

機関番号：12102
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20590987
 研究課題名（和文） 水晶体におけるアミロイドβ蛋白の解析と認知機能との相関に関する研究
 研究課題名（英文） Analyses of amyloid protein in lens in correlation with cognitive function
 研究代表者：玉岡 晃 (TAMAOKA AKIRA)
 筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授
 研究者番号：50192183

研究成果の概要（和文）：アルツハイマー病（Alzheimer's disease; AD）患者の剖検水晶体におけるアミロイドβ蛋白（Aβ）の蓄積が報告されたが、白内障手術検体を含め水晶体中のAβの定量法は未確立である。本研究では非認知症患者における白内障水晶体中のAβの抽出方法およびELISAによる定量化を検討した結果、認知症を伴わない白内障患者において、水晶体中にAβ x-42が少量ながら蓄積し、白内障の増悪に伴って増加している事が確認された。

研究成果の概要（英文）：In this investigation, we performed to extract amyloid β protein (Aβ) in lens tissues obtained from cataract patients without dementia, and to measure Aβ by enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs), revealing that Aβ x-42 was deposited in lens in a small amount and increased in parallel with severity of cataract.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：神経内科学，神経生化学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：アルツハイマー病，アミロイドβ蛋白，水晶体，白内障，認知症，αBクリスタリン

1. 研究開始当初の背景

(1) 高齢化社会と認知症

我が国は既に高齢化社会に突入し、認知症の患者数も増加しつつある。2005年の厚生労働省調査結果では、血管性及び詳細不明の認知症患者数は14万5千人、アルツハイマー病

(Alzheimer's Disease; AD) 患者数は17万6千人である。認知症は、治療に加えて介護の費用や労力を多く必要とするため、経済的・人的負担が大きい。認知症に対する早期診断、治療法などの開発が望まれている。

(2)アルツハイマー病

ADは、認知症の原因として最も高頻度にみられる神経変性疾患の一つである。

その臨床症状は、学習や想起における進行性の高度の記憶障害であり、また計算力の低下や失語、失行、失認、実行機能障害などの大脳高次機能障害がみられる。画像検査所見では、進行性のびまん性の脳萎縮がみられ、臨床症状に対応して、特に側頭葉（海馬）や頭頂葉に顕著に現れる。

神経病理学的には、大脳皮質の老人斑と呼ばれる細胞外アミロイド沈着と、神経細胞内の神経原線維変化により特徴づけられ（Figure 1）、顕著な神経細胞脱落とグリオーシスもみられる（Table 1）。電子顕微鏡レベルでは、老人斑には直径 5-20 nm のアミロイド細線維の沈着が見られ、神経原線維変化は直径 10 nm の paired helical filament (PHF) からなる²⁾。

生化学的には、老人斑アミロイドの主要構成成分はアミロイド β 蛋白 (Amyloid β ; A β) であり³⁾、PHF の主要構成成分はタウ蛋白である。神経原線維変化は様々な神経変性疾患等で見られるのに対し、老人斑は AD に特徴的である。

(3)A β

A β は 38~43 アミノ酸残基からなる約 4 kDa のペプチドであり、I 型 1 回膜貫通タンパクである Amyloid Precursor Protein (APP) から、 β -並びに γ -セクレターゼと呼ばれる酵素により、生理的に順次切りだされ分泌される。主要な β -セクレターゼとして β -site APP cleaving enzyme 1 (BACE1) が同定され、 γ -セクレターゼは presenilin-1 (PS-1) を活性中心に持つ蛋白複合体であることが明らかにされている。 γ -セクレターゼによる APP の切断部位は複数あり、40 アミノ酸残基からなる A β (1-40) と 42 アミノ酸残基からなる A β (1-42) が主要な分子種であり、その産生比率は約 10 対 1 である。AD 脳に蓄積した A β の N-並びに C-末端は不均一であり、N-末端は A β 産生後、様々な翻訳後修飾や切断を受けている。

A β は非常に重合しやすく、その重合性は N-、C-末端の不均一性や A β 配列内のアミノ酸残基の修飾により大きく影響を受ける。A β (x-40) の C-末端側に疎水性アミノ酸残基 2 残基、イソロイシン (Ile) とアラニン (Ala) が付加された A β (x-42) は、より重合性が増し、AD 脳にも先ず A β (x-42) が沈着し、続いて A β (x-40) が沈着する。特に A β (x-42) の AD 発症における重要性は、分子遺伝学的研究や、ヒト脳の免疫組織・生化学的検討、動物モデルの検討等から確立されている。

AD 脳では A β はさらに高度に重合して線維化し、アミロイド細線維を形成する。一旦アミ

ロイド細線維が形成されてしまうと、これは生化学的に非常に安定で難溶性である。アミロイド細線維は Sodium dodecyl sulfate (SDS) や尿素では可溶性は困難で、ギ酸でのみ溶解することができる。そのため、形成されたアミロイド細線維は代謝されずに蓄積され組織に沈着する。

A β が上述の一連の神経病理学的変化を引き起こし、AD を発症させる上で重要な役割を果たすことは、これまでの様々な研究から確立されている（アミロイド仮説）。しかし、A β の蓄積や沈着の機序並びに A β が神経毒性を発揮する機序は不明である。これまでに AD に対する抗 A β 免疫療法をはじめとする抗 A β 療法が遺伝子改変モデル動物では有効であることが明らかにされてきたが、米国における治験の結果では、実際の AD 患者に対する抗 A β 免疫療法では老人斑除去には成功したものの認知症の進行を抑制することができなかった。実際の AD 患者においては、その病理変化が進展した後に治療を開始したのでは既に手遅れであり、早期診断、早期治療が重要であることが示唆される。しかし、AD における A β の蓄積は中枢性（主に大脳皮質）であり、早期診断は困難である。

(4)アルツハイマー病の診断マーカー

AD の診断基準として DSM-IV や NINCDS-ADRDA が用いられる。診断の要点は、①記憶障害と、前頭葉～側頭・頭頂葉の障害を反映した何らかの高次機能障害を中心とした認知機能障害があり、“AD らしい”機能障害のパターンを示していること、②それが社会的障害を引き起こすほど顕著であって認知症といえる程度に至っていること、③その原因として、他の認知症や意識障害などが除外できること、の 3 点である。神経心理学的評価には、mini-mental state examination (MMSE) や Wechsler memory scale-revised (WMS-R) などが用いられる。さらに、画像診断として computed tomography (CT)、magnetic resonance imaging (MRI) や single photon emission computed tomography (SPECT)、positron emission tomography (PET) を用いて脳の萎縮の有無と部位、その程度や脳血流代謝の低下の有無、その分布を評価する。診断の確定には死後の剖検が必要であり、生化学的な病態を反映した、客観的な生物学的診断マーカーの確立が必要とされている。

その神経病理学的な AD 特異性から、A β は診断マーカーの重要な候補の一つとして期待される。A β は年齢にかかわらず脳脊髄液 (cerebrospinal fluid; CSF) や血漿中にも存在し、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) で測定は可能である。これまでに一部の家族性 AD では血漿中の A β (1-40)、

A β (1-42)双方の増加 (APP Sweden 変異), 或いは A β (1-42)の選択的増加 (APP London 変異や PS-1/PS-2 の変異等) が知られている. しかしながら, A β 量はもともと個人差が大きく, AD と非 AD でのオーバーラップが大きい. AD の大半を占める孤発性 AD においては, 血漿中の A β 量には変化がない, A β (1-42)/A β (1-40)比が増加または減少する, など一定した見解が得られておらず, 現在のところ AD の診断マーカーとして使用することができない.

また, CSF 中の A β は, A β (1-42)/A β (1-40)比或いは A β (1-42)の低下が A β の脳への沈着を反映するとされ, さらに CSF 中の総タウ蛋白と A β 比の積 {AD index: t-tau \times A β (1-40)/A β (1-42)}は AD で有意に上昇するなどの報告があり, これらが主要な診断マーカーとして注目されているが, 診断感度, 特異度ともに 90%に満たず不十分である.

(5)アルツハイマー病と白内障

老人性白内障は, AD と同様に加齢を高リスク因子とし, 水晶体を形成している水溶性タンパクの α B-クリスタリンが重合し, 立体構造が変化する事で, 水晶体の透明性を著しく低下させ散乱光強度を増加させる. 白内障の治療では, 手術が一般的であり, 通常は, 水晶体の前囊を切開後, 超音波で水晶体皮質や核内の白内障部位を破碎・吸引し, 新たに眼内レンズをはめ込むというものである. 破碎・吸引された水晶体は通常は廃棄される.

これまで AD における A β の蓄積は中枢神経系に起こるとされていたが, Goldstein らは, AD 患者の剖検検体より摘出した水晶体から A β を検出したと報告した. 加齢性の白内障における変化は, 水晶体の皮質や核, 後囊下に強いが, AD 患者においては核上性白内障がみられるとの報告も存在する. 加齢性の白内障やその他の様々な白内障で A β が沈着するかは不明である.

2. 研究の目的

本研究では, AD の診断マーカーとして, 白内障水晶体中の A β に着目し, 水晶体における A β の解析と認知機能との関連の検討を目的とした. もし認知症が顕在化するより以前に白内障の水晶体に A β が蓄積するならば, 白内障手術の際に, 通常であれば吸引後廃棄していた白濁化した水晶体を回収し, それに含まれる A β を定量することで, AD の早期診断ができる可能性がある. 本研究では, まずは非 AD 患者 (非認知症患者) の白内障手術で得られた, 水晶体中の A β の抽出方法および定量化の検討を試み, 白内障の進展度や年齢との関連の有無につき解析を行った.

3. 研究の方法

通常の内視鏡手術時に破碎後, 患者の眼から吸引・回収された水晶体 (N=86) から A β を可溶性の異なる各種溶液 (TBS, 1% Triton X 100, ギ酸) を用いて連続的に抽出し, ELISA 法にて A β 量を測定した. 検出された A β の確認のためウエスタンブロッティングも行った. また, 白内障手術時の超音波破碎物の回収条件により A β の回収率が低下する可能性も考えられたため, 回収率を向上させる目的で全眼摘出標本の水晶体を用いて回収直後の遠心条件についても検討を行った.

(倫理面への配慮)

筑波大学大学院人間総合科学研究科医の倫理委員会 (通知番号: 第 564 号, 課題名: 白内障手術で除去した水晶体に含まれるアミロイドベータ蛋白の検出・測定 の研究) において承認を受けた.

4. 研究成果

(1)白内障グレードと A β (42)

今回検討した ELISA の結果では, A β (x-40) は最小感度 (1.0 pmol/l) 以下であり, A β (x-42) もそのほとんどが 1.0 pmol/l 以下の低値であった (A β (x-42) の最小感度は 0.1 pmol/l). しかしながら A β (x-42) の結果を分析すると, 性別では特に差はみられなかったものの, 年齢および白内障グレード LOCS III 分類での分析では, 年齢が上昇するにつれ A β (x-42) 量が増加する傾向がみられ, また白内障のグレードが上昇するにつれ, A β (x-42) は有意に増加した. 年齢による比較では, 50 歳以下の 3 検体で若干高めの傾向にあったが, この 3 検体はいずれも 30 歳代の患者由来であり, 老年性白内障とは, 発症原理が異なっているためと思われる. 今回はいずれも非 AD 患者の水晶体であったが, 白内障グレードが上昇するにつれ A β 量が増加していた. ヒト脳では, 40 歳代から主に A β (x-42) から成る非線維性のびまん性老人斑が出現し, A β の蓄積と沈着が始まるとされる. 脳と同様に, 水晶体でも認知症の顕在化以前より加齢とともに A β , 特に A β (x-42) が蓄積する可能性が考えられた.

白内障のグレード分類に用いた LOCS III は, 水晶体中の核の濁り (Nuclear opalescence; NO) や色 (Nuclear color; NC), 皮質性 (Cortical; C), 後囊性 (Posterior subcapsular; P) などについてそれぞれ 1~6 段階に評価するものである. 今回分類に用いた NO は, 核の乳白濁の濃さを指標としたものである. 乳白濁が濃くなるにつれ, 硬さも増し, タンパクの構造変化がより強くなるものと思われる. 脳とは異なり, 白内障の水晶体における A β の蓄積は α B-クリスタリンなど他の蛋白の構造変化に伴うことが示唆された.

α B-クリスタリンは、元来は水晶体中のタンパクであるが、脳を含む生体内の多くの場所にも発現している。熱ショックタンパクの一つであり、通常は分子内シャペロンとして、タンパクの構造を維持する働きを持つ。しかし、 $A\beta$ と共存している場合は、 $A\beta$ の構造を変化させ、さらには $A\beta$ の神経毒性を高めるとされている。ギ酸は、通常は共有結合以外のタンパク同士の結合を乖離させるためギ酸抽出液内では $A\beta$ と α B-クリスタリンの結合は確認することができないが、水晶体内では、 $A\beta$ は α B-クリスタリンと相互作用の上存在している可能性がある。

(2)ウエスタンブロッティングと ELISA での感度の違い

ELISA における $A\beta$ (x-40), $A\beta$ (x-42) はごく低値であり、 $A\beta$ (x-40) はほとんどが感度以下であった。しかしながら、抗 $A\beta$ (1-42) 抗体を用いた WB の結果では、ELISA の結果に比べてはるかに多量 (100 倍程度) の $A\beta$ (x-42) 量が確認された。Goldstein らの報告でも、尿素抽出試料の WB で、大量の $A\beta$ を検出し、デンストメトリーを用いた結果、その量について AD 患者で $0.4 \sim 6.17 \mu\text{g/g protein}$, 非 AD 患者で $0.52 \sim 0.98 \mu\text{g/g protein}$ と報告している¹⁹⁾。この量は、本検討での抗 $A\beta$ (1-42) 抗体を用いたウエスタンブロッティングの結果と比較しうる量である。

一方、尿素抽出とギ酸抽出との比較では、WB でも ELISA でも明らかな差を認めなかった。したがって、Goldstein らの報告した $A\beta$ の量と本検討での ELISA による $A\beta$ の量との違いは、抽出法によるものではなくむしろ定量法の違いによるものであると言える。ギ酸抽出物に合成 $A\beta$ ペプチドを添加した後、ELISA や IP-WB を行ったが、添加した $A\beta$ の検出は阻害されず、塩や未知の阻害物質の影響は少ないと考えられた (データ非記載)。

また、WB の結果より、水晶体に含まれる $A\beta$ は、単量体よりはむしろ、重合した二量体が多く含まれていると思われた。本 ELISA 系は微量の血液や髄液中の $A\beta$ を測定するために広く使用され、確立されたものであるが、測定できる $A\beta$ は主に単量体であることが知られている。水晶体 $A\beta$ は、ELISA では検出しにくく、WB とは異なる結果が出たものと考えられる。

さらに今回用いた ELISA 系は、 $A\beta$ (x-40), $A\beta$ (x-42) 検出系とも固相抗体に BNT77 ($A\beta$ 11-28 認識) を使用している。従って、水晶体 $A\beta$ では 11-28 位で後述のように立体構造が変化したものが多く、固相抗体との反応が悪かった可能性がある。同様の抗体のエピトープによる違いは、WB でも生じていた可能性がある。

(3) $A\beta$ の立体構造変化・翻訳後修飾

今回の検討では、ウエスタンブロットにおける一次抗体としてまず、脳のアミロイド検出に通常使用される事の多い 4G8 と 6E10 の抗体を使用した。しかしながら、水晶体サンプルの場合は感度が悪く、濃縮水晶体サンプルでも薄いシグナルが確認出来るのみであった。抗 $A\beta$ (1-42) 抗体を使用した場合は、明らかに反応が異なり、 $A\beta$ と思われる 8 kDa 付近のシグナルが確認できるようになった (Fig. 10, 11-b)。4G8 のエピトープは 18-22 位、6E10 のは 3-8 位であるが、抗 $A\beta$ (1-42) 抗体は C-末端断端特異的である (Figure 14)。4G8 や 6E10 のエピトープ或いはその近傍において蛋白老化などによる翻訳後修飾が生じ、エピトープの構造が変化している可能性がある。

翻訳後修飾を受けているアミノ酸残基としてまず挙げられるのは、23 位のアスパラギン酸 (Asp) 残基である。AD 脳では、蛋白老化によるラセミ化により 23 位の L-アスパラギン酸 (L 体) が D-アスパラギン酸 (D 体) に構造変化をしている報告がある。また、同部位のイソ化も知られている。同様に、6E10 についても、第 7 位に Asp 残基があり、同部位のイソ化やラセミ化が知られている。

今後 $A\beta$ N-末端側のピログルタミン酸化や断片化などを含め、 $A\beta$ 分子における翻訳後修飾や切断を、翻訳後修飾特異抗体を使用した WB や質量分析法等を用いて、水晶体と脳とで質的量的に比較検討する必要がある。白内障水晶体における主要な $A\beta$ 分子を同定するとともに、白内障水晶体において AD 特異的な $A\beta$ 分子の修飾が存在するか解明できるならば、その修飾を伴った $A\beta$ 分子特異的な ELISA 系による検討が可能となる。また、以上のような検討は、AD の早期診断のために水晶体 $A\beta$ の定量が有用であるか否かを解析するために重要となるであろう。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

① Tamaoka A, Arai M, Itokawa M, Arai T, Hasegawa M, Tsuchiya K, Takuma H, Tsuji H, Ishii A, Watanabe M, Takahashi Y, Goto J, Tsuji S, and Akiyama H, TDP-43 M337V Mutation in Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis in Japan, Intern Med, 49, 2010, pp. 331-4, Epub 査読有

② Oda A, Tamaoka A, Araki W, Oxidative stress up-regulates presenilin 1 in lipid

rafts in neuronal cells, J Neurosci Res, 85, 2010, pp. 1137-114 査読有

③ Tomidokoro Y, Tamaoka A, Holton JL, Lashley T, Frangione B, Revesz T, Rostagno A, Ghiso J, Pyroglutamate formation at the N-termini of ABri molecules in familial British dementia is not restricted to the central nervous system, Hirosaki Igaku, 61(Suppl), 2010, S262-S269. 査読有

〔学会発表〕(計20件)

①赤松 恵, 富所 康志, 加治 優一, 大鹿 哲郎, 玉岡 晃, 白内障晶体におけるアミロイドβペプチドの定量化の可能性—非認知症患者検体での検討, 第29回日本認知症学会学術集会(名古屋), 11月5日, 2010

②赤松 恵, 富所康志, 加治優一, 大鹿哲郎, 玉岡 晃, 認知症を伴わない白内障患者の水晶体におけるアミロイドβペプチドの解析, 第51回日本神経学会総会(東京), 5月21日, 2010

〔図書〕(計10件)

①玉岡 晃, アルツハイマー病・認知症. 病気と薬 パーフェクトブック2010, 横田千津子, 池田宇一, 大越教夫監修・編集, 南山堂(東京), 2010, pp868-873.

②Reiko Koide and Akira Tamaoka, Body image deviation in chronic schizophrenia: new research. In Adolescent Schizophrenia, ed by James T. Nillinghouse, Robert P. Trotman, Nova Biomedical Books, N.Y., 2009, pp81-139.

〔その他〕

ホームページ等

http://www.md.tsukuba.ac.jp/chs/clinical_sciences/tamaoka.htm

6. 研究組織

(1) 研究代表者

玉岡 晃 (TAMAOKA AKIRA)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授

研究者番号：50192183

(2) 研究分担者

富所 康志 (TOMIDOKORO YASUSHI)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師

研究者番号：80447250