

る。わが国の高齢社会の特長は、

- 1) 女性が世界第一位，男性は世界第二位の長寿であること，
- 2) 65歳以上の高齢者比率が最も高い(20%)こと，
- 3) 75歳以上の後期高齢者比率が最も高い(9%)こと，
- 4) 高齢化社会(高齢者比率7%)から高齢社会(高齢者比率14%)へ世界最短の24年間で移行したこと，

などがあげられる。このような超高齢社会では，高齢うつ病患者や高齢認知症患者が確実に増加していくことが予想されている。

### 加齢に伴う記憶障害と認知障害

これまで，高齢者の物忘れは生理的な現象であり，高齢になるとだれでも物忘れをするものと考えられていた。このような状態は，古くは良性老年性物忘れ(benign senescent forgetfulness, Kral, 1962)，あるいは加齢に伴う記憶障害[age-associated memory impairment (AAMI), Crook, 1986]などと呼ばれていた。ところが，近年の脳科学の知見は，必ずしも脳神経細胞が加齢により減少していないこと，高齢者の糖代謝・血流量は健康な高齢者のみを選択して測定する限りでは加齢による低下が少ないこと，また，高齢者の海馬歯状回において50歳代を過ぎても神経新生(neurogenesis)が認められることなどから，高齢者における記憶障害は必ずしも生理的なものではなく，すべての人が物忘れを呈するわけではないと理解されるようになった。

1994年以降も数多くの概念が提出されており，軽度認知症(mild cognitive disorder, WHO, 1993)，加齢関連認知力低下(age-related cognitive decline, APA, 1994)，軽度神経認知障害(mild neurocognitive disorder, APA, 1994)，年齢随伴認知低下[age-associated cognitive decline (AACD), Levy, 1994]などがあるが，1997年にPetersenらの軽度認知障害[mild cognitive impairment (MCI), Petersen, 1997]，あるいはカナダのグループによる非認知症性認知障害[cognitive impairment no dementia (CIND), Graham, 1997]などの概念が注目されている。

図1に，社会生活を営む個人の生活機能を3つに区分して示した。個人はすべからく生物的生活機能を有する。この生物的生活機能は，呼吸・循環・代謝などの生物個体としての生命維持機能のことであるが，もちろん人は，これに加えて，個人的生活機能と社会的な生活機能を有する。個人的生活機能は，自らの食事，睡眠，排泄，衛生管理などの個人生活を維持するための機

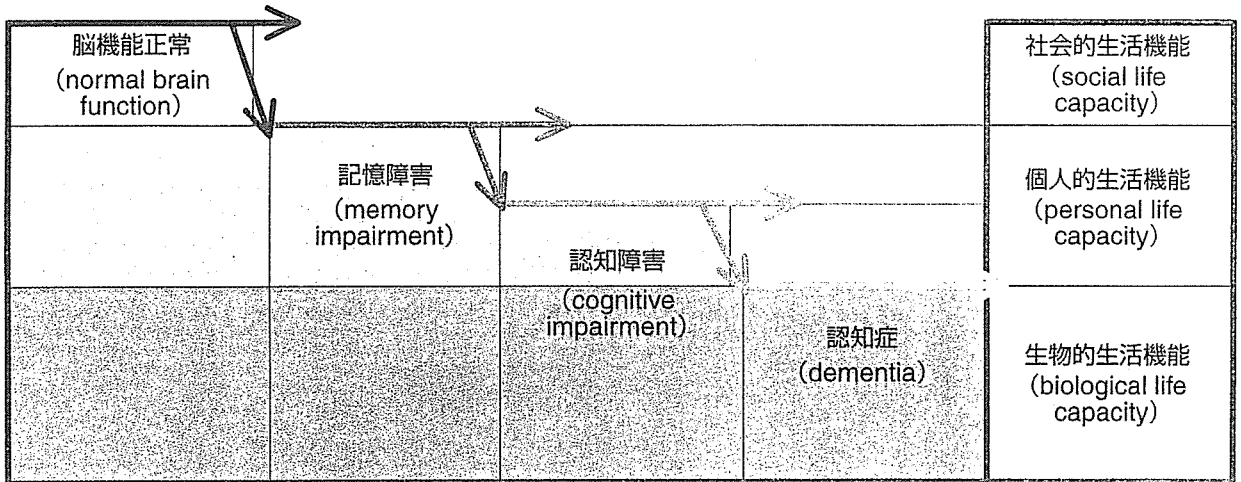


図1 社会生活を営む個人の生活機能を3区分した模式図

能であり、認知症ではこの個人的生活機能が大きく障害される。多くの人は、他人とコミュニケーションし、自分の行動を介して、他人とかかわりをもちながら生活している。このような対人関係を中心とした生活機能を社会的な生活機能と呼ぶが、高齢者になると、このような社会機能が障害されてくる。軽度認知障害 (MCI) などの、健常と認知症の中間のレベルを表す概念は、社会的な生活機能は障害されていると考えることができ、MCI 相当のレベルは個人的な生活機能は維持されているが、社会的な生活機能が障害されているレベルをさすと考えることができる。

## MCI 概念 : MCI のはじまり

このような概念化のもとに、生物学的マーカーの位置づけを考えてみたい。図2にアルツハイマー病の罹病期間と ADAS-cog (Alzheimer's disease assessment scale-cognition) でみた認知機能の変化を示す。アルツハイマー病における認知機能の低下は、初期にはゆっくりと進行し、中期に急速に悪くなり、また末期に低下速度はゆっくりとなる。このようなS字上のカーブをアルツハイマー病発症以前にまで外挿したものである。この図で示したいことは、MCIの始まりはきわめてゆっくりとした認知機能の低下であり、その始まりの時期を特定することは困難であるという事実である。認知機能の臨床評価、あるいは神経心理学的検査所見は、いずれも正常から連続してきわめてゆっくりと低下していくものであり、その始まりの時点を特定することは

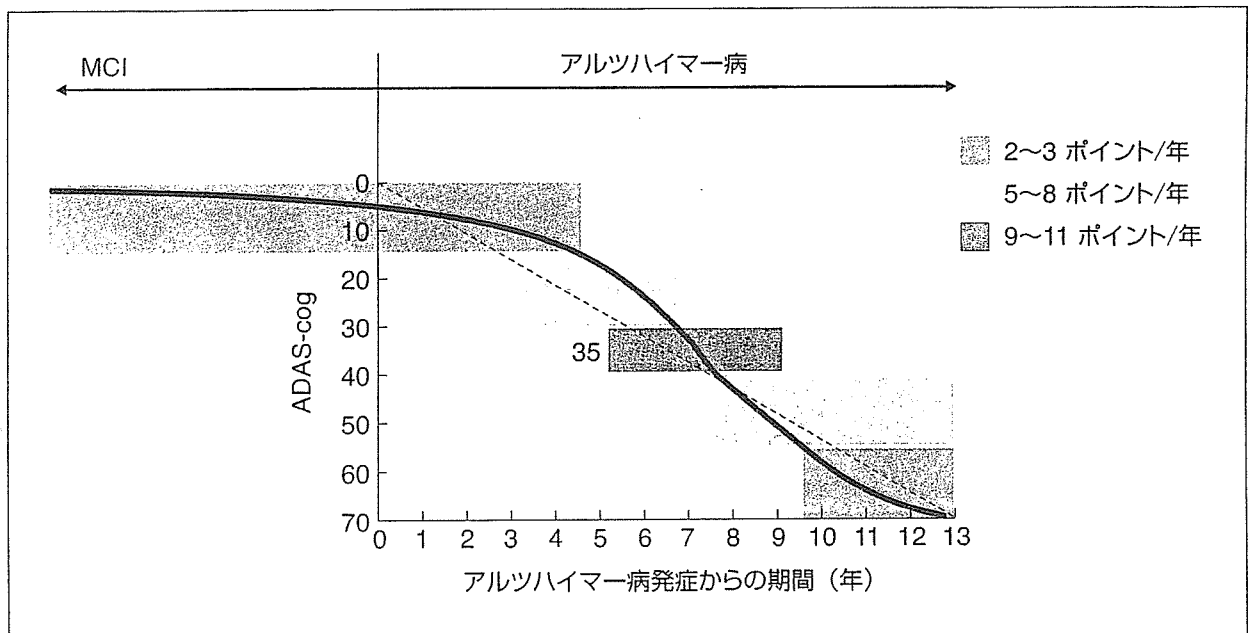


図2 MCIからアルツハイマー病へ：縦断的認知力低下

きない。したがって、このような臨床評価によりMCIの開始時点を特定することは不可能であろう。

近年、アルツハイマー病の生物学的マーカーとして、脳脊髄液中のタウ蛋白の上昇とアミロイド蛋白42の低下が示されている。そして、両者の変化はアルツハイマー病の初期にすでに確実に認められることが示されている。一般に、アルツハイマー病の基本病理として脳内アミロイド沈着と神経細胞内神経原線維変化、神経細胞脱落がいわれているが、脳内アミロイド沈着は臨床症状が発現する数十年前からすでに観察される。生物学的変化が先行して、その後一定の時間経過の後に臨床症状が観察されることを考えると、MCIの診断マーカーとして生物学的診断マーカーの有用性が示唆される。

図3に、健常者、MCI患者、アルツハイマー病患者、その他の認知症患者の脳脊髄液中のタウ蛋白とアミロイド蛋白の変化を示した。アルツハイマー病患者ではタウ蛋白の上昇、アミロイド蛋白の減少が認められる。MCI患者においては、タウ蛋白は上昇しているが、アミロイドの低下は認められない。健常者から、MCIを経過してアルツハイマー病に至る経路を考えると、まず脳脊髄液中のタウが上昇した状態がMCIに対応し、その後にアミロイド蛋白の低下が認められるようになるとアルツハイマー病が発症すると考えられる。このような生物学的マーカーを組み合わせることによりMCIを診断することが可能である。

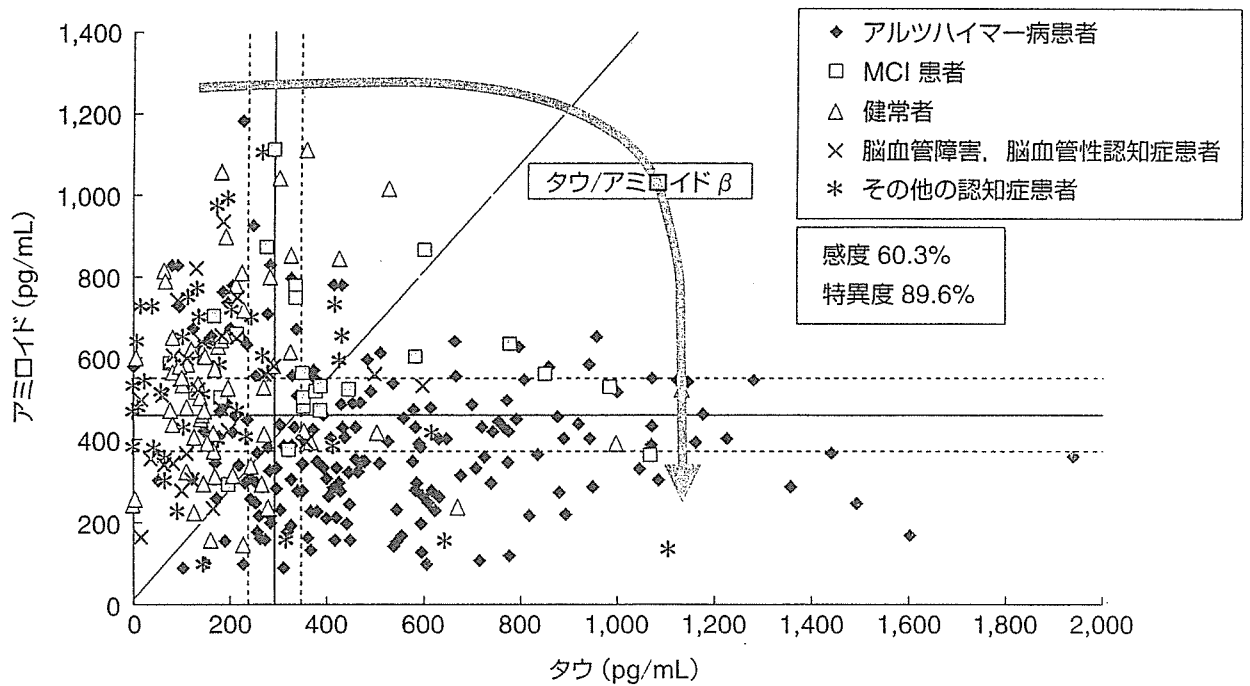


図3 脳脊髄液中のアミロイドβ蛋白42とタウ蛋白によるMCIの診断

### MCI 概念：MCIのおわり

認知症は、記憶障害と認知障害のために、社会的生活が大きく障害されているものと定義される。DSM (diagnostic and statistical manual)-4 の診断基準においても、病前の社会生活機能と比較した生活機能の低下が問題とされており、かならずしも認知症を定める絶対的基準は明らかにされていない。この点は、神経生物学的立場からみると、認知症の診断をきわめて曖昧なものにしているということができよう。社会生活機能の障害は、個人の機能的予備力によって大きく左右されるものであり、個人の社会的環境により左右されうる。これまでも低い教育歴は認知症のリスクとなることが指摘されており、もともと知的レベルに余裕がないので、少しの認知力の低下で認知症と診断されるのではないかと考えられていた。社会環境の違いにより、認知症と診断されたりされなかったりすることの問題点が指摘されてきた。

ここで議論したいことは、認知症の診断基準としてこのようなきわめて社会的環境により左右される内容を組み入れることの妥当性である。むしろ、生物的生活機能は、その定義からみてもきわめて生物学的な事象であり、神経生物学的に規定しうるものであるという事実を指摘したいのである。個人的生活機能という健常者と認知症患者との境界に位置する部分を想定すること

により、認知症の生物学的診断を統一したものにできる可能性がある。このように、MCIの概念をこれまでの認知症の概念と神経生物学的理解とのギャップを埋めるものとして整理することにより、認知症の診断基準が生物学的立場からも受け入れやすくなるものと考えられる。

## 生物学的診断マーカーに求められる性質

これまで、数多くの生物学的診断マーカーについて検討されてきた。われわれも厚生労働省の研究班として、アルツハイマー病の生物学的診断マーカーに取り組んできた。前年度までの研究により、1つの生物学的マーカーですべての臨床上的有用性を満たすことは困難であるという結論に達し、それぞれの目的に応じた生物学的マーカーを探索するのが妥当であろうと考えている。

そもそも生物学的診断マーカーの目的としては、以下のような3つの目的が考えられる。

- 1) 認知症のスクリーニングのためのマーカー
- 2) 認知症の鑑別診断のためのマーカー
- 3) 認知症の重症度評価のためのマーカー

第一のスクリーニングを目的としたマーカーは、ハイリスクの個体を集団のなかから選別するものであり、アポリポ蛋白E4などの遺伝子タイピングはその一例である。第二の鑑別診断のためのマーカーは、アルツハイマー病、レビー小体病、前頭側頭型認知症などの鑑別のためのマーカーであり、タウ蛋白、アミロイド蛋白などが考えられる。そして、第三の重症度マーカーは、疾患の重症度や介入の効果を鋭敏に反映するマーカーであり、過酸化脂質、酸化DNA、酸化蛋白などの酸化ストレスの程度を表す指標などが考えられる。

## 開発中のアルツハイマー病診断マーカー

われわれは、プレセニリンによる膜内蛋白分解の過程について研究してきた。プレセニリンは家族性アルツハイマー病の原因遺伝子であり、プレセニリン複合体によるアミロイド前駆体蛋白 (amyloid precursor protein: APP) の膜内分解の異常によりアミロイド40-42が過剰に産生されることによりアルツハイマー病が惹起されると考えられている。プレセニリンはAPP以外に

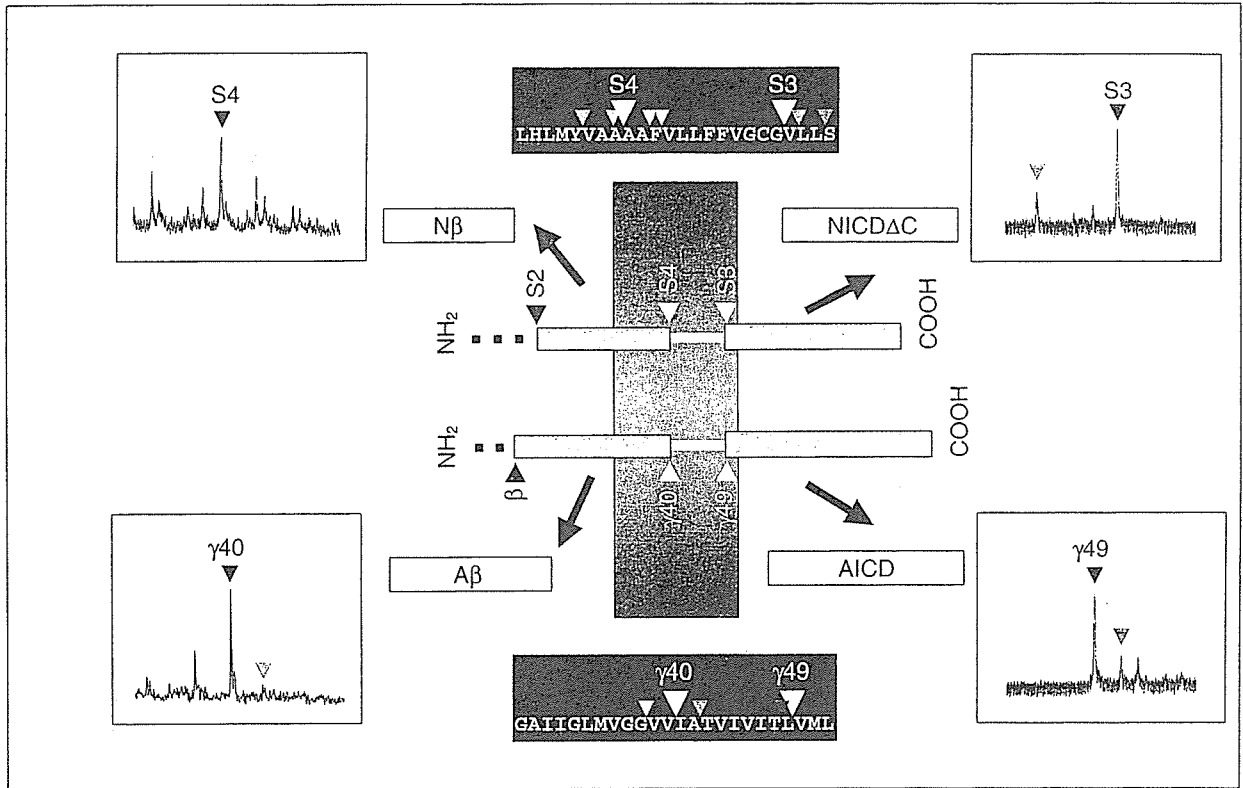


図4 Cell-free assay システムによる Notch-β, NICD, アミロイドβ, AICD の解析  
Nβ: Notch-β, NICD: Notch intracellular domain, Aβ: アミロイドβ, AICD: APP intracellular domain

も APLP (amyloid precursor-like protein), Notch, ErbB-4, LRP (low-density lipoprotein receptor-related protein), E-cadherin, CD44 などの多くの膜蛋白の切断に関与することが知られており、プレセニリンによる Notch の切断部位を明らかにした。

図4 に APP と Notch の切断部位の解析結果を示すが、変異プレセニリンにより APP と同様に Notch の切断部位も変化していることが明らかにされている。APP の切断により生じるアミロイドβ蛋白の大部分は脳実質中に沈着することから、末梢血中の可溶性アミロイドβは低値であるが、プレセニリンにより切り出された末梢血流中の Notch 断片 (Nβ) を測定することにより、プレセニリンによる膜内切断作用を知ることができる。このようなマーカーはアルツハイマー病の病理過程を直接反映するものであり、より直接的なアルツハイマー病の診断マーカーとなりうる。

アルツハイマー病 (AD) と  
その関連疾患に対する早期診断マーカー：  
最新の話

講演 2

アルツハイマー病の生物学的診断マーカーとしての  
修飾型タウ蛋白

Modified tau protein as a biological diagnostic marker for AD

田中稔久\*

和田健二\*\*

山森英長\*

ベグム ヌルン ネッサ\*

ゴラム ムハマド サディック\*

武田雅俊\*

\* 大阪大学大学院医学系研究科精神医学

\*\* 鳥取大学医学部脳内科学

Toshihisa Tanaka\*, Kenji Isoe-Wada\*\*, Hidenaga Yamamori\*,  
Begum Nurun Nessa\*, Golam Md. Sadik\*, Masatoshi Takeda\*

\* Osaka University Graduate School of Medicine

\*\* Tottori University, Faculty of Medicine



田中稔久 先生

## アルツハイマー病の生物学的診断マーカーとしての 修飾型タウ蛋白

### Modified tau protein as a biological diagnostic marker for AD

田中稔久\*, 和田健二\*\*, 山森英長\*, ベグム ヌルン ネッサ\*,  
ゴラム ムハマド サディック\*, 武田雅俊\*

\* 大阪大学大学院医学系研究科精神医学

\*\* 鳥取大学医学部脳内科学

Toshihisa Tanaka\*, Kenji Isoe-Wada\*\*, Hidenaga Yamamori\*,  
Begum Nurun Nessa\*, Golam Md. Sadik\*, Masatoshi Takeda\*

\* Osaka University Graduate School of Medicine

\*\* Tottori University, Faculty of Medicine

### はじめに

わが国の認知症性高齢者は現時点で180万人を数えるが、この数は今後も増加し続けており2020年にはほぼ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 (Alzheimer's disease: 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。ADの診断には、臨床症状、認知機能検査、脳機能画像検査などが考えられるが、現在アセチルコリンエステラーゼ阻害剤などを含むAD治療薬が開発され、早期に確定診断に基づいた投薬や治療的介入を計画し、早期予防のためのスクリーニングを行うには、生物学的診断マーカーがもっとも有効と考えられる。

今日までにADに対するいくつかの生物学的診断マーカーが提唱されているが、現時点でもっとも実用性のレベルに到達しているものは、脳脊髄液 (cerebrospinal fluid: CSF) 中のアミロイド $\beta$  ( $A\beta$ )<sub>1-42</sub>の低下とタウ蛋白の増加である<sup>1,2)</sup>。CSF中のタウ蛋白の増加はきわめて有効な方法と考えられているが、実は他の神経変性疾患でもCSF中のタウ蛋白の増加が報告されており、これらの鑑別が問題となる。これを克服するために、たとえばAD脳におけるタウ蛋白は蛋白内のセリン (Ser) /スレオニン (Thr) 残基の多くが高度にリン酸化していることから、リン酸化特異認識抗体を用いたCSF中タウ蛋白のアッセイが最近いくつか報告された。われわれはこれ以外に、酸化蛋白が含有するカルボニル残基を検出する方法によって、ADと他の変性疾患



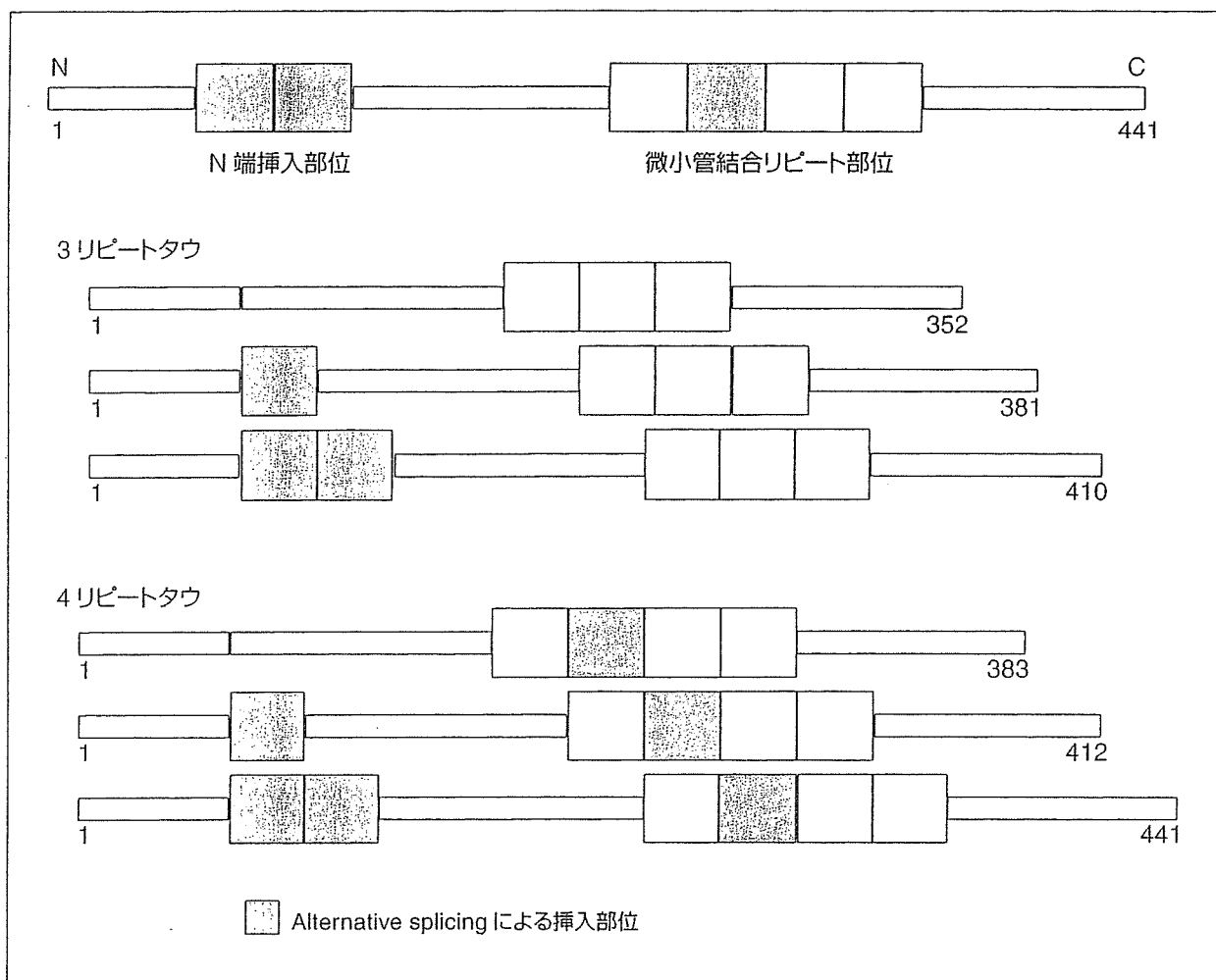


図1 タウ蛋白の構造

タウ蛋白には6つのアイソフォームがあり、これらは単一の遺伝子から alternative splicing というメカニズムによって作り分けられている。N末端側に2つの挿入部位があり、挿入のないもの、1つあるもの、2つあるものの3通り、C末端側のリピートする微小管結合部位の2番目が挿入されるものとされないものの2通りあり、計6通りのアイソフォームが存在する。リピートする微小管結合部位が3つあるものと4つあるものを総称してそれぞれ3リピートタウ、4リピートタウと呼び、発達過程において胎生期には3リピートタウのみが発現しているが成長するに従って4リピートタウも発現するようになることが知られている。

を鑑別する方法を検討している。ここでは、おもにCSF中のタウ蛋白によるAD診断の概説と、新しい診断マーカーの探索に関するわれわれの知見を述べたい。

## タウ蛋白

タウ蛋白とはもともと微小管付随蛋白の1つとして見出された蛋白であり、alternative splicing というメカニズムによって1つの遺伝子から6種類の

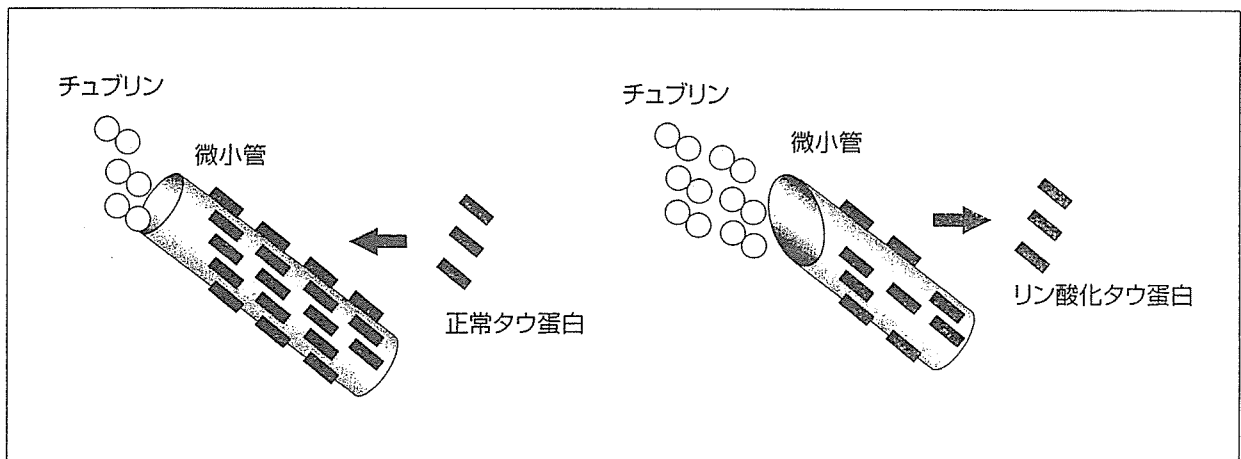


図2 タウ蛋白の微小管重合促進能とリン酸化

タウ蛋白は微小管付随蛋白の1つであり、ダイマーとなったチュープリンが重合して微小管を形成するのを促進する働きがある。このタウ蛋白はリン酸化されると、微小管に結合する能力や微小管形成を促進する能力を喪失し、細胞骨格に破綻をきたす。

mRNA が産生されて、6つのアイソフォームが存在する(図1)。タウ蛋白は、AD脳に見出される神経原線維変化の主要構成成分であり、これは異常なリン酸化を受けていることが知られている。正常なタウ蛋白は、チュープリンの重合による微小管形成を促進することが知られている(図2左)。このタウ蛋白には多くのリン酸化を受けると同時に微小管結合能および微小管重合能が消失することも知られている(図2右)。

CSF中の全タウ蛋白のアッセイはVandermeerenら、およびその他のグループによって数多く報告され、ADにおけるCSF中の全タウ蛋白は増加しており、有力な生物学的診断マーカーであることは多くの研究によって明らかにされてきた<sup>2-6)</sup>。しかし、皮質基底核変性症<sup>7)</sup>、前頭側頭型認知症<sup>8)</sup>、クロイツフェルトーヤコブ病(Creutzfeldt-Jakob disease: CJD)<sup>9)</sup>、正常圧水頭症(normal pressure hydrocephalus: NPH)<sup>10)</sup>といったいくつかの神経疾患においてもCSF中の全タウ蛋白量が増加することも併せて明らかになってきた。このような点を解決するために、前述のアミロイド $\beta_{1-42}$ の低下と組み合わせて $A\beta$  index ( $\tau \times A\beta_{1-40}/A\beta_{1-42}$ )という指標を用いることもShojiらによって提唱された<sup>11)</sup>。

## タウ蛋白の修飾——リン酸化

きわめて疾患に特徴的な蛋白修飾であるタウ蛋白リン酸化をアッセイに利

表 1 リン酸化特異性抗体を用いた CSF リン酸化タウ蛋白のアッセイ

	抗体名	リン酸化部位	Cut-off 値	特異性	感受性
Vanmechelen, <i>et al.</i> <sup>12)</sup>	AT270	p-Thr181	22.6 pM	95%	43.9%
Hampel, <i>et al.</i> <sup>13)</sup>	CP9	p-Thr231	10.1 ng/mL	97%	85%
Ishiguro, <i>et al.</i> <sup>14,15)</sup>	Anti-PS199	p-Ser199	1.05 fmol/mL	85.0%	85.2%
Wang, <i>et al.</i> <sup>16)</sup>	PHF-1	Ser396/404	100 pg/mL	94%	96%

タウ蛋白リン酸化特異性抗体を用いて、CSF 中のタウ蛋白の各部位におけるリン酸化レベルの測定が行われ、AD の診断に応用された。これらの検討は高い特異性と感受性を示し、診断法としての有用性を示している。

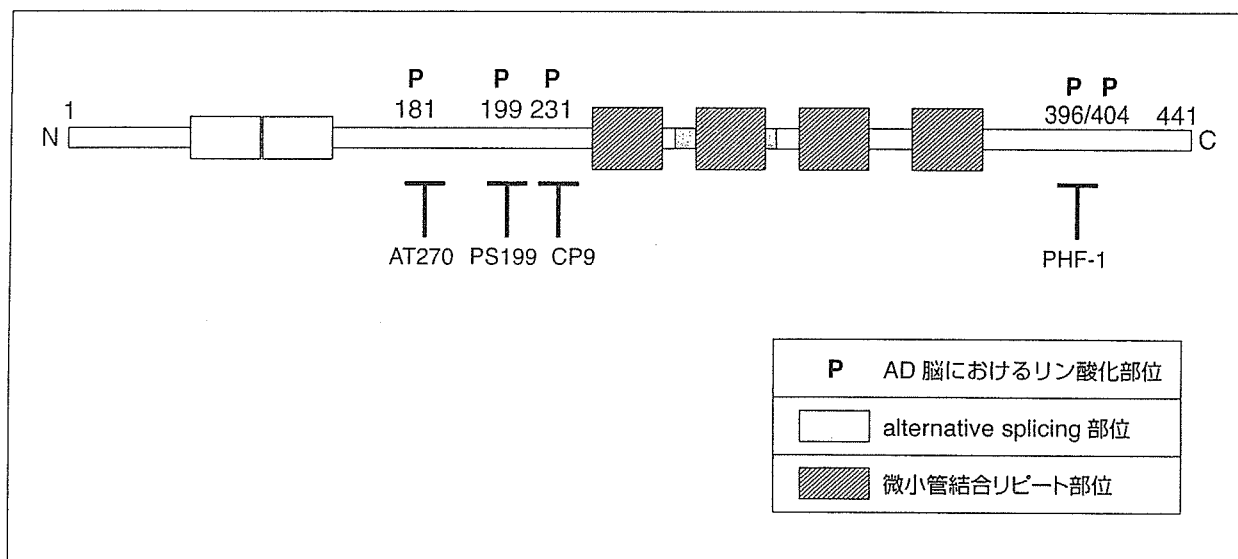


図 3 タウ蛋白のリン酸化と各リン酸化特異性抗体の認識部位

AD ではタウ蛋白のなかの多くの Ser/Thr 残基がリン酸化されるが、これを検討するために、リン酸化特異性抗体が作製された。このなかでもっとも古い PHF-1 抗体は、タウ蛋白の Ser396/Ser404 部位がリン酸化されたときのみタウ蛋白を認識して結合する。このような部位別のリン酸化特異性抗体を用いて、CSF 中のタウ蛋白のリン酸化レベルの測定が行われた。

用する方法が、最近いくつも報告された(表 1)。Vanmechelen ら<sup>12)</sup>, Hampel ら<sup>13)</sup>, Ishiguro ら<sup>14,15)</sup>, Wang ら<sup>16)</sup> のグループは、それぞれリン酸化されたタウ蛋白を認識する抗体 AT270 (リン酸化 Thr181 部位認識), CP9 (リン酸化 Thr231 部位認識), anti-PS199 (リン酸化 Ser199 部位認識), PHF-1 (リン酸化 Ser396/404 部位認識) を用いたサンドイッチアッセイの ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) によって、CSF 中のリン酸化タウ蛋白を測定した(図 3)。それによると、タウ蛋白全体を測定したときよりも高い特異性と感受性が得られることがわかった(表 1)。

## タウ蛋白の修飾——カルボニル化

われわれはこのような方法に加えて、ADを他の疾患から鑑別するためにCSF中の酸化された蛋白の検討を行った。酸化はADの神経変性メカニズムに大きく関与することが知られており、AD脳内においてはいままでに酸化された核酸、脂質、そして蛋白が増加していることが知られている。

蛋白が酸化されたときに生じる残基としてカルボニル基が知られているが、これは不飽和脂肪酸が酸化されて蛋白内のHis, Cys, Lys残基などに結合した場合や、非酵素的糖化(glycation)によってMaillard productsやAmadori productsが生成された場合に現われるものである。これらを検出するには、酸性条件のなかで2,4-dinitrophenylhydrazine (DNP)と反応させ、カルボニル基にDNPを結合させて、抗DNP抗体にて検出する方法がよく用いられる。われわれは、CSF 1 mLからタウ蛋白を含むheat stableな蛋白分画を抽出し、これをポリアクリルアミドゲルにて電気泳動したあとニトロセルロース膜に転写し、それに上記の方法でDNPを結合させ、ウエスタンブロットの要領で抗DNP抗体にて検出を行った。用いたのは、AD患者およびNPH患者のCSFサンプルである(図4)。

それぞれのタウ蛋白濃度はELISAにより測定され、どちらも正常値(この系では400 pg/mL以下)よりはるかに高い。しかし、抗DNP抗体により染色された約30kDaおよび約60kDaのバンドは明らかにAD患者のほうに強く認められる。染色されたバンドはCSF中のカルボニル蛋白と考えられるが、AD患者のCSFを抗タウ蛋白抗体にて染色すると約30kDaのバンドが染色された。タウ蛋白は本来50kDaから60kDaであるが、CSF中のタウ蛋白は切断された約30kDaの断片として存在することはすでに知られている。

また、さらにAD脳から抽出されたリン酸化タウ蛋白(p-tau)であるAD p-tauを同様にDNPと反応させ、抗DNP抗体にて検出すると、本来の分子量である約60kDaのバンドが確認された。これらのことから、AD患者のCSF中に認められた約30kDaの抗DNP抗体陽性カルボニル蛋白は、断片化されたタウ蛋白である可能性が示唆された。

## 今後のADマーカー研究

ADの生物学的診断マーカーについて、とくにCSF中のタウ蛋白を概説し、修飾型タウ蛋白が他の神経変性疾患との鑑別に有用であることを述べ

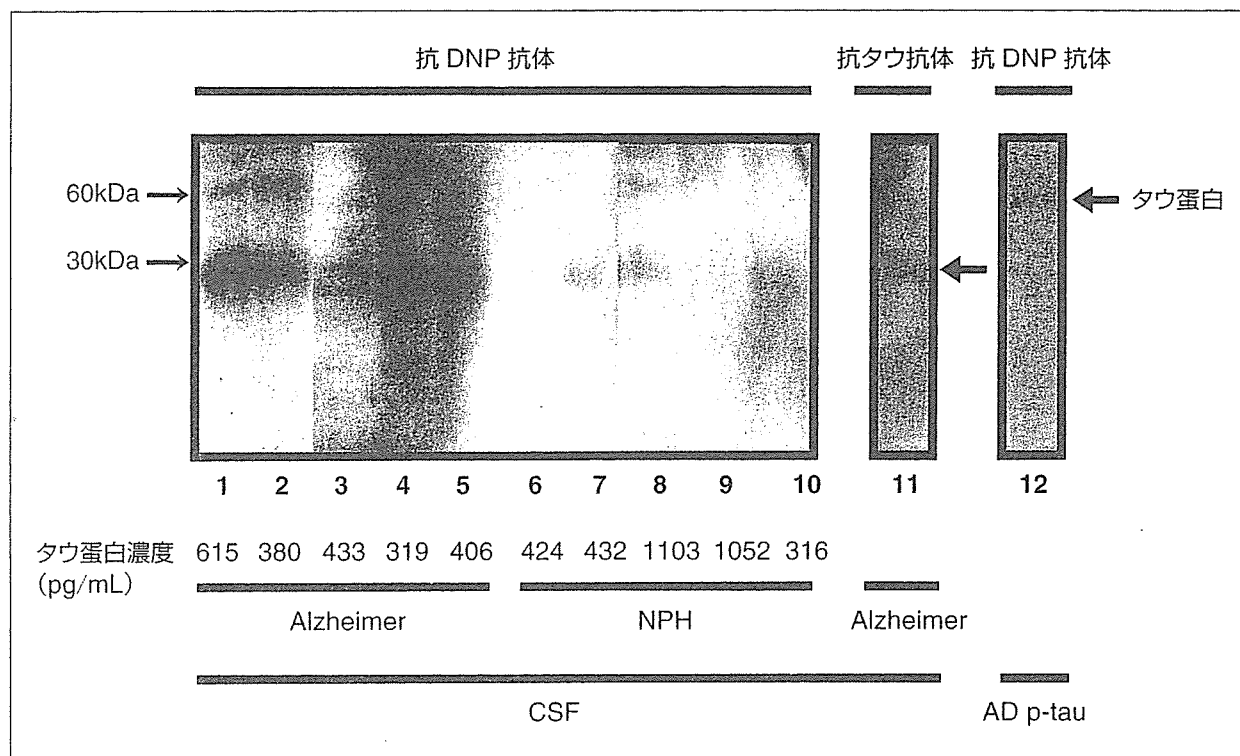


図4 カルボニル化タウ蛋白の検出

AD患者および正常圧水頭症(NPH)患者のCSFサンプル1 mLからタウ蛋白を含むheat stable分画を抽出し、電気泳動したあとニトロセルロース膜に転写し、酸性条件のなかでDNPとカルボニル基と結合反応させ、ウエスタンブロットの要領で抗DNP抗体にて検出を行った。それぞれのタウ蛋白濃度はELISAにより測定された。抗DNP抗体により染色された約30kDaおよび約60kDaのバンドは明らかにAD患者のほかに強く認められた。また、AD患者CSFには約30kDaの抗タウ抗体陽性のバンドが認められた。さらに、AD脳から抽出されたリン酸化タウ蛋白(p-tau)であるAD p-tauを同様にDNPと反応させ、抗DNP抗体にて検出すると、本来の分子量である約60kDaのバンドが確認された。

た。タウ蛋白の蓄積はADにおいてもっとも特徴的な病理変化であることから、これはその病態に密接に関係した生物学的診断マーカーとなっている。ただし、病気の重症度や進行度との相関に関してはまだはっきりとした見解はなく、今後はそれらに対応する生物学的マーカーがもっと必要になってくるものと考えられる。具体的には、軽度認知機能障害(mild cognitive impairment: MCI)患者のなかからADに移行する者を検出できる病前期のマーカー、重症度とともに値の上昇する生物学的な病態ステージングマーカーなどが必要となるであろう。これらの点に関しては、酸化ストレスに由来する酸化物の測定や、その他炎症性産物などが有効になるかもしれない。

さらに、CSFに由来しないもっと簡便で侵襲性の低く、かつ精度の高い生物学的マーカーも必要になるはずである。この点では、血液や尿から極微量の物質を用いたアッセイが必要となってくるであろう。また、アセチルコリ

ンエステラーゼ阻害剤および開発中の薬剤を含めて、抗認知症薬に対する反応性を予測させる生物学的マーカーも近い将来必要になるものと思われる。これには、アセチルコリンエステラーゼやアセチルコリン受容体の遺伝子多型などが重要になってくるであろう。今後予想される患者数の増加と薬剤開発に伴う治療戦略の多様化に伴って、生物学的診断マーカーの開発にはいつそうの進歩が望まれるところである。

## References

1. Motter R, Vigo-Pelfrey C, Kholodenko D, *et al.* Reduction of beta-amyloid peptide<sub>42</sub> in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1995; 38: 643-648.
2. Vandermeeren M, Mercken M, Vanmechelen E, *et al.* Detection of tau proteins in normal and Alzheimer's disease cerebrospinal fluid with a sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *J Neurochem* 1993; 61: 1828-1834.
3. Mori H, Hosoda K, Matsubara E, *et al.* Tau in cerebrospinal fluids: establishment of the sandwich ELISA with antibody specific to the repeat sequence in tau. *Neurosci Lett* 1995; 186: 181-183.
4. Arai H, Terajima M, Miura M, *et al.* Tau in cerebrospinal fluid: a potential diagnostic marker in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1995; 38: 649-652.
5. Nishimura T, Takeda M, Nakamura Y, *et al.* Basic and clinical studies on the measurement of tau protein in cerebrospinal fluid as a biological marker for Alzheimer's disease and related disorders: multicenter study in Japan. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 1998; 20: 227-235.
6. Takeda M, Tanaka T, Arai H, *et al.* Basic and clinical studies on the measurement of  $\beta$ -amyloid(1-42) in cerebrospinal fluid as a diagnostic marker for Alzheimer's disease and related disorders: Multicenter study in Japan. *Psychogeriatrics* 2001; 1: 56-63.
7. Urakami K, Wada K, Arai H, *et al.* Diagnostic significance of tau protein in cerebrospinal fluid from patients with corticobasal degeneration or progressive supranuclear palsy. *J Neurol Sci* 2001; 183: 95-98.
8. Green AJ, Harvey RJ, Thompson EJ, *et al.* Increased tau in the cerebrospinal fluid of patients with frontotemporal dementia and Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1999; 259: 133-135.
9. Otto M, Wiltfang J, Tumani H, *et al.* Elevated levels of tau-protein in cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurosci Lett* 1997; 225: 210-212.
10. Kudo T, Mima T, Hashimoto R, *et al.* Tau protein is a potential biological marker for normal pressure hydrocephalus. *Psychiatry Clin Neurosci* 2000; 54: 199-202.
11. Shoji M, Matsubara E, Kanai M, *et al.* Combination assay of CSF tau, A beta 1-40 and A beta 1-42(43) as a biochemical marker of Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 1998; 158: 134-140.
12. Vanmechelen E, Vanderstichele H, Davidsson P, *et al.* Quantification of tau phosphorylated at threonine 181 in human cerebrospinal fluid: a sandwich ELISA with a synthetic phosphopeptide for standardization. *Neurosci Lett* 2000; 285: 49-52.
13. Hampel H, Buerger K, Kohnken R, *et al.* Tracking of Alzheimer's disease progression with cerebrospinal fluid tau protein phosphorylated at threonine 231. *Ann Neurol*

- 2001; 49: 545–546.
14. Ishiguro K, Ohno H, Arai H, *et al.* Phosphorylated tau in human cerebrospinal fluid is a diagnostic marker for Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1999; 270: 91–94.
  15. Itoh N, Arai H, Urakami K, Ishiguro K, *et al.* Large-scale, multicenter study of cerebrospinal fluid tau protein phosphorylated at serine 199 for the antemortem diagnosis of Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 2001; 50: 150–156.
  16. Hu YY, He SS, Wang X, *et al.* Levels of nonphosphorylated and phosphorylated tau in cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients: an ultrasensitive bienzyme-substrate-recycle enzyme-linked immunosorbent assay. *Am J Patol* 2002; 160: 1269–1278.

occurrence of dementia. Average follow-up period was 21.9 months (range, 10.7-34.8 months; median, 24.3 months). Nineteen MCI patients (32.7%) converted to AD at a rate of 18.2% per person-year. The MCI converter (MCI-C) group was slightly older than the MCI stable (MCI-S) group ( $77.6 \pm 4.6$  vs.  $75.6 \pm 3.6$ ,  $p=0.084$ ). The MCI-C patients were more impaired in the total recall in the Selective Reminding test (SRT), immediate and delayed recall in the Complex Figure Test (CFT), and CASI. The hippocampal volumes were significantly smaller in the MCI-C group compared with those in the MCI-S group ( $p=0.023$ , for bilateral hippocampi). The 4 carrier frequency was 33.3% in the MCI-C group and 22.9% in the MCI-S group ( $X^2=0.671$ ,  $p=0.413$ ). Both cognitive performance and hippocampal volume were predictive for progression to AD. However, stepwise Cox regression model integrating both neuropsychological and radiological variables showed that global cognitive performance was the only significant predictor for AD. A poor global cognitive score may be more crucial than a small hippocampal volume in the prediction of AD.

With rapidly expanding research on MCI and dementia worldwide, we are looking forward to seeing the integration in neurobiology, neuroimaging, and neurobehavior fields to establish a multidisciplinary approach to MCI and dementia. This also is the goal of our future research.

#### REFERENCES

1. Morris JC. The clinical dementia rating (CDR): current version and scoring rules. *Neurology* 1993;43:2412-4.
2. Petersen RC, Smith GE, Waring SC, et al. Mild cognitive impairment. Clinical characterization and outcome. *Arch Neurol* 1999;56:303-8.
3. Graham JE, Rockwood K, Beattie, BL, et al. Prevalence and severity of cognitive impairment with and without dementia in an elderly population. *Lancet* 1997;349:1793-6.
4. Linn RT, Wolf PA, Bachman DL, et al. The "preclinical phase" of probable Alzheimer's disease. A 13-year prospective study of the Framingham cohort. *Arch Neurol* 1995;52:485-90.
5. Morris JC, Storandt M, Miller JP, et al. Mild cognitive impairment represents early-stage Alzheimer disease. *Arch Neurol* 2001;58:397-405.
6. Hughes CP, Berg L, Danziger WL, et al. A new clinical scale for the staging of dementia. *Br J Psychiatry* 1982;140:566-72.
7. Mckhann G, Drachman D, Folstein M, et al. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 1984;34:939-44.
8. Teng EL, Hasegawa K, Homma A, et al. The Cognitive Abilities Screening Instrument (CASI): a practical test for cross-cultural epidemiological studies of dementia. *Int Psychogeriatr* 1994;6:45-58.
9. Van Hoesen GW, Hyman BT. Hippocampal formation: anatomy and the patterns of pathology in Alzheimer's disease. *Prog Brain Res* 1990;83:445-57.
10. Xanthakos S, Krishnan KR, Kim DM, et al. Magnetic resonance imaging of Alzheimer's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1996;20:597-626.
11. Wang PN, Lirng JF, Lin KN, et al. Prediction of Alzheimer's disease in mild cognitive impairment: a prospective study in Taiwan. *Neurobiol Aging* (in press).

#### Neurobiological Studies of Dementia - Biological Markers and Neuroprotective Strategies for Alzheimer Disease

Toshihisa Tanaka<sup>1</sup>, Kenji Isoe-Wada<sup>2</sup>, Hidenaga Yamamori<sup>2</sup>, Kiyoko Kato<sup>1</sup>, Begum Nurun Nessa<sup>1</sup>, Golam Md. Sadik<sup>1</sup>, Masatoshi Takeda<sup>1</sup>.  
<sup>1</sup>Department of Psychiatry, Osaka University Graduate School of Medicine, Japan; <sup>2</sup>Department of Neurology, Tottori University, Faculty of Medicine, Japan; <sup>3</sup>Department of Neurochemistry, New York State Institute for Basic Research in Developmental Disabilities, U. S. A.

#### ABSTRACT

Tau protein and amyloid  $\beta$  ( $A\beta$ ), two major components of neuropathology in Alzheimer disease (AD), have been applied for establishment of more useful biomarkers and therapeutic approaches. Total tau protein in CSF is a biomarker for AD, however increased

levels of total tau in CSF were also observed in other neurological disease with dementia. Phosphorylation is an important feature of tau protein and phosphorylated tau in CSF is useful to distinguish AD from other disease.  $A\beta$  has toxic effects on neuronal cells, and its mechanisms are complicated. One of mechanism of  $A\beta$ -cytotoxicity is a down-regulation of XIAP, and this effect



is observed in the low concentration of A $\beta$ . XIAP might be a therapeutic target employing compounds that increase expression of XIAP in neuronal cells.

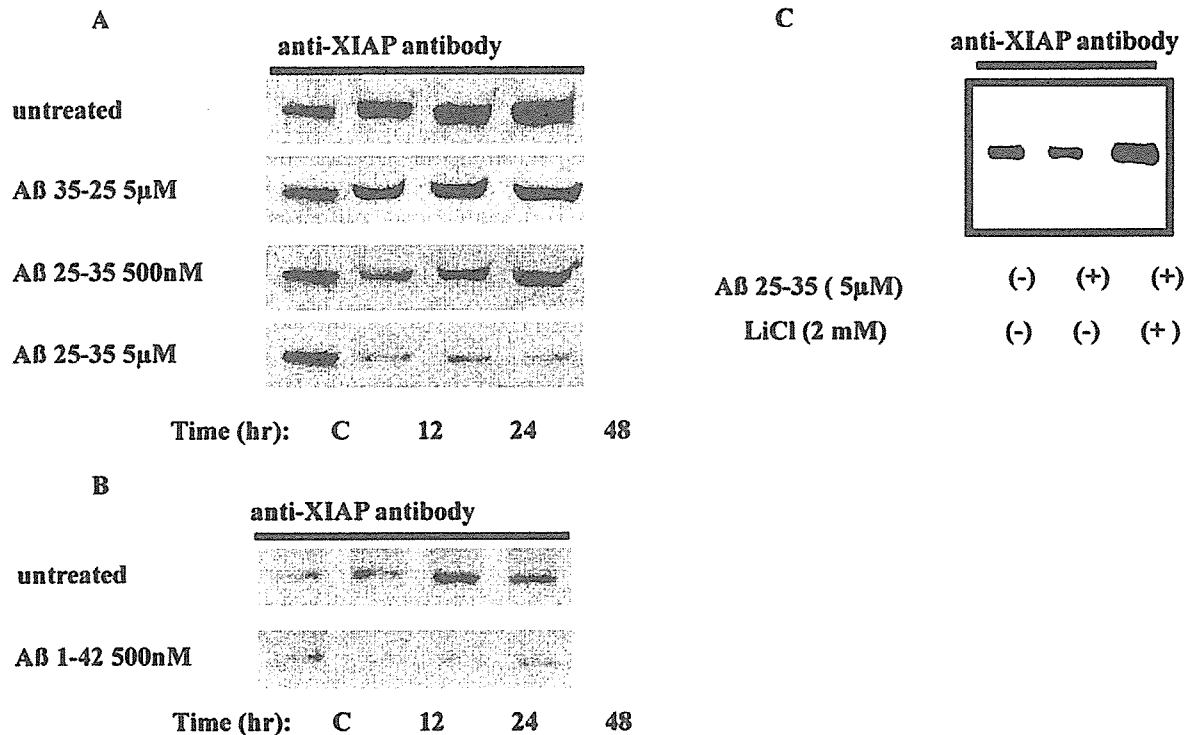
Key Words: Dementia, Alzheimer's disease, Biomarker, Tau protein

## INTRODUCTION

Senile plaques (SP) and neurofibrillary tangles (NFT) are neuropathological hallmarks of Alzheimer disease (AD), and amyloid  $\beta$  (A $\beta$ ) and abnormally hyperphosphorylated tau protein are major protein components of SP and NFT, respectively. In this review, neurodegenerative processes in AD are focused and the approaches in establishment of biomarkers for AD, and therapeutic treatment for it are described.

## Phosphorylated and other modified tau as a biomarker

Tau protein is abundant in NFT-bearing neurons in AD brain. This pathological observation has been applied for establishment of biomarker for AD. Assays of total tau in CSF have been first reported by Vandermeeren et al, and total tau in CSF is increased in AD<sup>(1)</sup>. However, increased levels of total tau in CSF were also observed in other neurological disease with dementia; corticobasal degeneration, frontotemporal dementia, Creutzfeldt-Jacob disease, and normal pressure hydrocephalus<sup>(2-9)</sup>. To overcome this situation, modified types of tau protein have been employed as diagnostic markers. As mentioned above, phosphorylation is a characteristic modification of tau in AD brain. Employing specific antibodies against phosphor-epitopes of tau protein, AT270 (against phosphorylated Thr181), CP9 (against phosphorylated Thr231), anti-PS199 (against phosphorylated Ser199), and PHF-1 (against



**Figure.** Effects on expression of XIAP by Amyloid  $\beta$  (A $\beta$ ) and lithium (A) SH-SY5Y cells were treated with 500nM and 5 $\mu$ M of A $\beta$ 25-35 and 5 $\mu$ M of A $\beta$ 35-25 (reverse peptide as control) for the indicated number of hours. Decreased expression of XIAP was observed in cells treated with 500nM and 5 $\mu$ M of A $\beta$ 25-35. (B) SH-SY5Y cells were treated with 500nM fibrillar A $\beta$ 1-42 for the indicated number of hours. Decreased expression of XIAP was observed in cells treated with fibrillar A $\beta$ 1-42. (C) SH-SY5Y cells were cultured in the presence of 5 $\mu$ M of amyloid  $\beta$ 25-35 or in the presence of combination of 5 $\mu$ M of amyloid  $\beta$ 25-35 and 2 mM lithium chloride. Decreased expression of XIAP was observed in cells treated with amyloid  $\beta$ 25-35, however this effect was converted by lithium chloride.

phosphorylated Ser396/404), phosphorylated tau in CSF has been assayed by Blennow et al<sup>(6)</sup>, Hampel et al<sup>(7)</sup>, Ishiguro et al<sup>(8,9)</sup>, Wang et al<sup>(10)</sup>, respectively. These assays have been shown to have higher specificities and sensitivities, compared to the total CSF-tau assay, probably because the phosphorylation, is based on neurodegenerative process of AD. Probably many other biomarkers for AD will appear in future and hopefully those biomarkers will be employed for early detection of AD and specific diagnosis of AD. Mild cognitive impairment (MCI) is one of recent clinical topics in AD research, and converters of MCI to AD might be distinguished by those useful biomarkers in future.

#### Amyloid toxicity and therapeutic approach

Several hypothesized mechanisms have been shown to explain the amyloid toxicity, and reactive oxygen species are thought to be one of mediators of apoptosis. In experimental cultures of neurons exposed to A $\beta$ , dying cells display the characteristics of apoptosis. However, the A $\beta$  concentration that leads to apoptosis is much higher (10~25  $\mu$ M) than the physiological concentration (nM order). Apoptosis is regulated by several gene products which include the members of the caspase family, Apaf-1, the Bcl-2 family, and the inhibitor of apoptosis (IAP) family. Members of the IAP family are intrinsic cellular suppressors of apoptosis and are represented by highly conserved members found in a wide range of locations, from insect viruses to mammals. The most potent human IAP is the X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP). Previously it was found that subtoxic, high physiological concentrations of A $\beta$  increases vulnerability to oxidative stress, at least in part through an increase in the expression ratio of Bax/Bcl-2<sup>(11)</sup>, therefore the effects of subtoxic concentrations of A $\beta$  on the expression of XIAP were investigated<sup>(12)</sup>. SH-SY5Y human neuroblastoma cells were exposed to A $\beta$  and there was no significant difference in cell death in cells treated with A $\beta$ 25-35 (500 nM ~ 5  $\mu$ M), A $\beta$ 35-25 (reverse peptide) (500 nM ~ 5  $\mu$ M), fibrillar A $\beta$ 1-42 (500 nM), A $\beta$ 42-1 (500 nM), and untreated cells up to 48 hours. To determine whether XIAP expression is involved in the A $\beta$ -induced neurotoxic mechanism, the expression level of XIAP protein in SH-SY5Y cells exposed to A $\beta$  was investigated by western blotting. Treatment cells with A $\beta$ 25-35 (500 nM), A $\beta$ 25-35 (5  $\mu$ M), fibrillar A $\beta$ 1-42 (500 nM) reduced XIAP protein levels compared to cells treated with reverse peptide and untreated cells (Fig.1 A, B). Further study revealed that XIAP expression is involved in the mechanism of this A $\beta$ -induced increase in vulnerability to oxidative stress. Briefly, increased numbers of cell death were observed in cells pretreated

with A $\beta$ 25-35 (5  $\mu$ M) and fibrillar A $\beta$ 1-42 (500 nM) for 48hr and then submitted to low oxidative stress levels, using 0.5  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. In contrast, the cells treated with the control peptide A $\beta$ 35-25 (5  $\mu$ M) do not show increased sensitivity to such low levels of oxidative stress. Then the feature of decreased expression of XIAP was applied as a target of therapeutics. SH-SY5Y cells were cultured in the presence of A $\beta$ 25-35 (5  $\mu$ M) or in the presence of combination of A $\beta$ 25-35 (5  $\mu$ M) and lithium chloride (2 mM). Decreased expression of XIAP was observed in cells treated with A $\beta$ 25-35, however this effect was converted by lithium chloride (2 mM) (Fig. 1C). This result suggests that drugs that increase expression of XIAP might be useful therapeutics for attenuation of A $\beta$ -induced cytotoxicity or vulnerability.

#### CONCLUSION

Tau protein and A $\beta$  are two major components of neuropathology in AD. Phosphorylation and other protein-modifications are important features of tau protein and CSF tau has been applied for biological marker for AD. In future these modified tau protein will be employed as a common diagnostic marker for AD, and in more earlier stages including MCI these markers will be helpful for prediction of conversion to real AD. A $\beta$  has toxic effects on neuronal cells, and its mechanisms are complicated. One of the mechanisms of A $\beta$ -cytotoxicity is a down-regulation of XIAP. This effect might be applied for therapeutics employing compounds that increase expression of XIAP in neuronal cells. In summary, based on the neurodegenerative mechanisms of AD, establishments of more useful biomarkers and more therapeutic compounds are required.

#### REFERENCES

1. Vandermeeren M, Mercken M, Vanmechelen E, et al. Detection of tau proteins in normal and Alzheimer's disease cerebrospinal fluid with a sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *J Neurochem* 1993;61:1828-34.
2. Urakami K, Wada K, Arai H, et al. Diagnostic significance of tau protein in cerebrospinal fluid from patients with corticobasal degeneration or progressive supranuclear palsy. *J Neurol Sci* 2001; 183:95-8.
3. Green AJ, Harvey RJ, Thompson EJ, et al. Increased tau in the cerebrospinal fluid of patients with frontotemporal dementia and Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1999;259:133-5.
4. Otto M, Wiltfang J, Tumani H, et al. Elevated levels

- of tau-protein in cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurosci Lett* 1997;225: 210-2.
5. Kudo T, Mima T, Hashimoto R, et al. Tau protein is a potential biological marker for normal pressure hydrocephalus. *Psychiatry Clin Neurosci* 2000;54: 199-202.
  6. Vanmechelen E, Vanderstichele H, Davidsson P, et al. Quantification of tau phosphorylated at threonine 181 in human cerebrospinal fluid: a sandwich ELISA with a synthetic phosphopeptide for standardization. *Neurosci Lett* 2000;285:49-52.
  7. Hampel H, Buerger K, Kohnken R, et al. Tracking of Alzheimer's disease progression with cerebrospinal fluid tau protein phosphorylated at threonine 231. *Ann Neurol* 2001;49:545-6.
  8. Ishiguro K, Ohno H, Arai H, et al. Phosphorylated tau in human cerebrospinal fluid is a diagnostic marker for Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1999; 270:91-4.
  9. Itoh N, Arai H, Urakami K, et al. Large-scale, multicenter study of cerebrospinal fluid tau protein phosphorylated at serine 199 for the antemortem diagnosis of Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 2001; 50:150-6.
  10. Hu YY, He SS, Wang X, et al. Levels of nonphosphorylated and phosphorylated tau in cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients: an ultrasensitive bienzyme-substrate-recycle enzyme-linked immunosorbent assay. *Am J Patol* 2002;160:1269-78.
  11. Paradis E, Douillard H, Koutroumanis M, et al. Amyloid beta peptide of Alzheimer's disease downregulates Bcl-2 and upregulates bax expression in human neurons. *J Neurosci* 1996;16:7533-59.
  12. Yamamori H, Tanaka T, Kudo T, et al. Amyloid- $\beta$  down-regulates XIAP expression in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *NeuroReport* 2004;15:851-4.

## Regular Article

# Albumin gene encoding free fatty acid and $\beta$ -amyloid transporter is genetically associated with Alzheimer disease

RYO KIMURA, MD,<sup>1</sup> KOUZIN KAMINO, MD, PhD,<sup>1</sup> MITSUKO YAMAMOTO, BS,<sup>1</sup> TOMOYUKI KIDA, MD, PhD,<sup>1</sup> HIROYASU AKATSU, MD, PhD,<sup>2</sup> TAKESHI UEMA, MD, PhD,<sup>3</sup> TOSHIKO KOBAYASHI, MD, PhD,<sup>4</sup> HIDEYUKI HATTORI, MD, PhD,<sup>5</sup> AIDARALIEVA NURIPA, MD,<sup>1</sup> BEGUM NURUN NESSA, MD,<sup>1</sup> HIROAKI KAZUI, MD, PhD,<sup>1</sup> YOSHITAKA IKEJIRI, MD, PhD,<sup>1</sup> TOSHIHISA TANAKA, MD, PhD,<sup>1</sup> HISASHI TANII, MD, PhD,<sup>9</sup> TAKASHI KUDO, MD, PhD,<sup>1</sup> HIROSHI YONEDA, MD, PhD,<sup>6</sup> HIDEHISA YAMAGATA, MD, PhD,<sup>7</sup> TETSURO MIKI, MD, PhD<sup>8</sup> AND MASATOSHI TAKEDA, MD, PhD<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Division of Psychiatry and Behavioral Proteomics, Department of Post-Genomics and Diseases, Osaka University Graduate School of Medicine, Suita, <sup>2</sup>Chou Medical Institute, Fukushima Hospital, Toyohashi, <sup>3</sup>Department of Psychiatry, Osaka General Medical Center, Osaka, <sup>4</sup>Department of Social Services, Faculty of Human Services, Osaka University of Human Sciences, Settsu, <sup>5</sup>Department of Psychiatry, National Hospital for Geriatric Medicine, Ohbu, <sup>6</sup>Department of Neuropsychiatry, Osaka Medical College, Takatsuki, <sup>7</sup>Department of Medical Genetics, <sup>8</sup>Department of Geriatric Medicine, School of Medicine, Ehime University, Toon, Japan and <sup>9</sup>Department of Psychiatry, Mie University, Mie, Japan

## Abstract

Alzheimer disease (AD), the major cause of dementia in the elderly, is characterized by  $\beta$ -amyloid deposition in senile plaques and hyperphosphorylated tau in neurofibrillary tangles. Since albumin, binding and transporting free fatty acids is also the major transporter of  $\beta$ -amyloid, we examined the association between the albumin (*ALB*) gene and the occurrence of late-onset AD (LOAD). We found that the allele distribution of the intron 4 microsatellite of the *ALB* gene showed a significant difference ( $P < 0.05$ ) between LOAD ( $n = 285$ ) and control group ( $n = 656$ ). An allele with 11 CA repeat, termed (CA)<sub>11</sub> allele, was significantly predominant in the control group ( $P < 0.005$ ), and the odds ratio carrying the (CA)<sub>11</sub> allele was 0.43 ( $P < 0.01$ , 95% CI = 0.24–0.79). Logistic regression indicated that this effect was independent of age and the  $\epsilon 4$  dose of the apolipoprotein E gene ( $P < 0.01$ ), while the *ALB* gene was supposed to be related to aging. Our results indicate that the *ALB* gene is genetically related with the occurrence of LOAD, supporting the link between fatty acid and  $\beta$ -amyloid transport in the development of LOAD.

**Key words** albumin, Alzheimer's disease,  $\beta$ -amyloid, fatty acids, microsatellite.

## INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) is the major cause of dementia in the elderly and is pathologically characterized by

the existence of senile plaques and neurofibrillary tangles with marked neuronal loss in the brain. In the case of late-onset AD (LOAD), the  $\epsilon 4$  allele of the apolipoprotein E gene (*APOE- $\epsilon 4$* ) is the major genetic risk in multiple genetic backgrounds, leading to the thought that lipid metabolism is a major concern in the development of LOAD.<sup>1,2</sup> The different affinity between apolipoprotein E (apoE) isoforms with both  $\beta$ -amyloid and tau suggests a direct link between the apoE isoform and AD pathology.<sup>2,3</sup> The LDL receptor-related protein (LRP1) gene, encoding a receptor for apoE, is

Correspondence address: Ryo Kimura, MD, Division of Psychiatry and Behavioral Proteomics, Department of Post-Genomics and Diseases, Osaka University Graduate School of Medicine, 2-2-D3 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan.  
Email: kimura@psy.med.osaka-u.ac.jp