

200500359A

厚生労働科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

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17年度 総括研究報告書

主任研究者 武田 雅俊

平成18年(2006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. 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…………… 5
武田 雅俊
2. アルツハイマー病骨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…………… 13
浦上 克哉
4. アルツハイマー病生物学的診断マーカーの確立に関する臨床研究…………… 19
千葉 茂

III. 研究成果の刊行に関する一覧表…………… 25

IV. 研究成果の刊行物・別刷…………… 27

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 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。

まず、 γ セクレターゼ活性に関してはNotchシグナル伝達に伴うNotchの段階的蛋白分解によって産生される $N\beta$ の主な分子種は $N\beta 21$ と延長型 $N\beta 25$ であること、プレセニリンの病原性変異体やNSAIDなどの薬剤により $A\beta 42$ 産生量が増加すると、 $N\beta 25$ 産生量もそれと相関して変化することを明らかにした。

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、これに結合するXIAPの発現制御に関して検討をおこない、リチウムおよびGSK-3阻害剤はXIAPの発現を亢進させることを見いだした。

糖化産物に関しては、約75kDaのWGA（小麦胚芽凝集素, Wheat Germ Agglutinin）結合糖蛋白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、さらにこの糖蛋白はトランスフェリンであると同定した。さらに、ADの髄液中でのトランスフェリンのWGA結合量の減少は、トランスフェリンタンパク自体の減少ではなく、糖鎖の減少したトランスフェリンが増加していることが明らかとなった。さらに、この減少は血清中のトランスフェリンには見られなかった。

酸化ストレス産物に関しては、尿中8-hydroxydeoxyguanosineはAD群のみで、血清CoQ10酸化率はMCI群とAD群で、STASはMCI群、AD群およびFTD群で、対照群に比べて有意に変化していた。

キーワード：アルツハイマー病、 β 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。現時点で臨床上的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。

WGA・LCA(*Lens culinaris* agglutinin : レンズ豆凝集素)結合タンパクの検索は、WGA・LCA によるレクチンブロット法を用いて検討を行った。トランスフェリンの測定は、サンドイッチ ELISA (Bethyl Laboratories Inc.) 法を用いて測定した。トランスフェリンの糖鎖は、等電点電気泳動によって解析した。

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℃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

我々は Notch-1 受容体とそのリガンドが結合することを契機とした Notch-1 の段階的蛋白分解により、Aβ 類似の Notch-1 ペプチド (Notch-1 Aβ-like peptide; Nβ)が分泌されているかどうかを検討した。Notch-1 受容体とリガンドの一種である Jagged-1 が共存する際にのみ、細胞内 NICD の産生と Notch シグナルの

上昇が認められた。この時の培養上清中に SDS-PAGE 上で~6KDa と~3KDa にバンドが認められた。MALDI-TOF 型質量分析器と合成ペプチドを用いた解析で~6KDa のバンドは S2 を N 末とする 21 アミノ酸からなる Nβ 21 の homodimer であり、~3KDa のバンドは S2 を N 末とする 25 アミノ酸からなる延長型 Nβ 25 monomer であることがわかった。延長型 Nβ 25 の量は Nβ 21 の約 20%であった。この結果から延長型 Aβ 42 と Aβ 40 に相当する可能性が示唆された。

また、γセクレターゼ複合体を形成する中心的な分子であるプレセニンの病原性変異体の多くで Aβ 42 産生が上昇することがわかっている。我々は β APP と Notch 由来の基質および各種 PS 1 病原性変異体を発現する細胞を用いて Aβ 42 産生量と延長型 Nβ 25 産生量を検討した。その結果 Aβ 42 産生が増加するに従い、延長型 Nβ 25 産生量が増加し、それらの間には統計学的に有意な相関関係が認められた。Aβ 42 産生を増大させる効果が特に強い L166P 変異体発現細胞から分泌される Nβ の殆どは延長型 Nβ 25 であった。これらの結果より Aβ を切り出すプレセニンγセクレターゼによるγ切断と Nβ を切り出す S4 切断機構は共通している可能性が示された。

SY5Y 神経芽細胞腫に 2mM および 20 mM の塩化リチウムを添加したところ、時間とともに XIAP の発現量は増加した。この効果は濃度依存的であった。次に、同じ細胞に 5 μM の Aβ₂₅₋₃₅ を添加して 24 時間後の XIAP の発現は低下していたが、同時に 2mM の塩化リチウムを添加していた細胞では、逆に XIAP の発現は増加していた。さらに、GSK-3 阻害剤(10 μM の GSK-3 Inhibitor-I および -II)を添加して 3 時間後の XIAP の発現量を検討したところ、20 mM の塩化リチウムを添加した場合と同様に XIAP の発現は増加していた。最後に、SY5Y 神経芽細胞腫に 2mM の塩化リチウムを添加したものとそうでないものを 24 時間培養し、さまざまな細胞死ストレスを与えると、10 μM および 50 μM の過酸化水素の場合も、25 μM の Aβ₂₅₋₃₅ の場合も、細胞死レベルは減少していた。以上のことから、リチウムは XIAP の発現を亢進させること、その機序は GSK-3 の阻害であること、そしてリチウムによる neuroprotection のメカニズムの 1 つとしてアポトーシス阻害機能を有する XIAP の発現の亢進があることが示唆された。

髄液中のトランスフェリンは、AD(25 例) 22.78 ±

11.44 μ g/ml、AD 以外の認知症(44 例) 27.00 \pm つとしてアポトーシス阻害機能を有する XIAP の発現 8.70 μ g/ml、コントロール(26 例) 24.31 \pm 13.42 μ g/ml で、トランスフェリン濃度に AD で異常は見られなかった。そこで、トランスフェリンの糖鎖を、等電点電気泳動をもちいて分離し、検討した。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、ガラクトース、シアル酸を含む N-結合型複合糖鎖を 2 本持つ。糖鎖付加の最終段階で付加されるシアル酸の数によって、アイソフォームが分類されており、通常血清のトランスフェリンは、シアル酸を 4 つ持つ tetrasialotransferrin である。髄液中では、0~4 つのシアル酸を持つトランスフェリンすべてが存在しているが、AD では、糖鎖の少ない 1~3 つのトランスフェリンの割合が、増加していることが分かった。

次に、血清中でのトランスフェリンを、髄液同様に濃度と糖鎖について検討した。血清中のトランスフェリン濃度は、コントロール(15 例) 2.61 \pm 0.71mg/ml、AD(15 例) 3.21 \pm 1.21mg/ml で、髄液同様に有意な差はみられなかった。等電点電気泳動で糖鎖を解析したが、糖鎖に関しても AD 群とコントロール群において明らかな有意差は見られなかった。

これらのことより、トランスフェリンの糖鎖は、今までリン酸化タウだけでは困難であったタウオパチーと AD との鑑別できる可能性があり、臨床として有用性があると考えられ、AD の診断に貢献できることが示された。血液マーカーとしては、現在のところ髄液のような有意差は見られていないが、今後多数例における検討の必要がある。

尿中 8-OHdG は、対照群、MCI 群、AD 群、FTD 群の順に、7.9(4.2)、9.3(5.2)、12.3(7.4)、9.8(6.4) ng/ml、[平均(標準偏差)]であり、対照群に比較して AD 群のみで有意に高値であったが ($p < 0.01$)。

血清 CoQ10 酸化率は、対照群、MCI 群、AD 群、FTD 群の順に、4.8(0.9)、7.8(2.4)、7.9(2.3)、5.1(1.1) [平均(標準偏差)]であり、対照群に比較して MCI 群 ($p < 0.03$) あるいは AD 群 ($p < 0.02$) で有意に高値であった。

STAS は、対照群、MCI 群、AD 群、FTD 群の順に、1398(129)、1223(167)、1124(101)、1220(124) μ M [平均(標準偏差)]であり、対照群に比較して MCI 群 ($p < 0.002$)、AD 群 ($p < 0.0001$) あるいは FTD 群 ($p < 0.02$) で有意に低値であった。なお、STAS では MCI 群と AD 群の間でも有意差が認められた ($p < 0.03$)。また、

尿中 8-OHdG、血清 CoQ10 酸化率、および STAS のいずれにおいても、MCI 群あるいは AD 群と FTD 群との間に有意差は認められなかった。

AD および関連疾患の剖検脳における検討から、酸化的傷害は AD 型の変性過程において早期段階の普遍的な変化であることが示唆されている。したがって、OS マーカーは、AD 早期診断マーカーとして重要な候補の 1 つであると考えられる。平成 15 年度までの検討によって、AD 患者の尿および血清において OS 強度の増加や OS に対する防御能力の低下が認められ、AD 患者では尿や血清を用いて OS の増加が検出されることが明らかになっている。AD の前段階と考えられる MCI において、OS 強度の指標である血清 CoQ10 酸化率の増加や OS に対する防御能力の指標である STAS の低下が認められたことから、これらの血清 OS マーカーが AD の早期診断に有用である可能性が示唆された。また、STAS は FTD でも対照群に比べて変化していたが、OS マーカーの疾患特異性については、今後さらに種々の認知症疾患を対象に多数例を用いた検討が必要である。

D. 結論

γセクレターゼ活性に関しては Notch シグナル伝達に伴う Notch の段階的蛋白分解によって産生される N β の主な分子種は N β 21 と延長型 N β 25 であること、プレセニリンの病原性変異体や NSAID などの薬剤により A β 42 産生量が変化すると、N β 25 産生量もそれと相関して変化することを明らかにした。

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、これに結合する XIAP の発現制御に関して検討をおこない、リチウムおよび GSK-3 阻害剤は XIAP の発現を亢進させることを見いだした。

糖化産物に関しては、約 75kDa の WGA (小麦胚芽凝集素, Wheat Germ Agglutinin) 結合糖蛋白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、さらにこの糖蛋白はトランスフェリンであると同定した。さらに、AD の髄液中でのトランスフェリンの WGA 結合量の減少は、トランスフェリンタンパク自体の減少ではなく、糖鎖の減少したトランスフェリンが増加していることが明らかとなった。さらに、この減少は血清中のトランスフェリンには見られなかった。

酸化ストレス産物に関しては、尿中 8-hydroxydeoxyguanosine は AD 群のみで、血清 CoQ10

酸化率はMCI群とAD群で、STASはMCI群、AD群およびFTD群で、対照群に比べて有意に変化していた。

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, Jiang J, Itoh N, Kimura R, Steiner H, Haass C, Tagami S, Takeda M
Secretion of the Notch-1 A β -like peptide during Notch signaling J Biol Chem. 2006 Epub
2. Fukumori A, Okochi M, Tagami S, Jiang J, Itoh N, Nakayama T, Yanagida K, Ishizuka-Katsura Y, Morihara T, Kamino K, Tanaka T, Kudo T, Tanii H, Ikuta A, Haass C, Takeda M
Presenilin-dependent γ -secretase on plasma membrane and endosomes is functionally distinct BIOCHEMISTRY 2006 in press
3. Sato N, Okochi M, Taniyama Y, Kurinami H, Shimamura M, Takeuchi D, Hamada H, Fukumori A, Kiyosue K, Taguchi T, Tanaka T, Miyasaka M, Takeda M, Ogihara T, Morishita R
Development of new screening system for Alzheimer disease, in vitro A β sink assay, to identify the dissociation of soluble A β from fibrils Neurobiology of Disease. 2006 Epub
4. Yamasaki A, Eimer S, Okochi M, Smialowska A, Kaether C, Baumeister R, Haass C, Steiner H
The protease active site domain of γ -secretase contributes to substrate identification J Neuroscience 2006 in press
5. Nakajima T, Takauchi S, Ohara K, Kokai M, Nishii R, Maeda S, Takanaga A, Tanaka T, Takeda M, Seki M, Morita Y.
Alpha-synuclein-positive structures induced in leupeptin-infused rats. Brain Res. 1040; 73-80, 2005
6. Tanaka, T Multiple pathogenesis of frontotemporal dementia. Psychogeriatrics 5; 15-17, 2005
7. Urakami K, Arai H, Itoh N, Ishiguro K, Oono H, Taniguchi M, Wada-Isoe K, Wakutani Y, Kuzuhara S, Sasaki H, Nakashima K, Imahori K: Cerebrospinal fluid phosphorylated tau

protein at serin199 is a useful diagnostic biomarker in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. Recent Progress In Alzheimer's And Parkinson's Diseases 177-182, 2005.

8. Urakami K, Taniguchi M, Inoue M, Wada-Isoe K, Wakutani Y, Nakashima K: Studies on diagnostic markers Alzheimer's disease. Psychogeriatrics 5 (3): 99-102, 2005.
9. Inoue M, Urakami K, Taniguchi M, Kimura Y, Saito J, Nakashima K: Evaluation of computerized test system to screen for mild cognitive impairment. PSYCHOGERIATRICS 5(2): 36-41, 2005.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

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

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

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：）アルツハイマー病新規診断マーカーに関する研究

分担研究者 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 田上真次 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

アルツハイマー病を発症した時点では、既に脳内に凝集した A β 、中でも A β 42 を主たる構成要素とする老人斑が認められる。家族性アルツハイマー病ではこの A β 42 産生が上昇することがわかっている。この病原性物質である A β 42 の産生量を推定できれば有望な早期診断マーカーとなる。しかしながらその非常に凝集しやすい性質のため A β そのものをアルツハイマー病の診断マーカーとして使うことは難しい。我々はプレセニリン γ セクレターゼによる Notch や CD44 の膜内蛋白分解の詳細は β APP のそれと非常によく似ていることを発見した。そこでそれらの基質から切り出される A β 様ペプチドを診断マーカーとして利用する方法を提唱してきた。本年度はそれらの A β 様ペプチドのうち N β について詳細に検討し、(i)Notch シグナル伝達に伴う Notch の段階的蛋白分解によって産生される N β の主な分子種は N β 21 と延長型 N β 25 であること、(ii)プレセニリンの病原性変異体や NSAID などの薬剤により A β 42 産生量が増加すると、N β 25 産生量もそれと相関して増加することを明らかにした。これらの結果より、延長型 N β 量を測定することで A β 42 産生量を推定できる可能性を提示した。

A. 研究目的

アルツハイマー病を発症した時点では、既に脳内に凝集した A β 、中でも A β 42 を主たる構成要素とする老人斑が認められる。シナプスの可塑性・機能も低下しており、不可逆的な神経細胞死もある程度進行していると考えられる。したがって、病理過程を阻害する目的で有用な治療薬が開発されたとしても、症状の根本的かつ劇的な改善が得られる可能性は低いと考えられる。ところが、現在開発中の診断マーカーは、概して発症後の状態評価をターゲットとしている。我々が目標とするのは、発症前または無症候期を識別できる診断マーカーを開発することである。つまり予期診断が可能となって初めて、不可逆的な神経細胞障害が起こる前に治療を行うことが可能になると考える。プレセニリン γ セクレターゼによる β APP からの A β 42 産生活性を推定することが最も理想的であるが、その極めて凝集しやすい性質のため、実際にこれを診断マーカーとして用いることは困難である。我々はプレセニリン γ セクレターゼの他の基質である Notch-1 蛋白や CD44 からも、A β 様ペプチドが分泌されることを発見した。これら A β 様ペプチドがプレセニリン γ セクレターゼにより切り出さ

れる機構と A β が切り出される機構が類似していれば、A β 様ペプチドを診断マーカーとして用いることができる可能性がある。

Notch-1 は蛋白タイプ 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。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 β APP の γ 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、A β 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Flag-tagged NEXTから新規ペプチド (Notch β -peptide; N β)が細胞外に分泌されることを明らかにした。そして、Flag-N β 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 β 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 β 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/ β APP)の同じような部位 (S4/ γ 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)を及ぼす可能性を提示した。

上記のような前年までの研究結果を応用して、本年度は実際の Notch シグナル伝達において N β ペプチドが分泌されるかどうか、およびその正確な分子種の同定を行った。さらに γ 切断の正確さに影響を及ぼすプレセニリンの病原性突然変異体や NSAIDs などの薬剤が S4 切断にどのような影響を及ぼすかを詳細に検討し、N β を例に A β 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、野生型、家族性アルツハイマー型プレセニリン1および β 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 およびそ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で検討した。RI ラベルした細胞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。Notch シグナル強度は HES-1 プロモーターの下流にルシフェラーゼをコードしたベクターと PRL-TK をコードしたベクターを共発現させた細胞を用いて測定した (dual luciferase assay)。A β を切り出す γ 切断なら

びに N β を切り出す S4 切断の正確さを変化させる薬剤として既存の NSAIDs および新規薬剤(Compound W)を用いた。Compound W は NSAID のうち γ セクレターゼ修飾作用が報告されている薬剤とそれがないとされている薬剤の構造を比較検討し、新たに作製した化合物の中から活性を持つものとして選択された薬剤である。

C. 研究結果

Notch シグナル伝達の過程でアルツハイマー病アミロイド β 蛋白様ペプチドの一つ; N β が細胞外に分泌される。

我々はNotch-1 受容体とそのリガンドが結合することを契機とした Notch-1 の段階的蛋白分解により、A β 類似の Notch-1 ペプチド (Notch-1 A β -like peptide; N β)が分泌されているかどうかを検討した。Notch-1 受容体とリガンドの一種である Jagged-1 が共存する際にのみ、細胞内 NICD の産生と Notch シグナルの上昇が認められた。この時の培養上清中に SDS-PAGE 上で~6KDa と~3KDa にバンドが認められた。MALDI-TOF 型質量分析器と合成ペプチドを用いた解析で~6KDa のバンドは S2 を N 末とする 21 アミノ酸からなる N β 21 の homodimer であり、~3KDa のバンドは S2 を N 末とする 25 アミノ酸からなる延長型 N β 25 monomer であることがわかった。延長型 N β 25 の量は N β 21 の約 20%であった。この結果から延長型 A β 42 と A β 40 に相当する可能性が示唆された。

家族性アルツハイマー型プレセニリン病原性変異体の効果により延長型 A β 42 産生が上昇する際、延長型 N β 25 産生量も上昇する。

γ セクレターゼ複合体を形成する中心的な分子であるプレセニリンの病原性変異体の多くで A β 42 産生が上昇することがわかっている。我々は β APP と Notch 由来の基質および各種 PS 1 病原性変異体を発現する細胞を用いて A β 42 産生量と延長型 N β 25 産生量を検討した。その結果 A β 42 産生が増加するに従い、延長型 N β 25 産生量が増加し、それらの間には統計学的に有意な相関関係が認められた。A β 42 産生を増大させる効果が特に強い L166P 変異体発現細胞から分泌される N β の殆どは延長型 N β 25 であった。これらの結果より A β を切り出すプレセニリン γ セクレターゼによる γ 切断と N β を切り出す S4 切断機構は共通している可能性が示された。

N β の産生量と A β 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する。

NSAIDの一部には延長型 A β 42 産生量を選択的に減少させたり逆に上昇させる活性があることがわかっている。またこれらの薬剤は Notch の S3 切断により産生される発生上の重要な転写因子である NICD 産生量は変化させないと報告されている。従って NSAID の作用点は基質である β APP である可能性が示唆されている。我々は各種 NSAID ならびに新たに開発した Compound W が A β 42 産生を変化させる際、N β 分泌量がどのように変化するかを検討した。その結果 A β 42 分泌量は N β 25 分泌量とほぼ相関することが明らかになった。このことから N β 25 分泌量は病原性因子である A β 42 産生量を正確に反映することが示唆された。さらに NSAID の作用点は基質の一つである β APP ではなく、酵素であるプレセニリン γ セクレターゼである可能性が示された。

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

A β 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 β 25 などの A β 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 β 42 産生量を推定できると考えられる。

D. 考察

我々は Notch からの N β ペプチドに加えて CD44 からも CD44 ペプチド(CD44 A β -like peptide; CD44 β)が細胞外に分泌されることを明らかにした。これらの事実から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する。

RIP シグナル伝達のメカニズムを考えるとこのような A β 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。

末梢や CSF 中の A β の代わりに N β あるいは N β 25/21 を測定することにより、今まで不明であった SAD 患者脳内 γ -secretase 活性あるいは A β 42/40 比率の増大を正確に推定できる可能性を示した。AD を

引き起こす脳内 A β 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測できる可能性がある。

E. 結論

プレセニリン γ セクレターゼによる Notch の膜内蛋白分解の詳細は β 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 β 様ペプチドが分泌されている。それらの A β 様ペプチドのうち N β について詳細に検討したところ、 β APP と Notch-1 の切断 γ セクレターゼによる切断は基質間で極めて類似していることが明らかになった。我々の発見した N β などの A β 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した。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

論文発表

Secretion of the Notch-1 A β -like peptide during Notch signaling

Okochi M, Fukumori A, Jiang J, Itoh N, Kimura R, Steiner H, Haass C, Tagami S, Takeda M
J Biol Chem. 2006 Epub

Presenilin-dependent γ -secretase on plasma membrane and endosomes is functionally distinct
Fukumori A, Okochi M, Tagami S, Jiang J, Itoh N, Nakayama T, Yanagida K, Ishizuka-Katsura Y, Morihara T, Kamino K, Tanaka T, Kudo T, Tanii H, Ikuta A, Haass C, Takeda M
BIOCHEMISTRY 2006 in press

Development of new screening system for Alzheimer disease, in vitro A β sink assay, to identify the dissociation of soluble A β from fibrils

Sato N, Okochi M, Taniyama Y, Kurinami H, Shimamura M, Takeuchi D, Hamada H, Fukumori A, Kiyosue K, Taguchi T, Tanaka T, Miyasaka M, Takeda M, Ogihara T, Morishita R
Neurobiology of Disease. 2006 Epub

The protease active site domain of γ -secretase contributes to substrate identification

Yamasaki A, Eimer S, Okochi M, Smialowska A, Kaether C, Baumeister R, Haass C, Steiner H
J Neuroscience 2006 in press

The S3 cleavage site of Notch-1 by presenilin/ γ -secretase has a diversity.

Tagami, S., Okochi, M., Fukumori, A., Ito, N., Jiang, J., Ikuta, A., Takeda, M.
神経化学, 44, p204, 2005

The physiological meaning that BACE cleaves amyloid beta.

Tagami, S., Okochi, M., Fukumori, A., Jiang, J., Kudo, T., Takeda, M.

Joint meeting of the 27th annual meeting of JSBP and the 35th annual meeting of JSNP, p206, 2005

プレセニリン依存性膜内蛋白分解による Notch-1 の S3 切断には多様性が存在する。

Tagami, S., Okochi, M., Fukumori, A., Ito, N., Jiang, J., Ikuta, A., Kudo, T., Takeda, M.

Dementia Japan, 19, p133, 2005

γ セクレターゼと Notch シグナル

大河内正康, 田上真次, 武田雅俊.Molecular Medicine
2005; 42: 790-798

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：アルツハイマー病髄液マーカーの確立に関する研究)

分担研究者 田中稔久 大阪大学大学院医学系研究科・精神医学
分担研究協力者 Golam Sadik 大阪大学大学院医学系研究科・精神医学
分担研究協力者 Begum Nurun Nessa 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。今回我々は、XIAP がタウ蛋白に結合して影響をあたえることに注目して XIAP の発現制御に関して検討をおこない、リチウムおよび GSK-3 阻害剤は XIAP の発現を亢進させることを見いだした。このことは、リチウムによる neuroprotection のメカニズムの1つとして、アポトーシス阻害機能を有する XIAP の発現の亢進があることを示唆された。以上のことより、XIAP とタウ蛋白はともに、神経細胞死の機序を理解するうえで重要であり、特にタウ蛋白はバイオマーカーとして有用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。現時点で臨床上的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。そし
て前年度は、A β によってXIAPの発現が抑制される
ことを報告した。そこで、今年度は、XIAPの発現を
逆に促進する因子を検討した。

リチウムは臨床的には主に躁病に用いられる薬剤
であるが、タウ蛋白をリン酸化する酵素の1つである
グリコーゲンシンターゼキナーゼ-3 (Glycogen
Synthase Kinase-3 (GSK-3))の阻害機能があること
が判明し、タウ蛋白のリン酸化制御の側面からも研究
がおこなわれている。また、neuroprotectionの作用
があることも知られ、そのメカニズムとしては
Protein Kinase B (PKB)の活性化やBcl-2の発現促進
なども報告されている。今回我々はリチウムによる
XIAPの発現の影響を検討し、リチウムおよびGSK-3
阻害剤はXIAPの発現を亢進させることを見いだした。
このことは、リチウムによるneuroprotectionのメカ
ニズムの1つとして、アポトーシス阻害機能を有する
XIAPの発現の亢進があることが示唆された。

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、2mMおよび20 mM
の塩化リチウムを添加し24時間まで経過を迫った後、
細胞を集めた。また、前年度5 μ MのA β ₂₅₋₃₅によっ
て、XIAPの発現が低下することを確認しているの
で、リチウムがそれにどのような影響を与えるかを見
るために、SY5Y神経芽細胞腫に5 μ M A β ₂₅₋₃₅および5
 μ M A β ₂₅₋₃₅と2mM塩化リチウムを添加して24時間
後、細胞を集めた。さらに、リチウムの作用機序を検
討するために、市販のGSK-3阻害剤(10 μ Mの
GSK-3 Inhibitor-I および -II (Calbiochem社)を添
加して3時間後に細胞を集めた。集めた細胞はバッ
ファー(100 mM PIPES、pH6.8、2 mM MgCl₂、0.1
mM EDTA、1 mM EGTA、25 mM NaF、1 mM
Na₃VO₄、1 mM PMSF、5 μ g/ml aprotinin、5
 μ g/ml leupeptin、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 μ 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)を用いたウェスタンブロットをおこない
XIAPの発現を検討した。

そして、リチウムのneuroprotectionの効果を確認
するために、SY5Y神経芽細胞腫に2mMの塩化リチ
ウムを添加して24時間培養したものとそうでないも
のを用意し、これにさまざまな細胞死ストレス(10 μ
Mおよび50 μ Mの過酸化水素、25 μ MのA β ₂₅₋₃₅)
を添加した。そして24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

C. 研究結果

SY5Y神経芽細胞腫に2mMおよび20 mMの塩化
リチウムを添加したところ、時間とともにXIAPの発
現量は増加した。この効果は濃度依存的であった。次
に、同じ細胞に5 μ MのA β ₂₅₋₃₅を添加して24時間
後のXIAPの発現は低下していたが、同時に2mMの
塩化リチウムを添加していた細胞では、逆にXIAPの
発現は増加していた。さらに、GSK-3阻害剤(10 μ M
のGSK-3 Inhibitor-I および -II)を添加して3時間後
のXIAPの発現量を検討したところ、20 mMの塩化
リチウムを添加した場合と同様にXIAPの発現は増加
していた。最後に、SY5Y神経芽細胞腫に2mMの塩
化リチウムを添加したものとそうでないものを24時
間培養し、さまざまな細胞死ストレスを与えると、10
 μ Mおよび50 μ Mの過酸化水素の場合も、25 μ M
のA β ₂₅₋₃₅の場合も、細胞死レベルは減少していた。
以上のことから、リチウムはXIAPの発現を亢進させ
ること、その機序はGSK-3の阻害であること、そし
てリチウムによるneuroprotectionのメカニズムの1
つとしてアポトーシス阻害機能を有するXIAPの発現
の亢進があることが示唆された。

D. 考察

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、前年度の検討から
低濃度のA β 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。我々は今までに、神経細胞死とタウ
蛋白異常リン酸化のメカニズムをプロテインフォス
ファターゼや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。今回の研究は、
XIAPの発現を逆に促進する因子としてリチウムを見
出し、その検討をおこなったものである。

そもそもリチウムは躁病に対する薬剤として約半
世紀使用されてきたが、さまざまな生物学的作用を有

し、抗躁効果の作用機序は未だ明らかではない。有力な機序としては、フォスファチジルイノシトールモノフォスファターゼ阻害作用、結果として細胞内イノシトール枯渇作用というものが知られている。しかし、抗躁効果との関連性はないようであるがリチウムの重要な薬理作用として Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK-3)の阻害機能があることもよく知られるようになり、タウ蛋白のリン酸化制御や、詳細な機序は不明であるがA β 産生制御の側面からも研究がおこなわれるようになった。また、リチウムには近年 neuroprotection 作用があることが報告されるようになり、この機序としては Protein Kinase B (PKB)の活性化や Bcl-2 の発現促進などが報告されている。

今回の我々の研究は、XIAP の発現を促進する因子としてリチウムを見出したものであったが、その作用機序としては GSK-3 の阻害がまず考えられる。発現量の促進に関しては、通常の転写レベルでの亢進と翻訳レベルでの亢進、そして分解速度の低下がその理由として考えられる。XIAP の発現は他の蛋白と異なり、通常の転写レベルでの制御に加えて、その遺伝子の5'末端に IRES (Internal Ribosome Entry Sites) という配列を持つことから翻訳レベルでの制御が重要であるとされている。この IRES による制御を介して、培地のアミノ酸除去などのストレス刺激によって mRNA から蛋白への翻訳量が増大することが知られているが、これは細胞死ストレスに対する生体反応として備わっている可能性が高い。今回発見した、発現亢進を誘導するリチウムは細胞死ストレスとは異なるため、神経変性疾患に対して治療的に応用されうる可能性を有している。リチウムにはさまざまな生理薬理的作用が存在するが、その1つである GSK-3 の抑制が示唆された。GSK-3 の機能と IRES を介した翻訳制御についてはまだ報告はないが、興味深い可能性があると思われ、さらに検討が必要と考えられる。また、リン酸化酵素が分解に関与する可能性としては、ある蛋白がリン酸化によりユビキチン化が亢進し、そのため分解が促進する例もあり、この点についてもさらに検討が必要と考えられる。

以上より、リチウムによる XIAP の発現の影響を検討し、リチウムおよび GSK-3 阻害剤は XIAP の発現を亢進させることが示唆された。このことは、リチウムによる neuroprotection のメカニズムの1つとして、アポトーシス阻害機能を有する XIAP の発現の亢進があることをも示唆している。以前の検討から、少なくとも、アポトーシス阻害因子という細胞死の過程に逆

の働きをしているものも関与している可能性が示唆されていることから、今後提起された疑問点を解明するための検討をおこなうことにより、さまざまな神経変性疾患におけるアポトーシス阻害因子をターゲットにした治療および診断的方法の検討が必要と考えられた。

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。今回我々は、XIAP がタウ蛋白に結合して影響をあたえることに注目して XIAP の発現制御に関して検討をおこない、リチウムおよび GSK-3 阻害剤は XIAP の発現を亢進させることを見いだした。このことは、リチウムによる neuroprotection のメカニズムの1つとして、アポトーシス阻害機能を有する XIAP の発現の亢進があることが示唆された。以上のことより、XIAP とタウ蛋白はともに、神経細胞死の機序を理解するうえで重要であり、その発現は病態に関与していることが示唆され、バイオマーカーとしても有用である可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakajima T, Takauchi S, Ohara K, Kokai M, Nishii R, Maeda S, Takanaga A, Tanaka T, Takeda M, Seki M, Morita Y. Alpha-synuclein-positive structures induced in leupeptin-infused rats. *Brain Res.* 1040; 73-80, 2005
2. Tanaka, T Multiple pathogenesis of frontotemporal dementia. *Psychogeriatrics* 5; 15-17,2005
3. 田中稔久、武田雅俊 精神科領域の用語解説 タウ蛋白 分子精神医学 5;183-186,2005.
4. 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、金山大祐、姜経緯、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 精神薬療研究年報 37,69-74,2005.

5. 田中稔久、武田雅俊 家族性 FTD の遺伝子変異 老年精神医学雑誌 16;1033-1040,2005.
 6. 田中稔久、武田雅俊 トラックセッション 2 痴呆症治療をめぐる戦略—現状と可能性、課題を考える II. 近未来に向けて解決すべき治療・予防戦略 タウタンパクの制御を通じたアプローチ 老年精神医学雑誌 16 増刊号—III;116-125,2005.
 7. 田中稔久、武田雅俊 第4部高齢者精神疾患各論 2. アルツハイマー病「現代老年精神医療」編集 武田雅俊 永井書店 東京 2005
 8. 田中稔久、武田雅俊 1, アルツハイマー病 アルツハイマー病の生化学的診断 「日常診療に生かす老年病ガイドブック4 認知症・うつ・睡眠障害の診療の実際」編集三木哲朗 メジカルレビュー社 東京 2005
2. 学会発表
1. 田中稔久、Nurun Nessa Begum、Golam Md. Sadik、武田雅俊 リチウムによる内因性アポトーシス阻害蛋白質発現亢進 第25回リチウム研究会 2005.04.23 東京経団連会館 (大阪)
 2. 田中稔久 シンポジウム 近未来に向けて解決すべき治療・予防戦略——.3. タウ蛋白の制御を通じたアプローチ 第6回アルツハイマー型痴呆研究会 2005,04,16 京王プラザホテル (東京)
 3. Tanaka T, Isoe-wada K, Yamamori H, Begum NN, Sadik MG, Takeda M. Modified tau protein as a biological diagnostic marker for AD The 8th Congress of the World Federation of Societies of Biological Psychiatry 2005,, 7,

16 (Wien, Austria)

4. 田中稔久 精神科入門—うつ病からアルツハイマーまで— 大阪大学歯学部同窓会 第349回臨床談話会、2005,, 7, 16、大阪大学歯学部記念会館 (大阪)
5. 田中稔久 特別講演 アルツハイマー病における細胞死メカニズム：アミロイドβとリン酸化タウ蛋白 第16回中国四国生体ラジカル研究会 2005,07,30 高知市文化プラザ かるぽーと (高知)
6. Tanaka T, Isoe-wada K, Yamamori H, Begum NN, Sadik MG, Takeda M. Tau protein as a biological marker for AD The 12th Congress of the International Psychogeriatrics Association, 2005.,9.22, (Stockholm , Sweden.)
7. 田中稔久、Golam Sadik、Begum Nurn Nessa、武田雅俊 タウ蛋白と 14-3-3 蛋白の結合に関するリン酸化の影響 日本認知症学会 2005. 9. 30、WTC コスモタワー (大阪)
8. Tanaka T, Isoe-wada K, Yamamori H, Begum NN, Sadik MG, Takeda M. Neurobiological studies of Dementia – Biological markers and neuroprotective strategies for Alzheimer disease. Taiwan-Japan Symposium of Dementia -1, 2005,, 12, 167 (Tainan, Taiwan)

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（長寿科学総合研究事業）

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

我々は、アルツハイマー病(AD)の新規診断マーカーの候補として、WGA (小麦胚芽凝集素, Wheat Germ Agglutinin) 結合糖タンパクに注目してきた。AD の髄液中では、WGA に対する結合量の減少している糖タンパクを数種類見出し、そのうち最も有意に減少している約 75kDa の WGA 結合糖タンパクはトランスフェリンであることをすでに同定している。そして、AD の髄液中でのトランスフェリンの WGA 結合量の減少は、トランスフェリンタンパク自体の減少ではなく、糖鎖の減少したトランスフェリンが増加していることが明らかとなった。さらに、この減少は血清中のトランスフェリンには見られなかったが、今後多数例での検討が必要である。これらのことより、髄液中、あるいは脳内での糖鎖の減少は AD の病態に関連しており、トランスフェリンの糖鎖の測定は、有力な診断マーカーとなりうると考えられる。

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 結合糖タンパク質に注目してきた。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あり (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)、有効な診断マーカーとなりうることが示唆された。16 年度には、こ

の糖タンパクがトランスフェリンであることを同定した。そこで今年度は AD におけるトランスフェリンの WGA 結合量の減少の原因を明らかにしてその測定法を検索し、新たな診断マーカーとして確立すること、また病態との関連を明らかにすることを目的として研究を行った。

B. 研究方法

対象は、AD 63 例 (男/女: 19; 74.24 ± 7.85 歳/44; 71.36 ± 8.85 歳)、AD 以外の認知症: 脳血管性認知症(VD)、正常圧水頭症(NPH),

レビー小体型認知症(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; 70.35 ± 6.97歳/11; 60.11 ± 13.34歳)、コントロールとして認知症のない症例50例(28; 71.58 ± 7.59歳/22; 72.00 ± 10.86歳)と正常6例(4; 56.25 ± 22.94歳/2; 85, 68歳)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、DLBはDLBのコンセンサスガイドライン、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・LCA(*Lens culinaris agglutinin*: レンズ豆凝集素)結合タンパクの検索は、WGA・LCAによるレクチンブロット法を用いて検討を行った。トランスフェリンの測定は、サンドイッチELISA(Bethyl Laboratories Inc.)法を用いて測定した。トランスフェリンの糖鎖は、等電点電気泳動によって解析した。

(倫理面への配慮)

本研究は、鳥取大学倫理審査委員会へ申請し、承認を得ている。

また、髄液・血液の提供対象者への倫理的配慮として、①本研究の目的、方法、内容について、②提供による本研究への参加を拒否した場合があってもなんら不利益や実害を受けることはないこと、③参加が自由意志によるものであり、いつでも中止できること、④プライバシーが守られること、を対象者に説明し同意を

得た。

研究はあくまでタンパクレベルの量的、質的な差異を検討するものであり、個人を特定する検査ではない。また研究結果は個人の特定ができないようにプライバシーを尊重し、保護に留意した。さらにこれらのことを対象者に通達の上、本研究への参加は自由であることを添えて協力を依頼した。

C. 結果および考察

髄液中のトランスフェリンは、AD(25例) 22.78 ± 11.44μg/ml、AD以外の認知症(44例) 27.00 ± 8.70μg/ml、コントロール(26例) 24.31 ± 13.42μg/mlで、トランスフェリン濃度にADで異常は見られなかった。そこで、トランスフェリンの糖鎖を、等電点電気泳動をもちいて分離し、検討した。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、ガラクトース、シアル酸を含むN-結合型複合糖鎖を2本持つ。糖鎖付加の最終段階で付加されるシアル酸の数によって、アイソフォームが分類されており、通常血清のトランスフェリンは、シアル酸を4つ持つtetrasialotransferrinである。髄液中では、0~4つのシアル酸を持つトランスフェリンすべてが存在しているが、ADでは、糖鎖の少ない1~3つのトランスフェリンの割合が、増加していることが分かった。

次に、血清中でのトランスフェリンを、髄液同様に濃度と糖鎖について検討した。血清中のトランスフェリン濃度は、コントロール(15例) 2.61 ± 0.71mg/ml、AD(15例) 3.21 ± 1.21mg/mlで、髄液同様有意な

差はみられなかった。等電点電気泳動で糖鎖を解析したが、糖鎖に関しても AD 群とコントロール群において明らかな有意差は見られなかった。

これらのことより、トランスフェリンの糖鎖は、今までリン酸化タウだけでは困難であったタウオパチーと AD との鑑別できる可能性があり、临床上としても有用性があると考えられ、AD の診断に貢献できることが示された。血液マーカーとしては、現在のところ髄液のような有意差は見られていないが、今後多数例における検討の必要がある。

また、AD におけるトランスフェリンの糖鎖を、LCA を用いて検討した。LCA はマンノースに特異的に結合するため、糖鎖付加の初期段階の付加機能を検討することができる。髄液のトランスフェリンの LCA 結合量は、AD 群とコントロール群で差がなく、AD 髄液中における糖鎖の異常は、マンノース以降、特にシアル酸付加に異常があるのではないかと推測された。このことは、トランスフェリンの糖鎖を診断マーカーとするだけでなく、糖鎖付加の異常を AD の新たな病態として解析し、病態解明に役立つと期待できる。

D. まとめ

AD の髄液中では、WGA 結合糖タンパクが数種類減少しており、そのうち最も有意に減少し診断マーカーとして有効であろうと思われる約 75kDa の糖タンパクは、トランスフェリンであることを明らかにした。トランスフェリンの WGA 結合量の減少は、糖鎖の減少であった。この現象は、血清中のトランスフェリンには見られず、髄液中

に特異的なものであることが示唆された。髄液中トランスフェリンの糖鎖の減少を検出することで、新たな診断マーカーのひとつとして、診断に貢献できるとともに、新たな AD の病態として、AD の病態の解明に貢献できると期待できる。

E. 健康危険情報

特記すべきことなし。

文献

1) Yamashita K, et al: Sugar chains of serum transferrin from patients with carbohydrate deficient glycoprotein syndrome. J. Biol. Chem. 268(8): 5783-5789, 1993

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Urakami K, Arai H, Itoh N, Ishiguro K, Oono H, Taniguchi M, Wada-Isoe K, Wakutani Y, Kuzuhara S, Sasaki H, Nakashima K, Imahori K: Cerebrospinal fluid phosphorylated tau protein at serin199 is a useful diagnostic biomarker in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. Recent Progress In Alzheimer's And Parkinson's Diseases 177-182, 2005.

2) Urakami K, Taniguchi M, Inoue M, Wada-Isoe K, Wakutani Y, Nakashima K: Studies on diagnostic markers Alzheimer's disease. Psychogeriatrics 5 (3): 99-102, 2005.

3) Inoue M, Urakami K, Taniguchi M,

Kimura Y, Saito J, Nakashima K: Evaluation of computerized test system to screen for mild cognitive impairment. PSYCHOGERIATRICS 5(2): 36-41, 2005.

4) 浦上克哉、谷口美也子、和田健二、涌谷陽介、中島健二：痴呆症疾患における生物学的診断マーカー パーキンソン病 痴呆の問題 中外医学社 103-106, 2005

5) 木村有希、綱分信二、谷口美也子、齋藤潤、北浦美貴、細田理恵子、米原あき、長谷川順子、児山憲恵、清水百合子、森本靖子、頼田孝男、小嶋良平、浦上克哉：アルツハイマー病患者に対するアロマセラピーの有用性 Dementia Japan 19(1): 77-85, 2005.

6) 齋藤潤、井上仁、北浦美貴、谷口美也子、木村有希、佐藤智明、馬詰美保子、福田由貴子、山本照恵、浦上克哉：認知症予防教室における対象者の判別法と評価法の検討 Dementia Japan 19(2): 177-186, 2005.

7) 浦上克哉、谷口美也子：《変性疾患の治療に向けて》アルツハイマー型痴呆の早期診断 内科 95(5): 879-883, 2005.

8) 浦上克哉、谷口美也子：バイオマーカーはアルツハイマー型痴呆の鑑別診断にどの程度有用か 老年精医誌 16: 49-54, 2005.

9) 浦上克哉、谷口美也子：アルツハイマー病の臨床早期診断 Dementia Japan 19(1): 52-59, 2005.

10) 浦上克哉：ADとMCIの生物学的診断マーカー（アルツハイマー病のフロンティア） 老年精神医学雑誌 16(6): 731-733, 2005.

11) 浦上克哉、谷口美也子、和田健二、涌谷陽介、中島健二：アルツハイマー病の遺伝疫学 神経研究の進歩 49(3): 395-401,

2005.

12) 浦上克哉：長寿のための認知症の治療と予防 成人病と生活習慣病 35(7): 784-788, 2005.

13) 本間昭、浦上克哉、北村伸、山田正人、繁田雅弘：痴呆症診療のための実践的教育企画 日本老年医学会雑誌 42(4): 409-410, 2005.

14) 浦上克哉、涌谷陽介、和田健二、中島健二：痴呆診療:診断と治療の進歩 老年期痴呆の疫学 日本内科学会雑誌 94(8): 1467-1472, 2005.

15) 浦上克哉、谷口美也子：アルツハイマー病の診断 日本医師会雑誌 134(6): 1002-1006, 2005.

16) 浦上克哉、谷口美也子：アルツハイマー病の早期発見 日本醫事新報 4247: 33-36, 2005.

17) 浦上克哉、谷口美也子：アルツハイマー病早期診断に役立つ生物学的診断マーカー アルツハイマー病とその関連疾患に対する早期診断マーカー：最新の話 37-42, 2006.

2. 学会発表

国内学会

1) 谷口美也子、木村有希、齋藤潤、荒井啓行、和田健二、涌谷陽介、中島健二、浦上克哉：アルツハイマー病診断マーカーとしての髄液中 WGA 結合糖タンパク質。第46回日本神経学会総会 5月27日、鹿児島, 2005

2) 齋藤潤、井上仁、北浦美貴、谷口美也子、木村有希、橋本祐樹、神保太樹、佐藤智明、馬詰美保子、福田由貴子、山本照恵、浦上克哉：認知症予防教室における対象者の判

別法と評価法の検討。第7回日本早期痴呆学会 9月10-11日, 2005

4) 神保太樹、浦上克哉: アルツハイマー病に対するアロマセラピーの効果。第7回日本早期痴呆学会 2005年9月10-11日, 2005

5) 鈴木利治、荒木陽一、川口映子、浦上克哉、西村正樹、藤重沙弥香、石川貴雄、中矢正: Alcadein 代謝産物 β -Alcaの性状解析とアルツハイマー病診断マーカーとしての可能性の検証。第24回日本痴呆学会 9月30-10月1日, 大阪, 2005

6) 井上仁、藤原静香、齋藤潤、北浦美貴、浦上克哉: タッチパネル式コンピュータを用いた認知症スクリーニングと介入プログラムの効果。第24回日本痴呆学会 9月30日-10月1日, 大阪, 2005

7) 神保太樹、浦上克哉: アルツハイマー病に対するアロマセラピーの有効性の検討(続報)。第24回日本痴呆学会9月30日-10月1日, 大阪, 2005

8) 堀越優子、浦上克哉、谷口美也子、涌谷陽介、中島健二、前田雅弘、山口晴保: アルツハイマー病の脳脊髄液ではアミロイド β 40濃度、アミロイド β 40/42比、アミロイド β 1-x/42比が高い。第24回日本痴呆学会9月30日-10月1日, 大阪, 2005

9) 橋本祐樹、谷口美也子、北浦美貴、齋藤潤、神保太樹、平木綾子、浦上克哉: LCAをもちいたアルツハイマー病における糖鎖修飾メカニズムの検討。第24回日本痴呆学会 9月30日-10月1日, 大阪, 2005

10) 谷口美也子、齋藤潤、木村有希、橋本祐樹、北浦美貴、神保太樹、和田健二、涌谷陽介、中島健二、浦上克哉: アルツハイマー病診断マーカーとしてのWGA結合糖タンパク質。第24回日本痴呆学会 9月30

日-10月1日, 大阪, 2005

11) 齋藤潤、井上仁、北浦美貴、谷口美也子、木村有希、橋本祐樹、神保太樹、平木綾子、佐藤智明、馬詰美保子、福田由貴子、山本照恵、浦上克哉。第24回日本痴呆学会9月30日-10月1日, 大阪, 2005

12) 浦上克哉、藤原静香: 認知症になっても安心して暮らせるまちづくりを目指して第6回日本認知症ケア学会 地域連携シンポジウム 10月1日, 2005

13) 神保太樹、木村有希、橋本祐樹、平木綾子、北浦美貴、谷口美也子、浦上克哉: アロマセラピーはアルツハイマー型認知症の認知機能を改善する。第9回山陰認知症ケア研究会 11月26日, 米子, 2005

国際学会

1) Urakami K, Taniguchi M: Early Diagnostic Marker for Alzheimer's Disease. 8th World Congress of Biological Psychiatry June28-July3, Vienna, Austria, 2005.

2) Urakami K: Recent advances of Early Diagnostic Marker for Alzheimer's Disease (AD) and Related Disorders. 8th World Congress of Biological Psychiatry June28-July3, Vienna, Austria, 2005.

3) Winblad B, Homma A, Awata S, Kitamura S, Shigeta M, Nakamura Y, Ikeda M, Urakami K, Whitehouse P: Pre IPA Congress Workshop, September 20- Norra Latin, Stockholm, 2005

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

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

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。