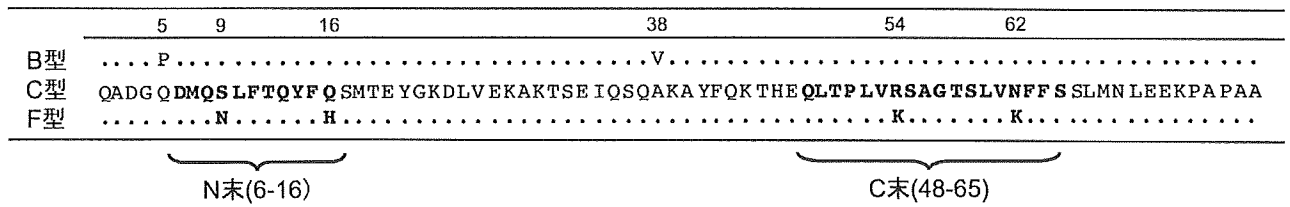
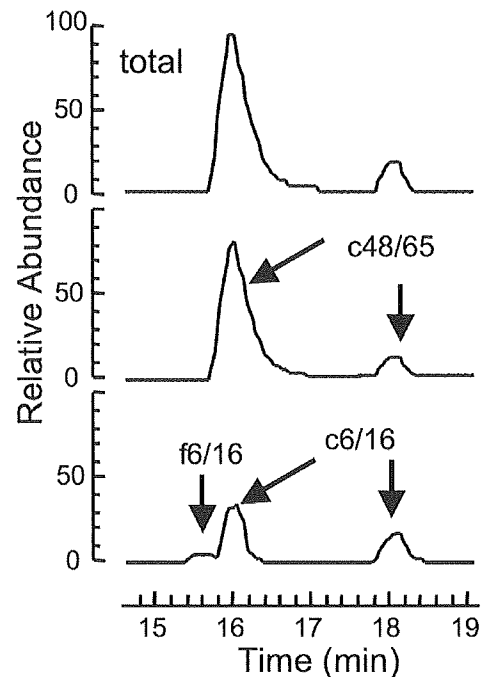
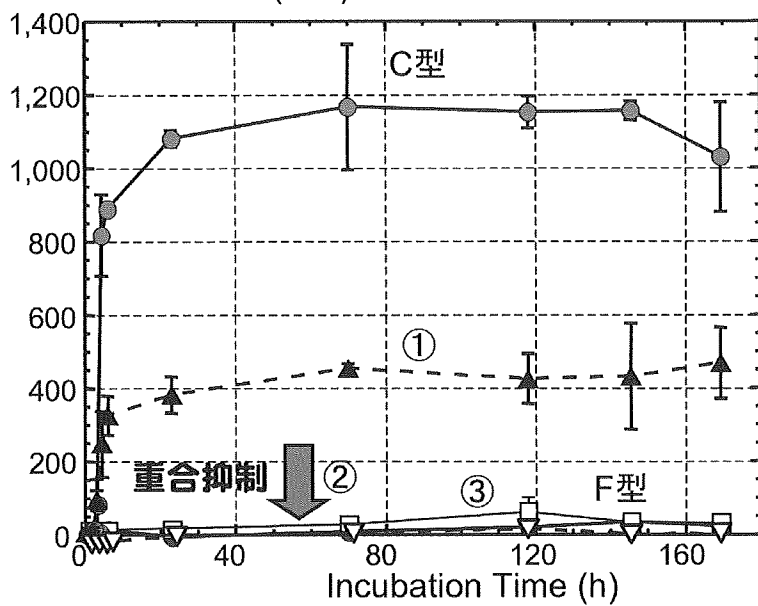


A.



B.

ThT-fluorescence (a.u.)



	ペプチド (μM)			
	N末		C末	
	c6/16	f6/16	c48/65	f48/65
C型	50	—	50	—
F型	—	50	—	50
① N末; C型+F型 (▲)	25	25	50	—
② C末; C型+F型 (▽)	50	—	25	25
③ C/F型 (□)	25	25	25	25

図1 F型apoA-IIのC末ペプチドはC型apoA-IIペプチドの線維形成を抑制する

A. マウスapoA-IIのアミノ酸組成と線維形成可能な最小領域を示す。 **B.** N末がC型+F型でC末はC型の重合反応 (①) はC型と同様にThT蛍光強度が増加したが、21時間後の反応生成物にはF型ペプチドは含まれていなかった。一方、C末がC型+F型 (②) やN末もC末もC型+F型 (③) では、反応7日後までThT蛍光強度は全く増加しなかった。

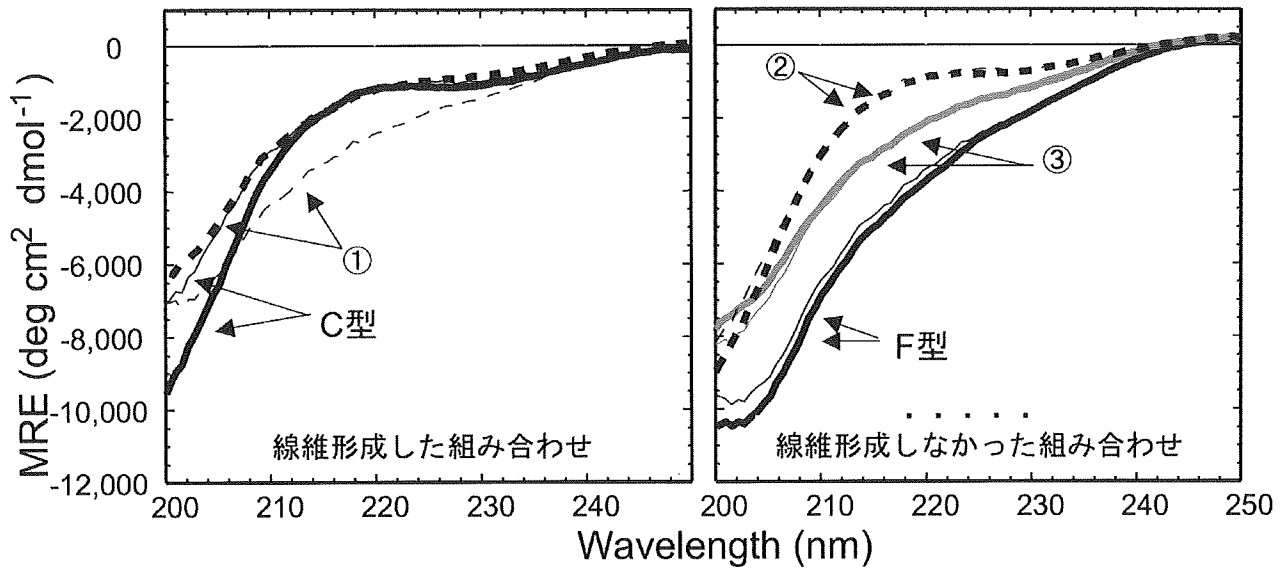


図2 F型apoA-IIのC末ペプチドはC型ペプチドの重合反応初期における2次構造変化を阻害する

重合反応開始直後のCDスペクトル(太線)と、ペプチド単独のCDスペクトルから算出した理論的スペクトル(細線)を示した。左図: N末がC型+F型でC末はC型の実測CDスペクトル(①破線)は、C型(実線)と同様に理論上のスペクトルから乖離していた。右図: 反応7日後まで線維を形成しなかった組み合わせ(N末はC型でC末がC型+F型(②破線), N末もC末もC型+F型(③グレーの実線))では、F型(黒色実線)と同様に理論上のスペクトルと実測スペクトルがほぼ重なっていた。

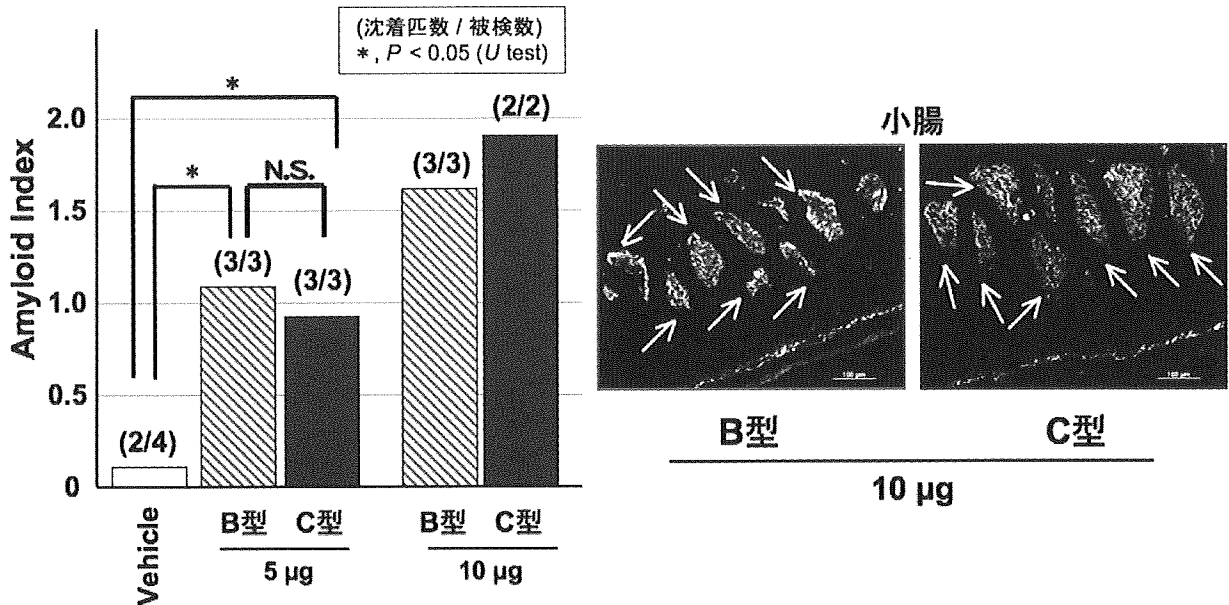


図3 B型apoA-IIペプチド線維はC型と同等の伝播力をもつ

左図: apoA-IIペプチド由来線維投与3ヶ月後の線維沈着程度を示した。B型もC型線維も、投与したマウス全てに高頻度に線維が沈着し、両型の沈着程度に差はなかった。右図: 10 µg投与3ヶ月後の小腸のコンゴレッド染色標本を示した。沈着組織(矢印)に両型の差異はなかった。

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

アミロイドーシス特有の病理像を認識するプローブの探索

研究分担者 工藤幸司 東北大学未来医工学治療開発センター

共同研究者 福田順也^{1,2)}、岡村信行^{1,2)}、古本祥三²⁾、谷内一彦²⁾、古川勝敏³⁾、荒井啓行³⁾、
 星井嘉信⁴⁾、宇田裕史⁵⁾、佐伯修⁵⁾、奥田恭章⁶⁾、中村正⁷⁾、坂井勇仁⁸⁾、
 和田庸子⁸⁾、中野正明⁸⁾、佐藤弘恵⁹⁾、小関由美¹⁰⁾、田村裕昭¹¹⁾、神谷百合香¹²⁾、
 寺井千尋¹²⁾、江原重幸¹³⁾、植崎雅司¹⁴⁾、吉崎和幸¹⁴⁾、山田正仁¹⁵⁾

所属：東北大学未来医工学治療開発センター¹⁾、東北大学医学系研究科機能薬理学分野²⁾、東北
 大学加齢医学研究所³⁾、山口大学医学系研究科情報解析医学系学域病理形態分野（病理
 学第一講座）⁴⁾、堺温心会病院内科⁵⁾、道後温泉病院リウマチセンター内科⁶⁾、熊本リウ
 マチセンターリウマチ膠原病内科⁷⁾、新潟大学大学院医歯学総合研究科内部環境医学講
 座（第2内科）⁸⁾、新潟県立リウマチセンター⁹⁾、東京女子医大付属膠原病リウマチ痛風
 センター¹⁰⁾、勤医協中央病院内科（リウマチ・膠原病）¹¹⁾、自治医科大学附属さいたま
 医療センターアレルギーリウマチ科¹²⁾、神戸徳洲会病院¹³⁾、大阪大学先端科学イノベー
 ションセンター¹⁴⁾、金沢大学大学院脳老化・神経病態学（神経内科学）¹⁵⁾

研究要旨 [¹¹C]BF-227・PET 画像では、正常健常人（2名）とアミロイドーシス患者様（1名）との間に特記すべき差は見られなかった。これは PET 画像を撮影した患者様の病理像が極めて進行の程度が低く、それ故に明確な PET 画像が得られなかったのであろうと考察された。平成 22 年度は前もって消化管標本の BF-227 染色を実施し、明瞭な蓄積像を示す患者様を PET 画像撮影に用いたいと考えている。

42 症例のアミロイドーシス患者様の消化管生検標本の BF-227 染色では、個体により染色像にかなりのバラツキが見られた。

A. 研究目的

アミロイドーシスという難病に苦しむ患者様により優れた診断法（プローブを用いたインビボ画像診断）を提供することを最終目的として、これまでにヒトアミロイドーシス標本および動物モデルにおけるアミロイド蛋白と、分担研究者らによって開発されたアミロイドリガンド BF-227 との結合性を検討し、いずれの標本および動物モデルにおいても高い結合性を示すことを確認してきた。本年度は東北大学倫理委員会および利益相反委員会等の承認を経て、いよいよヒトにおける [¹¹C]BF-227 探索的臨床研究としてまず最初に正常健常人 2、およびアミロイドーシス患者様 1 名の PET 画像を撮影した。

また併せて「AA アミロイドーシス臨床研究会」

会員よりお送りいただいたアミロイドーシス患者様の消化管生検標本の BF-227 染色を実施した。

B. 研究方法

1) ヒトにおける [¹¹C]BF-227 探索的臨床研究

東北大学医学部・医学系研究科倫理委員会の承認（承認番号：2007-366、研究課題名：アミロイドーシス患者におけるアミロイド蓄積の非侵襲的 PET 計測）を得て、23 および 26 歳の 2 名の正常健常人（2 名とも男性）ならびに AA アミロイドーシスと診断された 65 歳のアミロイドーシス患者様（1 名、女性）に [¹¹C]BF-227 を静脈内投与し、以後 PET 装置（島津 SET-2400W）を用いてダイナミックスキャンを施行した。

2) アミロイドーシス患者様の消化管生検標本の

BF-227 染色

「AA アミロイドーシス臨床研究会」会員よりお送りいただいたアミロイドーシス患者様の消化管生検（胃幽門輪の 0 時、3 時、9 時）標本の BF-227 染色を実施した。

（倫理面への配慮）

アミロイドーシス患者様標本を使用する場合、ヘルシンキ宣言を基準として倫理面に配慮し、標本提供許である各施設倫理委員会の承認を得た上で使用する。動物実験においては、東北大学における動物実験に関する指針（S63.3.24）に従い、十分なる愛護精神をもってできるだけ動物に苦痛を与えぬように配慮する。

標識プローブを用いた探索的 PET 臨床研究では「東北大学における新規 PET 薬剤の臨床開発の指針」に従って、東北大学放射性薬剤品質管理委員会、同放射性核種を用いる臨床研究委員会、同医学部・医学系研究科倫理委員会の承認を得るとともに東北大学利益相反マネージメント委員会の承認を得た上で実施する。

なお、 ^{11}C BF-227・PET の臨床研究についてはすでにアルツハイマー病、プリオン病において実施されている。したがって ^{11}C BF-227・PET の臨床研究に関する東北大学放射性薬剤品質管理委員会および同放射性核種を用いる臨床研究委員会の承認はすでに得てあったため、今回は「研究課題名：アミロイドーシス患者におけるアミロイド蓄積の非侵襲的 PET 計測」の東北大学医学部・医学系研究科倫理委員会の承認を得た（承認番号：2007-366）。

東北大学利益相反マネージメント委員会には本研究課題を実施する上で利益相反が存在しないことを申請した。

また臨床研究においてはヘルシンキ宣言を基準として倫理面に十分配慮し、研究の目的、ご協力いただきたい内容、PET 検査の概要、予想される危険性・副作用、健康被害が生じた場合の補償、プライバシー（秘密）の保護、検査内容・結果の説明、研究結果の公表、利害関係（利益相反）、問い合わせ・苦情の窓口等について患者様および家族に十分なる説明を行うとともに「患者様とご家族へのご協力の同意文書」、または「被験者の方へ

の協力の同意文書」に同意・署名（インフォームド・コンセント）をいただいた上で実施することとし、これらを遵守した。

C. 研究結果

1) ヒトにおける ^{11}C BF-227探索的臨床研究

図1および2に23歳および26歳正常健常人の ^{11}C BF-227 PET画像を示した。

23歳正常健常人（男性）においては、投与4-14分の画像では ^{11}C BF-227の主たる代謝臓器と考えられる肝において ^{11}C BF-227の集積が見られ、60-70分後には胆嚢に集積が見られた。

26歳正常健常人（男性）においては、投与4-14分の画像では ^{11}C BF-227の主たる代謝臓器と考えられる肝において ^{11}C BF-227の集積画が見られ、以後時間経過とともに徐々に同部位における集積は低下していった。

2名とも肝以外の諸臓器、特にAAアミロイドーシス患者におけるアミロイド好蓄積臓器である腎、消化管には特記すべき放射能集積が見られなかったことから、 ^{11}C BF-227はヒトアミロイドーシス（特にAAアミロイドーシス）において有用な診断ツールとなる可能性の高いことが示唆された。

これらを受けてAAアミロイドーシスと診断されたアミロイドーシス患者様（65歳、女性）のPET画像を撮影した。その結果、予想に反してアミロイド好蓄積臓器である腎、消化管においても特記すべき放射能集積が見られなかった（図3）。その理由は、次項で論じているようにこの患者様のアミロイド蓄積量が極めて少なかったことがあげられる。

2) アミロイドーシス患者様の消化管生検標本のBF-227染色

2010年1月18日までに延べ42症例のAAアミロイドーシス患者様消化管生検標本のBF-227染色を実施した（表1）。

まず、PET画像を撮影した患者様のBF-227染色所見について述べると、胃幽門輪の0時標本においてはごく軽度のBF-227染色像が一部に局在して観察された（図4-1）が、3時および9時標本においては極めて軽微な染色像が観察されるのみであった（図4-2、図4-3）。この所見を明瞭な

染色像が見られた標本（図 5）と比較すると、PET 画像を撮影した患者様の病理像は極めて進行の程度が低く、それ故に明確な PET 画像が得られなかったのであろうと考察された。

BF-227 染色データのまとめを表 2 に示した。症例によって 3 部位中 3 部位（全部位）が BF-227 染色陽性から、全部位が BF-227 染色陰性まで、症例間で大きなばらつきが存在していた。

なお、これらの隣接切片を用いたコンゴ レッド染色が他の機関で進行中であり、今後データを照らし合わせる予定である。

D. 考察

[¹¹C]BF-227・PET 画像では、正常健常人（2 名）とアミロイドーシス患者様（1 名）との間に特記すべき差は見られなかった。これは PET 画像を撮影した患者様の病理像は極めて進行の程度が低く、それ故に明確な PET 画像が得られなかったのであろうと考察された。平成 22 年度は前もって消化管標本の BF-227 染色を実施し、明瞭な蓄積像を示す患者様を PET 画像撮影に用いたいと考えている。

42 症例のアミロイドーシス患者様の消化管生検標本の BF-227 染色では、個体により染色像にかなりのバラツキが見られた。

E. 結論

[¹¹C]BF-227・PET 画像では、正常健常人（2 名）とアミロイドーシス患者様（1 名）との間に特記すべき差は見られなかった。42 症例のアミロイドーシス患者様の消化管生検標本の BF-227 染色では、個体により染色像にかなりのバラツキが見られた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Okamura N, Shiga Y, Furumoto S, Tashiro M, Tsuboi Y, Furukawa K, Yanai K, Iwata R, Arai H, Kudo Y, Itoyama Y, Doh-ura K: In vivo detection of prion amyloid plaques using [¹¹C]BF-227 PET. *Eur J*

Nuc Med, in press.

2) Furukawa K, Okamura N, Tashiro M, Waragai M, Furumoto S, Iwata R, Yanai K, Kudo Y, Arai H: Amyloid PET in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease with BF-227: comparison to FDG-PET. *J Neurol*, in press.

3) Waragai M, Okamura N, Furukawa K, Tashiro M, Furumoto S, Funaki Y, Kato M, Iwata R, Yanai K, Kudo Y, Arai H: Comparison study of amyloid PET and voxel-based morphometry analysis in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 285:100-105, 2009.

4) Fujiwara H, Tabuchi M, Yamaguchi T, Iwasaki K, Furukawa K, Sekiguchi K, Ikarashi Y, Kudo Y, Higuchi M, Saido TC, Maeda S, Takashima A, Hara M, Yaegashi N, Kase Y, Arai H: A traditional medicinal herb *Paeonia suffruticosa* and its active constituent 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -D-glucopyranose have potent anti-aggregation effects on Alzheimer's amyloid β proteins in vitro and in vivo. *J Neurochem* 1009:1648-1657, 2009.

5) Okamura N, Fodero-Tavoletti MT, Kudo Y, Rowe CC, Furumoto S, Arai H, Masters CL, Yanai K, Villemagne VL: Advances in molecular imaging for the diagnosis of dementia. *Expert Opin Med Diagn* 3:705-716, 2009.

6) Fodero-Tavoletti MT, Mulligan RS, Okamura N, Furumoto S, Rowe CC, Kudo Y, Masters CL, Cappai R, Yanai K, Villemagne VL: In vitro characterisation of BF227 binding to α -synuclein/Lewy bodies. *Eur J Pharmacol* 617:54-58, 2009.

7) 荒井啓行、岡村信行、藁谷正明、古川勝敏、谷内一彦、工藤幸司：アルツハイマー病の病態とバイオマーカー開発。 *日薬理誌* 135:3-7, 2010.

8) 工藤幸司：アミロイドーシスの分子イメージング。 *医学のあゆみ* 299:430-435, 2009.

2. 学会発表

1) Sugi k, Okamura N, Furumoto.S, Tashiro M, Furukawa K, Funaki Y, Arai H, Kudo Y, Iwata R, Yanai K: [18F]FACT PET is Useful for Noninvasive Detection of Amyloid Plaques in Alzheimer's Disease. The European association of nuclear medicine,

- Barcelona, Spain, 10.9-14, 2009.
- 2) Okamura N, Furumoto S, Tashiro M, Funaki Y, Kikuchi A, Shiga Y, Furukawa K, Arai H, Doh-ura K, Iwata R, Yanai K, Kudo Y : [¹¹C]BF-227 PET Study in Protein Conformational Diseases. The European association of nuclear medicine, Barcelona, Spain, 10.9-14, 2009.
- 3) Furukawa K, Okamura N, Tashiro M, Furumoto S, Iwata R, Yanai K, Kudo Y, Arai H: PET imaging for mild cognitive impairment with FDG and β -amyloid tracer, ¹¹C-BF-227. International Conference on Alzheimer's Disease (Imaging Consortium) , Vienna, Austria, 7.11-16, 2009.
- 4) Arai H, Fujiwara H, Tabuchi M, Yamaguchi T, Iwasaki K, Furukawa K, Sekiguchi K, Ikarashi Y, Kudo Y, Yaegashi N, Kase Y: A traditional medicinal herb *Paeonia suffruticosa* and its active constituent 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -D-glucopyranose have potent anti-aggregation effects on Alzheimer's amyloid β proteins in vitro and vivo. International Conference on Alzheimer's Disease, Vienna, Austria, 7.11-16, 2009.
- 5) Furukawa K, Okamura N, Tashiro M, Furumoto S, Iwata R, Yanai K, Kudo Y, Arai H : PET imaging for mild cognitive impairment with FDG and β -amyloid tracer, ¹¹C-BF-227. International Conference on Alzheimer's Disease, Vienna, Austria, 7.11-16, 2009.
- 6) Okamura N, Kikuchi A, Takeda A, Furumoto S, Tashiro M, Furukawa K, Arai H, Iwata R, Yanai K, Kudo Y: Noninvasive Detection of α -synuclein Deposits In Human Brain Using [¹¹C]BF-227 PET. International Conference on Alzheimer's Disease, Vienna, Austria, 7.11-16, 2009.
- 7) 工藤幸司：タウイメージング. 第 28 回日本認知症学会(シンポジウム)、仙台、11.20-22、2009.
- 8) 岡村信行、古本祥三、荒井啓行、谷内一彦、工藤幸司：神経原線維変化を検出する ¹⁸F 標識 PET プローブの開発. 第 28 回日本認知症学会 (ポスター)、仙台、11.20-22、2009.
- 9) 藁谷正明、岡村信行、古川勝敏、谷内一彦、工藤幸司、荒井啓行：軽度認知障害の予後予測における BF227-PET と MRI の比較検討. 第 28 回日本認知症学会、仙台、11.20-22、2009.
- 10) 岡村信行、古本祥三、杉健太郎、谷内一彦、田代学、古川勝敏、荒井啓行、工藤幸司：アミロイドイメージング用プローブ [¹⁸F]FACT のアルツハイマー病早期診断における有用性の検討. 第 16 回東北脳循環カンファレンス、仙台、11.28、2009.
- 11) 古本祥三、岡村信行、工藤幸司、谷内一彦：ポジットロン標識アミロイド画像化プローブの開発研究. 第 37 回薬物活性シンポジウム、仙台、10.9、2009.
- 12) 杉健太郎、岡村信行、石井賢二、石渡喜一、伊藤健吾、加藤隆司、鷲野谷利幸、工藤幸司、谷内一彦：[¹¹C]BF 227-PET によるアルツハイマー病早期診断法の多施設共同臨床試験. 第 49 回日本核医学会学術総会、旭川、10.1-3、2009.
- 13) 岡村信行、古本祥三、田代学、古川勝敏、杉健太郎、船木善仁、岩田錬、荒井啓行、工藤幸司、谷内一彦：アルツハイマー病診断における [¹⁸F]FACT-PET の有用性の検討. 第 49 回日本核医学会学術総会、旭川、10.1-3、2009.
- 14) 工藤幸司、福田順也：タウイメージングによるアルツハイマー病診断. 東北大学イノベーションフェア 2009 in 仙台、仙台、10.14、2009.
- 15) 岡村信行、工藤幸司：PET を用いたアルツハイマー病の超早期診断法の確立と普及について. 第 15 回サイプリス交流会、東京、8.27、2009.
- 16) 杉健太郎、岡村信行、石井賢二、石渡喜一、伊藤健吾、加藤隆司、工藤幸司、谷内一彦：[¹¹C]BF 227 を用いたアルツハイマー病早期診断法の多施設共同臨床試験. 日本分子イメージング学会 第 4 回総会・学術集会、千葉、5.14-15、2009.
- 17) 工藤幸司：アルツハイマー病診断の TR (トランスレーショナル リサーチ)、東北大学橋渡し研究支援推進プログラム. 第 4 回基盤整備進捗会議・シーズ進捗会議、仙台市、4.20、2009.
- 18) 杉健太郎、岡村信行、古本祥三、加藤元久、森雅憲、田代学、岩田錬、工藤幸司、荒井啓行、谷内一彦：[¹¹C]BF -227-PET を用いた軽度認知症障害段階でのアルツハイマー病の早期診断. 第 82 回日本薬理学会年会、横浜、3.16、2009.
- 19) 森雅憲、岡村信行、古本祥三、工藤幸司、谷内一彦：近赤外線蛍光プローブ X50 による脳内アミロイドの検出. 第 82 回日本薬理学会年会、横浜、3.16、2009.

20) 工藤幸司: タウイメーキングによるアルツハイマー病診断. 内閣府主催 第3回ナノバイオテクノロジー連携群 成果報告会、1.28、2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

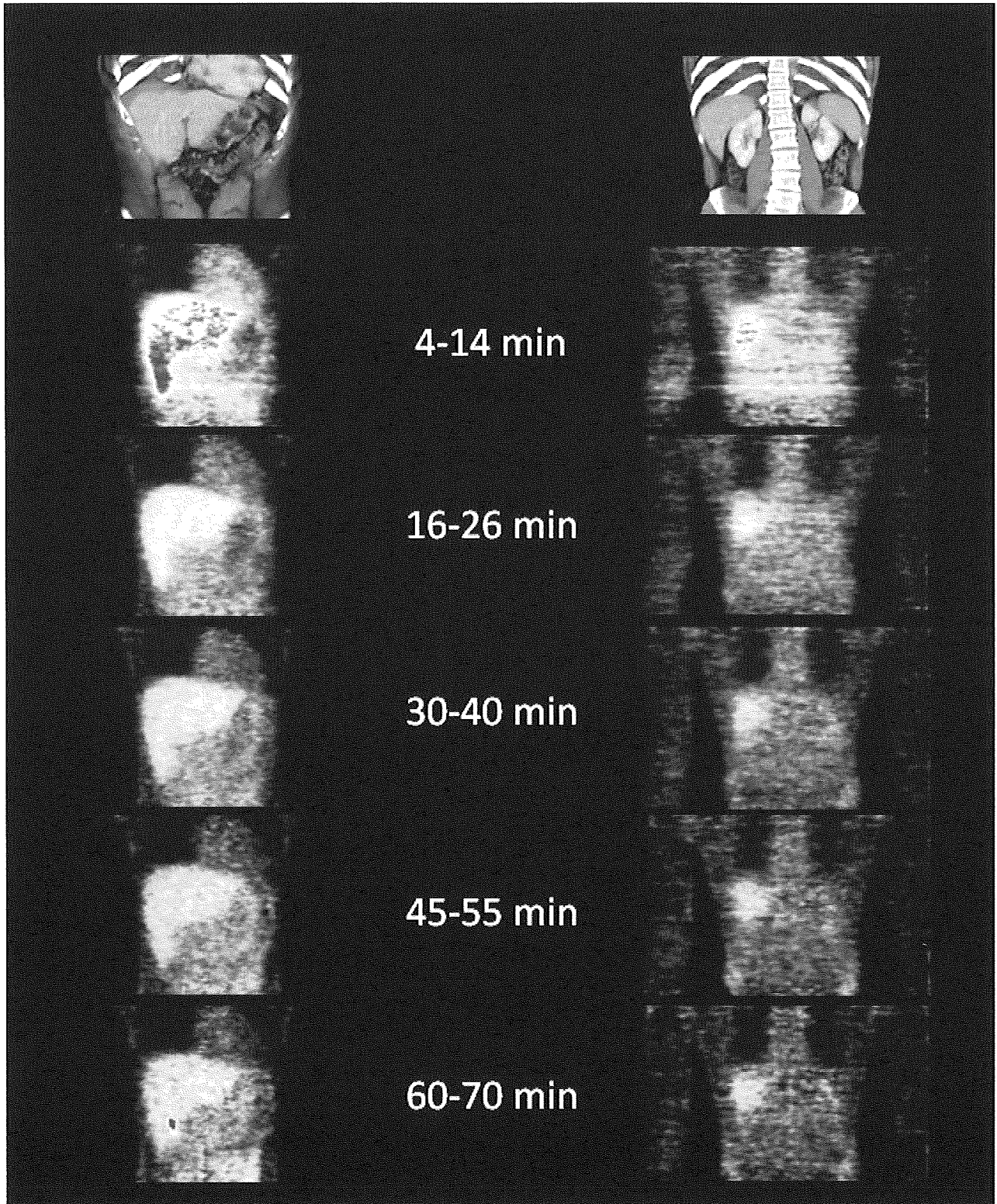


図 1. 正常健康人 (23 歳、男性) における $[^{11}\text{C}]\text{BF-227}$ PET 画像

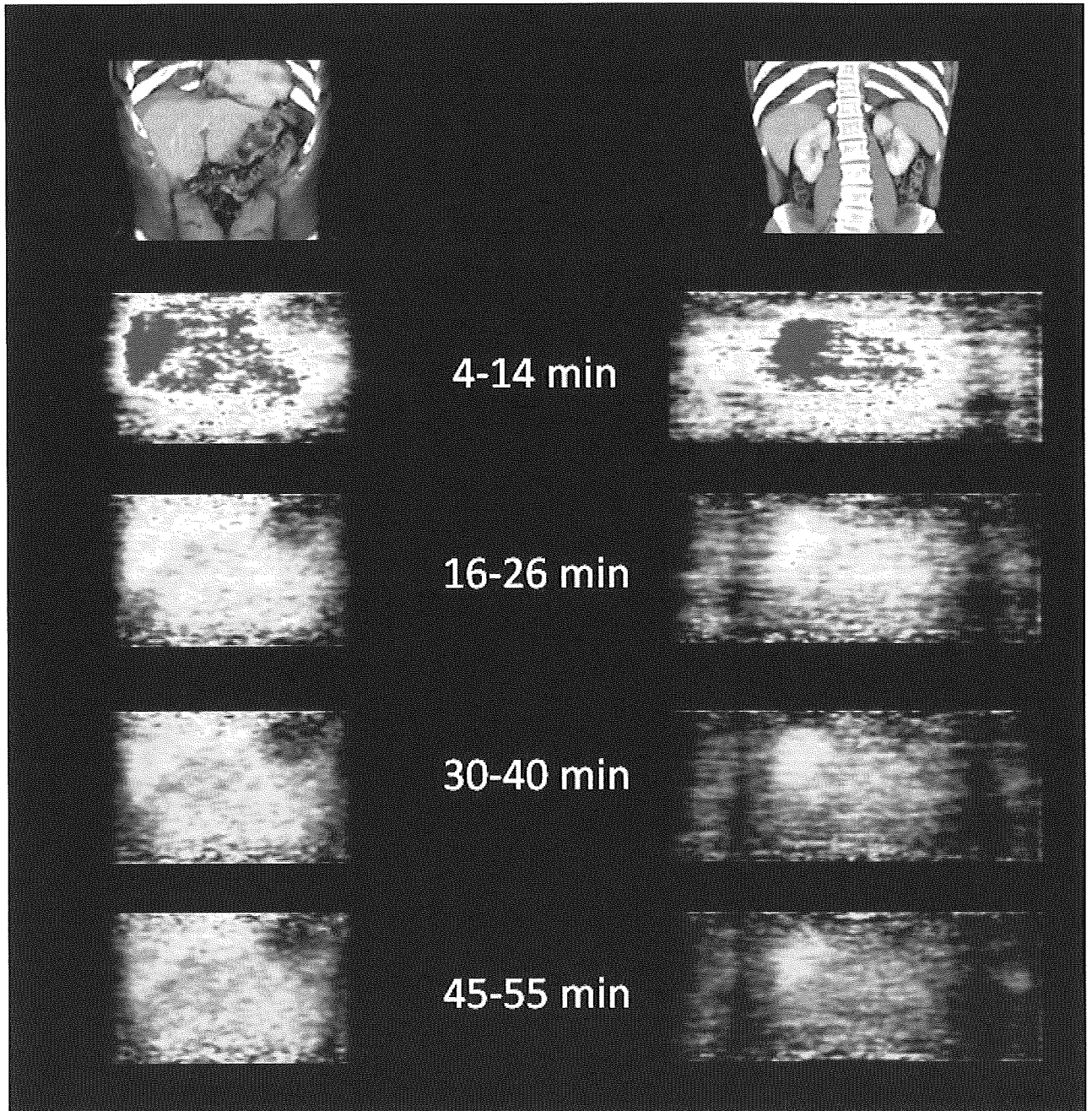


図2. 正常健康人（26歳、男性）（正常健康人）における ^{11}C BF-227 PET 画像

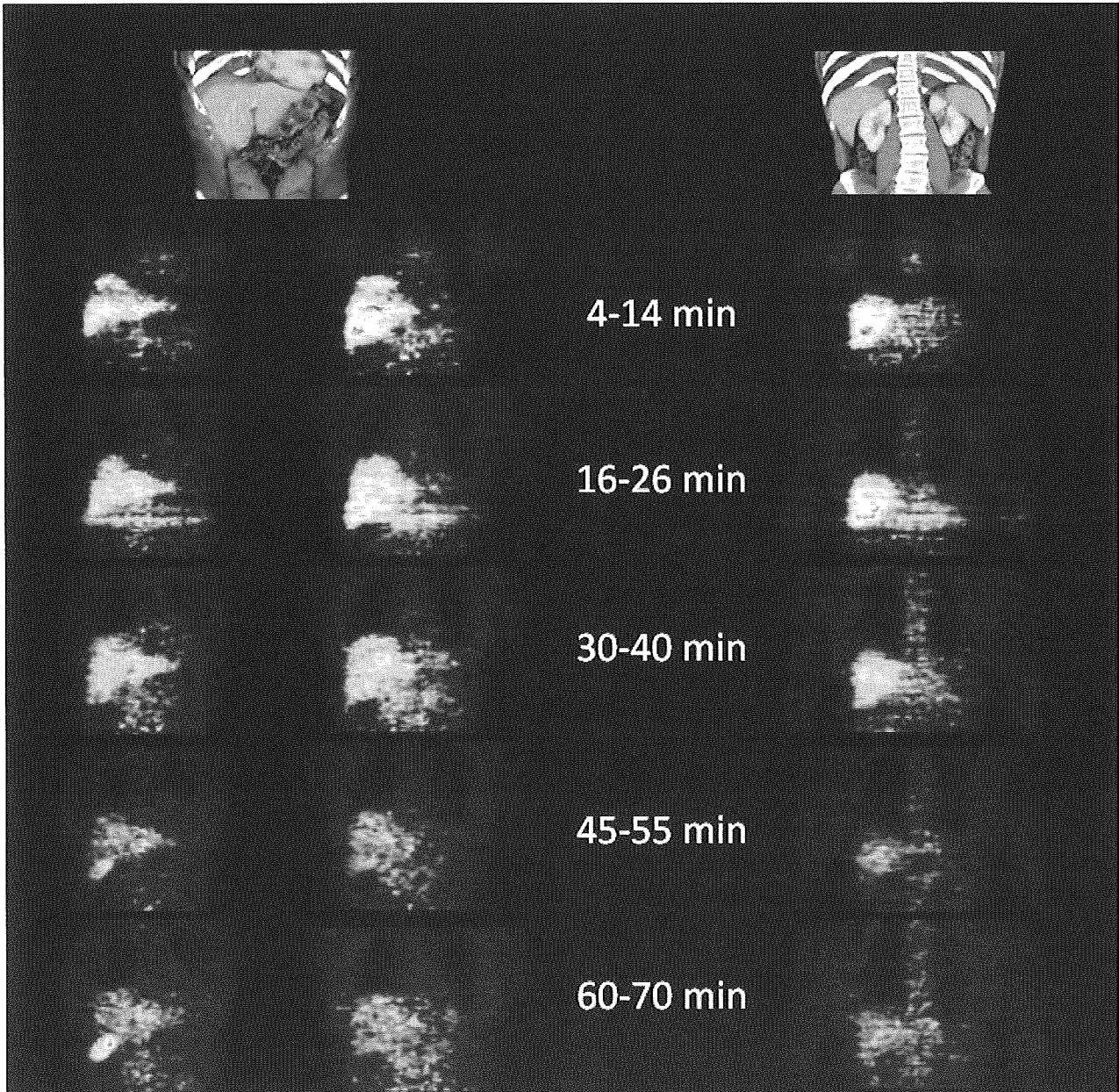
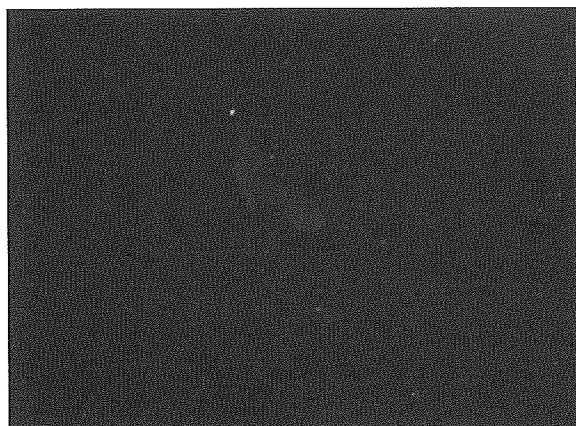
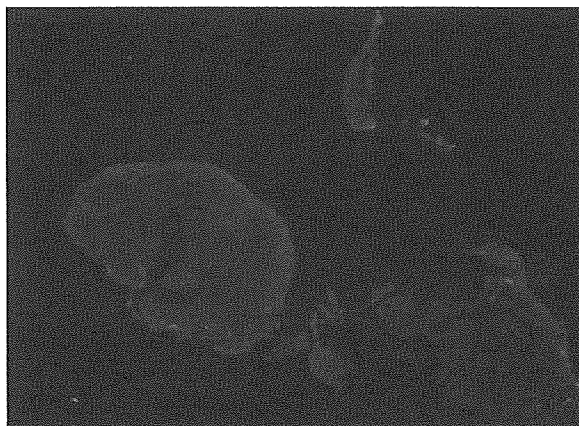


図3. アミロイドーシス患者様（65歳、女性）における $[^{11}\text{C}]\text{BF-227}$ PET 画像



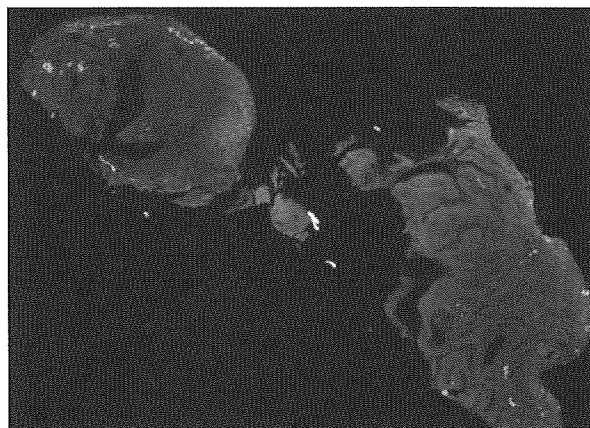
未染 ×8 39.3秒



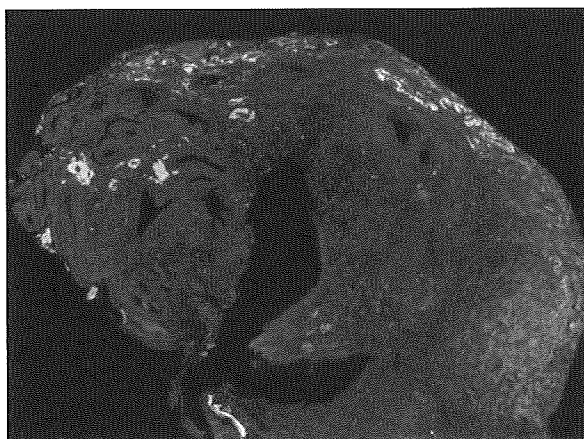
未染 ×40 1/4秒



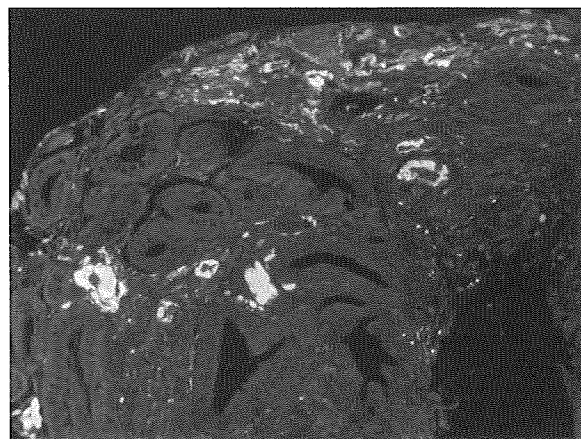
BF-227染色 ×8 12.8秒



BF-227染色 ×40 1/6秒



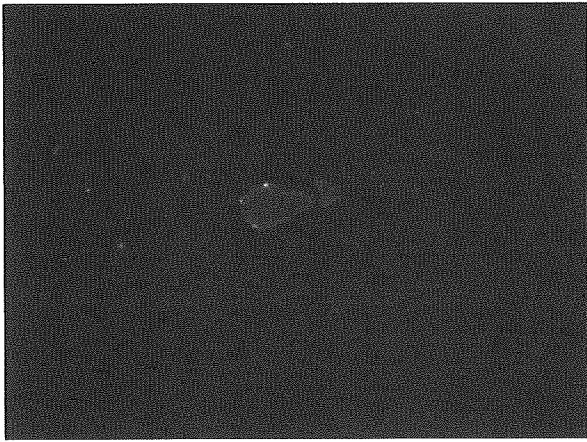
BF-227染色 ×100 1/12秒



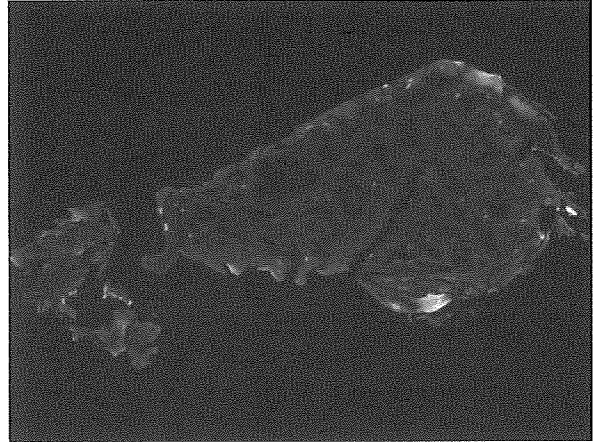
BF-227染色 ×200 1/15秒

大阪大学0809610-0°

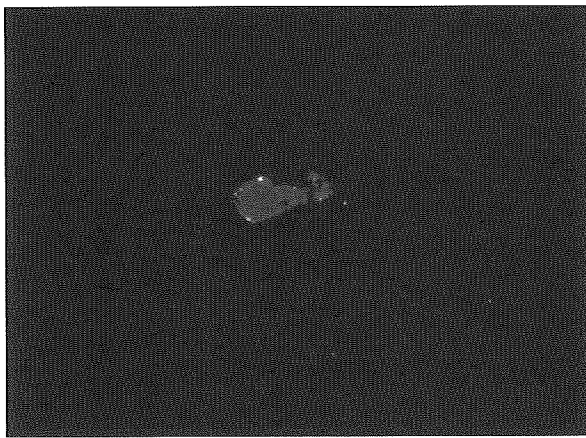
図 4-1. PET 画像を撮影した患者様の幽門輪(0 時)標本における BF-227 染色像



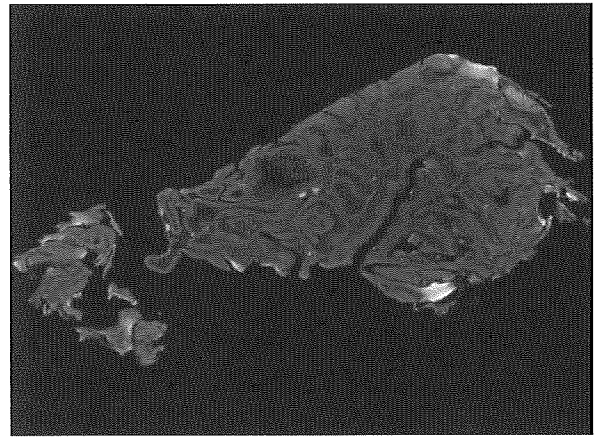
未染 ×8 35.7秒



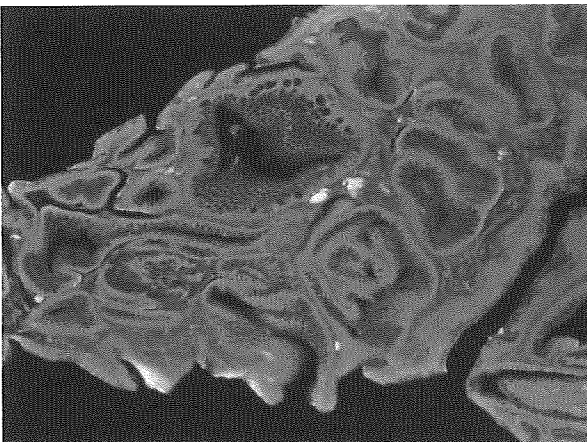
未染 ×40 1/4秒



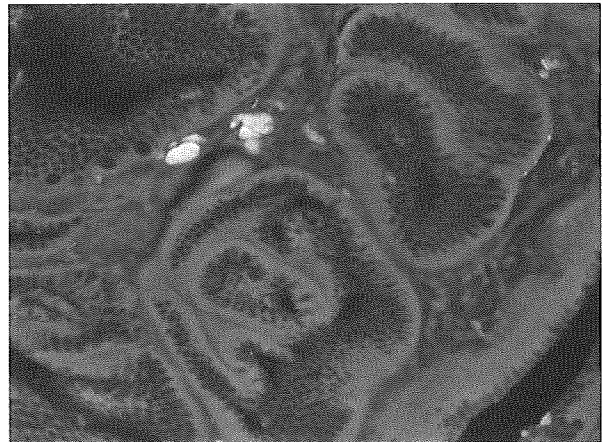
BF-227染色 ×8 7.9秒



BF-227染色 ×40 1/20秒



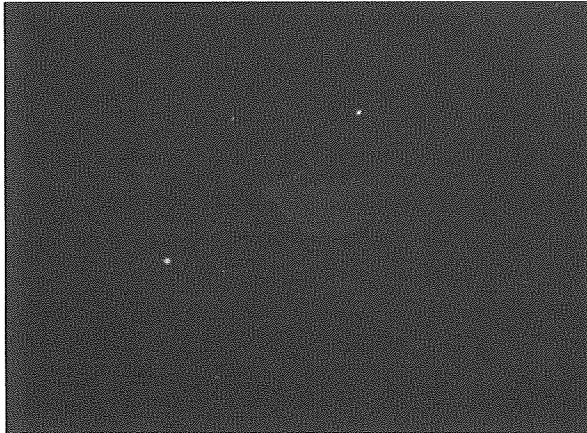
BF-227染色 ×100 1/25秒



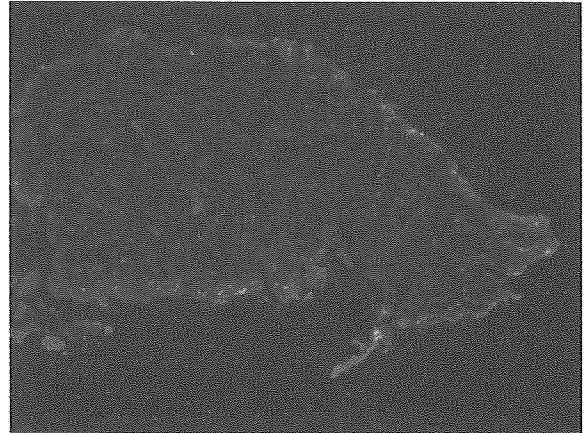
BF-227染色 ×200 1/25秒

大阪大学0809610-3°

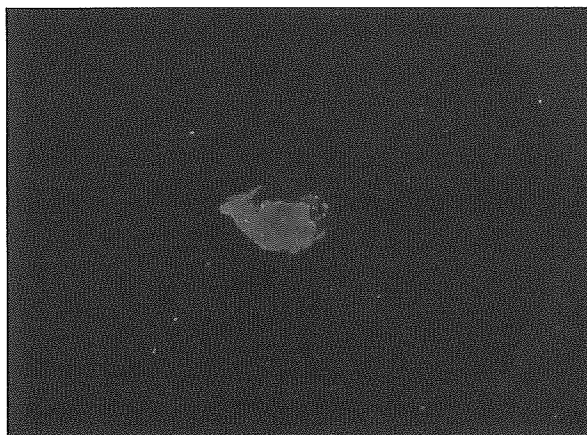
図 4-2. PET 画像を撮影した患者様の幽門輪(3 時)標本における BF-227 染色像



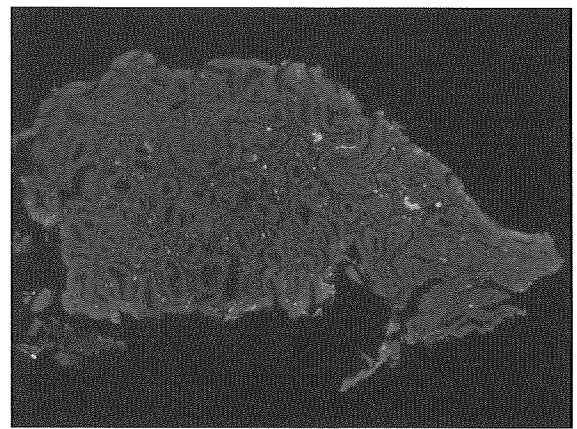
未染 ×8 35.7秒



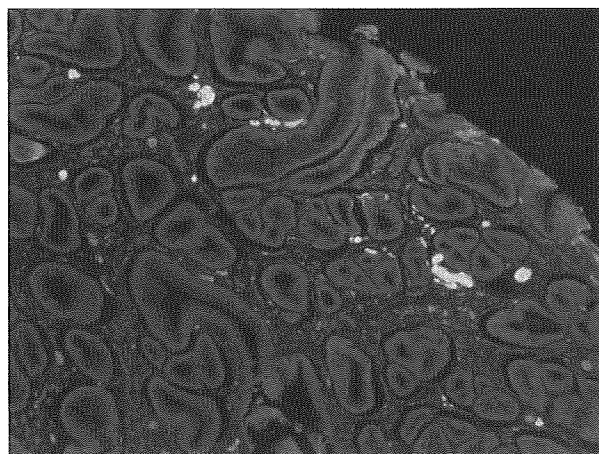
未染 ×40 1/3秒



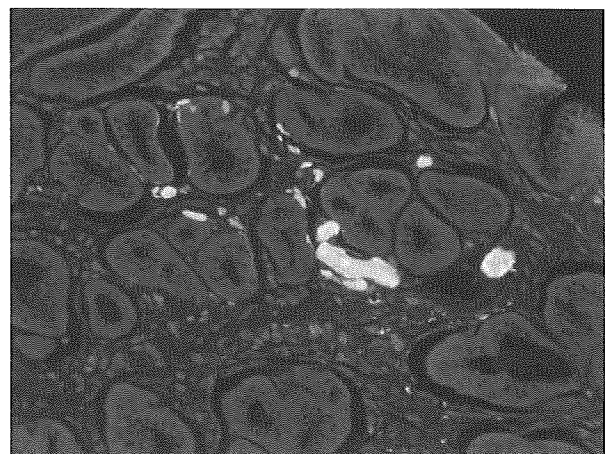
BF-227染色 ×8 15.6秒



BF-227染色 ×40 1/20秒



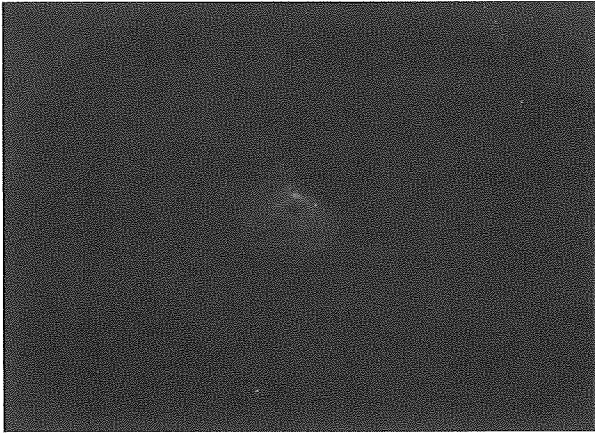
BF-227染色 ×100 1/25秒



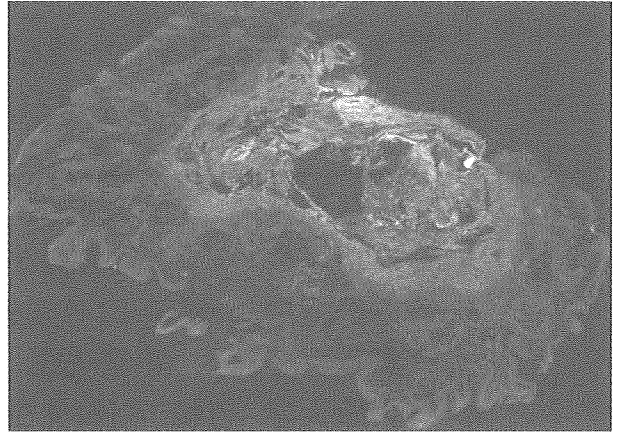
BF-227染色 ×200 1/25秒

大阪大学0809610-9°

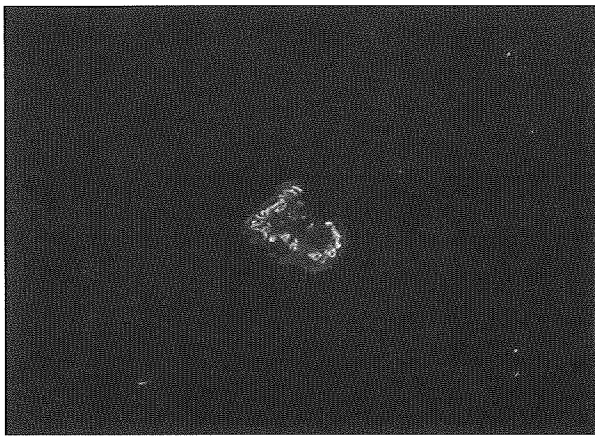
図 4-3. PET 画像を撮影した患者様の幽門輪(9時)標本における BF-227 染色像



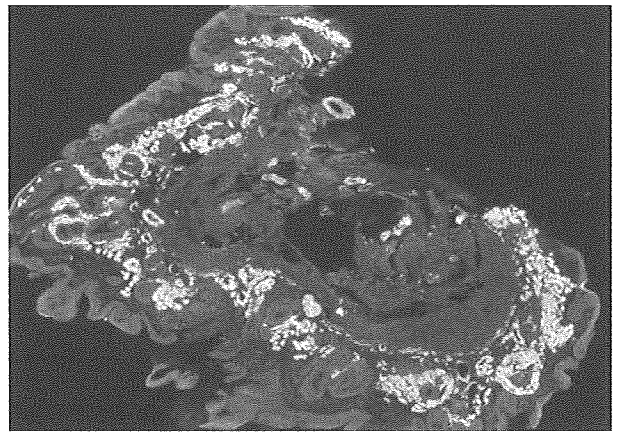
未染 ×8 27.9秒



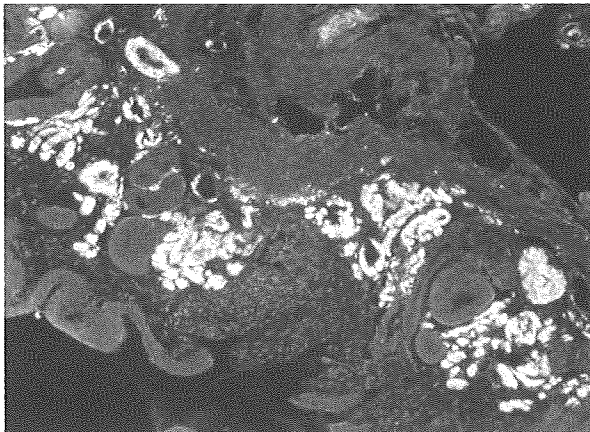
未染 ×40 1/3秒



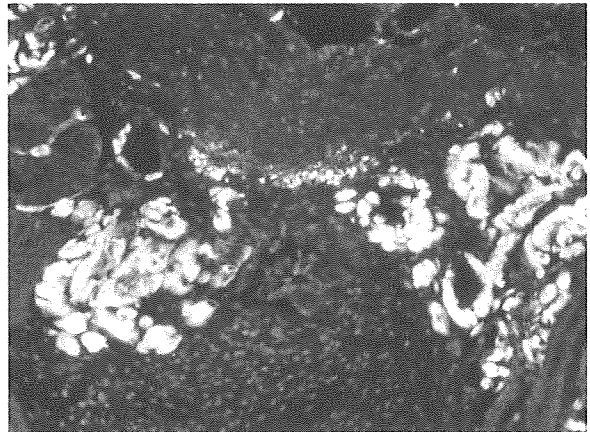
BF-227染色 ×8 8.3秒



BF-227染色 ×40 1/30秒



BF-227染色 ×100 1/60秒



BF-227染色 ×200 1/100秒

自治医大H0907708-9^o

図 5. 明瞭な BF-227 染色像が得られた 1 例

表1. AAアミロイドーシス患者様の消化管生検標本
をお送りいただいた機関および先生方

2010/1/18 までに

道後温泉病院 奥田先生	17 症例
自治医大 寺井、神谷先生	8
勤医協中央病院 田村先生	5
東京女子医大 小関先生	3
大阪大学 吉崎、櫛崎先生	3
神戸徳洲会 江原先生	1
新潟大学 坂井、和田先生	2
新潟リウマチセンター 佐藤先生	1
堺温心会 宇田、佐伯先生	1
熊本リウマチセンター 中村先生	1
計42 症例	

表2. AAアミロイドーシス患者様の消化管生検
標本におけるBF-227染色データまとめ

平成22年1月18日まで

3部位中3部位(3/3) がBF-227染色陽性	19 症例
2/3 がBF-227染色陽性	8
1/3 がBF-227染色陽性	6
3/3 がBF-227染色陰性	4
4/4 がBF-227染色陽性	2
3/4 がBF-227染色陽性	1
1/4 がBF-227染色陽性	1
1/1 がBF-227染色陽性	1
計42 症例	

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

βアミロイド線維の核形成に及ぼす界面と攪拌の効果

研究分担者 内木宏延 福井大学医学部病因病態医学講座・分子病理学領域

共同研究者 長谷川一浩*、森永章義**、山田正仁**

*福井大学医学部病因病態医学講座・分子病理学領域、

**金沢大学大学院脳老化・神経病態学 (神経内科学)

研究要旨 アミロイドβ-ペプチド(Aβ)は重合核依存性重合機構により重合してβアミロイド線維を形成する。脳内での Aβ濃度は pM-nM の領域であるが、試験管内実験では一般に 10-100 μM の濃度範囲で重合反応が行われている。Aβ(1-40)ペプチドの試験管内重合挙動を改めて検討するため、Aβ濃度を重合反応が生じるなるべく低い濃度まで下げて反応を行った。静置条件で反応を行った時、気液界面有りでは 2.5-20 μM で重合が認められたが、気液界面無しでは 5 μM 以下の濃度では重合しなかった。また、気液界面上で凝集体が最初に生成した。気液界面有りでは 5 μM Aβ溶液を攪拌すると、重合反応は顕著に促進された。5 μM Aβ溶液で気液界面を無くし、ポリプロピレンのディスクを入れて攪拌すると重合反応は促進され、また、重合はディスク上で最初に起きた。以上のように、Aβ濃度 5 μM 以下では反応容器の気液界面や疎水性表面がないと重合しない。また、攪拌がこれらの重合反応を促進する。

A. 研究目的

アミロイドβ-ペプチド(Aβ)は重合核依存性重合機構により重合してβアミロイド線維を形成する。この機構は核形成過程と線維伸長過程から構成されるが、核形成過程が全体の律速段階となる。脳内での Aβ濃度は pM-nM の領域であるが、試験管内実験では一般に 10-100 μM の濃度範囲で重合反応が行われている。また、βアミロイドが沈着する脳内の細胞外領域は脳間質液などの流れによる攪拌があり、この効果を解析する必要がある。今回、Aβ(1-40)ペプチドの試験管内重合挙動を改めて検討するため、Aβ濃度を重合反応が生じるなるべく低い濃度まで下げて反応を行った。このとき、反応容器の気液界面や疎水性表面などの界面の存在や攪拌が重合反応にどのような影響を及ぼすか検討した。

B. 研究方法

アミロイド線維に特異的に反応する蛍光色素チオフラビン T (5 μM) を加えた、2.5, 5, 10, 20 μM Aβ(1-40)-PBS 溶液の試験管内線維形成をリアルタイムでモニターした。Aβ溶液を、96 ウェルマ

イクロプレート(の透明な 8 ウェルモジュール中に、気液界面有り・無しで封入した。37°Cで最長 3 週間インキュベーションを行い、蛍光マイクロプレートリーダーでアミロイド線維形成に伴うチオフラビン T 蛍光量の増加を測定した。また、蛍光実体顕微鏡によりウェル中の凝集状態を観察した。

(倫理面への配慮)

化学合成ペプチドを用いた試験管内実験であり問題なし。

C. 研究結果

気液界面の効果；Aβ溶液を気液界面有り・無しの条件で静置反応した。気液界面有りでは 2.5-20 μM で重合が認められたが、重合開始までに少なくとも数日間以上を要した。一方、気液界面無しでは 10, 20 μM では重合したものの、2.5, 5 μM は重合しなかった。また、5 μM Aβ溶液をインキュベーションすると、溶液中の凝集体形成に先行して気液界面上に蛍光性の膜が認められた。Aβは気液界面に集積し単分子膜を形成し、高密度に集積するとβシート構造をとることが報告されている。この状

態で長時間インキュベートすることで、重合核が形成されたと考えられる。

攪拌の効果；気液界面有りで5 μ M A β 溶液を攪拌すると、重合反応は数時間で開始され、顕著に促進された。攪拌により拡散が促進されて、溶液中A β の気液界面への集積が加速された可能性がある。

気液界面以外の疎水性界面の効果；5 μ M A β 溶液で気液界面を無くし、ポリプロピレンのディスクを入れて攪拌すると重合反応は顕著に促進され、また、重合はディスク上で最初に起きた。A β はポリプロピレン表面の疎水性-親水性界面に集積し、攪拌によりその過程が促進され、核形成したと考えられる。

D. 考察

脳内では特定の細胞膜リン脂質表面、例えば神経細胞の脂質ラフト中のGM1 ガングリオシドや、その他の細胞外マトリクス成分等の生体界面が、気液界面やプラスチック表面等に対応する“核形成の場”である可能性がある。

また、試験管内実験において、生体物質・薬剤がA β の重合に及ぼす効果を解析する際に、気液界面存在下で行うと核形成反応が競合する可能性があり、注意が必要である。

E. 結論

試験管内重合実験において、A β 濃度5 μ M以下では反応容器の気液界面や疎水性表面が重合に必要なである。攪拌がこれらの重合反応を促進した。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Morinaga A, Hasegawa K, Nomura R, Ookoshi T, Ozawa D, Goto Y, Yamada M, Naiki H: Critical role of interfaces and agitation on the nucleation of A β amyloid fibrils at low concentrations of A β monomers. *Biochim Biophys Acta*, In press.
- 2) Yamamoto S, Kazama JJ, Narita I, Naiki H, Gejyo F: Recent progress in understanding dialysis-related

amyloidosis. *Bone* 45(Suppl 1):S39-S42, 2009.

- 3) Sasahara K, Yagi H, Naiki H, Goto Y: Thermal response with exothermic effects of β_2 -microglobulin amyloid fibrils and fibrillation. *J Mol Biol* 389:584-594, 2009.
 - 4) Pál-Gábor H, Gombos L, Micsónai A, Kovács E, Petrik E, Kovács J, Gráf L, Fidy J, Naiki H, Goto Y, Liliom K, Kardos J: Mechanism of lysophosphatidic acid-induced amyloid fibril formation of β_2 -microglobulin *in vitro* under physiological conditions. *Biochemistry* 48:5689-5699, 2009.
 - 5) Chatani E, Lee YH, Yagi H, Yoshimura Y, Naiki H, Goto Y: Ultrasonication-dependent production and breakdown lead to minimum-sized amyloid fibrils. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:11119-11124, 2009.
 - 6) Sawashita J, Kametani F, Hasegawa K, Tsutsumi-Yasuhara S, Zhang B, Yan J, Mori M, Naiki H, Higuchi K: Amyloid fibrils formed by selective N-, C-terminal sequences of mouse apolipoprotein A-II. *Biochim Biophys Acta* 1794:1517-1529, 2009.
 - 7) Kameda A, Morita EH, Sakurai K, Naiki H, Goto Y: NMR-based characterization of a refolding intermediate of β_2 -microglobulin labeled using a wheat germ cell-free system. *Protein Sci* 18: 1592-1601, 2009.
 - 8) Naiki H, Nagai Y: Molecular pathogenesis of protein misfolding diseases: pathological molecular environments versus quality control systems against misfolded proteins. *J Biochem* 146:751-756, 2009.
 - 9) 内木宏延：アミロイドーシス. *病理と臨床* 27:273-279, 2009.
 - 10) 内木宏延：透析アミロイドーシス発症の分子機構. *医学のあゆみ* 229:377-383, 2009.
 - 11) 高橋直生、木村秀樹、糟野健司、三上大輔、内木宏延、吉田治義：その他の二次性ネフローゼ症候群. *日本内科学会雑誌* 98:75-81, 2009.
- ##### 2. 学会発表
- 1) 大越忠和、長谷川一浩、後藤祐児、内木宏延：遊離脂肪酸による β_2 -ミクログロブリンアミロイド線維伸長反応促進効果の解析. 第98回日本病理学会総会、5.1-3、2009.
 - 2) 高橋直生、木村秀樹、大越忠和、長谷川一浩、

奈良雅文、宮崎良一、内木宏延、吉田治義：透析アミロイドーシス発症における血漿リゾリン脂質濃度の意義、第 52 回日本腎臓学会学術総会、横浜、6.3-5、2009.

3) 内木宏延：アミロイド線維形成・沈着の分子機構— β 2-ミクログロブリンアミロイド線維を中心に—、第 60 回日本電気泳動学会総会 (アミロイド蛋白の基礎と臨床)、松本、9.19-20、2009.

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

βアミロイド蓄積に対するアポリポ蛋白 E アイソフォーム 特異的効果の検討

研究分担者 岩坪 威 東京大学大学院医学系研究科 神経病理学

共同研究者 堀 由起子*、橋本 唯史*

*東京大学大学院薬学系研究科 臨床薬学

研究要旨 アルツハイマー病 (AD)の発症機序について「アミロイド仮説」が広く受け入れられており、老人斑アミロイドを構成する amyloid βペプチド (Aβ)の線維化過程の解明は重要である。

アポリポタンパク質の1つである apolipoprotein E (apoE)は脳にも発現し、Aβ結合タンパク質の1つとしても知られている。ヒト apoE には3種類の遺伝多型 (ε2、ε3、ε4)が存在し、ε4 アレルはAD発症の遺伝的危険因子として確立されているが、その発症促進メカニズムには不明な点が多い。そこで apoE がAβ線維形成過程に関与する可能性を考え、特に線維形成中間体である protofibril に着目し、アイソフォームごとにまず *in vitro* において検討を行った。Thioflavin T とゲル濾過による分離を組み合わせて protofibril と fibril の形成を同時に評価可能な実験系を独自に確立し、apoE 添加時のAβ線維形成過程をアイソフォーム毎に測定した。その結果、apoE2 及び apoE3 の添加により apoE 非添加時と比べ protofibril が安定に維持され fibril の形成が遅れることがわかった。一方 apoE4 を添加した場合は、他のアイソフォームに比べて protofibril 維持効果が弱く、fibril 形成が早期に進行した。次に、protofibril と apoE の相互作用について SDS-PAGE にて検討すると、apoE3、apoE4 共に protofibril 画分に回収され protofibril と結合していたが、SDS 耐性なAβと apoE の結合体の量は apoE3 の方が apoE4 に比べ多いことがわかった。この結果は、protofibril と apoE3 の結合は apoE4 に比べ強い結合であることを示唆する。以上の結果から、apoE はアイソフォーム特異的な protofibril との結合状態に応じて、Aβ線維形成を調節する可能性が考えられた。このアイソフォーム特異的な効果により、apoE4 は他のアイソフォームに比べAβの不溶化が進行しやすく、より AD 発症に関与する可能性が考えられた。

A. 研究目的

アルツハイマー病 (AD)の発症機序について「アミロイド仮説」が広く受け入れられており、老人斑アミロイドを構成する amyloid βペプチド (Aβ)の線維化過程の解明は重要である。

アポリポタンパク質の1つである apolipoprotein E (apoE)は脳にも発現し、Aβ結合タンパク質の1つとしても知られている。ヒト apoE には3種類の遺伝多型 (ε2、ε3、ε4)が存在し、ε4 アレルはAD発症の遺伝的危険因子として確立されているが、その発症促進メカニズムには不明な点が多い。そこで本研究では、apoE がAβ線維形成過程に関与する可能性を考え、特に線維形成中間体である protofibril に着目し、アイソフォームごとにその効

果を検討することを目的とした。

B. 研究方法

合成Aβ1-42 ペプチドを用いた *in vitro* 線維形成過程において、その評価系としてβシート構造を特異的に認識する蛍光色素 Thioflavin T とゲル濾過カラムによる分離を組み合わせた独自の実験系を確立した。この評価系を用い、apoE 非添加、各アイソフォームの apoE 添加時の protofibril と fibril の形成を評価した。また、protofibril と apoE の相互作用の検討では、ゲル濾過カラムにより分離した protofibril を SDS-PAGE することで、その結合状態を明らかにした。

(倫理面への配慮)

問題なし。ヒトに関する研究は含まず、動物実験についても東京大学実験動物研究指針に沿って愛護的に施行しており、倫理面の問題は生じない。

C. 研究結果

まず apoE が A β 線維形成過程に及ぼす影響について *in vitro* で検討すると、apoE2、apoE3 の添加は protofibril の存続時間を延長し、その後の fibril の形成を遅延した。一方、apoE4 の protofibril 維持効果はアイソフォーム間で最も弱く、fibril の形成が速やかに生じることがわかった。

次に、protofibril と apoE の相互作用を検討すると、apoE3、apoE4 共に protofibril 画分に回収され protofibril と結合していたが、SDS 耐性な A β と apoE の結合体の量は apoE3 の方が apoE4 に比べ多いことがわかった。この結果は、protofibril と apoE3 の結合は apoE4 に比べ強い結合であることを示唆する。

D. 考察

本研究で、apoE は protofibril とアイソフォーム特異的な結合状態にあること、またアイソフォーム特異的に protofibril 維持効果をもつことが示された。protofibril は A β の線維形成過程において重合核 (seed) として働くことから、apoE はアイソフォーム特異的な protofibril との結合状態に応じて、protofibril の seed としての働き (seed 効果) を調節し、A β 線維形成を調節する可能性が考えられた。

E. 結論

apoE の protofibril に対するアイソフォーム特異的な効果により、apoE4 は他のアイソフォームに比べ A β の不溶化が進行しやすく、より AD 発症に関与する可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Yamada K, Yabuki C, Seubert P, Schenk D, Hori Y, Ohtsuki S, Terasaki T, Hashimoto T, Iwatsubo T: A β immunotherapy: intracerebral sequestration of A β by an anti-A β monoclonal antibody 266 with high affinity to soluble A β . *J Neurosci* 29:11393-11398, 2009.

2. 学会発表

1) Hori Y, Hashimoto T, Nomoto H, Iwatsubo T: Isoform-specific effects of apolipoprotein E on the stability of protofibrils and amyloid deposition. 39th ANNUAL MEETING OF SOCIETY FOR NEUROSCIENCE, Chicago, USA, 10.17-21, 2009.

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