



# 脳水溶性蛋白減少仮説から 異常蛋白凝集仮説へ

## —小胞体ストレスとシャペロン誘導剤—

大阪大学大学院医学系研究科情報統合医学講座精神医学准教授

工藤 喬

### I はじめに

西村健先生は、アルツハイマー病(Alzheimer's disease; AD)では脳水溶性蛋白が減少していることを世界に先駆けて発見された。従来、AD 脳の研究は神経病理学的に行われていたが、西村先生は当時最新の電気泳動法を用いて生化学的な検討を行い、B2あるいはB4と名づけた蛋白が水溶性分画で減少し(図1A)、不溶性分画で増加していることを発表された<sup>1)</sup>。このデータを基に西村先生は、正常脳では水溶性の性質をもつ蛋白が、AD 脳では不溶化する傾向があるとした脳水溶性蛋白減少仮説を提唱された(図1B)。

この西村先生の仮説は、AD をはじめとする神経変性疾患の病態を包括する現在の異常蛋白凝集仮説に引き継がれている。すなわち神経細胞内で異常蛋白が出現し凝集することにより不溶化して神経変性を促進すると考えられている。近年筆者らは、神経細胞内に出現する凝集性の異常蛋白に対する小胞体(endoplasmic reticulum; ER)ストレスとADの関連を検討し、それを基に新しい

治療法開発を検討している。

### II ER ストレスとアルツハイマー病

細胞小器官の1つであるERは分泌蛋白や膜構成蛋白などの折りたたみや翻訳後修飾を行う蛋白の「組み立て工場」のような役割を担う。「組み立て工場」であるがゆえに「不良品」すなわち折りたたみが不十分なあるいは不正な蛋白(unfolded protein)の出現は宿命のようなものである。細胞内の、カルシウム動態の変化、酸化還元状態の変化、分泌蛋白の過剰産生、ブドウ糖欠乏、糖付加の変化などのストレスはERストレスといわれ、ER内のunfolded proteinの増加をきたす。そのような「不良品」が「出荷」されないようにERはunfolded protein response (UPR) という「品質管理」機能を有する。

#### 1. 3つのUPR(ERストレス反応, 図2)

現在では3つのUPRが想定されている。細胞はこれらの機構によってERストレスを克服しようとするが、なんらかの理由でこれらが機能しないと細胞はアポトー

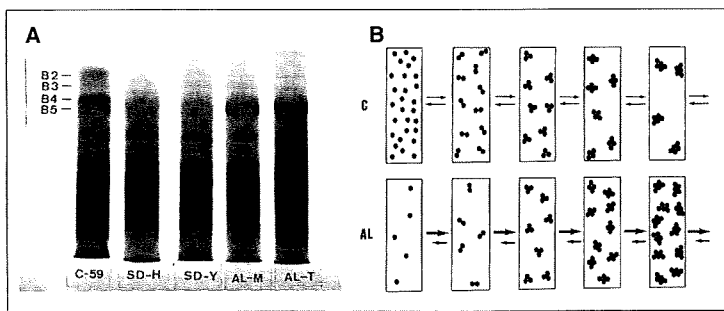


図1 アルツハイマー病(AD)脳における脳水溶性蛋白減少仮説  
A: 脳水溶性分画の電気泳動像。正常対照脳(C-59)で認められるB2やB4のバンドは、アルツハイマー型老年期認知症脳(SD-H, SD-Y)やAD脳(AL-M, AL-T)では観察されない。B: ADにおける脳水溶性蛋白減少仮説。

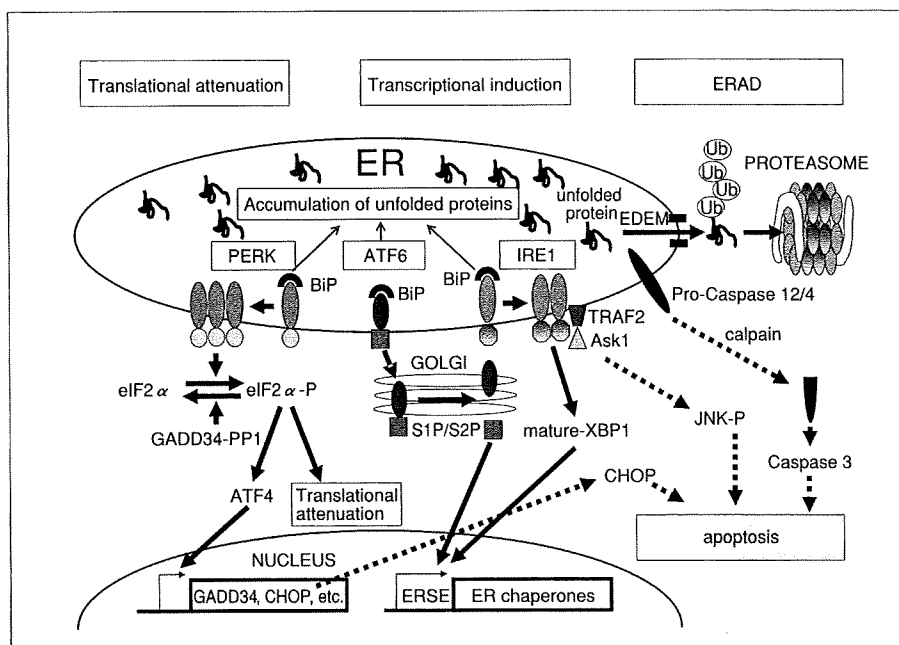


図2 UPR[unfolded protein response, 小胞体(ER)ストレス反応]  
 折りたたみ不整蛋白がER内に蓄積(accumulation of unfolded proteins)すると、PERK、ATF6、IRE1からシャペロン分子BiPが離れることにより活性化し、蛋白翻訳抑制(translational attenuation)とシャペロン蛋白誘導(transcription induction)のUPRが発動する。また、不整蛋白はユビキチン化されプロテアソームで分解されるER関連分解が起こる(ER-associated degradation; ERAD)。これらUPRによってERストレスが解消されないとアポトーシスが起る。

シス経路へ導かれる。

1) 蛋白翻訳抑制(translational attenuation)

第1の戦略として、unfolded proteinがER内にこれ以上蓄積しないように、細胞は、蛋白翻訳全般を抑制するという方策を講じる。これは、翻訳開始因子eIF2αのリン酸化によってもたらされる。

2) シャペロン蛋白誘導

第2の戦略として、細胞はERストレスによるunfolded proteinのER内での蓄積を察知し、ERから核へ細胞内シグナル伝達を活性化させ、シャペロン蛋白であるBiP、calnexin、やcalreticulinなどを発現誘導する。これらシャペロン蛋白は、ERに蓄積したunfolded proteinの折りたたみを促進あるいは是正する。

3) 小胞体関連分解(ER-associated degradation; ERAD)

ERに蓄積したunfolded proteinを処理しきれない場合、それらはERからプロテアソームに運ばれ分解される。

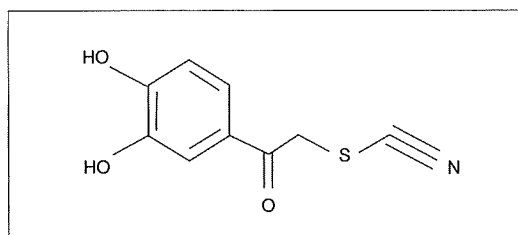


図3 BiP inducer X [1-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-thiocyanato-ethanone, BIX]

2. ER ストレスセンサー分子(図2)

UPRはER内のunfolded proteinの蓄積を感知することから始動する。現在まで、ER膜上に存在し、unfolded proteinのセンサーとしてPERK、ATF6、IRE1が報告され、前述のUPRを発動する。

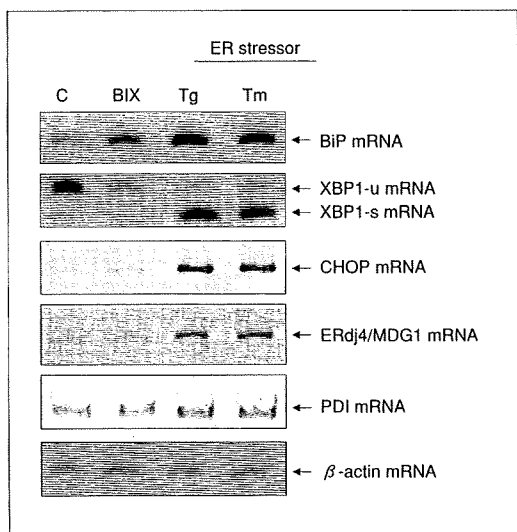


図4 BIXは選択的にBiPを誘導する  
BIXは、5  $\mu$ M thapsigargin (Tg)や5  $\mu$ g/mL tunicamycin (Tm)で活性化されるXBP-1 (XBP1-s), CHOP, ERdj4/MDG1やPDI mRNA上昇させず、BiP mRNAのみを上昇させる。

### 3. ERストレスとアルツハイマー病

家族性アルツハイマー病 (familial Alzheimer's disease; FAD)の最も頻度の高い原因遺伝子であるプレセニリン1 (PS1)はERに多く局在するという事実から、われわれはERストレスとPS1変異体の関係について注目した。FADでみつかったPS1変異体を遺伝子導入した神経細胞は、ERストレスに対し脆弱性を示すことが示された<sup>2)</sup>。

PS1のFAD変異体を導入した神経細胞において、ERストレスセンサー分子の活性化を検討したところ、IRE1, PERK, ATF6すべてで活性化が阻害されており、PS1のFAD変異体はUPRを阻害して神経変性をもたらすことが示唆された<sup>2)~4)</sup>。

実際のBiPの蛋白レベルについてAD脳と正常高齢者脳で検討したところ、BiPはFAD患者脳で減少しており、孤発性のADでも減少する傾向が認められ、UPRの障害すなわちERシャペロンの阻害がADの病理の一環である可能性を示している<sup>2)</sup>。

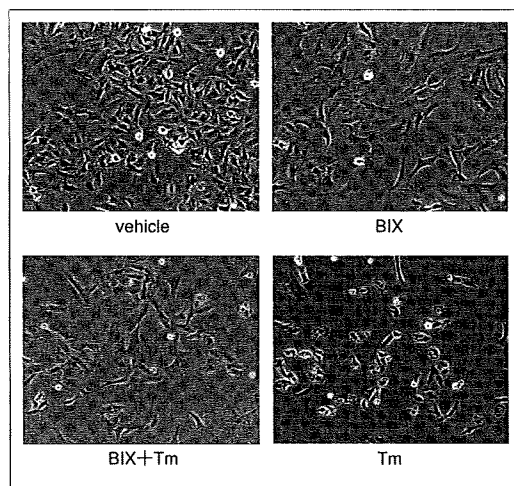


図5 BIXはERストレスによる細胞死を抑制する  
0.5  $\mu$ g/mL tunicamycin (Tm)はSK-N-SH細胞に36時間後に細胞死をもたらすが(Tm), 5  $\mu$ M BIXを12時間前に前処理しておくとその抑制される(BIX+Tm)。

### III 分子シャペロン誘導剤開発

以上の知見から、UPRを人為的に活性化することはADの治療につながる可能性が考えられる。そこでわれわれは、UPRのうち分子シャペロン誘導に着目し、分子シャペロンBiP誘導剤の探索を行った。BiPのプロモーター配列を利用してBiPレポーターシステムを構築し、コンパウンドライブラリーをハイスループットスクリーニングにて検索し、最もBiPのメッセージを誘導するコンパウンドBiP inducer X (BIX)を得た(図3)<sup>5)</sup>。

このBIXが、もしBiP以外のERストレスによって発現される分子を活性化すれば、ERストレスによるアポトーシスにつながりかねず、治療法とはなりえない。そこで、BiP以外のERストレス分子XBP1, CHOP, ERdj4/MDG1, PDIの活性化について、BIXの効果を検討した。BIXをSK-N-SH細胞に投与しても、BiPは誘導するが、XBP1のスプライシング(活性化)、CHOPの誘導、ERdj4/MDG1の誘導、PDIの誘導は起きないことが確認された(図4)。また、BiP誘導と相対する蛋白翻訳抑制を起こすeIF2 $\alpha$ のリン酸化についてもBIXの効果を検討したが、そのリン酸化は観察されなかった。

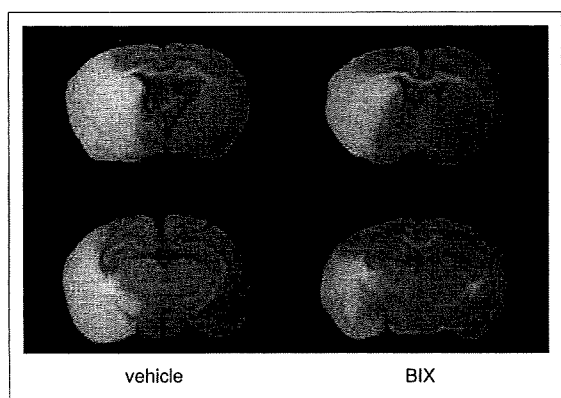


図6 BIXは中大脳動脈閉塞による脳梗塞巣を縮小する  
BIXの脳室内投与は、閉塞24時間後のTTC染色によって示された梗塞巣を縮小する。

以上の結果から、BIXはBiPのみを誘導し、他のERストレス反応分子を誘導しないことが示された<sup>9)</sup>。

BIXのERストレス保護作用を検討する目的で、BIXをSK-N-SH細胞の培地に添加し、12時間後に tunicamycin を投与してERストレスをかけた。BIXを投与していない細胞では tunicamycin 投与36時間後より細胞死が観察されたが、BIX投与細胞では有意な細胞死の減少が観察された(図5)<sup>9)</sup>。

脳虚血はERストレスを惹起するので、BIXの効果を

検証する *in vivo* の実験系として、マウスの中大脳動脈閉塞(middle cerebral artery occlusion ; MCAO)モデルを採用した。MCAO24時間後の脳切片を作成し、TTC染色により脳梗塞部位の計測を行ったところ、脳室内にBIXを投与したマウスでは脳梗塞部位面積の有意な減少が認められ、特に梗塞周辺領域(penumbra)の減少が顕著であった(図6)<sup>9)</sup>。これらのことから、BIX投与は脳梗塞周辺領域 penumbra のERストレスを軽減し、それによるアポトーシスを抑制することで梗塞巣の増大を抑えることができることを示し、*in vivo* においてもBIXはERストレスによるアポトーシスに効果があることを示している。

#### IV おわりに

西村先生は脳水溶性蛋白が不溶化して水溶性分画から減少することが、ADをはじめとする神経変性のメカニズムであるとする脳水溶性蛋白減少仮説を世界に先駆けて提唱され、現在の異常蛋白凝集仮説へと引き継がれている。筆者らは、この異常蛋白凝集のメカニズムを解明するために、ERストレスの観点から研究を進め、治療法への応用も視野に入れつつある。この西村先生からの研究の流れをさらに発展すべく研究を進めていきたいと決意を新たにしている。西村先生のご冥福をお祈りいたします。

#### 文 献

- 1) 西村 健：老人脳の生化学。脳と神経 33：769-780, 1981
- 2) Katayama T, Imaizumi K, Sato N, et al：Presenilin-1 mutations downregulate the signalling pathway of the unfolded-protein response. Nat Cell Biolog 1：479-485, 1999
- 3) Katayama T, Imaizumi K, Honda A, et al：Disturbed activation of endoplasmic reticulum stress transducers by familial Alzheimer's disease-linked presenilin-1 mutations. J Biol Chem 276：43446-43454, 2001
- 4) Yasuda Y, Kudo T, Katayama T, et al：FAD-linked presenilin-1 mutants impede translation regulation under ER stress. Biochem Biophys Res Commun 296：313-318, 2002
- 5) Kudo T, Kanemoto S, Hara H, et al：A molecular chaperone inducer protects neurons from ER stress. Cell Death Differ 15：364-375, 2008



# タウの病理

大阪大学大学院医学系研究科情報統合医学講座精神医学講師  
田中稔久

## I はじめに

1906年に Alois Alzheimer は、現在われわれがアルツハイマー病 (Alzheimer's disease; AD) と呼ぶ病態脳の光学顕微鏡的観察を報告し、神経原線維変化 (neurofibrillary tangle; NFT) と老人斑 (原文では粟粒性病巣) の存在を指摘したが、それぞれの構成成分の正体が判明するまでには長い年月が必要であった<sup>1)</sup>。このような異常蓄積物を研究する経緯としては1960年代以降電子顕微鏡が医科学に応用されてから、NFTの超微形態が明らかにされた<sup>2)</sup>。それはあたかも直径10nmの線維が2本よじり合わさった二重螺旋線維の構造であり、paired helical filament (PHF) と呼ばれるようになった。しかし、PHFは高度の不溶性を示すことから生化学的解析は困難をきわめていた。当時普及してきた免疫学的検討からは、神経細胞骨格の1つである中間径線維ニューロフィラメントに対する抗体がNFTと反応するという報告がなされた<sup>3)</sup>。このニューロフィラメントは直径10nmであり、PHFの超微形態を説明しやすいものであった。当時 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) が研究に導入される以前より、大阪大学精神医学西村教室では故西村健先生・故播口之朗先生らにより AD 脳における蓄積蛋白およびそれに関与すると想定された細胞骨格蛋白の解析が行われていたが、蓄積蛋白の解明には至っていなかった。その後、ニューロフィラメントの重要性を考慮して、ニューロフィラメントの分解や、重合過程およびリン酸化によるその制御、脱リン酸化酵素によるリン酸化レベルの制御などに関する検討が行われていた<sup>4,5)</sup>。これらの検討は精製されたニューロフィラメントがPHFを再構成させる可能性を追求するために行われていたが、この考えは実現されなかった。ところで、PHFは不溶性であることを逆手に

とり、さまざまな可溶化剤にて不溶性成分を遠心にて集め、電子顕微鏡にて PHF の形態を確認しながら精製するというアプローチがいくつかの研究室で行われた。そして、精製 PHF を強行に可溶化して解析された結果、構成成分はタウ蛋白であることが判明した<sup>6,7)</sup>。精製 PHF を抗原として動物に投与して PHF に対する抗体を作成しこれをツールにして構成成分の解析も行われたが、これにはニューロフィラメントとタウの両方に反応する性質のものが存在した。興味深いことにニューロフィラメント H サブユニットとタウ蛋白にはともに Lys-Ser-Pro というアミノ酸配列が存在し、作成された抗体はこの中の Ser 残基がリン酸化されたエピトープを認識していたことが明らかにされた。

タウ蛋白は微小管付随蛋白の1つであり、チューリンが重合して微小管を構成する際の促進因子として機能するものであるが、どのようにして PHF に変換されるのかの機序はいまだ十分に明らかではない。しかし、タウ蛋白は前頭側頭型認知症 (frontotemporal dementia; FTD) や進行性核上性麻痺などにおいても病脳内における蓄積が確認され、さらに家族性 FTD の原因遺伝子としてタウ遺伝子が同定されるなど、神経変性疾患におけるタウ蛋白の重要性はますます増加し、タウ蛋白が細胞内に異常蓄積する神経変性疾患の総称としてタウオパチーが提唱された。本稿では、このタウの病理について概説する。

## II タウ蛋白とタウオパチー

タウ蛋白には6つのアイソフォームがあり、これらは単一の遺伝子から選択的スプライシングというメカニズムによって作り分けられている<sup>8)</sup>。リピーター微小管結合部位が3つあるアイソフォームと4つあるアイソフォームを総称してそれぞれ3リピータータウ、4リピー

トタウと呼ぶが、これはエクソン10が発現されるかどうかによって決まり、発達過程においては胎生期には3リピートタウのみが発現し成長するにしたがって4リピートタウも発現するようになることが知られている(図1)。

このタウ蛋白が異常に蓄積するタウオパチーにはAD、FTD(ピック病などを含む)、進行性核上性麻痺、大脳皮質基底核変性症、嗜銀顆粒性認知症(argyrophilic grain dementia, dementia with grains)といった孤発性の

の神経変性疾患などが存在する(表1)。また、前述のタウ遺伝子変異が原因となる遺伝性FTDはFTDP-17(frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17)と呼ばれている<sup>9)</sup>。

### III FTDP-17とタウ

FTDは前頭葉と側頭葉の限局性萎縮を伴う認知症疾患の総称であり、ピック病を含み、運動ニューロン疾患を合併する場合があることが知られている。このFTD

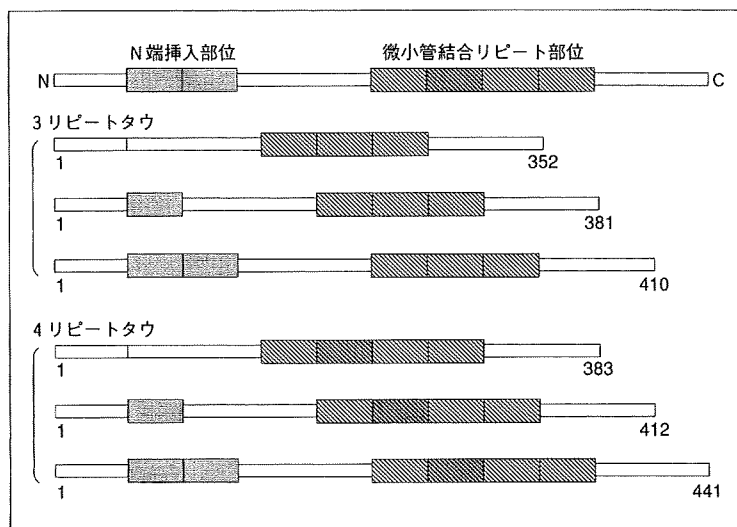


図1 タウ蛋白のアイソフォーム

表1 主なタウオパチーの性質

疾患名	主要なタウアイソフォーム	神経病理学的構造
FTDP-17(遺伝性)	4リピートあるいは両方(遺伝子変異により異なる)	NFT など
アルツハイマー病	3リピート, 4リピート	NFT
ピック病	3リピート	Pick body
進行性核上性麻痺	4リピート	NFT, glial coiled body, tuft-shaped astrocyte
大脳皮質基底核変性症	4リピート	glial coiled body, astrocytic plaque
嗜銀顆粒性認知症	4リピート	argyrophilic grain
石灰化を伴うびまん性NFT病	3リピート, 4リピート	NFT
ニーマンピック病(C型)	3リピート, 4リピート	globose tangle, flame-shaped tangle
亜急性硬化性全脳炎	3リピート, 4リピート	NFT, glial fibrillary tangle
Dementia pugilistica(ボクサー脳症)	3リピート, 4リピート	NFT

NFT : neurofibrillary tangle



の中には遺伝性を示すものがあり、17番染色体に関連するものはタウ遺伝子変異によって発症していることがHuttonらによって報告され、FTDP-17と呼ばれるようになった<sup>9)</sup>。FTDP-17の遺伝子変異はいくつかのタイプに分類されるが、興味深いのは第10-11エクソン間のイントロン内の変異および第10エクソン内の変異のいくつかにおいて引き起こされるものであり、タウ mRNAの選択的スプライシングのメカニズムに異常が生じて、4リピートタウが優勢に発現することである。3リピートタウと4リピートタウのバランスが崩れて4リピートタウのみとなることによって神経細胞死が誘導される可能性が考えられるのだが、微小管結合能および微小管重合能が高らかに高い4リピートタウの増加によって障害が惹起されるメカニズムの詳細は不明である。また、その他のエクソン内での変異によるアミノ酸置換ではタウ蛋白の微小管結合能および微小管重合能が低下することが示されており、これにより神経細胞障害が生じるものと推定される。病態過程の詳細を理解するには、微小管結合や微小管重合以外のタウ蛋白の機能を知ることが重要な課題になると考えられる。

#### IV アルツハイマー病とタウ

ADにおいてはNFTと老人斑が主要な病理学的変化であるが、NFTの局在には規則性があり、厳密には病気の進行に伴って、内嗅皮質が側頭葉新皮質に移行する部分(transentorhinal cortex)から、内嗅皮質、海馬のCA1からCA4、そして大脳皮質(II-III層、V層)へと出現する。神経細胞が死んでもNFTは残存し、これはextracellular tangleまたはghost tangleと呼ばれている。超微形態では直径約10 nmのフィラメント構造をとり約80 nmを周期に緩やかに規則的な凹凸があり、あたかも2本のフィラメントが互いにねじれてできたように見えるためPHFと呼ばれているのは、前述のとおりである。NFTの構成成分はリン酸化とユビキチン化を受けたタウ蛋白であるが、この中には3リピートと4リピート両方の6アイソフォームが含まれている。

#### V ピック病とタウ

ピック病とは、前頭葉・側頭葉に限局する業性萎縮の認められる認知症性疾患である。光学顕微鏡下において

は、萎縮部位の皮質表相(第II層と第III層の上半)優位の神経細胞脱落とニューロピルの海綿状変化が認められる。特徴的なものはピック嗜銀球の存在であるが、これは細胞核とはほぼ同じ大きさの境界鮮明なほぼ球状の小体であり、前頭葉・側頭葉の変性部位および海馬CA1、支脚、島回、帯状回、扁桃核などに出現する。ピック嗜銀球は免疫組織化学的には抗リン酸化タウ抗体、抗MAP2抗体、抗ニューロフィラメント(NF200)抗体に陽性である。ピック嗜銀球の超微形態としては直径15nmの直細管(ピック細管)と少数のpaired twisted profiles(直径13-26nm, 周期120nm)であり、不規則な方向に配列している。抗タウ蛋白抗体によるウエスタンブロットにおいては、55kDa, 64kDa, 69kDaの3本のバンドがある。ピック嗜銀球の主要構成成分は3リピートタウ蛋白が主体であるが、4リピートタウ蛋白が混在するピック病も報告されている。

#### VI 進行性核上性麻痺とタウ

進行性核上性麻痺とは、パーキンソニズムを中核症状とし下方視を含む核上性眼球運動障害が特徴的な疾患である。神経病理学的には、脳幹被蓋、特に橋被蓋の著明な萎縮と線維性グリオシスが特徴的である。NFTについては視床下核(ルイ体)、淡蒼球、黒質、動眼神経核、赤核、上丘、前視蓋野、中脳水道周囲灰白質、脳幹網様体、青斑核、橋核、小脳歯状核、下オリブ核などの主に脳幹の神経細胞内に糸屑の固まりのように見えるglobose tangleとして認められる。これらは免疫組織化学的には抗リン酸化タウ抗体、抗ユビキチン抗体に陽性である。Gallyas-Braak染色を行うと、神経細胞以外にもグリア細胞において嗜銀性構造物が染色されてくる。オリゴデンドロサイト内にはglial coiled body、アストロサイト内部にはtuft-shaped astrocyteと呼ばれるに嗜銀性異常構造物の存在が知られており、これも免疫組織学的に抗リン酸化タウ抗体陽性である。これらNFTおよびglial coiled bodyにおいては、超微形態として主として直径15nmのstraight tubuleが観察されている。この疾患の脳内不溶性タウ蛋白をイムノブロットにて検討すると、主に64kDaと69kDaの2本のバンドがみられ、4リピートタウ蛋白が主要構成成分であることが報告されている。

## VII 皮質基底核変性症とタウ

皮質基底核変性症は、巧緻運動の稚拙、肢節運動失行、パーキンソニズムが特徴的な認知症性疾患である。神経病理学的には、前頭葉前方部、前運動領、側頭葉後方部、左下前頭回弁蓋部に萎縮中心のある限局性萎縮が特徴である。光学顕微鏡下においては、大脳皮質では皮質表相(第Ⅱ層と第Ⅲ層)の海綿状態、神経細胞脱落、グリオーシスが認められ、また ballooned neuron は必ず認められる。また、黒質、淡蒼球にも病変が認められる。神経細胞内に NFT も認められるが、それよりも pretangle と呼ばれる Gallyas-Braak 染色または抗タウ抗体免疫染色にて顆粒状に染色される構造物が非常に多い。また、アストロサイト由来の astrocytic plaque、オリゴデンドログリア由来の argyrophilic thread や glial coiled body などと呼ばれる嗜銀性異常構造物の存在が知られている。これらは免疫組織学的に抗タウ抗体陽性である。argyrophilic thread はオリゴデンドログリアの突起抹消部分のミエリン鞘の inner loop と outer loop の異常構造物であり、glial coiled body はオリゴデンドログリアの細胞体部分の異常構造物である。これら NFT および glial coiled body においては、超微形態として主として直径15 nm の直細管と、直径10~20nm、周期120~150nm の長周期ねじれ細管が共存している。抗タウ蛋白抗体によるウエスタンブロットにおいては、64kDa、69kDa および 74kDa と 3本のバンドが認められ、皮質基底核変性症の神経細胞およびグリア細胞において蓄積するタウ蛋白は4リピートのタウ蛋白が主に含まれていることが報告されている。

## VIII 嗜銀顆粒性認知症とタウ

嗜銀顆粒性認知症とは、海馬から海馬傍回および扁桃核に嗜銀性の顆粒状異常構造物が多数観察され、かつ認知症を呈する疾患である。光学顕微鏡下においては、argyrophilic grain は小さな顆粒状、紡錘状の嗜銀性構造物であり、海馬支脚、内嗅皮質、海馬CA1、そして側頭葉皮質に出現する。また、扁桃核、視床下部外側隆起核に多い。argyrophilic grain のみられる部位では神経細胞脱落、グリオーシスが認められ、NFT は少なく、それよりも pretangle が多く認められる。Argyrophilic

grain の超微形態としては主として直径9~13nm の直細線維と直径25nm の直細管の束から構成されている。タウ蛋白アイソフォームの解析に関しては、3リピートタウ蛋白と4リピートタウ蛋白それぞれに特異的なモノクローナル抗体を用いた解析が行われ、argyrophilic grain を構成するタウ蛋白は主に4リピートタウ蛋白であることが報告されている。

## IX おわりに

タウオパチーには上記のものに加えて、石灰化を伴うびまん性 NFT 病、ニーマンピック病(C型)や、外因性の亜急性硬化性全脳炎、dementia pugilistica(ボクサー脳症)などもある。タウオパチーの疾患概念の理解を通して、神経変性による認知症の病態形成過程がより詳細にわかるようになりつつある。タウの場合、非AD型認知症の病態に多く関与していると同時に、遺伝性認知症の原因遺伝子でもあることから、認知症の病態過程を理解するための key molecule である位置は確立されている。

振り返って、故西村健先生は1991年よりタウ蛋白研究のリーダー的拠点の1つであった Khalid Iqbal 博士のもとへ筆者を含めて門下生を留学させ、国際的な交流を大切にしながら細胞骨格蛋白研究を進展させようとした。筆者も留学した者の1人であるが、継続して留学生を派遣する国際交流は後継の武田教室でも引き継がれ、計6名がIqbal博士のもとでの留学を経験した。筆者自身もこの留学の機会を与えていただき、大変感謝しております。故西村健先生は周期性精神病の生化学的解析のためノルウエーのGjessing教授のもとに留学されましたが<sup>10)</sup>、1991年にGjessing教授のもとへ久しぶりに表敬訪問をされた際には同行させていただいた。このときすでに老年精神医学の権威になられていた西村先生でしたが、過去に精神病に関する生化学的研究を行われ、極寒の地にて研究に没頭されていたことを伺い知ることができ、大変貴重な体験でした。西村先生の精神医学領域における幅広い御活躍を知り、後年の生化学研究の中心となった細胞骨格蛋白研究を発展的に継承する意義を改めて感じることができました。臨床教室における基礎医学的研究を地道に発展されながら、国際的な発展を目



認知症研究への貢献と到達点  
- 故西村健先生を偲んで -



指す西村先生の姿勢に敬服しております。そして、研究を行う精神科医である者の姿勢を絶えずお示しいただい

た故西村健先生に心より感謝すると同時に、謹んでご冥福をお祈り申し上げます。

文 献

- 1) Alzheimer A : Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg Zeitschr Psychiatr* 64 : 146-148, 1907
- 2) Terry RD : The fine structure of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 22 : 629-642, 1963
- 3) Anderton BH, Breinburg D, Downes MJ, et al : Monoclonal antibodies show that neurofibrillary tangles and neurofilaments share antigenic determinants. *Nature* 298 : 84-86, 1982
- 4) Angelides KJ, Smith KE, Takeda M : Assembly and exchange of intermediate filament proteins of neurons ; Neurofilaments are dynamic structures. *J Cell Biol* 108 : 1495-1506, 1988
- 5) Tanaka T, Takeda M, Niigawa H, et al : Phosphorylated neurofilament accumulation in neuronal perikarya by cyclosporin A injection in rat brain. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 15 : 77-87, 1993
- 6) Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Quinlan M, et al : Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem* 261 : 6084-6089, 1986
- 7) Ihara Y, Nukina N, Miura R, et al : Phosphorylated tau protein is integrated into paired helical filaments in Alzheimer's disease. *J Biochem* 99 : 1807-1810, 1986
- 8) Goedert M, Spillantini MG, Cairns NJ, et al : Tau proteins of Alzheimer paired helical filaments ; Abnormal phosphorylation of all six brain isoforms. *Neuron* 8 : 159-168, 1992
- 9) Hutton M, Lendon CL, Rizzu P, et al : Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* 393 : 702-705, 1998
- 10) Nishimura T, Gjessing LR : Failure to detect 3,4-dimethoxyphenylethylamine and bufotenine in the urine from a case of periodic catatonia. *Nature* 206 : 963-964, 1965

# アルツハイマー病診断治療新時代への 「アミロイドβ産生過程」と 「プレセニリンによる膜内蛋白分解」 研究の貢献

大阪大学大学院医学系研究科情報統合医学講座精神医学  
大河内正康(講師)・武田 雅俊(教授)

今回、西村健先生のご逝去にあたり思いがけず大阪大学精神医学教室で行われてきた幅広い精神医学領域の研究の中から「アルツハイマー病アミロイドβ産生とプレセニリンによる膜内蛋白分解研究」についてまとめることになり真に光栄に存じます。

## I 生化学研究室でのアルツハイマー病アミロイド研究の流れ

アルツハイマー病(Alzheimer's disease; AD)はご存知のとおり神経原線維変化(タングル)と老人斑(プラーク)という不溶性で鍍銀染色陽性の蓄積像を特徴とする神経変性疾患である。両者の違いはタングルが神経細胞内に起こるのに対し、プラークは細胞外にみられることである。「どちらがADの病理過程で重要か」という不毛ともいえる議論が学会でも展開されてきたが、重要なことは、教室では両者の研究が戦略的・総合的に西村健教授そしてそれを引き継がれた武田雅俊教授の指導のもと継続して実施されてきたことである。

まず教室で「アミロイドβ(Aβ)産生や膜内蛋白分解研究」が行われるようになった歴史的経緯について簡単に説明する。認知症研究が西村先生らの手で始まった当初は研究室のAD研究の主要標的は世界的なトレンドと同じく「神経細胞内の不溶性物質の蓄積」であり、「ニューロフィラメントなどの神経細胞の構造蛋白の関与やその集積の仕組みについて」研究が進められていた。しかし、筆者が大学で研修を終えて生化学研究室の大学院に進学した90年頃は、今から思うと学会全体から

みても生化学での研究の流れからみてもAD研究の過渡期だったようだ。当時の筆者の先輩のうち中村祐先生<sup>1)</sup>、田中稔久先生<sup>2)</sup>、谷向知先生<sup>3)</sup>らは上記の中心的課題であった「神経細胞内蓄積」についてオリジナリティー豊かな研究をされていた。なかでも筆者より1年前に進学された館林義孝先生<sup>4)</sup>は「患者皮膚線維芽細胞を材料にADでシグナル伝達異常がみられるのか」研究されており、事情はわからないながらも「どのような経緯関連でその研究をされているのか？」不思議に感じていた記憶がある。筆者はそのような状況のもと、入学させていただいた。そして直接指導を仰ぐことになった武田先生から「細胞外蓄積であるプラークの主要構成成分であることがわかったAβ」に関する研究テーマを与えられた。それは幸か不幸か当時急激に盛んになってきた研究分野で、世界中の多くの優秀な研究者が参入してきた分野であった。武田先生の当時のお考えの全貌は想像するに「[Aβはβアミロイド前駆体蛋白(β amyloid precursor protein; βAPP)が分解された一部分なのだが]、βAPPが血小板中に多量にあるという報告<sup>5)</sup>に目をつけ、「AD脳内で起こっている異常なAβ蓄積」を反映した仕組みが患者血小板内でも働いている可能性があるかもしれない。すなわち、患者血液からADの診断的根拠を得たり、患者血液でのβAPPの分解異常を調べることで病気の起こる仕組みがわかるのではないか」というものだった。この研究は今から考えると完遂するには、①技術的にも難しく、②証明しなければならないステップも多く、③また革新的ストーリーを説得力をもって展開せ



ねばならず、当時の筆者の能力では相当に困難な課題であったと思う。結局、大学院の4年間に実験科学の基礎の習得はもちろん、きわめて多くのことを学ばせていただいたが、奮闘虚しく失敗の連続のうえ教室への有意な貢献はできず、何とか卒業だけはさせていただいたというのが現実であった<sup>6)</sup>。一緒に生化研にきた車谷隆宏先生<sup>7)</sup>、関山敦生先生<sup>8)</sup>も虚血・グリア・*in situ* hybridization など各々今までの流れとは異なる一分野を任された。特に印象的だったのは2年後にこられた谷井久志先生<sup>9)</sup>に「悪性症候群モデルの開発」のテーマが与えられたことで、教室首脳陣の「研究領域の広範化戦略」を強く感じた記憶がある。教室の研究活動戦略の1つとして、この「できるかぎり広い分野をカバーする」という考えは基本方針の1つとして現在も受け継がれている。

## II 生化学研究室でのβAPP分解研究の萌芽

筆者は総説で自らの研究の実際について触れることはほとんどないというか皆無だが、今回はやむをえないのでお許しいただきたい。血小板中にはβAPPの細胞外部分すなわち分泌型APP(sAPP, 図1)と呼ばれるフラグメントが集積しており、刺激時に大量に放出される。筆者はまず「血小板からのsAPPの放出を同定・半定量するアッセイ系」を作成し、健常老人や孤発性AD患者、そして希少な家族性AD患者血液から分離した血小板からのsAPP分泌に何らかの「疾患に依存した変化」がないか検討した。しかし症例数を増やしても病気に関連した変化は認められなかった。さらに、血小板からのAβ分泌を同定しようとしたがこれもうまくいかなかった。

βAPPは膜貫通蛋白なのでsAPPが切り出された後もAβ部分を含んだC末端断片(CTF)スタック(図1)という残存部分が膜上に残存する。当時はAβの長さの違い、すなわち主要な分子種であるAβ40に比較したAβ42の量がADに関連するという考え方が出はじめたころであった。そこで次に「Aβがみえないなら、Aβが切り取られた後の細胞内に残るCTFであるAICD(APP intracellular domain, 当時はp7と呼んだ)のN末端をみようと考えた(図1)。なぜならそうすれば間接的にはあるが「Aβ42とAβ40がそれぞれどれくらい産生され

たかを見分けることができる」と考えたわけだ。そのため、βAPPの細胞内部分に対する特異抗体を作成しようということになった。抗体作成は医学生時代に微生物病研究所でお世話になった東隆親先生(当時名古屋市立大学医学部)にご指導いただきせせと努力した。しかし、結局精魂込めて作成した単クローン抗体はすべて「ある方法ではAICDを確かに認識するが、その他のいくつかの方法でうまくそれを認識しているかどうか証明できない」性質であった。しかし、その性質のはっきりしないそれらの抗体を用いて各種実験を実施したため、結局「結果の蓋然性や重要性に確信をもてない」まま学位論文をまとめなければならず大変苦労した。しかし、最終的に西村先生がその結果を学位に値するとお考えくださり卒業させていただいたわけである<sup>6)</sup>。

この件には後日談がある。当時、筆者がその責任を果たせなかった「AICDのN末端決定」について、2001年にそれが「予想されたAβのC末端とは異なる別の膜内部分で切断されて産生される」ことがセンセーショナルに報告された<sup>10)-12)</sup>(図1)。筆者は当時ドイツのハース教授のもとへの留学から帰ってきたばかりだったが、学会に来日した彼に「内緒の話だが……」と耳打ちされ

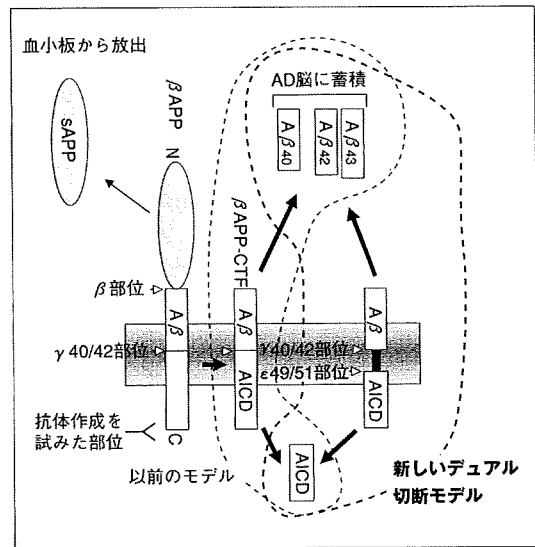


図1 βAPPの膜内蛋白分解の仕組み—その理解の変遷

て、「昔のこととはいえ『これは切腹ものだ!』と自らの実力のなさを思い知った苦い記憶がある。ただ言い訳をさせてもらえば、筆者はドイツから帰国する数ヵ月前から「A $\beta$  以外にもそれと似たようなペプチドは体内で産生されているのではないか?」と考え、そういう物質の探索を目的にハース研から引き上げに際してさまざまな実験材料の分与を受けた。そしてその後「 $\beta$ APP から A $\beta$  を作り出す仕組み」が他の蛋白質でも働いていることを、N $\beta$  と名づけた新規ペプチドが Notch-1 受容体分子から A $\beta$  と同じような仕組みで切り出されることを示し証明した。筆者らは N $\beta$  や A $\beta$  のようなペプチドを概念的に捉え、「A $\beta$  様ペプチド」と名づけた<sup>13)</sup>(図 2)。このとき、「Notch の AICD に相当する部分 [NICD (Notch intracellular domain)]」の切断と「N $\beta$  部分」の産生が図らずも異なる部位での切断で起こっていることを発見したわけで、「ICD の N 末端」と「A $\beta$  様ペプチドの C 末端」とは一般的に異なる蛋白分解であることを証明し、この不思議な膜内蛋白分解の仕組みを「デュアル切断メカニズム」と名づけた<sup>13)</sup>(図 2)。

### III 生化学研究室でのプレセニリン研究の萌芽と小胞体ストレス研究への発展

結局、筆者以降に A $\beta$  や  $\beta$ APP の膜内蛋白分解を主要なテーマとして与えられた大学院生はおらず、卒業後は教室で得た基礎のうえに森啓教授(当時東京都精神医学総合研究所)<sup>14)15)</sup>やドイツのハース教授(ミュンヘン大

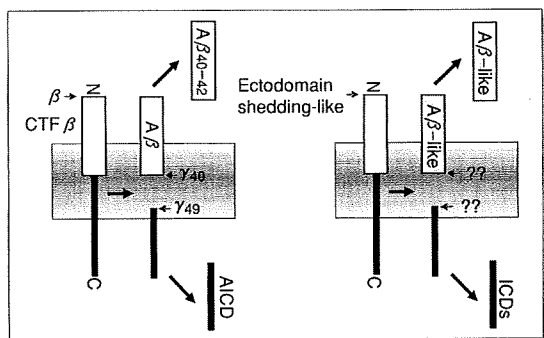


図 2 「A $\beta$  様ペプチド」の概念とその分泌の仕組み (Okochi M, et al, EMBO J, 2002 より引用)

学医学部)<sup>16)17)</sup>のご指導を受け 5 年半ほどの間研究室を留守にすることになった。その間の 1995 年に AD 研究にとって非常に重要な発見、すなわち「プレセニリンという膜蛋白の病原性変異が家族性 AD の発症に関与する」ことが明らかになった<sup>18)</sup>。教室でも工藤喬先生や谷向仁先生はいち早くこの蛋白に対する抗体を作成し虚血との関連を検討し<sup>19)</sup>、さらに中野有香先生<sup>20)</sup>はすぐに阪大でみつかったこの遺伝子の変異を導入した遺伝子改変マウスを作成し、確かに脳内の A $\beta$ 42 が増大していることを明らかにされた。少し後から教室に加わられることになった紙野晃人先生らは、プレセニリン遺伝子の発表とほぼ同時に日本人の AD 家系にプレセニリン変異があること<sup>21)</sup>などを発表された。その後精神科(武田研)と第一解剖(遠山研)が共同してプレセニリンの作用を介して AD に小胞体(endoplasmic reticulum; ER)ストレスが関与するという画期的な論文を発表された<sup>22)</sup>が、この展開は中心的役割を果たされた工藤先生の稿に譲らせていただく。

### IV 生化学研究室での A $\beta$ 42 産生メカニズム解析とその診断治療薬開発への応用

筆者が帰国後 AD 研究を含めて医学研究全体が徐々に「病気の仕組みの解析」から、「診断治療薬開発」つまりトランスレーショナル・リサーチに焦点が移っていった。帰国後、病院勤めをしながら「A $\beta$  産生やプレセニリンによる膜内蛋白分解」を研究する小さなグループを立ち上げた。「1 年ぐらいいは留学の貯金でやっていけても、その後は臨床との兼業で世界についていくのは難しい」と武田先生と話したことを覚えている。しかし、上記のように 1 年ほど研究したところで幸運がめぐってき、驚くべきことに筆者が予想したとおりの「A $\beta$  様ペプチド」がどうやら自然界に存在するらしいことがわかった<sup>13)23)</sup>(図 2)。同時に発見したプレセニリンの膜内蛋白分解の仕組みである「デュアル切断メカニズム」も脚光を浴びることになった<sup>13)</sup>(図 2, 3)。重要なことは、上記の N $\beta$  をみつけた瞬間に「脳内に A $\beta$  とは違う A $\beta$  様ペプチドをみつければ診断薬として使用でき、治療薬開発にも応用できる」ことに気づいたことだ。この N $\beta$  に関しては途中で三重大学に移られた谷井先生も大変興

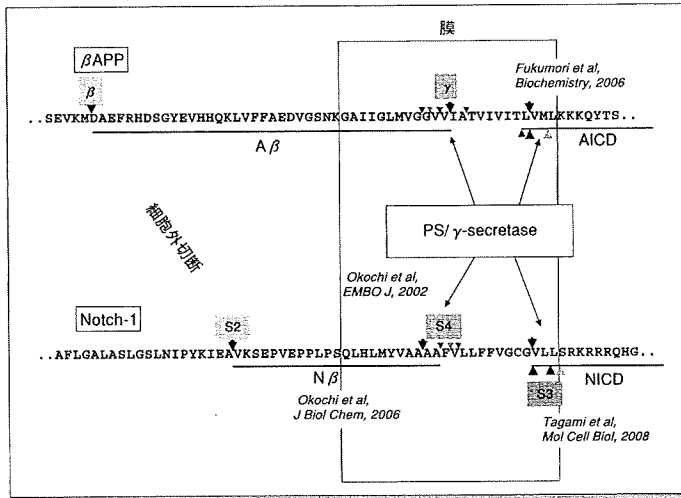


図3 βAPPとNotchの膜内蛋白分解の概観

味をもって一緒に研究されたことを特に付け加えない<sup>24)</sup>。

そして、その頃から筆者は「学会では『プレセニン』、『γセクレターゼ』や『βセクレターゼ』、さらには『Aβ産生や分解』が注目されているが、AD研究という医学的見地からみると実は『Aβ42だけが重要』であって、『主要なAβ40は重要ではない!』のではないかと考えるようになった。その信念に従って、グループの研究の焦点を「Aβを産生するプレセニン/γセクレターゼの作用」そのものではなく、その中でAβ42を産生する「γ切断のうちの1つの切断」に当てていくように変貌させようと考えた。言い換えれば、そのような「Aβ42に標的を狭めた仕組みを解明」しなければ、どこまで行っても得られる結果は「生物学者としての成果」であって、「医学者として納得のいく成果は得られない」と察知したのである。このときから、学会の流れとは少し距離を置いて個人的直感から徐々にグループ全体の研究プロジェクトが「Aβ産生の仕組みではなくAβ42の産生の仕組み」にシフトさせていっている。

さて、Nβの発見に際して、「ノーベル賞をとられた田中耕一博士のレーザーを当てる形式の質量分析装置(MALDI-TOF/MS)」を使うと抗体で免疫沈降したAβやAβ様ペプチドが簡単に分子レベルで同定・半定量で

きることを発見したことは、その後、「Aβ40とAβ42の産生に分かれ目となる微妙な蛋白分解部位の違いの認識」についての分野で教室が世界をリードする基礎的技術となった(図3)。2002年のNβの発見からしばらく時間がかかったが2006年に重要な2つの報告を発表した。まずそのうちの1つで、われわれは「Aβ42産生」が「Nβのうちの長さの長いNβ25」という分子種の産生とパラレルに変化する、つまり「AβのうちADに重要なAβ42の産生」を反映したサロゲートマーカーが脳内に実在する可能性を示唆した<sup>25)</sup>(図3)。第2にわれわれは「Aβが産生された後細胞内に残るAICDにもAβ40とAβ42のような切り分けがあ

る」ことをみつけ、さらにそれら各部位での切断の割合は「プレセニン・βAPPの変異や薬剤の添加などの外来性の要素なしに変化する」ことを示した<sup>26)</sup>(図3)。さらに、2008年には「Notchシグナル伝達の細胞内シグナリング分子であるNICD」にも同様の切断のパラエティーにより、複数の種類が存在し、そのことがシグナル伝達機能の強弱に関連していることを示した(図3)。つまり、「Aβ42を作る仕組み」言い換えれば「膜内蛋白分解のもつ切断部位の奇妙な多様性」はADという病気の原因となるだけではなく、発生の過程で重要な生理的機能の一端を担っているらしいのだ<sup>26)</sup>。これらのわれわれ自身の実験結果から考えると、当時も今も学界では非常識かもしれないが、「人間の体の中にAβを作るに際して『Aβ42というADの原因となる1分子種を産生する割合を調節する仕組み』がある」、そしてわれわれは「その未知の仕組みの働きの結果を観察している」とみるのが一番素直な解釈ではないかと考えた。この2つの考え方はわれわれが提唱する「ADの診断薬開発、新規治療薬開発」の基礎的実験的事実となっている。すなわち、予期診断薬として「まず、蓄積しやすく末梢での量がその脳内の量を反映しないAβ42ではなく、それと同じ仕組みで産生され脳内に蓄積することのないAβ様ペプチドを探し出す。そして、そのAβ様ペプチドのいくつ

かの分子種のうち、A $\beta$ 42やN $\beta$ 25のように長さの長い分子種を測定すれば、病気を発症する前、さらに脳内にA $\beta$ が蓄積するまだ前に、A $\beta$ 42が脳内で蓄積しつつある状態を捉えることができるのではないかと(図4)」。そして治療薬開発としては、学会の常識では存在しないことになっている「A $\beta$ 42の産生を調節する内因性の仕組み」を世界に先駆けて発見しその働きの仕組みを明らかにしていくことで、新規でより正確かつ直接的な治療薬開発標的をみつけだそうと考えている。

高齢化の現状では世界的にできるかぎり早期の新規治療薬の開発が求められており、われわれのオリジナルな標的ではないが、「A $\beta$ 42を標的としてA $\beta$ 40を標的としない」、すなわち「A $\beta$ 42の産生を特異的に下げる」薬剤である $\gamma$ セクレターゼ修飾薬の開発を実施中である。この開発研究は医薬基盤研究所からの委託研究として、われわれのアッセイ系を塩野義製薬に提供することで共同実施している。塩野義製薬の伊藤尚弘氏はその過程で出てきた特殊な薬剤を用いて「 $\beta$ APPの分解を阻害しなくても『基質を酵素から遠ざける』ことによりA $\beta$ 産生を減少させることができる」ことを明らかにした<sup>27)</sup>。

次の大きな技術的ブレークスルーはLC/MS/MS型の質量分析器を用いたきわめて高精度の微量物質定量システムが確立できたことだ。よくある抗体を用いたELISA法などと比較すると圧倒的に信頼度・精度が高く、微量な物質の系統的同定と定量が可能である。

われわれは残念ながら「最初に同定した延長型A $\beta$ 様ペプチド」であるN $\beta$ 25を脳内にみつけることができなかった。そのため止むなく次の手段として、 $\beta$ APPや

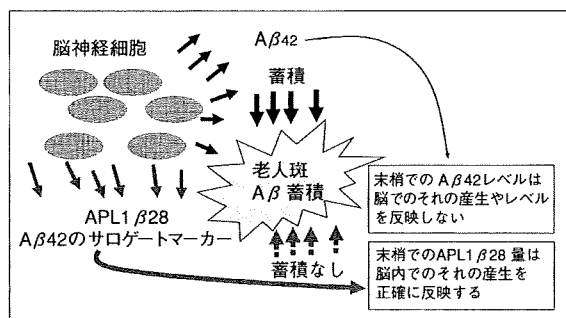


図4 A $\beta$ 42のサロゲートマーカーを測定するとA $\beta$ 42の産生量が推測できる

Notch1以外のさまざまな $\gamma$ セクレターゼの基質について徹底的に「A $\beta$ 様ペプチドの分泌の有無」を検討した。最終的にAPLP1由来のAPL1 $\beta$ 28をヒト脳脊髄液(cerebrospinal fluid; CSF)中に発見することに成功したので、これと上記の「微量物質定量システム」の技術革新を併せて大きな仕事にまとめることができた<sup>28)</sup>(図5)。つまり、われわれは予期診断薬として、「まず、蓄積しやすく末梢での量はその脳内での量を反映しないA $\beta$ 42と同じ仕組みで産生され(図5)脳内に蓄積することのないA $\beta$ 様ペプチド(図4)であるAPL1 $\beta$ 28を発見した。そして、ヒトCSF中でその量を測定したところ、「臨床的にADの診断基準を満たさない軽度認知機能障害(mild cognitive impairment; MCI)患者」のうち数年後にADを発症した方のCSF中ですでにその値が上昇していることを見つけた。つまり、たとえば「今筆者の脳内でA $\beta$ 42の産生が増えて濃度が上がり蓄積を始めているかどうか?」、「10年、20年後に発症するような状況

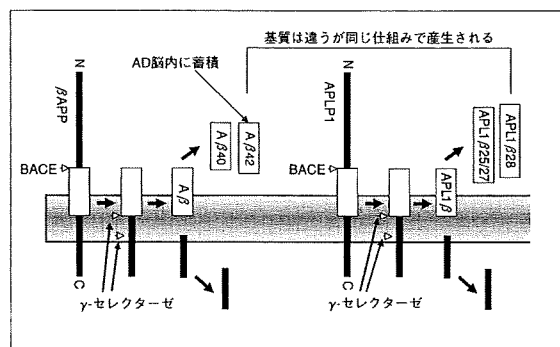


図5 A $\beta$ 42のサロゲートマーカーであるAPL1 $\beta$ 28の産生機序

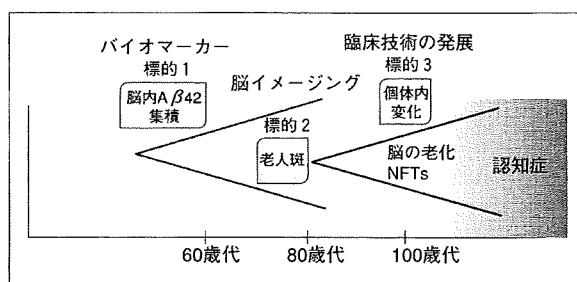


図6 アルツハイマー病バイオマーカーは病気の診断ではなく将来の発症予測に役立つ



が脳内で生じているか?」, 脳内でトラップされてしまっ  
てその値から判断できない Aβ42に代わって APL1β28  
の値から推測できる(図6)。

V 生化学研究室での Aβ42  
産生メカニズム解析と  
診断治療薬開発の今後の展開

治療薬開発では塩野義製薬・加藤晃氏, 阪口岳氏を中心とした多くの方々の方々の努力の結果, われわれの先進的な  
アッセイシステムと製薬企業の巨大な薬剤ライブラリー  
の2つが合わさり, 現在, ヒトでの臨床治験が可能な薬  
剤の開発を目指して日々研究が進められている。またグ  
ループでは総力をあげて「Aβ42の産生を調節する内因  
性の仕組み」に関与する物質を見つけ, その作用を証明  
しようと日々努力が重ねられている。

現在開発中の抗AD薬は, 病気の進行を根本的に止  
めてしまおうという考え方に基づいている。だから, でき  
るだけ早期につまりできれば病気が発症する前に投与  
すべき対象を抽出する必要がある。つまり, 薬剤は早期  
または予期的診断とセットで開発しなければその効果が  
十分に発揮できない。たとえば筆者が「50歳で20年後に  
ADになりますから服薬しましょう」と指導されたとする。  
想像するにそのとき筆者がその予防的服薬を受け入れ  
るためには, 相当説得力のある根拠が必要と思う。いわ  
ゆる「発症リスク」ではなく実際に「脳内にAβの蓄積  
があることをアミロイドイメージングで可視化する」  
とか, 今回われわれが示したように実際に「Aβ42が刻  
一刻と脳内に蓄積しつつある」証拠(図6)をみせなければ,  
実際に服薬するだろうか?。

われわれの押し進める研究の結果, 「Aβ42の産生割合

が上昇して10年以上経過していく間にAβ42の蓄積が脳  
内に起こり, やがて細胞内蓄積が起こり細胞死が招来さ  
れる」とADの病理過程が理解できるようになってき  
た。われわれの考える早期診断治療戦略では「APL1β28  
というペプチド量の測定でその根拠を提示し, そのうえ  
で『その根本原因であるAβ42の産生』を減少させる薬  
剤を服用してもらう」ように現在は考えている。

紙面の限度と話の流れの関係でここに名前が出なかつ  
たAβやプレセニリンに関する研究成果を発表された教  
室の先生方にお詫びいたします。またグループの研究に  
ついては関連した方々のお名前を省略いたしました。こ  
こに, 懸命に実際に試験管を振って実験を遂行してい  
ただいた方々を年代順に辻ゆみさん, 福森亮雄先生, 谷井  
久志先生, 藤井(堀之内)加奈さん, 姜経緯先生, 田上真  
次先生, 生田亜希子先生, 木村亮先生, 伊藤尚弘さん,  
中山泰介博士, 柳田寛太先生, 小栗崇史博士, 桂芳子博  
士, 森康治先生, 田坂志都子さん, 金玉粉博士, 西富晃  
平さん, 早瀬稔博士, 上元大介さん, 辰巳真一さん, 児  
玉高志博士であることを申し上げます。

最後に, 西村健先生が長い闘病生活の末亡くなられま  
した。皆様同様わかっていたこととはいえ深い悲しみに  
沈みました。大学院生時代に西村先生からいただいた愛  
情のこもった, しかし深く厳しいお言葉と気高い理想が  
懐かしく思い出されます。それら諸々に悩んだ日々も今  
では「それこそ教室の誇るべき伝統教育であった」こと  
がわかる年齢になってしまいました。今となっては, 武  
田教授のもとで「1人でも多くの有意の若者がこの得が  
たい教育を経験し素晴らしい伝統を引き継ぐ」手伝いを  
現場でさせていただくことが使命と思っています(了)。

文 献

- 1) Nakamura Y, Takeda M, Aimoto S, et al: Assembly regulatory domain of glial fibrillary acidic protein. A single phosphorylation diminishes its assembly-accelerating property. *J Biol Chem* 267: 23269-23274, 1992
- 2) Tanaka T, Takeda M, Niigawa H, et al: Phosphorylated neurofilament accumulation in neuronal perikarya by cyclosporin A injection in rat brain. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 15: 77-87, 1993
- 3) Takeda M, Nishimura T, Kudo T, et al: Buffy coat from families of Alzheimer's disease patients produces intracytoplasmic neurofilament accumulation in hamster brain. *Brain Res* 551: 319-321, 1991
- 4) Tatebayashi Y, Takeda M, Kashiwagi Y, et al: Cell-cycle-dependent abnormal calcium response in fibroblasts from patients with familial Alzheimer's disease. *Dementia* 6: 9-16, 1995
- 5) Cole GM, Galasko D, Shapiro IP, et al: Stimulated platelets release amyloid beta-protein precursor. *Biochem Biophys Res*

Commun 170 : 288-295, 1990

- 6) 大河内正康 : アルツハイマー病脳におけるアミロイド前駆体蛋白 C 末端部分エピトープの異常蓄積について. 老年精医 6 : 877-892, 1995
- 7) Kurumatani T, Kudo T, Ikura Y, et al : White matter changes in the gerbil brain under chronic cerebral hypoperfusion. Stroke 29 : 1058-1062, 1998
- 8) Sekiyama A, Ueda H, Kashiwamura S, et al : A stress-induced, superoxide-mediated caspase-1 activation pathway causes plasma IL-18 upregulation. Immunity 22 : 669-677, 2005
- 9) Tani H, Taniguchi N, Niigawa H, et al : Development of an animal model for neuroleptic malignant syndrome ; Heat-exposed rabbits with haloperidol and atropine administration exhibit increased muscle activity, hyperthermia, and high serum creatine phosphokinase level. Brain Res 743 : 263-270, 1996
- 10) Gu Y, Misonou H, Sato T, et al : Distinct intramembrane cleavage of the beta-amyloid precursor protein family resembling gamma-secretase-like cleavage of Notch. J Biol Chem 276 : 35235-35238, 2001
- 11) Sastre M, Steiner H, Fuchs K, et al : Presenilin-dependent gamma-secretase processing of beta-amyloid precursor protein at a site corresponding to the S3 cleavage of Notch. EMBO Rep 2 : 835-841, 2001
- 12) Weidemann A, Eggert S, Reinhard FB, et al : A novel epsilon-cleavage within the transmembrane domain of the Alzheimer amyloid precursor protein demonstrates homology with Notch processing. Biochemistry 41 : 2825-2835, 2002
- 13) Okochi M, Steiner H, Fukumori A, et al : Presenilins mediate a dual intramembraneous gamma-secretase cleavage of Notch-1. Embo J 21 : 5408-5416, 2002
- 14) Okochi M, Ishii K, Usami M, et al : Proteolytic processing of presenilin-1 (PS-1) is not associated with Alzheimer's disease with or without PS-1 mutations. FEBS Lett 418 : 162-166, 1997
- 15) Okochi M, Sahara N, Kametani F, et al : Presenilin 1 cleavage is a universal event in human organs. Neurobiol Aging 19 : S3-S10, 1998
- 16) Okochi M, Walter J, Koyama A, et al : Constitutive phosphorylation of the Parkinson's disease associated alpha-synuclein. J Biol Chem 275 : 390-397, 2000
- 17) Okochi M, Eimer S, Bottcher A, et al : A loss of function mutant of the presenilin homologue SEL-12 undergoes aberrant endoproteolysis in Caenorhabditis elegans and increases abeta 42 generation in human cells. J Biol Chem 275 : 40925-40932, 2000
- 18) Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, et al : Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. Nature 375 : 754-760, 1995
- 19) Tanimukai H, Imaizumi K, Kudo T, et al : Alzheimer-associated presenilin-1 gene is induced in gerbil hippocampus after transient ischemia. Brain Res Mol Brain Res 54 : 212-218, 1998
- 20) Nakano Y, Kondoh G, Kudo T, et al : Accumulation of murine amyloid beta42 in a gene-dosage-dependent manner in PS1 'knock-in' mice. Eur J Neurosci 11 : 2577-2581, 1999
- 21) Kamino K, Sato S, Sakaki Y, et al : Three different mutations of presenilin 1 gene in early-onset Alzheimer's disease families. Neurosci Lett 208 : 195-198, 1996
- 22) Katayama T, Imaizumi K, Sato N, et al : Presenilin-1 mutations downregulate the signalling pathway of the unfolded-protein response. Nat Cell Biol 1 : 479-485, 1999
- 23) Okochi M, Fukumori A, Jiang J, et al : Secretion of the Notch-1 Abeta-like peptide during Notch signaling. J Biol Chem 281 : 7890-7898, 2006
- 24) Tani H, Jiang J, Fukumori A, et al : Effect of valine on the efficiency and precision at S4 cleavage of the Notch-1 transmembrane domain. J Neurosci Res 84 : 918-925, 2006
- 25) Fukumori A, Okochi M, Tagami S, et al : Presenilin-dependent gamma-secretase on plasma membrane and endosomes is functionally distinct. Biochemistry 45 : 4907-4914, 2006
- 26) Tagami S, Okochi M, Yanagida K, et al : Regulation of Notch signaling by dynamic changes in the precision of S3 cleavage of Notch-1. Mol Cell Biol 28 : 165-176, 2008
- 27) Itoh N, Okochi M, Tagami S, et al : Destruin E decreases beta-amyloid generation by reducing colocalization of beta-amyloid-cleaving enzyme 1 and beta-amyloid protein precursor. Neurodegenerative Dis 4 : 2009 Sep 9 [Epub ahead of print]
- 28) Yanagida K, Okochi M, Tagami S, et al : The 28-amino acid form of an APLP1-derived Aβ-like peptide is a surrogate marker for Aβ42 production in the central nervous system. EMBO Mol Med 1 : 223-235, 2009





# 認知症のMEG研究の最新知見

大阪大学大学院医学系研究科情報統合医学講座精神医学  
河崎会水間病院\*

石井良平・栗本 龍\*・池澤浩二・Leonides Canuet・疇地道代  
岩瀬真生(講師)・高橋秀俊・中鉢貴行・数井裕光(講師)・武田雅俊(教授)

## I はじめに

先進各国における高齢化社会の本格化に伴い、発症率が上昇の一途をたどっているアルツハイマー病(Alzheimer's disease; AD)に対して、効果的な治療法の開発と早期診断法の確立という社会的要請が高まっている。近年、本企画の他稿でも紹介されているようにADの分子生物学的研究が急激に進んだ結果、AD患者の血清、髄液、あるいは遺伝子から数多くのバイオマーカーの候補が発見されている。

一方で、CT、MRI、SPECT、PETなどの脳形態・機能画像法と並んで、脳波(electroencephalography; EEG)は、認知症の補助的な非侵襲的診断法として、現在広く臨床に用いられている。一般にAD患者のEEGでは、基礎律動を形成する $\alpha$ 波の徐波化、振幅減少、周期的振動変化(waxing and waning)の減少、基礎律動の全般化などに加えて、徐波の出現、速波の減少、律動形成の不規則化などの知見が報告されている<sup>1)</sup>。脳磁図(magnetoencephalography; MEG)もEEG同様に脳細胞の電気活動を捉える検査であるが、EEGに比して高い空間分解能をもち、また速波成分を検出するのに適するという利点をもつ。しかし、その高額な装置や維持費の問題のため、MEGはEEGほどには普及しておらず、認知症への応用を試みた研究も限定的なものにとどまっている。

今日までに発表されたADのMEG研究では、基本的にはEEGと同様の変化が観察されるが、MEGの優れた時間・空間分解能を活かして、安静時あるいは認知課題施行中にある特定の周波数の局在を解析したものも散見される。また近年ADの前段階として軽度認知障害(mild cognitive impairment; MCI)という概念が提唱さ

れ、電気生理学的にはEEGを用いての研究が盛んに行われているが、MEGを用いた研究はさほど多くないのが現状である。また解析法としては、周波数解析、相関解析などの時系列解析や、等価電流双極子法(ダイポール法)、ミニマムノルム法、空間フィルタ法などの電流源推定法が用いられている。本稿ではこれらの先行研究に加えて、われわれの結果も紹介したい。

## II アルツハイマー病、軽度認知障害(MCI)に関する先行研究

ADに関する最初のMEG研究は、聴覚刺激による誘発脳磁場研究として行われた。1996年、フィンランドのPekkonenらのグループは、AD 11人、健康高齢者(normal control; NC) 11人を対象として、P50m、N100m成分をダイポール法を用いて解析した。その結果、AD患者では聴覚刺激と同側の聴覚野でP50m、N100mの潜時が延長したが、対側の聴覚野ではそういった潜時の延長が認められなかったことから、彼らはAD患者で左右の聴覚情報の並行処理が障害されている可能性を示唆している<sup>2)</sup>。次に行われたのがオランダのvan Dijkらによる自発脳磁場研究で、AD 5人、NC 5人のMEGをチャンネルごとに周波数解析し、ADでは前頭部や中央部を最大とする全般性の徐波を認め、後頭部や側頭部での高い周波数活動の低下を報告している。

ADに関する研究論文の中で多数を占めるのが、スペインのMaestuとFernandezらのグループによるものである。彼らはADの自発脳磁場と誘発脳磁場に対して、ダイポール法を応用したダイポール密度解析(dipole density analysis)を用いて解析し報告している。安静閉眼時のMEG測定を15人のAD群と19人のNC群に対して行い、ダイポール密度解析を用いた結果、頭頂部や側

頭部で  $\delta$ ,  $\theta$  活動のダイポール密度が増加すると報告している<sup>3)</sup>。また, Sternberg's task という短期記憶課題中の MEG では, AD 患者において全周波数帯域におけるダイポール密度が頭頂部や側頭部で低下するという報告<sup>4)</sup>や, 老年期うつ病患者10人を加えた解析で AD 患者でのみ左側頭部でダイポール密度の減少, 右側頭部では増加を認めたという報告もある。他の脳画像法との組み合わせでは, MRI の体積測定法(volumetry)で認めた AD 患者における左海馬の体積減少が, 左側頭部の  $\delta$ ・ $\theta$  活動のダイポール密度と有意に相関すること<sup>5)</sup>や, 磁気共鳴分光法(magnetic resonance spectroscopy; MRS)と MEG のダイポール密度解析を組み合わせると, AD 群の鑑別の感度, 特異度が良好になると報告している<sup>6)</sup>。2006年には AD 患者の安静閉眼時の MEG を周波数解析し, AD と NC の鑑別には,  $\delta$  活動以外に16~28 Hz 帯域の  $\beta$  活動も有効であると結論づけている。彼らは MCI についても研究を行っているが, 2005年には AD, MCI, NC 群の間で, 平均周波数に差があることを報告した<sup>7)</sup>。また, 2006年には MCI 患者を左頭頂部の  $\delta$  活動の双極子が多い群と少ない群に二分し, 多い群のほうが AD に進展しやすかったとの報告や, 短期記憶課題施行中に海馬に観察されたダイポールが少なかった NC 群は2年後に MCI になりやすかったと報告している<sup>8)</sup>。これは認知症の MEG 研究では, 初めて経過観察を行ったものだが, ただ MEG で海馬の活動を捉えられるのかという疑問が残る。2008年には, MCI, NC 群に対して短期記憶課題施行中に測定された MEG データをミニマムノルム法で解析し, MCI 群における脳内の腹側経路(腹側前頭前野, 中側頭回, 側頭葉内側面)での代償的な活性化を報告している。

### III われわれの取り組み

$\alpha$  波などの律動活動や, 記憶課題などの高次の情報処理を担う脳活動を描出する場合, 脳内の各領域はより広がりをもって活動していると考えられる。このような場合には, 脳活動の発生源を一点に集約して求めるダイポール法よりも, 電流源の領域的な分布として求める領域的推定法が, より脳活動の実態に近い結果を得られるのではないかと考えられる。この領域的推定法には, ミニマムノルム法や LORETA(low resolution brain electro-

magnetic tomography)法, 空間フィルタ法といったいくつかの方法が提案されており, 臨床応用も始まっている。領域的推定法を用いた AD と MCI の MEG 研究としては, 先述の Maestu らの短期記憶課題施行時の MEG 解析がある。

われわれは早期の AD 群13人と MCI 群13人, NC 群14人において, 空間フィルタ法の一種である BESA<sup>®</sup>(Brain Electrical Source Analysis, ドイツ・MEGIS Software 社)の MSBF 法(multiple source beamformer)を用いて, 開眼時と閉眼時の基礎律動の MEG を差分して解析し, さらに BrainVoyager<sup>™</sup> QX を用いて標準脳化し, 各群の間で群間比較を行った。その結果, NC 群に比して早期の AD 群において  $\alpha$  帯域活動(8~15Hz)の両側前頭葉の広い領域に偏位を認めたが, MCI 群では認めなかった(図1参照)<sup>9)</sup>。AD 患者における脳活動の前方偏位は, いくつかの EEG による研究で報告されているが, その臨床的意義は明らかではない。今回, MCI 群ではみられない基礎律動の前方偏位が早期の AD 群でみられたことから, MCI から AD への進行過程において, 安静閉眼時の前頭葉活動の低下が関与する可能性が示唆された。また, 開閉眼は臨床 EEG の測定でルーチンに行われているタスクで, 基礎律動の振幅, 周波数, 分布に加えて, 開眼時の基礎律動の抑制や閉眼時の再活性化などから, 全般的な脳機能の状態を判定することができる。このことから, 今回の課題と解析法が, 認知機能障害のために複雑な認知課題に取り組みにくいような AD を含む精神神経疾患患者にも簡単に応用できることが示された。

また, 記憶課題として Sternberg's task を施行中の早期の AD 群と NC 群の MEG を測定し, 同様の方法で解析した。その結果, NC 群では記憶課題提示後のベータ帯域(15~30Hz)の事象関連脱同期(event-related desynchronization; ERD)が両側前頭葉で広汎に認められたが, AD 群では左中下前頭回でわずかに認めただけであった。この2群を統計的に差分した結果, 右中前頭回を含む広汎な右前頭葉, および左中前頭回において  $\beta$  帯域の ERD が有意に低下していた<sup>10)</sup>。ワーキングメモリとの関連が指摘されている中前頭回において  $\beta$  帯域の ERD に差がみられたことは, NC と比べて AD 患者でワーキングメモリ機能の障害が中前頭回の活動低下と

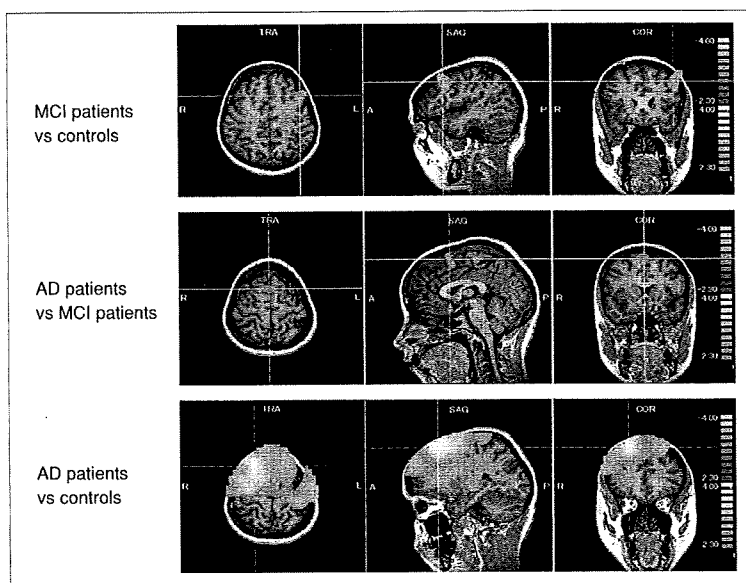


図1 BESA®-BrainVoyager™ QX 法による NC, MCI, AD 3 群間での開閉眼時の事象  
 関連同期活動の差分結果 (巻頭グラビアページ参照)  
 $t > 2.30$ ,  $p < 0.05$ .

(文献9)より引用)

関連していることを示唆している。

#### IV まどめ

認知症の MEG 研究の分野においては、周波数解析、ダイポール解析が現在も主流であり、空間フィルタ法や MCE (minimum current estimation) 法などの領域的推定法による解析はほとんど見受けられない。今後はこのような新しい解析法を用いた認知症・MCI 研究が増加してくるものと思われる。また認知症や MCI の電気生理学的特徴から、これまで徐波成分を解析した報告が多いが、EEG に比べ速波成分の検出に優れるという MEG の特性を考えれば、認知症・MCI についても今後  $\beta$  あるいは  $\gamma$  帯域といった速波帯域の解析が進んでいくものと思われる。臨床的に MCI は、あるものは AD に進行しあるものは進行しないという不均一な群である。そのため今後は Maestu, Fernandez らが行ったフォローアップスタディのような縦断的な研究や、サブグループに分類して群間で比較、解析するような研究が必要になっ

てくと思われる。

MEG は現在ではてんかんの術前検査においてのみ保険適応となっており、精神科の臨床現場における存在はまだまだ大きくはない。しかし脳細胞の電気活動を直接観察しうる MEG は、他の脳画像検査と比べて優れた時間分解能、空間分解能を有しており、さまざまな精神疾患、神経疾患における病態解明、早期発見に役立つ可能性がある。今後われわれは今回のような認知症の早期発見も含めた精神科領域における MEG の臨床応用を目指していきたいと考えている。

筆者が2年間のカナダ留学から帰国して阪大に奉職した直後、たまたま休日の当直で病棟に詰めていたときに、体調を崩されて阪大病院に入院された先生をお世話させていただく機会がありました。すでにその頃、病魔は先生のお体を蝕んでいたようでした。しかし、先生は、淡々とご自分のご病状を説明され、笑顔をみせられました。そのお姿は、身をもってある種のお覚悟を示されたよう

で、私は言葉も出ないまま頭を下げるほかありませんでした。西村先生にいただいたさまざまな教えを胸に、先

生の在りし日の面影を偲び、心からご冥福をお祈りいたします。

## 文 献

- 1) Adamis D, Sahu S, Treloar A : The utility of EEG in dementia ; A clinical perspective. *Int J Geriatr Psychiatry* 20 : 1038-1045, 2005
- 2) Pekkonen E, Huottilainen M, Virtanen J, et al : Alzheimer's disease affects parallel processing between the auditory cortices. *Neuroreport* 31 : 1365-1368, 1996
- 3) Maestu F, Arrazola J, Fernandez A, et al : Do cognitive patterns of brain magnetic activity correlate with hippocampal atrophy in Alzheimer's disease ? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74 : 208-212, 2003
- 4) Maestu F, Fernandez A, Simos PG, et al : Spatio-temporal patterns of brain magnetic activity during a memory task in Alzheimer's disease. *Neuroreport* 12 : 3917-3922, 2001
- 5) Fernandez A, Arrazola J, Maestu F, et al : Correlations of hippocampal atrophy and focal low-frequency magnetic activity in Alzheimer disease ; Volumetric MR imaging-magnetoencephalographic study. *AJNR Am J Neuroradiol* 24 : 481-487, 2003
- 6) Maestu F, Garcia-Segura J, Ortiz T, et al : Evidence of biochemical and biomagnetic interactions in Alzheimer's disease ; An MEG and MR spectroscopy study. *Dement Geriatr Cogn Disord* 20 : 145-152, 2005
- 7) Fernandez A, Hornero R, Mayo A, et al : MEG spectral profile in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Clin Neurophysiol* 117 : 306-314, 2006
- 8) Maestu F, Campo P, Gil-Gregorio P, et al : Medial temporal lobe neuromagnetic hypoactivation and risk for developing cognitive decline in elderly population ; A 2-year follow-up study. *Neurobiol Aging* 27 : 32-37, 2006
- 9) Kurimoto R, Ishii R, Canuet L, et al : Event-related synchronization of alpha activity in early Alzheimer's disease and mild cognitive impairment ; An MEG study combining beamformer and group comparison. *Neurosci Lett* 443 : 86-89, 2008
- 10) 栗本 龍, 石井良平, 池澤浩二, 他 : 軽度アルツハイマー病患者における記憶課題中の脳磁場活動. *臨神生* 36 : 207-211, 2008