

700.500359 B

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16～17年度

総合研究報告書

主任研究者 武田 雅俊

平成 18 年(2006 年)3 月

目 次

I. 総合研究報告書

- 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…………… 7
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…………… 12
田中 稔久
3. アルツハイマー病診断マーカーとしての WGA 結合糖タンパクの同定と
検査方法の確立…………… 20
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…………… 29
千葉 茂

III. 研究成果の刊行に関する一覧表…………… 34

IV. 研究成果の刊行物・別刷…………… 37

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った。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。また、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。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。

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-ハイドロキシコレステロールのレベルなどが検討されてきた。現時点で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。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、プレセニリン 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ーで認識した。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)によるウェ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°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

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、 $A\beta$ 類似の Notch-1 ペプチド (Notch-1 $A\beta$ -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 $\sim 6\text{KDa}$ と $\sim 3\text{KDa}$ 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 $\sim 6\text{KDa}$ 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、 $\sim 3\text{KDa}$ 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 $A\beta$ 42 と $A\beta$ 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リンの病原性変異体の多くで $A\beta$ 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 $A\beta$ 42 産生量と延長型 N β 25 産生量を検討した。その結果 $A\beta$ 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。 $A\beta$ 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 $A\beta$ 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。

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 $5 \mu\text{M}$ の $A\beta_{25-35}$ 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($10 \mu\text{M}$ 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、 20mM 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、 $10 \mu\text{M}$ および $50 \mu\text{M}$ の過酸化水素の場合も、 $25 \mu\text{M}$ の $A\beta_{25-35}$ 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。

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、デンシ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-deIM 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。

髄液中のトランスフェリンは、AD(25 例) $22.78 \pm 11.44 \mu\text{g/ml}$ 、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 $8.70 \mu\text{g/ml}$ 、コントロール(26 例) $24.31 \pm 13.42 \mu\text{g/ml}$ 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、通常の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) $2.61 \pm 0.71 \text{mg/ml}$ 、AD(15 例) $3.21 \pm 1.21 \text{mg/ml}$ 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、臨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。

尿中 8-OHdG は、対照群、MCI 群、AD 群、FTD 群の順に、 $7.9(4.2)$ 、 $9.3(5.2)$ 、 $12.3(7.4)$ 、 $9.8(6.4) \text{ng/ml}$ 、[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、 $1398(129)$ 、 $1223(167)$ 、 $1124(101)$ 、 $1220(124) \mu\text{M}$ [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 群と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 Nβ の主な分子種は Nβ 21 と延長型 Nβ 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 Aβ 42 産生量が増加すると、Nβ 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。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., Satoh, Y., Aidaraliev, N., Tanii, H., Kamino, K., Tanaka, T., Kudo, T., Takeda M. Alzheimer's β -secretase mechanism produces Amyloid- β -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- β 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
 14. 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
 15. 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, Tani H, Ikuta A, Haass C, Takeda M Presenilin-dependent γ -secretase on plasma membrane and endosomes is functionally distinct *BIOCHEMISTRY* 2006 in press
 16. 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
 17. 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
 18. 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
 19. Tanaka, T Multiple pathogenesis of frontotemporal dementia. *Psychogeriatrics* 5: 15-17, 2005
 20. 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.
 21. 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.
 22. 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

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

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。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

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る。

我々は PS 依存的 γ -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 β 類似の Notch-1 ペプチド (Notch-1 A β -like peptide; N β) あるいは CD44 ペプチド (CD44 A β -like peptide; CD44 β) 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 β のような膜貫通部分を含むペプチドの分泌が β APP からの A β 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 β 様ペプチド (A β -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 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。

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

アルツハイマー病は A β の蓄積が引き金となって起こると考えられており A β 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 β 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 β 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 β 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 β などのA β 様ペプチドを代わりに測定することによってA β 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 β のカルボキシル末端部位の構成比率はA β のそれと一致する。

N β のカルボキシル末端を生成する γ 切断部位の正確さはA β 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 β 分子であるN β 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 β 1733-5量の増大が認められる。

このようにNotchと β APPの膜内蛋白分解のメカニズムはA β 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 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 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産生量を推定することができる。

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PS1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。

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見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 $A\beta$ 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、 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 $N\beta$ 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

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

Alzheimer's γ -secretase mechanism produces Amyloid- β 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 β 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「研究成果公开发表(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 γ -secretase activity by level of $A\beta$ -like peptides
Psychogeriatrics (2004), 4: 23-27

Secretion of the Notch-1 $A\beta$ -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 $A\beta$ sink assay, to identify the dissociation of soluble $A\beta$ 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

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

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 山森英長 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。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。また、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。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-ハイドロキシコレステロールのレベルなどが検討されてきた。現時点で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。そして前年度は、 $A\beta$ 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^{19,20}、 $5\mu\text{M}$ および 500nM の $A\beta_{25-35}$ (部分ペプチド)、 $5\mu\text{M}$ $A\beta_{35-25}$ (逆配列部分ペプチド)、 500nM $A\beta_{1-42}$ (全長フィブリル化ペプチド) (Sigma-Aldrichより購入)の存在下にて48時間まで経過を追った後細胞を集めた。但し、 $A\beta_{1-42}$ はフィブリル化のために培養細胞への使用前3日間 1mM 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 $A\beta_{1-42}$ の存在下にて48時間まで経過を追った後細胞を集めた。そして、これらの細胞をバッファー (100mM PIPES、 $\text{pH}6.8$ 、 2mM MgCl_2 、 0.1mM EDTA、 1mM EGTA、 25mM NaF、 1mM Na_3VO_4 、 1mM PMSF、 $5\mu\text{g/ml}$ aprotinine、 $5\mu\text{g/ml}$ leupeptine、 0.1% Triton-X100)にて溶解し、そのlysatesを $200\text{K} \times \text{G}$ にて遠心し、supernatantを得た。このsupernatantの各 $50\mu\text{g}$ 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 $5\mu\text{M}$ $A\beta_{25-35}$ 、 $5\mu\text{M}$ $A\beta_{35-25}$ 、 500nM $A\beta_{1-42}$ の存在下で48時間培養した。そして、 $0.5\mu\text{M}$ H_2O_2 および 5nM 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 $A\beta_{1-42}$ の存在下でさらに48時間培養し、そして、 $0.5\mu\text{M}$ H_2O_2 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 (Molecular Probe 社) を用いて検討した。

さらに、2mM および 20 mM の塩化リチウムを添加し 24 時間まで経過を追った後、細胞を集めた。また、前年度 5 μ M の $A\beta_{25-35}$ によって、XIAP の発現が低下することを確認しているため、リチウムがそれほ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 $A\beta_{25-35}$ および 5 μ M $A\beta_{25-35}$ 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。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同じものを用意し、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 $A\beta_{25-35}$) 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 μ l のサンプルに 5 μ 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 μ g/ml aprotinine、25 μ 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 μ 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エスタンプ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 $A\beta_{25-35}$ 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 μ M から 5 μ 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 μ M から 50 μ 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。一方、 $A\beta_{35-25}$ では 0 μ M から 50 μ M まで細胞毒性が全く観察されなかった。次に、5 μ M の濃度の $A\beta_{25-35}$ および $A\beta_{35-25}$ 、そして 5 μ M と 500 nM のフィブリル化 $A\beta_{1-42}$ を用いて 48 時間後までの経時的変化を検討したところ、細胞毒性が観察されたのは 5 μ M のフィブリル化 $A\beta_{1-42}$ のみであった。よって、以後実験に用いる 5 μ M および 500 nM の $A\beta_{25-35}$ および 500 nM 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 control の 48 時間後に比べて少なく、5 μ 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。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 μ 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。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。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 μ M $A\beta_{25-35}$ 、5 μ 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 μ M H_2O_2 を添加した場合も、5 nM 4-hydroxynonenal を添加した場合も、3 時間後の細胞死の増加は確認されなかった。しかし、5 μ 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_2O_2 の添加または 4-hydroxynonenal の添加によって、3 時間後の細胞死の増加が確認された。そして、このような細胞死脆弱性を惹起する効果が XIAP の発現減少によるものかどうかを確認するために、293 細胞株に XIAP を一過性に強制発現させた細胞を用いて検討をおこなった。まず、XIAP の発現レベルを確認したところ、コントロールとして用いた mock vector をトランスフェクトした細胞では $A\beta_{1-42}$ 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。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_2O_2 の添加あるいは 4-hydroxynonenal の添加によって細胞死の増加が確認されたが、この効果は XIAP を一過性に強制発現させた細胞では有意に減少していた (Fig.4 B)。さらに、この現象が caspase-3 の活性の変化に依存しているかどうかを検討するために、caspase-3 活性を測定した。結果は、mock vector をトランスフェクトした細胞では $A\beta_{1-42}$ の添加後、 H_2O_2 の添加あるいは 4-hydroxynonenal の添加によって caspase-3 活性が明らかに亢進していたが、XIAP を一過性に強制発現させた細胞ではこの caspase-3 活性の亢進が認められなかった。よって、このことから $A\beta_{1-42}$ 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。

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 $A\beta_{25-35}$ 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 $A\beta_{25-35}$ 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。

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、デンシ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 β によってアポトーシス誘導蛋白の Bax の発現が誘導され、同時にアポトーシス阻害蛋白の Bcl-2 の発現が抑制されることがこれまでに報告されている。アポトーシスはいくつかのステップで進行するので、促進因子と抑制因子のバランスで制御されており、この報告の趣旨は、そのバランスをアポトーシス促進側へ傾かせることで細胞脆弱性が誘導されていて、この脆弱性の誘導に関しては低濃度の A β 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 β 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 β 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 β 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 β によって発現量が減少することを見出された。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。

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。

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ッセイをおこないアルツハイマー病の鑑別に用いる試みは他施設にてすでに先行する研究がある。この研究は、AD 患者由来の脳脊髄液内における

第1メチオニンの切断化されたタウ蛋白に関するものであり、この変化はアルツハイマーの病態過程に対する理解と深く関わっている。AD 脳内のタウ蛋白は高度にリン酸化しているが、以前からの我々の研究より、培養神経系細胞にアポトーシス誘導刺激を与えるとタウ蛋白は脱リン酸化することが見出されていた。ここから AD の病態においてはアポトーシスのカスケードに加えてと非アポトーシスのカスケード存在して、これらが拮抗的に作用しているものと我々は考えていた。そこで、内因性のカスパーゼ阻害蛋白として XIAP の検討をおこなったのだが、結果として XIAP は AD 脳に多く発現していることが見出されていた。この XIAP に結合してカスパーゼ阻害作用を阻害する、つまりアポトーシスを促進する蛋白(Smac/DIABLO)などが最近数種類発見され、その結合様式として蛋白の N 末端に Ala-X-Pro-X (X は任意のアミノ酸)の配列が認められるというものであった。タウ蛋白の N 末端は ¹Met-Ala-Glu-Pro-Arg⁵ 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この考えから、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 β 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 β によって引き起こされている酸化ストレスへの脆弱性が、回復することを見出した。そして、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。

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)にはあまり相関しないが、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- β 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., Tani H., Kamino K., Tanaka T., Kudo T., Takeda M. Alzheimer's γ -secretase mechanism produces amyloid- β 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.
 7. 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
 8. Tanaka T Multiple pathogenesis of frontotemporal dementia. *Psychogeriatrics* 5; 15-17,2005
 9. 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.
 10. 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.
 11. 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.
 12. 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.
13. 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
 14. 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、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4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 β and tau protein.. The 9th 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 alzheimers disease .. The 9th 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..