

[Ⅱ] 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患等克服研究事業 (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

アルツハイマー病脳における毒性 A β コンフォマーの検討

研究分担者 玉岡 晃 筑波大学医学医療系神経内科学

共同研究者 富所康志*、篠塚由美*、荒木 亘**、石井一弘*

*筑波大学医学医療系神経内科学、

**国立精神・神経医療研究センター神経研究所

研究要旨 A β 分子の中でも、第 22 位と第 23 位のアミノ酸残基においてターン構造を有する A β コンフォマーは毒性と活性酸素誘導能がより高いとされる。毒性 A β コンフォマーは Alzheimer 病(AD)の新たな治療標的やよりよい診断マーカーとして期待される。その AD 脳における存在様態は不明であるため、その生化学的同定を試みた。毒性 A β コンフォマーは SDS の存在下でその特異的構造が失われやすいことが示された。免疫沈降と Western blot 法の組み合わせにより、可溶性の毒性コンフォマーの同定が可能となり、AD 脳では可溶性 A β の少なからぬ部分が毒性コンフォマーで占められている可能性が示唆された。

A. 研究目的

Alzheimer 病(AD) における A β の病因関連物質ならびに診断マーカーとしての重要性は既に確立されているが、近年 γ セクレターゼ阻害薬の海外での治験をはじめとして様々な根本的治療法の開発が不調に終わっている。認知症の発症抑制療法や認知症発症後の根本的治療法の開発は今後の大きな課題であり、新たなストラテジーが求められている。

A β 分子はその中ほどにターン構造を有する。そのターン構造は複数個所で生じうるが、特に第 22 位と第 23 位のアミノ酸残基にターン構造をもつ A β コンフォマーの毒性と活性酸素誘導能が高いとされる。毒性 A β コンフォマーは新たな治療標的やより良い診断マーカーとして期待できるが、その AD 脳における存在様態は不明であるため、その生化学的同定を行った。

B. 研究方法

ホルマリン固定パラフィン包埋切片 (AD 2 例) について、毒性コンフォマー特異抗体 11A1 を用いて免疫組織学的に検討し、エピトープが第 18 位～第 22 位アミノ酸残基である 4G8 の結果と比較検討した。凍結剖検脳 (AD 2 例、非 AD 2 例)

を PBS、SDS、ギ酸を用いて連続的にホモジェネートし、超遠心を行い、それぞれ PBS、SDS、ギ酸抽出画分を得た。ホモジェネート中の毒性 A β コンフォマーを、11A1 を用いた免疫沈降法(IP)と Western blot 法(WB)により同定し、4G8 によって認識される総 A β と比較検討した。C-末端の違いや SDS の有無による毒性コンフォメーションの維持への影響を、合成ペプチドを用いて検討した。

(倫理面への配慮)

剖検脳は、病理診断、教育並びに研究が病理解剖の目的である事を遺族に説明し、当院で病理解剖された症例のものであり、匿名化されている。

C. 研究結果

ギ酸で前処理をすることで、11A1で4G8と同様に老人斑の染色が得られた。血管や軟膜の染色所見もみられた。前処理なしで、一部の神経細胞が 11A1陽性であった。

一方、AD脳のWBでは、SDS抽出画分とギ酸抽出画分に4G8によって標識されるA β が大量に見出されたが、11A1によるWBではギ酸抽出画分にわずかなダイマー以上のスメアを認めるのみであった。PBS抽出画分のIP-WBでは、11A1によってIP

されたモノマー、ダイマー、トライマーから高分子量のスメアまでが4G8によって標識され、その重合の程度は4G8によるIP-WBに類似していたがシグナル強度は若干低下していた。非AD脳では、11A1、4G8のいずれによってもA β を検出しなかった。合成ペプチドによる検討では、ドットブロット法でA β -(1-40)、A β -(1-42)ともに11A1は4G8と同様のシグナルを示したが、11A1を用いたWBではシグナルは失われた。IP-WBでは、A β -(1-40)はA β -(1-42)に比して11A1によってIPされる量が若干低下した。

D. 考察

免疫組織学検討とWBの結果の比較検討や、合成ペプチドを用いた検討の結果などから、毒性A β コンフォマーはSDSの存在下でその特異的構造が失われやすいことが示された。IPとWBの組み合わせによって、可溶性A β の少なからぬ部分が毒性コンフォマーであることが示された。AD脳における毒性コンフォマーは当初想定されたA β -(1-42)のみならず、A β -(1-40)などによるものも含まれる可能性がある。AD脳における、A β の様々な分子種と毒性A β コンフォマーとの関連や、毒性コンフォマーの総A β に対する比率などは今後明らかにされるべき点である。

E. 結論

毒性A β コンフォマーはSDSの存在下でその特異的構造が失われやすいことが示された。AD脳では可溶性A β の少なからぬ部分が毒性コンフォマーで占められている可能性が示唆された。現在症例数を増やし更に検討中である。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Hosaka A, Araki W, Oda A, Tomidokoro Y, Tamaoka A: Statins reduce amyloid β -peptide production by modulating amyloid precursor protein maturation and phosphorylation through a cholesterol-independent mechanism in cultured

neurons. *Neurochem Res*, 38: 589-600, 2013.

2) Tsuji H, Arai T, Kametani F, Nonaka T, Yamashita M, Suzukake M, Hosokawa M, Yoshida M, Hatsuta H, Takao M, Saito Y, Murayama S, Akiyama H, Hasegawa M, Mann DM, Tamaoka A: Molecular analysis and biochemical classification of TDP-43 proteinopathy. *Brain*. 2012 Oct 3. [Epub ahead of print]

3) Egawa N, Kitaoka S, Tsukita K, Naitoh M, Takahashi K, Yamamoto T, Adachi F, Kondo T, Okita K, Asaka I, Aoi T, Watanabe A, Yamada Y, Morizane A, Takahashi J, Ayaki T, Ito H, Yoshikawa K, Yamawaki S, Suzuki S, Watanabe D, Hioki H, Kaneko T, Makioka K, Okamoto K, Takuma H, Tamaoka A, Hasegawa K, Nonaka T, Hasegawa M, Kawata A, Yoshida M, Nakahata T, Takahashi R, Marchetto MC, Gage FH, Yamanaka S, Inoue H: Drug Screening for ALS Using Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells. *Sci Transl Med*. 2012 Aug 1;4(145):145ra104.

4) Araki W, Oda A, Motoki K, Hattori K, Itoh M, Yuasa S, Konishi Y, Shin RW, Tamaoka A, Ogino K: Reduction of β -amyloid accumulation by reticulon 3 in transgenic mice. *Curr Alzheimer Res*. 2012 Jun 26. [Epub ahead of print]

5) Motoki K, Kume H, Oda A, Tamaoka A, Hosaka A, Kametani F, Araki W: Neuronal b-amyloid generation is independent of lipid raft association of b-secretase BACE1: analysis with a palmitoylation-deficient mutant. *Brain Behav*. 2012 May;2(3):270-82.

6) Tanaka N, Saitou H, Takao T, Iizuka N, Okuno J, Yano H, Tamaoka A, Yanagi H: Effects of gait rehabilitation with a footpad-type locomotion interface in patients with chronic post-stroke hemiparesis: a pilot study. *Clin Rehabil*. 2012 Jan 24. [Epub ahead of print]

7) Tsuji H, Nonaka T, Yamashita M, Masuda-Suzukake M, Kametani F, Akiyama H, Mann DM, Tamaoka A, Hasegawa M: Epitope mapping of antibodies against TDP-43 and detection of protease-resistant fragments of pathological TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis and

frontotemporal lobar degeneration. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012 Jan 6;417(1):116-21.

8) 詫間 浩, 玉岡 晃: Hyperekplexia とグリシン受容体. *Clinical Neuroscience* 30(12): 1404-1407, 2012.

9) 石井一弘, 玉岡 晃: ガランタミンの長期有効例- 約3年半にわたり認知機能が維持された1例-. *Cognition and Dementia* 11(1):67-71, 2012.

10) 玉岡 晃: アルツハイマー病の分子病態〜特にアミロイドβ蛋白を中心に〜、日本医科大学医学会雑誌 8(4):285-290, 2012.

11) 玉岡 晃: ここまでわかった発症原因「アルツハイマー」最前線. *ヘルシスト* 36(6):16-19, 2012.

12) 玉岡 晃: 翻訳と解説 アルツハイマー病による認知症の診断- 米国国立老化研究所/アルツハイマー病協会よりの推奨、*Cognition and Dementia*, 11(3):8-18, 2012.

13) 詫間 浩, 玉岡 晃: ワクチン療法、*Cognition and Dementia*, 11(3):76-81, 2012.

14) 玉岡 晃: 認知症性疾患 (Alzheimer 病など)、診断と治療 100 巻 (増刊号): 403-408, 2012.

15) 玉岡 晃: Aβオリゴマーの病因性と検査. *臨床検査* 56(1):57-64, 2012.

16) 玉岡 晃: 認知症疾患治療ガイドラインについて、*神経治療学* 29(2):177-181, 2012.

17) 玉岡 晃: アルツハイマー病の病態とアミロイドβ蛋白、*臨床化学* 41]5-15, 2012.

2. 学会発表

1) 玉岡 晃: 認知症: 病態と診療の最前線, 第136回つくば臨床研究会 (つくば), 1月31日, 2013.

2) 玉岡 晃: 筋萎縮性側索硬化症・脊髄症小脳変性症・多系統萎縮症の療養上の留意点について、平成24年度第2回医療従事者研修会「神経難病の療養生活支援に関する研修会」(つくば), 12月15日, 2012.

3) 玉岡 晃: アルツハイマー病: 診断と治療の進歩, 認知症治療学術講演会 (神栖), 11月22日, 2012.

4) 玉岡 晃: 認知症について, 第6回健康フォーラム in 水郷地区 (潮来), 11月17日, 2012.

5) 玉岡 晃: 認知症: 診断と治療の最前線, 第7回鹿児島認知症懇話会 (神栖), 11月7日, 2012.

6) 玉岡晃: アルツハイマー病の病因仮説〜アミロイドβ蛋白を中心に〜, 第31回日本認知症学会学術集会 (つくば), 10月26日, 2012.

7) 富所康志, 保坂愛, 佐々木一樹, 石井一弘, 南野直人, 玉岡晃: 野生型 Bri ペプチド N-末端は DPP4 によって切断される, 第31回日本認知症学会学術集会 (つくば), 10月27日, 2012.

8) 保坂愛, 荒木亘, 織田彰子, 富所康志, 玉岡晃: スタチンによるアミロイドβ蛋白産生抑制のメカニズムの検討, 第31回日本認知症学会学術集会 (つくば), 10月27日, 2012.

9) Akira Tamaoka: Alzheimer's disease: From amyloid cascade hypothesis to latest advances in treatment. *Hydrocephalus 2012 Kyoto Evening Seminar 2. The 4th Meeting of the International Society for Hydrocephalus and Cerebrospinal Fluid Disorders*, Oct 21, 2012.

10) 玉岡 晃: 筋萎縮性側索硬化症・脊髄症小脳変性症・多系統萎縮症の療養上の留意点について、平成24年度第1回医療従事者研修会「神経難病の療養生活支援に関する研修会」(つくば), 10月20日, 2012.

11) 玉岡 晃: 認知症の診断と治療の最前線, ひたちなか市学術講演会 (ひたちなか), 10月18日, 2012.

12) 玉岡 晃: 認知症の診断と治療の最前線〜アルツハイマー病を中心に〜, *Dementia Forum in Kagoshima*, 10月11日 (鹿児島), 2012.

13) 玉岡 晃: コリンエステラーゼからみたアルツハイマー病治療薬, つくば認知症ミーティング (つくば), 8月22日, 2012.

14) 玉岡 晃: 重症筋無力症状の診断と治療について、平成24年度難病相談会 (水戸), 8月18日, 2012.

15) 玉岡 晃: アルツハイマー病: 病態と治療の最前線, 坂東地区調剤薬局セミナー (坂東), 8月8日, 2012.

16) 玉岡 晃: アルツハイマー病の病因総論, MR 向け研修講演 (東京), 8月2日, 2012.

- 17) 玉岡 晃：認知症の診療の最近の知見～アルツハイマー病を中心に～，日立市医師会認知症学術講演会（日立），7月27日，2012.
- 18) 吉田祐史，寺田 真，石井一弘，玉岡 晃：相貌失認で発症し，右側優位の萎縮を認めた前頭側頭葉変性症の75歳女性例，第1回茨城県神経病態研究会（つくば），7月25日，2012.
- 19) 玉岡 晃：認知症の臨床と治療の最前線～アルツハイマー病新規治療薬を含めて～，薬剤師生涯学習講座（東京），7月22日，2012.
- 20) 玉岡 晃，山口哲人，石井亜紀子，詫間 浩，望月昭英，里井介史：神経スフェロイドを伴う遺伝性瀰漫性白質脳症-特に若年性認知症における位置づけについて-，第41回茨城県南脳血管生涯研究会（つくば），7月20日，2012.
- 21) 山口哲人，望月昭英，石井亜紀子，詫間 浩，里見介史，玉岡 晃：神経軸索スフェロイドを伴う遺伝性瀰漫性白質脳症の1家系，第13回茨城県神経免疫フォーラム（つくば），7月11日，2012.
- 22) 玉岡 晃：リバスチグミンのブチリルコリンエステラーゼ阻害の意義，アルツハイマー型認知症学術講演会（つくば），7月6日，2012.
- 23) 玉岡 晃：若年性認知症におけるミクログリアの遺伝子異常～神経軸索スフェロイドを伴う遺伝性びまん性白質脳症と那須ハコラ病を中心に～，第31回症例から学ぶ神経内科 in 広島（広島），7月4日，2012.
- 24) 玉岡 晃：認知症：診断と治療の最前線，水郷医師会学術講演会（行方），6月21日，2012.
- 25) 玉岡 晃：Alzheimer 病の分子病態，日本医科大学医学会公開シンポジウム「認知症の Update」，6月9日（東京），2012.
- 26) 山口哲人，石井亜紀子，望月昭英，詫間 浩，玉岡 晃：神経軸索ジストロフィーを伴う遺伝性白質脳症の42歳男性例，第201回日本神経学会関東・甲信越地方会（東京），6月2日，2012.
- 27) 長谷川成人，野中 隆，増田雅美，辻 浩史，玉岡 晃，吉田眞理，村山繁雄，新井哲明，秋山治彦：「蛋白ガン」としての神経変性疾患，第53回日本神経学会学術大会（東京），5月25日，2012.
- 28) 玉岡 晃，望月昭英，石井亜紀子，山口哲人，赤松 恵，詫間 浩：若年性認知症の鑑別診断における HDLS の位置付け，第53回日本神経学会学術大会（東京），5月25日，2012.
- 29) 保坂 愛，荒木 亘，織田彰子，富所康志，玉岡 晃：スタチンのアミロイドβ蛋白産生低下作用に関する研究，第53回日本神経学会学術大会（東京），5月23日，2012.
- 30) 詫間 浩，赤松 恵，岡田拓也，山下雄也，石井一弘，榊 和子，郭 伸，榊 正幸，玉岡 晃：マウス胎仔電気穿孔法を用いた新規萎縮性側索硬化症モデルの開発. 第53回日本神経学会学術大会（東京），5月23日，2012.
- 31) 富所康志，保坂 愛，石井一弘，佐々木一樹，南野直人，玉岡 晃：血漿における野生型 Bri ペプチドのN-末端の切断，第53回日本神経学会学術大会（東京），5月24日，2012.
- 32) 寺田 真，石井一弘，富所康志，詫間 浩，石井亜紀子，玉岡 晃：多発性硬化症における認知機能障害の Cog Health を用いた検討，第53回日本神経学会学術大会（東京），5月24日，2012.
- 33) 望月昭英，山口直人，石井亜紀子，玉岡 晃：軸策腫大を伴う家族性びまん性大脳白質脳症の神経画像と病理像との比較検討，第53回日本神経学会学術大会（東京），5月25日，2012.
- 34) 塩谷彩子，斉藤祐子，有馬邦正，村山繁雄，玉岡 晃：双極性感情障害の背景病理としての嗜銀顆粒，第53回日本神経学会学術大会（東京），5月25日，2012.
- 35) 石井亜紀子，大越教夫，吉田端子，玉岡 晃：ラット骨格筋の実験的筋再生過程における水溶性フラレンの効果，第53回日本神経学会学術大会（東京），5月25日，2012.
- 36) 玉岡 晃：Closing Remarks- レミニールの作用機構を中心に-，レミニール1周年記念講演会（つくば），5月10日，2012.
- 37) 玉岡 晃：認知症診療の最新の知見- アルツハイマー病を中心に-，レミニール発売1周年記念講演会（水戸），4月19日，2012.
- 38) 玉岡 晃：認知症：診断と治療の最前線，旭川認知症懇話会（旭川），4月6日，2012.
- 39) 玉岡 晃：日常診療にみられる神経難病と今後の展望～パーキンソン病，多発性硬化症，

重症筋無力症を中心に～，平成 23 年度難病研修会（水戸），3 月 15 日，2012.

40) 玉岡 晃：認知症の診断と治療の進歩，メマリー発売 1 周年記念講演会（取手），2 月 23 日，2012.

41) 山口哲人，保坂 愛，石井亜紀子，大越教夫，詫間 浩，玉岡 晃，高橋祐二，後藤 順，辻 省次：下肢の下位運動ニューロン徴候で発症し、SOD1 遺伝子 Glu100Lys 変異を認めた家族性筋萎縮性硬化症（FALS）の 33 歳男性例，第 5 回茨城県神経内科フォーラム（つくば），2 月 17 日，2012.

42) 山口哲人，保坂 愛，石井亜紀子，大越教夫，玉岡 晃，高橋祐二，後藤 順，辻 省次：下肢の下位運動ニューロン徴候で発症し，SOD1 遺伝子 Glu100Lys 変異を認めた家族性筋萎縮性硬化症（FALS）の 33 歳男性例，第 585 回日本内科学会関東地方会（東京），2 月 11 日，2012.

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 (難治性疾患等克服研究事業 (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

アポリポ蛋白 E がアミロイド β 蛋白質のオリゴマー化に与える影響の検討

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分野

共同研究者 橋本唯史^{1,2}、堀由起子^{1,2}、Alberto Serrano-Pozo²、Matthew P Frosch²、
 Bradley T Hyman²

¹東京大学大学院医学系研究科神経病理学分野、²マサチューセッツ総合病院アルツハイマー病ユニット

研究要旨 アポリポ蛋白 E (apoE)の遺伝多型である $\epsilon 4$ アレルはアルツハイマー病 (AD)発症の遺伝的危険因子として知られる。しかし apoE4 がどのようにして AD 発症に関わるか不明である。近年アミロイド β 蛋白質 (A β)オリゴマーは神経細胞障害性を示すアイソフォームとして注目されている。そこで本研究では apoE の A β オリゴマー形成に対する作用を明らかにするため、まず apoE $\epsilon 2/\epsilon x$ 、 $\epsilon 3/\epsilon 3$ 、 $\epsilon 4/\epsilon 4$ 各アレルを持つ AD 患者脳を用い、脳内の TBS 可溶性 A β オリゴマー量を検討したところ、 $\epsilon 4/\epsilon 4$ アレルを持つ AD 患者脳では他アレルの患者脳に比して有意に A β オリゴマー量が上昇していることを見出した。この結果を検証するため、split-luciferase tag を付加した A β を用いた A β オリゴマーアッセイ系を用い検討したところ、apoE4 は apoE2、apoE3 に比べ有意に A β オリゴマー量を増加させることがわかった。これらの結果は apoE4 が他のアイソフォームに比べ、A β のオリゴマー化を促進することにより AD 発症リスクを高めている可能性を示唆するものである。

A. 研究目的

アルツハイマー病の発症機序として A β が凝集する過程において神経細胞に障害を与えると考えるアミロイド仮説が広く支持されている。しかしどのようなアイソフォームの A β がどのようにして神経細胞障害性を発揮するか未だ不明である。近年可溶性 A β オリゴマーが神経細胞障害性を示すことが報告され注目されている。ApoE の遺伝多型である $\epsilon 4$ アレルは AD 発症の遺伝的危険因子である。しかし apoE4 はどのようにして AD 発症に関わるか不明である。我々はこれまでに apoE4 が apoE3 に比べ、前線維状態である A β protofibril の形成、さらに A β 蓄積を促進することを明らかにした。今回はさらに apoE がアイソフォーム特異的に A β オリゴマー形成にどのような影響を与えるか検討を行った。

B. 研究方法

apoE $\epsilon 4/\epsilon 4$ アレルを持つ AD 患者 10 例、apoE $\epsilon 3/\epsilon 3$ アレルを持つ AD 患者 10 例、apoE $\epsilon 2$ アレル

を持つ AD 患者 6 例、認知症症状のない同年代コントロール 8 例の前頭葉皮質より TBS 可溶画分を抽出し、A β オリゴマー量を測定した。またゲルろ過カラム superdex75 を用いて分離し、A β オリゴマーのサイズを検討した。さらに相補的な split-luciferase tag が付加された A β を用い、A β オリゴマーを培養上清に分泌する HEK293 細胞を樹立し、apoE を遺伝子導入することにより apoE が A β オリゴマー形成に及ぼす影響を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究はマサチューセッツ州総合病院において承認を受け、マサチューセッツ州アルツハイマー病研究センターブレインバンクより十分にインフォームドコンセントを得られた症例の剖検脳を解析に用いた。

C. 研究結果

ゲルろ過カラムを用いた検討から、AD患者脳 TBS可溶画分には2-merから3-mer程度の低分子量

A β オリゴマーと、100 kDa以上の高分子量A β オリゴマーが存在することがわかり、さらに高分子量A β オリゴマーは免疫沈降法によりapoEと結合していることがわかった。さらにapoE ϵ 4/ ϵ 4アレルを持つAD患者脳には ϵ 3/ ϵ 3アレルを持つAD患者に比べ約2.7倍、 ϵ 2アレルを持つAD患者に比べ約6.9倍A β オリゴマー量が多いことが分かった。

そこでA β オリゴマー形成過程を特異的にモニターするために、split-luciferase complementation assayを用いて検討した。相補的なsplit-luciferase taggedが付加されたA β を発現するHEK293細胞にapoE2, E3, E4をそれぞれ遺伝子導入したところ、apoE4は他のアイソフォームに比べ有意にA β オリゴマー量を増加させることを見出した。apoE4のArg61はその高次構造維持に重要なアミノ酸であることが知られている。そこでR61T変異を持つapoE4を遺伝子導入したところ、apoE4と比べ、A β オリゴマー量が有意に低下することが分かった。

D. 考察

以上の結果から apoE は A β と相互作用してそのオリゴマー形成に関わる事が明らかとなった。また apoE4 は E2, E3 と比べ A β オリゴマー形成促進効果が大きいことが分かった。R61T 変異により apoE4 の A β オリゴマー形成促進効果が抑制されたことから、apoE4 と E2, E3 の高次構造の違いがアイソフォーム特異的な A β オリゴマー化への作用の違いに重要であると考えられる。これらの結果から apoE4 アレル保因者は apoE3 アレル保因者に比べ脳内の A β オリゴマー量が増加し、神経細胞障害性が増大することにより AD 発症が早まる可能性が示唆された。

E. 結論

apoE は脳内において A β と相互作用し、A β のオリゴマー化に関わり、また apoE4 は apoE2, apoE3 に比べ A β オリゴマー化を促進する効果があることを明らかにした。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hayashi I, Takatori S, Urano Y, Iwanari H, Osawa S, Morohashi Y, Li T, Wong PC, Chiba S, Kodama T, Hamakubo T, Tomita T, Iwatsubo T: Neutralization of the γ -secretase activity by monoclonal antibody against extracellular domain of nicastrin. *Oncogene* 31:787-798, 2012.
- 2) Takeo K, Watanabe N, Tomita T, Iwatsubo T: Contribution of γ -secretase cofactors to the formation of catalytic pore of presenilin 1. *J Biol Chem* 287:25834-25843, 2012.
- 3) Suzuki K, Hayashi Y, Nakahara S, Kumazaki H, Prox J, Horiuchi K, Zheng M, Tanimura S, Nishiyama Y, Osawa S, Sehara-Fujisawa A, Saftig P, Yokoshima S, Fukuyama T, Matsuki N, Koyama R, Tomita T, Iwatsubo T: Activity-dependent proteolytic cleavage of neuroligin-1. *Neuron* 76:410-422, 2012.
- 4) Takagi-Niidome S, Tomita T, Iwatsubo T: Inhibition of γ -secretase activity by a monoclonal antibody against the extracellular hydrophilic loop of presenilin 1. *Biochemistry* 52:61-69, 2013.

2. 学会発表

- 1) From protein deposits to disease-modifying therapies: a personal history longing for the cure of Alzheimer's disease. Potamkin prize award presentation. 64th American Academy of Neurology. April 24, 2012, New Orleans.
- 2) Alzheimer's disease: from molecular pathology to disease-modification. APRU-BMAP 2012 / FIRST 2012 Symposia. August 31, 2012, Tokyo.

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 (難治性疾患等克服研究事業 (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

アルツハイマー病における脳微小出血と脳糖代謝・灰白質容量との関連

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 佐村木美晴*、松成一朗**、吉田光宏*、島 啓介*、篠原もえ子*、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)

**先端医学薬学研究センター

研究要旨 アルツハイマー病(AD)において脳微小出血(BMB)と灰白質容量、脳糖代謝との関連を検討した。脳MRI T2*GE法にてBMBの有無を評価しえたADで、BMB以外の脳血管障害を有さない140例(男性62例、女性78例、平均年齢70.2歳)を対象とした。ADはBMBを認めない群(BMB-AD)と認める群(BMB+AD)の2群に分けて、さらに、BMB+AD群から大脳皮質および大脳皮質下のみにBMBを認めるAD群 [ボストン診断基準のprobableあるいはpossible cerebral amyloid angiopathy (CAA)] (CAA+AD)を抽出した。BMB-ADとBMB+AD間において、およびBMB-ADとCAA+AD間において、頭部MRI、18-F fluorodeoxyglucose positron emission tomography (18F-FDG PET)を比較した。ADにおいてBMBは23例(16%)に認められた。BMB+AD 23例中、CAA+ADは11例であった。BMB+AD 23例と、BMB-AD 117例で頭部MRI、FDG-PETを群間比較した結果、BMB+AD群において頭部MRIでは両側前頭葉、側頭葉、島皮質などで灰白質容積が低下し、FDG-PETでは両側島皮質、基底核、帯状回などで代謝低下を認めた。また、CAA+AD 11例と、BMB-AD 117例で群間比較した結果、頭部MRIでは両側側頭葉、右島皮質などの灰白質容積が低下し、FDG PETでは、両側島皮質、帯状回、右基底核などで代謝低下を認めた。BMB+AD、CAA+ADでは、BMB-ADと比較し灰白質容積、糖代謝共に低下していた。ADにおけるCAAの合併は灰白質容積、脳糖代謝に影響を与えることが示唆される。

A. 研究目的

アルツハイマー病(Alzheimer's disease: AD)では脳微小出血(brain microbleed: BMB)が多くみられ、しばしば脳アミロイドアンギオパチー(cerebral amyloid angiopathy: CAA)に関連している。CAAに焦点をあてADにおけるBMBと灰白質容量、脳糖代謝との関連を明らかにする。

B. 研究方法

脳MRI T2*GE法にてBMBの有無を評価しえたADで、BMB以外の脳血管障害を有さない140例(男性62例、女性78例、平均年齢70.2±8.8歳)を対象とした。ADをBMBを認めない群(BMB-AD)と認める群(BMB+AD)の2群に分け、さらに、BMB+AD群から大脳皮質および大脳皮質下のみにBMBを認めるAD群(ボストン診断基

準のprobableあるいはpossible CAA) (CAA+AD)を抽出した。認知機能はMini-Mental State Examination (MMSE)にて評価した。BMB-ADとBMB+AD間、およびBMB-ADとCAA+AD間において、頭部MRI、18-F fluorodeoxyglucose positron emission tomography (18F-FDG PET)、11-C Pittsburgh compound-B PET (11C-PIB PET)を比較した。

(倫理面への配慮)

本研究は、金沢大学及び先端医学薬学研究センターの倫理委員会で承認されている。

C. 研究結果

ADにおいてBMBは23例(16%)に認められた。BMB+AD 23例中、CAA+ADは11例(7.8%)であった。

BMB+AD群ではBMBは側頭葉に最も多く分布し、次いで頭頂葉に分布していた。CAA+AD群でもBMBが最も多く分布していたのは側頭葉であり、次いで後頭葉に多く分布していた。MMSEはBMB-AD群では 21.2 ± 3.6 、BMB+AD群では 21.9 ± 3.6 、CAA+AD群では 20.8 ± 4.1 と各群間に差はなかった。BMB+AD 23例と、BMB-AD 117例で頭部MRI、¹⁸F-FDG PETを群間比較した結果、BMB+AD群において頭部MRIでは両側前頭葉、側頭葉、島皮質などで灰白質容積が低下し、FDG-PETでは両側島皮質、基底核、帯状回などで代謝低下を認めた。また、CAA+AD 11例と、BMB-AD 117例で群間比較した結果、頭部MRIでは両側側頭葉、右島皮質などの灰白質容積が低下し、FDG PETでは、両側島皮質、帯状回、右基底核などで代謝低下を認めた。¹¹C-PIB PETはBMB+AD群で4例施行し、そのうち1例はCAA+ADであった。BMB-AD群では11例に施行し得た。¹¹C-PIBのStandardized Uptake Value Ratio (SUVR)は各群間において有意差はなく、BMBとPIB陽性部位との間に明らかな関連を認めなかった。

D. 考察

ADにおけるCAAの合併は認知機能への影響は明らかではないが、灰白質容積、脳糖代謝には影響することが示唆される。BMBが多い側頭葉に灰白質容積、糖代謝低下を認める傾向があることも上記を示唆している。

また、BMBとPIB集積との間で明らかな関連を認めない要因として、ADでは脳実質に顕著なアミロイド沈着があるため、CAAの血管アミロイド沈着の影響を検出しにくい可能性が考えられる。

E. 結論

BMB+AD、CAA+ADでは、BMB-ADと比較し灰白質容積、糖代謝共に低下していた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hirohata M, Ono K, Takasaki JI, Takahashi R, Ikeda T, Morinaga A, Yamada M: Anti-amyloidogenic effects of soybean isoflavones in vitro: fluorescence spectroscopy demonstrating direct binding to A β monomers, oligomers and fibrils. *Biochim Biophys Acta (Molecular Basis of Disease)* 1822: 1316-1324, 2012.
- 2) Ono K, Li L, Takamura Y, Yoshiie Y, Zhu L, Han F, Mao X, Ikeda T, Takasaki J, Nishijo H, Takashima A, Teplow DB, Zagorski MG, Yamada M: Phenolic compounds prevent amyloid β -Protein oligomerization and synaptic dysfunction by site specific binding. *J Biol Chem* 287: 14631-14643, 2012.
- 3) Ono K, Mochizuki H, Ikeda T, Nihira T, Takasaki JI, Teplow DB, Yamada M: Effect of melatonin on α -synuclein self-assembly and cytotoxicity. *Neurobiol Aging* 33: 2172-2185, 2012.
- 4) Ono K, Yamada M: Vitamin A and Alzheimer's disease. *Geriatr Gerontol Int* 12: 180-188, 2012.
- 5) Ono K, Takahashi R, Ikeda T, Yamada M: Cross-seeding effects of amyloid β -protein and α -synuclein. *J Neurochem* 122: 883-890, 2012.
- 6) Sakai K, Ono K, Harada H, Shima K, Notoya M, Yamada M: Parkinson's disease showing progressive conduction aphasia. *Neurol Sci* 33: 399-402, 2012.
- 7) Sakai K, Hayashi S, Sanpei K, Yamada M, Takahashi H: Multiple cerebral infarcts with a few vasculitic lesions in the chronic stage of cerebral amyloid angiopathy-related inflammation. *Neuropathology* 32: 551-556, 2012.
- 8) Samuraki M, Matsunari I, Chen WP, Shima K, Yanase D, Takeda N, Matsuda H, Yamada M: Glucose metabolism and gray-matter concentration in apolipoprotein E ϵ 4 positive normal subjects. *Neurobiol Aging* 31: 2321-2323, 2012.
- 9) Shima K, Matsunari I, Samuraki M, Chen WP, Yanase D, Noguchi-Shinohara M, Takeda N, Ono K, Yoshita M, Miyazaki Y, Matsuda H, Yamada M: Posterior cingulate atrophy and metabolic decline in early stage Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 33:

2006-2017, 2012.

10) Sugano K, Yokogawa M, Yuki S, Dohmoto C, Yoshita M, Hamaguchi T, Yanase D, Iwasa K, Komai K, Yamada M: Effect of cognitive and aerobic training intervention on older adults with mild or no cognitive impairment: a derivative study of the nakajima project. *Dement Geriatr Cogn Dis Extra* 2: 69-80, 2012.

11) Takahashi R, Ono K, Ikeda T, Akagi A, Noto D, Nozaki I, Sakai K, Asakura H, Iwasa K, Yamada M: Coagulation and fibrinolysis abnormalities in familial amyloid polyneuropathy. *Amyloid* 19: 129-132, 2012.

12) Yamada M: Predicting cerebral amyloid angiopathy-related intracerebral hemorrhages and other cerebrovascular disorders in Alzheimer's disease. *Front Neurol* 3: 64, 2012.

13) Yamada M, Naiki H: Cerebral amyloid angiopathy. *Prog Mol Biol Transl Sci* 107: 41-78, 2012.

14) 小野賢二郎, 山田正仁: 認知症の阻止を狙った治療薬開発研究「Aβ凝集機構解明から予防・治療薬開発へ」*日本認知症学会誌* 26: 1-6, 2012.

15) 佐村木美晴, 小野賢二郎, 山田正仁: 認知症診断に役立つ臨床検査: PET. *認知症の最新医療* 2: 22-26, 2012.

16) 佐村木美晴, 山田正仁: アルツハイマー型認知症. *Suzuken Medical* 15: 4-6, 2012.

17) 佐村木美晴, 山田正仁: 疾患 SUMMARY: アルツハイマー型認知症. *Suzuken Pharma* 15: 6, 2012.

18) 篠原もえ子, 山田正仁: どう診断する? — 認知症の診断. *内科* 109: 757-762, 2012.

19) 篠原もえ子, 山田正仁: 認知症の問題とは? *臨床検査* 56: 8-12, 2012.

20) 篠原もえ子, 山田正仁: 薬剤による認知機能障害. *Brain and Nerve* 64: 1405-1410, 2012.

21) 島 啓介, 松成一朗, 佐村木美晴, 陳 偉萍, 柳瀬大亮, 篠原もえ子, 竹田のぞみ, 小野賢二郎, 吉田光宏, 宮崎吉春, 松田博史, 山田正仁: 早期アルツハイマー病における後部帯状回萎縮と代謝低下. *金沢大学十全医学会雑誌* 121: 70-71, 2012.

22) 浜口 毅, 山田正仁: βアミロイドの propagation

による進展. *Current Therapy* 30: 336-340, 2012.

23) 山田正仁: アミロイドーシスの臨床. *画像診断* 32: 1100-1110, 2012.

24) 山田正仁: アルツハイマー病の病態と診断. *日本医師会雑誌* 141: 534-538, 2012.

25) 佐村木美晴, 山田正仁: 認知症診断のアルゴリズム. 辻 省次 (編) *アクチュアル脳・神経疾患の臨床 認知症 神経心理学的アプローチ*, 中山書店, 東京, pp20-25, 2012.

26) 山田正仁, 吉田光宏, 篠原もえ子: DLB の画像診断 MIBG 心筋シンチグラフィと他の診断ツールとの比較. レビー小体型認知症研究会 (編) *レビー小体型認知症の最前線 5th. Anniversary*. 株式会社 harunosora, 東京, pp18-23, 2012.

27) 吉田光宏, 山田正仁: DLB における MIBG 心筋シンチグラフィの診断的価値の確立に向けて. レビー小体型認知症研究会 (編) *レビー小体型認知症の最前線 5th. Anniversary*, 株式会社 harunosora, 東京, pp103-106, 2012.

28) 山田正仁: Lewy 小体型認知症の臨床的特徴とその診断基準は? 中島健二, 和田健二 (編) *認知症診療 Q&A92*. 中外医学社, 東京, pp67-69, 2012.

29) 山田正仁: 「Lewy 小体型認知症」と「認知症を伴う Parkinson 病」は同じ病気ですか? 症状の違いはあるのでしょうか? 中島健二, 和田健二 (編) *認知症診療 Q&A92*, 中外医学社, 東京, pp70-71, 2012.

30) 山田正仁: アミロイドポリニューロパチー. 小林祥泰, 水澤英洋 (編) *神経疾患最新の治療 2012-2014*, 南江堂, 東京, pp311-313, 2012.

2. 学会発表

1) Yamada M. Protein aggregation as a therapeutic target of cerebral amyloidosis. *Clinical Neuroscience Seminar*, Southampton, May 8, 2012.

2) Hirohata M, Ono K, Takasaki J, Yamada M. Anti-amyloidogenic effects of isoflavones *in vitro*: fluorescence spectroscopy demonstrating direct interactions between isoflavones and Aβ. *Alzheimer's Association International Conference on Alzheimer's Disease 2012*, Vancouver, July 14-19, 2012.

3) Ono K, Takasaki J, Yoshiike Y, Hirohata M, Ikeda T, Morinaga A, Takashima A, Yamada M. Vitamin A has anti-oligomerization effects on amyloid- β *in vitro*. Alzheimer's Association International Conference on Alzheimer's Disease 2012, Vancouver, July 14-19, 2012.

4) Matsunari I, Samuraki M, Shima K, Wei-Ping Chen, Noguchi-Shinohara M, Ono K, Yoshita M, Miyazaki Y, Matsuda H, Yamada M. Hippocampal glucose metabolism is reduced in some, but not all patients with Alzheimer's disease: the Ishikawa brain imaging study. Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine, Milan, October 27-31, 2012.

5) 赤木明生, 岩佐和夫, 坂井健二, 本崎裕子, 小野賢二郎, 杉山 有, 山田正仁: 新規トランスサイレチン遺伝子変異 (TTR Leu58arg) を有する家族性アミロイドポリニューロパチー家系の臨床的検討. 第 53 回日本神経学会学術大会, 東京, 5.22-25, 2012.

6) 小野賢二郎, 高崎純一, 吉池裕二, 廣畑美枝, 池田篤平, 森永章義, 高島明彦, 山田正仁: ビタミン A による A β オリゴマー形成抑制効果. 第 53 回日本神経学会学術大会, 東京, 5.22-25, 2012.

7) 高橋良一, 小野賢二郎, 池田篤平, 赤木明生, 能登大介, 野崎一朗, 坂井健二, 朝倉英策, 岩佐和夫, 山田正仁: 家族性アミロイドポリニューロパチーの凝固・線溶異常. 第 53 回日本神経学会学術大会, 東京, 5.22-25, 2012.

8) 廣畑美枝, 小野賢二郎, 高崎純一, 森永章義, 池田篤平, 山田正仁: NSAIDs は β アミロイド蛋白オリゴマー形成抑制作用およびシーディング抑制作用を有する. 第 53 回日本神経学会学術大

会, 東京, 5.22-25, 2012.

9) Ono K, Takasaki J, Yoshiike Y, Hirohata M, Ikeda T, Morinaga A, Takashima A, Yamada M: Vitamin A inhibits A β oligomerization *in vitro*. 第 35 回日本神経科学大会 Neuroscience 2012, 名古屋, 9.18-21, 2012.

10) 小野賢二郎, Lei Li, 高村雄策, 吉池裕二, 池田篤平, 西条寿夫, 高島明彦, David B. Teplow, Michael G. Zagorski, 山田正仁: フェノール化合物は特異的結合によって A β オリゴマー形成及びシナプス毒性を抑制する. 第 31 回日本認知症学会学術集会, 筑波, 10.26-28, 2012.

11) 廣畑美枝, 小野賢二郎, 高崎純一, 高橋良一, 池田篤平, 森永章義, 山田正仁: イソフラボンの β アミロイド蛋白モノマー・オリゴマー・線維への作用の検討. 第 31 回日本認知症学会学術集会, 筑波, 10.26-28, 2012.

12) 山田正仁: DLB 診断のための MIBG 心筋シンチグラフィ. 第 6 回レビー小体型認知症研究会, 横浜, 11.10, 2012.

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 (難治性疾患等克服研究事業 (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

p62/SQSTM1-dependent autophagy of Lewy body-like α -synuclein inclusions

研究分担者 徳田隆彦 京都府立医科大学分子脳病態解析学(神経内科併任)

共同研究者 渡邊義久*、田中雅樹*、建部陽嗣**、水野敏樹**、中川正法**

*京都府立医科大学基礎老化学、**同神経内科学

研究要旨 パーキンソン病(PD)の培養細胞モデルを用い、1) α -シヌクレイン(α -Syn)凝集体のオートファジーによる分解、および2) α -Syn の分解活性を有するセリンプロテアーゼである neurosin の細胞内および細胞外での protease 活性を解析した。1) α -Syn 封入体はオートファジーによる分解の標的となっており、この分解にはオートファジーアダプター蛋白質 p62 が必要であった。2) Neurosin の α -Syn 分解活性は細胞外に分泌された場合に認められ、neurosin は主に細胞外プロテアーゼとして機能している可能性が考えられた。

A. 研究目的

α -Syn は様々な分解機構により代謝され、ユビキチン・プロテアソーム系やオートファジー・リソソーム系の破綻により α -Syn は蓄積し凝集体を形成する。しかし、これらの分解系が α -Syn のどのような分子種 (monomer、oligomer や fibril) を分解し得るのかは分かってない。また我々はセリンプロテアーゼである neurosin が α -Syn 分解活性を有することを報告している。しかし、近年重要視されている細胞外の α -Syn および封入体を形成した α -Syn がこのような分解系の標的となり得るのかは明らかではない。我々は、培養細胞モデルを用いて、1) オートファジーによる細胞内 α -Syn 封入体の分解機構、および2) neurosin による細胞内・外の α -Syn 分解機構を解析した。

B. 研究方法

1) オートファジーによる細胞内 α -Syn 封入体の分解機構の解析

α -Syn monomer 溶液を2週間攪拌しつつ incubate して α -Syn を *in vitro* で線維化させた。この線維化 α -Syn を Lipofectamine 試薬を用いて HEK293 細胞へ導入することで細胞内に α -Syn 封入体を形成した細胞を作製した。この細胞を用い、リソソームやオートファジー関連蛋白質の RNAi による

阻害が α -Syn 封入体の分解過程に及ぼす影響を、抗リン酸化 α -Syn (S129)抗体、抗 LC3 抗体、抗ユビキチン(Ub)抗体、抗 p62 抗体を用いた免疫染色によって解析した。

2) neurosin による細胞内・外の α -Syn 分解機構の解析

Neurosin 発現ベクターを HEK293T 細胞にトランスフェクトし、細胞外における neurosin の酵素活性の有無は protease activity assay によって検討した。細胞内における酵素活性の有無は zymography によって検討した。細胞外 neurosin による α -Syn 分解活性を評価するために、培養上清に recombinant α -Syn を添加し分解過程を評価した。さらに、細胞内 neurosin による α -Syn 分解活性を評価するため neurosin と α -Syn の共発現細胞を作製し、細胞溶解液中の α -Syn 分解産物の有無を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究はヒトおよびヒト由来の生体試料を対象とはしていない。

C. 研究結果

1) オートファジーによる細胞内 α -Syn 封入体の分解機構の解析

①α-Syn 凝集体のオートファジーによる分解

HEK293 細胞に α-Syn 凝集体を形成させ、4 時間後に α-Syn 凝集体(P-αSyn)とオートファゴソームマーカーLC3 の局在を検討した。コントロール細胞では P-αSyn 陽性凝集体と GFP-LC3 は共局在を示した(図 1、Cont-siRNA)。一方、オートファゴソーム形成に必須の蛋白である Atg5 のノックダウン細胞では、GFP-LC3 の共局在は観察できなかった(図 1、Atg5-siRNA)。また、これらの細胞における 24 時間後の α-Syn 凝集体の残存率は、コントロール細胞では約 20%であったが、Atg5 ノックダウン細胞では 60%の凝集体が分解されずに残存していた。これらの結果から、α-Syn 凝集体はオートファジー分解のターゲットとなり得ることが分かった。

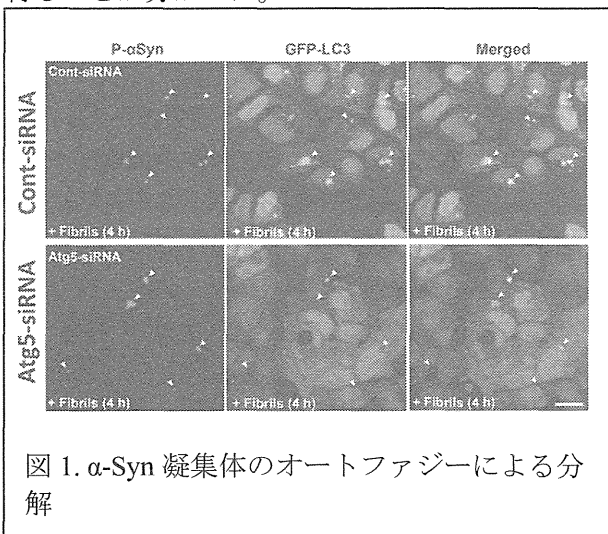


図 1. α-Syn 凝集体のオートファジーによる分解

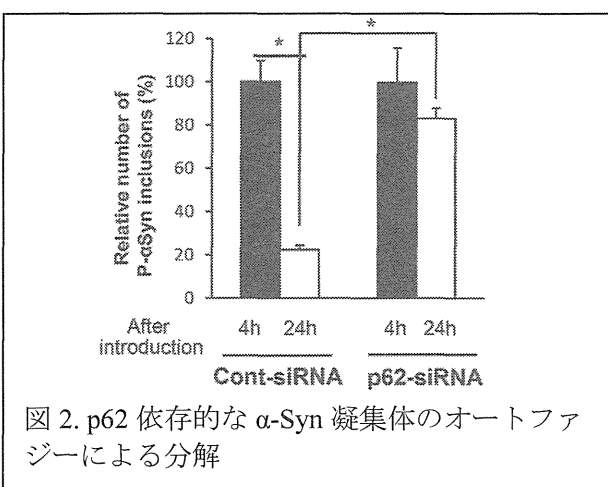


図 2. p62 依存的な α-Syn 凝集体のオートファジーによる分解

②α-Syn 凝集体の p62/SQSTM1 依存的分解

異常蛋白質のオートファジーによる選択的分解にはオートファジーアダプター蛋白質である

p62 が必要である。α-Syn 凝集体のオートファジー分解における p62 の必要性を検討した。p62 を siRNA でノックダウンした後、α-Syn fibril を細胞内へ導入した。p62 ノックダウン細胞では、α-Syn 凝集体形成はコントロール細胞同様に起きるが、GFP-LC3 との共局在は示さなくなった。また、24 時間後には、コントロール細胞では 80%の α-Syn 凝集体が分解されていたが、p62 ノックダウン細胞では 20%しか分解されていなかった(図 2)。

2) neurosin による細胞内・外の α-Syn 分解機構の解析

①細胞外に分泌された neurosin の α-Syn 分解活性

培養上清におけるセリンプロテアーゼ活性の検討では、neurosin をトランスフェクトした細胞の培養上清中においてセリンプロテアーゼ活性が検出された。Neurosin 発現細胞の培養上清中に添加した recombinant α-Syn は経時的に減少した(図 3)。以上の結果より、細胞外に分泌された neurosin は α-Syn 分解活性を有していることが確認された。

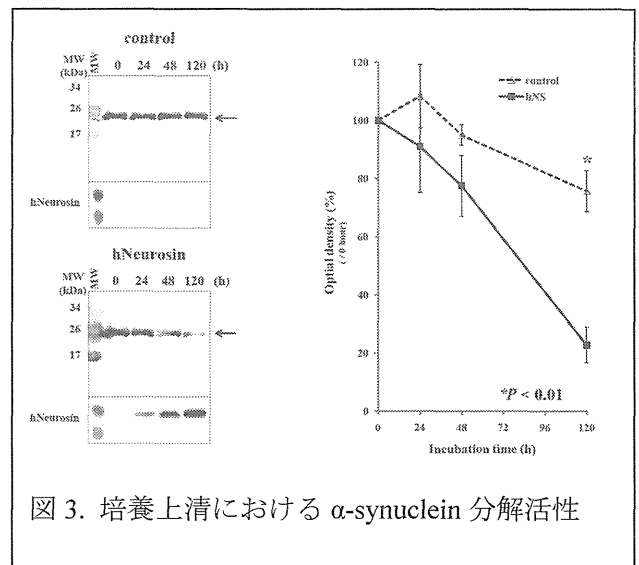
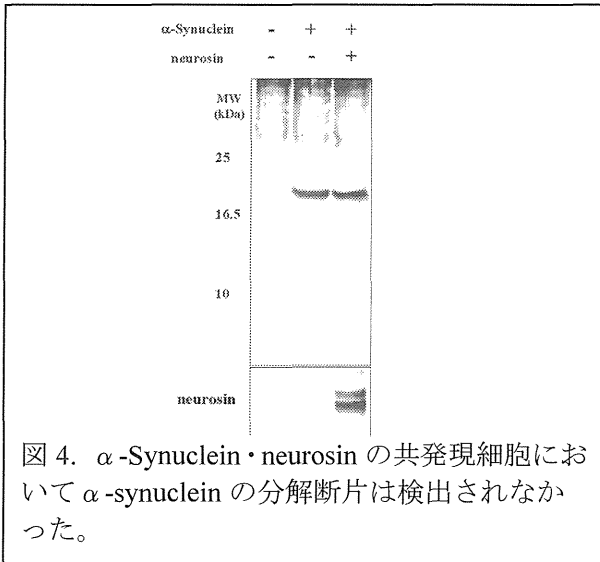


図 3. 培養上清における α-synuclein 分解活性

②細胞内に存在する neurosin の α-Syn 分解活性

Neurosin および α-Syn を共発現させた HEK293T 細胞のウェスタンブロッティングによる検討(図 4)においても、neurosin 発現細胞の細胞抽出液中に α-Syn の分解産物は検出できなかった。以上から細胞内の neurosin は α-Syn 分解活性を有していないと考えられた。



D. 考察

1) オートファジーによる細胞内 α -Syn 封入体の分解機構

これまでの研究により、オートファジー・リソソーム系の抑制により α -Syn 凝集体が細胞内に蓄積することが明らかにされていた。しかし、オートファジーがどのような α -Syn 分子種を分解ターゲットにしているのかは十分には明らかでなかった。本研究では、 α -Syn 凝集の細胞モデル系を用い、fibril 分子などを含む α -Syn 凝集体がオートファジーにより分解されること、および、この分解過程に p62 が必要であることを明らかにした。これらの結果から、細胞内に蓄積した α -Syn 凝集体は p62 と結合することでオートファゴソーム内にリクルートされ、最終的にリソソームで分解されることが示唆された。

2) neurosin による α -Syn 分解機構

今回の結果から、neurosin は細胞外に分泌され、細胞外でプロテアーゼとして機能することが示唆された。細胞外に分泌された neurosin は、培養上清中の α -Syn 量を減少させたことから、 α -Syn に対する分解活性を有していると考えられるが、細胞内の neurosin には α -Syn に対する分解活性がないことから、neurosin は細胞外に分泌された後に α -Syn 分解活性を獲得する可能性が高いと考えられた。

E. 結論

- 1) α -Syn 封入体はオートファジーによる分解の標的となっており、この分解にはオートファジーアダプター蛋白質 p62 が必要であると考えられた。
- 2) Neurosin の α -Syn 分解活性は細胞外に分泌された場合に認められ、neurosin は主に細胞外プロテアーゼとして機能している可能性が考えられた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Ishigami N, Tokuda T, Ikegawa M, Komori M, Kasai T, Kondo T, Matsuyama Y, Nirasawa T, Thiele H, Tashiro K, Nakagawa M: Cerebrospinal fluid proteomic patterns discriminate Parkinson's disease and multiple system atrophy. *Mov Disord* 27: 851-857, 2012.

2) Watanabe Y, Tatebe H, Taguchi K, Endo Y, Tokuda T, Mizuno T, Nakagawa M, Tanaka M. p62/SQSTM1-dependent autophagy of Lewy body-like α -synuclein inclusions. *PLoS One* 7: e52868, 2012.

2. 学会発表

1) 徳田隆彦, 石神紀子, 中川正法, 池川雅哉, 近藤誉之, 小森美華: パーキンソンニズム患者の髄液プロテオーム解析. 第6回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres (Movement Disorder Society of Japan), 京都, 2012.10.12.

2) Watanabe Y, Tatebe H, Taguchi K, Endo Y, Tokuda T, Mizuno T, Nakagawa M, Tanaka M. p62/SQSTM1-dependent autophagic clearance of Lewy body-like α -synuclein inclusions. 42th annual meeting of the Society for Neuroscience 2012, New Orleans, 2012.10.13.

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 (難治性疾患等克服研究事業 (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

Aβ 重合体の神経毒性発現機序解明

分担研究者 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
 研究協力者 松原 悦朗 弘前大学大学院医学研究科 脳神経内科学講座
 瓦林 毅 弘前大学大学院医学研究科 脳神経内科学講座

研究要旨 Sortilin は Aβ 重合体を細胞内に取り込み、その細胞内蓄積を誘導するばかりでなく、神経細胞膜上で P75^{NTR} と death シグナリング受容体を形成し、Aβ 重合体の神経毒性発現機構におけるキー分子であるとの作業仮説を検証した。本研究において Sortilin は細胞外 Aβ 重合体の神経毒性発現を直接制御するばかりでなく、細胞内 Aβ 重合体やタウの分解・クリアランスも制御しうる重要な分子と考えられた。

A. 研究目的

Aβ 重合体は神経・シナプス毒性を持ち、アルツハイマー型認知症における記憶障害発症の分子基盤と考えられている。その毒性機構の解明は根本的治療法開発に極めて重要であるものの、詳細は依然不明である。本研究では我々の発明抗体(抗 Aβ 重合体抗体)を最大限に活用し、Aβ 重合体がシナプス・神経変性を惹起する分子メカニズム解明に焦点を絞り、その制御分子同定を試みた。

B. 研究方法

Aβ 重合体の神経毒性発現機序解明は、sortilin に対する siRNA 法や新規 Aβ 重合体特異的モノクローナル抗体(72D9)を用いて培養細胞系で行った。

(倫理面への配慮)

該当なし

C. 研究結果 と D. 考察

SH-SY5Y 細胞で sortilin をノックダウンすると Aβ 重合体の神経毒性が抑制された。この sortilin をノックダウンでは p75^{NTR} 依存性アポトーシス抑制が認められており、p75^{NTR} と sortilin が Aβ 重合体存在下で death シグナリング受容体を形成していると推測された。一方で、sortilin 自身は生理的条件下では Beclin-1 を介しオートファジー誘導に関与しているが、Aβ 重合体の存在する病的条件下では Beclin-1 誘導抑制からオートファゴゾーム形成・成熟抑制を引き起こすことが明らかとなった。

さらに、Aβ 重合体存在下、細胞膜上で sortilin と p75^{NTR} の death シグナリング受容体形成が誘導され、Aβ 重合体特異的モノクローナル抗体(72D9)で細胞外 Aβ 重合体を特異的に制御すると、sortilin と p75^{NTR} の death シグナリング複合体形成が阻害され、細胞外 Aβ 重合体の神経毒性も中和されることが明らかとなった。

E. 結論

Sortilin は細胞外 A β 重合体の神経毒性発現を直接制御するばかりでなく、細胞内 A β 重合体やタウの分解・クリアランスも制御しうる重要な分子と考えられた。

F. 健康危険情報
なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Takamura A, Sato Y, Watabe D, Okamoto Y, Nakata T, Kawarabayashi T, Oddo S, Laferla FM, Shoji M, Matsubara E. Sortilin is required for toxic action of A β oligomers (A β Os): Extracellular A β Os trigger apoptosis, and intraneuronal A β Os impair degradation pathways. *Life Sci.* 2012 Dec 10;91(23-24):1177-86..

Kakuda N, Shoji M, Arai H, Furukawa K, Ikeuchi T, Akazawa K, Takami M, Hatsuta H, Murayama S, Hashimoto Y, Miyajima M, Arai H, Nagashima Y, Yamaguchi H, Kuwano R, Nagaike K, Ihara Y; the Japanese Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Altered γ -secretase activity in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *EMBO Mol Med.* 2012 Apr;4(4):344-52.

Abe K, Ikeda Y, Kurata T, Ohta Y, Manabe Y, Okamoto M, Takamatsu K, Ohta T, Takao Y, Shiro Y, Shoji M, Kamiya T, Kobayashi H, Koizumi A. Cognitive and affective impairments of a novel SCA/MND crossroad mutation Asidan. *Eur J Neurol.* 2012 Aug;19(8):1070-8.

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 cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL) with multiple cerebrovascular risk factors. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2012 Feb;21(2):143-5.

2. 学会発表

Matsubara E. A β oligomer immunotherapy as a potential disease-modifying therapy for Alzheimer's disease. The 15th MNRC International Symposium, Shiga, Nov. 13, 2012 (シンポジウム).

Kawarabayashi T, Nakata T, Wakasaya Y, Matsubara E, Shoji M, A β oligomers in lipid rafts impair signal transduction pathways in transgenic mouse model of Alzheimer's disease. Neuroscience 2012, the Society for Neuroscience, 42th Annual Meeting, New Orleans, Oct 13-17, 2012.

松原悦朗, 学会奨励賞候補演題講演「Sortilin が A β 重合体の神経毒性発現を制御している」第 31 回日本認知症学会学術集会, つくば国際会議場. 2012 年 10 月 26 日.

松原悦朗, トピックス徹底討論, 免疫療法. 第 31 回日本認知症学会, つくば国際会議場, 2012 年 10 月 28 日 (シンポジウム)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患等克服研究事業 (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

ネコ科動物の脳にみられる βアミロイド沈着と神経原線維変化に関する比較病理学的研究

研究分担者 宇根有美 麻布大学獣医学部獣医学科

共同研究者 チェンバーズ ジェームズ*

*東京大学大学院農学生命科学研究科

研究要旨 本研究では、ネコ科動物の脳におけるβアミロイドの沈着と神経原線維変化について病理学的に解析し、ヒトのアルツハイマー病における脳病変と比較検討した。14頭のツシマヤマネコの脳を解析した結果、6頭にβアミロイドの沈着が観察され、そのうち5頭に神経原線維変化が観察された。これらの病変の分布は、ヒトのアルツハイマー病と類似していた。βアミロイドは、嗜銀性のプラークを形成することなく、神経網に微細顆粒状に沈着するパターンをとり、同蛋白質のN末端側エピトープがヒトとは異なることが判明した。神経原線維変化については、同病変が形成される細胞種および構成蛋白質がヒトのアルツハイマー病と同じであった。この結果から、βアミロイドが嗜銀性プラークを形成せず、アルツハイマー病型の神経原線維変化を形成することが動物で示された。

A. 研究目的

動物の脳における老化病変を解析することにより、ヒトのアルツハイマー病の病態を比較医学的な視点から理解することを目的として研究を行った。

ヒトのアルツハイマー病は、脳におけるβアミロイド沈着(Aβ)と、それに続く神経原線維変化(NFT)によって発症すると考えられている(アミロイド仮説)。これまでサルやイヌの研究から、動物では加齢性のNFTの形成はないと考えられていたが、発表者らはチーターをはじめ、一部のネコ科動物の脳に同病変を発見した。興味深いことに、これらの動物では、脳におけるAβの沈着パターンが他の動物と異なっていることが判明した。そこで、本研究ではこれらの病変を詳細に解析し、ヒトのアルツハイマー病の病態メカニズムと比較検討した。

B. 研究方法

ツシマヤマネコ 14頭の脳サンプルを用いて、病理組織学、免疫組織化学および超微形態学的手法を用いて病変解析を行った。また、保存状態が良い3個体については、サンプルからRNAを抽

出し、アミロイド前駆蛋白質Aβ領域の塩基配列を同定した。

(倫理面への配慮)

本研究に使用したサンプルは全て死亡した動物から採材しており、本研究を目的に犠牲にした個体はいない。ツシマヤマネコは天然記念物に指定されており、本研究は環境省の許可のもとに実施された。

C. 研究結果

14頭のツシマヤマネコのうち6頭にAβ42の沈着が観察され、そのうちの5頭に高リン酸化タウ抗体(AT8およびAT100)陽性の凝集物が観察された。Aβ42沈着は頭頂葉から側頭葉にはじまり、重度の個体では海馬に進展した。Aβは、嗜銀性のプラークを形成せず、神経網に微細顆粒状に沈着した。同部位は、AβN末端抗体(AβN1およびAβpN3)では染色されなかった。アミロイド前駆蛋白質mRNAのシークエンシングにより、ツシマヤマネコAβの7番目のアミノ酸残基がグルタミン酸であることが判明した(ヒト、サル、イヌなどはアスパラギン酸)。高リン酸化タウ凝集物は、海馬傍