

博士論文

脳内で β アミロイドーシスを誘発する
可溶性高分子量 A β オリゴマーの解析

箱 崎 眞 結

題目：

脳内で β アミロイドーシスを誘発する

可溶性高分子量 A β オリゴマーの解析

所属：病因・病理学専攻

指導教員名：牛久 哲男 教授

申請者名：箱崎 真結

要旨

1. 序文

- 1-1. アルツハイマー病アミロイド仮説
- 1-2. A β オリゴマー
- 1-3. A β の脳内伝播とプリオン仮説
- 1-4. A β を標的とした既存の治療とその問題点

2. 目的

3. 方法

- 3-1. マウス
- 3-2. 剖検脳
- 3-3. 脳抽出方法
 - 3-3-1. マウス脳回収
 - 3-3-2. 段階抽出
 - 3-3-3. TBS 繰り返し抽出
- 3-4. ゲルろ過クロマトグラフィー

- 3-5. A β 特異 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) による A β 濃度測定
- 3-6. イムノブロットティング
- 3-7. 蛋白濃度の測定
- 3-8. A β の免疫除去実験
- 3-9. *In vivo* マイクロダイアリシス
- 3-10. *In vivo* injection 実験
- 3-11. 免疫組織化学的解析
 - 3-11-1. パラフィン切片作成
 - 3-11-2. 酵素抗体法による免疫染色
 - 3-11-3. Thioflavin S 染色
 - 3-11-4. A β 蓄積面積の定量
- 3-12. *In vitro* A β 凝集実験
 - 3-12-1. seed の調整
 - 3-12-2. Thioflavin T アッセイ
- 3-13. 統計処理

4. 結果

4-1. APP tg 脳中のトリス可溶性 A β 分子種の解析

4-1-1. APP tg 脳中に存在する可溶性 A β 分子種 (peak 1, 2, 3 A β)の分離

4-1-2. Peak 1 A β 画分内には A β オリゴマーが存在する

4-1-3. 抗 A β オリゴマー抗体 A11、OC は peak 1 A β 画分中の A β 分子種と反応する

4-1-4. Peak 1 A β 画分中の A β 分子種は *in vivo* マイクロダイアリシス法によって脳間質液から回収されない

4-1-5. Peak 1 A β 画分の反復抽出による検討

4-2. APP tg 脳由来の可溶性 A β 分子種の seed 効果の検討

4-2-1. Peak 1 A β 画分中の A β 分子種は *in vivo* で seed 効果を発揮する

4-2-2. Peak 1 A β 画分接種によって誘発される A β 蓄積の性状解析

4-2-3. Peak 1 A β 画分中の A β が seed 効果を発揮する

4-2-4. 野生型マウスへの peak 1 A β 接種は脳内 A β 蓄積を誘発しない

4-2-5. Peak 1 A β 画分中の総蛋白質量に対する A β 分子の割合に関する検討

4-3. Peak 1 A β 画分中の A β 分子種が seed 効果を発揮するメカニズムの検討

4-3-1. *In vitro* 凝集実験で peak 1 A β 画分は A β の線維化を抑制する

4-3-2. *In vivo* で peak 1 A β は A β の凝集核として A β 蓄積を促進する

4-4. AD 脳中の A β seed 分子種の同定

4-4-1. AD 脳中にも peak 1 A β 画分が存在する

4-4-2. AD 脳における A β 蓄積の免疫組織化学的検討

4-4-3. AD 脳由来の TBS 可溶性分子量 200-300 $\times 10^3$ の A β 分子種は *in vivo* で seed 効果を発揮する

5. 考察

5-1. 脳内で β アミロイドーシス蓄積を誘発する可溶性高分子量 A β 分子種の同定

5-2. A β seed 分子の分子性状

5-3. A β seed 分子は脳でどこに局在しているのか

5-4. 高分子量 A β 分子種が A β 蓄積を誘発するメカニズム

5-5. プリオン蛋白質との比較

5-6. AD 脳由来の高分子量 A β seed 分子の多様性について考察

5-7. AD 病態における A β seed 分子の役割と AD 治療応用への可能性

6. 結論

7. 引用文献

謝辞

要旨

本研究において私は、A β 蓄積を有する APP トランスジェニックマウス脳中に、トリス可溶性分子量 200-300 $\times 10^3$ の A β オリゴマーが存在し、この高分子量 A β 分子種が脳内で A β 蓄積を誘発する強力な seed 能を有することを示した。また、この A β seed 分子は、脳内で神経終末から放出されたモノマーA β の凝集・不溶化を促進することで、A β 蓄積の拡大に寄与することが示唆された。さらに、アルツハイマー病患者の脳中にも同様の高分子量 A β 分子種が存在し、seed 能を有することを明らかにした。これらの結果から、本研究で同定した A β seed 分子は、AD 発症において β アミロイドシスの開始とその経時的な脳内での拡大に重要な役割を果たすことが示唆された。

1. 序文

1-1. アルツハイマー病アミロイド仮説

高齢化に伴い、認知症の患者数は増加の一途を辿っており、患者や家族の QOL 低下、医療費・介護費の増大は社会問題となっている。アルツハイマー病 (Alzheimer's disease; AD) は高齢者の認知症の中で最も頻度が高い疾患であり、AD 脳では、アミロイド β (amyloid β ; A β) からなる老人斑、リン酸化タウからなる神経原線維変化という 2 種類の蓄積物と広汎な神経細胞死が、主要な病理学的変化として観察される。AD 発症の分子病態メカニズムは未だ明らかでなく、有効な予防法や根本治療法も存在していない。

アミロイドとは、蛋白質が重合し、特徴的な線維構造を形成したもので、組織化学的には Congo red 染色陽性で偏光顕微鏡下で緑色を呈すること、生物物理学的には X 線解析でクロス β シート構造をとることにより定義される¹。組織にアミロイド線維の沈着を伴う疾患をアミロイドーシスと呼ぶ。

A β は神経細胞において、アミロイド β 前駆体蛋白質 (A β precursor protein; APP) から、 β -secretase、 γ -secretase による 2 段階の酵素切断を経て分泌される、分子量約 4×10^3 のペプチドである。A β は健常人でも恒常的に分泌され、 γ -secretase の切断部位や酵素修飾により、アミノ酸長や凝集能の異なる複数種類の A β 分子種が存在する。脳内に存在する主な A β 分子種は 40 番バリリンで終わる A β 40 であるが、一部に 42 番ア

ラニンで終わる A β 42 も存在する。A β 42 は A β 40 と比べて凝集性が高く²、また AD 脳に最初期に蓄積する分子種であることから³、AD の病因に深く関与することが考えられてきた。常染色体優性遺伝形式をとる家族性 AD において、APP、あるいは γ -secretase の活性中心である presenilin 1、presenilin 2 に点突然変異が同定され⁴⁻⁷、これらの変異が A β 産生総量の増加、凝集能の高い A β 42 の産生比率の増加、または A β の凝集性増加を引き起こすことが分かり⁸⁻¹²、さらに家族性 AD に連鎖する変異を持つヒト APP 遺伝子を神経細胞に過剰発現させたトランスジェニックマウス (APP tg) 脳は、加齢依存的に A β 蓄積を呈したことから^{13,14}、AD の発症機序の鍵分子は A β であり、脳内で A β が凝集を開始することが、AD 発症の最初期に起こる原因的变化であるとする、アミロイド仮説^{15,16} が提唱された (図 1)。さらに、アミロイド仮説の遺伝学的根拠として、染色体 21 番に位置する APP 遺伝子を 3 コピー有する 21 トリソミーの患者の剖検脳は、若齢から広汎な A β 蓄積と、加齢によりタウ蓄積を伴う AD の病理学的所見を呈すること¹⁷、家族性 AD 家系の連鎖解析により APP 遺伝子の重複 (duplication) 変異が同定されたこと¹⁸、さらに APP の A β 領域内部 A673T 変異は AD 発症及び加齢性認知機能低下に抑制的に働くこと¹⁹、などが明らかとなり、現在アミロイド仮説は広く受け入れられている。

AD の大多数は孤発性に発症するが、孤発性 AD 発症の最も強力なリスクアレルとして APOE ϵ 4 が同定されている^{20,21}。APOE 遺伝子がコードする apoE タンパク質は

AD 脳において老人斑に A β と共に蓄積することが知られ²²、さらに apoE4 は他のアイソフォームに比して A β のクリアランス低下²³、凝集・オリゴマー化の促進²⁴⁻²⁶を起こすと報告されており、APOE ϵ 4 は何らかの機序で A β の凝集を促進することにより、AD 発症リスクを上昇させる可能性が示唆されてきた。

一方アミロイド仮説については、A β がどのような機序で神経細胞死を引き起こすか明らかでない点が問題点であった。AD 脳において老人斑量と神経細胞死の程度は相関せず、一方神経原線維変化量と神経細胞死の程度は正に相関することも明らかとなっている²⁷。そこで、アミロイド線維として老人斑に蓄積した不溶な A β ではなく、線維化の中間状態にある可溶性 A β オリゴマーに神経細胞毒性が存在する可能性が想定され、A β オリゴマーが AD 発症の鍵分子であるとする「オリゴマー仮説」が提唱され、AD 脳中 A β オリゴマー分子の本態や毒性発揮のメカニズムについて研究が進められた。A β オリゴマーについては次節で詳細に述べる。

1-2. A β オリゴマー

AD 脳を用いた検討で、界面活性剤を用いない saline buffer 抽出液中に、可溶性 A β オリゴマーが存在すること、そして AD 脳中の A β オリゴマー量は、認知機能低下の程度とよく相関すること^{28,29}が示された。また、家族性 AD Arctic 家系において同定された APP の A β 領域内部 E693G 変異は、可溶性前線維状態 A β オリゴマーである A β

protofibril、及び A β 線維形成を加速させる作用があると報告された^{11,12}。また、APP の 1 アミノ酸欠損変異である E693 Δ *Osaka* 変異のホモザイゴット患者は、初老期に認知症を呈したにも関わらず、PET によるアミロイドイメージングにおいて顕著な A β アミロイドの蓄積上昇を示さなかった。また *in vitro* において *Osaka* 変異型 A β はオリゴマー形成を促進することが報告された³⁰。これらの知見は A β オリゴマーが、AD 発症に重要な役割を担っていることを示唆するものである。これまでに多様なサイズ、構造、生物学的活性を有する可溶性 A β 分子種の存在が報告されており³¹、以下に詳述する。

A β モノマーは毒性を示さないが、*in vitro* で A β モノマーをインキュベートすると、多様な会合状態の中間体 A β 分子種を形成して、線維化することが知られている。A β protofibril は、リコンビナント A β を 37 $^{\circ}$ C でインキュベート後、可溶画分をゲルろ過クロマトグラフィーで分離して 100 \times 10³ 以上の分子量サイズに分画される A β オリゴマーである。A β protofibril は電子顕微鏡で直径 6-8 nm、長さ 200 nm 未満の湾曲した構造をとる線維状分子として観察される³²。また、A β protofibril は初代培養神経細胞に対し細胞毒性を示すことが知られ³³、*in vitro* 及び *in vivo* においてアミロイド線維形成の凝集核の作用を発揮する^{34,12}。一方 A β -derived diffusible ligands (ADDLs) は、リコンビナント A β を PBS あるいは Ham's F-12 培地中 4 $^{\circ}$ C でインキュベートしたサンプルの可溶画分中出现し、SDS-PAGE で分子量 17 \times 10³ 程度に移動度を持つ球状

の構造物であり、長期増強 (long-term potentiation; LTP) の阻害効果、Src ファミリーチロシンキナーゼである Fyn 依存的な神経細胞死、病的タウ変化をきたすことが報告されている^{35,36}。

また A β オリゴマーは培養細胞の上清中からも検出されている。家族性アルツハイマー病変異を有する APP (V717F)を過剰発現する CHO 細胞 (7PA2 cell line)の培養上清中に存在する A β オリゴマーをラット脳室内に投与すると LTP を阻害すること³⁷等、培養細胞から分泌された A β オリゴマーも神経細胞毒性を発揮するとされる。

A β オリゴマーは AD 脳からも同定されている。AD 脳トリソ可溶画分をゲルろ過クロマトグラフィーで分離して得た A β ダイマーは、海馬スライスカルチャー上で LTP を抑制することから、A β ダイマーが毒性 A β 分子の最小単位であるとする報告がある³⁸。また、A β *56 は、APP tg の Tg 2576 系統の脳可溶画分中に存在し、SDS-PAGE やゲルろ過クロマトグラフィーで分子量約 56×10^3 の位置に溶出される A β オリゴマーである。Tg 2576 の脳内 A β *56 量と認知機能障害の程度はよく相関し、A β *56 は *in vitro* でシナプス障害を示し、ラットの脳室に投与すると認知機能低下を引き起こすなど、神経細胞障害性があることが示された³⁹。他にも、amylospheroids は、AD 脳可溶画分中に存在する、10-15 nm の球状を示す A β 分子種であり、32-150 mer と推定され、*in vitro* で神経細胞毒性を示すと報告されている⁴⁰。

In vitro 凝集実験や培養細胞を用いた得られた A β オリゴマーと AD 脳内に存在する

A β オリゴマーの構造や性質が同一であるかは明らかではない。興味深いことに、同じ分子量を示す A β オリゴマーでも、*in vitro* で合成されたものと比較して、AD 脳由来あるいは培養細胞由来のオリゴマーがより強い毒性を示すことも報告されている⁴⁰⁻⁴²。その差をもたらす因子としては、A β オリゴマーの構造の違いや、*in vitro* では起こらない構成 A β 分子の不均一性、翻訳後の修飾の有無などが考えられるが、未だにその原因は明らかでない。

脳内の A β オリゴマーの存在様式を明らかにするため、A β オリゴマーを検出する方法についても開発が進められた。A11 抗体⁴³は A β オリゴマーを特異的に認識し、OC 抗体⁴⁴は A β オリゴマー及び A β 線維を認識する抗体である。APP tg を用いた検討では、アミロイド斑蓄積前から存在する、シナプス障害性を有する A11 陽性 A β オリゴマーと、アミロイド斑蓄積後に出現する、アミロイド斑の量と相関する OC 陽性 A β オリゴマーの、少なくとも 2 種類の A β オリゴマーが存在することが示された⁴⁵。抗 A β オリゴマー抗体 NAB61⁴⁶は、AD 脳や APP tg 脳においてアミロイド斑の辺縁部を認識し、NAB61 陽性部位と postsynaptic density の減少に相関関係があることから、アミロイド斑周囲に毒性 A β オリゴマーのプールがある可能性が示唆されている⁴⁷。mAb158 抗体は A β protofibril を特異的に認識する抗体であり、mAb158 抗体を用いた A β protofibril 特異 ELISA によって A β protofibril が APP tg 脳に存在することが示された⁴⁸。現在、mAb158 抗体のヒト化抗体 BAN2401 を用いた A β 免疫療法の第 III 相臨

床試験が実施されている。24B3 抗体は A β オリゴマーにおける 22 番グルタミン酸と 23 番アスパラギン酸の折れ曲がり構造を特異的に認識する A β オリゴマー抗体であり⁴⁹、特に毒性の高い A β オリゴマーを検出することが可能である。また、A β オリゴマーの測定方法として、サンドイッチ ELISA の capture 抗体と detect 抗体に同じ抗 A β モノクローナル抗体を用いることで、モノマーA β とは反応せず、ダイマー以上の A β 分子とのみ反応するようにデザインされた A β オリゴマー特異 ELISA の開発が行われた。抗 A β 抗体 82E1 のサンドイッチ ELISA を用いた検討では、AD 症例では、脳中の A β オリゴマー量がコントロール症例に比して有意に高く、血漿中の A β オリゴマー量が経時的に減少することが報告された⁵⁰。また抗 A β 抗体 BAN50 のサンドイッチ ELISA を用いた検討では、分子量 40-200 $\times 10^3$ 、12 mer 以上の可溶性高分子量 A β オリゴマーを認識し、AD/MCI 群の脳脊髄液中の A β オリゴマー量を測定すると、オリゴマー量と MMSE スコアの間に負の相関があることが報告された⁵¹。

1-3. A β の脳内伝播とプリオン様伝播仮説

AD をはじめとするタンパク質の異常蓄積を伴う様々な神経変性疾患では、疾患の進行に伴い病因タンパク質の蓄積病理の分布が広がる「伝播」現象が知られている。AD における A β 蓄積も、大脳新皮質の基底側から始まり、大脳皮質連合野～海馬へ広がり、最終的に大脳皮質の広い領域が侵される⁵²。その機序として、病因タンパク

質が何らかの異常構造を獲得して凝集核 (seed) を形成し、seed を鋳型として自己複製して拡散することにより、病理が広がるという「プリオン様伝播仮説」が提唱されている⁵³。プリオンはクロイツフェルトヤコブ病 (Creutzfeldt-Jakob disease; CJD) などのプリオン蓄積を伴うプリオン病の病因タンパク質で、プリオン病においてプリオンは異常構造を獲得して神経変性を発揮すると共に、異常構造型プリオンを鋳型として正常プリオンが異常構造型に複製されること、さらに異常構造型プリオンが個体から個体へ伝達して疾患を引き起こすことが知られている⁵⁴。

In vitro において A β ペプチドをインキュベートすると、一定のラグタイム (nucleation phase)後に線維伸長 (elongation phase)が生じる。ここへ予め線維化させた A β を凝集核として添加すると、ラグタイムが消失し速やかに線維化が起こることから、A β はプリオンと同様に凝集核依存的な重合プロセスを経ると考えられている²。さらに近年、A β 蓄積を有する AD 脳や APP tg 脳の抽出液を若齢 APP tg 脳に接種すると、脳内で A β 蓄積を誘発する^{55,56}、APP tg 脳抽出液の腹腔内投与が脳内 β アミロイドーシスを誘発する⁵⁷等の報告がなされ、*in vivo* で何らかの seed 能を持った分子が AD 脳内に存在し、A β 蓄積を誘発し、伝播させることが示唆された。また CJD 患者の下垂体由来の成長ホルモン投与や硬膜移植に伴って発症した、医原性 CJD の剖検脳において、 β アミロイドーシスの伝播を示唆する知見が複数報告されている^{58,59}。これらの結果、A β が異常構造をとった seed を鋳型として異常構造を獲得し凝集すること、

さらに A β 蓄積を誘発する何らかの seed が AD 脳や APP tg 脳に存在し、 β アミロイドーシスの伝播に関与することが示唆され、A β はプリオン様の挙動をとって病理形成すると考える「プリオン仮説」が支持されるに至った。しかし、AD 脳内でどのような分子が seed 効果を発揮するのかは未だ不明である。

A β 蓄積の seed は伝播能を持ちある程度移動可能な分子であることから、APP tg 脳あるいは AD 脳の可溶性脳抽出液中に存在する A β 分子種が seed 能を持つ可能性を考え、seed の同定と seed 効果の発揮メカニズム解明を目指した。

1-4. A β を標的とした既存の治療とその問題点

現在、AD の治療薬としては、コリンエステラーゼ阻害剤であるドネペジル、ガラントミン、リバスチグミンや、N-Methyl-D-Aspartate (NMDA)受容体の阻害剤であるメマンチンを投与する対症療法が行われているのみである。これまでに AD のメカニズムを標的とする疾患修飾療法として、アミロイド仮説に基づき、A β を標的とした治療法として、抗 A β 抗体を用いた受動免疫療法、A β ペプチドを投与する能動免疫療法、A β の産生を抑制する β -secretase 阻害剤や γ -secretase modulator 等が開発されたが、現時点で下に記述する抗 A β 抗体 aducanumab による受動免疫療法以外に、認知機能改善の有効性が確認された疾患修飾療法はない。

A β 免疫療法は、A β の投与、あるいは抗 A β 抗体の投与により脳内に移行した抗 A β 抗体による、脳からの A β 除去を企図した治療法である。APP tg に凝集した A β をワクチン様に免疫する、あるいは抗 A β 抗体を投与すると、脳内の A β 斑が消失することが分かり、免疫療法の有効性が明らかとなった^{60,61}。これまでに、多様な会合状態の A β を標的にした抗 A β 抗体を利用した受動免疫療法の開発が進められた。しかし、今まで行われた臨床試験では、いずれも有意に認知機能低下を抑制する効果が得られず実用化には至っていなかった⁶²。aducanumab は凝集した A β を認識するヒト B 細胞の抗体ライブラリーからスクリーニングされた抗 A β 抗体である。aducanumab を用いて軽度認知機能障害群～早期 AD 患者に受動免疫療法を行ったところ、PET を用いたアミロイドイメージングによりアミロイド蓄積が容量依存的に減少し、認知機能低下を遅らせることが明らかとなった⁶³。そこで aducanumab を用いた、軽度認知障害～早期 AD を対象とした第 III 相臨床試験が行われ、2019 年 aducanumab 高容量投与群で有意な症状進行抑制、アミロイドイメージングでの A β 集積低下効果が得られたと報告された。A β を標的とした根本治療薬で第 3 相試験において有効性が確認された初めての例であり、今後実用化が期待されている。A β 受動免疫療法の重要な副作用に頭部 MRI での異常所見 amyloid-related imaging abnormalities (ARIA)があり、血管周囲の浮腫を反映する ARIA-E、微小出血やヘモジデリン沈着を反映する ARIA-H の 2 種類が挙げられる^{64,65}。抗 A β 抗体によってアミロイド斑が分解されることで、血管壁のアミロイドアンギオパチーに A β が集積し血管傷害が起きる可能性、あるいはアミロイ

ド斑の分解に伴い、毒性を有する可溶性 A β 分子が脳全体に拡散した可能性が考えられた。A β 免疫療法の副作用を低減させ、より治療効果を高めるには、より発症早期に治療介入をする必要がある。さらに、病理形成に関与する A β 分子種を同定し、その A β 分子種を標的とした抗体を利用することにより、より効率的な A β 免疫療法も可能であると考えられた。

2. 目的

本研究では、アミロイド斑蓄積を有する APP tg 脳あるいは AD 脳の可溶性抽出液中に A β 蓄積を誘導する seed 分子が存在すると予想し、seed 分子の同定と分子性状の解析を一つ目の目的とした。APP tg 脳のトリス可溶画分をゲルろ過クロマトグラフィーで分子量毎に分離し、A β ELISA や抗 A β 抗体を用いたイムノブロットで各フラクションに含まれる A β 量を、*in vivo injection* 実験で A β 蓄積を誘発する seed 能をそれぞれ評価した。また、各フラクションに存在する A β 分子の性状を、抗 A β オリゴマー抗体や A β オリゴマー特異的な ELISA を用いて検討した。また、A β seed 分子が A β 蓄積を誘発する機序の解明を二つ目の目的とし、*in vitro* A β 凝集実験や、*in vivo injection* 実験を行った。*In vivo* の検討では、seed 接種後のマウス脳内 A β 動態の変化を経時的に解析した。AD 脳に存在する seed 分子の性状解析を三つ目の目的とし、AD 脳トリス可溶性画分をゲルろ過クロマトグラフィーで分離し、各フラクションに含まれる A β 量を ELISA で測定し、*in vivo injection* 実験で seed 脳を評価した。また、seed を構成する A β 分子や脳内アミロイド蓄積形態が、seed 分子の性質とどのように関連するか検討した。これらの検討を通して、最終的には AD において A β 蓄積が時空間的に広がる機序を解明することを目指した。

3. 実験方法

3-1. マウス

本研究では、当研究室で作成された APP トランスジェニックマウス (以下 APP tg) である A7 系統マウスを用いた。A7 系統マウスは、2 種類の家族性 AD 変異、*Swedish* 型変異 (K670N/M671L) と *Austrian* 変異 (T714I) を有するヒト APP を、Thy1.2 プロモーター下で神経細胞特異的に過剰発現させたマウス⁶⁶ であり、遺伝学的背景は C57BL/6J 系統にバッククロスされている。A7 系統マウスにおけるヒト APP の発現量は内因性マウス APP の約 1.4 倍であり、9~12 ヶ月齢から大脳新皮質においてアミロイド斑蓄積が開始し、経時的に増加する。マウスは 12 時間の明暗サイクルで飼育した。全ての動物実験は、東京大学大学院医学系研究科・医学部動物実験委員会の承認のもと、倫理面に十分配慮して行った。

3-2. 剖検脳

Dr. Matthew P. Frosch、Dr. Bradley T. Hyman より、Massachusetts Alzheimer's Disease Research Center において、患者家族の同意を得て剖検時に収集された脳の、凍結保存された組織切片とパラフィン切片の提供を受けた。病理学的に AD の診断基準をみたく AD 6 症例、生前に認知機能障害を指摘されず病理学的にも AD の所見を認めない

コントロール 6 症例分について検討した。各症例の年齢、Braak stage (タウ病理の進展の程度を示す指標⁵²⁾)、組織片を採取した脳の部位を表 1 に示す。ヒト脳組織を用いた実験については、東京大学大学院医学系研究科・医学部倫理委員会の承認のもと (承認番号 11959)、倫理面に十分配慮して行った。

3-3. 脳抽出方法

3-3-1. マウス脳回収

マウスをジエチルエーテル麻酔後、脳を摘出した後、左右半球に分割して、小脳と脳幹を取り除いた。生化学的解析に用いる分を 15 mL チューブに入れ、液体窒素中で急速凍結後、速やかに -80 °C で保存した。海馬のみを解析に用いる場合は、脳を摘出した後、氷冷した金属の台の上で速やかに海馬を分離し、海馬を 1.5 mL チューブに入れ、液体窒素中で急速凍結後、-80 °C で保存した。

3-3-2. 段階抽出

凍結保存していたマウス脳あるいはヒト脳組織片 (灰白質部分) の質量を測定し、脳質量 (g) の 10 倍容量 (mL) のトリス緩衝生理食塩水 (Tris buffered saline; TBS) (Tris 50 mM, NaCl 150 mM) (pH 7.6) を加え、ポッター型ホモジナイザーを用いて 25 回組織破碎した。TBS には予め、タンパク質分解酵素阻害剤カクテル錠 (Roche)

を加えた (TBS with inhibitor; TBSi)。破碎液を遠心チューブに移し、卓上超遠心機 (Optima TLX-120 Ultracentrifuge, Beckman coulter) で 267,000 ×g、20 分、4 °C で遠心分離し、上清 (TBS 画分/トリス可溶画分) を -80 °C 保存した。ペレットに対して、脳質量の 10 倍容量の 2% Triton X-100/TBSi を加え、同様の条件で 25 回組織破碎、遠心分離し、上清を -80 °C 保存した。ペレットに対し、2% ドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate; SDS) /TBSi を加え、同様の条件で 25 回組織破碎し、37 °C で 1 時間インキュベートした後、267,000 ×g、20 分、20 °C で遠心分離し、上清を -80 °C 保存した。残ったペレットに対し 500 mL の 70% ギ酸を加えて、目視で組織片が見えなくなるまでソニケーター (Branson Analogue Sonifier 250A, Branson) で 10 回以上超音波破碎し、267,000 ×g、20 分、4 °C で遠心分離した。得られた上清を 1.5 mL チューブに移して、Speed-Vac 濃縮装置 (Savant™ SPD131DDA Speed Vac™, Thermo Fisher Scientific) で乾燥させた後、脳質量と同容量の dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解し、-80 °C 保存した (SDS 不溶画分/ギ酸画分)。

3-3-3. TBS 繰り返し抽出

3-3-2. と同様に、マウス脳組織の質量の 10 倍量の TBSi を加えてホモジナイザーで 25 回破碎し、267,000 ×g、20 分、4 °C で遠心分離し、上清 (TBS 画分/トリス可溶画分) を -80 °C で保存した。ペレットに対して、脳質量の 10 倍量の TBSi を加え、同様の条件で組織破碎、遠心分離し、上清 (TBS 画分 2 回目) を -80 °C で保存した。こ

の操作を繰り返し、「TBS 画分 3 回目」、「TBS 画分 4 回目」、「TBS 画分 5 回目」を得た。TBS 画分 5 回目を採取した後のペレットを半分に分け、一方のペレットはリン酸緩衝液 (Phosphate buffered saline; PBS) ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.865 g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.312 g, NaCl 7.65 g/1L 蒸留水) を脳質量の 5 倍量加えて十分に超音波破碎した (TBS 不溶画分 PBS 懸濁)。もう半分のペレットには、70%ギ酸 500 μL を加えて十分に超音波破碎した後、267,000 $\times\text{g}$ 、20 分、4 $^\circ\text{C}$ で遠心分離し、上清 (TBS 不溶画分ギ酸溶出) を回収後、Speed-Vac 濃縮装置で乾燥し、脳質量の 5 倍量の DMSO に溶解した。

3-4. ゲルろ過クロマトグラフィー

APP tg 脳やヒト脳 TBS 画分を、ゲルろ過クロマトグラフィーで分離した。Superdex75 10/300 カラム (GE Healthcare) を AKTA purifier 10 (GE Healthcare) に接続し、緩衝液として PBS を用い、流速 0.5 mL/min で分離した。分離後のサンプルを 0.2 mL あるいは 0.5 mL ずつ回収し、ELISA やイムノブロットで解析した (後述)。分子量マーカーとして Gel Filtration Calibration Kit (GE Healthcare) に含まれる、Aldolase、Ovalbumin、Ribonuclease A (分子量はそれぞれ 158×10^3 , 44×10^3 , 13.7×10^3) の 3 種類もしくは、Ferritin (分子量 440×10^3) を加えた 4 種類を分子量測定に用いた。

3-5. A β 特異 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) による A β 濃度測定

A β を特異的に認識するサンドイッチ ELISA を用い、サンプル中の A β 濃度を測定した。A β 42 測定に BNT77/BC05 ELISA (FUJIFILM)、A β 40 測定に BNT77/BA27 ELISA (FUJIFILM) を用いた。また、A β オリゴマー濃度測定の際には、A β オリゴマーを特異的に認識する 2 種類の ELISA (High Molecular Amyloid β Oligomer ELISA Kit, FUJIFILM; Human Amyloid β oligomers (82E1-specific) Assay Kit, IBL) を用い、キット付属のプロトコルに従って操作した。プレートリーダー Spectramax M2 (Molecular Devices)あるいは Glomax Discover (promega) で発光を測定した。

ELISA 測定前に A β 多量体をモノマーに分離する目的で、グアニジン処理を行なった⁶⁶。あらかじめ緩衝液で測定サンプルを適切な濃度に希釈し、サンプルと等量の 1 M グアニジン塩酸 (終濃度 0.5 M グアニジン塩酸、マウス脳由来のサンプル) あるいは 5 M グアニジン塩酸 (終濃度 2.5 M グアニジン塩酸、ヒト脳由来のサンプル) を混ぜ、室温で 1 時間インキュベートした。ヒト脳由来のサンプルは、反応後、終濃度 0.5 M グアニジン塩酸となるように希釈して測定した。

3-6. イムノブロットティング

イムノブロットティングを行う際は、解析するサンプルに、サンプルバッファー (終

濃度 2% SDS, 0.08 M Tris, 15% glycerol, 1% Brilliant green, 1% CBB-G250) とメルカプトエタノール (終濃度 2%) を加え、95 °C で 10 分間加熱した後、10–20% Novex Tris-Glycine gels (Thermo Fisher Scientific) にアプライし、Tris-Glycine SDS running buffer (Thermo Fisher Scientific) 中で泳動した。その後、PVDF (polyvinylidene difluoride) メンブレン (millipore) に転写した。転写後のメンブレンは 85 °C に熱した D-PBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline) 中で 10 分間煮沸した。次に、メンブレンを 5% スキムミルク/TBS-T (TBS with 0.1% Tween20) 中で室温 30 分間ブロッキングし、TBS-T で 4 回 (各回 5 分間) 洗浄した。メンブレンを 1 次抗体液に浸潤し 4 °C で 12 時間以上反応させ、洗浄した後、西洋わさび由来ペルオキシダーゼ (horseradish peroxidase; HRP) で標識された 2 次抗体液中に浸潤し室温で 2 時間反応させ、再度洗浄した。抗体の希釈にはイムノエンハンサー (FUJIFILM) を用いた。イムノスター (FUJIFILM) のキットを用いて発色させ、Image Quant LAS-4000 mini (FUJIFILM) で化学発光を検出した。高感度での検出が必要な際は Super Signal West Femto (Thermo Fisher Scientific) のキットを発色に用いた。ドットブロットの際は、解析するサンプルを、直接ニトロセルロースメンブレン (GE Healthcare) に 2 μ L ブロットし、乾燥させた。この後は、イムノブロッティングと同様の手順で抗体液と反応させ、検出を行った。使用した 1 次抗体と希釈倍率は、抗 A β マウスモノクローナル抗体 (clone 82E1, 1:1000, IBL)、抗 APP/抗 A β マウスモノクローナル抗体 (clone 6E10, 1:1000, BioLegend)、抗 A β オリゴマーラビットポリクローナル抗体 (A11, 1:1000, Thermo Fisher Scientific)、抗アミロイ

ド線維ラビットポリクローナル抗体 (OC, 1:1000, millipore) である。

3-7. 蛋白質濃度の測定

銅の酸化還元反応を利用して蛋白質濃度を測定する BCA Protein Assay Kit (TaKaRa) を用いて、サンプル中の蛋白質濃度を測定した。562 nm の吸光度を測定する際は、Spectramax M2 を用いた。

3-8. A β の免疫除去実験

22 ヶ月齢 APP tg 脳 TBS 画分をゲルろ過クロマトグラフィーで分離して得たフラクションに対し、A β の免疫除去を行った。まず、1.5 mL 蛋白質低吸着チューブ (Merck) に、解析するフラクション 250 μ L、PBS 250 μ L、recombinant Protein G agarose beads (以下 beads と記載) (Thermo Fisher Scientific) 25 μ L を加え、4 $^{\circ}$ C で 2 時間回転しながらインキュベートした後、8,000 rpm、5 分間、4 $^{\circ}$ C で遠心し、上清 (preclear 済みサンプル) を回収した。次に、beads 25 μ L に、5 μ g の抗体と、クエン酸バッファー (2.35 g クエン酸、4.6 g Na₂PO₄/500 mL 蒸留水、pH=5.0) を液量が合計 400 μ L となるように加え、4 $^{\circ}$ C で 2 時間インキュベートした。遠心後、上清を捨て、沈殿した beads を、3 回 TBS で洗浄した。抗体は、抗 A β マウスモノクローナル抗体 BAN50 (FUJIFILM)、

4G8 (BioLegend)、コントロール抗体として抗 TDP-43 ラビットモノクローナル抗体 C2 (当研究室で作成、抗原はヒト TDP-43 の最 C 末端 13 アミノ酸) を用いた。

A β の免疫除去では、beads-BAN50 複合体に、preclear 済みサンプル 450 μ L を加え、4 $^{\circ}$ C で 12 時間以上反応させた後、8,000 rpm、4 $^{\circ}$ C、5 分間遠心し、上清を回収した。次いで、回収した上清 400 μ L を beads-4G8 複合体に加え、4 $^{\circ}$ C で 2 時間反応させた後、遠心して上清を回収した。同様の操作を BAN50、4G8 の順で繰り返し、合計 4 回行った免疫除去した後の上清を回収し、A β 免疫除去後サンプルとして *in vivo injection* 実験に使用した。コントロールとして、beads-抗 TDP-43 抗体複合体に preclear 済みサンプル 450 μ L を加え、4 $^{\circ}$ C で 12 時間以上反応させた後、8,000 rpm、4 $^{\circ}$ C、5 分間遠心して回収した上清を *injection* 実験に用いた。免疫除去操作後の peak 1 A β 画分中の A β 42濃度を BNT77/BC05 ELISA で測定した。

3-9. *In vivo* マイクロダイアリシス

マイクロダイアリシス法^{67,68}を用いて、脳内に十分な A β 蓄積を有する 20-22 ヶ月齢 APP tg の脳間質液の回収を行った。

まず、マウス脳にガイドカニューレを挿入した。マウスに体重 (g) x 20 (μ L) の 20 mg/mL 抱水クロラル (400 mg/kg 体重) を腹腔内投与して十分に麻酔をかけ、頭部

固定台上に3点で固定した。術野の剃毛をし、皮切して頭蓋骨を露出させた。頭部固定台を脳定位固定装置上に設置し、ラムダ、ブレグマ、AP -2.8 mm、 LM +/-2.0 mm の位置を基準に、頭蓋骨の前後左右の高さを水平に合わせた後、AP -2.8 mm、LM -0.5 mm の位置に、ドリルで1 mm 大の穴をあけた。ガイドカニューレ (EICOM) を 37.5 度の角度で脳表から 1.3 mm の深さに挿入し、セメントで周囲を固定した。

ガイドカニューレ挿入3日後に、脳間質液の回収を行った。実験当日に、マイクロダイアリシスの灌流液として人工脳脊髄液 (以下 aCSF; artificial cerebrospinal fluid) を調整した (CaCl₂ 1.3 mM、MgSO₄ 1.2 mM、KCl 3.0 mM、KH₂PO₄ 0.4 mM、NaHCO₃ 25 mM、NaCl 122 mM/蒸留水に、アルブミンを終濃度 0.15%となるよう添加し、0.22 μm 孔径の PVDF フィルターを通したもの)。間質液の回収には、1,000 kDa カットオフ透析膜プローブ (EICOM) を用いた。プローブを 70%エタノールに 3 秒間浸し、蒸留水で洗浄した後、マウス脳に設置したガイドカニューレにプローブを挿入し固定した。FEP チューブ (EICOM) を用いて、aCSF をみたした 2.5 mL シリンジをプローブの inlet に接続し、プローブの outlet を、ローラーポンプ (ERP-10, EICOM) を経由してサンプルを回収する自動サンプラー (820Microsampler, Univentor) にそれぞれ接続し、灌流路を形成した。灌流路内は aCSF でみたし、気泡が入らないよう注意した。流路に接続した 2.5 mL シリンジをシリンジポンプ (KDS101, Kd Scientific) に設置し、10 μL/min の速度で 2-3 時間脳脊髄液を灌流させるプレ灌流を行った後、灌流速度を 1.0-

1.3 $\mu\text{L}/\text{min}$ の速度に落とし、脳間質液を 4 $^{\circ}\text{C}$ で回収した。回収開始後、2-20 時間に得たサンプルを解析に用いた。灌流中、マウスは常に明条件に置き、回転ケージ内を自由に行動できる状態で飼育した。

脳内に存在する $\text{A}\beta$ はモノマーから高分子量オリゴマーに至るまで、種々の会合状態をとっている。脳内から抽出した $\text{A}\beta$ 分子種が 1,000 kDa カットオフ透析膜プローブを通過できることを確認する実験を行った。氷上においた 1.5 mL チューブに、高齢 APP tg 脳 TBS 画分を入れ、プローブを浸した。プローブの outlet を、ローラーポンプを経由してサンプラーに接続し、ローラーポンプの灌流速度を 1.0-1.3 $\mu\text{L}/\text{min}$ に設定し、4 $^{\circ}\text{C}$ で溶液を回収した。

3-10. *In vivo* injection 実験

既報⁵⁶を参考にマウス脳に脳抽出液由来サンプルを注入する *in vivo* injection 実験を行った。

マウスに体重 (g) x 20 (μL) の 20 mg/mL 抱水クロラルを腹腔内投与し (400 mg/kg 体重)、十分に麻酔をかけた。マウスの頭部を固定台に 3 点で固定し、術野の剃毛、皮切をし、頭蓋骨を露出させた。脳定位固定装置を用いて、ラムダ、ブレグマ、AP-2.5 mm, LM +/-2.0 mm の位置を基準に、頭蓋骨の前後左右の高さを水平に合わせた後、

AP -2.5 mm、LM +/- 2.0 mm の位置にドリルで 1 mm 大の穴をあけた。10 μ L ハミルトンシリンジをシリンジポンプ (KDS101, Kd Scientific) に設置し、ハミルトンシリンジとガラスキャピラリーを FEP チューブで接続し、流路内をフロリナートで満たした。ガラスキャピラリーの先端から注入するサンプルを吸い、マウス海馬 (AP -2.5 mm、LM +/- 2.0 mm、DIV -1.8 mm) にガラスキャピラリーを挿入し 2 分静置した後、0.35 μ L/min の速度で 2.5 μ L のサンプルを注入し、8 分間ガラスキャピラリーを静置した後、静かに抜去し、縫合した。左海馬には seed 能を評価したいサンプルを、右海馬にはコントロールの PBS を接種した。

3-11. 免疫組織化学的解析

3-11-1. パラフィン切片作成

マウスをジエチルエーテルで麻酔後、脳を摘出し、全脳または半脳を、4% パラホルムアルデヒド/PBS (pH 7.4) に入れ、室温で 24 時間浸潤固定した。固定後の脳組織片を 3-6 mm 幅の冠状断で細断し、室温で、充分量の 70%、80%、90%、99%、99% エタノール/蒸留水の順に浸潤して脱水 (反応時間: 各 2 時間、99%エタノールの 2 回目のみ 12 時間以上)、99%キシレンに 2 回浸潤した後 (各 2-3 時間)、65 $^{\circ}$ C のパラフィン液に 3 回 (1・2 回目 1 時間以上、3 回目 12 時間以上) 浸透させ、パラフィンに包埋してブロックを作成した。マイクロトーム (HYRAX S30, Zeiss) を用いて 4 μ m 厚

に薄切し、スライドガラス上に乗せ、37 °Cで2 日間以上乾燥した。

3-11-2. 酵素抗体法による免疫染色

パラフィン切片を 99%キシレンに 3 回（各 5 分）浸潤して脱パラフィン処理を行った後、アルコール系列（99%、99%、90%、80%、70%エタノール/蒸留水、各 1 分）に順に浸潤して親水化し、流水中で 10 分洗浄した。その後、microwave 処理（mw）、proteinase K 処理（proK）、ギ酸処理（FA）の内、各抗体に必要な前処理を行った。10% 仔ウシ血清（calf serum; CS）/PBS を切片上にのせて室温で 30 分インキュベートし、タンパク質の非特異的結合のブロッキングを行った。一次抗体を、10% CS/PBS を用いて希釈し切片上に乗せ、室温で 12 時間インキュベートした後、TBS に 3 回（5 分間）浸して洗浄した。次に、10% CS/PBS で 500 倍に希釈したビオチン化抗マウス IgG 抗体をあるいはビオチン化抗ラビット IgG 抗体（Vector Laboratories）を切片上に乗せ、室温で 2 時間反応させた後、TBS で 3 回洗浄した。続いて、HRP 結合 avidin-biotin complex 液（ABC elite, Vector Laboratories）を調整し、切片上に乗せ、室温で 1 時間反応させ、TBS で 3 回洗浄した。切片を、0.015%過酸化水素を添加した 20 mg/mL DAB (diaminobenzidine)/TBS 液中に 5-10 分間浸潤し発色させた後、流水で 10 分間洗浄した。その後、エタノール系列（70%、80%、90%、99%、99%エタノール、各回 1 分）、99%キシレン（3 回、各回 1 分）に順に浸潤して脱水、透徹を行った後、HSR 液（シスメックス）で封入した。使用した 1 次抗体、希釈倍率（濃度）、前処理は以下

の通り、抗 A β マウスモノクローナル抗体 (clone 82E1, 1:1000, mw+proK, IBL)、抗 A β 40マウスモノクローナル抗体 (clone BA27, 1:1000, FA, FUJIFILM)、抗 A β 42 マウスモノクローナル抗体 (clone BC05, 1;100,000, FA, FUJIFILM)、抗 GFAP (Glial fibrillary acidic protein)マウスモノクローナル抗体 (clone GA5, 1:1000, mw, Merck)、抗 Iba1 ウサギポリクローナル抗体 (1:1000, mw, FUJIFILM)、抗ユビキチンマウスモノクローナル抗体 (clone Ubi-1, 1:1,000, mw, Merck)。

前処理の方法を以下にまとめる。

・ microwave 処理 (mw) : 10 mM クエン酸緩衝液 (1.8 mM 無水クエン酸、8.2 mM 無水クエン酸三ナトリウム/蒸留水)に切片を乗せたスライドガラスを浸し、電子レンジで 20 分間加熱した。反応終了後、4 °Cで常温まで冷まし、流水で 10 分間洗浄した。

・ proteinase K 処理 (proK) : 20 mg/mL proteinase K (Takara) を希釈し、100 μ g/mL Proteinase K/TBS 溶液を作成し、37 °Cに加温し、切片を乗せたスライドガラスを浸し、6 分間 37 °Cでインキュベートした。反応終了後、流水で 10 分間洗浄した。

・ ギ酸処理 (FA) : 99%ギ酸中に切片を乗せたスライドガラスを浸し、5 分間インキュベートした。反応終了後、流水で 10 分間洗浄した。

3-11-3. Thioflavin S 染色

パラフィン切片を、キシレン系列、エタノール系列に浸潤させて脱パラフィンし、

流水洗浄した後、thioflavin S (ThS, Sigma)を終濃度 0.1%となるよう 50%エタノール/蒸留水に溶解した液に浸潤し、10 分間反応させた。その後、70%エタノールで 5 回洗浄し、流水で 10 分間洗浄した後、水溶性封入材 PermaFluor (Thermo Fisher Scientific) で封入し、乾燥させた。

3-11-4. A β 蓄積面積の定量

前述のように冠状断でパラフィン切片を作成した。*In vivo* injection 実験後のマウス脳については、1 匹につき injection 部位 (AP-2.5mm)と、injection 部位から前後に 100 μm ・200 μm 離れた切片の計 5 枚を作成し、抗 A β 抗体 82E1 を用いて免疫染色を行った。光学顕微鏡 (BX51, OLYMPUS) で観察、写真を撮影し、Image J を用いて海馬の A β 蓄積面積 (%) を定量し、5 枚の A β 蓄積面積の平均値を算出した。

3-12. *In vitro* A β 凝集実験

既報^{12,69}を参考に、マウス脳抽出液の seed 能を *in vitro* で確かめる目的で、A β 凝集実験を行った。

3-12-1. seed の調製

あらかじめ、seed 能を確かめるサンプルの準備を行った。18 ヶ月齢以上の APP tg 脳あるいは野生型マウス脳の TBS 画分をゲルろ過クロマトグラフィーで分離し、各

フラクションの A β 濃度を BNT77/BC05 ELISA で測定し (3-4、3-5 参照)、seed 能を評価したいフラクションを選んだ。ポジティブコントロールとして合成 A β fibril を準備した。合成 A β 42 ペプチド (ペプチド研) を 1 mg/mL となるよう 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) (関東化学)に溶解した後、Speed-Vac 濃縮装置で乾燥し、終濃度 0.1 mg/mL となるように 2%DMSO/PBS に溶解し、0.22 μ m 孔径のフィルターを通し、A β 42 液を調整した。A β 42 液を 37 $^{\circ}$ C で 1 週間振盪しながらインキュベートした後、氷上で sonication したものを合成 A β fibril として用いた。

3-12-2. Thioflavin T アッセイ

合成 A β 40 ペプチド (ペプチド研) を、1 mg/mL となるように HFIP に溶解し、乾燥した後、終濃度 0.2 mg/mL となるよう 2%DMSO/PBS に溶解し、0.22 μ m 孔径のフィルターを通し、A β 40 液を調製した。A β 40 液 25 μ L に、3-12-1 で調製した seed 液 25 μ L あるいはコントロールとして PBS 25 μ L 加えた。37 $^{\circ}$ C に設定した PCR サーマルサイクラー (Takara) 中で、決められた時間インキュベートした。回収したサンプルは、解析まで氷上で保存し、線維化の進行を抑制した。インキュベート後、96 ウェルプレートに、測定するサンプル 20 μ L と、200 μ L の 3 μ M thioflavin T (ThT) (東京化成工業株式会社)/0.1 M グリシン-NaOH (pH 8.5) (0.22 μ m 孔径フィルター済)を加え、速やかに Spectramax M2 (Molecular Devices)を用いて蛍光を計測した(λ_{ex} = 443 nm、 λ_{em} = 484 nm)。

3-13. 統計処理

統計解析は、Excel (Microsoft)もしくは Prism (GraphPad)を用いて行った。2 群間の解析には Paired t-test もしくは Student's t-test を、3 群間以上の解析には 2-way ANOVA 検定を用い、 $p < 0.05$ を有意であるとした。

4. 結果

4-1. APP tg 脳中のトリス可溶性 A β 分子種の解析

4-1-1. APP tg 脳中に存在する可溶性 A β 分子種 (peak 1, 2, 3 A β)の分離

これまで当研究室では、APP tg 脳に、分子量の異なる 3 種類の可溶性 A β 分子種が存在することを明らかにしている (図 2、仲泰史博士論文より引用)。そこで、十分な A β 蓄積を有する 18 ヶ月齢以上の APP tg 脳に、脳質量の 10 倍容量の TBS を加えて組織破碎し、超遠心して回収した上清を TBS 画分として回収した。APP tg 脳の TBS 画分を、Superdex 75 カラム 1 本を利用したゲルろ過クロマトグラフィーで分離した。本研究で用いた A7 系統の APP tg マウスは、トランスジェン上の家族性 AD 変異により A β 42産生が優位となっているため、各フラクションの A β 42濃度を BNT77/BC05 ELISA で測定した。その結果、分子量 $200-300 \times 10^3$ (peak 1 A β)、 $50-60 \times 10^3$ (peak 2 A β)、約 15×10^3 (peak 3 A β) の 3 つのピークに A β 42が分取され (図 3A)、先行研究と合致した結果が得られた。さらに、ゲルろ過クロマトグラフィーで分離した各フラクションを、抗 A β 抗体を用いたイムノブロットィングで解析した (図 3B)。その結果、peak 1 A β 画分中には、分子量約 4.5×10^3 の移動度に A β に相当すると考えられるバンドが検出され、A β が存在することが確かめられた。一方、peak 2 A β 、peak 3 A β 画分中に分子量約 4.5×10^3 の A β に相当するバンドは認められなかった。分子量 $200-300 \times 10^3$ に相当する peak 1 A β 画分中の A β のバンドが分子量約 4.5×10^3 の移動度であったこと

から、peak 1 A β 画分中の A β は SDS 非耐性であることが示唆された。また、peak 2 A β 、peak 3 A β 画分中に分子量約 4.5×10^3 の A β のバンドが検出されなかった理由として、A β 濃度が低く検出感度以下であった可能性が考えられた。また、分泌型 APP (secreted APP; sAPP)のバンドや、マウスイムノグロブリンへの非特異的な反応によるバンドが多数みられており、A β 分子が SDS 耐性を獲得して、移動度の遅いバンドとして存在し、これらのバンドにマスクされて検出されていない可能性も考えられた。

次に、18 ヶ月齢以上の野生型マウス脳 TBS 画分を同様にゲルろ過クロマトグラフィーで分離し、ELISA 法で各フラクションの A β 42 濃度を測定したところ、peak 1 A β に相当する分子量 $200-300 \times 10^3$ の画分中には A β 42 が含まれていなかった。peak 2 A β や peak 3 A β と合致する分子量の画分には、少量の A β 42 が検出された (図 4)。これらの結果から、マウス内因性 A β は peak 2 A β 、peak 3 A β 画分に分離されるが、peak 1 A β 画分には存在しないことが示唆された。

4-1-2. Peak 1 A β 画分内には A β オリゴマーが存在する

A β 42 の分子量は約 4.5×10^3 にもかかわらず高齢 APP tg 脳 TBS 可溶画分中の A β は 4.5×10^3 より大きな 3つの分子量フラクションに分画されたことから、これらの画分中に A β は、A β 同士会合してオリゴマーを形成している可能性、あるいは何らかの分子と複合体を形成している可能性が考えられた。そこで peak 1 A β 、peak 2 A β 、peak

3 A β 画分中に A β オリゴマーが存在するか確かめるため、A β オリゴマー特異的 ELISA を用いて解析を行った。A β オリゴマー特異的 ELISA は、capture と detection に同じ抗 A β 抗体を用いることにより、A β の単量体は認識せず、A β オリゴマーのみを特異的に認識する。本研究では抗 A β 抗体として 82E1、BAN50 をそれぞれ用いた 2 種類の A β オリゴマー-ELISA を用いて検討した。82E1 を用いた ELISA (IBL)は 2 量体以上のオリゴマーを、BAN50 を用いた ELISA (FUJIFILM)は 16 量体以上の高分子量 A β オリゴマーを認識すると報告されている^{50,51} (図 5A)。18 ヶ月齢以上の APP tg 脳 TBS 画分を、ゲルろ過クロマトグラフィーで分離し、各画分中の A β オリゴマー濃度を 82E1、あるいは BAN50 を用いた A β オリゴマー特異 ELISA で測定したところ、peak 1 A β 画分に合致する分子量 200-300 $\times 10^3$ の画分に A β オリゴマーのピークが検出された (図 5B、図 5C)。一方いずれの ELISA でも peak 2 A β 、peak 3 A β 画分中に A β オリゴマーは検出されなかった。これらの結果から、peak 1 A β 画分中には A β オリゴマーが存在することが示唆された。

4-1-3. 抗 A β オリゴマー抗体 A11、OC は peak 1 A β 画分中の A β 分子種と反応する

さらに、peak 1 A β 画分中の A β オリゴマーと、既存の抗 A β オリゴマー抗体の反応性を確かめた。A11 抗体⁴³、OC 抗体⁴⁴はいずれも APP tg 脳や AD 脳中に含まれる A β オリゴマーを特異的に認識する抗体である⁴⁵。18 ヶ月齢以上の APP tg 脳 TBS 画

分をゲルろ過クロマトグラフィーで分離し、各フラクションと A11、OC との反応性をドットプロット法で解析した (図 6)。その結果、peak 1 A β 画分、peak 2 A β 画分を含む、分子量 55-270 $\times 10^3$ 程度の広範囲のフラクションが、A11、OC に対し陽性を示した。また、抗 A β 特異抗体 82E1 及び抗 APP/A β 抗体 6E10 の混合抗体を用いて同様のフラクションを解析すると、分子量約 70-270 $\times 10^3$ のフラクションが陽性を示し、A11、OC 陽性画分に A β が存在していることが示唆された。一方、2次抗体をコントロール抗体として用い、A11、OC 抗体を認識する抗ラビット IgG 抗体はどの画分にも陽性を示さず、また 82E1、BAN50 抗体を認識する抗マウス IgG 抗体は、分子量 100-200 $\times 10^3$ の画分に陽性を示した。これらの結果から、分子量 200-300 $\times 10^3$ の peak 1 A β 画分には A11、OC 陽性の A β オリゴマーが存在している可能性が示唆された。一方 peak 2 A β 画分は A11、OC 陽性を呈したものの、A β が存在しているか否かドットプロット法では判断できなかった。また、peak 3 A β 画分は A11、OC 陰性であった。

4-1-4. Peak 1 A β 画分中の A β 分子種は *in vivo* マイクロダイアリシス法によって脳間質液から回収されない

次に、脳 TBS 画分から分離した A β 分子種が、脳間質液中に存在するかどうか確かめるため、1,000 kDa カットオフ値の微小透析膜プローブを用いた *in vivo* マイクロダイアリシス法により、4 匹の 18 ヶ月齢以上の APP tg 脳から脳間質液を回収した。

BNT77/BC05 ELISA を用いて脳間質液中の A β 42 濃度を測定したところ、A β 42 濃度は 6-10 pM であった (図 7A)。次に、脳間質液をゲルろ過クロマトグラフィーで分離した後、各フラクションの A β 42 濃度を ELISA 法で測定した。結果、ゲルろ過クロマトグラフィーで分離した画分では、4 匹中 2 匹 (マウス C、D) において peak 3 A β に相当する分子量約 15×10^3 の分子量画分に、A β のピークが検出されたが、残り 2 匹 (マウス A、B) では明瞭な A β ピークは検出されなかった。Peak 1 A β あるいは peak 2 A β に相当する A β 分子種はいずれのマウスでも検出されなかった (図 7B)。

そこで、本実験で使用した 1,000 kDa カットオフ透析膜プローブに、peak 1 A β 中の A β 分子が通過できるか確認するため、18 ヶ月齢以上の APP tg 脳 TBS 画分に透析膜プローブを直接浸し、マイクロダイアリシスと同様の条件で回収を行った。得られたサンプルをゲルろ過クロマトグラフィーで分離した後、各フラクションの A β 42 濃度を ELISA 法で測定したところ、peak 1 A β 画分、peak 3 A β 画分に A β 42 が検出され (図 7C)、peak 1 A β 分子が 1,000 kDa カットオフ透析膜プローブを通過しうることが確認できた。以上より、peak 1 A β 画分中の A β 分子種は、脳間質液中に回収されないことが分かり、peak 1 A β 画分中の A β 分子種は脳間質液中に存在しない可能性が考えられた。

4-1-5. Peak 1 A β 画分の反復抽出による検討

前項において、peak 1 A β 画分中の A β 分子種が、脳間質液中に検出されないという結果を得た。このことから、peak 1 A β 画分中の A β 分子種は、抽出過程で、A β 斑中のアミロイド線維が破碎されて可溶化した産物である可能性が考えられた。脳内に十分な A β 蓄積を有する高齢 APP tg 脳では、TBS 画分中の 100 倍以上のアミロイド線維由来の不溶な A β が存在することから、もし peak 1 A β 画分中の A β 分子種がアミロイド線維から溶出された産物であれば、抽出操作を繰り返すたびに、分子量 $200-300 \times 10^3$ の A β 分子種が抽出液中に溶出されると考えられた。そこでこの仮説を検証するため、18 ヶ月齢以上の APP tg 脳 TBS 画分採取後のペレットに、さらに TBS を加えて抽出する操作を 4 回繰り返した (TBS 2~5 回目)。A β 42 特異 ELISA で測定すると、TBS 2-5 回目の抽出液中には、1 回目の TBS 画分 (1.7 nM)以上の A β 42 が含まれることが分かった (図 8A)。そこで各 TBS 画分をゲルろ過クロマトグラフィーで分離したところ、TBS 画分 (1 回目) 中には、peak 1 A β 、peak 2 A β 、peak 3 A β の 3 つの A β ピークが検出され、peak 1 A β 画分が最も高いピークであった (図 8B 上パネル)。一方 TBS 2-5 回目中には peak 1 A β 、peak 2 A β 、peak 3 A β の 3 つの A β ピークが検出されたものの、peak 1 A β 画分の A β 42 量は peak 3 A β 画分の A β 42 量より少量であった (図 8B 下パネル)。さらに、TBS 5 回抽出後のペレットをギ酸で溶出すると、357.1 nM の A β が抽出され、TBS 抽出後にも不溶な A β が残っていることが分かった (図 8A)。以上よ

り、peak 1 A β 画分中に含まれる分子量 200-300 $\times 10^3$ の A β 分子種はアミロイド線維が抽出操作によって可溶化された A β である可能性は低いと考えられた。一方、peak 3 A β 画分の A β 分子種は抽出操作によって可溶化された A β を含んでいる可能性が考えられた。

4-2. APP tg 脳由来の可溶な A β 分子種の seed 効果の検討

4-2-1. Peak 1 A β 画分中の A β 分子種は *in vivo* で seed 効果を発揮する

これまでの検討で、APP tg マウス脳トリス可溶画分には分子量の異なる 3 種類の A β を含む画分、すなわち peak 1 A β 、peak 2 A β 、peak 3 A β 画分が存在しており、中でも分子量 200 $\times 10^3$ 以上の peak 1 A β 画分には A β オリゴマーが含まれていることが分かった。そこでこれらの A β 分子種が脳内で A β 蓄積を誘発する seed 効果を発揮するかを確かめるために、*in vivo* seeding 実験を行った。

18 ヶ月齢以上の APP tg 脳 TBS 画分をゲルろ過クロマトグラフィーで分離し、peak 1 A β 画分、peak 2 A β 画分を調製した。またコントロールとして、18 ヶ月齢以上の野生型マウス脳 TBS 画分を同様にゲルろ過クロマトグラフィーで分離し、peak 1 A β と相同な分子量 200-300 $\times 10^3$ のフラクションを得た。次に、まだ脳内に A β 蓄積を有さない、9-10 カ月齢の APP tg 脳左海馬に peak 1 A β 、peak 2 A β 、野生型マウス由来の分

分子量 $200-300 \times 10^3$ のフラクションを、右海馬に PBS を接種し、4 ヶ月間インキュベーションした後、抗 A β 抗体 82E1 を用いて免疫組織化学的に脳内 A β 蓄積量を評価した (図 9A)。結果、peak 1 A β を接種したマウスでは、インジェクション側の海馬の歯状回に、特徴的な帯状の A β 蓄積が観察された (図 9B、図 10)。一方 PBS をインジェクションした海馬にはそのような特徴的な A β 蓄積は認められなかった (図 9B、図 10)。A β 蓄積面積を測定したところ、peak 1 A β をインジェクション側の海馬は対側海馬に比べて有意に増加していた (図 9C)。これらの結果から、peak 1 A β 画分に *in vivo* で A β 蓄積を誘発する seed 能があることが分かった。

次に、peak 2 A β 画分を APP tg 脳左海馬に、PBS を右海馬に接種したところ、インジェクションした側の海馬、及び対側海馬で特徴的な A β 蓄積は観察されなかった (図 11A-B、図 12A)。一方、peak 1 A β を希釈し A β 濃度を peak 2 A β と揃えて APP tg 脳左海馬に接種したところ、peak 1 A β インジェクション側海馬に特徴的な帯状の A β 蓄積が観察された (図 11A-B、図 12B)。これらの結果から、peak 2 A β 画分の A β 分子種には seed 能が乏しいことが分かった。さらに、18 ヶ月齢以上の野生型マウス脳由来の分子量 $200-300 \times 10^3$ のフラクションを APP tg 脳左海馬に接種したところ、インジェクションした側の海馬、及び対側海馬で特徴的な A β 蓄積は観察されなかった (図 13A-B、図 14)。この結果から、APP tg マウス脳の peak 1 A β 画分に含まれる A β 分子種が seed 効果を発揮するために必要である可能性が示唆された。

4-2-2. Peak 1 A β 画分接種によって誘発される A β 蓄積の性状解析

Peak 1 A β を APP tg 脳海馬に接種すると、特徴的な形態の A β 蓄積が誘発された (図 15A, D)。誘発された A β 蓄積は主に、海馬歯状回で分子層の外側海馬裂の軟膜直下に沿うような帯状の蓄積 (図 15B 矢頭)、顆粒細胞層の外側を縁どる dot 状の蓄積 (図 15B 矢印)、分子層の限局した蓄積 (図 15C)、として認められた。いずれの部位でも A β は細胞外に蓄積しており、境界が不明瞭なびまん性の A β 蓄積がみられ、コア領域を伴う境界明瞭な成熟した形態のアミロイド斑はみられなかった。これらの A β 蓄積パターンは、既報の AD 脳、あるいは APP tg 脳抽出液を海馬に接種して A β 蓄積を誘導した実験の結果と類似していたことから^{55,56}、これら既報で接種された AD 脳、あるいは APP tg 脳抽出液中に存在する peak 1 A β 分子種が A β 蓄積を誘導した可能性が考えられた。一方、peak 1 A β 接種側の海馬や皮質において血管壁への A β 蓄積は、対側に比べて明らかな変化はなく、血管壁への A β 蓄積が増大を認めた既報と異なっていた^{55,56}。この結果は、peak 1 A β 画分中の A β に血管壁への A β 蓄積を誘導する作用がない可能性、あるいは本 *in vivo* seeding 実験に用いた APP tg A7 系統が既報と異なることから、血管壁への A β 蓄積を十分に評価できなかった可能性が考えられた。

次に peak 1 A β 接種により誘発された A β 蓄積 (図 16A-B) の性状を解析するため、 β -sheet 構造を認識する蛍光色素 thioflavin S (ThS)を用いて検討を行った。誘発された A β 蓄積は ThS 陰性であり (図 16C-D)、豊富な β -sheet 構造を有さない A β 蓄積である

ことが分かった。また AD 脳老人斑周囲には活性化したアストロサイトやミクログリアが集積することが知られている。そこで peak 1 A β 接種により誘発された A β 蓄積の周囲でアストロサイトやミクログリアが集積するか免疫組織化学的に検討したところ、GFAP 陽性なアストロサイト (図 16E-F) や Iba1 陽性なミクログリア (図 16G-H) の集積が観察された。海馬における Iba1 陽性面積 (%) (図 15I)、GFAP 陽性面積 (%) (図 15J) を測定したところ、いずれも peak 1 A β 接種側で有意に増加していることが分かった。

4-2-3. Peak 1 A β 画分中の A β が seed 効果を発揮する

これまでに APP tg 脳由来 peak 1 A β 画分は *in vivo* で seed 効果を発揮することが分かったが、peak 1 A β 画分は A β 以外にも、多量のタンパク質等を含む heterogenous な画分であることが推測される。そこで peak 1 A β 画分中に含まれる A β が seed 効果を発揮していることを確かめるために、A β 免疫除去実験を行った。18 ヶ月齢以上 APP tg 脳 TBS 画分をゲルろ過クロマトグラフィーで分離して得た peak 1 A β 画分に対し、異なるエピトープを有する 2 種類の抗 A β モノクローナル抗体 (BAN50、4G8) を用いて合計 4 回 (BAN50 を用いて 2 回、4G8 を用いて 2 回) の免疫除去操作を繰り返した。コントロールとして、抗 TDP-43 抗体を用いて同様の操作を行った。ELISA 法でサンプル中の A β 42 濃度を測定すると、免疫除去操作前の A β 42 濃度は 753 pM

で、A β 免疫除去操作後の peak 1 A β 画分中の A β 42 濃度は 1 pM の検出感度以下であった (図 17B)。コントロール抗体を用いた免疫除去操作後の peak 1 A β 画分では、peak 1 A β 画分中の A β 42 濃度は 253 pM と約 1/3 まで低下した。APP tg 左海馬に A β 免疫除去後の peak 1 A β 画分を、右海馬に PBS を接種し seed 効果を評価した (図 17A)。コントロール群では、左海馬に抗 TDP-43 抗体で免疫除去後の peak 1 A β 画分を、右海馬に PBS を接種した。結果、コントロール群では、左海馬に帯状の A β 蓄積が誘発されたのに対し、A β 免疫除去後の peak 1 A β 画分接種では、一部の個体で海馬裂に沿った dot 状 A β 蓄積がごくわずかにみられるのみであった。海馬の A β 蓄積面積(%)を定量し、左海馬の A β 蓄積面積と右海馬の A β 蓄積面積の差を、seed 接種により誘発された A β 蓄積面積として産出した。A β 免疫除去後の peak 1 A β 画分接種により誘発された A β 蓄積面積は、コントロール群に比べて有意に低下していた (図 17C-D、図 18)。以上から、peak 1 A β 画分に含まれる A β が seed 効果を発揮していることが示唆された。

4-2-4. 野生型マウスへの peak 1 A β 接種は脳内 A β 蓄積を誘発しない

続いて、peak 1 A β 接種実験において、接種マウス脳にヒト APP が発現していることが必要であるか検討するため、9 ヶ月齢の野生型マウスの左海馬に、18 ヶ月齢以上の APP tg 脳 TBS 画分から分離した peak 1 A β 画分を接種した (図 19A)。しかし、野生型マウス脳中では、peak 1 A β を接種しても A β 蓄積が誘発されなかった (図 19B-C、

図 20)。この結果から、peak 1 Aβ画分接種後に APP tg 脳内で観察される Aβ蓄積は、単にインジェクションサンプル中の Aβの沈着をみているわけではないことが示唆された。Peak 1 Aβ画分中の Aβ分子種がホストマウスが産生した Aβの凝集・線維化・蓄積を何らかの機序で促進することにより、Aβ蓄積を誘発する可能性が考えられた。

4-2-5. Peak 1 Aβ画分中の総蛋白質量に対する Aβ分子の割合に関する検討

18 ヶ月齢以上の APP tg 脳 TBS 画分からゲルろ過クロマトグラフィーを用いて分離し、各フラクションに含まれる総蛋白質濃度を BCA アッセイで、Aβ42濃度を BNT77/BC05 ELISA で測定した (図 21A-B)。結果、peak 1 Aβ画分中に含まれる総蛋白質濃度は約 740 mg/L、Aβ42 濃度は 1.42 μg/L であり、Aβがタンパク質全体に対して占める割合は $1.93 \times 10^{-4} \%$ (w/w)であった。Peak 1 Aβ画分は Aβ分子以外にも多量の蛋白質を含む crude な画分であることが分かった。この結果をもとに、*in vivo injection* 実験で用いた 2.5 μL のインジェクションサンプル中に含まれる総蛋白質量を概算すると、peak 1 Aβ画分約 1.85 μg (希釈して peak 2 Aβ画分と濃度を揃えた peak 1 Aβ画分約 0.34 μg)、peak 2 Aβ画分約 0.77 μg であった。

4-3. Peak 1 A β 画分中の A β 分子種が seed 効果を発揮するメカニズムの検討

4-3-1. *In vitro* 凝集実験で peak 1 A β 画分は A β の線維化を抑制する

これまでの検討で、peak 1 A β 画分は *in vivo* で A β 蓄積を促進する seed として働くことが分かったが、そのメカニズムは不明であった。*In vitro* での A β 凝集は、凝集核形成過程である nucleation phase と、それに続いて A β 線維が伸長する elongation phase から成り立っている²。そこで、peak 1 A β が *in vitro* での A β 線維化に影響を与えるかを調べるため、 β -sheet 構造と特異的に結合する蛍光色素である Thioflavin T (ThT) を用いた *in vitro* A β 凝集実験を行った。0.2 mg/mL (44 μ M)合成 A β 40 ペプチドに、18 ヶ月齢以上の APP tg 脳由来の peak 1 A β 画分、或いは 18 ヶ月齢以上の野生型マウス由来の peak 1 A β と相同な分子量 200-300 $\times 10^3$ の画分を添加し、A β の線維化に及ぼす影響を検討した。検討に用いた peak 1 A β 画分中の A β 42 濃度は約 580 pM、野生型マウス脳由来の高分子量画分中の A β 42 濃度は約 0.3 pM であった。さらにポジティブコントロールとして合成 A β 42 ペプチドから予め作成した線維化 A β を 20 μ g/mL (440 nM)の濃度で添加し、ネガティブコントロールとして PBS のみを添加し、それぞれ比較対象とした。その結果、PBS を加えた群では、インキュベーション開始後、6 時間 nucleation phase が続き、その後 elongation phase に移行して線維伸長が進み、12 時間後には線維化がプラトーに達した。また、線維化 A β を加えた群では、nucleation phase が消失しインキュベーション開始後速やかに elongation phase が開始し、6 時間後に

A β の線維化がプラトーに達した。これに対し、APP tg 脳由来の peak 1 A β 画分を添加すると、24 時間経過しても A β の線維化が起こらなかった (図 22)。また、野生型マウス脳由来の分子量 200-300 $\times 10^3$ の画分を添加しても A β の線維化は認められなかった。これらの結果、peak 1 A β 画分は *in vitro* で A β の凝集を阻害する効果があったが、野生型マウス脳由来の分子量 200-300 $\times 10^3$ 画分を添加した際にも同様に A β 凝集が阻害されたことから、マウス脳の TBS に可溶性 200-300 $\times 10^3$ 分子量の A β 以外の何らかの分子 (群) が、A β 凝集を阻害したと考えられた。このため、peak 1 A β 画分の A β 凝集過程に対する作用は判断できなかった。

4-3-2. *In vivo* で peak 1 A β は A β の凝集核として A β 蓄積を促進する

Peak 1 A β が *in vivo* で seed 効果を発揮するメカニズムを調べるため、peak 1 A β 接種後の経時的な脳内 A β 動態の変化を、免疫組織化学的、生化学的に検討した。まず、peak 1 A β 接種後、脳内でどのように A β 蓄積が進行するか、脳海馬に A β 蓄積が生じない 5 ヶ月齢から 11 ヶ月齢にかけての APP tg マウスを用いて検討を行った。本検討では接種する peak 1 A β 中の A β 42 濃度を ELISA 法で測定し、700-800 pM に調整して用いた。5 カ月齢の APP tg 脳左海馬に peak 1 A β 画分を、右海馬に PBS をインジェクションし、手術後、2/4/6 ヶ月後に脳を回収し、抗 A β 抗体 82E1 を用いた免疫染色で、A β 蓄積を評価した (図 23A)。その結果、接種 2 ヶ月後では、peak 1 A β 接種側で、海

馬裂に沿い、歯状回分子層の最外側で、軟膜直下に限局した線状、または dot 状の A β 蓄積が観察され、接種 2 ヶ月後には既に A β 蓄積が誘導されることが分かった。接種 4 ヶ月後には、軟膜直下の帯状、または dot 状の A β 蓄積面積が増加しており、歯状回顆粒細胞層を縁取るような dot 状 A β 蓄積や分子層の限局した A β 蓄積も観察された。また、peak 1 A β 接種側の皮質領域においてインジェクション経路に沿った A β 蓄積や、線維束に沿った A β 蓄積が出現する個体もみられた。接種 6 ヶ月後には、上記の部位に加えて、peak 1 A β 接種側の皮質や、PBS を接種した対側海馬の歯状回顆粒細胞層の外側に A β 蓄積が広がっていることが分かった (図 23B、図 24)。いずれのタイムポイントでも、peak 1 A β 接種側海馬において、対側海馬と比較して A β 蓄積面積は有意に増加していた (図 23C)。これらの結果から、peak 1 A β による seed 効果は時間的・空間的に脳内を広がる可能性が示唆された。

次に、peak 1 A β 接種後、脳内の peak 1 A β 画分を含む TBS 可溶画分中の A β 量やアミロイド線維として蓄積する不溶な A β 量がどのように変化するか生化学的に検討を行った。5 カ月齢の APP tg 左海馬に peak 1 A β 画分を、右海馬に PBS をインジェクションし、2、4、6 ヶ月後に両側海馬を回収し、段階的脳抽出を行い、TBS 可溶画分と、アミロイド線維が豊富に抽出される SDS 不溶・ギ酸可溶画分 (SDS 不溶画分) の A β 42 量を ELISA 法で測定し、A β の存在様式の経時的な変化を調べた (図 25A)。その結果、海馬 SDS 不溶画分の A β 量は、接種後 2 ヶ月では左右海馬で有意な差はなかった

が、接種 4 ヶ月後では、peak 1 A β 画分接種側で有意に増加し、接種 6 ヶ月後では、peak 1 A β 画分接種側だけでなく、対側においても不溶な A β 量が増加した（図 25B）。この結果は、免疫組織化学的検討（図 23、図 24）の結果を踏まえると、peak 1 A β 接種により誘発された A β 蓄積の増加に伴い、海馬中の SDS 不溶 A β 量が増加したと考えられた。

一方、海馬中 TBS 可溶性 A β 量（図 25C）は、接種後 2、4、6 ヶ月で上昇する傾向がみられたが、いずれの時点においても peak 1 A β 画分接種側海馬と対側の PBS 接種側海馬間で明らかな差を認めなかった。接種後 4 ヶ月の時点で、peak 1 A β 接種側で軽度増加する傾向がみられたが、対側と比して有意差はなかった。これらの結果から、peak 1 A β 画分接種後、インジェクション側の海馬において A β 蓄積が誘導されたにも関わらず可溶性 A β 量が上昇していないことが分かり、peak 1 A β は可溶性画分中の A β 量に影響を与えずに、脳内に放出された A β の線維化・蓄積を促進する作用がある可能性が考えられた。

4-4. AD 脳中の A β seed 分子種の同定

4-4-1. AD 脳中にも peak 1 A β 画分が存在する

AD 患者の脳内にも APP tg と同様の可溶性高分子量 A β 分子種が存在するか確かめ

るため、臨床的・病理学的に AD と診断された患者 6 例 (AD 群)、認知機能障害のない高齢者 6 例 (non-AD control; NC 群) 由来の脳を用いて、脳内の TBS 可溶性 A β 分子種を解析した。凍結保存された脳組織片の TBS 画分をゲルろ過クロマトグラフィーで分離し、A β 40 あるいは A β 42 特異 ELISA で A β 濃度を測定した。結果、AD 脳 6 例の全てで、peak 1 A β 画分と同様の分子量 200-300 $\times 10^3$ の画分に、A β 42 を含む A β のピークが認められた (図 26)。さらに、AD 群 6 例中 3 例 (AD1、AD3、AD5) では分子量 200-300 $\times 10^3$ の画分に A β 42 と A β 40 が共に含むが、残りの 3 例 (AD2、AD4、AD6) では主に A β 42 が含まれており、A β 40 量は乏しいことが分かった。さらに、分子量 200-300 $\times 10^3$ の画分に A β 42 と A β 40 が存在した AD 群 6 例中 3 例 (AD1、AD3、AD5) では peak 3 A β 画分と同様の分子量約 15 $\times 10^3$ の画分に、明瞭な A β のピークが観察され、その 3 例中 2 例 (AD1、AD5) では分子量約 15 $\times 10^3$ の画分に A β 42 と A β 40 が共に含まれ、3 例中 1 例 (AD3) では主に A β 40 が存在した。また、peak 2 A β に相当する分子量 50-60 $\times 10^3$ の A β 分子種は AD 群全症例で検出されなかった。一方、NC 群では、6 例中 1 例 (NC3) のみで、peak 1 A β 、peak 3 A β に相当する分子量のフラクションに、主に A β 42 からなるピークがみられたが、他の症例では明瞭な A β のピークはみられなかった (図 27)。これらの結果から、AD 患者脳においても APP^{tg} マウス脳と同様に分子量 200-300 $\times 10^3$ の高分子量ピークに TBS 可溶性 A β 分子種が存在することが明らかとなった。また分子量 200-300 $\times 10^3$ のピークを構成する A β には 2 つのパターンがあることが分かった。すなわち、peak 1 A β 画分が主に A β 42 から構成され、

A β 40 がほとんど溶出されない症例（AD2、AD4、AD6）と、peak 1 A β 画分中に A β 42 と A β 40 が検出され、peak 3 A β 画分にも A β 40 が含まれる症例（AD1、AD3、AD5）である（図 26）。この A β 分子の溶出パターンの差が何に起因するか、次項で検討を行った。

4-4-2. AD 脳における A β 蓄積の免疫組織化学的検討

AD 脳中の TBS 画分をゲルろ過クロマトグラフィーで分離すると、A β 分子種の溶出パターンが、症例によって異なることが分かった。そこでこの溶出パターンと、AD 脳中の A β 蓄積形態に関連があるか確かめるため、抗 A β 抗体 82E1（N 末断端を特異的に認識）、BC05（主に A β 42 を認識）、BA27（A β 40 を特異的に認識）を用い、免疫組織化学的に解析した。解析には TBS 画分を採取した脳部位（対側）から作成したパラフィン切片を用いた。その結果、82E1 抗体を用いた検討から、いずれの症例でも顕著な β アミロイドーシスを認めた（図 28）。さらに 82E1、BA27、BC05 抗体による連続切片を用いた検討では、peak 1 A β 中に A β 40 が含まれた症例（AD1、AD3、AD5）において、軟膜直下や皮質に存在する血管壁が、82E1、BA27 陽性を示しており、A β 40 主体の顕著なアミロイドアンギオパチーの存在が確認された。これに対し、peak 1 A β が主に A β 42 で構成されていた症例（AD2、AD4、AD6）では、一部の血管壁に A β 蓄積がみられるのみで、全体的にアミロイドアンギオパチーは軽度であった（図 29）。

またいずれの症例でも大脳皮質に多数の老人斑が形成されており、皮質表層に diffuse な形態の斑が、深層にコアのあるコンパクトな形状の斑が分布する傾向がみられたが、老人斑の形態について症例間で明瞭な差は認められなかった (図 30)。AD2-AD6 の症例において、A β 40 は一部のコアのある成熟した老人斑に局在していたが、AD1 では、ほとんどの老人斑が強く A β 40 陽性を示す特徴があった。

以上の結果から、AD 脳の TBS 可溶性分子量 200-300 $\times 10^3$ の画分中に A β 40 及び A β 42 を認めた症例 (AD1、AD3、AD5)では著明な BA27 陽性のアミロイドアンギオパチーが観察されること、一方で皮質の老人斑の蓄積パターンには症例間で明らかな差がなかったことから、AD 脳中の TBS 可溶性分子量 200-300 $\times 10^3$ の画分中の A β 40 は、アミロイドアンギオパチー由来である可能性が推察された。

4-4-3. AD 脳由来の TBS 可溶性分子量 200-300 $\times 10^3$ の A β 分子種は *in vivo* で seed 効果を発揮する

最後に、AD 脳由来 TBS 可溶性分子量 200-300 $\times 10^3$ 画分中の A β 分子種が、APP tg 脳由来 peak 1 A β 画分と同様に、A β 蓄積を誘発する seed 能を有するか確かめるため、APP tg 海馬へのインジェクション実験を行った。本実験には A β 分子種の溶出パターンが異なる症例、AD3 と AD4 由来の TBS 可溶性分子量 200-300 $\times 10^3$ 画分を用いた。

4-4-1 で示した通り分子量 200-300 $\times 10^3$ 画分の A β 分子種は、AD3 は A β 40 と A β 42 か

ら、AD4 は主に A β 42 から構成されていた。さらに、AD3 由来の peak 3 A β 画分と相当な分子量の 15×10^3 画分、A β がほとんど検出されなかった NC2 由来の分子量 200-300 $\times 10^3$ 画分の seed 能についても同様に検討した。9-10 カ月齢の APP tg 脳左海馬にこれらの脳由来サンプルを、対側海馬に PBS を接種し、4 ヶ月後に脳内 A β 蓄積を免疫組織化学的に評価した (図 31A)。その結果、AD4 由来の TBS 可溶性分子量 200-300 $\times 10^3$ 画分を接種した群では、接種側の海馬で、歯状回分子層外側に、海馬裂に沿うような形態で、dot 状、または帯状の A β 蓄積が惹起された (図 31B、図 32)。A β 蓄積面積は接種側で有意に増加していた (図 31C)。AD4 由来の TBS 可溶性分子量 200-300 $\times 10^3$ 画分の接種により誘発された A β 蓄積パターンは、APP tg 由来の peak 1 A β 画分を接種した場合 (図 9、10) と類似していたが、惹起された A β の蓄積面積は小さい傾向があり、海馬裂に限局しており、インジェクションサンプル中の seed 量が、APP tg 由来 peak 1 A β 画分より乏しかった可能性が考えられた。一方、AD3 由来の TBS 可溶性分子量 200-300 $\times 10^3$ 画分を接種した群では、4 例中 2 例で、peak 1 A β 接種側の歯状回の海馬裂を縁どるような A β の蓄積がごくわずかに観察されたが、他 2 例ではほとんど A β 蓄積がみられず (図 33A、図 34)、接種側で有意な A β 蓄積面積の増加は認められなかった (図 33B)。さらに、AD3 由来の分子量 15×10^3 画分 (図 35A-B、図 36)、NC2 由来の TBS 可溶性分子量 200-300 $\times 10^3$ 画分を接種した群では、A β 蓄積の誘発は認められなかった (図 37A-B、図 38)。これらの結果から、AD 脳由来の TBS 可溶性分子量 200-300 $\times 10^3$ 画分中の A β 分子種に A β 蓄積の seed 能があることが確か

められた。一方 AD4 と AD3 由来の peak 1 A β 画分で seed 効果に差がみられることが分かった。インジェクションサンプル中の A β 40、A β 42 量を ELISA 法で測定したところ、AD4 由来の peak 1 A β (A β 42: 130 pM, A β 40: 2 pM)、AD3 由来の peak 1 A β (A β 42: 180 pM, A β 40: 38 pM) であり、A β 総量は AD3 の方が AD4 より多かった。この seed 効果の差が、seed 能を発揮する A β 分子種の含有割合あるいは seed 分子の性状の差、いずれに起因するのかは明らかではない。今後さらに多数の症例について、seed 能を検討し、臨床病理学的特徴と比較する実験が必要である。

5. 考察

5-1. 脳内でβアミロイドーシス蓄積を誘発する可溶性高分子量 Aβ分子種の同定

ADにおけるβアミロイドーシスは、大脳新皮質の基底側や楔前部から始まり、病期の進行とともに大脳皮質連合野～海馬へ広がり、最終的に大脳皮質の広範囲の領域が侵される⁷⁰。近年、Aβ蓄積を有するAD脳あるいはAPP tg 脳のPBS抽出液が、脳内でβアミロイドーシスを誘発することが報告された^{55,56}。このことから、AD発症において、Aβの凝集・蓄積の開始とそれに続くβアミロイドーシスの拡大にcriticalな役割を果たすAβ seed分子の存在が示唆されたが、どのようなAβ分子種がどのような機序でseed効果を発揮するかは明らかでなかった。AD脳中のβアミロイドーシスも、脳PBS抽出液接種によって誘発されたAβの蓄積も、経時的に拡大し、脳の広汎な領域に広がることから⁵⁹、Aβ seedは脳内で高い拡散性を有する可溶性の分子であると予想し、本研究に着手した。

本研究では、脳内に十分なAβ蓄積を有するAPP tg 脳のTBS可溶画分をゲルろ過クロマトグラフィーで分離し、3種類の分子量の異なるAβ分子種、peak 1 Aβ (分子量 200-300 × 10³)、peak 2 Aβ (分子量 50-60 × 10³)、peak 3 Aβ (分子量約 15 × 10³)を同定し、それぞれのseed能を*in vivo seeding* 実験を用いて評価した。その結果、peak 1 Aβ画分は、APP tg 脳にAβ蓄積を誘導するseed能を有すること、一方peak 2 Aβ画分にはそのようなseed能は認められないことを明らかにした。さらに、AD脳におい

でも peak 1 A β 画分と同様に A β 蓄積の時空間的な広がりに関わる seed 分子の探索を、TBS 可溶画分を用いて行い、peak 1 A β 画分と類似した $200-300 \times 10^3$ の高分子量画分に APP tg 脳に A β 蓄積を誘導する seed 能があることを見出した。一方 AD 脳から分離した peak 3 A β 画分と同様の分子量を示す約 15×10^3 の画分は seed 効果を発揮しないことを示した。これらの結果から、私は、本研究において A β 蓄積を有する APP tg 脳及び AD 脳に存在する可溶性分子量 $200-300 \times 10^3$ の A β 分子種の存在を明らかにし、この分子が *in vivo* レベルで A β 蓄積を誘発しうることを実証した。以下この A β 分子種について考察する。

5-2. A β seed 分子の分子性状

Peak 1 A β 画分は heterogenous な画分であり、A β 以外に様々な分子を含んでいる。A β 以外の分子が seed として働く可能性を除外するため、まず、脳内に A β 蓄積を有さない 18 ヶ月齢以上の野生型マウスから peak 1 A β と相同な分子量の画分を抽出し、APP tg 脳に接種したが、seed 効果を示さなかった。さらに、peak 1 A β 画分から A β を免疫除去したサンプルを接種すると seed 効果が消失した。これらの結果、peak 1 A β 画分に含まれる何らかの A β 分子種が seed 効果を発揮している可能性が示された。

また、AD 脳の、peak 1 A β 画分に相当する分子量 200-300 $\times 10^3$ A β 分子種も seed 能を有することを示したが、脳内に A β 蓄積をほとんど有さない非 AD 症例の分子量 200-300 $\times 10^3$ 画分は seed 効果がなかったことから、AD 脳の可溶性 200-300 $\times 10^3$ 画分に含まれる A β が seed として働いていると考えられた。

可溶性 200-300 $\times 10^3$ の分子量画分に含まれる seed 能を持つ A β は、単量体 A β 42の分子量が約 4.5 $\times 10^3$ であることから、TBS 可溶性を帯びた何らかの高分子量複合体であると考えられた。そこで本研究では、高分子量 A β seed 分子の分子性状を明らかにするために peak 1 A β 画分中に複数個の A β から構成された A β オリゴマーが含まれるか、A β オリゴマー特異 ELISA、及び A β オリゴマー特異抗体を用いたドットブロット法を用いて検討を行い、peak 1 A β 画分には、A11 及び OC 抗体陽性の A β オリゴマーが含まれていることを示した。また、peak 1 A β 画分を SDS-PAGE で分離した結果、単量体 A β の移動度と相同のバンドが検出された。この結果は peak 1 A β 画分中の A β オリゴマーは SDS 非耐性である可能性を示唆するものと考えた。一方、A β オリゴマー特異 ELISA を用いた検討では、低分子量の画分の peak 2 A β （分子量 50-60 $\times 10^3$ ）や peak 3 A β （分子量約 15 $\times 10^3$ ）画分中には A β オリゴマーが検出されなかった。この結果からは、peak 2 ないし peak 3 A β 画分中の A β は、peak 1 A β 画分中の A β オリゴマーとは異なる、A β オリゴマー特異 ELISA と反応できない立体構造を持

つ A β オリゴマーを含む可能性や、A β 単量体と他の結合タンパク質が複合体を形成している可能性などが考えられた。

APP tg 脳由来の peak 1 A β 画分中に含まれる A β 42の量と総蛋白質量を測定すると、peak 1 A β 画分に含まれる総蛋白質量は、質量にして A β 42の1万倍近いことが分り、非常に crude 画分であることが示唆された。Peak 1 A β 画分に含まれる A β 以外の分子が、A β seed 分子の seed 能に影響を与えている可能性や、コファクターとして A β と結合して seed 分子を形成している可能性が考えられる。例えば、*APOE* ϵ 4 は孤発性 AD の最も強力なリスクアレルである^{20,21} が、ApoE 蛋白質は AD 脳中で A β と共に蓄積しており²²、AD 脳 TBS 画分をゲルろ過クロマトグラフィーで分離すると、約 200 kDa の peak 1 A β 画分に相当する分子量の画分に ApoE が溶出される²⁵。今後、*APOE* ノックアウトマウスや、*APOE*4 ノックインマウス由来 peak 1 A β 画分の seed 効果の検討や、AD 脳由来の peak 1 A β 画分の seed 効果と *APOE* 遺伝子型に比較検討を行い、ApoE が peak 1 A β 画分中の seed 分子に及ぼす影響について検討したい。また、peak 1 A β 、peak 2 A β 、peak 3 A β 画分中で A β がどのような分子と結合しているかを明らかにするためには、今後 IP-MS 解析などで検討する必要がある。

In vitro で形成され、ゲルろ過クロマトグラフィーで peak 1 A β とほぼ同じ 200×10^3 以上の分子量に溶出される A β オリゴマー分子種として、A β protofibril があげられ

る。A β protofibril は電子顕微鏡で直径 6-8 nm、長さ 200 nm 未満のカーブした構造をとる線維状分子である。当研究室の先行研究で、A β protofibril を APP tg 海馬に接種して seed 能を評価したところ、インジェクション経路に沿って限局した A β 蓄積が出現することが報告された²⁶。しかし、A β protofibril のインジェクションによって誘発された A β 蓄積はインジェクション部位に限局しており、本研究で示した peak 1 A β 画分をインジェクションした際に観察された歯状回の帯状・びまん性の A β 蓄積の広がりには誘発されなかった。また、インジェクションサンプル中の A β 42 濃度は、先行研究 (A β protofibril) は 22 μ M、本研究 (peak 1 A β 画分) では約 800 pM であり、A β の1分子あたりの seed 能は peak 1 A β 画分中の高分子量 A β 分子種の方が A β protofibril に比べて高いものと考えられた。また *in vitro* で合成した線維化 A β を APP tg 脳にインジェクションした先行研究においても A β 蓄積は惹起しない、あるいは脳 PBS 抽出液と比してかなり少ないことが示されており^{56,71}、これまでに *in vitro* でオリゴマー化、或いは線維化させた A β と比べ、peak 1 A β 画分中の A β 分子種の seed 能は極めて高いものと考えられた。Peak 1 A β 画分中の A β 分子種の立体構造や翻訳後修飾などは明らかではないが、今後さらに peak 1 A β 画分から seed 能を持つ A β 分子種を精製することによりこれを明らかにしたい。さらに本検討では、可溶性な seed 能を持つ A β 分子種の同定を試みたが、A β 蓄積を伴う APP tg 脳や AD 脳の SDS 不溶画分に含まれる線維化 A β の seed 能の検討も今後の課題としたい。

5-3. A β seed 分子は脳でどこに局在しているのか

本研究で同定した、seed 能を有する高分子量 A β は、可溶性があることから、脳内で高度の可動性を有し、A β 蓄積の拡大に役割を果たすものと予想していた。本研究での観察結果から、APP tg 脳由来 peak 1 A β 画分、あるいは AD 脳由来分子量 200-300 $\times 10^3$ 画分を海馬にインジェクションした全ての APP tg 脳において、海馬裂の軟膜直下に帯状または dot 状のびまん性 A β 蓄積や、顆粒細胞層の神経細胞を縁どるような形状の A β 蓄積を誘発することが分かった。この特徴的なパターンから、A β seed 分子は、軟膜や線維束などの解剖学的構造に結合することによって、seed 能を保持したまま、長期間保持され、seed 効果を発揮する可能性を考えた。これまでに A β は GM1 ganglioside と結合し *in vitro* で seed 効果を発揮すること⁷²や、A β とヘパラン硫酸の結合は A β 病理の形成に関与すること⁷³などが示されている。このように A β は様々な細胞外マトリクスを構成する分子と結合することが知られていることから、A β seed 分子もニューロピルにおいてこれらの細胞外マトリクスと相互作用して共局在している可能性を考えた。また細胞の膜面分に A β seed 分子が多く含まれるとする報告⁷⁴を考え合わせると、A β seed 分子は、細胞の表面上にある何らかの細胞外マトリクス分子に結合して存在する可能性も考えられた。A β seed 分子を特異的に認識する抗体や、A β seed 分子を蛍光色素やラジオアイソトープで標識する方法を

開発することができれば、 $A\beta$ seed 分子の脳内の局在を詳細に明らかにできる可能性がある。

また、本研究では、seed 能を有する高分子量 $A\beta$ 分子種が細胞外腔に存在するか否かについて、*in vivo* マイクロダイアリシス法を用いて脳間質液を回収することにより検討したが、高齢 APP tg 脳間質液中には、高分子量 $A\beta$ 分子種は検出されなかった。APP tg 脳抽出液には seed 効果があるのに対し、脳脊髄液には seed 効果がないことを示した既報⁷⁵も、この結果を支持すると考えられた。当研究室の先行研究では、18ヶ月齢以上の APP tg 脳の peak 1 $A\beta$ 画分中の $A\beta$ 量は、海馬のアミロイド斑蓄積面積と正に相関する一方、peak 2 $A\beta$ 画分中の $A\beta$ 量は海馬アミロイド斑蓄積面積と相関しないことを明らかにした（図 39、仲泰史博士論文より引用）。これらの結果から、高分子量 $A\beta$ 分子種は、 $A\beta$ 蓄積を伴う高齢 APP tg 脳や AD 脳においては、アミロイド斑の出現とともに増加し、アミロイド斑の周囲に局在して、seed 能を保持している可能性が考えられた。これまでに抗 $A\beta$ オリゴマー特異抗体 NAB61 を用いた検討において、アミロイド斑周囲の $A\beta$ オリゴマープールの存在を示した結果⁴⁷や、 β アミロイドーシスを構成する SDS 不溶な $A\beta$ とトリス可溶性 $A\beta$ との相互作用を示した結果⁷⁶も、アミロイド斑の存在下では高分子量 $A\beta$ 分子種はアミロイド斑周囲に局在する可能性を支持するものとする。

高分子量 A β 分子種は、その抽出過程において、SDS 不溶なアミロイド線維の一部が可溶化されることにより生じたものである可能性も当初除外できなかった。しかし、TBS を加えて脳組織から可溶化される画分を反復抽出する実験では、ペレット中に多量の不溶な A β が残存している状態でも、TBS 可溶な高分子量 A β 分子種の溶出は、少数回の反復抽出により消失した。この結果から、本実験で同定した peak 1 A β 画分中の高分子量 A β は、脳抽出操作によってアミロイド線維が可溶化されたものではないと考えた。

5-4. 高分子量 A β 分子種が A β 蓄積を誘発するメカニズム

本研究において、peak 1 A β 画分を APP tg 海馬に接種すると、歯状回に帯状の A β 蓄積が誘発されたが、野生型マウス脳に接種しても A β 蓄積は誘発されなかった。この結果から、peak 1 A β 画分接種後に APP tg 海馬にみられる A β 蓄積が、単にインジェクションしたサンプルに含まれる A β 分子の沈着である可能性は除外できる。本研究で用いた A7 系統の APP tg では、トランスジェーンによるヒト APP の発現量は内因性マウス APP の 1.4 倍程度である⁶⁶。また、マウス A β とヒト A β は、アミノ酸配列が 3 カ所異なっている⁷⁷。野生型マウス脳で seed 能が発揮されなかった原因として、ホストマウスの APP 発現量が APP tg 脳より低く A β 供給量が不足していた可能性、ホストマウスからのヒト型 A β の供給がないと seed 分子を接種しても A β 蓄積が

誘発されない可能性が考えられた。AD 脳 PBS 粗抽出液を野生型マウス脳に接種しても A β 蓄積を誘発しない⁵⁶、一方 AD 脳抽出液をヒト APP ノックインマウスや、APP タンパク質の A β 領域配列が 100%ヒトと相同なマーモセット脳に接種すると A β 蓄積が誘発される^{78,79}などの知見も報告されていることから、宿主動物の APP 発現量よりは、発現している APP がヒト型であることが seed 能の発揮に重要であることが示唆される。A β seed 分子が A β 蓄積を誘発するためには、宿主動物側のヒト型 A β の存在と、持続的な供給が不可欠であると考えられた。

本研究において peak 1 A β 画分を APP tg 海馬に接種し 2, 4, 6 ヶ月後に観察を行ったところ、インキュベーション 2 ヶ月では、海馬歯状回の分子層の最外側、軟膜直下に、海馬裂に沿った線状のかすかな A β 蓄積が観察され、4 ヶ月後以降には歯状回分子層外側や周囲皮質に A β 蓄積が広がった。この観察結果から、A β seed 誘発性の A β 蓄積が最初に起こる部位は、歯状回分子層外側の貫通線維投射領域に沿っていることが分かった。貫通線維路は嗅内皮質から海馬歯状回へ投射する海馬の主要な入力経路であり、APP tg マウスの貫通線維路のプレシナプス終末から神経活動依存的に A β が放出されることが知られている⁸⁰⁻⁸²。これらの知見から、peak 1 A β 画分に含まれる高分子量 A β seed 分子は、貫通線維路のプレシナプス終末から放出された A β に対し、その不溶化を促進し、蓄積を誘発するものではないかと考えた。

また、peak 1 A β 接種後 4-6 ヶ月後には、A β 蓄積は接種部位周囲の脳実質や対側海馬に経時的に拡大した。この結果は、A β seed 分子がニューロピル内の細胞外腔を拡散し、さらに、交連線維を介して反対側海馬へ伝達された可能性を示唆した。

Peak 1 A β 画分に含まれる高分子量 A β 分子種が A β 蓄積を誘発するメカニズムとして、①seed A β 分子が自己複製能を持つことにより、seed 能をもつ高分子量 A β 分子が増加して脳全体に A β 蓄積を誘発する、②seed A β 分子が A β の凝集核として働き、単量体 A β の不溶化を促し、蓄積を誘発する、という 2つの可能性を考えた。このいずれが正しいかを検証するため、A β seed 分子をインジェクションした APP tg 脳内における A β の生化学的性質の経時変化を調べた。Peak 1 A β 画分を APP tg 脳に接種し、2, 4, 6 ヶ月後に海馬を回収し、段階抽出法により TBS 画分及び SDS 不溶画分を採取し、A β 量を測定した結果、peak 1 A β 画分を接種した海馬中の SDS 不溶な A β 量は対側に比べ有意に増加していた。これは peak 1 A β 画分接種により誘発された A β 蓄積に含まれるアミロイド線維を反映しているものと考えられた。一方 A β 蓄積が誘発されたにも関わらず、TBS 可溶性 A β 量には、接種側と対側で有意差はみられなかった。この結果は、peak 1 A β 画分接種側の海馬で peak 1 A β 画分中の A β が増加しなかったことを示すものである。従って、peak 1 A β 画分中の A β seed は A β の凝集核として働き、単量体 A β の不溶化を促し、蓄積を誘発するとの、後者の可能性が支持されると考えた。また、本研究で、APP tg 脳に接種したインジェクションサンプル

ル (peak 1 A β 画分) 中に含まれる A β 42量は約 2×10^{-3} pmol である。A7系統のAPP tg 脳に含まれるトリス可溶性 A β 42濃度は5ヶ月齢で約2 pmol/g 脳質量、9ヶ月齢で約5 pmol/g 脳質量であり⁸³、実験により海馬に注入されたサンプル中の A β 量は、本 APP tg 脳中で生理的に産生される範囲を超えないことが分かる。ごく微量の seed 分子注入により長期間にわたり A β 蓄積が拡大し続ける機序については、前項で述べたように、peak 1 A β 画分中に存在する seed 分子が、ニューロピルや細胞表面の細胞外マトリクス、線維束など解剖学的構造物に結合することで、安定的に seed 能を保持したまま長期間働く可能性や、seed 分子がアミロイド斑の周囲に安定して存在しており、アミロイド斑の蓄積面積増加とともに seed 分子が増加し、脳内を拡散する可能性が考えられた。

A β 凝集・線維化過程で peak 1 A β 画分中の高分子量 A β が果たす役割を検討するために、*in vitro* A β 凝集実験を行ったところ、peak 1 A β 画分の添加により A β 凝集はむしろ抑制された。野生型マウス由来の分子量 200-300 $\times 10^3$ 画分でも同様の現象が観察されたことから、マウス脳抽出液の高分子量画分に含まれる A β 以外の分子が A β 凝集を阻害したと考えられた。マウス脳や海馬のスライスカルチャーを用いた実験系において、AD 脳抽出液が seed 効果を発揮することが報告されており⁸⁴、このような *ex vivo* の実験系を用いるなどして、*in vivo* の条件下のみで peak 1 A β が seed 効果を発揮できるメカニズムについて検討していきたい。

また、本研究では peak 1 A β 画分の高分子量 A β によって誘発された A β 蓄積の周囲に、活性化したミクログリアやアストロサイトの集積がみられた。ミクログリアやアストロサイトは凝集した A β を貪食する働きがあると考えられている。一方、近年ミクログリア由来の ASC speck が A β 凝集の seed 効果を媒介するとの報告もあり⁸⁵、ミクログリアやアストロサイト由来の分子との相互作用、あるいはミクログリアやアストロサイトによる貪食過程が A β seed 形成や seed 効果発揮に必要である可能性も考えられる。

以上の知見を総合すると、peak 1 A β 画分中に含まれる seed A β 分子は、脳内で A β の凝集核として働き、ヒト型 A β 単量体の凝集・不溶化を促進することにより、A β 蓄積を誘発するものと考えられた。

5-5. プリオン蛋白質との比較

Seed 依存的な異常蛋白質の伝播を示す代表的な神経変性疾患として、クロイツフェルトヤコブ病などをはじめとするプリオン病があり、AD の発症メカニズムとの類似点が議論されている⁸⁶。健常ヒト脳には、正常なプリオン蛋白質 (PrP^c) が発現しているが、プリオン病患者脳内には、異常構造を取ったプリオン蛋白質 (PrP^{sc}) が出現する。PrP^{sc} はプロテアーゼ耐性を有し、 β シート構造を獲得して凝集・不溶化しやすい。興味深いことに、PrP^c は PrP^{sc} と接触すると、PrP^{sc} に構造が変

換され、連鎖的に PrP^{sc}が増加し、脳内に蓄積してプリオン病が発症すると考えられている。これまでに、*in vitro* で合成した PrP^{sc} よりも、感染した脳から抽出した PrP^{sc}の方が、感染力が高いと報告されている⁸⁷。さらに、seed 能の高い PrP^{sc}を同定するために、プリオン病の一種であるスクレイピーに感染したハムスター脳抽出液を、フィールド・フロー・フラクショネーション法を用いて分子量サイズ毎に分離し、*in vitro* で PrP^{sc} への変換効果の強さを、*in vivo* インジェクション実験で感染力の強さをそれぞれ評価したところ、線維状の PrP よりも、分子量サイズ約 300-600 ×10³ の 17-27 mer と推測される PrP オリゴマーが最も seed 能が高いという結果が報告されている⁸⁸。線維状態をとらない高分子量オリゴマーが高い seed 能を有したという点で、本研究で同定した分子量 200-300 ×10³ の Aβオリゴマーと PrP^{sc} の seed 分子種との類似性が考えられた。PrP^{sc}分子は、NaOH や NaOCl などの強塩基、熱処理等を組み合わせ、立体構造が破壊されると不活化されることから⁸⁹、特定の構造をとった PrP^{sc}が感染に関与していると考えられているが、その構造や seed 効果発揮メカニズムは明らかになっていない。今後、高分子量 Aβ seed 分子についても立体構造の破壊を含む、不活化処理により伝播能が変化するかを検討するなどして、PrP^{sc}とその性質を比較したい。

5-6. AD 脳由来の高分子量 A β seed 分子の多様性について考察

本研究で AD 脳を用いた検討では、全ての AD 症例で、TBS 画分中に分子量 200-300 $\times 10^3$ の A β 分子種が存在した。興味深いことに AD 症例は、TBS 可溶性分子量 200-300 $\times 10^3$ 画分が、主に A β 42 から構成されている症例と、A β 42 と A β 40 から構成されている症例の、2つのパターンに分けられることが分かった。前者に該当する AD4、後者に該当する AD3 の 2 症例由来の分子量 200-300 $\times 10^3$ 画分を APP tg 脳にインジェクションし、seed 効果を評価したところ、AD4 由来の分子量 200-300 $\times 10^3$ 画分は、AD3 由来の分子量 200-300 $\times 10^3$ 画分に比べ、高い seed 能を持つことが分かった。この seed 効果の差が何に由来するかを考察する。

まず、両症例間では peak 1 A β 画分中に含まれる A β の分子種が大きく異なるのが特徴であった。主に A β 42 から構成される AD4 由来分子量 200-300 $\times 10^3$ 画分が seed 効果を発揮したが、A β 42 及び A β 40 から構成される AD3 由来分子量 200-300 $\times 10^3$ 画分は seed 効果が弱かったことから、A β 40 を含むことが、seed 能の減少に関与する可能性が考えられた。また、本研究で使用した A7 系統の APP tg は家族性 AD 変異により A β 42/A β 40 の産生比率が増加しているのが特徴であり、A7 脳 TBS 画分由来の peak 1 A β 画分が seed 能を示すことも、上記の仮説を支持すると考えられる。A β 40 と A β 42 はいずれも APP から β -secretase、 γ -secretase の連続切断によって産生される分子種であるが、カルボキシ末端長の違いから、A β 42 は A β 40 に比べ凝集性

が高く²、AD 脳に最初期に蓄積する分子種である³。これまでに、British amyloid 前駆体タンパク質と A β 42 あるいは A β 40 を融合させたタンパク質を過剰発現することにより、A β 42 あるいは A β 40 のみを脳内に産生するトランスジェニックマウスにおいて、A β 42 を発現させると、A β 斑が出現するが、A β 40 を発現させると、A β 斑が出現しないこと⁹⁰、さらに APP tg と A β 40 を発現するトランスジェニックマウスを交配すると、その A β 斑量が顕著に低下することから⁹¹、A β 40 は A β 42 蓄積を抑制する作用がある可能性が示唆されていた。本研究で、A β 40 を含む AD 脳由来分子量 200-300 $\times 10^3$ 画分の seed 能が乏しかったことは、A β 40 が A β 42 による seed 効果を阻害した可能性が示唆された。AD3 症例において A β 40、A β 42 いずれも分子量 200-300 $\times 10^3$ 画分に溶出されたことから、A β 40 と A β 42 は混在した高分子量オリゴマーを形成しており、A β 40 が混在すると構造が変化して seed 効果が弱まった可能性、或いは A β 40 で構成されるオリゴマーと A β 42 で構成されるオリゴマーが別に存在しており、A β 40 オリゴマーが A β 42 オリゴマーの seed 効果を阻害した可能性も考えられた。今後抗 A β 40 特異抗体を用いた免疫除去実験を行い、A β 40 が高分子量 A β 分子種の seed 能に与える役割を明らかにすることが必要である。

また、本研究では peak 1 A β 画分に A β 40 を含む症例は、いずれも血管壁に顕著な A β 40 蓄積がみられたが、peak 1 A β 画分が主に A β 42 からなる症例では血管壁への A β 蓄積の程度は低かった。AD3 の peak 1 A β 画分中の A β 40 は主にアミロイドアング

オパチーに由来している可能性が考えられ、アミロイドアンギオパチー由来の高分子量 A β 分子種は、皮質の老人斑由来の高分子量 A β 分子種に比べ seed 能が乏しい可能性も示唆された。これまでに、AD 脳あるいは APP tg 脳抽出液の *in vivo* インジェクション実験で、誘発される A β 蓄積パターンは、seed を提供した症例あるいはモデルマウスに類似することが報告された^{56,92}。本実験においてアミロイドアンギオパチー由来高分子量 A β 分子種は異なる構造をとるために、APP tg 脳にアミロイドアンギオパチーを誘発することができなかった可能性も考えられる。

さらに、AD 発症からの期間が seed 能に影響を与えた可能性も考えられた。これまでに、AD では発症からの病期が早い症例ほど脳抽出液中の seed 能が高いこと⁹³、APP tg では A β 蓄積開始直後のマウス脳抽出液の方がより高齢のマウス脳抽出液より seed 能が高いこと⁹⁴が報告されている。本症例では AD4 の方が AD3 に比べて年齢が低く、より seed 能が高い A β 分子種が形成された可能性も考えられた。

以上、高分子量 A β seed 分子を構成する A β の種類、脳内 A β 蓄積パターン、AD 病期などの違いが seed 効果を左右する可能性について考察した。今後様々な AD 症例由来の A β seed のインジェクション実験を行い、臨床病理学的特徴や生化学的特徴と seed 能を比較し、上記のいずれの性質が伝播能を規定するかを明らかにしたい。

5-7. AD 病態における A β seed 分子の役割と AD 治療応用への可能性

本研究では、APP tg 脳や AD 脳に TBS 可溶性高分子量 A β オリゴマーが存在し、APP tg 脳内で A β 蓄積を誘発する seed 能を有すること、誘発された A β 蓄積が経時的に脳内を広がることを示した。これらの結果から、今回同定した可溶性高分子量 A β は、AD 病態において、A β が老人斑として蓄積し、A β 病理が脳内で進展する過程に重要な役割を果たしている可能性が考えられる (図 40)。

本研究では、脳内トリソ可溶画分から分離した高分子量 A β 分子種が A β 蓄積を誘発する seed 効果に着目し、本分子の神経細胞傷害性や認知機能に及ぼす影響については検討しなかった。今後、海馬スライスカルチャーや初代培養神経細胞に peak A β 画分を添加する実験を行い、神経細胞毒性について評価を行いたい。本研究で同定した A β seed 分子は AD 発症ごく初期のイベントである、A β 凝集・蓄積開始と脳内 A β 蓄積の進展において重要な役割を果たすことが予想される。今後、高分子量 A β 分子種の産生を抑制する、あるいは脳内から除去することにより、高分子量 A β 分子種の AD 病態形成への寄与が明らかになると共に、高分子量 A β 分子種を脳内から除去することは、AD の有効な予防法となる可能性がある。

5-4 項で考察した通り、高分子量 A β 分子種は長期間にわたって seed 能を維持したまま脳内に存在している可能性や、アミロイド斑蓄積の進展とともに高分子量 A β 分子種も増加する可能性が考えられた。また、APP tg 脳に接種した peak 1 A β 画分(イ

ンジェクションサンプル)に含まれる A β 分子はごく微量でありながら脳内で A β 蓄積を誘発した。これまでに APP 遺伝子を欠損した APP null マウスへ APP tg 脳抽出液接種を行った実験では、APP null マウス中では A β 蓄積が誘発されないものの、脳中で seed 能を維持することが報告されている⁹⁵。このように脳内で高い安定性を有し、微量でも seed 効果を発揮する A β seed を治療標的とするには、高分子量 A β 分子種を特異的に認識する特異抗体の開発が必須である。A β seed が形成される早期から特異抗体を用いた免疫療法などを行うことにより、脳内から A β seed を除去し、AD 発症を予防できる可能性があり、今後の研究課題としたい。

6. 結論

本研究において私は、A β 蓄積を有する APP tg 脳のトリス可溶性画分に、分子量 200-300 $\times 10^3$ の A β オリゴマーが存在することを見出した。この高分子量 A β オリゴマーを含む画分は、*in vivo* で A β 蓄積を誘発する強力な seed 能を持つことを実証した。この画分から A β を免疫学的に除去すると seed 能を失うことから、高分子 A β 分子種が seed の本態であることを示した。さらに、若齢 APP tg 脳に高分子量 A β seed 分子種を投与後、経時的に免疫組織化学的・生化学的な解析を行い、高分子 A β 分子種はホストマウス由来の A β の凝集・蓄積を促進する凝集核として働くことを明らかにした。また、ヒト AD 脳中にも同様の分子量 200-300 $\times 10^3$ の A β 分子種が存在し、A β 蓄積の seed 能を持つことを示した。そして、AD 脳由来の分子量 200-300 $\times 10^3$ の A β 分子種が持つ seed 能の強さは症例によって異なることを明らかにした。

以上より、AD 脳中に存在する可溶性高分子量 A β オリゴマーが、AD 発症において β アミロイドシスの開始と経時的な脳内の広がり重要な役割を果たす分子である可能性を示唆した。本研究で同定した A β seed 分子を対象に、新たな AD 治療・予防法が開発されることを期待したい。

7. 引用文献

1. Eisenberg, D. & Jucker, M. The amyloid state of proteins in human diseases. *Cell* **148**, 1188–1203 (2012).
2. Jarrett, J. T. & Lansbury, P. T. Seeding “one-dimensional crystallization” of amyloid: A pathogenic mechanism in Alzheimer’s disease and scrapie? *Cell* **73**, 1055–1058 (1993).
3. Iwatsubo, T. *et al.* Visualization of A β 42(43) and A β 40 in senile plaques with end-specific A β monoclonals: Evidence that an initially deposited species is A β 42(43). *Neuron* **13**, 45–53 (1994).
4. Goate, A. *et al.* Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer’s disease. *Nature* **349**, 704–706 (1991).
5. Mullan, M. *et al.* A pathogenic mutation for probable Alzheimer’s disease in the APP gene at the N-terminus of β -amyloid. *Nat. Genet.* **1**, 345–347 (1992).
6. Sherrington, R. *et al.* Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer’s disease. *Nature* **375**, 754–760 (1995).
7. Levy-Lahad, E. *et al.* Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer’s disease locus. *Science* **269**, 973–977 (1995).
8. Scheuner, D. *et al.* Secreted amyloid β -protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer’s disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked

- to familial Alzheimer's disease. *Nat. Med.* **2**, 864–870 (1996).
9. Tomita, T. *et al.* The presenilin 2 mutation (N141I) linked to familial Alzheimer disease (Volga German families) increases the secretion of amyloid β protein ending at the 42nd (or 43rd) residue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 2025–2030 (1997).
 10. Strooper, B. D. *et al.* Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature* **391**, 387–390 (1998).
 11. Nilsberth, C. *et al.* The 'Arctic' APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced A β protofibril formation. *Nat. Neurosci.* **4**, 887–893 (2001).
 12. Hori, Y. *et al.* The Tottori (D7N) and English (H6R) Familial Alzheimer Disease Mutations Accelerate A β Fibril Formation without Increasing Protofibril Formation. *J. Biol. Chem.* **282**, 4916–4923 (2007).
 13. Games, D. *et al.* Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F β -amyloid precursor protein. *Nature* **373**, 523–527 (1995).
 14. Hsiao, K. *et al.* Correlative Memory Deficits, A β Elevation, and Amyloid Plaques in Transgenic Mice. *Science* **274**, 99–103 (1996).
 15. Beyreuther, K. & Masters, C. L. Amyloid Precursor Protein (APP) and BZA4 Amyloid in the Etiology of Alzheimer's Disease: Precursor - Product Relationships in the Derangement of Neuronal Function. *Brain Pathol.* **1**, 241–251 (1991).
 16. Selkoe, D. J. & Hardy, J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years.

- EMBO Mol. Med.* **8**, 595–608 (2016).
17. Heston, L. L. & Mastri, A. R. The genetics of Alzheimer's disease: associations with hematologic malignancy and Down's syndrome. *JAMA Psychiatry* **34**, 976–981 (1977).
 18. Rovelet-Lecrux, A. *et al.* APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nat. Genet.* **38**, 24–26 (2006).
 19. Jonsson, T. *et al.* A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature* **488**, 96–99 (2012).
 20. Strittmatter, W. J. *et al.* Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid beta peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 8098–8102 (1993).
 21. Corder, E. H. *et al.* Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* **261**, 921–923 (1993).
 22. Namba, Y., Tomonaga, M., Kawasaki, H., Otomo, E. & Ikeda, K. Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain Res.* **541**, 163–166 (1991).
 23. Castellano, J. M. *et al.* Human apoE Isoforms Differentially Regulate Brain Amyloid- β Peptide Clearance. *Sci. Transl. Med.* **3**, 89ra57 (2011).
 24. Cerf, E., Gustot, A., Goormaghtigh, E., Ruysschaert, J.-M. & Raussens, V. High ability of

- apolipoprotein E4 to stabilize amyloid- β peptide oligomers, the pathological entities responsible for Alzheimer's disease. *FASEB J.* **25**, 1585–1595 (2011).
25. Hashimoto, T. *et al.* Apolipoprotein E, especially apolipoprotein E4, increases the oligomerization of amyloid β peptide. *J. Neurosci.* **32**, 15181–15192 (2012).
26. Hori, Y., Hashimoto, T., Nomoto, H., Hyman, B. T. & Iwatsubo, T. Role of Apolipoprotein E in β -Amyloidogenesis. *J. Biol. Chem.* **290**, 15163–15174 (2015).
27. Gómez - Isla, T. *et al.* Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* **41**, 17–24 (1997).
28. McLean, C. A. *et al.* Soluble pool of A β amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* **46**, 860–866 (1999).
29. Esparza, T. J. *et al.* Amyloid-beta oligomerization in Alzheimer dementia versus high-pathology controls. *Ann. Neurol.* **73**, 104–119 (2013).
30. Tomiyama, T. *et al.* A new amyloid β variant favoring oligomerization in Alzheimer's-type dementia. *Ann. Neurol.* **63**, 377–387 (2008).
31. Benilova, I., Karran, E. & Strooper, B. D. The toxic A β oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes. *Nat. Neurosci.* **15**, 349–357 (2012).
32. Walsh, D. M., Lomakin, A., Benedek, G. B., Condron, M. M. & Teplow, D. B. Amyloid β -Protein Fibrillogenesis DETECTION OF A PROTOFIBRILLAR INTERMEDIATE. *J. Biol. Chem.* **272**, 22364–22372 (1997).

33. Walsh, D. M. *et al.* Amyloid β -Protein Fibrillogenesis STRUCTURE AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF PROTOFIBRILLAR INTERMEDIATES. *J. Biol. Chem.* **274**, 25945–25952 (1999).
34. Arimon, M., Grimminger, V., Sanz, F. & Lashuel, H. A. Hsp104 Targets Multiple Intermediates on the Amyloid Pathway and Suppresses the Seeding Capacity of A β Fibrils and Protofibrils. *J. Mol. Biol.* **384**, 1157–1173 (2008).
35. Lambert, M. P. *et al.* Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A β 1–42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 6448–6453 (1998).
36. Zempel, H., Thies, E., Mandelkow, E. & Mandelkow, E.-M. A β Oligomers Cause Localized Ca²⁺ Elevation, Missorting of Endogenous Tau into Dendrites, Tau Phosphorylation, and Destruction of Microtubules and Spines. *J. Neurosci.* **30**, 11938–11950 (2010).
37. Walsh, D. M. *et al.* Naturally secreted oligomers of amyloid β protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* **416**, 535–539 (2002).
38. Shankar, G. M. *et al.* Amyloid β -Protein Dimers Isolated Directly from Alzheimer Brains Impair Synaptic Plasticity and Memory. *Nat. Med.* **14**, 837–842 (2008).
39. Lesné, S. *et al.* A specific amyloid- β protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* **440**, 352–357 (2006).
40. Noguchi, A. *et al.* Isolation and Characterization of Patient-derived, Toxic, High Mass

- Amyloid β -Protein ($A\beta$) Assembly from Alzheimer Disease Brains. *J. Biol. Chem.* **284**, 32895–32905 (2009).
41. Reed, M. N. *et al.* Cognitive effects of cell-derived and synthetically derived $A\beta$ oligomers. *Neurobiol. Aging* **32**, 1784–1794 (2011).
42. Jin, M. *et al.* Soluble amyloid β -protein dimers isolated from Alzheimer cortex directly induce Tau hyperphosphorylation and neuritic degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 5819–5824 (2011).
43. Kaye, R. *et al.* Common Structure of Soluble Amyloid Oligomers Implies Common Mechanism of Pathogenesis. *Science* **300**, 486–489 (2003).
44. Kaye, R. *et al.* Fibril specific, conformation dependent antibodies recognize a generic epitope common to amyloid fibrils and fibrillar oligomers that is absent in prefibrillar oligomers. *Mol. Neurodegener.* **2**, 18 (2007).
45. Liu, P. *et al.* Quaternary structure defines a large class of amyloid- β oligomers neutralized by sequestration. *Cell Rep.* **11**, 1760–1771 (2015).
46. Lee, E. B. *et al.* Targeting Amyloid- β Peptide ($A\beta$) Oligomers by Passive Immunization with a Conformation-selective Monoclonal Antibody Improves Learning and Memory in $A\beta$ Precursor Protein (APP) Transgenic Mice. *J. Biol. Chem.* **281**, 4292–4299 (2006).
47. Koffie, R. M. *et al.* Oligomeric amyloid β associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*

- 106**, 4012–4017 (2009).
48. Englund, H. *et al.* Sensitive ELISA detection of amyloid- β protofibrils in biological samples. *J. Neurochem.* **103**, 334–345 (2007).
49. Murakami, K. *et al.* Monoclonal antibody with conformational specificity for a toxic conformer of amyloid β 42 and its application toward the Alzheimer's disease diagnosis. *Sci. Rep.* **6**, 29038 (2016).
50. Xia, W. *et al.* A Specific ELISA for Measuring Amyloid β -Protein Oligomers in Human Plasma and the Brains of Alzheimer Patients. *JAMA Neurol.* **66**, 190–199 (2009).
51. Fukumoto, H. *et al.* High-molecular-weight β -amyloid oligomers are elevated in cerebrospinal fluid of Alzheimer patients. *FASEB J.* **24**, 2716–2726 (2010).
52. Braak, H. & Braak, E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* **82**, 239–259 (1991).
53. Jucker, M. & Walker, L. C. Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nature* **501**, 45–51 (2013).
54. Prusiner, S. B., Scott, M. R., DeArmond, S. J. & Cohen, F. E. Prion Protein Biology. *Cell* **93**, 337–348 (1998).
55. Kane, M. D. *et al.* Evidence for Seeding of β -Amyloid by Intracerebral Infusion of Alzheimer Brain Extracts in β -Amyloid Precursor Protein-Transgenic Mice. *J. Neurosci.* **20**, 3606–3611 (2000).

56. Meyer-Luehmann, M. Exogenous Induction of Cerebral β -Amyloidogenesis Is Governed by Agent and Host. *Science* **313**, 1781–1784 (2006).
57. Eisele, Y. S. *et al.* Peripherally Applied $A\beta$ -Containing Inoculates Induce Cerebral β -Amyloidosis. *Science* **330**, 980–982 (2010).
58. Jaunmuktane, Z. *et al.* Evidence for human transmission of amyloid- β pathology and cerebral amyloid angiopathy. *Nature* **525**, 247–250 (2015).
59. Hamaguchi, T. *et al.* Significant association of cadaveric dura mater grafting with subpial $A\beta$ deposition and meningeal amyloid angiopathy. *Acta Neuropathol.* **132**, 313–315 (2016).
60. Schenk, D. *et al.* Immunization with amyloid- β attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* **400**, 173–177 (1999).
61. Bard, F. *et al.* Peripherally administered antibodies against amyloid β -peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nat. Med.* **6**, 916–919 (2000).
62. Panza, F., Lozupone, M., Logroscino, G. & Imbimbo, B. P. A critical appraisal of amyloid- β -targeting therapies for Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurol.* **15**, 73–88 (2019).
63. Sevigny, J. *et al.* The antibody aducanumab reduces $A\beta$ plaques in Alzheimer's disease. *Nature* **537**, 50–56 (2016).
64. Salloway, S. *et al.* A phase 2 multiple ascending dose trial of bapineuzumab in mild to moderate Alzheimer disease. *Neurology* **73**, 2061–2074 (2009).

65. Sperling, R. A. *et al.* Amyloid Related Imaging Abnormalities (ARIA) in Amyloid Modifying Therapeutic Trials: Recommendations from the Alzheimer's Association Research Roundtable Workgroup. *Alzheimers. Dement.* **7**, 367–385 (2011).
66. Yamada, K. *et al.* A β Immunotherapy: Intracerebral Sequestration of A β by an Anti-A β Monoclonal Antibody 266 with High Affinity to Soluble A β . *J. Neurosci.* **29**, 11393–11398 (2009).
67. Cirrito, J. R. *et al.* In Vivo Assessment of Brain Interstitial Fluid with Microdialysis Reveals Plaque-Associated Changes in Amyloid- β Metabolism and Half-Life. *J. Neurosci.* **23**, 8844–8853 (2003).
68. Yamamoto, K. *et al.* Chronic Optogenetic Activation Augments A β Pathology in a Mouse Model of Alzheimer Disease. *Cell Rep.* **11**, 859–865 (2015).
69. Lomakin, A., Teplow, D. B., Kirschner, D. A. & Benedek, G. B. Kinetic theory of fibrillogenesis of amyloid β -protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 7942–7947 (1997).
70. Thal, D. R., Rüb, U., Orantes, M. & Braak, H. Phases of A β -deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology* **58**, 1791–1800 (2002).
71. Stöhr, J. *et al.* Purified and synthetic Alzheimer's amyloid beta (A β) prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 11025–11030 (2012).
72. Hayashi, H. A Seed for Alzheimer Amyloid in the Brain. *J. Neurosci.* **24**, 4894–4902 (2004).

73. Liu, C.-C. *et al.* Neuronal heparan sulfates promote amyloid pathology by modulating brain amyloid- β clearance and aggregation in Alzheimer's disease. *Sci. Transl. Med.* **8**, 332ra44 (2016).
74. Marzesco, A.-M. *et al.* Highly potent intracellular membrane-associated A β seeds. *Sci. Rep.* **6**, 28125 (2016).
75. Fritsch, S. K. *et al.* Highly potent soluble amyloid- β seeds in human Alzheimer brain but not cerebrospinal fluid. *Brain* **137**, 2909–2915 (2014).
76. Roberts, B. R. *et al.* Biochemically-defined pools of amyloid- β in sporadic Alzheimer's disease: correlation with amyloid PET. *Brain* **140**, 1486–1498 (2017).
77. Götz, J. & Ittner, L. M. Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Nat. Rev. Neurosci.* **9**, 532–544 (2008).
78. Ruiz-Riquelme, A. *et al.* Prion-like propagation of β -amyloid aggregates in the absence of APP overexpression. *Acta Neuropathol. Commun.* **6**, 26 (2018).
79. Ridley, R. M., Baker, H. F., Windle, C. P. & Cummings, R. M. Very long term studies of the seeding of β -amyloidosis in primates. *J. Neural. Transm. (Vienna)* **113**, 1243 (2005).
80. Lazarov, O., Lee, M., Peterson, D. A. & Sisodia, S. S. Evidence That Synaptically Released β -Amyloid Accumulates as Extracellular Deposits in the Hippocampus of Transgenic Mice. *J. Neurosci.* **22**, 9785–9793 (2002).
81. Cirrito, J. R. *et al.* Synaptic Activity Regulates Interstitial Fluid Amyloid- β Levels In Vivo.

- Neuron* **48**, 913–922 (2005).
82. Cirrito, J. R. *et al.* Endocytosis is required for synaptic activity-dependent release of amyloid- β in vivo. *Neuron* **58**, 42–51 (2008).
83. Wakabayashi, T. *et al.* Differential effects of diet- and genetically-induced brain insulin resistance on amyloid pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Mol. Neurodegener.* **14**, 15 (2019).
84. Novotny, R. *et al.* Conversion of Synthetic A β to In Vivo Active Seeds and Amyloid Plaque Formation in a Hippocampal Slice Culture Model. *J. Neurosci.* **36**, 5084–5093 (2016).
85. Venegas, C. *et al.* Microglia-derived ASC specks cross-seed amyloid- β in Alzheimer's disease. *Nature* **552**, 355 (2017).
86. Walker, L. C., Schelle, J. & Jucker, M. The Prion-Like Properties of Amyloid- β Assemblies: Implications for Alzheimer's Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **6**, a024398 (2016).
87. Legname, G. *et al.* Synthetic Mammalian Prions. *Science* **305**, 673–676 (2004).
88. Silveira, J. R. *et al.* The most infectious prion protein particles. *Nature* **437**, 257–261 (2005).
89. Giles, K., Woerman, A. L., Berry, D. B. & Prusiner, S. B. Bioassays and Inactivation of Prions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **9**, a023499 (2017).
90. McGowan, E. *et al.* A β 42 Is Essential for Parenchymal and Vascular Amyloid Deposition

- in Mice. *Neuron* **47**, 191–199 (2005).
91. Kim, J. *et al.* A β 40 Inhibits Amyloid Deposition In Vivo. *J. Neurosci.* **27**, 627–633 (2007).
92. Watts, J. C. *et al.* Serial propagation of distinct strains of A β prions from Alzheimer's disease patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**, 10323–10328 (2014).
93. Aoyagi, A. *et al.* A β and tau prion-like activities decline with longevity in the Alzheimer's disease human brain. *Sci. Transl. Med.* **11**, eaat8462 (2019).
94. Ye, L. *et al.* A β seeding potency peaks in the early stages of cerebral β - amyloidosis. *EMBO Rep.* **18**, 1536-1544 (2017).
95. Ye, L. *et al.* Persistence of A β seeds in APP null mouse brain. *Nat. Neurosci.* **18**, 1559–1561 (2015).

症例	Braak stage	年齢	脳部位
Control1	II	87	BA9
Control2	0	>90	BA9/46
Control3	I	>90	頭頂葉
Control4	II	>90	BA20
Control5	I	>90	BA9
Control6	I	>90	BA9/46
AD1	V	82	BA8/9
AD2	VI	70	BA9
AD3	VI	90	BA9
AD4	VI	66	BA9
AD5	VI	83	BA9
AD6	VI	89	BA9

表1. 脳組織片を採取したAD症例と非AD症例の特性

研究に使用したヒト脳組織について、Braak stage、症例の年齢、組織を採取した脳部位を示す。(BA; Brodmann area) (BA8：前頭眼野、BA9：背外側前頭前野、BA20：下側頭回、BA46：背外側前頭前野)

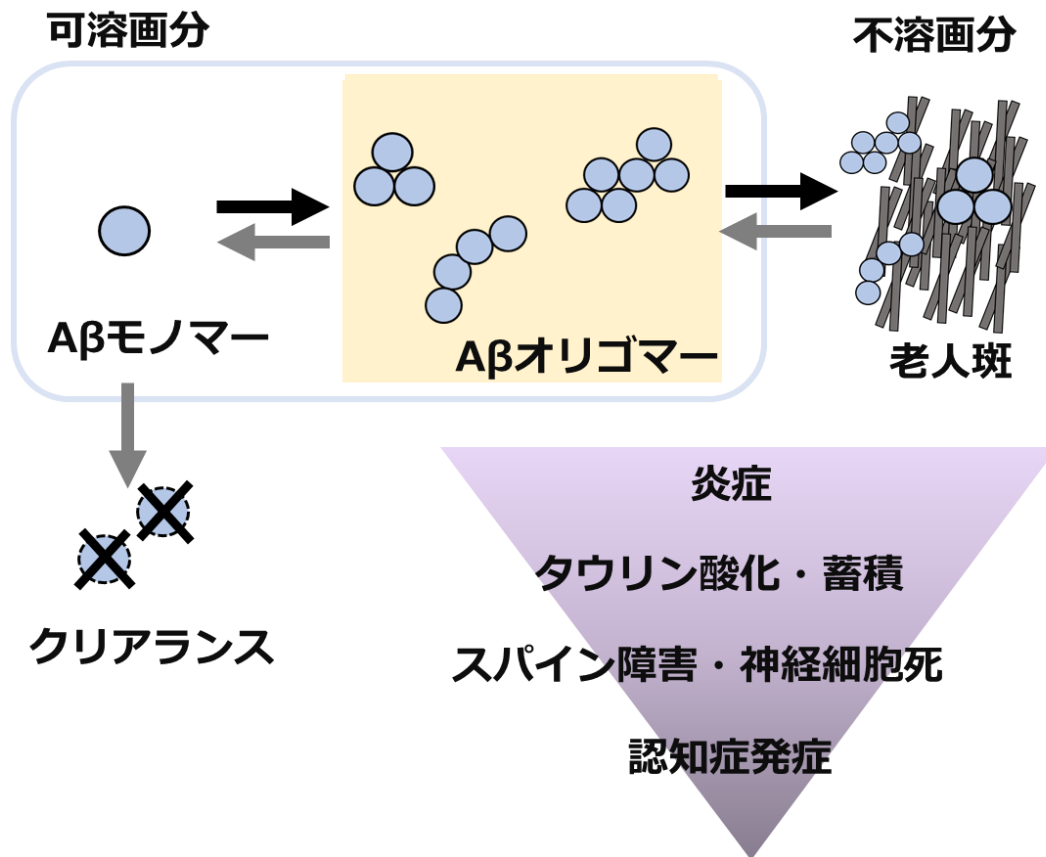


図1. Aβの凝集・蓄積とAD発症

Aβが異常な凝集性を獲得し、Aβ産生とクリアランスのバランスが崩れるのがAD発症初期の原因的变化であり、その下流で、炎症、病的タウリン酸化・蓄積、スパイン障害、神経細胞死が惹起され、認知症発症に至るといふ、アミロイド仮説が広く支持されている。

Aβは神経細胞からモノマーとして分泌された後、ダイマーやトライマー、より高分子量のオリゴマー、線維化Aβなど多様な凝集形態をとり、最終的に老人斑として脳内に蓄積すると考えられている。

18-19カ月齢 APP tgマウス

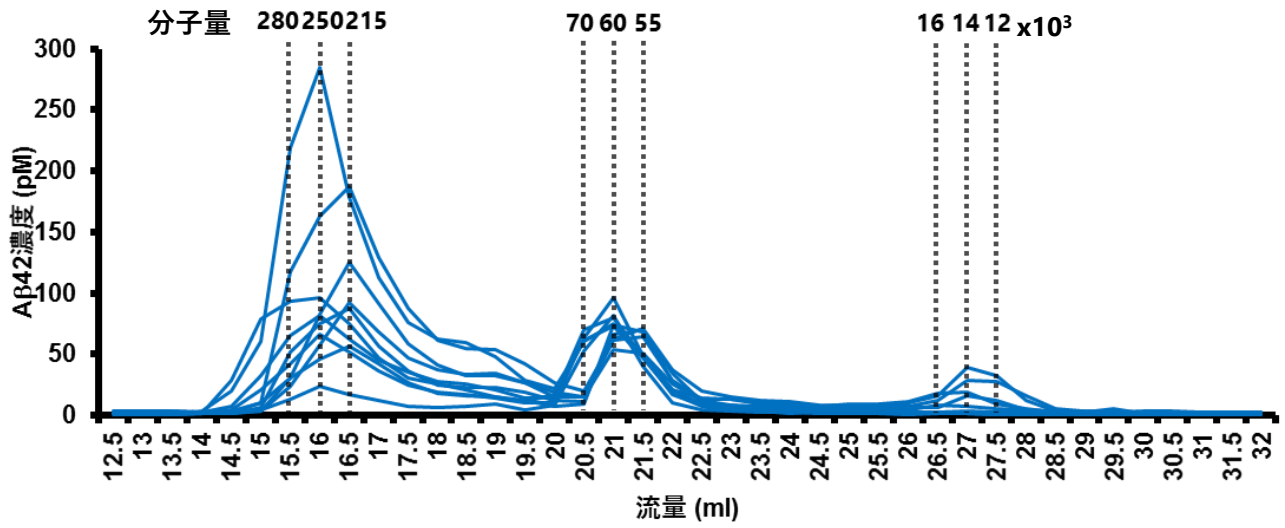


図2. Aβの凝集・蓄積とAD発症（仲泰史博士論文より引用）

脳内にアミロイド斑が蓄積した18ヶ月齢以上のAPP tg脳(n=10)のTBS画分をSuperdex 75カラムを2本連結したゲルろ過クロマトグラフィーで分離し、BNT77/BC05 ELISAで各フラクション中のAβ42量を測定したところ、分子量の異なる3つのピークが観察された。分子量は分子量マーカーの溶出時間より得られた推定分子量である。

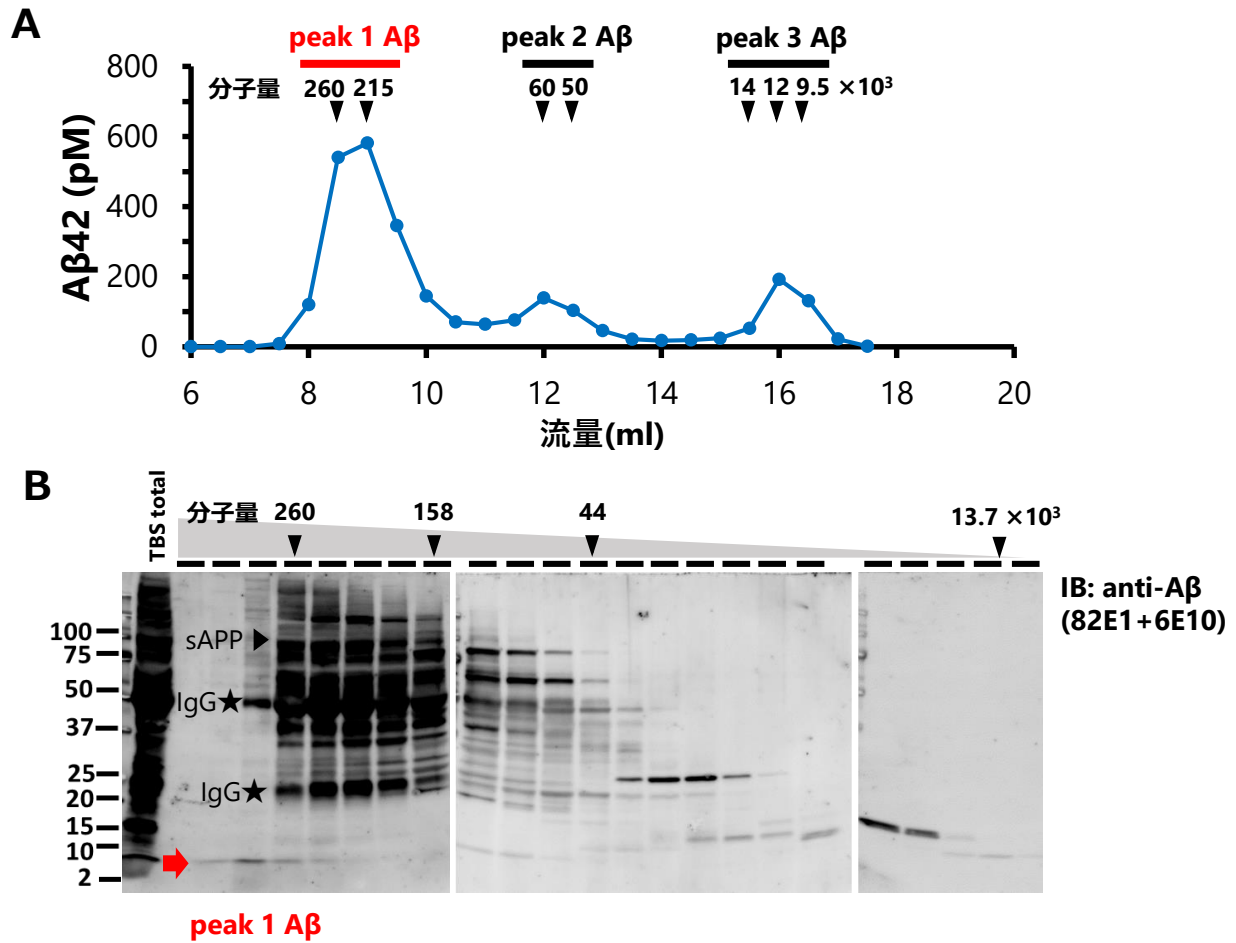


図3. 高齢APP tg脳TBS画分中のAβ分子種の解析

脳内にアミロイド蓄積を有する高齢APP tg脳TBS画分を、Superdex 75カラム1本を用いたゲルろ過クロマトグラフィーで分離した。**A.** BNT77/BC05 ELISAで、各フラクションのAβ42濃度を測定したところ、分子量の異なる3種類のAβ分子が存在しており、分子量200-300×10³ (peak 1 Aβ)、50-60×10³ (peak 2 Aβ)、10~15×10³ (peak 3 Aβ)画分に溶出された。上に示した分子量は、分子量マーカの溶出流量から計算した値である。**B.** SDS PAGE、抗Aβ抗体 (82E1、6E10) を用いたウエスタンブロットで、各フラクション中のAβ/APPの検出を試みた。Peak 1 Aβ画分中にはAβモノマーと推定される分子量4 × 10³のバンドが検出された (赤矢印) が、peak 2 Aβ、peak 3 Aβ画分では同様のバンドを認めなかった。上に示した分子量は、分子量マーカの値と、分子量マーカの溶出流量から計算した値である。★印はマウス内因性イムグロブリン由来のバンド、黒矢頭はsAPP (分泌型APP) のバンドである。

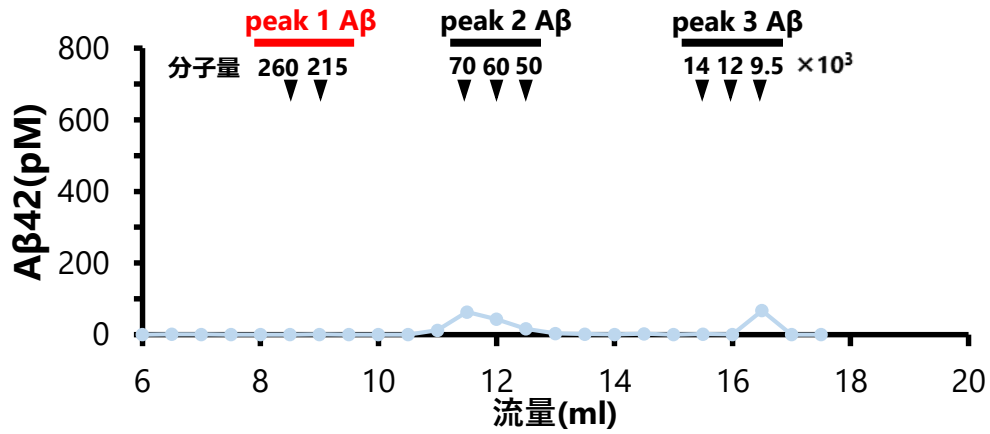


図4. 高齢野生型マウス脳TBS画分中のAβ分子種の解析

高齢野生型マウス脳TBS画分を、ゲルろ過クロマトグラフィーで分離し、BNT77/BC05 ELISAで、各フラクションのAβ42濃度を測定した。Peak 1 Aβ画分に相当する 200×10^3 以上の分子量の画分のAβ42濃度は、ELISAの検出感度以下であった。Peak 2 Aβ、peak 3 Aβに相当する分子量の画分に、少量のAβが検出された。

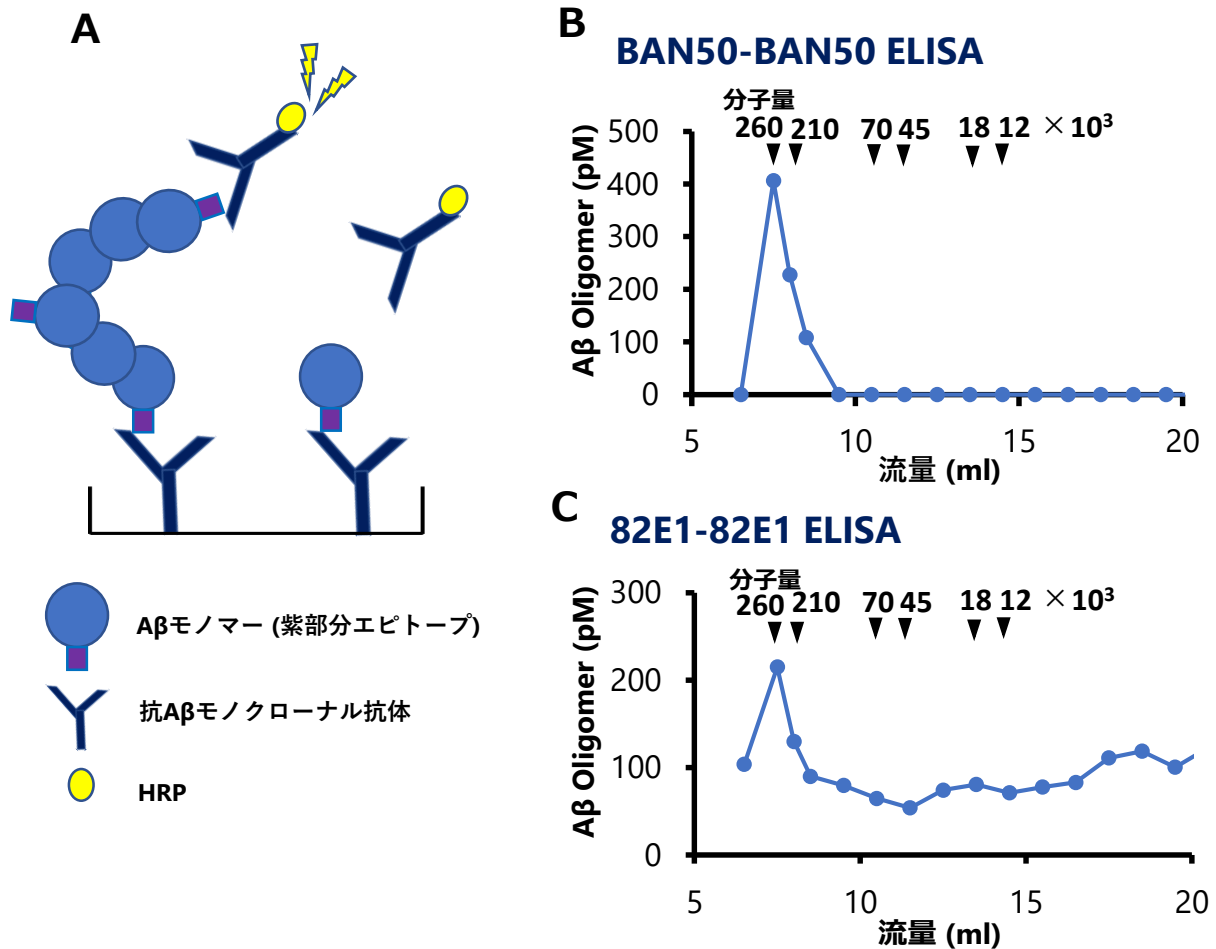


図5. 高齢APP tg脳TBS画分中のAβ分子種とAβオリゴマー特異ELISAの反応性

脳内にアミロイド蓄積を有する高齢APP tg脳TBS画分を、ゲルろ過クロマトグラフィーで分離し、各フラクションをAβオリゴマー特異ELISAで測定した。

A. Aβオリゴマー特異ELISAの概念図。Aβのcapture抗体とdetect抗体に同じ抗Aβ抗体（82E1もしくはBAN50）を用いており、モノマーAβは検出せず、ダイマー以上のAβオリゴマーのみを検出する設計である。**B.** 82E1-82E1 ELISAでの測定結果。**C.** BAN50-BAN50 ELISAでの測定結果。いずれのELISAでも、peak 1 Aβ画分中にAβオリゴマーが検出された。Peak 2 Aβ、peak 3 Aβ画分中にはAβオリゴマーは検出されなかった。

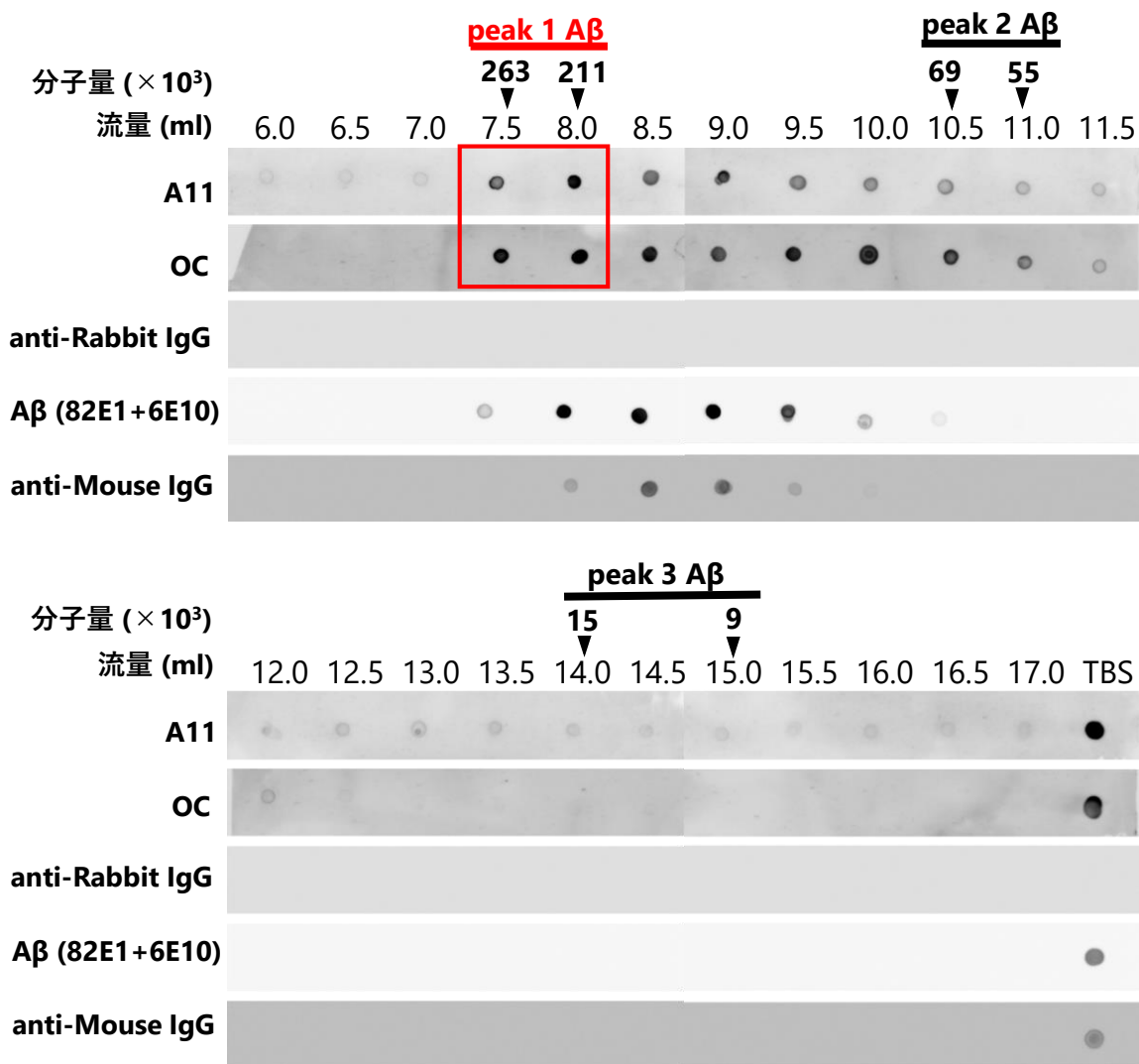


図6. 高齢APP tg脳TBS画分中のAβ分子種と抗Aβオリゴマー抗体A11、OCとの反応性

高齢APP tg脳TBS画分をゲルろ過クロマトグラフィーで分離した。ゲルろ過前のTBS画分、あるいはゲルろ過して得た各フラクションと、抗Aβ抗体、抗Aβオリゴマー抗体A11、OCとの反応性をドットブロットで確かめた。上部に示した分子量は、分子量マーカの溶出流量から計算した分子量である。結果、推定分子量50~270 × 10³の、peak 1 Aβ画分を含む広い範囲のフラクションと、A11、OCが反応することが分かった。抗Aβ抗体82E1では、推定分子量70~270 × 10³の範囲で、抗マウスIgG抗体では推定分子量108~210 × 10³の範囲で反応性がみられた。また、Peak 3 Aβに相当する低分子量の画分との反応性はいずれの抗体でもみられなかった。

(抗Aβオリゴマー抗体A11、OCはラビットポリクローナル抗体、抗Aβ抗体82E1、6E10はマウスモノクローナル抗体である。)

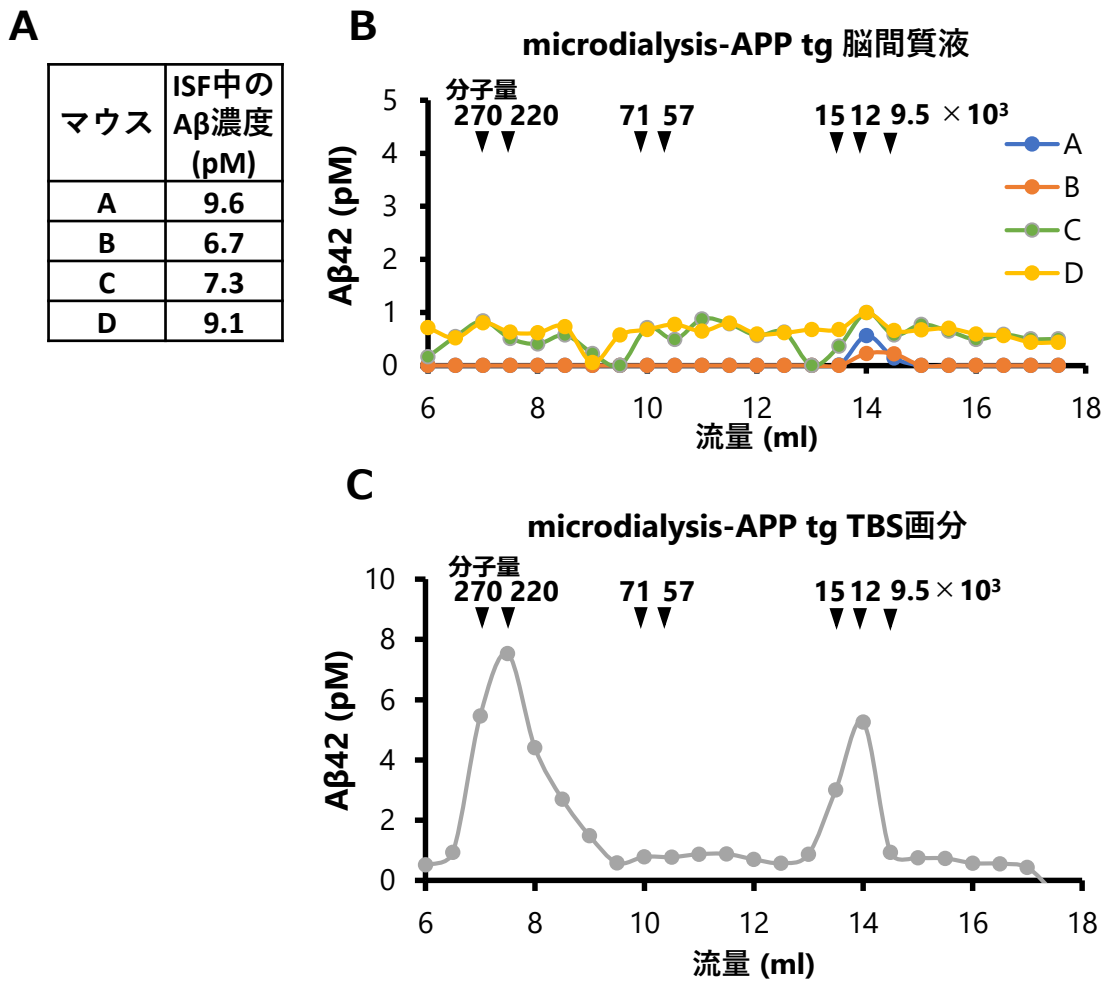


図7. 高齢APP tg脳間質液中に存在するA β 分子種の解析

*In vivo*マイクロダイアリシス法を用いて、高齢APP tg脳間質液を回収した(n=4)。

A. 実験で用いたAPP tg (マウスA、B、C、D) の脳間質液中のA β 42濃度をBNT77/BC05 ELISAで測定した。脳間質液中のA β 42濃度は5~10pMの範囲であった。**B.** 回収した脳間質液をゲルろ過クロマトグラフィーで分離し、各フラクション中のA β 42濃度をBNT77/BC05 ELISAで測定した。Peak 1 A β に相当する高分子量A β 分子種は検出されなかった。**C.** 高齢APP tg脳TBS画分に直接プローブをいれてマイクロダイアリシスを行った(n=1)。回収された液をゲルろ過クロマトグラフィーで分離し、各フラクション中のA β 42濃度を測定した。Peak 1 A β 、peak 3 A β に相当する分子量の画分にA β 42が検出された。

A

脳抽出液	Aβ42濃度 (nM)
TBS 画分	1.7
TBS 2回目	6.2
TBS 3回目	4.5
TBS 4回目	5
TBS 5回目	8
TBS不溶画分 ギ酸溶出	357.1

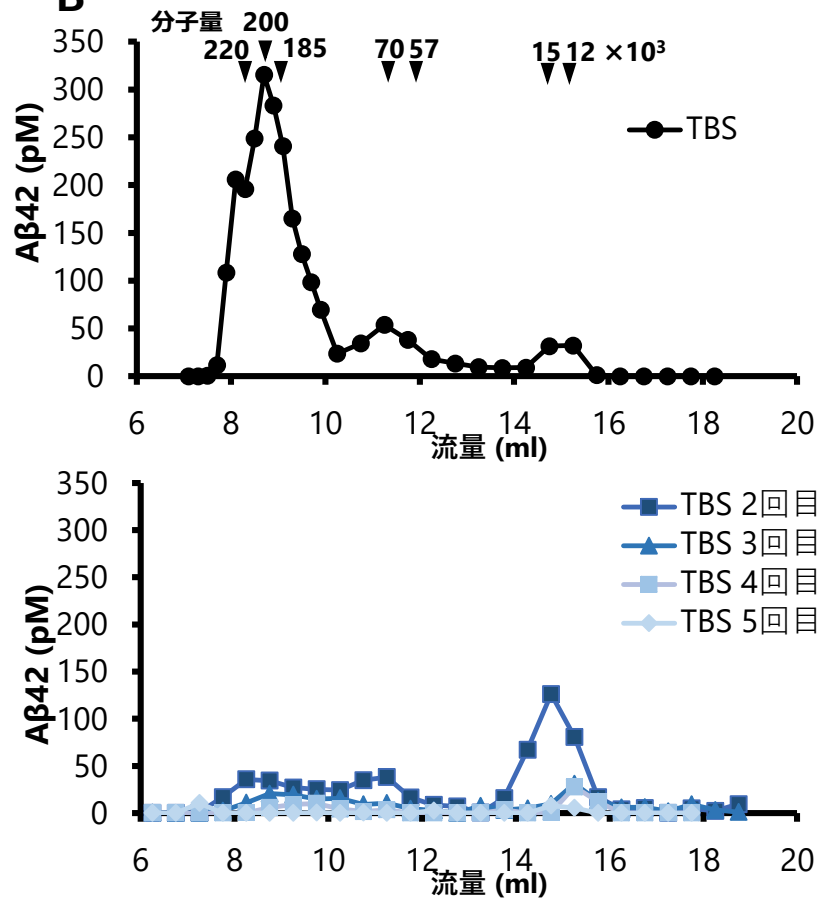
B

図8. 高齢APP tg脳TBS繰り返し抽出

高齢APP tg脳のTBS可溶画分を採取した後のペレットに、TBSを加えて再度抽出する操作を4回繰り返し、上清を回収した（TBS 2～5回目）。合計5回の抽出操作を行った後のペレットに70%ギ酸を加えてソニケーションし、超遠心後の上清を回収、乾燥させDMSOに溶解させた（TBS不溶画分ギ酸溶出）。

A. 各脳抽出液中のAβ42濃度をBNT77/BC05 ELISAで測定した。TBSで抽出操作を繰り返すと、TBS画分と同程度あるいはそれ以上の高濃度のAβが溶出された。5回抽出操作後のTBS不溶なペレット中にも多量のAβが検出された。

B. TBS画分と、TBS 2～5回目抽出液をそれぞれゲルろ過クロマトグラフィーで分離し、各フラクションをグアニジン処理した後、Aβ42濃度をBNT77/BC05 ELISAで測定した。抽出操作を繰り返す毎に、すべての画分の溶出されるAβ量は減少した。5回目抽出液中には、peak 1 Aβ画分中に含まれる高分子量Aβはほとんど残存していなかった。

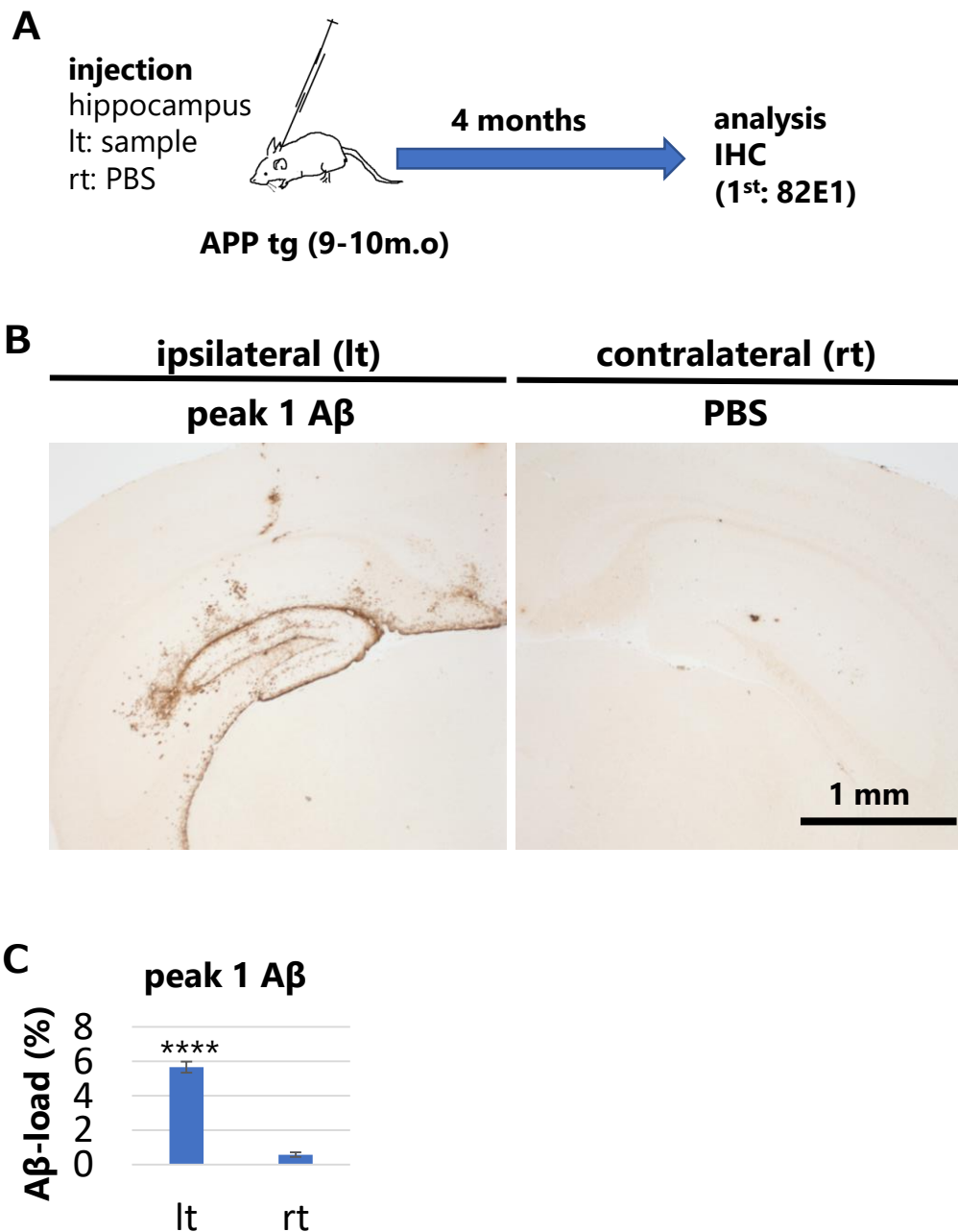


図9. *In vivo*におけるpeak 1 A β の seed効果の解析

A. 実験のタイムコース。9-10ヶ月齢のAPP tg脳左海馬に脳抽出液由来のサンプルを、右海馬にPBSを接種し、4ヶ月間インキュベーションした後、抗A β 抗体82E1を用いて免疫組織化学的に脳中A β 蓄積面積を定量した。 **B.** Peak 1 A β 画分を接種されたマウスでは、A β 濃度依存的に、海馬に帯状のA β 蓄積が誘発された。インジェクションしたサンプル中のA β 42濃度は825 pMであった

(BNT77/BC05 ELISAで測定)。 **C.** インジェクション後のAPP tg脳左右海馬のA β 蓄積面積 (%) を定量した。Peak 1 A β 接種側の海馬でA β 蓄積面積は有意に増加していた。エラーバー: SE、paired t-test、n=6 (各個体につき、5スライスのA β 蓄積面積の平均を算出した)。(****; p<0.0001)

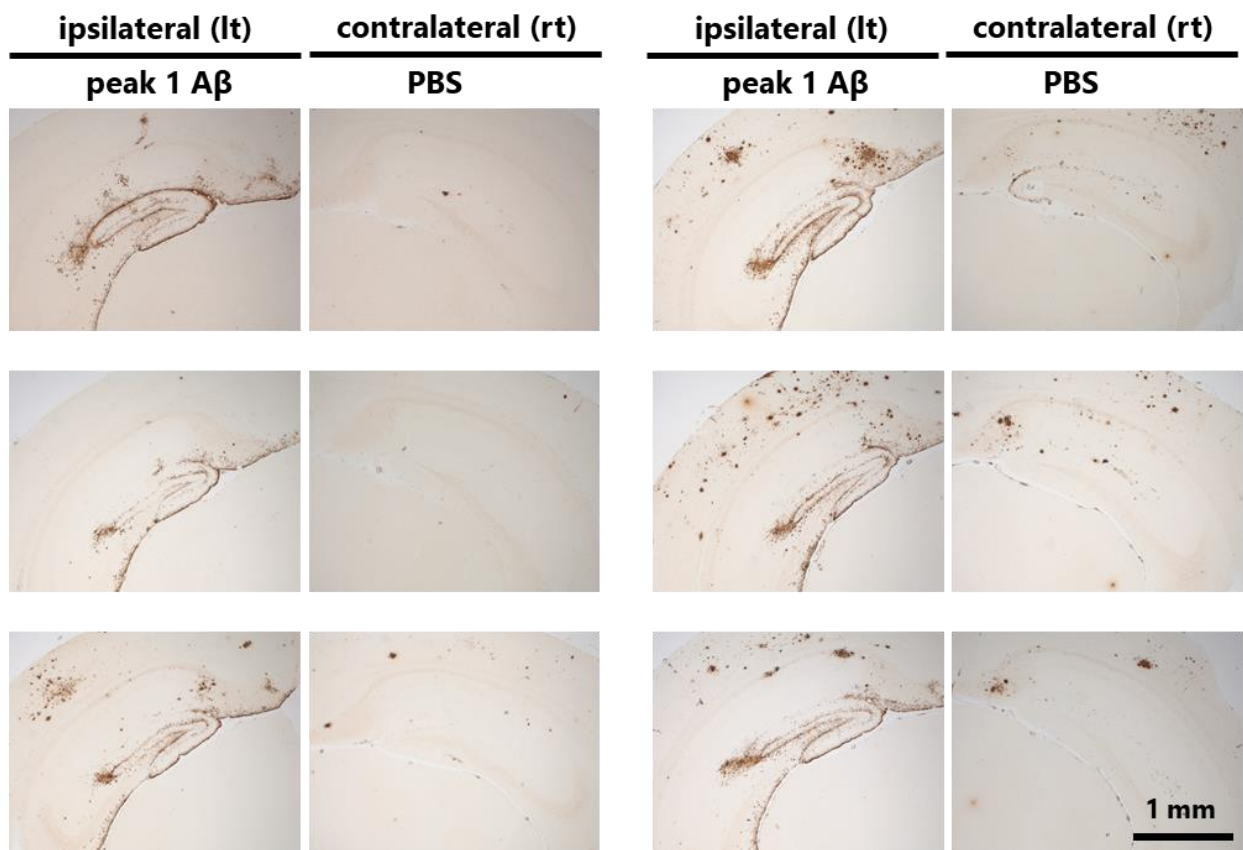


図10. *In vivo*における peak 1 A β の seed効果の解析

A. Peak 1 A β 画分を接種されたAPP tg、全個体のA β 蓄積パターンを示す。

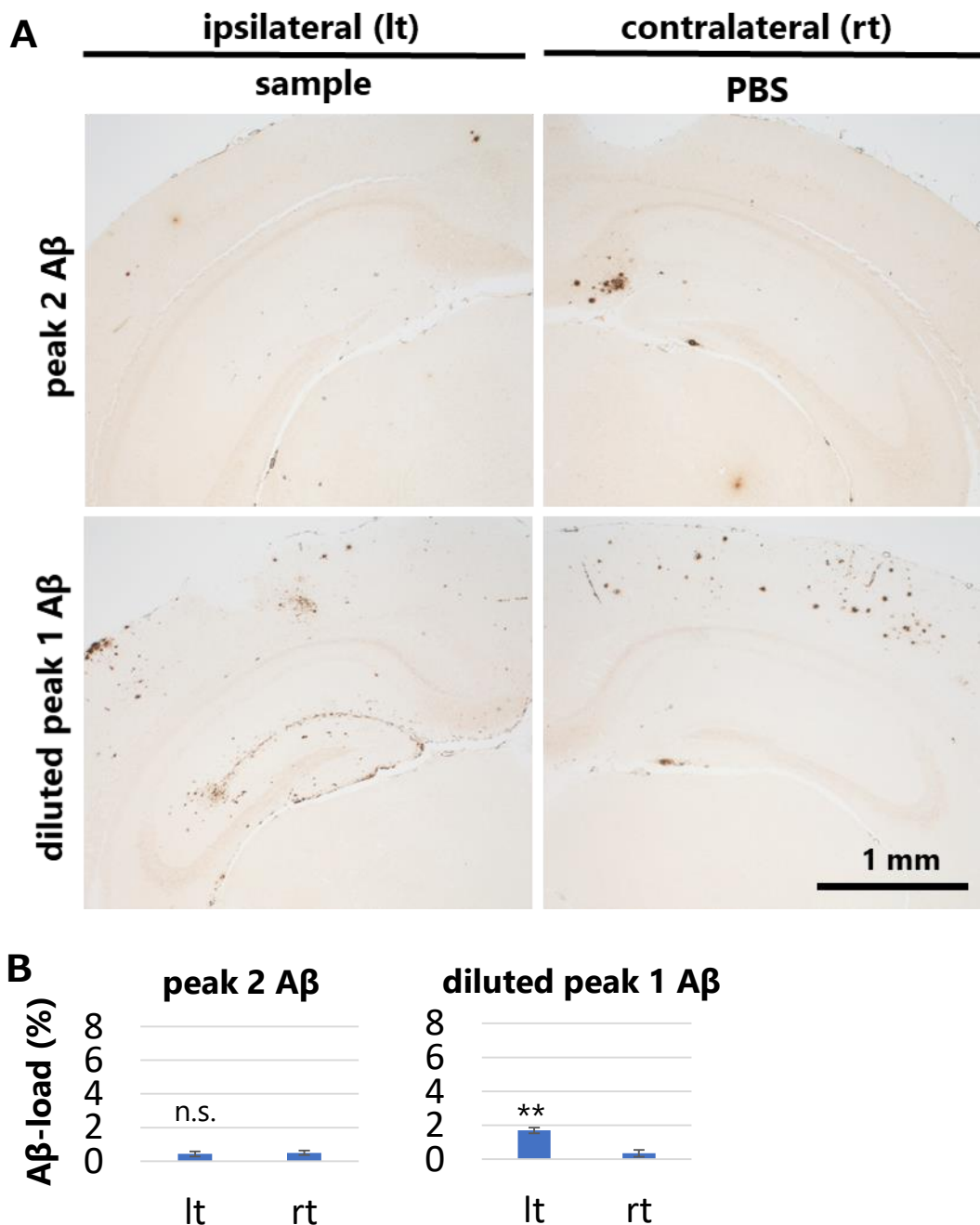


図11. *In vivo*におけるpeak 2 Aβの seed効果の解析

A. Peak 2 Aβ画分の接種では、Aβ蓄積は誘発されなかった。Peak 2 Aβ画分とAβ42濃度が同じになるように希釈したpeak 1 Aβ画分の接種では、帯状のAβ蓄積が誘発された。インジェクションサンプル中のAβ42濃度は139 pMである (BNT77/BC05 ELISAで測定)。**B.** インジェクション後のAPP tg脳左右海馬のAβ蓄積面積 (%)を定量した。希釈したpeak 1 Aβ接種側の海馬でAβ蓄積面積は有意に増加していた。Peak 2 Aβ接種群では左右差なし。エラーバー: SE、paired t-test、n=4 (peak 2 Aβ)、n=5 (diluted peak 1 Aβ) (各個体につき、5スライスのAβ蓄積面積の平均を算出した)。(n.s.; not significant, **; p<0.01) 有意差がなかった群のp値: peak 2 Aβ群p=0.53。

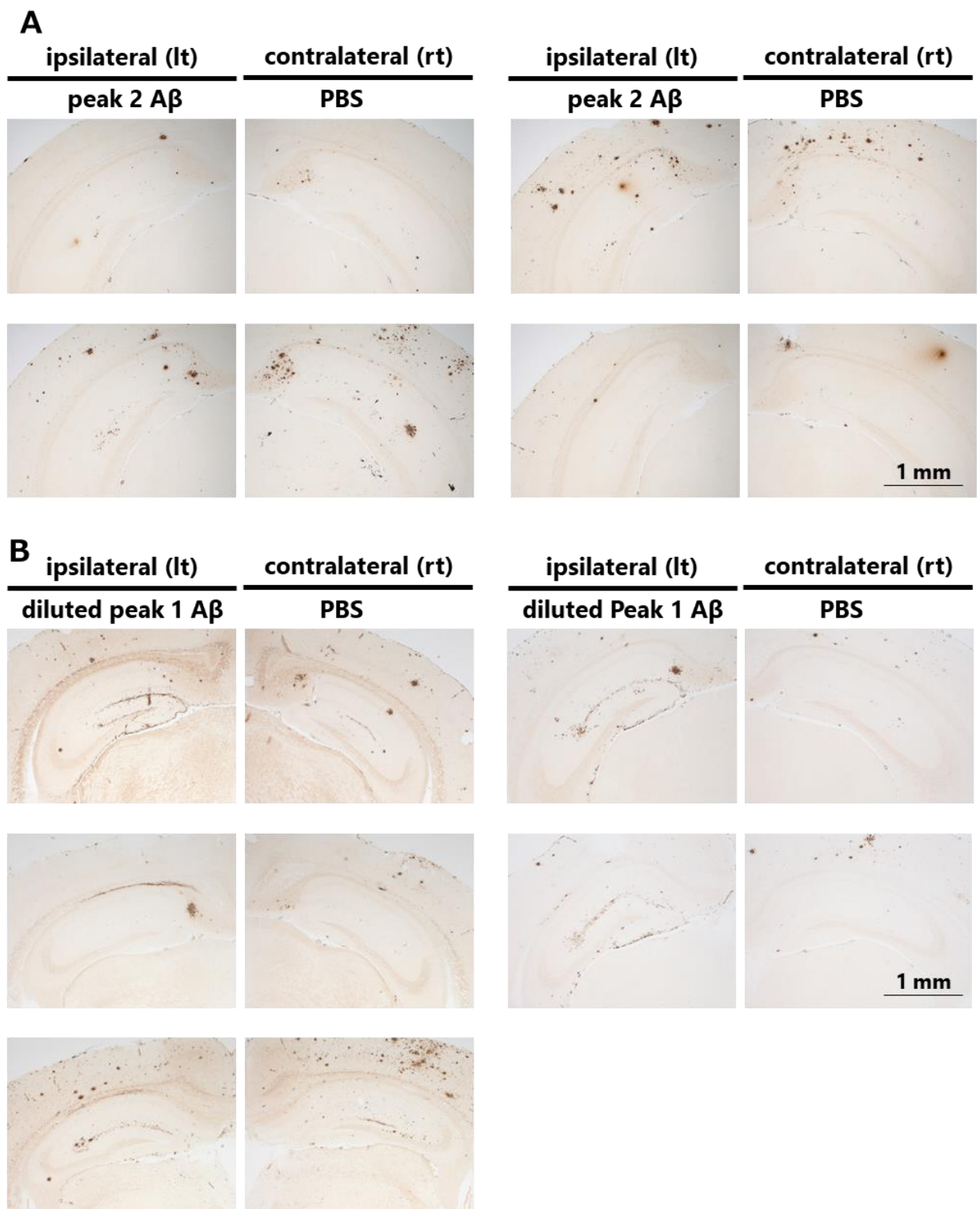


図12. *In vivo*におけるpeak 2 A β の seed効果の解析

A. Peak 2 A β 画分を接種されたAPP tg、全個体のA β 蓄積パターンを示す。

B. Peak 2 A β 画分とA β 42濃度を揃えたpeak 1 A β を接種されたAPP tg、全個体のA β 蓄積パターンを示す。

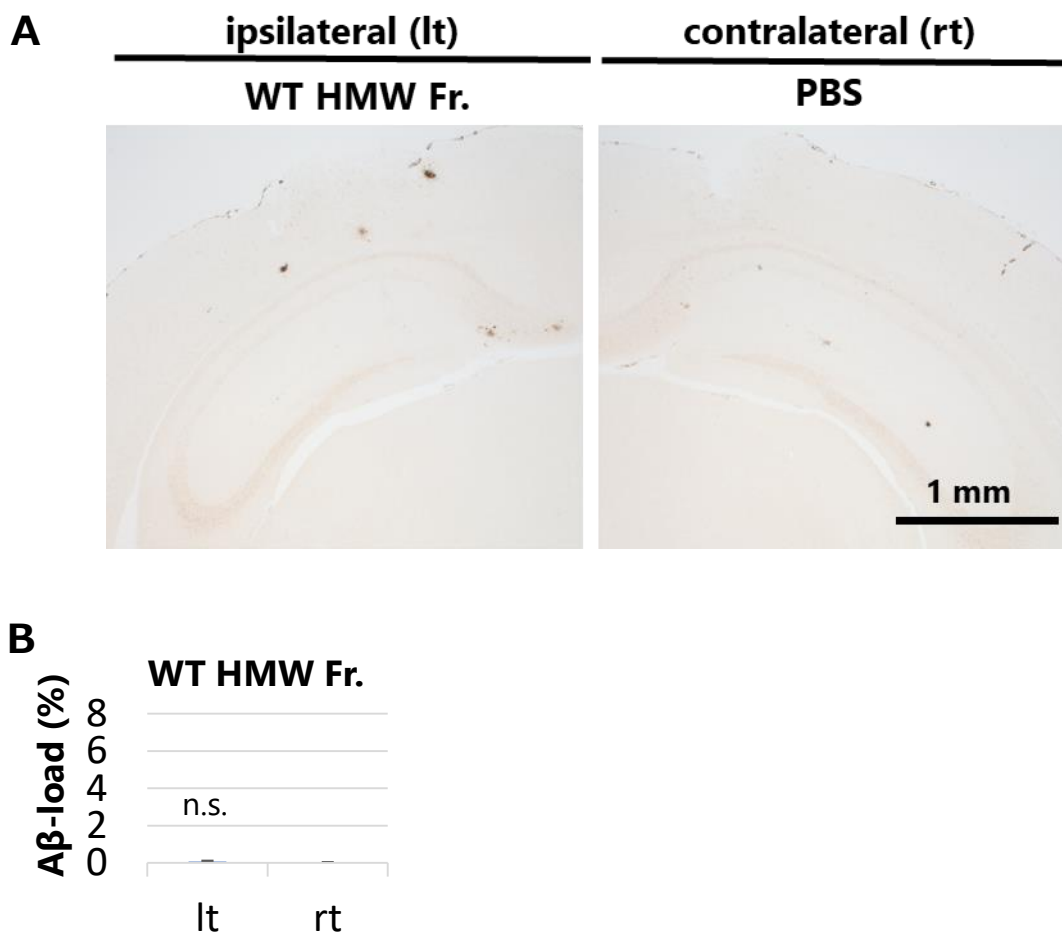


図13. *In vivo*における野生型マウス由来の高分子量画分の seed効果の解析

A. 18ヶ月齢以上の野生型マウス脳由来の、推定分子量 $200-300 \times 10^3$ の高分子量画分 (wild type; WT, high molecular weight fraction; HMW Fr.) では、A β 蓄積は誘発されなかった。インジェクションしたサンプル中のA β 42濃度は、BNT77/BC05 ELISAの検出感度以下であった。**B.** インジェクション後のAPP tg 脳左右海馬のA β 蓄積面積 (%) を定量した。A β 蓄積面積に左右差を認めなかった。エラーバー: SE、paired t-test、n=4 (各個体につき、5スライスのA β 蓄積面積の平均を算出した)。p=0.42。 (n.s.; not significant)

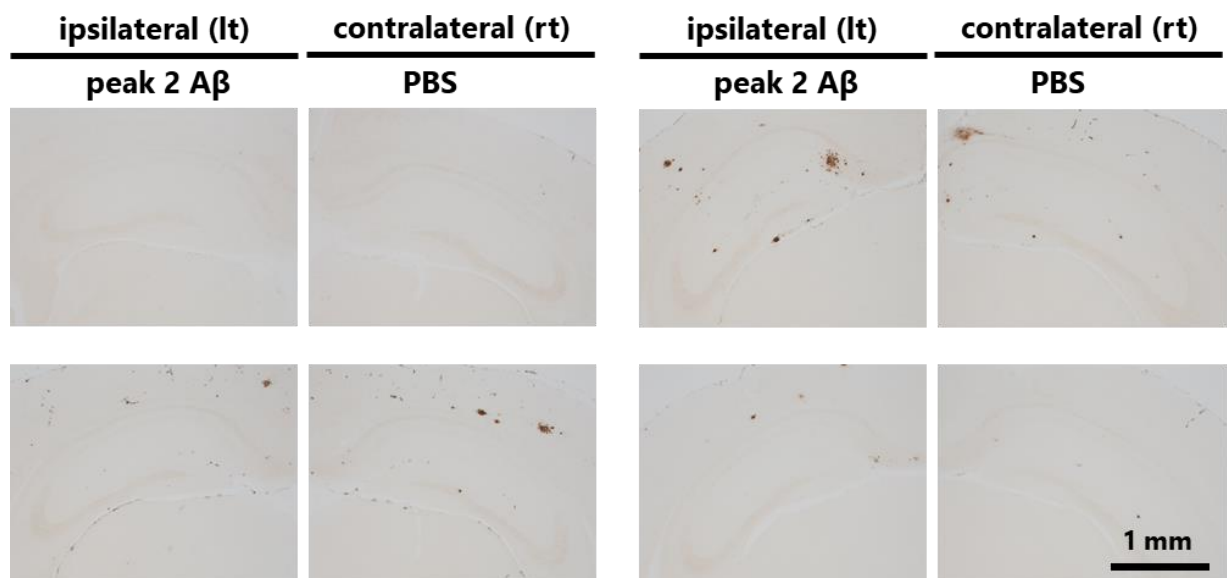
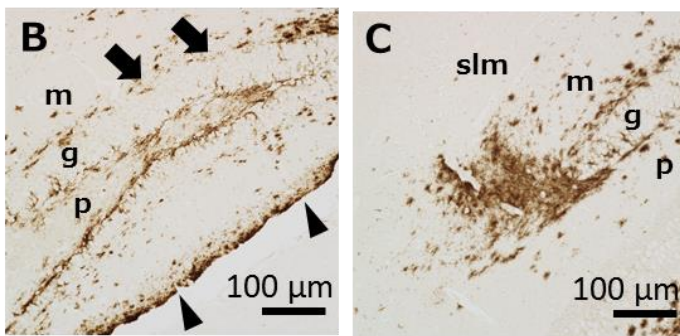
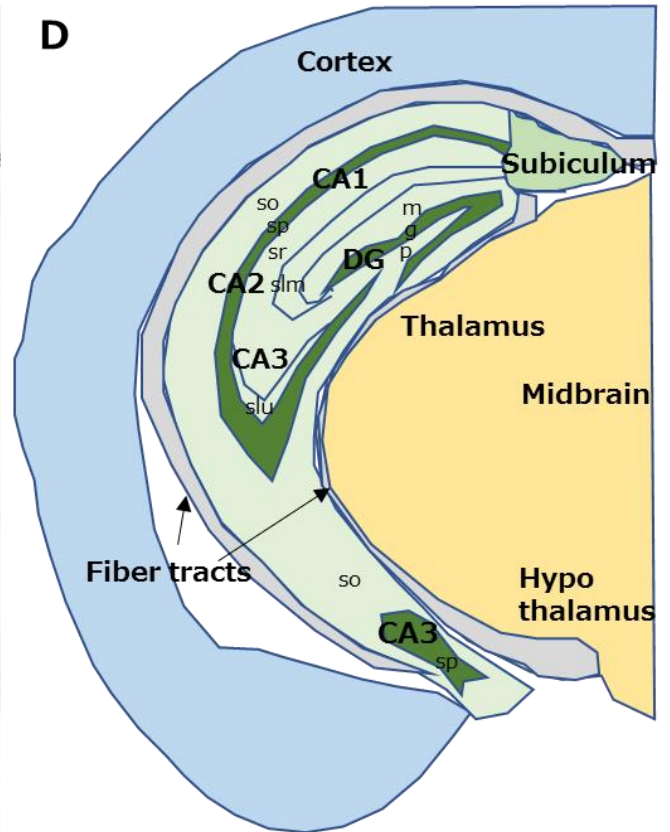
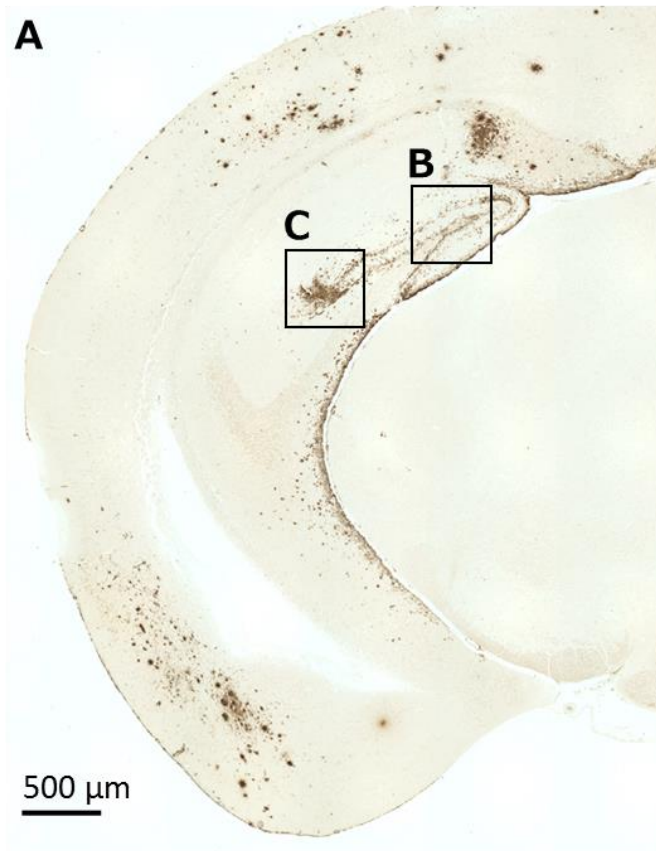


図14. *In vivo*における野生型マウス由来の高分子量画分の seed効果の解析

A. 18ヶ月齢以上の野生型マウス脳由来の高分子量画分を接種されたAPP tg、全個体のA β 蓄積パターンを示す。



DG; dentate gyrus, 齒状回
 m; molecular layer, 分子層
 g; granule cell layer, 顆粒細胞層
 p; polymorph layer, 多形細胞層

CA; Ammon's horn, アンモン角
 so; stratum oriens, 上昇層
 sp; pyramidal layer, 錐体細胞層
 sr; stratum radiatum, 放線層
 slm; stratum lacunosum-moleculare, 網状-分子層
 slu; stratum lucidum, 透明層

図15. Peak 1 Aβ接種によって誘発されるAβ蓄積のパターン

A-C. Peak 1 Aβを9-10ヶ月齢のAPP tg脳海馬に接種し4ヶ月インキュベーションした後の脳内Aβ蓄積パターンを示す。齒状回の海馬裂に沿って、軟膜直下にdiffuseなAβ蓄積を認めた(矢頭)。齒状回の顆粒細胞層を縁どるような、带状あるいはdot状のびまん性のAβ蓄積を認めた(矢印)。D. 写真Aに対応する解剖学的部位の名称を示す。

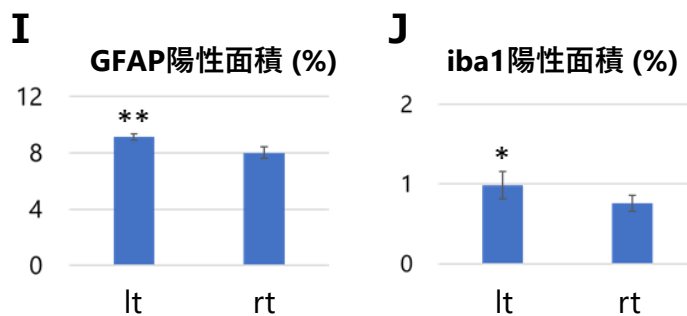
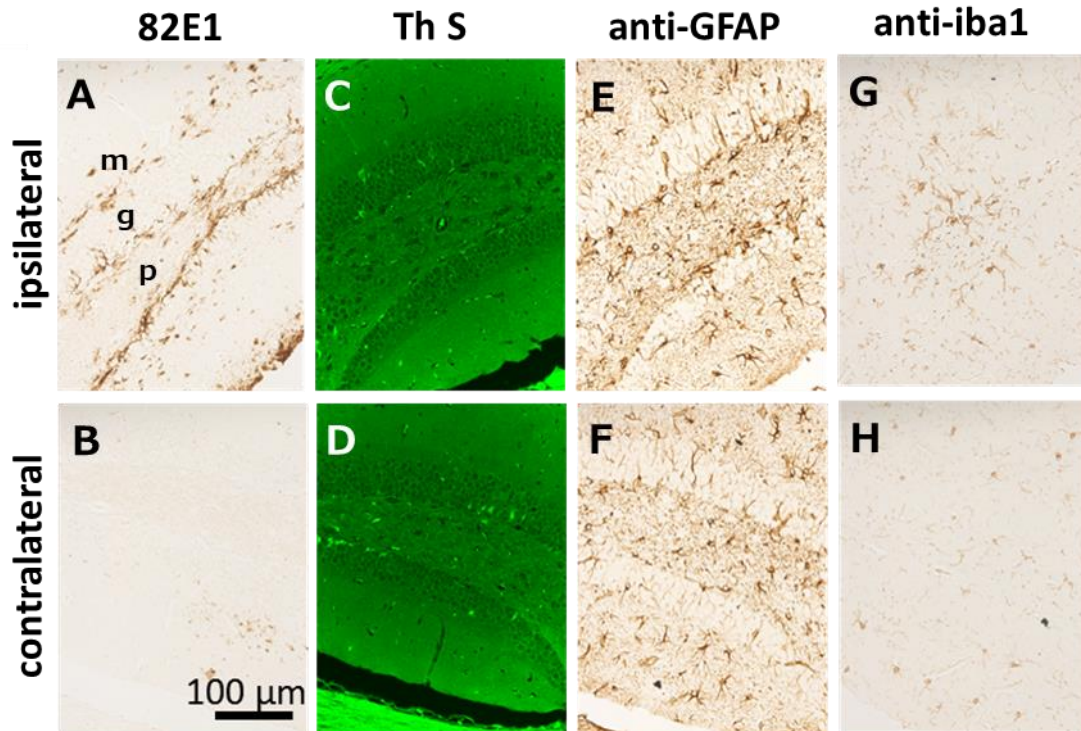


図16. Peak 1 A β 接種によって誘発されるA β 蓄積の周囲の変化

Peak 1 A β を9-10ヶ月齢のAPP tg脳海馬に接種し4ヶ月インキュベーションした後、歯状回に誘発されたA β 蓄積と周囲の変化を示す。

A-B. Peak 1 A β によって顆粒細胞層を縁取るような帯状～dot状A β 蓄積が誘発された。対側には変化を認めなかった。**C-D.** 誘発されるA β 蓄積は、thioflavin S (Th S)染色陰性であった。**E-F.** 抗GFAP抗体で免疫染色すると、A β 蓄積部位に合致して活性化アストロサイトの集簇がみられた。**G-H.** 抗iba1抗体で免疫染色すると、A β 蓄積部位に合致してミクログリアの集簇がみられた。**I.** 海馬のiba1陽性面積 (%)、**J.** GFAP陽性面積 (%) の定量結果。いずれもpeak 1 A β 接種側で有意に増加していた。エラーバー: SE、paired t-test、n=6。 (*; p<0.05, **; p<0.01) (m; 分子層、g; 顆粒細胞層、p; 多形細胞層)

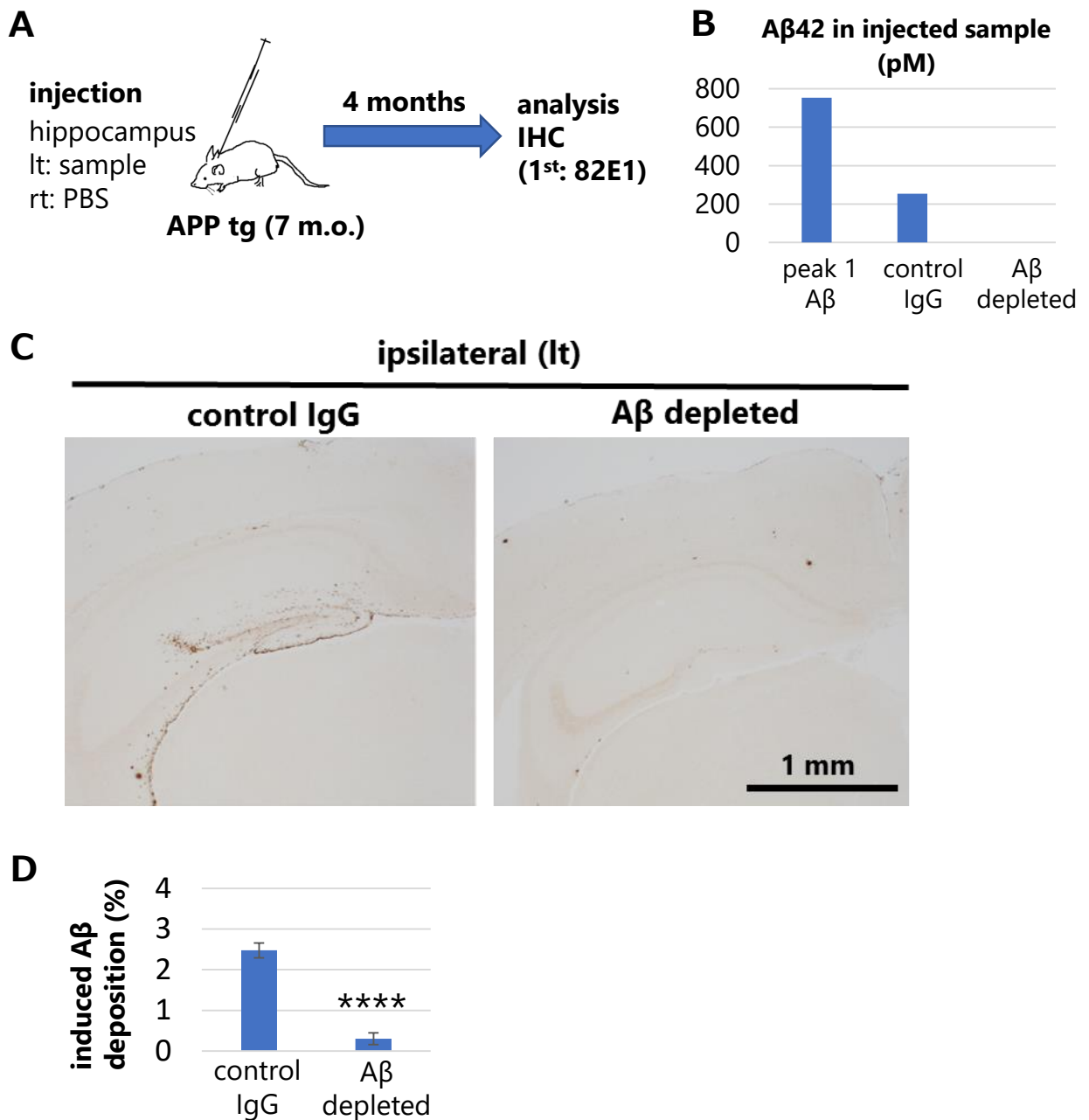


図17. Peak 1 Aβ画分のAβ免疫除去実験

A. 実験のタイムコース。抗Aβ抗体（4G8、BAN50）あるいはコントロール抗体（抗TDP-43抗体）を用いて免疫除去操作を行った。7カ月齢のAPP tg左海馬に各抗体で免疫除去後のpeak 1 Aβを、右海馬にPBSを接種し、4ヶ月インキュベーションし、抗Aβ抗体82E1を用い免疫組織化学的に解析した。**B.** 免疫除去前後のpeak 1 Aβ画分中のAβ42濃度をBNT77/BC05 ELISAで測定した。抗Aβ抗体による免疫除去後は、ELISAの検出感度以下までサンプル中のAβ42濃度が減少した(Aβ-depleted)。コントロール抗体である抗TDP43抗体の免疫除去でも、peak 1 Aβ画分中のAβ濃度は約1/3まで低下した(control IgG)。**C.** サンプル接種側の海馬の抗Aβ抗体82E1による免疫染色像。Aβ免疫除去後のpeak 1 Aβ画分接種では、Aβ蓄積は誘発されず、seed効果がほぼ消失していることが分かる。**D.** 海馬のAβ蓄積面積(%)の定量結果。Aβの免疫除去操作後のpeak 1 Aβ画分を接種された群では、脳内Aβ蓄積面積がコントロール群に比べて有意に減少した。エラーバー: SE、student's t-test、n=4（各個体につき、5スライスのアβ蓄積面積の平均を算出した）。(****; p<0.0001)

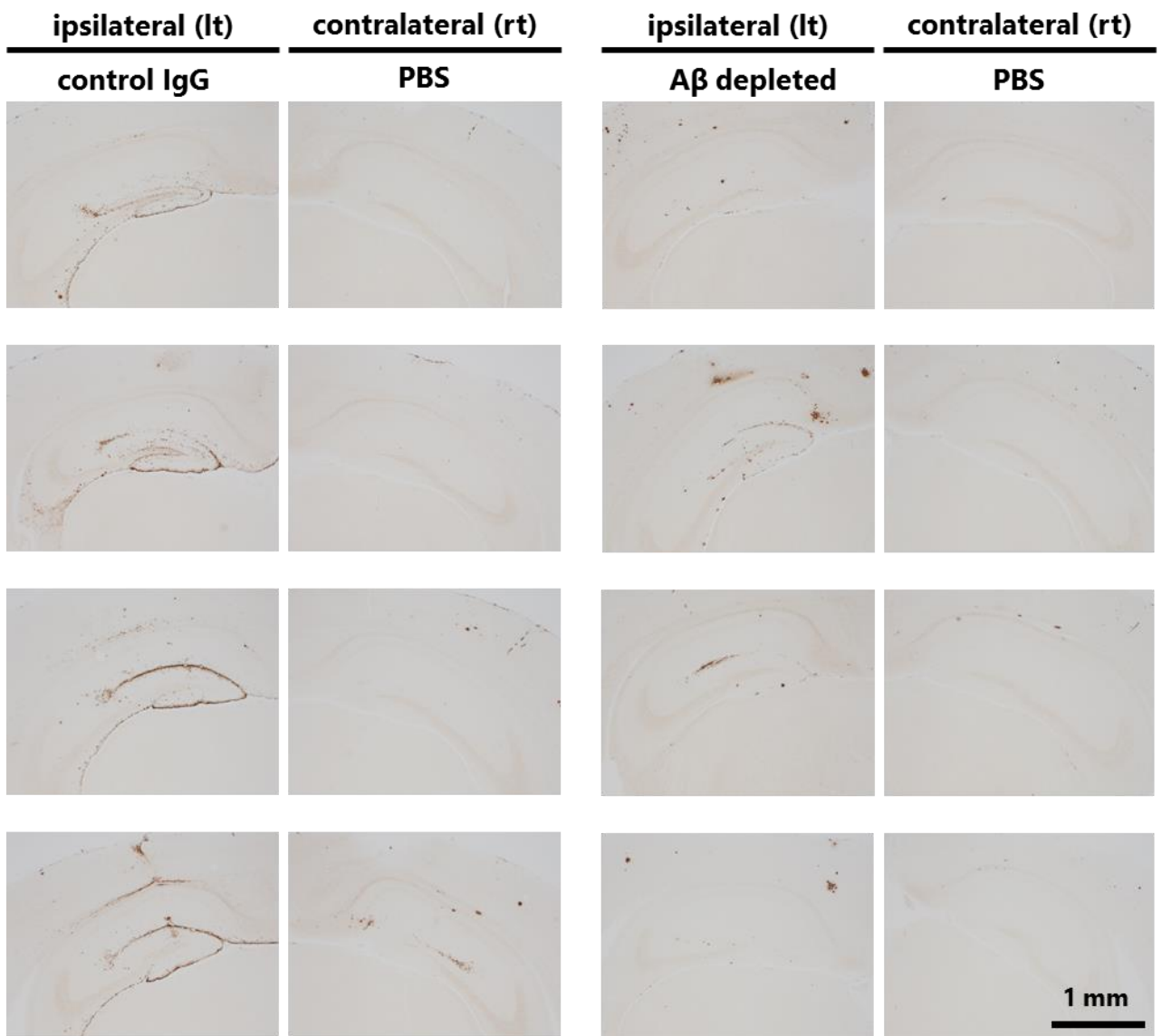


図18. Peak 1 A β 画分のA β 免疫除去実験

コントロール抗体（抗TDP-43抗体）あるいは抗A β 抗体で免疫除去したpeak 1 A β 画分を接種されたAPP tg全個体のA β 蓄積パターンを示す。

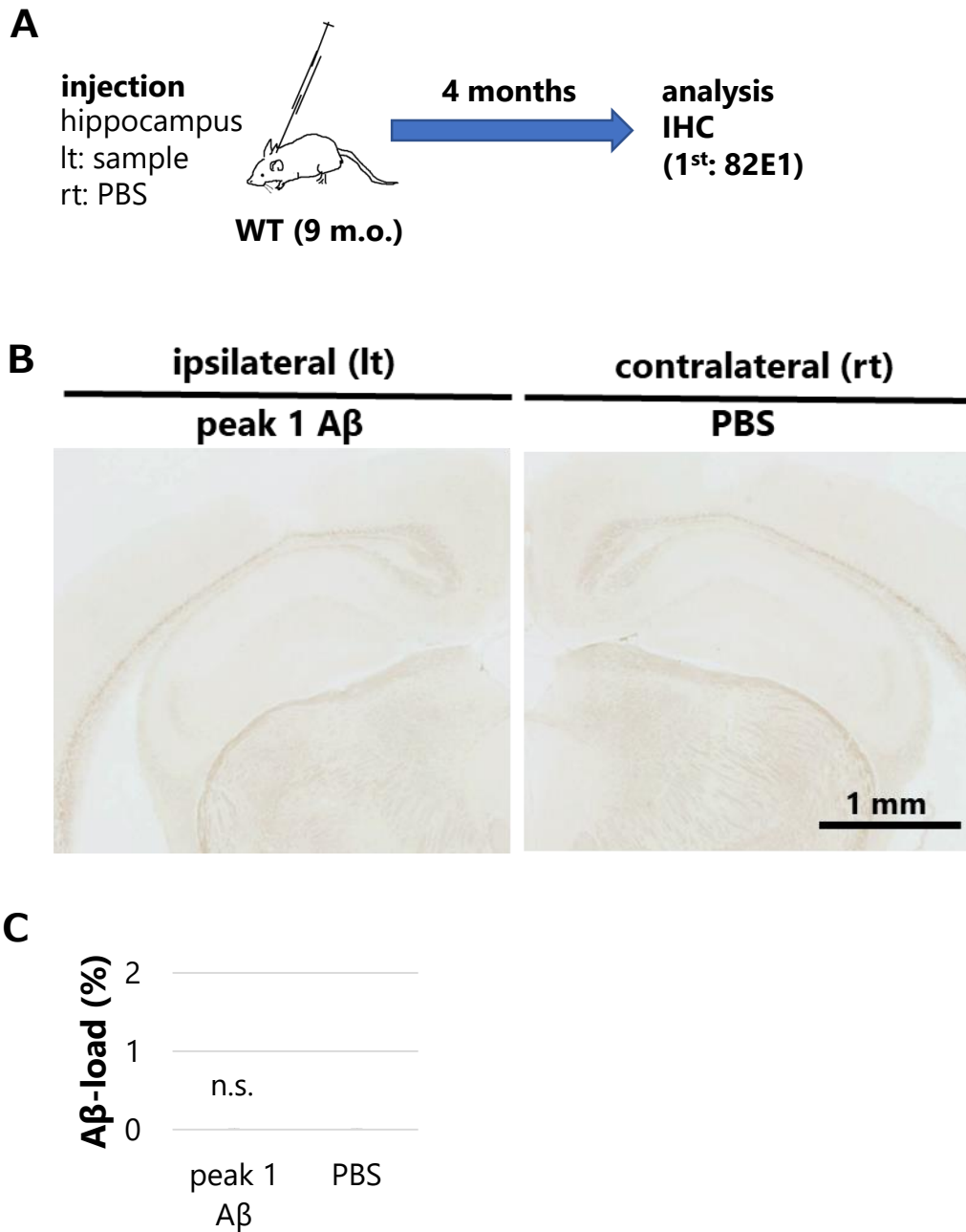


図19. Peak 1 A β 画分の野生型マウス脳へのinjection実験

A. 実験のタイムコース。9カ月齢の野生型マウス(WT)左海馬にpeak 1 A β 画分を、右海馬にPBSを接種し4ヶ月間インキュベーション後に、抗A β 抗体82E1を用い免疫組織化学的に解析した。**B.** 海馬の82E1免疫染色像、**C.** 海馬におけるA β 蓄積面積定量結果。Peak 1 A β 接種の有無にかかわらず、A β 蓄積をほとんど認めず、左右のA β 蓄積面積に有意差なし。エラーバー: SE、paired t-test、n=4 (各個体につき、5スライスのA β 蓄積面積の平均を算出した)。p=0.40。(n.s.; not significant)

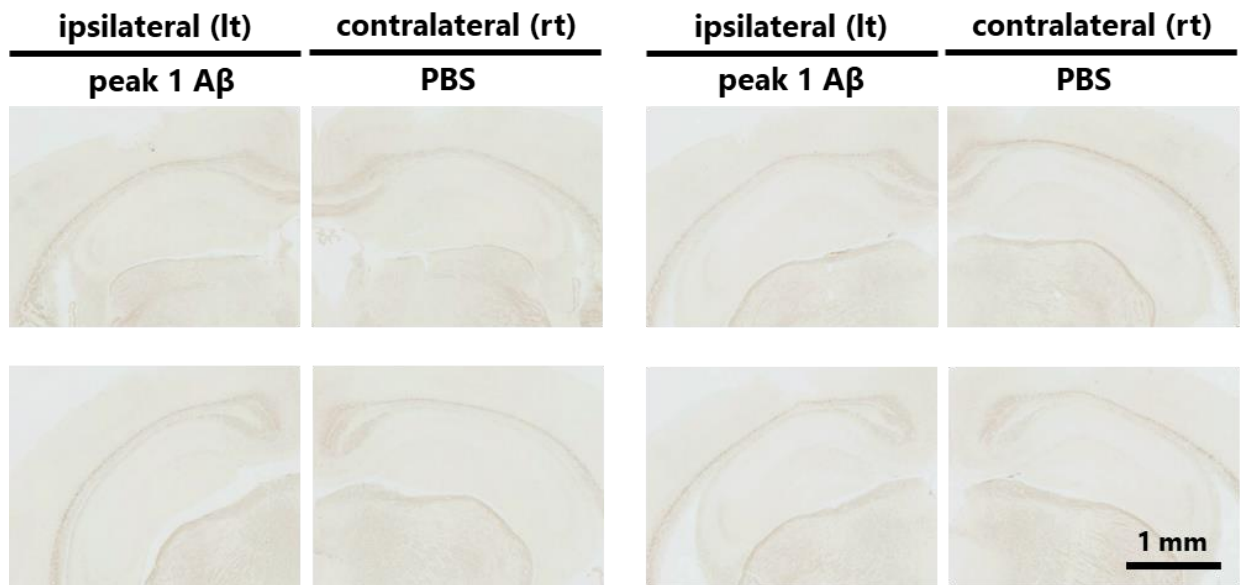


図20. Peak 1 A β 画分の野生型マウス脳へのinjection実験

Peak 1 A β 画分を接種された野生型マウス全個体のA β 蓄積パターンを示す。

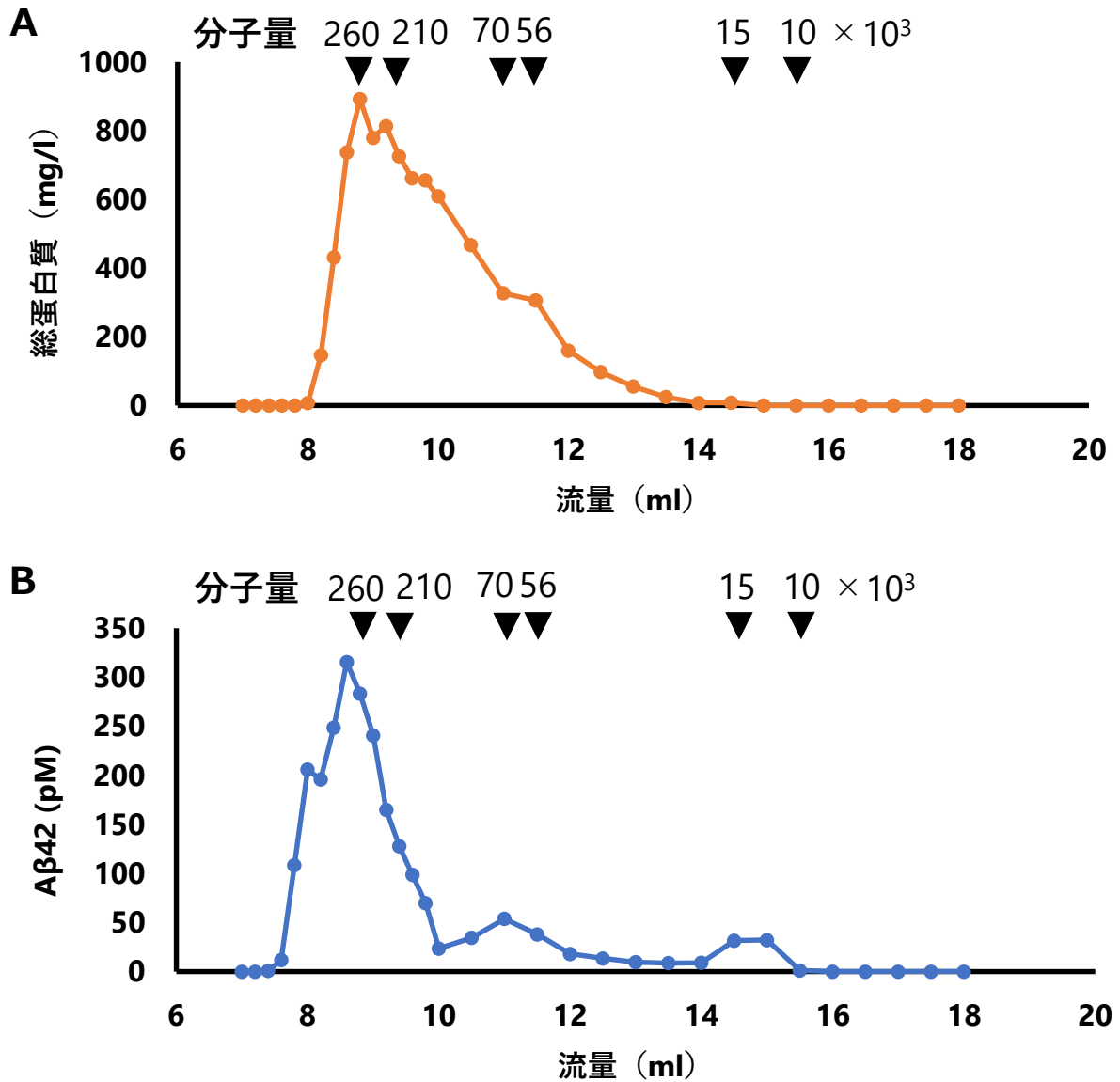


図21. 高齢APP tg脳TBS画分ゲルろ過フラクション中に含まれる蛋白質量の測定
 18ヶ月齢以上のAPP tg脳のTBS可溶画分をゲルろ過クロマトグラフィーで分離した。**A.** 分離後の各フラクション中に含まれる蛋白質濃度をBCA法で測定した。**B.** 分離後の各フラクション中に含まれるAβ42濃度をBNT77/BC05 ELISAで測定した。各フラクションの容量は200 μlである。上に示した分子量は、分子量マーカーの溶出流量から計算した値である。

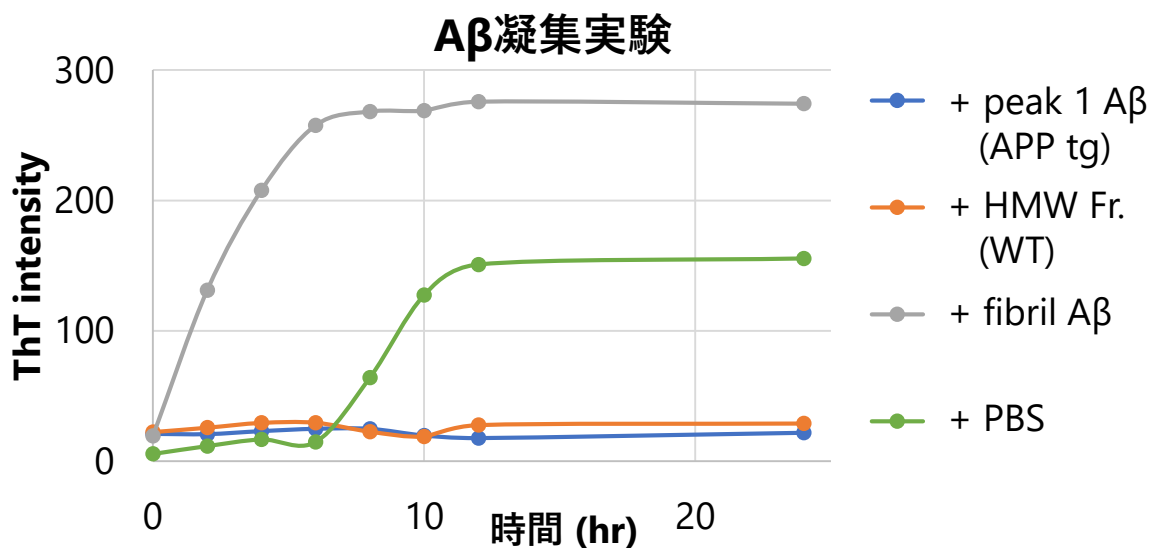


図22. *In vitro*でpeak 1 A β がA β 線維化に及ぼす影響の検討

合成A β 40ペプチドを用いたthioflavin T (ThT)アッセイを行った。0.2 mg/mLに調整した合成A β 40ペプチドに、あらかじめ調整したseedもしくはPBSを加えて、0、4、6、8、10、12、24時間インキュベーションし、ThTアッセイで線維化の程度を評価した。seed分子を加えないと、インキュベーション開始の約6時間後にnucleation phaseが終了し速やかな線維化が起こり、10~12時間後に線維化がプラトーに達する。A β seedのポジティブコントロールとして線維化A β (fibril A β) を添加すると、nucleation phaseがほぼ消失し、速やかにA β ペプチドの線維化が促進した。APP tg脳由来のpeak 1 A β 画分 (peak 1 A β Fr.)、野生型マウス脳由来のpeak 1 A β と相同の高分子量の画分 (WT HMW Fr.) を添加すると、A β 凝集がnucleation phaseで抑制され、24時間インキュベーションしてもA β の線維化が起こらなかった。

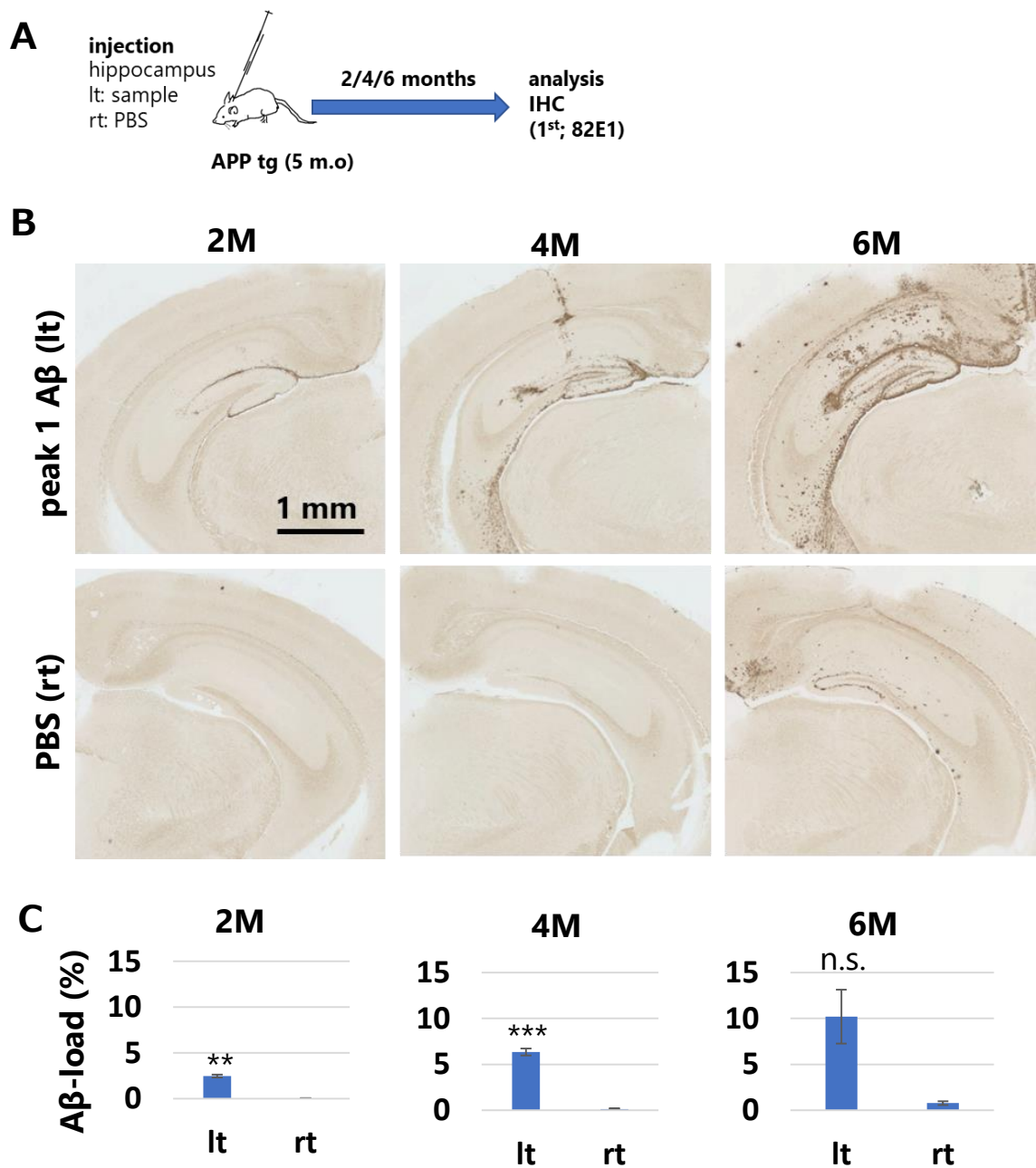


図23. Peak 1 A β 接種後の脳内A β 蓄積の経時的変化

A. 実験のタイムコース。5カ月齢APP tg左海馬にpeak 1 A β 画分を、右海馬にPBSをインジェクションし、手術後2、4、6ヶ月後に、抗A β 抗体82E1を用いて免疫組織化学的に脳内A β 蓄積パターンを解析した。**B.** Peak 1 A β 接種側では、接種後2ヶ月の時点ではインジェクション部位に限局した帯状のA β 蓄積がみられた。蓄積面積は経時的に増加し、6ヶ月後には左側海馬～皮質の広い範囲、対側海馬の一部にA β 蓄積が広がっていた。**C.** 海馬のA β 蓄積面積の定量結果。接種後2～4ヶ月では、peak 1 A β 接種側で有意にA β 蓄積面積が増加していた。接種6ヶ月後には有意差はつかないもののpeak 1 A β 接種側でA β 蓄積が増加傾向にあった ($p=0.06$)。エラーバー; SE, paired t-test, $n=3$ (2M), $n=4$ (4M, 6M) (各個体につき、5スライスのA β 蓄積面積の平均を算出した)。(**; $p<0.01$, ***; $p<0.001$, n.s.; not significant)

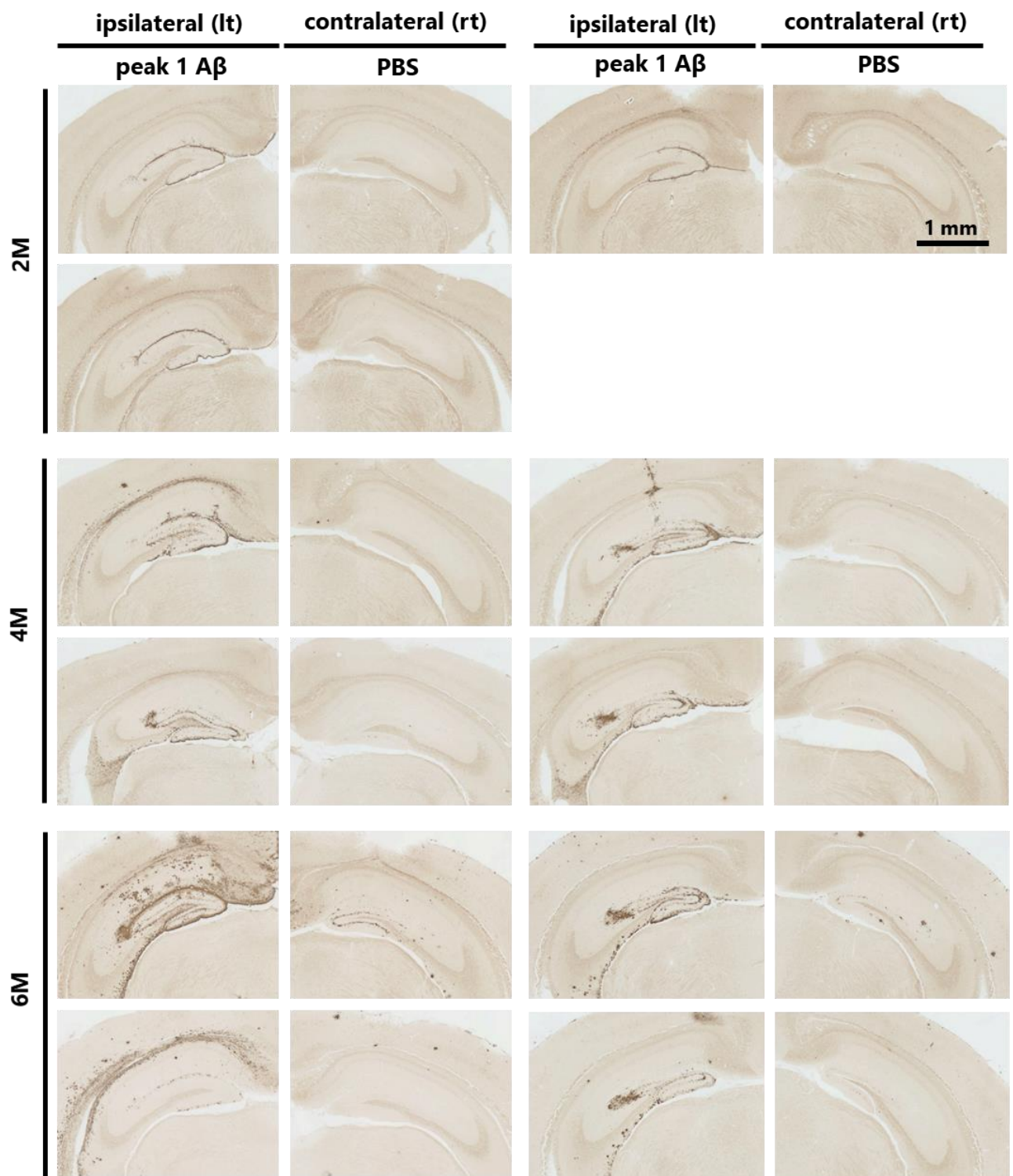


図24. Peak 1 A β 接種後の脳内A β 蓄積の経時的変化

左海馬にpeak 1 A β 画分、右海馬にPBSをインジェクションし、2、4、6ヶ月インキュベートしたAPP tg全個体の、脳内A β 蓄積パターンを示す。

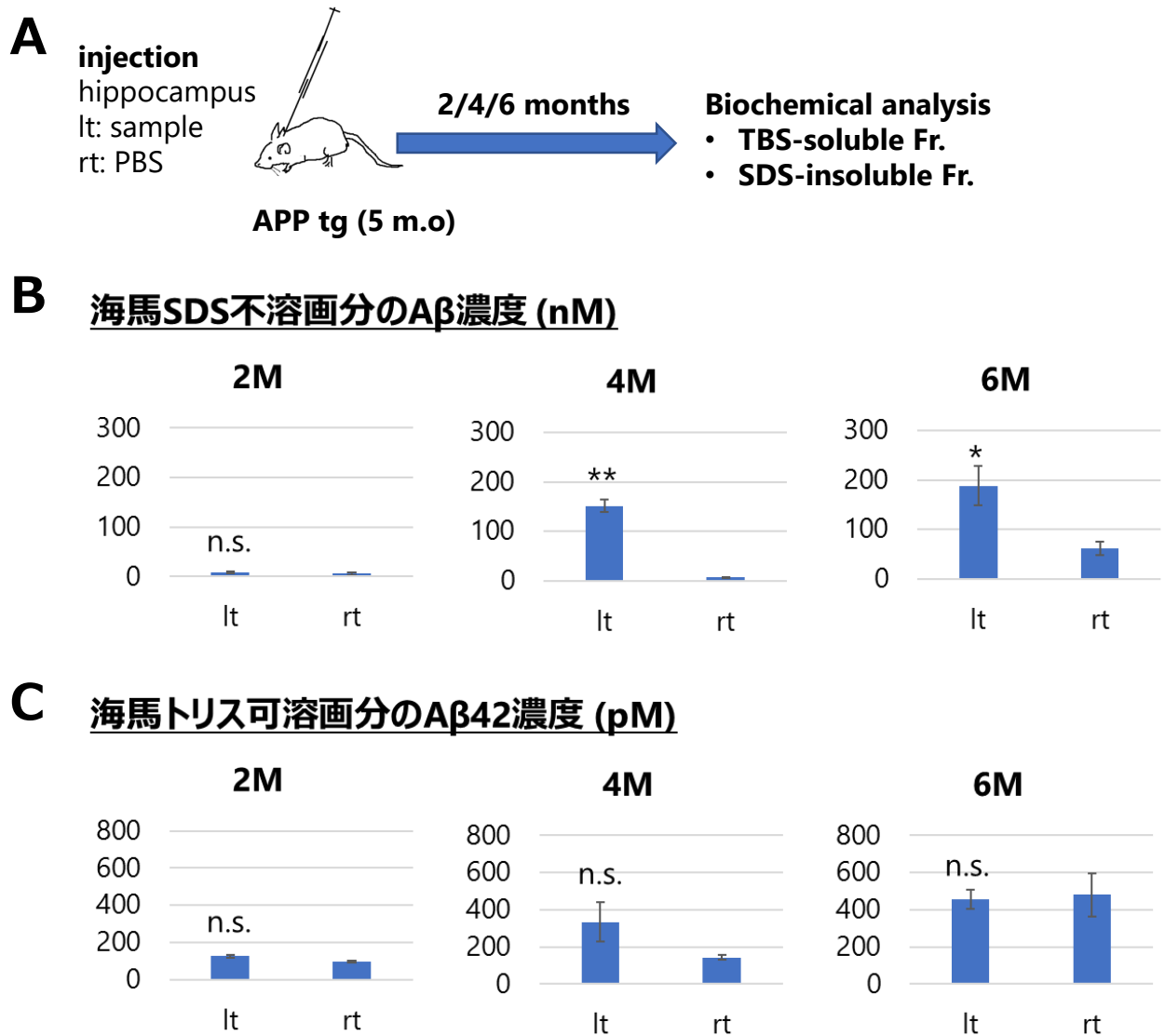


図25. Peak 1 Aβ接種後の脳内可溶Aβ量と不溶Aβ量の経時的な変化

A. 実験のタイムコース。5カ月齢APP tg左海馬にpeak 1 Aβ画分を、右海馬にPBSをインジェクションし、手術の2、4、6ヶ月後に海馬を回収し、4段階抽出した後、TBS画分とSDS不溶画分（ギ酸画分）のAβ42量をBNT77/BC05 ELISAで測定した。**B.** 海馬SDS不溶画分中のAβ42濃度。Peak 1 Aβ接種2ヶ月後、接種側と対側で海馬に含まれるSDS不溶なAβ42量に差を認めなかった ($p=0.26$)。4～6ヶ月後には、peak 1 Aβ接種側でSDS不溶なAβ42量が有意に増加していた。両側の海馬で、SDS不溶なAβ量が経時的に増加する傾向がみられた。エラーバー; SE、paired t-test、 $n=3$ (2M)、 $n=4$ (4M, 6M)) 。**C.** 海馬TBS画分のAβ42濃度。Peak 1 Aβ接種後、2～6ヶ月の間、接種側海馬と対側海馬に含まれるトリス可溶なAβ量が有意差を認めなかった ($p=0.16$ (2M)、 $p=0.16$ (4M)、 $p=0.88$ (6M))。エラーバー; SE、paired t-test、 $n=3$ (2M)、 $n=4$ (4M, 6M)) 。(*; $p<0.05$, **; $p<0.01$, n.s.; not significant)

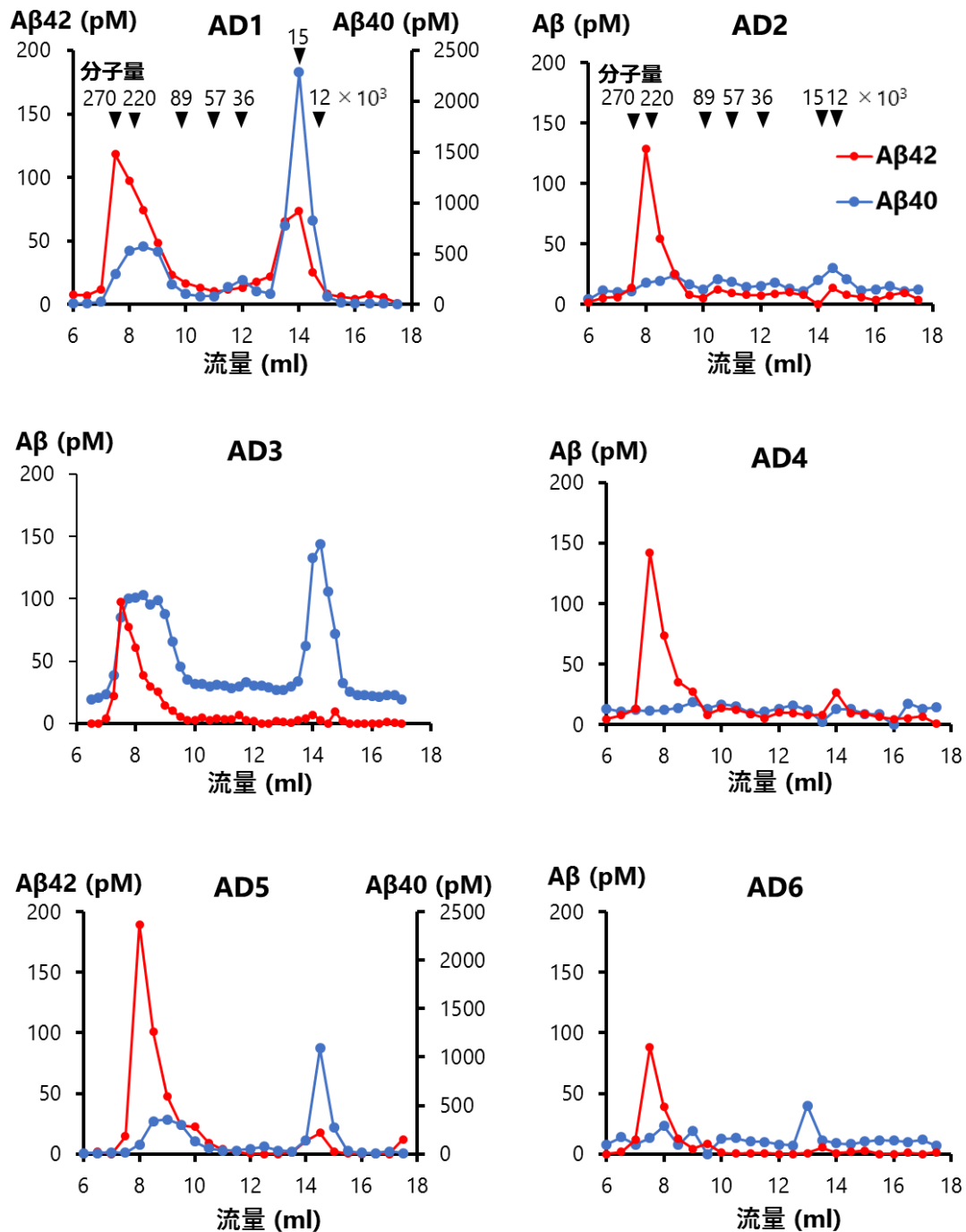


図26. AD脳TBS画分に含まれるAβ分子種の分離

AD脳TBS画分をゲルろ過クロマトグラフィーで分離し、各フラクションをグアニジン処理した後、Aβ42濃度をBNT77/BC05 ELISAで、Aβ40濃度をBNT77/BA27 ELISAでそれぞれ測定した。6例全例で、peak 1 Aβ画分に相当する分子量 200×10^3 以上の画分に、主にAβ42から構成されるAβのピークがみられた。6例中3例でpeak 3 Aβに相当する分子量約 15×10^3 の画分にAβの明瞭なピークがみられた。各Aβピークを構成するAβ40/Aβ42比は症例により大きく異なっていた。

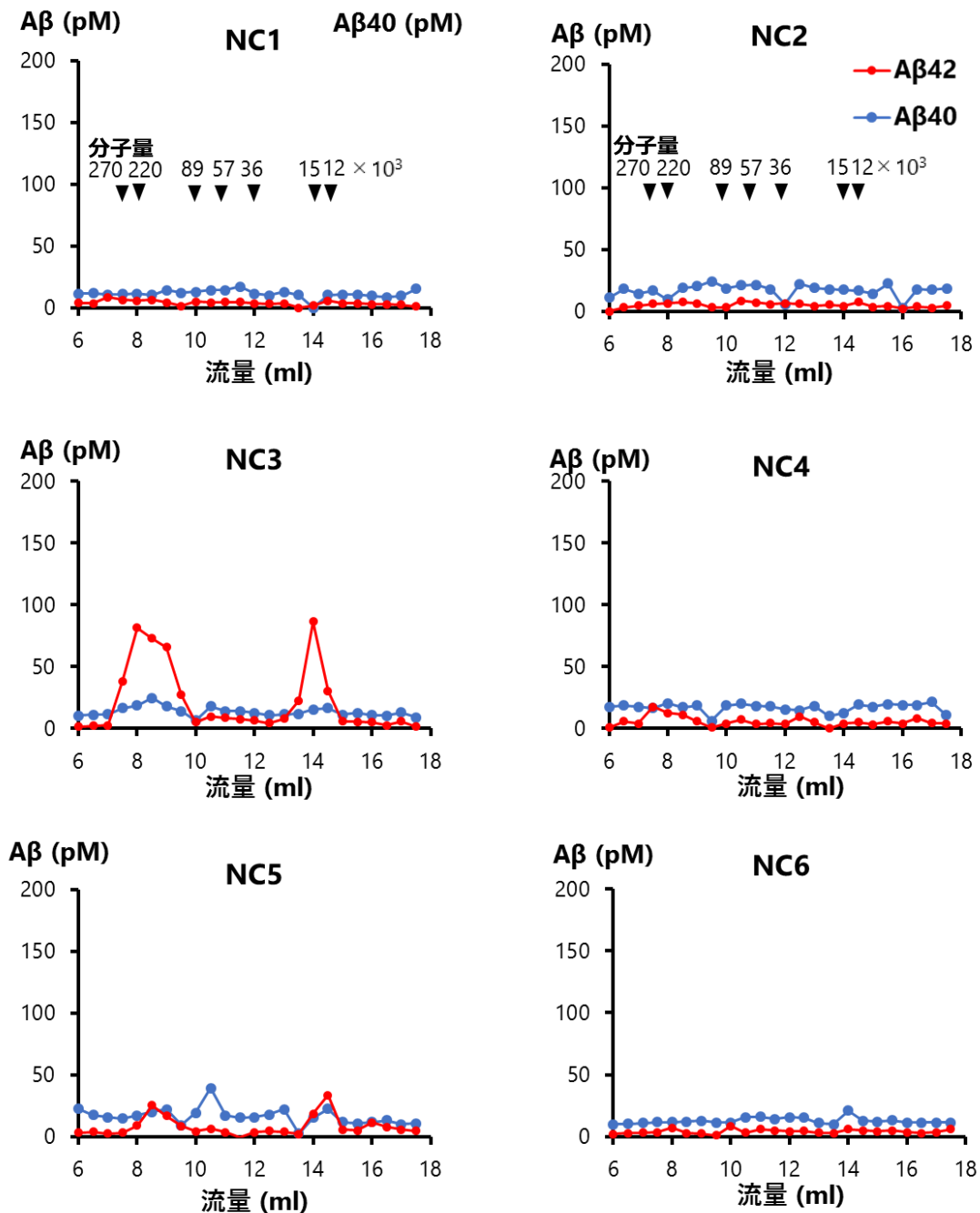


図27. 非AD症例脳TBS画分に含まれるAβ分子種の分離

コントロール (Non-AD control; NC) 症例TBS画分をゲルろ過クロマトグラフィーで分離し、各フラクションをグアニジン処理した後、Aβ42濃度をBNT77/BC05 ELISAで、Aβ40濃度をBNT77/BA27 ELISAで測定した。6例中1例 (NC3) のみで、分子量200-300 × 10³の画分と約15 × 10³の画分にAβのピークを認めた。他の5症例では、明瞭なAβのピークは認めなかった。

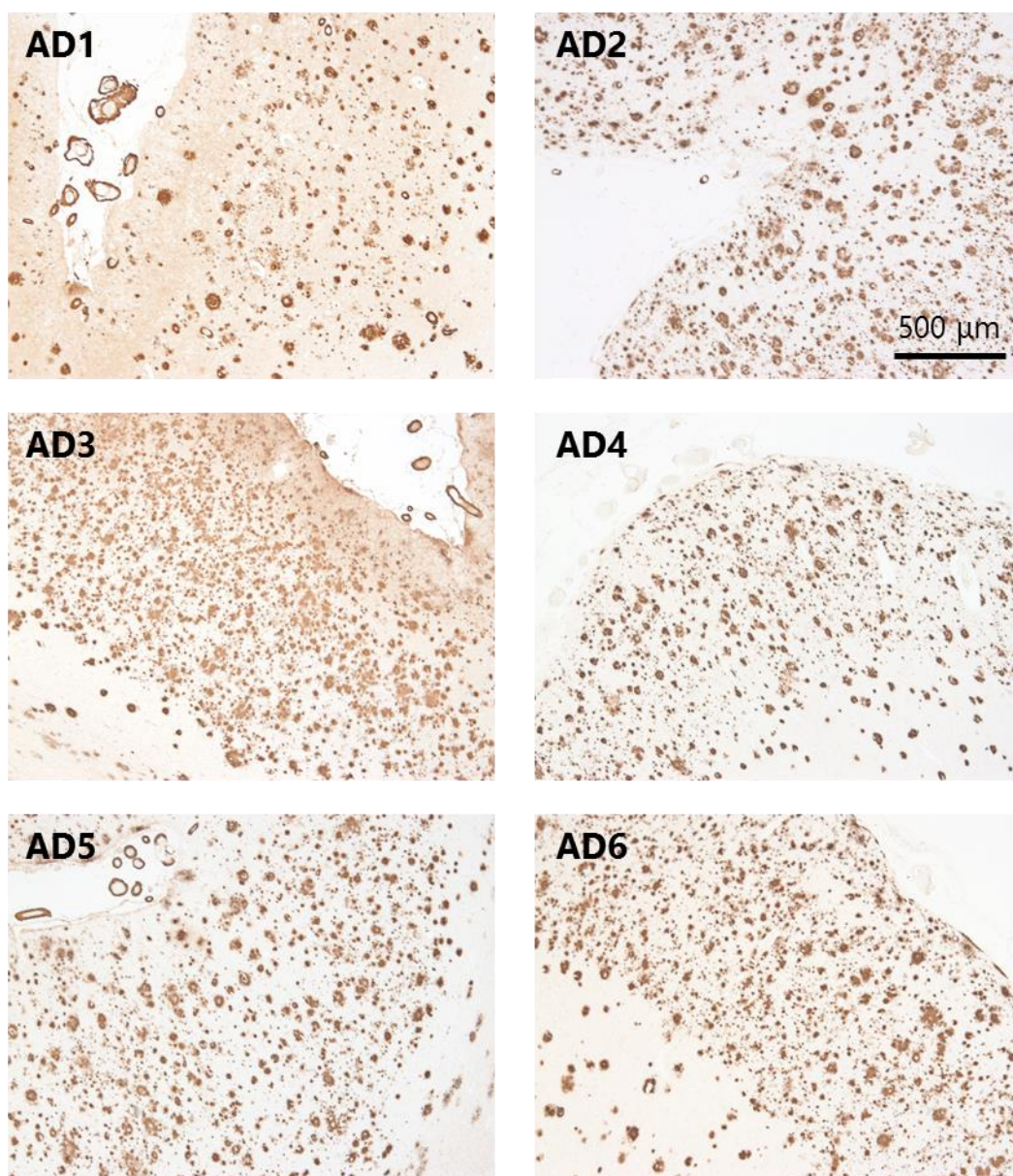


図28. AD脳のアβ蓄積パターンの比較—全体像

AD脳パラフィン切片を抗Aβ抗体82E1を用いて免疫染色した。
 いずれの症例も顕著なβ-アミロイドーシスを認める。

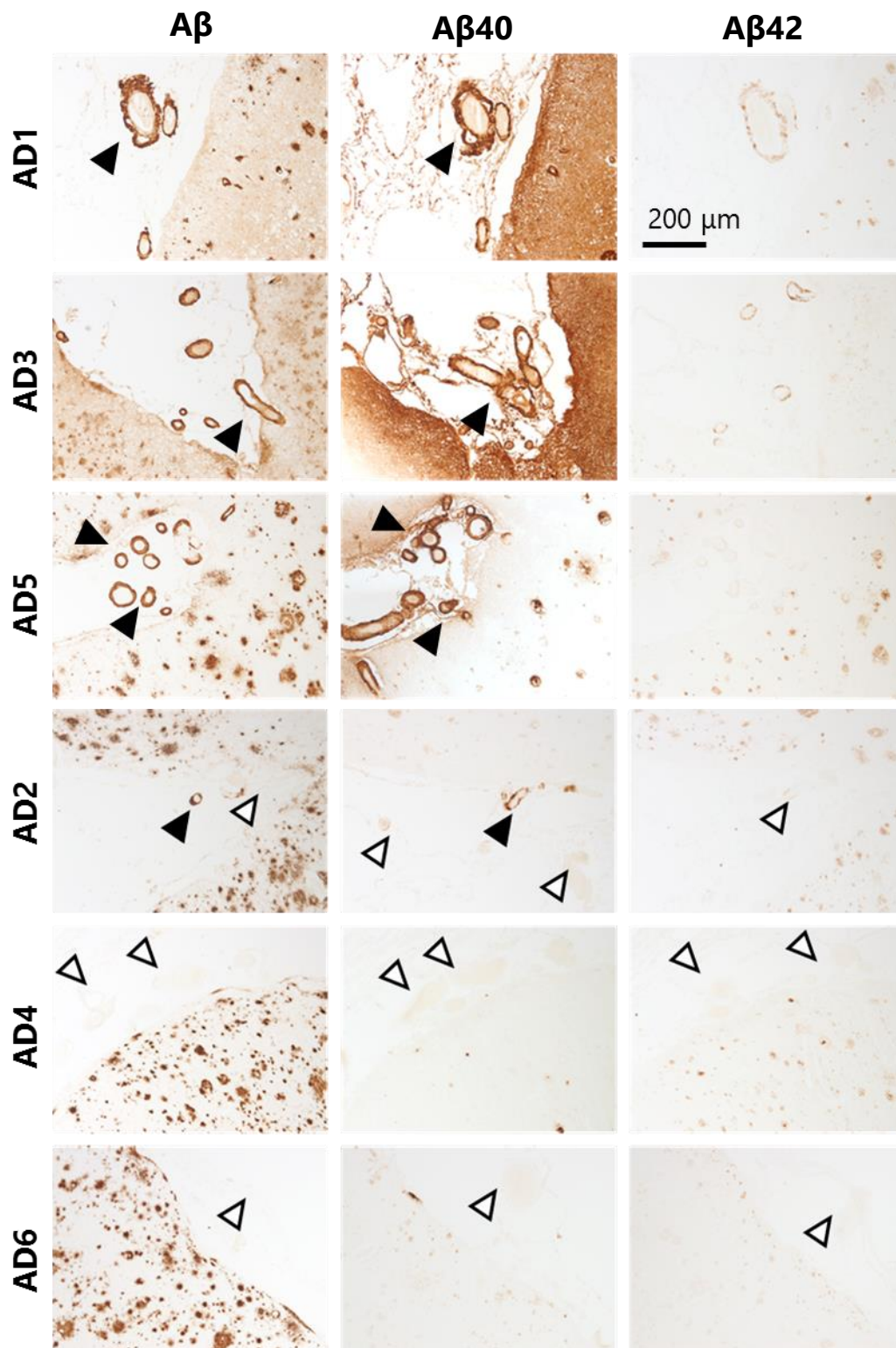


図29. AD脳のA β 蓄積パターンの比較—アミロイドアンギオパチー

AD脳パラフィン切片を抗A β 抗体82E1、抗A β 40抗体BA27、抗A β 42抗体BC05を用いて免疫染色した。軟膜下の血管部分の写真を示す。AD1、AD3、AD5では、軟膜下の大部分の血管の壁に、82E1、BA27陽性を示す多量のA β 40蓄積を認められた（黒矢頭）。AD2では、血管壁の一部にA β 40主体のA β 蓄積を認められたが（黒矢頭）、大部分の血管はA β 蓄積を認めなかった（白矢頭）。AD4、AD6では、ほとんどの血管にA β 蓄積を認められた（白矢頭）。

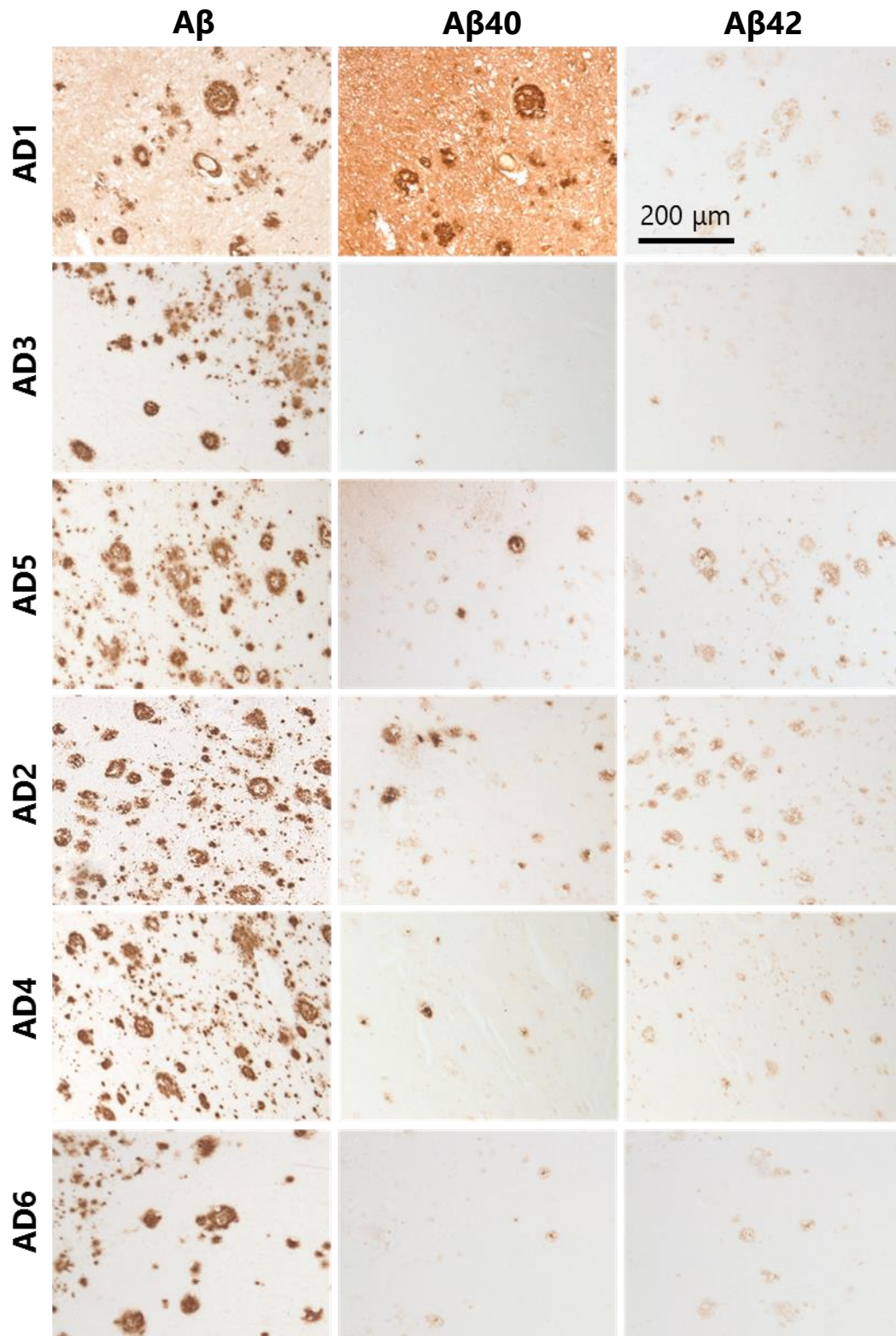


図30. AD脳のア β 蓄積パターンの比較—脳皮質アミロイド斑

AD脳パラフィン切片を抗A β 抗体82E1、抗A β 40抗体BA27、抗A β 42抗体BC05を用いて免疫染色した。脳皮質の写真を示す。AD1～AD6のいずれの症例も、多数の老人斑の形成がみられた。いずれの症例でも diffuse plaque と、コンパクトで中心にコアのある形状の neuritic plaque が混在していた。AD1では大部分の老人斑が強く BA27陽性なのが特徴的であった。その他の症例では、A β 40はコアのあるコンパクトな斑に、A β 42は diffuse な斑とコンパクトな斑の両方に局在する傾向があった。各症例の老人斑の形態や蓄積する A β 40/42 比に、明らかな差はみられなかった。

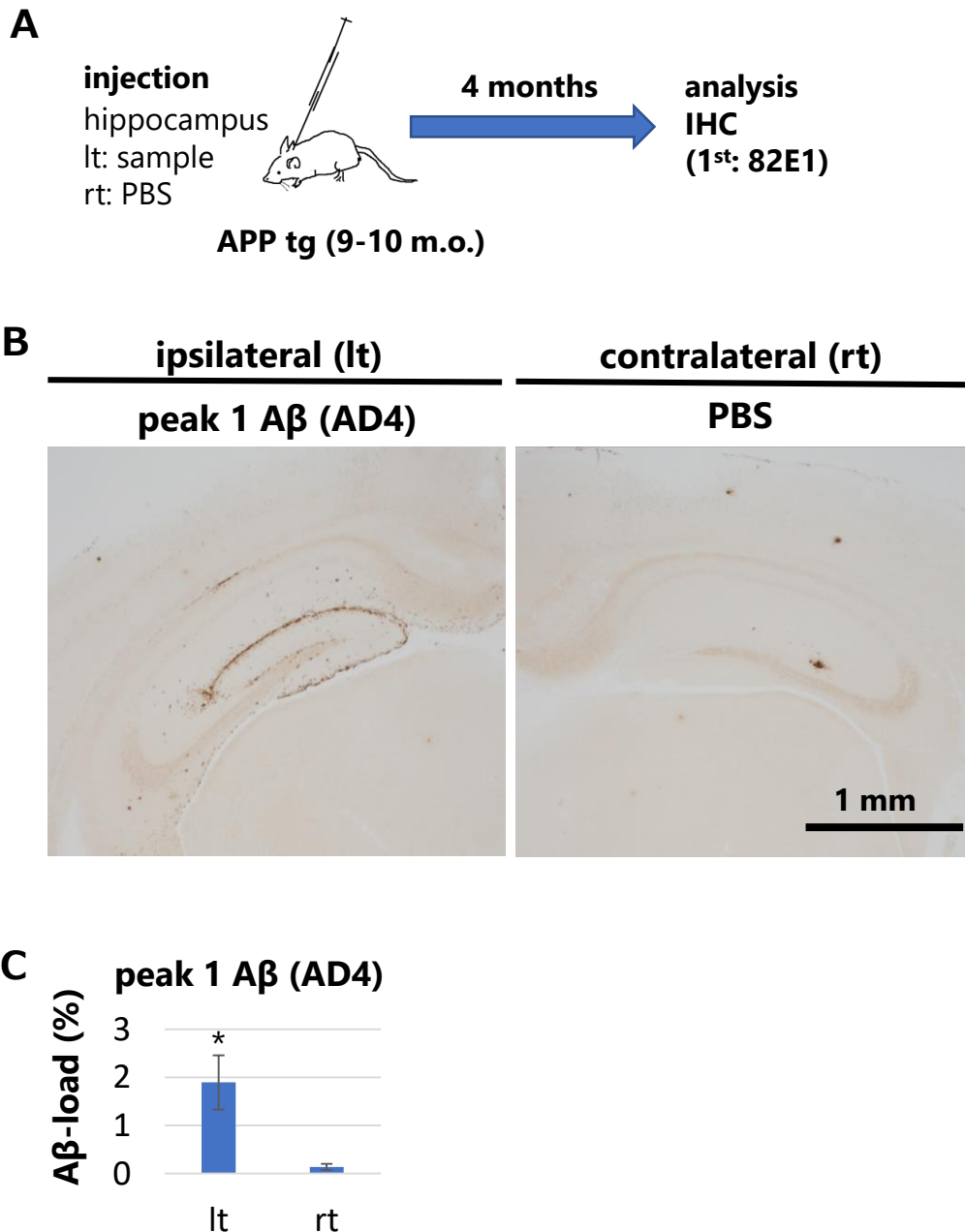


図31. AD脳由来peak 1 A β 分子種のseed効果の解析

A. 実験のタイムコース。9-10ヶ月齢のAPP tg脳の左海馬に、ヒト脳TBS可溶画分由来のサンプルを、右海馬にPBSを接種し、4ヶ月後に脳内のA β 蓄積形態を免疫組織化学的に評価した。**B.** AD4由来のpeak 1 A β 画分を接種したAPP tgでは、接種側の海馬歯状回の分子層に限局して、線状～dot状のA β 蓄積が誘発された。**C.** 海馬のA β 蓄積面積(%)の定量結果。peak 1 A β 接種側でA β 蓄積面積が有意に増加した。エラーバー: SE、paired t-test、n=4 (各個体につき、5スライスのA β 蓄積面積の平均を算出した)。インジェクションサンプル中のA β 濃度 (A β 40/A β 42) は2 pM/130 pM (A β 40濃度をBNT77/BA27 ELISAで、A β 42濃度をBNT77/BC05 ELISAで測定した)。(*; p<0.05)

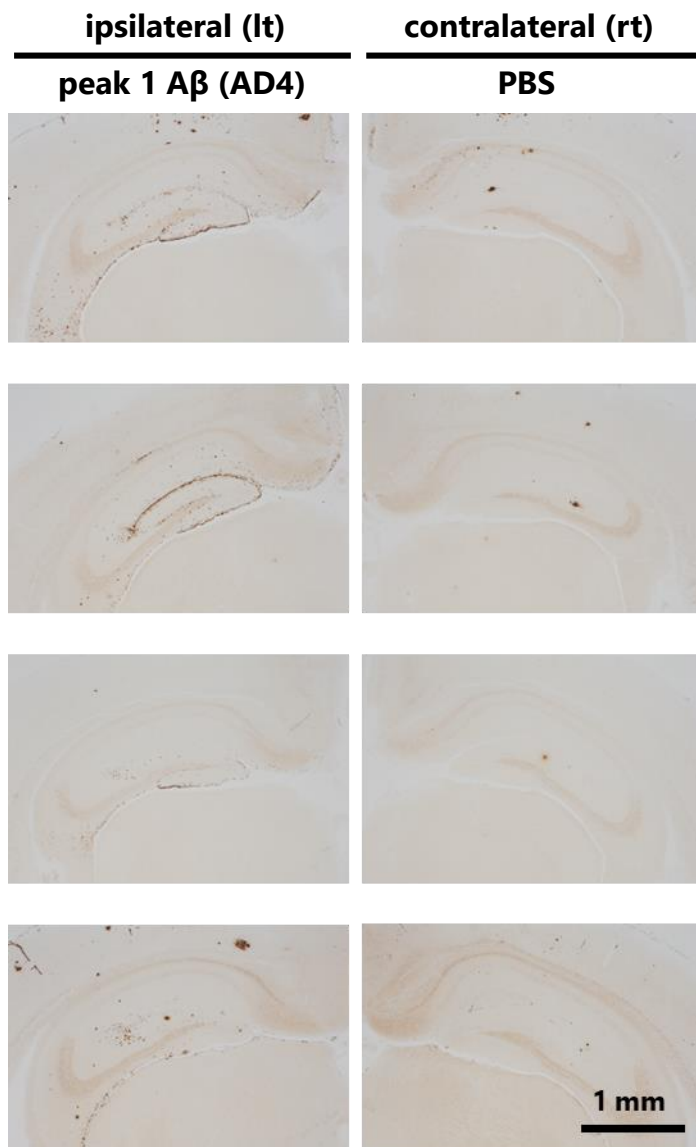


図32. AD脳由来peak 1 A β 分子種のseed効果の解析

A. AD4由来のpeak 1 A β 画分を接種されたAPP tg全個体のA β 蓄積パターンを示す。

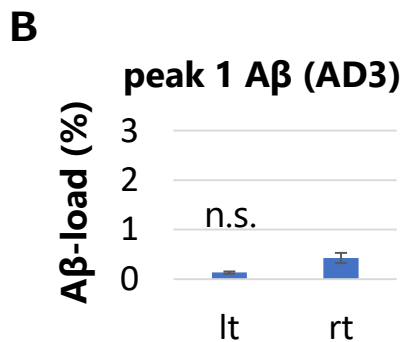
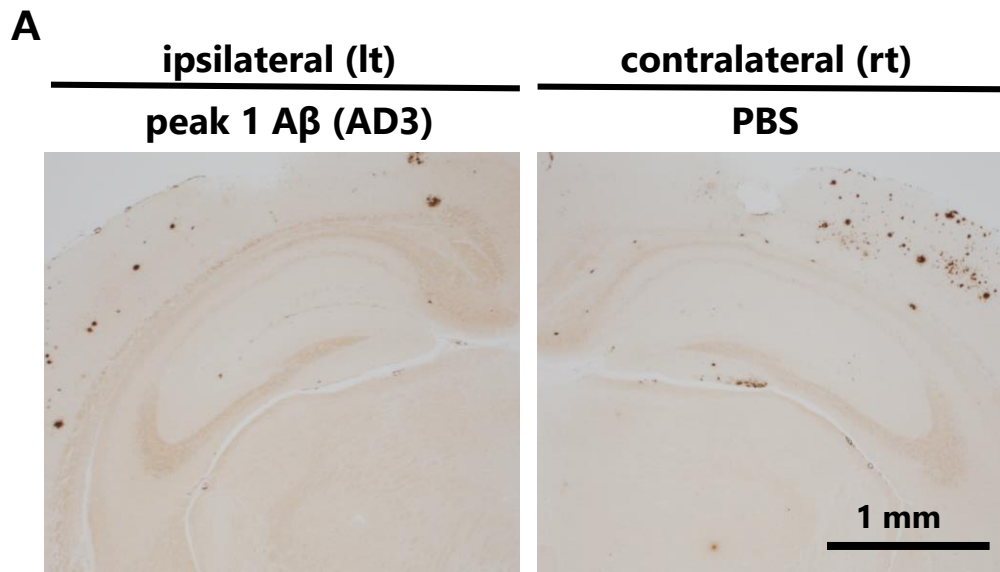


図33. AD脳由来peak 1 A β 分子種のseed効果の解析

A. AD3由来のpeak 1 A β 画分を接種したAPP tgでは、一部の個体で接種側の歯状回で、海馬裂に沿って、ごく微量の線状のA β 蓄積が観察されたが、残り2個体ではA β 蓄積を認めなかった。**B.** 海馬のA β 蓄積面積(%)に左右差はなかった。p=0.09。エラーバー: SE、paired t-test、n=4 (各個体につき、5スライスのA β 蓄積面積の平均を算出した)。インジェクションサンプル中のA β 濃度 (A β 40/A β 42) は38 pM/180 pM (A β 40濃度をBNT77/BA27 ELISAで、A β 42濃度をBNT77/BC05 ELISAで測定した)。(n.s.; not significant)

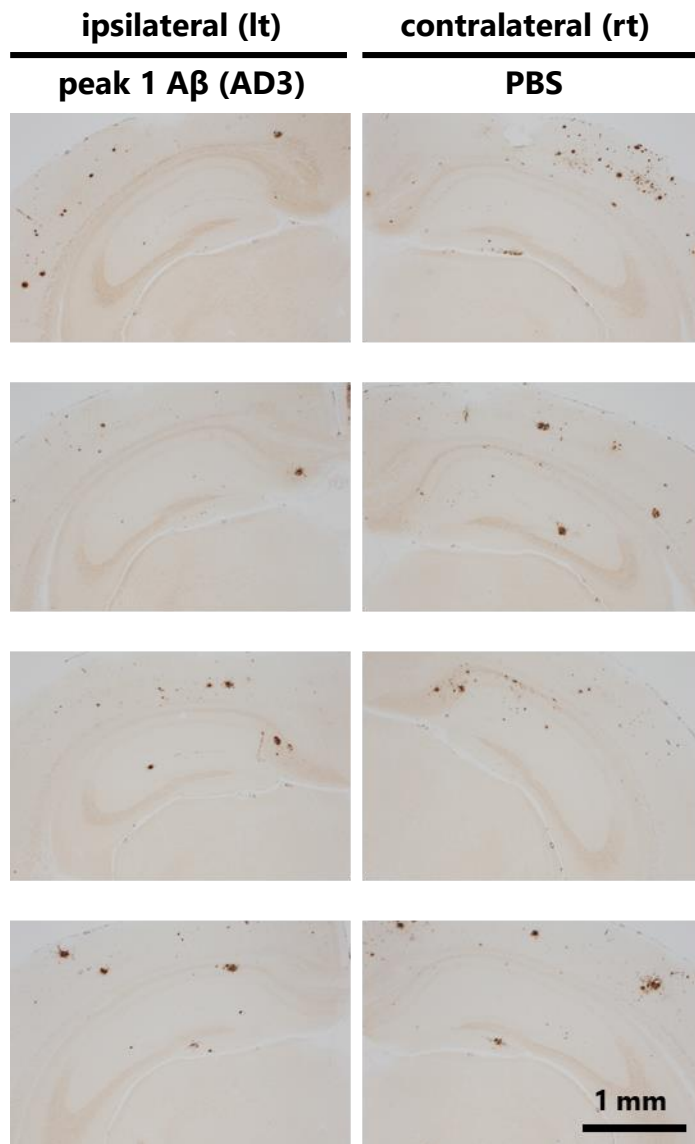


図34. AD脳由来peak 1 A β 分子種のseed効果の解析

A. AD3由来のpeak 1 A β 画分を接種されたAPP tg全個体のA β 蓄積パターンを示す。

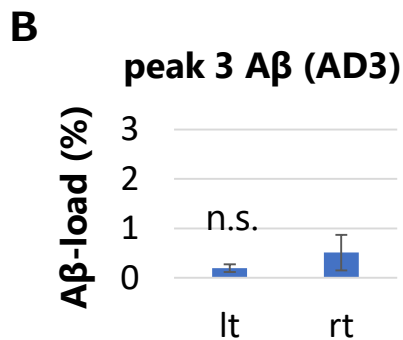
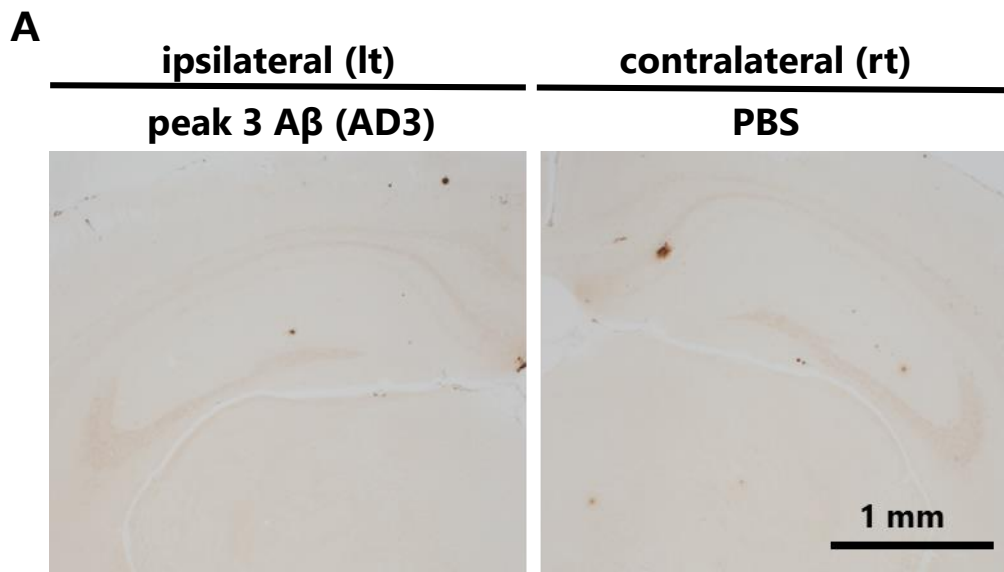


図35. AD脳由来peak 3 A β 分子種のseed効果の解析

A. AD3由来のpeak 3 A β 画分の接種では、A β 蓄積は誘発されなかった。**B.** 海馬のA β 蓄積面積 (%) に左右差を認めなかった。p=0.39。エラーバー: SE、paired t-test、n=4 (各個体につき、5スライスのA β 蓄積面積の平均を算出した)。インジェクションサンプル中のA β 濃度 (A β 40/A β 42) は414 pM/20 pM (A β 40濃度をBNT77/BA27 ELISAで、A β 42濃度をBNT77/BC05 ELISAで測定した)。(n.s.; not significant)

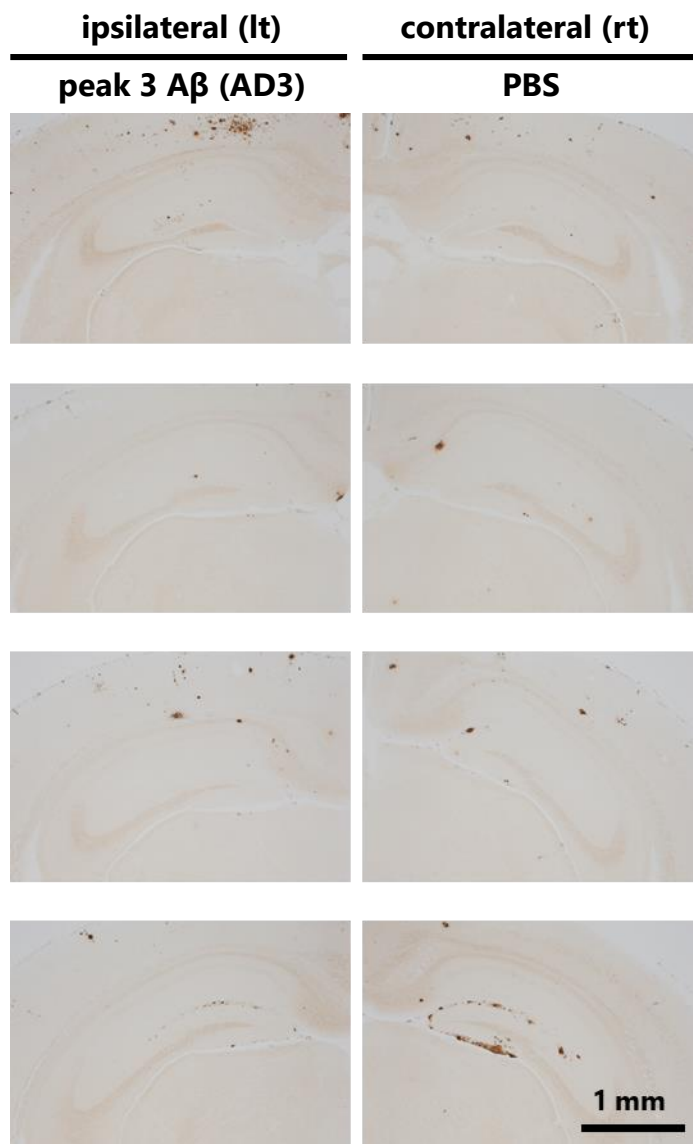


図36. AD脳由来peak 3 A β 分子種のseed効果の解析

A. AD3由来のpeak 3 A β 画分を接種されたAPP tg全個体のA β 蓄積パターンを示す。

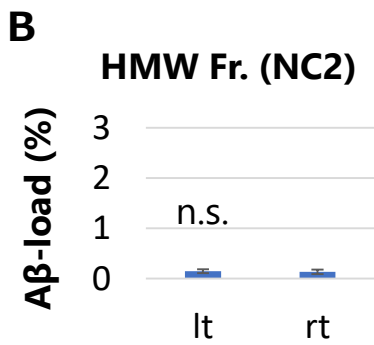
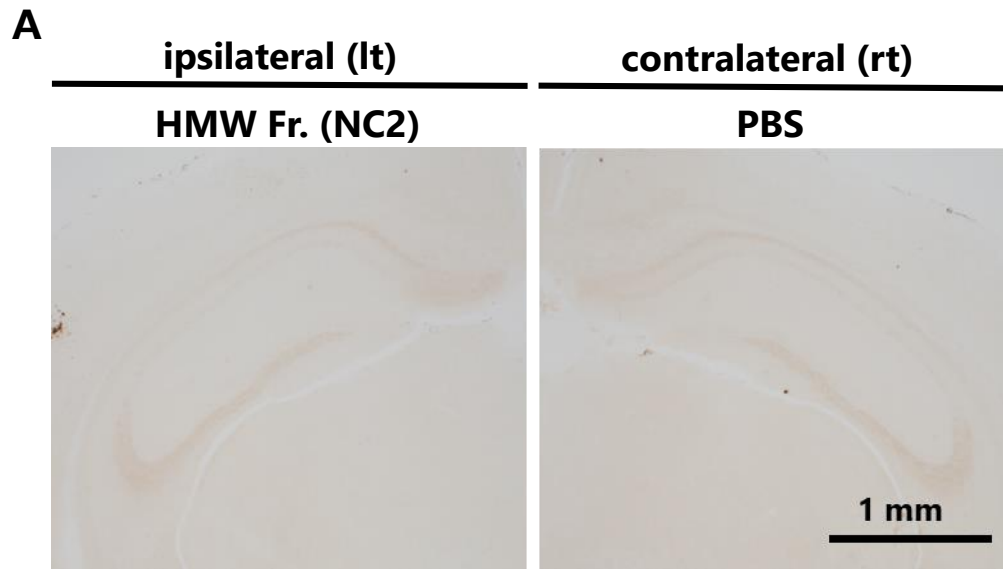


図37. コントロール症例脳由来高分子量画分のseed効果の解析

A. コントロール症例NC2由来の高分子量画分の接種では、Aβ蓄積は誘発されなかった。**B.** 海馬のAβ蓄積面積 (%) に左右差を認めなかった。p=0.63。エラーバー: SE、paired t-test、n=4 (各個体につき、5スライスのAβ蓄積面積の平均を算出した)。(n.s.; not significant)

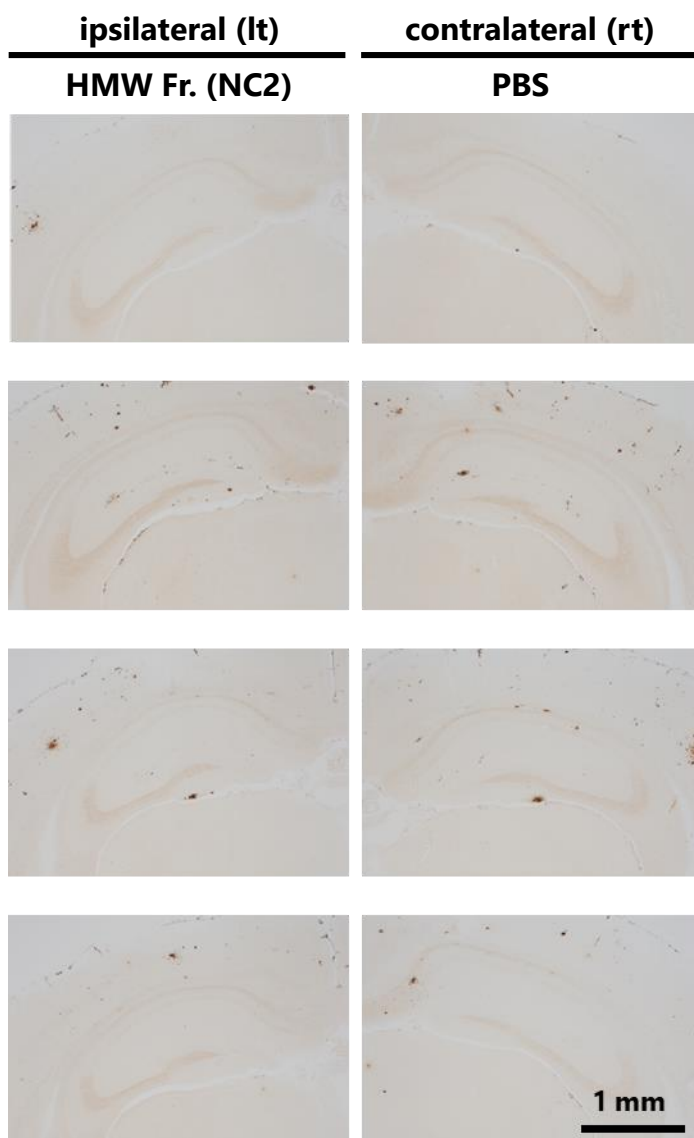


図38.コントロール症例脳由来高分子量画分のseed効果の解析

A. コントロール症例脳由来高分子量画分を接種されたAPP tg全個体のA β 蓄積パターンを示す。

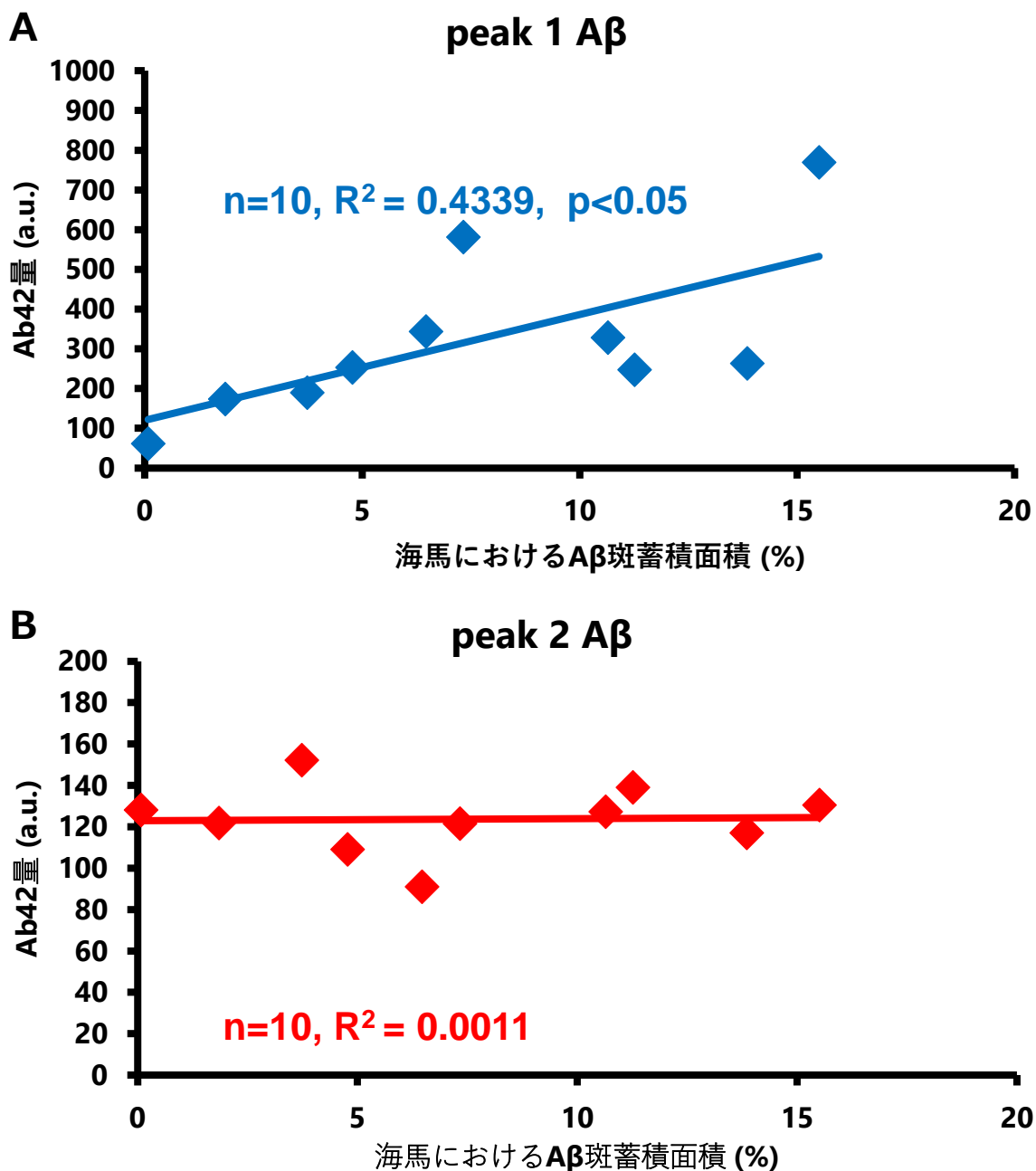


図39. Aβの凝集・蓄積とAD発症 (仲泰史博士論文より引用)

A. アミロイド斑を有する 18-19カ月齢のAPP tg脳峰のpeak 1 Aβ画分中のAβ42量は、海馬におけるアミロイド斑蓄積面積と正の相関があった(n=10, R² = 0.4339, p<0.05)。**B.** 一方peak 2 Aβ画分に含まれるAβ42量は、海馬におけるアミロイド斑蓄積面積比率と相関は無かった(n=10, R² = 0.0011)。

Peak 1 Aβ画分、peak 2 Aβ画分中のAβ量は、APP tg脳TBS画分をゲルろ過クロマトグラフィーで分離後、各フラクションのAβ42濃度をBNT77/BC05 ELISAで測定し、最高点周囲5フラクション間のグラフを積分し求めた。アミロイド斑蓄積面積は抗Aβ抗体82E1を用いた免疫染色により定量した。また、サンプルがn個ある相関関数における、相関係数のp値を出すために、まずExcelのpearson関数で2つのパラメータにおける相関係数(r)を出し、次にt値をとるために $r \times \text{SQRT}(N-2) / \text{SQRT}(1-r^2)$ の式を解き、最後にp値を求めるためにExcelのTDIST関数を用いた。

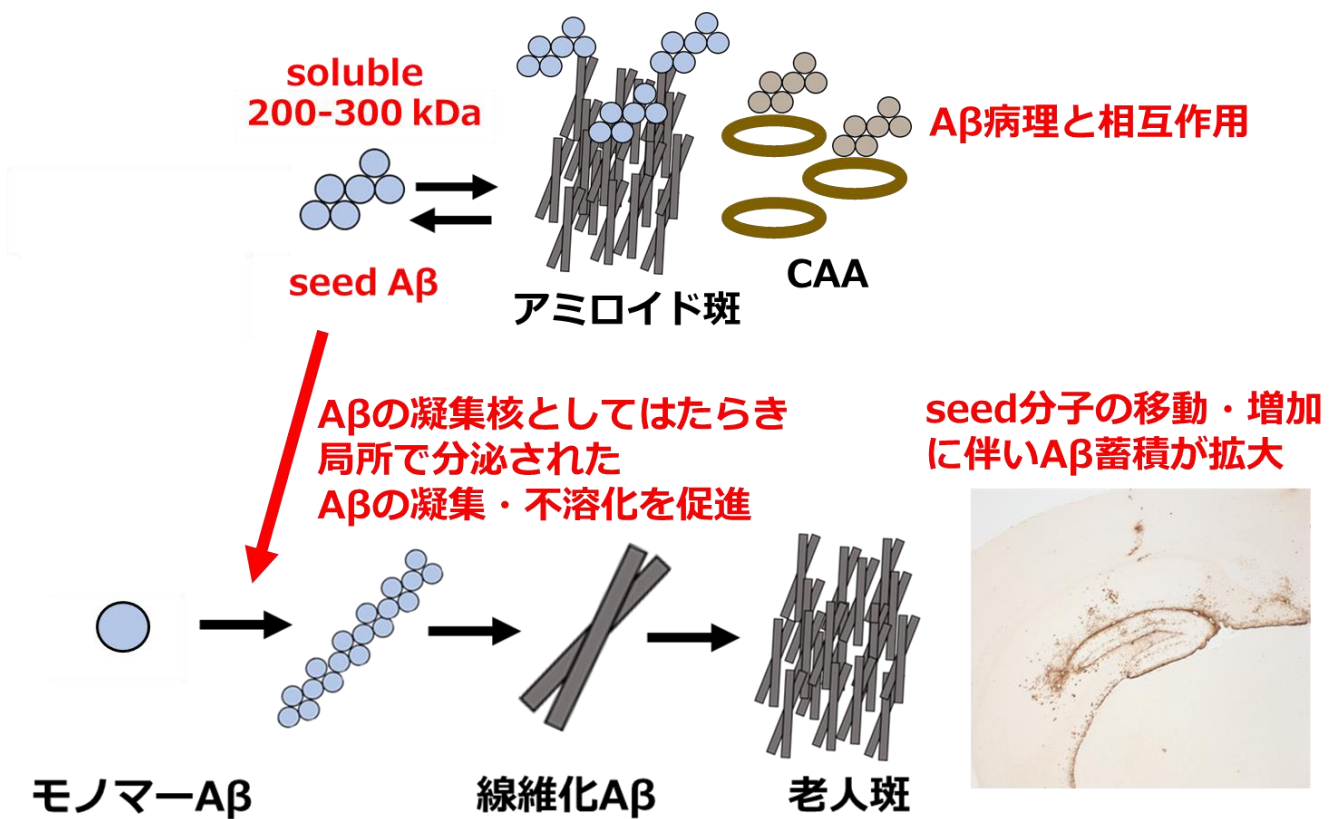


図40. AD発症においてAβ seed分子が果たす役割の考察

本研究では、トリス可溶性分子量 200×10^3 以上の高分子量Aβ分子種が、脳内でAβ蓄積を誘発するseed能を有することを示した。APP tg脳へのpeak 1 Aβ画分接種後の経時的な検討から、このseed分子は、脳内でAβの凝集核として働き、局所で分泌されたモノマーAβの凝集・不溶化を促進する効果があると考えられた。Peak 1 Aβ画分中のAβ分子は脳間質液中に検出されないことや、APP tg脳内アミロイド斑の量とpeak 1 Aβ画分中のAβ42量が正に相関することから、peak 1 Aβ画分中のseed分子はアミロイド斑と相互作用し、蓄積したアミロイド線維の周囲に存在している可能性が示唆された。また、APP tg脳へのpeak 1 Aβ画分接種後に脳内に誘発される特徴的なAβ蓄積パターンや、6カ月にわたりAβ蓄積が拡大し続けることから、Aβ seed分子のseed能が長期間保持される可能性や、アミロイド斑蓄積増加に伴いseed分子が増加しながら、解剖学的構造に沿って脳内を拡大する可能性が考えられた。本Aβ seed分子はβ-アミロイドシスの開始と伸展に重要な役割を果たす鍵分子であることが示唆される。

謝辞

本研究遂行にあたり、熱心にご指導いただいた、神経病理学分野の岩坪威 教授、橋本唯史 特任准教授に深い謝意を表します。いつも温かく見守って下さった、人体病理学分野の牛久哲男 教授、深山正久 前教授(現東京大学名誉教授)に感謝いたします。

貴重な剖検脳組織をご供与頂いた、Massachusetts Alzheimer's Disease Research Center の Dr. Matthew P. Frosch と Dr. Bradley T. Hyman、そしてご協力いただいた患者さん並びにそのご家族に深く感謝いたします。

共同研究者である仲泰史 博士には、実験手法や考察方法等、細やかなご指導をいただきました。ありがとうございます。適切な助言や有意義な議論を頂き、いつも研 究生活を支えて下さった、神経病理学分野の皆さまに感謝いたします。

最後に心身ともに支えてくれた家族と友人に深い感謝の意を表します。