

平成 23年 3月 31日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20509008

研究課題名(和文) 血液浄化によりアルツハイマー病脳アミロイドを除去する治療システム
基本構成の創成研究課題名(英文) Creation and evaluation of the novel concept of the therapeutic blood
purification system for Alzheimer's Disease by the removal of blood amyloid beta

研究代表者

北口 暢哉 (KITAGUCHI NOBUYA)

藤田保健衛生大学・医療科学部・教授

研究者番号：70508077

研究成果の概要(和文)：

アルツハイマー病の原因物質である A β を、血中から除去することで脳内濃度を下げて、認知機能を改善する治療システムの構築のため、人工透析患者の血中 A β 変化を解析した。

1. A β の除去率が高い吸着材料を見出し、この素材のカラムで血液浄化を行っている透析患者では A β は 50% 程度除去されていた。
2. 透析器によっても A β が除去され、これにより他組織から血液への A β 移行(引抜)が促進される事を見出した。透析患者は、血中 A β が高濃度にも関わらず認知能力が保たれており、長期透析の方が認知能力が高かった。

以上から、血液からの A β 除去が認知機能の維持、改善に寄与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：

We intend to develop the new therapeutic system for Alzheimer's Disease (AD) by removal of blood amyloid beta (A β) which may reduce brain A β , one of the major cause of AD. As the first step, we investigated suitable materials for A β removal, and the change of plasma A β by blood purification with the A β removal materials.

1. Two effective adsorbents for A β removal were found. Around 50% of plasma A β s were reduced by extracorporeal system with one of the two adsorbents.
2. Dialyzers also effectively removed plasma A β s, which triggered the large influx of A β s into the blood. The cognitive functions of the patients remained, although the plasma A β concentrations were high. The patients of longer dialysis vintage showed higher cognitive functions.

Conceivably then, it is suggested that the removal of blood A β may maintain or improve the cognitive functions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	0	1,100,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	690,000	4,090,000

研究分野：医薬医療分野(医療機器、血液浄化、生化学、再生医療)

科研費の分科・細目：医用生体工学・生体材料学

キーワード：アルツハイマー病、血液浄化、A β 除去材

1. 研究開始当初の背景

(1) アルツハイマー病の脳には、Aβという不溶性のアミロイド蛋白で構成される老人斑が多数見いだされており、Aβ(おもにオリゴマー)が強い神経毒性をもつことが明らかになってきた。

(2) 欧米の製薬企業/ベンチャーが、Aβに対する抗体の投与、またはAβワクチンの臨床試験を実施し、認知症の改善が起こることを見いだした。さらに、抗体投与などにより、今まで除去は困難と思われていた老人斑の消失、Aβ蓄積量の減少が起こることが示された。しかしながら、上記のワクチンでは髄膜脳炎の副作用が発生したため、初期の製剤を用いた治験は中止された。

これらのワクチンや抗Aβ抗体投与による効果のメカニズムの一つとして、脳内のAβを血液側に引っ張り出すことにより脳内のAβ濃度をさげるといふ「引き抜き仮説」が提唱されている

(3) 免疫賦活機能のないAβ結合物質(gelsolinやGM1-ganglioside)を腹腔に投与しても脳内Aβが減少する事も報告された。

(4) 脳脊髄液のAβ濃度は、血中のほぼ10倍高い。また、脳と血液間のAβトランスポーターの存在が証明されている。

(5) 一方、人工透析(体外循環による血液浄化)によって、血中のAβがある程度除去されることが明らかになってきた。

2. 研究の目的

(1) 最終目的:

アルツハイマー病アミロイド蛋白(Aβ)を血液から除去する事により、脳から除去(引き抜く)し、認知機能を改善する「血液浄化によるアルツハイマー病治療システム」の構築を目指す。システムの概念図を以下に示す(図1)。

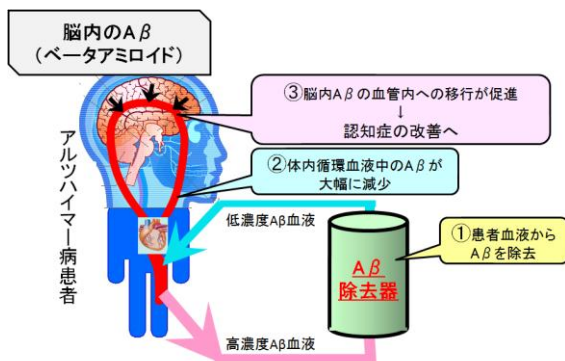


図1. 血液浄化によるアルツハイマー病治療システムの概念図

(2) 本応募では、その第一段階として、日本が世界に比して優位な、透析等の実際の血液浄化療法におけるAβ除去率の解析を行い、システムの基本コンセプトの妥当性と基本構成を示す事を目的とする。

① 透析を中心とする体外循環/血液浄化治療法において、血中の種々のAβ群(Aβ₁₋₄₀、神経毒性の強いAβ₁₋₄₂やAβオリゴマー)が除去されているかを解析する。

② Aβ除去率が高い材料で構成された医療機器を用いた血液浄化治療法では、Aβ血中濃度の推移がAβ除去率や認知機能(アルツハイマー病発症率等を含む)と関連するのかを解析する。

③ Aβ除去材の材料の性質とAβ除去率との関係を検討する。

3. 研究の方法

(1) Aβ除去材量

① 検討した医用吸着材料

認知症以外の疾患治療のための血液浄化療法に用いられている医用吸着材料から6種を選択し、Aβ除去能の評価に供した。各吸着材の素材を表1にまとめた。

表1. 検討した医用吸着材

	Materials	Ligand	Particle mean Size *	Material volume or weight for batch analysis
HDC(リクセル)	cellulose particle	hexadecyl group	460μm	4.375ml
CHA(ヘモパッチ)	charcoal(poly-HEMA coating)	none	500-750μm	4.375ml
TRV(イムパット)	polyvinyl alcohol gel	Tryptophan	80-100μm	4.375ml
CAP(アダカラム)	cellulose acetate particle	none	2mm	2.75g
CLD(セルソルブ)	cellulose gel	dextran sulfate	30-100μm	750μl
NPT(セルソパ)	polyethylene telephthalate	none	1-30μm**	0.33g

② 吸着メカニズム解析のための材料

シリカを担体表面に0, 2, 8, 18のアルキル基を有するビーズ(GLサイエンス社)、および、セルロースを担体表面に0, 2, 4, 8, 16, 22のアルキル基を有するビーズ(カネカ)を用いた。

(2) Aβ測定法

Aβ₁₋₄₀およびAβ₁₋₄₂の濃度は、和光純薬製ELISA Kit WAKO IIを用いて測定した。このキットでは主にAβモノマーが測定できる。

(3) Aβオリゴマー測定

① ウェスタンブロッティング

15/25 マルチゲルIIミニ(コスモバイオ)を用い、PVDF膜AE-6665(アトー)にブロッテ

イング後、DE2 (抗 A β 1-16 抗体、Millipore) を 1 次抗体とし、ECL Plus (GE ヘルスケア) を使い、Light Capture II (ATTO) により検出した。血漿蛋白が多く A β の定量はできなかった。

② A β オリゴマー-ELISA

IBL 社製 amyloid β Oligomers (82E1 特異的) ELISA を用いたが、このキットで A β オリゴマーが正しく測定できているかどうかは他の報告を待つ必要がある。

(4) 吸着材の in vitro アッセイ

① バッチ評価

100 μ g/ml の A β ₁₋₄₀ および A β ₁₋₄₂ のストック DMSO 溶液から、40ng/ml になるよう当日調整した A β /10mg/mlBSA/PBS 溶液 10ml をポリプロピレン製の 15ml 遠心管に入れ、表 1 記載の吸着材を添加後、4 時間または 16 時間振盪した。適宜サンプリングを行い溶液中の A β ₁₋₄₀ または A β ₁₋₄₂ の濃度を測定した。

② シングルパス評価

ヒトの体外循環システムを模して、想定スケールの 1/200 のミニシステムを構築した(図 2)。

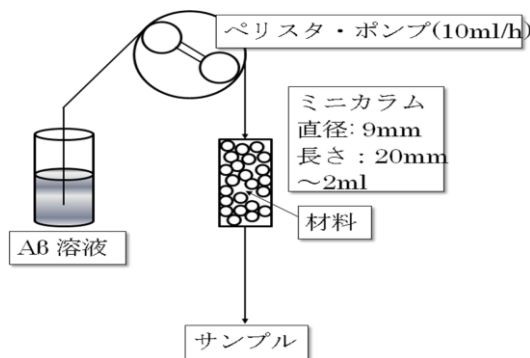


図 2. シングルパス評価用ミニシステム

(5) ヒト臨床評価

糖尿病ではアルツハイマー病発症リスクが 2 倍程度に高くなる事が知られており、また、透析導入患者の 40%以上が糖尿病性腎症由来であることから、本研究では、非糖尿病で年齢が 60-70 歳程度の人工透析患者を対象とした。同意が得られた透析患者では、脳の変化の把握のため CT を撮影した。

① HDC カラム使用患者

HDC カラムによる β 2mg 除去療法を併用している非糖尿病透析患者 5 例 (男 4、女 1、年齢: 65.6 \pm 7.1 歳) を対象とした。

② 人工透析のみの患者

非糖尿病の透析患者 37 例 (男 16、女 21。年齢: 59-75 歳 (平均 68. \pm 4.1 歳)。透析歴 2~35 年 (平均 11.5 \pm 8.0 年)) を対象とした。

(6) 認知能力

認知機能評価は 30 点満点の Mini Mental

State Examination (MMSE) で測定した。

(7) ラットの体外循環システムの構築

HDC ミニカラムを A β 除去材としたラット用体外循環血液浄化システムを検討した。実際の循環実験は、Wistar または SD ラット オス 7 週令を中心に検討した。A β の測定は、和光純薬製 Human/Rat β Amyloid ELISA Kit, High-Sensitive を用いた。

(8) 統計

Microsoft Excel 2007 または JMP8 (SAS Institute Inc., USA) を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) A β 吸着材の検討

① in vitro バッチ評価

臨床応用までの時間を短くするため、現在、LDL や β 2 マイクログロブリン (β 2mg) 等の除去のための血液浄化療法に用いられている医用吸着材料から 6 種を選択した(表 1)。血漿に近い溶液環境とする事、および、非特異吸着を抑制するため、10mg/ml の BSA を加えた A β ₁₋₄₀ または A β ₁₋₄₂ の PBS 溶液と各吸着材料を混合し、16 時間後の A β 除去率を測定した。図 3 に示すように HDC (C16 のアルキル基リガンドを有するセルロースビーズ) および CHA (ポリハイドロキシエチルメタクリレート をコーティングした活性炭) が、ほぼ 100% 近い A β ₁₋₄₀ および A β ₁₋₄₂ の除去率を示した。

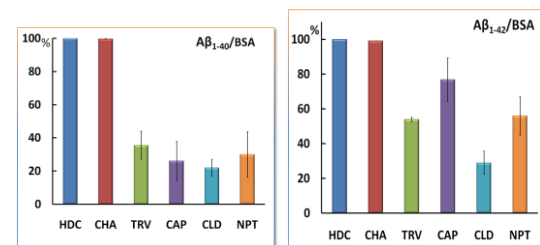


図 3. 6 種の医用吸着材料による A β 除去率 (16hr 振盪後)

HDC, CHA について、A β 除去の経時変化を解析したところ、図 4 に示すように、30 分間程度とかなり速く、A β ₁₋₄₀ および A β ₁₋₄₂ ともに除去できていることがわかった。

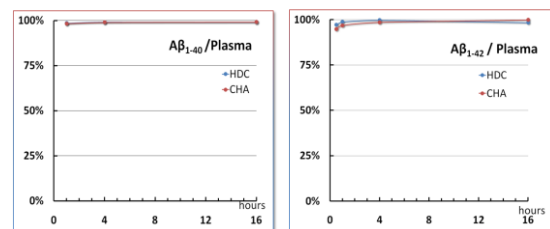


図 4. HDC および CHA の A β 除去率の経時変化(バッチ評価)

②in vitro シングルパス評価
臨床を模したミニカラムシステムを用いて、連続的に HDC または CHA に Aβ 溶液をフィードして、カラム前後での Aβ 除去率を測定したところ、HDC は 5 時間（ヒトでの体外循環では血漿 10L 処理相当）の間、ほぼ 100% 近い Aβ 除去率を示した（図 5）。CHA については Aβ₁₋₄₂ の除去率が経時的に低下する傾向があったものの、ほぼ 100% 近い Aβ₁₋₄₀ 除去率を 120 分間（ヒトでは血漿 4L 処理相当）維持できた。

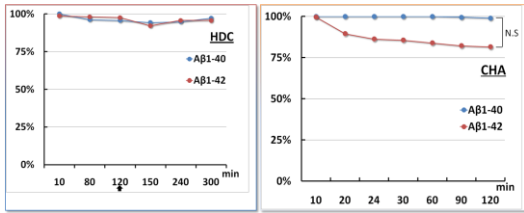


図 5. シングルパス評価における HDC および CHA カラムの Aβ 除去率の経時変化

③ HDC カラムを用いた透析患者での Aβ 除去率の検討

β 2mg 除去治療のために、透析器とともに HDC をタンデムにつないで血液浄化を行っている患者の血液を解析したところ（図 6）、実際のヒト血液でも HDC カラムは、Aβ₁₋₄₀ および Aβ₁₋₄₂ を各々 50%、40% 程度除去でき、4 時間の施行中に大幅な性能低下は示さなかった（表 2）。

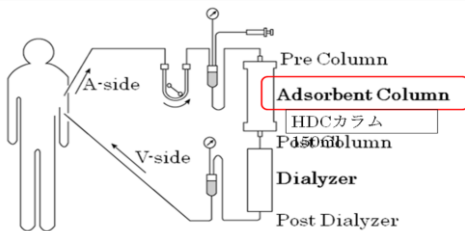


図 6. HDC カラムと透析器を用いた血液浄化療法

④ 吸着メカニズム

リガンドアルキル鎖長の異なるシリカ担体ビーズ、および、セルロース担体ビーズを用いて、表面疎水性と Aβ 除去率の関係を解析した。疎水性が高ければ高いほど Aβ 除去率が高いというわけではなく、疎水性の最適範囲が存在する事が示唆された。

表 2. ヒト臨床での HDC の Aβ 除去率

HDCカラム前後除去率	Aβ ₁₋₄₀	Aβ ₁₋₄₂
1時間値	51.1±6.6%	44.9±5.0%
4時間値	46.1±6.6%	38.2±5.8%

(2) 透析器(ダイアライザー)による Aβ 除去の検討

当初はアルツハイマー病の透析患者も含めて解析する事も考えていたが、アルツハイマー病を発症すると同意の取得が難しくなるとともに、血液透析そのものも容易ではなくなるため、認知機能が正常および軽度認知障害 (MCI) の透析患者を対象とした。

非糖尿病の透析患者 37 例を対象に、ダイアライザー前後および全身循環血中の Aβ 濃度変化を測定した（図 7）。

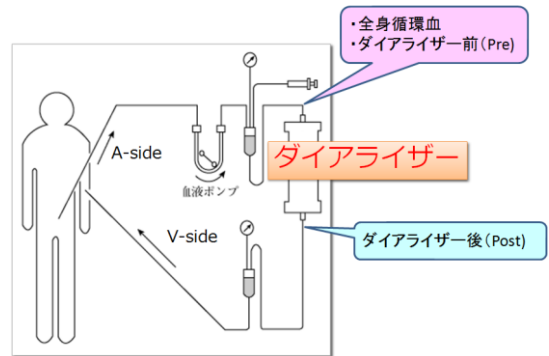


図 7. 透析患者の回路図と採血部位

① ダイアライザー前後の Aβ 除去率

ダイアライザーも HDC と同じく、65%前後の Aβ₁₋₄₀ および 50% 程度の Aβ₁₋₄₂ の除去率を示し、4 時間の透析施行中にはその性能低下はなかった（表 3）。Aβ₁₋₄₂ 除去率は Aβ₁₋₄₀ よりも有意に高かった。

表 3. 透析患者のダイアライザー前後の Aβ 除去率

	1hr	4hr	p-value 1hr vs 4hr
Aβ ₁₋₄₀	66.6±9.8%	63.9±14.4%	n.s.
Aβ ₁₋₄₂	51.4±9.8%	51.6±17.0%	n.s.
p-value Aβ ₁₋₄₀ vs Aβ ₁₋₄₂	p<0.0001	p=0.024	

② ダイアライザー中空糸の素材別の Aβ 除去率

ポリスルホン (PS f) 以外のダイアライザーを使用した症例数が少なかったため、素材別の比較は適切ではないと考えるが、セルローストリアセテート (CTA) に比べて PS f の Aβ₁₋₄₀ 及び Aβ₁₋₄₂ の除去率は有意に高かった。

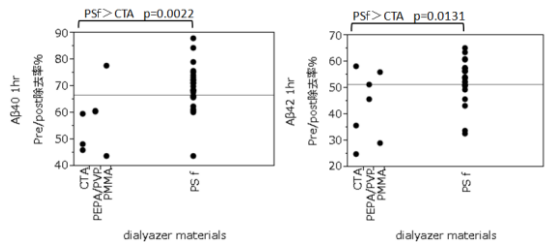


図 8. ダイアライザー素材別の Aβ 除去率

③ 透析患者の全身循環血漿中の Aβ 濃度変化

ダイアライザーの Aβ 除去能により全身循環血漿中の Aβ 濃度は低下した (図 9)。下記の微分方程式に基づく速度論的解析から (V: 血漿総量, Ct: 血漿中 Aβ 濃度, K: ダイアライザーによる 1 分間あたりの Aβ 除去量, INF: 血液外からの 1 分間あたりの Aβ 移行 (引抜) 量)、透析施行中は、血液浄化がトリガーとなって血液外組織から血液への Aβ 移行は著しく大きくなるが、透析施行終了とともに、血液外からの Aβ 移行はほぼ 1/100 に減少する事が示唆された。

$$V \times \frac{dCt}{dt} = -KCt + INF$$

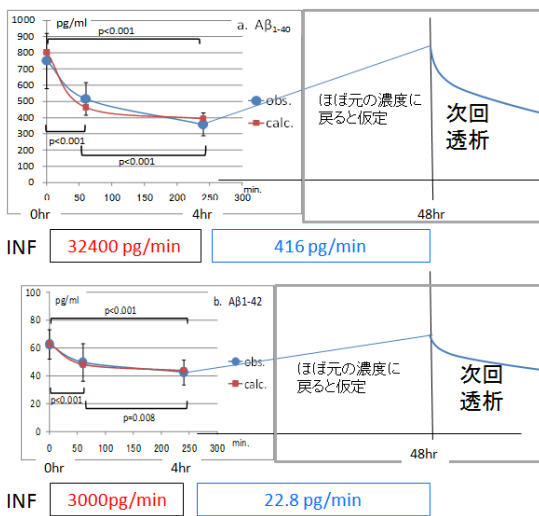


図 9. 透析患者の血中 Aβ 濃度の変化

④ 透析歴と血中 Aβ 濃度の関係

透析患者の血中 Aβ 濃度は、透析歴が増すに従って少なくとも増加することはない、Aβ₁₋₄₀ では、有意な減少傾向を示した (図 10)。これは、透析導入時には腎不全により血中 Aβ 濃度が著しく高くなるが、透析導入後は、4 時間×週 3 回の血液透析により、血液外組織も含めて Aβ が除去されていく結果と考えられる。

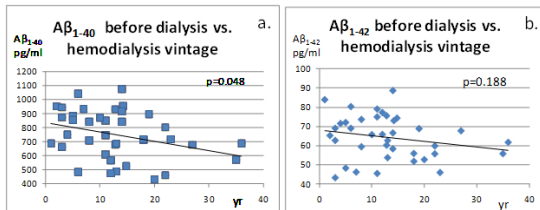


図 10. 透析歴と血中 Aβ 濃度の関係

⑤ 認知機能と Aβ 除去との関係

透析患者の血中 Aβ 濃度は、絶対値として

アルツハイマー病患者の数倍高く、アルツハイマー病発症リスクは高くなると考えられるが、MMSE で測定した認知機能は、透析患者においては認知機能と血中 Aβ 濃度は相関しなかった (図 11)。

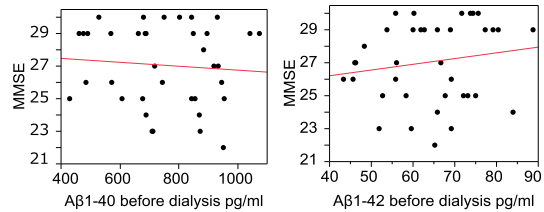


図 11. 血中 Aβ 濃度と認知機能 (MMSE) との関係

透析歴が長くなるにつれて、有意ではないものの認知機能が改善していく傾向があり (図 12 左)、MMSE が 24 以下を軽度認知障害 (MCI) とした場合に、認知機能正常と MCI の各群の透析歴を比較すると、MCI 群の方が有意に短かった (図 12 右)。

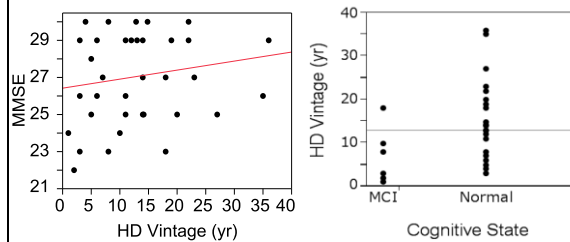


図 12. 透析歴と認知機能との関係

脳 CT の解析でも、血管病変や委縮の割には、透析患者の認知機能は正常に保たれていることが示され、Aβ 除去を含む血液浄化が認知機能改善に何らかの効果を与えている可能性が示唆された。

(3) ラットの体外循環システムの構築

HDC ミニカラムを Aβ 除去材とするラット用体外循環血液浄化システムを構築した。このシステムを用いてラット血液中の Aβ が効率よく除去されることを確認したが、認知機能の評価までは至らなかった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Kitaguchi N., Kawaguchi K., 他 11 名. Reduction of Alzheimer's Disease Amyloid β in plasma by hemodialysis and its relation to cognitive functions. Blood Purification. 査読有、2011;32:57-62
- ② Kazunori Kawaguchi, Nobuya Kitaguchi, 他 6 名. Novel therapeutic approach for Alzheimer's Disease by removing amyloid β protein from the brain with

Extracorporeal Removal System. J Artif Organs. 査読有、2010;13:31-37.

③川口和紀、北口暢哉、杉山敏、Amyloid Beta-Protein (A β)除去システムの基本構成の創製、藤田学園医学会誌、査読有、2009;33:55-61.

〔学会発表〕(計9件)

①北口暢哉、血液からのA β 除去によるアルツハイマー病治療システム創製に向けて、ADの早期診断治療予防法開発研究会、2010年12月21日、名古屋

②川口和紀、中井滋 村上和隆 他6名、北口暢哉、血液透析患者と非透析腎不全患者の血中Amyloid Beta-Protein (A β)除去の検討、日本認知症学会、2010年11月5日、名古屋

③北口暢哉、血液からのA β 除去によるアルツハイマー病治療システム創製に向けて、CAMDセミナー、2010年8月3日、愛知県大府市 国立長寿医療研究センター

④Nobuya Kitaguchi, Kazunori Kawaguchi, 他9名、Therapeutic system for Alzheimer's Disease by blood purification with Extra-Corporeal A β Removal System (EARS): Reduction of plasma A β by hemodialysis、International Conference on Alzheimer's Disease (ICAD) 2010、2010年7月13日、Hawaii (Honolulu)

⑤川口和紀、北口暢哉、他8名、血液浄化によるアルツハイマー病治療システムの構築に向けて～吸着剤によるAmyloid Beta蛋白(A β)除去の検討、医工学治療学会、2010年4月3日、東京

⑥川口和紀、北口暢哉、他8名、血液浄化による新規アルツハイマー病治療法の開発にむけて～血中Amyloid Beta-Protein (A β)除去の検討～、日本認知症学会、2009年11月20日、仙台

⑦Kazunori Kawaguchi, Nobuya Kitaguchi, 他5名、Toward the novel method of treatment for Alzheimer's Disease; Extra-Corporeal A β Removal System (EARS)、International Conference on Alzheimer's Disease (ICAD) 2009、2009年7月14日、ウィーン

⑧川口和紀、北口暢哉、杉山敏、血液浄化によるアルツハイマー病アミロイド β 蛋白(A β)除去システムの検討、医工学治療学会、2009年4月11日、大阪

⑨川口和紀、北口暢哉、杉山敏、Amyloid Beta-Protein (A β)除去システムの検討、医工学治療学会、2009年4月12日、大阪

〔産業財産権〕

○出願状況(計3件)

①名称:中空糸材料を用いた血中A β 除去シ

ステム

発明者:北口暢哉 川口和紀

権利者:学校法人藤田学園、旭化成株式会社
種類:特許

番号:US provisional Application No 61/344,376;

出願年月日:2010年7月8日

国内外の別:国外

②名称:A β 除去材、A β 除去器及びA β 除去システム

発明者:北口暢哉 川口和紀

権利者:学校法人藤田学園、(株)カネカ

種類:特許

番号:PCT/J P 2 0 0 9 / 0 0 7 0 5 1

出願年月日:2009年12月21日

国内外の別:国外

③名称:A β 除去材、A β 除去器及びA β 除去システム

発明者:北口暢哉 川口和紀

権利者:学校法人藤田学園

種類:特許

番号:特願2008-326174

出願年月日:2008年12月22日

国内外の別:国内

○取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

北口 暢哉 (KITAGUCHI NOBUYA)

藤田保健衛生大学・医療科学部・教授
研究者番号:70508077

(2)研究分担者:なし

(3)連携研究者

川口 和紀 (KAWAGUCHI KAZUNORI)

藤田保健衛生大学・医療科学部・助教
研究者番号:00508468

(4)主な研究協力者

①藤田保健衛生大学・医療科学部
中井滋教授 堀秀生助教

②藤田保健衛生大学・医学部・腎内科
杉山敏 教授、湯澤由紀夫 教授
村上和隆 講師

③藤田保健衛生大学・医学部・神経内科
武藤多津郎教授、伊藤信二准教授

④生寿会 かわな病院
島野泰暢前副院長、石田治副院長

⑤知立クリニック
鈴木信夫 院長

⑥大阪府立大学大学院・工学研究科
竹内雅人 准教授