

C. 研究結果

1) アミロイドーシス患者様の消化管生検標本の BF-227 染色

BF-227 染色では、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、症例間でばらつきが存在した（表 2）。しかし、82 症例中 64 症例が全部位 BF-227 染色陽性と多数を占めた。

染色を行った標本について、トシリズマブ治療開始前・開始 1、2 年後の染色像からアミロイドの沈着量を比較した。沈着量は、表 3 に基づき、(0)アミロイド沈着なし、(1)染色像が一部限局、軽度のびまん性、(2)染色像はあまり明瞭でないが広範囲、または明瞭だがあまり範囲の広くないもの、(3)染色像が明瞭かつ広範囲、の 4 段階で評価した。各症例について、0 時、3 時、9 時それぞれにアミロイド沈着を評価し、それを踏まえ全体の沈着量を 4 段階で評価した。評価点 3 の例を図 1 に示した。治療前後でこの評価を比較し、評価点が減少したものを改善傾向、同じものを変化なし、増加したものを悪化傾向とした。

トシリズマブ単独投与例のうち、治療開始 1 年後と 2 年後に評価した症例では、4 症例中改善傾向が 2 例、変化なしが 1 例、悪化傾向が 1 例であった。1 年後に評価した例では、8 症例中、改善傾向が 4 例、変化なしが 4 例であった。合計すると、トシリズマブ単独投与例では、12 例中 6 例に改善傾向がみられた（表 4）。改善例と、変化の見られない例の代表例を図 2 に示した。

他の治療薬投与例では、1 年後と 2 年後に評価した 6 例中、3 例が改善傾向、2 例が変化なし、1 例が悪化傾向であった。治療開始 1 年後に評価した例では、4 例中 3 例が変化なし、1 例が改善傾向であった。他の治療薬投与例は 10 例中 4 例に改善の傾向がみられた（表 5）。

なお、これらの隣接切片の標本を用いたコンゴールレッド染色およびアミロイド蛋白定量が、他の研究機関で行われており、データを照らし合わせる予定である。

D. 考察

82 症例のアミロイドーシス患者様の消化管生検標本について、BF-227 染色を行った。症例ごと

に 3 か所またはそれ以上の部位の染色を行った結果、82 症例中 64 症例が全部位 BF-227 染色陽性と、多数を占めた。

治療開始 1 年後または 2 年後の時点での症例について、トシリズマブ単独投与例で 12 例中 6 例、他の治療薬投与例では 10 例中 4 例の改善例がみられた。

なお、信州大学池田教授らによって脳血管および全身アミロイドーシスにおける [11C]BF-227-PET の有用性が報告されている¹⁾。

E. 結論

BF-227 染色像による、治療前後の比較により、トシリズマブ治療開始 1 年後または 2 年後の時点では 12 例中 6 例の改善例がみられた。

参考

1) 池田修一、安出卓司、町田香津子、東城加奈古川勝敏、工藤幸司、鷺野谷利幸：脳アミロイドアンギオパチーおよび全身性アミロイドーシスに対する [11C]BF-227 の診断的有用性。アミロイドーシス調査研究班 平成 22 年度 研究報告会プログラム抄録集。演題 No.23

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 Nucl Med Mol Imaging* 37:934-941, 2010.

2) Arai H, Okamura N, Furukawa K, Kudo Y: Geriatric medicine, Japanese Alzheimer's disease neuroimaging initiative and biomarker development. *Tohoku J Exp Med* 221:87-95, 2010.

3) Shao H, Okamura N, Sugi K, Furumoto S, Furukawa K, Tashiro M, Iwata R, Matusda H, Kudo Y, Arai H, Fukuda H, Yanai K: Voxel-based analysis of amyloid positron emission tomography probe [11C]BF-227 uptake in mild cognitive impairment

and Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 30:101-111, 2010.

4) Kikuchi A, Takeda A, Okamura N, Tashiro M, Hasegawa T, Furumoto S, Kobayashi M, Sugeno N, Baba T, Miki Y, Mori F, Wakabayashi K, Funaki Y, Fukuda H, Arai H, Kudo Y, Yanai K, Itoyama Y: In vivo visualization of α -synuclein deposition by [11C]-BF-227 PET in multiple system atrophy. *Brain* 133:1772-1778, 2010.

5) 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* 257:721-727, 2010.

6) Okamura N, Mori M, Furumoto S, Yoshikawa T, Harada R, Ito S, Fujikawa Y, Arai H, Yanai K, Kudo Y: In vivo Detection of Amyloid Plaques in the Mouse Brain using the Near-Infrared Fluorescence Probe THK-265. *J Alzheimers Dis* 23:37-48, 2011.

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、岡村信行、古本祥三、古川勝敏、谷内一彦、荒井啓行：タウ イメージング。 *Dementia Japan* 24:146-154, 2010.

9) 工藤幸司：アルツハイマー病脳のアミロイド蓄積の生体画像化研究。 *老年期認知症研究会誌* 17:85-87, 2010.

10) 岡村信行、古本祥三、杉健太郎、邵 和、谷内一彦、田代学、岩田 錬、荒井啓行、古川勝敏、工藤幸司：アミロイドイメージングプローブ[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。 *東北脳循環カンファレンス* 16:13-15, 2010.

11) 岡村信行、古本祥三、谷内一彦、工藤幸司：新しいPET製剤の開発—アミロイド・タウイメージングプローブ開発の現状—。 *INNERVISION* 6-1:50-53, 2010.

12) 荒井啓行、工藤幸司、古川勝敏、富田尚希：MCIの概念とpreclinical ADの提唱。 *Cognition and Dementia* 10-1:8-12, 2011.

2. 学会発表

1) Okamura N, Furumoto S, Furukawa K, Arai H, Yanai K, Kudo Y: Binding and pharmacokinetic properties of novel 18F-labeled agents for in vivo imaging of tau pathology in Alzheimer's disease. International Conference on Alzheimer's Disease 2010, Honolulu, July 10-15, 2010.

2) Fodero-Tavoletti MT, Okamura N, Mulligan R, Furumoto S, Connor AR, Kudo Y, Cao DX, Rigopoulos A, O'Keefe G, Gong S, Adlard PA, Masters CL, Cappai R, Yanai K, Villemagne VL: Characterisation of [18F]-THK523, a novel in vivo tau imaging ligand. International Conference on Alzheimer's Disease 2010, Honolulu, July 10-15, 2010.

3) 菊池昭夫、岡村信行、工藤幸司、他 17 名：多系統委縮症における脳内 α -シヌクレイン蛋白凝集体の PET による画像化。第 51 回日本神経学会総会、東京、5.20-22、2010.

4) 岡村信行、古川勝敏、富田尚希、藁谷正明、古本祥三、田代 学、岩田 錬、工藤幸司、荒井啓行、谷内一彦：18F 標識アミロイドイメージング用 PET プローブ FACT の臨床評価。第 29 回日本認知症学会学術集会（病態を踏まえ、予防へ、治療へ）、名古屋、11.5-7、2010.

5) 古川勝敏、岡村信行、富田尚希、田代 学、工藤幸司、谷内一彦、荒井啓行：BF-227 を用いたアミロイド PET と Biofluid バイオマーカー。第 29 回日本認知症学会学術集会（病態を踏まえ、予防へ、治療へ）、名古屋、11.5-7、2010.

6) 工藤幸司：特異的プローブによるタウおよび A β 蓄積メカニズムの解明。キックオフシンポジウム 2010 (分子イメージング研究戦略推進プログラム (J-AMP))、東京、11.24、2010.

7) 古本祥三、岡村信行、石川洋一、岩田 錬、谷内一彦、工藤幸司、Fodero-Tavoletti M、Villemagne V：フッ素 18 標識タウ画像化プローブの開発。第 50 回日本核医学会学術総会、さいたま市、11.11-13、2010.

8) 岡村信行、菊池昭夫、武田 篤、古本祥三、田代 学、船木善仁、工藤幸司、岩田 錬、谷内一彦： α シヌクレイノパチーにおける [11C]BF-227PET 画像所見。第 50 回日本核医学会

学術総会、大宮、11.12、2010.

9) 岡村信行、古川勝敏、藁谷正明、富田尚希、田代 学、工藤幸司、荒井啓行、谷内一彦：軽度認知障害の進行予後予測のための画像バイオマーカーの比較検討. 第 31 回日本臨床薬理学会年会、京都、12.1、2010.

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

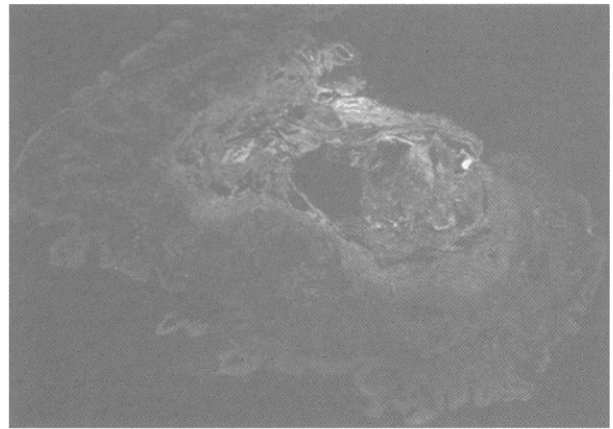
なし

3. その他

なし



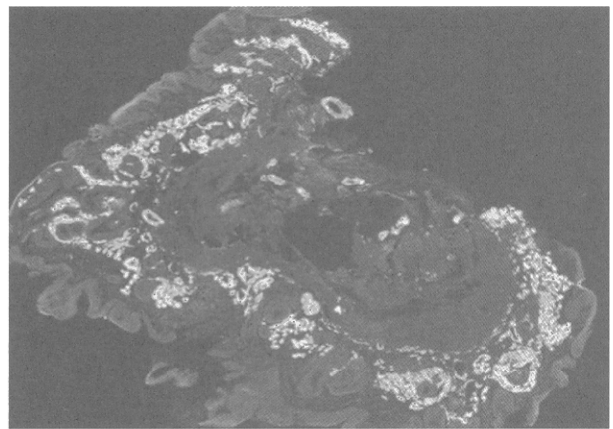
未染 ×8 27.9秒



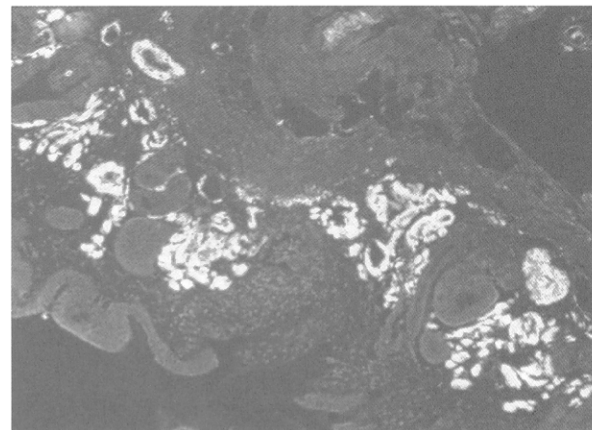
未染 ×40 1/3秒



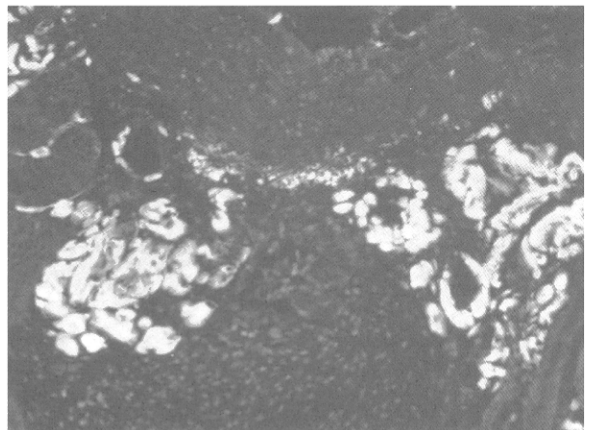
BF-227染色 ×8 8.3秒



BF-227染色 ×40 1/30秒



BF-227染色 ×100 1/60秒



BF-227染色 ×200 1/100秒

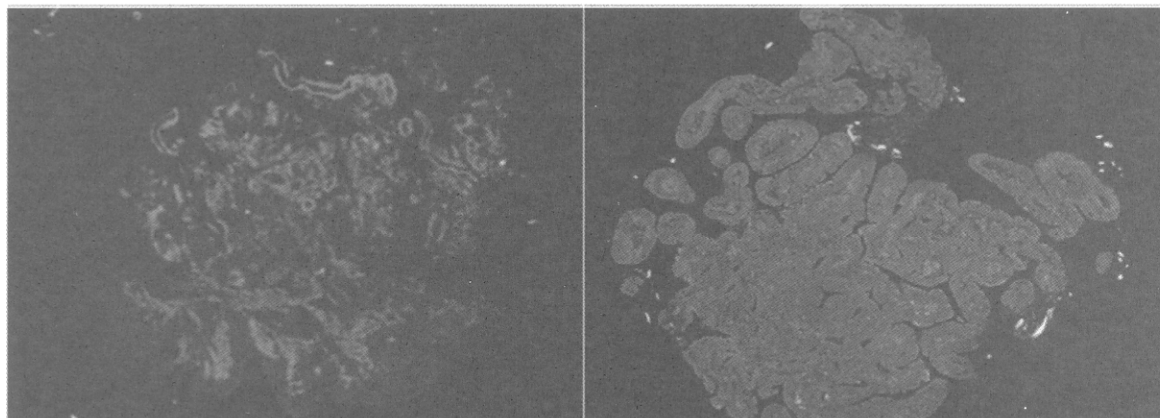
自治医大H0907708-9°

図1. 明瞭なBF-227染色像が得られた1例（評価点3の例）

改善傾向の例（大阪大学 L-1）

治療前

治療 1 年後



変化のない例（道後温泉 1）

治療前

治療 1 年後

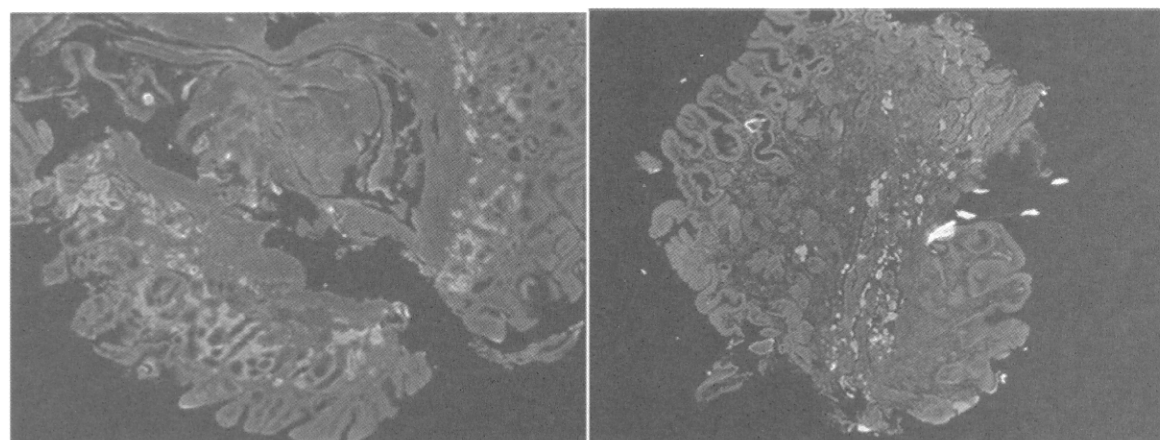


図 2. 治療 1 年後における改善例（上段）と変化のない例（下段）

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

		平成23年1月25日 まで	
• 道後温泉病院 奥田先生	26	• 堺温心会 宇田、佐伯先生	2
• 自治医大 寺井先生	13	• 熊本リウマチセンター 中村先生	1
• 勤医協中央病院 田村先生	18	• 高知大学 谷口、公文先生	2
• 東京女子医大 小関先生	4	• 香川大学 亀田先生	1
• 大阪大学 吉崎、榑崎先生	6	• 大阪南医療センター 松下先生	1
• 神戸徳洲会 江原先生	3	• 長崎大学病院 川上先生	1
• 新潟大学 坂井、和田先生	1		
• 新潟リウマチセンター 佐藤先生	3		
		計82 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23年1月25日まで		
3部位中3部位(3/3)	がBF-227染色陽性	56症例
2/3	がBF-227染色陽性	10
1/3	がBF-227染色陽性	3
3/3	がBF-227染色陰性	2
4/4	がBF-227染色陽性	8
1/4	がBF-227染色陽性	1
5/6	がBF-227染色陽性	1
1/1	がBF-227染色陽性	1
		計82 症例

表3.AAアミロイドーシス患者様の消化管生検標本の
BF-227染色による評価の指標

アミロイドの沈着量を、以下の4段階で評価した。

- 0:アミロイド沈着なし
- 1:染色像が一部限局、軽度のびまん性
- 2:染色像はあまり明瞭でないが広範囲、または明瞭だがあまり範囲の広がらないもの
- 3:染色像が明瞭かつ広範囲

表4. AAアミロイドーシス患者様の消化管生検標本の
BF-227染色による治療前後の比較
(トシリズマブおよびトシリズマブ+他の治療薬)

平成23年1月25日まで

【トシリズマブ単独】

- 治療前、治療1年後および2年後に評価した例…4症例
 - ・改善傾向 2例 (2例とも治療1年後では変化なし)
 - ・変化なし 1例
 - ・悪化傾向 1例 (1年後:変化なし, 2年後:悪化傾向)
 - 治療前、治療開始1年後に評価した例 …8症例
 - ・改善傾向 4例
 - ・変化なし 4例
- ※トシリズマブ投与12例中、改善傾向が見られた例は6例

【トシリズマブ+他の治療薬】

- 治療前、治療1年後および2年後に評価した例…1症例
 - ・変化なし 1例

表5. AAアミロイドーシス患者様の消化管生検標本の
BF-227染色による治療前後の比較
(他の治療薬および経過観察のみ)

平成23年1月25日まで

【他の治療薬】

- 治療前、治療1年後および2年後に評価した例…6症例
 - ・改善傾向 3例 (1例は治療1年後では変化なし。
2例は1年後に改善傾向、2年後は変化なし)
 - ・変化なし 2例
 - ・悪化後改善 1例 (悪化・改善とも変化は小さい)
 - 治療前、治療開始1年後に評価した例 …4症例
 - ・改善傾向 1例
 - ・変化なし 3例
- ※他の治療薬投与10例中、改善傾向が見られた例は4例

【経過観察のみ】

1症例：悪化傾向

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 分担研究報告書

アミロイドβ蛋白 (Aβ) オリゴマーの構造- 毒性相関

研究分担者 小野賢二郎 金沢大学大学院脳老化・神経病態学 (神経内科学)

共同研究者 David B Teplow*、山田正仁**

*Department of Neurology University of California at Los Angeles

**金沢大学大学院脳老化・神経病態学 (神経内科学)

研究要旨 我々は今までポリフェノール骨格をもつ様々な有機化合物がアミロイドβ蛋白 (Aβ) 凝集 (オリゴマー形成) を抑制し、かつ細胞毒性を軽減させることを *in vitro* 及び *in vivo* における実験にて証明してきた。Aβ凝集過程においてどの段階の凝集体が一番、活性が強いのかを明らかにするため、光誘発架橋法を用いてAβをオリゴマー化し、monomer、dimer、trimer、tetramerを分離して抽出し、各オリゴマーおよび成熟線維の二次構造、seed活性、形態、細胞毒性を比較検討した。monomerは、random coilで、dimer→tetramerは、order依存性にβシートの割合が増加し、形態学的にも特徴的变化を示した。また、seed活性や細胞毒性も二次構造の結果と相関して増強していた。Aβオリゴマーはオーダー依存性に構造活性や毒性が増強することが明らかになった。

A. 研究目的

アルツハイマー病 (AD) の病態において、β-アミロイド蛋白 (Aβ) の凝集・蓄積がADの発症機構に重要な役割を果たしていると考えられている (アミロイドカスケード仮説)。従来、脳アミロイドとして蓄積するAβ線維が神経毒性を發揮すると考えられていたが、最近、可溶性オリゴマーの毒性に注目が集まっている。我々は今までポリフェノール骨格をもつ様々な有機化合物がアミロイドβ蛋白 (Aβ) オリゴマー形成を抑制し、かつ細胞毒性を軽減させることを *in vitro* 及び *in vivo* における実験にて証明してきた。今回、Aβ凝集過程のどの段階の凝集体が一番、毒性が強いかを明らかにすることを主目的とした。

B. 研究方法

Photo-induced cross-linking of unmodified proteins (PICUP) を用いて Aβ をオリゴマー化し、SDS-PAGE による電気泳動後、ゲルを切り出し、monomer、dimer、trimer、tetramer を分離して抽出することを試みた。次に各オリゴマーおよびfibrilをCDスペクトロスコーピー (二次構造)、チオフラビンT法 (seed活性)、電子顕微鏡 (形態学的

観察)、原子間力顕微鏡 (形態学的観察)、nerve growth factor にて分化させた PC12 細胞を用いた MTT 及び LDH assay (細胞毒性) により Aβ の各凝集体の構造-毒性相関を検討した。

(倫理面への配慮)

問題なし。

C. 研究結果

monomer、dimer、trimer、tetramer を安定化した状態で分離・抽出することに成功した。monomer は、random coil で、dimer、trimer、tetramer は、order 依存性に β-sheet の割合や seed 活性が増加し、形態学的にも特徴的变化を示した。また、オリゴマー及び線維の毒性関係は、tetramer ≒ trimer > dimer ≒ fibril > monomer であった。

D. 考察

最近、Chimon は、non-fibrillar な Aβ 凝集体の構造および毒性の解析をし、n=150 でβシート構造を有し、monomer より大きい fibrils より小さい細胞毒性を有した high order な凝集体を報告しているが、今回の我々の研究では、より早期の段階、

すなわち、low-n order オリゴマー形成において、monomer から dimer への重合過程で 2 次構造が変化し、細胞毒性が増加し、order 依存性に β シートの割合だけでなく、細胞毒性も増加することを明らかにした。

近年、AD 患者の剖検脳を用いた実験にて A β dimer がシナプス毒性を有する最小単位であることが報告された。

今回の我々の結果と併せて monomer から dimer への重合を抑制することが AD の予防・治療の最重要ターゲットになり得ると考えられる。

E. 結論

オリゴマーは、order 依存性に構造活性や毒性が増強するが、特に monomer→dimer が重要な治療ターゲットになる可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ono K, Condrón MM, Teplow DB: Effects of the English (H6R) and Tottori (D7N) familial Alzheimer disease mutations on amyloid β -protein assembly and toxicity. *J Biol Chem* 285:23186-23197, 2010.
- 2) Morinaga A, Ono K, Ikeda T, Ikeda Y, Shima K, Noguchi-Shinohara M, Samuraki M, Yanase D, Yoshita M, Iwasa K, Mastunari I, Yamada M: A comparison of the diagnostic sensitivity of MRI, CBF-SPECT, FDG-PET and cerebrospinal fluid biomarkers for detecting Alzheimer's disease in a memory clinic. *Dement Geriatr Cogn Disord* 30:285-292, 2010.
- 3) Ikeda T, Ono K, Elashoff D, Condrón MM, Noguchi-Shinohara M, Yoshita M, Teplow DB, Yamada M: Cerebrospinal fluid from Alzheimer's disease patients promotes amyloid β -protein oligomerization. *J Alzheimers Dis* 21:81-86, 2010.
- 4) Hamaguchi T, Ono K, Yamada M: REVIEW: Curcumin and Alzheimer's disease. *CNS Neurosci Ther* 16:285-297, 2010.
- 5) Wang J, Santa-Maria I, Ho L, Ksiazak-Reding H,

Ono K, Teplow DB, Pasinetti GM: Grape derived polyphenols attenuate tau neuropathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 22:653-661, 2010.

6) Ono K, Yamada M: Low-n oligomers as therapeutic targets of Alzheimer's disease. *J Neurochem*, in press.

7) Wang J, Ono K, Dickstein D, Arrieta-Cruz I, Zhao W, Qian X, Lamparello A, Ferruzzi MG, Pavlides C, Ho L, Hof P, Teplow DB, Pasinetti GM: Carvedilol as a potential novel agent for the treatment of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, in press.

8) 小野賢二郎、山田正仁：アルツハイマー病患者の脳脊髄液は β アミロイド線維形成を促進する。 *老年期認知症研究誌* 16:15-117, 2010.

9) 小野賢二郎、山田正仁：A β 凝集阻害薬. *Prog Med* 30:2149-2152, 2010.

10) 小野賢二郎、山田正仁：A β 凝集の分子機構と治療. *Pharma Medica* 28:51-54, 2010.

11) 内木宏延、長谷川一浩、小野賢二郎、山田正仁：アミロイド線維形成の重合核依存性重合モデルと線維形成阻害薬の探索. *薬学雑誌* 130:503-509, 2010.

12) 小野賢二郎：アルツハイマー病 β アミロイド蛋白凝集過程における分子間相互作用. *神経化学* 49:933-943, 2010.

13) 小野賢二郎、山田正仁：アルツハイマー病の予防. *認知症の最新医療*, in press.

2. 学会発表

1) Ono K, Teplow DB, Condrón MM: Structure-neurotoxicity analysis of amyloid β -protein oligomers. Alzheimer's Association International Conference on Alzheimer's Disease 2010, Honolulu, 7.10-15, 2010.

2) Yamada M, Ono K, Hamaguchi T, Hirohata M, Morinaga A, Ikeda T: Phenolic compounds inhibit A β aggregation and prevent Alzheimer pathology in *in vitro* and *in vivo* models. Alzheimer's Association International Conference on Alzheimer's Disease 2010, Honolulu, 7.10-15, 2010.

3) Yamada M, Hamaguchi T, Ono K, Hirohata M, Morinaga A, Ikeda T, Takasaki J, Murase A: The

effects of phenolic compounds on A β aggregation and cerebral A β plaques and angiopathy. 2nd International CAA Conference, Los Angeles, 5.13-15, 2010.

4) Wang J, Santa-Maria I, Ho L, Ksiezak-Reding H, Ono K, Teplow DB, Pasinetti GM: Grape derived polyphenols attenuate tau neuropathology in the tmht mouse model of Alzheimer's disease. Neuroscience Nanosymposium 2010, San Diego, 11.13-17, 2010.

5) 小野賢二郎、Margaret M Condron、David B Teplow、山田正仁：アミロイド β 蛋白オリゴマーの構造—毒性相関。第 51 回日本神経学会総会、東京、5.20-22、2010。

6) 廣畑美枝、小野賢二郎、森永章義、池田篤平、高崎純一、山田正仁：多系統萎縮症脳脊髄液は α シヌクレイン凝集を促進する。第 51 回日本神経学会総会、東京、5.20-22、2010。

7) 森永章義、小野賢二郎、高崎純一、池田篤平、廣畑美枝、山田正仁：女性ホルモンの β アミロイドオリゴマー形成抑制作用。第 51 回日本神経学会総会、東京、5.20-22、2010。

8) 池田篤平、小野賢二郎、David Elashoff、Margaret M. Condron、篠原もえ子、吉田光宏、David B. Teplow、山田正仁：アルツハイマー病患者の脳脊髄液はアミロイド β 蛋白のオリゴマー化を促進する。第 51 回日本神経学会総会、東京、5.20-22、2010。

9) 島 啓介、佐村木美晴、柳瀬大亮、陳 偉萍、松成一朗、小野賢二郎、吉田光宏、山田正仁：MRI によるアルツハイマー病診断：側頭葉内側部と後部帯状回萎縮評価による診断精度向上。第 51 回日本神経学会総会、東京、5.20-22、2010。

10) 池田芳久、吉田光宏、町谷知彦、小野賢二郎、菊知 充、初坂奈津子、樋口正法、賀戸 久、山田正仁：アルツハイマー病における安静自発 MEG 脳表記録の検討。第 51 回日本神経学会総会、東京、5.20-22、2010。

11) 小野賢二郎：A β 凝集機構解明から予防・治療薬開発へ。第 29 回日本認知症学会学術集会、名古屋、11. 5-7、2010。

12) 小野賢二郎、David B Teplow、山田正仁：Structure-neurotoxicity relationships of amyloid β -protein oligomers. 第 29 回日本認知症学会学術集会、名古屋、11. 5-7、2010。

13) 廣畑美枝、小野賢二郎、森永章義、池田篤平、高崎純一、山田正仁： α -シヌクレノパチー患者の脳脊髄液の α シヌクレイン凝集促進効果。第 29 回日本認知症学会学術集会、名古屋、11. 5-7、2010。

14) 森永章義、小野賢二郎、廣畑美枝、高崎純一、池田篤平、山田正仁：女性ホルモンの β アミロイド線維及びオリゴマー形成抑制作用。第 29 回日本認知症学会学術集会、名古屋、11. 5-7、2010。

15) 高崎純一、小野賢二郎、池田篤平、森永章義、廣畑美枝、山田正仁：ビタミンによる A β オリゴマーの形成抑制効果。第 29 回日本認知症学会学術集会、名古屋、11. 5-7、2010。

H. 知的所有権の取得状況（予定を含む）

1. 特許取得

1) 発明の名称：アルツハイマー病の検査方法
特許番号：特許第 4568840 号
取得日：平成 22 年 8 月 20 日

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)
 アミロイドーシスに関する調査研究班 分担研究報告書

アミロイド蓄積に対する apolipoprotein E のアイソフォーム 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 ($A\beta$)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、 $A\beta$ 結合タンパク質の1つとして知られている。ヒト apoE には3種類の遺伝多型 ($\epsilon 2$ 、 $\epsilon 3$ 、 $\epsilon 4$)が存在し、 $\epsilon 4$ 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。これまでの解析から、 $\epsilon 4$ アレルの保有によりアミロイド蓄積量が増加することが明らかになっていることから、私達は apoE がアイソフォーム特異的に $A\beta$ 線維形成過程に、さらにはアミロイド蓄積量に影響を与えて AD 発症に関与する可能性を考えた。そこで、線維形成中間体であり、*in vitro* では線維形成過程における重合核 (seed)として線維形成促進に重要な役割を果たす protofibril に特に着目し、apoE が protofibril の重合核効果 (seed 効果)に及ぼす影響について、新規に作出した APP transgenic mouse の脳内に様々な凝集状態の $A\beta$ を注入する実験により検討を行った。その結果、免疫組織化学、生化学的定量のいずれにおいても、protofibril、fibril の注入によってアミロイド蓄積量が増加することが分かり、両者は *in vivo* でも seed 効果を持つことが示唆された。また apoE3 と apoE4 存在下で形成させた protofibril の注入による変化を比較すると、apoE4 の方がアミロイド蓄積量を増加させた。これらの結果から apoE はアイソフォーム特異的に protofibril の seed 効果を調節する可能性が示唆され、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アミロイド蓄積が進行しやすく、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 ($A\beta$)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、 $A\beta$ 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 ($\epsilon 2$ 、 $\epsilon 3$ 、 $\epsilon 4$)が存在し、 $\epsilon 4$ 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。今までに AD 患者あるいは外因性にヒト apoE を発現するノックインマウスの解析から、apoE4 では他のアイソフォームよりもアミロイド蓄積量が増加することが明らかになっていることから、

apoE がアイソフォーム特異的に $A\beta$ 線維形成過程に関与しアミロイド蓄積量に影響を与える可能性を考えた。そこで本研究では、特に線維形成中間体であり、*in vitro* では線維形成過程における重合核 (seed)として線維形成促進に重要な役割を果たす protofibril に着目し、apoE が protofibril の重合核効果 (seed 効果)に及ぼす影響を検討することを目的とした。

B. 研究方法

独自に作製した APP TG マウス (A7 マウス; Swedish/Austrian 変異)の脳内に $A\beta$ を注入し、注入後のアミロイド蓄積量を評価することでアミロイド蓄積に対する seed 効果を評価した。また、あらかじめ apoE とインキュベートした protofibril を

注入することにより、アミロイド蓄積に対する apoE の効果についてもアイソフォーム間で評価した。

(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 *in vivo* の脳内でも、**protofibril** が線維形成の **seed** 効果を有するかについて、A7マウスへの A β 脳内注入実験により検証した。その結果 **fibril**、**protofibril** の注入はともに注入部位近傍の A β 蓄積を増加させたことから、**protofibril** は *in vivo* においてもアミロイド形成の **seed** 効果を有することが示唆された。

次に apoE が **protofibril** の **seed** 効果に影響を及ぼしアミロイド蓄積量を変化させるかについて検討した。apoE4 存在下で形成させた **protofibril** の注入により apoE3 の場合と比べて A β 蓄積が増加した。この結果は apoE が **protofibril** の **seed** 効果を調節し、そのため apoE4 はアミロイド蓄積量を増加させる可能性を示唆する。

D. 考察

私達は昨年度 *in vitro* の検討において、apoE4 は apoE3 に比べ **protofibril** 安定化効果が弱く、早期に **fibril** が形成することを明らかにしている。またこの安定化効果の違いは、apoE と **protofibril** の間の結合状態の違いに起因する可能性も推測されている。そのため apoE4 存在下で作製した **protofibril** の注入によりアミロイド蓄積量が増加したのは、apoE アイソフォーム特異的な結合状態の違いによって **protofibril** の安定性が減弱し、**protofibril** の **seed** 効果が他のアイソフォームよりも増強されたためではないかと推測される。

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アミロイド蓄積が進行しやすく、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) Watanabe N, Takagi S, Tomita T, Iwatsubo T: Functional analysis of the transmembrane domains of presenilin 1: participation of transmembrane domains 2 and 6 in the formation of initial substrate binding site of γ -secretase. *J Biol Chem* 285:19738-19746, 2010.
- 2) Fukumoto H, Takahashi H, Tarui N, Matsui J, Tomita T, Hirode M, Sagayama M, Maeda R, Kawamoto M, Hirai K, Terauchi J, Sakura Y, Kakihana M, Kato K, Iwatsubo T, Miyamoto M: A non-competitive BACE1 inhibitor TAK-070 ameliorates A β pathology and behavioral deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 30:11157-11166, 2010.
- 3) Takagi S, Tominaga A, Sato C, Tomita T, Iwatsubo T: Participation of transmembrane domain 1 of presenilin 1 in the catalytic pore structure of the γ -secretase. *J Neurosci* 30:15943-15950, 2010.

2. 学会発表

- 1) Iwatsubo T: Molecular pathology of amyloid β peptides in Alzheimer's disease. XVIIth International Congress of Neuropathology, Salzburg, Sep 13, 2010.

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

スタチンのアミロイドβ蛋白産生抑制効果とそのメカニズム

研究分担者 玉岡 晃 筑波大学臨床医学系神経内科

共同研究者 織田彰子^{***}、本木和美^{**}、荒木 亘^{**}

*筑波大学臨床医学系神経内科、**国立精神・神経センター神経研究所

研究要旨 スタチン(HMG-CoA 還元酵素阻害剤)は、アルツハイマー病の有病率を減少させることや、アミロイドβ蛋白(Aβ)産生の減少効果および神経保護効果を有することが報告されている。スタチンはメバロン酸(MVA)経路を阻害してコレステロールやイソプレノイドの合成を減少させるため、スタチンの効果にはこれらの減少が関与していると考えられているが、詳細は不明である。本研究では、ラット初代培養大脳皮質神経細胞を pitavastatin (PV)で処理し、Aβ分泌および細胞内蛋白質の変化を検討した。PV 処理により、Aβ分泌が減少し、細胞内 amyloid precursor protein (APP)の減少および成熟化の変化を認めた。これらの変化は MVA の共処理により抑制され、geranylgeranylpyrophosphate (GGPP)の共処理では抑制されなかった。スタチンは APP の減少および成熟化の変化を介して Aβ産生を抑制する可能性が考えられ、その機序にはイソプレノイドの減少よりもコレステロールの減少が関与している可能性が考えられた。

A. 研究目的

スタチン(HMG-CoA 還元酵素阻害剤)は、コレステロール低下薬として広く使用されている薬剤であるが、アルツハイマー病(Alzheimer's disease;AD)の有病率を減少させることが示唆された。その後、スタチンが AD 病態の中心的因子であるアミロイドβ蛋白(Aβ)の産生を減少させることや、神経保護効果を有する可能性も指摘されるようになった。スタチンは、メバロン酸(MVA)経路において、HMG-CoA の還元による MVA 生成を阻害する薬剤であり、MVA 経路はコレステロール合成の他、イソプレノイドである farnesylpyrophosphate (FPP) や geranylgeranylpyrophosphate (GGPP)の産生に関わる(図 1)。スタチンの AD に対する効果には、コレステロールの減少やイソプレノイドの減少が関与していると考えられてきているが、その詳細な機序はまだ不明である。今回我々は、ラット初代培養神経細胞を pitavastatin (PV)で処理した培養系を用いて、スタチンによる Aβの減少効果とその機序について検討した。

B. 研究方法

1. PV 処理の、Aβ分泌および細胞内 amyloid precursor protein (APP), β-site APP-cleaving enzyme 1 (BACE1), γセクレターゼ複合体に対する影響

ラット初代培養大脳皮質神経細胞を7日間培養した後、PV (0.1~5 μM)で4日間または7日間処理し、培養液中の Aβ40, Aβ42 レベルをサンドイッチ ELISA 法で測定した。また、細胞内蛋白質の変化をウエスタンブロットで解析した。

2. PV と MVA の共処理

ラット初代培養大脳皮質神経細胞を、PV (2.5 または 5 μM)と、MVA (0.5 または 1 mM)で7日間共処理した。培養液中の Aβ40, Aβ42 レベル、細胞内 APP の変化を上記と同様に解析した。

3. 細胞内総コレステロールの定量

ラット初代培養大脳皮質神経細胞を、PV (2.5 または 5 μM)で7日間処理し、細胞内総コレステロールレベルを Cholesterol/Cholesteryl Ester Quantitation Kit (BioVision)を用いた比色法により測定した。

4. PV と GGPP の共処理

ラット初代培養大脳皮質神経細胞を、PV (2.5

または 5 μ M)と, GGPP (2.5 または 5 μ M)で 7 日間共処理した. 培養液中の A β 40, A β 42 レベル, 細胞内 APP の変化を検討した.

(倫理面への配慮)
問題なし

C. 研究結果

1. PVによるA β 分泌の変化および細胞内APP, BACE1, γ セクレターゼ複合体の変化

ラット初代培養大脳皮質神経細胞をPVで処理した場合, 培養液中のA β 40, A β 42ともにPVの用量依存性に減少した(図2). 細胞内APPレベルはPVの用量依存性に減少した. PV 5 μ M処理では成熟型APPの分子サイズの減少も認めた(図3). これらの変化は, PV処理後4日後よりも7日後の方がより強かった. BACE1や γ セクレターゼ複合体因子の蛋白レベルには変化が認められなかった.

2. PVによるA β 分泌および細胞内APPの変化に対するMVAの効果

PVとMVAの共処理により, PVによるA β 分泌量の減少が抑制され, 同時に細胞内APPの変化も抑制された.

3. PVによる細胞内総コレステロールレベルの変化

PV処理により, 細胞内総コレステロールレベルが減少し, MVAの共処理によりその減少は抑制された.

4. PVによるA β 分泌および細胞内APPの変化に対するGGPPの効果

PVとGGPPの共処理では, PVによるA β 分泌量の減少や細胞内APPの変化は影響を受けなかった.

D. 考察

我々は本研究において, PV 処理により初代培養大脳皮質神経細胞における A β 分泌が減少し, また細胞内 APP レベルの減少および成熟型 APP の分子サイズが減少することを観察した. また, 上記の変化は MVA との共処理により妨げられたが, GGPP との共処理では妨げられなかった. さらに PV 処理により細胞内総コレステロールレベルが減少したが, MVA との共処理で減少が抑制された. これらの結果は, PV が APP の減少およ

び成熟化の変化を介して A β 産生を減少させることを示唆し, そしてこの APP と A β の変化には GGPP の減少ではなく, コレステロールの減少が影響している可能性を示唆している. 今後はさらに, スタチンによる A β 産生抑制の詳細なメカニズムの解明を進める予定である.

E. 結論

スタチンは APP の減少および成熟化の変化を介してA β 産生を減少させる可能性が考えられた. またその機序には, イソプレノイドの減少よりもコレステロールの減少が関与している可能性が考えられた.

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Matsumoto L, Takuma H, Tamaoka A, Kurisaki H, Date H, Tsuji S, Iwata A: CpG demethylation enhances alpha-synuclein expression and affects the pathogenesis of Parkinson's disease. *PLoS One* 5:e15522, 2010.

2) Tomidokoro Y, Tamaoka A, Holton JL, Lashley T, Frangione B, Revesz T, Rostagno A, Ghiso J: Pyroglutamate formation at the N-termini of ABri molecules in familial British dementia is not restricted to the central nervous system. *Hiroaki Igaku* 61(Suppl):S262-S269, 2010.

3) Tokuda T, Qureshi MM, Ardah MT, Varghese S, Shehab SA, Kasai T, Ishigami N, Tamaoka A, Nakagawa M, El-Agnaf OM: Detection of elevated levels of α -synuclein oligomers in CSF from patients with Parkinson disease. *Neurology* 75:1766-1772, 2010.

4) Araki W, Kametani F, Oda A, Tamaoka A: MEK inhibitors suppress β -amyloid production by altering the level of a β -C-terminal fragment of amyloid precursor protein in neuronal cells. *FEBS Lett* 584:3410-3414, 2010.

5) Ishi K, Hosaka A, Adachi K, Nanba E, Tamaoka A: A Japanese case of Fragile-X-associated tremor/ataxia

- syndrome (FXTAS). *Intern Med* 49:1205-1208, 2010.
- 6) Hirohata M, Yoshita M, Ishida C, Ikeda S-I, Tamaoka A, Kuzuhara S, Shoji M, Ando Y, Tokuda T, Yamada M: Clinical features of non-hypertensive lobar intracerebral hemorrhage related to cerebral amyloid angiopathy. *Eur J Neurol* 17:823-829, 2010.
- 7) Tamaoka A, Arai M, Itokawa M, Arai T, Hasegawa M, Tsuchiya K, Takuma H, Tsuji H, Ishii A, Watanabe M, Takahashi Y, Goto J, Tsuji S, Akiyama H: TDP-43 M337V mutation in familial amyotrophic lateral sclerosis in Japan. *Intern Med* 49:331-334, 2010.
- 8) Oda A, Tamaoka A, Araki W: Oxidative stress up-regulates presenilin 1 in lipid rafts in neuronal cells. *J Neurosci Res* 85:1137-1145, 2010.
- 9) 辻 浩史、長谷川成人、玉岡 晃：ALSの病態 - TDP-43の観点から. *医学のあゆみ* 235:231-235, 2010.
- 10) 玉岡 晃：MCI 段階を含む早期 AD に対する薬物介入 - いつから薬物投与を開始すべきか. *Prog Med* 30:47-51, 2010.
- 11) 玉岡 晃：嗅覚と神経疾患 - アルツハイマー病 -. *Clinical Neuroscience* 28:1296-1299, 2010.
- 12) 玉岡 晃：薬物治療の原則と実際. *Clinical Neuroscience* 28:1037-1039, 2010.

2. 学会発表

- 1) 玉岡 晃：アルツハイマー病（1）：概念，疫学，病因，病態. 第4回日本認知症学会教育セミナー、名古屋、11.7、2010.
- 2) 富所康志、玉岡 晃、Blas Frangione、Jorge Ghiso：Familial British Dementia の中枢神経、末梢組織並びに脳脊髄液におけるアミロイド分子 N 末端の翻訳後修飾. 第29回日本認知症学会学術集会、名古屋、11.5、2010.
- 3) 赤松 恵、富所康志、加治優一、大鹿哲郎、玉岡 晃：白内障水晶体におけるアミロイドβペプチドの定量化の可能性 - 非認知症患者検体での検討. 第29回日本認知症学会学術集会、名古屋、11.5、2010.
- 4) 辻 浩史、詫間 浩、中馬越清隆、富所康志、石井亜紀子、石井一弘、渡邊雅彦、山下万貴子、野中 隆、亀谷富由樹、新井哲明、長谷川成人、秋山治彦、玉岡 晃：TDP-43 proteinopathy に認め

- る TDP-43 蛋白 C 末断片に関する検討. 第29回日本認知症学会学術集会、名古屋、11.5、2010.
- 5) 荒木 亘、本木和美、織田彰子、篠崎綾子、久米秀明、北條浩彦、玉岡 晃：ALS 関連変異による TDP-43 のリン酸化の促進. 第29回日本認知症学会学術集会、名古屋、11.5、2010.
- 6) 玉岡 晃：認知症の診断と治療の実際. 平成22年度日本内科学会生涯教育講演会、金沢、9.12、2010.
- 7) 玉岡 晃：認知症の診断と治療の実際. 平成22年度日本内科学会生涯教育講演会、横浜、5.30、2010.
- 8) 徳田隆彦、笹井高士、石神紀子、中川正法、玉岡 晃、Omar El-Agnaf：ヒト髄液中のα-synuclein oligomerの検討. 第51回日本神経学会総会、東京、5.22、2010.
- 9) 荒木 亘、織田彰子、玉岡 晃：MEK阻害剤のβアミロイド産生低下作用. 第51回日本神経学会総会、東京、5月20日、2010.
- 10) 玉岡 晃、辻 浩史、詫間 浩、新井 誠、小幡菜々子、糸川昌成、新井哲明、長谷川成人、塩谷彩子、石井亜紀子、石井一弘、秋山治彦：SOD 1 遺伝子変異L144FVXを有する家族性ALSの臨床的特徴について. 第51回日本神経学会総会、東京、5.20、2010.
- 11) 石井亜紀子、詫間 浩、辻 浩史、塩谷彩子、保坂 愛、中馬越清隆、大越教夫、石井一弘、渡邊雅彦、玉岡 晃：末梢神経疾患におけるTDP-43の免疫組織学的検討. 第51回日本神経学会総会、東京、5.20、2010.
- 12) 赤松 恵、富所康志、加治優一、大鹿哲郎、玉岡 晃：認知症を伴わない白内障患者の水晶体におけるアミロイドβペプチドの解析. 第51回日本神経学会総会、東京、5.20、2010.
- 13) 辻 浩史、長谷川成人、野中 隆、新井哲明、山下万貴子、亀谷富由樹、秋山治彦、詫間 浩、富所康志、中馬越清隆、石井亜紀子、石井一弘、渡邊 雅彦、玉岡 晃：筋萎縮性側索硬化症に蓄積するTDP-43蛋白C末端断片に関する検討. 第51回日本神経学会総会、東京、5.20、2010.
- 14) 織田彰子、荒木 亘、玉岡 晃：酸化ストレスはPS 1 蛋白の発現を増加させ、Aβの産生を促進する. 第51回日本神経学会総会、東京、5.22、2010.

15) 富所康志、玉岡 晃、Blas Frangione、Jorge Ghiso : Familial British Dementiaアミロイド分子N末端のピロ化は中枢神経系に限定されない. 第51回日本神経学会総会、東京、5.22、2010.

16) 松本ルミネ、岩田 淳、古和久朋、詫間 浩、玉岡 晃、栗崎博司、辻 省次 : ヒト剖検脳における α -シヌクレイン遺伝子発現とDNAメチル化の解析. 第51回日本神経学会総会、東京、5.22、2010.

17) 詫間 浩、山下雄也、石井一弘、郭 伸、玉岡 晃 : 筋萎縮性側索硬化症患者白血球における新規RNA editing部位の検討. 第51回日本神経学会総会、東京、5.22、2010.

18) 玉岡 晃 : 認知症の診断と治療の実際. 平成22年度日本内科学会生涯教育講演会、大阪、2.7、2010.

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

なし

3. その他

なし

図1. メバロン酸経路

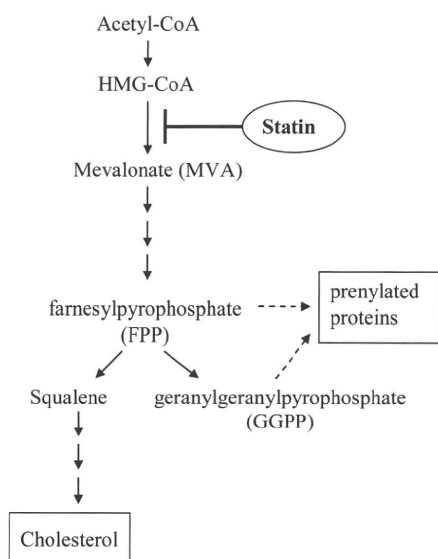


図2. PV処理(7日間)による培養上清中の Aβレベルの変化

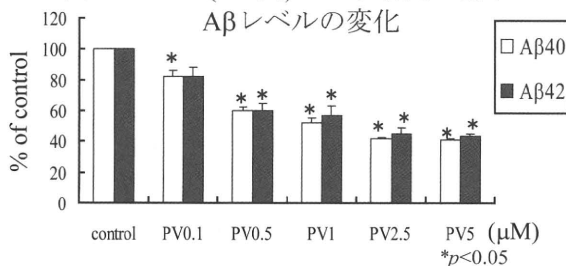


図3. PV処理(7日間)による細胞内APPの変化

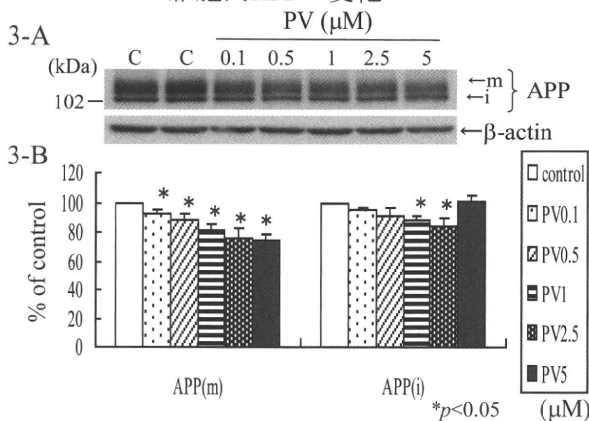


図 1. メバロン酸経路

メバロン酸経路では、コレステロールの他、イソプレノイドである farnesylpyrophosphate と geranylgeranylpyrophosphate が産生される。スタチンは、HMG-CoA の還元によるメバロン酸の生成を阻害する。

図 2. PV 処理(7 日間)による培養上清中の Aβレベルの変化

サンドイッチ ELISA 解析：PV の用量依存性に Aβ40, Aβ42 レベルが減少し、PV 5 μM では Aβ40, Aβ42 レベルがいずれも対照と比べ約 40%に減少した。

図 3. PV 処理(7 日間)による細胞内 APP の変化

3-A. ウェスタンブロット解析：PV 処理により、APP レベルは減少し、PV 5 μM では成熟型 APP の分子サイズの減少も認めた。m;mature, i;immature

3-B. A における APP の定量：PV の用量依存性に、成熟型優位に APP の減少を認め、PV 5 μM では成熟型 APP レベルが対照の約 75%に減少した。m;mature, i;immature

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)
 アミロイドーシスに関する調査研究班 分担研究報告書

エストロゲンのアルツハイマー病 β アミロイドオリゴマー形成に与える影響

研究分担者 山田正仁 金沢大学大学院脳老化・神経病態学 (神経内科学)

共同研究者 森永章義^{*}、^{**}、小野賢二郎^{*}、高崎純一^{*}、池田篤平^{*}、^{***}、廣畑美枝^{*}、^{***}

^{*}金沢大学大学院脳老化・神経病態学 (神経内科学)、^{**}石川県立中央病院、

^{***}独立行政法人国立病院機構医王病院

研究要旨 近年の疫学調査では、エストロゲンが Alzheimer 病(AD)発症の危険率を低下させ、その発症を遅延させる可能性が指摘されている。エストロゲンが β アミロイド蛋白(A β)オリゴマー形成過程に及ぼす効果を明らかにするため、エストロゲン(エストロン(E1)、エストラジオール(E2)、エストリオール(E3))と他の性ホルモン(アンドロステンジオン(AND)、テストステロン(TES)) 存在下にて、A β (1-40)または A β (1-42)を Photo-Induced Cross-Linking of Unmodified Proteins (PICUP)により安定化したオリゴマーとし、SDS-PAGE で定性的に、デンシトメトリーで半定量的に、電子顕微鏡で形態的に *in vitro* で解析した。A β (1-40)では E1、E2、E3 がオリゴマー形成を、A β (1-42)では検討した全ての性ホルモンでオリゴマー形成を抑制した。これらのホルモンでの抗オリゴマー効果は、E3 >> E2 = E1 >= AND = TES であった。エストロゲンは A β オリゴマー形成抑制作用をもち、生体内で AD 発症に抑制的に働いている可能性がある。エストロゲンまたはその類似構造をもつ化合物による A β オリゴマーの形成抑制は治療ターゲットとなり得る。

A. 研究目的

β アミロイド蛋白(A β)が凝集し沈着することが Alzheimer 病(AD)発症に中心的な役割を果たしており、なかでも A β 数個の凝集体であるオリゴマーの毒性が高く、神経機能が阻害される機序の1つと考えられている。

一方、近年の疫学調査で、男性よりも女性の方が AD の発症率が高いこと、ホルモン補充療法を受けている女性では AD の発症率が低いことが報告され女性ホルモンが AD の発症率を低下させ、その発症を遅延させる可能性が指摘されている。この機序としては女性ホルモンがアミロイド前駆蛋白から β アミロイド蛋白(A β)の産生を抑制すること、クリアランスなどに影響を及ぼし脳内の A β 量を減少させること、抗酸化作用を有すること、シナプスの可塑性を向上させることなどが報告されている。我々も β アミロイド線維の形成過程および不安定化過程に女性ホルモンが直接影響を及ぼすことを報告した。今回、我々は A β オリゴマー形成反応における女性ホルモンの効果を

検討した。

B. 研究方法

0-250 μ M のエストロゲン(エストロン(E1)、エストラジオール(E2)、エストリオール(E3))または他の性ホルモン(アンドロステンジオン(AND)、テストステロン(TES))存在下にて、25 μ M の A β (1-40) または A β (1-42) を Photo-Induced Cross-Linking of Unmodified Proteins (PICUP)により安定化したオリゴマーとし、SDS-PAGE で定性的に、デンシトメトリーで半定量的に、電子顕微鏡で形態的に *in vitro* で解析した。

(倫理面への配慮)

本検討では市販の化合物のみを用いており、倫理面への配慮は不要である。

C. 研究結果

A β (1-40)ではE1、E2、E3がオリゴマー形成を、A β (1-42)ではE1、E2、E3の方が効果は強いものの

検討した全ての性ホルモンでオリゴマー形成を濃度依存的に抑制した。これらのホルモンでの抗オリゴマー効果の強弱の関係は、 $E3 \gg E2 = E1 \gg AND = TES$ であった。

D. 考察

今回検討した E1、E2、E3、AND、TES は非常に類似した構造をもっているにも関わらず、抗オリゴマー効果に違いが認められた。この抗オリゴマー効果の強弱の関係は抗アミロイド効果の強弱の関係と類似しており、抗アミロイド効果については水酸基との関連が示唆されている。また、既に報告されている抗オリゴマー効果をもつ物質も複数の水酸基を有しており、抗オリゴマー効果についても水酸基との関連性が考えられている。今回、最も強い抗オリゴマー効果が認められた E3 は perhydrocyclopentanophenanthrene 環の C16 位に水酸基をもっており、E1、E2、E3 では AND、TES と異なり C3 位に共通して水酸基を持つことが影響しているのではないかと考えた。一方、C17 位の水酸基の有無は抗オリゴマー効果に影響を及ぼさないと考えられた。

今回の我々の検討では抗オリゴマー効果を示すために必要なエストロゲン濃度は最も効果の強い E3 で $25 \mu M$ 、E1 や E2 では $250 \mu M$ であった。E3 の髄液中の濃度やホルモン補充療法後の濃度についてはデータがない。E2 については生体内での髄液中の濃度やホルモン補充療法後の髄液中の濃度の予測値と比較してもはるかに高いものであった。しかし、低濃度であっても生体内では長期間のエストロゲンへの暴露により抗オリゴマー効果を示している可能性はあると思われた。

E. 結論

エストロゲンは $A\beta$ オリゴマー形成抑制作用をもち、生体内で AD 発症に抑制的に働いている可能性がある。エストロゲンまたはその類似構造をもつ化合物による $A\beta$ オリゴマーの形成抑制は治療ターゲットとなり得る。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Morinaga A, Ono K, Ikeda T, Ikeda Y, Shima K, Noguchi-Shinohara M, Samuraki M, Yanase D, Yoshita M, Iwasa K, Mastunari I, Yamada M: A comparison of the diagnostic sensitivity of MRI, CBF-SPECT, FDG-PET and cerebrospinal fluid biomarkers for detecting Alzheimer's disease in a memory clinic. *Dement Geriatr Cogn Disord* 30: 285-292, 2010.
- 2) 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 $A\beta$ amyloid fibrils at low concentrations of $A\beta$ monomers. *Biochim Biophys Acta* 1804: 986-995, 2010.
- 3) Ikeda T, Ono K, Elashoff D, Condrón MM, Noguchi-Shinohara M, Yoshita M, Teplow DB, Yamada M: Cerebrospinal fluid from Alzheimer's disease patients promotes amyloid β -protein oligomerization. *J Alzheimers Dis* 21: 81-86, 2010.
- 4) Hamaguchi T, Ono K, Yamada M: REVIEW: Curcumin and Alzheimer's disease. *CNS Neurosci Ther* 16: 285-297, 2010.
- 5) Hirohata M, Yoshita M, Ishida C, Ikeda S, Tamaoka A, Kuzuhara S, Shoji M, Ando Y, Tokuda T, Yamada M: Clinical features of non-hypertensive lobar intracerebral hemorrhage related to cerebral amyloid angiopathy. *Eur J Neurol*, 17: 823-829, 2010.
- 6) Ono K, Yamada M: Low-n oligomers as therapeutic targets of Alzheimer's disease. *J Neurochem*, in press.
- 7) 山田正仁：アルツハイマー病—診断と治療の進歩. *日本医師会雑誌* 139:866-868, 2010.
- 8) 山田正仁： $A\beta$ 免疫療法の臨床試験. *Dementia Japan* 24: 122-128, 2010.
- 9) 山田正仁：アルツハイマー病への新たな挑戦—AD 治療薬登場後の 10 年と今後—. *Prog Med* 30:2069-2070, 2010.
- 10) 小野賢二郎、山田正仁： $A\beta$ 凝集阻害薬. *Prog Med* 30:2149-2152, 2010.
- 11) 小野賢二郎、山田正仁：アルツハイマー病患者の脳脊髄液は β アミロイド線維形成を促進する. *老年期認知症研究誌* 16: 115-117, 2010.