

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月28日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791134

研究課題名（和文）レビー小体型認知症における診断マーカー

研究課題名（英文）Biomarker for diagnosis of Dementia with Lewy bodies.

## 研究代表者

小林 清樹 (KOBAYASHI SEIJU)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：50569035

## 研究成果の概要（和文）：

アポリポ蛋白E(ApoE)をコードする対立遺伝子  $\epsilon$  4allele は、アルツハイマー病(AD)では高率に見出され、AD の危険因子であることが明らかになっている。一方、レビー小体型認知症(DLB)においても  $\epsilon$  4allele の頻度が高いことが剖検研究において報告されている。しかし臨床診断例のDLBを対象とした報告は少ない。そこでDLB およびADと臨床診断された症例、normal controlを対象にApoE4キャリアーと $\epsilon$  4alleleの頻度を調べた。normal control群では、ApoE4キャリアーは18.3%、 $\epsilon$  4allele 頻度が9.7%であった。Late onset AD(LOAD)群ではApoE4キャリアーは47%、 $\epsilon$  4allele 頻度が27%であった。Early onset AD(EOAD)群ではApoE4キャリアーは50%、 $\epsilon$  4allele 頻度が31%であった。DLB群ではApoE4キャリアーは42%、 $\epsilon$  4allele 頻度が24%であった。これまで報告されているLOAD,EOAD剖検例のApoE4キャリアーは47%から59%、 $\epsilon$  4allele 頻度は27%から37%で、今回の結果は剖検研究の結果に近い頻度を示していた。一方、DLBについては報告数は少なく、剖検例ではApoE4キャリアーは35%から65%、 $\epsilon$  4allele は19%から36%と幅がある。臨床からの報告は、ほとんどなく、かつ剖検例での報告と結果に乖離がある。今回の我々の結果は、剖検例の頻度に近くDLBにおいても $\epsilon$  4allele はADと同様に危険因子であることが臨床的にも確認された。

## 研究成果の概要（英文）：

The apolipoprotein E (APOE)  $\epsilon$ 4 allele has been reported to be a risk factor for Alzheimer's disease (AD) and dementia with Lewy bodies (DLB). Previous neuropathological studies have demonstrated similar frequencies of the APOE  $\epsilon$ 4 allele in AD and DLB. However, the few ante-mortem studies on APOE allele frequencies in DLB have shown lower frequencies than post-mortem studies. One reason for this may be inaccuracy of diagnosis. We examined APOE genotypes in subjects with AD, DLB, and a control group using the latest diagnostic criteria and MRI, SPECT, and MIBG myocardial scintigraphy. The rate of APOE4 carrier status was 18.3% and the frequency of the  $\epsilon$ 4 allele was 9.7% in controls. The rate of APOE4 carrier status and the frequency of the  $\epsilon$ 4 allele were 47% and 27% for LOAD, 50% and 31% for EOAD, and 42% and 31% for DLB, respectively. The APOE4 genotypes in this study are consistent with previous neuropathological studies suggesting accurate diagnosis of AD and DLB. APOE4 genotypes were similar in AD and DLB, giving further evidence that the  $\epsilon$ 4 allele is a risk factor for both disorders.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：老年精神医学・認知症

1. 研究開始当初の背景

DLBは、老年期の変性性認知症ではアルツハイマー型認知症(AD)に次いで頻度が高いと言われており、病理診断による頻度は、認知症の15～25%程度と報告されている。診断基準としては、第1回DLB国際ワークショップの報告として出版されたものがこれまで用いられていたが、この診断基準では特異度は95～100%と高いが、感度は22～83%とばらつきがあり、感度が低く、DLBが他の認知症性疾患と誤診されていることが問題となっていた。DLBを見逃して精神症状に対し、安易に抗精神病薬を投与すると、急速に臨床症状を悪化させ、ときに生命に影響を及ぼすような重篤な副作用が出現する。このように治療、介護、予後の点からも少しでも見逃しを少なく診断精度を上げることは大きな臨床的意義がある。この点を鑑み、第3回DLB/PDD国際ワークショップにおいて診断基準が一部改定され2005年のNeurology誌に発表されたものが最新の診断基準となっている(McKeith IG et al.Neurology,2005)。画像診断がDLBと他の認知症を鑑別する上で有用であることが、この最新の診断基準でも認められている。診断基準の支持症状(supportive features)の「機能画像で後頭葉の取り込み低下」「MIBGシンチの取り込みの低下」に

ついては、その感度・特異度の高さを我々も報告してきた。特にMIBGシンチについては、2006年の第4回国際ワークショップで、最重要項目に匹敵する示唆症状(suggestive features)にレベルアップすべきであるという意見が日本の研究者を中心に出たが、「まだエビデンスが少ない、日本以外の欧米では行っていない検査なのでより多くの関連した知見・データが必要」という理由等でsupportive featuresに留まっている。我々は、このような臨床診断基準の改訂に向けた日本人の取り組み・情熱に賛同し、少しでも多くのデータを日本から海外に発信したいと思い、研究・報告をしてきた。

DLBは、日本人(小阪)が世界で初めて発見した疾患であり、第2回DLB研究会でもオーガナイザーの小阪より我々は招待され、MIBGシンチを中心とした報告活動を行ってきた(小林清樹,他:2008.11.1,横浜)。2009.11.7の第3回DLB研究会でも同様に依頼があり、発表を行った。また、国際学会13th International Psychogeriatric Association(IPA)でも、診断基準主任研究者であるMcKeith,小阪がオーガナイズしたDLBシンポジウムにてOral Presentationを依頼され同様な報告を行った。MIBGシンチの臨床診断基準における重要度をさらに高めようとする動きがあるが、統一され

た撮像プロトコールは存在しないため、撮像手技の標準化が必須である。使用するコリメーターにより、数値データに大きな違いが生じる。我々は同一対象に複数の撮像方法(異なるコリメーターの使用etc)でMIBGシンチを施行することにより撮像方法の標準化を目指す。また、MIBGシンチの感度・特異度という点での診断精度についてのみならず、様々な臨床症状、その他のバイオマーカーとの関連性についても調べて明らかにすることも大切である。臨床症状については、起立性低血圧(OH)が有る群は無い群に比べ有意に心臓MIBG集積が低下しており、DLBの自律神経症状との関連が示唆される結果を出した。バイオマーカーについては、ApoEに注目し、調査する。

そのApoEは、脳内コレステロール代謝を担う主要な蛋白であり、神経細胞の維持や修復に重要な役割を果たしている。ApoEは3種の対立遺伝子 allele( $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$ ,  $\epsilon 4$ )がコードしており、E2・E3・E4のアイソフォームがある。その中でもE4は細胞傷害性に働く(老人斑形成やアポトーシス、神経原繊維変化などに関与)。1993年、ApoE4が晩発性家族性ADの危険因子であると発表され、その後も相次いで孤発例ADにおいてもApoE4の頻度が高率であることが報告され、最大の危険因子であるとされている(Sounders AM et al.Neurology,1993)。一方、ApoE4は、ADばかりではなくDLBにおいても高率であることが報告されている(Arai H et al.Lancet,1994)。しかし、現行のDLB診断基準(2005)が作成された後の研究・データの蓄積は皆無であり、バイオマーカーとして十分臨床応用されていない。また、DLBにおけるApoEの genotype と臨床症状・画像検査(SPECT, MIBGシンチ)との関連性については報告はなく、さらなる研究が必須である。特にMIBGシンチは、先に述べたように様々な側面からの知見・データの蓄積が必要であ

る。

## 2. 研究の目的

アポリポ蛋白E (ApoE)をコードする対立遺伝子  $\epsilon 4$ allele は、アルツハイマー病(AD)では高率に見出され、ADの危険因子であることが明らかになっている。一方、レビー小体型認知症(DLB)においても  $\epsilon 4$ allele の頻度が高いことが剖検研究において報告されている。しかし臨床診断例のDLBを対象とした報告は少ない。そこでDLBおよびADと臨床診断された症例を対象にApoE4キャリアーと  $\epsilon 4$ allele の頻度を調べた。

## 3. 研究の方法

### (1) 対象

ADについては、NINCDS-ADRDAの診断基準で、probable ADと診断された145例。65歳を超える発症をLate onset AD(LOAD)、65歳以下の発症をEarly onset AD(EOAD)とした。LOAD129例(平均年齢  $79.1 \pm 4.9$  歳、男女比 44 : 85)、EOAD16例(平均年齢  $63.1 \pm 5.0$  歳、男女比 7 : 9)。診断基準を満たす臨床症状と、頭部MRIで海馬傍回や頭頂葉の萎縮、もしくは脳SPECTで同部位あるいは帯状回後部の低下を満たす症例に絞った。

DLBについては、改定版臨床診断基準ガイドライン(2005年)でprobable DLBの基準を満たす50例(平均年齢  $79.1 \pm 4.9$  歳、男女比 15 : 35)。診断基準を満たし、かつ脳SPECTで後頭葉の低下、MIBGシンチで心臓縦隔比後期像(dH/M比)が1.83以下の画像所見を認めた症例とした。

Normal controlについては、279例(平均年齢  $75.6 \pm 8.1$  歳、男女比 113 : 166)を対象とした。なお本研究については本人あるいは家族に研究の主旨・内容を説明して書

面にて同意を得た。また、遺伝子研究であることから、倫理面には最新の注意を払うべく、札幌医科大学の倫理委員会にて承認を得た。

## (2) 方法

本研究では、産生される DNA 断片の大きさからゲル ApoE タイプを決定した。静脈より採血後、4℃で保存し、6時間以内に遠心により血漿を除き、血球分画の上部のbuffy coatを回収した。ゲノム DNA はキット (QIAamp DNA Blood Mini kit, Qiagen) で調製した。次に ApoE の一部分をコードする DNA (センスプライマー: ACAGAATTCGCCCGGCCTGGTACAC ; アンチセンスプライマー: TAAGCTTGGCACGGCTGT CCAAGGCA) を PCR で増幅し、制限酵素 (Hha1) 処理を行い、電気泳動 (15% gel, SuperSep Ace, Wako) によって DNA バンドを分離し、出現したバンドから ApoE タイプを決定した。

その上で、AD145 例、DLB50 例、normal control 279 例の ApoE4 キャリアーと ε 4 allele の頻度について調べた。

## 4. 研究成果

normal control 群では、ApoE4 キャリアーは 18.3%、ε 4 allele 頻度が 9.7%であった。

LOAD 群では ApoE4 ヘテロが 52 例 (40.3%)、ApoE4 ホモが 9 例 (7.0%) で ApoE4 キャリアーは合計 47.3%であり、ε 4 allele 頻度が 27.1%であった。

EOAD 群では ApoE4 ヘテロが 6 例 (37.5%)、ApoE4 ホモが 2 例 (12.5%) で ApoE4 キャリアーは合計 50%であり、ε 4 allele 頻度が 31.3%であった。

DLB 群では ApoE4 ヘテロが 18 例 (36%)、ApoE4 ホモが 3 例 (6%) で

ApoE4 キャリアーは合計 42%であり、ε 4 allele 頻度が 24%であった。

これまでの LOAD 剖検例からの報告による ApoE4 キャリアーの頻度は、47~59%、ε 4 allele 頻度は 27~37%、また臨床例からの報告による ApoE4 キャリアーの頻度は 40~59%、ε 4 allele 頻度は 24~31%と、いずれも高率である。その他、AD の報告は剖検例・臨床例ともに多いが、その多くが EOAD と LOAD を区別してせず、合算した値となっている。結果は、区別した場合と大きくは変わらないようであるが、EOAD は LOAD と比べて、遺伝学的背景が異なる、進行が早い、言語機能や視覚認知機能がより強く障害されるなどの報告があり、両者を区別するべきだと思われる。また、NINCDS-ADRDA の診断基準では研究を目的とする場合 65 歳以前、65 歳を超える発症でサブタイプに分けるべきとされている。

今回の我々の研究では、LOAD と EOAD を区別した。LOAD 群では ApoE4 ヘテロが 52 例 (40.3%) ApoE4 ホモが 9 例 (7%) で ApoE4 キャリアーは合計 47.3%、ε 4 allele 頻度が 27.1%であり、やはり高率であった。

EOAD については、報告が少ないが、剖検例のみからの報告では、ApoE4 キャリアーの頻度は 52~57%、ε 4 allele 頻度は 35%前後である。Okuzumi らの臨床例 33 例+剖検例 11 例からの報告による ApoE4 キャリアーの頻度は 58%、ε 4 allele 頻度は 30%と、いずれも高率である。臨床例からの報告は、Kawamata et al によれば、ApoE4 キャリアー頻度は 7%、ε 4 allele 頻度は 4%である。一方、Dai et al によれば、ApoE4 キャリアー頻度は 72%、ε 4 allele 頻度は 43%である。このように、極

端に低い、もしくは高い結果である。今回の我々の研究も、臨床例からであるが、EOAD 群では ApoE キャリアーは 8 例 (50%)、 $\epsilon$  4allele 頻度が 31.3%であり、やはり高率であり、剖検例に近似していた。嶋田らの報告も近似している。

一方、DLB においても ApoE4 の頻度が高いという報告がある。Arai らの報告は、剖検を施行できた症例に限っているので 10 例と少ないが、我が国における貴重なデータである。この報告の結果を裏付ける理由は、DLB 患者にも AD 病変が見られることが多々あることが関係していると思われる。実際、Kawanishi らは DLB の剖検脳において、AD 脳でみられる老人斑が出現することを報告している。また、DLB の通常型や AD 型では (AD 病変が混在するので) ApoE4 が危険因子であることが明らかにされている。

その後、Galasko et al、Harrington et al、Singleton et al、Akatsu et al が、より多くの剖検例で調査しており、ApoE4 キャリアーの頻度は 35~65%、 $\epsilon$  4allele 頻度は 19~36%である。

一方、DLB での臨床例での報告は極めて少ない。谷向らは、ある研究報告書の中で DLB68 例における  $\epsilon$  4allele が 28.1%と記載しているが、「AD バイオマーカーの研究報告書」のためか、DLB の診断基準や患者背景など詳細な記載がない。DLB の ApoE4 キャリアーと  $\epsilon$  4allele 頻度を臨床から報告しているものとして、我々が調べる限り、Engelborghs.S et al のベルギーからの報告、Carrillo G et al のスペインからの報告の二つがあった。それぞれ、ApoE4 キャリアーの頻度は 28.5%と 27.6%、 $\epsilon$  4allele 頻度は 18%と 16.4%であり、剖検例に比べて頻度は低い。今回の我々の研究

では、ApoE4 キャリアーの頻度は 42%、 $\epsilon$  4allele 頻度は 24%と剖検例のものに近似していた。このことは脳 SPECT や MIBG シンチの画像検査を加えた臨床診断がその精度を高めていると思われた。特に MIBG シンチの診断精度は、極めて高いことが報告されており、この検査を取り入れた DLB 臨床診断は剖検に匹敵すると言っても過言ではない。2005 年に改訂された DLB 診断基準でも、MIBG シンチの診断妥当性が取り入れられている。ApoE 研究は、世界的にコンセンサスの得られた DLB 診断基準(1996)が作成される前に行われていた。その後、正確な診断に焦点を当て、さらに改訂された現行の診断基準(2005)作成後に、その内容を十分加味した上で、我々は研究を行ったという見地からも、本研究は貴重であると思われた。

今後も、国内外から多くの報告が出ることを期待される。また、ApoE genotype の各割合は民族によって異なると言われているので、特に国内からも、さらに報告が欲しいところである。本研究の limitation としては、剖検は行っていないので、診断については絶対的なものではないということである。しかし、詳細な問診、心理検査、画像検査を行い典型的な AD や DLB に絞った。特に MIBG シンチも組み合わせたことで、より正確な臨床診断ができたと考える。今後さらに症例数を増やして検討を行いたい。

## 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 4 件)

- ① **Kobayashi S**, Tateno M, Park TW, Utsumi K, Sohma H, Ito YM, Kokai Y, Saito T. Apolipoprotein E4 frequencies in a Japanese population

with Alzheimer's disease and dementia with lewy bodies.

(査読有) PLoS One. 6(4):e18569,2011  
doi:10.1371/journal.pone.0018569

- ② **小林清樹**, 齊藤正樹, 館農勝, 内海久美子, 古瀬勉, 森井秀俊, 齋藤利和: 石灰沈着を伴うびまん性神経原線維変化病(DNTC)が疑われた1例 最新の画像診断技術を用いた機能画像所見を含めて.(査読有) 精神科 18 巻 2 号 223-233,2011
- ③ **小林清樹**: 内科医にも可能な認知症の診断と治療.(査読無)札幌市内科医会会報 第18 号 15-21,2011
- ④ Yamaguchi M, Kokai Y, Imai S, Utsumi K, Matsumoto K, Honda H, Mizue Y, Momma M, Maeda T, Toyomasu S, Ito YM, **Kobayashi S**, Hashimoto E, Saito T, Sohma H. Investigation of annexin A5 as a biomarker for alzheimer's disease using Neuronal cell culture and mouse model. (査読有) J Neurosci Res.18. 2682-2692,2011

[学会発表] (計 10 件)

- ① **小林清樹** 他: 家族性に脳内石灰化を示した**Fahr**病の1例. 第31回日本精神科診断学会. 2011年11月18-19日. 熊本
- ② **小林清樹** 他: 有棘赤血球を伴う舞蹈病の1例. 第30回日本認知症学会. 2011年11月11-13日. 東京
- ③ **小林清樹** 他: 石灰沈着を伴うび慢性神経原線維変化病(DNTC)が疑われた1例～最新の画像診断技術を用いた機能画像所見を含めて～. 第107回日本精神神経学会学術総会. 2011年10月26-27日. 東京
- ④ **Kobayashi S** et al. A long-term care community model to support people with dementia: the Naka-sorachi local network. 5th International Psychogeriatric Associa-

tion (IPA) Congress. Sep 6-9, 2011. Hague, Netherlands

- ⑤ **小林清樹** 他: 有棘赤血球を伴う舞蹈病の1例. 第26回日本老年精神医学会. 2011年6月15-17日. 東京
- ⑥ **小林清樹** 他: 石灰沈着を伴うび慢性神経原線維変化病(DNTC)が疑われた1例. 第30回日本精神科診断学会. 2010年1月12日. 福岡
- ⑦ **小林清樹** 他: 家族性に脳内石灰化を示した**Fahr**病の1例. 第29回日本認知症学会. 2010年11月5日. 愛知
- ⑧ **小林清樹** 他: レビー小型認知症のステージ別特徴. 日本認知症ケア学会北海道地域大会(招待講演). 2010年7月11日. 札幌
- ⑨ **小林清樹** 他: 大学病院における認知症クリニカルパスの有用性. 第25回日本老年精神医学会. 2010年6月24日. 熊本
- ⑩ **小林清樹** 他: アルツハイマー型認知症とレビー小体型認知症におけるApolipoprotein E. 第106回日本精神神経学会. 2010年5月21日. 広島

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 清樹 (Kobayashi Seiju)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号: 50569035