

## 第 1 章

ダウン症候群 (DS) 患者脳の免疫組織化学による画像解析および DS  
脳脊髄液・血漿における A $\beta$  定量とアポリポ蛋白 E (APOE)  
アイソフォームとの関連についての検討

## 第1章 DS 患者脳の免疫組織化学による画像解析および DS 脳脊髄液・血漿における A $\beta$ 定量とアポリポ蛋白 E アイソフォームとの関連についての検討

### 1-1 目的

AD の主要な病理所見の1つとして、老人斑や脳血管アミロイドが海馬や大脳皮質に沈着する点が挙げられる。A $\beta$  前駆体蛋白 (APP) 遺伝子の存在する 21 番染色体のトリソミーである DS も、30 歳代より AD 同様の病的変化を来とし、痴呆をきたすことが知られている (1)。さらに DS では、superoxide dismutase-I (SOD-I) 遺伝子が DS 責任領域に存在し、対照の 1.5 倍の発現量であること (2)、cyclooxygenase-2 (COX-2) が神経原線維変化を伴う神経細胞や病的軸索において特異的に誘導されること (3) が報告されている。以上より、DS 脳では APP の遺伝子量増加に伴う A $\beta$  の産生が亢進し、更には酸化ストレスが増加していると考えられている。従って DS は AD の病的過程が増幅されたモデルとして扱えることができ、DS の痴呆の発症機序の解明は、DS のみならず AD における痴呆の病態機構の解明に有用であると考えられる。

本研究では、成人 DS 5 例の大脳切片の A $\beta$  免疫組織化学にて、老人斑の密度やアミロイド陽性脳血管について画像解析し、AD と比較検討した。また 4 例の凍結脳、6 例の脳脊髄液 (cerebrospinal fluid: CSF)、および 105 例 (44+61 例) の血漿における A $\beta$  の主要分子種 (A $\beta$  40 および A $\beta$  42) の分別定量を、Suzuki らの開発したサンドイッチ ELISA 法 (4) にて施行した。一方、アポリポ蛋白 E

(apolipoprotein E: APOE) の allele  $\epsilon 4$  は AD の危険因子として知られており (5-6), アイソフォームによる作用の違いなども報告されている (7-8). 本研究では, 対象 DS105 例の APOE アイソフォームを同定し, 血漿  $A\beta$  分子種濃度と, APOE アイソフォームとの相関について検討した.

元来脳は, 神経細胞膜の不飽和脂肪酸やカテコールアミンなどの酸化を受けやすい物質が多量に存在することもあり, フリーラジカルを発生しやすい組織である. AD では過酸化脂質の蓄積や抗酸化物質の低下 (9) がみられ, 酸化刺激による過酸化脂質の蓄積が対照に比べ増加していたという一連の報告 (10-12) があり, DS においては早期より脳の酸化反応による障害が存在するといった報告がある (13). 一方, APOE は膜脂質輸送に関与しており, *in vivo* の実験ではアイソフォームによる抗酸化作用の違いが報告されている

(7). Tamaoka らは AD 脳について, 酸化刺激後の過酸化脂質の量は, APOE-E3/3, 3/4, 4/4 の順に増加しており, 抗酸化作用がこの順に低下していることを報告した (14). 本研究では, DS5 例の凍結脳について, チオバルビタール酸反応を用いた酸化刺激後の過酸化脂質の量を測定した. また, 過酸化脂質量と APOE アイソフォームとの関連性について, AD や対照と比較検討した.

## 1-2 対象と方法

対象:

DS 脳切片の老人斑免疫組織化学は成人 DS 5 例 (38-59 歳, mean  $\pm$  s.d.=50.4 $\pm$ 7.23 歳, 男:女=3:2) を, DS 凍結脳の  $A\beta$  分別定量

には 4 例 (51-59 歳,  $\text{mean} \pm \text{s.d.} = 54.5 \pm 3.70$  歳, 男 : 女 = 2 : 2) を用いた. CSF は, 成人 DS 6 例 (51-59 歳,  $\text{mean} \pm \text{s.d.} = 56.0 \pm 2.97$  歳, 男 : 女 = 2 : 4) より, インフォームドコンセントを得た後採取し, 測定時まで  $-20^{\circ}\text{C}$  に凍結保存した.

血液は, 2 グループに分けて採取した. 第 1 グループの DS 患者は 44 例 (19-61 歳,  $\text{mean} \pm \text{s.d.} = 44.1 \pm 7.57$  歳, 男 : 女 = 18 : 26), 正常対照 (normal Control: NC) は 66 例 (19-61 歳,  $\text{mean} \pm \text{s.d.} = 44.1 \pm 9.34$  歳, 男 : 女 = 35 : 31) であり, 第 2 グループの DS は 61 例 (17-58 歳,  $\text{mean} \pm \text{s.d.} = 26.0 \pm 8.12$  歳, 男 : 女 = 32 : 29), 精神遅滞患者 (mental retardation: MR) は 58 例 (11-54 歳,  $\text{mean} \pm \text{s.d.} = 31.6 \pm 11.0$  歳, 男 : 女 = 32 : 26), NC は 77 例 (18-58 歳,  $\text{mean} \pm \text{s.d.} = 32.0 \pm 11.1$  歳, 男 : 女 = 35 : 42) であった. すべての血液は血液凝固剤 ( $\text{EDTA-Na}_2$ ) 入りの真空管に採取され,  $1500 \times g$ , 10 分間 ( $4^{\circ}\text{C}$ ) の遠心によって血漿の分離が行われた. 血漿には 0.01%  $\text{NaN}_3$ , 0.5mM PMSF (phenylmethane-sulphonyl fluoride) を加え, 測定時まで  $-20^{\circ}\text{C}$  に凍結保存した.

方法 :

#### 1) 免疫組織化学

各症例の組織ブロックをホルマリンにて固定, 脱水後にパラフィン包埋し, ミクロトームで  $6 \mu\text{m}$  の切片にした. 切片を脱パラフィン後に 99% 蟻酸 30 秒で処理し, 水洗後 0.3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  20 分の前処置を行った. 正常ウマ血清にてブロッキング後, 1 次抗体として, A $\beta$  の C 末端認識抗体のうち, それぞれ A $\beta$  40, A $\beta$  42 を認識するモノクローナル抗体 BA27 (anti-A $\beta$  1-40,  $\times 1000$ ), または BC05 (anti-

A $\beta$  35-42,  $\times 4000$ ) を用い, 一昼夜 4℃ で反応させた. 二次抗体にはビオチン化抗マウス IgG 抗体 ( $\times 2000$ , Vector Labs. / Burlingame) を用い, 60 分室温で反応させた. 次に ABC 法 (Vectastatin ABC kit, Vector Labs.) により, 0.2mg/ml 3, 3'-diaminobenzidine (DAB), 0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> で発色した (図 1-1).

## 2) 老人斑の形態学的解析

形態学的解析はまず免疫組織化学の脳切片で関心領域を 100 倍で 3 領域を写真撮影した. 写真撮影に際し, BA27 と BC05 の免疫染色切片上で同一領域を選んだ. キャビネ大の写真を Scanner-computer system (EPSON TWAIN Pro, Power Macintosh G3) で gray scale digital image に変換した. コントラストと明るさを標準化した後, artifacts を画像解析ソフトウェア (NIH imaging 1.61, Adobe Photoshop 5.5J) にて除去した. この時, 同時に血管アミロイドを含む老人斑以外の染色部位を取り除いた. BA27 または BC05 染色部分の面積を計測し, 全画面に対する比率として求めた (% area, %). また, 顕微鏡スケールから画像の実面積を計算し, 老人斑の個数を単位面積あたりの個数で求めた (density, 個/mm<sup>2</sup>). 染色された髄膜血管数については, 血管のみられる脳回を中心に, 1 症例につき 3 領域撮影し, 老人斑の解析と同様にコンピューターに取り込んだ. 画像上から大脳皮質表層脳溝の長さを測定し, 染色反応陽性の髄膜血管の個数を求め, 脳溝 1mm あたりのアミロイド陽性脳髄膜血管の個数を求めた.

### 3) A $\beta$ 定量

脳；-80℃に凍結保存された4例のDS患者剖検脳の側頭葉皮質（約0.5g）に3倍容量の99%蟻酸を加え、テフロン製ホモジェナイザーにて10回上下にホモジェナイズし、更に超音波破碎器（Seiko 7040／Tokyo）で10秒間、2回破碎した。次に100,000×g、4℃にて15分間遠心分離（rotor TLA100.3，Beckman／Palo Alto）を行ない、上清（蟻酸可溶画分）を得た。1規定NaOHで中和した脳蟻酸抽出物上清中のA $\beta$  1-40、A $\beta$  1-42、A $\beta$  x-40、A $\beta$  x-42（A $\beta$ のN末端が1位で始まるものをA $\beta$  1-、側鎖が修飾されたり、N末端が切断されたものを総称してA $\beta$  x-と記す）をサンドイッチELISAにて分別定量した。

CSF；-20℃に凍結保存された脳脊髄液は解凍後20倍にBuffer EC（0.02M phosphate buffer (pH7.0), 0.4M NaCl, 2mM EDTA, 10% Block Ace（大日本製薬／東京）, 0.2% Bovine Serum Albumin, 0.05% NaN<sub>3</sub>, 0.075% CHAPS）で希釈し、A $\beta$  1-40、A $\beta$  1-42、A $\beta$  x-40、A $\beta$  x-42を分別定量した。

血漿；-20℃に凍結保存された血漿は解凍後希釈せずに、第1グループの血漿はマウスIgG吸収試験後、A $\beta$  1-40、A $\beta$  1-42を、第2グループの血漿はそのままA $\beta$  x-40、A $\beta$  x-42を測定した。

マウスのIgG吸収試験は、A $\beta$ のN末端を認識するモノクローナル抗体BAN50（anti-A $\beta$  1-16）や、A $\beta$ のC末端認識抗体のうちA $\beta$  42を認識するBC05（anti-A $\beta$  35-42）と非特異的に結合する血漿間反応物を除去するために行なった。血漿1mlにつき0.05mlのMouse IgG whole molecule-Agarose（Jackson Immuno Research Labs.／West

Grove) を加え, 4℃で 4 時間ゆっくり攪拌した. 12,500×g, 10 分 (4℃) 遠心の後この上清を回収した. また, スタンダード合成ペプチド A $\beta$  1-40, A $\beta$  1-42 (Bachem/Torrance) も同様の吸収実験を施行した (図 1-2).

#### 4) サンドイッチ ELISA 法 ;

A $\beta$  の N 末端認識抗体 (固相化抗体) として, A $\beta$  1-16 に対するモノクローナル抗体 BAN50, または A $\beta$  11-28 に対するモノクローナル抗体 BNT77 を使用し, C 末端認識抗体 (標識抗体) として A $\beta$  1-40 に対するモノクローナル抗体 BA27, または A $\beta$  35-42 に対するモノクローナル抗体 BC05 を使用した (図 1-2). まず BAN50 または BNT77 を固相化したイムノプレート (Nunc/Rochester) にスタンダード合成ペプチド A $\beta$  1-40, A $\beta$  1-42 および各サンプルを 100  $\mu$ l ずつのせて 4℃で一晩静置した. Phosphate buffer saline (PBS) で洗浄後, HRP 標識抗体である BA27, BC05 を 100  $\mu$ l ずつのせて 4℃で一晩静置した. PBS で洗浄後, TMB Microwell Peroxidase Substrate System (Kirkegaard & Perry Labs./Gaithersburg)により発色させた. この反応を 1M のリン酸 (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) で停止し, プレートリーダーで OD 450nm の吸光度を測定し, スタンダードペプチドの容量反応曲線から, サンプルの各 A $\beta$  量を計算した. BAN50 の系で A $\beta$  1-40, A $\beta$  1-42 を, BNT77 の系で A $\beta$  x-40, A $\beta$  x-42 をそれぞれ分別定量した.

## 5) 脳過酸化脂質の測定

過酸化脂質の実験はチオバルビタール酸反応 (thiobarbituric acid reaction) を用いて、標準資料としてのマロンデアルデヒド (malondealdehyde: MDA) の検出量を、過酸化脂質生成の指標であるチオバルビタール酸反応物質 (thiobarbituric acid reactive substance: TBARS) 値とした (15)。DS5 例の凍結脳側頭葉皮質 0.2g を、氷冷した 0.9%生理食塩水で洗浄後、50mM Tris-HCl (TS, pH7.6) 4ml を加えて 10 回ホモジェナイズした。1 症例 0.5ml のホモジェナイズド溶液に対し、酸化刺激物として 2mM  $\text{FeSO}_4$  と 200mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  を添加した系と酸化刺激物を加えない系とを用意し、震盪インキュベートした (37℃, 90 分)。インキュベート後、ガラス試験管にそれぞれのサンプルと 0.8%チオバルビタール酸 (TBA) 溶液 0.75ml, 8.1% SDS 0.1ml, 20%酢酸 0.75ml と脱イオン水を加え、総量 2ml とした。攪拌後、95℃の湯浴で 60 分反応させ、冷却後脱イオン水 0.5ml, 1-ブタノール:ピリジン (15:1) 混合液を加えて攪拌後、遠沈した (1000 ×g, 15 分, 4℃)。その上層を取り、532nm の吸光度を測定した (図 1-3)。

各症例での酸化刺激を加えない基礎 TBARS 値, 酸化刺激後の TBARS 値, 酸化刺激により増加した TBARS 値を Tamaoka らの報告した AD, 対照群の値 (14) と、対応のない t 検定 (Student's t-test) にて比較検討した。また、それぞれの APOE アイソフォーム別の値を比較した。



## 6) APOE のアイソフォーム同定

等電点電気泳動法 (16) を用いたフェノタイピングキット (常光／東京) を用いて、対象の血漿より同定した。一部の症例では凍結脳より DNA を抽出し、Hixon らの方法 (17) を用いて、制限酵素 Hha I で消化した後、電気泳動にて APOE アイソフォームを同定した。

## 7) 蛋白定量

BCA protein assay kit (PIECE／Rockford) を用いて、脳の TS 抽出物より測定した (18)。

## 1-3 結果

### 1) DS 患者プロフィール

APOE アイソフォームは、脳の免疫組織化学および過酸化脂質測定を施行した DS 5 例は APOE-E3/3 : 4 例, 4/4 : 1 例であった。脳 A $\beta$  を測定した DS 4 例は APOE-E3/3 : 3 例, 4/4 : 1 例であった。髄液 A $\beta$  測定を施行した 6 例では APOE-E2/2 : 1 例, 3/3 : 4 例, 3/4 : 1 例であった。血漿 A $\beta$  を測定した 105 例のうち、第 1 グループの DS 44 例の内訳は APOE-E2/3 : 2 例, 3/3 : 32 例, 3/4 : 8 例, 4/4 : 2 例であり、NC 66 例は APOE-E2/3 : 1 例, 2/4 : 2 例, 3/3 : 47 例, 3/4 : 12 例, 4/4 : 2 例であった (2 例は未同定)。第 2 グループの DS 61 例の内訳は APOE-E2/3 : 5 例, 3/3 : 42 例, 3/4 : 14 例であった (表 1-1)。

## 2) 老人斑画像解析

老人斑面積比 (%area, %) ; DS5 症例の平均は, BA27(A $\beta$  40 を認識する抗体)陽性が  $2.39 \pm 2.97$  (% , mean $\pm$ s.d.), BC05 (A $\beta$  42 を認識する抗体) 陽性が  $3.08 \pm 1.39$  (% , mean $\pm$ s.d.)であるのに対し, 比較した孤発性 AD (sporadic AD: SAD) 14 例は, BA27 が  $0.27 \pm 0.96$  (% , mean $\pm$ s.d.), BC05 が  $3.30 \pm 1.28$  (% , mean $\pm$ s.d.) であった.

1mm<sup>2</sup> 単位当たりの老人斑数 (density, 個/mm<sup>2</sup>) DS5 症例では, BA27 陽性が  $19.6 \pm 12.8$  (個/mm<sup>2</sup>, mean $\pm$ s.d.), BC05 陽性が  $36.6 \pm 13.3$  (個/mm<sup>2</sup>, mean $\pm$ s.d.) であるのに対し, SAD14 例では, BA27 が  $8.65 \pm 4.79$  (個/mm<sup>2</sup>, mean $\pm$ s.d.), BC05 が  $40.4 \pm 14.9$  (個/mm<sup>2</sup>, mean $\pm$ s.d.) であった. t 検定 (Student's t-test) を用いて統計学的に解析すると, DS と AD 間において, %area (\* $p=0.026$ ), density (\*\* $p=0.046$ ) とともに A $\beta$  40 は DS が有意に増加していたが, A $\beta$  42 では両者の間に有意差を認めなかった.

A $\beta$  40 陽性血管と A $\beta$  42 陽性血管 ; DS 5 例では, A $\beta$  40 陽性血管が  $4.65 \pm 2.09$  mm/ surface length, A $\beta$  42 陽性血管が  $5.37 \pm 3.16$ mm/ surface length (mean $\pm$ s.d.)であった. SAD14 例では, A $\beta$  40 陽性血管が  $1.05 \pm 0.28$ /mm surface length, A $\beta$  42 陽性血管は  $0.08 \pm 0.06$ /mm surface length (mean $\pm$ s.d.). DS において A $\beta$  40 陽性血管 ( $^{\#}p=0.019$ ) および A $\beta$  42 陽性血管 ( $^{\#\#}P=0.020$ ) が有意に増加していた (表 1-2).

## 3) ELISA による A $\beta$ 分別定量

脳 A $\beta$  ; DS4 例の平均は A $\beta$  1-40 : ( $99.2 \pm 55.4$ nmol/ g wet tissue),

A $\beta$  1-42 : (4.66 $\pm$ 1.65nmol/ g wet tissue), A $\beta$  x-40 : (111 $\pm$ 52.1nmol/ g wet tissue) A $\beta$  x-42 : (97.0 $\pm$ 38.8nmol/ g wet tissue) であった. SAD6 例の平均は A $\beta$  1-40 : (2.81 $\pm$ 4.42nmol/ g wet tissue), A $\beta$  1-42 : (4.06 $\pm$ 1.65nmol/ g wet tissue), A $\beta$  x-40 : (4.89 $\pm$ 6.82nmol/ g wet tissue), A $\beta$  x-42 : (36.6 $\pm$ 9.40nmol/ g wet tissue) (mean $\pm$ s.d.)であった. DS 脳では A $\beta$  1-40 (\* $p$ =0.002), A $\beta$  x-40 (\*\* $p$ =0.0009), A $\beta$  x-42 (\*\* $p$ =0.0055) が SAD より著明に増加しており A $\beta$  との間で有意差がみられた (表 1-3 A).

髄液 A $\beta$  ; DS6 例の平均は A $\beta$  1-40 : 1837 $\pm$ 1065 (pM), A $\beta$  1-42 : 170.8 $\pm$ 101.7 (pM), A $\beta$  x-40 : 2320 $\pm$ 828.5 (pM), A $\beta$  x-42 : 221.2 $\pm$ 132.4 (pM) であった. SAD 20 例のそれぞれの平均は, A $\beta$  1-40 : 1530 $\pm$ 554 (pM), A $\beta$  1-42 : 164 $\pm$ 83.2 (pM), A $\beta$  x-40 : 2390 $\pm$ 1030 (pM) A $\beta$  x-42 : 219 $\pm$ 101 (pM) であり, AD に年齢と性を合わせた対照 34 例の平均は A $\beta$  1-40 : 520 $\pm$ 616 (pM), A $\beta$  1-42 : 323 $\pm$ 165 (pM), A $\beta$  x-40 : 2650 $\pm$ 1420 (pM) A $\beta$  x-42 : 332 $\pm$ 178 (pM) (mean $\pm$ s.d.) であった. DS の髄液 A $\beta$  1-42 (\* $p$ =0.036) は対照に比べて有意に低下していた (表 1-3B).

血漿 A $\beta$  ; [第 1 グループの血漿中における A $\beta$  分子種濃度] まず, スタンダードペプチドでの吸収実験を行い, A $\beta$  分子種が IgG-Agarose に吸収されないことを確認した. DS, NC 間における A $\beta$  40 (\* $p$ <0.0001), A $\beta$  42 (\*\*  $p$ <0.0001) 各分子種量は, いずれも DS で有意に高かった (Fisher's PLSD による検定). DS45 例について, A $\beta$  40, A $\beta$  42 濃度は, APOE の各表現型間において有意差を認め

なかった (図 1-4).

[第 2 グループ血漿中における  $A\beta$  分子種濃度] DS と MR 間, DS と NC 間における  $A\beta 40$  ( $*p<0.0005$ ),  $A\beta 42$  ( $**p<0.0005$ ) の各分子種量は, いずれも DS で有意に高かった. DS61 例について,  $A\beta 40$ ,  $A\beta 42$  濃度は,  $A\beta 42$  において, 症例数が少ない ( $N=5$ ) APOE-E2/3 を除けば, APOE の各アイソフォーム間において有意差を認めなかった (図 1-5).

#### 4) 過酸化脂質測定

DS5 例の, 酸化刺激を加えない基礎 TBARS 値は  $4.931 \pm 1.371$  nmol/mg protein (mean  $\pm$  s.d.), 酸化刺激後の TBARS 値は  $11.35 \pm 5.439$  nmol/mg protein (mean  $\pm$  s.d.), 酸化刺激による増加した TBARS 値は  $6.422 \pm 4.107$  nmol/mg protein (mean  $\pm$  s.d.) であった. Tamaoka らの報告 (14) した対照群との比較で, 基礎 TBARS 値 ( $*p=0.043$ ) 酸化刺激後 TBARS 値 ( $**p=0.001$ ) および酸化刺激により増加した TBARS 値 ( $***p=0.00025$ ) は有意に増加していた. 一方, AD との比較では, いずれの TBARS 値にも有意差は認められなかった.

APOE アイソフォーム別の比較では, APOE-E3/3 を有する DS 4 例の基礎 TBARS 値は  $4.832 \pm 1.362$  nmol/mg protein (mean  $\pm$  s.d.), 酸化刺激後 TBARS 値は  $10.65 \pm 6.012$  nmol/mg protein (mean  $\pm$  s.d.), 酸化刺激により増加した TBARS 値は  $5.816 \pm 4.477$  nmol/mg protein (mean  $\pm$  s.d.) であった. APOE-E3/3 を保有する対照 13 例の TBARS 値はそれぞれ  $3.361 \pm 1.135$  nmol/mg protein (mean  $\pm$  s.d.),  $4.642 \pm 2.002$  nmol/mg protein (mean  $\pm$  s.d.),  $1.281 \pm 0.988$  nmol/mg protein (mean  $\pm$

s.d.) であり, 基礎 TBARS 値 (\*\* $p=0.046$ ), 酸化刺激後 TBARS 値 (\*\* $p=0.005$ ), 酸化刺激により増加した TBARS 値 (\*\* $p=0.003$ ) と, いずれの TBARS 値も DS で有意に増加していた. 一方, APOE-E3/3 を保有する AD との比較では, いずれの TBARS 値の有意差は認められなかった (表 1-4, 図 1-6, 7, 8).

#### 1-4 考察

DS は第 21 番染色体のトリソミーであるため, APP の過剰発現があり (19), その結果  $A\beta$  の産生, 沈着が AD に比べて早い段階で出現し, かつ亢進していると推測される. 従って DS では AD の病的過程が増幅しているものと考えられ, AD の発症機序解明の有用なモデルであると考えられる. 免疫組織化学における画像解析では, DS の老人斑面積比と密度は  $A\beta 40$  が, アミロイド沈着血管は  $A\beta 40$ ,  $A\beta 42$  の両者が AD に比べて有意な増加を示した. これは ELISA にて DS の脳  $A\beta$  分子種で  $A\beta 40$  が AD より有意に増加していた結果と一致していた. 一方, Iwatsubo らによる DS の脳免疫組織化学による老人斑の画像解析の結果は, 面積比と密度は  $A\beta 42$  が優位に, アミロイド沈着血管は  $A\beta 40$  が優位に, いずれの  $A\beta$  分子種の増加が認められたという報告 (20) であり, 本研究の傾向と一致はしなかった.  $A\beta$  免疫活性の優位性については, 本研究での DS の症例数が少ないことや, 痴呆発症のステージングの違いなどの影響を考慮する必要がある, 今後症例を増やして更に検討する必要があると考えられた.

CSF の  $A\beta 1-40$  濃度が対照に比べ低下していたことは, Tamaoka

ら (21) や Motter ら (22) の AD-CSF についての従来の報告に一致していた。この結果は、DS においても CSF-A $\beta$ 42 の脳への吸着亢進や、脳より CSF への A $\beta$ 42 の分泌が低下していると考えられた。

DS 血漿では対照に比べ、A $\beta$ 40 と A $\beta$ 42 の有意な増加が認められたが、A $\beta$ 40 は対照の約 3 倍、A $\beta$ 42 は対照の約 2 倍と A $\beta$ 40 優位な増加が示された (23)。このことは、DS 脳で A $\beta$ 40 優位に増加していた結果と一致していたが、Mehta らは、DS 血漿では A $\beta$ 42 が優位に増加していると報告しており (24) 本研究の結果に一致しなかった。一方、Matsubara らは、DS の血漿中ではリポ蛋白フリーの A $\beta$ 40 および A $\beta$ 42 いずれも増加していたと報告しており (25)、DS 血漿の A $\beta$  分子種の量的優位性に関しては今後更に検討を要すると考えられた。生物学的には A $\beta$ 40 が優位であり、DS においては APP の遺伝子量の増加以外にも、第 21 番染色体上に存在する BACE2 による A $\beta$  の N 末端の切断が亢進している可能性を考えると、A $\beta$ 40 優位に産生亢進がみられる可能性が高いと考えられる。

血漿 A $\beta$  分子種と APOE アイソフォームとの相関に関しては、DS、AD いずれにおいても APOE-E4 の有無による有意差は得られず、AD の危険因子と考えられる APOE-E4 は A $\beta$  産生・分泌促進に寄与する可能性は否定的であった。

脳の過酸化脂質に関しては、AD 脳において Fe<sup>2+</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> や Fe<sup>2+</sup>/ascorbate の刺激によるフリーラジカルの産生があると、TBARS 値が対照に比べて増加することが従来報告されている (26-28)。本研究において、各症例脳の死亡から凍結までの時間はほぼ 5 時間と一定しており、保存状態も均一であり、空気酸化の個体差は無視でき

ると考えられた。DS と AD の比較では、基礎 TBARS 値、酸化刺激後 TBARS 値、酸化刺激により増加した TBARS 値に有意差はみられなかったが、一方、DS と対照の比較では基礎 TBARS 値、酸化刺激後 TBARS 値、酸化刺激により増加した TBARS 値いずれの値にも有意差を認めた。このことは DS 脳 では AD 同様に脳の酸化ストレスの亢進や酸化刺激に対する脆弱性があることを示唆する。

本研究では、老人斑の画像解析による A $\beta$  免疫活性や ELISA にる脳 A $\beta$  量が、SAD に比べて増加していたことが示されているが、DS と SAD 間では TBARS の有意差は認められず、脳内の過酸化脂質増加には A $\beta$  以外の要因の関与も示唆された。

A $\beta$  と酸化ストレスの関連について、Butterfield らは A $\beta$  自身がフリーラジカルを生成し、酸化ストレス誘導していること (29-31) を、また、Bush らは、A $\beta$  が Cu<sup>2+</sup>や Fe<sup>3+</sup>などの金属イオンを還元することにより、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> やフリーラジカルを発生させることを in vitro の実験にて報告している (32)。酸化ストレスに関する APOE アイソフォームの影響について、Miyata らは H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> などの細胞障害に対して、APOE-E2> E3> E4 の順に抗酸化作用を有することを in vivo の実験にて報告している (7)。Naiki らは in vitro において、APOE-E4 はその弱い抗酸化作用のために、結果的に老人斑内の A $\beta$  凝集を促進している可能性を指摘している (33)。本研究の結果で、APOE-E3/3 を保有する DS で、酸化刺激後の TBARS 値が APOE-E3/3 を保有する対照に比べて有意に増加していたことは、DS 脳内の酸化ストレスの亢進には、APOE-E4 以外の要因も考えられ、21 番染色体上の SOD-1 の影響も示唆された。

## 1-5 結論

(1) DS 脳では AD や対照に比べて、 $A\beta 40$ 、 $A\beta 42$  の免疫活性と分子種量の増加が認められ、特に  $A\beta 40$  の増加が優位であった。一方 DS の CSF  $A\beta 42$  は、AD の CSF 同様、対照に比べて低下しており、脳からの  $A\beta 42$  の分泌低下や CSF からの  $A\beta 42$  の脳への吸着の増加などが考えられた。

(2) DS の血漿  $A\beta$  分子種は正常対照に比べ有意な増加が認められ、特に  $A\beta 40$  に目立っていた。DS や AD の血漿  $A\beta$  と APOE アイソフォームとの相関は認められなかったことより、AD の危険因子と考えられる APOE4 は  $A\beta$  産生・分泌促進に寄与する可能性は否定的であった。

(3) DS 脳では過酸化脂質の増加がみられ、酸化ストレスの亢進や酸化刺激に対する脆弱性が示唆された。



## 第1章 引用文献

- (1) Prasher VP, Farrer MJ, Kessling AM, Fisher EM, West RJ, Barber PC, Butler AC, Prasher VP. Molecular mapping of Alzheimer-type dementia in Down's syndrome. *Ann Neurol*. 1998, 43: 380-383
- (2) Brooksbank BW, Balazs R. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase and lipoperoxidation in Down's syndrome fetal brain. *Brain Res* 1984, 318: 37-44
- (3) Oka A, Takashima S. Induction of cyclo-oxygenase 2 in brains of patients with Down's syndrome and dementia of Alzheimer's type: specific localization in affected and axons. *NeuroReport* 1997, 8:1161-1164
- (4) Suzuki N, Cheung TT, Cai XD, Odaka A, Otvos L Jr, Eckman C, Golde TE, Younkin SG. An increased percentage of long amyloid  $\beta$  protein secreted by familial amyloid  $\beta$ -protein precursor ( $\beta$  APP717) mutants. *Science* 1994, 264: 1336-1340
- (5) Ueki A, Kawano M, Namba Y, Kawakami M, Ikeda K. A high frequency of apolipoprotein E4 isoprotein in Japanese patients with late-onset nonfamilial Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1993, 163: 166-168
- (6) Tokuda T, Calero M, Matsubara E, Vidal R, Kumar A, Permanne B, Zlokovic B, Smith JD, Ladu MJ, Rostagno A, Frangione B, Ghiso J. Lipidation of apolipoprotein E influences its isoform-specific interaction with Alzheimer's amyloid beta peptides. *Biochem J* 2000, 348: 359-365
- (7) Miyata M, Smith JD. Apolipoprotein E allele-specific antioxidant activity and effects on cytotoxicity by oxidative insults and beta-amyloid peptides. *Nat Genet* 1996, 14: 55-61
- (8) Smith JD, Miyata M, Poulin SE, Neveux LM, Craig WY. The relationship between apolipoprotein E and serum oxidation-related variables is apolipoprotein E phenotype dependent. *Int J Clin Lab Res* 1998, 28: 116-121
- (9) Marcus DL, Thomas C, Rodriguez C, Simberkoff K, Tsai JS, Strafaci JA, Freedman ML. Increased peroxidation and reduced antioxidant enzyme activity in Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 1998, 150: 40-44
- (10) Tabaton M, Perry G, Smith M, Vitek M, Angelini G, Dapino D, Garibaldi S, Zaccheo D, Odetti P. Is amyloid beta-protein glycosylated in Alzheimer's disease? *Neuroreport* 1997, 8: 907-909
- (11) Russo C, Angelini G, Dapino D, Piccini A, Piombo G, Schettini G, Chen S, Teller JK, Zaccheo D, Gambetti P, Tabaton M. Opposite roles of apolipoprotein E in normal brains and in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, 95: 15598-15602

- (12) Smith MA, Hirai K, Hsiao K, Pappolla MA, Harris PL, Siedlak SL, Tabaton M, Perry G. Amyloid-beta deposition in Alzheimer transgenic mice is associated with oxidative stress. *J Neurochem* 1998, 70: 2212-2215
- (13) Odetti P, Angelini G, Dapino D, Zaccheo D, Garibaldi S, Dagna-Bricarelli F, Piombo G, Perry G, Smith M, Traverso N, Tabaton M. Early glycoxidation damage in brains from Down's syndrome. *Biochem Biophys Res Commun* 1998, 243: 849-851
- (14) Tamaoka A, Miyatake F, Matsuno S, Ishii K, Nagase S, Sahara N, Ono S, Mori H, Wakabayashi K, Tsuji S, Takahashi H, Shoji S. Apolipoprotein E allele-dependent antioxidant activity in brains with Alzheimer's disease. *Neurology* 2000, 54: 2319-2321.
- (15) Yagi K. Simple assay for the level of total lipid peroxides in serum or plasma. *Method mol Biol* 1998, 108: 101-106
- (16) Kataoka S, Paidi M, Howard BV. Simplified isoelectric focusing/immunoblotting determination of apoprotein E phenotype. *Clin Chem* 1994, 40: 11-13
- (17) Hixon JE, Venier DT. Restriction Isotyping of human apolipoprotein E by fine amplification and cleavage with Hha I. *J Lipid Res* 1990, 31: 545-548
- (18) Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985, 150: 76-85
- (19) Teller JK, Russo C, DeBusk LM, Angelini G, Zaccheo D, Dagna-Bricarelli F, Scartezzini P, Bertolini S, Mann DMA, Tabaton M, Gambetti P. Presence of soluble amyloid  $\beta$  peptide precedes amyloid plaque formation in Down's syndrome. *Nature Med* 1996, 2: 93-95
- (20) Iwatsubo T, Mann DMA, Odaka A, Suzuki N, Ihara Y. Amyloid  $\beta$ -protein (A $\beta$ ) deposition: A $\beta$  42(43) precedes A $\beta$  40 in Down syndrome. *Ann Neurol* 1995, 37:294-299
- (21) Tamaoka A, Sawamura N, Fukushima T, Shoji S, Matsubara E, Shoji M, Hirai S, Furiya Y, Endo R, Mori H. Amyloid beta protein 42(43) in cerebrospinal fluids of patients with Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 1997, 148: 41-45
- (22) Motter R, Vigo-Pelfrey C, Kholodenko D, Barbour R, Johnson-Wood K, Galasko D, Chang L, Miller B, Vlack C, Green R, Olson D, Southwick P, Wolfert R, Munroe B, Lieberburg I, Seubert P, Schenk D. Reduction of  $\beta$ -amyloid 42 in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1995, 36: 903-911

- (23) Tokuda T, Fukushima T, Ikeda S, Sukijima Y, Shoji S, Yanagisawa N, Tamaoka A. Plasma levels of amyloid  $\beta$ -proteins A $\beta$  1-40 and A $\beta$  1-42(43) are elevated in Down's syndrome. *Ann Neurol* 1997, 41: 271-273
- (24) Mehta PD, Dalton AJ, Mehta SP, Kim KS, Sersen EA, Wisniewski HM. Increased plasma amyloid beta protein 1-42 levels in Down syndrome. *Neurosci Lett* 1998, 241: 13-16
- (25) Matsubara E, Ghiso J, Frangione B, Amari M, Tomidokoro Y, Ikeda Y, Harigaya Y, Okamoto K, Shoji M. Lipoprotein-free amyloidogenic peptides in plasma are elevated in patients with sporadic Alzheimer's disease and Down's syndrome. *Ann Neurol* 1999, 45: 537-541
- (26) Hajimohammadreza I, Brammer M. Brain membrane fluidity and lipid peroxidation in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1990, 112: 333-337
- (27) Palmer AM, Burns MA. Selective increase in lipid peroxidation in the inferior temporal cortex in Alzheimer's disease. *Brain Res* 1994, 654: 338-342
- (28) Subbarao KV, Richardson JS, Ang LC. Autops samples of Alzheimer's cortex show increased peroxidation in vitro. *J Neurochem* 1990, 55: 342-345.
- (29) Hensley K, Carney JM, Mattson MP, Aksenova M, Harris M, Wu JF, Floyd RA, Butterfield DA. A model of beta-amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: relevance to Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, 91: 3270-3274
- (30) Hensley K, Aksenova M, Carney JM, Harris M, Butterfield DA. Amyloid  $\beta$  peptide spin trapping I: peptide enzyme toxicity is related to free radical spin trap reactivity. *Neuroreport* 1995, 6: 489-492
- (31) Hensley K, Aksenova M, Carney JM, Harris M, Butterfield DA. Amyloid  $\beta$  peptide spin trapping II: evidence for decomposition of the PBN spin adduct. *Neuroreport* 1995, 6: 493-496
- (32) Huang X, Atwood CS, Harshorn MA, Multhaup G, Goldstein LE, Scarpa RC, Cuajungco MP, Gray DN, Lim J, Moir RD, Tanzi RE, Bush AI. The A $\beta$  peptide of Alzheimer's disease directly produces hydrogen peroxide through metal ion reduction. *Biochemistry* 1999, 38: 7609-7616
- (33) Naiki H, Hasegawa K, Yamaguchi I, Gejyo F, Nakakuki K. Apolipoprotein E and antioxidants have different mechanisms of inhibiting Alzheimer's  $\beta$ -amyloid fibril formation in vitro. *Biochemistry* 1998, 37: 17882-17889

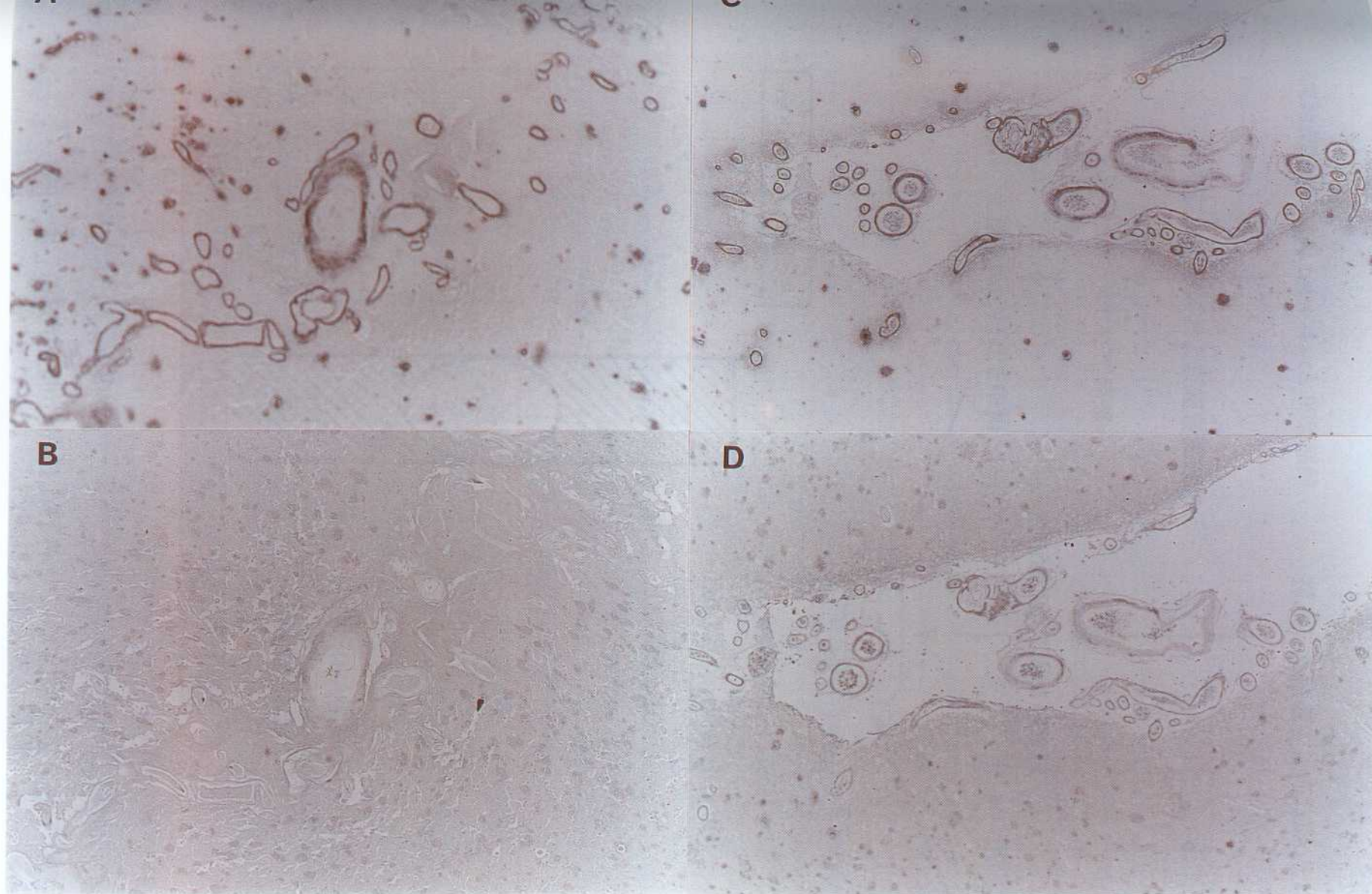
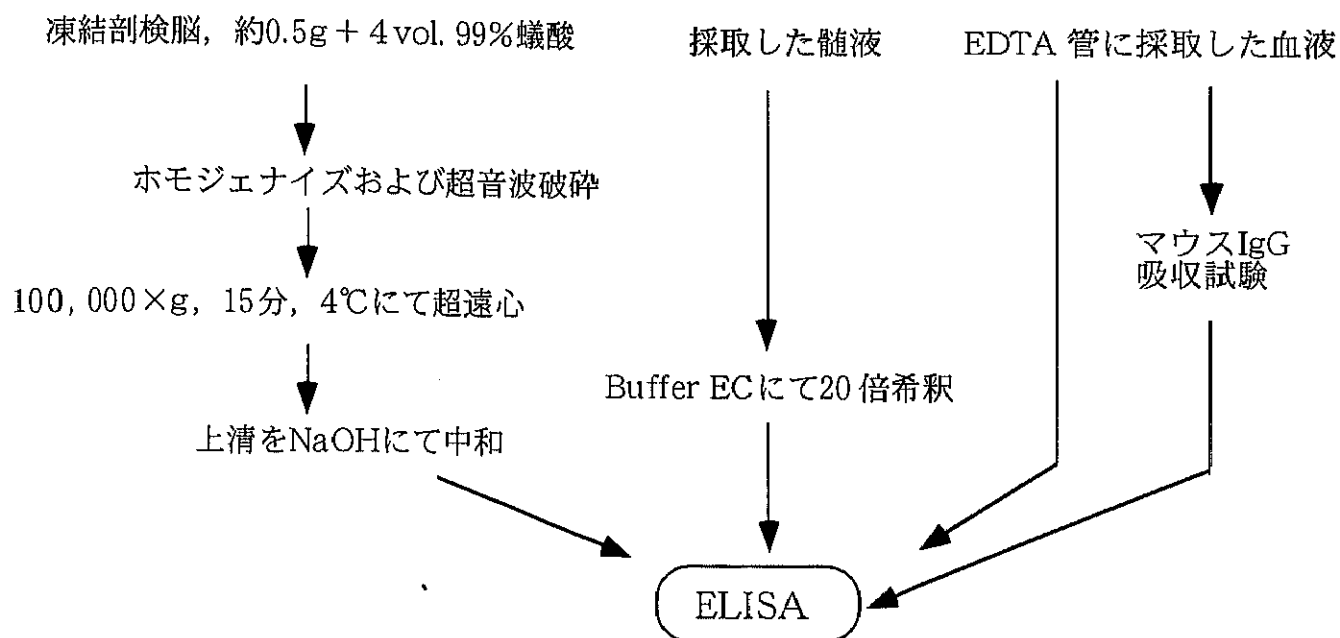


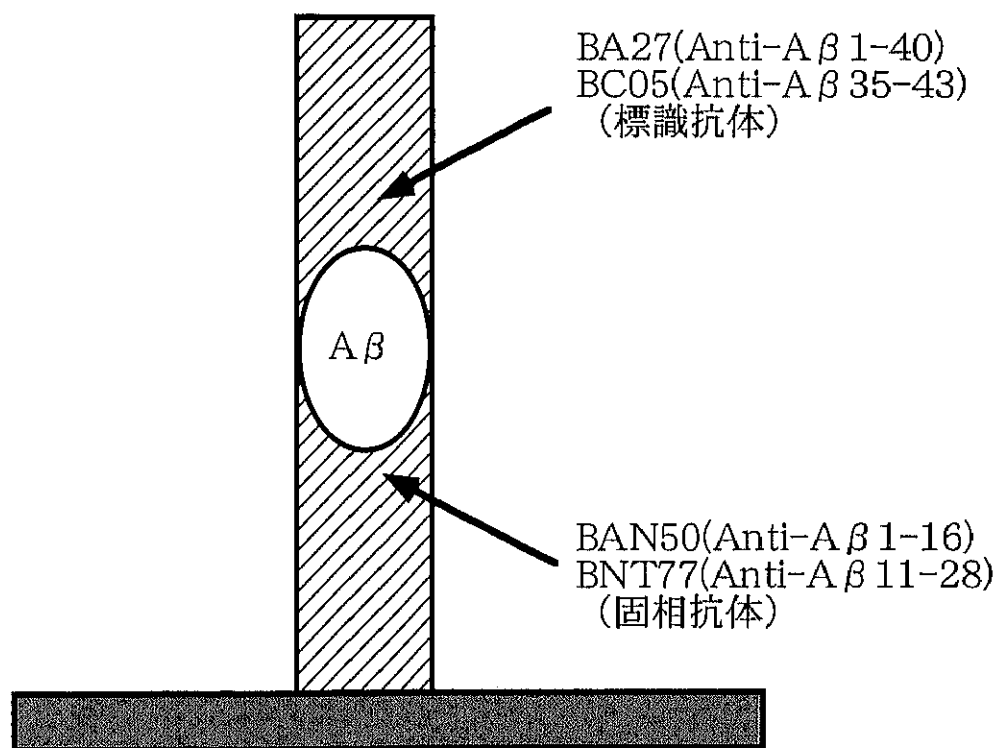
図 1-1 ダウン症候群患者大脳皮質免疫組織染色

A (51 歳/F) : A $\beta$  40 (BA27), B (51 歳/F) : A $\beta$  42 (BC05)

C (55 歳/F) : A $\beta$  40 (BA27), D (55 歳/F) : A $\beta$  42 (BC05)



sandwich ELISA



(Suzuki N et al. 1994, Science)

図1-2 脳A $\beta$ 抽出法および各サンプル中のA $\beta$ 分子種  
sandwich ELISAによる測定法と原理

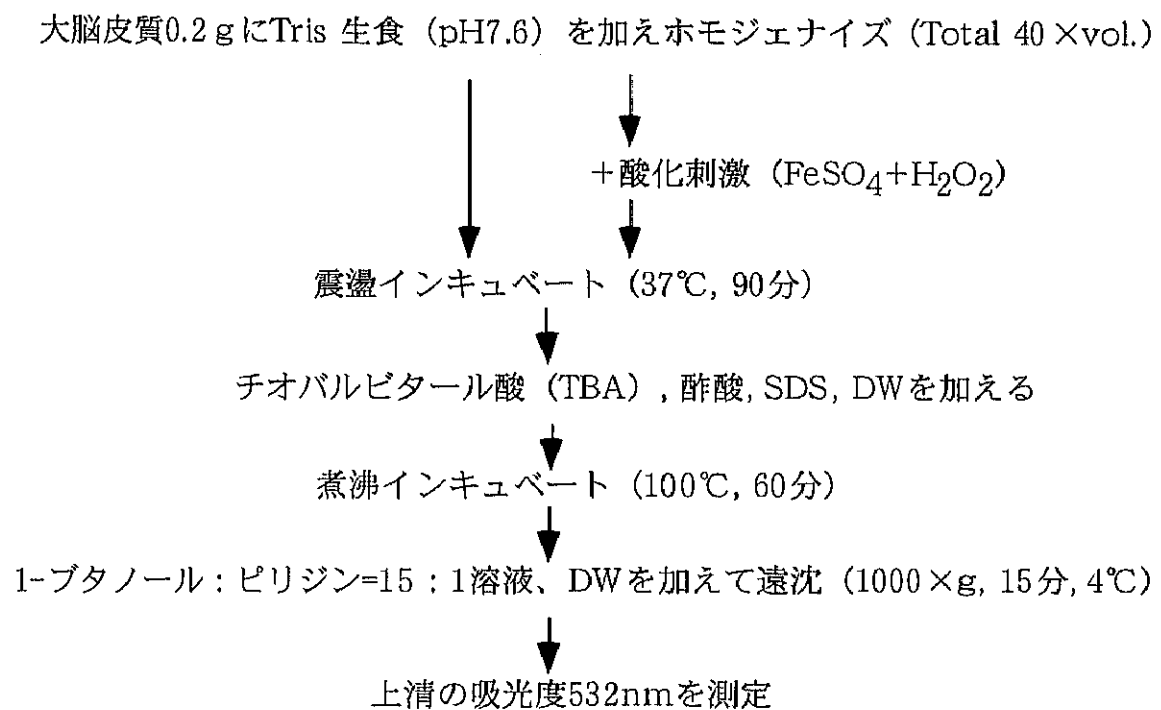


図1-3 TBARS測定法

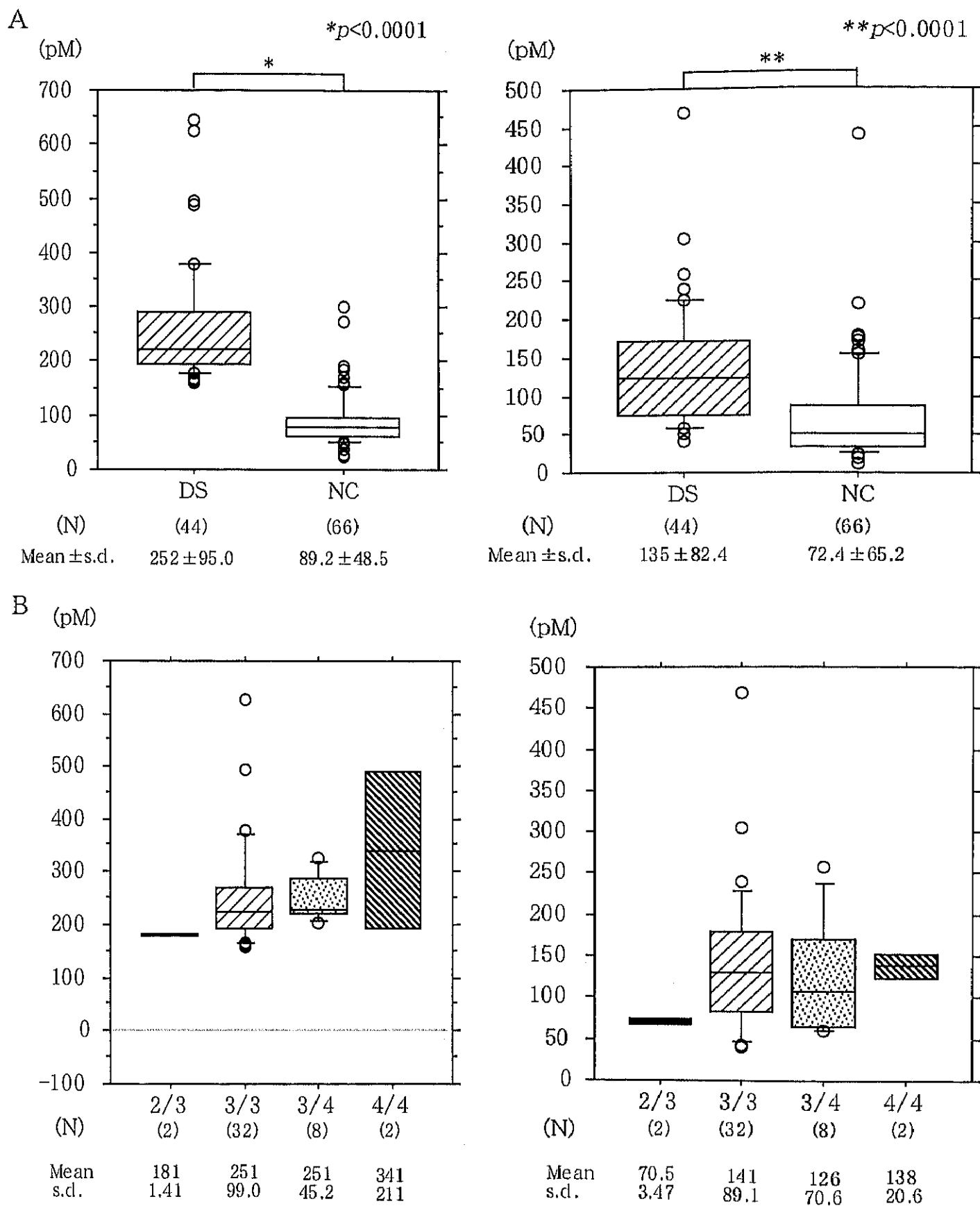


図1-4 DS、NCにおけるマウスIgG吸収後の血漿中A $\beta$ 分子種濃度

A；各分子種濃度ともDSではNCに比較して、有意に増加していた（Fisher's PLSD）。

B；DS 44例のAPOEアイソフォーム別A $\beta$ 分子種濃度。各アイソフォームによる有意差は認められなかった。DS：ダウン症候群，NC：正常対照

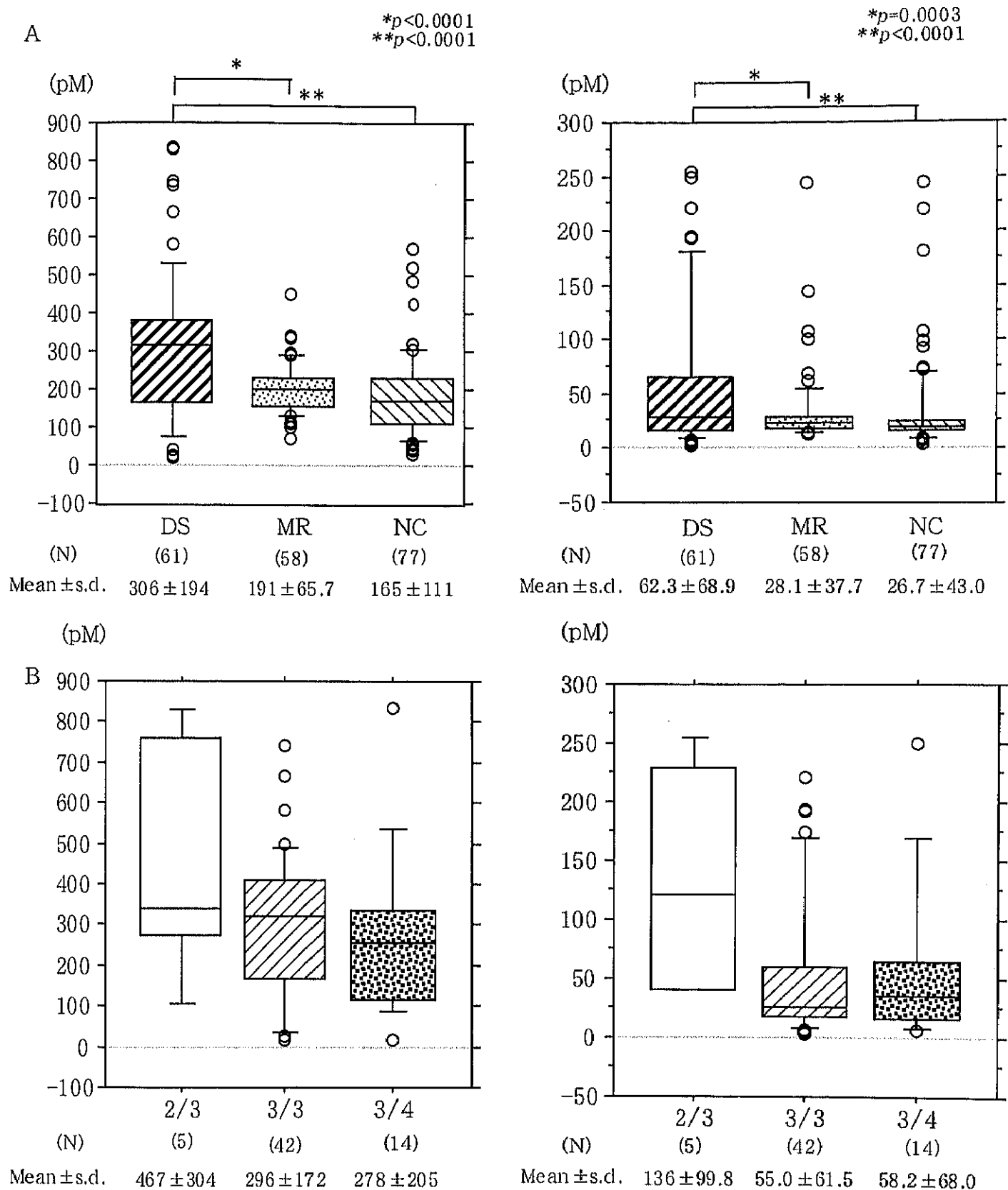


図1-5 DS, MR, NC における血漿中A $\beta$ 分子種濃度

A ; DSではMR, NC に比べて有意に増加していた(Fisher's PLSD).

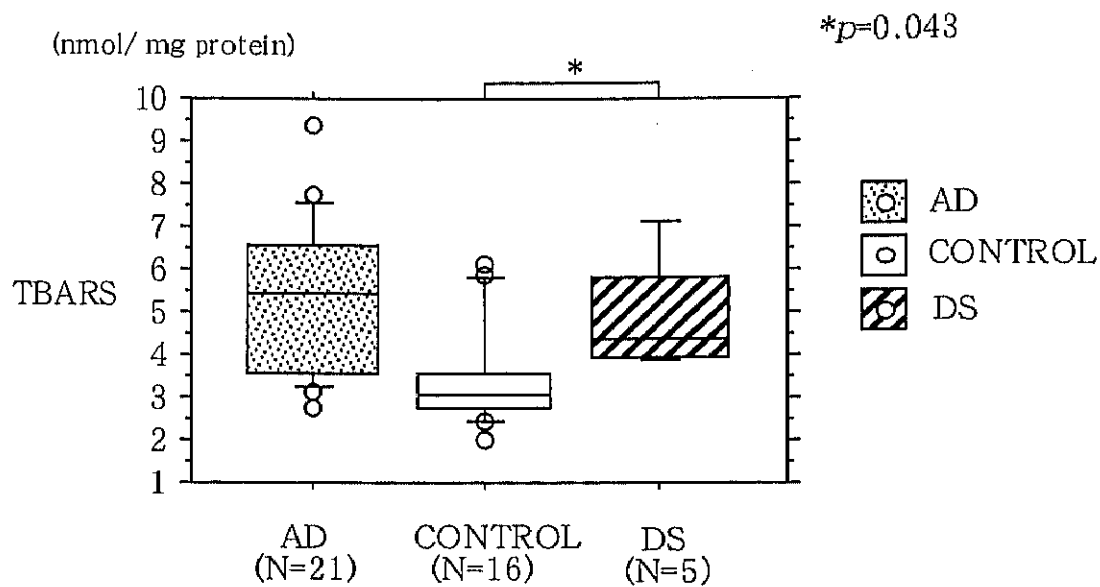
B ; DS61例におけるAPOE アイソフォーム血漿中A $\beta$ 分子種濃度.

A $\beta$  40およびA $\beta$  42濃度は, 少数例 (N=5) のAPOE-E2/3の平均値が高いが, APOE-E3/3とAPOE-E3/4 間の有意差は認められなかった.

DS : ダウン症候群, MR : 精神遅滞, NC : 正常対照



## A 総サンプルでの比較



## B APOEアイソフォーム別での比較

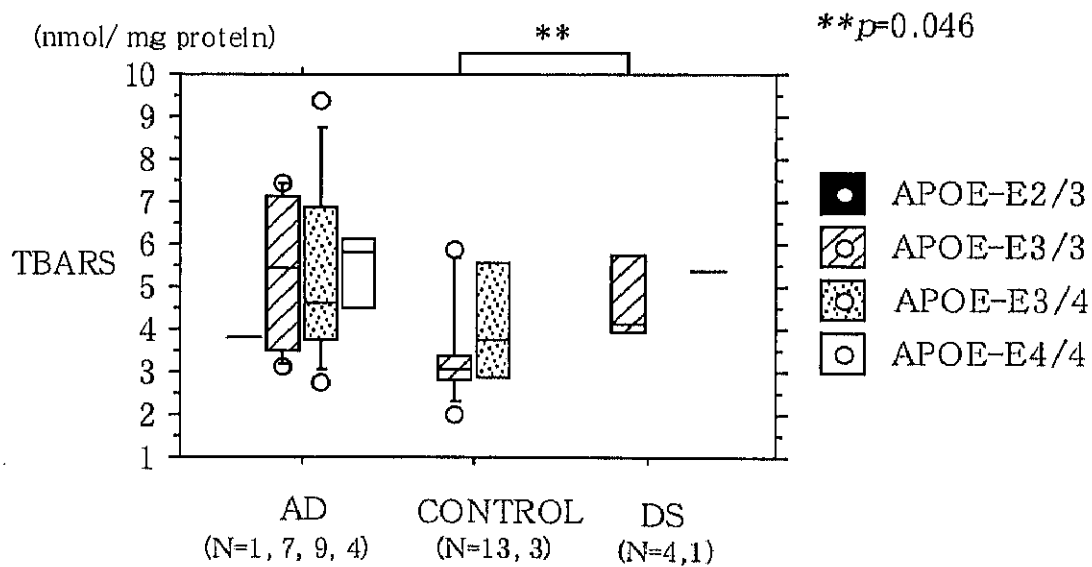


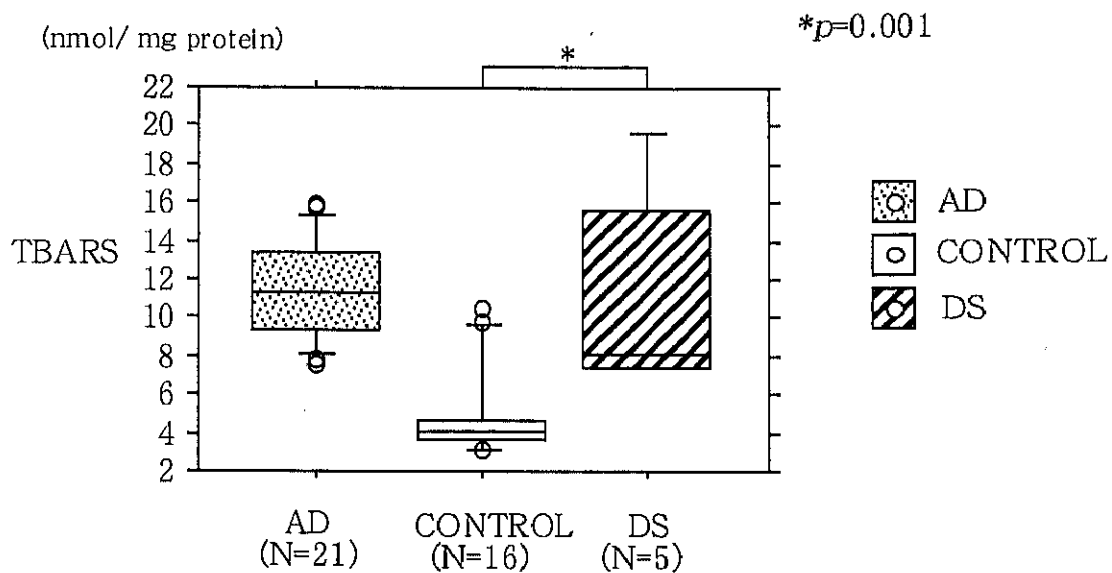
図1-6 基礎TBARS 値

A : DSでは対照に比べて有意に増加していた.

B : APOEアイソフォーム別では, APOE-E3/3を保有するDSはAPOE-E3/3を保有する対照に比べ有意に増加していた.

AD : Alzheimer 病, CONTROL : 対照, DS : ダウン症候群

## A 総サンプルでの比較



## B APOEアイソフォーム別での比較

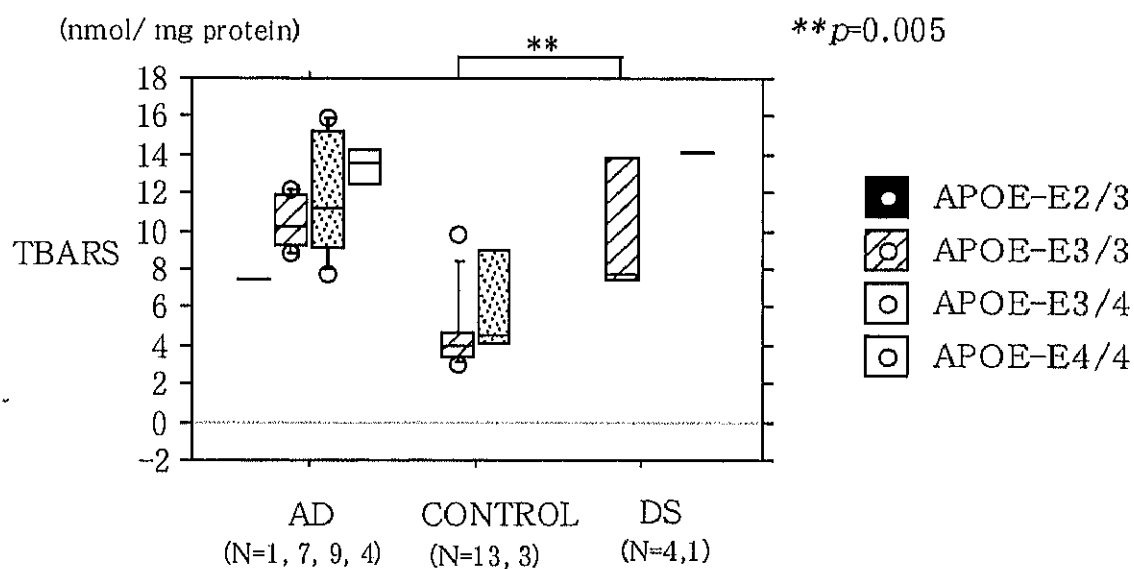


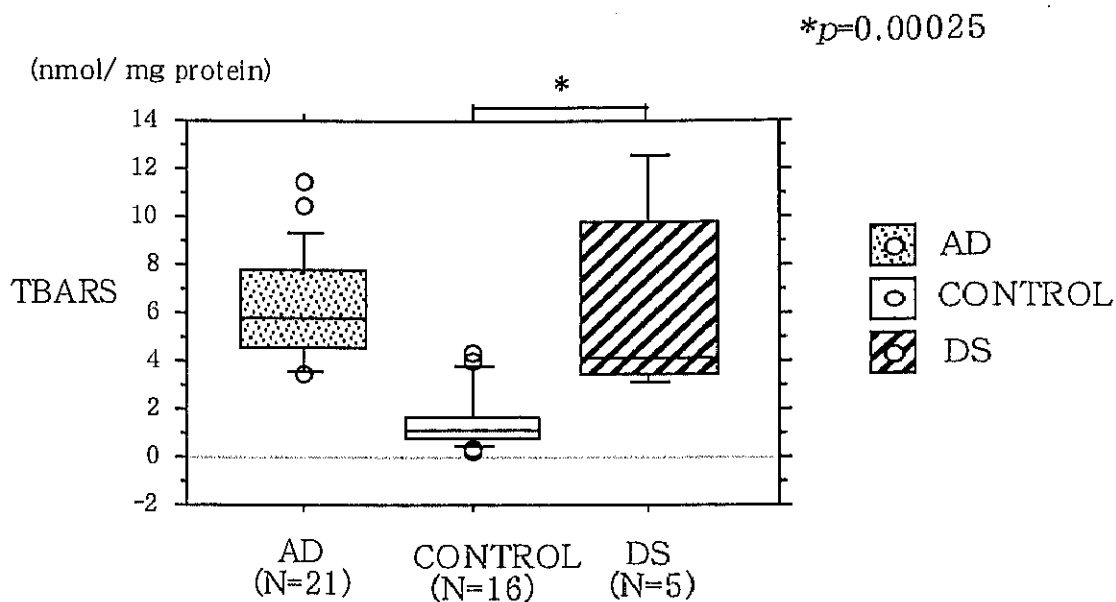
図1-7 酸化刺激後TBARS値

A : DSでは対象に比べ有意に増加していた。

B : APOEアイソフォーム別では, APOE-E3/3を保有するDSは, APOE-E3/3を保有する対照に比べ有意に増加していた。

AD : Alzheimer 病, CONTROL : 対照, DS : ダウン症候群

## A 総サンプルでの比較



## B APOEアイソフォーム別での比較

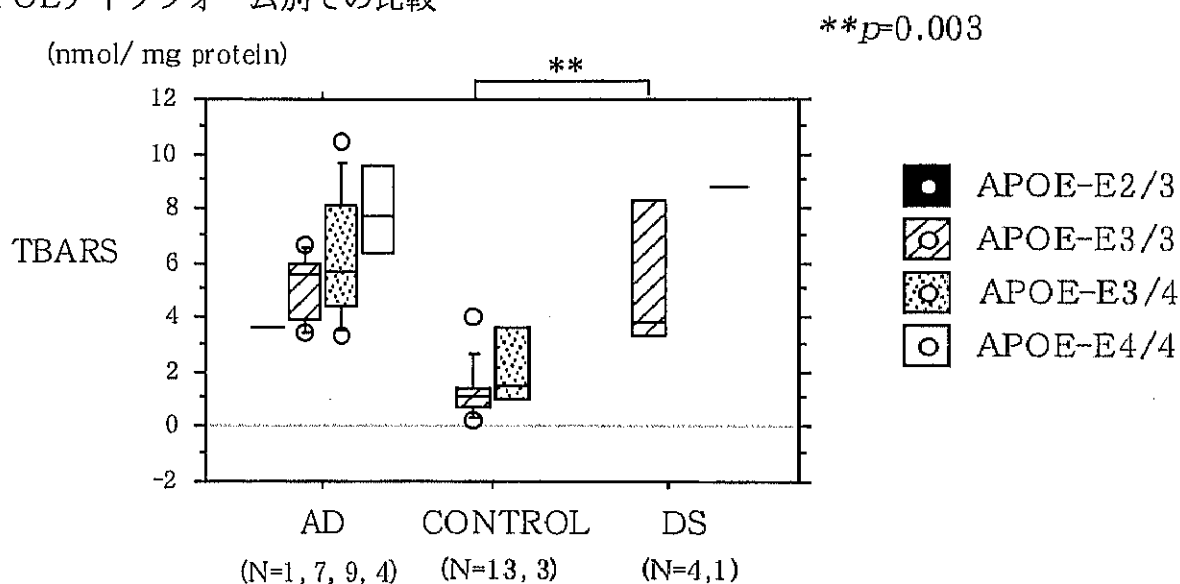


図1-8 酸化刺激により増加したTBARS値

A : DSでは対照に比べて有意に増加していた。

B : APOEアイソフォーム別では、APOE-E3/3を保有するDSはAPOE-E3/3を保有する対照に比べて有意に増加していた。

AD : Alzheimer 病, CONTROL : 対照, DS : ダウン症候群

	老人斑画像解析	脳A $\beta$	髄液A $\beta$
年齢(range, yr)	38-59	51-59	51-59
(mean $\pm$ s.d)	50.4 $\pm$ 7.23	54.5 $\pm$ 3.70	54.8 $\pm$ 1.27
APOE 表現型			
2/2	0	0	1
2/3	0	0	0
3/3	4	3	4
3/4	0	0	1
4/4	1	1	0
Total	5	4	6

	マウスIgG吸収後血漿A $\beta$ (第1グループ)		血漿A $\beta$ (第2グループ)
	DS	NC	DS
年齢(range, yr)	19-61	19-61	17-58
(mean $\pm$ s.d)	44.1 $\pm$ 7.57	44.1 $\pm$ 9.34	26.0 $\pm$ 8.12
APOE 表現型			
2/3	2	2	5
2/4	0	1	0
3/3	32	47	42
3/4	8	12	14
4/4	2	2	0
Total	44	64 (NE=2)	61

NE : APOE phenotype was not examined

表1-1 各実験におけるダウン症候群患者プロフィール

DS patient	Age/Sex (yr)	APOE Phenotype	%area of SPs (%)		Density of SPs (個/mm <sup>2</sup> )		No. of amyloid bearing vessels (個/mm surface length)	
			BA27	BC05	BA27	BC05	BA27	BC05
A.A.	51/F	3/3	7.48±2.98	4.36±0.96	31.9±14.2	50.4±11.6	4.37±0.11	2.75±0.82
S.Y.	55/M	3/3	0.57±0.23	2.11±0.14	9.23±6.77	38.7±5.60	4.87±0.69	3.77±0.45
K.K.	56/F	3/3	1.74±0.52	4.29±0.14	28.3±5.20	42.3±6.05	6.62±1.76	6.16±0.83
H.F.	38/M	3/3	0.21±0.09	1.48±0.77	4.97±2.86	17.2±4.74	1.83±0.84	8.85±5.26
E.I.	52/M	4/4	1.94±0.68	3.15±0.42	23.5±4.93	34.7±10.4	5.56±2.67	5.29±2.75
5例 (Mean±s.d.)	50±7.2		2.39±2.97	3.08±1.39	19.6±12.8	36.6±13.3	4.65±2.09	5.37±3.16
			*		**		#	
AD (N=14)			0.27±0.96	3.30±1.28	8.65±4.79	40.4±14.9	1.05±0.28	0.08±0.06
							##	

\*p=0.026, \*\*p=0.046, #p=0.019, ##p=0.020

表1-2 ダウン症候群 老人斑免疫組織化学 画像解析

A. 脳A $\beta$ 分子種量 (nmol/g wet tissue)

Patients	APOE Phenotype	A $\beta$ 1-40	A $\beta$ 1-42	A $\beta$ x-40	A $\beta$ x-42
A.A.	3/3	92.00	2.320	108.0	118.4
Y.S.	3/3	128.0	5.440	124.0	120.0
K.K.	3/3	24.82	4.802	42.41	39.21
I.E.	4/4	152.0	6.080	168.0	110.4
(Mean $\pm$ s.d.)		99.20 $\pm$ 55.39	4.660 $\pm$ 1.645	110.6 $\pm$ 52.06	97.00 $\pm$ 38.76
AD (N=6)		2.810 $\pm$ 4.420	4.060 $\pm$ 1.650	4.890 $\pm$ 6.823	36.60 $\pm$ 9.400

\* $p=0.002$ , \*\* $p=0.0009$ , \*\*\* $p=0.0055$

B. CSF A $\beta$ 分子種量 (pM)

Patients	APOE Phenotype	A $\beta$ 1-40	A $\beta$ 1-42	A $\beta$ x-40	A $\beta$ x-42
O.F.	3/3	2673	253.6	2766	322.8
A.A.	3/3	896.4	53.50	1619	105.5
T.E.	3/4	3564	327.8	3746	362.1
Y.S.	3/3	1253	109.4	1765	169.3
K.K.	3/3	982.8	160.4	1688	44.90
A.T.	2/2	1650	120.0	2336	322.8
(Mean $\pm$ s.d.)		1837 $\pm$ 1065	170.8 $\pm$ 101.7	2320 $\pm$ 828.5	221.2 $\pm$ 132.4
AD (N=20)		1530 $\pm$ 554.0	164.0 $\pm$ 83.20	2390 $\pm$ 1030	219.0 $\pm$ 101.0
CONTROL (N=34)		520.0 $\pm$ 616.0	323.0 $\pm$ 165.0	2650 $\pm$ 1420	332.0 $\pm$ 178.0

\* $p=0.036$

表1-3 ダウン症候群患者の脳および脳脊髄液 (CSF) に含まれる  
A $\beta$  分別定量

(nmol /mg protein)					
DS Patients	AGE/SEX (yr)	APOE phenotype	基礎 TBARS値	酸化刺激後 TBARS値	酸化刺激により増加したTBARS値
A.A.	51/ F	3/3	4.360	7.442	3.082
S.Y.	56/ M	3/3	7.153	19.66	12.50
K.K.	55/ F	3/3	3.874	7.447	3.573
H.F.	38/ M	3/3	3.940	8.047	4.107
E.I.	52/ M	4/4	5.327	14.17	8.844
mean±s.d.	50±7.2		4.931±1.371	11.35±5.439	6.422±4.107
A D (n=21)	73±9.2		5.266±1.828	* 11.38±2.633	** 6.110±2.239
CONTROL (n=16)	70±7.9		3.509±1.255	4.964±2.326	1.455±1.182

\*p=0.043, \*\*p=0.001, \*\*\*p=0.00025

表1-4 ダウン症候群TBARS結果