

- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) 吉田光宏、山田正仁：脳アミロイドアンギオパチー：病態と診断の進歩. *分子脳血管病* 9:190-197, 2010.
- 15) 吉田光宏、山田正仁：アルツハイマー病以外の認知症をどう見分けるか. *成人病と生活習慣病* 40:176-184, 2010.
- 16) 吉田光宏、山田正仁：Lewy 小体型認知症 2) 検査所見と診断. *神経内科* 72(Suppl 6):342-348, 2010.
- 17) 石田千穂、山田正仁：脳アミロイドアンギオパチー. *Clinical Neuroscience* 28:683-685, 2010.
- 18) 篠原もえ子、山田正仁：アルツハイマー病の脳脊髄液検査. *Clinical Neuroscience* 28:1023-1025, 2010.
- 19) 柳瀬大亮、山田正仁：認知症の診断と治療 ① アルツハイマー病. *からだの科学* 265:57-60, 2010.
- 20) 池田篤平、山田正仁：アルツハイマー病の危険因子. *BRAIN and NERVE - 神経研究の進歩* 62:679-690, 2010.
- 21) 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.
- 22) 廣畑美枝、山田正仁：脳アミロイドアンギオパチー：疫学と臨床像. *神経内科*, in press.
- 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) 山田正仁：アルツハイマー病の治療・予防法の開発. 第 15 回日本神経精神医学会、東京、12.3-4、2010.
- 5) 山田正仁：認知症患者の診かたー神経内科の立場から. 第 51 回日本神経学会総会、東京、5.20-22、2010.
- 6) 小野賢二郎、Margaret M Condrón、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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 池田篤平、小野賢二郎、David Elashoff、Margaret M. Condrón、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.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 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、

2. 学会発表

- 1) 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.
- 2) Morinaga A, Hasegawa K, Nomura R, Ookoshi T, Ozawa D, Goto Y, Yamada M, Naiki H: The role of interfaces and agitation on the fibril formation of amyloid β -protein. Alzheimer's Association International Conference on Alzheimer's Disease 2010, Honolulu, 7.10-15, 2010.

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 $A\beta$ 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)
 アミロイドシスに関する調査研究班 分担研究報告書

Aβ amyloidosis と tauopathy による認知症発症病態の検討

研究分担者 東海林幹夫 弘前大学医学部脳神経内科

共同研究者 瓦林 毅、若佐谷保仁、渡辺有希子、高村歩美、松原悦朗、
 弘前大学医学部脳神経内科

研究要旨 もの忘れ外来では AD と MCI で約 60% を占め (AD 37%、MCI 20%)、MCI の増加が明らかであった。CSF biomarker では AD で感度 90% 特異性 82%、MCI で感度 90%、特異性 62% であり、MCI では CSF Aβ40/42 が最も優れていた。PCA の 1 例で amyloid PET と CSF biomarker で AD と診断可能であった。TgTauP301L では、CSF と plasma に 68kD tau が存在し、脳不溶性 tau 蓄積と関連していた。Aβ amyloidosis およびコレステロール輸送障害はリン酸化 tau の蓄積を誘発した。Tauopathy における NFT と神経細胞死出現には、5 biological pathway と 24 遺伝子の発現変化が関連しており、tau 蓄積から NFT 形成、神経細胞死、認知症の発症のカスケードには多くの biological pathway と関連遺伝子の変動がみられるものと考えられた。

A. 研究目的

我々はもの忘れ外来を立ち上げ、アルツハイマー病(AD)をはじめとする脳アミロイド疾患で脳脊髄液(CSF)バイオマーカーを再検討すると共に、疾患モデルマウスを用いて Aβ amyloidosis による最終的な認知症発症に関連する tauopathy 誘発機序について検討を行った。

B. 研究方法

弘前大学病院もの忘れ外来を 2006 年から 2010 年度に受診した患者 558 例の解析を行った。このうち 239 例で CSF Aβ40、Aβ42、tau および血漿 Aβ40、42 の測定を行い、バイオマーカーとしての有用性を検討した。特殊な脳アミロイドシスとして Posterior cortical atrophy(PCA)を解析した。

我々の開発した tau 発現 transgenic mouse TgTauP301L で CSF tau の由来を検討した。CSF および plasma を tau 抗体 BT2 で免疫沈降し、western blotting を行い我々の開発した中枢 tau 特異抗体 tau-B で検出した。CSF tau を Innogenetics の INNOTEST® hTau Ag を用いて測定し、脳病理および脳 tau 蓄積との比較検討を行った。

Aβ による tauopathy 誘発機序の解析のために Aβ アミロイド蓄積マウス Tg2576 と TgTauP301L

マウスとの double transgenic mouse を作製し、多数例を長期間追跡検討して、脳アミロイド、NFT 出現の統計的解析を行った。

コレステロール代謝障害による tau 蓄積誘発の解析のため TgTauP301L と Niemann-Pick type C1 (NPC1)モデルマウスを掛け合わせた double transgenic mouse で tau 蓄積過程を検討した。

tau 蓄積から NFT 形成と神経細胞死に至るカスケードを検討するために TgTauP301L で NFT と神経細胞死を有するマウスと有さないマウス脳で Affymetrix Mouse Genome 430 2.0 による oligonucleotide microarray で比較解析を行った。さらに得られた関連遺伝子について TgTauP301L、ヒトにおいて蛋白レベルでの検証を行った。

(倫理面への配慮)

研究に当たっては、当該施設の倫理委員会の承認を得た。弘前大学動物実験倫理規定に従い、動物愛護や遺伝子組み換えに関する法律や取り決めを遵守した。

C. 研究結果

5 年間で患者総数は 558 人であり、そのうち AD が 37%、軽度認知障害(MCI)が 20%、レビー小体

型認知症が 9%と続いた。MCI と診断される患者が著明に増加していることが特徴的で、平均 74 歳、MMS は 25 点であった。このうち CSF A β 40/42 ratio、CSF tau および AD index (CSF A β 40/42xtau) は AD と MCI で有意な増加を認めた。血漿 A β 40/42ratio は AD で有意に増加した。感度を 90% に固定すると AD では AD index、A β 40/42ratio、tau とも特異性は 82%で、診断に有用なレベルであった。MCI では CSF A β 40/42 ratio¹¹ の特異性が 62% と最も高く、A β ratio の変化が MCI では重要と考えられた。

この群で興味深い症例を認めた。患者は 61 歳の男性で目が見えないという症状が始まり、神経心理検査で精神性注視麻痺、視覚性注意障害など Bálint 症候群と視覚性失認を認め、posterior cortical atrophy と診断した。MRI では頭頂後頭葉萎縮、FDG-PET で右有意の頭頂後頭葉糖代謝低下を認めた。BF-227 によるアミロイド PET では後頭葉から側頭葉にかけて集積増加を認め、CSF AD index は上昇したことから、臨床的に AD と診断された。

CSF tau は AD で著明に増加し、CBD、FTD、PSP などの Tauopathy で軽度増加を認めるが、その上昇機序は明らかではない。CSF tau の由来について TgTauP301L マウスを用いて検討した。TgTauP301L マウスの CSF と plasma には 68kd の full length tau と考えられるバンドが確認された。脳に神経原線維変化を認めるマウスおよび脳不溶性 tau の増加したマウスで CSF tau の増加を認めた。よって CSF tau は脳不溶性 tau 蓄積と関連を認めた。

Tg2576 マウスと TgTau P301L との double transgenic mouse では A β amyloidosis、tauopathy とも single Tg でみられた経時的蓄積と当初変化はみられなかったが、23 月齢でリン酸化 tau 蓄積の促進が認められた。リン酸化 tau 陽性の pretangle の出現頻度が有意に増加し、脳 sarkosyl 不溶性分画中のリン酸化 tau が増加した。この検討から A β 蓄積による NFT 誘発機序は細胞内リン酸化 tau 蓄積を増加することによるが、その作用は決して迅速で強力なものではないと考えられた。

Niemann-Pick type C (NPC1) は NPC1 変異によるコレステロールの細胞内輸送障害が原因である

が、患者脳には 20 代から AD と同様の神経原線維変化が大量に出現する。コレステロール代謝障害が tau 蓄積を変化させるかを NPC1 モデルマウスと TgTauP301L mice との掛け合わせで検討した。tau プラスで変異 NPC homozygous マウスの大脳皮質では 2 月齢で腫大神経突起にヒト tau、リン酸化 tau が蓄積した。この tau 蓄積は蛍光二重染色で lipid rafts のマーカー flotillin と共存していた。tau プラスで変異 NPC heterozygous マウスでは 20 月齢でリン酸化 tau 陽性の pretangle の形成が促進されていた。脳蔗糖分画では tau プラスで homozygous、heterozygous マウスとも lipid rafts 分画に tau、リン酸化 tau が増加した。以上の検討から NPC1 遺伝子の loss of function によるコレステロール代謝障害は lipid rafts に tau、リン酸化 tau の蓄積を生じて NFT を蓄積させる可能性が考えられた。

次に tau 蓄積から NFT 形成と神経細胞死に至るカスケードの検討を行った。TgTauP301L マウスが著明な phenotypic variation を示すことから、NFT と神経細胞死を起こすマウスと起こさないマウス脳を oligonucleotide array で比較解析した。NFT 形成と神経細胞死に関連して oxidative stress、apoptosis、mitochondrial fatty acid β oxidation、inflammatory response pathway、complement and coagulation cascades pathway の 5 つの biological pathway が変動した。既知の 17 遺伝子に 2 倍以上の発現増加を、7 遺伝子に 0.5 倍以下の発現低下を認めた。このうち抗体による検討が可能であった ApolipoproteinD (ApoD)、doublecortin (DCX)、neuronal PAS domain protein 4 (Npas4) および potassium channel voltage-gated shaker-related subfamily β member 1 (Kcnab1) について蛋白レベルでの検証を行うと。NFT と神経細胞死のある TauTg では免疫染色、western blot とも DCX と Kcnab は減少し、ApoD と Npas4 は増加し、蛋白レベルでも DNA microarray と同じ変化が確認された。またヒト tauopathy でも、免疫染色で同じ変化が認められた。

D. 考察

もの忘れ外来では AD と MCI で約 60% を占め、MCI の増加が明らかであった。CSF biomarker の検討では従来我々が報告してきた AD 診断の有用性がこの新しい群でも確認された。MCI では CSF

Aβ40/42 ratio が最も優れていたが特異度 62%と低かった。今後の follow up で AD への converter と非 converter の比較を行い、CSF Aβ40/42 ratio が MCI から AD への進行を予測するマーカーになり得るかどうかを検討する予定である。PCA の 1 例で amyloid PET と CSF biomarker は AD と診断するのに有用であった。CSF tau の由来について TgTauP301L で検討し、CSF tau が脳不溶性 tau 蓄積と関連することを示した。AD や FTD における CSF tau 増加にもこのような相関が見られるものと想定され、ヒト脳と CSF で検討中である。Aβ amyloidosis およびコレステロール輸送障害は p-tau 蓄積誘発によって NFT 形成を引き起こすと考えられた。一方、tauopathy における NFT と神経細胞死出現には、5 biological pathway と 24 遺伝子の発現変化が関連しており、tau 蓄積から NFT 形成、神経細胞死、認知症の発症のカスケードには多くの biological pathway と関連遺伝子の変動がみられるものと考えられた。今後、残りの遺伝子発現の検証を行った後、治療対照となる重要分子の絞り込みを行う予定である。

E. 結論

AD 診断における CSF biomarker の有用性が確認された。CSF tau は脳の不溶性 tau 蓄積と関連するものと考えられた。Aβ amyloidosis および NPC1 遺伝子異常によるコレステロール輸送障害は p-tau 蓄積を誘発することによって NFT 形成を促進すると考えられた。tau 蓄積から NFT 形成、神経細胞死、認知症の発症のカスケードには多くの biological pathway と関連遺伝子の変動がみられるものと考えられた。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Takamura A, Kawarabayashi T, Yokoseki T, Shibata M, Morishima-Kawashima M, Saito Y, Murayama S, Ihara Y, Abe K, Shoji M, Michikawa M, Matsubara E: Dissociation of Aβ from lipoprotein in cerebrospinal fluid from Alzheimer's disease

accelerates Aβ42 assembly. *J Neurosci Res*, in press.

2) Wakasaya Y, Kawarabayashi T, Watanabe M, Yamamoto-Watanabe Y, Takamura A, Kurata T, Murakami T, Abe K, Yamada K, Wakabayashi K, Sasaki A, Westaway D, Hyslop PS, Matsubara E, Shoji M: Factors responsible for neurofibrillary tangles and neuronal cell losses in tauopathy. *J Neurosci Res*, in press.

3) Seino Y, Kawarabayashi T, Wakasaya Y, Takamura A, Nakahata N, Watanabe M, Yamamoto-Watanabe Y, Matsubara E, Westaway D, Davis P, St.George-Hyslop P, Shoji M: Aβ amyloid accelerates accumulation of phosphorylated tau in neuronal cytoplasm and processes of double transgenic mice. *J Neurosci Res* 88:3547-3554, 2010.

4) Yamamoto-Watanabe Y, Watanabe M, Okamoto K, Fujita Y, Jackson M, Ikeda M, Nakazato Y, Ikeda Y, Matsubara E, Kawarabayashi T, Shoji M: A Japanese ALS6 family with mutation R521C in the FUS/TLS gene: a clinical, pathological and genetic report. *J Neurol Sci* 296:59-63, 2010.

5) Yamamoto-Watanabe Y, Watanabe M, Jackson M, Akimoto H, Sugimoto K, Yasujima M, Wakasaya Y, Matsubara E, Kawarabayashi T, Harigaya Y, Lyndon AR, Shoji M: Quantification of cystatin C in cerebrospinal fluid from various neurological disorders and correlation with G73A polymorphism in CST3. *Brain Res* 1361:140-145, 2010.

6) Yamamoto-Watanabe Y, Watanabe M, Hikichi M, Ikeda Y, Jackson M, Wakasaya Y, Matsubara E, Kawarabayashi T, Kannari K, Shoji M: Prevalence of autosomal dominant cerebellar ataxia in Aomori, the northernmost prefecture of Honshu, Japan. *Intern Med* 49:2409-2414, 2010.

7) Shoji M: Plasma antibodies to Aβ40 and Aβ42. *Hirosaki Medical Journal* 61suppl:S135-141, 2010.

8) Watanabe M, Adachi Y, Jackson M, Yamamoto-Watanabe Y, Wakasaya Y, Shirahama I, Takamura A, Matsubara E, Kawarabayashi T, Shoji M: An unusual case of elderly-onset CADASIL with multiple cerebrovascular risk factors. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, in press.

9) Hirohata M, Yoshita M, Ishida C, Ikeda SI,

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.

10) Shoji M: Biomarkers of the dementia. *Int J Alzheimers Dis*, in press.

2. 学会発表

1) Shoji M, Kawarabayashi T, Wakasaya Y, Takamura A, Watanabe Y, Watanabe M, Matsubara E: Factors responsible for neurofibrillary tangle formation and neuronal cell death in tauopathy brains. Alzheimer's Association 2010 International Conference on Alzheimer's disease (ICAD), Honolulu, July 10-15, 2010.

2) Takamura A, Kawarabayashi T, Matsubara T, Shoji M, Matsubara E: Alzheimer neuronal degeneration: extracellular vs. intracellular A β oligomers. Alzheimer's Association 2010 International Conference on Alzheimer's disease (ICAD), Honolulu, July 10-15, 2010.

3) Kawarabayashi T, Wakasaya Y, Watanabe M, Yamamoto-Watanabe Y, Takamura A, Matsubara E, Shoji M: Factors responsible for neurofibrillary tangle formation and neuronal cell loss in tauopathy brains. Neuroscience 2010, the Society for Neuroscience, 40th Annual Meeting, San Diego, Nov 13-17, 2010.

4) Kawarabayashi T, Wakasaya Y, Watanabe M, Yamamoto-Watanabe Y, Takamura A, Nakahata N, Matsubara E, Shoji M: Factors responsible for neurofibrillary tangle formation and neuronal cell losses in tauopathy brains. 12th Meeting of Hirosaki International Forum of Medical Science, Hirosaki, Oct 29, 2010.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

東海林幹夫

1) 発明の名称：アルツハイマー病の検査法、アルツハイマー病に対して治療効果を有する物質のスクリーニング方法およびアルツハイマー病の検査キット

整理番号：P2009-145（アルツハイマー）

出願番号：特願 2010-48003

出願日：平成 22 年 3 月 4 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 分担研究報告書

脳脊髄液中 A β オリゴマーの検討

研究分担者 東海林幹夫 弘前大学大学院医学研究科脳神経内科学講座
共同研究者 高村歩美、若佐谷保仁、瓦林 毅、松原悦朗
弘前大学大学院医学研究科脳神経内科学講座

研究要旨 アルツハイマー病の発症病態中核分子と考えられている A β オリゴマーに着目し、そのサロゲートマーカーとしての有用性を脳脊髄液で検証した。アルツハイマー病患者ではリポ非蛋白結合型 A β モノマーの減少と、リポ蛋白非結合型 A β オリゴマーの増加が認められ、A β オリゴマー化指標の A β オリゴマー/モノマー比 (O/M index) を検証するとアルツハイマー病患者で有意な増加が観察された。全リポ蛋白非結合型 A β 中に A β 42 が占める比率は健常高齢者が 13.2%に対し、アルツハイマー病患者では 9.3%と有意な低下が認められ、A β オリゴマー化に一致した結果であった。アルツハイマー病患者の脳脊髄液中ではリポ蛋白 (主に HDL) より A β 42 が乖離しやすい環境にあり、A β オリゴマー化が進む可能性が考えられ、この病態の検出はアルツハイマー病の脳病態を反映したサロゲートマーカーとして有用と考えられた。

A. 研究目的

A β オリゴマーはアルツハイマー病の発症病態中核分子と考えられている。その脳脊髄液中検出はアルツハイマー病のサロゲートマーカーとして重要と考えられるため、本研究では健常高齢者とアルツハイマー病患者とで脳脊髄液中 A β オリゴマーの検証を行った。

ELISA と BNT77-BA27 ELISA) にて別途測定し、A β 重合化程度やリポ蛋白除去下で A β 42 分子比率も検証した。

(倫理面への配慮)

本研究は、弘前大学の倫理委員会の承認を受けて行った。

B. 研究方法

健常高齢者 (13 例、平均年齢 70.6 歳) とアルツハイマー病患者 (12 例、平均年齢 73.2 歳) から脳脊髄液を採取し、各 10 例ずつプールした脳脊髄液をゲル濾過にて分取後、各フラクションを A β モノマー特異的 ELISAs (BNT77-BC05 ELISA と BNT77-BA27 ELISA) にて測定し、A β 分子の分布を検証した。脳脊髄液 0.6ml から 1.25g/ml の密度の HDL を除去したりポ蛋白除去脳脊髄液を作製し、各 10 例ずつプールしたりポ蛋白除去脳脊髄液をゲル濾過にて分取後、A β オリゴマー分布を A β オリゴマー特異的 ELISAs (2C3-BC05 ELISA と 2C3-BA27 ELISA) にて検証した。またリポ蛋白除去脳脊髄液は A β オリゴマー特異的 ELISAs (2C3-BC05 ELISA と 2C3-BA27 ELISA) と A β モノマー特異的 ELISAs (BNT77-BC05

C. 研究結果

アルツハイマー病患者ではリポ蛋白結合型 A β モノマー量は健常高齢者と同レベルであったが、リポ蛋白非結合型 A β モノマー量は減少していた。一方、リポ蛋白非結合型 A β オリゴマー量はアルツハイマー病患者で増加していた。計 25 例の個別検討でも、リポ蛋白非結合型 A β オリゴマー量はアルツハイマー病で増加しており、A β モノマー量との比率を検証するとアルツハイマー病患者では A β 重合化指標の A β オリゴマー/モノマー比 (O/M index) の有意な増加が観察された。一方、アルツハイマー病と健常高齢者の両群とも脳脊髄液中でのリポ蛋白非結合型 A β モノマーの占める割合は全体の 30%程度で同等であったが、全リポ蛋白非結合型 A β 中に A β 42 が占める比率は健常高齢者が 13.2%に対し、アルツハイマー病患者では 9.3%と

有意な低下が認められた。

D. 考察

アルツハイマー病の脳脊髄液では血液に比しリポ蛋白（主に HDL）との相互作用の破綻が高度な環境にあり、A β オリゴマー化促進因子となっているようである。こうした A β オリゴマーの存在様式に着目した検証がアルツハイマー病の発症病態解明の上で重要と考えられた。

E. 結論

アルツハイマー病患者の脳脊髄液中ではリポ蛋白（主に HDL）より A β 42 が乖離しやすい環境にあり、A β オリゴマー化が進む可能性が考えられ、この病態の検出はアルツハイマー病の脳病態を反映したサロゲートマーカーとして有用と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takamura A, Kawarabayashi T, Yokoseki T, Shibata M, Morishima-Kawashima M, Saito Y, Murayama S, Ihara Y, Abe K, Shoji M, Michikawa M, Matsubara E: Dissociation of A β from lipoprotein in cerebrospinal fluid from Alzheimer's disease accelerates A β 42 assembly. *J Neurosci Res*, in press.
- 2) Wakasaya Y, Kawarabayashi T, Watanabe M, Yamamoto-Watanabe Y, Takamura A, Kurata T, Murakami T, Abe K, Yamada K, Wakabayashi K, Sasaki A, Westaway D, Hyslop PS, Matsubara E, Shoji M: Factors responsible for neurofibrillary tangles and neuronal cell losses in tauopathy. *J Neurosci Res*, in press.
- 3) Yamamoto-Watanabe Y, Watanabe M, Okamoto K, Fujita Y, Jackson M, Ikeda M, Nakazato Y, Ikeda Y, Matsubara E, Kawarabayashi T, Shoji M: A Japanese ALS6 family with mutation R521C in the FUS/TLS gene: a clinical, pathological and genetic report. *J Neurol Sci* 296:59-63, 2010.

- 4) Yamamoto-Watanabe Y, Watanabe M, Jackson M, Akimoto H, Sugimoto K, Yasujima M, Wakasaya Y, Matsubara E, Kawarabayashi T, Harigaya Y, Lyndon AR, Shoji M: Quantification of cystatin C in cerebrospinal fluid from various neurological disorders and correlation with G73A polymorphism in CST3. *Brain Res* 1361:140-145, 2010.
- 5) Seino Y, Kawarabayashi T, Wakasaya Y, Watanabe M, Takamura A, Yamamoto-Watanabe Y, Kurata T, Abe K, Ikeda M, Westaway D, Murakami T, St.George-Hyslop P, Matsubara E, Shoji M: A β amyloid accelerates phosphorylation of tau and NFT formation in APP and tau double transgenic mice model. *J Neurosci Res* 88:3547-54, 2010.

2. 学会発表

- 1) Shoji M: Detection and prevention of Alzheimer's disease. Symposium The 1st world Forum of CBFM in Kyoto, Kyoto, 10.18-20, 2010.
- 2) 東海林幹夫：アルツハイマー病（2）：臨床，検査，診断，治療．第4回 日本認知症学会教育セミナー、名古屋市、11.7、2010.
- 3) 東海林幹夫：認知症：診断と治療の進歩．第28回日本治療学会総会ランチョンセミナー、横浜、7.15、2010.
- 4) Shoji M, Kawarabayashi T, Wakasaya Y, Takamura A, Watanabe Y, Watanabe M, Matsubara E: Factors responsible for neurofibrillary tangle formation and neuronal cell death in tauopathy brains. International Conference on Alzheimer's Disease – ICAD 2010, Honolulu, July 10-15, 2010.

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得（申請中を含む）
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

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

アルツハイマー病患者の脳脊髄液は アミロイドβ蛋白のオリゴマー化を促進する

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 池田篤平*、小野賢二郎*、David Elashoff**、Margaret M. Condran***、
 篠原もえ子*、吉田光宏*、David B. Teplow***

*金沢大学大学院 脳老化・神経病態学(神経内科学)、

カルフォルニア大学ロサンゼルス校 生物統計学教室、*同 神経学教室、

研究要旨 アルツハイマー病(AD)ではアミロイドβ蛋白(Aβ)のオリゴマーが特に注目されている。photo-induced cross-linking of unmodified proteins 法を用いて、AD 患者脳脊髄液の Aβ₁₋₄₀ および Aβ₁₋₄₂ のオリゴマー化に対する影響を比較検討した。電気泳動および銀染色後にデンシトメトリーを行い、33 例の AD 患者と対照として年齢を適合させた 33 例の非認知症性疾患患者の脳脊髄液を比較した。オリゴマー化抑制効果は Aβ₁₋₄₀ および Aβ₁₋₄₂ の両者において、AD 患者の脳脊髄液が対照群よりも有意に弱かった。AD 患者は Aβ のオリゴマー化を促進する脳脊髄液環境を有しているものと推察された。

A. 研究目的

アルツハイマー病(AD)ではアミロイドβ蛋白(Aβ)の単量体が数個から数十個凝集したオリゴマーの神経毒性が特に注目されている。オリゴマー状態は不安定であるため、その検討が難しい。photo-induced cross-linking of unmodified proteins (PICUP)法は光触媒を用いて、蛋白を共有結合させることでオリゴマー化させる方法である。我々は PICUP 法を用いて AD の中枢神経系に Aβ のオリゴマー化を促進する環境がある可能性について、患者の脳脊髄液を用いて検討した。

B. 研究方法

PICUP 法を用いて、脳脊髄液の Aβ₁₋₄₀ および Aβ₁₋₄₂ のオリゴマー化に対する影響を検討した。PICUP 法ではグルタチオン S 転移酵素 (GST) でオリゴマー化が観察できることが報告されている。脳脊髄液のオリゴマー化への影響が Aβ 特異的であることを検証するために、脳脊髄液の GST のオリゴマー化に対する効果を検討した。また、脳脊髄液中の特定の物質が Aβ のオリゴマー化を抑制していることを確認するため、脳脊髄液とほぼ同じ総蛋白濃度のヒト血清アルブミン

(HSA)による Aβ のオリゴマー化への影響を検討した。電気泳動および銀染色後にデンシトメトリーを行い、33 例の AD 患者と対照として年齢を適合させた 33 例の非認知症性疾患患者の脳脊髄液の Aβ のオリゴマー化に対する抑制効果を比較した。

(倫理面への配慮)

脳脊髄液サンプルの使用に関する同意取得、使用法、個人情報保護等に関しては、金沢大学医学倫理審査会において審査され、承認を得た。

C. 研究結果

ヒト脳脊髄液は両者とも Aβ₁₋₄₀ および Aβ₁₋₄₂ のオリゴマー化を抑制した。一方で、脳脊髄液は GST のオリゴマー化に影響せず、HSA は Aβ のオリゴマー化を抑制しなかった。更に、脳脊髄液の Aβ オリゴマー化の抑制効果は Aβ₁₋₄₀ および Aβ₁₋₄₂ の両者において、AD 患者の脳脊髄液が対照群よりも有意に弱かった。

D. 考察

脳脊髄液は Aβ のオリゴマー化を抑制した。HSA

および GST を用いた検討からは、この抑制効果は脳脊髄液が A β のオリゴマー化に特異的に影響したものと考えられた。また、この抑制効果が AD 患者の脳脊髄液で有意に弱かったことから、AD 患者は A β のオリゴマー化を促進する脳脊髄液環境を有しているものと推察された。

E. 結論

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。

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 β amyloid fibrils at low concentrations of A β 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 β 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 β 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.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) 吉田光宏、山田正仁：脳アミロイドアンギオパチー：病態と診断の進歩. *分子脳血管病* 9:190-197, 2010.
- 15) 吉田光宏、山田正仁：アルツハイマー病以外の認知症をどう見分けるか. *成人病と生活習慣病* 40:176-184, 2010.
- 16) 吉田光宏、山田正仁：Lewy 小体型認知症 2) 検査所見と診断. *神経内科* 72(Suppl 6):342-348, 2010.
- 17) 石田千穂、山田正仁：脳アミロイドアンギオパチー. *Clinical Neuroscience* 28:683-685, 2010.
- 18) 篠原もえ子、山田正仁：アルツハイマー病の脳脊髄液検査. *Clinical Neuroscience* 28:1023-1025, 2010.
- 19) 柳瀬大亮、山田正仁：認知症の診断と治療 ① アルツハイマー病. *からだの科学* 265:57-60, 2010.
- 20) 池田篤平、山田正仁：アルツハイマー病の危険因子. *BRAIN and NERVE—神経研究の進歩* 62:679-690, 2010.
- 21) 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.
- 22) 廣畑美枝、山田正仁：脳アミロイドアンギオパチー：疫学と臨床像. *神経内科*, in press.

2. 学会発表

- 1) 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.
- 2) Morinaga A, Hasegawa K, Nomura R, Ookoshi T, Ozawa D, Goto Y, Yamada M, Naiki H: The role of interfaces and agitation on the fibril formation of amyloid β -protein. 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) 山田正仁：アルツハイマー病の治療・予防法の開発. 第 15 回日本神経精神医学会、東京、12.3-4、2010.
- 5) 山田正仁：認知症患者の診かたー神経内科の立場から. 第 51 回日本神経学会総会、東京、5.20-22、2010.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 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.
 - 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

非認知症白内障患者の水晶体における アミロイドβペプチドの定量化への試み

研究分担者 玉岡 晃 筑波大学大学院人間総合科学研究科神経病態医学分野

共同研究者 赤松 恵*、富所康志*、加治優一**、大鹿哲郎**

*筑波大学大学院人間総合科学研究科神経病態医学分野、**同眼科学分野

研究要旨 アルツハイマー病 (AD)は認知症の原因として最も高頻度にみられる神経疾患の一つであり、その神経病理学的特徴である老人斑にはアミロイドβ (Aβ) と呼ばれるタンパクが凝集している。ADにおけるAβの蓄積は脳皮質内が中心であるが、AD患者の剖検水晶体におけるAβの蓄積が報告された[Goldsteinら, Lancet 2003]。もし認知症の顕在化以前に水晶体にAβが蓄積するならば、白内障手術の際に回収される水晶体中のAβを定量する事で、ADの早期診断ができる可能性がある。そこで、白内障手術時に回収した水晶体試料(N=86)を用いて、Aβの抽出方法および定量化を試みた。水晶体中のAβを溶解度の異なる各種溶液 (TBS, 1%Triton X-100, ギ酸)を用いて連続的に抽出し、ELISA法にてAβ量を測定した。連続抽出した上清中のうち、ギ酸分画でAβを検出した。タンパク重量あたりのAβ(x-42)は平均 7.88 ± 18.67 pg/mg (Mean \pm SEM)であった。Aβ(x-40)は感度以下であった。性別、年齢、白内障LOCS III分類別の分析では、Aβ(x-42)は高度の白内障であるグレードNO5~6において有意に増加していた。水晶体中Aβは、ラセミ化などの翻訳後修飾が進んでいる可能性があり、ELISA法での定量化には翻訳後修飾の検討が必要と思われた。今後、軽度認知機能障害を含めた様々な白内障患者の認知機能との定量比較が必要であるが、ADの早期診断につながる可能性が見出された。

A. 研究目的

アルツハイマー病(Alzheimer's disease; AD)患者の剖検水晶体におけるアミロイドβペプチド(Aβ)の蓄積が報告されている[Goldsteinら, Lancet 2003]。もし認知症の顕在化以前に水晶体へのAβ蓄積が始まるならば、白内障手術の際に回収される水晶体中のAβを定量する事で、ADの早期診断ができる可能性がある。しかしながら、ELISA法による定量的検討の報告はないため、本研究では、非認知症患者における白内障水晶体中のAβの抽出方法および定量化について検討を行った。

B. 研究方法

通常の白内障手術時に破碎後、患者の眼から吸引・回収された水晶体(N=86)からAβを可溶性の異なる各種溶液 (TBS, 1% Triton X 100, ギ酸)を用いて連続的に抽出し、ELISA法にてAβ量を測定した。検出されたAβの確認のためウエスタ

ンブロットイングも行った。また、白内障手術時の超音波破碎物の回収条件によりAβの回収率が低下する可能性も考えられたため、回収率を向上させる目的で全眼摘出標本の水晶体を用いて回収直後の遠心条件についても検討を行った。

(倫理面への配慮)

筑波大学大学院人間総合科学研究科医の倫理委員会 (通知番号: 第 564 号、 課題名: 白内障手術で除去した水晶体に含まれるアミロイドペータ蛋白の検出・測定 の研究) において承認を受けた。

C. 研究結果

白内障手術検体 (表1) によるELISA法での測定では、ギ酸分画でのみAβを検出した。タンパク重量当たりAβ(x-42)は平均 7.88 pg/mg, SEM= 18.67 であった (表2)。Aβ(x-40)は測定感度以下であった。

性別による有意差は認めなかった (図1)。年齢別では、50歳以上90歳未満では、年齢の上昇に伴って増加する傾向がみられたが有意差は認めなかった (図2)。白内障グレード評価法LOCSIII分類別での分析では、水晶体の白濁度を指標とするNO分類において、高度の白内障 (グレードNO5~6) においてタンパク重量あたりのA β (x-42)量は有意に増加していた (図3)。ウエスタンブロッティングでは、主にA β ダイマーが確認された。4G8と6E10の混合抗体では、ウエスタンブロッティングのシグナルは非常に弱く、抗A β (1-42)C末端特異抗体ではより強いシグナルが確認された。今回の水晶体試料は、眼科での白内障手術時に超音波破碎され吸引回収された全量約50 mLの水晶体懸濁液を1000~1500 rpm程度遠心を行い、上清を除いて得た沈殿物が試料となっていた。従って、上清中にA β が残存していた可能性もあり、全眼水晶体試料を用いて、回収時の遠心条件を想定した検討を行った。結果、48K rpmの超遠心に比べ低速 (3K, 6K rpm) ではA β がそれぞれ48%、16%程度上清に残存していた。

D. 考察

今回検討に用いた白内障水晶体試料はいずれも非認知症患者のものであったが、白内障の乳白濁度が増加した水晶体では、A β が有意に蓄積しており、認知症発症以前から水晶体中に A β が蓄積する可能性が示唆された。年齢別の比較では、年齢が増加するに従って A β が増加する傾向がみられたが (データ非表示)、年齢とグレード別間では相関はみられず、年齢による早期診断への影響は無視できるものと考えられた。

ウエスタンブロッティングでの A β の確認試験では、A β ダイマーの存在が確認された。また、4G8 と 6E10 の混合抗体での反応性が悪かったことより、4G8 と 6E10 のエピトープ近傍に存在するアスパラギン酸が、ラセミ化を起こし、立体構造が変化している可能性が示唆された。水晶体中の他のタンパクは同様に、白内障水晶体中の A β はラセミ化やイソ化などの翻訳後修飾や重合が進んだ状態で存在している可能性が示唆された。今回用いた ELISA 法は主にモノマーを検出するものであり、今後、翻訳後修飾に対応した抗体や、

ダイマーやオリゴマーを検出する ELISA 法での検討が必要と考える。

さらに、回収後の遠心条件の検討では、最初の遠心回転数が6000 rpm以下であるとA β の回収率が悪くなっていた。ADの水晶体では、A β は水晶体核部分よりその周りの柔らかい水晶体皮質に比較的多く沈着するとされている。皮質も含めた水晶体懸濁液を回収し、初期の段階から超遠心を行うことが、回収率向上のためには望ましいと考えられた。

E. 結論

認知症を伴わない白内障患者では、水晶体中に A β (x-42)が少量ながら蓄積し、高度の白内障 (グレード NO5~6) において白内障に伴う二次的増加が示唆された。しかし、軽~中程度の白内障 (グレード NO1~4 以下) では、今後の AD の早期診断への影響は軽度ないし無視しうると予想された。今後、白内障手術における破碎水晶体の回収条件の検討や、オリゴマーの定量などの検出系の検討とそれに対する水晶体 A β の翻訳後修飾の影響の検討、さらに、軽度認知機能障害を伴う白内障患者での定量比較を行い、AD の初期診断マーカーとしての有用性の検討が必要である。

F. 健康危険情報

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. *Hirosaki 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* 75:1766-1722, 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* 584:3410-4, 2010.

5) Ishii 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 亙、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 亙、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：SOD1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 互、玉岡 晃：酸化ストレスはPS1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

表 1. 試料背景

材料	白内障手術時に回収されたヒト水晶体超音波破砕物 (湿重量 10-100mg) 86 検体
年齢	33~93 歳 (平均 71.6±12.2 歳、不明 1)
性別	男性 38 例、女性 35 例、不明 13 例
病歴	糖尿病歴： あり 11 例、なし 75 例 認知症歴： 全例非認知症患者

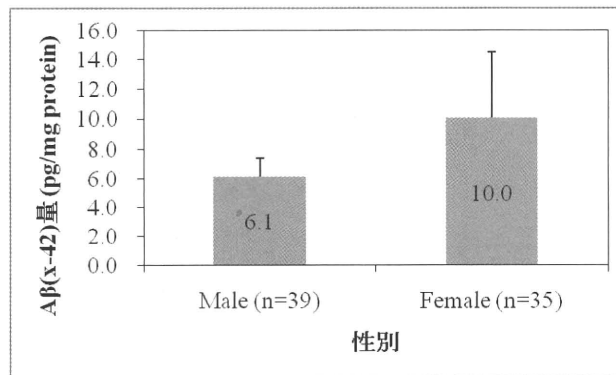


図 1. 水晶体中 Aβ(x-42)量の性別比較

表 2. ELISA 法の結果

		Aβ(x-40)	Aβ(x-42)
測定レンジ(pmol/l)		1-100	0.1-20
ギ酸抽出物の Aβ 量 (pmol/l)	N	86	86
	Mean	0.771	0.162
	SEM	0.089	0.019
水晶体湿重量あたりの Aβ 量 (ng/mg lens)	N	86	86
	Mean	2.002	0.437
	SEM	0.230	0.051
タンパクあたりの Aβ 量 (pg/mg protein)	N	83*	83*
	Mean	44.9	7.48
	SEM	8.99	1.97

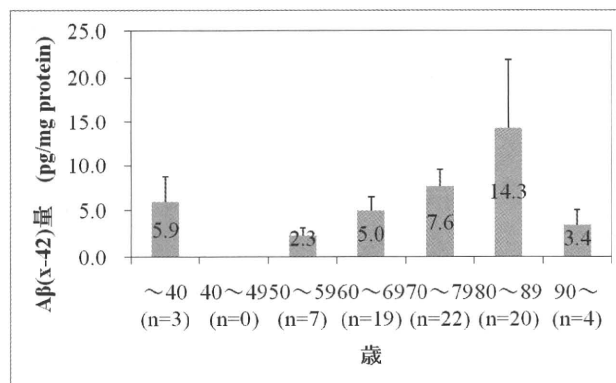


図 2. 水晶体中 Aβ(x-42)量の年齢別比較

*: ギ酸試料が少量のため BCA を行わなかった 3 検体を除く

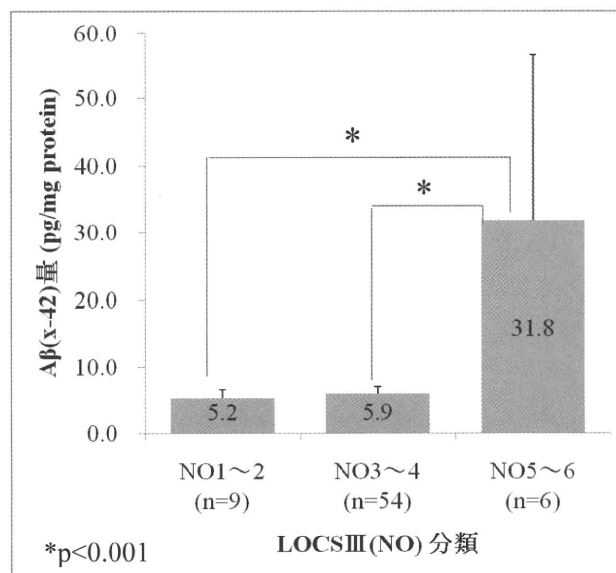


図 3. 水晶体中 Aβ(x-42)量の LOCSIII(NO)分類比較

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

WMS-R の Logical Memory II の有無による MCI 基準の比較検討 —J-ADNI 診断基準の検討—

研究分担者 水澤英洋 東京医科歯科大学大学院脳神経病態学
 共同研究者 堀 匠、三條伸夫、歌代浩美、松本裕希子
 東京医科歯科大学大学院脳神経病態学

研究要旨 Wechsler Memory Scale (-revised: WMS-R) は代表的な記銘力検査法であり、特に logical memory II (LM II) 検査は MCI 等の診断基準項目の一つとして頻用されている。J-ADNI 研究では LM II (物語 A のみ) の点数と教育年数の組み合わせにより健常人、軽度認知機能障害 (MCI)、早期 AD の分類基準を設定しており、研究結果のみならずこの診断基準自体も今後の認知症診療に大きな影響を与えることが予測される。物忘れ外来にて MMSE と WMS-R の両方を施行され MMSE が 24 点以上であった 82 例の診断と MCI から AD への転化率を J-ADNI 診断基準 (ADNI 基準) と ADNI 基準から LM II を除いた診断基準 (TMDU 基準) の両方で比較検討した。TMDU 基準で MCI は 19 例であったが ADNI 基準では 23 例となった。AD への転化症例は ADNI 基準では 11 例 (47.8%)、TMDU 基準では 7 例 (36.8%) であり、LM II 値 (物語 A+B) はどちらの基準でも AD への転化群で有意に低く、TMDU 基準では cut off 値 6 点以下が診断上至適 (感度 100%、特異度 66.7%) であった。MCI の診断基準に LM II を採用するかどうかにより診断数と転化率に差が生じることが推測された。また LM II 値 (物語 A+B) は MCI から AD への転化の予測に有用であり、教育歴や年齢を考慮せず一括して cut off 値を設定しうる可能性が示唆された。

A. 研究目的

記銘力障害を主症状とするアルツハイマー病 (AD) や amnesic MCI において、記銘力障害の質と量を正確に評価することが病状把握や診断において重要である。amnesic MCI で代表されるように、記銘力障害は MCI から AD への転化予測因子としても重要であり、また、記銘力に限定した神経心理検査は、MMSE や長谷川式知能評価スケールなどのスクリーニング検査などと比較して、より高感度に異常を検出する場合がある。Wechsler Memory Scale (-revised: WMS-R) は代表的な記銘力検査法であるが、その検査項目の一つである logical memory II (LM II) 検査は、簡単な物語文を記憶して 30 分以上経過後の遅延再生能力を見る検査であり、多数の臨床研究で MCI 等の診断基準項目の一つとして採用されている。J-ADNI 研究でも LM II 物語 A の点数と教育年数の組み合わせにより健常人、MCI、早期 AD の分

類基準を設定しており、研究結果のみならずこの診断基準自体も今後の認知症診療に大きな影響を与えることが予測される。しかし LM II 検査は単独で施行する場合でも 1 時間 30 分から 2 時間程度の時間が必要で、採点者にも習練が必要な検査である。今後の高齢化社会においては、認知症診療は専門外来以外の医師が数多くの認知症を診療することが求められており、そのためには専門性の高い WMS-R の LM II を日常診療に使用することは必ずしも現実的とは言えない。

本研究は J-ADNI の MCI 診断基準 (ADNI 基準) と ADNI 基準から LM II を除外した診断基準 (TMDU 基準) を比較し、診断基準の違いにより診断結果と MCI から AD への転化率に関してどのような違いが生じるのか、また LM II 検査自体が転化予測に有用な情報を与えているかどうか、について検討することを目的として実施した。

B. 研究方法

当大学付属病院認知症専門外来（物忘れ外来）を2007年4月から2009年11月の間に受診した患者のうち、MMSEとWMS-Rの両方を施行された131例中MMSEの点数が24点以上であった82例の診断およびMCI症例の経過とADへの転化率をJ-ADNI診断基準（ADNI基準）とADNI基準からWMS-R（LMII）を除いた診断基準（TMDU基準）の両方で比較検討した。

ADNI基準のMCIの診断基準の要旨は「被検者の記憶障害をstudy partnerが容認するかstudy partnerからの記憶障害の事実が示された上で、MMSEは24点以上、教育年数を考慮したLMII（物語Aのみ、25点満点）でカットオフスコア以下（教育年数0-9：2点以下、教育年数10-15：4点以下、教育年数16年以上：7点以下）。CDRは0.5。Depressionではないこと」に従った。ADの診断はNINCDS-ADRDAのCriteriaでProbable ADの基準に従った。

（倫理面への配慮）

本研究における匿名化情報を含む研究結果の発表に関しては東京医科歯科大学医学部倫理審査委員会の審査承諾を受けている（922番）。

C. 研究結果

TMDU基準では①正常又はうつ病等の非認知症の診断が30例、②MCIが19例、③早期ADが23例、④その他の認知症が10例であった。ADNI基準では①→②へ5例、②→①へ5例、③→①へ3例、③→②へ4例診断変更となり①33②23③16④10例とMCIと診断される症例数が増加した。

MCIからADへの転化症例数については、ADNI基準ではTMDU基準で非認知症の診断となった症例の経過観察がされていなかったために正確な数は不明であったが、11例（47.8%）とみなすことが可能であった（初期診断で非認知症と診断されていた症例は転化せず、初期診断でADと診断されていた症例はいずれADへ転化するとみなした場合）。TMDU基準と診断がMCIで一致していたのは14例で、この14例に限定すると転化症例は7例（50%）で転化率41.8%/年（MCIとしての平均follow up期間14.4±10.9月）であった。一方、TMDU基準での転

化症例は7例（36.8%）、転化率26.3%/年（MCIとしての平均follow up期間16.8±12.4月）でありADNI基準の方が転化症例の割合は高かった。

LMII値（物語A+B）はどちらの基準でもADへの転化群で有意に低く、ADNI基準では転化群2.3±3.5に対し非転化群で5.5±3.3（ $p=0.0337$ ）、TMDU基準では転化群1.4±2.1に対し非転化群で7.9±6.0（ $p=0.0141$ ）であった。ADNI基準に採用されている物語Aのみの点数ではどちらの基準でも有意差はつかず、ADNI基準では転化群1.5±2.0vs非転化群2.0±1.7点（ $p=0.5647$ ）、TMDU基準では転化群1.0±1.2vs非転化群4.0±3.7点（ $p=0.0527$ ）であった。

さらにMCIからADへの転化予測についてのLMII（物語A+B）の有用性をROC解析で検討した。TMDU基準で診断した場合の方が有用性は高く、cut off値6点以下が診断上至適（感度100%、特異度66.7%）であった。同じcut off値を使用した場合ADNI基準では感度100%、特異度50%であった。

MMSE値もいずれの診断基準でも転化予測因子として有意で、ADNI基準では転化群26.5±1.5に対し非転化群で28.3±2.0（ $p=0.0243$ ）、TMDU基準では転化群25.9±1.3に対し非転化群で28.2±1.9（ $p=0.0119$ ）であった。

D. 考察

MCIの厳密な定義や診断基準についてのコンセンサスは未だ確立されていない。MCIの症例について検討する場合には常にMCIの定義が問題となる。ADNI研究において行われているように、LMII値を診断基準に取り入れることについて、またその具体的な基準値について（正常下限値として標準偏差の2倍値は適切か、LMII値においては教育歴と年齢の影響を受けるが、診断基準に年齢も含めて考慮すべきか、など）も妥当性を検討する余地がある。

今回の我々の結果よりWMS-R（LMII）を診断基準に採用するか否かにより、MCIの診断数と転化率に差が生じることが推測された。今回の結果ではADNI基準の方がMCI診断数が多く、転化率も高くなったが、これはADNI基準の方がTMDU基準よりもMCIの定義が厳しい（LMII値の制限により、TMDU基準よりもよりADに転化しやす

い集団が MCI と定義されている)ためであると考えられる。

また LM II 検査は MCI から AD への転化の予測に有意であり、教育歴や年齢を考慮せず一括してカットオフ値を 6 点以下と設定して使用しうる可能性が示唆された。しかし、LM II 物語 A 単独では転化予測に有意ではなかった。認知症の進行に伴って神経心理検査の結果が悪化するであろうことを考えると LM II が低値の場合に MCI から AD へ転化しやすいことは理解しやすい。しかし、実際に LM II 検査の MCI から AD への転化予測に対しての有用性を評価した報告は少ない。今後、J-ADNI 研究においても MCI の定義について LM II 値の基準を変更した場合や基準値の意味付けなど踏み込んで検証することが望まれる。

E. 結論

MCI 診断基準に LM II を採用するか否かで MCI の診断と転化率は変化しうる。LM II 検査は MCI 症例の転化予測に有用である可能性がある。両方の観点から LM II 基準値の検討が望まれる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Jin H, Sanjo N, Uchihara T, Watabe K, St. George-Hyslop P, Fraser PE, Mizusawa H: Presenilin-1 holoprotein is an interacting partner of sarco endoplasmic reticulum calcium-ATPase and confers resistance to endoplasmic reticulum stress. *J Alzheimers Dis* 20:261-273, 2010.
- 2) Sanjo N, Katayama T, Hasegawa H, Jin H, Duthie M, Mount HTJ, Mizusawa H, St. George-Hyslop P, Fraser PE: Localization and trafficking of endogenous anterior pharynx-defective 1, a component of Alzheimer's disease related γ -secretase. *Neuroscience Lett* 483:53-56, 2010.
- 3) 三條伸夫、水澤英洋：神経診察法の基本とピットフォール 認知機能. *クリニカル・ニューロサイエンス* 28:1092-1093, 2010.

2. 学会発表

- 1) 三條伸夫、堀 匠、金 海峰、水澤英洋：アンジオテンシン受容体拮抗薬のアミロイド β 産生への影響とメカニズム. 第 51 回日本神経学会総会、東京、5.20-22、2010.
- 2) 堀 匠、歌代浩美、三條伸夫、水澤英洋：物忘れ外来における日本版 WMS-R の Logical Memory II の有用性. 第 51 回日本神経学会総会、東京、5.20-22、2010.
- 3) Sanjo N, Jin H, Uchihara T, Watabe K, Hori T, St. George-Hyslop P, Fraser PE, Mizusawa H: Presenilin-1 holoprotein is an interacting partner of SERCA and confers resistance to ER stress. International Conference in Alzheimer's Disease 2010, Honolulu, USA, July 10-15, 2010.
- 4) Hori T, Sanjo N, Watanabe M, Utashiro H, Mizusawa H: Usefulness of Logical Memory II of WMS-R for memory clinic outpatients. International Conference in Alzheimer's Disease 2010, Honolulu, USA, July 10-15, 2010.
- 5) 三條伸夫、久保寺隆行、渡邊睦房、石橋 哲、横田隆徳、水澤英洋：遺伝性プリオン病(GSS P105L)類似の臨床症状を呈した家族性アルツハイマー病(PSEN: I143T)の臨床像. 第 29 回日本認知症学会総会、名古屋、11.5-7、2010.
- 6) 堀 匠、三條伸夫、渡邊睦房、歌代浩美、水澤英洋：MCI 症例における日本語版 WMS-R の Logical Memory II の有用性. 第 29 回日本認知症学会総会、名古屋、11.5-7、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

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]BF227PETの診断的有用性

研究分担者 池田修一 信州大学医学部脳神経内科、リウマチ・膠原病内科

共同研究者 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****

*信州大学医学部脳神経内科、リウマチ・膠原病内科、

**東北大学加齢医学研究所老年医学分野、

***東北大学未来工学治療開発センター、

****南東北病院放射線科

研究要旨 アミロイドーシスの診断には生検組織においてアミロイド沈着を確認することが必要である。最近、非侵襲的な画像診断の有用性が検討されている。本研究では、ベンズオキサール構造をもち、アミロイドに対する高い親和性および優れた脳移行性を有する東北大学で開発された[11C]BF227アミロイドPETを用いて、CAAとFAP患者におけるアミロイド沈着を評価した。方法はCAA疑いの65歳男性、68歳女性の各1名、FAPATTRSer50Argの32歳男性1名を対象とした。CAA2名は副腎皮質ステロイド療法による治療中であり、1名は1年を経過して2回目の検査を施行した。また、FAP患者は心アミロイドーシスが顕著であった。CAA患者2名では大脳半球に、FAP患者では心臓に核種の特異的な取り込み像がみられた。以上より、[11C]BF227アミロイドPETは病理組織学的検索に代わる非侵襲的なアミロイド診断法であると考えられる。また、本PETは全身性アミロイドーシスの診断にも有用な可能性がある。

A. 研究目的

アミロイドーシスの診断には生検組織においてアミロイド沈着を確認することが必要である。最近、非侵襲的な画像診断の有用性が検討されている。今回、CAAとFAP患者における[11C]BF227アミロイドPETの診断的価値を検討した。

B. 研究方法

CAA疑いの65歳男性、68歳女性の各1名、FAPATTRSer50Argの32歳男性1名を対象とした。CAA2名は副腎皮質ステロイド療法による治療中であり、1名は1年を経過して2回目の検査を施行した。また、FAP患者は心アミロイドーシスが顕著であった。

(倫理面への配慮)

信州大学医学部倫理委員会申請済み

C. 研究結果

[11C]BF227アミロイドPETは、ベンズオキサール構造をもち、アミロイドに対する高い親和性および優れた脳移行性を有する東北大学で開発された国産のプローブである。米国製のPIBと比較して、感度は低いの特異度は高い。そのため、経時的変化の観察に有用であると考えられる。本研究では、ボストン診断基準でG3と診断されたCAA2症例共に[11C]BF227アミロイドPETにおいてAβアミロイドの蓄積を大脳皮質に認めた。副腎皮質ステロイド投与後は半年から1年半の経過観察中に脳出血の再発はなかったが、1例の一年後の再検ではAβアミロイドの沈着は軽度増加していた。FAP患者では心臓に選択的に核種が集積して陽性画像が得られた。

D. 考察

BF227PETにより非侵襲的にCAA患者のAβA