

回にはじまり、重度の個体では海馬に進展した。高リン酸化タウ陽性領域に一致して、Gallyas-Braak染色により嗜銀性の線維状物質が観察された。また、透過型電子顕微鏡観察により、幅が10–20 nmの線維束を細胞体内に確認した。高リン酸化タウの蓄積は主に神経細胞に観察され、一部の稀突起膠細胞にも観察されたが、星状膠細胞には認められなかった。高リン酸化タウに一致して、ユビキチンおよび非リン酸化型GSK-3 $\beta$ の共局在が示された。RD3およびRD4抗体を用いた免疫染色により、NFTが3リピートタウおよび4リピートタウ両方のタウ分子種で構成されていることが示唆された。また、生後3日齢のツシマヤマネコ脳では、3リピートタウのみが発現しており、成体では3リピートタウと4リピートタウ両方が発現していた。老齢のイエネコの脳においても同様のA $\beta$ 沈着およびNFTが観察され、現在イエネコについて解析を進めている。

#### D. 考察

これまでサルやイヌの研究から、動物では加齢性のNFT形成は無いと考えられていたが、チーターだけでなくヤマネコおよびイエネコにおいてもNFTが形成されることが判明した。NFT陽性個体ではA $\beta$ 沈着を伴っており、これらの病変の関連性が動物においても考えられた。興味深いことに、ネコ科動物におけるA $\beta$ の沈着様式は他の動物種と明らかに異なっており、嗜銀性プラークを形成しないことが形態的な特徴といえる。本研究では、ツシマヤマネコのA $\beta$ N末端アミノ酸配列がヒト、サル、イヌなどと異なることが示された。

#### E. 結論

A $\beta$ 嗜銀性プラークを形成せずに、アルツハイマー病型のNFTが形成されることが動物で示された。

ヒトのアルツハイマー病に関連した病変が様々に修飾された形で動物においても観察される。これらの病変を比較検証することが、ヒト疾患の病態メカニズムを解明するアプローチになる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Serizawa S, Chambers JK, Une Y: Beta amyloid deposition and neurofibrillary tangles spontaneously occur in the brains of captive cheetahs (*Acinonyx jubatus*). *Veterinary Pathology* 49(2):304-12, 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

## 老齢ネコの海馬神経細胞内にみられる Aβ42 沈着

研究分担者 宇根有美 麻布大学獣医学部獣医学科病理学研究室

共同研究者 高橋映里佳\*、チェンバース ジェームズ\*\*

\* 麻布大学獣医学部獣医学科病理学研究室、

\*\* 東京大学農学生命科学研究科獣医病理学研究室

**研究要旨** アルツハイマー病(AD)の特徴的病理所見である Aβ 沈着と高リン酸化タウの蓄積を自然発生性に認めるイエネコ 9 頭 (平均年齢 14.3 歳、6~24 歳) を対象に神経細胞内 Aβ の局在を免疫組織化学的に検索した。その結果、程度に差があるものの、すべての猫で神経細胞内 Aβ 沈着が認められ、その程度は頭頂部から側頭部上部までほぼ同一で、側頭葉下部から海馬ではより高度の沈着を認めた。また、細胞内 Aβ は瀰漫性~小顆粒状、大顆粒状タイプの 2 つの沈着パターンに区別され、12 歳以上の 7 頭では、瀰漫性~小顆粒状タイプの沈着に加えて、海馬錐体細胞を中心として大顆粒状タイプの沈着も観察された。なお、これらの沈着は細胞外 Aβ 沈着の程度と相関せず、高リン酸化タウの蓄積は 2 頭のみにとどまっていた。AD の初期段階では、細胞内 Aβ は神経細胞毒性を示し、細胞外 Aβ 沈着の促進に繋がると考えられているが、その機序は解明されていない。よって、さらに症例数を増やし詳細に検索することで、細胞内 Aβ、細胞外 Aβ と高リン酸化タウの蓄積との関連とその機序の解明に貢献できるかもしれない。

### A. 研究目的

近年、アルツハイマー病研究が進み、脳実質における細胞外 Aβ 沈着だけでなく、神経細胞内に存在する Aβ の神経細胞への毒性が注目されるようになってきた。そこで、本研究では、細胞内 Aβ 沈着と AD 病変との関連を明らかにするために、AD の特徴病理所見である Aβ 沈着と高リン酸化タウの蓄積を自然発生性に認めるイエネコを対象として検討を行った。

### B. 研究方法

種々の原因により死亡したイエネコ計 9 頭 (平均年齢 14.3 歳、6~24 歳) の大脳、ホルマリン固定、パラフィン切片を用いた (表 1)。ヘマトキシリン・エオジン染色を施し、免疫組織化学的検索には、以下の 6 種類の抗体を用いた：①抗ヒト Aβ42 ウサギポリクローナル抗体 (IBL)、②抗ヒト Aβ42 マウスモノクローナル抗体 (12F4、Millipore)、③抗ヒト Aβ40 ウサギポリクローナル

抗体 (IBL)、④抗ヒト Aβ40 マウスモノクローナル抗体 (11A5-B10、Millipore)、⑤Aβ17-24 マウスモノクローナル抗体 (4G8、Covance)、⑥抗高リン酸化タウ抗体 (AT8、INNOGENETICS)。また、細胞外 Aβ 沈着状況は、大脳皮質内の沈着分布を基準として以下の 4 段階にスコア化した。沈着なし：-、頭頂部のみ：+、頭頂部・側頭部：++、頭頂部・側頭部・海馬：+++。

表 1 症例のプロフィール

症例	品種	年齢	性別	診断
1	mix	6歳	♀	エチレングリコール中毒
2	ロシアンブルー	9歳	♀	腎不全
3	mix	12歳	♀	血栓症
4	mix	14歳	♂	肺水腫
5	mix	15歳	♀	リンパ腫
6	mix	15歳	♀	腎不全
7	mix	15歳	♂	蓄膿症
8	mix	19歳	♂	脳腫瘍
9	mix	24歳	♀	肝破裂

(倫理面への配慮)

本研究は病死した動物を用いており、動物実験委員会などの許可を必要としない。

### C. 研究結果

全頭に認知障害などの異常行動は観察されなかった。また、ヘマトキシリン・エオジン染色で、大脳に著変は認められなかった。

免疫組織化学的検査結果を表2に示した。細胞外Aβ沈着 (Aβ40、42陽性物質) は9頭のうち、最も若い6歳例を除き、全頭の大脳皮質にみられた。また、細胞外Aβ沈着面積は頭頂部で最も広く、沈着量の増加に従い、側頭部、海馬へと沈着領域が拡大していた。

一方、神経細胞内に局在したAβは、使用したAβ抗体 4種のうち抗ヒトAβ42ウサギポリクローナル抗体のみに交差性を認めた。これらは、程度に差を認めるものの、全頭の大脳皮質全域で観察された。沈着程度は、頭頂部から側頭部上部では同一であるが、側頭葉下部から海馬では高度であった。これらの細胞内Aβは、①瀰漫性～小顆粒状、②大顆粒状の2種類の沈着パターンを示した。大部分の細胞内Aβは、瀰漫性～小顆粒状タイプとして観察され、全頭の大脳皮質全域に認められた。一方、大顆粒状タイプは12歳以上の7頭で認められ、特に海馬錐体細胞で観察された。そして、これらの沈着は細胞外Aβ沈着の程度と関連しなかった。なお、軽度の高リン酸化タウの蓄積が2頭の海馬から海馬傍回の神経細胞内に認められた。

表2 細胞内外Aβ沈着と高リン酸化タウ蓄積

症例	年齢	細胞外Aβ	細胞内Aβ		高リン酸化タウ蓄積
			瀰漫性～小顆粒状	大顆粒状	
1	6歳	—	+	—	—
2	9歳	+	+	—	—
3	12歳	+++	+	+	—
4	14歳	+	+	+	—
5	15歳	++	+	+	—
6	15歳	+++	+	+	+
7	15歳	++	+	+	—
8	19歳	+++	+	+	—
9	24歳	+++	+	+	+

### D. 考察

ADの初期変化とも解される細胞内Aβ沈着が中年～高齢層のイエネコの大脳で高率に確認され、免疫組織化学的検索からヒトと同様にAβ42の沈着であると推察された。

細胞内Aβの沈着機序として、1. 細胞内で産生されたAβの排出障害あるいは過剰産生(ミトコンドリア、小胞体、ゴルジ体、リソソーム内等に蓄積)、2. 細胞膜で産生、細胞外へ分泌されたAβの各種受容体を介した取り込み(エンドソームやリソソーム内に蓄積)が想定されている。細胞内Aβの蓄積が神経細胞死を惹起することで、細胞外にAβを放出、細胞外Aβ沈着の促進に繋がると考えられており、AD初期段階では、細胞内Aβによる神経細胞毒性の可能性も示唆されている。しかしながら、本研究では、細胞外・内Aβ沈着の分布は一致せず、ヒトで考えられている機序を支持する所見は得られなかった。イエネコにおける細胞内Aβ沈着には、大顆粒状タイプと瀰漫性・小顆粒状タイプがあったが、前者は、中年層のイエネコ2頭ではみられず、12歳以上の症例でのみ観察されたことから、加齢性変化の可能性もあったが、症例数が少なく、他の動物での報告もないため、年齢相関の有無については断定できなかった。

今後、さらに症例数を増やし詳細に検索することで、細胞内Aβ、細胞外Aβと高リン酸化タウの蓄積との関連とその機序の解明に貢献できるかもしれない。

### E. 結論

ADの初期変化とも解される細胞内Aβ沈着が中年層から高齢層のイエネコの大脳で高率に確認された。

### F. 健康危険情報

特になし。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1) Chen L., Une Y., Higuchi K., Mori M.: Cheetahs have 4 serum amyloid A genes evolved through repeated duplication events. *J. Hered.* 103: 115-129, 2012.

2) Ueda M., Ageyama N., Nakamura S., Nakamura M., Chambers JK., Misumi Y., Mizuguchi M., Shinriki S., Kawahara S., Tasaki M., Jono H., Obayashi K., Sasaki E., Une Y., Ando Y.: Aged vervet monkeys eveloping

transthyretin amyloidosis with the human disease-causing Ile122 allele: a valid pathological model of the human disease. *Lab. Invest.* 92: 474-484, 2012.

3) Serizawa S., Chambers J. K, Une Y.: Beta amyloid deposition and neurofibrillary tangles spontaneously occur in the brains of captive cheetahs (*Acinonyx jubatus*). *Vet. Pathol.* 49: 304-3012, 2012.

## 2. 学会発表

1) 宇根有美：生息域内・域外の野生動物における疾病の原因究明と対策．講演会「野生動物の保全と疾病研究」，東京，5月26日，2012年．

2) 高橋映里佳：老齢ネコ科動物の脳におけるβアミロイド沈着および高リン酸化タウの蓄積．日本認知症学会 主催「認知症研究を知る若手研究者の集まり」，愛知，8月18～19日，2012年．

3) 高橋映里佳，宇根有美：老齢ネコ科動物のアルツハイマー病関連病変．第87回麻布獣医学会，神奈川，11月10日，2012年．

## 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

## 家族性アルツハイマー病原因遺伝子 (PSEN 変異) におけるアミロイド $\beta$ 種発現パターン変化の解析

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(神経内科)  
 研究協力者 三條伸夫、テムチナ、堀匠、日熊麻耶、伊藤陽子  
 東京医科歯科大学大学院脳神経病態学(神経内科)

**研究要旨** 家族性アルツハイマー病 (FAD) (*PSEN1* I143T) は、剖検脳において老人斑が主に抗アミロイド  $\beta$  ( $A\beta$ ) 42 抗体と  $A\beta$  43 抗体で染色されることが報告されており (Keller et al, 2010)、2012 年 7 月にカナダ・バンクーバーで開催された AAIC2012 において、新たに cotton wool plaque の存在と、アミノ基 (N) 側が切断された  $A\beta$  の蓄積などが提示された (Ghetti et al, 2012)。PSEN1 における FAD 変異遺伝子ホモ接合による各  $A\beta$  産生や N 側が切断された  $A\beta$  種を含めた発現パターンの病態への関与を調べるため、PSEN1 および PSEN2 のノックアウト (PSDKO) マウスの線維芽細胞 (PSDKO-MEF) を用いて  $A\beta$  40、 $A\beta$  42、 $A\beta$  43 の発現量に関して、複数の PSEN1 遺伝子変異間で比較したところ、我々の確立した ELISA 法による  $A\beta$  の測定では、細胞の種類や FAD 遺伝子のホモ接合における変化はなく、若年発症の変異ほど  $A\beta$  42/40 比が高値を示す傾向にあり、 $A\beta$  43 の発現量や比率よりも  $A\beta$  42 の影響が強いと考えられた。8M 尿素・バイシン・ゲルを用いた SDS-PAGE とウエスタン・プロット法では免疫沈降法を用いても  $A\beta$  42、 $A\beta$  43 が検出できず、更なる実験方法の改良が必要であった。

### A. 研究目的

家族性アルツハイマー病 (FAD) (*PSEN1* I143T) は、これまでに 8 家系の報告があり、プレセニン 1 蛋白 (PSEN1) の第 2 膜貫通領域 (TM2) 内の変異がある。臨床所見の特徴として、平均発症年齢が 32.5 と非常に早期で、早期に起立歩行不能となり、平均罹病期間は 8.7 年と進行も早い。認知機能障害の他に小脳失調、てんかん発作、ミオクローヌス、錐体路徴候など Gerstmann-Sträussler-Scheinker 病 (*PRNP* P105L) 類似の症状を呈する。MRI や脳血流 SPECT では早期から頭頂葉と海馬が萎縮し、後方領域が広範囲に高度の血流低下を呈し、剖検脳において、老人斑が主に抗 amyloid  $\beta$  ( $A\beta$ ) 42 抗体と  $A\beta$  43 抗体で染色されることが報告されている (Keller et al, 2010)。我々は、*in vitro* におけるメカニズムを明らかにする目的で、ELISA 法を用いて  $A\beta$  40、 $A\beta$  42、 $A\beta$  43 を特異的に定量する測定系を確立し、HEK293 細胞を用いて培養液中に産生される各  $A\beta$  を測定したところ、 $A\beta$  43 の産生は野生型と同じであった (平成 24 年度報告

書)。2012 年 7 月にカナダ・バンクーバーで開催された AAIC2012 において、FAD (*PSEN1* I143T) の 2 症例の剖検報告があり、これまでに報告されていない cotton wool plaque の存在と、アミノ基 (N) 側が切断された  $A\beta$  の蓄積などが提示された (Ghetti et al, 2012)。

今年度は、内因性野生型 PSEN と外因性変異 PSEN のヘテロ接合の状態のみでなく、外因性変異 PSEN によるホモ接合の状態での  $A\beta$  の産生量を確認する目的で、PSEN1 および PSEN2 のノックアウト (PSDKO) マウスの線維芽細胞 (PSDKO-MEF) を用いて、ヒト PSEN1 を導入した細胞における各  $A\beta$  の産生量、および新たな報告に基づいて、N 側が切断された  $A\beta$  の測定を試みた。

### B. 研究方法

Platinum-E 細胞を用いてレトロウイルス pMX を大量複製し、PSDKO-MEF 細胞にスウェーデン型変異を有する amyloid precursor protein (APP) 遺伝子を導入し、APP を安定発現させたのち、同細胞

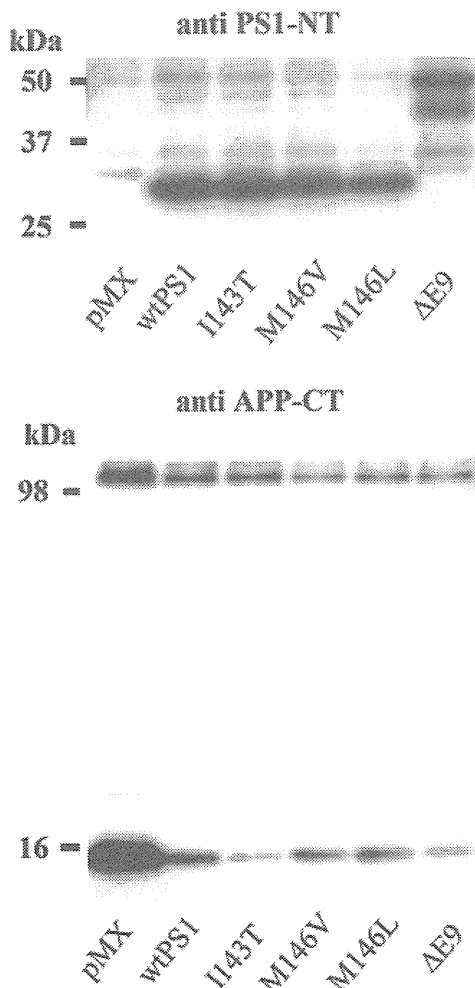
に同じ手法を用いて、FAD 遺伝子変異を有する PS1 を発現させて、Aβ<sub>11-28</sub> を認識する抗体 (BNT77: WAKO) を capture とし、Aβ<sub>42</sub> と Aβ<sub>43</sub> を特異的に認識する抗体 (IBL) を用いた ELISA 法と、緩衝剤としてバイシン (bicin) を用いた 8M 尿素ゲルを使用したウエスタン・ブロット法で N 側が切断された Aβ の検出、および測定を行った。

(倫理面への配慮)

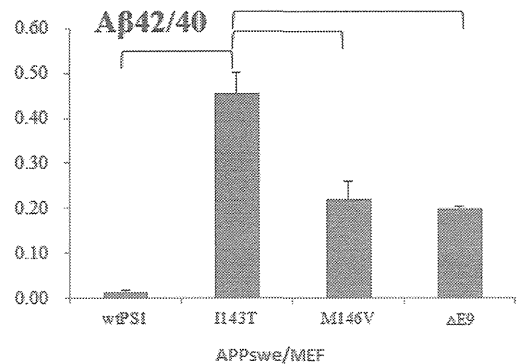
培養細胞を用いた研究のため、該当せず。

### C. 研究結果

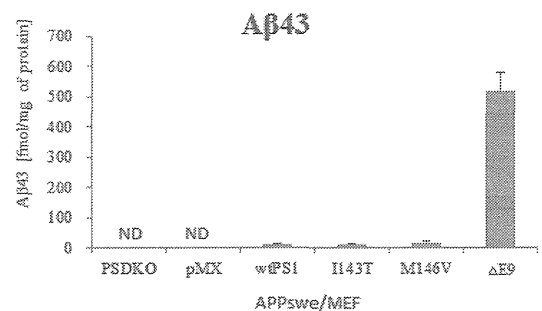
PSDKO-MEF細胞にAPPおよび、各変異を有するヒトPSEN1を安定過剰発現させることができ、各々の細胞においてヒトPSEN1とマウスNicastrin、マウスAph-1、マウスPen-2がハイブリッド・γセクレターゼを形成し、機能していることを確認する目的で各細胞におけるC99を測定した。その結果、ヒトPSEN1はマウス由来の他の因子と機能的複合体を形成することが確認された。



これらの細胞において産生される各Aβを測定したところ、I143Tにおいては野生型に比べてAβ<sub>40</sub>の産生低下とAβ<sub>42</sub>の産生亢進を認め、Aβ<sub>42/40</sub>比はI143Tで最も高かった。



一方、Aβ<sub>43</sub>の産生量は野生型と比較してI143T変異において産生亢進は認められなかった。



次に、8M 尿素・バイシン・ゲルを用いた SDS-PAGE、およびウエスタン・ブロッティングで N 側切断の Aβ を測定したが、ペプチド・レベルで 50pg の Aβ を検出するところまで感度を上げることができたが、培養液中の Aβ の検出はできなかった。

### D. 考察

ELISA 法による Aβ<sub>40</sub>、Aβ<sub>42</sub>、Aβ<sub>43</sub> では、細胞の種類や野生型/FAD 変異のヘテロ接合や FAD 変異のホモ接合であるかに関わりなく、変化が認められなかった。若年発症の変異ほど Aβ<sub>42/40</sub> 比が高値を示す傾向にあり、Aβ<sub>43</sub> の発現量や比率との関連性は認められなかった。我々が確立した系においては、剖検脳における Aβ<sub>43</sub> の沈着と遺伝子変異による Aβ<sub>43</sub> 産生における関連性よりも、Aβ<sub>42</sub> の影響が強いことが示唆された。

一方、8M 尿素・バイシン・ゲルを用いた SDS-PAGE、およびウエスタン・ブロッティングを用いた検出法では免疫沈降法を用いても細胞培

養液中の Aβ42、Aβ43 は検出できず、更なる実験方法の改良が必要であることが明らかになった。今後更なる改良を加える予定である。

## E. 結論

*PSENI* 変異による FAD においては、剖検脳に沈着する Aβ43 や N 側が切断された Aβ の関与を指摘する報告があるが、培養細胞を用いた系においては、Aβ43 の発現量は必ずしも多くはなく、Aβ42 が臨床病型へ及ぼす影響の方がより強いものと推測された。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Fujita K, Harada M, Sasaki M, Yuasa T, Sakai K, Hamaguchi T, Sanjo N, Shiga Y, Satoh K, Atarashi R, Shirabe S, Nagata K, Maeda T, Murayama S, Izumi Y, Kaji R, Yamada M, Mizusawa H. Multicentre, multiobserver study of diffusion-weighted and fluid-attenuated inversion recovery MRI for the diagnosis of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease: a reliability and agreement study. *BMJ Open* 2:e000649, 2012.
  - 2) Yoshikawa Y, Horiuchi M, Ishiguro N, Kadohira M, Kai S, Mizusawa H, Nagata C, Onodera T, Sata T, Tsutsui T, Yamada M, Yamamoto S. Alternative BSE risk assessment methodology of imported beef and beef offal to Japan. *J Vet Med Sci* 74:959-968, 2012
  - 3) Takumi Hori, Nobuo Sanjo, Makoto Tomita, Hidehiro Mizusawa. Visual Reproduction on the Wechsler Memory Scale-Revised as a predictor of Alzheimer's disease in Japanese patients with mild cognitive impairments. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders* 35, 165-176, 2012
  - 4) 三條伸夫、水澤英洋. 臨床講座 アルツハイマー病. *Pharma Tribune* 4: 19-29, 2012
- ### 2. 学会発表
- 1) Sanjo N, Nakamura Y, Kitamoto T, Yamada M, Hamaguchi T, Moriwaka F, Aoki M, Kuroiwa Y, Nishizawa M, Takeda M, Inuzuka T, Abe K, Mrai H, Murayama S, Satoh K, Harada M, Saito N, Takumi I, Mizusawa H. Human prion diseases in Japan: a prospective surveillance from 1999. *Asian Pacific Prion Symposium 2012, Yokohama, July 29-30, 2012.*
  - 2) Sakai K, Hamaguchi T, Noguchi-Shinohara M, Nozaki I, Sato T, Takumi I, Sannjo N, Nakamura Y, Kitamoto T, Saito N, Mizusawa H, Yamada M. Prion protein propagation in dura mater graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease. *Asian Pacific Prion Symposium 2012, Yokohama, July 29-30, 2012.*
  - 3) Sakai K, Hamaguchi T, Noguchi-Shinohara M, Nozaki I, Sato T, Takumi I, Sanjo N, Nakamura Y, Kitamoto T, Saito N, Mizusawa H, Yamada M. Prion protein propagation in dura mater graft-associated Creutzfeldt-jakob disease. *Prion2012, Amsterdam, May 10-12, 2012.*
  - 4) Sanjo N, Ohara M, Satoh K, Hamaguchi T, Nakamura Y, Kitamoto T, Yamada M, Mizusawa H. Clinical features of genetic prion disease and cerebrospinal fluid findings in Japanese patients. *Prion2012, Amsterdam, May 10-12, 2012.*
  - 5) Mizusawa H. PrionDiseases in Japan. The 13th Ilsong International Symposium CJD Surveillance in Asia., Ilsong, Feb. 13, 2012
  - 6) Mizusawa H. PrionDiseases in Japan. National for Viral Disease Control and Prevention.

Beijin.Nov.5.2011

- 7) 三條伸夫、テムチナ、堀匠、水澤英洋. 全長型 presenilin 1 の小胞体膜上における dual functions. 第 53 回日本神経学会学術集会、東京、2012 年 5 月 24 日
- 8) 堀匠、三條伸夫、水澤英洋. 日本人の軽度認知機能障害患者における視覚性再生検査の特徴. 第 53 回日本神経学会学術集会、東京、2012 年 5 月 23 日
- 9) Temuqina, Nobuo Sanjo, Takumi Hori, Paul E. Fraser, Hidehiro Mizusawa. Pattern of Amyloid  $\beta$  Production by Mouse Embryonic Fibroblasts Overexpressing PSEN1 with I143T Mutation. Alzheimer's Association International Conference, Vancouver, Canada, Jul 14-19, 2012
- 10) 三條伸夫、テムチナ、日熊麻耶、Paul Fraser、水澤英洋. An effect of PSEN1 with I143T mutation on amyloid beta production. 第 31 回日本認知症学会総会、筑波、10 月 27 日(26-28), 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

## CAA に対する副腎皮質ステロイドホルモンの作用機序： 脳血管壁構成蛋白のプロテオミクス分析による検討

研究分担者 池田修一 信州大学部内科学 (脳神経内科、リウマチ・膠原病内科)

共同研究者 亀谷富由樹\*

\* 公益財団法人東京都医学総合研究所 認知症・高次脳機能研究分野

**研究要旨** 脳アミロイドアンギオパチー(CAA)に対する有効な治療法はない。昨年本学会で、CAA 関連脳病変に副腎皮質ステロイドを投与することで、脳血管アミロイドが退縮し、病変を寛解させると報告した。そこで本研究では、この副腎皮質ステロイド投与による脳血管アミロイドの退縮メカニズムについて検討した。副腎皮質ステロイドを投与し、脳血管アミロイドが退縮した CAA 患者(昨年報告) 髄膜血管から A $\beta$  アミロイド粗画分を分離し、その中に含まれるタンパク質を LC/MS を用いて網羅的に解析した。対照には未治療 CAA 患者髄膜血管を用いた。未治療 CAA 髄膜血管から抽出された A $\beta$  アミロイド分子種は、全分子型 A $\beta$ 、N 末端あるいは C 末端一部欠損 A $\beta$ 、内部切断 A $\beta$  断片であったが、副腎皮質ステロイド治療 CAA 髄膜血管からは全分子型 A $\beta$  のみが抽出された。また、未治療 CAA 髄膜血管アミロイド粗分画には、apoE、A-I、A-IV、clusterin 等のアミロイド線維結合タンパク質および炎症関連タンパク質 S100A9 等が検出されたが、副腎皮質ステロイド治療 CAA 髄膜血管アミロイド粗分画にはこれらのアミロイド線維結合および炎症関連タンパク質は検出されなかった。S100A9 は A $\beta$  と相互作用し、アミロイド線維化を促進すると報告されており、副腎皮質ステロイド治療による S100A9 の激減が A $\beta$  アミロイド線維化抑制を導いたと推定された。副腎皮質ステロイド投与は CAA の有効な治療法と考えられる。

### A. 研究目的

脳アミロイドアンギオパチー (CAA) に対する有効な治療法はない。私たちは CAA 関連脳病変に副腎皮質ステロイドを一定期間少量持続的に投与することで、脳血管アミロイドが退縮し、病変を寛解させると報告してきた (Machida et al, Amyloid 19: 47-52, 2012)。そこで本研究では、この副腎皮質ステロイド投与による脳血管アミロイドの退縮メカニズムについて検討した。

### B. 研究方法

副腎皮質ステロイドを投与し、脳血管アミロイドが退縮した CAA 患者 (Machida et al, Amyloid 19: 47-52, 2012) 髄膜血管から A $\beta$  アミロイド粗画分を分離し、その中に含まれる A $\beta$  アミロイドおよび関連タンパク質を LC/MSMS を用いて網羅的に

解析した。対照には未治療 CAA 患者髄膜血管を用いた。

(倫理面への配慮)

剖検脳のプロテオミクス解析については信州大学および公益財団法人東京都医学総合研究所の倫理委員会の承認のもとに、実験指針に従って行った。

### C. 研究結果

未治療 CAA 髄膜血管から抽出された A $\beta$  アミロイド分子種は、全分子型 A $\beta$ 、N 末端あるいは C 末端一部欠損 A $\beta$ 、内部切断 A $\beta$  断片であったが、副腎皮質ステロイド治療 CAA 髄膜血管からは全分子型 A $\beta$  のみが抽出された (図1)。

また、未治療 CAA 髄膜血管アミロイド粗分画に

は、apoA-I、apoA-IV、clusterin等のアミロイド線維結合タンパク質および炎症関連タンパク質 S100A9等が特異的に検出されたが、副腎皮質ステロイド治療CAA髄膜血管アミロイド粗分画にはこれらのアミロイド線維結合および炎症関連タンパク質は検出されず、spectrin、Neurofilament等の細胞骨格系タンパク質が検出された（図2）。

#### D. 考察

S100A9 は A $\beta$  と相互作用し、アミロイド線維化を促進し、ミクログリアを炎症状態に導き、食欲作用を抑えると報告されており、副腎皮質ステロイド治療による S100A9 の激減、炎症の抑制が A $\beta$  アミロイド線維化抑制を導き、アミロイドはミクログリア、マクロファージによる食欲作用等の本来の除去システムによって除去されたと推定された（図 3）。

#### E. 結論

副腎皮質ステロイドは S100A9 の産生を激減させ、A $\beta$  のアミロイド線維化を抑制することで、血管に沈着したアミロイドを減少させると考えられた。副腎皮質ステロイドの一定期間少量持続的投与は CAA の有効な治療法である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Machida K, Tsuchiya-Suzuki A, Sano K, Arima K, Saito Y, Kametani F, Ikeda S: Postmortem findings in a patient with cerebral amyloid angiopathy actively treated with corticosteroid. *Amyloid* 19:47-52, 2012.
- 2) 吉田邦広、樋口京一、池田修一：神経変性疾患は個体間伝播するか？ —アミロイドーシス・モデルからの推論。 *BRAIN and NERVE* 64:665-674, 2012.

#### 2. 学会発表

- 1) 亀谷富由樹、池田修一：副腎皮質ステロイド治療による脳血管アミロイド退縮機序のプロテオミクス解析. 第 31 回日本認知症学会学術集会, つくば, 10. 27, 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

CAA brain without treatment		
A $\beta$ and its derivatives		
1-40	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV	
	DAEFRHDS#GYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV	#: formylation
1-38	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGG	ox: oxidation
1-21	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFA	
1-13	DAEFRHDSGYEVH	
	DAEFRHDS#GYEVH	
2-40	AEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV	
2-39	AEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSN#KAIIGLMoxV	
2-35	AEFRHDSGYEVHHQK#LVFFAEDVGSNK#GAIIGLM	
2-28	AEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNK	
	AEFRHDS#GYEVHHQKLVFFAEDVGSNK	
	AEFRHDSGYEVHHQK#LVFFAEDVGSNK	
	AEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNK#	
	AEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGS#NK	
2-21	AEFRHDSGYEVHHQKLVFFA	
	AEFRHDS#GYEVHHQKLVFFA	
2-13	AEFRHDSGYEVH	
	AEFRHDS#GYEVH	
3-40	EFRHDS#GYEVHHQKLVF#oxFAEDVGSNK#GAIIGLMVGGVV	
	EFRHDS#GYEVHHQKLVFF#oxAEDVGSNK#GAIIGLMVGGVV	
3-39	EFRHDSGYEVHHQK#LVFFAEDVGSN#K#GAIIGLMVGGVV	
3-28	EFRHDS#GYEVHHQK#LVFFAEDVGSNK	
7-42	DSGYEVHHQKLVFFAEDVGS#NK#GAIIGLMVGGVVIA	
7-39	DS#GYEVHHQKLVFFAEDVGSNK#GAIIGLMoxVGGV	
	DS#GYEVHHQKLVFFAEDVGS#NK#GAIIGLMoxVGGV	
14-40	HQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV	
CAA brain treated with corticosteroid		
A $\beta$		
1-40	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV	

図1 CAAアミロイド粗分画中のA $\beta$  およびその誘導体

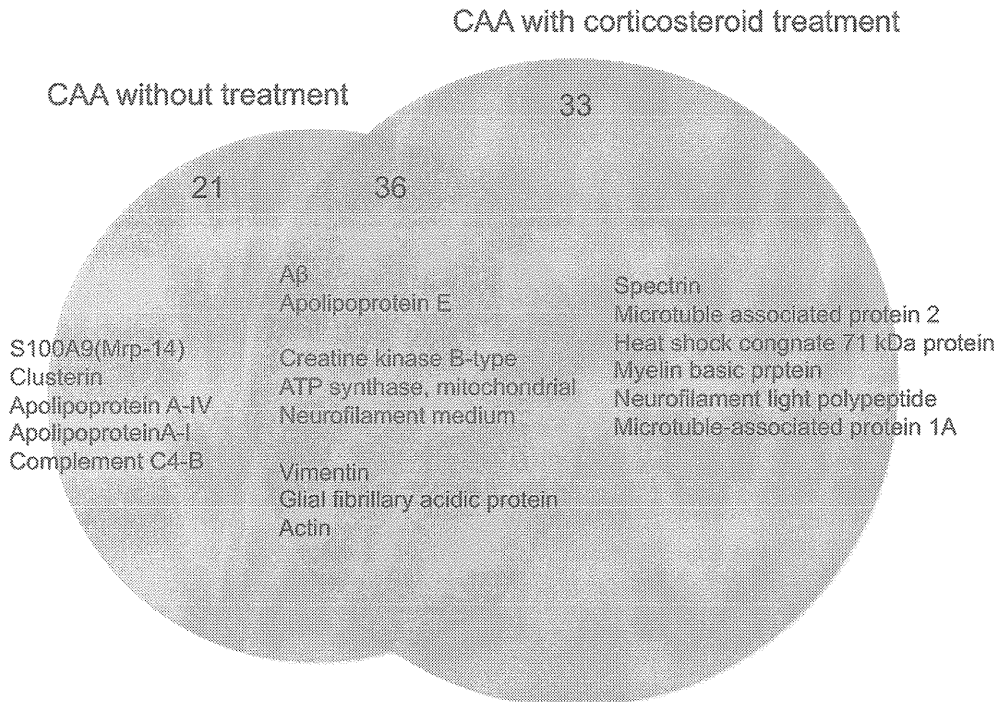


図2 CAAアミロイド粗分画中に同定されたタンパク質

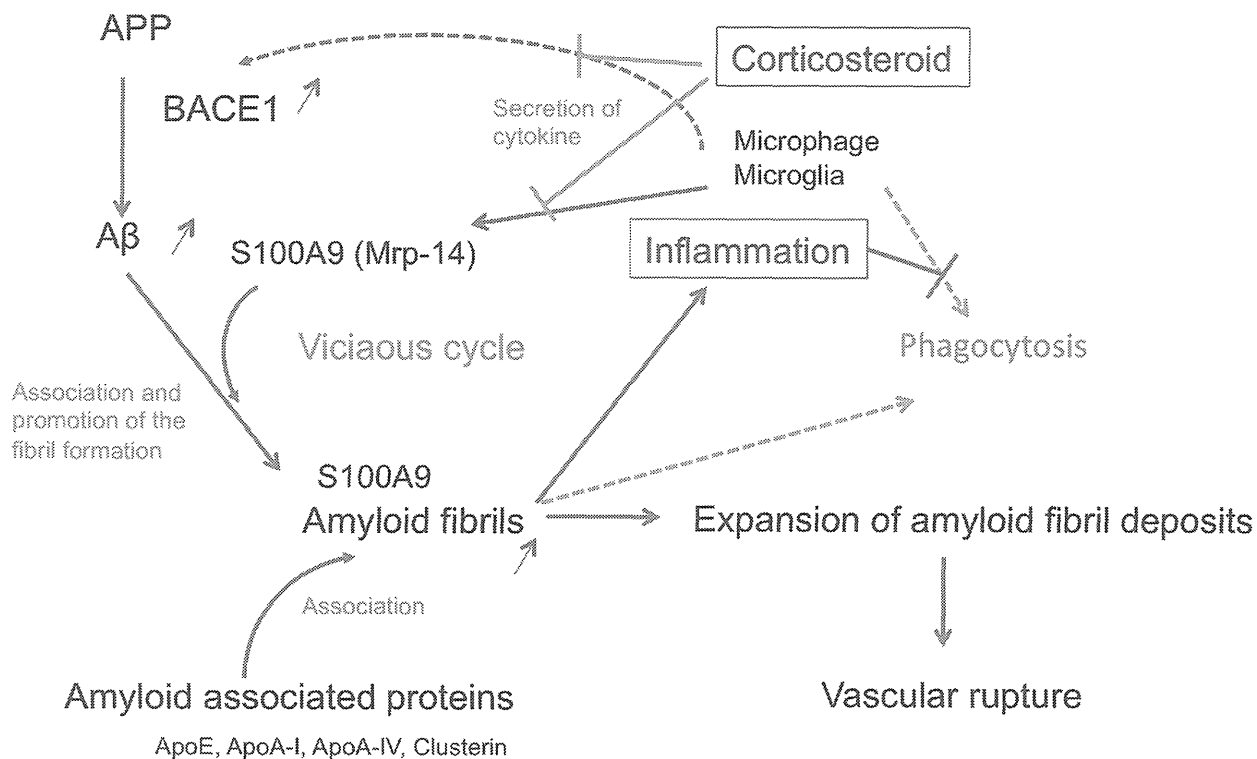


図3 脳血管におけるアミロイド沈着拡大機序と副腎皮質ステロイド

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

## スタチンのアミロイドβ蛋白低下作用とそのメカニズム： 培養神経細胞を用いた検討

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 保坂愛\*、\*\*、織田彰子\*、富所康志\*、荒木亘\*\*

\*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** スタチン (HMG-CoA 還元酵素阻害剤) はアミロイドβ蛋白 (Aβ) 産生の修飾作用を持つことが報告されているが、そのメカニズムの詳細は明らかではない。本研究では、スタチンの Aβ 産生に対する効果について、ラット初代培養大脳皮質神経細胞を用いて検討した。神経細胞を pitavastatin (PV)、atorvastatin (AV) で 4 日間処理した場合、Aβ40、Aβ42 の分泌量が用量依存性に低下した。PV、AV 処理した細胞では、成熟型アミロイド前駆体蛋白 (APP)、Thr668 位のリン酸化 APP (P-APP) の発現レベルの有意な低下を認めた。PV、AV による Aβ 分泌、成熟型 APP、P-APP レベルの低下はメバロン酸との共処理により回復したが、コレステロールやファルネシルピロリン酸、ゲラニルゲラニルピロリン酸との共処理では回復しなかった。さらに、PV、AV 処理した細胞において、細胞表面の成熟型 APP レベルは変化しなかったが、細胞表面の P-APP レベルの低下を認めた。以上より、スタチンはコレステロールの低下、プレニル化の変化とは別の機序を介して、APP の成熟化、リン酸化に影響し、Aβ 産生を低下させることが示唆された。

### A. 研究目的

アルツハイマー病 (AD) の病態にコレステロールが関与することが指摘されており、コレステロールの合成を阻害する薬剤であるスタチン (HMG-CoA 還元酵素阻害剤) による AD 有病率の減少や、アミロイドβ蛋白 (Aβ) 生成の修飾作用が報告されている。スタチンはメバロン酸 (MVA) 経路において、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、イソプレノイドの産生に関わる。スタチンの Aβ 産生に対する効果には、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いるが、その詳細な機序はまだ不明である。今回我々は、初代培養神経細胞を用いて、スタチンの Aβ 産生低下作用およびその作用機序について検討した。

### B. 研究方法

1. スタチンの Aβ 分泌およびアミロイド前駆体蛋白 (APP) などの蛋白発現に対する影響

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 または AV (0.2~5 μM) で 4 日間処理し、培養上清中の Aβ40、Aβ42 の量をサンドイッチ ELISA 法で測定した。また、細胞溶解液中の APP などの蛋白発現をウエスタンブロッティングで解析した。

#### 2. 細胞内総コレステロールの定量

PV または AV 処理した細胞の細胞内コレステロールの量を Cholesterol/Cholesteryl Ester Quantitation Kit (BioVision 社) を用いた酵素法により測定した。

#### 3. スタチンと MVA またはコレステロールとの共処理

神経細胞を、PV、AV (2 μM) と、MVA (2 mM) またはコレステロール (20 μM) で 4 日間共処理し、上記と同様に解析した。

#### 4. スタチンとファルネシルピロリン酸 (FPP) またはゲラニルゲラニルピロリン酸 (GGPP) との共処理

神経細胞を、PV、AV (2 μM) と、FPP (10 μM)

または GGPP (10  $\mu$ M) で 4 日間共処理し、上記と同様に解析した。

#### 5. 分泌型 APP (sAPP)、APP C 末端断片 (CTF) の解析

PV, AV (2.5  $\mu$ M) で処理した神経細胞の培養上清中の sAPP および細胞溶解液中の CTF の総量を免疫沈降-ウエスタンブロット法で解析した。

#### 6. 細胞表面の APP、P-APP の解析

PV, AV 2  $\mu$ M で処理した神経細胞の細胞表面の APP、P-APP の発現レベルを、細胞表面蛋白のピオチン標識実験を用いて解析した。

(倫理面への配慮)

特に問題なし。

### C. 研究結果

#### 1. スタチンによる A $\beta$ 分泌および細胞内 APP、P-APP、BACE1、 $\gamma$ 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 または AV で処理した場合、培養液中の A $\beta$ 40、A $\beta$ 42 ともに PV、AV の濃度依存的に低下した。同時に細胞内の成熟型 APP、P-APP レベルも有意に低下した。P-APP は成熟型 APP よりもより顕著に低下した。一方、未成熟型 APP は変化しなかった。また、BACE1 や  $\gamma$ セクレターゼ複合体因子のレベルも変化が認められなかった。

#### 2. スタチンによる細胞内総コレステロール量の変化

PV、AV 処理により PV、AV の濃度依存的に細胞内コレステロール量が著明に低下した。

#### 3. スタチンと MVA またはコレステロールとの共処理 (図 a-e)

PV、AV と MVA の共処理により、PV、AV による細胞内コレステロール量の低下は部分回復し、PV、AV による A $\beta$  分泌量の低下、成熟型 APP、P-APP レベルの低下も対照と同程度まで回復した。一方、コレステロール共処理では、PV、AV による細胞内コレステロール量の低下は明らかに回復したが、A $\beta$  分泌量の低下、成熟型 APP、P-APP の低下は回復しなかった。

#### 4. スタチンと FPP または GGPP との共処理

PV、AV と FPP または GGPP との共処理により、A $\beta$  分泌量の低下、成熟型 APP、P-APP の変化はいずれ

も回復しなかった。

#### 5. sAPP、CTF の解析

PV、AV 処理により sAPP、CTF の総量には明らかな変化を認めなかった。

#### 6. 細胞表面の APP、P-APP の解析

PV、AV 処理により細胞表面の成熟型 APP レベルは変化しなかったが、細胞表面の P-APP レベルの低下を認めた。

### D. 考察

本研究において、ラット初代培養大脳皮質神経細胞を 2 種類のスタチン (PV または AV) で 4 日間処理した時、スタチンのコレステロール低下作用を確認した。さらに、スタチン処理により A $\beta$ 40、A $\beta$ 42 分泌量が著明に低下した。また、スタチン処理した細胞では、成熟型 APP、P-APP の発現レベルは有意に低下し、P-APP は成熟型 APP よりもより顕著に低下した。また、スタチンによる A $\beta$  分泌低下と成熟型 APP の発現レベルの低下は MVA との共処理により回復したが、コレステロール、FPP、GGPP との共処理では回復しなかった。さらに、スタチン処理した細胞において、細胞表面の成熟型 APP レベルは変化しなかったが、細胞表面の P-APP レベルの低下を認めた。以上より、本実験系において、スタチンは APP の成熟化、リン酸化に影響し、A $\beta$  産生を低下させること、その作用にはコレステロールの減少、プレニル化の変化とは別の機序が関与することが推定された。細胞表面の P-APP の低下は、APP のエンドサイトーシスの減少を引き起こし、A $\beta$  産生低下作用に関与する可能性が考えられた。

### E. 結論

スタチン (PV、AV) は神経細胞の APP の成熟化およびリン酸化を変化させることにより、A $\beta$  産生を低下させることが示唆された。その作用には、コレステロール低下作用やプレニル化の変化とは別の機序が関与していると推定された。

### F. 健康危険情報

特になし。

### G. 研究発表

## 1. 論文発表

- 1) Hosaka A, Araki W, Oda A, Tomidokoro Y, Tamaoka A: Statins reduce amyloid  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -amyloid generation is independent of lipid raft association of  $\beta$ -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 $\beta$ 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: A $\beta$ 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 $\beta$ 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. Thr 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: リバスタチン阻害の意義, 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, 榎 和子, 郭 伸, 榎 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: 軸索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, 齊藤祐子, 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

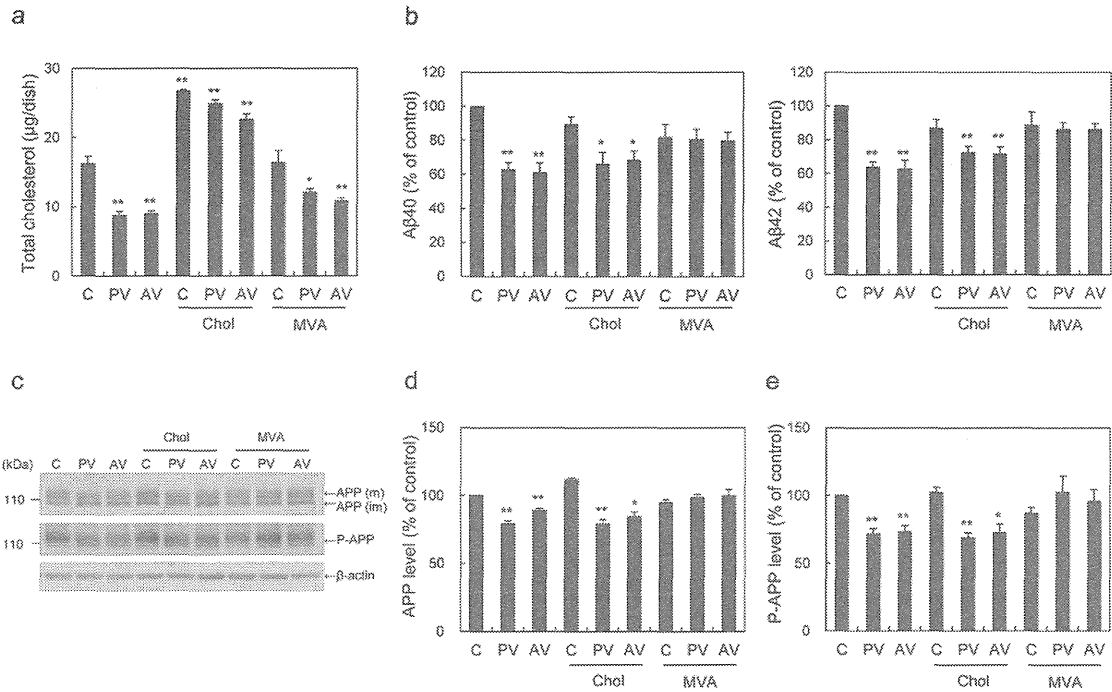


図. スタチンによる Aβ 分泌および成熟型 APP, P-APP の低下に対するコレステロールまたはメバロン酸の効果.

初代培養神経細胞を PV または AV 2 μM とコレステロール (Chol) 20 μM またはメバロン酸 (MVA) 2 mM で 4 日間共処理し,

(a) 細胞内コレステロールを測定した.

(b) 培養上清中の Aβ40, Aβ42 をサンドイッチ ELISA で定量した.

(c) 細胞溶解液中の APP, P-APP の蛋白レベルを APP 抗体, P-APP 抗体を用いて、ウエスタンブロット解析した.

(d, e) 成熟型 (m) APP および P-APP のバンドを定量し, 対照に対する相対値を示した.

結果は 3 回の実験の平均値±SEM で表した. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

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

## 造血幹細胞を利用した脳アミロイドーシス治療戦略の開発

研究分担者 芦原英司 京都薬科大学病態生理学分野

共同研究者 高田和幸、北村佳久

京都薬科大学病態生理学分野

**研究要旨** アルツハイマー病 (AD) の脳実質ではアミロイド  $\beta$  タンパク質 ( $A\beta$ ) が異常蓄積している。私達は、脳内の免疫担当細胞の一つであるミクログリアが  $A\beta$  貪食機能を有することに注目し、ミクログリアの移植が脳内の  $A\beta$  除去に有効であることを明らかにしている (FEBS. Lett., 2007, 581:475-478)。そこで本研究では、ヒト AD 患者への細胞治療法開発を目指し、骨髄細胞中の造血幹細胞からのミクログリア様細胞への分化・誘導とその  $A\beta$  貪食機能について解析した。マウス骨髄細胞やヒト骨髄由来造血幹細胞を macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) の存在下に培養したところ、培養ディッシュに付着する細胞数が増加し、それらはミクログリアのマーカータンパク質を発現していることが分かった。さらに鉄粒子や  $A\beta$  ペプチドを用いて貪食機能を解析した結果、付着細胞の一部は貪食機能を有していることがわかり、M-CSF の刺激により、貪食細胞数が有意に増加した。以上より、AD の細胞治療法における造血幹細胞および M-CSF 処置の有用性が示唆された。

### A. 研究目的

脳アミロイドーシスを示す代表的疾患の一つにアルツハイマー病 (AD) があり、その脳実質にはアミロイド  $\beta$  タンパク質 ( $A\beta$ ) が異常蓄積している。現在、最も期待されている AD の根本的治療戦略は、この  $A\beta$  の脳内からの除去である。これまでに私達は、脳内の免疫担当細胞の一つであるミクログリアが  $A\beta$  貪食機能を有することに注目し、ミクログリアの移植が脳内の  $A\beta$  除去に大変有効であることを明らかにしている (FEBS. Lett., 2007, 581:475-478)。しかしながら、この移植療法の臨床応用を想定した場合、ヒト由来ミクログリアの調製が必須であるが、その調製は困難である。一方、多分化能を有する造血幹細胞は、自己細胞の採取も可能であり、移植後の拒絶反応の回避という観点からも移植細胞として理想的な細胞と考えられている。本研究では、ヒト AD 患者への細胞治療法開発を目指し、骨髄細胞中の造血幹細胞からのミクログリア様細胞への分化・誘導とその  $A\beta$  貪食機能について解析した。

### B. 研究方法

大腿骨や脛骨から採取したマウス骨髄細胞 ( $2.5 \times 10^6$  cells) ならびにヒト骨髄由来 CD34 陽性造血幹細胞 ( $1.5 \times 10^5$  cells) をウシ胎児血清ならびにヒト macrophage-colony stimulating factor (M-CSF: ロイコプロール,  $2.0 \times 10^4$  units/ml) を添加した培地に播種した。その後、経時的な骨髄由来細胞の分化状態や増殖細胞数を解析した。分化状態についてはフローサイトメトリーや免疫細胞化学的手法を用い、細胞数についてはダイレクトカウント法を用いて解析した。さらに鉄粒子や  $A\beta$  を処置後、貪食機能について共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した。

(倫理面への配慮)

ヒト骨髄由来 CD34 陽性造血幹細胞については市販の匿名化による倫理的配慮が施された細胞を使用した。マウス骨髄細胞を用いた実験に関しては、京都薬科大学動物実験委員会の承認を得て実施しており、深麻酔下に頸椎脱臼により安楽死させたマウスから採取した。

## C. 研究結果

骨髄細胞の培養において、培養ディッシュへの付着細胞数が経時的に増加し、M-CSF処置によってこの増加が促進した(図1)。マウス骨髄由来の付着細胞について、ミクログリアマーカー(CD11b, ionized calcium-binding adapter molecule 1)を発現する細胞数をフローサイトメトリーを用いて解析した。その結果、培養日数依存的にミクログリア陽性細胞数の増加が見られた。さらに、M-CSF処置によりミクログリアマーカーを発現する細胞数は顕著に増加した(図2)。次に、食食機能についてマウス骨髄由来細胞およびヒト骨髄由来CD34陽性造血幹細胞を用いて解析した。その結果、付着細胞の一部が鉄粒子(図3)やA $\beta$ (図4)を食食しており、さらに、M-CSFを処置することで食食細胞数が有意に増加することが明らかとなった。以上の結果より、骨髄から採取した造血幹細胞由来の付着細胞はA $\beta$ の食食機能を有しており、その食食細胞の増殖はM-CSF刺激により有意に促進されることがわかった。

## D. 考察

AD発症リスクとして、加齢にともなうミクログリアの機能不全が指摘されている。骨髄幹細胞中にはミクログリア様のA $\beta$ 食食細胞への分化能を有する細胞が存在することが明らかとなり、その分化・誘導の促進にはM-CSF刺激が有効であることが分かった。今後、この細胞M-CSF処置A $\beta$ 食食細胞を脳内に送達できれば、ミクログリアの機能不全を補填することができ、AD治療への応用が期待できることが示唆された。

## E. 結論

ADの根治を目指した細胞治療法の開発における造血幹細胞およびM-CSF処置の有用性が示唆された。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Takata K, Kawanishi S, Touji Y, Takada T, Kitamura Y, and Ashihara E: Development of cell therapeutic strategies for Alzheimer's disease using animal models. Animal models in human disease: Applications, outcomes and controversies, NOVA Science Publishers, in press.

### 2. 学会発表

1) Takata K, Kitamura Y, Ashihara E: Monocytes derived from bone marrow cells by macrophage colony-stimulating factor treatment effectively phagocytose amyloid- $\beta$ . ISEH-Society for Hematology and Stem Cells-41st Annual Scientific Meeting, Amsterdam, Netherlands, 8.23-26, 2012.

2) 河西翔平、高田和幸、北村佳久、芦原英司: M-CSFを処置した骨髄由来細胞のアミロイド $\beta$ 食食機能の解析, 次世代を担う創薬医療薬理シンポジウム2012, 神戸, 9.1, 2012.

3) 高田和幸、北村佳久、芦原英司: ミクログリアおよび骨髄由来細胞のアミロイド $\beta$ 食食機能の解析, 第105回近畿生理学談話会, 大阪, 9.29, 2012.

4) Toji Y, Takata K, Kitamura Y, Ashihara E: Amyloid- $\beta$  phagocytosis by bone marrow-derived hematopoietic stem cells treated with macrophage colony-stimulating factor. 2012年度次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム, 京都, 2012.11.23-24.

## 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