

白内障術後試料を用いたアルツハイマー病早期発見・予防法の実用化

近畿大学薬学部
准教授 長井 紀章

(共同研究者)

金沢医科大学 眼科学 主任教授 佐々木 洋
金沢医科大学 眼科学 教授 久保 江理

はじめに

高齢化社会の到来に伴い、アルツハイマー病の患者数は300万人に至る勢いで増加している。このアルツハイマー病は進行性の疾患であり、かつ数種類の治療薬があるため、早期発見・早期治療が重要と言える。しかし、アルツハイマー病は、認知機能の低下が目立ってから、家族が患者を病院に連れて行くことが多く、診断がなされる際にはすでに病気は進行した段階にあり、その後の薬物療法の効果も限局的である。この問題を打破するためには、認知機能の低下が生じる前にアルツハイマー病を診断する必要があるが、現状アルツハイマー病の早期診断方法は確立されてはいない。しかし近年、アルツハイマー病早期診断方法として、アミロイド β ($A\beta$) の測定が注目されている。 $A\beta$ はアルツハイマー病の発症要因であり、主として $A\beta_{1-40}$ 、 $A\beta_{1-42}$ 、 $A\beta_{1-43}$ の3種に分類される。これら $A\beta$ は、アルツハイマー病発症前より脳内に凝集型として沈着が見られ、 $A\beta$ 産生や蓄積のしやすさを個々のレベルで明らかにできれば、アルツハイマー病の早期発見（診断）が可能と考えられている。しかし脳の特徴から、脳内の微量な $A\beta$ 蓄積量変化を非侵襲的に測定することは難しくこれら改善策が模索されている。一方、水晶体はカプセル（水晶体嚢）中で生涯にわたり細胞が蓄積されるという、他の組織と異なるユニークな構造を有しており、産生されたタンパクは比較的長期間蓄えられるといった特徴を示す。これらの特徴は髄膜で覆われる脳と類似しており、眼疾患とアルツハイマー病の間に $A\beta$ が関わる共通の病態発症機序が存在する可能性が示唆される⁽¹⁾。そこで著者らは、白内障手術時における水晶体中 $A\beta$ 量の測定がアルツハイマー病への早期診断になりうるかについて本研究で検討した。

結 果

脳と水晶体間での $A\beta$ 蓄積の関係を正確に評価するためには、まずヒト水晶体における $A\beta$ 蓄積とその基礎疾患を明確にすることが極めて重要な課題である。そこで 1. 加齢、2. 性差、3. 混濁及び 4. 病歴（糖尿病）がヒト水晶体中 $A\beta$ 蓄積に影響を与えるかどうかについて調査した。さらに、上記検討から得られた水晶体での $A\beta$ 蓄積関連因子を排除した試料

を用い、アルツハイマー病発症と水晶体中A β 蓄積量の関係を模索した。以下にこれら結果を示す。なお、術後ヒト水晶体は金沢医科大学からの譲与されたものを用い（倫理委員会；近畿大学No.13-046、金沢医科大学No.96）、A β 量はELISA法にて測定した。

1. 加齢が水晶体中A β 蓄積に及ぼす影響

図1は、年齢に対するA β_{1-40} 、A β_{1-42} 、A β_{1-43} 蓄積量の関係を示す。A β_{1-40} 、A β_{1-42} 、A β_{1-43} いずれにおいても加齢に伴うA β 蓄積量の増加は認められず、相関係数はそれぞれ、 $r=0.047$ 、 0.039 及び 0.014 であった。

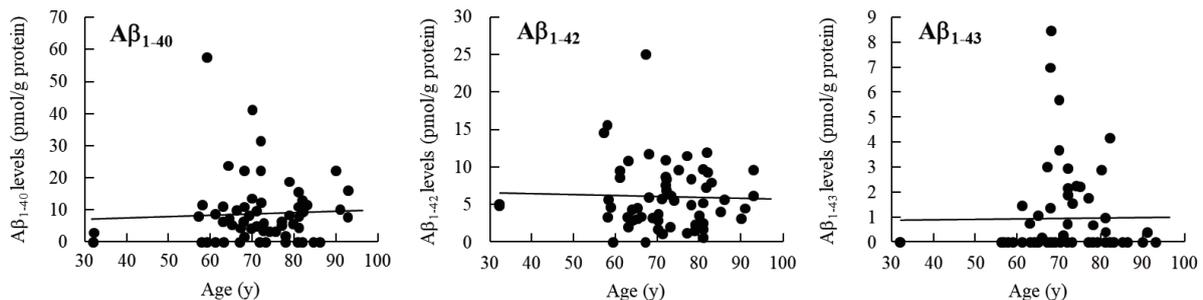


図1. Relationships of age and A β [A β_{1-40} , A β_{1-42} , and A β_{1-43}] in the normal and opaque lens epithelium of Japanese patients (normal, age 62.2 ± 4.3 y, $n = 13$; cataract patient, age 73.5 ± 1.3 y, opacity score 3.92 ± 0.28 , $n = 52$) .

2. 性差が水晶体中A β 蓄積に及ぼす影響

表1は、男女別におけるA β_{1-40} 、A β_{1-42} 、A β_{1-43} 蓄積量を示す。年齢と同様、男女間においても、A β_{1-40} 、A β_{1-42} 、A β_{1-43} 蓄積量間に有意な差は認められなかった。

表1. A β_{1-40} , A β_{1-42} , A β_{1-43} levels in lens epithelium of male- and female-patients with cataracts.

	Male	Female
A β_{1-40} (pmol/g protein)	9.59 ± 1.51	8.03 ± 2.02
A β_{1-42} (pmol/g protein)	6.50 ± 0.87	5.71 ± 0.80
A β_{1-43} (pmol/g protein)	1.15 ± 0.39	0.88 ± 0.29

Male, age 75.0 ± 1.50 y, opacity score 4.10 ± 0.38 , $n = 31$; Female, age 71.4 ± 2.20 y, opacity score 3.67 ± 0.40 , $n = 21$.

3. 混濁タイプが水晶体中A β 蓄積に及ぼす影響

図2は、水晶体でのA β_{1-40} 、A β_{1-42} 、A β_{1-43} 蓄積量と白内障分類別(単独型)の関係を示す。A β_{1-40} 及びA β_{1-42} 蓄積量では、いずれの白内障タイプにおいても有意な差は見られなかった。一方A β_{1-43} では、皮質混濁タイプの水晶体が他の白内障タイプ群と比較し有意に高値であった。

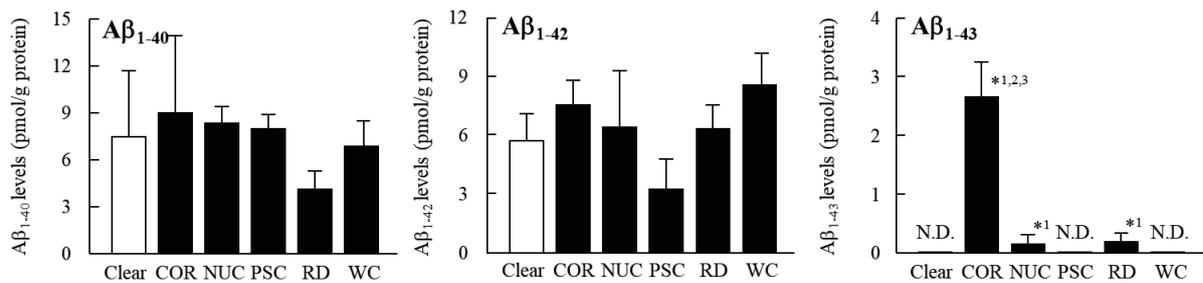


図 2. $A\beta_{1-40}$, $A\beta_{1-42}$ and $A\beta_{1-43}$ levels in lens epithelium of patients with cortical cataracts (COR), nuclear cataracts (NUC), posterior subcapsular cataracts (PSC), retrodots (RD) or water clefts (WC). Open columns, transparent lens epithelium (clear); closed columns, opaque lens epithelium. Clear, age, 62.2 ± 4.3 y, $n = 13$; COR, age, 70.5 ± 1.4 y, opacity score 2.67 ± 0.21 , $n = 6$; NUC, age, 67.8 ± 8.5 y, opacity score 1.50 ± 0.50 , $n = 4$; PSC, age, 69.3 ± 6.1 y, opacity score 1.67 ± 0.47 , $n = 3$; RD, age, 76.0 ± 2.0 y, opacity score 2.33 ± 0.94 , $n = 3$; WC, age, 73.3 ± 1.9 y, opacity score 2.33 ± 0.94 , $n = 3$. N.D., not detectable. ¹ $P < 0.05$, vs. clear for each group. ² $P < 0.05$, vs. NUC for each group. ³ $P < 0.05$, vs. RD for each group.

4. 糖尿病が水晶体中Aβ蓄積に及ぼす影響

上記“3. 混濁タイプが水晶体中Aβ蓄積に及ぼす影響”にて、皮質混濁によりAβ値が高まることが明らかとなったため、糖尿病と水晶体中Aβ値の確認には皮質混濁を伴わない検体を中心に評価を行った。図3は、皮質混濁を示さない糖尿病患者水晶体中におけるAβ₁₋₄₀、Aβ₁₋₄₂、Aβ₁₋₄₃蓄積量を示す。Aβ₁₋₄₀及びAβ₁₋₄₂においてClear（透明水晶体）、Opaque（皮質混濁を除いた白内障患者）、DM（皮質混濁を除いた糖尿病罹患白内障患者）群では、有意な差は見られなかった。一方、Aβ₁₋₄₃では、DM群がClear群やOpaque群と比較し有意に高値を示した。

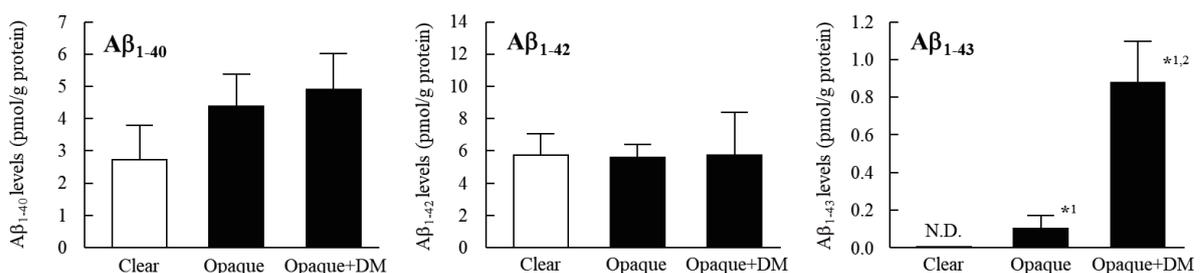


図 3. Changes in $A\beta_{1-40}$, $A\beta_{1-42}$ and $A\beta_{1-43}$ in lens epithelium of diabetic patients. Open columns, transparent lens epithelium; closed columns, opaque lens epithelium. Clear, transparent lens epithelium; opaque, opaque lens epithelium; opaque + DM, opaque lens epithelium with type 2 diabetes mellitus. N.D., not detectable. $n=5-18$. ¹ $P < 0.05$, vs. clear for each group. ² $P < 0.05$, vs. opaque for each group.

5. アルツハイマー病が水晶体中A β 蓄積に及ぼす影響

これまでの検討（上記1～4）により、皮質混濁と糖尿病発症時において水晶体でのA β ₁₋₄₃蓄積量が高値を示すことが明らかとなったため、皮質混濁を有さずかつ非糖尿病患者から得た検体を用い、アルツハイマー病罹患の有無と水晶体中A β 蓄積量の関係を調査した。その結果、皮質混濁を除いた糖尿病非罹患白内障患者のA β ₁₋₄₀、A β ₁₋₄₂、A β ₁₋₄₃蓄積量はそれぞれ4.7 ± 0.9, 5.9 ± 0.8, 0.11 ± 0.06 pmol/g protein (n=5)であったのに対し、アルツハイマー病罹患のA β ₁₋₄₀、A β ₁₋₄₂、A β ₁₋₄₃蓄積量は7.8、7.5、2.8 pmol/g protein (n=1)と高値であった。

考 察

A β はI型1回膜貫通タンパクであるAmyloid Protein Precursor (APP)が β -セクレターゼ並びに γ -セクレターゼと呼ばれる酵素により、生理的に順次切り出されることで産生される。通常A β は α -セクレターゼによる切断からは産生されない。また、産生されたA β もネプリライシン、Damage-Induced Neuronal Endopeptidase、Endothelin-Converting Enzyme-1といった酵素によって速やかに分解・代謝されることが知られており、正常な状態では蓄積はほとんど見られない^(2,3)。A β はアミノ酸の長さによりA β ₁₋₄₀、A β ₁₋₄₂、A β ₁₋₄₃に分類される。通常、神経細胞からはA β ₁₋₄₀がA β ₁₋₄₂に比べて10倍近く多く産生される。しかしA β ₁₋₄₂はA β ₁₋₄₀と比べ凝集しやすく、さらにA β ₁₋₄₃は、A β ₁₋₄₀、A β ₁₋₄₂よりも凝集性が高い分子種である⁽⁴⁾。このA β は高齢者認知症疾患の一つであるアルツハイマー病の原因物質として知られている。近年、このAD患者の眼領域において網膜機能の低下、網膜神経節細胞の減少および視神経変性が高率に認められること⁽⁵⁾、さらに、糖尿病網膜症患者では糖尿病非罹患者と比較し、硝子体中のA β の著明な低下およびタウ蛋白質の上昇が報告されている⁽⁶⁾。これらの変化はAD患者脳脊髄液中の変動と類似しており、眼疾患とADの間に共通の病態発症機序が存在し、特にA β が眼疾患の病態に深く関わっている可能性が考えられる。また、酸化ストレスの一つである過酸化水素(H₂O₂)の産生が網膜や脳において神経細胞でA β の産生増大を誘導し、さらに高まったA β 蓄積が酸化ストレスを増加させることが明らかとされている⁽⁷⁾。この酸化ストレスは、水晶体白濁に関わることからA β の蓄積と白内障発症との関係が注目されているが、加齢性白内障患者における水晶体中A β 蓄積量については、未だ解明されていない。白内障はその形態からWHO分類では、皮質白内障(COR)、核白内障(NUC)、後囊下白内障(PSC)に分類される。また金沢医大分類では、WHO分類の3つに加え、さらにRetrodot (RD)、water clefts (WC)と、細かく分類されている。そこで本研究では、水晶体中A β 量の測定がアルツハイマー病への早期診断になりうるかについて議論すべく、金沢医科大学眼科で硝子体または白内障手術によって得られた摘出水晶体の前囊71眼をサンプルとし、A β ₁₋₄₀、A β ₁₋₄₂、A β ₁₋₄₃蓄積量と1. 加齢、2. 性差、3. 混濁及び 4. 病歴(糖尿病)の関与について検討した。また、上記検討から得られた水晶

体でのA β 蓄積関連因子を排除したサンプルを用い、アルツハイマー病と水晶体中A β 蓄積量の関係を調査した。

A β_{1-40} 、A β_{1-42} 、A β_{1-43} いずれにおいても加齢に伴うA β 蓄積量の増加は認められず(図1)、また、男女間においても、A β_{1-40} 、A β_{1-42} 、A β_{1-43} 蓄積量に有意な差は認められなかった(表1)。加齢性白内障は皮質白内障、核白内障、後囊下白内障、Retrodot、Water cleftsなどに分類される。本研究ではこれら各種白内障タイプにおけるA β の蓄積について検討した。A β_{1-40} とA β_{1-42} はいずれのタイプにおいても有意な相関は見られなかった。一方、皮質白内障において、他の白内障タイプ群と比較しA β_{1-43} の蓄積が有意に高値を示した(図2)。本結果は、A β_{1-43} の水晶体上皮蓄積が、皮質混濁誘発に関与している可能性を示唆した。

次に、糖尿病がヒト水晶体上皮中A β_{1-40} 、A β_{1-42} 、A β_{1-43} 蓄積に与える影響について解析した。本実験では、皮質白内障が他の白内障タイプ群と比較しA β_{1-43} の蓄積が有意に高値を示すことより、皮質白内障を除いた白内障タイプを用いて検討を行った。糖尿病非罹患者と糖尿病罹患者を比較すると、A β_{1-40} 及びA β_{1-42} において有意な差は見られなかった。これら結果と異なり、A β_{1-43} では糖尿病罹患者が糖尿病非罹患者より有意に高値を示した(図3)。また我々はこれまで、糖尿病モデル動物OLETFラットの水晶体において、A β 産生に関わる遺伝子発現量(β -セクレターゼ、 γ -セクレターゼ)の上昇とA β 蓄積が認められることを見いだしている⁽⁸⁾。これらの結果は、ヒトにおいても糖尿病性白内障にA β が関与する可能性を示唆した。

最後に、これまでの結果をふまえ、皮質混濁を有さずかつ非糖尿病患者の検体を用い、アルツハイマー病罹患の有無と水晶体中A β 蓄積量の関係を調査した。その結果、アルツハイマー病罹患のA β 蓄積量は、皮質混濁を除いた糖尿病非罹患白内障患者のA β 蓄積量に比べ高値であった。しかし、本研究期間内においてアルツハイマー病罹患のサンプルを十分量得ることができなかつたため、今後さらに検体数を増やした検討が必要である。

以上、術後ヒト水晶体を対象に、皮質混濁や糖尿病発症が水晶体でのA β 蓄積量に関与していることをと明らかとした。現在、これら水晶体でのA β 蓄積に関わる基礎要因を除いた白内障手術患者の水晶体中A β 含量を記録しつつ、その後(術後)の加齢に伴う認知機能の変化について追跡調査を実施しているところである。これら追跡調査にて水晶体と脳間でのA β 蓄積量や認知機能との相関を明らかにすれば、白内障術後水晶体中のA β 量からアルツハイマー病の進行度の予測(早期診断)が実用可能と考える。

要 約

アルツハイマー病は進行性の疾患であり、かつ数種類の治療薬があるため、早期発見・早期治療が重要といえる。本研究では白内障手術時における水晶体中A β 量の測定がアルツハイマー病への早期診断になりうるかについて検討した。脳及び水晶体間でのA β 蓄積の関係を正確に評価するためには、ヒト水晶体におけるA β 蓄積とその基礎疾患を明確にすること

が極めて重要な課題である。そこでまず、1. 加齢、2. 性差、3. 混濁及び4. 病歴（糖尿病）がヒト水晶体中A β 蓄積に影響を与えるかどうかについて調査した。その結果、術後ヒト水晶体を対象に、皮質混濁や糖尿病発症が水晶体でのA β 産生および蓄積量に関与していることを明らかとした。さらに、上記検討から得られた水晶体でのA β 蓄積関連因子を排除した試料を用い、アルツハイマー病発症と水晶体中A β 蓄積量の関係を模索したところ、アルツハイマー病罹患のA β 蓄積量は、皮質混濁を除いた糖尿病非罹患白内障患者のA β 蓄積量に比べ高値であった。今後、これら水晶体でのA β 蓄積に関わる基礎要因を除いた白内障手術患者を対象に、A β 含量とその後の加齢に伴う認知機能の変化について追跡調査を実施し、水晶体と脳間でのA β 蓄積量や認知機能との相関を明らかにする予定である。

文 献

1. Goldstein L.E. et al. Cytosolic beta-amyloid deposition and supranuclear cataracts in lenses from people with Alzheimer's disease. *Lancet*, 361, 1258 – 1265 (2003) .
2. Vassar R. et al. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science*, 286, 735 – 741 (1999) .
3. Kukar T.L. et al. Substrate-targeting gamma-secretase modulators. *Nature*, 453, 925 – 929 (2008) .
4. Saito T. et al. Potent amyloidogenicity and pathogenicity of A β 43. *Nat. Neurosci.*, 14, 1023 – 1032 (2011) .
5. Ning A. et al. Amyloid-beta deposits lead to retinal degeneration in a mouse model of Alzheimer disease. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 49, 5136 – 5143 (2008) .
6. Hara H. et al. Elevated neprilysin activity in vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Mol. Vis.*, 12, 977 – 982 (2006) .
7. Oda A. et al. Oxidative stress up-regulates presenilin 1 in lipid rafts in neuronal cells. *J. Neuro Sci. Res.*, 88, 1137 – 1145 (2010) .
8. Nagai N. et al. Hyperglycemia Enhances the Production of Amyloid β 1-42 in the Lenses of Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty Rats, a Model of Human Type 2 Diabetes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 57, 1408 – 1417 (2016) .