分子であるICDs（核移行する細胞内フラグメント）と一対一の関係で産生されることが予期され、これをアルツハイマー病の診断に応用できる可能性が示唆された。

次にタウ蛋白に関しては、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おり、他の神経疾患と鑑別する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。

糖化産物に関しては、約75kDaのWGA（小麦胚芽凝集素, Wheat Germ Agglutinin）結合糖タンパクがアルツハイマー病(AD)の髄液中で減少していることを見だし、このタンパクのリン酸化タウタンパクとの比を指標とすると、感度85.1%、特異度80.6%でADを検出でき、さらにタウオパチーとの鑑別も可能である診断マーカーとなり得ることが示唆された。

酸化ストレス産物に関しては、血清CoQ10酸化率およびserum total antioxidant status (STAS)は、MCI～最軽度AD群でも軽度～高度AD群と同様に対照群に比べて有意に変化しており、早期診断に有用である可能性が示唆された。

キーワード：アルツハイマー病、 $\beta$ アミロイド、タウ蛋白、WGA結合糖タンパク、酸化ストレス

#### A. 研究目的

我が国の痴呆性高齢者は現時点で130万人を数えるが、この数は今後も増加し続けており2035年には300万人に達するものと予想されている。このうちの約半数はアルツハイマー病(AD)とされており、ADの早期診断法の確立は社会的急務ともいえる。アルツハイマー病の早期診断には、臨床症状、神経心理学的検査、生理学的検査、脳機能画像検査などが考えられるが、早期に、多人数をスクリーニングするという目的のためには、生物学的診断マーカーが最も有効と考えられる。

生物学的診断マーカーの必要性は、AD治療薬が開発されつつあることを考えると、ADの確定診断に基づいた投薬や治療的介入を計画し、さらに、発症前段階のADを的確に診断することによりADの予防への

道を切り開くために必要である。ADの生物学的診断マーカーの確立により、ADの早期診断、発症前診断が可能となれば、ADの発症を防ぐことができ、これはAD患者の医療と介護に必要な多大の費用を抑えることが期待されることは言うまでもない。

国内外の多くのグループによりADの生物学的診断マーカーの研究が進められている。例えば、糖鎖化アセチルコリンエステラーゼ、インターロイキン-6、サブスタン-P、シスタチンCなどの上昇がAD脳脊髄液で検討されてきた。末梢血では、血清アポリポ蛋白レベル、血清ホモシステイン、APPアイソフォーム、IL-6、 $\alpha$ 1アンチキモトリプシン、オキシゲナーゼ-1、24S-ヒドロキシコレステロールのレベルなどが検討されてきた。現時点で临床上の有用性が確認とされている診断マーカーとして脳脊髄液中のタウ蛋白とアミ

ロイド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。そこで、アルツハイマー病の生物学的診断マーカーの確立に関する臨床研究に関して、病態生理学的観点から、アミロイド産生に関わるγセクレターゼ活性、タウ蛋白の変化、糖化産物、および酸化ストレス産物の観点から研究をおこなった。

## B. 研究方法

Notch-1 蛋白、プレセニン1およびb APP 蛋白とその類縁体、変異体を発現するベクターを作成し、K293、HeLa、NIH 3T3、MEF 細胞に恒常的に発現させた。その細胞からの Notch-β peptide およびの分泌や蛋白分解産物を S35 メチオニンを用いたパルスチェース実験の上清および沈査を各抗体で免疫沈降し SDS ゲルで電気泳動法により分離後オートラジオグラフィで認識した。切断部位の特定はこの免疫沈降物を MALDI-TOF 型質量分析器を用いて分子量を決定することで直接特定した。また、これらの細胞の膜分画を精製しセル・フリーアッセイを実施した。

培養細胞に対する XIAP の発現の検討をおこなうため SY5Y 神経芽細胞腫を用いて、抗 XIAP 抗体(R&D 社より購入)によるウエスタンブロットをおこなった。また、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した。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ウエスタンブロットおよび ELISA による検討をおこなった。

WGA 結合タンパクの検索は、WGA によるレクチンブロット法を用いて検討を行った。リン酸化タウタンパク(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。トランスフェリンの測定は、ヒトトランスフェリン ELISA 測定キット(Cygnus Technologies)を用いた。さらに、トランスフェリンの糖鎖の解析は、髄液をトランスフェリン抗体カラムにて精製後、等電点電気泳動により分離し、ゲルを銀染色で染色して検出し、解析した。

酸化ストレス産物の測定は、朝食前に尿および静脈血を採取し(解析まで-70°Cで保存)、以下の 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-OHdG (ELISA 法)および血清 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 STAS (比色法)を測定した。

## C. 研究結果および考察

RIP シグナル伝達の過程でアルツハイマー病アミロイドβ蛋白様のペプチドの細胞外分泌が認められた。そして、Nβの産生量をAβの代わりに測定することにより、生体内での Aβ産生量を推定することが示唆された。さらに、Nβの産生量とAβ産生量はγセクレターゼ活性を反映し極めて平行して推移していることが示唆された。

遷移状態類似型およびそうでないγセクレターゼ阻害薬を様々な濃度で培養細胞に添加し、γセクレターゼ活性を変化させその時の Aβおよび Nβ分泌量について検討した。その結果 Aβ分泌の阻害効果を示す曲線と Nβ分泌の阻害効果を示す曲線は殆ど一致した。このことから Nβ分泌量はγセクレターゼ活性に応じて変化した Aβ産生量を正確に反映することが示唆された。Nβのカルボキシ末端部位の構成比率はAβのそれと一致しており、NβのC末端をAβのC末端の代わりに測定することにより、生体内での Aβ 42 産生量を推定することが示唆された。

AD 患者、くも膜下出血患者、正常者のサンプルを用い、ELISA による全タウ蛋白アッセイをおこなったところ、くも膜下出血患者、AD 患者は正常者より有意に高く、またくも膜下出血患者はAD患者よりも有意に高かった。同じサンプルを用いてウエスタンブロットをおこない、デンストメトリーにて測定したところ、AD患者のみが他の2者より有意に強い染色が認められた。このAD患者の中で、MMSEの値と全タウ蛋白濃度、MMSEの値とウエスタンブロットにおけるN-tau-delMペプチド抗体に対する染色強度に関して相関関係とみたところ、特に有意な相関は認められなかった。よって、重症度のマーカーにはなりにくい可能性が示唆された。

ADで低値を示すWGA結合糖タンパクのうち、約75kDaのタンパクについてはタウオパチーとの鑑別できる可能性が示唆されていた。このタンパクに対するリン酸化タウタンパク(pS199)の比の指標を、さらに多数例(12例)のタウオパチーと比較検討したところ、やはりADとは有意に(p<0.001)高値を示し、鑑別が可能であることが示唆された。また、WGA結合糖タンパクのみでのnon-AD群に対するROC解析を行なうと、カットオフ値2 x 10<sup>4</sup>で、感度74.6%、特異度76.6%であった。WGA結合糖タンパクに対するリン酸化タウタンパク(pS199)の比の指標を用いた場合、カットオフ値184で、感度85.1%、特異度80.6%

であった。約 75kDa の WGA 結合糖タンパクは、AD の新規診断マーカーとなり得るといえた。さらにこの約 75kDa の WGA 結合糖タンパクは、トランスフェリンであると同定された。

血清 CoQ10 酸化率は、対照群、MCI～最軽度 AD 群、軽度～高度 AD 群の順に、4.8(0.9)、7.6(2.4)、7.9(2.3) [平均 (標準偏差)] であり、対照群に比較して MCI～最軽度 AD 群 ( $p < 0.05$ ) あるいは軽度～高度 AD 群 ( $p < 0.02$ ) で有意に高値であった。STAS は、対照群、MCI～最軽度 AD 群、軽度～高度 AD 群の順に、1398(129)、1188(152)、1169(106)  $\mu\text{M}$  [平均 (標準偏差)] であり、対照群に比較して MCI～最軽度 AD 群 ( $p < 0.001$ ) あるいは軽度～高度 AD 群 ( $p < 0.0001$ ) で有意に低値であった。なお、尿中 8-OHdG、血清 CoQ10 酸化率、および STAS のいずれにおいても、MCI～最軽度 AD 群と軽度～高度 AD 群との間には有意差は認められなかった。

#### D. 結論

プレセニリン  $\gamma$  セクレターゼによる Notch の膜内蛋白分解の詳細は  $\beta$  APP のそれと非常によく似ている。Notch-1 や CD44 発現細胞の上清中に A $\beta$  様ペプチドが分泌されている。それらの A $\beta$  様ペプチドのうち N $\beta$  について詳細に検討したところ、(1)  $\beta$  APP と Notch-1 の切断  $\gamma$  セクレターゼによる切断は基質間で極めて類似しており、むしろ基質内で異なることが明らかになった。我々の発見した N $\beta$  などの A $\beta$  様ペプチドをアルツハイマー病の病前の予期診断に応用できることを提唱する。

また、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が、病気の重症度 (ステージ) にはあまり関係しないが、他の疾患との鑑別には有用であることが示唆された。

75kDa の WGA 結合糖タンパクはトランスフェリンであり、タウオパチーと鑑別が可能である診断マーカーであるといえる。WGA で検出したトランスフェリンの低値の原因は、糖鎖の異常であると考えられた。

血清中の OS マーカーである CoQ10 酸化率や STAS は、MCI～最軽度の AD において軽度～高度の AD と同様に变化しており、AD の早期診断上、これらの OS マーカーが有用である可能性が示唆された。

#### E. 健康危険情報

特記すべきことなし。

#### F. 研究発表

##### 論文発表

1. Okochi, M., Fukumori, A., Satoh, Y., Aidaraliev, N., Tani, H., Kamino, K., Tanaka, T., Kudo, T., Takeda M. Alzheimer's  $\beta$ -secretase mechanism produces Amyloid- $\beta$  protein like peptides simultaneously with release of intracellular signaling fragments Molecular Neurobiology of Alzheimer Disease and Related Disorders, Karger Press, 2004, pp31-41.
2. Yamamori H, Tanaka T, Kudo T, Takeda M. Amyloid- $\beta$  down-regulates XIAP expression in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. NeuroReport 15(5):851-854,2004.
3. Tanaka T, Yamamori H, Wada-Isoe K, Tsujio I, Takeda M. Activated protein kinases and phosphorylated tau protein in Alzheimer disease. Molecular Neurobiology of Alzheimer Disease and Related Disorders, ed. by Takeda M, Tanaka T, Cacabelos R. Karger, (Basel, Switzerland) 225-235, 2004
4. Kida T, Kamino K, Yamamoto M, Kanayama D, Tanaka T, Kudo T, Takeda M. C677T polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase(MTHFR) gene affects plasma homocysteine level and is a genetic factor of late-onset Alzheimer's disease. Psychogeriatrics 4:4-10,2004
5. Hattori S, Sakuma K, Wakutani Y, Wada K, Shimoda M, Urakami K, Kowa H, Nakashima K: A novel presenilin 1 mutation (Y154N) in a patient with early onset Alzheimer's disease with spastic paraparesis. Neuroscience Letters 368(3): 319-22, 2004.
6. Wada-Isoe K, Wakutani Y, Urakami K, Nakashima K: Elevated interleukin-6 levels in cerebrospinal fluid of vascular dementia patients. Acta Neurol. Scand. 110: 124-127, 2004.
7. Wakutani Y, Watanabe K, Adachi Y, Wada-Isoe K, Urakami K, Ninomiya H, Saido TC, Hashimoto T, Iwatsubo T, Nakashima K: Novel amyloid precursor protein gene missense mutation (D678N) in probable familial

- Alzheimer's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 75: 1039-1042, 2004.
8. Wakutani Y, Kowa H, Kusumi M, Nakaso K, Yasui K, Isoe-Wada K, Yano H, 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.
  9. Wakutani Y, Adachi Y, Wada-Isoe K, Yamagata K, Urakami K, Nakashima K: Genetic analysis of familial Alzheimer's disease in a Japanese population. *Molecular Neurobiology of Alzheimer Disease and Related Disorders*. Basel, Karger, pp.157-163, 2004.
  10. 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.
  11. Wakutani Y, Kowa H, Kusumi M, Nakaso K, Isoe-Wada K, Yano H, 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.
  12. 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, Tanaka T, Cacabelos R (Eds) Karger, Basel, 2004, pp 164-171
  13. Nunomura A, Chiba S, Lippa CF, Cras P, Kalaria RN, Takeda A, Honda K, Smith MA, Perry G. Neuronal RNA oxidation is a prominent feature of familial Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease* 17(1):108-113, 2004

出願人： 大河内正康、武田雅俊、大阪 TLO 国際出願：  
PCT/JP2004/16685  
提出日： 2004/11/10

特許申請

セル・フリー・Notch 切断分析方法および薬剤スクリーニング方法

研究課題名：痴呆のスクリーニング及び早期診断法の確立に関する臨床研究

(分担研究課題名：アルツハイマー病新規診断マーカーに関する研究)

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

分担研究協力者 大河内正康 大阪大学大学院医学系研究科・精神医学

#### 研究要旨

Notch シグナル伝達のカノニカル経路のように受容体分子の膜内蛋白分解を経たシグナル伝達を RIP シグナル伝達と呼ぶ。 プレセニリン $\gamma$ セクレターゼによる Notch の膜内蛋白分解の詳細は  $\beta$  APP のそれと非常によく似ている。 我々はアルツハイマー病 A $\beta$  の分泌がアルツハイマー病を引き起こす特異な現象ではなくて、RIP シグナル伝達に共通の現象ではないかと考えた。 検討の結果 Notch-1 や CD44 発現細胞の上清中に A $\beta$  様ペプチドが分泌されていることを示唆する結果を得た。 それらの A $\beta$  様ペプチドのうち N $\beta$  について詳細に検討したところ、(1)  $\beta$  APP と Notch-1 の切断について見る限り A $\beta$ /N $\beta$  の二つの分子の産生メカニズムは極めて類似し A $\beta$  42 産生が増大する条件ではやはり長さの長い N $\beta$  が産生され、(2) また AICD/NICD 産生のメカニズムも類似する、つまり $\gamma$ セクレターゼによる切断は基質間で極めて類似しており、むしろ基質内で異なるように見えることが明らかになった。 つまり同じメカニズムで基質の膜貫通部分を切断するのだが、膜の中央部分の切断と膜の細胞質側の切断はメカニズムが異なることが明らかになった。 我々の発見した N $\beta$  などの A $\beta$  様ペプチドはシグナル分子である ICDs (核移行する細胞内フラグメント) と一対一の関係で産生されることが予期され、これをアルツハイマー病の診断に応用できることを提唱する。

#### A. 研究目的

Notch-1 蛋白はタイプ 1 膜蛋白型・細胞表面レセプターであり、胎生期や成長後の細胞分化特に神経細胞の分化調節に必須の Notch シグナル伝達を担っている。 古典的なシグナル伝達パラダイムとは異なり、Notch シグナル伝達はリガンド結合に起因した Notch レセプター分子の段階的な蛋白分解の結果、その細胞内部分が核移行し直接転写調節因子として働くことでシグナル伝達が達成される。 即ち、リガンド結合により Notch レセプターの Site-2 での”細胞外シェディング”が誘導され、その結果生じる膜貫通フラグメントである NEXT (Notch extracellular truncation) は Site-3 で膜内蛋白分解を受ける。 この切断はアルツハイマー病  $\beta$  APP の $\gamma$ -切断と似通っている。 これらの蛋白分解は家族性アルツハイマー病の病原性蛋白であるプレセニリンの機能に依存することがわかっている。 しかしながら、アミロイド $\beta$  蛋白 (Amyloid  $\beta$  peptide; A $\beta$ ) と NICD (Notch intracellular cytoplasmic domain) を生じる切断部位の膜内トポロジーに違いがあるため、これらの切断は

二つの異なる蛋白分解酵素によるものではないかと考えられていた。

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

プレセニリンの病原性突然変異体は A $\beta$  のカルボキシル末端を延長する。 面白いことに、これらの変異型プレセニリンは Site-4 切断の正確さに同様の影響を及ぼす。 したがって、プレセニリン変異体は 2 つの全く異なる基質 (Notch/ $\beta$  APP) の同じような部位 (S4/ $\gamma$ 40) での切断の正確さに同じような影響 (切断をよりカルボキシル末端側へずらす) を示すことが明らかになった。

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

上記のような前年までの研究結果を応用して、N $\beta$ ペプチドを例に取り A $\beta$  様ペプチドの分泌がアルツハイマー病の診断的マーカーになることを示す仮説の提示および実験を行った。

## B. 研究方法

Notch-1 蛋白、プレセニン1および $\beta$  APP 蛋白とその類縁体、変異体を発現するベクターを作成し、K293、HeLa、NIH 3T3、MEF 細胞に恒常的に発現させた。その細胞からの Notch- $\beta$  peptide およびの分泌や蛋白分解産物を S35 メチオニンを用いたパルスチェース実験の上清および沈査を各抗体で免疫沈降し SDS ゲルで電気泳動法により分離後オートラジオグラフィで認識した。切断部位の特定はこの免疫沈降物を MALDI-TOF 型質量分析器を用いて分子量を決定することで直接特定した。

また、これらの細胞の膜分画を精製しセル・フリーアッセイを実施した。

## C. 研究結果

RIP シグナル伝達の過程でアルツハイマー病アミロイド $\beta$  蛋白様のペプチドの細胞外分泌が認められる。

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

RIP シグナル伝達のメカニズムを考えるとこのような A $\beta$  様ペプチドの分泌は、このシグナル伝達メカニズムに共通した現象と考えられる。このことからシグナル伝達量を測定するという今までの生物学では不可能であったことがこのペプチドの測定により可能になるかもしれない。

N $\beta$  の産生量を A $\beta$  の代わりに測定することにより、生体内での A $\beta$  産生量を推定することができる。

アルツハイマー病は A $\beta$  の蓄積が引き金となって起こると考えられており A $\beta$  の産生量が疾病患者あるいは病変の形成過程で上昇しているかどうかは大きな問題である。現時点まででは、そのような A $\beta$  ペプチド産生の上昇について正確に調べられたことはない。しかし、重要なことは A $\beta$ 42 の蓄積はアルツハイマー病患者脳では健常者に比較して例外なく増大していることである。実際、A $\beta$  産生量がアルツハイマー病のマーカーになる可能性は多くの研究者が指摘していたが、その大変凝集しやすい性質のため末梢で認識される量が産生量を反映しないため利用できなかった。そこで我々はこの N $\beta$  などの A $\beta$  様ペプチドを代わりに測定することによって A $\beta$  産生量を推定し、診断マーカーとして開発することを提案する。

N $\beta$  の産生量と A $\beta$  産生量は $\gamma$ -セクレターゼ活性を反映し極めて平行して推移する。

遷移状態類似型およびそうでない $\gamma$ -セクレターゼ阻害薬を様々な濃度で培養細胞に添加し、 $\gamma$ -セクレターゼ活性を変化させその時の A $\beta$  および N $\beta$  分泌量について検討した。その結果 A $\beta$  分泌の阻害効果を示す曲線と N $\beta$  分泌の阻害効果を示す曲線は殆ど一致した。このことから N $\beta$  分泌量は $\gamma$ -セクレターゼ活性に応じて変化した A $\beta$  産生量を正確に反映することが示唆された。

セルフリーアッセイ系を用いては極めて類似した。

$\beta$ APP および Notch を共発現させた細胞の膜分画を採取し、目的の蛋白分解以外の、生体内で常に起こっている蛋白分解を防いだ状態で A $\beta$  および N $\beta$  産生実験を行った。 $\gamma$ -セクレターゼ阻害薬の各切断効率に対する効果について検討したところ、A $\beta$  産生阻害の程度を示した曲線に一致するのは AICD 産生よりもむしろ N $\beta$  産生であった。つまり A $\beta$  および N $\beta$  産生のメカニズムが極めて類似したものであり、A $\beta$  と AICD の産生メカニズムの方がむしろ異なることが明らか



になった。このときの $\gamma$ 切断の類似は $\gamma$ 切断活性量のみならず質量分析解析の結果 $\gamma$ 切断の正確さにも同様に現れていることが明らかになった。

N $\beta$ のカルボキシル末端部位の構成比率はA $\beta$ のそれと一致する。

N $\beta$ のカルボキシル末端を生成する $\gamma$ 切断部位の正確さはA $\beta$ の場合と同様にFADを来たすPS突然変異体の影響を受け、2~4残基カルボキシル末端側へ移動することがわかった。即ち、最も量の多いN $\beta$ 分子であるN $\beta$ 1731 (1731はマウスNotch-1蛋白のN端からのアミノ酸残基の順番をあらわす)量に比較したN $\beta$ 1733-5量の増大が認められる。

このようにNotchと $\beta$ APPの膜内蛋白分解のメカニズムはA $\beta$ 42産生を反映するその切断の正確さを含めて検討したところ如何なる点でも極めて類似していることが明らかになった。

N $\beta$ のC末端をA $\beta$ のC末端の代わりに測定することにより、生体内でのA $\beta$ 42産生量を推定することができる。

A $\beta$ 42産生がアルツハイマー病を引き起こす可能性について指摘されている。上記の実験結果からN $\beta$ などのA $\beta$ 様ペプチドのC末端を測定することにより病原性のあるA $\beta$ 42産生量を推定することができる。

#### D. 考察

末梢やCSF中のA $\beta$ の代わりにN $\beta$ あるいはN $\beta$ 1733-35/N $\beta$ 1731を測定することにより、今まで不明であったSAD患者脳内 $\gamma$ -secretase活性あるいはA $\beta$ 42/40比率の増大を正確に推定できる可能性についてさらに検討した。その結果N $\beta$ などのA $\beta$ 様ペプチドの産生は正確にA $\beta$ 産生と平行して動くことが明らかになった。ADを引き起こす脳内A $\beta$ 蓄積は痴呆を発症する10年以上前から徐々に蓄積すると考えられており、その過程をこれらのペプチドの産生量を測定することで予見できる可能性がある。現在開発中のELISAによるN $\beta$ 量の測定結果を合わせて今後の開発を進める予定である。

#### E. 結論

プレセニリン $\gamma$ セクレターゼによるNotchの膜内蛋白分解の詳細は $\beta$ APPのそれと非常によく似ている。

Notch-1やCD44発現細胞の上清中にA $\beta$ 様ペプチドが分泌されている。それらのA $\beta$ 様ペプチドのうちN $\beta$ について詳細に検討したところ、(1) $\beta$ APPとNotch-1の切断 $\gamma$ セクレターゼによる切断は基質間で極めて類似しており、むしろ基質内で異なることが明らかになった。我々の発見したN $\beta$ などのA $\beta$ 様ペプチドをアルツハイマー病の病前の予期診断に応用できることを提唱する。

#### F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Okochi, M., Fukumori, A., Satoh, Y., Aidaraliev, N., Tani, H., Kamino, K., Tanaka, T., Kudo, T., Takeda M.

Alzheimer's  $\gamma$ -secretase mechanism produces Amyloid- $\beta$ -protein like peptides simultaneously with release of intracellular signaling fragments  
Molecular Neurobiology of Alzheimer Disease and Related Disorders, Karger Press, 2004, pp31-41.

大河内正康、武田雅俊 アミロイド前駆体蛋白遺伝子変異によるアルツハイマー病  
日本臨床62巻 増刊号1, 痴呆症候学(2) 臨床編 (2004) 86-89.

大河内正康、武田雅俊 アルツハイマー病の分子病態.  
日本医師会雑誌131巻、第12号、特別号 精神障害の臨床 (2004) S12-S13.

大河内正康 田上真次 武田雅俊 A $\beta$ の毒性発現機構  
Molecular Medicine 41-No.4 2004 427-431

大河内正康、武田雅俊  
アミロイド $\beta$ 蛋白産生の異常がアルツハイマー病につながる  
平成16年度・文部科学省科学研究費補助金・研究成果公開促進費「研究成果公開發表(A)」補助事業  
第19回「大学と科学」公開シンポジウム アルツハイマー病 治療の可能性を探る 予稿集 pp30-32

Okochi, M., Takeda, M.

Possible assessment of Alzheimer's  $\gamma$ -secretase activity  
by level of A $\beta$ -like peptides  
Psychogeriatrics (2004), 4: 23-27

特許申請

セル・フリー・Notch 切断分析方法および薬剤スクリー  
ニング方法

出願人： 大河内正康、武田雅俊、大阪 TLO 国際出願：

PCT/JP2004/16685

提出日： 2004/11/10

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、A $\beta$  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 A $\beta$  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 A $\beta$  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 A $\beta$  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-P、シスタチン C などの上昇が AD 脳脊髄液で検討されてきた。末梢血では、血清アポリポ蛋白レベル、血清ホモシステイン、APP アイソフォーム、IL-6、 $\alpha 1$  アンチキモトリプシン、オキシゲナーゼ-1、24S-ヒドロキシコレステロールのレベルなどが検討されてきた。現時点で临床上の有用性が確認とされている診断マーカーとして脳脊髄液中のタウ蛋白とアミ

ロイド $\beta$ 42 とがあるが、未だ生前診断を簡易に確定できるものではない。

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 A $\beta$  と XIAP の発現に関する研究をおこなった。

A $\beta$  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、酸化ストレス仮説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、A $\beta$  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 A $\beta$  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 A $\beta$  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 A $\beta$  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 メチオンin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<sup>19,20)</sup>、5  $\mu$ M および 500nM の A $\beta$ <sub>25-35</sub> (部分ペプチド)、5  $\mu$ M A $\beta$ <sub>35-25</sub> (逆配列部分ペプチド)、500nM A $\beta$ <sub>1-42</sub> (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、A $\beta$ <sub>1-42</sub> 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°C 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 A $\beta$ <sub>1-42</sub> 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<sub>2</sub>、0.1 mM EDTA、1 mM EGTA、25 mM NaF、1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>、1 mM PMSF、5  $\mu$ g/ml aprotinine、5  $\mu$ g/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 50  $\mu$ g 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 5  $\mu$ M A $\beta$ <sub>25-35</sub>、5  $\mu$ M A $\beta$ <sub>35-25</sub>、500nM A $\beta$ <sub>1-42</sub> の存在下で 48 時間培養した。そして、0.5  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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、COS7 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 A $\beta$ <sub>1-42</sub> の存在下でさらに 48 時間培養し、そして、0.5  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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  $\mu$ l のサンプルに 5  $\mu$ l の 500 mM PMSF、2.5 mg/ml aprotinine、2.5 mg/ml leupeptine を添加し (最終濃度 5 mM PMSF、25  $\mu$ g/ml aprotinine、25  $\mu$ g/ml leupeptine)、それを 100 度で 5 分間ボイルし

たあと 200K x G にて遠心し凝固物を遠沈して可溶性画分(supernatant)を得た。このステップはタウ蛋白などの熱耐性の蛋白を收拾するためのものである。この supernatant をセントリカット超ミニ(分子量 10,000 画分)を用いて 300  $\mu$ l まで濃縮し、それを氷冷アセトンによって蛋白沈降をかけてたあと、SpeedVac によって乾燥させた。この蛋白をポリアクリルアミドゲルにアプライして通常のウェ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する。

### C. 研究結果

まず、培養細胞に対する A $\beta$  の細胞死毒性に関して検討した。さまざまな濃度の A $\beta$ <sub>25-35</sub> と A $\beta$ <sub>35-25</sub> 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、0  $\mu$ M から 5  $\mu$ M までの濃度の A $\beta$ <sub>25-35</sub> では細胞毒性が観察されなかったのに対して、10  $\mu$ M から 50  $\mu$ M までの濃度の A $\beta$ <sub>25-35</sub> では濃度依存的な細胞死の増加が観察された。一方、A $\beta$ <sub>35-25</sub> では 0  $\mu$ M から 50  $\mu$ M まで細胞毒性が全く観察されなかった。次に、5  $\mu$ M の濃度の A $\beta$ <sub>25-35</sub> および A $\beta$ <sub>35-25</sub>、そして 5  $\mu$ M と 500 nM のフィブリル化 A $\beta$ <sub>1-42</sub> 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 5  $\mu$ M のフィブリル化 A $\beta$ <sub>1-42</sub> のみであった。よって、以後実験に用いる 5  $\mu$ M および 500 nM の A $\beta$ <sub>25-35</sub> および 500 nM のフィブリル化 A $\beta$ <sub>1-42</sub> 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 $\beta$ <sub>25-35</sub> 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、5  $\mu$ M の A $\beta$ <sub>25-35</sub> 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 $\beta$ <sub>35-25</sub> 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 $\beta$ <sub>1-42</sub> を 500nM の濃度で SY5Y 神経芽細胞腫に添加したところ、5  $\mu$ M の A $\beta$ <sub>25-35</sub> 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 $\beta$ <sub>1-42</sub> 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、A $\beta$  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 5  $\mu$ M A $\beta$ <sub>25-35</sub>、5  $\mu$ M A $\beta$ <sub>35-25</sub>、500nM A $\beta$ <sub>1-42</sub> 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 $\beta$ <sub>35-25</sub> を添加してあった細胞には、0.5  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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、5  $\mu$ M A $\beta$ <sub>25-35</sub> または 500nM A $\beta$ <sub>1-42</sub> 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 $\beta$ <sub>1-42</sub> 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 $\beta$ <sub>1-42</sub> 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 $\beta$ <sub>1-42</sub> 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 $\beta$ <sub>1-42</sub> の添加によって細胞死脆弱性が増加し、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 $\beta$  1-42 の添加後、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 $\beta$  1-42 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。

AD 患者 8 名、くも膜下出血患者 3 名、正常者 3 名のサンプルを用い、ELISA による全タウ蛋白アッセイをおこなったところ、くも膜下出血患者、AD 患者は正常者より有意に高く、またくも膜下出血患者は AD 患者よりも有意にたかかった。同じサンプルを用いてウエスタンブロットをおこない、デンストメトリーにて測定したところ、AD 患者のみが他の 2 者より有意に強い染色が認められた。この AD 患者 8 名の中で、MMSE の値と全タウ蛋白濃度、MMSE の値とウエスタンブロットにおける N-tau-delM ペプチド抗体に対する染色強度に関して相関関係とみたところ、特に有意な相関は認められなかった。よって、重症度のマーカーにはなりにくい可能性が示唆された。

#### D. 考察

A $\beta$  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、A $\beta$  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 A $\beta$  によってアポト

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 A $\beta$  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 A $\beta$  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 A $\beta$  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 A $\beta$  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 A $\beta$  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ておこなわれており、その知見も多い。結果としては、脳脊髄液中のタウ蛋白の増加はアルツハイマー病に確実に認められる変化であるが、アルツハイマー病以外の変性性神経疾患においても認められており、例えば皮質基底核変性症・前頭側頭葉型痴呆や正常圧水頭症においてはアルツハイマー病と同様にタウ蛋白が増加する。しかし、神経病理学的にタウ蛋白の蓄積のない脳血管性痴呆または神経原線維変化の発現範囲の狭い進行性核上性麻痺の場合は脳脊髄液中のタウ蛋白の増加は認められない。このように痴呆症状をきたす疾患の中で、広い意味で鑑別に用いることができる可能性が高い。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クセシ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<sup>1</sup>Met-Ala-Glu-Pro-Arg<sup>5</sup>であるが、このN末端のMetが切断されると、この配列みだすものとなる。理論的に想定されたXIAPとN末端のMetの除かれたタウ蛋白との特異的な結合は、今回の研究で明らかに示された。さらに、このような切断が実際にアルツハイマー病の脳内で起こっている現象であることも、今回の研究から示唆された。どのようなストレスに反応して、あるいはどのような機序でこの切断が引き起こされているかは、未だ明らかではないが、我々はこのN末端のMetの切断はリボソームなどに局在するメチオニンアミノペプチダーゼによって引き起こされているのではないかと想定している。リボソームは蛋白合成装置であるが、タウ蛋白のリン酸化を伴う神経細胞死を誘導するリボトキシックストレスの場であり、このリボソームへの酸化ストレスがADに特徴的な神経細胞死を引き出しているのではないかという考えから、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い。

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

のかというところを今回は解析したが、くも膜下出血患者との比較に置いては、峻別のための有効なマーカーになる可能性が示唆された。しかし、MMSEとの相関が得られなかったことより、重症度のマーカーとはなりにくい可能性が示唆された。

## 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A $\beta$ 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A $\beta$ 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。また、病気の重症度(ステージ)にはあまり関連しないが、他の疾患との鑑別には有用であることが示唆され、今後さらに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

1. Yamamori H, Tanaka T, Kudo T., Takeda M. Amyloid- $\beta$  down-regulates XIAP expression in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *NeuroReport* 15(5):851-854,2004.
2. Okochi M., Fukumori A., Satoh Y., Aidaraliev N., Tanii H., Kamino K., Tanaka T., Kudo T., Takeda M. Alzheimer's  $\gamma$ -secretase mechanism produces amyloid- $\beta$  protein like peptides simultaneously with release of intracellular signaling fragments. *Molecular Neurobiology of Alzheimer Disease and Related Disorders*, ed. by Takeda M., Tanaka T., Cacabelos R. Karger, (Basel, Switzerland) 31-41, 2004

3. Kida T, Kamino K, Yamamoto M, Kanayama D, Tanaka T., Kudo T, Takeda M. C677T polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase(MTHFR) gene affects plasma homocysteine level and is a genetic factor of late-onset Alzheimer's disease. *Psychogeriatrics* 4:4-10,2004
  4. 田中稔久、山森英長、Begum N. Nessa、Golam Md. Sadik、和田健二、紙野晃人、工藤喬、大河内正康、福森亮雄、金山大祐、姜経緯、木村亮、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 精神薬療研究年報 36,57-65,2004.
  5. 田中稔久、武田雅俊 痴呆 日本医師会雑誌特別号 131,12 精神障害の臨床 S140-S143,2004.
  6. 武田雅俊 田中稔久 CNS (中枢神経) 研究の動向 II 前頭側頭型痴呆症の分子病態—神経変性メカニズムの理解 老年精神医学雑誌 15:1421-1429,2004.
2. 学会発表
1. 田中稔久、山森英長、Nurun Nessen Begum、Md. Golam Sadik、武田雅俊 リチウムによるアポトーシス阻害蛋白質への影響 第24回リチウム研究会 2004.04.24 東京経団連会館
  2. 田中稔久 第19回老年精神医学会 (座長) 2004.6.26、長野県松本文化会館 (長野)
  3. 紙野晃人、貴田智之、山本美都子、田中稔久、工藤喬、武田雅俊 アポリポ蛋白 C-II 遺伝子多型によるアルツハイマー病発症年齢の修飾効果 第19回老年精神医学会 2004.6.25-26、長野県松本文化会館 (長野)
  4. 田中稔久 第41回近畿九大学精神神経科学教室集談会 (座長) 2004,7,10 薬業年金会館 (大阪)
  5. Tanaka T., Yamamori H, Begum NN, Sadik MG, Takeda M. Cytoprotective activity of X chromosome-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) is attenuated by amyloid  $\beta$  and tau protein.. The 9<sup>th</sup> international conference on Alzheimer disease and related disorders Jul,17-22,2004, Philadelphia, U.S.A.
  6. Begum NN, Tanaka T., Takeda M. Immune mediated hyperphosphorylation of tau in alzhemiers disease .. The 9<sup>th</sup> international conference on Alzheimer disease and related disorders Jul,17-22,2004, Philadelphia, U.S.A.
  7. Tanaka T., Yamamori H, Takeda M. Neuroprotective action of lithium IPA Asia Pacific Regional Meeting Sep,8-11,2004. (Seoul, Korea)
  8. くも膜下出血患者 Takeda M., Tanaka T. Symposium B-3, Biological aspect of late-onset psychiatric disorder: Behavioral symptoms and pathogenesis of frontotemporal dementia.. IPA Asia Pacific Regional Meeting Sep,8-11,2004. (Seoul, Korea)
  9. Tanaka T., Takeda M. Symposium C-1, Neurobiology of alzheimer's disease: Tau pathology and Alzheimer disease. IPA Asia Pacific Regional Meeting Sep,8-11,2004. (Seoul, Korea)
  10. 田中稔久、山森英長、武田雅俊 アポトーシス阻害蛋白とタウ蛋白との阻害 第23回日本痴呆学会、2004.9.30、江戸川総合区民ホール (東京)
  11. Tanaka T. and Dekosky T (Chairmen) Symposium I, "Early diagnosis of Dementia — its significance and methods" 20<sup>th</sup> International Conference of Alzheimer's Disease International Kyoto 2004, Oct 15, 2004 (Kyoro)
  12. Sadik G., Tanaka T., Yamamori H., Takeda, M. Regulation of Binding of Tau with 14-3-3 Protein by Phosphorylation.. (Abst.) Society for Neuroscience the 34<sup>th</sup> Annual Meeting, San Diego, Oct, 23-28, 2004.
  13. 田中稔久、山森英長、Begum Nurun Nessa, Md. Golam Sadik、工藤喬、紙野晃人、大河内正康、田上真次、福森亮雄、姜経緯、金山大祐、木村亮、武田雅俊 タウ蛋白修飾とアポトーシス阻害因子に関連するアルツハイマー病診断法と治療法の開発 第37回精神神経系薬物治療研究報告会、2004.12.10、千里ライフサイエンスセンター (大阪)
- 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（痴呆・骨折臨床研究事業）

分担研究報告書

研究課題名：痴呆のスクリーニング及び早期診断法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 結合糖タンパクの同定と  
検査方法の確立)

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 (小麦胚芽凝集素, 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、約 75kDa の WGA 結合糖タンパクがアルツハイマー病(AD)の髄液中で減少していることを見だし、この糖タンパクを新たな診断マーカーの候補として確立することを試みている。このタンパクのリン酸化タウタンパクとの比を指標とすると、感度 85.1%、特異度 80.6%で AD を検出でき、さらにタウオパチーとの鑑別も可能である診断マーカーとなり得ることが分かった。このタンパクの簡易かつ確実な診断方法の確立を目的として、タンパクの同定を行ったところ、トランスフェリンであることが分かった。しかし髄液中のトランスフェリン濃度には差がなく、トランスフェリンの糖差がなんらかの異常をきたしていると考えられる。現在糖鎖の解析を行っており、その簡便な測定方法を検索中である。

キーワード：アルツハイマー病、髄液、WGA、タウオパチー、トランスフェリン

A. 研究目的

WGA に結合する糖タンパクが、AD 患者の髄液中で減少しているという報告から (Fodero et al, J. Neurochem, 2001)、我々は WGA 結合糖タンパク質注目してきた。現在までの研究で、AD の髄液で新たに 3 種の WGA 結合糖タンパクが減少している傾向がみられ、特に約 75kDa の糖タンパクは、タウオパチーと鑑別できる可能性が示唆されていた (厚生労働省効果的医

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 年度報告書 pp18-23)。今年度は、タウオパチーとの鑑別について、症例を増やしてその信頼性を検討すること、また同時に、このタンパクを同定してその減少の由来を解析し、その異常部位を、簡便にかつ確実に検出できる検査方法を検索し、新たな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。さらに、WGA で検出できるこの糖タンパク質の異常部位の解析によって、新たな AD の病態を見いだすことができると考えた。

## 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 (DLB)、クロイツフェルトヤコブ病 (CJD)、進行性核上性麻痺 (PSP)、大脳皮質基底核変性症 (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) の髄液を用いた。各疾患の診断は詳細な問診、内科学的診察、神経学的診察、高次脳機能検査、画像検査 (CT, MRI, SPECT) などを行い、以下の診断基準を参考にして行った。AD では DSM-IV および NINCDS-ADRDA の診断基準を、VD で NINDS-AIREN の診断基準を、NPH, DLB は、CJD, PSP は NINDS-SPSP の診断基準、CBD では Rinne、森松らの診断基準を満足するものとした。WGA 結合タンパクの検索は、WGA によるレクチンプロット法を用いて検討を行った。リン酸化タウタンパク (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。タンパクの同定は、SDS-PAGE で電気泳動したゲルからタンパクを切り出してトリプシン処理してペプチドに分解し、それらのペプチドの質量分析と、さらに個々のペプチドのアミノ酸解析を行い、データベースから検索した (業者委託: プロフェニックス)。O-GlcNAc の検出は、抗 O-GlcNAc 抗体 (RL2) を用いて O-GlcNAc 結合タンパクを Protein A

Sepharose によって免疫沈降した後、ウェスタンブロットを行い検出した。トランスフェリンの測定は、ヒトトランスフェリン ELISA 測定キット (Cygnus Technologies) を用いた。さらに、トランスフェリンの糖鎖の解析は、髄液をトランスフェリン抗体カラムにて精製後、等電点電気泳動により分離し、ゲルを銀染色で染色して検出し、解析した。

## C. 結果および考察

AD で低値を示す WGA 結合糖タンパクのうち、約 75kDa のタンパクについてはタウオパチーとの鑑別できる可能性が示唆されていた。このタンパクに対するリン酸化タウタンパク (pS199) の比の指標を、さらに多数例 (12 例) のタウオパチーと比較検討したところ、やはり AD とは有意に ( $p < 0.001$ ) 高値を示し、鑑別が可能であると思われた。また、WGA 結合糖タンパクのみでの non-AD 群に対する ROC 解析を行なうと、カットオフ値  $2 \times 10^4$  で、感度 74.6%、特異度 76.6%であった。WGA 結合糖タンパクに対するリン酸化タウタンパク (pS199) の比の指標を用いた場合、カットオフ値 184 で、感度 85.1%、特異度 80.6%であった。約 75kDa の WGA 結合糖タンパクは、AD の新規診断マーカーとなり得るといえる。

さらにこの約 75kDa の WGA 結合糖タンパクの測定を簡便にするためには、タンパクを同定し、確実に AD での低値の由来を測定する必要がある。タンパクの同定には、ゲルから切り出したタンパクの、ペプチドの質量分析とアミノ酸解析を組み合わせた MS/MS 解析を用いた。約 75kDa の WGA

結合糖タンパクは、トランスフェリンであった。このタンパクがトランスフェリンであることは、抗トランスフェリン抗体を用いたウエスタンブロット解析により確認した。

WGA で検出したトランスフェリンが、低値を示した原因は、トランスフェリンタンパク自体の減少、あるいは WGA に結合する糖鎖の変化あるいは減少であると考えられる。現在までに、トランスフェリンが AD で低下していたという報告はない<sup>2)</sup>。実際に、髄液中トランスフェリンを測定してみると、AD(20 例)では  $26.68 \pm 8.66$  mg/ml、AD 以外で痴呆症状をもつ non-AD 群(44 例)では  $27.00 \pm 8.70$  mg/ml、痴呆症状のないコントロール群(21 例)では  $29.73 \pm 14.79$  mg/ml であり、有意な差は見られなかった。non-AD 群のなかのタウオパチーに関して検討しても、DLB(9 例)では  $24.75 \pm 9.59$  mg/ml、CBD(5 例)では  $23.86 \pm 9.20$  mg/ml、PSP(2 例)では、 $23.18 \pm 6.86$  mg/ml であり、いずれも有意な差は見られなかった。WGA で検出したトランスフェリンの低値は、タンパク自体の減少ではなく、糖鎖の何らかの変化あるいは減少であることが示唆された。

トランスフェリンの糖鎖は、413 番目と 611 番目のアスパラギンに N-アセチルグルコサミン、マンノース、グルコース、シアル酸を含む N 結合型複合糖鎖である。この糖鎖の異常を検出する為には、糖鎖の数の差でトランスフェリンの等電点が異なるという性質を用い、等電点電気泳動が有効である<sup>3,4)</sup>と思われた。現在、髄液から抗体カラムによってトランスフェリンを精製し、等電点電気泳動によって糖鎖のパターンの

解析を行なっているが、思いのほかタンパク量が必要であり、はっきりとした糖鎖パターンを得ることができていない。今後、さらに高感度に糖鎖パターンを検出できるように改良を重ねていく必要がある。また、糖鎖の数を推測する方法として、精製したトランスフェリンの結合型シアル酸量の測定も有効な手段であると考えられる。また、WGA で検出した糖タンパクは、3 種類のタンパクにおいて AD では減少している傾向が見られることより、髄液中の結合型シアル酸測定も、糖鎖の異常を検出できる手法である可能性がある。さらに、トランスフェリンの鉄との結合能が、膜脂質の酸化、さらに酸化ストレスに関与し、AD の病態に影響を与えているという報告もあり、鉄結合能についても今後検討していく予定である。

#### D. まとめ

75kDa の WGA 結合糖タンパクは、タウオパチーと鑑別が可能である診断マーカーであるといえる。このタンパクを同定したところ、トランスフェリンであった。WGA で検出したトランスフェリンの低値の原因は、糖鎖の異常であると考えられた。今後、糖鎖の異常を検出する測定法を検索していく予定である。

#### E. 健康危険情報

特記すべきことなし。

#### 文献

- 1) Fodero L, et al: Wheat Germ Agglutinin-binding glycoproteins are decreased in Alzheimer's disease