

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)  
 アミロイドーシスに関する調査研究班 分担研究報告書

## 家族性アミロイドポリニューロパチーのアミロイド沈着過程における ニトロソ化の役割

分担研究者 安東由喜雄 熊本大学大学院医学薬学研究部、病態情報解析学

共同研究者 斉藤史織\*、植田光晴\*\*、姫野慎吾\*\*、小田切優樹\*

熊本大学大学院医学薬学研究部、\*薬物動態制御学、\*\*同病態情報解析学

**研究要旨** [目的]FAP において、活性酸素傷害がアミロイド形成を促進させることが知られているが、ニトロソ化を受けたトランスサイレチン(TTR)のアミロイド形成能を検討した。[方法]正常者、および FAP ATTR V30M のホモ接合体患者からそれぞれ TTR を抽出し、これに *in vitro* で isoamyl nitrite を産生させ、ニトロソ化 TTR を作成した。これを用い酸性条件化でインキュベーションし、アミロイド形成能を thiofravin T 法で検討した。[結果] ニトロソ化を受けた TTR は wild type, V30M とも非ニトロソ化 TTR より有意にアミロイド形成能が高く、更に V30M のほうが、wild type より更にアミロイド形成能が高いことが判明した。[結論]FAP のアミロイド沈着好発部位は血管周囲で、NO が最も作用するところであることから、TTR のニトロソ化反応が重要な役割を果たすことが確認された。

### A. 研究目的

家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) を含むいくつかのアミロイドーシスのアミロイド沈着機構には活性酸素障害が関与していることが判明しているが、その詳細については不明な点が多い。血管周囲は FAP のアミロイド沈着の好発部位であると同時に、内皮細胞や血管平滑筋から産生された一酸化窒素 (NO) が豊富に存在する部位でもある。FAP の原因となるトランスサイレチン (TTR) 分子には 10 番目につだけシステイン (Cys) 残基が存在し、その修飾はアミロイド形成に重要であると考えられている。反応性に富む Cys 残基を持つ蛋白質は、生体内でニトロソ化を受けやすいことが知られており、TTR においても 10 番目の Cys 残基を介してニトロソ化されている可能性が考えられる。本研究では TTR 分子のニトロソ化がアミロイド形成に与える影響について検討することを目的とした。

### B. 研究方法

健常者ヒト血清由来の野生型 (WT) TTR 及び ATTR は FAP ATTR V30M のホモ接合体患者

血清からそれぞれ抽出された。両 TTR の Cys10 に isoamyl nitrite を用いて NO を付加し、ニトロソ TTR とした。作製したニトロソ TTR はその NO 付加率を算出後、立体構造及びそのアミロイド形成能の変化について検討を行った。

(倫理面への配慮)

TTR の抽出に当たっては、インフォームド・コンセントが得られた患者血清を用いた。

### C. 研究結果

ニトロソ TTR の NO 付加率を算出した所、ATTR V30M は WT TTR に比し有意にニトロソ化を受けやすいことが判明した。これは ATTR V30M が立体構造の変化により Cys10 の反応性が増し、更にニトロソ化されやすくなったためと思われる。CD スペクトル解析では、ニトロソ化によるスペクトルの変化は見られなかったものの、トリプトファン (Trp) 残基由来の蛍光スペクトルはニトロソ化により WT TTR、ATTR V30M の両方で減少し、特に ATTR V30M で顕著であった。このことより、ニトロソ化は TTR の Trp 残基周辺のミクロな環境変化を惹起していることが示唆された。非還元 SDS-PAGE により、

TTR の四量体の安定性を検討したところ、ニトロソ TTR、特にニトロソ ATTR V30M は未処理 TTR と比して四量体の安定性は有意に低下した。また、ニトロソ TTR のアミロイド形成能は、酸性条件下で未処理 TTR に比し有意に増加し、本現象は WT TTR より ATTR V30M においてより顕著に見られた(図 1)。

#### D. 考察

In vitro でのアミロイド形成実験において、TTR、とりわけ ATTR V30M は、S-ニトロソ化されることにより有意にアミロイド形成能が上昇することが判明した。これまでの TTR の立体構造に関する解析から、WT TTR の Cys10 残基は、比較的溶媒に向かって露出した位置に存在しているが、ATTR V30M においては、30 番目の Val が Met へと変異することにより、分子全体の立体構造が微妙に変化し、WT TTR よりさらに溶媒側へ露出することが知られている。このことは、ATTR V30M においては WT TTR よりさらに Cys10 残基が NO に対して反応性に富んでいる可能性が考えられる。

Trp 残基由来の蛍光スペクトル解析では、WT TTR、ATTR V30M 両方において S-ニトロソ化によってその蛍光強度は有意に減少していたことから、TTR の Cys10 残基を介した S-ニトロソ化は TTR の立体構造全体には大きな影響はないが、Trp 残基が存在する領域の微細な構造変化を誘起しているものと考えられた。

FAP のみならず他のアミロイドーシスでも組織のアミロイド沈着中に好中球由来の human neutrophil elastase、カテプシン G が共存することが知られている。これらのことは、NO を含む活性酸素分子種が FAP のアミロイド形成過程に重要な役割を果たす可能性を示している。このことはまた長期にわたる慢性炎症が FAP の組織沈着アミロイドのリスクファクターになることも示唆する。

TTR のアミロイド形成機構には TTR の四量体としての安定性が変化することが重要であることと考えられている (図 2)。TTR の S-ニトロソ化が四量体の安定性に及ぼす影響を明らかにするために、未処理の TTR と S-ニトロソ TTR

を用いて非加熱 (非還元) SDS-PAGE を行い、デンシトメトリーで単量体と四量体の比率を定量した。S-ニトロソ TTR、とりわけ S-ニトロソ ATTR V30M では有意に単量体の比率が増加していた。このことは、TTR が S-ニトロソ化を受けることにより、上述のごとく微細な立体構造が変化し、四量体としての安定性が変化した可能性が考えられた。

#### E. 結論

Cys 残基を介して起こるニトロソ化は TTR のアミロイド形成能を上昇させ、組織でのアミロイドの形成に促進的に作用し、そのことが FAP の病態と深く関わっている可能性が示された。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Motomiya Y, Ando Y, Haraoka K, Sun X, Morita H, Amano I, Uchimura T, Maruyama I. Studies on unfolded beta2-microglobulin at C-terminal in dialysis related amyloidosis *Kidney Int*, 67:314-320, 2005
- 2) Araki-Sasaki K, Ando Y, Nakamura M, Kitagawa K, Ikemizu S, Kawaji T, Yamashita T, Ueda M, Hirano K, Yamada M, Matsumoto K, Kinoshita S, Tanihara H. Lactoferrin Glu561Asp facilitates amyloid formation in the cornea. *Brit J Ophthalmol* 89:684-648, 2005
- 3) Hirai T, Ando Y, Yamura M, Kitajima M, Hayashida Y, Korogi Y, Yamashita T, Yamashita Y. Transthyretin-related familial amyloid polyneuropathy: Evaluation of CSF enhancement on Serial T1-weighted and FLAIR images following intravenous contrast administration. *Am J Neuroradiol* 26:2043-2048, 2005
- 4) Nakamura M, Ando Y, Sasada K, Haraoka K, Ueda M, Okabe H, Motomiya Y. Role of extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) in patients under maintenance hemodialysis. *Nephron Clin Pract* 101: c109-c115, 2005
- 5) Matsunaga N, Anan I, Rosenberg P, Nagai R,

- Lundstrom O, Horiuchi S, Ando Y, Suhr OB. Advanced glycation end product is implicated in amyloid-related kidney complications. *Scand J Clin Lab Invest* 65: 263-272, 2005
- 6) Saito S, Ando Y, Nakamura M, Ueda M, Kim J, Ishima Y, Akaike T, Otagiri M. Effect of nitric oxide in amyloid fibril formation on transthyretin-related amyloidosis. *Biochemistry* 44: 11122-11129, 2005
- 7) Kawaji T, Ando Y, Nakamura M, Yamamoto K, Ando E, Takano A, Inomata Y, Hirata A, Tanihara H. Transthyretin synthesis in rabbit ciliary pigment epithelium. *Exp Eye Res*, 81: 306-312, 2005
- 8) Nakamura M, Yamashita T, Ueda M, Obayashi K, Sato T, Ikeda T, Washimi Y, Hirai T, Kuwahara Y, Yamamoto MT, Uchino M, Ando Y. Neuroradiologic and clinicopathologic features of oculoleptomeningeal type amyloidosis. *Neurology* 65: 1051-1056, 2005
- 9) Terazaki H, Ando Y, Fernandes R, Yamamura K, Maeda S, and Saraiva MJ. Immunization in familial amyloidotic polyneuropathy: counteracting deposition by immunization with a Y78F TTR mutant. *Lab Invest*, 86: 23-31, 2005
- 10) Takei Y, Ikeda S, Ikegami T, Hashikura Y, Miyagawa S, Ando Y, and Japanese Liver Transplantation Society. Ten years of experience with liver transplantation for familial amyloid polyneuropathy in Japan: outcomes of living donor liver transplantations. *Intern Med* 44: 1151-1156, 2005
- 11) Mitsuhashi S, Yazaki M, Tokuda T, Sekijima Y, Washimi Y, Shimizu Y, Ando Y, Benson MD, Ikeda S. Biochemical characteristics of variant transthyretins causing hereditary leptomeningeal amyloidosis. *Amyloid* 12: 216-225, 2005
- 12) Sato T, Ando Y, Susuki S, Mikami F, Ikemizu S, Nakamura M, Suhr O, Anraku M, Kai T, Suico MA, Shuto T, Yamagata Y, and Kai F. Chromium (III) ion and thyroxine cooperate to stabilize the transthyretin tetramer and suppress in vitro amyloid fibril formation. *FEBS Lett*, 580:491-496, 2006
- 13) Ando Y, Nakamura M, and Araki S. Transthyretin related familial amyloidotic polyneuropathy. *Arch Neurol*, 62: 1057-1062, 2005
- 14) Ando Y. Liver transplantation and new therapeutic approaches for familial amyloidotic polyneuropathy (FAP). *Med Mor Morphol* 38: 142-154, 2005
2. 学会発表
- 1) Ando Y. Development of a transgenic rat for familial amyloidotic polyneuropathy. The 6th International Symposium on Familial Amyloidotic Polyneuropathy and Other Transthyretin Related Disorders & The 5th International Workshop on Liver Transplantation in Familial Amyloid Polyneuropathy, Aug 25, 2005
- 2) 安東由喜雄. ミスフォールディングとアミロイド蛋白. 第一回 飛鳥医療福祉研究会 プログラム、奈良, 3.17, 2005
- 3) 安東由喜雄. 微量蛋白の新たな解析法. 第52回日本臨床検査医学会イブニングセミナー、福岡、11.17, 2005
- 4) 安東由喜雄. 遺伝子検査の方向性. 第1回九州遺伝子検査研究会、福岡、9.3, 2005
- 5) 安東由喜雄. 家族性アミロイドポリニューロパチーの新しい治療法の開発. 第46回日本神経学会総会シンポジウム「難治性ニューロパチーの新しい治療戦略」、鹿児島、5.21, 2005
- 6) 安東由喜雄. トランスサイレチンの遺伝子変異と免疫反応. 第15回日本臨床化学会九州支部会総会、久留米、2.18, 2005
- 7) 安東由喜雄. 血清蛋白とアミロイドーシス: 血液疾患のトピックスと検査医学. 第6回日本検査血液学会、長崎、7.28, 2005
- 8) 安東由喜雄. NST と病院マネジメント. トランスサイレチンと検査医学. 第7回医療マネジメント学会、熊本、9.15, 2005
- 9) 安東由喜雄. トランスサイレチンと検査医学. 第52回日本臨床検査医学会シンポジウム「アミロイド蛋白と検査医学」、福岡、11.18, 2005
- 10) 安東由喜雄. 家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)の新たな診断・治療に関する研究. 第20回熊本県産学官技術交流会、熊本、1.24, 2006
- 11) 安東由喜雄. タスクフォースによる先端医学と社会の調和のための基礎整備」班会議ワークショップ、熊本、1.30, 2006

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得（申請中）

(1)部位特異的遺伝子変換促進剤及び遺伝子治療剤

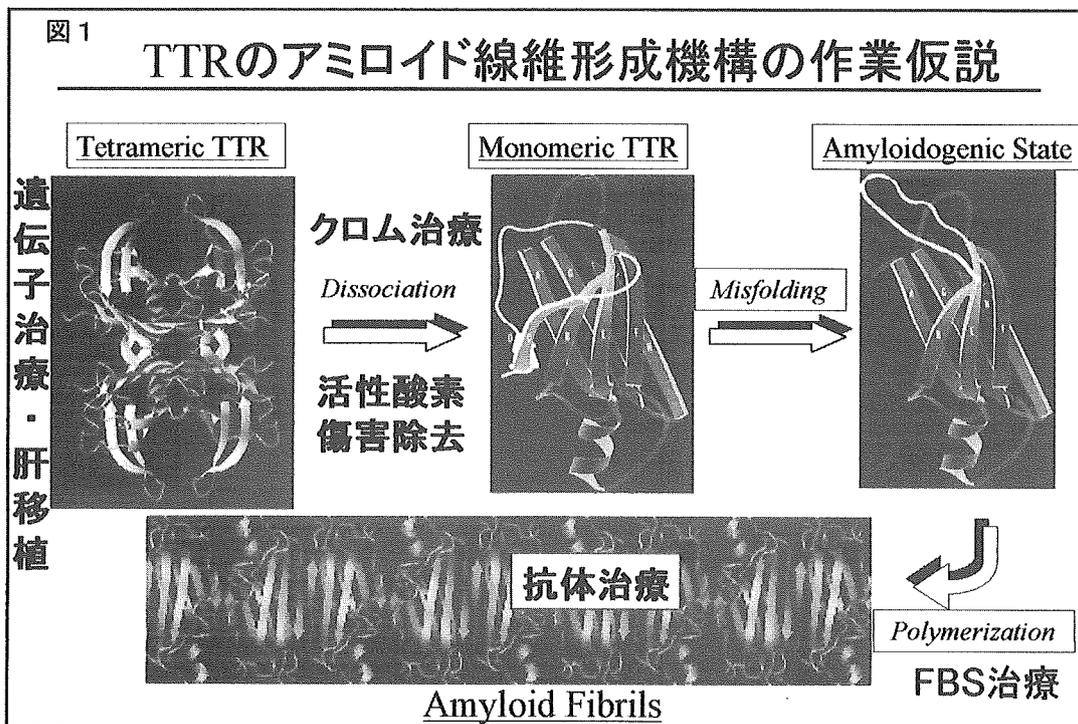
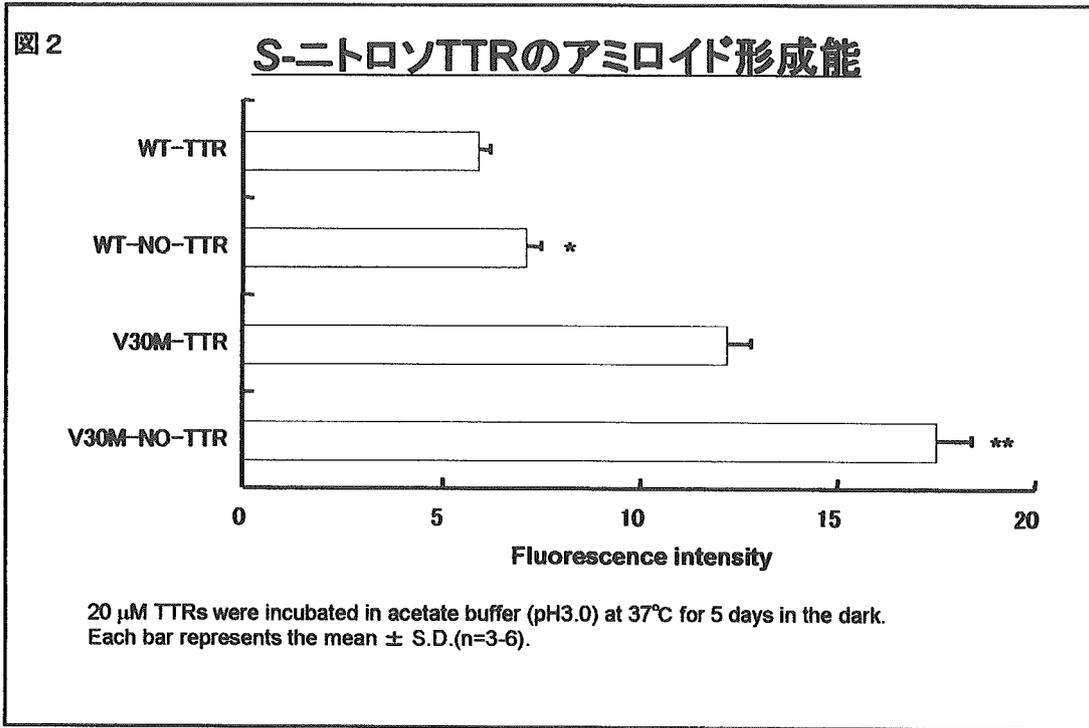
(2)アミロイドーシスの予防及び治療のための医薬

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 (難治性疾患克服研究事業)  
アミロイドーシスに関する調査研究班 分担研究報告書

## siRNAによる家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)の遺伝子治療における *in vivo*でのインターフェロン誘導の回避に関する検討

分担研究者 水澤英洋 東京医科歯科大学大学院脳神経病態学  
共同研究者 横田隆徳、久保寺隆行、仁科一隆、海野敏紀  
東京医科歯科大学大学院脳神経病態学

**研究要旨** 遺伝性疾患、ウイルス性疾患においてその変異遺伝子、病原遺伝子自体を small interfering RNA (siRNA) で治療するといった究極の遺伝子治療を旨とした基礎研究が進行している。今回、その siRNA による家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)の遺伝子治療を試み、まず FAP の変異遺伝子に対し特異的な siRNA を作製することに成功した。しかし、化学合成 siRNA をカチオニックリポソーム法で *in vivo* に投与した場合、血中にインターフェロンが誘導された。siRNA によるインターフェロン誘導は用量依存的であり、さらにそのインターフェロン誘導には siRNA 配列依存性あり、配列のなかにはインターフェロンを誘導しにくい配列が認められた。また、siRNA に 2'-O メチル化などの化学修飾を施すことによりインターフェロン誘導を軽減できることを確認した。まだまだ siRNA の *in vivo* への投与には解決すべき問題点も多いが、siRNA の高い抑制効果からその神経疾患への応用が急速に進展していくことは間違いないものと思われる。

### A. 研究目的

RNA interference は 2 本鎖 RNA (double-stranded RNA: dsRNA) によって配列特異的に mRNA が分解され、その結果遺伝子の発現が抑制される現象である。細胞内に導入された dsRNA が約 21 塩基の短い断片に分断され (siRNA)、これが RNA-ヌクレアーゼ複合体である RISC (RNA induced silencing complex) の形成を誘導し、siRNA 配列に相補的な配列をもつ mRNA を分解すると考えられている。

家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)を siRNA で治療しようとした場合、変異遺伝子のみを選択的に発現抑制して、野生型には作用しないことが望ましい。FAP の遺伝子変異のほとんどが点突然変異であり、そのような 1 塩基変異を識別する siRNA デザインを試みた。

また、siRNA による遺伝子治療に際し、化学合成 siRNA をカチオニックリポソーム法で投与した場合、インターフェロンを誘導することが最近報告されている。誘導されたインターフェロンは非特異的な遺伝子発現抑制の原因となり、

また他の炎症性サイトカインの誘導も起こるため、その回避は重要と考えられる。そこで、siRNA/カチオニックリポソームの *in vivo* におけるインターフェロン誘導の機序とその回避方法についても検討した。

### B. 研究方法

#### (1) 変異アレル特異的 siRNA のデザイン

FAP の代表的変異である点変異 Val30Met に対し、数種類の siRNA をデザインし、培養細胞に野生型または変異型トランスサイレチン遺伝子発現プラスミドと siRNA を共発現させ、野生型または変異型トランスサイレチンの発現をウエスタンブロッティングし、変異型トランスサイレチン特異的に発現抑制が可能か評価した。

#### (2) siRNA の *in vivo*でのインターフェロン誘導

各種マウスに siRNA とカチオニックリポソームの複合体を尾静脈より投与し、血中に誘導されるインターフェロン、IL12 などのサイトカインを ELISA を用いて測定した。さらに、siRNA によるインターフェロン誘導の機序を検討する

ために

- a) インターフェロンの誘導が siRNA の 1 本鎖、2 本鎖 RNA のいずれが起因しているか明らかにして、ミスマッチ 2 本鎖の効果を検討した。
- b) siRNA によるインターフェロンの誘導に配列依存性があるかどうかを複数の siRNA で検討した。
- c) 2'-O メチル化、2'-F 化、デオキシ化などの化学修飾によるインターフェロン誘導軽減の効果を検討した。

(倫理面への配慮)

マウスを用いた動物実験は東京医科歯科大学の動物実験委員会の規定に基づいて、動物愛護に留意して行った。

### C. 研究結果

#### (1) 変異アレール特異的 siRNA の作製

変異が 1 塩基の違いである Val30Met に対し作製した siRNA により、正常アレールの発現はほとんど抑制せずに、変異アレールの発現を著明に抑制できた。

#### (2) siRNA の *in vivo* でのインターフェロン誘導

siRNA/カチオニックリポソームの *in vivo* への投与により血中インターフェロン- $\alpha$ 、- $\beta$ 、IL12 が上昇した。上昇は一過性で 48 時間後には前値に回復した。さらに、

- a) インターフェロン誘導は 1 本鎖、2 本鎖いずれでも生じ、用量依存的であった。ミスマッチ 2 本鎖ではインターフェロン誘導は回避できなかった。
- b) siRNA によるインターフェロン誘導には配列依存性があり、配列の中にはインターフェロン誘導を起こしにくい配列もあった。これまで核酸では、配列中の GU 含量が多い程インターフェロン誘導が強いとの報告がなされてきたが、今回用いた siRNA 配列では配列中の GU 含量と実際のインターフェロン値との間に関連性はなかった。
- c) siRNA に 2'-O メチル化などの化学修飾をすることにより、インターフェロン誘導を軽減することができた。

### D. 考察

変異が 1 塩基の違いである点変異の場合には、

正常アレールと変異アレールの配列の差を識別し変異アレールのみを特異的に抑制する siRNA の作製が可能である。

siRNA をカチオニックリポソーム法で *in vivo* に投与する際にはインターフェロンが誘導され、その誘導には配列依存性があるが、インターフェロン誘導を起こしにくい siRNA 配列をデザインするのは容易ではないと考えられる。おそらく、インターフェロン誘導の軽減には siRNA 配列に化学修飾を施すことが有用であると考えられる。

### E. 結論

- (1) FAP に対し変異アレール特異的に発現抑制可能な siRNA を作製することができた。
- (2) siRNA をカチオニックリポソーム法で *in vivo* に投与する場合、インターフェロン誘導が生じ、その回避には siRNA への化学修飾が有用であると思われた。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Saito Y, Yokota T, Mitani T, Anzai M, Miyagishi M, Taira K, Mizusawa H: Transgenic siRNA halted amyotrophic lateral sclerosis in a mouse model. *J Biol Chem* 280: 42826-42830, 2005.
- 2) Akashi H, Miyagishi M, Yokota T, Watanabe T, Hino T, Nishina K, Kohara M, Taira K: Escape from the interferon response associated with RNA interference using vectors that encode long modified hairpin-RNA. *Molecular Bio Systems* 1: 382-390, 2005.
- 3) Hori S, Ohtsuki S, Ichinowatari M, Yokota T, Ohtsuki M, Terasaki T: Selective gene silencing of rat ATP-binding cassette G2 transporter in an *in vitro* blood-brain barrier model by short interfering RNA. *J Neurochem* 93: 63-71, 2005.
- 4) Kubodera T, Yokota T, Ishikawa K, Mizusawa H: New RNAi strategy for selective suppression of mutant allele in polyglutamine disease.

Oligonucleotides 15: 298-302, 2005.

2. 学会発表

- 1) 横田隆徳：RNA 干渉と神経疾患、第 46 回日本神経学会総会シンポジウム、鹿児島、5 月 25 日-27 日, 2005
- 2) 横田隆徳、久保寺隆行、叶内匡、水澤英洋：siRNA を用いた家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)に対する遺伝子治療。第 46 回日本神経学会総会、鹿児島、5 月 25-27 日
- 3) 久保寺隆行、横田隆徳、仁科一隆、海野敏紀、水澤英洋：*in vivo* における siRNA のインターフ

ェロン誘導。第 15 回アンチセンスシンポジウム、群馬、11 月 24-25 日

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 (難治性疾患克服研究事業)

アミロイドーシスに関する調査研究班 分担研究報告書

## FAP の肝移植の効果に関する検討

### -肝移植 10 年後に死亡した FAP ATTR V30M 患者の剖検例を通して-

分担研究者 安東由喜雄 熊本大学大学院医学薬学研究部病態情報解析学分野

共同研究者 山下太郎\*、姫野真悟\*\*、植田光晴\*、岡本定久\*、孫統国\*\*2、

植田明彦\*、三隅洋平\*、三隅将吾\*\*\*、庄司省三\*\*\*、内野誠\*

熊本大学医学薬学研究部、\*神経内科学分野、\*\*同病態情報解析学分野、\*\*\*薬学生化学分野

研究要旨 [目的] 肝移植後 10 年目に死亡した家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) 患者の剖検組織について臨床病理学的、生化学的検討を行い、肝移植の効果、肝移植後の FAP の病態変化を解析した。[方法] 症例は熊本県の FAP 集積地出身で家族歴のある FAP ATTR V30M の女性。40 歳時に発症し、その後上肢まで感覚障害が進行した。心エコー上 hyperrefractile echo を認めたが、心拡大、心不全症状はなかった。47 歳時にオーストラリアにて肝移植を施行し、その緑内障、心不全症状が徐々に増悪し、肝移植後 10 年目にうっ血性心不全で死亡した。本症例の臨床経過、剖検組織、臓器から抽出したアミロイドの解析を行った。[結果および考察] 肝移植後も網膜からの異型 TTR の産生は持続するが、本症例においても肝移植後に緑内障の出現がみられた。神経伝導検査所見の軽度の進行はあったが、感覚障害、筋力低下に悪化はなかった。心エコー上は肝移植後に左房径、左室後壁厚の拡大を認めた。剖検組織のアミロイド沈着量は、末梢神経などの諸臓器において著しく軽度であったが、右房には著明なアミロイド沈着が認められ、肝移植後に心アミロイドーシスが進行したと考えられた。心臓組織からアミロイドを抽出しトランスサイレチン (TTR) の比率を解析したところ、約 75% が正常型であり、移植前に沈着していたアミロイドからなる seed に対して、肝移植後の期間に正常 TTR がアミロイドを形成したと考えられた。[結論] 本例では、肝移植により眼、心臓の新たなアミロイド沈着は抑制できなかったが、膵臓を含むその他の臓器のアミロイド沈着は抑制されていた。FAP 患者への肝移植の適応検討には、移植前の心アミロイドーシスの評価が重要である。

#### A. 研究目的

肝移植は FAP ATTR V30M に対する有効な治療法であり肝移植後多くの患者で臨床症状の進行が停止しているが一部の患者では移植後にも症状の進行がみられる。今回我々は、肝移植後にも FAP の心症状が進行し、移植後 10 年目に死亡した患者について臨床病理学的、生化学的検討を行い、移植後の FAP の病態変化について解析した。

#### B. 研究方法

症例は熊本県の FAP 集積地出身で家族歴のある FAP ATTR V30M の女性。40 歳時に便秘症状

で発症し、その後下肢の感覚障害、筋力低下、上肢の感覚障害が出現した。心エコー上 hyperrefractile echo を認めたが、心拡大及び心不全症状はなかった。47 歳時にオーストラリアにて肝移植を施行し、その後出現した緑内障に対する治療のため入退院を繰り返したが、ニューロパチーの進行はなく、生活は自立していた。52 歳より出現した心不全症状が徐々に増悪し、発症 17 年目、肝移植後 10 年目、56 歳でうっ血性心不全で死亡した。本症例の臨床経過、検査所見、剖検所見を、肝移植を受けなかった FAP 患者、及び肝移植を受けたその他の FAP 患者と比較した。また、心臓から抽出したアミロイドの解析

を行った。

#### (倫理面への配慮)

本剖検、臓器の保存、及び解析は十分な説明後、家族の了解を得て行われた。

### C. 研究結果

熊本の FAP 患者においては、1994 年より、現在まで 33 人が肝移植を受けており、手術後 5 年生存率及び 10 年生存率は 100% であった。肝移植未施行の FAP 患者はでは平均 10 年あまりで死亡するのに対し、本患者を含む肝移植を受けた群では生命予後が延長していた(図 1)。

肝移植未施行例では、罹病期間に相関して臨床徴候の悪化がみられるが、本症例を含む肝移植を受けた患者では悪化がほぼ停止していた。

肝移植未施行では、罹病期間に相関して神経伝導検査のスコアが悪化したが、本患者を含む肝移植を受けた患者でも軽度悪化がみられた。

肝移植を受けず発症から 10 年後に死亡した 47 歳患者の腓腹神経において、アミロイドは神経線維の約 1/2 を占め、神経線維も萎縮していたのに対し、本例では、アミロイドの沈着は極めて微量であり神経線維の萎縮もみられなかった。

肝臓の病理所見では、小葉中心帯のうっ血、周囲の脂肪化によるニクズク肝を呈しており、小葉中心帯に出血壊死と肝細胞萎縮、小葉構造の改築がみられ、長期にわたるうっ血性心不全による変化が考えられた。

心エコー上、肝移植を受けた他の FAP 患者では変化が見られないのに対し、本患者においては左房径、及び左室後壁厚の拡大を認めた。

剖検組織のアミロイド沈着量は、消化管、腎臓などの諸臓器において、肝移植を受けずに死亡した FAP 患者と比較して著しく軽度であったが、右房には著明なアミロイド沈着がみられた。

心臓組織から抽出したアミロイドの解析では、異型 TTR が約 25%、正常 TTR が約 75%であった。

TTR は肝臓以外に膵臓の  $\alpha$  細胞からの産生が報告され、本例でも膵ラ氏島にコンゴレッド陰性、抗 TTR 抗体陽性の部分が認められた。本例では、肝移植後も膵臓から異型 TTR が産生さ

れ続けたと考えられるが、膵組織へのアミロイドの沈着は軽度であった。

### D. 考察

発症 7 年目に肝移植が行われ、移植後 10 年目に死亡した FAP V30M の剖検例について報告した。肝移植により、生命予後は改善し、神経症状の進行は抑制されており、末梢神経など諸臓器のアミロイド沈着は阻止されていた。

しかし、肝移植後も、正常 TTR による心臓の新たなアミロイド沈着は抑制できず、心臓に沈着したアミロイドの約 75%は正常 TTR によるものであり、移植前に沈着していたアミロイドからなる seed に対して、移植後の期間に正常 TTR がアミロイドを形成し沈着したと考えられた。このような症例もあるため、FAP 患者への肝臓移植の適応検討には、移植前の心アミロイドーシスの評価が重要であると考えられた。

肝移植後も網膜からの異型 TTR の産生は持続するが、本例においても肝移植後に緑内障の出現がみられており、肝移植では FAP の眼アミロイドーシスは阻止できないことが示された。

本症例において、肝移植後も膵ラ氏島から異型 TTR が持続的に賛成されたと考えられるが、膵臓へのアミロイド沈着は軽度であり、膵臓から産生される異型 TTR によるアミロイド形成への関与は低いと考えられた。

### E. 結論

肝移植は FAP に対する有効な治療法である。本例では、肝移植により眼、心臓の新たなアミロイド沈着は抑制できなかったが、末梢神経及び膵臓を含むその他の臓器のアミロイド沈着は抑制されていた。FAP 患者への肝臓移植の適応には、移植前の心アミロイドーシスの評価が重要である。膵臓から産生される異型 TTR のアミロイド形成への関与は小さいものと考えられる。

### F. 健康危険情報 特になし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1) Motomiya Y, Ando Y, Haraoka K, Sun X, Morita

- H, Amano I, Uchimura T, Maruyama I. Studies on unfolded beta2-microglobulin at C-terminal in dialysis related amyloidosis *Kidney Int*, 67:314-320, 2005
- 2) Araki-Sasaki K, Ando Y, Nakamura M, Kitagawa K, Ikemizu S, Kawaji T, Yamashita T, Ueda M, Hirano K, Yamada M, Matsumoto K, Kinoshita S, Tanihara H. Lactoferrin Glu561Asp facilitates amyloid formation in the cornea. *Brit J Ophthal* 89:684-648, 2005
- 3) Hirai T, Ando Y, Yamura M, Kitajima M, Hayashida Y, Korogi Y, Yamashita T, Yamashita Y. Transthyretin-related familial amyloid polyneuropathy: Evaluation of CSF enhancement on Serial T1-weighted and FLAIR images following intravenous contrast administration. *Am J Neuroradiol* 26:2043-2048, 2005
- 4) Nakamura M, Ando Y, Sasada K, Haraoka K, Ueda M, Okabe H, Motomiya Y. Role of extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) in patients under maintenance hemodialysis. *Nephron Clin Pract* 101: c109-c115, 2005
- 5) Matsunaga N, Anan I, Rosenberg P, Nagai R, Lundstrom O, Horiuchi S, Ando Y, Suhr OB. Advanced glycation end product is implicated in amyloid-related kidney complications. *Scand J Clin Lab Invest* 65: 263-272, 2005
- 6) Saito S, Ando Y, Nakamura M, Ueda M, Kim J, Ishima Y, Akaike T, Otagiri M. Effect of nitric oxide in amyloid fibril formation on transthyretin-related amyloidosis. *Biochemistry* 44: 11122-11129, 2005
- 7) Kawaji T, Ando Y, Nakamura M, Yamamoto K, Ando E, Takano A, Inomata Y, Hirata A, Tanihara H. Transthyretin synthesis in rabbit ciliary pigment epithelium. *Exp Eye Res*, 81: 306-312, 2005
- 8) Nakamura M, Yamashita T, Ueda M, Obayashi K, Sato T, Ikeda T, Washimi Y, Hirai T, Kuwahara Y, Yamamoto MT, Uchino M, Ando Y. Neuroradiologic and clinicopathologic features of oculoleptomeningeal type amyloidosis. *Neurology* 65: 1051-1056, 2005
- 10) Terazaki H, Ando Y, Fernandes R, Yamamura K, Maeda S, and Saraiva MJ. Immunization in familial amyloidotic polyneuropathy: counteracting deposition by immunization with a Y78F TTR mutant. *Lab Invest*, 86: 23-31, 2005
- 11) Takei Y, Ikeda S, Ikegami T, Hashikura Y, Miyagawa S, Ando Y, and Japanese Liver Transplantation Society. Ten years of experience with liver transplantation for familial amyloid polyneuropathy in Japan: outcomes of living donor liver transplantations. *Intern Med* 44: 1151-1156, 2005
- 12) Mitsuhashi S, Yazaki M, Tokuda T, Sekijima Y, Washimi Y, Shimizu Y, Ando Y, Benson MD, Ikeda S. Biochemical characteristics of variant transthyretin causing hereditary leptomeningeal amyloidosis. *Amyloid* 12: 216-225, 2005
- 13) Sato T, Ando Y, Susuki S, Mikami F, Ikemizu S, Nakamura M, Suhr O, Anraku M, Kai T, Suico MA, Shuto T, Yamagata Y, and Kai F. Chromium (III) ion and thyroxine cooperate to stabilize the transthyretin tetramer and suppress in vitro amyloid fibril formation. *FEBS Lett*, 580:491-496, 2006
- 14) Ando Y, Nakamura M, and Araki S. Transthyretin related familial amyloidotic polyneuropathy. *Arch Neurol*, 62: 1057-1062, 2005
- 15) Ando Y. Liver transplantation and new therapeutic approaches for familial amyloidotic polyneuropathy (FAP). *Med Mor Morphol* 38: 142-154, 2005
2. 学会発表
- 1) Ando Y. Development of a transgenic rat for familial amyloidotic polyneuropathy. The 6th International Symposium on Familial Amyloidotic Polyneuropathy and Other Transthyretin Related Disorders & The 5th International Workshop on Liver Transplantation in Familial Amyloid Polyneuropathy, Aug 25, 2005
- 2) 安東由喜雄. ミスフォールディングとアミロイド蛋白. 第一回 飛鳥医療福祉研究会 プログラム、奈良、3.17, 2005
- 3) 安東由喜雄. 微量蛋白の新たな解析法. 第 52 回日本臨床検査医学会イブニングセミナー、福岡、11.17, 2005
- 4) 安東由喜雄. 遺伝子検査の方向性. 第 1 回九州遺伝子検査研究会、福岡、9.3, 2005
- 7) 安東由喜雄. 家族性アミロイドポリニューロ

パチーの新しい治療法の開発. 第46回日本神経学会総会シンポジウム「難治性ニューロパチーの新しい治療戦略」、鹿児島、5.21, 2005

8) 安東由喜雄. トランスサイレチンの遺伝子変異と免疫反応. 第15回日本臨床化学会九州支部会総会、久留米、2.18, 2005

9) 安東由喜雄. 血清蛋白とアミロイドーシス: 血液疾患のトピックスと検査医学. 第6回日本検査血液学会、長崎、7.28, 2005

10) 安東由喜雄. NST と病院マネジメント. トランスサイレチンと検査医学. 第7回医療マネジメント学会、熊本、9.15, 2005

11) 安東由喜雄. トランスサイレチンと検査医学. 第52回日本臨床検査医学会シンポジウム「アミロイド蛋白と検査医学」、福岡、11.18, 2005

12) 安東由喜雄. 家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)の新たな診断・治療に関する研究. 第20回熊本県産学官技術交流会、熊本、1.24, 2006

13) 安東由喜雄. タスクフォースによる先端医学と社社会の調和のための基礎整備」班会議ワークショップ、熊本、1.30, 2006

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

##### 1. 特許取得（申請中）

(1) 部位特異的遺伝子変換促進剤及び遺伝子治療剤

(2) アミロイドーシスの予防及び治療のための医薬

##### 2. 実用新案登録 なし

##### 3. その他 なし

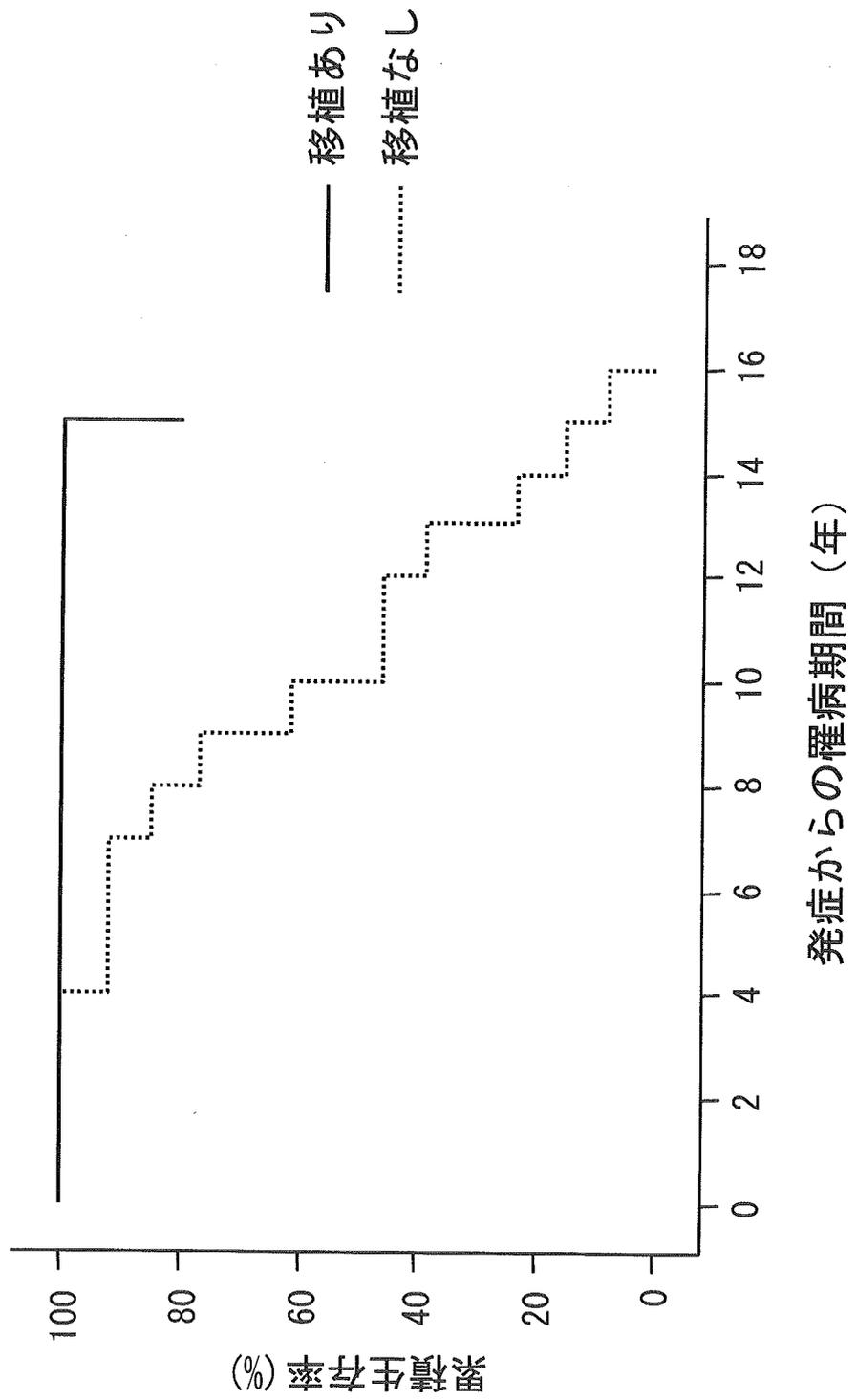


図 1

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)  
 アミロイドーシスに関する調査研究班 分担研究報告書

## FAP 患者肝を利用したドミノレシピエントの胃粘膜へのアミロイド沈着

分担研究者 池田修一 信州大学医学部神経内科、リウマチ・膠原病内科

共同研究者 武井洋一、矢崎正英 信州大学医学部神経内科、リウマチ・膠原病内科

**研究要旨** 家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)肝を利用したドミノ肝移植を施行した、ドミノレシピエント 4 名について、胃粘膜生検を施行し、アミロイド沈着の有無を検索した。4 名のドミノレシピエントのうち肝移植後 4 年で胃粘膜生検を施行した 2 名で同部位にアミロイド沈着を認めた。ドミノレシピエントの組織へのアミロイド沈着は肝移植後数年で病理組織学的に明らかになり、予想以上に早期に FAP を発症する危険性が示唆される。すべてのドミノレシピエントについて同様の調査が必要である。

### A. 研究目的

我々は、家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)肝を利用したドミノ肝移植を 2000 年 5 月以来、7 名の重篤な肝疾患患者に施行し、現在 6 名生存している。これらドミノレシピエントへのアミロイド沈着および FAP 発症の有無について検討した。

### B. 研究方法

患者は 6 名 (男 5 女 1 肝硬変肝細胞癌 5 名、代謝性肝疾患 1 名、肝移植時年齢 32-61 歳 中央値 54 歳)。ドミノ肝移植を施行したドミノレシピエントについて、神経学的な診察を施行し、FAP 症状の有無を確認。さらに説明と同意を得た 4 名のドミノレシピエントで、胃・十二指腸粘膜生検を行い、生検組織をホルマリン固定。Congo Red 染色にてアミロイド沈着の有無・程度について検索した。さらにアミロイド前駆蛋白の同定のために、1 名のドミノレシピエントで免疫組織化学染色にてトランスサイレチン(TTR)沈着の有無を検討した。

(倫理面への配慮)

胃・十二指腸生検を施行するにあたり、十分に説明を行い、同意を得たものについてのみ、生検を施行した。

### C. 研究結果

FAPの典型的な症状としての末梢神経障害および自律神経障害を認めたドミノレシピエントはいなかった。肝移植4年後に胃・十二指腸生検を施行したドミノレシピエント(肝移植時61歳男性HBV(+), 肝硬変、肝細胞癌)で、胃粘膜筋板を中心に斑状のCongo red陽性沈着物を認めた。偏光顕微鏡で緑黄色複屈折を示しアミロイドの沈着と診断した。免疫組織化学染色を施行したところ抗TTR抗体陽性であり、FAP肝(グラフト)由来のアミロイドと考えられた。

同様に肝移植後4年で胃・十二指腸生検を施行したドミノレシピエント(肝移植時52歳女性HBV(+), 肝硬変、肝細胞癌)で、ごく少量のCongo red陽性沈着物を認めた。偏光顕微鏡で緑黄色複屈折を示し、アミロイド沈着と診断した。

肝移植後32ヶ月で胃粘膜生検を施行した32歳男性と、29ヶ月で生検を施行した57歳男性では、胃粘膜へのアミロイド沈着は認められなかった。

### D. 考察

FAP 患者肝を利用したドミノ移植は 1995 年にポルトガルで開始されたが、本邦では現在までに 26 名のドミノ肝移植が施行されている。ポルトガルから肝移植後 3 年で皮膚へのアミロイド沈着が認められた、との報告がある。また英国では肝移植後 8 年でトランスサイレチンアミ

ロイドーシスが発症したとの報告がある。これらの報告から、従来予想より早期に組織へのアミロイド沈着が開始し、アミロイドーシスを発症する危険性が指摘されている。ブラジルからは肝移植後 12 ヶ月から 40 ヶ月を経過した 7 名のドミノレシピエントについて、胃粘膜生検組織にはアミロイドを認めなかったと報告されている。今回の我々の結果は肝移植後 4 年以前に胃粘膜にアミロイド沈着を認めており、肝移植後 3-4 年で胃粘膜のアミロイドが確認されることを示している。肝移植後 3 年で皮膚へのアミロイド沈着が認められたとする、ポルトガルの報告と一致している。FAP 患者ではアミロイドが沈着し症状が出現するまでに数十年かかるのに対し、ドミノレシピエントでは早期からアミロイド沈着が認められる一因として、組織の老化が関与している可能性が指摘されているが、詳細は不明である。高齢者ほど早期にアミロイドが沈着するか否か、どのドミノレシピエントでも同様なアミロイド沈着過程をたどるのか、について早急に調査する必要がある。

#### E. 結論

ドミノレシピエントの組織へのアミロイド沈着は肝移植後数年で病理組織学的に明らかになり、予想以上に早期に FAP を発症する危険性が示唆される。すべてのドミノレシピエントについて同様の調査が必要である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Takei Y, Ikeda S, et al. Ten years of experience with liver transplantation for familial amyloid polyneuropathy in Japan: outcomes of living donor liver transplantations. Intern Med 44: 1151-1156, 2005.

##### 2. 学会発表

1) Takei Y, Ikeda S, Ikegami T, Hashikura Y, Miyagawa S. Changing from tacrolimus to cyclosporin is recommended in familial amyloid polyneuropathy (FAP) patients with severe diarrhea after liver transplantation. The 6<sup>th</sup> International Symposium on Familial Amyloid Polyneuropathy and Other Transthyretin Related Disorders & The 5<sup>th</sup> International Workshop on Liver Transplantation in Familial Amyloid Polyneuropathy La Jolla, California, USA. August 24-26, 2005

2) 武井洋一, 池田修一. 家族性アミロイドポリニューロパチー患者の肝移植後の経過 肝移植後のマネージメントー長期予後改善への課題 DDW-Japan 神戸 10月7日

#### 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 (難治性疾患克服研究事業)  
 アミロイドーシスに関する調査研究班 分担研究報告書

## 新たなガンマ・セクレターゼ調節因子の検索

分担研究者 水澤英洋 東京医科歯科大学大学院脳神経病態学(神経内科学)  
 共同研究者 三條伸夫 東京医科歯科大学大学院脳神経病態学(神経内科学)

**研究要旨** 新たなガンマ・セクレターゼ調節因子の検索のため Time-controlled transcardiac perfusion cross-linking 法を用いて固定したマウスの脳を、ガンマ・セクレターゼの構成因子である Aph-1 に対する抗体で affinity purify し、mass spectroscopy で解析した。候補となる因子を同定し、培養細胞に強制発現させた後、免疫共沈降にて presenilin や nicastrin との結合の有無について確認したところ、候補となる蛋白質のうちある蛋白質で presenilin、nicastrin、Aph-1 との結合が確認され、別の蛋白質で Aph-1 とのみ結合が確認された。このことより、ガンマ・セクレターゼ複合体は既に報告している 4 因子の他に、その活性を調節する因子などが複数存在する可能性がある。その調節メカニズムを解明することにより、新たな治療法の手がかりが得られる可能性がある。

### A. 研究目的

アミロイド仮説に基づいたアルツハイマー病の根本的治療戦略を考えた場合、アミロイドβ蛋白質の産生調節因子を同定し、セクレターゼ調節のメカニズムを解明することは、有効で安全な治療法を計画する際の前提となる。

ガンマ・セクレターゼの構成因子は、現在 presenilin、nicastrin、Aph-1、Pen-2 の 4 つが基本構成因子として知られている(Fraering PC. et al. Biochemistry 2004;43:9774-9789. 他)。しかし、複合体としてのセクレターゼ活性が最も強いのは、670kDa 付近の複合体であるとの報告もあり(Gu Y. et al. J Biol Chem, 2004; 279: 31329-36)、更なる構成因子やセクレターゼの調節因子の存在が推測されている。実際、2005 年には「CD147」(Zhou S. et al. PNAS, 2005; 102: 7499-504)が negative regulator として、2006 年には「Phospholipase D1(PLD1)」(Cai D. et al. PNAS 2005; 103: 1941-46)が同様に negative regulator として報告されている。

新たなガンマ・セクレターゼ構成因子、あるいは調節因子を検索するため、カナダ・トロント大学 Centre for Research in Neurodegenerative Diseases (CRND)との共同研究として、Time-controlled transcardiac perfusion cross-linking

(tcTPC)法と Aph-1 に対する抗体を用いた affinity purification を試みた。

### B. 研究方法

マウス脳を cross-linker 入りの 20°C の buffer で transcardiac に 15 分間環流し、液体窒素で固定した後に homogenate した。detergent 入りの buffer を加え sonication を行った後、不溶成分を除去し、抗 Aph-1aL-C 末端に対する抗体と Affi-gel を用いて免疫沈降を行った。蛋白質複合体を抽出した後 mass spectroscopy にて解析した (Schmitt-Ulms G. et al. Nature Biotechnol, 2004; 22: 724-31)。解析結果のアミノ酸配列を基に database より候補となる蛋白質を同定した。

候補となる蛋白質の construct を作成し、HEK293 培養細胞へ導入し、蛋白質を強制発現させ、1%CHAPSO で蛋白質複合体を抽出し 10-40% Glycerol gradient 分画法で細胞抽出物を分画した。そして既知の 4 つのガンマ・セクレターゼ構成因子に対する抗体を用いた immunoblotting で既知の全ての因子と overlap する候補蛋白を選出した。

それらの候補蛋白と各構成因子の結合を確認するため抗 presenilin 抗体、抗 nicastrin 抗体、抗 Aph-1aL 抗体を用いて免疫沈降を行った。

#### (倫理面への配慮)

マウスを用いた実験はトロント大学 CRND で行い、カナダの倫理規定に従った。

#### C. 研究結果

2種類の蛋白質に新規のガンマ・セクレターゼ構成因子、あるいは調節因子の可能性が確認できた。1つめの蛋白では免疫沈降で、nicastrinと強く、presenilin、Aph-1とは弱く免疫沈降で結合が確認できた。別の蛋白質ではAph-1とのみ結合が確認できた。

#### D. 考察

$\gamma$ セクレターゼは APP のみならず、Notch、ErbB-4 等の 1 回膜貫通型蛋白質を膜貫通領域で presenilin 依存性に切断することが分かっている。Notch はシグナル蛋白質であり、胎生期および成人期の細胞に不可欠であることが知られている (Wong GT. et al. J Biol Chem 2004; 279(13): 12876-82)。また、アミロイド $\beta$ 蛋白自身も重合した場合には細胞毒性を有することが確認されているが、単体では抗酸化作用も有するという報告があり (Zou K. et al. J Neurosci 2002; 22(12): 4833-41)、単純に $\gamma$ セクレターゼ活性を阻害することでは AD 治療戦略は成り立たない。よって、アルツハイマー病の根本的な治療戦略としては APP に特異的な $\gamma$ セクレターゼ調節因子のメカニズムを解明し、特に凝集能の高いアミロイド $\beta$ (42)の産生を特異的に制御する薬剤やシステムを用いることが必要である。

既に述べたように、ガンマ・セクレターゼの調節因子は CD147、PLD1 に加え、最近 Daniel Curtis らのグループより、Drosophila の genetic screening を用いて新たに nicastrin を含む 19 の presenilin 調節因子が報告された (Mahoney MB. et al. Genetics 2006)。このことはガンマ・セクレターゼの調節因子は複数存在し、そのメカニズムも複数存在していることを示唆している。それらの調節因子や調節メカニズムの中には、アルツハイマー病の治療として上手に利用できるものも存在する可能性がある。

#### E. 結論

アルツハイマー病の根本的な治療法の開発のために、新規のガンマ・セクレターゼ構成因子、あるいは調節因子の検索を tcTPC 法と抗 Aph-1 抗体を用いた affinity purification を利用して行った。新たな候補因子を同定することに成功したので、引き続き機能解析を行う。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1)三條伸夫, 水澤英洋: アルツハイマー病の遺伝子. ゲノム医学 5(3): 27-32、2005 年.
- 2)Petit A, Kawarai T, Paitel E, Sanjo N, Maj M, Scheid M, et al.: Wild-type PINK1 Prevents Basal and Induced Neuronal Apoptosis, a Protective Effect Abrogated by Parkinson Disease-related Mutations. J Biol Chem 280(40): 34025-34032、2005 年.
- 3)Uchihara T, Sanjo N, Nakamura A, Han K, Song SY, St George-Hyslop P, et al.: Transient abundance of presenilin 1 fragments/nicastrin complex associated with synaptogenesis during development in rat cerebellum. Neurobiol Aging 27(1): 88-97、2006 年.

##### 2. 学会発表

- 1)三條伸夫, 水澤英洋. 内因性 Aph-1 の細胞内分布パターン: 第 24 回日本痴呆学会、大阪、9 月 30 日-10 月 1 日、2005 年.
- 2)三條伸夫, 水澤英洋, 片山泰一, Peter St. George-Hyslop, Paul E Fraser: 内因性 Aph-1 の切断および細胞内移動. 第 46 回日本神経学会総会、鹿児島、5 月 25 日・26 日・27 日、2005 年.

#### 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 (難治性疾患克服研究事業)  
 アミロイドーシスに関する調査研究班 分担研究報告書

## Beta-site APP cleaving enzyme 1 (BACE1)の発現に関する解析

分担研究者 玉岡 晃

筑波大学大学院人間総合科学研究科病態制御医学専攻  
 神経病態医学分野 (神経内科学)

共同研究者 原田祐嗣\*、石井一弘\*、荒木 亘\*\*

\*筑波大学大学院人間総合科学研究科病態制御医学専攻  
 神経病態医学分野 (神経内科学)

\*\*国立精神神経センター神経研究所疾病研究第六部

**研究要旨** アルツハイマー病(AD)脳に沈着するアミロイドβ蛋白(Aβ)は Aβ前駆体蛋白質(APP)がβ-secretase、γ-secretase で切断されることによって生成されるが、本研究では主要なβ-secretase である BACE1 の産生量が培養細胞系に酸化ストレスを負荷することで変化するかどうかを解析した。BACE1 濃度は未処理のものと比較して酸化処理後増加する傾向が認められた。AD の病態において酸化ストレスが BACE1 の発現増加を介して関与している可能性が示唆された。

### A. 研究目的

アルツハイマー病(AD)脳に沈着するアミロイドβ蛋白(Aβ)は Aβ前駆体蛋白質(APP)が N 末端をβ-secretase、C 末端をγ-secretase で切断されることによって生成される。一方、AD 脳には各種の酸化物の蓄積が認められ、AD の病態に酸化ストレスが関与していることが推察されている。本研究では、培養細胞系に酸化ストレスを負荷することで主要なβ-secretase である BACE1 の産生量が変化するかどうかを解析した。

(倫理面への配慮)

本研究は培養細胞を用いたものであり、倫理面への配慮は特に必要がなかった。

### C. 研究結果

BACE1 濃度は未処理のものと比較して酸化処理後 3 時間で 1.25 倍、6 時間で 1.37 倍と増加していた。AD の病態において酸化ストレスが BACE1 の発現増加を介して関与している可能性が示唆された。

### B. 研究方法

BACE1 の C 末端側 (485-501, LRQQHDDFADDISLLK)からなる合成ペプチドを各々ウサギに免疫し、ポリクローナル抗体を作成し、キャラクタライズを行った。BACE1 の産生が豊富な HTB-148/H4 細胞に 20 μM の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を加え、3 および 6 時間処理した。酸化処理後のものと未処理のものをバッファーにてホモジェナイズした後、抗 BACE1 抗体を用いて Western blotting し、BACE1 の蛋白量を densitometer にて測定した。

### D. 考察

既に酸化ストレスによって細胞外や細胞内の Aβが増加することが報告されており、酸化ストレスは Aβとともに AD の病態において互いに関連しあいながら重要な役割を果たすものと考えられてきた。本研究において酸化ストレスが BACE1 の発現を増加させる傾向を示すことが明らかとなったことより、BACE1 の阻害剤が抗酸化剤とともに AD の治療薬としての可能性を有することが示唆された。今後、酸化ストレスによる BACE1 の動態と Aβ量や APP のプロセッシングとの関係についても検討していく必要がある。

る。

## E. 結論

酸化ストレスにより A $\beta$  の産生が亢進し、AD の発症に関与している可能性が疑われた。

## F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 玉岡 晃：認知症の神経徴候の診方. D&N Trends、8：3、2006
- 2) 玉岡 晃：アルツハイマー病と脳血管性痴呆の鑑別. D&N Trends、7：3、2005
- 3) 玉岡 晃：自然科学者の視点からみた生と死（養老孟司、柏木哲夫）. 死の臨床 45、28（1）：3-6、2005.
- 4) 玉岡 晃：アミロイドカスケード仮説に基づく治療戦略. Modern Physician、25(9): 1096-1100、2005
- 5) 玉岡 晃：認知症の特有な歩行障害. D&N Trends、6：3、2005
- 6) 玉岡 晃：アミロイド $\beta$  蛋白から見たアルツハイマー病の分子病態. 昭和医会誌、65（1）：19-34、2005
- 7) 玉岡 晃：神経難病 ALS 患者の症状の進行に合わせた支援・対策. 難病と在宅ケア、11（6）：21-24、2005
- 8) 玉岡 晃：アルツハイマー病と UBQLN1 遺伝子変異の家族ベースでの関連性. The Mainichi Medical Journal、1（3）：224-225、2005
- 9) 玉岡 晃：しゃっくりの臨床. Brain Medical、17（2）：33-40、2005
- 10) 玉岡 晃：アルツハイマー病の抗体療法. D & N Trends、5：3、2005
- 11) 石井一弘、玉岡 晃：アルツハイマー病とスタチン. 神経進歩、40（3）：453-459、2005
- 12) 玉岡 晃：ALZHEIMER 病：スタチンによる制御は可能か？—ALZHEIMER 病病態におけ

るコレステロール制御の意義. 医学のあゆみ、212（9）：813-818、2005

13) 玉岡 晃： $\beta$  セクレターゼ. 神経進歩、40（3）：292-306、2005

14) Harada H, Tamaoka A, Ishii K, Shoji S, Kametaka S, Kametani F, Saito Y, Murayama S: Beta-site APP cleaving enzyme 1 (BACE1) is increased in remaining neurons in Alzheimer's disease brains. Neurosci Res. 54(1): 24-29, 2006.

### 2. 学会発表

- 1) 玉岡 晃；神経疾患の病態と治療. 平成17年度茨城県病院薬剤師会合同研修会（つくば）、1月14日、2006
- 2) 玉岡 晃：アルツハイマー型痴呆の臨床と早期診断. 取手医師会学術講演会、9月27日、2005
- 3) 玉岡 晃：アルツハイマー病とパーキンソン病の臨床と病態. 日本ベーリンガーインゲルハイム・セミナー、7月29日、2005
- 4) 玉岡 晃。原田祐嗣、石井一弘、庄司進一、斉藤祐子、村山繁雄：アルツハイマー病脳の低密度膜画分における過酸化脂質の解析—対照との比較検討—。第46回日本神経学会総会（鹿児島）、5月26日、2005
- 5) 原田祐嗣、玉岡 晃、石井一弘、亀高 諭、亀谷冬由樹、斉藤祐子、村山繁雄、庄司進一：アルツハイマー病脳における BACE-1 および A $\beta$  の解析. 第46回日本神経学会総会（鹿児島）、5月26日、2005
- 6) 玉岡 晃：アミロイド $\beta$  蛋白からみたアルツハイマー病の分子病態. 東北大学神経内科特別セミナー、1月28日、2005

## 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 (難治性疾患克服研究事業)  
アミロイドーシスに関する調査研究班 分担研究報告書

## 脳 Aβ42 選択的除去法の検討

分担研究者 東海林幹夫 弘前大学医学部脳神経統御部門

共同研究者 瓦林毅\*、阿部康二\*、松原悦朗\*\*

\*岡山大学大学院医歯学総合研究科神経病態内科学

\*\*国立長寿医療センター研究所アルツハイマー病研究部

**研究要旨** アルツハイマー病に特異的な病態惹起分子として脳 Aβ42 分子種に着目し、その選択的除去法によるアルツハイマー病の治療法構築を試みた。Aβ42 分子種特異的モノクローナル抗体を用いた受動免疫療法を行い、その有効性をアルツハイマー病モデルマウス(Tg2576)において検討した。抗体投与群では、脳内老人斑の除去とその際に可溶化された Aβ42 分子種の脳外への選択的クリアランス増加が認められた。Aβ42 分子種特異的モノクローナル抗体による受動免疫療法は脳 Aβ42 の選択的除去が可能であり、アルツハイマー病の病態特異的な治療法として有望と考えられた。

### A 研究目的

アルツハイマー病に特異的な治療法構築のためには、その病態を惹起するようなより特異的な Aβ 分子種を標的とした治療法構築が不可欠である。我々はアルツハイマー病モデルマウス(Tg2576)における検証から、アミロイド沈着に先行し、記憶障害の出現する時期に Lipid Rafts と呼ばれる脳内のマイクロドメインに Aβ42 ダイマー分子種が出現することを見だし、この Aβ42 ダイマー分子種こそがアルツハイマー病の病態惹起分子種であろうと推察をした。本年度はまずこの分子を標的とした脳内 Aβ42 分子種の選択的除去法の有用性を検証するため、Aβ42 分子種特異的モノクローナル抗体による受動免疫療法に着手した。腹腔内投与と脳室内投与での検証を行った。

### B. 研究方法

3 カ月齢の Tg2576 mice (>10 匹)で Aβ42 分子種特異的モノクローナル抗体 (BC05) 0.5mg/週の腹腔内投与を 6 週間、さらに 1mg/週で 34 週間の計 9 カ月間施行し、脳内 Aβ 蓄積量(可溶性 vs 不溶性)と血液中 Aβ 量を BNT77/BA27, BNT77/BC05 ELISA にて Aβ40, Aβ42 を分別定量した。脳内アミロイド除去のより効果的な治療

法として 18 月齢 Tg2576 の脳室内に Alzet pump を用いて BC05(2mg/ml)を 14 日間持続投与した。脳内 Aβ 蓄積の評価は Aβ40, Aβ42 特異ポリクローナル抗体(Biosource)を用いた免疫染色によって行った。また前記の ELISA にて脳・脳脊髄液・血液中 Aβ40, Aβ42 を分別定量しそのクリアランス効果を検証した。

(倫理面への配慮)

本研究ではヒト検体は用いないので、通常の動物実験倫理規定に従った。

### C. 研究結果

腹腔内 BC05 投与群においては免疫組織学的に老人斑として観察される Aβ 蓄積抑制効果が認められた。標識 BC05 抗体を用いた腹腔内投与マウスにおいて標識陽性老人斑が認められ、BC05 が脳内でアミロイドに結合していることが確認された。一方、ELISA の結果から、脳内不溶性(グアニジン塩酸可溶性) Aβ42 の減少傾向、脳内リン酸緩衝液可溶性 Aβ42 と血液中 Aβ42 の選択的な有意な上昇が認められた。

一方、脳室内投与群では免疫組織化学的には、治療群において投与側の脳室周囲の大脳皮質を中心に Aβ42 アミロイド沈着の減少を認めた。さら