

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07783

研究課題名(和文)新規抗変異型アミロイド抗体を用いたアミロイド蓄積機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of amyloid beta accumulation using novel anti-mutant amyloid beta antibody

研究代表者

足立 正 (ADACHI, Tadashi)

鳥取大学・医学部・准教授

研究者番号：50555711

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：家族性アルツハイマー病の遺伝子変異であるD67N家系の患者脳から、本変異アミロイドに対する特異的な抗体を作成した。この抗体を用いて、本家系患者脳、孤発性アルツハイマー病および加齢に伴う老人斑(アミロイド)について免疫染色を行った。結果として、本変異特異抗体は、本変異患者脳のアミロイドのみに結合し、孤発例および加齢に伴う老人斑には結合しなかった。これにより、家族性アルツハイマー病と孤発性アルツハイマー病ではアミロイドの蓄積機構が異なることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本抗体が孤発性アルツハイマー病や加齢に伴うアミロイド沈着には結合せず、本変異特異的なアミロイド抗体であることが証明された。これにより、孤発例と家族性アルツハイマー病のアミロイド蓄積機構が異なることが示唆された。また、患者脳を検索する際に本抗体を用いることで本変異の有無を確認することができるようになった。

研究成果の概要(英文)：Specific antibodies against the mutant amyloid were generated from the brains of patients of the D67N family with a familial Alzheimer's disease mutation. Using this antibody, immunostaining was performed on the brains of patients with the mutation, sporadic Alzheimer's disease, and age-related senile plaques. The results showed that the mutation-specific antibody bound only to amyloid in the brains of patients with the mutation, but not to sporadic cases or senile plaques associated with aging. This indicates that the mechanism of amyloid accumulation differs between familial and sporadic Alzheimer's disease.

研究分野：神経病理

キーワード：アミロイド 神経病理 免疫染色

### 1. 研究開始当初の背景

人口の高齢化による認知症高齢者は著しく増加しており、特にアルツハイマー型認知症 (AD) は最も頻度が高く、根本治療開発のための病態解明研究が必要とされている。アルツハイマー型認知症のうち、およそ 10% は家族性のものであり、2004 年我々はアミロイド前駆体蛋白 (APP) 遺伝子新規変異 (D678N) を同定し報告した (Wakutani et al, 2004, 図 1)。この APP 変異はアミロイド 内部に遺伝子変異を有するため、野生型アミロイド とともに変異型アミロイド が蓄積する特異的な病態が想定されている。In vitro の培養細胞実験系において、D678N-APP 遺伝子変異はアミロイド産生亢進やアミロイド A<sub>42/40</sub> 産生比には影響を及ぼさないが、合成ペプチドの検討において 野生型に比べて変異アミロイドは凝集性亢進が確認されている。また、この線維凝集の結果は、English 型変異 (H6R) でも認められ、A 配列内の N 末端側変異は、A 線維化において線維伸長に関連することが示唆されている (Hori et al, 2007)。我々は、新規アミロイド変異を同定後、平成 24 年度の研究課題 (研究代表者：和田健二) において、本変異特異的抗アミロイド抗体の精製にすでに成功しており、その変異特異性については検証済みである。その後、神経病理学の進歩により、AD においても シヌクレイン、TDP43 といった神経変性疾患に蓄積する異常タンパク質が複合病理として蓄積することが分かってきた。また、アミロイド 蛋白は oligomer に毒性があるという考えが広がり、A oligomer に対する抗体も市販に入手できるようになった。したがって、本変異アミロイドならびに A oligomer とこれら異常タンパク質との関連を解明する必要性がでてきたため、本研究の着想に至った。

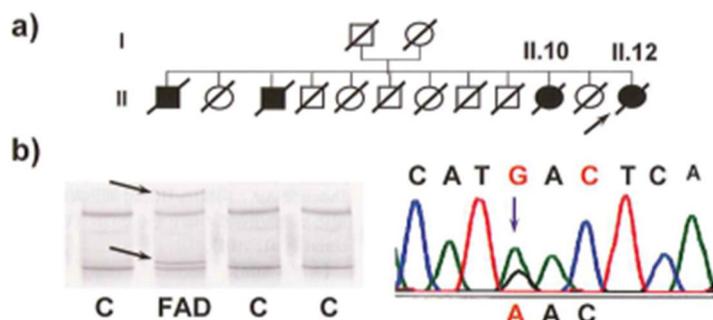


図 1 D678N 変異

a) 家系図  
b) 遺伝子解析：コドン 678GAC から AAC への点突然変異を認め、D678N 変異を見いだした。C = 対照, FAD = 家族性アルツハイマー病患者

### 2. 研究の目的

本変異患者凍結脳から作成した本変異特異的抗アミロイド抗体を用いて、本遺伝子変異剖検脳ならびに孤発性アルツハイマー病ならびに老年性変化におけるアミロイド蓄積の病態を検証することを第一の目的とする。次に、本抗体を用いて、臨床的にアルツハイマー病が疑われる症例の脳脊髄液中の変異アミロイドの定量評価を行うことを第二の目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 新規変異抗アミロイド抗体を用いた病理学的検索

##### 変異アミロイド例における検討

本変異特異抗体による、本変異症例におけるアミロイド蓄積の形態と一般的な A<sub>1-42</sub>, A<sub>1-40</sub> との関連性を、二重免疫染色および免疫電顕を用いて、変異アミロイドの蓄積部位とその関連性について検証する。また、抗アミロイド オリゴマー抗体を用いて変異アミロイドと A<sub>40</sub>, A<sub>42</sub> との関連性を検証する。その後、神経病理学的な進歩により、AD でもレビー小体病で蓄積する シヌクレインや、筋萎縮性側索硬化症あるいは前頭側頭葉変性症の蓄積タンパク質である TDP43 が複合して蓄積することが知られるようになった。これらの新知見をもちいて、改めてこの 2 例の剖検例を検索し、細胞内アミロイド蓄積と他の異常タンパク質の広がりおよびその程度について、検証する。

##### 他の神経変性疾患および老年性変化における病理学的検索

当施設に保存されている剖検症例において、新規変異抗アミロイド抗体を用いて疾患特異的な変異アミロイドの蓄積の有無および、抗アミロイド オリゴマー抗体を用いて、疾患としての AD と加齢に伴うアミロイド の蓄積の違いを、病変分布およびその形態から比較検討を行う。具体的には、病理組織標本における標準的切り出し部位 (前頭葉、側頭葉、頭頂葉、前方海馬、後方海馬、楔前部、中心前回、視床) を抗アミロイド抗体 A<sub>11-28</sub> でアミロイド沈着の有無をスクリーニングし、アミロイド沈着がある症例に関してはその部位を A<sub>1-40</sub>, A<sub>1-42</sub>, A<sub>オリゴマー</sub> 抗体ならびに本変異特異的抗アミロイド抗体を用いて免疫染色を行い、各部位におけるそれぞれのアミロイド沈着の程度の半定量評価を行う。病理学的な AD の診断は国際基準に基づき Braak NFT stage 4, amyloid stage C とし、それに満たないが A の沈着がある群と無い群で群間比較を行い、その差異について検討する。さらに、半脳凍結脳が保存されている症例にお

いては、同一部位の凍結脳におけるアミロイドの定量評価と mRNA の発現について各部位毎に比較検討する。

#### (2) 患者脳脊髄液を用いた生体内における変異アミロイドの測定

##### 病理診断確定 AD における生前脳脊髄液を用いた検討

生前に脳脊髄液検査を当院で行い凍結保存されており、不幸にして病理解剖となった症例について、新規抗変異アミロイド抗体を用いた ELISA 系を確立し、脳脊髄液中の変異アミロイドの定量解析を行う。併せて病理変化との量的な対応を検討する。

##### 臨床的に AD が疑われる症例の脳脊髄液を用いた検討

臨床的 AD は以下の検査基準で選択する。エピソード記憶を中心とした認知機能障害があり生活障害を認める、頭部 MRI にて海馬を含む側頭葉内側および頭頂葉の萎縮を認め、脳血流 SPECT で後部帯状回ならびに頭頂葉の血流低下を認める、脳脊髄液中の A<sub>β</sub>42 の低下を認めるものをバイオマーカー陽性 AD として選択する。さらに、当院でアミロイド PET (18F-florbetapir) を撮像し、脳脊髄液検が保存されている症例における、変異型アミロイド を ELISA を用いて測定し、アミロイド PET の SUVR (standard uptake value ratio )との対応を示す。

#### 4. 研究成果

アミロイド前駆蛋白遺伝子の新規変異 2 例における病理組織学的検索をすすめた。その結果、1 例は高度アルツハイマー病理のみで、その他のレビー小体関連病理および TDP43 関連病理は認めなかったものの、もう 1 例は高度アルツハイマー病理に加えてレビー小体病理関連を認め、TDP43 病理は認めなかったことが判明した。これにより、同一遺伝子家系であってもアミロイド、タウ、アルファシヌクレイン、TDP43 の蓄積が異なることが明らかとなり、孤発例での背景病理の理解が進んだ。次にアミロイド前駆蛋白遺伝子の新規変異に対する抗体を用いて、同変異の剖検例に対して免疫染色を行ったところ、変異特異的なアミロイドを検出することができた(図 2)。一方、同抗体を用いて孤発性アルツハイマー病の老人斑およびアルツハイマー病の診断には至らないレベルの、高齢者に蓄積する老人斑(アミロイド)に対して免疫染色を試みたが、同抗体ではこれらのアミロイドを検出することができなかった。以上より、本抗体は変異特異的なアミロイド抗体であることが組織学的にも証明された。これらの結果から、当初計画していた孤発性アルツハイマー病剖検例における生前の脳脊髄液を用いた ELISA による変異アミロイドの検出は難しいことが判明した。また、新規変異剖検例では、変異型アミロイドの蓄積と通常のアミロイド抗体免疫染色で認識されるアミロイドとは、分布と程度に差がないことが明らかとなった。そのため、当初の計画を十分に遂行することは困難であった。

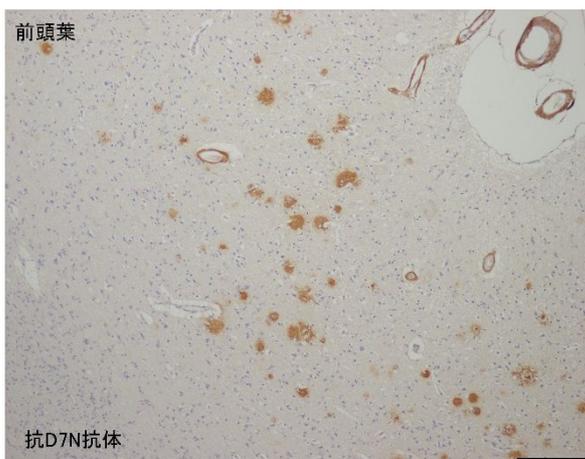


図 2 D687N 変異症例の抗 D7N 抗体 (変異アミロイド抗体) による免疫染色

大脳皮質内の細胞外に、アミロイドの沈着を認める。コア構造を持たない蓄積が多い。また、髄膜および皮質内の小血管内にも変異アミロイドの沈着を認める。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sakuwa Mayuko, Adachi Tadashi, Suzuki Yuki, Yoshida Kentaro, Fukuda Hiroki, Miura Hiroshi, Adachi Yoshiaki, Hanajima Ritsuko	4. 巻 91
2. 論文標題 First Japanese autopsy case showing LRRK2 mutation G2019S and TDP-43 proteinopathy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Parkinsonism & Related Disorders	6. 最初と最後の頁 85 ~ 87
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parkreldis.2021.09.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sakuwa Mayuko, Adachi Tadashi, Yoshida Kentaro, Adachi Yoshiaki, Nakano Toshiya, Hanajima Ritsuko	4. 巻 41
2. 論文標題 An autopsy case of PARK2 due to a homozygous exon 2 deletion of <i>&lt;i&gt;parkin&lt;/i&gt;</i> and associated with synucleinopathy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuropathology	6. 最初と最後の頁 293-300
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/neup.12735	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsubara Tomoyasu, Saito Yuko, Kurashige Takashi, Higashihara Mana, Hasegawa Fumio, Ogasawara Masashi, Iida Aritoshi, Nishino Ichizo, Adachi Tadashi, Kubota Akatsuki, Murayama Shigeo	4. 巻 24
2. 論文標題 Neuropathy/intranuclear inclusion bodies in oculopharyngodistal myopathy: A case report	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 eNeurologicalSci	6. 最初と最後の頁 100348 ~ 100348
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.enesci.2021.100348	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kanatani M, Adachi T, Sakata R, Nishimura Y, Saito Y, Maegaki Y, Watanabe Y, Hanajima R.	4. 巻 43
2. 論文標題 Dravet syndrome with parkinsonian symptoms and intact dopaminergic neurons: A case report	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain and development	6. 最初と最後の頁 486-489
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.braindev.2020.10.015.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 金谷優広, 足立正, 阪田良一, 渡辺保裕, 花鳥律子	4. 巻 60
2. 論文標題 抗横紋筋抗体陽性の重症筋無力症に合併したsporadic late-onset nemaline myopathyの1例	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 臨床神経学	6. 最初と最後の頁 489-494
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5692/clinicalneuro.60.cn-001427.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 足立正, 花鳥律子
2. 発表標題 認知症の病理診断が教えてくれること
3. 学会等名 第62回日本神経学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 足立正, 佐桑真悠子, 山下陽三, 小田晋輔, 長谷川成人, 池内健, 花鳥律子
2. 発表標題 FTDP17 (IVS10+14 C>T)の1剖検例
3. 学会等名 第62回日本神経病理学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 足立正
2. 発表標題 末梢自律神経系の シヌクレイン蓄積が軽微であった経過25年のパーキンソン病の1剖検例
3. 学会等名 第61回日本神経病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 足立正
2. 発表標題 18F-florbetapir アミロイドPETと脳脊髄液A 42との関連
3. 学会等名 第35回日本老年精神医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 足立正
2. 発表標題 薬剤性認知機能障害
3. 学会等名 第39回日本認知症学会学術集会シンポジウム28 (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関