

Abbreviations

本論文では以下の略語を用いる.

ABC	avidine-biotin complex	アビチン・ビオチン複合体
A β	amyloid β protein	アミロイド β タンパク
AD	Alzheimer's disease	アルツハイマー病
APOE	apolipoprotein E	アポリポタンパク E
β APP	β -amyloid presursor protein	β アミロイド前駆体タンパク
COX-2	cyclooxygenase-2	シクロオキシゲナーゼ-2
DMSO	dimethyl sulphoxide	ジメチルスルフォキシド
DNA	deoxyribonucleic acid	デオキシリボヌクレオシド
DS	Down syndrome	ダウン症候群
EDTA	ethylenediamine tetra acetic acid	エチレンジアミン 4 酢酸
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay	酵素免疫測定法
FAD	familial AD	家族性アルツハイマー病
FeSO ₄	ferric sulfate (II)	硫酸第一鉄
H ₂ O ₂	hydrogen peroxide	過酸化水素
MDA	malondealdehyde	マロンデアルデヒド
NHS	normal horse serum	正常ウマ血清
NFT	neurofibraly tangle	神経原線維変化
PCR	polymerase chain reaction	ポリメラーゼ連鎖反応
PSB	phosphate bufferd saline	リン酸バッファー化生理食塩水
PS	presenilin	プレセニリン
s.d.	standard deviation	標準偏差
SAD	sporadic AD	孤発性アルツハイマー病
SDS	sodium dodecyl sulfate	ドデシル硫酸ナトリウム
SOD-I	superoxide dismutase-I	スーパーオキシドジスムターゼ-I
TBARS	thiobarbituric acid reactive substances	チオバルビタール酸反応物質
TS	tris-HCl buffered saline	トリスバッファー化生理食塩水

論文概要

目的

アルツハイマー病 (AD) 脳に共通する病理学的特徴の 1 つとしてアミロイド β 蛋白 ($A\beta$) の沈着が挙げられるが、その機序に関しては不明である。本研究では、AD 脳における $A\beta$ の代謝や沈着機序解明を検討することを目的とした。21 番染色体のトリソミーであるダウン症候群 (Down's syndrome: DS) は、AD の病理変化が早期に出現し、かつ増幅していると考えられ AD のモデルとして用いられる。DS 凍結脳、脳脊髄液 (cerebrospinal fluid: CSF)、血漿、また AD の血小板や血漿、筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) の皮膚に含まれる $A\beta$ を測定し、 $A\beta$ の蓄積や沈着機構について検討した。一方、アポリポ蛋白 E (apolipoprotein E: APOE) は AD 発症の危険因子として知られており、APOE のアイソフォームと DS・AD 血漿や AD 血小板に含まれる $A\beta$ 分子種との関連を解析した。

対象と方法

本研究は大きく 3 つに分けた。第 1 章では、DS 脳の免疫組織化学による画像解析を行い、凍結脳・CSF・血漿中 $A\beta$ の酵素標識免疫定量法 (enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA) による測定、また血漿 $A\beta$ と APOE アイソフォームとの相関を解析した。さらに AD や DS では脳の酸化ストレスによる細胞障害を呈していることより、脳の過酸化脂質量を測定した。

5 例の脳組織切片を、 $A\beta$ の C 末端特異的なモノクローナル抗体を用いて免疫染色し、老人斑の占める面積比や密度、アミロイド沈着血管数について AD と比較検討した。また、DS 4 例の脳蟻酸抽出物、および DS 6 例の CSF、更に、DS 105 例 (44+61 例) の血漿中 $A\beta$ の主要分子種濃度 ($A\beta_{40}$ と $A\beta_{42}$) を測定し、対照と比較した。DS 5 例の脳過酸化脂質は過酸化水素と硫酸第 1 鉄で酸化刺激後、TBA 法にて測定した。

第 2 章では、AD の血小板を分離し、塩酸グアニジンにて血小板 A β を抽出後、ELISA にて A β 分子種を分別定量した。更に AD 血漿についても A β 分子種を測定し、血小板 A β とともに APOE アイソフォームとの相関について検討した。

第 3 章では、細胞外マトリックスの変化が存在することが知られている ALS 患者の皮膚の A β 免疫組織化学を行ない、また RIPA バッファーおよび塩酸グアニジンにて抽出した皮膚組織の各画分に含まれる A β の分別定量を ELISA にて施行し、対照と比較検討した。更に、皮膚組織のイムノブロットにて、4kDa の A β の存在を調べた。

結果と考察

免疫組織化学における画像解析では、DS の A β 40 で染色される老人斑面積比と密度、A β 40 および A β 42 陽性アミロイド沈着血管が AD に比べて有意な増加を示した。これは ELISA にて DS の脳 A β 分子種が A β 40 優位に AD より増加していた結果と一致していた。CSF の A β 1-42 濃度が低下していたことは、AD では CSF A β 42 が低下するという従来の報告と同様であった。DS 血漿では対照に比べ、A β 40 と A β 42 の有意な増加が認められたが、APOE フェノタイプとの相関は認められなかった。以上より、DS においては脳や血漿の A β の増加には、第 21 番染色体のトリソミーによる APP の遺伝子量の増加の影響のみでない可能性が示唆された。また DS の CSF-A β 42 が低下していたことより、DS における CSF-A β 42 の脳への吸着亢進や、脳より CSF への A β 42 の分泌低下の可能性が考えられた。また、酸化刺激後の脳過酸化脂質は、対照に比し有意に増加していた。

血小板 A β 42 は AD で増加しており、特に AD の APOE4-E4 保有者でより増加することが示唆された。血小板は神経細胞の末梢モデルとして、AD の研究に有用であるが、血小板 A β 分子種量は対照とのオーバーラップが多く診断には有用ではないと考えられた。AD の血漿 A β 各分子種濃度は対照と比較して

有意差は認められず、DS 同様 APOE フェノタイプとの相関は認められなかったことより、AD の危険因子としての APOE アイソフォーム E4 が、血漿 A β の産生・分泌の増加には寄与していないことが示唆された。

ALS 皮膚では免疫組織学的には対照と比較して A β 免疫活性の差異が検出されなかったものの、RIPA バッファー不溶性-塩酸グアニジン可溶性画分の A β 40, A β 42 の増加が認められたことは、detergent-insoluble な A β が増加していることを示唆するものであった。また、ALS と対照皮膚に 4kDa の A β を確認した。ALS の皮膚組織では形態学・生化学的な細胞外マトリックスの変化が報告されているが、本研究の結果は、細胞外マトリックスの変化によって、A β 沈着が促進される可能性を示唆していると考えられた。

結論

- (1) DS では 21 番染色体のトリソミーにより A β や過酸化脂質の増加が生じ、AD を早期に発症するものと推定された。また血漿 A β 増加や髄液 A β 42 の低下が DS の生物学的マーカーとなることが明らかとなった。AD では血漿 A β の有意な増加は認められず、AD の危険因子である APOE-E4 は血漿 A β 濃度に影響しないことが示された。APOE-E4 の AD 促進効果には脳内沈着 A β のクリアランス低下などの機序が、A β 産生亢進よりも優位であることが示唆された。
- (2) AD の血小板 A β 42 は対照に比して有意に増加しており、APOE アイソフォームとの相関を認めた。血小板の研究は神経細胞の末梢モデルとして AD の病態解明に有用であると考えられた。
- (3) 細胞外マトリックスの変化が生じる ALS 皮膚では対照に比べ A β 分子種量が増加していたことより、細胞外マトリックスの変化と A β 沈着との相互作用が示唆された。