

論文の内容の要旨

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

氏名 箱崎 眞結

【序文】

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease; AD) は高齢者の認知症の原因として最も頻度が高い神経変性疾患である。AD 脳の大脳皮質に特徴的な病理学的変化として、アミロイド β ペプチド (amyloid β peptide; $A\beta$) からなる老人斑、リン酸化タウからなる神経原線維変化の2種類の蓄積物と神経細胞死が挙げられる。 $A\beta$ は前駆体タンパク質 APP ($A\beta$ precursor protein) より β -secretase、 γ -secretase の2段階の酵素切断を経て放出されるタンパク質断片である。常染色体優性の家族性 AD 変異では、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、これらの変異が $A\beta$ 産生総量の増加、凝集性の高い $A\beta_{42}$ の産生比率の増加、または $A\beta$ の凝集性増加を引き起こすことが明らかになっている。このような遺伝学的・病理学的知見から、 $A\beta$ の凝集・蓄積が AD 発症最初期におこる原因的变化であるという「アミロイド仮説」が提唱されている。しかし脳内での $A\beta$ 凝集・蓄積過程の分子メカニズムには未だ不明な点が多く、AD 発症機序に即した有効な治療・予防法は未だない。

In vitro において $A\beta$ は凝集核 (seed) 依存的にアミロイド線維を形成することが示されている。*In vivo* においても AD 脳抽出液を AD モデルマウス (ヒト APP トランスジェニックマウス; APP tg) 脳に注入すると $A\beta$ の蓄積が誘発されることから、脳内で $A\beta$ の凝集・蓄積を促す seed 分子の存在が示唆されてきた。このような seed 分子は AD 脳で老人斑の蓄積、即ち β アミロイドーシスの開始と進展に重要な役割を果たすと考えられるが、seed 分子の本態は不明であった。そこで本研究では、AD 脳中で $A\beta$ 蓄積の seed として働く、何らかの構造変化を遂げた可溶性 $A\beta$ 分子種が存在するとの仮説に立脚し、アミロイド斑蓄積を有する APP tg 脳あるいは AD 脳内に存在する seed 分子を同定し、seed 分子が $A\beta$ 蓄積を誘発するメカニズムを解明することを目的として研究を行った。

【方法・結果・考察】

1. APP tg 脳トリソ可溶画分に含まれる $A\beta$ 分子種の解析

脳内で $A\beta$ 蓄積の seed としてはたらく $A\beta$ 分子種を同定するために、脳内に多量のアミロイド斑を有する高齢 APP tg 脳のトリソ可溶画分をゲルろ過クロマトグラフィーにより分離し、各画分の $A\beta$ 濃度を、 $A\beta_{42}$ 特異的な ELISA を用いて測定した。 $A\beta$ は分子量 $200-300 \times 10^3$ 、 $50-60 \times 10^3$ 、 15×10^3 の画分に分画され、それぞれ peak 1 $A\beta$ 画分、peak 2 $A\beta$ 画分、peak 3 $A\beta$ 画分とした。 $A\beta$ オリゴマー特異 ELISA と $A\beta$ オリゴマー特異抗体を用いたドットブロット法で各画分の反応性を検討したところ、peak 1 $A\beta$ 画分中に $A\beta$ オリゴマーが含まれることが

示唆された。また、APP tg 脳トリソ可溶画分の peak 1 A β 画分、peak 2 A β 画分に相当する A β 分子は *in vivo* microdialysis 法を用いて回収した脳間質液中には検出されなかった。

2. APP tg 脳由来トリソ可溶性 A β 分子種が有する seed 能の検討

APP tg 脳トリソ可溶画分から抽出した A β 分子が、*in vivo* で A β 蓄積を誘発する効果、即ち seed 能を評価するため、脳内に A β 蓄積がまだ出現していない 9-10 ヶ月齢の APP tg の左海馬に peak 1 A β 画分、peak 2 A β 画分、あるいは野生型マウス脳由来の分子量 200-300 $\times 10^3$ 画分を注入、右海馬には対照としてリン酸緩衝生理食塩水を注入し、4 ヶ月後に脳内の A β 蓄積を免疫組織化学的に評価した。Peak 1 A β 画分を注入した側の海馬では、歯状回分子層外側の帯状 A β 蓄積や、顆粒細胞層を縁どるような形態の A β 蓄積が観察された。一方、peak 2 A β 画分や野生型マウス脳由来の分子量 200-300 $\times 10^3$ 画分を APP tg 脳に注入しても、A β 蓄積は誘発されなかった。また、peak 1 A β 画分の seed 能は、抗 A β 抗体を用いた免疫除去により消失した。これらの結果は、peak 1 A β 画分に含まれる A β 分子が seed 能を有することを示すと考えた。野生型マウスに peak 1 A β 画分を接種した場合には A β 蓄積は誘発されないことから、seed 効果の発揮にはホストマウスがヒト APP を発現し、ヒト A β が供給されることが必要であると考えた。

3. Peak 1 A β 画分が発揮する seed 能の経時的解析

Peak 1 A β が脳内で A β 蓄積を誘発する機序を解析するため、peak 1 A β 画分接種後の、脳内 A β 存在様式の変化を経時的に検討した。本研究に使用した APP tg 脳では 11 ヶ月齢からアミロイド斑が出現する。アミロイド斑がない状態で、外来性の peak 1 A β 画分の作用によって誘発される A β 蓄積のみを選択的に評価するため、5 ヶ月齢マウス左海馬に peak 1 A β 画分を、右海馬にリン酸緩衝生理食塩水を注入し、2、4、6 ヶ月後に脳内 A β を免疫組織化学、生化学的に評価した。A β 蓄積は peak 1 A β 画分接種の 2 ヶ月後に左海馬歯状回に初発し、経時的に拡大して、6 ヶ月後には左海馬の広範囲に達し、右海馬の歯状回にも観察された。生化学的には、不溶性 A β 量は左海馬で増加したが、可溶性 A β 量には左右差は認めなかった。これらの結果から、peak 1 A β 画分に含まれる A β は、新たに放出された A β の不溶化・蓄積を促すことで seed 効果を発揮すると考えられた。また 6 ヶ月にわたって A β の蓄積が拡大したことからは、peak 1 A β 画分に含まれる A β は seed 能を保持したまま安定に存在し、解剖学的構造に沿って脳内を拡散する可能性や、seed 分子はアミロイド斑にゆるやかに結合して存在しており、アミロイド斑の蓄積増加とともに増加して、局所で A β 凝集・不溶化を促進しながら脳内を拡がる可能性が考えられた。

4. AD 脳由来 A β 分子種の有する seed 能の検討

AD 脳に由来する A β の有する seed 能を検討するため、AD 脳あるいは高齢非 AD 脳のトリソ可溶画分をゲルろ過クロマトグラフィーにより分離し、各画分の A β 濃度を A β 40 ある

いは A β 42 特異的な ELISA で測定した。解析した 6 例の AD 脳 of 全てにおいて、peak 1 A β 画分と相同な、分子量 200-300 $\times 10^3$ 画分に A β が溶出された。高齢非 AD 脳では、6 例中 1 例のみで分子量 200-300 $\times 10^3$ 画分に A β が検出された。AD 脳 of peak 1 A β 画分に存在する A β 分子種は、6 例中 3 例では主に A β 42 から成っていたが、他の 3 例では A β 42 に加えて A β 40 が豊富に含まれていた。脳 of A β 蓄積を免疫組織化学的に評価すると、peak 1 A β 画分に A β 40 と A β 42 を認めた 3 例では、血管壁に著明な A β 40 陽性 of アミロイドアンギオパチーが観察されたのに対し、peak 1 A β 画分が主に A β 42 で構成されている 3 例では、アミロイドアンギオパチーは比較的軽度であった。脳実質 of アミロイド斑 of 形態や蓄積量に一定 of 傾向は認められなかった。AD 脳由来 of peak 1 A β 画分が有する seed 能を評価するために、10 ヶ月齡 of APP tg 脳左海馬に AD 脳由来 of peak 1 A β 画分あるいは非 AD 脳由来 of 分子量 200-300 $\times 10^3$ 画分を、右海馬にリン酸緩衝生理食塩水を注入し、4 ヶ月後に A β 蓄積を免疫組織化学的に評価した。A β 42 で主に構成される AD 脳由来 of peak 1 A β 画分を注入した APP tg では、左海馬に A β 蓄積が観察され、その蓄積形態は APP tg 脳由来 of peak 1 A β 画分注入時と極めて類似していた。AD 脳由来 of peak 1 A β 画分が seed 能を持つことが確認された。一方 A β 40 と A β 42 を含む AD 脳由来 of peak 1 A β 画分を注入した APP tg では、peak 1 A β 画分接種側 of 左海馬で、右海馬に比して A β 蓄積面積 of 有意な増加はなかった。非 AD 脳由来 of 分子量 200-300 $\times 10^3$ 画分は seed 能を示さなかった。以上 of 結果から、AD 脳可溶画分中 of peak 1 A β 画分は、A β 蓄積 of seed となる A β 分子種を含むことが確かめられたが、seed 能 of 程度は症例により異なっていた。今後、AD 脳由来 of peak 1 A β 画分中 of A β 40 と A β 42 の存在比率や、蓄積 A β of 脳内局在と seed 能との関係を詳細に解析することにより、seed 分子種 of 本態をさらに追究したい。

【結語】

本研究において、脳内に A β 蓄積を有する APP tg 脳あるいはヒト AD 脳中に存在するトリス可溶性分子量 200-300 $\times 10^3$ の A β オリゴマーが、APP tg マウス脳で A β 蓄積を誘導する seed 能を有することを示した。この seed A β 分子種は、AD 脳において A β の蓄積開始とその進展に重要な役割を果たす鍵分子である可能性があり、その構造異常の詳細をさらに解明することにより、AD 予防・治療法 of 新たな分子標的となることが期待される。