

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500531

研究課題名(和文) 血液浄化によるアルツハイマー病治療システム：臨床応用に向けたヒト脳変化の検討

研究課題名(英文) Toward therapeutic systems for Alzheimer's Disease by removal of blood Abeta: Investigation of Abeta in the brain of dialysis patients

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：血中A $\beta$ 除去で脳内A $\beta$ を減少させるアルツハイマー病治療機器を創製するために、血中A $\beta$ がよく除去される血液透析で以下の検討を行った。1) 血液透析患者の死後脳では、非透析者に比して脳内A $\beta$ の蓄積(老人斑数)が有意に少なかった。2) 横断的研究：非透析者では腎機能が低下するにつれて血中A $\beta$ は増加し認知機能は低下したが、血液透析患者では透析歴が長くなっても血中A $\beta$ は増加せず、認知機能はほぼ維持された。3) 前向き研究：非透析腎不全患者5例(平均64.0歳)は透析導入とともに、血中A $\beta$ 濃度は低下し、認知機能は改善傾向を示した。以上から、血中A $\beta$ 除去器がアルツハイマー病治療につながる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To create therapeutic systems for Alzheimer's Disease by removal of blood Abeta, the followings were investigated regarding hemodialysis which effectively removes blood Abeta; 1) Abeta depositions as senile plaques in the postmortem brains of hemodialysis patients were significantly less than those of patients without dialysis. 2) The concentrations of plasma Abeta increased along with the decline of renal functions. Moreover, the renal failure patients without hemodialysis and with poorer renal functions showed lower cognitive functions. 3) Along with the initiation of hemodialysis of 5 renal failure patients (64.0+12.6 y.o.), the concentration of blood Abeta1-40, Abeta1-42, Abeta-oligomers were decreased and the cognitive functions were improved to or kept in full scores. These results indicate that the blood Abeta reduction system is worth investigating further as therapeutic systems for Alzheimer's Disease.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学、医用生体工学・生体材料学

キーワード：アルツハイマー病 アミロイド 治療機器 血液透析 脳病理 認知機能 アフェレシス

1. 研究開始当初の背景

(1) 本研究代表者 北口はアミロイド 蛋白 (A $\beta$ ) の新規な前駆体の発見 (Nature 1988 など) を緒として、以前からアルツハイマー病の原因は、脳に蓄積する A $\beta$  と考え研究を進めていた。

(2) 研究開始当初のアルツハイマー病治療に関する動向と本応募の基礎となる治療システム概要:

・アルツハイマー病の治療法として、原因物質の一つである A $\beta$  に対する抗体の末梢血への投与や A $\beta$  ワクチン療法が検討され一定の効果が認められたが、過剰な免疫反応による脳脊髄膜炎で死亡例が出現したため治験が停止されるなど、重篤な副作用が報告された。(その後の phase II 治験では、認知機能改善度が十分ではなく、軽度認知障害 MCI などのより早期での介入が検討されている)

・本研究者は、安全性が高く比較的コストな血液浄化法を用いて血中の A $\beta$  を除去できれば、結果的にアルツハイマー病を治療できるのではないかと着想した。

・本研究開始時点までに得た研究成果

既存医用吸着材料の中から、in vitro で A $\beta$  吸着能を示すものを複数見出し、そのうちの 1 材料 (HDC) が、非アルツハイマー病 (慢性腎不全) 患者の体外循環においてヒト血液中の A $\beta$  濃度を低下させることを確認した。

次いで、血液浄化療法としての人工透析に着目し、透析器の前後で血中 A $\beta$  が 60% 以上除去され、その結果、4 時間の透析で全身血中の A $\beta$  濃度がほぼ半減することを確認した。この解析で、血液透析施行中 (透析器により A $\beta$  が除去されている) は、非施行中に比べて体内から血液内への A $\beta$  湧出し速度が 100 倍近く高かった。この湧出しの一部が脳からなら、アルツハイマー病治療に期待もてる。また、透析患者の血中 A $\beta$  濃度はアルツハイマー病患者よりも数倍高いにも関わらず、透析が長期になっても認知機能が維持されていることも示唆された。

2. 研究の目的

血液浄化によるアルツハイマー病治療システムの Proof of Concept を、血液だけでなく、ヒト脳においても検討する。アルツハイマー病患者のモデルとして、血中 A $\beta$  濃度が高い進行した腎不全患者を選び、血中 A $\beta$  の除去 (血液透析導入) により、下記の変化がおこるのかを横断的研究、及び、前向き研究で明らかにする。

血中 A $\beta$  濃度 (A $\beta$ <sub>1-40</sub>、A $\beta$ <sub>1-42</sub>、A $\beta$  オリゴマ) が減少、または維持されるか

認知機能が向上または維持されるか

脳内 A $\beta$  量が減少するかを A $\beta$  イメージング、および、剖検脳を用いた脳病理などで検討する。

また、上記の基礎となる知見を得るため、in vitro で、透析施行条件による A $\beta$  除去率の違いなども補足的に把握する。

3. 研究の方法

(1) 対象患者: 本研究は、藤田保健衛生大学、および、研究参加施設の各倫理委員会の承認と患者の同意を得て、55-80 歳程度 of 非糖尿病腎不全患者で検討した。横断的研究透析群: 69.4 $\pm$ 3.8 歳の血液透析患者 57 例 (男 29、女 28、透析歴 13.9 $\pm$ 9.4 年)、非透析腎不全群: 71.7 $\pm$ 9.6 歳の非透析腎不全患者 17 例 (男 13、女 4)、対照群: 66.5 $\pm$ 4.2 歳の健康人 17 例 (男 5、女 12)。経時的な前向き研究: 64.0 $\pm$ 12.6 歳の 5 例 (男 3、女 2) を血液透析導入前からフォローした。脳の病理解析: 認知症病歴の記載がない剖検例ならびに解剖実習体より以下の大脳皮質を採取した。透析群: 75.8 $\pm$ 9.8 歳の血液透析患者 16 例 (男 10、女 6)、対照群: 79.0 $\pm$ 12.5 歳の非透析者 16 例 (男 7、女 9)。

(2) 認知能力: 30 点満点の Mini Mental State Examination (MMSE) で測定した。

(3) A $\beta$  測定: A $\beta$ <sub>1-40</sub> および A $\beta$ <sub>1-42</sub> モノマ濃度は、和光純薬製 ELISA Kit WAKO を用いて測定した。A $\beta$  オリゴマは IBL 社製 amyloid Oligomers (82E1 特異的) ELISA を用いた。また、A $\beta$  オリゴマのウェスタンブロッティングは、NuPAGE (4-12% Bis-Tris MES-SDS PAGE, Invitrogen) を用い、PVDF 膜 AE-6665 (アトー) にブロッティング後、6E10 (抗 A $\beta$ <sub>1-16</sub> 抗体, Covance) を 1 次抗体とし、ECL Prime (GE ヘルスケア) を用い、Light Capture (ATTO) により検出した。

(4) 脳切片の病理解析: 通常のパラフィン切片を作成し、抗 A $\beta$  抗体 4G8 (anti A $\beta$ <sub>1-16</sub>) および DE2 (anti A $\beta$ <sub>17-24</sub>)、抗 NFT 抗体を用いた免疫染色、ならびに渡辺鍍銀染色および過ヨウ素酸メタシ銀 (PAM) 染色を行なった。老人斑の個数は A $\beta$  免疫染切片 750,000  $\mu$ m<sup>2</sup> 当たりの数を各切片 5 カ所計測した。

(5) A $\beta$  イメージング: PIB をプローブとする PET で測定した (国立長寿医療研究センター)。

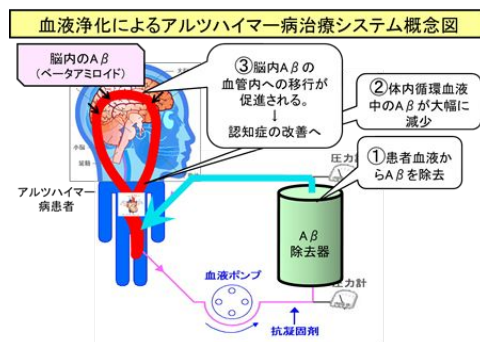
(6) A $\beta$  除去率の素材別検討: 製品ダイアライザから取り出した種々の素材からなる中空糸を 2mm 長に断片化し、エッペンドルフチューブ内で A $\beta$  溶液とバッチ反応を行った。

(7) 統計解析: JMP8 (SAS, USA) を用いた。

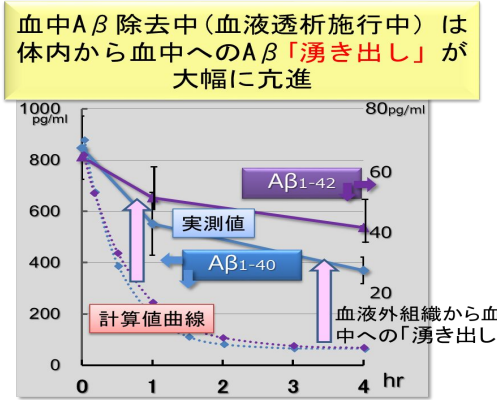
4. 研究成果

(1) はじめに

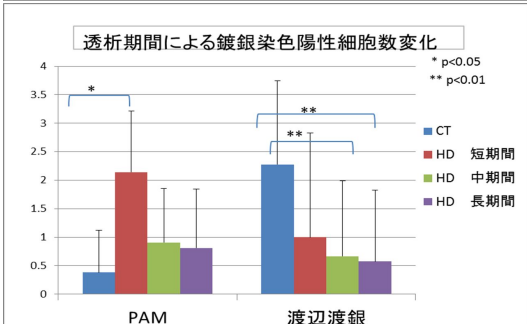
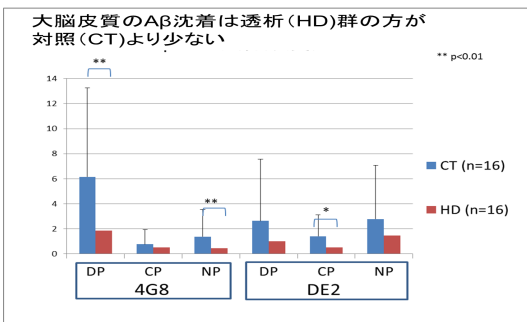
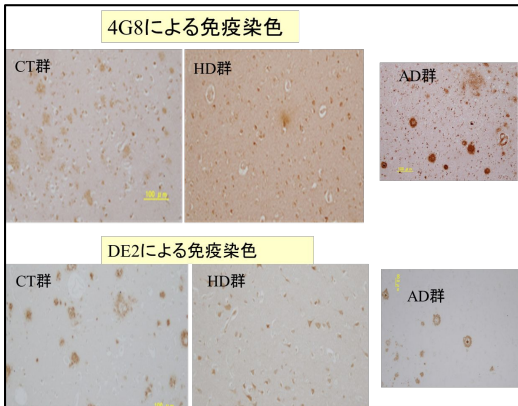
本研究の治療システム概念図を以下に示す。また、「血液透析中に、血液外から A $\beta$  が湧き



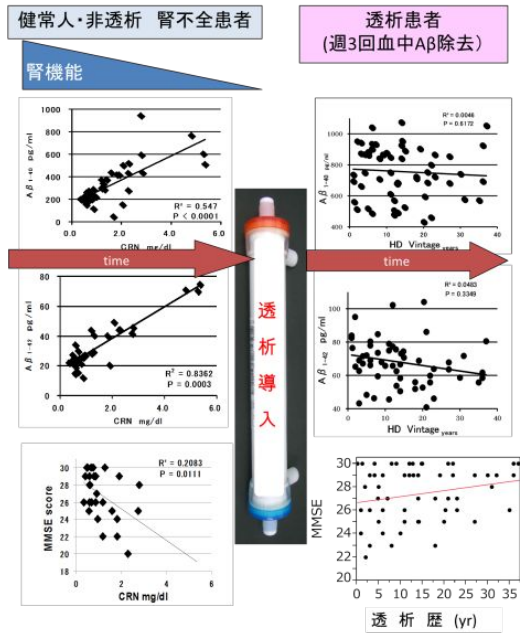
出してくる」ことを示す透析中の血中 A 濃度変化データを以下に示す。



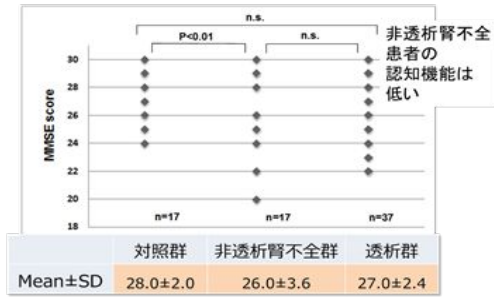
(2) 脳病理からの横断的解析：透析群は対照群に比して、diffuse plaque (DP)数および neuritic plaque (NP) 数 (4G8,  $p<0.01$ ), cored plaque (CP)数 (DE2,  $p=0.013$ )とも有意に少なかった。透析期間による変化では、渡辺鍍銀染色陽性細胞数が長期間透析ほど低値を示した。抗神経原線維変化 NFT 抗体陽性細胞数は透析/対照両群で差が無かった。



(3) 腎不全非透析、透析の横断的研究  
年齢対応健常人、非透析腎不全患者、血液透析患者の血中 Aβ、認知機能を解析したところ、非透析者では腎機能が低下するにつれて血中 Aβ は増加し認知機能は低下したが、血液透析患者では透析歴が長くなっても血中 Aβ は増加せず、認知機能はほぼ維持された。認知機能を各群で比較したところ、非透析腎不全患者で有意に低下するが、血液透析群では健常対照者と有意差がなくなった。

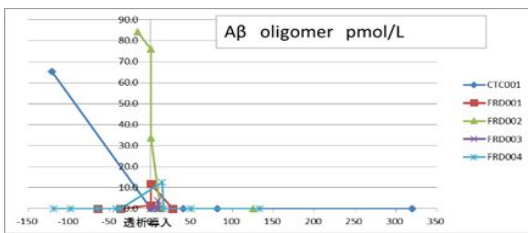
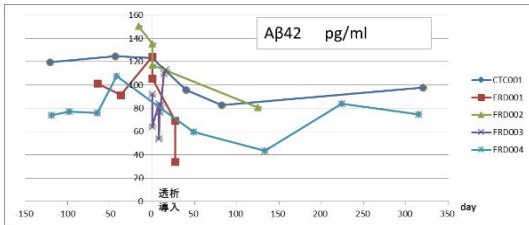
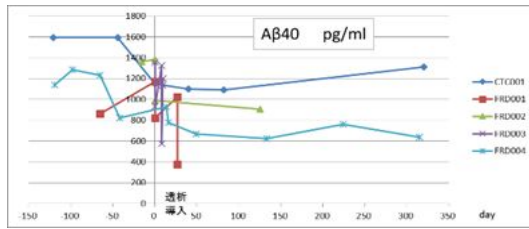


対照群、非透析腎不全群、透析群のMMSE比較

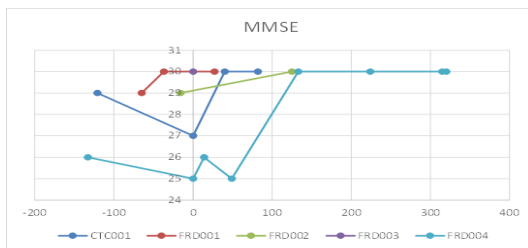


(4) 前向き研究：5例の腎不全患者について、透析導入前(直前を含む)から導入後までフォローした。血中 Aβ モノマ濃度は、Aβ 1-40、Aβ 1-42とも透析導入によって顕著に低下したが、透析期間が長くなるにつれてやや上昇してくる症例もあった。血中 Aβ オリゴマは、透析導入前から血中濃度が高かった症例については導入とともにほぼ検出感度以下に低下した。もともと血中に Aβ オリゴマが検出濃度以下だった症例については導入後もその状態が継続した。



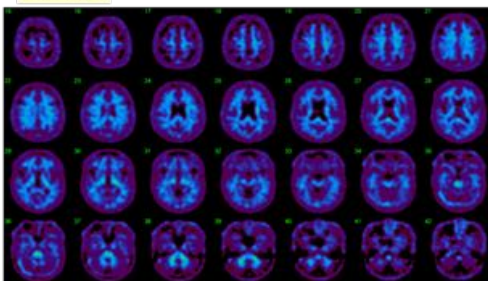


認知機能については、透析導入前で MMSE が 25, 27 点であった 2 症例は導入後に満点の 30 点に改善した。もともと MMSE が高得点であった症例については、透析導入後も高得点が維持された。



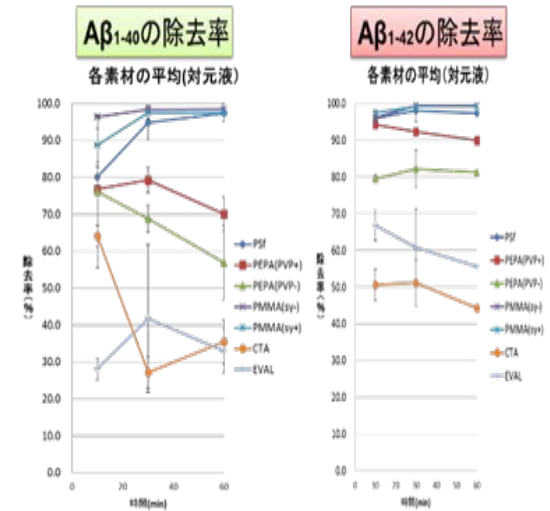
PIB プローブによる脳 A イメージング (PET) では、透析導入後 125 日および 320 日後(各々別症例)の測定では、脳内 A 沈着は両症例とも陰性であったが、透析導入前の状態が測定できていないため、血液からの A 除去効果とは結論付けられない。また、MRI で追跡している別の症例は、透析導入 98 日前に海馬萎縮などは顕著ではなかったが、透析導入直後も海馬萎縮はみられず、現在、1 年後の MRI を撮影、読影中である。

PIB/PET CTC001 透析導入10か月後 65歳F



## (5) 素材

A モノマは、断片化した中空糸でも除去されることから、吸着が主な除去機構であることが明らかになった。さらに、ポリスルホンや PMMA などの疎水性の高い透析用中空糸で除去されるが、EVAL や CTA などの親水性の高い透析用中空糸では除去率が低かったため、A モノマと素材表面との疎水性相互作用で吸着除去されていると推察された。A オリゴマについては、吸着ではあまり除去されなかった。



## (6) 高効率で A を除去できるシステムの検討

中空糸を用いて、通常の透析モード、透析液側を緩衝液または空気て封入(閉止)して濾過が起らないようにした吸着モードを比較した結果、吸着モードでも十分な A 除去が可能であることを見出した。血液側の流速は低いほど除去効率は高かったが、単位時間当たりの除去絶対量を大きくするには、 $Q_b=50\text{ml/min}$  程度が最適と考えられた。

## 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6件)

Kazunori Kawaguchi, Masato Takeuchi, Hiromasa Yamagawa, Kazutaka Murakami, Shigeru Nakai, Hideo Hori, Atsushi Ohashi, Yoshiyuki Hiki, Nobuo Suzuki, Satoshi Sugiyama, Yukio Yuzawa, Nobuya Kitaguchi. A Potential therapeutic system for Alzheimer's Disease Using Adsorbents with alkyl ligands for removal of blood Amyloid. J Artificial Organs 2013; 16:211-217. 査読有

Masao Kato, Kazunori Kawaguchi, Sigeru Nakai, Kazutaka Murakami, Hideo Hori, Atsushi Ohashi, Yoshiyuki Hiki, Shinji Ito, Yasunobu Shimano, Nobuo Suzuki, Satoshi Sugiyama, Hiroshi Ogawa, Hiroko Kushimoto, Tatsuro Mutoh, Yukio Yuzawa, Nobuya Kitaguchi. Potential therapeutic system

for Alzheimer's Disease: Removal of blood A $\beta$ s by hemodialyzers and its effect on the cognitive functions of renal failure patients. J Neural Transmission 2012; 119(12), 1533-1544 査読有

中井滋、北口暢哉. CKDと年齢(加齢による腎機能の変化)(2)CKDと認知障害 臨床透析 2012;28:41-52 査読無

加藤政雄、藤田孝、村上和隆、湯澤由紀夫、杉山敏、伊藤信二、武藤多津郎、堀秀生、川口和紀、大橋篤、中井滋、比企能之、北口暢哉. 血漿アミロイドの増加は腎機能障害及び認知の低下に関連する 藤田学園医学学会誌 2011;35:111-117. 査読有

北口暢哉、川口和紀. 血液からのA $\beta$ 除去によるアルツハイマー病治療システムの創製 PET Journal 2011;14:10-11 査読無

Kitaguchi N., Kawaguchi K., Nakai S., Murakami K., Ito S., Hoshino H., Hori H., Ohashi A., Shimano Y., Suzuki N., Yuzawa Y., Mutoh T., Sugiyama S. Reduction of Alzheimer's Disease Amyloid in plasma by hemodialysis and its relation to cognitive functions. Blood Purification 2011;32:57-62. 査読有

[学会発表](計17件)

川口和紀、堀秀生、酒井一由、中井滋、比企能之、長尾枝澄香、間宮隆吉、伊東亜紀雄、鍋島俊隆、北口暢哉 血液浄化によるアルツハイマー病治療法の開発へ～認知機能評価用モデル動物の作成～ 認知症学会 2013-11-8 松本

酒井一由、千田隆夫、黒田誠、川口和紀、中井滋、伊藤信二、武藤多津郎、加藤政雄、湯澤由紀夫、北口暢哉 血液透析患者の大脳皮質内A $\beta$ 沈着は対照高齢者に比して少ない. 認知症学会 2013-11-8 松本

Kazunori Kawaguchi, Hisae Toda, Sachi Oguri, Shun Ikedo, Yutarou Matsushita, Miwa Sakata, Hideo Hori, Atsushi Ohashi, Shigeru Nakai, Yoshiyuki Hiki, Nobuya Kitaguchi Toward the novel method of treatment for Alzheimer's disease; The optimal conditions of A $\beta$  removal by dialyzers. 5th Congress of the International Federation for Artificial Organs, 2013-9-27, Yokohama

北口暢哉、三枝滉、川口和紀、後藤健宏、山田真嗣、坂田美和、堀秀生、大橋篤、比企能之、中井滋 血液からのA $\beta$ 除去によるアルツハイマー病治療システムの創製:中空糸断片を吸着材として用いたA $\beta$ 除去. 人工臓器学会大会 2013-9-27 横浜

Nobuya Kitaguchi, Kazuyoshi Sakai, Takao Senda, Kazunori Kawaguchi, Masao Kato, Makoto Kuroda, Shigeru Nakai, Ryuji Hata, Yukio Yuzawa, Yoshiyuki Hiki, Removal of blood A $\beta$  might reduce brain A

deposition based on the study of hemodialysis patients: Extracorporeal A $\beta$  Removal System (EARS) for Alzheimer's Disease therapy. Alzheimer's Association International Conference AAIC 2013, July 17, 2013 Boston

竹内雅人、山側裕昌、川口和紀、北口暢哉、安保重一、近赤外分光法による血中タンパク質除去用吸着材の表面にグラフトした有機官能基と吸着水の同時解析. 触媒検討会 2012-9-25 福岡

北口暢哉、伊藤信二、川口和紀、村上和隆、中井滋、島野泰暢、鈴木信夫、杉山敏、小川洋史、久志本浩子、堀秀生、大橋篤、比企能之、湯澤由紀夫、武藤多津郎. 血液A $\beta$ 除去によるアルツハイマー病治療:血液透析患者の脳画像解析. 認知症予防学会 2012-9-7 北九州市

Nobuya Kitaguchi, Takehiro Gotoh, Kazunori Kawaguchi, Hideo Hori, Atsushi Ohashi, Shigeru Nakai, Shizuko Nagao, Shinji Ito, Tatsuro Mutoh, Yukio Yuzawa, Yoshiyuki Hiki, Extracorporeal A $\beta$  Removal System (EARS) for Alzheimer's Disease therapy: Novel Devices with fragments of hollow fibers removed A $\beta$  effectively both in vitro and in vivo. Alzheimer's Association International Conference AAIC2012. July 15, 2012 Vancouver

川口和紀、戸田尚枝、後藤健宏、小栗早智、堀秀生、中井滋、大橋篤、比企能之、加藤政雄、北口暢哉. 中空糸による血中アミロイド蛋白(A $\beta$ )除去性能の検討 医工学治療. 医工学治療学会 2012-3-25 札幌

北口暢哉、伊藤信二、川口和紀、村上和隆、中井滋、加藤政雄、島野泰暢、鈴木信夫、堀秀生、大橋篤、比企能之、杉山敏、湯澤由紀夫、武藤多津郎. 血中A $\beta$ 除去によるアルツハイマー病治療システムの検討:血液透析による血中A $\beta$ 変化と喫煙との関係. 認知症学会 2011-11-12 東京

川口和紀、堀秀生、大橋篤、中井滋、比企能之、村上和隆、湯澤由紀夫、伊藤信二、石田治、島野泰暢、武藤多津郎、北口暢哉. 18ヶ月間の維持血液透析による血中Amyloid Beta-Protein(A $\beta$ )、MMSEスコアの経時変化. 認知症学会 2011-11-12 東京

竹内雅人、山側裕昌、川口和紀、北口暢哉、安保重一. アルツハイマー病の治療に向けた血中タンパク質除去用吸着剤の表面有機官能基と吸着水の同時解析. 近赤外フォーラム. 2011-11-11 つくば

中井滋、北口暢哉、鈴木一之、土田健司、椿原美治. 透析人口における認知症有病率及び発症率に関する研究～日本透析医学会統計調査資料から～. 認知症予防学会 2011-9-10 米子

北口暢哉、川口和紀、中井滋. 血液からのA $\beta$ 除去によるアルツハイマー病治療シス

テムの創製 血液浄化で認知症を治療・予防する：血液透析の解析を中心に . 認知症予防学会 2011-9-10 米子

Nobuya Kitaguchi, Kazunori Kawaguchi, Masao Kato, Shigeru Nakai, Kazutaka Murakami, Shinji Ito, Hideo Hori, Atsushi Ohashi, Yasunobu Shimano, Nobuo Suzuki, Satoshi Sugiyama, Yoshiyuki Hiki, Tatsuro Mutoh, Yukio Yuzawa, Toward therapeutic system for Alzheimer ' s Disease by removal of blood A : Hemodialysis improved the impaired cognitive states of renal failure patients. Alzheimer ' s Association International Conference AAIC2011 July 18, 2011 Paris

伊藤信二、石川等真、引地智加、河村直樹 島さゆり、宮下忠行、植田晃広、木澤真努香、朝倉邦彦、武藤多津郎、川口和紀、中井滋、北口暢哉、村上和隆、湯澤由紀夫. 血液透析患者における透析前後の血中 A 濃度変化と、認知機能、頭部 CT 所見との関連. 日本神経学会 2011-5-20 名古屋

川口和紀、堀秀生、村上和隆、中井滋、大橋篤、島野泰暢、鈴木信夫、山側裕正、湯澤由紀夫、杉山敏、竹内雅人、北口暢哉. 血中アミロイド 蛋白 (A ) 除去によるアルツハイマー病治療システムの構築に向けて ~A 吸着材の吸着特性. 日本医工学治療学会 2011-4-23 岡山

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計3件)

名称：血液中 -アミロイド除去システム  
発明者：北口暢哉、川口和紀  
権利者：学校法人藤田学園 旭化成メディカル株式会社  
種類：特許  
番号：特願 2013-217885  
出願年月日：25年10月18日  
国内外の別：国内

名称：血液中の -アミロイド濃度を低下させるシステム  
発明者：北口暢哉、川口和紀  
権利者：学校法人藤田学園 旭化成メディカル株式会社  
種類：特許  
番号：特願 2011-152366号  
出願年月日：23年7月8日  
国内外の別：国内

名称：Method for Reducing Amyloid Beta Concentration in Blood  
発明者：北口暢哉、川口和紀  
権利者：学校法人藤田学園 旭化成メディカル株式会社  
種類：特許

番号：US 13/178790号  
出願年月日：23年7月8日  
国内外の別：国外

取得状況 (計1件)

名称：A 除去材、A 除去器及び A 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、株式会社カネカ  
種類：特許  
番号：特許 5432923号  
取得年月日：25年12月13日  
国内外の別：国内

〔その他〕  
ホームページ等

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  
川口 和紀 (KAWAGUCHI, Kazunori)  
藤田保健衛生大学・医療科学部・講師  
研究者番号：00508468

(3)研究分担者  
中井 滋 (NAKAI, Shigeru)  
藤田保健衛生大学・医療科学部・教授  
研究者番号：20345896

(4)研究分担者  
伊藤 信二 (ITO, Shinji)  
藤田保健衛生大学・医学部・准教授  
研究者番号：40572079

(5)研究分担者  
加藤 政雄 (KATO, Masao)  
藤田保健衛生大学・医学研究科・研究員  
研究者番号：50599537

(6)研究協力者  
酒井 一由 (SAKAI, Kazuyoshi)  
藤田保健衛生大学・医療科学部・准教授  
研究者番号：90215583

(7)研究協力者  
伊藤 健吾 (ITO, Kengo)  
国立長寿医療研究センター・認知症先進医療開発センター 脳機能画像診断開発部  
研究者番号：70184653