

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

血清アルブミンはトランスサイレチンのアミロイド形成を阻止する！

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 齋藤史織*、釘宮智江*、三隅洋平**、植田光晴***、星井嘉信****、
 石原得博****、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、**神経内科学、
 ***病態情報解析学、
 山口大学大学院医学系研究科 ****病理形態学

研究要旨 家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) 患者では、病態の進行と共に低タンパク、低アルブミン血症をきたすが、そのことがアミロイド形成に与える影響については不明である。本研究では、血清中に最も豊富に存在するヒト血清アルブミン (HSA) がトランスサイレチン (TTR) の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。その結果、HSA の共存により、TTR アミロイド化が有意に抑制され、その時の TTR 四量体の安定性が上昇していた。また、HSA は変性 TTR に対し高い結合性を示した。これらの結果より、HSA は TTR のアミロイド化に抑制的に寄与している可能性が示され、病態の進行によりそのレベルが低下することで、さらに加速度的な病態の進行を引き起こす可能性が考えられる。

A. 研究目的

家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) 患者においては、病期の進行とともに低タンパク、低アルブミン血症をきたすが、そのことがアミロイド形成に及ぼす影響については不明である。また、アミロイド沈着過程には酸化ストレスが関与していることも報告されているが、その詳細については不明な点が多い。本研究では、血清中に最も豊富に存在し、抗酸化機能を有するヒト血清アルブミン (HSA) とトランスサイレチン (TTR) の相互作用及び HSA が TTR の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。

TTR がアミロイドを形成する際に分子表面に露出するエピトープの一つである TTR₁₁₅₋₁₂₄ に対するモノクローナル抗体 (抗 TTR₁₁₅₋₁₂₄ 抗体) を用いたサンドイッチ ELISA 法により間接的に評価した。TTR 四量体の安定性は、非還元 SDS-PAGE により評価した。また、TTR と HSA の結合性は BIAcore を使い、センサーチップ上に HSA をリガンドとして固定化し、TTR をアナライトとして流すことで評価した。

(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。

B. 研究方法

野生型 (WT) TTR は健常者血清から、また変異型 TTR (ATTR) は FAP ATTR Val30Met のホモ接合体患者血清からそれぞれ抽出されたものを用いた。TTR を HSA 及び他の血清タンパク質との共存 (0-600 μ M)、非共存下 (37°C、酸性条件下) でインキュベーションし、アミロイド化の程度を評価した。アミロイド化の程度の評価には、

C. 研究結果

HSA 存在下で TTR をアミロイド化させたところ、抗 TTR₁₁₅₋₁₂₄ 抗体との反応性は、TTR 単独の時と比べ HSA の濃度依存的に有意に減少し、アミロイド化が抑制されていた (図 1)。また、この時 TTR 四量体の安定性は上昇していた。この結果は、WT TTR、ATTR Val30Met の両方で同様に見られた。

HSA以外の血清タンパク質 (α_1 -酸性糖たんぱく質及びトランスフェリン) を血中を反映した濃度で共存させても、TTRのアミロイド化の程度に有意な減少は見られなかった。HSAの示すTTRアミロイド化抑制作用は、脂肪酸結合型HSAを共存させることで増強し、HSA分子内のCys残基を特異的に修飾することで減弱した。さらに、アミロイド化TTR及び尿素処理により分子内部の疎水領域を露出させた尿素処理TTRとHSAの結合性を評価したところ、変性TTRはHSAと高い親和性を示した。

D. 考察

HSAの共存により、TTRのアミロイド化が抑制された。この時、TTR四量体の安定性が上昇していたことから、HSAの共存により、四量体が安定化することでアミロイド化が抑制されたと考えられる。また、HSA以外の血清タンパク質の共存では有意な差が見られなかったことより、この効果はHSAに特異的であると考えられた。HSAの示すTTRアミロイド化抑制作用が、HSAの抗酸化能を上昇させる結合型脂肪酸量の増加により増強し、またHSAが抗酸化能を発揮する上で非常に重要な残基であると考えられているCys残基を特異的に修飾することで減弱したことから、HSAが示すTTRアミロイド化抑制効果の一部は、HSA自身が持つ抗酸化機能に由来すると考えられる。アミロイド化TTR及び尿素処理TTRがHSAに非常に高い結合性を示し、TTR分子表面の疎水領域の変化が親和性に大きく影響したことから、変性TTRとHSAの結合には疎水性相互作用が寄与しており、この結合性によりTTR同士の重合が阻害されている可能性が考えられる。

E. 結論

HSAは自身の持つ抗酸化機能によりTTRのアミロイド化を抑制し、またアミロイド化TTRと疎水性相互作用を介した高い親和性を示すことでTTR同士の重合を阻害し、TTRのアミロイド形成に対し抑制的に機能していると考えられる。HSAは血清中、髄液中に最も豊富に存在するタンパク質であることから、TTRのアミロイド形成過程に大きく寄与するものと考えられる。FAP

患者においては病態の進行により腎障害を起こし、腎臓からタンパク質が漏出しHSAレベルが低下するが、TTRのアミロイド形成過程に抑制的に寄与しているHSAレベルの低下が、更に病態の進行を加速させる因子にな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) 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 novel transgenic rat with human amyloidogenic transthyretin V30M. *Biochem Biophys Res Commun* 352: 299-304, 2007.
- 2) Sato T, Susuki S, Suico MA, Miyata M, Ando Y, Mizuguchi M, Takeuchi M, Dobashi M, Shuto T, Kai H: Endoplasmic reticulum quality control regulates the fate of transthyretin variants in the cell. *EMBO J* 26: 2501-2512, 2007.
- 3) Koide-Yoshida S, Niki T, Ueda M, Himeno S, Taira T, Iguchi-Arigo SM, Ando Y, Ariga H: DJ-1 degrades transthyretin and an inactive form of DJ-1 is secreted in familial amyloidotic polyneuropathy. *Int J Mol Med* 19:885-893, 2007.
- 4) Bergström J, Patrosso MC, Colussi G, Salvatore M, Penco S, Lando G, Marocchi A, Ueda A, Nakamura M, Ando Y: A novel type of familial transthyretin amyloidosis, ATTR Asn124Ser, with co-localization of kappa light chains. *Amyloid* 14:141-145, 2007.
- 5) Inomata Y, Zeledon ME, Asonuma K, Okajima H, Takeichi T, Ishiko T, Ando Y: Whole-liver graft without the retrohepatic inferior vena cava for sequential (domino) living donor liver transplantation. *Am J Transplant* 7:1629-1632, 2007.
- 6) Yamamoto S, Wilczek H. E, Nowak G, Larsson M, Oksanen A, Iwata T, Gjertsen H, Söderdahl G, Wikström L, Ando Y, Suhr OB, and Ericzon B-G: Liver Transplantation for Familial Amyloidotic Polyneuropathy (FAP): A single center experience

- during 16 years. *Am J Transplant* 7:2597-604, 2007.
- 7) Yamashita T, Ando Y, Ueda M, Nakamura M, Okamoto S, Zeledon ME, Hirahara T, Hirai T, Ueda A, Misumi Y, Obayashi K, Inomata H, Uchino M: Effect of liver transplantation on transthyretin Tyr114Cys-related cerebral amyloid angiopathy. *Neurology* 70:123-128, 2008.
- 8) Berk JL, Bisbee AB, Kelly JW, Dyck PJ, Falk RH, Ando Y, Coelho T, Ikeda S, Merlini G, Suhr OB, Skinner M, the Diflunisal Investigators Consortium: Clinical trial for TTR amyloidosis using diflunisal. In "XIth International Symposium on Amyloidosis", Skinner M, Berk J, Connors L, Seldin D (Eds.), *CRC Press, New York* p387-389, 2007.
- 9) Himeno S, Ueda M, Nakamura M, Yamashita T, Obayashi K, Sun X, Misumi Y, Shinriki S, Ueda A, Uji Y, Saito S, Kim J, Meng W, Ando Y: Urinary transthyretin: a possible biochemical marker in the early stage of renal dysfunction. In "XIth International Symposium on Amyloidosis", Skinner M, Berk J, Connors L, Seldin D (Eds.), *CRC Press, New York* p146-148, 2007.
- 10) Kakizoe N, Ando Y, Kawaji T, Ando E, Sandgren O, Suhr OB, Tanihara H: Unique phenotype of vitreous amyloidosis in different endemic areas. In "XIth International Symposium on Amyloidosis", Skinner M, Berk J, Connors L, Seldin D (Eds.), *CRC Press, New York* p149-151, 2007.
- 11) Kim J, Motomiya Y, Nakamura M, Ueda M, Saito S, Misumi Y, Himeno S, Obayashi K, Shinriki S, Meng W, Semba U, Kai H, Ando Y: Role of the C-terminal amino acids in β 2-microglobulin amyloid formation. In "XIth International Symposium on Amyloidosis", Skinner M, Berk J, Connors L, Seldin D (Eds.), *CRC Press, New York* p16-18, 2007.
- 12) Misumi Y, Ando Y, Nakamura M, Yamashita T, Himeno S, Ueda M, Obayashi K, Sun X, Saito S, Kim J, Shinriki S, Meng W, Ueda A, Uchino M: An autopsy case of familial amyloidotic polyneuropathy ATTR Val30Met 10 years after liver transplantation: changes in the amount of amyloid deposits in the pancreas. In "XIth International Symposium on Amyloidosis", Skinner M, Berk J, Connors L, Seldin D (Eds.), *CRC Press, New York* p169-171, 2007.
- 13) Obayashi K, Yamashita T, Ueda M, Nakamura M, Asonuma K, Inomata Y, Uchino M, Tanaka K, Ando Y: Amyloid neuropathy in a Japanese domino liver-transplanted recipient. In "XIth International Symposium on Amyloidosis", Skinner M, Berk J, Connors L, Seldin D (Eds.), *CRC Press, New York* p172-174, 2007.
- 14) Okamoto S, Yamashita T, Ando Y, Nakamura M, Ueda M, Uchino M: Comparison of cardiomyopathy in FAP after orthotopic liver transplantation with those of non-transplanted FAP patients. In "XIth International Symposium on Amyloidosis", Skinner M, Berk J, Connors L, Seldin D (Eds.), *CRC Press, New York* p180-181, 2007.
- 15) Saito S, Ando Y, Ueda M, Kim J, Nakamura M, Yamashita T, Obayashi K, Misumi Y, Shinriki S, Himeno S, Meng W, Ishima Y, Akaike T, Otagiri M: Effect of nitric oxide in transthyretin-related amyloidosis. In "XIth International Symposium on Amyloidosis", Skinner M, Berk J, Connors L, Seldin D (Eds.), *CRC Press, New York* p185-187, 2007.
- 16) Sato T, Susuki S, Miyata M, Ando Y, Shuto T, Suico MA, Kai H: Inhibition of intracellular tetramerization induces the proteasomal degradation of amyloidogenic transthyretin variants. In "XIth International Symposium on Amyloidosis", Skinner M, Berk J, Connors L, Seldin D (Eds.), *CRC Press, New York* p188-190, 2007.
- 17) Shinriki S, Ueda M, Yamashita T, Obayashi K, Sun X, Himeno S, Ueda A, Misumi Y, Saito S, Kim J, Meng W, Shinohara M, Ando Y: Amyloid deposition in the tongue of patients with familial amyloidotic polyneuropathy. In "XIth International Symposium on Amyloidosis", Skinner M, Berk J, Connors L, Seldin D (Eds.), *CRC Press, New York* p196-198, 2007.
- 18) Ueda A, Ueda M, Yamashita T, Hirano T, Nakamura M, Misumi Y, Meng W, Ito T, Uchino M, Ando Y: Proliferation of smooth muscle cells in the tunica intima of cerebral vessels in familial amyloidotic polyneuropathy ATTR Y114C. In "XIth International Symposium on Amyloidosis", Skinner

M, Berk J, Connors L, Seldin D (Eds.), *CRC Press, New York* p202-204, 2007.

19) Ueda M, Ando Y, Nakamura M, Yamashita T, Obayashi K, Misumi Y, Shinriki S, Ueda A, Zeledon R ME, Himeno S, Saito S, Kim J, Meng W, Uchino M. FK506 inhibits murine AA amyloidosis without modulating serum SAA levels. In "XIth International Symposium on Amyloidosis", Skinner M, Berk J, Connors L, Seldin D (Eds.), *CRC Press, New York* p99-101, 2007.

20) Yamashita T, Ando Y, Ueda M, Nakamura M, Okamoto S, Hirahara T, Ueda A, Misumi Y, Obayashi K, Uchino M. Effects of liver transplantation on hereditary cerebral amyloid angiopathy associated with ATTR Y114C. In "XIth International Symposium on Amyloidosis", Skinner M, Berk J, Connors L, Seldin D (Eds.), *CRC Press, New York* p211-213, 2007.

21) Zeledon R, Ando Y, Asonuma K, Nakamura M, Ueda M, Sun X, Fujii J, Inomata Y. Effect of tacrolimus and cyclosporine on transthyretin (TTR) metabolism in rats: a long term analysis. In "XIth International Symposium on Amyloidosis", Skinner M, Berk J, Connors L, Seldin D (Eds.), *CRC Press, New York* p214-216, 2007.

2. 学会発表

1) Ando Y : Liver transplantation in hereditary amyloidosis. Symposium on pathology. The 24th World Congress of Pathology and Clinical Medicine, Kuala Lumpur, Malaysia, Aug 20-24, 2007.

2) Kim J, Motomiya Y, Nakamura M, Ueda M, Saito S, Misumi Y, Himeno S, Obayashi K, Shinriki S, Meng W, Semba U, Kai H, and Ando Y. Role of the C-terminal amino acids in beta2-microglobulin amyloid formation. 19th FAOBMB Seoul Conference, Seoul, Korea, May 27-30, 2007.

3) 植田光晴、安東由喜雄：遺伝子疾患の画期的診断法の確立と新たな病態解析. 第 26 回日本臨床化学会夏季セミナー、志摩、Jul 5-7、2007.

4) 大林光念、植田光晴、三隅洋平、山下太郎、内野誠、安東由喜雄. 本邦初のドミノ肝移植患者が術後 7 年目にアミロイドポリニューロパチー

を発症した. 第 25 回日本神経治療学会総会、仙台、June 21-22、2007.

5) 植田光晴、安東由喜雄、中村政明、山下太郎、大林光念、植田明彦、三隅洋平、内野 誠：実験的 AA アミロイドーシスにおける FK506 投与の遺伝子発現に及ぼす影響. 第 48 回日本神経学会総会、名古屋、May 16-18、2007.

6) 植田光晴、安東由喜雄：実験的 AA アミロイドーシスにおける FK506 投与の遺伝子発現に及ぼす影響. 第 51 回日本リウマチ学会総会・学術集会、横浜、April 26-29、2007.

7) 植田光晴、孟薇、大林 光念、堀端 洋子、安東 由喜雄：実験的 AA アミロイドーシスにおける FK506 のアミロイド抑制効果と T 細胞の関与. 第 35 回日本臨床免疫学会総会、大阪、Oct 19-20、2007.

8) 安東由喜雄、植田光晴、山下太郎、三隅洋平、大林光念、川路隆博、安東えい子、谷原秀信. 網膜光凝固術による家族性アミロイドポリニューロパチーの眼症状進行抑制の可能性. 第 48 回日本神経学会総会、名古屋、May 16-18、2007.

9) 安東由喜雄. トランスサイレチン型アミロイドーシスの病態解析と治療. 第 54 回日本臨床検査医学会学術集会、大阪、Nov 22-25、2007.

10) 植田光晴、孟薇、三隅洋平、齋藤史織、大林光念、堀端洋子、中熊るみ、中川邦子、永田四郎、安東由喜雄. SELDI-TOF MS を用いた異型トランスサイレチンの簡便かつ迅速な検出法. 第 54 回日本臨床検査医学会学術集会、大阪、Nov 22-25、2007.

11) 孟薇、植田光晴、大林光念、堀端洋子、安東由喜雄. AA アミロイドーシス惹起マウスの血中に AEF 類似因子が存在する. 第 54 回日本臨床検査医学会学術集会、大阪、Nov 22-25、2007.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

1)HMGB1 のアミロイドーシスへの保護作用（特願 2007-034325、平成 19 年 4 月 1 日出願）

2)HMGB1 のアミロイドーシスへの保護作用（C1-A0620、平成 19 年 6 月 1 日出願）

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

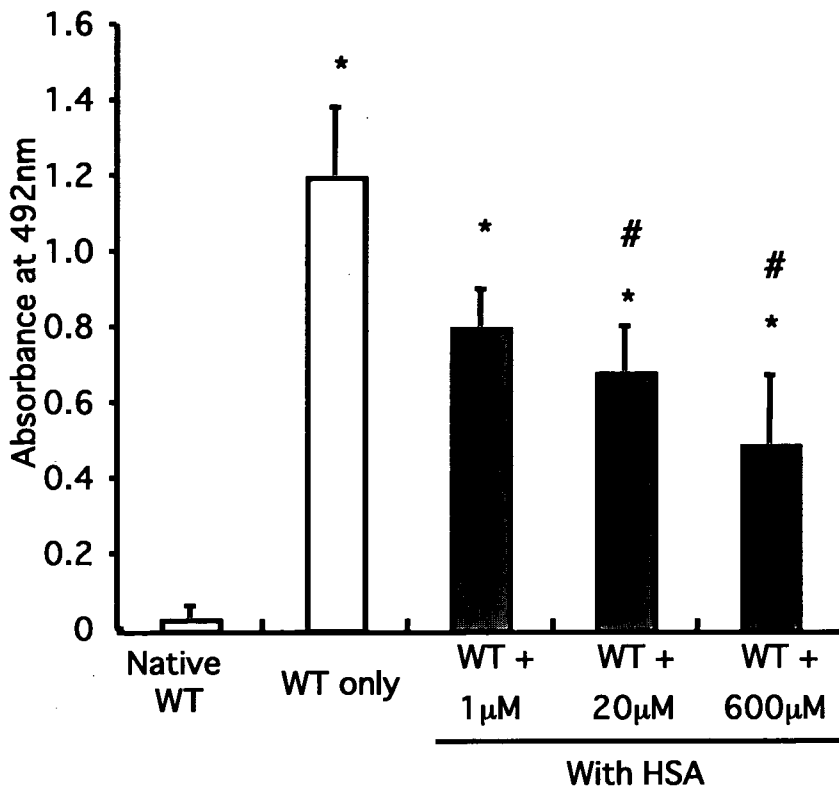


図1 HSA 共存時の TTR のアミロイド形成能

TTR 濃度を 20 mM とし、HSA 共存または非共存で pH 3.0、37°C で 5 日間インキュベーション後、アミロイド化の程度を評価した。

*; $p < 0.01$ vs. Native WT. #; $p < 0.01$ vs. WT only.

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

Ultrasonication を用いた生理的 pH 下でのトランスサイレチンの アミロイド形成 —in vitro での治療研究の新たなツール—

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 三隅洋平*、金 在美**、齋藤史織**、植田光晴***、大林光念***、
 山下太郎*、内野 誠*

*熊本大学大学院医学薬学研究部神経内科学、**同薬物動態制御学、
 ***同病態情報解析学

研究要旨 家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) のアミロイド前駆蛋白であるトランスサイレチン (TTR) のアミロイド形成機構においては、四量体の解離に加え、解離した単量体の立体構造の変化が必要であると考えられている。TTR の四量体構造は安定であるため、in vitro でのアミロイド形成機構および治療物質の解析はこれまで酸性条件で行われてきた。今回、生理的 pH での解析を可能にするために pH 7.0 でのアミロイド形成を試みた。pH 7.0 の条件下でドデシル硫酸ナトリウム、リゾリン脂質を加えても TTR はアミロイドを形成しなかったが、Ultrasonication を照射しつつインキュベートするとチオフラビン T 蛍光強度は有意に上昇し、透過型電顕では線維構造が認められた。また、Cross-linked SDS-PAGE および CD スペクトル分析では、Ultrasonication 照射により経時的に TTR 四量体の減少および二次構造の変化がおこることが示された。以上より、Ultrasonication により四量体の解離および単量体の立体構造の変化を誘導することにより、pH 7.0 でも TTR のアミロイド線維形成が促進されることが示唆された。本法は、生理的 pH でのアミロイド形成機構の解析と治療因子の開発を行う上で有用であると考えられた。

A. 研究目的

トランスサイレチン (TTR) のアミロイド線維形成機構においては、四量体から単量体への解離、さらに単量体の立体構造の変化が重要であることが示されてきた。酸性の条件下 (pH <5.0) ではこのような立体構造の変化とアミロイド線維形成が効率的に起こることから、種々のアミロイド線維形成促進・阻害因子の検討は主に酸性条件で行われてきた。一方、中性 pH では TTR の四量体構造が安定であるために、アミロイド線維形成が起こりにくく、生理的条件下でのアミロイド線維形成機構は不明な点が多い。本研究は、pH 7.0 でトランスサイレチンのアミロイド形成を行い、生理的 pH でのアミロイド形成機構の解析と治療実験へつなげることを目的とした。

B. 研究方法

ヒト血清由来の野生型 TTR を中性 (pH 7.0) の緩衝液中で、1) ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、2) Phosphatidylcholine、3) Ultrasonication をそれぞれ加えて、インキュベートした。各条件下での TTR の構造変化は CD スペクトル、Cross-linked SDS-PAGE を用いて解析した。アミロイド線維形成はチオフラビン T 蛍光度を用いて定量し、透過型電顕で形態観察を行った。

ヒト血清はインフォームドコンセントが得られた健常人ボランティアより採取した。

C. 研究結果

pH 7.0 での TTR のアミロイド線維形成は SDS やリゾリン脂質では促進されなかった。Ultrasonication を長期間反復して行うことによりチオフラビン T 蛍光度が有意に上昇し、透過型電顕で線維形成が認められた (図 1)。Cross-linked

SDS-PAGEではUltrasonicationにより四量体TTRが経時的に減少することが示された。CDスペクトルでもUltrasonicationによるTTRの二次構造の変化が示された。

D. 考察

生理的pH下においても、Ultrasonicationを用いて四量体の解離および単量体の立体構造の変化を誘導することによりTTRのアミロイド線維形成が促進されることが示唆された。またUltrasonicationを用いたアミロイド線維伸長は、種々のアミロイド線維形成促進・阻害因子を生理的pH下で検討する上で有用な方法であると考えられた。

E. 結論

Ultrasonicationにより生理的 pH 下において TTR の四量体の解離と、単量体の立体構造の変化が誘導され、アミロイド線維形成が促進されることが示された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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 novel transgenic rat with human amyloidogenic transthyretin V30M. *Biochem Biophys Res Commun* 352: 299-304, 2007.
- 2) Sato T, Susuki S, Suico MA, Miyata M, Ando Y, Mizuguchi M, Takeuchi M, Dobashi M, Shuto T, Kai H: Endoplasmic reticulum quality control regulates the fate of transthyretin variants in the cell. *EMBO J* 26: 2501-2512, 2007.
- 3) Koide-Yoshida S, Niki T, Ueda M, Himeno S, Taira T, Iguchi-Ariga SM, Ando Y, Ariga H: DJ-1 degrades transthyretin and an inactive form of DJ-1 is secreted in familial amyloidotic polyneuropathy. *Int J Mol Med* 19:885-893, 2007.
- 4) Bergström J, Patrosso MC, Colussi G, Salvatore M, Penco S, Lando G, Marocchi A, Ueda A, Nakamura M,

Ando Y: A novel type of familial transthyretin amyloidosis, ATTR Asn124Ser, with co-localization of kappa light chains. *Amyloid* 14:141-145, 2007.

5) Inomata Y, Zeledon ME, Asonuma K, Okajima H, Takeichi T, Ishiko T, Ando Y: Whole-liver graft without the retrohepatic inferior vena cava for sequential (domino) living donor liver transplantation. *Am J Transplant* 7:1629-1632, 2007.

6) Yamamoto S, Wilczek H. E, Nowak G., Larsson M, Oksanen A, Iwata T, Gjertsen H, Söderdahl G., Wikström L, Ando Y, Suhr OB, and Ericzon B-G: Liver Transplantation for Familial Amyloidotic Polyneuropathy (FAP): A single center experience during 16 years. *Am J Transplant* 7:2597-604, 2007.

7) Yamashita T, Ando Y, Ueda M, Nakamura M, Okamoto S, Zeledon ME, Hirahara T, Hirai T, Ueda A, Misumi Y, Obayashi K, Inomata H, Uchino M: Effect of liver transplantation on transthyretin Tyr114Cys-related cerebral amyloid angiopathy. *Neurology* 70:123-128, 2008.

8) Berk JL, Bisbee AB, Kelly JW, Dyck PJ, Falk RH, Ando Y, Coelho T, Ikeda S, Merlini G, Suhr OB, Skinner M, the Diflunisal Investigators Consortium: Clinical trial for TTR amyloidosis using diflunisal. In "XIth International Symposium on Amyloidosis", Skinner M, Berk J, Connors L, Seldin D (Eds.), *CRC Press, New York* p387-389, 2007.

9) Himeno S, Ueda M, Nakamura M, Yamashita T, Obayashi K, Sun X, Misumi Y, Shinriki S, Ueda A, Uji Y, Saito S, Kim J, Meng W, Ando Y. Urinary transthyretin: a possible biochemical marker in the early stage of renal dysfunction. In "XIth International Symposium on Amyloidosis", Skinner M, Berk J, Connors L, Seldin D (Eds.), *CRC Press, New York* p146-148, 2007.

10) Kakizoe N, Ando Y, Kawaji T, Ando E, Sandgren O, Suhr OB, Tanihara H. Unique phenotype of vitreous amyloidosis in different endemic areas. In "XIth International Symposium on Amyloidosis", Skinner M, Berk J, Connors L, Seldin D (Eds.), *CRC Press, New York* p149-151, 2007.

11) Kim J, Motomiya Y, Nakamura M, Ueda M, Saito S, Misumi Y, Himeno S, Obayashi K, Shinriki

- S, Meng W, Semba U, Kai H, Ando Y: Role of the C-terminal amino acids in β 2-microglobulin amyloid formation. In "XIth International Symposium on Amyloidosis", Skinner M, Berk J, Connors L, Seldin D (Eds.), *CRC Press, New York* p16-18, 2007.
- 12) Misumi Y, Ando Y, Nakamura M, Yamashita T, Himeno S, Ueda M, Obayashi K, Sun X, Saito S, Kim J, Shinriki S, Meng W, Ueda A, Uchino M. An autopsy case of familial amyloidotic polyneuropathy ATTR Val30Met 10 years after liver transplantation: changes in the amount of amyloid deposits in the pancreas. In "XIth International Symposium on Amyloidosis", Skinner M, Berk J, Connors L, Seldin D (Eds.), *CRC Press, New York* p169-171, 2007.
- 13) Obayashi K, Yamashita T, Ueda M, Nakamura M, Asonuma K, Inomata Y, Uchino M, Tanaka K, Ando Y. Amyloid neuropathy in a Japanese domino liver-transplanted recipient. In "XIth International Symposium on Amyloidosis", Skinner M, Berk J, Connors L, Seldin D (Eds.), *CRC Press, New York* p172-174, 2007.
- 14) Okamoto S, Yamashita T, Ando Y, Nakamura M, Ueda M, Uchino M. Comparison of cardiomyopathy in FAP after orthotopic liver transplantation with those of non-transplanted FAP patients. In "XIth International Symposium on Amyloidosis", Skinner M, Berk J, Connors L, Seldin D (Eds.), *CRC Press, New York* p180-181, 2007.
- 15) Saito S, Ando Y, Ueda M, Kim J, Nakamura M, Yamashita T, Obayashi K, Misumi Y, Shinriki S, Himeno S, Meng W, Ishima Y, Akaike T, Otagiri M. Effect of nitric oxide in transthyretin-related amyloidosis. In "XIth International Symposium on Amyloidosis", Skinner M, Berk J, Connors L, Seldin D (Eds.), *CRC Press, New York* p185-187, 2007.
- 16) Sato T, Susuki S, Miyata M, Ando Y, Shuto T, Suico MA, Kai H. Inhibition of intracellular tetramerization induces the proteasomal degradation of amyloidogenic transthyretin variants. In "XIth International Symposium on Amyloidosis", Skinner M, Berk J, Connors L, Seldin D (Eds.), *CRC Press, New York* p188-190, 2007.
- 17) Shinriki S, Ueda M, Yamashita T, Obayashi K, Sun X, Himeno S, Ueda A, Misumi Y, Saito S, Kim J, Meng W, Shinohara M, Ando Y: Amyloid deposition in the tongue of patients with familial amyloidotic polyneuropathy. In "XIth International Symposium on Amyloidosis", Skinner M, Berk J, Connors L, Seldin D (Eds.), *CRC Press, New York* p196-198, 2007.
- 18) Ueda A, Ueda M, Yamashita T, Hirano T, Nakamura M, Misumi Y, Meng W, Ito T, Uchino M, Ando Y: Proliferation of smooth muscle cells in the tunica intima of cerebral vessels in familial amyloidotic polyneuropathy ATTR Y114C. In "XIth International Symposium on Amyloidosis", Skinner M, Berk J, Connors L, Seldin D (Eds.), *CRC Press, New York* p202-204, 2007.
- 19) Ueda M, Ando Y, Nakamura M, Yamashita T, Obayashi K, Misumi Y, Shinriki S, Ueda A, Zeledon R ME, Himeno S, Saito S, Kim J, Meng W, Uchino M: FK506 inhibits murine AA amyloidosis without modulating serum SAA levels. In "XIth International Symposium on Amyloidosis", Skinner M, Berk J, Connors L, Seldin D (Eds.), *CRC Press, New York* p99-101, 2007.
- 20) Yamashita T, Ando Y, Ueda M, Nakamura M, Okamoto S, Hirahara T, Ueda A, Misumi Y, Obayashi K, Uchino M: Effects of liver transplantation on hereditary cerebral amyloid angiopathy associated with ATTR Y114C. In "XIth International Symposium on Amyloidosis", Skinner M, Berk J, Connors L, Seldin D (Eds.), *CRC Press, New York* p211-213, 2007.
- 21) Zeledon R, Ando Y, Asonuma K, Nakamura M, Ueda M, Sun X, Fujii J, Inomata Y: Effect of tacrolimus and cyclosporine on transthyretin (TTR) metabolism in rats: a long term analysis. In "XIth International Symposium on Amyloidosis", Skinner M, Berk J, Connors L, Seldin D (Eds.), *CRC Press, New York* p214-216, 2007.
2. 学会発表
- 1) Ando Y : Liver transplantation in hereditary amyloidosis. Symposium on pathology. The 24th World Congress of Pathology and Clinical Medicine,

Kuala Lumpur, Malaysia, Aug 20-24, 2007.

2) Kim J, Motomiya Y, Nakamura M, Ueda M, Saito S, Misumi Y, Himeno S, Obayashi K, Shinriki S, Meng W, Semba U, Kai H, and Ando Y: Role of the C-terminal amino acids in beta2-microglobulin amyloid formation. 19th FAOBMB Seoul Conference, Seoul, Korea, May 27-30, 2007.

3) 植田光晴、安東由喜雄：遺伝子疾患の画期的診断法の確立と新たな病態解析. 第 26 回日本臨床化学会夏季セミナー、志摩、Jul 5-7、2007.

4) 大林光念、植田光晴、三隅洋平、山下太郎、内野誠、安東由喜雄：本邦初のドミノ肝移植患者が術後 7 年目にアミロイドポリニューロパチーを発症した. 第 25 回日本神経治療学会総会、仙台、June 21-22、2007.

5) 植田光晴、安東由喜雄、中村政明、山下太郎、大林光念、植田明彦、三隅洋平、内野 誠：実験的 AA アミロイドーシスにおける FK506 投与の遺伝子発現に及ぼす影響. 第 48 回日本神経学会総会、名古屋、May 16-18、2007.

6) 植田光晴、安東由喜雄：実験的 AA アミロイドーシスにおける FK506 投与の遺伝子発現に及ぼす影響. 第 51 回日本リウマチ学会総会・学術集会、横浜、April 26-29、2007.

7) 植田光晴、孟薇、大林 光念、堀端 洋子、安東 由喜雄：実験的 AA アミロイドーシスにおけ

る FK506 のアミロイド抑制効果と T 細胞の関与. 第 35 回日本臨床免疫学会総会、大阪、Oct 19-20、2007.

8) 安東由喜雄、植田光晴、山下太郎、三隅洋平、大林光念、川路隆博、安東えい子、谷原秀信：膜光凝固術による家族性アミロイドポリニューロパチーの眼症状進行抑制の可能性. 第 48 回日本神経学会総会、名古屋、May 16-18、2007.

9) 安東由喜雄：ランスサイレチン型アミロイドーシスの病態解析と治療. 第 54 回日本臨床検査医学会学術集会、大阪、Nov 22-25、2007.

10) 植田光晴、孟薇、三隅洋平、齋藤史織、大林光念、堀端洋子、中熊るみ、中川邦子、永田四郎、安東由喜雄：ELDI-TOF MS を用いた異型トランスサイレチンの簡便かつ迅速な検出法. 第 54 回日本臨床検査医学会学術集会、大阪、Nov 22-25、2007.

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

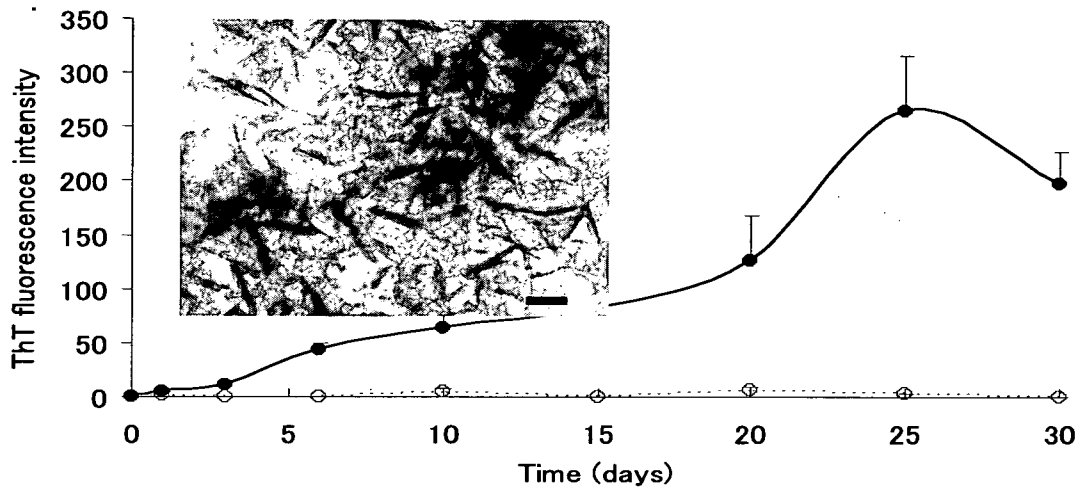
2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

図 1. Ultrasonication による pH 7.0 でのトランスサイレチンのアミロイド形成



pH 7.0 でトランスサイレチンをインキュベートすると、Ultrasonication を照射しない(○)とアミロイドは形成されなかったが、Ultrasonication を照射する(●)とチオフラビン T 蛍光度が有意に上昇し、透過型電顕で線維形成が認められた。bar = 100 nm

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

Aph-1 を介した γ セクレターゼ活性の調節メカニズムの解明

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

同上

研究要旨 ガンマ・セクレターゼ複合体構成因子である Aph-1 の量的変化がガンマ・セクレターゼ活性に及ぼす影響を調べるため、野生型およびスウェーデン型 mutation のあるアミロイド前駆蛋白(APP)を過剰発現させた培養細胞を用いて、培養液中のアミロイド β 蛋白を測定するシステムを構築した。Aph-1 を単独で過剰発現させた場合にはコントロールの約 1.5 倍の活性亢進が認められたが、その際 presenilin の N 末端、C 末端は共に量的変化が認められず、活性型ガンマ・セクレターゼの総量は変化していないことを示していた。一方、siRNA によるノックダウンにより Aph-1 をコントロールの約 50% に減少させた場合には明らかなガンマ・セクレターゼ活性の低下は認められなかった。その際、presenilin の両末端は共に量的変化が認められず、mature な nicastrin の量は減少していた。Aph-1 はこれまでに推測されているガンマ・セクレターゼにおける足場的な機能の他に allosteric な効果を有している可能性があり、そのメカニズムを解明することはアルツハイマー病の治療法の新たな手がかりになる可能性がある。

A. 研究目的

我々は平成 17 年度の研究報告にて Time-controlled transcardiac perfusion cross-linking (tcTPC)法による免疫共沈降法にて新たなガンマ・セクレターゼ調節因子の候補となる蛋白質を複数発見したことを報告した(Schmitt-Ulms G et al. Nat Biotechnol 2004;22(6):724-31)。そのうちの 1 つは Aph-1 と特異的に結合する蛋白質であった。Aph-1 はガンマ・セクレターゼ複合体においては足場分子的な働きをすることが推測されている。新たに発見した Aph-1 と特異的に結合する蛋白質の臨床応用を考えると、その蛋白質の量が変化することにより、結合していない Aph-1 の量的変化が起こることを利用する方法が考えられる。そこで、Aph-1 の量的変化がガンマ・セクレターゼの活性に対しどのような変化を起こすのかを確認するためのシステムを構築し、Aph-1 の量的変化とガンマ・セクレターゼ活性の変化を確認した。

(APPwt)および、スウェーデン型遺伝子異常を導入した APP(APPswe)のコンストラクトを作製し、HEK293 細胞に導入し stable line を作製した。各々の APP 導入 stable 細胞に 1 番染色体上 long form の Aph-1(Aph-1aL)遺伝子を導入し Aph-1aL を単独で導入した場合、ガンマ・セクレターゼの 4 因子全てを導入した場合、および Aph-1aL を siRNA にてノックダウンした場合に培養液中に産生されるベータ・アミロイド(A β)₄₀ および A β ₄₂ の産生量を ELISA 法にて測定した。また、活性型ガンマ・セクレターゼの量的指標として presenilin の両断端をウエスタン・ブロッティング法を用いて定量した。

(倫理面への配慮)

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。また、感染性のある病原微生物も使用していない。

B. 研究方法

ワイルドタイプのアミロイド前駆体蛋白質

C. 研究結果

培養細胞に Aph-1aL を過剰発現させたところ、

Aph-1aL蛋白の総量が増加し、培養液中に産生されたA β 40とA β 42は共に増加した(図1)。その際、活性型ガンマ・セクレターゼの指標としてのプレセニリンのN末端とC末端の量には変化を認めなかった(図2)。A β の増加量に関してはガンマ・セクレターゼ構成全4因子を培養細胞に導入した場合よりも少なかった。Aph-1aLをsiRNAによりノックダウンした細胞では、Aph-1aLの総量はコントロールの約半量に減少していた。Aph-1aLの半減によるA β の産生量に変化は認められず(図3)、活性型ガンマ・セクレターゼの指標としてのプレセニリンの両断端の量にも変化を認めなかった(図4)。matureなnicastatinの量はほぼ半減していた(図5)。

D. 考察

Aph-1は単独で、その蛋白量が増加すると活性型ガンマ・セクレターゼの量的変化を伴わずにA β の産生量が増加することが確認された。このことはAph-1が単独でガンマ・セクレターゼの活性に正の影響を与えることを示唆している。同様の所見はHeら(J. Neurochem. 2006)やMarlowら(BBRC, 2003)においても報告されているが、どちらの報告においてもメカニズムは明らかにされていない。

一方、siRNAによりAph-1を半減させた場合にはA β の産生に変化が認められなかった。これは、活性型ガンマ・セクレターゼの構成に関与するAph-1の量が微量なため、半減ではガンマ・セクレターゼの量、活性共に変化を起し得ないことを示している。しかし、presenilinの断端の量に変化が見られなかったものの、matureなnicastatinの量に変化が認められたことは、Aph-1の量的変化がmatureなnicastatinの量を調整している可能性を示唆しており、nicastatinがAPPをガンマ・セクレターゼ無いに取り込む機能を有していることと併せて考えると、Aph-1の増加によるA β 産生亢進のメカニズムを考える上で非常に興味深い所見であると思われる。

E. 結論

Aph-1はその量が増加した際に、ガンマ・セク

レターゼ複合体の総量を変化させずにA β の産生量を正の方向に変化させた。このことは、Aph-1が単独で独自のA β 産生調整機能を有している可能性を示唆しており、そのメカニズムを明らかにすることはアルツハイマー病の治療法の新たな手がかりとなる可能性がある。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

- 1) 高橋勝義, 三條伸夫, 渡邊睦房, 金海峰, 水澤英洋: Tau protein phosphorylation by oxidative stress via c-jun N-terminal kinase (JNK) activation, 第26回日本認知症学会総会, 大阪, 10月17-18日, 2007.
- 2) 金海峰, 三條伸夫, 渡邊睦房, 水澤英洋, 内原俊記: Quantitative Change of APH-1 and Presenilin in culture cells under various type of endoplasmic reticulum (ER) stress, 第26回日本認知症学会総会, 大阪, 10月17-18日, 2007.
- 3) 金海峰, 三條伸夫, 渡邊睦房, 水澤英洋, 内原俊記: 各種のERストレス負荷に対する培養細胞内Aph-1及びPresenilin1の動態, 第48回日本神経学会総会, 名古屋, 5月19日, 2007.
- 4) 三條伸夫, 金海峰, 渡邊睦房, 水澤英洋, St. George-Hyslop P, Fraser P: 内因性TMP21の細胞内および細胞表面の局在に関して, 第48回日本神経学会総会, 名古屋, 5月19日, 2007.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

図 1. Aph-1 過剰発現による β アミロイド産生量の変化

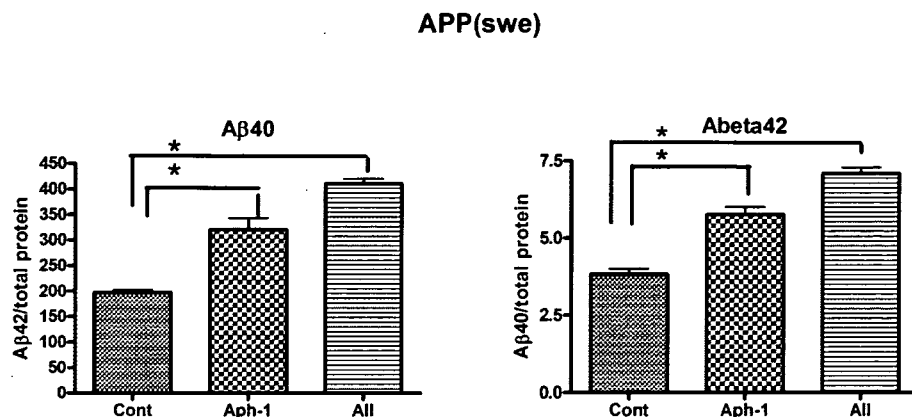


図 2. Aph-1aL 過剰発現による presenilin 断端量の変化

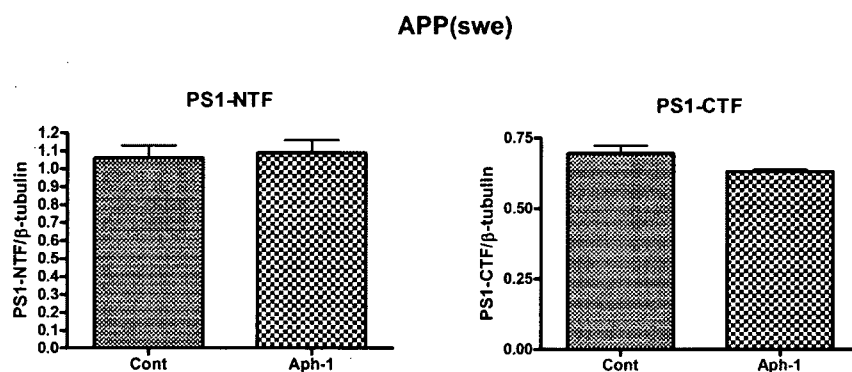


図 3. siRNA により Aph-1aL を 50%に減量した際の β アミロイド産生量の変化

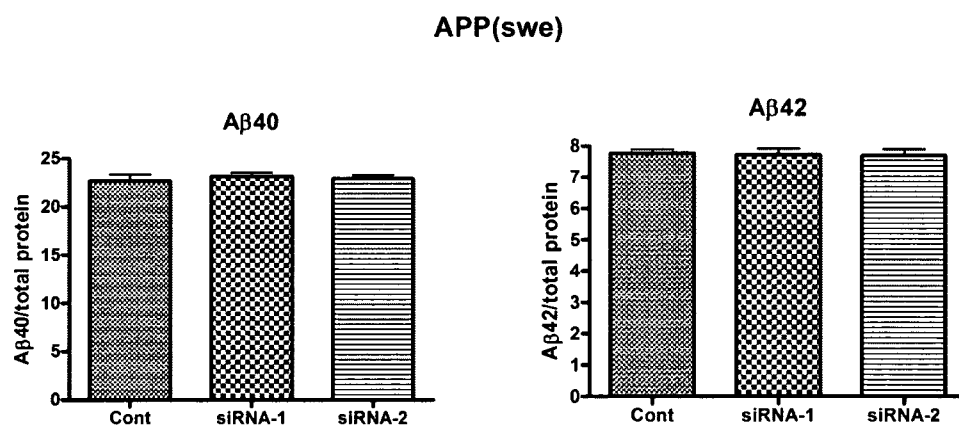


図 4. siRNA により Aph-1aL を 50%に減量した際の presenilin 断端量の変化

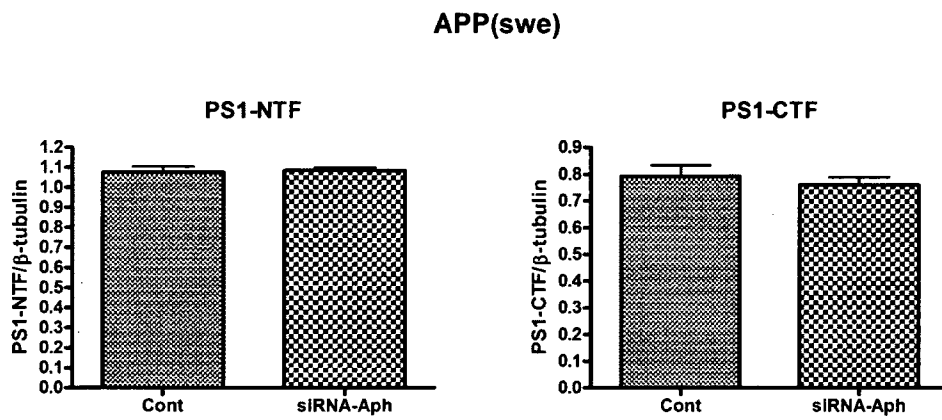
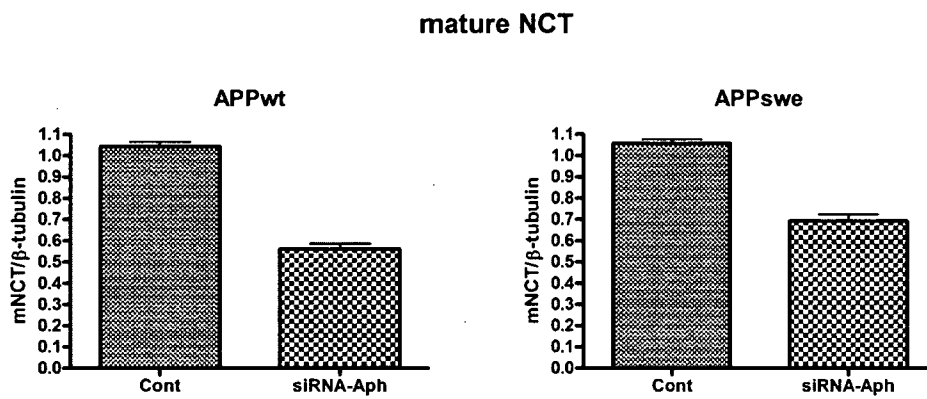


図 5. siRNA により Aph-1aL を 50%に減量した際の mature nicastrin 量の変化



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

エストロゲンのアルツハイマー病βアミロイド線維に対する 抗アミロイド効果

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 森永章義、廣畑美枝、小野賢二郎
 金沢大学大学院脳老化・神経病態学 (神経内科)

研究要旨 近年の疫学調査では、女性ホルモンが Alzheimer 病(AD)発症の危険率を低下させると報告されている。女性ホルモンがβアミロイド蛋白(Aβ)の凝集過程および既成凝集体の不安定化過程に直接及ぼす効果を明らかにするため、エストロゲン(エストロン(E1)、エストラジオール(E2)、エストリオール(E3))と他の性ホルモン(アンドロステンジオン(AND)、テストステロン(TES))の及ぼす影響をチオフラビン T (ThT) 法および電子顕微鏡を用いて *in vitro* で解析した。エストロゲンは濃度依存性に Aβ (1-40)、Aβ (1-42)の重合・伸長反応を抑制し、かつ既成凝集体を不安定化したが、AND、TES にはそのような効果はなかった。これらのホルモンでの抗アミロイド効果の強弱の関係は、E3 > E2 = E1 >> AND = TES であった。女性ホルモンは Aβの凝集体形成抑制および不安定化作用を持ち、生体内で AD 発症に抑制的に働いている可能性がある。

A. 研究目的

近年の疫学調査で、男性よりも女性の方が Alzheimer 病(AD)の発症率が高いこと、ホルモン補充療法を受けている女性では AD の発症率が低いことが報告され女性ホルモンが AD の発症率を低下させ、その発症を遅延させる可能性が指摘されている。この機序としては女性ホルモンがアミロイド前駆蛋白からβアミロイド蛋白(Aβ)の産生を抑制すること、クリアランスなどに影響を及ぼし脳内の Aβ量を減少させること、抗酸化作用を有すること、シナプスの可塑性を向上させることなどが報告されているが、Aβに対する直接の作用について検討したものはない。そこで今回我々は、βアミロイド線維(fAβ)の形成過程および不安定化過程に女性ホルモンが直接及ぼす効果を検討した。

B. 研究方法

pH7.5、37°Cにおいて、エストロゲン(エストロン(E1)、エストラジオール(E2)、エストリオール(E3))と他の性ホルモン(アンドロステンジオン(AND)、テストステロン(TES))が Aβ (1-40)、Aβ

(1-42)からの fAβの形成・伸長、および既成の fAβの不安定化過程に及ぼす影響をチオフラビン T 法による蛍光定量と電子顕微鏡による形態観察にて *in vitro* で解析した。

(倫理面への配慮)
 問題なし。

C. 研究結果

エストロゲン(E1、E2、E3)は、濃度依存性にAβ (1-40)、Aβ (1-42)からのfAβの形成・伸長反応を抑制するばかりでなく、既成のfAβを不安定化した。一方AND、TESにはこのような効果は認められなかった。これらのホルモンでの抗アミロイド効果の強弱の関係は、E3 > E2 = E1 >> AND = TES であった。

D. 考察

今回検討した E1、E2、E3、AND、TES は非常に類似した構造をもっているにも関わらず、抗アミロイド効果の違いが認められた。その原因として、E1、E2、E3 では AND、TES と異なり

perhydrocyclopentanophenanthrene 環の C3 位に共通して水酸基を持つこと、さらに E3 では C16 位に水酸基を持つことが考えられた。一方、C17 位の水酸基の有無は抗アミロイド効果に影響を及ぼさないと考えられた。

今回の我々の検討では抗アミロイド効果を示すために必要なエストロゲン濃度は 50-100 μ M であった。この濃度は生体内での髄液中の E2 濃度やホルモン補充療法後の髄液中の E2 濃度の予測値と比較してもはるかに高いものであった。しかし、低濃度であっても生体内では長期間のエストロゲンへの暴露により抗アミロイド効果を示している可能性はあると思われた。

E. 結論

女性ホルモンは A β の凝集体形成抑制および不安定化作用を持ち、生体内で AD 発症に抑制的に働いている可能性がある。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Hirohata M*, Hasegawa K*, Tsutsumi-Yasuhara S, Ohhashi Y, Ookoshi T, Ono K, Yamada M, Naiki H: The 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* 46:1888-1899, 2007.

*equally contributed authors

2) Hirohata M, Ono K, Morinaga A, Yamada M: Non-steroidal anti-inflammatory drugs have potent anti-fibrillogenic and fibril-destabilizing effects for alpha-synuclein fibrils in vitro. *Neuropharmacology*, In Press.

3) 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* 23:241-245, 2007.

4) Matsumoto Y, Yanase D, Noguchi-Shinohara M,

Ono K, Yoshita M, Yamada M: CSF/serum IgG index is correlated with medial temporal lobe atrophy in Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*, In Press.

5) Matsunari I, Samuraki M, Chen W-P, Yanase D, Takeda N, Ono K, Yoshita M, Matsuda H, Yamada M, Kinuya S: Comparison of 18 F-FDG PET and optimized voxel-based morphometry for detection of Alzheimer's disease: aging effect on diagnostic performance. *J Nucl Med* 48:1961-1970, 2007.

6) Morinaga A, Hirohata M, Ono K, Yamada M: Estrogen has anti-amyloidogenic effects on Alzheimer's β -amyloid fibrils in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 359:697-702, 2007.

7) Nozaki I, Inao G, Yamada M: Donepezil-induced chorea in Alzheimer's disease. *J Neurol* 254:1752-1753, 2007.

8) Nozaki I, Watanabe T, Kawaguchi M, Akatasu H, Tsuneyama K, Yamamoto Y, Ohe K, Yonekura H, Yamada M, Yamamoto H: Reduced expression of endogenous secretory receptor for advanced glycation endproducts in hippocampal neurons of Alzheimer's disease brains. *Arch Histol Cytol*. In Press.

9) Ono K, Hirohata M, Yamada M: Anti-fibrillogenic and fibril-destabilizing activity of nicotine in vitro: Implications for the prevention and therapeutics of Lewy body diseases. *Exp Neurol*, 205:414-424, 2007.

10) Ono K, Hirohata M, Yamada M: Anti-fibrillogenic and fibril-destabilizing activities of anti-Parkinsonian agents for α -synuclein fibrils in vitro. *J Neurosci Res* 85:1547-1557, 2007.

11) Ono K, Noguchi-Shinohara M, Yoshita M, Naiki H, Yamada M: Cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies patients enhances α -synuclein fibril formation in vitro. *Exp Neurol* 203:579-583, 2007.

12) Ono K, Yamada M: Vitamin A potently destabilizes preformed alpha-synuclein fibrils in vitro: implications for Lewy body diseases. *Neurobiol Dis* 25:446-454, 2007.

13) Samuraki M, Matsunari I, Chen WP, Yajima K, Yanase D, Fujikawa A, Takeda N, Nishimura S, Matsuda H, Yamada M: Partial Volume Effect

Corrected FDG PET and Gray Matter Volume Loss in Patients with Mild Alzheimer's Disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 34:1658-1669, 2007.

14) 石田千穂, 山田正仁: アルツハイマー病, 前頭側頭型認知症にみられる歩行障害. *老年精神医学雑誌* 18:49-54, 2007.

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. *医学のあゆみ (特集 Alzheimer 病- 基礎・臨床研究の最新動向)* 220:361-364, 2007.

16) 小野賢二郎, 山田正仁: 脳アミロイドーシスの診断と治療. *腎と透析 (特集 アミロイドーシスの診療 up to date)* 62:260-262, 2007.

17) 菅野圭子, 森永章義, 鈴木絵里子, 山田正仁: アルツハイマー病の非薬物治療. *Medicina* 44:1096-1099, 2007.

18) 浜口 毅, 山田正仁: 脳アミロイドアンギオパチーとアルツハイマー病. *臨床検査 (印刷中)*

19) 廣畑美枝, 小野賢二郎, 山田正仁: NSAIDs の抗 Alzheimer 病効果. *神経治療* 24:187-194, 2007.

20) 山田正仁: 認知症の鑑別診断: 鑑別すべき疾患・病態にはどのようなものがありますか? *CI)* 山田正仁: 脳老化と認知症の科学. *日整会誌* 81:872-876, 2007.

22) 吉田光宏, 山田正仁: シヌレイノパチーと MIBG シンチ. *Dementia Jpn* 21:68-80, 2007.

23) 吉田光宏, 山田正仁: レビー小体型認知症の脳画像・心筋シンチ. *精神医学* 49:699-705, 2007.

2. 学会発表

1) Ono K: Molecular interactions in the Formation and Destabilization of Alzheimer's β -amyloid Fibril in vitro, Case Western Reserve University Colloquium Lecture, Cleveland, November 29, 2007.

2) Hirohata M, Yoshita M, Ishida C, Ikeda S, Tamaoka A, Kuzuhara S, Shoji M, Ando Y, Tokuda T, Yamada M: A Nationwide Epidemiological Survey CAA-related Disorders in Japan, Cerebral Amyloid Angiopathy: emerging concepts, Iceland, August 8-11, 2007.

3) Shinohara M, Yoshita M, Matsumoto Y, Yamada M: Value of CSF-amyloid beta 1-42, total tau protein, phosphorylated tau protein in the differential

diagnosis of DLB from AD: comparison with MIBG radioactivity. Osaka, October 17-18, 2007.

4) Yamada M: Cerebral Amyloid angiopathy (CAA) and CAA-related Disorders : Epidemiology and Risk Factors. Cerebral Amyloid Angiopathy:emerging concepts, Iceland, 8.8-11, 2007.

5) 小野賢二郎: アミロイド β 蛋白および α -シヌクレイン蛋白の異常凝集における分子間相互作用. iANS & mfSANS ワークショップ, 筑波, 3.8-9, 2007.

6) 山田正仁: 「特別講演」アルツハイマー病と脳血管性認知症の診断と治療. 第 1 回 MIC (宮崎虚血性脳血管障害) 研究会, 宮崎, 10.10, 2007.

7) 山田正仁: 「特別講演」認知症の診断と治療—アルツハイマー病と脳血管性認知症を中心に—. 第 62 回石川脳血管障害研究会, 金沢, 4.28, 2007.

8) 山田正仁: 「特別発言」認知症早期診断の課題を再考する. アルツハイマー病研究会 第 8 回学術シンポジウム, 東京, 4.14, 2007.

9) 佐村木美晴, 松成一朗, 陳偉平, 柳瀬大亮, 矢嶋一賀, 山田正仁: ApoE ϵ 4 を有する健常人における脳 FDG PET の検討. 第 48 回日本神経学会総会, 名古屋, 5.16-18, 2007.

10) 佐村木美晴, 松成一朗, 陳偉平, 柳瀬大亮, 矢嶋一賀, 小野賢二郎, 吉田光宏, 山田正仁: 早期アルツハイマー病における部分容積効果補正後の脳ブドウ糖代謝の検討. 第 3 回革新脳科学 COE・金沢大学大学院医学系研究科脳医科学専攻・十全医学会合同シンポジウム, 金沢, 9.8, 2007.

11) 野崎一朗, 稲生暁春, 山田正仁: 塩酸ドネペジルによる不随運動. 第 48 回日本神経学会総会, 名古屋, 5.16-18, 2007.

12) 廣畑美枝, 長谷川一浩, 小野賢二郎, 安原 (堤) しのぶ, 内木宏延, 山田正仁: Polyphenols が β アミロイド線維に及ぼす抗アミロイド効果の分子機構解明. 第 48 回日本神経学会総会, 名古屋, 5.16-18, 2007.

13) 町谷知彦, 森永章義, 篠原もえ子, 小野賢二郎, 山田正仁: アルツハイマー病患者における認知症の家族歴と Apo E フェノタイプとの関連. 第 48 回日本神経学会総会, 名古屋, 5.16-18, 2007.

14) 町谷知彦: 軽度認知機能障害(Mild Cognitive

Impairment). 21 世紀の認知症を考える会, 金沢, 11.24, 2007.

15) 本崎裕子, 小野賢二郎, 山田正仁: 臨床調査個人票に基づくアミロイドーシスの疫学調査. 第 48 回日本神経学会総会, 名古屋, 5.16-18, 2007.

16) 森永章義, 小野賢二郎, 町谷知彦, 篠原もえ子, 佐村木美晴, 柳瀬大亮, 松本泰子, 岩佐和夫, 松成一朗, 山田正仁: アルツハイマー病早期診断での MRI, SPECT, FDG-PET, 髄液マーカー検査の有効性の比較. 第 48 回日本神経学会総会, 名古屋, 5.16-18, 2007.

17) 森永章義, 廣畑美枝, 小野賢二郎, 山田正仁: Estrogen has anti-amyloidogenic effects on Alzheimer's β -amyloid fibrils in vitro. 第 3 回革新脳科学 COE・金沢大学大学院医学系研究科脳医科学専攻・十全医学会合同シンポジウム, 金沢, 9.8, 2007.

18) 山田正仁, 吉田光宏, 篠原もえ子: DLB の画像診断:MIBG 心筋シンチグラフィと他の診断

ツールとの比較. 第 1 回レビー小体型認知症研究会, 横浜, 11.10, 2007.

19) 山田正仁: 認知症. 第 48 回日本神経病理学会総会学術研究会 教育コース, 東京, 5.30-6.1, 2007.

20) 山田正仁: 認知症の早期診断—現状と問題点—. 第 15 回関東脳 PET・SPECT 研究会, 東京, 3.10, 2007.

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

Transgenic mouse model を用いた脳アミロイド蓄積機序の 検討と治療法の開発

分担研究者 東海林幹夫 弘前大学大学院医学研究科 脳研神経内科学講座

共同研究者 瓦林 毅*、松原悦朗**、針谷康夫***

*弘前大学大学院医学研究科 脳研神経内科学講座、

**国立長寿医療センター研究所 アルツハイマー病研究部

***前橋赤十字病院神経内科

研究要旨 Transgenic mouse model を用いて脳アミロイド蓄積機序の検討と治療法の開発を行った。Tg2576 マウスと Presenilin-1L286V マウスとの double transgenic mouse を用いて Aβ アミロイド蓄積がリン酸化 tau とリン酸化 α-synuclein の二次的病理変化を誘発することを示した。②神経原線維変化と広範な細胞死を再現する TgTau^{P301L} マウスを確立した。③TgTauP301L と Tg2576 との double Tg で Aβ アミロイドが神経原線維変化を誘発する機序を解明した。④家族性 Parkinson 病の変異 α-synuclein を発現する Lewy 小体型認知症(DLB)モデルマウス TgαSYN を確立した。⑤抗 Aβ40 特異抗体の投与による脳アミロイドおよび脳血管アミロイドの選択的治療法の開発を行った。

A. 研究目的

従来、脳アミロイドを蓄積する適当な動物モデルが存在せず、その解析は困難を極めた。近年、アミロイドの原因蛋白を過剰産生する transgenic mouse model が開発されて脳アミロイドの再現に成功し、その蓄積機序の解明および治療法の開発が進んでいる。我々は Tg2576 マウスの開発時よりその解析を行ってきた。今回このマウスを用いて蓄積機序の解明および新規治療法の開発を行うとともに我々独自のマウスモデルを開発したので報告する。

B. 研究方法

①Sweden 型変異をもつ amyloid B protein (Aβ) 前駆体を過剰発現する Tg2576 マウスと L286V 変異をもつ presenilin-1 を発現する Presenilin-1L286V マウスを掛け合わせて double transgenic mouse (Tg2576xPresenilin-1L286V) を作成した。このマウスで脳アミロイド沈着に伴う tau および α-synuclein の蓄積を経時的に観察した。②家族性前頭側頭葉型認知症パーキンソンニズム-17FTDP-17 の P301L 変異をもつヒト tau を

hamster prion promotor の元に発現する transgenic mouse TgTau^{P301L} を作成し、脳タウ蓄積を経時的に検討した。③TgTauP301L と Tg2576 との double Tg を作成し、tau 蓄積を TgTauP301L と比較することで Aβ アミロイドが神経原線維変化を誘発する機序を検討した。④家族性 Parkinson 病の二つの変異 A30P/A53T を導入した α-synuclein をヒト Thy-1 promoter の下に発現する TgαSYN マウスを作成し、α-synuclein の蓄積を検討した。その行動実験を open field にて解析し、l-dopa 投与により行動障害が改善されるかどうかを検討した。⑤Tg2576xPresenilin-1L286V マウスに 4 月齢から 5 月齢まで抗 Aβ40 特異抗体 BA27 0.5mg 週 1 回腹腔内投与による受動免疫療法を 1 ヶ月間行った。効果は脳 Aβ 量および脳 Aβ 沈着量で判定した。副作用は脳出血や gliosis の有無で判定した。

(倫理面への配慮)

本研究ではヒト検体は用いないので、弘前大学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。