

C. 研究結果

①Tg2576xPresenilin-1L286Vマウスは2月齢から脳ABアミロイド沈着を認め、Tg2576マウスに比べて著明な蓄積促進を認めた。脳アミロイド周囲の変性神経突起のリン酸化tauとリン酸化 α -synucleinの蓄積はTg2576マウスに比べて著明に増加していた。

②TgTau^{P301L}では加齢に伴い大脳皮質にリン酸化tau陽性、Gallyas-Braak染色陽性の神経原線維変化およびグリア原線維変化が蓄積した。神経原線維変化の蓄積に伴って神経細胞の著明な変性脱落とgliosisが出現した。また、脳tau蓄積と共にMorris水迷路試験で学習障害が出現した。

③TgTauP301LとTg2576とのdouble Tgの検討では22-23月齢のdouble TgにおいてTgTauP301Lと比べて大脳皮質にリン酸化tau抗体陽性のpretangleの出現の増加を認めた。また、脳梁と大脳皮質の神経突起にリン酸化tauの蓄積を認め、一部はGallyas-Braak染色陽性であった。よってAB蓄積がリン酸化tauからなる神経原線維変化を誘発すると考えられた。

④Tg α SYNマウスでは α -synucleinの発現は大脳、海馬、中脳、脳幹に認められた。加齢により α -synucleinよりなるLewy小体様の細胞質内、核内の封入体を形成した。Tg α SYNマウスではopen fieldでの自発動作が低下し、l-dopa投与により行動障害が改善された。よって病理学的及び行動学的にDLBの変化を再現した。

⑤抗AB40特異抗体の投与により血漿AB40は選択的に1.5倍に増加し、血漿中へのAB40が亢進すると考えられた。脳の可溶性AB40は増加し、不溶性AB40の蓄積が選択的に減少した。脳AB42量には変化は認めなかった。よってアミロイドとして蓄積する不溶性の脳AB40が選択的に可溶化されるものと考えられた。組織ではAB40からなるcore plaqueとamyloid angiopathyの減少を認めた。脳出血やgliosisなどの副作用は認めなかった。

D. 考察

Tg2576xPresenilin-1L286V マウスの検討からADにおけるリン酸化tauおよび α -synucleinの二次性蓄積を再現する結果と考えられた。TgTauP301Lマウスの結果からtauが神経毒性に

働き、行動障害も起こすことが明らかとなり、tauopathy 解明の有用なモデルになりうると考えられた。TgTauP301LマウスとTg2576のdouble Tgの検討からABの蓄積がリン酸化tauの神経細胞内および神経突起内の蓄積を誘発することが示され、この誘発が神経原線維変化につながるTg α SYNマウスの検討からは α -synucleinの発現が神経細胞内の封入体を作ること、 α -synuclein発現が行動障害を起こし、l-dopaの投与がその改善に効果があることが示され、DLB病態解明の有用なモデルになると考えられた。AB40特異抗体による免疫療法はAB40選択的に不溶性ABを可溶化することが示され、不溶性AB40の蓄積であるamyloid angiopathyおよびcore plaqueに有用な治療法と考えられた。

E. 結論

AB amyloidosisに伴うTauopathyと α -synucleinopathyの誘発を明らかにした。新たなtau発現マウスモデルを作成し、神経原線維変化、神経細胞死および学習障害を再現することに成功した。このマウスでABのリン酸化tau誘発を明らかにした。新たな α -synuclein発現マウスを作成し、病理所見や行動異常を再現することに成功した。AB40のC末特異抗体による免疫療法は脳amyloidおよびamyloid angiopathyに有効な治療法と考えられた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Miyashita A, Arai H, Asada T, Imagawa M, Matsubara E, Shoji M, Higuchi S, Urakami K, Kakita A, Takahashi H, Toyabe S, Akazawa K, Kanazawa I, Ihara Y, Kuwano R, The Japanese Genetic Study Consortium for Alzheimer's Disease, Consortium Information: Genetic association of CTNNA3 with late-onset Alzheimer's disease in females. *Hum Mol Genet* 16: 2854-2869, 2007.

2) Kurata T, Kawarabayashi T, Murakami T,

Miyazaki K, Morimoto N, Ohta Y, Takehisa Y, Nagai M, Ikeda M, Matsubara E, Westaway D, Hyslop PS, Harigaya Y, Kamiya T, Shoji M, Abe K: Enhanced accumulation of phosphorylated α -synuclein in double transgenic mice expressing mutant β -amyloid precursor protein and presenilin-1. *J Neurosci Res* 85: 2246-2252, 2007.

3) 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 α -synucleinopathy brains. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 78 : 653-654, 2007.

4) Ohta Y, Hayashi T, Nagai M, Okamoto M, Nagotani S, Nagano I, Ohmori N, Takehisa Y, Murakami T, Shoji M, Kamiya T, Abe K: Two cases of spinocerebellar ataxia accompanied by involvement of the skeletal motor neuron system and bulbar palsy. *Intern Med* 46: 751-755, 2007.

5) Nagata T, Ilieva H, Murakami T, Shiote M, Narai H, Ohta Y, Hayashi T, Shoji M, Abe K: Increased ER stress during motor neuron degeneration in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Res* 29: 767-771, 2007.

6) Nagata T, Nagano I, Shiote M, Narai H, Murakami T, Hayashi T, Shoji M, Abe K: Elevation of MCP-1 and MCP-1/VEGF ratio in cerebrospinal fluid of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Neurol Res* 29(8):772-776, 2007.

2. 学会発表

1) Kawarabayashi T, Seino Y, Wakasaya Y, Kimura T, Suzuki C, Tomiyama M, Matsubara E, Shoji M: Analysis of amyloid angiopathy in Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. Brain'07 and Brain PET'07, Osaka, May 20-24, 2007.

2) Kawarabayashi T, Seino Y, Wakasaya Y, Watanabe M, Suzuki C, Tomiyama M, Matsubara E, Egashira N, Takahashi M, Fujiwara M, Carlson GA, Westaway D, George-Hyslop PS, Shoji M: Cortical neuronal and glial pathology in TgTauP301L transgenic mice. Neuroscience 2007, the Society for Neuroscience, 37th Annual Meeting, San Diego, Nov 14-18, 2007.

3) Sun H, Okamoto Y, Kawarabayashi T, Yokoseki T, Shibata M, Morishima M, Saito Y, Murayama S, Ihara Y, Shoji M, Michikawa M, Matsubara E: Characterization of therapeutic antibody against A β oligomers for Alzheimer's disease. Neuroscience 2007, the Society for Neuroscience, 37th Annual Meeting, San Diego, Nov 14-18, 2007.

4) Ikeda M, Goris I, Sasaki A, Kawarabayashi T, Harigaya Y, Shoji M, Moechars D, Okamoto K: Analysis of phosphorylation of tau in transgenic mice overexpressing GSK-3 β . Neuroscience 2007, the Society for Neuroscience, 37th Annual Meeting, San Diego, Nov 14-18, 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

アルツハイマー病の抗体治療

分担研究者 東海林幹夫 弘前大学医学部脳研神経内科

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 アルツハイマー病に特異的な病態惹起分子として AB oligomer 分子に着目し、その選択的制御によるアルツハイマー病の治療構築を目的として、その特異的抗体作製を試みた。本抗体は神経毒性 AB oligomer 中和活性、AB アミロイド線維形成抑制活性、アルツハイマー病患者脳内 AB oligomer 捕捉能を有し、アルツハイマー病治療としてより病態特異的な治療法構築に有望と考えられた。

A. 研究目的

アルツハイマー病に特異的な治療法構築のためには、その病態を惹起するより特異的な AB 分子種を標的とした治療法構築が不可欠である。我々はアルツハイマー病モデルマウス (Tg2576) における検証から、アミロイド沈着に先行し、記憶障害の出現する時期に Lipid Rafts と呼ばれる脳内のマイクロドメインに AB42 ダイマー分子種が出現することを見だし、この AB42 ダイマー分子種こそがアルツハイマー病の病態惹起分子種であろうと推察をした。これまで、脳内 AB42 分子種の選択的除去を目的として、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を構築し、その有用性を報告してきた。本年度はこうした AB oligomer 分子を標的とした受動免疫療法を構築するため、AB oligomer 分子特異的モノクローナル抗体作製を試みた。

B. 研究方法

AB1-42 oligomer(4-mer)を試験管内で作製し、マウスに免疫後多数のハイブリドーマを取得した。ドットプロット、免疫沈降法によるスクリーニングから AB oligomer 特異的クローンを選別した。治療抗体としての有用性は、AB ペプチド誘発性の神経毒性中和能、チオフラビン T 結合アミロイド線維形成抑制能、取得抗体での免疫沈降

法によるアルツハイマー病患者脳内 AB oligomer 捕捉能にて評価した。

(倫理面への配慮)

研究に当たっては、当該施設の倫理委員会の承認を得て、動物愛護や遺伝子組み換えに関する法律や取り決めに遵守した。

C. 研究結果

NGFで神経細胞に分化させた神経細胞にAB1-42ペプチドを加えるとその半数に細胞死が誘発されたが、あらかじめ取得抗体を共存させた状態では、有意に細胞死が抑制され、我々の取得抗体にABペプチド誘発性の神経毒性中和活性があることが明らかとなった。

また、チオフラビンT結合アミロイド線維量も、あらかじめ取得抗体を共存させた状態で有意に抑制され、我々の取得抗体にアミロイド線維形成抑制活性があることが証明された。

さらに、AB oligomerを大量に含有するアルツハイマー病患者脳蟻酸抽出分画を取得抗体で免疫沈降すると、ダイマー以上のAB oligomerが特異的に免疫沈降されることが明らかとなった。

D. 考察

今回の検討から、AB oligomer は確かに神経毒

性を発揮することが培養細胞系で確認された。我々の取得抗体はこの A β oligomer 惹起性神経毒性を選択的・特異的に中和する活性があることが明らかとなった。さらに、こうした A β oligomer はアミロイド線維形成能も有しているが、我々の取得抗体はこのアミロイド線維形成をも抑制する活性を有することが判明した。アルツハイマー病の治療抗体として、両活性を有することは極めて重要であり、これまで類似の抗体の報告はない。さらに、本抗体が標的とする A β oligomer が、アルツハイマー病患者脳にも存在することも、本抗体による免疫沈降法で確認されたことは、極めて重要な傍証である。即ち、A β oligomer を選択的に制御することでアルツハイマー病を予防・治療しようとする受動免疫療法に、整合性が得られたと考えられるからである。

現時点で A β 抗体を利用した受動免疫療法はアルツハイマー病治療で最も期待されて治療法である。しかしながら生理的な A β 分子(monomer)の生物学的機能が不明な現在、この従来受動免疫療法には思わぬ副作用が生じる危険性を払拭することが出来ない。我々の取得抗体は、この生理的な A β 分子(monomer)を標的とせず、病的分子である A β oligomer のみを標的とした医療を展開できる大きな利点を有している。抗体の効果発現機序として、末梢を作用点とした脳からの A β 分子引き出し(sink hypothesis)、脳移行しての脳内での A β oligomer 分子直接的制御、抗体依存的なミクログリア貪食による A β 除去、逆に抗体非依存的なミクログリア貪食による A β 除去が考えられているが結論は未だ得られていない。また、A β oligomer がアルツハイマー病の発症病態の分子基盤と想定されているが、これまで実際にインビボでこの直接の証明はなされていない。今回我々の取得した抗体は、こうした疑問点を解決するツールとなりうることを期待される。今後、モデルマウスにおける前臨床試験での検証が不可欠である。

E. 結論

本年度の研究から、A β oligomer を特異的に制御しうるモノクローナル抗体を取得した。本抗体は、A β oligomer のアルツハイマー病における分

子学的機能解析に最適であるとともに、治療抗体として非常に有力な候補であることが確認できた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Miyashita A, Arai H, Asada T, Imagawa M, Matsubara E, Shoji M, Higuchi S, Urakami K, Kakita A, Takahashi H, Toyabe S, Akazawa K, Kanazawa I, Ihara Y, Kuwano R, The Japanese Genetic Study Consortium for Alzheimer's Disease, Consortium Information: Genetic association of CTNNA3 with late-onset Alzheimer's disease in females. *Hum Mol Genet* 16: 2854-2869, 2007.
- 2) Kurata T, Kawarabayashi T, Murakami T, Miyazaki K, Morimoto N, Ohta Y, Takehisa Y, Nagai M, Ikeda M, Matsubara E, Westaway D, Hyslop PS, Harigaya Y, Kamiya T, Shoji M, Abe K: Enhanced accumulation of phosphorylated α -synuclein in double transgenic mice expressing mutant β -amyloid precursor protein and presenilin-1. *J Neurosci Res* 85: 2246-2252, 2007.
- 3) 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 α -synucleinopathy brains. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 78 : 653-654, 2007.
- 4) Ohta Y, Hayashi T, Nagai M, Okamoto M, Nagotani S, Nagano I, Ohmori N, Takehisa Y, Murakami T, Shoji M, Kamiya T, Abe K: Two cases of spinocerebellar ataxia accompanied by involvement of the skeletal motor neuron system and bulbar palsy. *Intern Med* 46: 751-755, 2007.
- 5) Nagata T, Ilieva H, Murakami T, Shiote M, Narai H, Ohta Y, Hayashi T, Shoji M, Abe K: Increased ER stress during motor neuron

degeneration in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Res* 29: 767-771, 2007.

6) Nagata T, Nagano I, Shiote M, Narai H, Murakami T, Hayashi T, Shoji M, Abe K. Elevation of MCP-1 and MCP-1/VEGF ratio in cerebrospinal fluid of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Neurol Res* 29(8):772-6, 2007.

2. 学会発表

1) Kawarabayashi T, Seino Y, Wakasaya Y, Kimura T, Suzuki C, Tomiyama M, Matsubara E, Shoji M: Analysis of amyloid angiopathy in Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. Brain'07 and Brain PET'07, Osaka, May 20-24, 2007.

2) Kawarabayashi T, Seino Y, Wakasaya Y, Watanabe M, Suzuki C, Tomiyama M, Matsubara E, Egashira N, Takahashi M, Fujiwara M, Carlson GA, Westaway D, George-Hyslop PS, Shoji M: Cortical neuronal and glial pathology in TgTauP301L transgenic mice. Neuroscience 2007, the Society for Neuroscience, 37th Annual Meeting, San Diego, Nov 14-18, 2007.

3) Sun H, Okamoto Y, Kawarabayashi T, Yokoseki T, Shibata M, Morishima M, Saito Y, Murayama S, Ihara Y, Shoji M, Michikawa M, Matsubara E:

Characterization of therapeutic antibody against A β oligomers for Alzheimer's disease. Neuroscience 2007, the Society for Neuroscience, 37th Annual Meeting, San Diego, Nov 14-18, 2007.

4) Ikeda M, Goris I, Sasaki A, Kawarabayashi T, Harigaya Y, Shoji M, Moechars D, Okamoto K: Analysis of phosphorylation of tau in transgenic mice overexpressing GSK-3 β . Neuroscience 2007, the Society for Neuroscience, 37th Annual Meeting, San Diego, Nov 14-18, 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

典型的老人斑を欠く 変異型アルツハイマー病アイオワ家系脳の生化学的解析

分担研究者 玉岡 晃 筑波大学大学院人間総合科学研究科病態制御医学専攻
 神経病態医学分野 (臨床医学系神経内科)

共同研究者 富所康志*、Blas Frangione**、Jorge Ghiso**

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

**Department of Pathology, New York University School of Medicine

研究要旨 変異型家族性アルツハイマー病アイオワ家系は、A β 分子内の Asp23Asn 変異により引き起こされる。高度のアミロイドアンギオパシー、大脳皮質のプレアミロイド沈着並びに広範な神経原線維変化がその主要神経病理学的変化であるが、典型的老人斑は見られない。本家系は、アルツハイマー病の病態において典型的老人斑は必須でないことを示し、同病の病態解明や治療法開発の上で重要である。アイオワ変異に関連したA β 分子の蓄積機序を明らかにするため、本家系凍結剖検脳を用いて、蓄積したA β 分子を生化学的に解析した。A β 23-Asp と A β 23-Asn の双方のA β が沈着し、部分的にN-、C-両末端で切断され、全ての位置のAsp残基が部分的な翻訳後修飾を受けていた。これらの、A β 分子の重合・沈着過程における関与が示唆された。

A. 研究目的

A β PP の A β 分子領域内のアミノ酸置換は常染色体優性遺伝形式をとるアルツハイマー病(AD)やアミロイドアンギオパシーの原因となる。中でも、A β 分子内の Asp23Asn 変異はアイオワ家系で早期発症認知症を引き起こす。高度のアミロイドアンギオパシー、プレアミロイド沈着並びに広範な神経原線維変化がその主要神経病理学的変化であるが、典型的老人斑は見られない。図は同家系患者の剖検脳、前頭葉切片の抗A β 抗体による免疫染色を示す。アイオワ変異に関連したA β 分子の蓄積機序を明らかにするため、蓄積したA β 分子を生化学的に解析した。

B. 研究方法

凍結剖検脳からA β 分子をギ酸に抽出し、免疫沈降(IP)、ウエスタンブロット(WB)、質量分析(MS)、逆相HPLC並びにアミノ酸シーケンス(AAS)法等を組み合わせ生化学的に解析した。
 (倫理面への配慮)

剖検例の凍結脳の解析は米国ニューヨーク大学、マサチューセッツジェネラルホスピタル、アイオワ大学並びに米国NIHのプロトコールに従い、それらの承認のもと行われた。

C. 研究結果

SDS洗浄後のギ酸分画において、WB法では以前の免疫染色の報告と同様、A β x-40が主要構成要素であり、A β x-42はマイナーな要素であった。IP-MS分析法では、更にN-、C-両末端の不均一性が明らかとなった。A β 1-40に続き、A β 2-40、A β 4-40、A β 1-38、A β 2-38が主要構成要素であった。A β 分子の第23位のアミノ酸置換は、ギ酸抽出物のトリプシン消化産物の逆相HPLCとMS各分析法の組み合わせで確認した。A β 23-AspとA β 23-Asnのモル比は約1:1であった。逆相HPLC、MS並びにAAS各分析法の結果の比較から、A β 分子の第1位と第23位のAsp残基からiso-Asp残基への部分的な翻訳後修飾が示唆された。A β 1-40はMS分析法では最も主要な分子種であったが、AAS分析法では少量であった。

同様に、A β 23-AspとA β 23-Asnのモル比はAAS分析法ではわずかに約1:8であった。以上より、A β 分子の第1位並びに第23位でエドマン分解が阻害されており、同位置でのイソ化やラセミ化したAsp残基の存在を反映すると予想された。Isoaspartyl methyltransferaseを用いたiso-Asp残基の特異的メチル化により、第1位と第23位のiso-Aspの存在が確認され、更に第7位のiso-Asp残基の存在も明らかとなった。

D. 考察

アイオワ家系では、アミロイド芯を伴う典型的老人斑を欠き、非線維性のプレアミロイド病変が大脳皮質のA β 沈着として重要である。典型的老人斑は欠くものの、広範な神経原線維変化を伴うことから、本家系は家族性の変異型ADととらえることができる。近年、ADをはじめとした神経変性やアミロイドーシスにおいて、アミロイド細線維よりは低分子重合体(オリゴマー)の重要性が試験管内や動物による実験系において指摘されている。本家系により、実際のヒト脳での神経変性、特にADにおいて、典型的老人斑が必須でないことが示され、又、プレアミロイド/オリゴマーの重要性も示唆された。本家系は、ADの病態解明や治療法開発の上で重要と考えられる。

本家系脳に蓄積したA β 分子は、孤発性ADと同様に、N-、C-末端双方で翻訳後切断を受けていた。又、孤発例で報告されている第1並びに7位のAsp残基の部分的イソ化に加え、第23位でもiso-Asp残基が生化学的に検出された。AD脳における第23位のiso-Aspの生化学的検出は、本検討以前に報告はない。A β 分子の翻訳後修飾と切断が本家系脳でも孤発例と同様或いはそれ以上に存在することが示された。これらの翻訳後修飾や切断は、これまで試験管内実験系で示唆されてきた様に、A β 分子の凝集促進、或いは、除去の阻害に関与すると予想される。

一方、野生型A β 分子の共沈着の意義として、変異A β 分子による野生型A β 分子の引き込みや、他のAD家系で報告されている様に、2種のA β 分子の共存によって、その線維化の阻害を引き起こす、等もその可能性の一つとして想定された。

E. 結論

変異型アルツハイマー病アイオワ家系では、A β 23-AspとA β 23-Asn双方のA β が沈着し、部分的にN-、C-両末端で切断され、全ての位置のAsp残基が部分的な翻訳後修飾を受けていた。これらの重合・沈着過程における関与が示唆された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Miyazaki H, Oyama F, Wong HK, Kaneko K, Sakurai T, Tamaoka A, Nukina N: BACE1 modulates filopodia-like protrusions induced by sodium channel beta4 subunit. *Biochem Biophys Res Commun* 361:43-8, 2007.
- 2) Mizuno Y, Guyon JR, Ishii A, Hoshino S, Ohkoshi N, Tamaoka A, Okamoto K, Kunkel LM: Beta-synemin expression in cardiotoxin-injected rat skeletal muscle. *BMC Musculoskelet Disord* 8:40, 2007.
- 3) Aoyagi H, Hasegawa M, Tamaoka A: Fibrillogenic nuclei composed of P301L mutant tau induce elongation of P301L tau, but not wild-type tau. *J Biol Chem* 282(28):20309-20318, 2007.
- 4) 玉岡 晃：アルツハイマー病の予防. *臨床検査* 2008、印刷中.
- 5) 玉岡 晃：インスリン分解酵素、*日本臨床* 66巻増刊号1, 72-79, 2008.
- 6) 富所康志、玉岡 晃：NSAIDs、*日本臨床* 66巻増刊号1、478-483, 2008.
- 7) 玉岡 晃：高コレステロール血症とアルツハイマー型認知症. *老年精神医学雑誌*、18(10): 1074-1082, 2007.
- 8) 玉岡 晃、古庄健太郎、萩原直木、渡辺雅彦、吉沢和朗：今後の脳梗塞慢性期治療—茨城県下での脳梗塞慢性期管理における抗血小板薬のあり方を考える—。 *新薬と治療* 56(5): 15-25, 2007.
- 9) 玉岡 晃：アルツハイマー病の危険因子と予防の可能性. *Medicina* 44: 1082-1085, 2007.
- 10) 玉岡 晃：セクレターゼ阻害薬. *神経治療学* 24: 177-186, 2007.

11) 玉岡 晃: アポ E とアルツハイマー病- アポ E の分子病態と疾患発症機構. 医学のあゆみ 220: 431-438, 2007.

2. 学会発表

1) 玉岡 晃: 茨城県の神経難病の実態と将来的な構想. 第 1 回神経難病医療従事者研修会、つくば、1 月 13 日, 2008.

2) Harada H, Ishii K, Tamaoka A: Quantitation of amyloid beta protein in cerebrospinal fluid from patients taking various statins in comparison with control subjects. 第 26 回日本認知症学会、大阪、10 月 17-18 日, 2007.

3) Tomidokoro Y, Tamaoka A, Frangione B, Ghiso J: Familial Danish dementia: co-existence of Danish and Alzheimer amyloid subunits (ADan and Abeta) in the absence of compact plaques. 第 26 回日本認知症学会、大阪、10 月 17-18 日, 2007.

4) 宮崎晴子、小山文隆、Hon-Kit Wong、金子貢巳、櫻井隆、玉岡晃、貫名信行: BACE1 cleavage mediates neurite morphology induced by sodium channel b4 subunit、日本神経科学大会第 30 回大会、横浜、9 月, 2007

6) 小山文隆、宮崎晴子、黒沢大、玉岡晃、金子武嗣、貫名信行: Dysregulation of b4 gene transcription in the striatum of Huntington Disease transgenic mice、日本神経科学大会第 30 回大会、横浜、9 月, 2007.

7) 宮崎晴子、小山文隆、Hon-Kit Wong、金子貢巳、櫻井隆、玉岡晃、貫名信行: BACE1 によるナトリウムチャネル b4 サブユニットの神経突起伸長活性の制御、第 12 回病態と治療におけるプロテアーゼとインヒビター学会、大阪、8 月, 2007 (ポスター奨励賞受賞) .

8) 玉岡 晃: アルツハイマー病の分子病態と治療- アミロイド・カスケード仮説を中心に-. 第 26 回日本医用画像工学会大会、つくば、7 月 21 日, 2007.

9) 玉岡 晃: アルツハイマー病とレビー小体型認知症の分子病態と治療. 第 16 回徳島神経難病治療薬研究会、徳島、7 月 13 日, 2007.

10) 富所康志、玉岡 晃: 家族性デンマーク型認知症状におけるアミロイド分子種 ADan 及び Aβ

の翻訳後修飾と共沈着機構. 第 49 回老年医学会学術集会、札幌、6 月 21, 2007.

11) 上野友之、黒田博子、古矢直己、河野豊、永田博司、玉岡 晃: 慢性脳虚血ラットにおける matrix metalloproteinase とアミロイド β-プロテインの発現. 第 48 回日本神経学会総会、名古屋、5 月 17 日, 2007.

12) 原田祐嗣、石井一弘、玉岡 晃: スタチン服用群における髄液 Aβ 分子種の検討. 第 48 回日本神経学会総会、名古屋、5 月 16 日, 2007.

13) 富所康志、玉岡 晃、Frangione B, Ghiso J: 家族性デンマーク型認知症: 典型的老人斑を欠いた ADan および Aβ の共沈着. 第 48 回日本神経学会総会、名古屋、5 月 16 日, 2007.

14) 上野友之、黒田博子、古矢直己、河野豊、馬場健、永田博司、玉岡晃: 慢性脳虚血ラットモデルにおけるアミロイド β タンパクの発現. 第 32 回日本脳卒中学会総会、福岡、3 月 23 日, 2007.

15) 玉岡 晃: アルツハイマー病の分子病態と治療-アミロイドカスケードを中心に-. 第 16 回新潟臨床痴呆懇話会、新潟、3 月 9 日, 2007.

16) 織田彰子、石井亜紀子、関島良樹、星井嘉信、玉岡 晃: 肥大型心筋症にて発症し、Technetium-99m-pyrophosphate シンチグラフィで著明な心筋集積を認めた家族性アミロイドポリニューロパチー (Val30MetTTR 型) の 62 歳男性例. 第 180 回日本神経学会関東地方会、東京、3 月 3 日, 2007.

17) 玉岡 晃: アルツハイマー型認知症の臨床と早期発見. きぬ医師会学術講演会、つくばみらい、2 月 14 日, 2007.

18) Tomidokoro Y, Rostagno A, Greenberg SM, Frangione B, Rebeck, WG, Ghiso J: Biochemical Analysis of Aβ Amyloid Deposits in the Iowa Variant of Alzheimer's Disease, 9th international conference on Alzheimer's disease and related disorders, Philadelphia, PA, USA, Jul. 19, 2004.

19) Tomidokoro Y, Rostagno A, Greenberg SM, Frangione B, Rebeck W, Ghiso J: Biochemical Analysis of Aβ Amyloid Deposits in the Iowa Variant of Alzheimer's Disease, 33rd Annual Meeting of American Society for Neuroscience, New Orleans, LA, USA, Nov. 8-12, 2003.

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

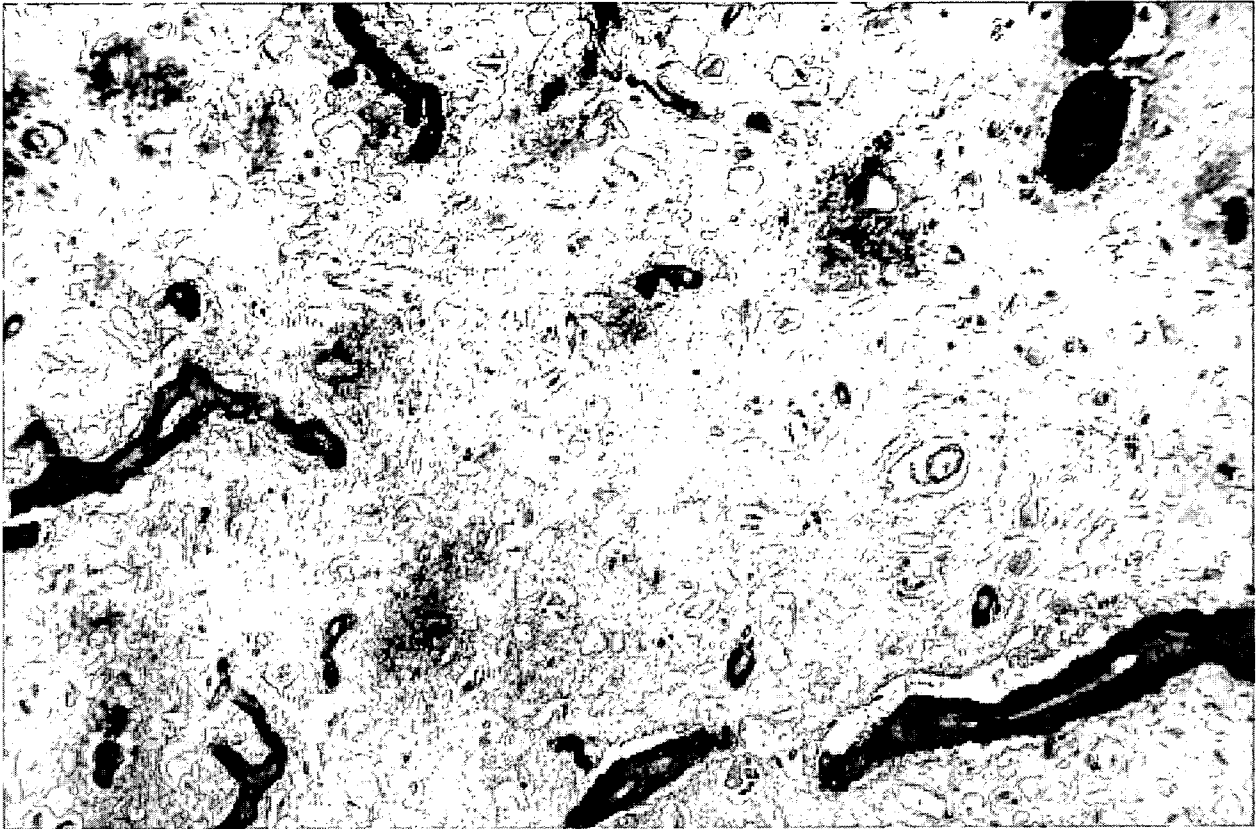
2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

図. アイオワ家系脳の前頭葉の抗 A β 抗体による免疫染色



アイオワ家系発端者の前頭葉凍結剖検脳から切片を作成し、抗 A β 抗体(4G8)にて免疫染色を行った。血管壁への著明な A β の沈着と、皮質でのプレアミロイド病変を認める。アミロイド芯を伴う典型的老人斑は見られない。

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

慢性脳低灌流ラットにおけるアミロイドβ蛋白の発現

分担研究者 玉岡 晃 筑波大学大学院人間総合科学研究科病態制御医学分野 (神経内科学)

共同研究者 上野友之**、富所康志*、矢口雅江**、古矢直己**、河野 豊**、永田博司**

*筑波大学大学院人間総合科学研究科病態制御医学分野 (神経内科学)、

**茨城県立医療大学医科学センター

研究要旨 慢性脳低灌流下でのβアミロイド(Aβ)の産生について明らかにするため、両側総頸動脈永久結紮モデルラットを用い、行動科学、免疫組織、生化学的検討を行った。永久結紮後、2ヶ月の経過にて、認知学習機能の低下を認め、免疫組織学的検討ではAβ40/42、APP、BACE1の沈着が認められた。また、Aβ40/42についてはELISAによる検討においても、皮質領域における高発現が確認された。慢性脳虚血によりAβの産生が促進される可能性が示唆され、アルツハイマー病の脳血管障害による影響との関連において示唆に富むものと考えられた。

A. 研究目的

近年、臨床および疫学的研究からAlzheimer's disease (AD)の血管性要因が注目されるようになり、ADと脳血管性痴呆(VaD)との類似性が指摘されている。また病理学的にも、AD脳の細小動脈における様々な血管病変の存在や微小循環障害に関連した所見が多数報告されている。また、ラット等を用いた局所脳虚血モデルにおいて、アミロイドβ蛋白(Aβ)やアミロイドβ蛋白前駆体(APP)の発現について、いくつかの報告があり、脳虚血巣周囲にAβやAPPが蓄積することや免疫電顕の所見より、APPの蓄積が産生増加以外に軸索輸送の障害に由来する可能性が示唆されている。また、虚血再灌流モデルにおいて、脳血管関門(BBB)の透過性の亢進を認め、脳の虚血が神経障害性物質に曝される一要因になっているとの報告がある。これらから、ADにおいて、循環障害および血管障害がAD病変進行の一つの重要な要因になっているものと考えられる。今回われわれは、慢性的な脳低灌流の再現モデルとして両側総頸動脈結紮モデルラットを用い、脳内のAβについて免疫組織化学的ならびに生化学的検討を行い、脳虚血と脳内Aβの関連を解析した。

B. 研究方法

生後6ヶ月の雄性Wistarラット750gを用い、両側総頸動脈を永久結紮するモデルを作製し、BCAO群とし、両側総頸動脈の露出にとどめ、結紮を行わない群をコントロール群とした。結紮後両側総頸動脈結紮後10週後にvisibleな指標を用いたcue navigation taskを行い、認知学習機能について評価した。さらに、結紮12週にて灌流固定を行い、断頭後、脳を摘出し、凍結切片を作成した。免疫組織学的検討においては、抗Aβ(1-40)抗体(BA27, WAKO)、抗Aβ(1-42)抗体(BC05, WAKO)、抗APP抗体(22C11, CHEMICON)、抗BACE(D-16)抗体(sc-10053, Santa Cruz)を使用し、免疫染色を行った。また、生化学的検討については、ELISAによりAβ1-40、Aβ1-42をそれぞれ、皮質、および皮質下組織に分別して定量し、同時にBCA Protein Assayにて蛋白定量を行い、蛋白量にて補正を行った。

C. 研究結果

行動科学taskにおいて、BCAOラットは、コントロール群と比して、最高遊泳速度に明らかな差は認められず、運動障害の出現は認めなかった。一方、指標にたどり着くまでにかかる時間は、1施行目では差は認めないものの、その後の施行では、有意に延長しており、認知学習機能において、

障害を認めた。病理組織学的には、皮質領域において、神経細胞の脱落および空胞変性が認められた。また、大脳皮質領域において A β 40、A β 42、APP、BACE の沈着を認め、あわせて血管周囲に IgG の組織内への浸透を認めた。また、ELISA による検討では、皮質領域において A β (1-40) は MCAO 群がコントロール群に対して、有意に高値であった (BCAO : 431fmol/g protein、コントロール群 : 339fmol/g protein、p=0.016)。また、A β (1-42) も同様に、BCAO 群にて有意に高値であった (BCAO : 159fmol/g protein、コントロール群 : 134fmol/mg protein、p=0.044)。一方、皮質下組織においては、どちらも、有意差は認められなかった (A β (1-40) : BCAO 群 : 701fmol/g protein、コントロール群 : 661fmol/g protein、p=0.46、A β (1-42) : BCAO 群 : 180fmol/g protein、コントロール群 : 190fmol/g protein、p=0.76)。

D. 考察

これまで、両側総頸動脈を永久結紮したラットモデルの脳血流量について、結紮直後から、大脳皮質、海馬、および皮質下において、40-60%程度まで低下するとの報告があり、この低灌流状態は、結紮後 3 ヶ月程度まで持続するとされている。また、組織学的検討において、明らかな脳梗塞病変は認められず、また、行動科学上、運動麻痺は認められなかったことから、脳梗塞には至らない程度の低灌流状態が作成されたと考えられる。この慢性脳低灌流暴露により、A β 1-40、1-42 の沈着増加が認められた。要因として、クリアランス能の低下、産生の増加が考えられる。同時に、APP や BACE についても、高発現が認められたことから、慢性的な脳低灌流による微小循環障害や局所炎症反応の惹起によって、BACE や APP を介して、A β 1-40/1-42 の産生が増加する方向へ作用したものと考えられる。

E. 結論

慢性的な脳低灌流状態が続いた場合、アミロイド β タンパクの大脳皮質における沈着が認められた。一方、このモデルにおいて、大脳皮質領域において、APP、BACE の発現が認められた。慢性的な脳低灌流により生じる微小循環障害は、APP、

BACE の発現を通じて、アミロイド β タンパクの産生を亢進させる可能性があると考えられた。これらは、脳血管障害がアルツハイマー病の修飾因子として関わることを検討する上で、示唆に富むものと考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Miyazaki H, Oyama F, Wong HK, Kaneko K, Sakurai T, Tamaoka A, Nukina N: BACE1 modulates filopodia-like protrusions induced by sodium channel beta4 subunit. *Biochem Biophys Res Commun* 361:43-8, 2007.
- 2) Mizuno Y, Guyon JR, Ishii A, Hoshino S, Ohkoshi N, Tamaoka A, Okamoto K, Kunkel LM: Beta-synemin expression in cardiotoxin-injected rat skeletal muscle. *BMC Musculoskelet Disord* 8:40, 2007.
- 3) Aoyagi H, Hasegawa M, Tamaoka A: Fibrillogenic nuclei composed of P301L mutant tau induce elongation of P301L tau, but not wild-type tau. *J Biol Chem* 282:20309-18, 2007.
- 4) 玉岡 晃 : アルツハイマー病の予防. *臨床検査* 2008, 印刷中.
- 5) 玉岡 晃 : インスリン分解酵素. *日本臨床* 66 巻増刊号 1、72-79, 2008.
- 6) 富所康志、玉岡 晃 : NSAIDs. *日本臨床* 66 巻増刊号 1、478-483, 2008.
- 7) 玉岡 晃 : 高コレステロール血症とアルツハイマー型認知症. *老年精神医学雑誌*、18: 1074-1082, 2007.
- 8) 玉岡 晃、古庄健太郎、萩原直木、渡辺雅彦、吉沢和朗 : 今後の脳梗塞慢性期治療- 茨城県下での脳梗塞慢性期管理における抗血小板薬のあり方を考える-. *新薬と治療* 56: 15-25, 2007.
- 9) 玉岡 晃 : アルツハイマー病の危険因子と予防の可能性. *Medicina* 44(6): 1082-1085, 2007.
- 10) 玉岡 晃 : セクレターゼ阻害薬. *神経治療学* 24: 177-186, 2007.
- 11) 玉岡 晃 : アポ E とアルツハイマー病- アポ E の分子病態と疾患発症機構. *医学のあゆみ* 220: 431-438, 2007.

2. 学会発表

- 1) 玉岡 晃：茨城県の神経難病の実態と将来的な構想. 第1回神経難病医療従事者研修会、つくば、1月13日, 2008.
- 2) Harada H, Ishii K, Tamaoka A: Quantitation of amyloid beta protein in cerebrospinal fluid from patients taking various statins in comparison with control subjects. 第26回日本認知症学会、大阪、10月17-18日, 2007.
- 3) Tomidokoro Y, Tamaoka A, Frangione B, Ghiso J: Familial Danish dementia: co-existence of Danish and Alzheimer amyloid subunits (ADan and Abeta) in the absence of compact plaques. 第26回日本認知症学会、大阪、10月17-18日, 2007.
- 4) 宮崎晴子、小山文隆、Hon-Kit Wong、金子貢巳、櫻井隆、玉岡晃、貫名信行：BACE1 cleavage mediates neurite morphology induced by sodium channel b4 subunit、日本神経科学大会第30回大会、横浜、9月、2007.
- 6) 小山文隆、宮崎晴子、黒沢大、玉岡晃、金子武嗣、貫名信行：Dysregulation of b4 gene transcription in the striatum of Huntington Disease transgenic mice、日本神経科学大会第30回大会、横浜、9月、2007.
- 7) 宮崎晴子、小山文隆、Hon-Kit Wong、金子貢巳、櫻井隆、玉岡晃、貫名信行：BACE1によるナトリウムチャンネル b4 サブユニットの神経突起伸長活性の制御、第12回病態と治療におけるプロテアーゼとインヒビター学会、大阪、8月、2007（ポスター奨励賞受賞）.
- 8) 玉岡 晃：アルツハイマー病の分子病態と治療- アミロイド・カスケード仮説を中心に-. 第26回日本医用画像工学会大会、つくば、7月21日, 2007.
- 9) 玉岡 晃：アルツハイマー病とレビー小体型認知症の分子病態と治療. 第16回徳島神経難病治療薬研究会、徳島、7月13日, 2007.
- 10) 富所康志、玉岡 晃：家族性デンマーク型認知症状におけるアミロイド分子種ADan及びAβの翻訳後修飾と共沈着機構. 第49回老年医学会学術集会、札幌、6月21日, 2007.

- 11) 上野友之、黒田博子、古矢直己、河野豊、永田博司、玉岡 晃：慢性脳虚血ラットにおけるmatrix metalloproteinaseとアミロイドβ-プロテインの発現. 第48回日本神経学会総会、名古屋、5月17日, 2007.
- 12) 原田祐嗣、石井一弘、玉岡 晃：スタチン服用群における髄液Aβ分子種の検討. 第48回日本神経学会総会、名古屋、5月16日, 2007.
- 13) 富所康志、玉岡 晃、Frangione B、Ghiso J：家族性デンマーク型認知症：典型的老人斑を欠いたADanおよびAβの共沈着. 第48回日本神経学会総会、名古屋、5月16日, 2007.
- 14) 上野友之、黒田博子、古矢直己、河野豊、馬場健、永田博司、玉岡晃：慢性脳虚血ラットモデルにおけるアミロイドβタンパクの発現. 第32回日本脳卒中学会総会、福岡、3月23日, 2007.
- 15) 玉岡 晃：アルツハイマー病の分子病態と治療-アミロイドカスケードを中心に-. 第16回新潟臨床痴呆懇話会、新潟、3月9日, 2007.
- 16) 織田彰子、石井亜紀子、関島良樹、星井嘉信、玉岡 晃：肥大型心筋症にて発症し、Technetium-99m-pyrophosphateシンチグラフィで著明な心筋集積を認めた家族性アミロイドポリニューロパチー (Val30MetTTR型) の62歳男性例. 第180回日本神経学会関東地方会、東京、3月3日, 2007.
- 17) 玉岡 晃：アルツハイマー型認知症の臨床と早期発見. きぬ医師会学術講演会、つくばみらい、2月14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
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

cerebral amyloid angiopathy の画像診断に関する検討(続報)

分担研究者 葛原茂樹 国立病院機構精神神経センター武蔵病院

共同研究者 伊藤伸朗*、前田正幸**、三室摩耶***

三重大学大学院神経病態内科学 (神経内科学) *

三重大学大学院医学研究科病態制御医学講座非侵襲的診断治療分野

(放射線科) **

愛知医大加齢医学研究所神経病理学部門***

研究要旨 昨年度に引き続き、cerebral amyloid angiopathy(CAA)のMRI診断についての知見を得るため、とくにCAAを併発する可能性の高いAlzheimer病(AD)、皮質下出血に注目しながら、当科でMRI検査を行った60歳以上の連続548例でMRI gradient-echo法(T2*)でのdot状信号消失-cerebral microbleeds(CMBs)を検討した。脳皮質・皮質直下のみにCMBsが認められる表在型CMBパターンが、皮質下出血症例とAD症例で有意に多かった(probable CAA with supporting pathology, probable CAAの67%(6/9)、ADの12.3%(8/67)、コントロールの4.2%(4/94))。特に表在型多発例(3個 \leq)は皮質下出血とADの一部にしかみられなかった。表在型CMBパターンはCAAの診断に関して有用であり感度は低い、比較的特異度は高い診断マーカーであると考えられた。また、2.5年の観察期間中に、AD治療中の皮質下出血発症、皮質下出血数年後のAD発症がともに複数例認められ、相互の関連が深いことが示唆された。CMBの病態に関して、表在型、混合型の表在性CMBsの分布はともに後頭葉に多かったが、皮質分水嶺領域に約70%が存在し、低還流の影響が推測された。

A. 研究目的

孤発性脳アミロイド血管症(CAA)は、高齢者の脳血管障害、認知症に関して重要な病態であるが、生前の臨床診断は困難で、その病的な意義も十分にわかっていない。昨年度、我々は当院の脳疾患連続例と脳葉型出血例のMRI T2*画像によるdot状信号消失:cerebral microbleeds(CMB)に注目し、CAAの画像診断についてのいくつかの知見を得た。本年度は、更に症例を蓄積し、とくに皮質・皮質直下CMBの病理、臨床的意義についての考察を進めた。

B. 研究方法

2005年7月-2007年12月に三重大神経内科依頼でMRI検査を施行した60歳以上の連続症例(全548例)でT2*画像を撮像し、脳内のcerebral microbleeds:CMBを検討した。症例の内訳は脳梗

塞120例、TIA23例、脳出血28例[深部型15例、脳葉型13例-血腫除去手術時の組織標本からCAAが確認されたprobable CAA with supporting pathology 6例、probable CAA 3例、possible CAA+高血圧合併皮質下出血5例(Boston criteriaによる。CMBは出血に含めない。)]、AD 67例、軽症認知障害14例、パーキンソン病およびその他の変性型パーキンソニズム、脊髄小脳変性症、非AD変性型認知症などの神経変性疾患76例、頭痛、めまい、しびれ精査などの非脳(器質性)疾患(コントロール)94例、その他(NPH、脳腫瘍、中枢神経感染症など)で平均年齢は71.7 \pm 7.2歳。CMBは脳内のdot状(径<10mm)の信号消失とし、急性期血腫、陳旧性血腫、除去手術後の血腫周辺のdot状信号消失は除外した。CMBの出現部位、数、CMBの背景因子として、白質高信号域の程度と、高血圧、高脂血症、糖尿病、抗血小板療法、

抗凝固療法の有無、そして、CMB 陽性例 (30 例) で ApoE 多型を調べた。

倫理面への配慮：遺伝子検査は文書による説明の上、同意書を得て行った。画像、血液生化学データは匿名化して解析した。

C. 研究結果

1. 皮質下出血の検討

皮質下出血 14 例の MRI 検討では、probable CAA with supporting pathology (s. p.) の 67% (4/6 例) と、複数の皮質下出血のある probable CAA の 67% (2/3 例) が表在型だった。1 つの皮質下出血のみの possible CAA と高血圧例では表在型はなく、1/5 例が混合型だった。血腫周辺およびくも膜下出血の影響が疑われるヘモジデリン沈着を除いての、皮質下出血の表在型症例の CMB 数は 2-10 個 (中央値 5、平均 5.9 個) で、陽性例は全例が多発例だった。6 例で 1-2 年後の再検査を行ったところ CMB 増加例はなかったが、1 例の probable CAA with s. p. (右後頭葉) で新しい皮質下出血 (左頭頂葉) の再発があった。この症例は、79 歳男性で高血圧なし、抗血栓療法なし。1 年前の MRI では表在性 CMB が 10 個あり、新規出血は CMB のない部位であった (Fig 1)。ApoE 多型は probable CAA + probable CAA with s. p. で 3/4-5 例、3/3-2 例、2/2-1 例、possible CAA + 高血圧例で 3/3-2 例、3/4-1 例であった。

2. Alzheimer 病の検討

AD (67 例) における CMB 陽性例の頻度は 18.5% で、表在型症例は 12.3% (8/67) であった。一方、コントロールではそれぞれ 14.9%、4.2% (4/94) であった。AD 表在型で、CMB 数は 1-44 個で中央値 1.5 と多くは 1-2 個と少数だった。多発例 (5 個 ≤) は 3 例だった。背景因子の検討では、高血圧合併は、AD の CMB 表在型症例では 55.6% で非 CMB 例は 28% ($p=0.1$)。白質高信号域の程度 (deep white matter hyper intensities (DWMH)、periventricular white matter hyperintensities (PVWMH)、DWMH+PVWMH のいずれとも) と高い相関があった。抗血栓療法の有無、糖尿病の有無と関連なく、ApoE 多型は CMB の有無や型で有意差なしだった。また、多発ラクナ梗塞と広範 WMH の臨床診断での脳血管性認知症 (subcortical vascular

dementia) の 13 例では、表在型 1 例、混合型 3 例、深部型 4 例だった。

3. AD の皮質下出血例

2.5 年の観察期間中、AD として治療中に皮質下出血を発症したものが 3 例あった。また、反対に皮質下出血後の観察中に認知症 (AD) を発症したものが 2 例 (1.5 年後と 2 年後、いずれもラクナおよび WMH は軽度) 確認された。

4. CMB の分布

表在型と混合型の表在性 CMB の分布 (Fig 2) は、両型とも脳葉としては後頭葉に多かった。また、両型の表在性 CMB はともに皮質分水嶺領域に多く、およそ 70% がこの領域に存在した。

D. 考察

昨年度は、当院の連続多数例の MRI T2*画像での dot 状信号消失 (CMB) の検討で、近年多数報告されるこの検査所見について、正常コントロール、脳梗塞、深部脳出血症例などについて、CMB 出現率や背景因子などの結果が既報告とほぼ同様であることを確認した。その上で、これまで報告されていない CAA の病理学的証拠のある症例 (複数例の血腫除去手術例) をはじめとして CAA 疑い症例を検討したところ、皮質・皮質直下のみ CMB を認める出現パターン (CMB 表在型) が CAA の存在を示唆した。今年度は、さらに症例を増して、この CMB 出現パターンの臨床的意義、病理学的な考察を行った。

臨床的意義については、この画像検査により、CAA の病理学的証拠によらない診断精度向上、さらに将来的な出血の予見についての有用性が期待される。CAA の診断感度について、病理学的に CAA が確認された症例でも CMB 陰性例が 33% あり、CAA の程度、血管壁障害の程度を考慮しない CAA の診断感度は高くないと思われた。また、一般に AD 脳では病理学的に CAA が 80% に認められるとされ、また、加齢により CAA の頻度が増す事が知られるが、今回の検討では AD で CMB 表在型が認められる頻度は 12% 程度であり、加齢による CMB 陽性率増加は認めなかった。しかし、特異度の点では、CAA の可能性の高い皮質下出血症例の 67% (6/9) が表在型症例であり、全 CMB 表在型症例の 60% (18/30) が臨床診断は AD か皮質下出血で

あった。とくに3個以上の多発性表在型症例は皮質下出血(5例)とAD(3例)にしかみられず、CAAの、特に高度例の診断特異度は比較的高いと思われた。以上から、皮質下出血の予見については、表在型多発例では危険性が高いと推測可能である。しかし、CMB陰性からの皮質下出血発症も稀でない。

また、全脳梗塞+脳出血症例での深部CMB陽性率(32%)、脳血管性認知症(subcortical vascular dementia)の深部のCMB陽性率(54%)を考慮すると有用性に限界はあるものの、CMBの出現パターンが、AD(とくにMRIで白質高信号域の広がりが目立つ症例)と脳血管性認知症の鑑別の一助になると思われる。

ADとして治療中の皮質下出血発症、逆に皮質下出血後に出血/虚血による血管性認知症とは考えられない認知症-AD発症が複数あった。しかし、従来はADの皮質下出血合併頻度は高いとは考えられていない。今回の皮質下出血発症例は2007年に3例が集中していたこともあり一般的な傾向であるか不明だが、MRI画像検査などによる認知症の早期診断と治療が一般的になった近年、ADと皮質下出血との関連についての疫学的見直しも必要と思われる。

この観察期間中、CMBの病理学的確認は検討症例の中にCreutzfeldt-Jacob病の剖検例で側頭葉表在性CMB(表在型。計1個)を有する例があったが、ヘモジデリン沈着部位を特定することが出来なかった。Blooming effectで拡大した画像所見よりも、おそらく数分の一の微小な病変であることと、MRI軸断像で認めるCMBと冠状断の病理標本との間で、位置関係の把握が困難であることが原因と思われた。基底核部のCMBの病理学的検討は複数報告されているが、皮質・皮質直下のCMBの病理学的検討はFazekasら(Fazekas F, et al. AJNR 1999)が皮質-皮質直下にCMBをもつ2症例で、CAAとhypertensive angiopathyの混在を報告しているのみであり、今後の症例蓄積が望まれる。

CMB出現部位のMRI軸断像上へのプロット(Fig. 2)では、脳葉では後頭葉に多く、一般にCAAが高頻度に認められる部位であることと関連する可能性が示唆された。昨年度、今回よりも少数

例で認められた、表在性CMBが皮質分水嶺領域に多く存在する傾向が、今年度はより明らかになった。表在型でも、混合型の表在性CMBでも同程度:表在型では65.1%(ADのCMBの70.5%、皮質下出血のCMBの70.0%)、混合型では72.9%(脳梗塞・深部脳出血の表在性CMBの72.6%)が皮質分水嶺領域に存在し、CMBの発生機序に虚血性の因子が関与している事が示唆された。CAA+分水嶺の虚血のため、脆弱化した皮質血管壁の破綻を助長している可能性や、微小梗塞と関係している可能性が考えられた。

MRIでも捉えられない皮質の微小梗塞は、認知症との深い関連が指摘され注目されている。軽度のADの病理がみられる例で、微小梗塞が認知症発症と関連することを示唆する報告(Kovari E, et al. Neurology 2007)や、ADでは皮質分水嶺領域に高率に微小梗塞があり、hemodynamic factorがADの病態に関与していることを示唆する報告(Suter OC, et al. Stroke 2002)などがある。三室らも、CAAと皮質微小梗塞の両方がみられる5例を検討し、以下の点を指摘している(Mimuro M, et al. Neuropathology 2007)。1)CAAは全例で後頭葉に最も強く、CAAの高度な部位に微小梗塞が多かった。全例とも髄膜血管より皮質血管にアミロイド沈着が強く、dyschoric changeを高頻度に認めた。3)皮質微小梗塞、CAA血管壁および周囲に、ヘモジデリン沈着がしばしば認められた。4)後頭葉の皮質分水嶺領域に微小梗塞が多く存在し、その傾向はAD病変の軽度群>高度群であった。

このCMB出現部位の検討から、CMB出現の病態、さらにはADの病態に虚血性機序が関与していることが推測された。一方で、実際の症候性皮質下出血の部位は分水嶺領域との関連は認められなかった。先述した、症候性皮質下出血は必ずしもCMBが多い部位から生じる訳でないことと同様の観察所見であった。

今回、ApoE多型以外の分子遺伝学的検討は行っていないが、今後、CMB陽性例(とくに表在型)の遺伝的背景、生化学的背景を検討することも必要である。

E. 結論

CMBに注目したCAAのMRI診断の可能性に関して、今回の検討から以下の結論を得た。A. CMB表在型症例はCAAによる可能性が高い。このCMB出現パターンは、診断の感度は低い、特異度は高いと考えられる。特に表在型多発例はCAAに特異的と思われ、皮質下出血に注意が必要と考えられる。B. 表在性CMBは皮質分水嶺領域に多く存在し、虚血が関与している可能性がある。C. AD（認知症）と皮質下出血との関連につき疫学的に再検討を要すると思われた。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mimuro M, Kokubo Y, Kuzuhara S: Similar topographical distribution of neurofibrillary tangles in amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia complex in people living in the Kii peninsula of Japan suggests a single tauopathy. *Acta Neuropathol* 113:653-658, 2007.
- 2) Shibata N, Kawaguchi M, Uchida K, Kakita A, Takahashi H, Nakano R, Fujimura H, Sakoda S, Ihara Y, Nobukuni K, Takehisa Y, K0uroda S, Kokubo Y, Kuzuhara S, Honma T, Mochizuki Y, Mizutani T, Yamada S, Toi S, Sasaki S, Iwata M, Hirano A, Yamamoto T, Kato Y, Sawada T, Kobayashi M: Protein-bound crotonaldehyde

accumulates in the spinal cord of superoxide dismutase-1 mutation-associated familial amyotrophic lateral sclerosis and its transgenic mouse model. *Neuropathology* 27:49-61, 2007.

2. 学会発表

- 1) 伊藤伸朗、前田正幸、葛原茂樹：高齢者の cerebral microbleeds : Cerebral Amyloid Angiopathy の画像的診断に関する検討、日本神経学会総会、名古屋、2007. 5. 12.

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

Fig 1. CAA 表在型皮質下出血の再発例

79歳 男性。 H10年 右後頭葉出血(血腫除去術でCAA 確認)、 H19年12月 左頭頂葉出血。
 H19年1月 MRI T2* 表在性CMB10個 (血腫除去部周辺を除く)。高血圧(-)、抗血小板薬(-)、
 白質高信号域軽度、ApoE3・4、認知症なし。

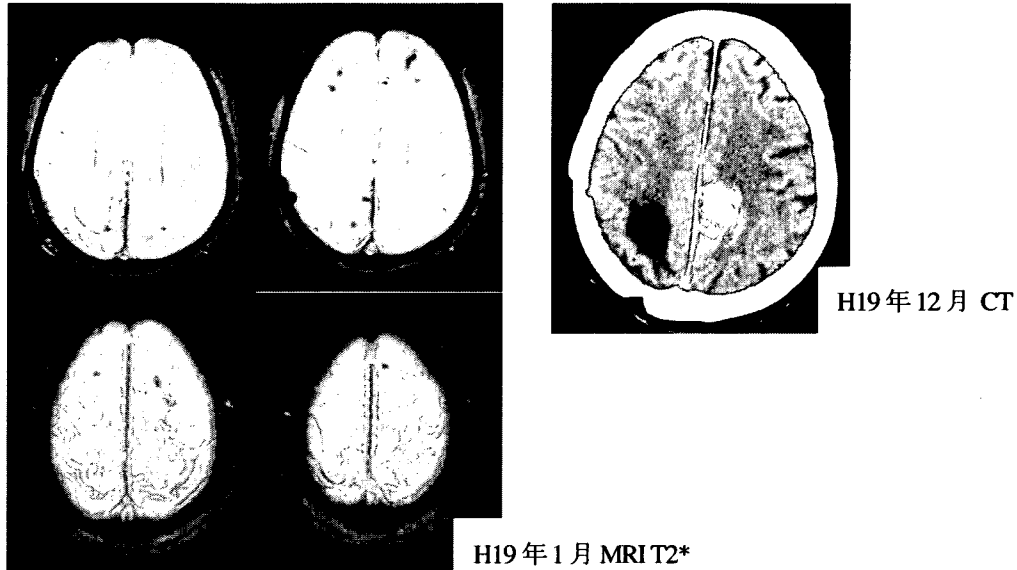
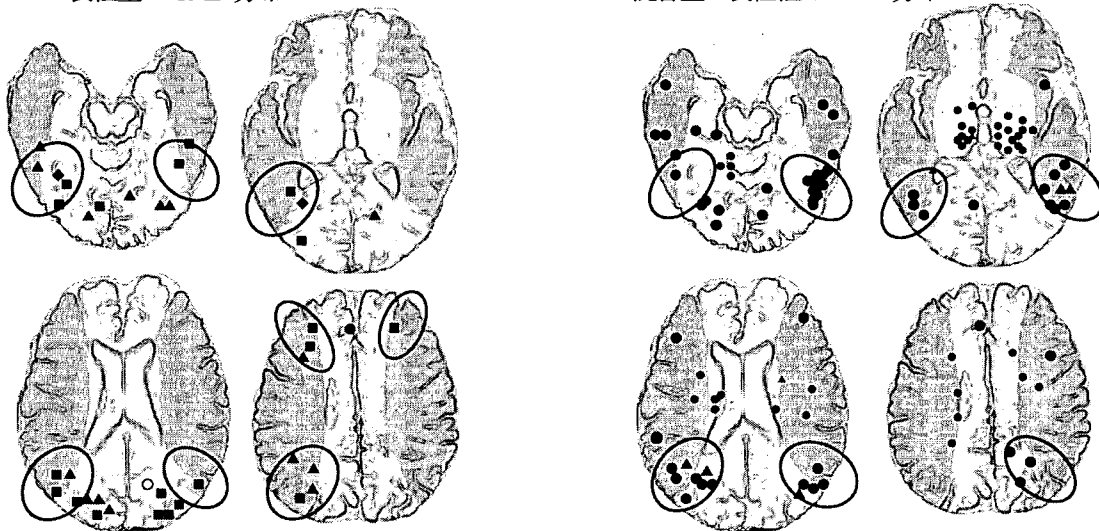


Fig 2. 表在性 CMB の分布 (軸断像の一部のみ提示)

▲AD ■皮質下出血 ●脳血管障害 ○MCI ◆その他 (小さいプロットは深部CMB)

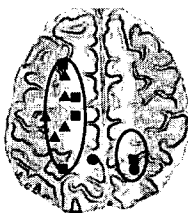
表在型の CMB 分布

混合型の表在性 CMB の分布

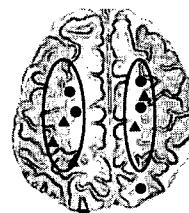


表在型のCMB数

混合型の表在性CMBs数



	AD	皮質下出血	CVA	計
前頭葉	14	7	1	22
側頭葉	4	4	4	12
頭頂葉	3	2	2	7
後頭葉	23	17	2	42
				83



	AD	CVA	計
前頭葉	3	16	19
側頭葉	3	31	34
頭頂葉	2	18	20
後頭葉	19	41	60
			133

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

認知症脳における BRI 関連蛋白の検索

分担研究者 中里雅光 宮崎大学内科学講座神経呼吸内分泌代謝学分野
 共同研究者 塩見一剛、京楽 格
 宮崎大学内科学講座神経呼吸内分泌代謝学分野

研究要旨 英国およびデンマークで発見された家族性認知症を呈する疾患はいずれも BRI 遺伝子の変異に起因していることが明らかとなった。BRI 関連遺伝子は3種類が同定されており、これまで報告された認知症を来たすものは BRI2 遺伝子異常によるものである。BRI 関連蛋白は A β 蛋白生成や凝集形成との関連が報告されており、アルツハイマー病の発症に関連している可能性が示唆されている。BRI 関連蛋白の脳内の分布やアルツハイマー病との関連について検討するため、BRI2 および3の分泌部位に対する抗体を作成し、免疫組織学的検討を行った。脳内では海馬の神経細胞内に染色性を認めるとともに、老人斑の部位で A β 染色陽性の部位に BRI2 および3を認めた。この結果よりアルツハイマー病のアミロイド沈着形成に BRI が関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

Familial British dementia (FBD)は英国で報告された脳血管および間質のアミロイド沈着による家族性認知症で、BRI 遺伝子の変異に起因している。また BRI 遺伝子の他の変異も Familial Danish dementia(FDD)を発症する。いずれも C 末端のアミノ酸残基が延長しアミロイド ABri と ADan を形成する。近年 FDD の原因ペプチド ADan と A β の共沈着が報告されており、また FBD や FDD の前駆蛋白である BRI 関連蛋白がアミロイド前駆蛋白 (APP) のプロセッシングに影響してアミロイド型 A β ペプチドの産生を抑制すると報告がある。今回 BRI の機能解明のためアルツハイマー脳における BRI 関連蛋白について検討した。

B. 研究方法

FBD および FDD の原因ペプチドの ABri や ADan の前駆蛋白である BRI2 の分泌型の 23 アミノ酸残基に対する抗体と、近年同定された BRI3 遺伝子の分泌型の 25 アミノ酸残基に対する抗体を作成した。これらの抗体を用いて免疫組織染色を行った。

(倫理面への配慮)

研究に際しては、宮崎大学・医の倫理審査委員会の審査、承認を得た。

C. 研究結果

BRI2に対する抗体は神経細胞に染色性を示した。また、アルツハイマー病における老人斑において、抗A β 抗体陽性のアミロイド沈着部位にも染色性を示した。またBRI3に対する抗体も、神経細胞に染色性を示すとともに、BRI2と同様に老人斑におけるアミロイド沈着部位にも染色性を示した。

D. 考察

アルツハイマー病において老人斑において抗A β 抗体陽性のアミロイドの部位に BRI 蛋白が共沈していることが示された。アミロイド前駆蛋白からA β の凝集に関して関与する可能性が示唆され、アミロイド形成に関わっている可能性が示された。これまでの報告では、in vitro の実験では BRI はアミロイド前駆蛋白のプロセッシングについては抑制的に働くとの報告ほか、BRI の存在下でA β 蛋白のアミロイド形成を促進するという報告もあり、BRI とアミロイド形成との関連は見解が分かれている。今回 BRI3 とともに沈着していることが示され、これら BRI 関連蛋白はアミ

ロイド形成にやはり関与していると推察された。

E. 結論

BRI 関連蛋白はアルツハイマー病においてアミロイド形成に関与している可能性が高いと考えられた。

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