

CE/J 系マウスの 実験的 AA アミロイドーシス 抵抗性は、特有の SAA 配列によるものと考えられた。

4) 脳アミロイドーシス

脳アミロイドーシスの治療法について、A β 貪食機能を有する骨髄細胞由来 M-CSF 処置マイクログリア様細胞を用いた細胞治療の有用性、および AB4-10 組み換え大豆蛋白による経口免疫療法の有用性を示した。脳アミロイドーシスの病態解析では、毒性 A β コンフォーマーが AD の新たな治療標的、診断マーカーとして有用であることを示した。さらに、新たに発見したガンマ・セクレターゼ結合蛋白は APP の安定性などのメカニズムを介し、ガンマ・セクレターゼ活性を調節している可能性がある。また、脳の A β 沈着量は年齢ではなく、A β seeds が脳内に存在した期間によって変動することを示した。

5) 透析アミロイドーシス

身体機能をもとにした DRA の重症度を評価する指標を作成した。今後は解析集団を広げて同スコアの有用性を検討する。

個々の患者の β_2m 負荷量を検討することにより、CTS 発症予防する透析条件を検討できる可能性がある。DRA の発症に慢性炎症・酸化ストレスが関与している可能性がある。維持透析患者におけるアミロイド原性 β_2m 濃度は β_2m 濃度に依存しているため、アミロイドーシス発症阻止のためには血中 β_2m 濃度をコントロールすることは極めて重要である。緑茶特有のカテキンは抗アミロイド効果が期待できる。今後も追跡調査を継続する。アミロイド線維はエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、壊死及びアポトーシスの両者を引き起こすことで毒性を発揮すると考えられる。等温滴定熱量計を用いて、 β_2m のアミロイド線維形成の熱測定に成功し、熱力学的な構造安定性が検証できた。

6) アミロイドーシスに共通する発症・伝搬機構の解析および診断・治療法の開発など

アミロイドに親和性を有する近赤外線蛍光プローブ THK-5XY を用いたアミロイドイメージング技術の基礎的な知見が得られた。

医原性アミロイドーシスであるインスリンアミロイドーシスが疑われる症例は、4.4%と従来考

えられていたよりも発生頻度は高い。

各種の動物に特徴的なアミロイドーシスが生じていることが確認された。ヒトの病態を考察する上でこれらの知見は大変貴重であると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(主要論文のみを以下に示す。発表の詳細は分担研究報告を参照のこと)

1. Misumi Y, Ando Y, Gonçalves NP, Saraiva MJ. Fibroblasts endocytose and degrade transthyretin aggregates in transthyretin-related amyloidosis. *Lab Invest* 93: 911-920, 2013
2. Oshima T, Kawahara S, Ueda M, Kawakami Y, Tanaka R, Okazaki T, Misumi Y, Obayashi K, Yamashita T, Ohya Y, Ihse E, Shinriki S, Tasaki M, Jono H, Asonuma K, Inomata Y, Westermark P, Ando Y. Changes in pathological and biochemical findings of systemic tissue sites in familial amyloid polyneuropathy more than 10 years after liver transplantation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2013 in press
3. Tasaki M, Ueda M, Obayashi K, Koike H, Kitagawa K, Ogi Y, Jono H, Su Y, Suenaga G, Oshima T, Misumi Y, Yoshida M, Yamashita T, Sobue G, Ando Y. Effect of age and sex differences on wild-type transthyretin amyloid formation in familial amyloidotic polyneuropathy: A proteomic approach. *Int J Cardiol* 170: 69-74, 2013
4. Ando Y, Coelho T, Berk JL, Cruz MW, Ericzon BG, Ikeda S, Lewis WD, Obici L, Plante-Bordeneuve P, Rapezzi C, Said Salvi F. Guideline of transthyretin-related hereditary amyloidosis for clinicians. *Orphanet J Rare Dis* 8: 31, 2013
5. Ono K, Takasaki J, Takahashi R, Ikeda T, Yamada M. Effects of anti-parkinsonian agents on β -amyloid and α -synuclein oligomer formation in vitro. *J Neurosci Res* 91: 1371-1381, 2013

6. Ono K, Takahashi R, Ikeda T, Mizuguchi M, Hamaguchi T, Yamada M. Exogenous amyloidogenic proteins function as seeds in amyloid β -protein aggregation. *Biochim Biophys Acta (Mol Basis Dis)* 1842: 646-653, 2014
7. Yamada M. Brain hemorrhages in cerebral amyloid angiopathy. *Semin Thromb Hemost* 39: 955-962, 2013
8. Berk JL, Suhr OB, Obici L, Sekijima Y, Zeldenrust SR, Yamashita T, Heneghan MA, Gorevic PD, Litchy WJ, Wiesman JF, Nordh E, Corato M, Lozza A, Cortese A, Robinson-Papp J, Colton T, Rybin DV, Bisbee AB, Ando Y, Ikeda S, Seldin DC, Merlini G, Skinner M, Kelly JW, Dyck PJ; Diflunisal Trial Consortium. Repurposing diflunisal for familial amyloid polyneuropathy: a randomized clinical trial. *JAMA* 310: 2658-2667, 2013
9. Mori M, Tian G, Ishikawa A, Higuchi K. Diversity and complexity of the mouse *Saa1* and *Saa2* genes. *Exp Anim* 63: 99-106, 2014
10. Iwata A, Nagata K, Hatsuta H, Takuma H, Bundo M, Iwamoto K, Tamaoka A, Murayama S, Saido T, Tsuji S. Altered CpG methylation in sporadic Alzheimer's disease is associated with APP and MAPT dysregulation. *Hum Mol Genet* 23: 648-656, 2013
11. Akamatsu M, Takuma H, Yamashita T, Okada T, Keino-Masu K, Ishii K, Kwak S, Masu M, Tamaoka A. A unique mouse model for investigating the properties of amyotrophic lateral sclerosis-associated protein TDP-43, by in utero electroporation. *Neurosci Res* 77: 234-241, 2013
12. Sato J, Kotani K, Yamada T. Accumulation and absorption of serum amyloid A and apolipoprotein E fragments in the course of AA amyloidosis: A study in a mouse model. *Ann Clin Lab Sci*, 2013 in press
13. Takase H, Tanaka M, Miyagawa S, Yamada T, Mukai T. Effect of amino acid variations in the central region of human serum amyloid A on the amyloidogenic properties. *Biochem Biophys Res Commun* 444:92-97, 2014
14. Hasegawa K, Ozawa D, Ookoshi T, Naiki H. Surface-bound basement membrane components accelerate amyloid- β peptide nucleation in air-free wells: An in vitro model of cerebral amyloid angiopathy. *Biochim Biophys Acta* 1834: 1624-1631, 2013
15. Tiwari P, Yoshizaki K. Prediction and experimental validation of a putative non-consensus binding site for transcription factor STAT3 in serum amyloid A gene promoter. *Biochim Biophys Acta* 1830: 3650-3655, 2013
16. Matsubara E, Takamura A, Okamoto Y, Oono H, Nakata T, Wakasaya Y, Kawarabayashi T, Shoji M. Disease modifying therapies for Alzheimer's disease targeting A β oligomers: implications for therapeutic mechanisms. *Biomed Res Int*: 1-6, 2013
17. Yokoyama T, Mizuguchi M, Nabeshima Y, Kusaka K, Yamada T, Hosoya T, Ohhara T, Kurihara K, Tanaka I, Niimura N. Hydrogen-bond network and pH sensitivity in human transthyretin. *J Synchrotron Radiat* 20: 834-837, 2013
18. Yokoyama T, Kosaka Y, Mizuguchi M. Crystal structures of human transthyretin complexed with glabridin. *J Med Chem* 57: 1090-1096, 2014
19. Tomita N, Furukawa K, Okamura N, Tashiro M, Une K, Furumoto S, Iwata R, Yanai K, Kudo Y, Arai H. Brain accumulation of amyloid β protein visualized by positron emission tomography and BF-227 in Alzheimer's disease patients with or without diabetes mellitus. *Geriatr Gerontol Int* 13: 215-221, 2013
20. Maruyama M, Shimada H, Suhara T, Shinotoh H, Bin J, Maeda J, M.R.Z, Trojanowski J.Q, Lee V.M.Y, Ono M, Masamoto K, Takano H, Sahara N, Iwata N, Okamura N, Furumoto S, Kudo Y, Chang Q, Saido C.T, Takashima A, Jada L, M.K.J, Aoki I, Ito H, Higuchi M. Imaging of Tau Pathology in a Ttauopathy Mouse Model and in Alzheimer Patients Compared to Normal Controls. *Neuron* 79: 1094-1108, 2013
21. Takahashi E, Kuribayashi H, Chambers JK,

- Imamura E, Une Y. Senile plaques and cerebral amyloid angiopathy in an aged California sea lion (*Zalophus californianus*). *Amyloid*, 2014 in press
22. Kanatsu K, Morohashi, Suzuki M, Kuroda H, Watanabe T, Tomita T, Iwatsubo T. Decreased CALM expression reduces A β 42 to total A β through clathrin-mediated endocytosis of γ -secretase. *Nat Comm* 5: 3386, 2014
23. Tomita T, Iwatsubo T. Structural biology of presenilins and signal peptide peptidases. *J Biol Chem* 288: 14673-14680, 2013
24. Ogawa Y, Suzuki K, Sakai A, Iida S, Ogura M, Tobinai K, Matsumoto M, Matsue K, Terui Y, Ohashi K, Ishii M, Mukai HY, Ando K, Hotta T. Phase 1/2 study of bortezomib -melphalan- Prednisolone for previously untreated Japanese patients with multiple myeloma. *Cancer Science* 104: 912-919, 2013
25. Poshusta TL, Katoh N, Gertz MA, Dispenzieri A, Ramirez-Alvarado M. Thermal stability threshold for amyloid formation in light chain amyloidosis. *Int J Mol Sci* 14: 22604-22617, 2013
26. Migita K, Izumi Y, Torigoshi T, Satomura K, Izumi M, Nishino Y, Jiuchi Y, Nakamura M, Kozuru H, Nonaka F, Eguchi K, Kawakami A, Motokawa S. Inhibition of JAK/STAT signaling pathway in rheumatoid synovial fibroblasts using small molecule compounds. *Clin Exp Immunol* 174: 356-363, 2013
27. Nakamura T, Migita K, Ando Y, Takaoka H, Suzushima H, Shiraishi N. Amyloid A amyloidosis in a Japanese patient with familial Mediterranean fever associated with homozygosity for the pyrin variant M694I/M694I. *Mod Rheumatol* 24: 349-352, 2014
- 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

[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

脳への A β 沈着は、年齢ではなく A β seeds が脳に存在した期間に依存する

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 浜口 毅^{1,2}、Yvonne S. Eisele²、Nicholas H. Varvel²、Bruce T. Lamb³、
Lary C. Walker⁴、Mathias Jucker²

¹金沢大学大学院脳老化・神経病態学(神経内科学)、

²Department of Cellular Neurology, University of Tübingen, Germany、

³Department of Neurosciences, Cleveland Clinic Foundation, USA、

⁴Yerkes National Primate Research Center and Department of Neurology, Emory University, USA

研究要旨 加齢と Alzheimer 病の病理学的変化である脳へのアミロイド β 蛋白 (A β) 沈着との関係を明らかにするために、異なる月齢 (3 ヶ月齢、9 ヶ月齢) のアミロイド前駆体蛋白遺伝子改変マウスに、脳に著明な A β 沈着を認める高齢 APP23 マウス脳の前駆体蛋白遺伝子改変マウスを接種した。6 ヶ月後に脳への A β 沈着の程度を比較したが、若年、高齢間では有意な差を認めず、若年 (3 ヶ月齢) で接種し 12 ヶ月後に評価した群のみ脳への A β 沈着が前 2 群と比較して有意に増加していた ($p < 0.001$)。この結果は、加齢によって脳への A β 沈着が促進されることはなく、A β seeds が脳内に存在した期間によって A β 沈着量は変動することを示した。

A. 研究目的

多くの疫学研究によって、加齢が Alzheimer 病 (AD) の大きな危険因子であることが示されている (1)。また、脳へのアミロイド β 蛋白 (A β) 沈着が AD の発病に関与していると考えられており、脳への A β 沈着も加齢とともに増加していくことが知られているが、何故加齢とともに脳への A β 沈着が増加するかは分かっていない。本研究では、AD モデルマウスを用いて、加齢によって脳への A β 沈着が促進されるかについて検討する。

B. 研究方法

アミロイド前駆体蛋白 (amyloid precursor protein: APP) 遺伝子改変マウスである R1.40 マウスに、脳に著明な A β 沈着を認める高齢 APP23 マウス脳の前駆体蛋白遺伝子改変マウスを接種した。宿主である R1.40 マウスを、(グループ 1) 脳前駆体蛋白遺伝子改変マウスを 3 ヶ月齢で接種し、6 ヶ月後の脳を評価、(グループ 2) 脳前駆体蛋白遺伝子改変マウスを 9 ヶ月齢で接種し、6 ヶ月後の脳を評価、(グループ 3) 脳前駆体蛋白遺伝子改変マウスを 3

ヶ月齢で接種し、12 ヶ月後の脳を評価、の 3 群に分け、それぞれのグループの脳への A β 沈着の程度を比較した。

(倫理面への配慮)

本研究は、ドイツのバーデン-ブルテンベルク州の動物実験委員会の認可を得て行った。

C. 研究結果

脳前駆体蛋白遺伝子改変マウスを接種していない R1.40 マウスの脳には、3 ヶ月齢、9 ヶ月齢、15 ヶ月齢の何れの月齢でも A β 沈着はほとんど見られず、脳内の A β 濃度にも差を認めなかった。脳前駆体蛋白遺伝子改変マウスを接種したマウスでは、接種した月齢の異なるグループ 1 とグループ 2 では脳への A β 沈着に有意な差を認めなかったが、接種後から評価までの期間を 12 ヶ月と長くしたグループ 3 では、グループ 1 やグループ 2 と比較して約 6 倍に達する程 A β 沈着が有意に増加していた ($p < 0.001$)。また、接種後 12 ヶ月待ったグループ 3 では、脳前駆体蛋白遺伝子改変マウスを接種した

海馬とその上方の皮質のみでなく、大脳皮質および海馬全体にA β 沈着を認めた。

D. 考察

本研究では、異なる年齢のマウスに A β を含む脳ホモジネートを注入し、加齢によって脳 β アミロイドーシス伝播が促進されるかを調べたが、脳への A β 沈着の程度は、異なる年齢の宿主間でも差はなく、A β を含む脳ホモジネートが脳内に存在した期間に依存していた。この結果からは、加齢によって脳にA β が沈着し易くなるわけではなく、A β 線維の seeds となるものが脳内にいつ出現するかによって将来の脳への A β 沈着程度が決まることを示している。よって、AD の発症予防・治療を行うには、若い時期に出現する A β seeds に対する治療を行うことが重要となる。

E. 結論

加齢によって脳への A β 沈着が促進されることはなく、A β seeds が脳内に存在した期間によって A β 沈着量は変動した。また、限局した部位への A β seeds の接種にもかかわらず、A β 沈着は大脳皮質および海馬全体に広がった。

[参考文献]

1) Kawas C, Gray S, Brookmeyer R, Fozard J, Zonderman A. Age-specific incidence rates of Alzheimer's disease: the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Neurology* 54: 2072-2077, 2000.

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Miyashita A, Koike A, Jun G, Wang LS, Takahashi S, Matsubara E, Kawarabayashi T, Shoji M, Tomita N, Arai H, Asada T, Harigaya Y, Ikeda M, Amari M, Hanyu H, Higuchi S, Ikeuchi T, Nishizawa M, Suga M, Kawase Y, Akatsu H, Kosaka K, Yamamoto T, Imagawa M, Hamaguchi T, Yamada M, Moriaha T, Takeda M, Takao T, Nakata K, Fujisawa Y, Sasaki K, Watanabe K, Nakashima K, Urakami K, Ooya T, Takahashi M,

Yuzuriha T, Serikawa K, Yoshimoto S, Nakagawa R, Kim JW, Ki CS, Won HH, Na DL, Seo SW, Mook-Jung I; Alzheimer Disease Genetics Consortium, St George-Hyslop P, Mayeux R, Haines JL, Pericak-Vance MA, Yoshida M, Nishida N, Tokunaga K, Yamamoto K, Tsuji S, Kanazawa I, Ihara Y, Schellenberg GD, Farrer LA, Kuwano R: SORL1 is genetically associated with late-onset Alzheimer's disease in Japanese, Koreans and Caucasians. *PLoS One* 8: e58618, 2013.

2) Miyoshi I, Fujimoto Y, Yamada M, Abe S, Zhao Q, Cronenberger C, Togo K, Ishibashi T, Bednar MM, Kupiec JW, Binneman B. Safety and pharmacokinetics of PF-04360365 following a single-dose intravenous infusion in Japanese subjects with mild-to-moderate Alzheimer's disease: A multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study. *Int J Clin Pharmacol Ther* 51: 911-923, 2013.

3) Noguchi-Shinohara M, Yuki S, Dohmoto C, Ikeda Y, Samuraki M, Iwasa K, Yokogawa M, Asai K, Komai K, Nakamura H, Yamada M. Differences in the prevalence of dementia and mild cognitive impairment and cognitive functions between early and delayed responders in a community-based study of the elderly. *J Alzheimers Dis* 37:691-698, 2013.

4) Ono K, Takasaki J, Takahashi R, Ikeda T, Yamada M. Effects of anti-parkinsonian agents on β -amyloid and α -synuclein oligomer formation in vitro. *J Neurosci Res* 91:1371-1381, 2013.

5) Ono K, Takahashi R, Ikeda T, Mizuguchi M, Hamaguchi T, Yamada M: Exogenous amyloidogenic proteins function as seeds in amyloid β -protein aggregation. *Biochim Biophys Acta (Mol Basis Dis)*, in press.

6) Takamura Y*, Ono K*, Matsumoto J, Yamada M, Nishijo H. Effects of the neurotrophic agent T-817MA on oligomeric amyloid β -induced deficits in long-term potentiation in the hippocampal CA1 subfield. *Neurobiol Aging* 35:532-536, 2014. *Equally contributed

7) Wang J, Zhao Z, Lin E, Zhao W, Qian X, Freire D, Bilski AE, Cheng A, Vempati P, Ho L, Ono K,

- Yamada M, Pasinetti GM. Unintended effects of cardiovascular drugs on the pathogenesis of Alzheimer's disease. *PLoS One* 8:e65232, 2013.
- 8) Yamada M. Brain hemorrhages in cerebral amyloid angiopathy. *Semin Thromb Hemost* 39:955-962, 2013.
- 9) 池田篤平, 山田正仁: アルツハイマー病. *耳鼻咽喉科・頭頸部外科* 85:426-431, 2013.
- 10) 池田篤平, 山田正仁: HCHWA-D(hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis-Dutch type). *日本臨牀 (別冊) [神経症候群 (第2版) I]* 26:333-337, 2013.
- 11) 小野賢二郎, 山田正仁: A β 凝集制御薬の開発. *認知症の最新医療* 3:128-132, 2013.
- 12) 小野賢二郎, 山田正仁: アルツハイマーの未来 疾患修飾薬の開発研究の基礎. *からだの科学* 278:152-155, 2013.
- 13) 小野賢二郎, 山田正仁: ビタミン A とアルツハイマー病. *イルシー* 115:3-7, 2013.
- 14) 坂井健二, 山田正仁: アルツハイマー病に対するアミロイド免疫療法. *BRAIN and NERVE* 65:461-468, 2013.
- 15) 坂井健二, 山田正仁: 孤発性脳アミロイドアンギオパチー. *日本臨牀 (別冊) [神経症候群 (第2版) I]* 26:338-342, 2013.
- 16) 佐村木美晴, 山田正仁: 新しいアルツハイマー病の診断基準 - バイオマーカー重視の診断. *Cognition and Dementia* 12:114-120, 2013.
- 17) 佐村木美晴, 小野賢二郎, 山田正仁: 新しいアルツハイマー病診断基準に基づくアルツハイマー病の診断. *認知症の最新医療* 3:147-149, 2013.
- 18) 篠原もえ子, 山田正仁: アルツハイマー病とライフスタイル. *からだの科学* 278: 37-40, 2013.
- 19) 高橋良一, 山田正仁: Familial cerebral amyloid angiopathy, British type. *日本臨牀 (別冊) [神経症候群 (第2版) I]* 26:328-332, 2013.
- 20) 野崎一朗, 山田正仁: HCHWA- I (hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis-Icelandic type). *日本臨牀 (別冊) [神経症候群 (第2版) I]* 26:323-327, 2013.
- 21) 濱口 毅, 山田正仁: 2.認知症の薬物療法 1) 認知症の中核症状に着目した治療薬の使用法と注意点. *Geriat Med* 51:39-45, 2013.
- 22) 濱口 毅, 山田正仁: 脳 A β アミロイドーシスの伝播. *Dement Jpn* 27:38-44, 2013.
- 23) 山田正仁: アルツハイマー病の診断と治療・予防の新展開. *老健* 24:20-23, 2013.
- 24) 山田正仁: アルツハイマー病の診断と治療の新しい展開. *からだの科学* 278:2-7, 2013.
- 25) 山田正仁: 認知症主要疾患の特徴と鑑別診断. *Medical ASAHI* 42:23-25, 2013.
- 26) 小野賢二郎, 山田正仁: 抗認知症薬使用に際して注意すべき副作用があったら教えてください. 川畑信也 (編) 治療特別編集 認知症でお困りですか? 南山堂, 東京, pp116-118, 2013.
- 27) 山田正仁: アミロイドーシス. 矢崎義雄 (編) 内科学 第 10 版. 朝倉書店, 東京, pp1813-1816, 2013.
- 28) 山田正仁: アルツハイマー病の薬物療法. 水澤英洋, 鈴木則宏, 梶 龍兒, 吉良潤一, 神田 隆, 齊藤延人 (編) 今日の神経疾患治療指針 第 2 版. 医学書院, 東京, pp716-720, 2013.
- 29) 山田正仁: 大脳変性疾患: (1) Alzheimer 病, (2) Lewy 小体型認知症, (3) 前頭側頭型認知症. 矢崎義雄 (編) 内科学 第 10 版. 朝倉書店, 東京, pp2144-2150, 2013.

2. 学会発表

- 1) Ono K, Li L, Takamura Y, Yoshiike Y, Ikeda T, Nishijo H, Takashima A, Teplow DB, Zagorski MG, Yamada M. Phenolic compounds prevent amyloid β -protein oligomerization and synaptic dysfunction by site-specific binding. Alzheimer's Association International Conference on Alzheimer's Disease 2013, Boston, July 13-18, 2013.
- 2) Yamada M. Cerebral amyloid angiopathy (CAA) and development of anti-A β aggregation therapies. The Stroke Research Meeting, Massachusetts General Hospital, July 12, 2013.
- 3) Yamada M. Phenolic compounds with anti-aggregation effects on A β s preventives and therapeutics for Alzheimer's disease. Alzheimer's Association International Conference 2013 Ancillary Breakfast Workshop, Boston, July 17, 2013.
- 4) 池田芳久, 初坂奈津子, 佐村木美晴, 吉田光宏, 町谷知彦, 小野賢二郎, 菊知 充, 春田康博, 樋口正法, 山田正仁: アルツハイマー病の脳磁図に

- において閉眼により出現する α 活動の検討. 第 54 回日本神経学会学術大会, 東京, 5.29-6.1, 2013.
- 5) 小野賢二郎, 山田正仁: バイオマーカーとしての α -シヌクレイン. 第 54 回日本神経学会学術大会, 東京, 5.29-6.1, 2013.
- 6) 小野賢二郎, 山田正仁: $A\beta$ 凝集機序とその制御薬の開発. 第 1 回日本アミロイドーシス研究会学術集会, 東京, 8.30, 2013.
- 7) 小野賢二郎, 山田正仁: フェノール化合物に焦点をあてたアルツハイマー病の予防・治療薬開発. 第 8 回臨床ストレス応答学会, 松本, 11.15-16, 2013.
- 8) 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 $A\beta$ オリゴマー形成及びシナプス毒性を抑制する. 第 54 回日本神経学会学術大会, 東京, 5.29-6.1, 2013.
- 9) 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 $A\beta$ オリゴマー形成及びシナプス毒性を抑制する. Neuro 2013, 京都, 6.20-23, 2013.
- 10) 小野賢二郎, 高橋良一, 池田篤平, 山田正仁: Cross-seeding effects of amyloid β -protein and α -synuclein. 第 32 回日本認知症学会学術集会, 松本, 11.8-10, 2013.
- 11) 小松潤史, 佐村木美晴, 松成一朗, 島 啓介, 吉田光宏, 小野賢二郎, 濱口 毅, 篠原もえ子, 山田正仁: 早期 Alzheimer 病における脳萎縮パターンとドネペジル塩酸塩の効果との関連. 第 54 回日本神経学会学術大会, 東京, 5.29-6.1, 2013.
- 12) 佐村木美晴, 松成一朗, 山田正仁: 画像からみた早期 Alzheimer 病の多様性. 第 32 回日本認知症学会学術集会, 松本, 11.8-10, 2013.
- 13) 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, 山田正仁: アルツハイマー病における脳微小出血と灰白質容量および脳糖代謝との関係. 第 54 回日本神経学会学術大会, 東京, 5.29-6.1, 2013.
- 14) 篠原もえ子, 柚木颯偲, 堂本千晶, 池田芳久, 佐村木美晴, 岩佐和夫, 横川正美, 駒井清暢, 中村裕之, 山田正仁: 地域脳健診参加者と非参加者の認知症および軽度認知障害の有病率は異なる. 第 54 回日本神経学会学術大会, 東京, 5.29-6.1, 2013.
- 15) 篠原もえ子, 柚木颯偲, 堂本千晶, 池田芳久, 佐村木美晴, 岩佐和夫, 横川正美, 駒井清暢, 中村裕之, 山田正仁: 地域脳健診参加者と非参加者の認知症及び軽度認知障害の有病率は異なる. 第 32 回日本認知症学会学術集会, 松本, 11.8-10, 2013.
- 16) 高橋良一, 小野賢二郎, 赤木明生, 小松潤史, 池田芳久, 島 啓介, 能登大介, 坂井健二, 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に対するジフルニサルの使用経験. 第 54 回日本神経学会学術大会, 東京, 5.29-6.1, 2013.
- 17) 高橋良一, 小野賢二郎, 赤木明生, 小松潤史, 池田芳久, 島 啓介, 能登大介, 坂井健二, 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に対するジフルニサルの使用経験. 第 1 回日本アミロイドーシス研究会, 東京, 8.30, 2013.
- 18) 山田正仁: アルツハイマー病の診断と治療の進歩. 日本内科学会北陸支部 第 58 回生涯教育講演会, 金沢, 3.10, 2013.
- 19) 山田正仁: 特殊な脳卒中 (4) 脳アミロイドアンギオパチー. STROKE2013 第 38 回日本脳卒中学会総会, 東京, 3.21-23, 2013.
- 20) 山田正仁: 脳 $A\beta$ アミロイドーシスの病態と治療・予防. 第 1 回日本アミロイドーシス研究会, 東京, 8.30, 2013.

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

AB アミロイドーシスの神経毒性機序の解明と治療法開発

研究分担者 東海林幹夫 弘前大学医学部神経内科

共同研究者 瓦林毅¹、若佐谷保仁¹、仲田崇¹、大野英人²、松原悦朗²

¹弘前大学医学部神経内科、²大分大学医学部神経内科

研究要旨 ABアミロイドーシスの神経毒性発現機序について検討し、postsynaptic lipid raftsのAB oligomerがリン酸化tauの増加を引き起こすこと、sortilinがAB oligomerの神経毒性発現を制御することを示した。AB₄₋₁₀組み換え大豆蛋白による経口免疫によって海馬依存性の記憶障害の改善、脳ABアミロイド蓄積の減少が認められ、AB amyloidosisの疾患修飾薬開発に有望な方法と考えられた。

A. 研究目的

AB アミロイドーシスの脳内蓄積がアルツハイマー病(AD)の発症の分子学的基盤と考えられている。しかし AB アミロイドーシスの神経毒性発現機序や tauopathy 誘発機序などはまだ明らかになっていない。我々は AB の中でも最も神経毒性の高いと考えられている AB oligomer の神経毒性発症機序を解析した。さらに AB₄₋₁₀ 組み換え大豆蛋白を用いた AB amyloidosis 疾患修飾薬の開発を行った。

B. 研究方法

1. 変異 APP 産生マウス Tg2576 と変異 tau 産生マウス TgTauP301L との double transgenic mouse (double Tg) を作製し、AB oligomer 蓄積による tauopathy と神経毒性の誘発機序の解明を行った。
2. SH-SY5Y 細胞を用いて AB 重合体がシナプス・神経変性を惹起する分子メカニズムを解析した。
3. 変異 APP 産生マウス TgCRND8 を用いて AB 経口免疫療法の開発を行った。ダイズグロブリンの 3 カ所に AB の Th1 刺激部位 4-10 を挿入した組換えダイズ蛋白 AB+ を作製した。2 月齢より 8 カ月または 12 カ月まで AB+ またはダイズ 11S グロブリン AB- の 1mg を cholera toxin subunit B 10 μg と共に週 1 回ゾンデで経口投与した (AB+ 免疫群 n=12, AB- 免疫群 n=12)。3 カ月齢よりモリス水迷路試験にて行動評価を行った。AB 経口免疫成立の確認は、抗体の確認と脾臓 splenocyte の抗原刺激による Thymidine 取り込みを測定した。半脳は TBS,

2%SDS, 70% FA で抽出し、AB を測定し、半脳は固定し病理学的検索を行った。

(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

1. Double Tg では樹状突起のリン酸化 tau 蓄積が増加しており、lipid rafts に AB oligomer とリン酸化 tau が共に蓄積していた。Lipid rafts には Fyn の著増と NMDA receptor、AMPA receptor の増加が認められた。

2. SH-SY5Y 細胞で sortilin をノックダウンすると AB 重合体の神経毒性が抑制され、p75^{NTR} 依存性アポトーシス抑制が認められた。AB 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、AB 重合体特異的モノクローナル抗体(72D9)で細胞外 AB 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 AB 重合体の神経毒性が中和された。

3. モリス水迷路試験で水面下に隠されたプラットフォームまでの到達時間が、AB+ 免疫マウスでは AB- 免疫マウスに比べて投与 3 カ月後(5 月齢)より改善し、記憶障害進行の予防効果は最終の 12 カ月後(14 月齢)まで持続して認められた。AB+ 免疫マウスの

血中にはAβ+に反応するが、Aβ-には反応しない特異抗体が検出された、Aβ+免疫マウス血漿によるAD脳の免疫染色では脳Aβアミロイドが染色された。Aβ+免疫マウスのsplenocyteはAβ+刺激によりThymidine取り込みの亢進を示したが、Aβ-では取り込みの亢進は示さず、細胞性免疫も成立していた。病理学的検索では、Aβ+免疫マウスではmicrogliaの増加を認め、脳Aβ蓄積の減少を認めた。脳TBS分画中のAβ oligomerがAβ+免疫マウスではAβ-マウスと比べて減少を認めた。

D. 考察

Postsynaptic lipid raftsのAβ oligomerはリン酸化tauの増加を引き起こし、グルタミン酸神経毒性を介したシナプス障害と神経細胞死を誘発する可能性が考えられた。

Aβ oligomerはsortilinと結合して細胞内に取り込まれ、p75^{NTR}と複合体を形成してapoptosisを誘発する。sortilinはAβ oligomerの神経毒性発現を制御すると考えられた。

Aβ₄₋₁₀組み換え大豆蛋白による経口免疫によって海馬依存性の記憶障害の改善、特異抗体の産生、細胞性免疫の活性化、microgliosis亢進、脳Aβアミロイド蓄積の減少および可溶性Aβ oligomerの減少が認められた。

E. 結論

Aβ oligomer はリン酸化 tau の増加や sortilin を介した apoptosis の誘発などによって神経毒性を引き起こすと考えられた。Aβ₄₋₁₀ 組み換え大豆蛋白による経口免疫は今後 Aβ amyloidosis の疾患修飾薬開発に有望な方法と考えられた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Matsubara E, Takamura A, Okamoto Y, Oono H, Nakata T, Wakasaya Y, Kawarabayashi T, Shoji M: Disease modifying therapies for Alzheimer's disease targeting Aβ oligomers: implications for therapeutic mechanisms. *Biomed Res Int* 984041, 2013.

2013.

- 2) Mizuno Y, Nomoto M, Kondo T, Hasegawa K, Murata M, Takeuchi M, Ikeda J, Tomida T, Hattori N; Rotigotine Trial Group. Transdermal rotigotine in early stage Parkinson's disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Mov Disord* 28: 1447-1150, 2013.
- 3) Miyashita A, Koike A, Jun G, Wang LS, Takahashi S, Matsubara E, Kawarabayashi T, Shoji M, Tomita N, Arai H, Asada T, Harigaya Y, Ikeda M, Amari M, Hanyu H, Higuchi S, Ikeuchi T, Nishizawa M, Suga M, Kawase Y, Akatsu H, Kosaka K, Yamamoto T, Imagawa M, Hamaguchi T, Yamada M, Moriaha T, Takeda M, Takao T, Nakata K, Fujisawa Y, Sasaki K, Watanabe K, Nakashima K, Urakami K, Ooya T, Takahashi M, Yuzuriha T, Serikawa K, Yoshimoto S, Nakagawa R, Kim JW, Ki CS, Won HH, Na DL, Seo SW, Mook-Jung I; Alzheimer Disease Genetics Consortium, St George-Hyslop P, Mayeux R, Haines JL, Pericak-Vance MA, Yoshida M, Nishida N, Tokunaga K, Yamamoto K, Tsuji S, Kanazawa I, Ihara Y, Schellenberg GD, Farrer LA, Kuwano R: SORL1 Is Genetically Associated with Late-Onset Alzheimer's Disease in Japanese, Koreans and Caucasians. *PLoS One* 8: e58618, 2013..
- 4) 仲田崇, 若佐谷保仁, 中畑直子, 瓦林毅, 石井賢二, 金丸和富, 村山繁雄, 松原悦朗, 東海林幹夫, 進行性の失行を伴ったアルツハイマー病の1例. 第28回青森県核医学研究会誌 28: 7-9, 2013.

2. 学会発表

- 1) Kawarabayashi T, Nakata T, Wakasaya Y, Nakahata N, Oono H, Matsubara E, Shoji M, Accumulation of Aβ oligomers and prion and impaired signal transduction in lipid rafts. *Neuroscience 2013, the Society for Neuroscience, 43th Annual Meeting, San Diego, Nov 9-13, 2013*

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

ヒト脳ならびに脳脊髄液における毒性 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、石井一弘 筑波大学医学医療系神経内科学

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。ヒト脳や脳脊髄液における毒性 A β コンフォマーの存在様態は不明であるため、その生化学的同定を試みた。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った。AD 脳ならびに、ヒト脳脊髄液では可溶性 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おり、総 A β と同様に N-/C-末端が不均一であることが示唆された。今後、ヒト脳における AD 病変の進展に際していつから毒性 A β コンフォマーが脳脊髄液中に出現してくるか検討が必要である。

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、抗 A β 療法の開発においても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が、少なくとも第 25 位-第 26 位においてターン構造を有するものと第 22 位-第 23 位においてターン構造を有するものが存在する。先行研究から、後者の毒性や酸化ストレス誘導能が高く、毒性 A β コンフォマーと呼ばれ、特異抗体 11A1 によって識別できる。毒性コンフォマーは、AD のより良いサロゲートマーカーや根本的治療法開発における標的となる可能性があるが、ヒト脳や脳脊髄液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。

B. 研究方法

特異抗体 11A1 によって認識される毒性 A β コンフォマーの特異的構造は、SDS の存在下で失われる。凍結剖検脳（AD 8 例、63~87 歳、AD によ

らない早期発症の認知症である ALS-D 2 例、59~66 歳）を、PBS を用いてホモジェネートし、超遠心を行い、PBS 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と Western blot 法の組み合わせ（IP-WB）により同定した。11A1 のエピトープは A β の第 22~23 位のアミノ酸配列であり、近傍の第 18~22 位のアミノ酸配列に対する抗体 4G8 によって認識される総 A β と比較検討した。

脳脊髄液については、まず臨床的に AD を合併していない交通性水頭症症例 3 例（59~76 歳）から廃液された脳脊髄液を用いて、凍結剖検脳と同様に毒性 A β コンフォマーの有無と検出のための必要量を検討した。次いで、脳脊髄液中の A β 42 測定により確認された、認知症を呈している AD 2 例（64~68 歳）と頸椎症などの対照症例 2 例（認知症なし、65~67 歳）の脳脊髄液を用いて、毒性 A β コンフォマーの同定を試みた。

（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。

脳脊髄液は、当院神経内科で診療された患者

のうち、診断を目的として行われた腰椎穿刺によって得られた脳脊髄液の残余を、当院倫理審査委員会の承認のもとで使用し、匿名化されている。

C. 研究結果

AD脳の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によって標識された。その重合の程度は4G8によるIP-WBに類似していたが若干モノマーに対してダイマーが増加しており、一方でシグナル強度はやや低下していた。早期発症非AD認知症患者脳では、総A β 、毒性コンフォマーとも検出しなかった。

プロットの際に、さまざまな抗体を用いて検討したところ、A β 40ならびにA β 42特異的C末端特異抗体や、ピロ化A β 特異抗体でシグナルが得られ、毒性A β コンフォマーにおいても総A β と同様にN-/C-末端が不均一であることが示された。

交通性水頭症患者から得られた脳脊髄液の検討で、脳脊髄液中にも毒性A β コンフォマーが見出され、主にモノマーとして存在することが示唆された。ADや対照例で得られた脳脊髄液でも同様であった。

D. 考察

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からIPとWBの組み合わせによって同定を試みた。AD脳やヒト脳脊髄液において、可溶性A β の少なからぬ部分が毒性コンフォマーであった。先行研究における想定と異なり、毒性A β コンフォマーはA β -(1-42)のみならず、さまざまな分子種からなることが示唆された。

このことから、比較的少量の脳脊髄液における毒性A β コンフォマーの検出が可能と考えられ、水頭症患者脳脊髄液を用いてその検証を行った。次いで、脳脊髄液中のA β 42測定により確認された、ADならびに正常対照とみなせる患者から得た脳脊髄液による少数例の検討を行い、いずれにおいても毒性A β コンフォマーを検出した。脳へのA β 沈着を反映した脳脊髄液中のA β 42の低下が生じる以前から、すでに毒性A β コンフォマー

が出現している可能性が示唆された。ADによる認知症の発症に至るまでの経過の中で、脳脊髄液中に毒性A β コンフォマーがいつから出現するのか、質的量的差があるのか、症例数を増やしての今後の見当が必要である。

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が、免疫沈降とウエスタンブロット法を組み合わせることで検出が可能である。ADにより認知症を呈した患者の脳では可溶性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おり、これまで総A β で知られているのと同様のN-、C-末端の不均一性が示唆された。脳脊髄液中にも毒性コンフォマーが存在することが示唆されたが、ADによる認知症の発症に至るまでの経過の中で、脳脊髄液中に毒性A β コンフォマーがいつから出現するのか、質的量的差があるのかについては、今後の検討が必要である。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Iwata A, Nagata K, Hatsuta H, Takuma H, Bundo M, Iwamoto K, Tamaoka A, Murayama S, Saido T, Tsuji S: Altered CpG methylation in sporadic Alzheimer's disease is associated with APP and MAPT dysregulation. *Hum Mol Genet.* 2013 Oct 6. [Epub ahead of print]
- 2) Akamatsu M, Takuma H, Yamashita T, Okada T, Keino-Masu K, Ishii K, Kwak S, Masu M, Tamaoka A: A unique mouse model for investigating the properties of amyotrophic lateral sclerosis-associated protein TDP-43, by in utero electroporation. *Neurosci Res.* 2013 Sep 27. doi:pii: S0168-0102(13)00206-X. 10.1016/j.neures.2013.09.009. [Epub ahead of print]
- 3) Hosokawa M, Arai T, Yamashita M, Tsuji H, Nonaka T, Masuda-Suzukake M, Tamaoka A, Hasegawa M, Akiyama H: Differential diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis from Guillain-Barré syndrome by quantitative determination of TDP-43 in

- cerebrospinal fluid. *Int J Neurosci.* 2013 Oct 31. [Epub ahead of print]
- 4) 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: Response to Comment on "Drug Screening for ALS Using Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells". *Sci Transl Med.* 2013 Jun 5;5(188):188r2. doi: 10.1126/scitranslmed.3005697
- 5) Nakamagoe K, Fujizuka N, Koganezawa T, Yamaguchi T, Tamaoka A: Downbeat nystagmus associated with damage to the medial longitudinal fasciculus of the pons: a vestibular balance control mechanism via the lower brainstem paramedian tract neurons. *J Neurol Sci.* 2013 May 15;328(1-2):98-101. doi: 10.1016/j.jns.2013.02.017. Epub 2013 Mar 16.
- 6) Nakamagoe K, Fujizuka N, Koganezawa T, Shimizu K, Takiguchi S, Horaguchi T, Ishii K, Tamaoka A: Residual central nervous system damage due to organoarsenic poisoning. *Neurotoxicol Teratol.* 2013 May-Jun;37:33-8. doi: 10.1016/j.ntt.2013.02.007. Epub 2013 Feb 21.
- 7) 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. Doi: 10.1007/s11064-012-0956-1.
- 8) 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.* 2013 Feb;10(2):135-42.
- 9) Hoshino S, Sakamoto K, Vassilopoulos S, Camus SM, Griffin CA, Esk C, Torres JA, Ohkoshi N, Ishii A, Tamaoka A, Funke BH, Kucherlapati R, Margeta M, Rando TA, Brodsky FM: The CHC22 clathrin-GLUT4 transport pathway contributes to skeletal muscle regeneration. *PLoS One.* 2013 Oct 30;8(10):e77787. doi:10.1371/journal.pone.0077787. eCollection 2013.
- 10) 玉岡 晃: アルツハイマー病の病態仮説: アミロイド β 蛋白を中心に. *Dementia Japan* 28:3-10, 2014.
- 11) 寺田 真, 石井一弘, 玉岡 晃: 多発性硬化症に伴う dementia. *神経内科* 80(1): 43-48, 2014.
- 12) 玉岡 晃: 脳・神経疾患と転倒・骨折, *CLINICAL CALCIUM* 23(5): 45-51, 2013.
- 13) 玉岡 晃: 理解を助けるトレーニング問題. *CLINICAL CALCIUM* 23(5): 112, 2013.
- 14) 玉岡 晃: アルツハイマー病の病態仮説: アミロイド β 蛋白を中心に. *臨床病理* 61(11): 1060-1069, 2013.
- 15) 玉岡 晃: 若年性認知症の鑑別診断と HDLS. *神経内科* 78(4): 405-411, 2013.
- 16) 玉岡 晃: アルツハイマー病による認知症の診断. *からだの科学* 278: 78-83, 2013.

2. 学会発表

- 1) 塩谷彩子, 石井一弘, 佐藤泰樹, 野口雅之, 玉岡 晃, 斉藤祐子: 姿勢時振戦, 運動失調を主徴とし, MRI にて両側中小脳脚の以上を呈し, 辺縁系に多数の各内封入体を認めた脆弱 X 関連振戦/運動失調症候群の 74 歳男性例. 日本神経病理学会関東地方会(東京), 12月7日, 2013.
- 2) 玉岡 晃: アルツハイマー病: 病態と治療の最前線. 三重認知症セミナー(津), 1月23日, 2014.
- 3) 玉岡 晃: 認知症の危険因子~生活習慣病を中心に~. 第64回糖尿病血管障害講演会(東京), 11月19日, 2013.
- 4) 玉岡 晃: アルツハイマー病: 病態と治療の最前線. AD/PD/MS Forum 2013(神戸), 11月16日, 2013.
- 5) 玉岡 晃: アルツハイマー病の抗体療法. シンポジウム2「神経疾患における抗体療法」. 第18回日本神経感染症学会(宮崎), 10月11日, 2013.
- 6) Nakamagoe K, Fujimiya M, Koganemaru T, Shimizu K, Fujizuka N, Tamaoka A: Study of vestibular dysfunction in frontotemporal lobar degeneration. *J Neurol Sci* 333(2013):e292-e357.

WCN 2013 (Wien)

- 7) 玉岡 晃: アルツハイマー病の病態と治療. Daiichi-Sankyo セミナー〜糖尿病と認知症(東京), 8月28日, 2013.
- 8) 松村えりか, 山口哲人, 富所康志, 石井亜紀子, 玉岡 晃: 関節拘縮を主症状とし, 骨格筋にアミロイド沈着を認めたALアミロイドーシスの1例. 第2回茨城県神経病態研究会(つくば), 7月26日, 2013.
- 9) 玉岡 晃: アルツハイマー病の病態と診断基準. Clinical Dementia Meeting in Chiba(千葉), 7月19日, 2013.
- 10) 保坂孝史, 山口哲人, 寺田 真, 石井一弘, 玉岡 晃: 当院で経験した意味性認知症3例の臨床的検討. 茨城認知症最新治療研究会(つくば), 7月10日, 2013.
- 11) 玉岡 晃: アルツハイマー病: 病態と治療の最前線- BuChE 阻害の意義を含めて-. 愛知認知症フォーラム(名古屋), 7月11日, 2013.
- 12) 玉岡 晃: アルツハイマー病: 診断と治療の最前線. 県西認知症カンファレンス(筑西), 6月11日, 2013.
- 12) 松村えりか, 山口哲人, 富所康志, 石井亜紀子, 玉岡 晃: 関節拘縮を主症状とし, 骨格筋にアミロイド沈着を認めたALアミロイドーシスの68歳男性例. 第205回日本神経学会関東・甲信越地方会, 6月8日, 2013.
- 13) 塩谷彩子, 有馬邦正, 杠 岳文, 村山繁雄, 玉岡 晃, 齊藤祐子: 双極性感情障害が神経変性疾患に先行する一群の存在について. 第54回日本神経学会学術大会(東京), 5月29日, 2013.
- 14) 中馬越清隆, 藤塚 捺, 小金澤禎史, 清水彩音, 玉岡 晃: 非認知症高齢者の前庭機能に対する生理的加齢の影響. 第54回日本神経学会学術大会(東京), 5月29日, 2013.
- 15) 石井一弘, 根本清貴, 増本智彦, 玉岡 晃: 有機ヒ素化合物曝露による脳容積変化の検討. 第54回日本神経学会学術大会(東京), 5月29日, 2013.
- 16) 渡邊雅彦, 玉岡 晃: パーキンソン病の運動症状類型と気分障害. 第54回日本神経学会学術大会(東京), 5月30日, 2013.
- 17) 詫間 浩, 赤松 恵, 山下雄也, 岡田拓也, 石井一弘, 榊 和子, 郭 伸, 榊 正幸, 玉岡 晃:

- マウス胎仔電 孔 による in vivo TDP-43 子導入と封入体形成の検討. 第54回日本神経学会学術大会(東京), 5月30日, 2013.
- 18) 富所康志, 石井一弘, 玉岡 晃: Alzheimer 病患者脳における毒性A β コンフォマーの同定. 第54回日本神経学会学術大会(東京), 5月31日(金), 2013.
- 19) 保坂 愛, 嶺岸正治, 玉岡 晃, 荒木 亘: アミロイド β 蛋白によるBACE1の発現亢進. 第54回日本神経学会学術大会(東京), 5月31日, 2013.
- 20) 石井亜紀子, 吉田瑞子, 大越教夫, 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2報). 第54回日本神経学会学術大会(東京), 5月31日, 2013.
- 21) 玉岡 晃: アルツハイマー病の病態仮説〜アミロイド β 蛋白を中心に〜. 日本臨床化学会第21回関東支部総会日本臨床検査医学会第69回関東・甲信越支部例会連合体会(自治医科大学), 5月11日, 2013.
- 22) 野原誠太郎, 石井亜紀子, 寺田真, 保坂孝史, 塩谷彩子, 詫間浩, 富所康志, 上野友之, 玉岡晃: ジスフェルリノパチー3家系6症例の臨床的検討. 第110回日本内科学会学術総会(東京), 4月12日, 2013.
- 23) 玉岡 晃: アルツハイマー病の病態と診断基準について. 第2回城東認知症研究会(東京), 3月28日, 2013.
- 24) 玉岡 晃: アルツハイマー病の病態と治療薬の開発. いばらき治験ネットワーク設立記念講演会(東京), 3月23日, 2013.
- 25) 玉岡 晃: アルツハイマー病の病態と診断基準について. 第2回静岡県東部認知症エキスパートミーティング(三島), 3月21日, 2013.
- 26) 玉岡 晃: アルツハイマー病の病態と診断基準について, Clinical Dementia Meeting(つくば), 3月8日, 2013.
- 27) 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.

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

PiB-PET が発症早期診断に有用であった脳アミロイドーシス 2 例

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 中川道隆¹、木下朋実¹、関島良樹¹、小口和浩²、伊藤公輝³

¹信州大学医学部脳神経内科、リウマチ・膠原病内科²同相澤病院脳画像センター

³国立精神・神経医療研究センター放射線診療部

研究要旨 従来、脳アミロイドーシスの確定診断は剖検による病理診断にてなされていた。生前に CT や MRI などの形態学的な評価や、脳血流シンチグラフィー、髄液バイオマーカーなどで脳アミロイドーシスの可能性が疑われても、脳への Aβ の蓄積を直接評価することは困難であった。今回、若年発症の認知症患者で PiB-PET 検査により脳アミロイドーシスと診断した 2 例を経験したのでその有用性も含め検討し報告する。

A. 研究目的

近年、髄液バイオマーカーやアミロイド PET の実用化により、脳アミロイドーシスの低侵襲な生前の確定診断が可能となりつつある。今回我々は、当科で脳アミロイドーシスと診断した 2 症例における PiB PET の有効性を検討した。

B. 研究方法

当科で脳アミロイドーシスと診断した 2 症例（早発型家族性アルツハイマー病、48 歳男性；脳血管アミロイドアンギオパチー、48 歳男性）の臨床症状、各種検査結果、PiB PET 所見、確定診断に至った経緯を後方視的に解析した。

C. 研究結果

症例1は48歳男性。2年ほど前から物忘れ、意欲低下が出現。徐々に症状が進行したため精査目的に当科へ入院した。家族歴では、同胞の姉が40代後半から認知症を発症。身体所見では、MMSE15点と認知機能の低下を認めた。血液・髄液検査所見では特記すべき異常は認めなかった（髄液tau蛋白は測定出来なかった）。頭部MRIでは脳のびまん性萎縮、I¹²³IMP脳血流シンチグラフィーでは頭頂葉、後部帯状回に血流低下を認めた。PiB PETでは、両側前頭葉および頭頂葉皮質に明瞭な集積増加を認め、家族歴から早発型家族性アルツハイマー病

と診断した。遺伝子検査では、新規のPSEN1遺伝子変異（p.Gly209Ala）を認めた。

症例2は66歳男性。5年前から夜間の異常行動が指摘されていた。1年ほど前から睡眠中の異常行動、物忘れ、易怒性などが出現し当科へ入院した。家族歴では、母親、兄、母方叔父に認知症を認めた。身体所見では特記事項なく、MMSEは28/30と比較的保たれていた。血液・髄液検査所見に特記すべき異常なし。頭部MRIでは右頭頂後頭葉に拡散強調画像で高信号、ADC mapで高信号、T2*で低信号を呈する多発病変を認め、両側海馬の軽度萎縮を認めた。I¹²³IMP脳血流シンチグラフィーでは両側頭頂葉から後頭葉に軽度集積低下を認めた。画像検査からは、脳血管アミロイドアンギオパチー(CAA)が強く疑われ、Boston診断基準からprobable CAAと診断した。PiB PETでは、大脳皮質、前頭葉、後部帯状回、頭頂葉、側頭葉に集積増加を認め、特にMRI T2*で多発低信号を認めた後頭葉に強い集積を認めCAAとして矛盾しない所見であった。

D. 考察

両症例とも従来の検査では確定診断に至らず、PiB PETで脳へのアミロイド沈着が証明された。症例1ではPSEN1遺伝子変異の同定に結びついた。症例2については遺伝子検査を施行中である。

E. 結論

アミロイド PET 検査は脳へのアミロイド沈着を鋭敏に検出することが可能であり、他の検査で特異的な所見に乏しい症例における脳アミロイドーシスの確定診断に有用であると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tanaka K, Sekijima Y, Yoshida K, Tamai M, Kosho T, Sakurai A, Wakui K, Ikeda SI, Fukushima Y. Follow-up nationwide survey on predictive genetic testing for late-onset hereditary neurological diseases in Japan. *J Hum Genet* 58: 560-563, 2013
- 2) Nakagawa M, Sekijima Y, Tojo K, Ikeda SI. High prevalence of ATTR amyloidosis in endomyocardial biopsy-proven cardiac amyloidosis patients. *Amyloid* 20: 138-40, 2013
- 3) Tsuchiya-Suzuki A, Yazaki M, Sekijima Y, Kametani F, Ikeda S. Steady turnover of amyloid fibril proteins in gastric mucosa after liver transplantation in familial amyloid polyneuropathy. *Amyloid* 20: 156-163, 2013
- 4) Kobayashi A, Uhara H, Kido K, Sekijima Y, Tojo K, Ikeda S, Okuyama R. Bullous formation in a patient with familial amyloid polyneuropathy type I. *Int J Dermatol* 52: 1398-400, 2013
- 5) Berk JL, Suhr OB, Obici L, Sekijima Y, Zeldenrust SR, Yamashita T, Heneghan MA, Gorevic PD, Litchy WJ, Wiesman JF, Nordh E, Corato M, Lozza A, Cortese A, Robinson-Papp J, Colton T, Rybin DV, Bisbee AB, Ando Y, Ikeda S, Seldin DC, Merlini G, Skinner M, Kelly JW, Dyck PJ; Diflunisal Trial Consortium. Repurposing diflunisal for familial amyloid polyneuropathy: a randomized clinical trial. *JAMA* 310: 2658-2667, 2013.
- 6) Takanashi T, Matsuda M, Yazaki M, Yamazaki H, Nawata M, Katagiri Y, Ikeda S. Synovial

deposition of wild-type transthyretin-derived amyloid in knee joint osteoarthritis patients. *Amyloid* 20:151-155, 2013.

- 7) 田中敬子, 関島良樹, 吉田邦広, 水内麻子, 山下浩美, 玉井真理子, 池田修一, 福嶋義光: 信州大学医学部附属病院遺伝子診療部における遺伝性神経筋疾患の発症前診断の現状. *臨床神経学* 53:196-204, 2013
- 8) 関島良樹, 池田修一: 家族性アミロイドポリニューロパチー. *医学のあゆみ* 247: 515-520, 2013

2. 学会発表

- 1) 池田修一他: 家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)に対する肝移植 50 例の予後の検討. 第 54 回日本神経学会学術大会、東京、H25.5.29-6.1、2013.
- 2) 矢崎正英、池田修一、矢彦沢裕之、渡辺正秀: 生体肝移植後 15 年で死亡した家族性アミロイドポリニューロパチー患者のアミロイド沈着動態. 第 31 回日本肝移植研究会、熊本、H25.7.4-5、2013.
- 3) 関島良樹、中川道隆、東城加奈、池田修一: 心筋生検組織のアミロイド分析からみた心アミロイドーシスの基礎疾患の検討. 第 1 回日本アミロイドーシス研究会学術大会、東京、H25.8.30、2013.
- 4) 矢崎正英、加藤修明、池田修一、矢彦沢裕之、渡辺正秀、亀谷富由樹: 生体肝移植長期経過 (15 年) 後死亡した家族性アミロイドポリニューロパチー患者の一例一病理組織像とアミロイド蛋白の解析. 第 1 回日本アミロイドーシス研究会学術大会、東京、H25.8.30、2013.
- 5) Ikeda S: Key note lecture. Endemic and non-endemic areas of FAP in Japan. Late and early onset cases. IXth International Symposium on Familial Amyloidotic Polyneuropathy. Rio de janeiro Brazil, 2013. Nov 10-13.
- 6) Yazaki M, Tsuchiya-Suzuki A, Sekijima Y, Kametani F, Ikeda S: Steady amyloid turn-over after liver transplantation in FAP patients. IXth International Symposium on Familial Amyloidotic Polyneuropathy. Rio de janeiro

- Brazil, 2013. Nov 10-13.
- 7) Sekijima Y, Tojo K, Morita H, Koyama J, Koike H, Sobue G, Ikeda S: Safety and efficacy of long-term diflunisal administration in late-onset ATTR Val30Met FAP. IXth International Symposium on Familial Amyloidotic Polyneuropathy. Rio de Janeiro Brazil, 2013. Nov 10-13.
- 8) 池田修一：ランチョンセミナー 神経アミロイドーシスの治療の進歩：FAP と CAA を中心に。第 31 回日本神経治療学会総会、東京、H25.11.21-23、2013.

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

グリア系培養細胞上清中に含まれる セリンプロテアーゼ様 Aβ 分解活性の解析

研究分担者 岩坪 威 東京大学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 木柵究¹、富田泰輔²、秋下雅弘¹、大内義善³

¹ 東京大学大学院医学系研究科加齢医学講座

² 同大学院薬学系研究科臨床薬学教室

³ 虎の門病院

研究要旨 アルツハイマー病 (AD) の病因としてアミロイド β ペプチド (Aβ) が凝集、蓄積する過程において神経細胞死を引き起こすと考える「アミロイド仮説」が提唱されている。しかし、神経細胞において産生、分泌された Aβ が脳内でどのように代謝を受け、さらに一部は凝集、蓄積に至るのかその詳細なメカニズムは未だ不明である。本研究ではヒトアストロサイト由来培養細胞上清中に含まれる分泌型セリンプロテアーゼ KLK7 が新規 Aβ 分解プロテアーゼであることを見いだした。

A. 研究目的

アルツハイマー病 (AD) は認知症の原因の中で頻度の最も高い神経変性疾患である。アミロイド β ペプチド (Aβ) の蓄積は AD の原因と考えられており、特に孤発性 AD 患者脳においては Aβ クリアランスの低下が示唆されている。近年、グリア細胞の関連する Aβ 分解系が注目されており、Aβ 分解酵素の同定と解析は新規治療法の創出に繋がる可能性がある。

リンプロテアーゼ様の Aβ 分解活性が認められた。文献情報や脳内発現プロファイルから複数の候補プロテアーゼを絞込み、RNAi を用いた分子細胞生物学的解析から、培養細胞上清中に存在する Kallikrein-related peptidase 7 (KLK7) に Aβ 分解活性があることを見いだした。またマウス由来初代培養系を用いて内在性 KLK7 タンパク質の発現を検討したところ、ミクログリアでは観察されずアストロサイトに検出された。

B. 研究方法

グリア系培養細胞や初代培養細胞の培養上清を Aβ と混合し、Aβ 分解活性について検討した。また、各種阻害剤や RNAi 法を用いて責任酵素の同定を試みた。

(倫理面への配慮)

動物実験においては、当該施設の倫理委員会の承認を得て、動物愛護や遺伝子組み換え等に関する法律を遵守して行った。

C. 研究結果

グリア系培養細胞である CCF-STTG1 や U87 の培養上清中に亜鉛イオン感受性キモトリプシン型セ

D. 考察

KLK7 は AD 病変の好発部位である海馬や扁桃体で特に発現量が高いプロテアーゼである。興味深いことに、AD 患者の脳脊髄液中で KLK7 の発現量の低下が報告されている。これらの結果は、加齢に伴うグリア細胞における KLK7 発現量低下が脳内 Aβ 分解活性の減少につながり、AD 発症に寄与している可能性を示唆するものと考えた。今後ノックアウトマウスを用いて *in vivo* における KLK7 の脳内 Aβ 代謝システムへの寄与を検証する。

E. 結論

アストロサイト由来新規 Aβ 分解プロテアーゼ