

- M, Sun X, Ueda M, Fujii J, and Inomata Y: Effect of tacrolimus and partial hepatectomy on transthyretin (TTR) metabolism in rats: the double-edged sword effect of the liver. *Transplant Int* 19:233-238, 2006.
- 5) Wakita M, Kawaji T, Ando E, Koga T, Inatani M, Tanihara H, Ando Y: Ocular decompression retinopathy following trabeculectomy with mitomycin C associated with familial amyloidotic polyneuropathy. *Br J Ophthalmol* 90:515-516, 2006.
- 6) Ueda M, Ando Y, Haraoka K, Katsuragi S, Terasaki Y, Sugimoto M, Sun X, and Uchino M: Aging and transthyretin-related amyloidosis: pathologic examinations in pulmonary Amyloidosis. *Amyloid* 13: 24-30, 2006.
- 7) Sakashita N, Ando Y, Haraoka K, Terazaki H, Yamashita T, Nakamura M, and Takeya M: Severe congestive heart failure with cardiac liver cirrhosis 10 years after orthotopic liver transplantation for familial amyloidotic polyneuropathy. *Pathol Int* 56:408-412, 2006.
- 8) Bergström J, Ueda M, Une Y, Sun X, Misumi S, Shoji S, and Ando Y: Analysis of amyloid fibrils in the Cheetah (*Acinonyx jubatus*). *Amyloid* 13:93-98, 2006.
- 9) Bergström J, Engström U, Yamashita T, Ando Y, Westermark P: Surface exposed epitopes and structural heterogeneity of in vivo formed transthyretin amyloid fibrils. *Biochem Biophys Res Commun* 348:532-539, 2006.
- 10) Goto T, Yamashita T, Ueda M, Ohshima S, Yoneyama K, Nakamura M, Nanjo H, Asonuma K, Inomata Y, Watanabe S, Uchino M, Tanaka K, Ando Y: Iatrogenic amyloid neuropathy in a Japanese patient after sequential liver transplantation. *Am J Transplant* 6:2512-2515, 2006.
- 11) Wada Y, Ando Y, Kai N, Takahashi W, Kikukawa H, Nakanishi J, Jinnouchi Y, Ueda S: Lower Urinary tract dysfunction in type 1 familial amyloidotic polyneuropathy in Kumamoto, Japan. *Int J Urol* 13:1475-1478, 2006.
- 12) Ueda M, Ando Y, Nakamura M, Tamashita T, Himeno S, Kim J, Sun X, Saito S, Tateishi T, Bergstrom J, Uchino M: FK506 Inhibits Murine AA Amyloidosis: Possible Involvement of T Cells in Amyloidogenesis. *J Rheumatol* 33:2260-2270, 2006.
- 13) Ando Y, and Nakamura M: Gene therapy by liver transplantation and single stranded oligonucleotides (SSOs) in familial amyloidotic polyneuropathy (FAP). *Curre Ppharmacogen* 4:79-86, 2006.
- 14) Ueda M, Ando Y, Hakamata Y, Nakamura M, Yamashita T, Obayashi K, Himeno S, Inoue S, Sato Y, Kaneko T, Takamune N, Misumi S, Shoji S, Uchino M, Kobayashi E: A transgenic rat with the human ATTR V30M: A novel tool for analyses of ATTR metabolisms. *Biochem Biophys Res Commun* 352: 299-304, 2007.
- 15) 中村政明、安東由喜雄: Single-stranded oligonucleotides (SSOs) による家族性アミロイドポリニューロパチーの遺伝子治療. *臨床病理* 52: 804-812, 2004.
- 16) 植田光晴、安東由喜雄: 血清蛋白とアミロイドーシス. *臨床検査血液学会誌* 7: 92-99, 2006.
- 17) 安東由喜雄: 家族性アミロイドポリニューロパチーと部分生体肝移植. *神経内科* 64:500-504, 2006.
- 18) 安東由喜雄: アミロイド関連蛋白と検査医学. *臨床病理* 54: 494-496, 2006.
- 19) 安東由喜雄: トランスサイレチンの病原性と疾患. *臨床病理* 54: 497-502, 2006.
- 20) 安東由喜雄: プロテオミックスー トランスサイレチンの解析. *臨床病理* 54:601-608, 2006.
- 21) 安東由喜雄: アミロイドーシス. 今日の治療指針 2007 年版 2006 年 in press.
- 22) 安東由喜雄: 家族性アミロイドポリニューロパチーの治療法. *難病と在宅ケア* 12:57-60, 2006.
- 23) 植田光晴、安東由喜雄: アルツハイマー病の病態と診断の展望. *臨床化学* 35:322-331, 2006.
- 24) 安東由喜雄、立石多貴子、姫野真悟: 血清アミロイド A 蛋白質検査と技術増刊号 34:1172-1174, 2006.
- 25) 安東由喜雄、三隅洋平: 家族性アミロイドポリニューロパチーの抗体治. *Annal Neview 神経疾患* 2007 in press.
- 26) 安東由喜雄: 家族性アミロイドポリニューロ

パチー. 最新自律神経 2007 in press.

2. 学会発表

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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

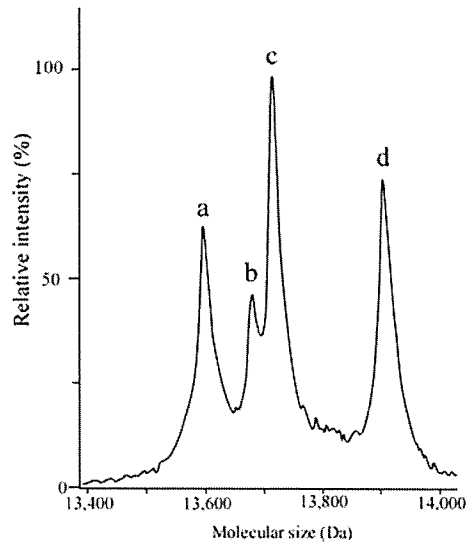


図 1. TG ラット血中 ATTR のフォーム

質量分析装置 (MALDI/TOF-MS) で TG ラット血中の TTR を解析した。

- a. 遊離型ラット TTR (13,597 Da)、b. システイン結合型ラット TTR (13,717 Da)、c. 遊離型ヒト ATTR V30M (13,793 Da)、d. システイン結合型ヒト ATTR V30M (123,912 Da)

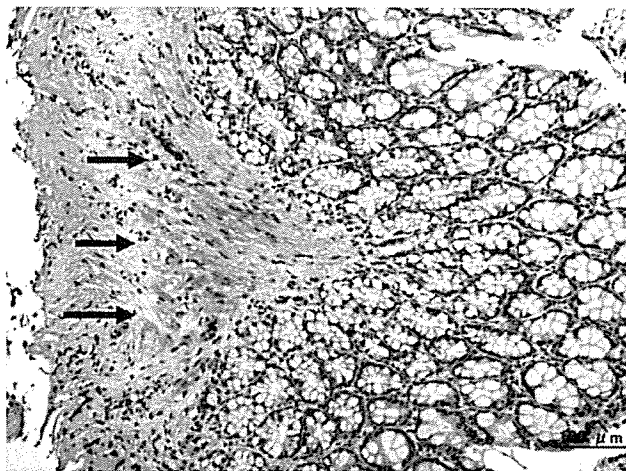


図 2. TG ラット直腸のヒト ATTR 沈着

ウサギ抗ヒト TTR 抗体を用いた免疫組織化学染色でヒト ATTR 陽性所見 (矢印) を認める。

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

Val30Met TTR 型 FAP 患者における腹壁アミロイドの 正常型：変異型 TTR の年代別比率

分担研究者 池田修一 信州大学医学部脳神経内科、リウマチ・膠原病内科
 共同研究者 土屋彩子、矢崎正英、武井洋一、関島良樹
 信州大学医学部脳神経内科、リウマチ・膠原病内科

研究要旨 未治療の Val30Met 型家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)患者 35 名の腹壁脂肪吸引生検の沈着アミロイドについて、Congo red 染色後のスライド標本より、アミロイド線維蛋白を抽出し、質量分析計(LC-MS/MS)により正常型トランスサイレチン(TTR)(V30)と変異型 TTR(M30)の構成比を検索、さらに正常型と変異型の比について、発症年齢、生検時の年齢、罹病期間などの患者背景と比較検討した。発症年齢、生検時年齢が高くなるにしたがって、正常型 TTR の比率が高くなる傾向がみられた。臨床症状が大きく異なることが報告されている若年発症(50 歳未満)群と高齢発症(50 歳以上)群に分けて比較したところ、有意差を持って高齢発症群で正常型 TTR の比率が高かった。また、生検時年齢を 50 歳未満と 50 歳以上に分けた場合でも、同様に 50 歳以上で正常型 TTR の比率が高かった。正常型 TTR もアミロイド惹起性を持つことが知られているが、FAP 患者のアミロイド形成における正常型 TTR の関与や、変異型 TTR の沈着の速度が加齢により変化するか、組織に沈着したアミロイド線維が継続的にどのように変化していくのかなど、十分に解明されていない点も多く今後の研究が待たれる。いずれにしても、腹壁脂肪に沈着したアミロイド線維の TTR は、全体としては、加齢によって正常型の比率が高くなる傾向にあるものと考えられる。

A. 研究目的

Systemic senile amyloidosis (SSA)では、加齢とともに正常型 TTR がアミロイド線維を形成していくことが知られている。一方、変異型 TTR によって起こる FAP においては、加齢によるアミロイド線維の変化や、正常型 TTR の関与について、十分に解明されていない。今回我々は、Val30Met 型 FAP 患者の腹壁脂肪沈着アミロイドにおける、正常型 TTR の関与について、年齢との関係を検討する。

B. 研究方法

対象は、肝移植や diflunisal 内服など、FAP に対する直接的な治療を行っていない、Val30Met 型 FAP 患者 35 名。男:女 = 19:16、発症年齢 20-70 (45.1±16.1)歳、生検時年齢 24-83(49.1±17.1)歳、発症から生検までの罹病期間は 1 年未満-15(4.0±3.5)年であった。

腹壁脂肪吸引生検のスメア標本(Alkaline Congo red 染色)を観察後、数日間 Hemo De 内で脱パラフィンを行い、カバーガラスを外れた後 100%エタノールに浸し、その後乾燥させた。スライドガラスから標本を剥離回収し、6M 塩酸グアニジンにて可溶化、透析脱塩後、得られた検体を SDS-PAGE 解析し、western blot の結果を参考に銀染色後のゲルから 15kD 付近の TTR バンドを切り出した。トリプシンによるゲル内酵素処理後、質量分析計(liquid chromatography-ion trap mass spectrometry: LC-MS/MS)により正常型 TTR(V30)と変異型 TTR(M30)の構成比を検索した。(図 1)

更に、正常型 TTR の比率を発症年齢や罹病期間、生検時の年齢などの患者背景と比較検討した。倫理面の配慮:各患者にはインフォームドコンセントを得て、生検を行った。

C. 研究結果

発症年齢、生検時年齢が高くなるにしたがって、正常型TTRの比率が高くなる傾向がみられた(図2)。Val30Met型FAP患者の全国調査では、若年発症(50歳未満)群と高齢発症(50歳以上)群で地理的分布の違いの他、臨床症状も大きく異なることが報告されている(Koike H et al. Arch Neurol 59 2002)。このため今回の結果を発症年齢50歳未満(若年発症群)と50歳以上(高齢発症群)で比較したところ、有意差を持って高齢発症群で正常型TTRの比率が高いことが明らかとなった。また、殆どの症例は発症後数年以内に生検を行っていることもあり、生検時年齢を50歳未満と50歳以上に分けた場合でも、同様に50歳以上で正常型TTRの比率が高かった。(図3)

D. 考察

変異のない正常型 TTR もアミロイド惹起性を持ち線維形成をすることが知られている。老人性アミロイドーシスの発症年齢は比較的高齢とされているが、FAP 患者においてもある年代から、正常型 TTR の沈着が始まることが予想される。また、既に変異型 TTR によるアミロイド線維が組織に沈着していることから、健常人に比し正常型 TTR の沈着が早くから始まっている可能性も考えられる。

一方、変異型 TTR の沈着の速度が加齢により変化するのか、また組織に沈着したアミロイド線維が臓器によっては turn over していくのか、などについては更なる研究が待たれるが、いずれにし

ても、腹壁脂肪に沈着したアミロイド線維の TTR は、全体としては、加齢によって正常型の比が多くなる傾向にあるものと考えられる。

E. 結論

Val30Met TTR 型 FAP 患者における腹壁脂肪沈着アミロイドは、加齢とともに正常型 TTR の占める割合が高くなっていく可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

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

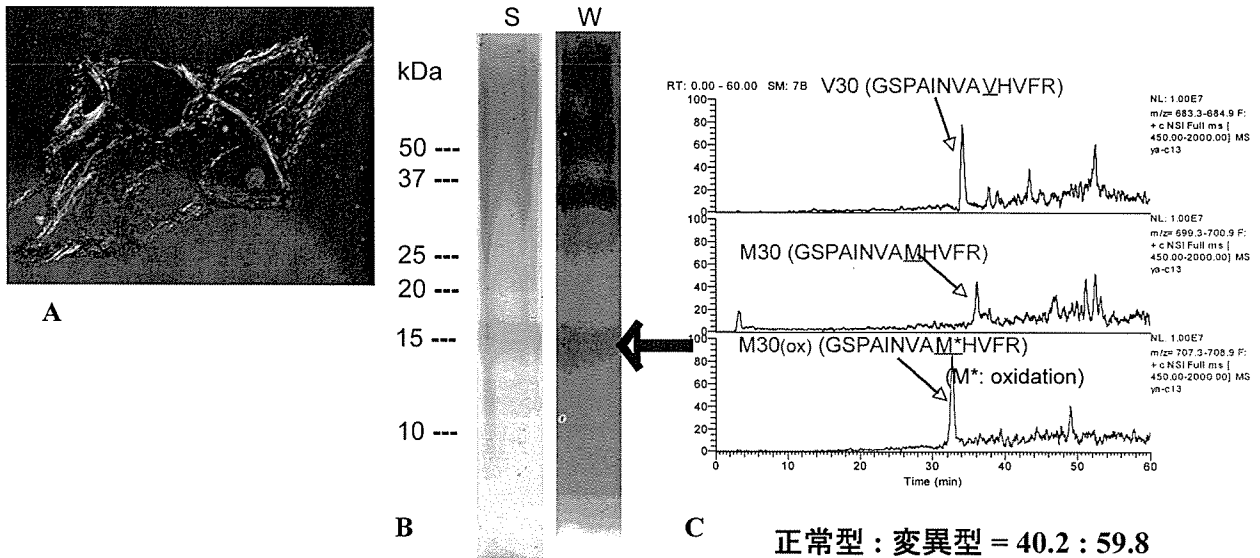


図 1 : 症例 1(34 歳女性。発症後 2 年)の解析例。A: 腹壁脂肪吸引生検(Congo red 染色)。アミロイド痰着を認める。B: S; SDS-PAGE、W; western blot)。15kD 付近に TTR バンドあり(矢印)。C: LC-MS/MS。V30 と M30、M30(ox)のピークの面積比から、構成比を計算した。

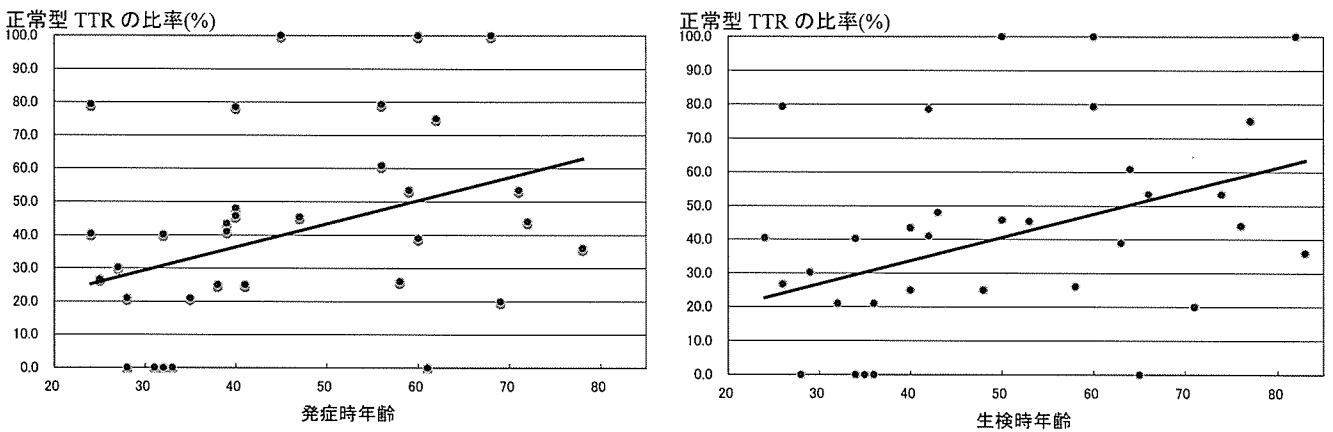


図 2 : A: 発症時年齢と正常型 TTR の比率($r=0.37$, $p=0.03$)。B: 生検時年齢と正常型 TTR の比率($r=0.41$, $p=0.02$)。

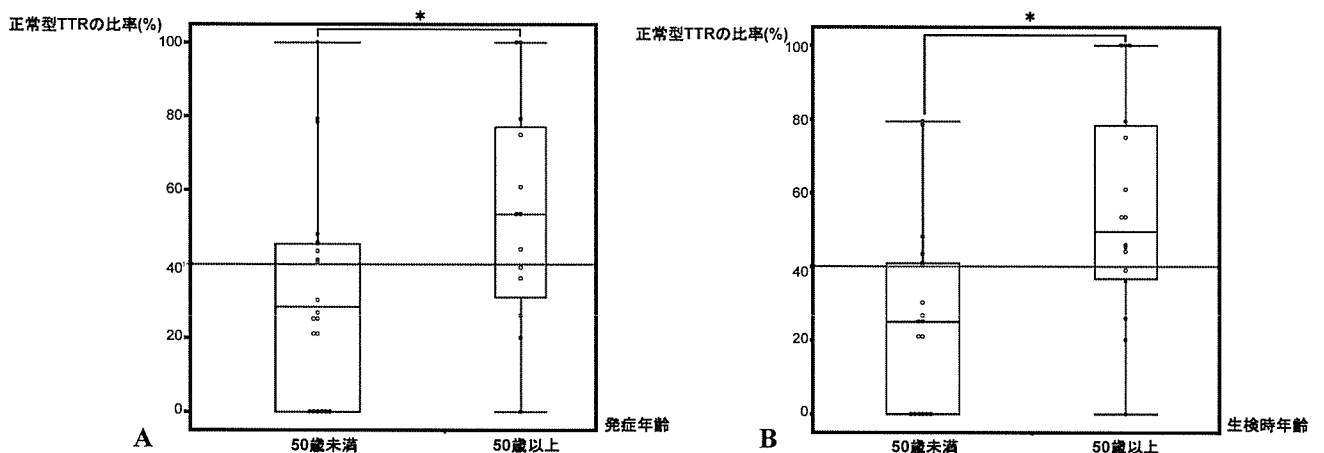


図 3 : 若年発症群(50 歳未満)および高齢発症群(50 歳以上)の比較。A: 発症時年齢と正常型 TTR の比率。B: 生検時年齢と正常型 TTR。(*: $p<0.05$ Wilcoxon)

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

新たな変異トランスサイレチン (Val71Ala および Val94Gly) FAP 症例の 臨床的検討

分担研究者 中里雅光 宮崎大学医学部神経呼吸内分泌代謝学

共同研究者 塩見一剛*、伊達 紫**、宗像真希***、塚本 忠****、村田美穂****、

小川雅文****、小池春樹*****、祖父江元*****、向井栄一郎*****、

*宮崎大学医学部神経呼吸内分泌代謝学

**宮崎大学フロンティア科学実験総合センター・生理活性物質探索分野

***国立精神・神経センター 国府台病院神経内科

****国立精神・神経センター 武蔵病院神経内科

*****名古屋大学神経内科、*****国立名古屋医療センター

研究要旨 家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) はトランスサイレチン (TTR) の分子異常に起因する遺伝性疾患で、prototype である Met30 型以外にも数多くの TTR 変異が発見されている。臨床的にも古典的な末梢神経障害や自律神経以外に、多彩な症状を呈する症例が多く存在する。非典型的な臨床像を呈した 2 症例について変異トランスサイレチンの同定を行った。その結果、1 例はこれまで国内では報告のない Val71Ala で、もう一例は国内外では初めての報告となる Val94Gly の症例であった。いずれの症例も発症時は典型的な症状を呈さず、確定診断にいたるまで時間を要した。FAP はまれな疾患ではあるが、治療法を検討するうえでも早期診断が望まれ、疑われる要素がある場合には積極的に診断を進めてゆくことが重要と考えられた。

A. 研究目的

FAP はトランスサイレチン(transthyretin:TTR) の分子異常に起因し、末梢神経障害や自律神経障害を主徴とする遺伝性疾患である。近年、診断学の進歩により、数多くの TTR 遺伝子変異が報告され、多彩な症状を呈する FAP の存在が明らかになっている。今回われわれは非典型的な臨床像を呈した 2 例の FAP について TTR 解析を行い、新たな変異 TTR 見出したので報告する。

B. 研究方法

(症例 1) 悪心・嘔吐を初発症状とした 40 歳、女性。当初は神経性食思不振症を疑われたが、約 10 年の経過の間に膀胱直腸障害や起立性低血圧が出現し、その後末梢神経障害を認めるようになった。胃および直腸生検を行い、アミロイド沈着

を認めた。(症例 2) 下腿の浮腫が出現し、房室ブロックのため失神をきたした 60 歳、女性。感覚障害や自律神経障害をほとんど認めず、舌筋萎縮と四肢筋力低下を認めた。血清を飛行時間型質量分析法で解析し、血清変異型 TTR の検索を行った。さらに直接塩基配列法により TTR の全エクソンの塩基配列を決定した。

(倫理面への配慮)

2 例とも各施設において、遺伝子診断の説明を行い同意を文書で得た。

C. 研究結果

血清 TTR の一次構造解析ならびに遺伝子解析の結果、症例 1 は TTR Val71Ala、症例 2 は TTR Val94Gly であることが明らかになった。Val71Ala は国内で

は報告のないTTR変異で、Val94Glyは国内外を含め報告のない新規のTTR変異であった。

D. 考察

臨床像において、症例1は末梢神経症状の出現に先行した消化器症状、膀胱直腸障害、起立性低血圧を特徴とし、主に自律神経症状が前面に出ていた。症例2は心症状で発症したが、発病当初は運動ニューロン疾患を強く疑わせる臨床像を呈していた。このようにTTRによるアミロイドーシスでも、病初期に非典型的な症状を主徴とする場合、早期診断が時に困難な場合があると考えられた。

E. 結論

今回新たなトランスサイレチン変異によるFAPを報告した。いずれの症例もFAPの典型的な症状を呈さなかった。FAPを疑った場合には積極的にアミロイドーシスの診断を行うことが重要であると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

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

トランスサイレチン型遺伝性脳アミロイドアンギオパチー患者における 肝臓移植後の脳出血の減少

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*、植田光晴*、岡本定久*、Manuel Zeledon Ramires**、
三隅洋平*、中村政明**、内野 誠*

*熊本大学大学院医学薬学研究部神経内科学分野、**同病態情報解析学分野

研究要旨 目的：我々のこれまでの研究により、トランスサイレチン(TTR) Y114C 遺伝子異常を有する FAP 患者は、遺伝性脳アミロイドアンギオパチー(Hereditary Cerebral Amyloid Angiopathy, CAA)を呈することが明らかとなってきた。今回我々は、肝臓移植の本症患者における CAA に対する効果について検討した。方法：肝臓移植を受けた本疾患患者 3 例（肝移植群）と肝臓移植を受けなかった患者 5 例（非肝移植群）の臨床経過を比較検討した。結果：肝移植群の生存率は非肝移植群と比較して有意に高かった。非肝移植群では 3 例に脳出血がみられたのに対して、肝移植群では 1 例のみであり、血腫の体積は非移植群と比較して、移植群で有意に小さかった。痴呆は非肝移植群において認められたが、肝移植群ではみられなかった。変動する意識、TIA に関しては非肝移植群と肝移植群において差はなかったが、非肝移植群では発症後不可逆性となりその後患者が死亡したのに対し、肝移植群では数週から数ヶ月で意識は清明となり軽度であった。結論： TTR Y114C 型 CAA 患者の中枢神経徴候、特に脳出血に対して肝臓移植は有効であった。

A. 研究目的

我々のこれまでの研究により、トランスサイレチン(TTR) Y114C 遺伝子異常を有する患者は、軽度の多発神経炎症状などに加え脳出血、一過性脳虚血発作、変動する意識、急速進行性痴呆などの中枢神経徴候をきたし、剖検脳では髄膜へのアミロイド沈着に加え、髄膜及び脳実質の血管に TTR アミロイド沈着がみられ、遺伝性脳アミロイドアンギオパチー(Hereditary Cerebral Amyloid Angiopathy, CAA)を呈することが明らかとなってきた。肝臓移植は、TTR 遺伝子変異による家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) に対し有効であるが、FAP の中枢神経徴候に対しては効果がないと考えられてきた。今回我々は、肝臓移植の本症患者における CAA に対する効果について検討した。

B. 研究方法

対象は長崎県島原市出身の遺伝子診断・病理診

断された TTR Y114C 型 CAA 患者 8 名。肝臓移植を受けた患者 3 例（肝移植群）と、肝臓移植を受けなかった患者 5 例（非肝移植群）の、発症年齢、罹病期間、生存期間、脳出血、痴呆、変動する意識、TIA の出現頻度、脳出血の体積について比較検討した。

(倫理面への配慮) 本疾患の遺伝子診断及び肝臓移植は、熊本大学医学部附属病院の倫理委員会で承認されており、本人及び家族への十分な説明と同意後に行なわれた。

C. 研究結果

発症年齢は肝移植群 35.7 ± 8.1 歳、非肝移植群 36.6 ± 6.1 歳であり 2 群間に有意差はなかった。

肝移植群の生存率は非肝移植群と比較して有意に高かった。

非移植群では 3 例に脳出血がみられたのに対して、移植群では 1 例のみであり、血腫の体積は

非移植群と比較して、移植群で有意に小さかった。

痴呆は非移植群において認められたが、移植群ではみられなかった。変動する意識、TIAに関しては非移植群と移植群において差はなかった。しかし、変動する意識に関して、非移植群では発症後不可逆性となりその後患者が死亡したのに対し、移植群では数週から数ヶ月で意識は清明となり軽度であった。

D. 考察

肝移植群の生存率は非肝移植群と比較して有意に高かったことより、本症の全身の血管、組織へのアミロイド沈着に対する肝臓移植の効果が示された。さらに、非肝移植群と比較して、肝移植群において、脳出血及び痴呆の出現頻度が低く、脳出血の血腫の体積が有意に小さかったことより、本症の CCA に対する肝臓移植の効果が示唆された。

CCA には、A β やシスタチン C によるものなどが知られているが、根治的治療法は確立されていない。また、FAP 患者の中枢神経徴候は脈絡叢から産生された異型 TTR による髄膜アミロイドーシスが原因とされ、肝臓移植後も脈絡叢からの異型 TTR の産生は持続することから、肝臓移植は FAP の中枢神経徴候に対しては無効と考えられていた。しかし、本症では、肝臓移植を受けた患者において、肝臓移植を受けなかった患者と比較して、生存率の改善のみならず、中枢神経徴候、特に脳出血体積の減少を認めた。本症では、中枢神経徴候発現に髄膜アミロイドーシスに加え CCA が深く関与していること、一般に髄液中より血中 TTR 濃度が約 10 倍高いことなどより、肝臓由来の血中異型 TTR が CCA に深く関与していることが考えられる。本症に肝臓移植が有効であった機序として、肝臓移植により血液中の異型 TTR が減少し、CAA の進行が抑制された可能性が考えられた。一般に FAP において、進行した患者では肝臓移植後も臨床徴候の進行がみられることがあり、早期の肝移植がより効果的とされている。本症患者に対しても早期に肝臓移植を行えば、中枢神経徴候をより効果的に抑制出来る可能性が考えられる。

E. 結論

TTR Y114C 型 CCA 患者の中枢神経徴候、特に脳出血に対して肝臓移植は有効であった。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 山下太郎, 安東由喜雄, 内野誠: 家族性アミロイドポリニューロパチーに肝臓移植は有効か. EBM 神経疾患の治療 中外医学社 365-370, 2007.
- 2) Goto T, Yamashita T, Ueda M, Ohshima S, Yoneyama K, Nakamura M, Nanjo H, Asonuma K, Inomata Y, Watanabe S, Uchino M, Tanaka K, Ando Y: Iatrogenic amyloid neuropathy in a Japanese patient after sequential liver transplantation. *Am J Transplant.* 6(10):2512-5, 2006.

2. 学会発表

- 1) 山下太郎, 安東由喜雄, 中村政明, 植田光晴, 岡本定久, 平原智雄, 植田明彦, 三隅洋平, 内野誠: 異型トランスサイレチンによる遺伝性脳アミロイドアングリオパチーに対する肝臓移植の効果の検討. 第 24 回日本神経治療学会総会. 横浜. 07.13-14. 2006.

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

NSAIDs の β アミロイド蛋白凝集抑制・不安定化作用と 抗アミロイド効果の分子機構解明

分担研究者 山田正仁 金沢大学大学院脳老化・神経病態学 (神経内科)

共同研究者 廣畑美枝*、小野賢二郎*、長谷川一浩**、安原 (堤) しのぶ**、大越忠和**、
大橋祐美子**、内木宏延**

*金沢大学大学院脳老化・神経病態学 (神経内科)、

**福井大学医学部病因病態医学講座・分子病理学領域

研究要旨 本研究では、第一に、疫学研究でその抗アルツハイマー病 (AD) 効果が注目されている非ステロイド性抗炎症剤 (NSAIDs) の抗アミロイド効果の有無を明らかにするため、生体条件試験管内モデルを用いて、NSAIDs (ibuprofen, aspirin, flurbiprofen, diclofenac sodium salt, ketoprofen, indomethacin, sulindac sulfide, naproxen, meclofenamic acid sodium salt) が、 β アミロイド線維 (fA β) 形成 (重合・伸長) 過程および既成fA β 不安定化過程に及ぼす作用を解析した。解析したNSAIDsは、濃度依存性にfA β 形成反応を抑制し、かつ既成fA β を不安定化した。NSAIDsは抗アミロイド効果を有し、ADの予防薬や治療薬の重要な候補分子となると考えられた。第二に、抗アミロイド効果の分子機構を明らかにするため、蛍光光度計、分光光度計、原子間力顕微鏡、SDS-PAGE、表面プラスモン共鳴 (surface plasmon resonance (SPR)) 解析を用いて、抗酸化剤polyphenolsがA β やfA β 形成・不安定化過程に及ぼす分子間相互作用をin vitroで検討した。酸化型polyphenolsは非酸化型よりも強力にfA β 形成を阻害した。三次元蛍光光度解析では、fA β 存在下で新しい蛍光ピークが同定され、fA β とpolyphenolsの特異的結合が示唆された。SPR解析では、A β monomerに対する微弱な反応とは対照的に、polyphenolsはfA β に対して強力な結合・解離反応を示した。Polyphenolsは、A β monomerよりもfA β 線維構造に優先的かつ可逆的に結合することにより、抗アミロイド効果を及ぼすと推定された。

A. 研究目的

近年の疫学研究では、非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) の抗アルツハイマー病 (AD) 効果が報告され、NSAIDs の抗炎症作用のみならず、A β 産生過程における抗アミロイド効果も注目されている。また、これまで我々は、様々な抗酸化剤や抗炎症薬の抗アミロイド効果を検討し、系統的に報告してきた。しかし、その分子作用機構は十分に明らかにされていない。本研究では、第一に、NSAIDs が既知の作用点よりも直接的に、 β アミロイド線維 (fA β) の凝集過程および不安定化過程に及ぼす作用 (抗アミロイド効果) を検討する。第二に、既報告 polyphenols が fA β に及ぼす抗アミロイド効果について、新たな分子作用機構を明らかにする。

B. 研究方法

1. NSAIDs の A β 凝集抑制・不安定化作用の検討

分光蛍光計を用いた Thioflavin T 法と、電子顕微鏡による形態学的観察を用いて、9種類の NSAIDs (ibuprofen, aspirin, meclofenamic acid sodium salt, diclofenac sodium salt, ketoprofen, R-flurbiprofen, naproxen, sulindac sulfide, indomethacin) が、pH 7.5、37 °C の環境下で、fA β 形成反応 (重合反応・伸長反応) 抑制作用、及び既形成線維の不安定化作用の有無について in vitro で解析した。

2. 抗アミロイド効果の分子機構解明

分光光度計、分光蛍光計、原子間力顕微鏡、sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel 電気泳動

(SDS-PAGE)、表面プラスモン共鳴 (surface plasmon resonance (SPR)) を用いて、5 種類の polyphenol (myricetin (Myr)、quercetin、morin、(+)-catechin、(-)-epicatechin) が A β monomer あるいは fA β に及ぼす分子間相互作用について、in vitro で詳細に解析した。

3. 倫理面への配慮
問題なし。

C. 研究結果

1. NSAIDs の A β 凝集抑制・不安定化作用の検討

NSAIDsは濃度依存性にA β monomerからのfA β 重合反応、及び伸長反応を抑制し、かつ既形成fA β を不安定化した。総括的なanti-amyloidogenic effect活性強度は、[ibuprofen \approx sulindac sulfide \geq meclofenamic acid sodium salt > aspirin \approx ketoprofen \geq R-flurbiprofen \approx diclofenac sodium salt > naproxen \approx indomethacin]であった。

2. 抗アミロイド効果の分子機構解明

酸化型 polyphenols は、非酸化型よりも強力に fA β 凝集を抑制した。Myr は fA β 存在下で特徴的な蛍光 (Ex 430nm, Em 586 nm) を発し、A β monomer よりも fA β に特異的に結合した。SPR解析では、polyphenols の結合・解離反応は、A β monomer よりも fA β に対して特異的かつ強力に観察され、fA β 伸長速度は 0.5 μ M 以上の Myr 存在下で著明に抑制された。

D. 考察

NSAIDs は fA β に対する直接作用で、凝集抑制・不安定化 (抗アミロイド効果) を及ぼすことが明らかになった。

さらに、Myr をはじめとする polyphenols は、A β monomer よりも fA β の線維立体構造、おそらく cross- β 構造に、優先的かつ可逆的に結合することで抗アミロイド効果を及ぼすことが明らかになった。

E. 結論

解析した NSAIDs は、fA β 形成抑制作用、および既成 fA β 不安定化作用を持ち、AD 予防・治療薬の重要な候補分子となり得る。Polyphenols が

fA β に及ぼす抗アミロイド効果について新たな分子作用機構を解明し、抑制分子が fA β の線維立体構造に優先的かつ可逆的に結合していることを明らかにした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ono K, Hasegawa K, Naiki H, Yamada M: Anti-Parkinsonian agents have anti-amyloidogenic activity for Alzheimer's β -amyloid fibrils in vitro. *Neurochem Int* 48: 275-285, 2006.
- 2) Ono K, Hirohata M, Yamada M: alpha-Lipoic acid exhibits anti-amyloidogenicity for β -amyloid fibrils in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 341: 1046-1052, 2006.
- 3) Ono K, Noguchi-Shinohara M, Matsumoto Y, Samuraki M, Yanase D, Iwasa K, Naiki H, Yamada M: Blood-borne factors inhibit Alzheimer's β -amyloid fibril formation in vitro. *Exp Neurol* 202: 125-132, 2006.
- 4) Ono K, Naiki H, Yamada M: The development of preventives and therapeutics for Alzheimer's disease that inhibit the formation of β -amyloid fibrils (fA β), as well as destabilize preformed fA β . *Curr Pharm Des* 12: 4357-4375, 2006.
- 5) Ono K, Hamaguchi T, Naiki H, Yamada M: Anti-amyloidogenic effects of antioxidants: implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1762: 575-586, 2006.
- 6) Hamaguchi T, Ono K, Yamada M: Anti-amyloidogenic agents: implications for prevention and treatment of Alzheimer's disease. *Cell Mol Life Sci* 63: 1538-1552, 2006.
- 7) Nozaki I, Hamaguchi T, Noguchi-Shinohara M, Ono K, Shirasaki H, Komai K, Kitamoto T, Yamada M: The MM2-cortical form of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease presenting with visual disturbance. *Neurology* 67: 531-533, 2006.
- 8) Hirohata M, Hasegawa K, Tsutsumi-Yasuhara S, Ohhashi Y, Ookoshi T, Ono K, Yamada M, Naiki H:

Anti-amyloidogenic effect against Alzheimer's β -amyloid fibrils in vitro is exerted by preferential and reversible binding of flavonoids to the amyloid fibril structure. *Biochemistry*, in press.

9) Matsumoto Y, Yanase D, Noguchi-Shinohara M, Ono K, Yoshita M, Yamada M: Blood-brain barrier permeability correlates with medial temporal lobe atrophy, but not with amyloid- β protein transport across the blood-brain barrier in Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*, in press.

10) 小野賢二郎、濱口毅、山田正仁：抗加齢サプリメントの認知機能改善効果；アンチエイジングサプリメントの認知機能に対する効果。コエンザイム Q10 など。老年精神医学雑誌 17: 58-62, 2006。

11) 小野賢二郎、山田正仁：アルツハイマー病。EBM のためのベストアプローチ臨床検査実践ガイド 143-144, 2006。

12) 小野賢二郎、山田正仁：アルツハイマー病。医学生・研修医のための病態生理 FIRST AID, 印刷中。

13) 廣畑美枝、小野賢二郎、山田正仁：NSAIDs の抗 Alzheimer 病効果。神経治療, 印刷中。

14) 小野賢二郎、山田正仁： β アミロイドの凝集とその抑制薬。医学のあゆみ(特集 Alzheimer 病- 基礎・臨床研究の最新動向), 印刷中。

15) 小野賢二郎、山田正仁： β アミロイドの凝集とその抑制薬。腎と透析(特集 アミロイドーシスの診療 up to date), 印刷中。

2. 学会発表

1) Hirohata M, Ono K, Naiki K, Yamada M: Non-steroidal anti-inflammatory drugs have anti-amyloidogenic effects for Alzheimer's β -amyloid fibrils in vitro. The 10th International Conference of Alzheimer's Disease and Related Disorders. Madrid, July 15-20, 2006.

2) Ono K, Noguchi M, Matsumoto Y, Yanase D, Iwasa K, Naiki H, Yamada M: Cerebrospinal fluid of Alzheimer patients promotes β -amyloid fibril formation in vitro. The 10th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders. Madrid, July 15-20, 2006.

3) Ono K, Noguchi-Shinohara M, Samuraki M, Matsumoto Y, Yanase D, Iwasa K, Naiki H, Yamada M: Cerebrospinal fluid and plasma of Alzheimer patients promote β -amyloid fibril formation in vitro. The 11th International Symposium on Amyloidosis. Woods Hole, November 5-9, 2006.

4) 廣畑美枝、吉田光宏、池田修一、玉岡 晃、葛原茂樹、東海林幹夫、安東由喜雄、徳田隆彦、山田正仁：我が国における脳アミロイドアンギオパチーに関する全国疫学調査。第 47 回日本神経学会総会。東京。2006 年 5 月 11-13 日。

5) 小野賢二郎、野口もえ子、松本泰子、柳瀬大亮、岩佐和夫、内木宏延、山田正仁：アルツハイマー病患者の髄液は β アミロイド線維形成を促進する。第 47 回日本神経学会総会。東京。2006 年 5 月 11-13 日。

6) 小野賢二郎、長谷川一浩、内木宏延、山田正仁：抗パーキンソン病薬によるアルツハイマー病 β アミロイド線維の分解効果。第 5 回北陸パーキンソン病研究会。金沢。2006 年 7 月 8 日。

7) 小野賢二郎、廣畑美枝、長谷川一浩、内木宏延、山田正仁：Coenzyme Q10, alpha-lipoic acid and ferulic acid destabilize preformed β -amyloid fibrils in vitro. 第 49 回日本神経化学会大会。名古屋。2006 年 9 月 14-16 日。

8) 廣畑美枝、小野賢二郎、長谷川一浩、安原(堤)しのぶ、内木宏延、山田正仁：NSAIDs による Alzheimer 病 β アミロイド蛋白凝集抑制・不安定化作用と anti-amyloidogenic effect の分子機構解明。第 3 回脳細胞・発達・学習・記憶分子シンポジウム。革新脳科学 COE・金沢大学十全医学会・脳医科学専攻合同シンポジウム。金沢。2006 年 9 月 23 日。

9) Hirohata M, Hasegawa K, Tsutsumi-Yasuhara S, Ohhashi Y, Ookoshi T, Ono K, Yamada M, Naiki H: Molecular mechanisms underlying anti-amyloidogenic effects of polyphenols. 第 25 回日本認知症学会学術集会。広島。2006 年 10 月 6-7 日。

10) 小野賢二郎、長谷川一浩、内木宏延、山田正仁：Anti-Parkinsonian agents have anti-amyloidogenic activity for Alzheimer's β -amyloid fibrils in vitro. 第 25 回日本認知症学会。広島。2006 年 10 月 6-7 日。

11) 小野賢二郎：アルツハイマー病患者の脳脊髄

液は β アミロイド線維形成を促進する。第16回中部老年期痴呆研究会。名古屋。2006年10月14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

複数の ER ストレスに対する Presenilin-1、Aph-1 の量的変化の検討

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(神経内科学)

共同研究者 三條伸夫、金海峰 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 脳アミロイドーシスの主要な原因物質であるアミロイドβ蛋白の産生に深く関わっている presenilin を中心としたγセクレターゼの構成因子の機能に関して、複数の培養細胞に対し複数のER ストレスを付加した場合の変化を解析した。γセクレターゼ構成因子の量的変化を測定したところ、全長型 presenilin の有意な増加と全長型 Aph-1 の有意な減少を認めた。ER ストレス下ではγセクレターゼ活性が停止することが知られており、量的変化は各γセクレターゼ構成因子がγセクレターゼ以外の独自の機能を有しており、脳アミロイドーシスにおいては presenilin を中心とするγセクレターゼ構成因子がγセクレターゼ以外の機能においても病的な影響を与えていることを示唆しているものと思われる。

A. 研究目的

脳アミロイドーシスの主要な原因物質であるアミロイドβ蛋白の産生には presenilin を中心としたγセクレターゼが深く関わっている。他方、γセクレターゼ構成因子が単独でγセクレターゼ以外の別の機能を有することも知られている。特に小胞体(ER)ストレスなどに対する細胞死への影響やその機序に関しての多数の報告がある。しかし、ER ストレスに対する presenilin の関わりなど、報告間で必ずしも同様の結論になり得ない場合があり、その理由は不明である。我々は、その様に ER ストレスに対する反応が一定でない原因としてストレスの種類や実験に用いる細胞の種類が関与している可能性を疑い、複数の ER ストレスを培養細胞に与えた場合のγセクレターゼ関連因子の量的変化を確認し、反応の違いを調べた。また、我々が既に報告したようにγセクレターゼ構成因子は presenilin、nicastrin、Aph-1、Pen-2 の主要な4因子に加え、TMP-21 などの構成因子が存在することが確認されている(Sanjo N, et al.:共著者20名の8番目: Nature 440: 1208-12, 2006)。それ以外にも各構成因子と独自に関連を有する未知の蛋白の存在も知られており、その様な新たな構成因子や未知の蛋白とストレスの関

わりについても従来のγセクレターゼによるアミロイドβ蛋白の産生調節とは異なった観点での研究が必要であると思われる。

B. 研究方法

HEK293、グリア系株細胞 KNS-42、神経系株細胞 GOTO を培養し、各々の細胞に、機序の異なる複数の ER ストレスを引き起こす化合物(tunicamycin、staurosporine、brefeldin-A、thapsigargin など)を培養液に添加し、一定時間ごとに培養細胞を回収し抗 presenilin-1-NT 抗体と抗 Aph-1-CT 抗体を用いたウェスタン・ブロッティングにて各々の蛋白の量的変化を確認し、ANOVA 検定をした。

(倫理面への配慮)

培養細胞を用いた in vitro の実験のみであり、倫理上特に問題となる実験は行わなかった。

C. 研究結果

細胞死を起こさない限界の濃度を確認し、各ストレス因子を培養液に添加した。tunicamycin を培養液に添加した場合にのみHEK293および神経系株細胞GOTOで全長型presenilin-1の有意な増加が

認められた。通常認められるpresenilinの分子内切断によって産生されるアミノ基端とカルボキシル基端の各断端に関しては、ストレス付加による量的変化は認められなかった。同様に、tunicamycinを培養液に添加した場合にのみ神経系株細胞GOTOで全長型APH-1aLの有意な減少が認められ、通常認められる断端の量的変化は認められなかった。

D. 考察

tunicamycinはER内タンパク質の糖鎖修飾を阻害することによりタンパク質の正常なfoldingが妨げられることが知られている。その様なストレスにのみ全長型presenilin-1の量的増加が認められ、細胞死が起こらなかったことは、糖鎖修飾阻害に対する細胞の自己防御機能か、あるいは全く逆に細胞が一時的に不安定な状態になってしまったことを示している可能性がある。Presenilin 2に関してはpro-apoptoticな作用が報告されており、Aph-1やPen-2はanti-apoptoticな作用が報告されていることを考えると細胞が不安定な状態になっている可能性が高いと思われる。

ERストレスの γ セクレターゼ活性への影響に関しては、ERストレス下では β アミロイド産生が停止してしまうことが知られており、 β アミロイド産生亢進を介した細胞障害ではなく、 γ セクレターゼを介していない各々の因子独自の機能による量的な変化を見ているものと思われる。その機能が細胞障害性か細胞保護的なものであるかは現時点では不明であるが、脳アミロイドーシスと酸化ストレスやERストレスは深い関わりを有することが指摘されており、更なる解析が必要であると思われる。

昨年、我々はAph-1と非常に強く結合する未知の蛋白の存在を発表した。今回の実験より、Aph-1には γ セクレターゼの構成因子としての機能の他に独自の機能があり、その様な未知の蛋白との相互作用によりERストレスに対し機能するものであることを示唆しているものと思われる。

E. 結論

脳アミロイドーシスにおいて重要である γ セ

クレターゼ構成因子の各構成成分に関して、複数のERストレス負荷により糖鎖付加を阻害された場合に全長型presenilinの増加、全長型Aph-1の減少を認め、 γ セクレターゼ構成因子のうちいくつかの因子が γ セクレターゼ活性以外の独自の機能で脳アミロイドーシス下における細胞のストレス反応に関わっていることが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 水澤英洋: RNA干渉による脊髄小脳変性症の治療. *神経治療学* 23(1): 17-24, 2006
- 2) 水澤英洋 (分担, 平野朝雄/編著): カラーアトラス神経病理, 第3版. 医学書院, 東京, 2006.
- 3) 水澤英洋: Kennedy-Alter-Sung病(球脊髄性筋萎縮症). 山口 徹, 北原光夫, 福井次矢/編, 今日の治療指針 2006. 医学書院, 東京, 672-673, 2006.
- 4) 水澤英洋: RNAiを用いた神経難病の治療戦略. 組織細胞化学 2006 (第31回組織細胞化学講習会). 日本組織細胞化学会, 京都, 195-202, 2006.
- 5) Hino T, Yokota T, Ito S, Nishina K, Kang Y-S, Mori S, Hori S, Kanda T, Terasaki T, Mizusawa H: In vivo delivery of small interfering RNA targeting brain capillary endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 340: 263-267, 2006.
- 6) Ohkubo T, Sakasegawa Y, Toda H, Kishida H, Arima K, Yamada M, Takahashi H, Mizusawa H, Hachiya NS, Kaneko K: Three-repeat tau 69 is a major tau isoform in laser-microdissected Pick bodies. *Amyloid* 13(1): 1-5, 2006.
- 7) Nishida Y, Yokota T, Takahashi T, Uchihara T, Jishage K, Mizusawa H: Deletion of vitamin E enhances phenotype of Alzheimer disease model mouse. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 350: 530-536, 2006.

2. 学会発表

- 1) 三條伸夫, 金海峰, 水澤英洋. 新規プレセニン複合体構成因子 TMP21 の細胞内分布: 第 25 回日本痴呆学会、広島、10 月 6 日-10 月 7 日、2006 年.
- 2) 三條伸夫, 金海峰, 水澤英洋, 片山泰一, Peter St. George-Hyslop, Paul E Fraser : 内因性 Aph-1 の oligomer 形成に関して. 第 47 回日本神経学会総会、東京、5 月 11 日・12 日・13 日、2006 年.

3. 講演会

- 1) 水澤英洋: RNAi を用いた神経難病の治療戦略. 日本組織細胞化学会第 31 回組織細胞化学講習会、東京、2006.8.3.

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

胆汁への血液 AB クリアランス経路の検討

分担研究者 東海林幹夫 弘前大学医学部脳研脳神経統御部門

共同研究者 瓦林毅*、池田将樹**、松原悦朗***

*弘前大学医学部脳研脳神経統御部門、**群馬大学医学部神経内科

***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 AB42 分子種特異的モノクローナル抗体による受動免疫療法の効果発現に、脳内沈着 AB42 の選択的な脳外へのクリアランスが重要であることを昨年度の研究班で指摘した。血液中の AB42 はリポ蛋白結合型・非結合型が約 9:1 の割合で存在しているが、両分子種とも肝臓が主要代謝臓器として報告されている。この血液中の AB クリアランス (末梢性) は、受動免疫療法の治療効果発現を左右する重要な因子と考えられる。本年度は血液から肝臓を介し胆汁へと排泄された AB を指標に、末梢性 AB クリアランスをアルツハイマー病モデルマウス(Tg2576)で検証した。興味深いことに高齢群 Tg2576 においては、コントロールマウス(non-Tg)に比し、AB 胆汁排泄低下を認めた。この AB42 胆汁排泄低下と脳内 AB42 蓄積量とは逆相関関係にあった。一方、著しい高 AB 血症を呈す脾臓アミロイド沈着マウス(Tg0304)においては、non-Tg を凌ぐ AB 胆汁排泄が高齢群でも保たれていた。アルツハイマー病モデルマウスでは末梢性 AB クリアランスが低下しており、脳からの中枢性 AB クリアランスを悪化させ、その病態を増悪する可能性が考えられた。

A. 研究目的

アルツハイマー病モデルマウスにおける受動免疫療法効果発現機序の一つとして、脳から血液への AB クリアランス経路 (中枢性) の重要性が指摘されている。この脳と血液中 AB との間には平衡関係が成り立っていることが明らかとされており (sink theory)、この血液中 AB の代謝 (末梢性) が、中枢性 AB 代謝をも左右すると推測される。現在、血液中 AB の由来は脳と血小板と考えられており、リポ蛋白結合型と非結合型分子種として存在し、肝臓で主に代謝・分解されると考えられている。我々は、アルツハイマー病やダウン症候群患者においてリポ蛋白非結合型 AB の増加が認められることから、この末梢性 AB クリアランスが障害されている可能性を以前の本研究会議で報告した。本研究では胆汁中に排泄される AB を指標に、アルツハイマー病モデルマウスにおいて末梢性 AB クリアランスの果たす意義を検証した。

B. 研究方法

コントロールマウス(non-Tg)、脳アミロイド沈着を再現するアルツハイマー病モデルマウス(Tg2576)、高濃度の血液中 AB を有するにもかかわらず脳アミロイド沈着をきたさず、脾臓にアミロイド沈着をきたすマウス(Tg0304)の胆汁中 AB40・AB42 を BNT77-BA27/BNT77-BC05 ELISA にて分別測定した。さらに、Tg2576 脳内 AB 沈着総量(70%蟻酸可溶性画分)も同 ELISA にて測定し、胆汁中 AB との相関を検証した。

(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。動物実験では愛護と苦痛の防止に留意した。

C. 研究結果

non-Tg における胆汁排泄 AB40・AB42 量に加齢変動は認めず、高齢マウスでも胆汁中への AB 排泄はよく保たれていた (若年群 : 4-8M vs 高齢

群：12-27M)。しかしながら、胆汁と血液中の Aβ40/Aβ42 比を比較検討すると、胆汁においてその比の著明な低下が明らかとなった。この傾向は Tg2576 でも同様であったが、胆汁への Aβ 排泄は高齢群で減少した。すなわち、脳内アミロイド沈着前の若年群マウス(4-8M)には non-Tg に比して有意に増加した Aβ 胆汁排泄(Aβ42 優位)を認めたが、脳内アミロイド沈着を加速度的に認める高齢群(12-27M)においては Aβ 胆汁排泄は著減し、その総排泄量レベルは non-Tg をも下回った。次いで、この Tg2576 において低下が認められた末梢性 Aβ クリアランスが、如何に病態へ関与しているかを検証するため、脳内総 Aβ 蓄積量(70%蟻酸可溶性画分)と胆汁への Aβ 排泄量との相関を検討した。興味深いことに Aβ42 において両者間に有意な負の相関関係を認めた。一方、Tg2576 を凌ぐ高 Aβ 血症を呈すものの、脳アミロイド沈着を来たすことなく、膵臓にアミロイド沈着を呈する Tg0304 において胆汁中 Aβ 排泄を検討した結果、Tg2576 とは逆に、高齢群において胆汁中 Aβ40・Aβ42 排泄増加を認めた。

D. 考察

本研究より non-Tg においては肝臓での Aβ 代謝(Aβ42 優位)が良く保たれていることが明らかとなった。アルツハイマー病モデルマウスである Tg2576 においては、高齢群で胆汁への Aβ 排泄が低下し、脳 Aβ 蓄積増加と逆相関関係にあることを明らかとした。一方、著しい高 Aβ 血症を呈するにもかかわらず脳内にアミロイド沈着をきたさぬ高齢 Tg0304 では、胆汁排泄 Aβ 経路の機能が良好に保たれている事が明らかとなった。さらにこの Tg0304 の胆汁中 Aβ 排泄レベルが極めて高いことから、この代謝経路の担う Aβ 排泄許容量は極めて高いことも判明した。こうした結果より、Tg2576 では末梢性クリアランス機能低下が存在し、この機能低下が中枢性クリアランスにも悪影響を及ぼし、脳内病変形成を増強している可能性が考えられた。著しい高 Aβ 血症を呈するにもかかわらず脳内にアミロイド沈着をきたさぬ高齢 Tg0304 では、末梢性 Aβ クリアランスが良く保たれ、結果的に中枢性 Aβ クリアランスが最適化された状態となり、脳内アミロイド沈着を防

止しているとも考えられる。昨年度報告した受動免疫療法において、腹腔内投与した抗体はほとんど脳内移行せず、末梢で作用し、脳から血液中へと Aβ の効率的な引き出しをはかっているとの結果は、本研究で明らかとなった末梢性 Aβ クリアランス障害の改善が受動免疫療法治療効果増強に役立つばかりでなく、アルツハイマー病の新規治療法構築に重要な視点であると考えられた。今後、末梢性クリアランス機構の詳細な解明が必要である。

E. 結論

アルツハイマー病モデルマウスでは末梢性 Aβ クリアランスが低下しており、脳からの中枢性 Aβ クリアランスを悪化させ、その病態を増悪している可能性が考えられた。末梢性 Aβ クリアランス機能低下改善は新規治療法構築に重要な視点と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kuwano R, Miyashita A, Arai H, Asada T, Imagawa M, Shoji M, Higuchi S, Urakami K, Kakita A, Takahashi H, Tsukie T, Toyabe S, Akazawa K, Kanazawa I, Ihara Y: Japanese Genetic Study Consortium for Alzheimer's Disease: Dynamamin-binding protein gene on chromosome 10q is associated with late-onset Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 15(13): 2170-2182, 2006.
- 2) Murakami T, Paitel E, Kawarabayashi T, Ikeda M, Chishti MA, Janus C, Matsubara E, Sasaki A, Kawarai T, Phinney AL, Harigaya Y, Horne P, Egashira N, Mishima K, Hanna A, Yang J, Iwasaki K, Takahashi M, Fujiwara M, Ishiguro K, Bergeron C, Carlson GA, Abe K, Westaway D, St George-Hyslop P, Shoji M: Cortical neuronal and glial pathology in TgTauP301L transgenic mice: neuronal degeneration, memory disturbance, and phenotypic variation. *Am J Pathol* 169(4):1365-1375, 2006.
- 3) Samura E, Shoji M, Kawarabayashi T, Sasaki A,

Matsubara E, Murakami T, Wuhua X, Tamura S, Ikeda M, Ishiguro K, Saido TC, Westaway D, St George Hyslop P, Harigaya Y, Abe K: Enhanced accumulation of tau in doubly transgenic mice expressing mutant betaAPP and presenilin-1. *Brain Res* 1094(1): 192-199, 2006.

4) Harigaya Y, Tomidokoro Y, Ikeda M, Sasaki A, Kawarabayashi T, Matsubara E, Kanai M, Saido TC, Younkin SG, Shoji M: Type-specific evolution of amyloid plaque and angiopathy in APPsw mice. *Neurosci Lett* 395(1): 37-41, 2006.

5) Murakami T, Moriwaki Y, Kawarabayashi T, Nagai M, Ohta Y, Deguchi K, Kurata T, Takehisa Y, Matsubara E, Ikeda M, Harigaya Y, Shoji M, Takahashi R, Abe K: PINK1, a gene product of PARK6, accumulates in {alpha}-synucleinopathy brains. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007 [Epub ahead of print]

6) Hayashi T, Shoji M, Abe K: Molecular mechanisms of ischemic neuronal cell death--with relevance to Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 3 (4): 351-358, 2006.

2. 学会発表

1) Kawarabayashi T, Kurata T, Matsubara E, Murakami T, Takehisa Y, Nagai M, Hayashi T, Asami-Odaka A, Abe K, Shoji M: Selective Aβ42 removal using Aβ42 C-terminal-specific antibody reduces Aβ accumulation in Alzheimer's disease model mouse. Neuroscience 2006, the Society for

Neuroscience, 36th Annual Meeting, Atlanta, Oct 14-18, 2006.

2) Sasaki A, Shoji M, Kawarabayashi T, Ikeda M, Nakazato Y: Microglial activation in human tauopathies and transgenic mouse models. XVI International Congress of Neuropathology, San Francisco, Sept 9-16, 2006.

3) Kurata T, Kawarabayashi T, Murakami T, Ota Y, Morimoto N, Takehisa Y, Nagai M Hayashi T, Shoji M, Abe K: Enhanced accumulation of α-synuclein & phosphorylated α-synuclein in transgenic mice expressing APP and Presenilin-1. IGGP2006, Hiroshima, Oct 6, 2006.

4) Murakami T, Kawarabayashi T, Kurata T, Nagai M, Inoue H, Moriwaki Y, Shoji M, Takahashi R, Abe K: Pael-R is accumulated in Lewy bodies of dementia with Lewy bodies and Parkinson's disease. 10th International Conference on Alzheimer's disease and related disorders. Madrid, July 15-20, 2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1.特許取得

1) 脳 Aβ42 選択的除去療法 特願 2003-317443

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし