

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) が知られており、その中でも XIAP (X chromosome-linked inhibitor of apoptosis) 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<sup>714)</sup>。昨年我々は、この XIAP が過剰発現する細胞ではそうでない細胞に比べて、アポトーシスを誘導するストレスのもとでその細胞死が抑制されると同時に、アポトーシスに伴うタウ蛋白の脱リン酸化が抑制されること、および N 末端の Met の除かれたタウ蛋白と XIAP は特異的に結合し、XIAP の機能が抑制される可能性があることを報告してきた<sup>23)</sup>。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<sup>9)</sup>。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<sup>16)10)</sup>、そのような理解における大きな問題点として、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可能性としては、低濃度の A $\beta$  によってアポトーシス促進蛋白の 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<sup>11)</sup>。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されることを見出した。よって、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。

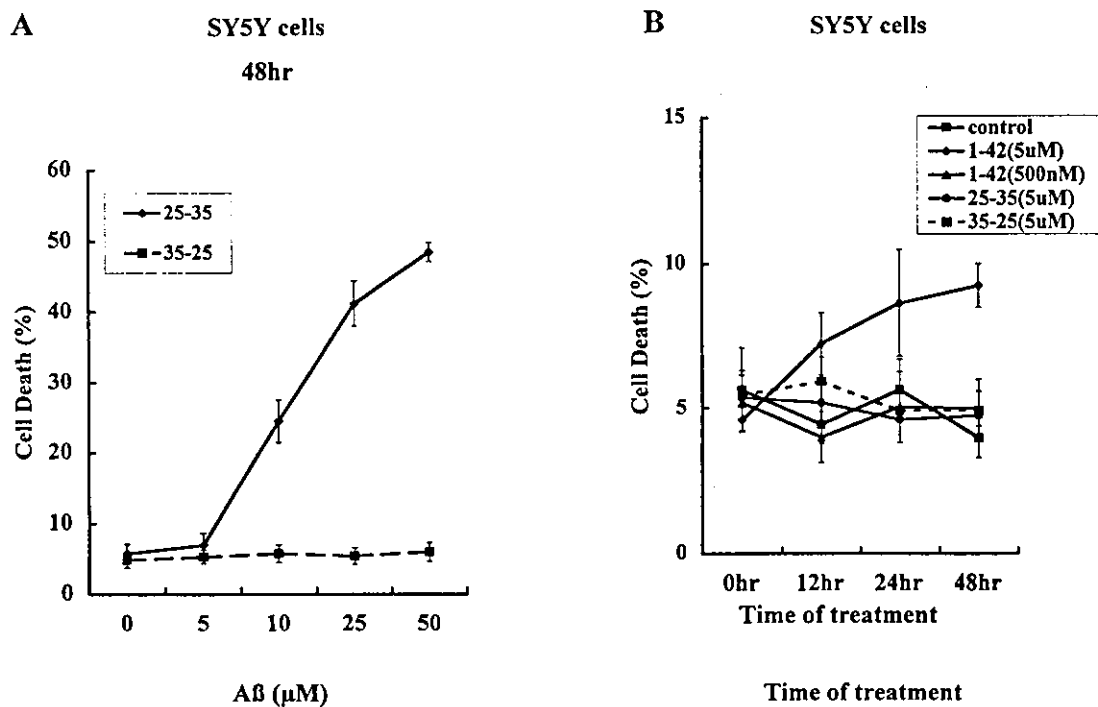
## 方 法

細胞培養に関しては、SY5Y 神経芽細胞腫は 5%ウシ胎児血清を含む D-MEM/F-12 培地にて培養し、293 細胞および COS7 細胞を 10%ウシ胎児血清を含む D-MEM 培地にて培養した。まず、SY5Y 神経芽細胞腫に対する A $\beta$  の細胞毒性を検討

するために、0  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M の A $\beta$ <sub>25-35</sub> (部分ペプチド) および A $\beta$ <sub>35-25</sub> (逆配列部分ペプチド) (Sigma-Aldrich 社) を培地に添加して、48 時間後の細胞死レベルを Live and Dead Assay (Molecular Probe 社) を用いて検討した。さらに、1 mM の A $\beta$ <sub>1-42</sub> (Sigma-Aldrich 社) を 37°C で 3 日間インキュベートしてフィブリル化 A $\beta$  を作成し (以下、使用された A $\beta$ <sub>1-42</sub> は全てフィブリル化 A $\beta$  である)、これを 500nM および 5  $\mu$ M の濃度で SY5Y 神経芽細胞腫の培地に添加し、0 時間、12 時間、24 時間、48 時間後の細胞死レベルを測定した。同様の時間経過で、5  $\mu$ M の A $\beta$ <sub>25-35</sub> および A $\beta$ <sub>35-25</sub> を添加した後の細胞死レベルを測定した。

次に、培養細胞に対する XIAP の発現の検討をおこなうため、5  $\mu$ M および 500nM の A $\beta$ <sub>25-35</sub>, 5  $\mu$ M の A $\beta$ <sub>35-25</sub>, 500nM A $\beta$ <sub>1-42</sub> の存在下にて SY5Y 神経芽細胞腫を培養し、0 時間、12 時間、24 時間、48 時間後の細胞を集めた。また、非神経系細胞における検討として 293 細胞および COS7 細胞にも、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 (100mM PIPES, pH6.8, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1mM EDTA, 1 mM EGTA, 25 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1mM PMSF, 5  $\mu$ g/ml aprotinin, 5  $\mu$ g/ml leupeptin, 0.1% Triton-X100) にて溶解し、その lysates を 200K  $\times$  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) および抗 actin 抗体 (Sigma-Aldrich 社) を用いたウエスタンブロットをおこなった。そして、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。

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。そして、0.5  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> および 5 nM 4-hydroxynonenal (HNE) (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 を用いて検討した。

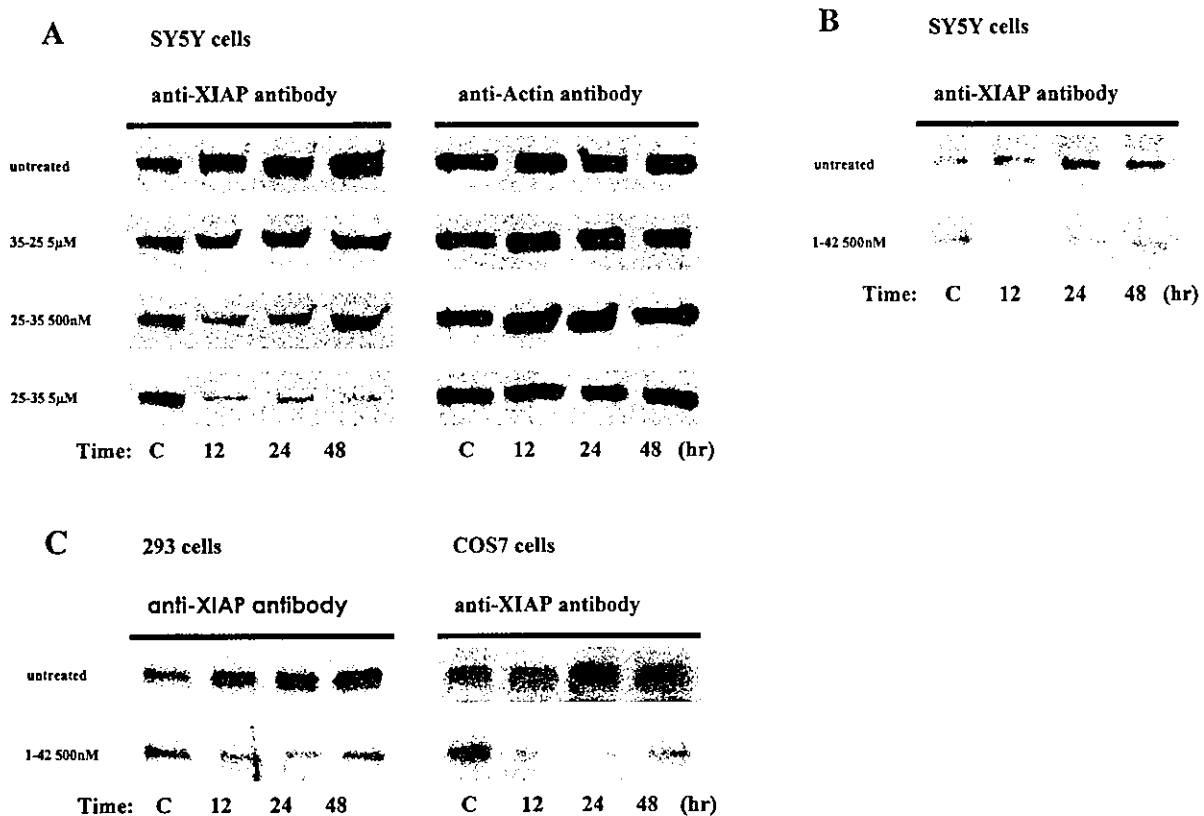


**Fig. 1** Cell death in SH-SY5Y cells treated with A $\beta$   
 (A) SH-SY5Y cells were exposed to A $\beta$  25-35 or A $\beta$  35-25 at various concentrations for 48hr. (B) SH-SY5Y cells were exposed to 5  $\mu$ M A $\beta$  25-35, 5  $\mu$ M and 500nM fibrillar A $\beta$  1-42, and 5  $\mu$ M A $\beta$  35-25 for 12hr, 24hr, and 48hr. Surviving and dead cells were visualized and counted using the Live/Dead Eukolight Viability/ Cytotoxicity kit. Data are expressed as percentage of dead cells of the total cells ( $n = 3, \pm$  SEM).

最後に、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、293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 (Gibco社)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の24時間後に、500nM A $\beta$  1-42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5nM 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。さらに、この細胞をバッファーで溶解し10K $\times$ Gで10分遠心した上清を集め、Caspase Colorimetric Protease Assay Kit (MBL社)を用いてDVED-pNAを発色基質として、caspase-3活性を測定した。

## 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 $\beta$  25-35とA $\beta$  35-25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、0  $\mu$ Mから5  $\mu$ Mまでの濃度のA $\beta$  25-35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 $\beta$  25-35では濃度依存的な細胞死の増加が観察された(Fig. 1A)。一方、A $\beta$  35-25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 $\beta$  25-35およびA $\beta$  35-25、そして5  $\mu$ Mと500 nMのフィブリル化A $\beta$  1-42を用いて48時間後までの経時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 $\beta$  1-42のみであった(Fig. 1B)。よって、以後実験に用いる5  $\mu$ Mおよび500 nMのA $\beta$  25-35および500nMのフィブリル化A $\beta$  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



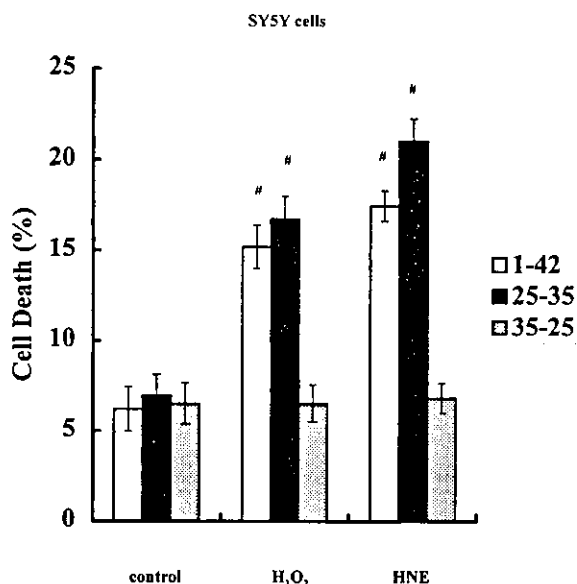
**Fig. 2** Western blot analysis showing expression of XIAP and actin after treatment with  $A\beta$ . (A) SH-SY5Y cells were treated with 500nM and 5  $\mu$ M  $A\beta$  25-35 and 5  $\mu$ M  $A\beta$  35-25 for the indicated number of hours. (B) SH-SY5Y cells were treated with 500nM fibrillar  $A\beta$  1-42 for the indicated number of hours. (C) HEK293 cells and COS7 cells were treated with 500nM fibrillar  $A\beta$  1-42 for the indicated number of hours.

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  $A\beta$  25-35 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 untreated の 48 時間後に比べて少なく、5  $\mu$ M の  $A\beta$  25-35 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 (Fig. 2A)。このような影響は逆配列部分ペプチドである  $A\beta$  35-25 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  $A\beta$  1-42 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  $A\beta$  25-35 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 (Fig. 2B)。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  $A\beta$  1-42 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 (Fig. 2C)。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  $A\beta$  25-35、5  $\mu$ M  $A\beta$  35-25、500nM  $A\beta$  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。 $A\beta$  35-25 を添加してあった細胞には、0.5  $\mu$ M  $H_2O_2$  を添加した場合も、



**Fig. 3** Susceptibility to oxidative stress in SH-SY5Y cells pretreated with A $\beta$  25-35 or fibrillar A $\beta$  1-42, but not the cells treated with A $\beta$  35-25

EthD-1 staining indicates increased cell death in cells pretreated with A $\beta$  25-35 (5  $\mu$ M) and fibrillar A $\beta$  1-42 (500nM) for 48hr and then submitted to low oxidative stress levels, using 0.5  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or 5nM HNE. In contrast, the cells treated with the control peptide A $\beta$  35-25 (5  $\mu$ M) do not show increased sensitivity to low levels of oxidative stress. Data represent an average of three experiments. (# : p < 0.05)

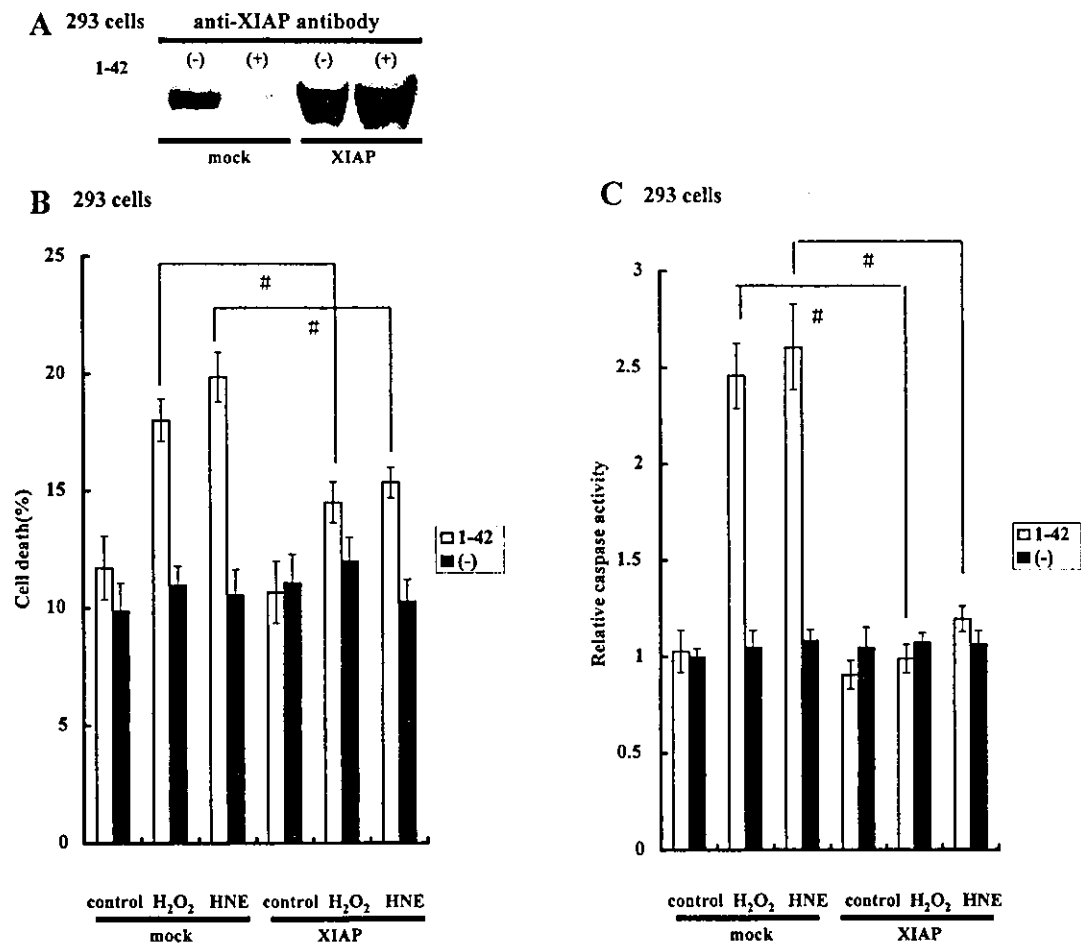
5 nM 4-hydroxynonenal を添加した場合も、3時間後の細胞死の増加は確認されなかった。しかし、5  $\mu$ M A $\beta$  25-35 または 500nM A $\beta$  1-42 を添加してあった細胞では酸化ストレスへの脆弱性が増加しており、酸化ストレスを誘導する物質をさらに添加しなければ細胞死は増加しないが、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の添加または 4-hydroxynonenal の添加によって、3時間後の細胞死の増加が確認された (Fig. 3)。そして、このような細胞死脆弱性を惹起する効果が XIAP の発現減少によるも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 $\beta$  1-42 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 $\beta$  1-42 の添加によってもその発現レベルに影響はなかった (Fig. 4A)。この 2 種類の細胞を用い、前述の実験と同様に 500nM A $\beta$  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 $\beta$  1-42 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. 4B)。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 (Fig. 4C)。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。

## 考 察

我々は今まで、神経細胞死とタウ蛋白異常リン酸化のメカニズムを GSK-3 およびストレス関連 MAP キナーゼとの関わりから詳細に検討してきた<sup>15)16)17)18)19)20)21)22)24)</sup>。また、細胞死過程におけるタウ蛋白のリン酸化メカニズムに関わり、かつタウ蛋白に結合する可能性のある重要な蛋白として XIAP を見出し、その検討もおこなってきた<sup>23)</sup>。今回の研究は、アポトーシス抑制機能を持つ XIAP の発現に関して、AD の病態過程におけるもう一つの重要分子である A $\beta$  の関与を検討した。

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<sup>16)9)10)</sup>。しかし、



**Fig. 4** XIAP attenuates vulnerability to oxidative stress

(A) The levels of XIAP expression in transfected cell lines were determined by Western blotting. In cells showing overexpression of XIAP, no change was observed after treatment with fibrillar A $\beta$  1-42 (500nM) for 48hr. (B) Susceptibility to oxidative stress in HEK293 cells pretreated with fibrillar A $\beta$  1-42 was attenuated by over-expression of XIAP. HEK293 cells were transfected with mock vector gene or XIAP gene and exposed to 0.5  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or 5nM HNE after treatment with fibrillar A $\beta$  1-42 (500nM) for 48hr. Surviving and dead cells were visualized and counted using the Live/Dead Eukolight Viability/ Cytotoxicity kit. Data are expressed as percentage of dead cells of the total cells (n = 3,  $\pm$  SEM). (C) Activation of caspase activity induced by oxidative stress after treatment with A $\beta$  was inhibited by over-expression of XIAP. Caspase activity was measured by observing the cleavage of colorimetric substrate for caspase-3and7, DEVD-pNA. Data are expressed as relative caspase activity to untreated cells transfected with mock vector gene (n = 3,  $\pm$  SEM). (# : p < 0.05)

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 $\beta$ によってアポトーシス促進蛋白の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<sup>10)</sup>。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。

ところで、XIAPの発現制御に関しては興味深いことが知られている。蛋白の産生に関しては、まずDNAからmRNAへの転写がおこなわれ、そのmRNAは5'末端が7メチルグアノシンによってキャップ構造化されてからリボソームにて蛋白質に翻訳されており、発現量の制御はこのような一連の過程の中でおこなわれている。しかし、XIAPの場合はInternal Ribosome Entry Site (IRES)という特殊な配列がXIAP mRNAの5'末端側にあることが知られている<sup>2)</sup>。通常mRNAの5'末端は7メチルグアノシンのキャップ構造を有しており、これがeIF4Eに結合することによってリボソームに結合され翻訳合成に向う。しかし、IRES構造を有するmRNAの場合はキャップ構造の有無に関らず直接リボソームに結合して翻訳合成に向う<sup>25)</sup>。5'末端が7メチルグアノシンによってキャップ構造化されたmRNAは、細胞にストレスが与えられた際にはeIF2 $\alpha$ のリン酸化などを通して翻訳抑制がかかるのだが、IRES構造を介して直接リボソームに結合するmRNAの場合はこの抑制がかからず、相対的に翻訳合成が増加する。今回の結果である低濃度のA $\beta$ によるXIAPの発現減少がこのIRES構造を介した翻訳制御に関っているかどうかは不明であるが、今後検討を要するものと考えられる。また、細胞内蛋白量を決定するもう一つの因子である分解機構も重要であると考えられる。XIAPはカルパインおよびプロテオソームによって分解されることが報告されているが、今回の結果を低濃度のA $\beta$ によるカルパインまたはプロテオソームの活性亢進によるXIAPの分解亢進と考えることも可能である。実際、A $\beta$ によるカルパインの活性化も最近報告されている<sup>2)</sup>。以上より、今後XIAP

の合成系と分解系に対するA $\beta$ の影響に関して、より詳しく解明する必要があると考えている。

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。予備実験における検討から、我々はリチウムがXIAPの発現を亢進させることも見出している。今後は、このようなXIAPの発現促進因子の発見およびその機序の解明もおこなう必要があると考えている。

#### 参 考 文 献

- 1) Behl C, Davis JB, Lesley R, Schubert D. Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. *Cell*, 1994 ; 77 : 817 - 27.
- 2) Boland B, Campbell V. Beta-Amyloid (1-40)-induced apoptosis of cultured cortical neurones involves calpain-mediated cleavage of poly-ADP-ribose polymerase. *Neurobiol Aging*, 2003 ; 24 : 179 - 86.
- 3) Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease : initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 1984 ; 120 : 885 - 90.
- 4) Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Quinlan M, Tung YC, Zaidi MS, Wisniewski HM. Microtubule-associated protein tau. *J Biol Chem*, 1986 ; 261 : 6084 - 9.
- 5) Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder L. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986 ; 83 : 4913 - 7.
- 6) Harris ME, Hensley K, Butterfield DA, Leedle RA, Carney JM. Direct evidence of oxidative injury produced by the Alzheimer's beta-amyloid peptide (1-40) in cultured hippocampal neurons. *Exp Neurol*, 1995 ; 131 : 193 - 202.
- 7) Holcik M, Gibson H, Korneluk RG. XIAP : apoptotic brake and promising therapeutic target. *Apoptosis*, 2001 ; 6 : 253 - 61.
- 8) Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Smith AJ, Georges L, Tung YC, Zaidi T. Identification of localization of tau peptide to paired helical filaments of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci*

- USA, 1989 ; 86 : 5646 - 50.
- 9) Loo DT, Copani A, Pike CJ, Whitemore ER, Walencewicz AJ, Cotman CW. Apoptosis is induced by beta-amyloid in cultured central nervous system neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993 ; 90 : 7951 - 5.
  - 10) Mattson MP, Cheng B, Davis D, Bryant K, Lieberburg I, Rydel RE. Beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *J Neurosci*, 1992 ; 12 : 376 - 89.
  - 11) Paradis E, Douillard H, Koutroumanis M, Goodyer C, LeBlanc A. Amyloid beta peptide of Alzheimer's disease downregulates Bcl-2 and upregulates bax expression in human neurons. *J Neurosci*, 1996 ; 16 : 7533 - 9.
  - 12) Smale G, Nichols NR, Brady DR, Finch CE, Horton JR WE. Evidence for Apoptotic Cell Death in Alzheimer's Disease. *Exp Neurol*, 1995 ; 133 : 225 - 30.
  - 13) Stadelmann C, Bruck W, Bancher C, Jellinger K, Lassmann H. Alzheimer disease : DNA fragmentation indicates neuronal vulnerability, but not apoptosis. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1998 ; 57 : 456 - 64.
  - 14) Suzuki Y, Nakabayashi Y, Nakata K, Reed JC, Takahashi R. X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) inhibits caspase-3 and -7 in distinct modes. *J Biol Chem*, 2001 ; 276 : 27058 - 63.
  - 15) 武田雅俊, 田中稔久, 工藤 喬, 中村 祐, 柏木雄次郎, 辻尾一郎. アルツハイマー病におけるリン酸化および細胞骨格蛋白異常に関する研究. *精神薬療基金研究年報*, 1998 ; 29 : 264 - 70.
  - 16) 武田雅俊, 田中稔久, 工藤 喬, 中村 祐, 柏木雄次郎, 車谷隆宏, 辻尾一郎, 森原剛史, 谷 向仁, 橋本亮太, 中野有香, 田上真次, 森 裕, 小池裕子. タウ蛋白リン酸化抑制機序によるアルツハイマー病治療薬開発の研究. *精神薬療基金研究年報*, 1999 ; 31 : 202 - 10.
  - 17) 武田雅俊, 田中稔久, 工藤 喬, 中村 祐, 柏木雄次郎, 辻尾一郎, 車谷隆宏, 橋本亮太, 谷 向仁, 中野有香, 田上真次, 森 裕, 小池裕子, 神野由華. 一次変性痴呆症治療のためのタウ蛋白重合・蓄積阻害剤についての研究. *精神薬療研究年報*, 2000 ; 32 : 33 - 40.
  - 18) Tanaka T, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Takeda M, Nishimura T. Dysregulation of phosphorylation system in Alzheimer's disease. *Annal Psychiat*, 1995 ; 5 : 65 - 79.
  - 19) Tanaka T, Iqbal K, Trenkner E, Liu DJ, Grundke-Iqbal I. Abnormally phosphorylated tau in SY5Y human neuroblastoma cells. *FEBS Lett*, 1995 ; 360 : 5 - 9.
  - 20) Tanaka T, Jun Z, Iqbal K, Trenkner E, Grundke-Iqbal I. The regulation of phosphorylation of tau in SY5Y neuroblastoma cells : The roles of protein phosphatases. *FEBS Lett*, 1998 ; 426 : 248 - 54.
  - 21) 田中稔久, 山森英長, 和田健二, 辻尾一郎, 工藤 喬, 中村 祐, 車谷隆宏, 田上真次, 森 裕, 小池裕子, 神野由華, 松本均彦, 瀬川優子, 福所英理子, 武田雅俊. 一次変性痴呆症治療のためのタウ蛋白重合阻害剤についての研究. *精神薬療研究年報*, 2001 ; 33 : 2 - 10.
  - 22) 田中稔久, 山森英長, 和田健二, 田中修二, 鈴木英鷹, 工藤 喬, 紙野晃人, 大河内正康, 谷井久志, 小池裕子, 安田由華, 貴田智之, 松本均彦, 福森亮雄, 武田雅俊. タウ蛋白重合蓄積への結合因子の関与とその阻害剤開発についての研究. *精神薬療研究年報*, 2002 ; 34 : 21 - 7.
  - 23) 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*, 2003 ; 35 : 63 - 73.
  - 24) Tsujio I, Tanaka T, Kudo T, Nishikawa T, Shinozaki K, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Takeda M. Inactivation of glycogen synthase kinase-3 by protein kinase C delta : implication for regulation of tau phosphorylation. *FEBS Lett*, 2000 ; 469 : 111 - 7.
  - 25) Vagner S, Galy B, Pyronnet S. Irresistible IRES. Attracting the translation machinery to internal ribosome entry sites. *EMBO Rep*, 2001 ; 2 : 893 - 8.
  - 26) Yang F, Sun X, Walter B, Teter B, Wu S, Sigel J, Vinters HV, Frautschy SA, Cole GM. Antibody to Caspase-cleaved actin defects apoptosis in differentiated neuroblastoma and plaque-associated neurons and microglia in Alzheimer's disease. *Amer J Pathol*, 1998 ; 152 : 379 - 89.

**ABSTRACT****Study on inhibitor of apoptosis protein in tau-dependent apoptosis and its expression affected by amyloid  $\beta$** 

Toshihisa Tanaka\*, Hidenaga Yamamori\*, Begum N. Nessa\*, Golam Md. Sadik\*, Kenji Wada\*\*, Kouzin Kamino\*, Takashi Kudo\*, Masayasu Okochi\*, Akio Fukumori\*, Daisuke Kanayama\*, Jang Jing Wei\*, Ryo Kimura\*, Masatoshi Takeda\*

\*Division of Psychiatry and Behavioral Science, Osaka University, Graduate School of Medicine, D3, 2-2, Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan. \*\*Division of Neurology, Faculty of Medicine, Tottori University, 86, Nishimachi, Yonago, Tottori 683-8504, Japan.

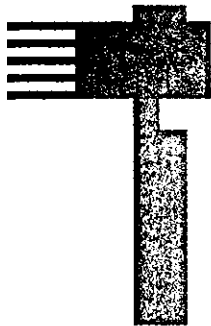
Abnormally hyperphosphorylated tau, the major protein component of neurofibrillary tangles, and amyloid  $\beta$  ( $A\beta$ ), the major component of senile plaques, are important characteristics of Alzheimer disease (AD). Previously, XIAP (X chromosome-linked inhibitor of apoptosis), one of intrinsic anti-apoptotic proteins, was found as a tau-binding protein. In this study effects of  $A\beta$  on expression of XIAP were investigated.  $A\beta$  has been shown to induce apoptosis in cultured neuronal cells. However, the concentration of  $A\beta$  that leads to neuronal cell death, is much higher than the concentration in cerebrospinal fluid, observed in normal controls or AD patients. Bax and Bcl-2 are factors involved in the process of apoptosis, and former is pro-apoptotic and later is anti-apoptotic. It was reported that subtoxic concentration of  $A\beta$  increases vulnerability to oxidative stress at least in part through increase in the expression ratio of Bax/Bcl-2. We report here that subtoxic concentration of  $A\beta$  can also downregulate the expression of XIAP and that vulnerability to oxidative stress caused by  $A\beta$  is attenuated by over-expression of XIAP. These results suggest that downregulation of XIAP expression in response to  $A\beta$  increases vulnerability to oxidative stress, and that XIAP might be involved in neurodegenerative process of AD.

(Ann. Rep. Mitsubishi Pharma Res. Found. 2004, 36 : 57 ~ 65)



# 痴呆

田中稔久, 武田雅俊



# 痴呆

田中 稔久, 武田 雅俊

## 痴呆の鑑別と分類

痴呆とは後天的に、脳の器質的な病変によって生じてくる、認知機能または精神機能の衰退・崩壊現象である。痴呆症状と類似の症状を来す疾患は数多くあり（表1）、基本的に非器質性のせん妄とうつ病との鑑別が大切である。痴呆を引き起こす病態にはさまざまなものが知られているが、臨床的には血管性痴呆と神経変性性痴呆とに大きく分けられる。

血管性痴呆とは血管の障害が原因となる痴呆であるが、これはさらに多発梗塞型痴呆とBinswanger病と呼ばれるものに分けら

れる。前者は脳実質の梗塞または小梗塞を特徴とし、後者は深部白質の広範なびまん性髄鞘脱落と萎縮とを特徴とする。

神経変性性痴呆とは、現在のところ詳しいメカニズムは不明であるが、神経そのものが傷害され、消失することによって痴呆となるものである。これはアルツハイマー型痴呆、レビー型痴呆、前頭側頭葉型痴呆などに分類され、最も多いものはアルツハイマー型痴呆である。

## 痴呆の臨床症状とその経過

アルツハイマー型痴呆の進行は規則的なパターンに当てはまることが多いのに対して、それ以外のものは規則性を欠く場合が多い。たとえば、血管性痴呆の場合においても記憶力障害、計算、全般的理解力などの低下が起こってくるが、血管障害の部位によって維持されている能力と障害された能力にばらつきがあり、いわゆる「まだら痴呆」の状態を呈している。

ここではアルツハイマー型痴呆を例に解説する。疾患の経過は、前期・中期・後期とほぼ3段階に分けることができるが、さらに疾患の前段階の状態を近年MCI（Mild Cognitive Impairment）と呼んで重要視するようになってきた。これは記憶障害の愁訴があり、標準化された記憶検査で平均より1.5SD以上下回る程度の記憶力低下を認めるが、日常生活活動および全般的な認知機能は正常であるものを指している。

アルツハイマー型痴呆の前期は、近時記憶

表1 痴呆症状あるいは類似の症状を来す疾患

- 神経変性疾患  
アルツハイマー型痴呆, レビー型痴呆, 前頭側頭葉型痴呆 (ピック病を含む), 皮質基底核変性症, FTDP-17, ハンチントン病, DRPLA, 脊髄小脳変性症
- 脳血管性疾患  
多発梗塞型痴呆, Binswanger病
- 感染性疾患  
進行麻痺, 脳炎, 髄膜炎, クロイツフェルト・ヤコブ病, エイズ脳症
- 内分泌・代謝性疾患  
甲状腺機能低下症, 副甲状腺機能異常症, クッシング症候群, アジソン病, ビタミンB<sub>1</sub>欠乏症, ベラグラ, ビタミンB<sub>12</sub>欠乏症
- 呼吸器性疾患  
CO<sub>2</sub>ナルコーシス
- 中毒性疾患  
アルコール中毒, 慢性一酸化炭素, 各種薬物
- その他  
正常圧水頭症, 骨髄腫, せん妄, うつ病

の障害が目立ってくる時期で、時間的な見当識障害や自発性の低下などを伴う。新しく体験したことや情報を記憶しておくことが難しくなる。病期と老化による生理的健忘との違いは、昨日や今日の当然覚えているはずと思われるような出来事を覚えているかどうか、約束した事柄を覚えているかどうかによって、おおむね判断できる。知人などの名前がすぐに想起できないだけであれば、おそらく生理的健忘の範疇である。この時期では、主に時間的な見当識障害のみが認められる。近時記憶に関しては、物品や単語を一度覚えてもらった後に別の試験をしてから再生させる遅延再生試験によって、また即時記憶の場合には数字列の復唱・逆唱によって簡易的に評価することができる。

中期は、近時記憶にとどまらず、自己および社会における古い情報に関する記憶（遠隔記憶）が障害される。また、時間のみならず場所に関する見当識障害も現れ、外出して家に帰ってくることができなくなったり、自宅にいても他人の家にいると思いつんだりする。さらに、判断力も低下し、日常の生活でも買い物・料理など判断を要する事柄から難しくなってくる。そして、着衣・摂食・排便など、きわめて基本的な事柄でも介護が必要になってくることがある。行動面では、多動および徘徊がみられたり、常同行為があったりする。そして、失語・失行・失認などの神経心理学的症状なども認められる。痴呆に伴う行動と心理の異常徴候であるBPSD (Behavioral and Psychiatric Symptoms of Dementia, 悲哀感やうつなどの気分障害、物盗られ妄想や不義妄想、人物誤認妄想といった思考の障害、暴言や暴力といった攻撃性、徘徊などの行動障害などが含まれている) が認められるのも主にこの時期である。これらの症状はできるだけ少量の向精神薬にてコントロールするような工夫が求められている。

後期に至ると記憶障害はさらに著しくな

り、自分の配偶者・両親・兄弟の名前も忘れていたりする。さらに人物に関する見当識障害も現れ、目の前の家族に対して「だれですか」と尋ねたりもする。また、着衣・摂食・排便など、きわめて基本的な事柄にも常時介護が必要となる。行動面では、多動・徘徊および常同行為も認められるが、障害が高度になるにつれて活動性も減少してそのような行為は減ってくる。しかし、同時に疎通性も減少してきて、意味不明の発語やしぐさを行ったりするのみとなる。そして、最終的には寝たきりとなり、嚥下障害なども起こりやすくなり、誤嚥性肺炎なども生じる。

## 痴呆の診断

痴呆の診断は、認知機能検査・脳画像検査・血液生化学検査によって、認知機能の低下の確認と認知機能低下をもたらし原因の評価によってなされる。痴呆以外の非器質性疾患としてまず鑑別すべき疾患（状態）として重要なのは、前述のようにせん妄およびうつ病である。診断基準としては、DSM-IV-TRによる血管性痴呆の診断基準（表2）、アルツハイマー型痴呆の診断基準（表3）などが知られている。

認知機能検査としては、スクリーニングに適するものとしてMini-Mental State Examination Test (MMSE) および改定長谷川式簡易知能評価スケール (HDS-R)、重症度の評価に適したものとしてN式精神機能検査 (Nishimura Dementia Scale) およびWechsler Adult Intelligence Scale-Revised (WAIS-R) などがある。アルツハイマー型痴呆に関しては、臨床経過をフォローするための経時的な指標として優れたAlzheimer's Disease Assessment Scale (ADAS) などがよく知られている。

脳画像検査としては、X線CT、MRI、ポジトロンCT (positron emission tomography ; PET)

表2 血管性痴呆の診断基準 (DSM-IV-TR)

- A. 多彩な認知欠損の発現で、それは以下の両方により明らかにされる
  - (1) 記憶障害 (新しい情報を学習したり、以前に学習した情報を想起する能力の障害)
  - (2) 以下の認知障害の1つ (またはそれ以上):
    - (a) 失語 (言語の障害)
    - (b) 失行 (運動機能が損なわれていないにもかかわらず動作を遂行する能力の障害)
    - (c) 失認 (感覚機能が損なわれていないにもかかわらず対象を認識または同定できないこと)
    - (d) 実行機能 (すなわち、計画を立てる、組織化する、順序立てる、抽象化する) の障害
- B. 基準A1およびA2の認知欠損は、そのおのおのが、社会的または職業的機能の著しい障害を引き起こし、病前の機能水準からの著しい低下を示す
- C. 局在性神経徴候や症状 (例: 深部腱反射の亢進、伸展性足底反射、偽性球麻痺、歩行異常、一肢の筋力低下)、または臨床検査の証拠がその障害に病因的関連を有すると判断される脳血管疾患 (例: 皮質や皮質下白質を含む多発性梗塞) を示す
- D. その欠損はせん妄の経過中にのみ現れるものではない

高橋三郎, ほか訳: DSM-IV-TR精神疾患の分類と診断の手引き, 医学書院, 2002.

表3 アルツハイマー型痴呆の診断基準 (DSM-IV-TR)

- A. 多彩な認知欠損の発現で、それは以下の両方により明らかにされる
  - (1) 記憶障害 (新しい情報を学習したり、以前に学習した情報を想起する能力の障害)
  - (2) 以下の認知障害の1つ (またはそれ以上):
    - (a) 失語 (言語の障害)
    - (b) 失行 (運動機能が損なわれていないにもかかわらず動作を遂行する能力の障害)
    - (c) 失認 (感覚機能が損なわれていないにもかかわらず対象を認識または同定できないこと)
    - (d) 実行機能 (すなわち、計画を立てる、組織化する、順序立てる、抽象化する) の障害
- B. 基準A1およびA2の認知欠損は、そのおのおのが、社会的または職業的機能の著しい障害を引き起こし、病前の機能水準からの著しい低下を示す
- C. 経過は、緩やかな発症と持続的な認知の低下により特徴づけられる
- D. 基準A1およびA2の認知欠損は、下記のいずれかによるものでもない
  - (1) 記憶や認知に進行性の欠損を引き起こす他の中枢神経系疾患 (例: 脳血管疾患、パーキンソン病、ハンチントン病、硬膜下血腫、正常圧水頭症、脳腫瘍)
  - (2) 痴呆を引き起こすことが知られている全身性疾患 (例: 甲状腺機能低下症、ビタミンB<sub>12</sub>または葉酸欠乏症、ニコチン酸欠乏症、高カルシウム血症、神経梅毒、HIV感染症)
  - (3) 物質誘発性の疾患
- E. その欠損はせん妄の経過中にのみ現れるものではない
- F. その障害は他の第1軸の疾患 (例: 大うつ病性障害、統合失調症) でうまく説明されない

高橋三郎, ほか訳: DSM-IV-TR精神疾患の分類と診断の手引き, 医学書院, 2002.

やシングルフォトンCT (single photon emission computed tomography; SPECT) が用いられる。アルツハイマー型痴呆のMRI画像の所見としては、まず海馬の萎縮がとらえられ、これは水平断では側脳室下角の拡大として描出される。脳室の拡大、大脳のびまん性萎縮、シルビウス裂の拡大も病期の進行とともに認められる。血管性痴呆の場合は、MRI画像において多発小梗塞が認められるか、T2強調

画像にて脳室周囲に広範な高信号域が認められる。

血液生化学検査および脳脊髄液 (Cerebrospinal Fluid; CSF) 検査は、主には他の全身性疾患を除外するために行われ、甲状腺機能とビタミンB群に関しては注意すべきといえる。CSF検査においては、脳炎などの除外が基本となる。また近年、CSF中のアミロイドβ蛋白およびタウ蛋白の定量が診断法として

確立されつつある。

## 治療

痴呆性疾患に対する治療は薬物療法と非薬物療法（心理・社会的生活のケア）とに分けられる。血管性痴呆に対する薬物療法としては、高血圧や糖尿病などの基礎疾患があればまずそれを治療することが大切であり、多発梗塞がある場合は再梗塞の予防として、血小板凝固阻害剤も用いられる。

アルツハイマー型痴呆に対する薬物療法としてはアセチルコリンエステラーゼ阻害薬（塩酸ドネペジル, rivastigmine, galantamine）がまず使用される。元来、アルツハイマー型痴呆における記憶力低下はマイネルト基底核から投射されるアセチルコリン作動系神経系が早期に脱落することが原因と考えられており、このためアセチルコリン量を増やすことは症状改善に関して直接効果があると考えられていた。これらのアセチルコリンエステラーゼ阻害薬はアルツハイマー型痴呆患者の認知機能を統計学的に有意に改善することがいくつも報告されているが、欠点は疾患の根本治療薬ではないというところにあり、服用開始時の認知機能を9か月から1年は維持することができるが、以後は徐々に機能が減衰していく。根治を含めた治療手段としては、アミロイド生成を阻害する $\beta$ セクレターゼ阻害剤および $\gamma$ セクレターゼ阻害剤、そしてこれもアミロイド生成阻害機序が関与すると報告された抗炎症剤療法、さらにアミロイド除去に有効な免疫療法などが研究上では話題となっているが、実用化はまだである。

認知機能低下以外の症状としてはBPSDが問題として挙げられるが、妄想、興奮、攻撃性などには抗精神病薬、抑うつ症状などに対しては抗うつ薬、躁状態に対しては気分安定

薬などが用いられる。基本的に薬量を少量から使用して、不必要な副作用を避けることがポイントとなる。

心理・社会的な意味で生活機能の改善を目指す治療法としては、回想療法、リアリティオリエンテーション、芸術療法などが知られている。回想療法とは、患者が自分の生きてきた道を振り返り整理することに対し受容的に共感することによって、情動の安定や意識の向上による残存機能の維持を目的としたものである。リアリティオリエンテーションは患者の見当識を補強するために、環境の改善・コミュニケーションの強化を主体とする方法である。

このような非薬物的な治療を含めて、痴呆患者へのサポートは通所サービスや施設でのサービスによって行われている。通所サービスは、通所介護（デイサービス）と通所リハビリテーション（デイケア）の2つに分類されている。通所介護とは、老人デイサービスセンターなどに通い、入浴・食事の提供、介護や生活等についての相談・助言、健康状態の確認等の日常生活の世話と機能訓練を受けるものである。通所リハビリテーションとは、介護老人保健施設や病院・診療所に通い、心身の機能の維持回復を図り、日常生活の自立を助けるための理学療法・作業療法等の必要なりハビリテーションを受けるものである。入所型施設には介護老人福祉施設（特別養護老人ホーム）、介護老人保健施設、介護療養型医療施設などがある。さらに、訪問介護（ホームヘルプサービス）もしばしば行われている。どのような痴呆に対してもその診断に基づいて、薬物療法および非薬物療法を含めた痴呆患者へのサポートとの適切なコンビネーションによって対応すべきであるが、そのためには社会的な資源の有効な活用も大切であり、2000年度から導入されている介護保険制度の十分な活用も重要な課題である。

## IV

さまざまな環境でみられる精神症状の理解と対応——症状から治療まで

# アルツハイマー病の 遺伝的危険因子

genetic risk factor in Alzheimer's disease

浦上 克哉\*・谷口 美也子\*・山形 薫\*\*  
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講座・環境保健学分野  
\*\*鳥取大学医学部附属脳幹性疾患研究施設・脳神経内科部門



浦上 克哉(うらかみ かつや)  
1983年鳥取大学医学部卒業。1988年鳥取大学医学部大学院博士課程修了。1988年鳥取大学医学部脳神経内科助手採用。1996年鳥取大学医学部脳神経内科講師。2001年鳥取大学医学部保健学科教授承認。現在に至る。  
研究テーマはアルツハイマー病及び関連疾患の原因、病態及び診断マーカーに関する研究、痴呆性疾患の治療及びケアに関する研究。

⇒Key Words:

アルツハイマー病, 酸化ストレス, 治療, 遺伝子多型

## ■ Abstract ■

アルツハイマー病(AD)は、現在65歳以上の約20人に1人の割合で存在するといわれるほど頻度の高いCommon diseaseである。孤発性アルツハイマー病(SAD)の遺伝的危険因子としてアポリポ蛋白E4 (アポE4) が報告されて以来、数多くの遺伝子が疾患関連遺伝子の候補として報告されている。しかし、アポE4以外は未だ共通の見解を得るには至っていない。現在ADの病因のひとつとして酸化ストレスが注目されている。ADに本邦でも塩酸ドネペジルが発売され、治療が可能となっている。しかし、本剤がどのような症例で有効か、あまり有効でないか、また有効性が得られない時いつまで投与すべきか等早急に明らかにすべき問題点がある。このような治療効果を予知できるような遺伝子多型が分かれば、臨床上大変有用である。これまで報告されている遺伝子多型に関する研究の紹介と我々のグループが検討した酸化ストレス関連の遺伝子多型及びADにおける塩酸ドネペジルへの反応性とアセチルコリン関連遺伝子多型との関連について述べた。

大多数を占めるSADの危険因子が未同定であり、アポE4以外の遺伝的危険因子の検討が必要である。本邦においてもミレニアムプロジェクトとして遺伝子多型の解析が進行中であり、今後、ADの原因究明や治療予知に役立つ遺伝子多型が発見されることが望まれる。

## ■ はじめに

アルツハイマー病(AD)は、現在65歳以上の約20人に1人の割合で存在するといわれるほど頻度の高い

Common diseaseである<sup>1,2)</sup>。孤発性アルツハイマー病(SAD)の遺伝的危険因子としてアポリポ蛋白E4 (アポE4) が報告されて以来、数多くの遺伝子が疾患関連遺伝子の候補として報告されている(表1)。しかし、アポE4以外は未だ共通の見解を得るには至っていない。現在ADの病因のひとつとして酸化ストレスが注目されている。ADに本邦でも塩酸ドネペジルが発売され、治療が可能となっている。しかし、本剤がどのような症例で有効か、あまり有効でないか、また有効性が得られない時いつまで投与すべきか等早急に明らかにすべき問題点がある<sup>3)</sup>。このような治療効果を予知できるような遺伝子多型が分かれば、臨床上大変有用である。以上のことから、本稿ではこれまでの遺伝子多型に関する研究の紹介と、そして次に我々のグループが検討した酸化ストレス関連の遺伝子多型及びADにおける塩酸ドネペジルへの反応性とアセチルコリン関連遺伝子多型との関連について述べる。

## ■ 1. プレセニリン(PS)遺伝子

PS-1遺伝子が、SADの発症に関与しているか否かは、重要な問題である。PS-1遺伝子の多型につ

■ Katsuya Urakami\*, Miyako Taniguchi\*, Kaoru Yamagata\*\*, Kenji Wada\*\*, Yosuke Wakutani\*\*, Kenji Nakashima\*\*

\*Section of Environment and Health Science, Department of Biological Regulation, School of Health Science, Faculty of Medicine, Tottori University

\*\*Department of Neurology Institute of Neurological Science, Faculty of Medicine, Tottori University

表1 これまでに報告されている候補遺伝子

アルツハイマー病の危険因子としての候補遺伝子		
遺伝子	報告者	報告年
Apolipoprotein E (ApoE)	Corder	1993
$\alpha$ 1-antichymotripsin (ACT)	Kamboh	1995
Very low density lipoprotein receptor (VLDL-R)	Okuizumi	1995
Presenilin1 (PS1)	Wragg	1996
Presenilin2 (PS2)	Brooks	1997
Estrogen receptor (ER)	Isoe	1997
Dihydrolipoyl succinyltransferase(DLST)	Sheu	1997
Apolipoprotein A-IV (ApoA-IV)	Csaszar	1997
Low density lipoprotein receptor related protein(LRP)	Kang	1997
Butyrylcholinesterase K variant (BCHE-K)	Lehmann	1997
$\alpha$ 2-macroglobulin ( $\alpha$ 2M)	Blacker	1998
Bleomycin hydrolase (BH)	Montoya	1998
Angiotensin-converting enzyme (ACE)	Kehoe	1999
Interleukin 6	Papassotiropoulos	2000
Interleukin 1 $\alpha$	Nicoll	2000
Fas receptor	Fenk	2000
5-HT transporter	Hu	2000
Cystatin C	Crawford	2000
Tumor necrosis factor- $\alpha$	McCusker	2001
$\alpha$ -synuclein	Matsubara	2001
Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)	Riemenschneider	2002
Fe65L2	Tanahashi	2002
Interleukin10	Lio	2003

いては、WraggらによりSADの危険因子となる可能性が報告された。筆者らも、日本人でPS-1遺伝子の多型を検討したが、アポE4を有さない晩発型SADでのみ有意に高値を示し、アポE4以外の危険因子である可能性を指摘したり。ただし、この結果については賛否両論別れており、アポE4に比較して関連が弱い可能性が考えられる。

PS-2の遺伝子多型については、1997年にBrooksらによりSADと関連するとの報告がなされた。しかし、欧米や本邦からの追試ではいずれも関連を否定するものであり、PS-2の遺伝子多型はSADの危険因子としての意義は否定的と思われる。

## ■ 2. $\alpha$ 2マクログロブリン( $\alpha$ 2M)遺伝子

PS1とPS2が発見された後、12番染色体に連鎖する晩期発症型FAD家系が存在することが報告された。連鎖解析では $\alpha$ 2Mが近傍に位置することは分

かっていたが原因遺伝子とする結果は得られていなかった。しかし、Tanziらのグループより $\alpha$ 2MとADが有意に関連するとの報告がなされ注目されたが、以後否定的な追試が欧米および本邦で多くなされている。現時点では、Tanziらのグループが報告した $\alpha$ 2Mのエクソン18の5' splice-siteのdeletion多型はADと関連していないと考えられる。しかし、 $\alpha$ 2Mは12番染色体上のlod scoreの高い位置に存在しており、それ以外の部位がADと関連する可能性も否定できないので、その他の部位についての検討も今後必要と思われる。

## ■ 3. エストロゲンレセプター $\alpha$ (ER $\alpha$ )遺伝子

ADは多くの疫学調査より女性に圧倒的に頻度が多いこと、閉経後女性の認知機能低下と関連すること、およびエストロゲン補充療法が有用であることなどの報告等により、AD発症にエスト

ロゲンが密接に関連している可能性が指摘されている。このような背景より、エストロゲンレセプター  $\alpha$ (ER $\alpha$ )遺伝子はADの有力な候補遺伝子と考えられる。そこで筆者らのグループは、既に骨粗鬆症で報告されているER $\alpha$ の遺伝子多型部位をADで検討してみた。その結果ER $\alpha$ の遺伝子多型がADと有意に関連するとの初めてのデータを得た<sup>5)</sup>。Maruyamaらは日本人と英国人を対象として同様の検討を行っているがER $\alpha$ の転写活性は約2倍増加しているが遺伝子多型とADの間に有意な関連を認めなかったと報告している。しかしその後、筆者らはさらに多数の日本人例で検討し我々の前回の結果を確認した<sup>6)</sup>。欧米でも、イタリア人、スウェーデン人とフィンランド人、イギリス人などを対象とした報告で我々の報告を支持する結果がなされており、ER $\alpha$ の多型はアポEに次ぐ危険因子である可能性が示唆される(表2)。今後その機序の解明が必要と思われる。

■ 4. Angiotensin-converting enzyme (ACE)遺伝子

ACE遺伝子多型は高血圧の領域でよく研究されており、ACEのdeletionを有するD/D型が高血圧患者で多いと報告されている。Kehoeらは、ADでACE遺伝子多型を検討し、逆にInsertionを持つI/I型がADに多いことを報告し注目されている。本邦でも、直ちにHuらが日本人を対象として同様の検討を行いKehoeらとよく一致した結果を報告している。ACE遺伝子変異はADにおける血管性要因のひとつと考えられる。今後の追試報告が期待される場所である。

■ 5. 酸化ストレス関連の遺伝子

ADの原因のひとつとして酸化ストレスの問題は以前より注目され、AD脳ではDNA酸化の増加と酸化グアニン修復能の低下が報告されてきた。これまでに報告されているADと酸化ストレス関連遺伝子多型の結果を表2にまとめた。残念ながらすべての報告で一致した見解が得られておらず、有力なものは未だ発見されていない。

表2 酸化ストレスに関連する遺伝子多型

NOS2 CCTTT	negative Xu et al Neuroreport 2000
NOS3 intron4 repeat	negative Alvarez et al JNNP 1999
exon7 Glu298Asp	positive Dahiyat et al Ann Neurol 1999
	negative Singelton et al Neurosci Lett 2001
	negative Guerra et al JNNP 2001
	negative Crawford et al Ann Neurol 2000
	negative Higuchi et al Ann Neurol 2000
DLST C19183T	positive Nakano et al Lancet 1997
	negative Matsushita et al Neurobiol Aging 2001
Transferrin C2 allele	positive Namekata et al Hum Genet 1997
	negative Hussain et al Neurosci Lett 2002
	negative Kim et al Neurosci Lett 2001
HFE H63D	positive Sampietro et al Neurobiol Aging 2001
	negative Candore et al Mech Ageing Dev 2003

NOS nitric oxide synthase  
DLST dihydrolipoyl succinyltransferase  
HFT hemochromatosis

そこで我々は、以下の理由から酸化ストレスの修復系に視点を向けてみた。AD脳でのDNA酸化について報告は多数なされてきているが、修復酵素に関する報告は少ない。AD脳は強い酸化ストレスにさらされているが、Reactive oxygen species産生だけでなく、抗酸化系、修復系の活性低下がDNA酸化(8-オキシグアニンの形成)に関与する可能性がある。8-オキシグアニンDNAグリコシダーゼ(OGG1)遺伝子エクソン7のC/G多型により、コドン326にセリンからシステインへ置換する変異があり、OGG1の活性低下をきたすことが知られている。最近AD脳でOGG1の蛋白レベルの発現が低下し、それが神経原線維変化と関連しているとする報告もなされている。そこで、著者らのグループはOGG1エクソン7のC/G多型とADとの関連をPCR-FLP法にて検討した<sup>7)</sup>。その結果、ADでは変異型であるGG型を有する頻度が高く(p<0.05)、その傾



向はアポE4を持つ群でより顕著であった ( $p < 0.039$ , 表3)。OGG1遺伝子のGG型とアポE4の組み合わせでオッズ比が5.56と有意に上昇した。これらの結果より、OGG1遺伝子のGG型はアポE4と協調して働きADの発症・進展に関与している可能性が示唆された。今後、人種差を越えて一致した結果が得られるかの更なる検討が必要である。

■ 6. Fe65L2遺伝子

Fe65L2はFe65蛋白ファミリーに属しており、アミロイドβ蛋白の産生に関与すると考えられている low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP) と結合する。田平らのグループはFe65L2の遺伝子多型を解析し、c954C→T多型がAD群と健常対照群の間で有意差がみられることを報告した<sup>9)</sup>。さらにアポE4アレルを考慮して検討したところ、このc954C→T多型は独立したリスクファクターであることも見出している。最近フランスのグループからも同様な報告がなされている<sup>9)</sup>。

■ 7. 治療の有効性に関連する遺伝子多型

これまでに、アポE4を有するか否かで塩酸ドネペジルへの感受性が異なるとする報告がなされたが、現在必ずしも一致した見解が得られていない。塩酸ドネペジルはアセチルコリンエステラーゼ (AChE)阻害剤であり、アセチルコリンを増加させ

て記憶を改善する効果がある。本剤は患者のAChE自体やアセチルコリンレセプター(AChR)の感受性の差異により薬剤の有効性が異なり、その感受性が遺伝子レベルで調節されている可能性が考えられる。そこで、まず塩酸ドネペジルのADへの効果を検討し、次いで薬剤への反応が良好な群 (responder)と反応が良好でない群(non-responder)に分けて、アセチルコリン関連遺伝子の多型性との関連を解析した<sup>3)</sup>。

7-1. AChE及びAChR遺伝子多型とADの関連

AChE遺伝子多型の対象はAD98例 (男24/女74, 平均年齢70.8才), 対照群101例 (男30/女71, 平均年齢69.7才), AChR遺伝子多型の対象はAD96例 (男31/女65, 平均年齢69.8才), 対照群99例 (男29/女70, 平均年齢69.1才)であった。AChE遺伝子多型は、エクソン2コドン322のCAC(His)からAAC(Asn)に置換するミスセンス変異を検討した。AChR遺伝子多型はα7のエクソン6のTGの2 base pair deletionの多型を検討した。患者ならびに家族に研究の目的・方法について十分な説明を行い同意が得られた後に、DNA用の血漿採血 (EDTA-2 Na入り)を行った。AChE及びAChR遺伝子多型をPCR-FRLP法にて解析した。DNAの抽出は、フェノールクロロホルム法にて行った。統計解析に

表3 OGG1遺伝子多型の結果  
結果1-2 アポリポ蛋白E遺伝子型別におけるOGG1遺伝子型とアリル分布

アポE ε3/ε3	コントロール (n=182)	p*	アルツハイマー (n=96)	アポE ε3/ε4	コントロール (n=51)	p*	アルツハイマー (n=89)
遺伝子型				遺伝子型			
Ser/Ser	61 (33.5%)	0.741	33 (34.3%)	Ser/Ser	15 (29.4%)	0.098	14 (15.7%)
Ser/Cys	78 (42.8%)		37 (38.5%)	Ser/Cys	26 (50.9%)		47 (52.8%)
Cys/Cys	43 (23.6%)		26 (27.0%)	Cys/Cys	10 (19.6%)		28 (31.4%)
アリル				アリル			
Ser	200 (54.9%)	0.769	103 (53.6%)	Ser	56 (54.9%)	0.039	75 (42.1%)
Cys	164 (45.0%)		89 (46.3%)	Cys	46 (45.0%)		103 (57.8%)

\*χ<sup>2</sup>検定によるp値

は、 $\chi^2$ 乗検定を用いた。AChE遺伝子のエクソン2コドン322のCAC(His)からAAC(Asn)に置換するミスセンス変異の多型は、AD、対照群共にすべての例がC/C型であり、ADとの有意な関連は認めなかった。AChR $\alpha$ 7遺伝子のエクソン6のTGの2 base pair deletionの多型は、ADで30例、対照群に24例のヘテロが存在したが、ADと対照群の間に有意差は認めなかった。

### 7-2. 塩酸ドネペジルの有効性とAChR遺伝子多型

AD患者43例を対象として塩酸ドネペジルへのresponderとnon-responderに分けて、AChR $\alpha$ 7遺伝子多型を解析した。薬剤の有効性の判定は、家族もしくは介護者の印象、主治医の印象、及び知的機能検査（長谷川式簡易知的機能検査、ほか）のいずれかにおいて改善と判断できたものをresponderとし、それ以外をnon-responderとした。患者ならびに家族に研究の目的・方法について十分な説明を行い同意が得られた後に、DNA用の血漿採血（EDTA-2Na入り）を行った。AChR遺伝子多型はPCR-FRLP法にて解析した。DNAの抽出は、フェノールクロロホルム法にて行った。統計解析には、 $\chi^2$ 乗検定を用いた。塩酸ドネペジルの有効性は、49%（21例）が改善、不変が35%（15例）、悪化が7%（3例）、中止が9%（4例）にみられた。著効例は改善例中の約20%程度にみられており、絵が描けるようになった著効例として既に文献報告<sup>10)</sup>した症例1（63才男性）は、現在も絵を描き続け以前はクレヨンを使っていたのが、絵の具を使って描くようになり、使う道具にも進歩がみられている。

その他、同文献で症例2として報告している例（73才女性）は、最近短歌が作れるようになり、また年賀状もすばらしい字で書かれている。さらに、キーボードが弾けるようになったり、卓球ができるようになった症例なども新たに経験している。Responderとnon-responderでの検討では、AChE遺伝子はヘテロの例もなかったため、ヘテロの例を有したAChR $\alpha$ 7の遺伝子多型との関連を検討した。そ

の結果、responder群にヘテロの頻度が統計学的に有意に多いことが分かった（ $p < 0.05$ 、表4）。

まず、塩酸ドネペジルの有効性についてであるが、我々の結果では49%（21例）が改善、不変が35%（15例）、悪化が7%（3例）にみられ、他の報告と極めて良く一致した結果であった。塩酸ドネペジルは根本的に直せる薬剤ではないが、2例に1例は何らかの改善があることが分かり、またこの改善例中の約20%に著効例も認めることから、是非試してみる価値のある薬剤と考えられる。副作用による中止は2例のみで、1例は食欲不振のため、もう1例は興奮・易怒性のためであり、重篤なものではなく安全性も高い薬剤と考えられる。有効性を判断するにあたって、単に知的面だけでなく機能維持の観点からも評価する必要があることが指摘されている。

AChE及びAChR遺伝子多型とADの関連については、まずAChE遺伝子のエクソン2コドン322のCAC(His)からAAC(Asn)に置換するミスセンス変異の多型は、われわれの今回検討したAD、対照群共にすべての例がC/C型（野生型）であり、ADとの有意な関連は認めなかった。欧米では、A/A型、C/A型を認めており、他の遺伝子でもしばしば経験していることではあるが日本人と欧米人での著しい人種差が存在すると思われる。AChR遺伝子多

表4 塩酸ドネペジルの有効性とAChR $\alpha$ 7遺伝子多型

	例数	遺伝子型		
		W/W	W/M	M/M
$\chi^2$ 乗検定				
良好群 $p < 0.05$ (改善)	21	10	11	0
不良群 (改善以外)	22	17	5	0

型は $\alpha 7$ のエクソン6のTGの2base pair deletionの多型は、ADで30例、対照群に24例のヘテロが存在したが、ADと対照群の間に有意差は認めなかった。Kawamataらが孤発性ADを対象としてAChR  $\alpha 7$ 遺伝子多型を検討しているが、われわれと同様に有意な関連を認めていない。しかし、AD群と対照群共にヘテロを認めたので、次のresponderとnon-responderに分けての検討を行った。その結果、responder群にヘテロの頻度が統計学的に有意に多いことが分かった。

このことより、塩酸ドネペジルのAD患者への有効性とAChR  $\alpha 7$ 遺伝子多型との関連が示唆された。正確な機序はまだ分からないが、AChR  $\alpha 7$ 遺伝子の2base pair deletionはフレームシフトを起こし、エクソン6にストップコドンを生じて、AChRの機能に影響する可能性が考えられる。例数がまだ少なく今後の検討が必要ではあるが、AChR  $\alpha 7$ 遺伝子多型の検査が塩酸ドネペジルの有効性の予知に役立つ可能性が示唆される。AChE及びAChR遺伝子多型とADとの関連については、両遺伝子共に今回検討した以外の部位に多型が存在する可能性があり、今後その他の部位の多型の解析も必要と思われる。Responderとnon-responderについての検討は、これまでにいくつかの報告がなされているが、responderとnon-responderの分け方が報告間で一致しておらず、十分な結論が出ていない。

今回われわれは例数が少ない関係上改善例をresponder、それ以外をnon-responderに分けて検討したが、これだけでは不十分と考えている。不変例も悪化していないという観点からは効果が見られている可能性もあり、また欧米では5mgで不変でも10mgへの増量で効果を認めた例（本邦では5mgしか認可されていない）もあり、安易な判断をしてはいけないと思われる。今後、例数を増やし種々の分類を試みた上で、真のresponderとnon-responderを区別できるパラメーターを明らかにする必要がある。

## ■ まとめ

大多数を占めるSADの危険因子が未同定であり、アポE以外の遺伝的危険因子の検討が必要である。本邦においてもミレニアムプロジェクトとして遺伝子多型の解析が進行中であり、今後の発展が期待される。

酸化ストレスについてはADの原因のひとつとして有力なものであるが、酸化ストレス関連遺伝子多型についてはまだ十分な検討がなされていない。治療の有効性を判定するための遺伝子多型として、AChR $\alpha 7$  遺伝子多型との間に有意な関連がある可能性を報告したが、今後の追試、多数例の検討が必要である。今後、ADの原因究明や治療予知に役立つ遺伝子多型が発見されることが望まれる。

## 文 献

- 1) 涌谷陽介, 石崎公郁子, 足立芳樹, ほか: 鳥取県大山町における2000年度痴呆性疾患疫学調査. *Dementia Japan*, 15: 140, 2001.
- 2) Urakami K, Adachi Y, Wakutani Y, *et al.*: Epidemiologic and genetic studies of dementia of the Alzheimer type in Japan. *Dement Geriatr Cogn Disord*, 9: 294-298, 1998.
- 3) 浦上克哉, 谷口美也子, 佐久間研司, ほか: アルツハイマー型痴呆の遺伝子多型と簡易スクリーニング法. *老年精神医学雑誌*, 13: 5-10, 2002.
- 4) Isoe K, Urakami K, *et al.*: Presenilin-1 polymorphism in patients with Alzheimer's disease, vascular dementia and alcohol-associated dementia in Japanese population. *Acta Neurol Scand*, 94: 326-328, 1996.
- 5) Isoe K, Ji Y, Urakami K, *et al.*: Genetic association of estrogen receptor gene polymorphisms with sporadic Alzheimer's disease. *Alzheimer's Res*, 3: 195-197, 1997.
- 6) Ji Y, Urakami K, Isoe K, *et al.*: Estrogen receptor gene polymorphisms in patients with Alzheimer's disease, vascular dementia and alcohol-associated dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord*, 11: 119-122, 2000.
- 7) 浦上克哉, 谷口美也子, 山形薫, ほか: 8-OH-dGTP DNA グリコシダーゼ(OGG1)遺伝子多型とアルツハイマー病との関連ならびに診断マーカーとしての有用性の検討. 厚生科学研究費補助金 21世紀型中核開拓推進研究事業 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13年度報告書, 15-20, 2002.
- 8) Tanahashi H, Asada T, Tabira T.:  $\epsilon 95R^*T$  polymorphism in Fe65L2 gene is associated with early-onset Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, 52: 691-693, 2002.
- 9) Cousin E, Hannequin D, Ricard S, *et al.*: A risk factor for early-onset Alzheimer's disease associated with the APBB1 gene (FE65) intron 13 polymorphism. *Neurosci Lett*, 342: 5-8, 2003.
- 10) 浦上克哉, 涌谷陽介, 中島健二.: アルツハイマー病における塩酸ドネペジル(アリセプト)の使用経験 総論の描けるようになった著効例の報告—新薬と臨床. 37: 1087-1091, 2000.

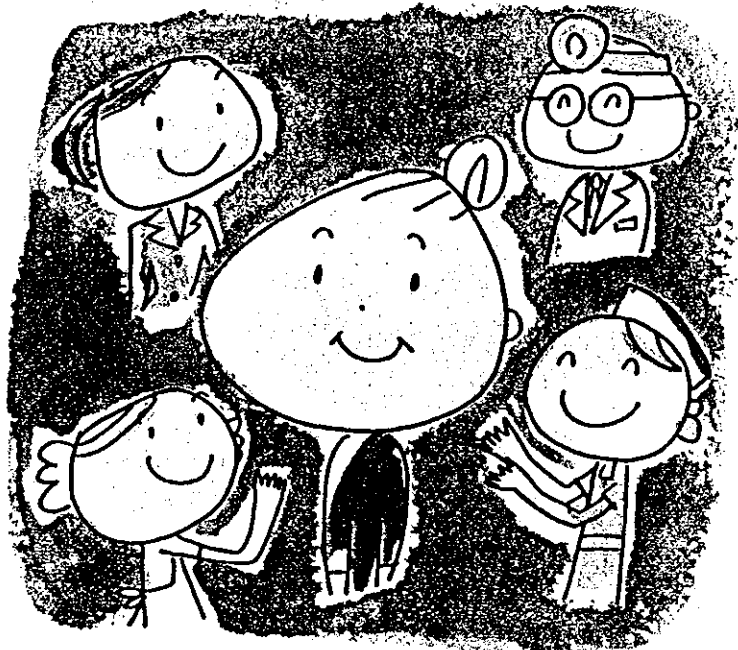
# 他疾患との鑑別・除外診断

鳥取大学医学部保健学科 生体制御学講座 環境保健分野教授  
浦上 克哉



<うらかみ かつや>

1956年岡山県生まれ。83年鳥取大学医学部卒業。88年同大医学部大学院博士課程修了。同大医学部脳神経内科助手、講師を経て、2001年から現職。アルツハイマー型痴呆および関連疾患の原因、病態、診断マーカーに関する研究を続けるとともに、臨床医として同大付属病院、倉吉市の病院などで一般診療を行う。第13回ノバルティス老化および老年医学研究基金、第9回日本認定内科専門医会研究奨励賞受賞。



痴呆の症状を呈する疾患はたくさんあり、アルツハイマー型痴呆であることを確認するためには、他疾患との鑑別診断をしなければなりません。痴呆性疾患では必ず出現する中核症状の理解を深めたくうえで、痴呆症が疑われた患者さんに対して、診察室でできるアルツハイマー型痴呆以外の疾患の診断についてお話しします。

## 痴呆の症状と間違われやすい、「せん妄」と「うつ病」

痴呆の症状と間違われやすい代表的な症状に、せん妄とうつ病があります。せん妄・うつ病は、診断さえできれば回復可能な状態であり、それぞれの特徴をとらえることでアルツハイマー型痴呆への診断につながります。

アルツハイマー型痴呆を診断する際、前回までにお話しした認知障害の有無が必須で、認知障害の検索と診断にあたっては、診断時に意識障害がないことが前提です。意識障害の有無は、多くの場合、呼びかけなどに対する応答の迅速性や表情から判断が可能です。応答が遅い、あるいは表情が

暗く、活気がないときなどには、せん妄を含む、意識障害やうつ病を考慮しなければなりません。痴呆であるかどうかを診断す

アルツハイマー型  
痴呆  
せん妄  
うつ病

