

日本膜学会シンポジウム「脂質低下療法  
時代の生体膜研究」

東京理科大学森戸記念館 平成 21 年 5 月  
22 日、東京

H. 特許申請

1. 発明の名称：アルツハイマー病の予防  
及び治療薬並びにアルツハイマー病の

予防及び治療薬のスクリーニング方法

発明者：道川 誠、西辻和親

出願者：財団法人ヒューマンサイエンス  
振興財団

出願日：平成 21 年 12 月 21 日

出願番号：特願 2009-289487

# 厚生労働科学研究補助金（認知症対策総合研究事業）

## 分担研究報告書

### 血液での鬱鑑別マーカー開発に関する研究

研究分担者：関山敦生 兵庫医科大学非常勤講師

#### 研究要旨

老年性認知症を代表するアルツハイマー病の認知症の正確な早期診断を目的として、鑑別診断が極めて困難とされるうつ病に注目。うつ病、老年性うつ病とアルツハイマー病を判別するための血液中マーカーの確立をはかっている。

平成22年度は、40-65歳のうつ病を対象に、うつ病の経過を追跡するためのマーカー、および数理統計学的解析方法の検討を行った。また、前年度の成果をもとに老年性うつ病に関してさらに検討を進めた。結果、ハミルトンうつ病スケールの素点と相関するバイオマーカー群を選定した。

#### A. 研究目的

うつ病、老年性うつ病とアルツハイマー病およびアルツハイマー型老年認知症とを鑑別するための血液中マーカーの確立を目的としている。老年期うつ病に関する前年度の成果をもとに、さらにサンプル数を拡大した。また、アルツハイマー病との鑑別が大きな課題となっている中一壮年期のうつ病を対象とした検討も新たに開始した。

#### B. 研究方法

研究分担者が構成した被験者のなかから、65歳以上（老年期うつ病）および40歳以上65歳以下（中一壮年期うつ病）を対象とした。認知症検査（MMSE）の他、心理テスト（Zung-SDS, HAM-D）を行い、抑うつ傾向を示したケースを選抜。炎症性身体疾患及びステロイドの使用者を除外。肥満者も除外した。静脈血を採血し遠心後、血清を分離。血液中生理活性分子濃

度を、特にサイトカイン、ケモカインに注目して詳細に測定。分担研究者が新たに開発した多変量解析手法、および診断自動化プログラムによって、数理的に解析。アルツハイマー型老年性認知症およびアルツハイマー病との相違を検出できるマーカー群の選定を行った。得られたデータは、健常高齢者、健常中壮年者のデータと比較し、認知症群およびうつ症状群との異同を検討した。

中壮年期のうつ病は、アルツハイマー病への移行等が見られる場合が多く、脳血管炎など病態のオーバーラップが推測されている。うつ病の重症度の変化を追跡観察できるマーカーを確立することで、うつ病診断精度のさらなる向上、および、健常化せずアルツハイマー病を発症する群を予見することを狙った。本年度は、うつ病に対する小規模な前向き研究（回復例36例）を行い、うつ病重症度と相関するマーカー群を探索した。

また、研究課題に関連して、サイトカイン・ケモカインが精神疾患ストレス等で分泌される経路に対する、細胞内レドックスバランス変化の関与の有無について検討を加えた。これは、マーカー分子が病態に寄与していた場合に、細胞内レドックス制御が創薬シードとして蓋然性がある対象か否かを評価するために行った。

### C. 研究結果

分担研究者が集めた対象は前年度と総計して1753名。うち65歳以上は96名だった。平成21年度の成果として、TNF $\alpha$ およびCRP値が、老年性うつ病リスクに負の寄与をしていること、認知症リスクには正の寄与をしていることが示唆されていたが、これらの傾向は、平成22年度に集めた独立した被験者群においても同様に観察された。

うつ病患者に対する追跡研究からは、サイトカイン・ケモカイン11分子を選定。これらの血中濃度を荷重配分して素点化したところ、ハミルトンうつ病スケールと相関し、うつ病状の消失に沿って正常化する重症度評価式の作製に成功した。

### D. 考察

抑うつエピソードの後に認知症を発症するケースは多々見られ、認知症への早期介入を困難にしている。初期アルツハイマー病・アルツハイマー型老年認知症いずれにおいても、人当たりがよくなる、おだやかな性格傾向が強まるなどの所見が見られることが知られ、これらによって鑑別はさらに困難になる。うつ病の経

過を迫えるバイオマーカーを得ることで、うつ病としての回復と認知症発症とを簡便に判別することができる可能性が高い。本新規発見は、認知症への早期介入の診断的根拠となる可能性がある。

### E. 結論

さまざまな交絡因子の除外のため、及び結論的な結果を得るためには、新たにデザインされた、さらに多数を対象とした研究が期待される。しかし、注目すべきポイントを明らかにすることができた。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

Emiko Kasahara, Misato Kashiba, Mika Jikumaru, Daisuke Kuratsune, Kumi Orita, Yurika Yamate, Kenjiro Hara, Atsuo Sekiyama, Eisuke F. Sato and Masayasu Inoue. Dynamic aspects of ascorbic acid metabolism in the circulation: analysis by ascorbate oxidase with a prolonged in vivo half-life. *Biochem J.* 421(2):293-9, 2009..

#### 2. 学会発表

##### 関山敦生 (他5名)

血液による精神的ストレス、身体的ストレスの判別および強度評価法の検討 第31回 日本生物学的精神医学会 国立京都大会館 平成21年4月25日 (23-25)

##### 関山敦生 (他5名)

うつ病および統合失調症における血中サイトカイン・ケモカイン濃度パターンの

検討 第31回 日本生物学的精神医学  
会 国立京都会館 平成21年4月25日  
(23-25)

関山 敦生(他6名) 精神的、身体的負荷、  
および精神疾患における血中サイトカイン  
濃度の検討 第73回 日本心理学会ワ  
ークショップ 立命館大学 平成21年8  
月27日

関山敦生

大うつ病、統合失調症における、血中サ  
イトカイン・ケモカイン濃度プロファイ  
ルの検討  
第17回日本精神・行動遺伝学会学術大  
会

シンポジウム  
大阪医科大学 平成22年2月11日

関山敦生

ストレスおよび精神疾患下でのサイトカ  
イン・ケモカイン血中濃度の検討  
大阪医科大学 精神医学教室主宰 学内  
セミナー招待講演 大阪医科大学精神  
医学講座 平成21年11月16日  
平成21年11月16日 於大阪医科大学精  
神医学講座

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

厚生労働科学研究費補助金（認知症対策総合研究事業）  
分担研究報告書

バイオマーカーを用いたアルツハイマー病診断に関する研究に向けた  
[C-11]PIB PET, [F-18]FDG PET 検査実施の準備

分担研究者 加藤隆司 国立長寿医療センター長寿脳科学研究部室長  
研究協力者 伊藤健吾 国立長寿医療センター長寿脳科学研究部部長  
研究協力者 籾野健太郎 国立長寿医療センター長寿脳科学研究部室長

研究要旨

バイオマーカーを用いたアルツハイマー病診断に関する研究計画のための  
ポジトロン核医学検査の準備を進めてきた。[C-11]PIB や[F-18]FDG を用いた  
PET 検査は、アルツハイマー病診断のゴールドスタンダードとして、位置づ  
けることが可能である。これらの検査をどのような枠組みで行うかを探り、  
検討してきた。その結果、高度医療評価制度など費用を被検者に求める制度  
は用いず、純粋に研究の枠組みで実施することにした。

A. 研究目的

認知症研究の困難さは、診断のゴールドスタンダードを何に求めるかにある。バイオマーカーを用いたアルツハイマー病診断に関する本研究において、診断のゴールドスタンダードは臨床診断である。しかし、臨床診断と病理診断が一致しないことは珍しくない。これが、認知症の臨床試験を行うことの根本的な問題の一つである。臨床試験の対象患者、対象健常者のすべてに病理診断を行うことは理想であるが、現実的な解と言えない。そこで画像がはたす役割が出てくる。臨床診断とFDG PET 診断を比較した場合、FDG PETの方が病理診断との一致率が高いという報告があるように、脳糖代謝画像は、脳内で起こっているアルツハイマー病の病理変化を、忠実に反映した結果である可能性が高い。近年は、アミロイドプラークに結合するPET用製剤PIBも実用化され、より直接的な病理変化を可視化することが可能になっている。

本研究のように比較的短期間かつ少数の症例数でバイオマーカー診断能の結果を出すためには、[C-11]PIB PET, [F-18]FDG PETの画像を、診断のゴールドスタンダードとして活用することが期待される。

むしろ、画像自体の診断能も同時に評価の対象とすることにかわりはないが、その目的はどちらかと言えば二次的なものである。

本年度は、以上のような観点からの研究計画の立案策定と実施上の準備作業を行った。

実施に向けての準備は、薬剤合成のための準備と高度医療評価のための準備がある。

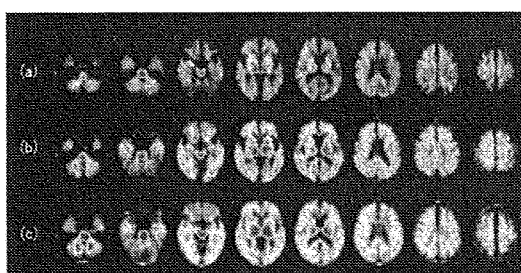
B. 研究方法, 結果, 考察

研究計画の策定

FDG PET, PIB PETの対象者は、本研究の対象となる健常者、軽度認知障害(MCI, mild cognitive impairment)患者、アルツハイマー病(AD, Alzheimer's disease)患者のうち、MCIに絞り込むこととした。これは、短い経

過期間、少数の症例数という限定された条件下で、バイオマーカーの診断成績を出すためである（主任研究者）。

アミロイドプラークのイメージング用製剤として [C-11]PIB(N-methyl-[C-11])2-(4'-methylaminophenyl)-6-hydroxybenzothiazole を採用することにした。長寿医療センターでは、この3年間[C-11]BF-227 PET アミロイド・イメージングの臨床評価を行ってきた。



BF-227 PET, (a)健常者, (b)アルツハイマー病患者, (c)健常者でアミロイド沈着陽性

BF-227 は、東北大学で開発された製剤である。しかし、BF-227 は PIB と比較して実績が乏しく、国際的に事実上の標準となっている PIB の方が、ゴールドスタンダードとして用いるのに適していると考えを主任研究者から示された。そこで、アミロイドイメージング製剤としては PIB を採用することにした。BF-227 アミロイドイメージングでの撮像、解析の経験は、PIB にも活用可能であると考えられる。

本研究の中で実施する画像検査に関して、厚生労働省から指示があった。その内容は、「薬事法上未承認又は適応外の医薬品・医療機器を用いた診療行為については、治験や先進医療（高度医療）などとして行うことにより、保険診療との併用が認められています。このような制度を活用せずに保険診療と併用して研究を実施した場合には、当該保険診療分の医療費を返還していただくこととなりま

す。」というものであった。FDG および PIB PET 検査は、これに該当する。そのため、高度医療評価制度を申請のための準備を開始した。高度医療評価制度は、2008年4月に始まったばかりで、制度の細部や実際上の運用に関してこれまで、関係諸方面に問い合わせと調整を行ってきた。

高度医療評価制度に関しては、本研究における PIB PET を高度医療評価制度にのせて実施するのは、事実上不可能であることがあきらかになった。まず第一に PIB PET は検査法としてまだエビデンスが確立されたとは言えず、高度医療評価の制度になじまないという考えを示された。

しかし、それから1年以上経過した時点で、院内製剤による PET 検査に関する考え方が変わったとのことで、院内製剤を用いた PET 検査は先進医療の第二項の枠組みで行う選択肢を示唆された。

先進医療の第二項で実施する場合、FDG、PIB を合わせて検査費用が 20 万円を超える可能性があることがわかった。これでは、本研究遂行上、実施することが事実上不可能である。そこで、これまでの経緯を含めて総合的に、主任研究者、分担研究者、件急遽力者で再検討した結果、純粹の研究扱いで PET 検査を実施することに決定した。

## E. 結論

本研究の脳 PET 検査を、先進医療第二項、高度医療評価制度の枠組みで実施するのは、実際的でないことが明らかになった。純粹研究の枠組みで、一日も早い実施をめざすことに決定した。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- (1) 伊藤健吾, 加藤隆司: FDG-PET によるアルツハイマー病の早期診断. *Dementia Japan* 23, 14-21, 2009
- (2) 伊藤健吾, 加藤隆司: 認知症の診断と根本治療薬の開発に貢献する PET イメージング  
*日本神経精神薬理雑誌*, 29(4), 153-160, 2009

### 2. 学会発表

- (1) Kato T, Ito K, Hatano K, Nakamura A, Washimi Y, Arahata Y, Suenaga M, Hattori H, Miura H, Okamura N, and Yanai K. [C-11]BF-227 PET imaging of amyloid deposition in AD, MCI, and normal subjects. The 56th Annual meeting of Society of Nuclear Medicine. June 16 (June 13-17), 2009. Metro Toronto Convention Centre, Toronto, Canada.
- (2) Ito K, Senda M, Ishii K, K. Ishii K, Fukuyama H, Ouchi Y, Meguro K, Maeda K, Okumura A, Mitsuyama Y, SEAD-J Study Group; Study on diagnosis of early Alzheimer's disease-Japan (SEAD-J): Results of analysis of the initial clinical and image data. The 56th Annual meeting of Society of Nuclear Medicine. June 15 (June 13-17), 2009. Metro Toronto Convention Centre, Toronto, Canada.
- (3) 加藤隆司, 伊藤健吾, 水野加奈子, 簗島聡, 松田博史, 石井一成, 桑原康雄, 畑澤順, 米倉義晴, 研究部グループ J-COSMIC. MCI を対象としたアルツハイマー型痴呆の早期診断に関する研究 (J-COSMIC). -画像解析 1- 第 49 回日本核医学会学術総会 2009 年 10 月 1-3 (1) 日 旭川市
- (4) 加藤隆司, 伊藤健吾, 旗野健太郎, 新畑豊, 藤原 謙, 岡村信行, 谷内一彦. [C-11]BF-227 PET アミロイドイメージングの AD, MCI, 健常者における検討, 第 49 回日本核医学会学術総会 2009 年 10 月 1-3 (1) 日 旭川グランドホテル, 旭川市
- (5) 杉健太郎, 岡村信行, 石井賢二, 石渡喜一, 伊藤健吾, 加藤隆司, 鷺野谷利幸, 工藤幸司, 谷内一彦[C-11]BF227-PET によるアルツハイマー病早期診断法の多施設臨床試験. 49 回日本核医学会学術総会 2009 年 10 月 1-3 (1) 日 旭川市
- (6) 米倉義晴, J-COSMIC Study Group. MCI を対象としたアルツハイマー型痴呆の早期診断に関する研究 (J-COSMIC). 第 49 回日本核医学会学術総会 2009 年 10 月 1-3 (1) 日 旭川グランドホテル, 旭川市
- (7) 伊藤健吾, 松田博史, 石井一成, 桑原康雄, 橋川一雄, 百瀬敏光, 内田佳孝, 畑澤 順, 簗島 聡, 米倉義晴, 研究グループ J-COSMIC. MCI を対象としたアルツハイマー型痴呆の早期診断に関する研究 (J-COSMIC). -画像解析 2- 第 49 回日本核医学会学術総会 2009 年 10 月 1-3 (1) 日 旭川グランドホテル, 旭川市
- (8) 石井一成, 伊藤健吾, 松田博史, 桑原康雄, 橋川一雄, 百瀬敏光, 内田佳孝, 畑澤 順, 簗島 聡, 米倉義晴, 研究グループ J-COSMIC. MCI を対象としたアルツハイマー型痴呆の早期診断に関する研究 (J-COSMIC). -画像解析 1- 第 49 回日本核医学会学術総会 2009 年 10 月 1-3 (1) 日

- 旭川グランドホテル, 旭川市
- (9) 川嶋将司, 加藤隆司, 伊藤健吾, 千田道雄, 石井一成, 石井賢二, 福山秀直, 尾内康臣, 目黒兼一, SEAD-J 研究グループ. アルツハイマー病早期診断に関する研究 SEAD-J と US-ADNI における MCI 患者の特徴と FDG PET 画像の比較. 第 49 回日本核医学会学術総会 2009 年 10 月 1-3 (1) 日 旭川グランドホテル, 旭川市
- (10) 田島稔久, 飯田昭彦, 松原充隆, 加藤隆司, 伊藤健吾. アルツハイマー型認知症における MMSE, ADAS-Jcog 関連糖代謝部位の評価における FDG-PET 定量画像の有用性. 第 49 回日本核医学会学術総会 2009 年 10 月 1-3 (1) 日 旭川グランドホテル, 旭川市
- (11) 前野信久, 加藤隆司, 川嶋将司, 藤原 謙, 水野加奈子, 鷺見幸彦, 伊藤健吾, SEAD-J スタディグループ SEAD-Japan と

US-ADNI の MCI に差異はあるか?—登録時データの比較検討— 第 28 回日本認知症学会学術集会 2009 年 11 月 20-22 (20) 日 東北大学百周年記念会館 川内萩ホール 仙台市

- (12) 伊藤健吾. シンポジウム 4 “ニューロイメージングの最先端” 「FDG-PET」, 日本認知症学会 第 28 回日本認知症学会学術集会 2009 年 11 月 21 日 宮城県仙台市 東北大学百周年記念会館
- (13) 伊藤 健 吾 , 「 PET UPDATES 」 World-wide ADNI の展望 2009 年 11 月 22 日 宮城県仙台市 東北大学百周年記念会館

#### 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



### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

## 研究成果の刊行に関する一覧表

### 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
服部英幸	高齢者うつ病	日本老年医学会雑誌編集委員会編、	老年医学update 2009-2010	メジカルビュー社	東京	2009	110-122
遠藤英俊	法的知識 F.高齢者介護に関する法と施設	山内俊雄	精神科専門医のためのプラクティカル精神医学	中山書店	東京	2009	661-670
遠藤英俊	介護保険	小川聡	改訂第7版内科学書vol.1	中山書店	東京	2009	265-271
遠藤英俊	第8章精神科医療 8-2-5認知症	精神保健福祉白書編集委員会	精神保健福祉白書2010年版	中央法規出版株式会社	東京	2009	139-139
道川 誠	コレステロール代謝とアルツハイマー病.	大澤俊彦、丸山和佳子	脳内老化制御とバイオマーカー: 基盤研究と食品素材	株)シーエムシー出版	東京	2009	pp129-136.
Sugimoto, H., Takikawa O., Shiro Y.	Tryptophan catabolism by heme dioxygenases	Kadish et al.,	The Porphyrin Handbook			2009 (in press)	

### 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ikeda M, Kawarabayashi T, Harigaya Y, Sasaki A, Yamada S, Matsubara E, Murakami T, Tanaka Y, Kurata T, Wuhua X, Ueda K, Kuribara H, Ikarashi Y, Nakazato Y, Okamoto K, Abe K, Shoji M.	Motor impairment and aberrant production of neurochemicals in human alpha-synuclein A30P+A53T transgenic mice with alpha-synuclein pathology.	<b>Brain Res</b>	1250	232-41	2009

Wati H, Kawarabayashi T, <u>Matsubara E</u> , Kasai A, Hirasawa T, Kubota T, Harigaya Y, Shoji M, Maeda S.	Transthyretin accelerates vascular Abeta deposition in a mouse model of Alzheimer's disease.	<b>Brain Pathol</b>	19(1)	48-57	2009
松原悦朗	アルツハイマー病 の治療薬—現状と 将来展望	<b>PET journal</b>	26	13-15	2009
鷺見幸彦	認知症の診断と薬物療 法	<b>J Clin Reh</b>	18	204-211	2009
鷺見幸彦	日常生活から見た認知 症の原因と予防法	<b>Ageng Health</b>	18	7-10	2009
鷺見幸彦	高齢者の脳疾患と転 倒・骨折予防—整形外 科医に必要な実践知識 —	<b>MB Orthop</b>	22	59-66	2009
鷺見幸彦	実地医家が遭遇する精 神疾患の症状、鑑別診 断および治療ストラテ ジー—実地医家の守備 範囲と対処の実際—	<b>Medical Practice</b>	26	1515-1519	2009
服部英幸	高 齢 者 う つ 病 と Alzheimer 病に伴ううつ 状態	日本臨床	67(4)	835-844、	2009
Hattori H, Kamiya J, Shimada H, Akiyama H, Yasui A, Kuroiwa K, Oda K, Ando M, Kawamura T, Harada A, Kitagawa Y, Fukata S	Assessment of postoperative delirium risk of the elderly using E-PASS and the NEECHAM confusion scale.	<b>Int J Geriatric Psychiatry.</b>	24	1304-1310	2009
服部英幸	高齢者うつ病は認知症 とどこが違うのか—対処 法は？	訪問看護と介護	15	32-38	2010

森明子、小長谷陽子、鈴木亮子、服部英幸	デイケア利用者におけるうつの実態とデイケアの効果。	日本医事新報	472	93-96	2010
服部英幸	認知症の地域医療-各医療機関の特性(得手不得手)と地域連携の現状・課題4) 老年医療専門病院の認知症専門医としての立場から	。神経内科	Vol.72, Suppl.6	206-210	2010
梅本充子、遠藤英俊、三浦久幸	認知症高齢者における行動観察評価スケールNOSGERの検討(第1報) -信頼性の検討-	老年精神医学雑誌	20(10)	1139-1148	2009
遠藤英俊、三浦久幸	高齢者診療マニュアル後期高齢者医療(長寿医療)制度	日本医師会雑誌第138巻・特別号(2)	138(2)	318-319	2009
三浦久幸、中島一光、遠藤英俊	7.高齢者終末期医療・ケアの国際比較	Geriatric Medicine (老年医学) 4月号	47(4)	487-491	2009
飯島節、遠藤英俊、百瀬由美子、井口昭久	座談会□高齢者の終末期をめぐる諸問題	Geriatric Medicine (老年医学) 4月号	47(4)	509-521	2009
Yukiko Tanaka, Kumiko Nagata, Tomoe Tanaka, Koichi Kuwano, Hidetoshi Endo, Tetsuyotani, Minato Nakazawa, Hiroshi Koyama	Can an individualized and comprehensive care strategy improve urinary incontinence (UI) among nursing home residents?	Arch Gerontol Geriatr	49(2)	278-283	2009
石附 敬、和気純子、遠藤英俊	重度要介護高齢者の在宅生活の長期継続に関連する要因	老年社会科学	31(3)	359-365	2009
Takahashi K, Adachi K, Yoshizaki K, Kunimoto S, Kalaria RN, Watanabe, A.	Mutations in Notch3 cause the formation and retention of aggregates in the endoplasmic reticulum, leading to impaired cell proliferation.	Hum. Mol. Genet	19	79-89	2010

Hiramoto M, Maekawa N, Kuge T, Ayabe F, <u>Watanabe A</u> , Masaike Y, Hatakeyama M, Handa H, Imai T.	High-performance affinity chromatography method for identification of L-arginine interacting factors using magnetic nanobeads.	<b>Biomedical Chromatography</b>			2010 (in press)
Takahashi K, Adachi K, Yoshizaki K, Kunimoto S, Kalaria RN, <u>Watanabe, A.</u>	Mutations in Notch3 cause the formation and retention of aggregates in the endoplasmic reticulum, leading to impaired cell proliferation.	<b>Hum. Mol. Genet</b>	19	79-89	2010
Yamada A, Akimoto H, Kagawa S, Guillemin GJ, <u>Takikawa O.</u>	Proinflammatory cytokine interferon-gamma increases indoleamine 2,3-dioxygenase in monocytic cells primed with amyloid beta peptide 1-42: Implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease.	<b>J. Neurochem.</b>	110	791-800	2009
Nisapakultorn K, Makrudthong J, Sa-Ard-lam N, Rerkyen P, Mahanonda R, <u>Takikawa O.</u>	Indoleamine 2,3-dioxygenase expression and regulation in chronic periodontitis.	<b>J. Periodontol.</b>	80	289-297	2009
Ogasawara N, Oguro T, Sakabe T, Matsushima M, <u>Takikawa O</u> , Isobe K, Nagase F.	Hemoglobin induces the expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in dendritic cells through the activation of PI3K, PKC, and NF-kappaB and the generation of reactive oxygen species.	<b>J. Cell Biochem.</b>	108	716-725	2009
Brenk M, Scheler M, Koch S, Neumann J, <u>Takikawa O</u> , Häcker G, Bieber T, von Bubnoff D.	Tryptophan deprivation induces inhibitory receptors ILT3 and ILT4 on dendritic cells favoring the induction of human CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup> T regulatory cells.	<b>J. Immunol.</b>	183	145-154	2009

滝川 修、 横山祐一	Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)の病態生理学的意義と阻害剤の開発	ファルマシア			2009 (in press)
Kim HJ, Jung CG, Dukala D, Bae H, Kakazu R Wollmann R Soliven B.	Fingolimod and related compounds in a spontaneous autoimmune polyneuropathy	<b>J Neuroimmunol</b>	214	93-1000	2009
Nakamura T, Watanabe A, Fujino T, Hosono T, and Michikawa M	Apolipoprotein E4 (1-272) fragment is associated with mitochondrial proteins and affects mitochondrial function in neuronal cells.	<b>Mol. Neurodegener</b>	4(35)	35	2009
Zou K, Maeda T, Oba R, Komano H, and Michikawa M	A $\beta$ 42-to-A $\beta$ 40- and angiotensin- converting activities in different domain of angiotensin-converting enzyme.	<b>J. Biol. Chem.</b> ,	284	31914-31920	2009
Tesseur I, Brecht W, Corn J, Gong J-S, Yanagisawa K, Michikawa M, Weisgraber K, Huang Y, and Wyss-Coray T.	Bioactive TGF- $\beta$ can associate with lipoproteins and is enriched in those containing apolipoprotein E3.	<b>J. Neurochem</b>	110(4)	1254-1262	2009
Doi Y, Mizuno T, Maki Y, Jin S, Mizoguchi H, Ikeyama M, Doi M, Michikawa M, Takeuchi H, and Suzumura A.	Microglia activated with toll-like receptor 9 ligand CpG attenuate oligomeric amyloid- $\beta$ neurotoxicity in vitro and in vivo models of Alzheimer's disease.	<b>Am. J. Pathol.</b>	175	2121-2132	2009
Maeda T, Marutani T, Zou K, Araki W, Yagishita N, Yamamoto Y, Amano T, Michikawa M, Nakajima T, and Komano H	An E3 ubiquitin ligase, Synoviolin is involved in the degradation of immature Nicastrin, and regulates the production of amyloid b-protein.	<b>FEBS J</b>	276	5832-5840	2009

Minagawa K, Gong J-S, Jung C-G, Watanabe A, Lund-Katz S, Phillips M C, Saito H, and <u>Michikawa M.</u>	Mechanism underlying apolipoprotein E isoform-dependent lipid efflux from neural cells in culture.	<b>J. Neurosci. Res.</b>	87	2498-2508	2009
Kasahara E, Kashiba M, Jikumaru M, Kuratsune D, Orita K, Yamate Y, Hara K, <b><u>Sekiyama A.</u></b> Sato EF, Inoue M	Dynamic aspects of ascorbic acid metabolism in the circulation: analysis by ascorbate oxidase with a prolonged in vivo half-life.	<b>Biochem J.</b>	421(2)	293-296	2009
伊藤健吾 加藤 <u>隆司</u>	FDG-PETによるアル ツハイマー病の早期診 断	<b>Dementia Japa n</b>	23	14-21	2009
伊藤健吾 加藤 <u>隆司</u>	認知症の診断と根本治 療薬の開発に貢献する PETイメージング	日本神経精神薬 理雑誌	29	153-160	2009

## IV. 研究成果の刊行物・別刷



## RESEARCH ARTICLE

# Transthyretin Accelerates Vascular A $\beta$ Deposition in a Mouse Model of Alzheimer's Disease

Henny Wati<sup>1</sup>; Takeshi Kawarabayashi<sup>2</sup>; Etsuro Matsubara<sup>3</sup>; Ayumi Kasai<sup>4</sup>; Takae Hirasawa<sup>5</sup>; Takeo Kubota<sup>5</sup>; Yasuo Harigaya<sup>6</sup>; Mikio Shoji<sup>2</sup>; Shuichiro Maeda<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Biochemistry, Interdisciplinary Graduate School of Medicine and Engineering, University of Yamanashi, 1110 Shimokato, Chuo, Yamanashi 409-3898, Japan.

<sup>2</sup> Department of Neurology, Hirosaki University School of Medicine, 5 Zaifu, Hirosaki 036-8562, Japan.

<sup>3</sup> Department of Alzheimer's Disease Research, National Institute for Longevity Sciences, National Center for Geriatrics and Gerontology, 36-3 Gengo, Morioka, Obu, Aichi 474-8522, Japan.

<sup>4</sup> Department of Molecular Signaling, Interdisciplinary Graduate School of Medicine and Engineering, University of Yamanashi, 1110 Shimokato, Chuo, Yamanashi 409-3898, Japan.

<sup>5</sup> Department of Epigenetic Medicine, Interdisciplinary Graduate School of Medicine and Engineering, University of Yamanashi, 1110 Shimokato, Chuo, Yamanashi 409-3898, Japan.

<sup>6</sup> Neurology Service, Maebashi Red Cross Hospital, 3-21-36 Asahi, Maebashi, Tokyo 371-0014, Japan.

## Keywords

Alzheimer's disease, amyloid- $\beta$ , apoptosis, tau phosphorylation, Tg2576 mouse, Transthyretin.

## Corresponding author:

Shuichiro Maeda, Department of Biochemistry, Interdisciplinary Graduate School of Medicine and Engineering, University of Yamanashi, 1110 Shimokato, Chuo, Yamanashi 409-3898, Japan (Email: [smaeda@yamanashi.ac.jp](mailto:smaeda@yamanashi.ac.jp))

Received 12 October 2007; revised: 10 February 2008; accepted 12 February 2008.

doi:10.1111/j.1750-3639.2008.00166.x

## Abstract

Transthyretin (TTR) binds amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ) and prevents A $\beta$  fibril formation *in vitro*. It was reported that the lack of neurodegeneration in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease (AD) (Tg2576 mouse) was associated with increased TTR level in the hippocampus, and that chronic infusion of anti-TTR antibody into the hippocampus of Tg2576 mice led to increased local A $\beta$  deposits, tau hyperphosphorylation and apoptosis. TTR is, therefore, speculated to prevent A $\beta$  pathology in AD. However, a role for TTR in A $\beta$  deposition is not yet known. To investigate the relationship between TTR and A $\beta$  deposition, we generated a mouse line carrying a null mutation at the endogenous *TTR* locus and the human mutant amyloid precursor protein cDNA responsible for familial AD (Tg2576/*TTR*<sup>-/-</sup> mouse) by crossing Tg2576 mice with TTR-deficient mice. We asked whether A $\beta$  deposition was accelerated in Tg2576/*TTR*<sup>-/-</sup> mice relative to the heterozygous mutant Tg2576 (Tg2576/*TTR*<sup>+/-</sup>) mice. Contrary to our expectations, the degree of total and vascular A $\beta$  burdens in the aged Tg2576/*TTR*<sup>-/-</sup> mice was significantly reduced relative to the age-matched Tg2576/*TTR*<sup>+/-</sup> mice. Our experiments present, for the first time, compelling evidence that TTR does not suppress but rather accelerates vascular A $\beta$  deposition in the mouse model of AD.

## INTRODUCTION

Insoluble amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ) peptides, the main components of brain amyloid plaques, are thought to be the causative agent of Alzheimer's disease (AD) (11). However, A $\beta$  is normally present in a soluble form in plasma and in the cerebrospinal fluid (CSF) (39, 40), suggesting that some other factors may modulate the aggregation of A $\beta$  fibrils. The hypothesis that transthyretin (TTR) might play some role in the pathogenesis of AD originated from the observation that TTR in the CSF binds A $\beta$ , and prevents A $\beta$  fibril formation *in vitro* (36, 37). It was further observed that the levels of both TTR and its oxidized forms in the CSF were lower in patients with AD compared with the age-matched controls (2, 38). The importance of TTR in inhibition of A $\beta$  fibril formation and toxicity *in vivo* was also suggested in two model systems: transgenic *Caenorhabditis elegans* and a transgenic mouse model of AD, Tg2576. Link reported that co-expression of A $\beta$  peptide

and TTR in transgenic *C. elegans* led to a reduction in A $\beta$  deposits (22). Tg2576 line has high level of plasma A $\beta$  peptides (14, 18), and develops brain A $\beta$  deposits similar to that seen in patients with AD (15, 35) and behavioral deficits (13, 53). However, it lacks neurofibrillary tangles (NFT) (27, 48, 49) and neuronal loss (15), which are unique characteristics of patients with AD (5). Stein and Johnson reported that the lack of neurodegeneration was associated with increased level of TTR in the hippocampus of Tg2576 (43). They also reported that chronic infusion of an antibody against TTR into the hippocampus of Tg2576 mice led to increased A $\beta$  deposits, tau hyperphosphorylation, neuronal loss and apoptosis in the CA1 neuronal field (42). Carro *et al* reported that reduced A $\beta$  burden after insulin-like growth factor I-treatment of Tg2576 was paralleled by increased brain levels of TTR (6). Giunta *et al* reported the inhibition of A $\beta$  aggregation and toxicity and A $\beta$ -induced apoptotic changes by TTR in cultured cells (10).

All these findings support for the importance of TTR in prevention of A $\beta$  aggregation and toxicity. However, a role for TTR in A $\beta$  deposition is not yet known. To investigate the relationship between TTR and A $\beta$  deposition, we generated a mouse line carrying a null mutation at the endogenous *TTR* locus and the human mutant amyloid precursor protein (APP) cDNA responsible for familial AD (Tg2576/*TTR*<sup>-/-</sup> mouse), by crossing Tg2576 mice with *TTR*-deficient mice generated through gene targeting (9). We asked whether A $\beta$  deposition was accelerated in Tg2576/*TTR*<sup>-/-</sup> mice relative to the heterozygous mutant Tg2576 (Tg2576/*TTR*<sup>+/-</sup>) mice.

## METHODS

### Animals

Transgenic mice producing human variant APP and lacking endogenous mouse TTR were generated as follows. A male Tg2576 mouse (13) carrying the human mutant APP cDNA with the double mutation K670N and M671L responsible for Swedish familial AD backcrossed to C57BL/6 for 2 generations was mated with *TTR*<sup>-/-</sup> female mice backcrossed to C57BL/6 for eight generations (9). The *TTR*<sup>+/-</sup> F1 male mice carrying the mutant APP cDNA were mated with *TTR*<sup>-/-</sup> female mice. Heterozygous (*TTR*<sup>+/-</sup>) F2 male mice carrying the mutant APP cDNA (Tg2576/*TTR*<sup>+/-</sup>) were mated with *TTR*<sup>-/-</sup> F2 female mice. The *TTR*<sup>+/-</sup> and *TTR*<sup>-/-</sup> F3 progenies carrying the mutant APP cDNA (Tg2576/*TTR*<sup>+/-</sup> and Tg2576/*TTR*<sup>-/-</sup>) were used in the present study. The F3 transgenic mice were maintained in cages housing three to six mice each, on separate racks in the same room, kept under a 12-h light cycle. Regular rodent's chow (Oriental Yeast, Tokyo, Japan) and tap water were freely available.

Transgenic mice were killed by cervical dislocation after anesthesia with diethyl ether. The brains were dissected; the right hemibrains were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C while the left hemibrains were fixed in 4% buffered paraformaldehyde, and embedded in paraffin. Genotype analysis for each animal was carried out by polymerase chain reaction on DNA, purified from tails, as described (9, 14). The presence and absence of TTR in the serum of Tg2576/*TTR*<sup>+/-</sup>, and Tg2576/*TTR*<sup>-/-</sup> mice, respectively, were confirmed by western blotting analysis as described (51).

All animal experiments were approved by University of Yamaguchi Animal Care and Use Committee.

### Immunohistochemistry

For brain A $\beta$  detection, the paraffin-embedded left hemi-brain sections (5  $\mu$ m) were pretreated with 99% formic acid for 3 minutes and immersed in 5% periodic acid for 10 minutes to block endogenous peroxidase. They were then incubated with blocking buffer [5% normal goat serum (Gibco, Carlsbad, CA, USA) in 10-mM phosphate buffer pH 7.4 and 100-mM NaCl with 0.05% Tween-20 (Bio-Rad, Richmond, CA, USA) containing Block Ace (Dainipon-seiyaku, Suita, Japan)] for 1 h, with primary antibody [Ab9204 recognizing normal L-aspartate at position 1 (34), 0.1  $\mu$ g/ml] overnight, and with biotinylated anti-rabbit immunoglobulin G (IgG) antibody (1:200) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) for 1 h. Immunoreactivity was visualized with the use of Vectastain ABC Elite kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), and

3,3'-diaminobenzidine, tetrahydrochloride (DAB). Tissue sections were counterstained with hematoxylin.

For phosphorylated tau detection, the paraffin sections were pretreated with periodic acid, as described above and then irradiated in 10-mM citric acid buffer pH 6.0 for 15 minutes with microwave oven. After blocking, as described above, the sections were stained with the use of primary antibody AT8, recognizing phosphorylated tau at Ser202/Thr205 (1:500) (Innogenetics, Gent, Belgium) or anti-phosphorylated tau, recognizing phosphorylated tau at Thr231 (Thr231; 1:1000) (Calbiochem, Darmstadt, Germany), and Vectastain ABC Elite kit and counterstained by hematoxylin.

Fragmented DNA of apoptotic cells in the brain was detected by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) method with the use of DeadEnd Colorimetric TUNEL System (Promega, Madison, WI, USA) and DAB according to the manufacturer's instructions.

### Quantification of A $\beta$ burden by image analysis

For quantification of A $\beta$  burden, immuno-labeling was examined in the entire cerebral cortex and hippocampal areas of Tg2576/*TTR*<sup>+/-</sup> and Tg2576/*TTR*<sup>-/-</sup> mice. The amyloid burden was calculated by dividing total area of A $\beta$  deposits by total area of region analyzed (in pixels). Images were captured and analyzed with the use of ImagePro@ver6 software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). Four coronal sections from each of the mice were examined. The burden was expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean.

### Protein extraction

Frozen right hemi-brains were sequentially extracted using two-step extraction method, as described previously (18). Initially, the frozen brain samples were homogenized in 2% sodium dodecylsulfate (SDS) (150 mg/ml wet weight) with protease inhibitors (complete protease inhibitor cocktail, one tablet in 50-ml solution; Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) followed by centrifugation at 100,000 g for 1 h at 4°C. The supernatant was then removed (termed SDS fraction), and the resultant pellet was sonicated [(35 s at level 10; XL-2000 Microson Ultrasonic Cell Disruptor (Misonix Inc., Farmingdale, NY, USA)] in 70% formic acid in water. After sonication, the samples were centrifuged, as described above, and the supernatant was removed (termed FA fraction). Total protein concentration measurement for SDS fraction was carried out with the use of BCA Kit (Pierce, Rockford, IL, USA).

### Western blotting analysis

The SDS fractions of brain extracts (30  $\mu$ g of protein) were electrophoresed on 4–12% gradient Bis-Tris gels (NuPage, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Tefco, Tokyo, Japan). Membranes were labeled with the use of primary antibody, Saeko (1:1000), recognizing C terminal 30 amino acids of both human and mouse APP (18) overnight at 4°C, incubated with horseradish peroxidase-linked anti-rabbit IgG antibody (Amersham Biosciences, Buckingham, UK) (1:2000) for 1 h, and the immunoreactivity was visualized with the use of Supersignal (Pierce, Rockford, IL, USA). Images were captured by Fuji Bas-1000 imaging analyzer (Fujifilm, Tokyo, Japan), and the

intensity of the bands was quantified with the use of Scion Image (Scion Corp., Frederick, MD, USA).

### Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay

Amyloid- $\beta$  40 and A $\beta$ 42 in the brain extracts (SDS and FA fractions) were measured by sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), as described previously (18, 24, 25). Microplates (Immunoplate I, Nunc, Rockilde, Denmark) were pre-coated with anti-A $\beta$  monoclonal antibody BNT77 (IgA isotype specific for A $\beta$ 11-16) that recognizes both A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42, then incubated for 24 h at 4°C with 100  $\mu$ l/well of samples. The microplates were further incubated for 24 h at 4°C with either horseradish-peroxidase-conjugated BA27 (anti-A $\beta$ 1-40, specific for A $\beta$ 40) or BC-05 (anti-A $\beta$ 35-43, specific for A $\beta$ 42 and A $\beta$ 43). Color was developed with 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine and evaluated at 450 nm on a microplate Reader (Molecular Devices, Menlo Park, CA, USA). The SDS fractions were diluted 400 times in EC buffer [20-mM phosphate buffer, pH 7.0, 400-mM NaCl, 2-mM EDTA, 0.4% Block Ace (Dainipponseiyaku, Suita, Japan), 0.2% bovine serum albumin, 0.05% CHAPS and 0.05% sodium azide] containing 0.005% SDS. The FA fraction was neutralized by a 1:50 dilution into 1-M Tris-HCl, pH 8.0 and then further diluted 20 times in EC buffer. The program Softmax (Molecular Devices, Menlo Park, CA, USA) was used to calculate A $\beta$  concentration (in picomolar) by comparing the sample absorbance with the absorbance of known concentrations of synthetic A $\beta$ 42 or A $\beta$ 40 standards (Sigma, St Louis, MO, USA) assayed identically on the same plate. Using the wet weight of brain in the original homogenate, the final values of A $\beta$  in brain were expressed as picomoles per gram wet weight.

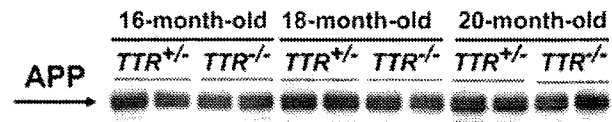
### Statistical analysis

The difference in the A $\beta$  burden between Tg2576/TTR<sup>+/+</sup> and Tg2576/TTR<sup>-/-</sup> mice was examined with ANOVA followed by the Student's unpaired *t*-test with GraphPad Prism, Version 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). *P* < 0.05 was considered significant.

## RESULTS

### There is no significant difference in the brain levels of full-length APP between Tg2576/TTR<sup>+/+</sup> and Tg2576/TTR<sup>-/-</sup> mice

Amyloid- $\beta$  peptides are derived from APP. To determine whether or not TTR affected the level of full-length APP, the groups of two Tg2576/TTR<sup>+/+</sup> and Tg2576/TTR<sup>-/-</sup> littermates were killed at 16, 18 and 20 months of age, and relative levels of full-length APP in the SDS fractions prepared from the brain were determined by western blotting with the use of Saeko, as described under *Methods*. Significant differences were never detected in the levels of full-length APP among any of the Tg2576/TTR<sup>+/+</sup> and Tg2576/TTR<sup>-/-</sup> mice examined (Figure 1). Thus, TTR does not affect the level of full-length APP in the brain of Tg2576 mice.



**Figure 1.** Western blotting analysis of full-length amyloid precursor protein (APP). The arrow on the left indicates the location of full-length APP.

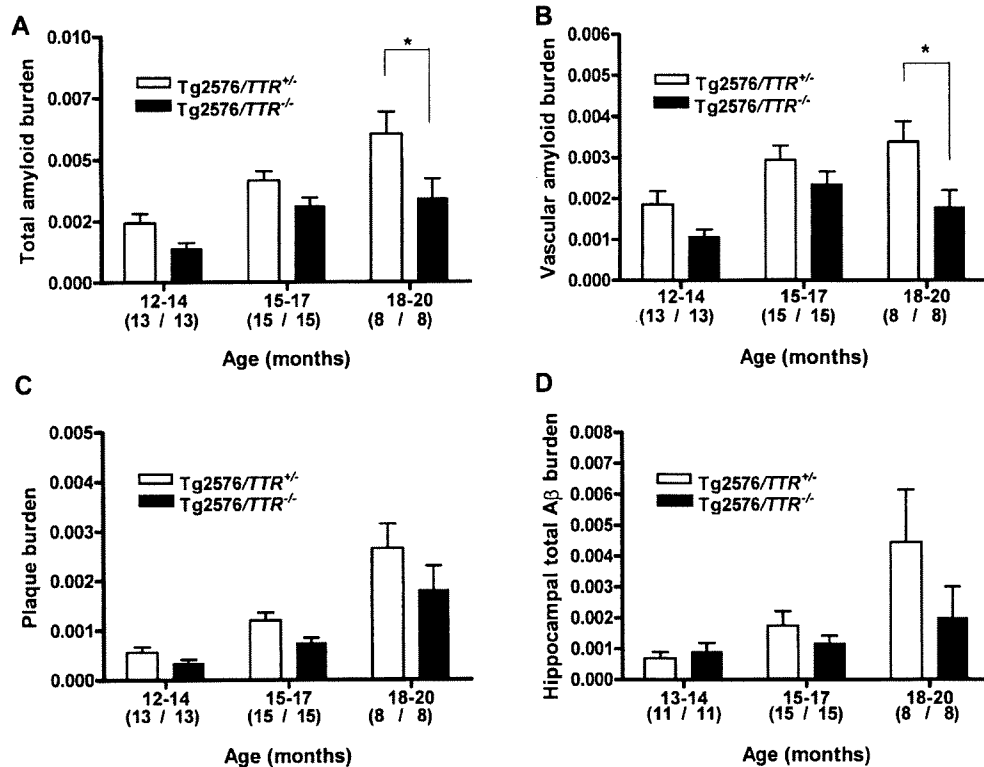
### Transthyretin deficiency does not increase but decreases the degree of total and vascular A $\beta$ burdens in the brain of Tg2576 mice

#### Total A $\beta$ burden

To evaluate whether or not TTR affected A $\beta$  deposition, we compared the onset, progression and distribution of amyloid deposition between the brain of Tg2576/TTR<sup>+/+</sup> and Tg2576/TTR<sup>-/-</sup> mice, measuring the area occupied by A $\beta$  deposits around the vascular wall of the meninx and cerebral parenchyma (termed cerebral amyloid angiopathy; CAA) and inside the brain parenchyma (termed A $\beta$  plaque), as described under *Methods*. A time-course analysis of the total A $\beta$  deposition in the brain was performed by assessing mice of ages 7–20 months. The number and age of mice examined were shown in Table 1. A $\beta$  deposits were not detected in any of the six 7–11-month-old Tg2576/TTR<sup>+/+</sup> and Tg2576/TTR<sup>-/-</sup> mice examined. A small amount of A $\beta$  deposits was first observed at 12 months of age in both the mice (data not shown). With advancing age, total A $\beta$  burden increased (Figure 2A), and A $\beta$  deposits were observed in the cerebral cortex, neocortex and hippocampus (Figure 3A), but not in the cerebellum (data not shown) in both the mice. Although there was a trend to reduction of total A $\beta$  burden in 12–17-month-old Tg2576/TTR<sup>-/-</sup> mice relative to the age-matched Tg2576/TTR<sup>+/+</sup> mice, there was no statistically significant difference in the onset, progression and distribution of total A $\beta$  deposition in the entire cerebral cortex between Tg2576/TTR<sup>+/+</sup> and Tg2576/TTR<sup>-/-</sup> mice (Figure 2A). The size of A $\beta$  deposits in Tg2576/TTR<sup>-/-</sup> mice was also much the same as that in the age-matched Tg2576/TTR<sup>+/+</sup> mice. In 18–20-month-old Tg2576/TTR<sup>-/-</sup>

**Table 1.** The number and age of mice examined by immunohistochemistry. Abbreviation: n = number of mice.

Age (months)	Tg2576/TTR <sup>+/+</sup> (n)	Tg2576/TTR <sup>-/-</sup> (n)
7	2	2
8	2	2
11	2	2
12	2	2
13	5	5
14	6	6
15	6	6
16	6	6
17	3	3
18	6	6
20	2	2
Total	42	42



**Figure 2.** The A $\beta$  burden in the brain of Tg2576/TTR<sup>+/+</sup> and Tg2576/TTR<sup>-/-</sup> mice. The total A $\beta$  burden (vascular amyloid and plaques) (A) vascular A $\beta$  burden (B) and A $\beta$  plaque burden (C) in the entire cerebral cortex were calculated by dividing total area of A $\beta$  deposits by total area of analyzed cortex. The hippocampal total A $\beta$  burden (D) was calculated

by dividing area of total A $\beta$  deposits (vascular amyloid and plaques) by area of analyzed hippocampus. All data are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean. Numbers in parentheses denote numbers of mice examined. \* $P < 0.05$ . TTR = transthyretin.

mice, however, total A $\beta$  burden was significantly reduced relative to the age-matched Tg2576/TTR<sup>+/+</sup> mice ( $P < 0.05$ ) (Figure 2A). Thus, contrary to our expectations, total A $\beta$  burden is not increased, but rather decreased by eliminating TTR in Tg2576 mice.

### Vascular A $\beta$ burden

It had been reported that Tg2576 mice developed abundant vascular amyloid while aging, especially in leptomeningeal vessels (31). In order to determine whether the onset and degree of particular form of A $\beta$  deposition were affected by TTR, we separately assessed vascular amyloid and plaque burdens in the brain of Tg2576/TTR<sup>+/+</sup> and Tg2576/TTR<sup>-/-</sup> mice, as described under *Methods*.

A time-course analysis of vascular A $\beta$  burden was performed by assessing the mice of ages 7–20 months. A few vascular A $\beta$  deposits were first observed at 12 months of age in both Tg2576/TTR<sup>+/+</sup> and Tg2576/TTR<sup>-/-</sup> mice. With advancing age, total vascular A $\beta$  burden increased in both the mice (Figure 2B). Vascular A $\beta$  deposits were detected only in the wall of leptomeningeal vessels of 12–16-month-old Tg2576/TTR<sup>+/+</sup> and Tg2576/TTR<sup>-/-</sup> mice, while in the 17–20-month-old Tg2576/TTR<sup>+/+</sup> and Tg2576/TTR<sup>-/-</sup> mice, the deposits were detected in the vascular wall of cerebral paren-

chyma as well as the wall of leptomeningeal vessels (data not shown). There was no significant difference in the onset, progression and distribution of vascular A $\beta$  deposition in the entire cerebral cortex between Tg2576/TTR<sup>+/+</sup> and Tg2576/TTR<sup>-/-</sup> mice up to 17 months of age. However, a significant reduction in vascular A $\beta$  burden by 47.1% was found in 18–20-month-old Tg2576/TTR<sup>-/-</sup> mice relative to the age-matched Tg2576/TTR<sup>+/+</sup> mice ( $P < 0.05$ ) (Figure 2B). These findings suggested that TTR does not decrease but rather increases the degree of vascular A $\beta$  burden in Tg2576 mice.

### Amyloid- $\beta$ plaque burden

A $\beta$  plaques were first detected in both Tg2576/TTR<sup>+/+</sup> and Tg2576/TTR<sup>-/-</sup> mice at 12 months of age, and both the size and number of the plaques increased with advancing age (Figure 2C). Although there was a trend to reduction of total A $\beta$  plaque burden in 12–20-month-old Tg2576/TTR<sup>-/-</sup> mice relative to the age-matched Tg2576/TTR<sup>+/+</sup> mice, there was no statistically significant difference in the onset, degree and distribution of A $\beta$  plaque deposition between Tg2576/TTR<sup>+/+</sup> and Tg2576/TTR<sup>-/-</sup> mice (Figure 2C). These findings suggested that TTR does not decrease A $\beta$  plaque burden in the brain of Tg2576 mice.