

候補分子として、KLK7 を同定した。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Kanatsu K, Morohashi, Suzuki M, Kuroda H, Watanabe T, Tomita T, Iwatsubo T: Decreased CALM expression reduces A $\beta$ 42 to total A $\beta$  through clathrin-mediated endocytosis of  $\gamma$ -secretase. Nat Comm 5, Article number: 3386, 2014

Ohki Y, Shimada N, Higo T, Tokoshima S, Fukuyama T, Tomita T, Iwatsubo T: Binding of longer A $\beta$  to transmembrane domain 1 of presenilin 1 impacts on A $\beta$ 42 generation. Mol Neurodegener 9(1):7, 2014.

Tomita T, Iwatsubo T: Structural biology of presenilins and signal peptide peptidases. J Biol Chem 288(21):14673-14680, 2013

## 2. 学会発表

建部卓也、木棚究、秋下雅弘、大内尉義、富田泰輔、岩坪威：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 A $\beta$  分解活性の解析 2014 年 3 月 27-30 日 日本薬学会第 134 年会 熊本

木棚究、秋下雅弘、大内尉義、富田泰輔、岩坪威：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 A $\beta$  分解活性の解析 第 32 回日本認知症学会学術集会 松本 2013 年 11 月 8-10 日

## H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

### 1. 特許取得

特になし

### 2. 実用新案登録

特になし

### 3. その他

特になし

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

## 培養細胞を用いたミトコンドリア内 A $\beta$ 産生系に関する検討

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 儘田直美<sup>1,2</sup>、石井一弘<sup>1</sup>、荒木亘<sup>2</sup>

<sup>1</sup>筑波大学医学医療系神経内科学、<sup>2</sup>国立精神神経医療研究センター神経研究所

**研究要旨** アルツハイマー病(AD)の病態にミトコンドリアの機能異常が関与していることが示唆されており、その機序として、アミロイド $\beta$  蛋白 (A $\beta$ ) がミトコンドリア内に蓄積し、ミトコンドリアの機能不全を引き起こす可能性が考えられている。しかし、ミトコンドリアへの A $\beta$  蓄積のメカニズムについては不明な点が多く、ミトコンドリア内での A $\beta$  産生の関与についても明らかではない。今回我々はミトコンドリア内における APP 代謝、A $\beta$  産生について検討するため、培養細胞を用いて検討した。Swedish 変異型の APP を過剰発現するヒト神経芽細胞腫 (SH-SY5Y) 細胞を、遠心分離を用いた細胞下分画法によりミトコンドリア画分・マイクロゾーム画分に分離した。ウェスタンブロッティングでの解析では、APP はミトコンドリア・マイクロゾーム画分に同程度分布しており、BACE1 はマイクロゾーム画分優位、Presenilin1、Nicastrin、APH-1aL、PEN-2 はミトコンドリア画分優位に分布していた。 $\alpha$ -CTF、 $\beta$ -CTF は両画分に存在していたが、 $\beta$ -CTF/ $\alpha$ -CTF 比はマイクロゾーム画分で有意に高かった。以上の結果から、ミトコンドリア画分内には APP、BACE1、 $\gamma$ -secretase 複合体因子が豊富に存在しており、ミトコンドリア内においても APP の代謝、A $\beta$  産生が行われている可能性が示唆された。

### A. 研究目的

アルツハイマー病(AD)の病態にミトコンドリアの機能異常が関与していることが示唆されている。その機序として、アミロイド $\beta$  蛋白 (A $\beta$ ) がミトコンドリア内に蓄積し、ミトコンドリア外膜における蛋白輸送の障害、TCA cycle にかかわる酵素の減少、cytochrome oxidase の減少、呼吸鎖の障害、ROS 産生などを介して、ミトコンドリア機能不全をきたし、ATP 産生が低下し、シナプス障害を来すと考えられている。しかし、ミトコンドリアへの A $\beta$  蓄積のメカニズムについては不明な点が多く、ミトコンドリア内での A $\beta$  産生の関与についても明らかではない。今回我々は、アミロイド前駆体蛋白 (APP) を過剰発現する細胞を用いて、ミトコンドリアおよびマイクロゾームにおける APP、BACE1、 $\gamma$ -secretase 複合体、APP C 末端断片 (CTF) の発現量を評価し、ミトコンドリア内における APP 代謝、A $\beta$  産生について検討した。

### B. 研究方法

Swedish 変異型の APP を過剰発現するヒト神経芽細胞腫 (SH-SY5Y) 細胞を材料として用いた。細胞を、遠心分離を用いた細胞下分画法によりミトコンドリア画分・マイクロゾーム画分に分離した。それぞれのマーカーで分離を確認した後、BACE1、 $\gamma$ -secretase 複合体因子、APP、APP CTF などの発現をウェスタンブロッティングで解析し、比較した。

(倫理面への配慮)

特に問題なし。

### C. 研究結果

ミトコンドリア画分の分離は TOMM20、TOMM40、Cytochrome C を用いて確認した。マイクロゾーム画分は  $\gamma$ 1 Adaptin、Calnexin、Cathepsin D などで評価したが、Cathepsin D はミトコンドリア画分内にもマイクロゾーム画分と同程度に存在しており、ライソゾームが一部ミトコンドリア画

分に含まれている可能性が示唆された。

APPはミトコンドリア・マイクロゾーム画分に同程度分布していた。BACE1はマイクロゾーム画分優位、Presenilin1、Nicastrin、APH-1aL、PEN-2はミトコンドリア画分優位に分布していた。CTFの解析では、 $\alpha$ -CTFはややミトコンドリアに多く、 $\beta$ -CTFはマイクロゾーム優位に分布しており、 $\beta$ -CTF/ $\alpha$ -CTF比はマイクロゾーム画分で有意に高かった。

#### D. 考察

本実験系において、ミトコンドリア画分内にはAPP、 $\gamma$ -secretase複合体因子が豊富に存在していた。ミトコンドリア画分ではマイクロゾーム画分に比してBACE1の発現が少なく、 $\beta$ -CTF/ $\alpha$ -CTF比は低かった。以上の結果から、ミトコンドリア内においてもAPPの代謝、A $\beta$ 産生が行われている可能性が示唆された。今回の実験の問題点として、ミトコンドリア画分からのライソゾーム成分の分離が不十分である点があげられ、さらに分離法を検討する必要がある。また、今後ミトコンドリアおよびマイクロゾーム内のA $\beta$ の存在様式を解析し、A $\beta$ の毒性発揮機構を検討する予定である。

#### E. 結論

ミトコンドリア画分内にはAPP、 $\gamma$ -secretase複合体因子が豊富に存在しており、ミトコンドリア内においてもAPPの代謝、A $\beta$ 産生が行われている可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) 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):188lr2. 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  $\beta$ -peptide production by modulating amyloid precursor protein

maturation and phosphorylation through a cholesterol-independent mechanism in cultured neurons. *Neurochem Res*, 38: 589-600, 2013. 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  $\beta$ -amyloid accumulation by reticulin 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  $\beta$  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  $\beta$  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, 齊藤祐子: 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: マウス胎仔電気穿孔法による *in vivo* TDP-43 遺伝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 $\beta$  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 $\beta$  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 $\beta$  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

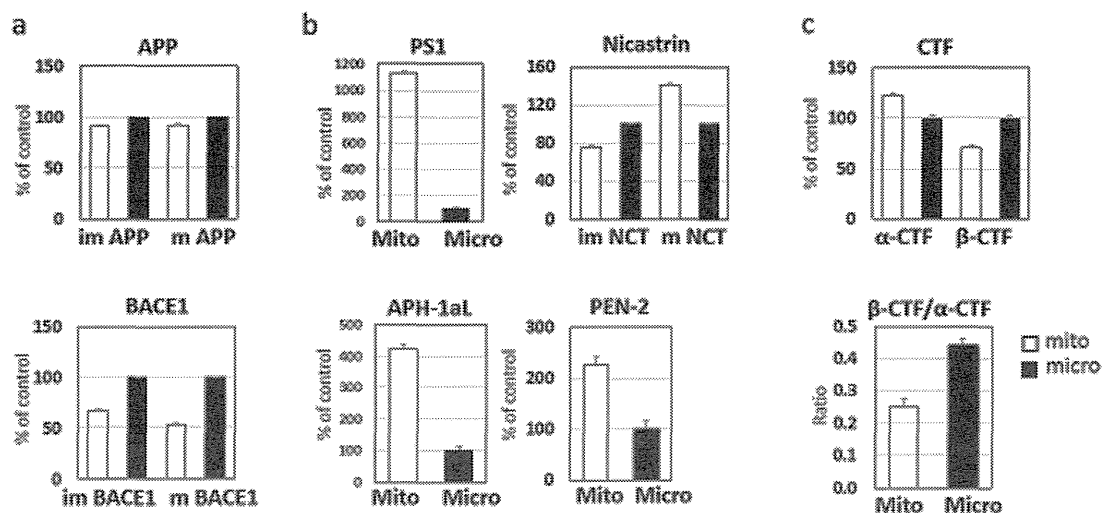


図. Sweden 型 APP を過剰発現するヒト神経芽細胞腫細胞を用い、遠心分離による細胞下分画法によりミトコンドリア・マイクロソーム画分を分離した。ウェスタンブロットで蛋白を解析した。

- (a) APP は各分画で同程度、BACE1 はマイクロソーム優位に分布していた。
- (b)  $\gamma$ セクレターゼ複合体はミトコンドリア優位に分布していた。
- (c)  $\alpha$ -CTF,  $\beta$ -CTF は両画分に存在していたが、 $\beta$ -CTF/ $\alpha$ -CTF 比はマイクロソーム画分で高かった。

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 分担研究報告書

## Cross-seeding effects of amyloid $\beta$ -protein and $\alpha$ -synuclein

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 小野賢二郎、高橋良一、池田篤平

金沢大学大学院脳老化・神経病態学（神経内科学）

**研究要旨**  $\beta$ アミロイド蛋白 ( $A\beta$ ) や  $\alpha$ -シヌクレイン蛋白 ( $\alpha S$ ) の凝集はアルツハイマー病 (AD) や  $\alpha$ -シヌクレノパチーの病態に深く関わっている。また、最近の研究は、 $A\beta$  と  $\alpha S$  が相互に作用していることを示唆している。 $A\beta 40$ 、 $A\beta 42$  および  $\alpha S$  の凝集体の  $A\beta$  および  $\alpha S$  凝集に対する seeding、あるいは cross-seeding 効果をチオフラビン色素蛍光法および電子顕微鏡を用いて検討した。シーズとして、試験管内で形成させた  $A\beta$  および  $\alpha S$  の線維とオリゴマーを用いて、それらの  $A\beta$  および  $\alpha S$  線維形成促進効果 (seeding 効果) を評価した。超音波破碎された  $A\beta 40$ 、 $A\beta 42$  線維、 $\alpha S$  線維、 $A\beta 40$ 、 $A\beta 42$  オリゴマー、 $\alpha S$  オリゴマーは全て、同種間だけでなく、異種間でも seeding 効果を示した。とくに  $\alpha S$  線維は、 $A\beta$  凝集系において  $A\beta 40$ 、 $A\beta 42$  線維以上に強力な seeding 効果を示した。 $A\beta$  や  $\alpha S$  は相互にシーズとして凝集系に作用し、特に  $\alpha S$  線維の  $A\beta$  凝集に及ぼす効果は  $A\beta$  線維よりも強力である。

### A. 研究目的

$\beta$ アミロイド蛋白 ( $A\beta$ ) や  $\alpha$ -シヌクレイン蛋白 ( $\alpha S$ ) の凝集はアルツハイマー病 (AD) や  $\alpha$ -シヌクレノパチーの病態に深く関わっている。また、最近の研究は、 $A\beta$  と  $\alpha S$  が相互に作用していることを示唆している。本研究では、微量の  $A\beta$  あるいは  $\alpha S$  の凝集体を投与することによって  $A\beta$  および  $\alpha S$  凝集が促進されるか否かについて試験管内凝集モデルを用いて検討した。

### B. 研究方法

$A\beta$  および  $\alpha S$  の線維シードは、25  $\mu M$   $A\beta$  および  $\alpha S$  溶液を 2 ( $A\beta 42$ )、または 10 ( $A\beta 40$ 、 $\alpha S$ ) 日間 37°C でインキュベートした後に超音波破碎を加えて作成した。 $A\beta$  および  $\alpha S$  のオリゴマーは、25  $\mu M$   $A\beta$  および  $\alpha S$  溶液に photo-induced cross-linking of unmodified proteins (PICUP) を行ったのちに size-exclusion chromatography を用いて精製した。上記で準備した  $A\beta$  および  $\alpha S$  の線維シード、またはオリゴマーを 25  $\mu M$   $A\beta$ 、または  $\alpha S$  溶液と混和して 37°C でインキュベートし、それらの  $A\beta$  および  $\alpha S$  線維形成促進効果 (seeding、あるいは cross-seeding 効果) をチオフラビン色素 (T、

または S) 蛍光法および電子顕微鏡を用いて検討した。

(倫理面への配慮)  
問題なし。

### C. 研究結果

超音波破碎された  $A\beta 40$ 、 $A\beta 42$  線維、 $\alpha S$  線維、 $A\beta 40$ 、 $A\beta 42$  オリゴマー、 $\alpha S$  オリゴマーは全て、同種間だけでなく、異種間でも seeding 効果を示した。とくに  $\alpha S$  線維は、 $A\beta$  凝集系において  $A\beta 40$ 、 $A\beta 42$  線維以上に強力な seeding 効果を示した。各種オリゴマーの seeding 効果は超音波破碎された線維シードにくらべて弱かった。

### D. 考察

$A\beta 40$ 、 $A\beta 42$ 、 $\alpha S$  の疎水性中心は各々の凝集に重要な役割を果たしているだけでなく、相互に interaction することも報告されており、これらの疎水性中心がモノマーと線維シードとの interaction に互いに影響を及ぼし合い、特に  $\alpha S$  の疎水性中心の効果は  $A\beta 40$  および  $A\beta 42$  より強力であると考えられた。

いくつかの動物実験でAβとαSが互いに作用して各々の沈着を促進させる報告がある。また、Aβは、細胞外だけでなく細胞内、αSは細胞内だけでなく細胞外にもモノマーやオリゴマーとして存在することが報告されており、AβやαSが細胞内および細胞外の両方で相互に作用して凝集を促進している可能性も考えられた。

## E. 結論

AβやαSは相互にシーズとして凝集系に作用し、特にαS線維のAβ凝集に及ぼす効果はAβ線維よりも強力である。

## 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*, in press.

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: Aβ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 $\beta$  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  $\beta$ -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 $\beta$  aggregation therapies. The Stroke Research Meeting, Massachusetts General Hospital, July 12, 2013.
- 3) Yamada M. Phenolic compounds with anti-aggregation effects on A $\beta$ 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おいて閉眼により出現する  $\alpha$  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  $\alpha$ -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  $\beta$ -protein and  $\alpha$ -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，柚木颯憐，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，柚木颯憐，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

## 新たなガンマ・セクレターゼ結合蛋白の解析

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(神経内科学)

共同研究者 三條伸夫、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(神経内科学)

**研究要旨** 培養細胞を用いて、Time-controlled transcardiac perfusion cross-linking 法により同定した新たなガンマ・セクレターゼ結合蛋白について解析を行ったところ、新規蛋白をノックダウンした細胞において、アミロイド前駆体蛋白の減少が認められ、新規蛋白は APP の発現調節や安定性に関与している可能性が示唆された。

### A. 研究目的

我々は Time-controlled transcardiac perfusion cross-linking (tcTPC)法による免疫共沈降法にて新たなガンマ・セクレターゼ調節因子の候補となる蛋白質を見だし、そのうちの1つは Aph-1 と特異的に結合する蛋白であった。Aph-1 はガンマ・セクレターゼ複合体においては足場分子的な働きをすることが推測されている。新たに発見した Aph-1 と特異的に結合する新規蛋白の生化学的性質を解析した。

### B. 研究方法

野生型アミロイド前駆体蛋白(APPwt)および、スウェーデン型遺伝子異常を導入した APP(APPswe) のコンストラクトを作製し、HEK293 細胞に導入した。各々の APP 導入細胞に 1 番染色体上 long form の Aph-1(Aph-1aL)遺伝子を導入し Aph-1aL を単独で導入した場合、ガンマ・セクレターゼの 4 因子全てを導入した場合、および Aph-1aL を siRNA にてノックダウンした場合に培養液中に産生されるベータ・アミロイド(A $\beta$ )40 および A $\beta$  42 の産生量を ELISA 法にて測定した。また、新規蛋白を siRNA でノックダウンさせた場合の野生型 APP の発現量をウエスタン・ブロッティングで確認した。

(倫理面への配慮)

養細胞を用いた in vitro の実験のみであり、倫

理上特に問題となる実験は行わなかった。また、感染性のある病原微生物も使用していない。

### C. 研究結果

培養細胞に Aph-1aL を過剰発現させたところ、Aph-1aL 蛋白の総量が増加し、培養液中に産生された A $\beta$  40 と A $\beta$  42 は共に増加した。その際、活性型ガンマ・セクレターゼの指標としてのプレセニリンの N 末端と C 末端の量には変化を認めなかった。新規蛋白をノックダウンした細胞において、アミロイド前駆体蛋白の減少が認められた。

### D. 考察

Aph-1 は単独で、その蛋白量が増加すると活性型ガンマ・セクレターゼの量的変化を伴わずに A $\beta$  の産生量が増加することが確認された。このことは Aph-1 が単独でガンマ・セクレターゼの活性に正の影響を与えることを示唆している。同様の所見は He ら(J. Neurochem. 2006)や Marlow ら(BBRC, 2003)においても報告されているが、どちらの報告においてもメカニズムは明らかにされていない。

Aph-1 に特異的に結合する新規蛋白をノックダウンさせた細胞では、APP の量が減少しており、新規蛋白・Aph-1・APP の結合により APP の安定性に関与している可能性が示唆された。

### E. 結論

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て、新たなガンマ・セクレターゼ活性を調節している可能性がある。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Koji Fujita, Masafumi Harada, Makoto Sasaki, Tatsuhiko Yuasa, Kenji Sakai, Tsuyoshi Hamaguchi, Nobuo Sanjo, Yusei Shiga, Katsuya Satoh, Ryuichiro Atarashi, Susumu Shirabe, Ken Nagata, Tetsuya Maeda, Shigeo Murayama, Yuishin Izumi, Ryuji Kaji, Masahito Yamada, Hidehiro Mizusawa. 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.* , 2012, 2:e000649
- 2) 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, 2013
- 3) Maya Higuma, Nobuo Sanjo, Katsuya Satoh, Yusei Shiga, Kenji Sakai, Ichiro Nozaki, Tsuyoshi Hamaguchi, Yosikazu Nakamura, Tetsuyuki Kitamoto, Susumu Shirabe, Shigeo Murayama, Masahito Yamada, Jun Tateishi, Hidehiro Mizusawa. Relationships between Clinicopathological Features and Cerebrospinal Fluid Biomarkers in Japanese Patients with Genetic Prion Diseases. *PLoS One* 8(3): e60003, 2013.
- 4) Sano K, Satoh K, Atarashi R, Takashima H, Iwasaki Y, Yoshida M, Sanjo N, Murai H,

Mizusawa H, Schmitz M, Zerr I, Kim YS, Nishida N. Early Detection of Abnormal Prion Protein in Genetic Human Prion Diseases Now Possible Using Real-Time QUIC Assay. *PLoS One* 8(1). e54915, 2013

- 5) Tsuyoshi Hamaguchi, Kenji Sakai, Moeko Noguchi-Shinohara, Ichiro Nozaki, Ichiro Takumi, Nobuo Sanjo, Atsuko Sadakane, Yosikazu Nakamura, Tetsuyuki Kitamoto, Nobuhito Saito, Hidehiro Mizusawa, Masahito Yamada. Insight into the frequent occurrence of dura mater graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease in Japan. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, in press, 2013.
- 6) Kenji Sakai, Tsuyoshi Hamaguchi, Moeko Noguchi-Shinohara, Ichiro Nozaki, Ichiro Takumi, Nobuo Sanjo, Yosikazu Nakamura, Tetsuyuki Kitamoto, Nobuhito Saito, Hidehiro Mizusawa, Masahito Yamada. Graft-related disease progression in dura mater graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease: a cross-sectional study. *BMJ Open* 2013; 3: e003400.

### 2. 学会発表

- 1) 三條伸夫、三苦博、日熊麻耶、伊藤陽子、堀匠、水澤英洋. 歩行解析器を用いたアルツハイマー病における歩行障害の解析. 第 54 回日本神経学会学術大会. 東京, 5 月 31 日, 2013, 東京国際フォーラム
- 2) 堀匠、三條伸夫、水澤英洋. 日本人の軽度認知機能障害患者の転化予測における SPECT での楔前部血流低下の有用性. 第 54 回日本神経学会学術大会. 東京, 5 月 30 日, 2013, 東京国際フォーラム.
- 3) Maya Higuma, Nobuo Sanjo, Hiroshi Mitoma, Yoko Ito, Takumi Hori, Hidehiro Mizusawa. Quantitative analysis of gait disorders in patients with Alzheimer’s disease by using a portable gait

- |  |   |
|--|---|
| <p>rhythmograph. Alzheimer's association international conference 2013, USA/Boston, 7月17日, Boston Convention &amp; Exhibition Center</p> <p>4) Takumi Hori, Nobuo Sanjo, Hidehiro Mizusawa. Visual Reproduction on the Wechsler Memory Scale-Revised as a predictor of Alzheimer's disease in Japanese patients with mild cognitive impairments. Alzheimer's association international conference 2013, USA/Boston, 7月17日, Boston Convention &amp; Exhibition Center</p> | <p>H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）</p> <p>1. 特許取得<br/>なし</p> <p>2. 実用新案登録<br/>なし</p> <p>3. その他<br/>なし</p> |
|--|---|

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

## 脳アミロイドーシスの細胞治療法の開発を目指した骨髄由来 ミクログリア様細胞の機能ならびに脳移行性の解析

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βタンパク質 (Aβ) 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 Aβ 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 Aβ 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)。また、骨髄細胞を macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) で刺激することにより、ミクログリア様の Aβ 貪食細胞へと分化・誘導することに成功している (J. Addict. Res. Ther., 2011, S5, 001. 1-5.doi:10.4172/2155-6105.S5-001)。本研究では、マウス骨髄細胞ならびに M-CSF 処置ミクログリア様細胞を野生型マウスに投与して脳移行性を解析した。その結果、脳室内ならびに尾静脈に投与しても、どちらの細胞も脳実質へと移行することが示唆された。さらに、M-CSF 処置により誘導した骨髄細胞由来ミクログリア様細胞が、内在性ミクログリアに作用する何らかの液性因子を分泌する可能性について解析した。その結果、培養上清には、内在性ミクログリアの Aβ 貪食機能を促進する因子が存在していることを発見した。以上より、AD の細胞治療法の開発における骨髄細胞由来 M-CSF 処置ミクログリア様細胞の有用性が示唆された。

### A. 研究目的

アルツハイマー病 (AD) の脳実質ではアミロイドβタンパク質 (Aβ) 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 Aβ の脳内からの除去である。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 Aβ 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 Aβ 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)。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、多分化能を有する骨髄幹細胞は、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。これまでに私たちは、骨髄細胞を macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) で刺激することにより、ミクログリア様の Aβ 貪食細胞へと分化・誘導することに成功している (J. Addict. Res. Ther., 2011,

S5, 001. 1-5.doi:10.4172/2155-6105.S5-001)。そこで本研究では、マウス骨髄細胞ならびに M-CSF 処置ミクログリア様細胞を野生型マウスに投与して脳移行性を解析した。

### B. 研究方法

Enhanced green fluorescent protein (EGFP) マウスの大腿骨と脛骨から採取した骨髄細胞 ( $2.5 \times 10^6$  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、7日後に培養皿に付着する細胞を M-CSF 処置ミクログリア様細胞として採取した。採取した骨髄細胞または M-CSF 処置ミクログリア様細胞を野生型マウスの脳室内 ( $1.0 \times 10^6$  cells) や尾静脈 ( $1.0 \times 10^7$  cells) に投与し、移植細胞の脳移行性について EGFP の免疫反応性を指標に免疫組織学的に解析した。さらに、M-CSF 処置ミクログリア様細胞が産生する液性因子の内在性ミクロ

グリアに対する作用を解析するため、M-CSF 処置後に M-CSF を含まない無血清基本培地へと1日間置換し、培養上清を採取した。この培養上清をマウス新生仔脳から調製した内在性マイクログリアに処置し、A $\beta$  貪食作用への液性因子の作用を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) により解析した。

#### (倫理面への配慮)

EGFP マウスの骨髄細胞の採取、初代培養マイクログリアの調製ならびに野生型マウスへの移植に関して、京都薬科大学遺伝子組換え実験安全委員会ならびに動物実験委員会の承認を得た。遺伝子組換え生物等の拡散防止措置や動物倫理に照らした深麻酔下での脳室内投与など苦痛の削減ならびに臓器摘出時には頸椎脱臼による安楽死措置を講じた。

### C. 研究結果

EGFPマウスから採取した骨髄細胞ならびに骨髄由来M-CSF処置マイクログリア様細胞を野生型マウスの脳室内に移植した結果、一部の細胞が脳実質へと移行した (図1)。M-CSFを処置し、マイクログリア様細胞へと分化させてから移植すると、脳実質に移行する細胞数が減少したが、実質へと移行する細胞が確かに存在することが示唆された (図1)。同様に骨髄細胞ならびに骨髄由来M-CSF 処置マイクログリア様細胞を野生型マウスの尾静脈から投与した結果、投与した細胞は脳血管に到達しており、一部は脳実質へと移行することがわかった (図2)。

一方、骨髄由来M-CSF処置マイクログリア様細胞の培養上清を用いて、初代培養マイクログリアを培養し、A $\beta$  貪食機能を解析した。その結果、骨髄由来M-CSF処置マイクログリア様細胞の培養上清の処置により内在性マイクログリアのA $\beta$  貪食機能が有意に促進した (図3)。

### D. 考察

AD 発症リスクとして、加齢にともなうマイクログリアの機能不全が指摘されている。M-CSF を処置した骨髄由来マイクログリア様細胞は末梢から投与しても脳血管ならびに一部が脳実質へと移

行することがわかり、A $\beta$  貪食機能により脳血管内や脳内A $\beta$  除去に機能する可能性が示唆された。さらに骨髄由来マイクログリア様細胞は内在性マイクログリアのA $\beta$  貪食機能を促進する液性因子を産生することがわかり、脳血管にとどまる移植細胞も脳内A $\beta$  除去に機能する可能性が示唆された。以上から、M-CSF を処置した骨髄由来マイクログリア様細胞は内在性マイクログリアの機能不全を補填することで、アルツハイマー病の細胞治療への応用が期待できることが示唆された。

### E. 結論

アルツハイマー病の細胞治療法開発における、骨髄細胞由来 M-CSF 処置マイクログリア様細胞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) Inden M, Takata K, Nishimura K, Kitamura Y, Ashihara E, Yoshimoto K, Ariga H, Honmou O, Shimohama S: Therapeutic effects of human mesenchymal and hematopoietic stem cells on rotenone-treated parkinsonian mice. *J Neurosci Res* 91: 62-72, 2013.

#### 2. 学会発表

1) Takata K, Toji Y, Kawanishi S, Takada T, Kitamura Y, Ashihara E: Microglia-like monocytic cells derived from bone marrow cells phagocytose amyloid- $\beta$  and facilitate phagocytosis of amyloid- $\beta$  by resident microglia. American Society of Hematology (ASH) 55th annual meeting, New Orleans, USA, 12.7-10, 2013.

2) 高田和幸、北村佳久、下濱 俊、芦原英司: アルツハイマー病克服に向けたトランスレーショナルリサーチ. 第 86 回日本薬理学会, 福岡, 3.21-23, 2013.

3) 高田和幸、河西翔平、杜氏裕美子、北村佳久、

芦原英司: M-CSF 刺激による造血幹細胞からのアミロイドβ 貪食細胞への分化誘導. 第 75 回日本血液学会学術総会, 札幌, 10.11-13, 2013.

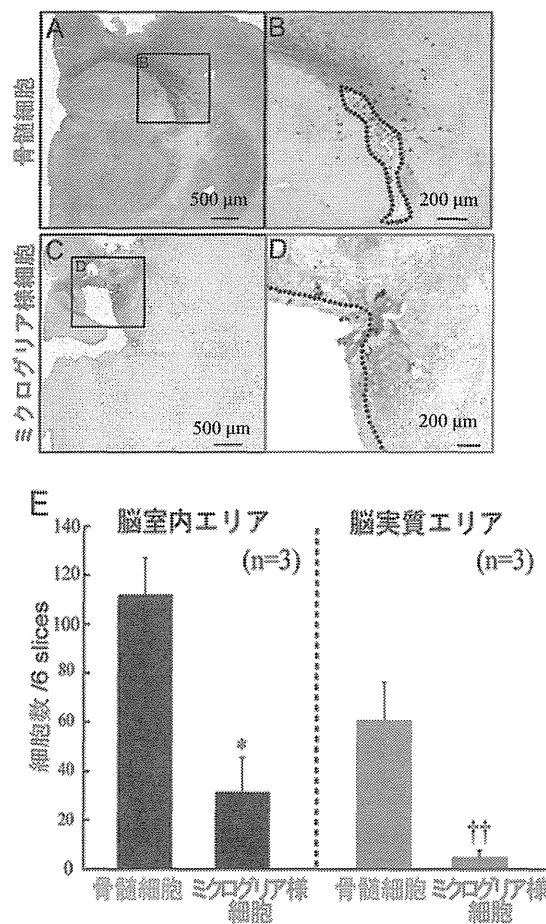
2. 実用新案登録  
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

3. その他  
なし

1. 特許取得  
なし

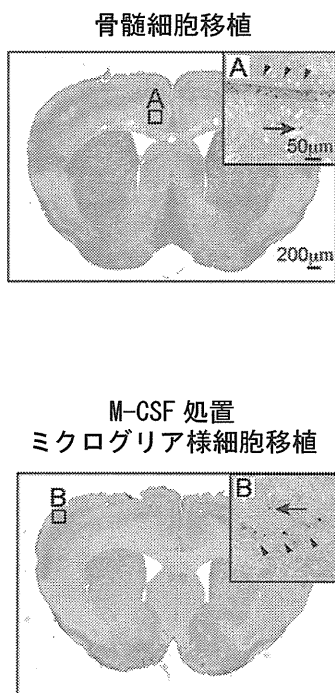
図 1 : 脳室内投与による移植細胞の脳実質移行性の定量



マウスから採取した骨髓細胞 (A, B) ならびに骨髓由来 macrophage-colony stimulating factor 処置ミクログリア様細胞 (C, D) を野生型マウスの脳室内に移植した結果、一週間後において一部の細胞が脳実質へと移行した。M-CSF を処置し、ミクログリア様細胞へと分化させてから移植すると、脳実質に移行する細胞数が減少するが、脳実質に移行する細胞が存在することが示唆された (E)。\* $P < 0.05$  vs 骨髓細胞 (脳室内エリア), †† $P < 0.01$  vs 骨髓細胞 (脳実質エリア)

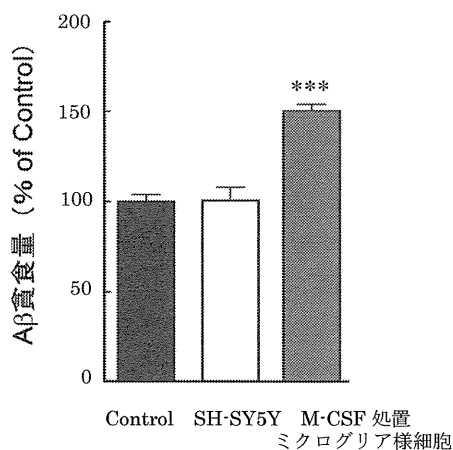


図 2：尾静脈投与による移植細胞の脳移行性の解析



骨髓細胞 (A) ならびに骨髓由来 macrophage-colony stimulating factor 処置ミクログリア様細胞 (B) を野生型マウスの尾静脈から投与した結果、一週間後、投与した細胞は脳血管に遅達しており (矢頭)、一部は脳実質へと移行することがわかった (矢印)。

図 3：骨髓由来ミクログリア様細胞の培養上清の内在性ミクログリアに対する作用



骨髓由来 macrophage-colony stimulating factor 処置ミクログリア様細胞の培養上清を用いて、初代培養ミクログリアを培養し Aβ 貪食機能を解析した結果、内在性ミクログリアの Aβ 貪食機能が有意に促進した。\*\*\* $P < 0.001$  vs Control, SH-SY5Y：ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞の培養上清

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

## 透析アミロイドーシスに関する臨床重症度分類の作成

研究分担者 高市憲明 虎の門病院腎センター

共同研究者 星野純一 澤直樹 川田真宏 三瀬広記 住田圭一 平松里佳子

長谷川詠子 早見典子 諏訪部達也 乳原善文

虎の門病院 腎センター

**研究要旨** 透析アミロイドーシス(DRA)の所見と臨床重症度の関連は明らかでない。今回、患者身体機能をもとにした DRA 臨床重症度分類の作成を目的とした。

対象は外来維持透析患者 140 名（年齢 64±11 歳、透析期間 16±12 年）。DRA 診断は厚生労働省診断基準に従い、DRA 主要 5 症状（多関節痛・バネ指・手根管症候群(CTS)・透析脊椎症（脊柱管狭窄症もしくは破壊性脊椎症）・骨嚢胞）を評価対象項目とした。身体機能は SF-36version2 にて評価した。

DRA 診断は身体機能低下と強く相関しており、多変量解析にて患者背景因子（年齢・性別・透析歴・糖尿病・脳心血管病の既往・血清 Alb・Hb・CRP）を補正した後も有意であった(身体機能の Normo-based score -16.5 [-23.4~-9.6],  $p<0.01$ )。次に各 DRA 主要 5 症状の身体機能への影響を検討したところ、それぞれ多関節痛-8.2 [-15.8~-0.6], バネ指-4.9 [-13.5~3.6], CTS -6.3 [-15.3~2.6], 透析脊椎症 -8.6 [-14.7~-2.5], 骨嚢胞 2.0 [-6.6~10.6]であった。この結果から、以下の 2 モデルを作成した。

① モデル 1 “多関節痛 x8 + バネ指 x5 + CTS x6 + 透析脊椎症 x9”（最大値 28）

② 簡便なモデル(モデル 2) “多関節痛 x3 + バネ指 x2 + CTS x2 + 透析脊椎症 x3”（最大値 10）

DRA 診断に関する AUC は同等で両者の相関性も良好であったことから、簡便なモデル 2 を A-stage index 計算式とした。更に、身体機能 NBS をもとに、DRA の臨床重症度を Stage 1(4 点以下)、Stage 2(5~7 点)、Stage 3(8 点以上)の 3 段階に分類した。今後 DRA 臨床重症度分類を作成した。今後は解析集団を広げて A-stage index の有用性を検討し、更には患者予後との相関性の検討を行っていきたい。

### A. 研究目的

透析アミロイドーシス（以下 DRA）の診断は画像診断と自覚症状をもとに行われているが、これらの所見が実際の患者の身体機能にどのような影響を与えているかは明らかでなかった。今回、患者身体機能をもとにした DRA 臨床重症度分類 (Amyloid Clinical Stage: A-stage)の作成を目的とした。

### B. 研究方法

対象は虎の門病院本院・分院にて外来維持透析を施行中の 175 名。疼痛を有する悪性腫瘍や膠原病、重度心血管障害患者、四肢切断後の患者を除き、アンケート調査の協力を得られた 140 名を解析した。DRA の診断は厚生労働省透析アミロイド

診断基準に従い、DRA 主要 5 症状（多関節痛・バネ指・手根管症候群(CTS)・透析脊椎症（脊柱管狭窄症もしくは破壊性脊椎症）・骨嚢胞）を評価対象項目とした。患者 QOL(身体機能)は SF-36version2 を用いた国民標準との比較値 (Norm-based score: NBS)にて評価し、骨嚢胞・脊柱管狭窄症(CS)・破壊性脊椎症(DSA)は X 線 and/or MRI、バネ指・手根管症候群(CTS)の有無は医師の診察にて評価した。

（倫理面への配慮）

取得した患者情報は院内のみで取り扱い、統計解析を行う際にはパスワードロックされたパソコンを用いた。また発表の際には匿名化した。

### C. 研究結果

当院外来維持透析例のうち140名が解析対象例となった(平均年齢64±11歳、平均透析期間16±12年、男性71%、糖尿病性腎症14%)。そのうち43例が透析アミロイド症診断基準の主要臨床症状2項目以上を満たし、DRAと診断された。

DRA診断は身体機能低下と強く相関しており、この関係は多変量解析にて患者背景因子(年齢・性別・透析歴・糖尿病・脳心血管病の既往・血清Alb・Hb・CRP)を補正した後も有意であった(身体機能NBS -16.5 [-23.4~-9.6],  $p<0.01$ )。

次に各DRA主要5症状がどの程度独立して身体機能に影響しているかを調べた(図1)。患者背景因子で補正後に、DRA5症状の有無が身体機能NBSに与える影響は、それぞれ多関節痛-8.2 [-15.8~-0.6], バネ指-4.9 [-13.5~3.6], CTS -6.3 [-15.3~-2.6], 透析脊椎症 -8.6 [-14.7~-2.5], 骨嚢胞 2.0 [-6.6~10.6]であった。この結果から、モデル1“多関節痛x8 + バネ指x5 + CTS x6 + 透析脊椎症x9”(最大値28)と、より簡便なモデル2“多関節痛x3 + バネ指x2 + CTS x2 + 透析脊椎症x3”(最大値10)の2モデルを作成した。DRA診断に関するAUCは同等で両者の相関性も良好であったことから、モデル2をA-stage index計算式とした。更に、身体機能NBSをもとに、DRAの臨床重症度をStage 1(4点以下)、Stage 2(5~7点)、Stage 3(8点以上)の3段階に分類した(図2)。

### D. 考察

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。透析患者の身体機能に影響する他因子を可能な限り補正し、患者身体機能へのDRA主要項目の影響を調べた。今回のモデルは患者評価と医師評価の双方を含んだものとなった。

今後は解析集団を広げて同スコアの有用性を検討し、更には患者予後との相関性の検討を行っていきたい。

### E. 結論

DRAの重症度を評価する指標を作成した。

“A-stage index = 多関節痛 x3 + バネ指 x2 + CTSx2 + 透析脊椎症 x3”を算出し、4点以下を

stage 1, 5-7点をstage 2, 8点以上をstage 3と分類した(但し各症状の有る場合1,ない場合0)。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

Tsuchiya Y, Hoshino J, Suwabe T, Sumida K, Hiramatsu R, Mise K, Hasegawa E, Yamanouchi M, Hayami N, Sawa N, Arizono K, Hara S, Takaichi K, Fujii T, Ubara Y. Variegated porphyria complicated by systemic AA amyloidosis: a case report. *Amyloid*. 2013; 20:272-4.

Tsuchiya Y, Ubara Y, Suwabe T, Nomura K, Sumida K, Hiramatsu R, Hoshino J, Hasegawa E, Yamanouchi M, Hayami N, Sawa N, Takaichi K, Oohashi K. AA-amyloidosis in autosomal dominant polycystic kidney disease caused by chronic cyst infections lasting for 30 years. *Intern Med*. 2013; 52:791-4.

#### 2. 学会発表

濱之上 哲, 乳原 善文, 早見 典子, 三瀬 広記, 住田 圭一, 平松 里佳子, 山内 真之, 長谷川 詠子, 諏訪部 達也, 星野 純一, 澤 直樹, 高市 憲明: Tocilizumabが奏効したAA型アミロイドーシス合併家族型地中海熱の1例. 第57回日本リウマチ学会学術集会, 京都, 4/18-20, 2013

諏訪部 達也, 乳原 善文, 三瀬 広記, 濱之上 哲, 住田 圭一, 早見 典子, 星野 純一, 今福 礼, 平松 里佳子, 長谷川 詠子, 山内 真之, 澤 直樹, 高市 憲明: AA型アミロイドーシスを合併した関節リウマチ症例の検討. 第57回日本リウマチ学会学術集会, 京都, 4/18-20, 2013

川田 真宏, 乳原 善文, 星野 純一, 諏訪部 達也, 早見 典子, 住田 圭一, 三瀬 広記, 濱之上 哲, 澤 直樹, 長谷川 詠子, 山内 真之, 平松 里佳子, 今福 礼, 高市 憲明, 藤井 丈士: ALアミロイドーシスに合併した心臓病変に対する自家末梢血幹細胞移植併用大量メルファラン療法の治療効果. 第56回

日本腎臓学会学術総会, 東京, 5/10-12, 2013

星野 純一, 澤 直樹, 三瀬 広記, 川田 真宏, 今福 礼, 濱之上 哲, 平松 里佳子, 住田 圭一, 長谷川 詠子, 山内 真之, 早見 典子, 諏訪部 達也, 喜多島 出, 乳原 善文, 高市 憲明: 透析アミロイドがQOLに与える影響について. 第58回日本透析医学会学術集会, 福岡, 6/21-23, 2013

今福 礼, 乳原 善文, 川田 真宏, 澤 直樹, 住田 圭一, 諏訪部 達也, 長谷川 詠子, 早見 典子, 平松 里佳子, 星野 純一, 三瀬 広記, 山内 真之, 高市 憲明, 藤井 丈士, 大橋 健一: 心筋生検でALアミロイドーシスが疑われたが組織の再評価で老人性アミロイドーシスの診断に至った一例. 第43回日本腎臓学会東部学術集会, 東京, 10/4-5, 2013

菊地 晃一, 早見 典子, 諏訪部 達也, 住田 圭一,

三瀬 広記, 葉末 亮, 上野 智敏, 川田 真宏, 山内 真之, 平松 里佳子, 長谷川 詠子, 星野 純一, 澤 直樹, 高市 憲明, 大橋 健一, 藤井 隆志, 乳原 善文: メルファラン・デキサメサゾン併用療法にて良好な経過をとっている重鎖軽鎖(AHL)型原発性アミロイドーシスの一例. 第43回日本腎臓学会東部学術集会, 東京, 10/4-5, 2013

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

##### 1. 特許取得

該当せず

##### 2. 実用新案登録

該当せず

##### 3. その他

特になし