

審査の結果の要旨

氏名 箱崎 眞結

本研究は、アルツハイマー病 (Alzheimer's disease; AD) 発症において、A β 蓄積が開始し時間的に拡大する機序を明らかにするため、アミロイド斑蓄積を有する APP トランスジェニックマウス (tg) 脳あるいは AD 脳の可溶性抽出液中に、何らかの異常構造を有する A β 分子が存在し A β 蓄積を誘導するとの仮説に立脚し、A β seed 分子の同定と分子性状の解析、seed 分子が A β 蓄積を拡大する機序の解明を試みたものである。

本研究では下記の結果を得ている。

1. 脳内に多量のアミロイド斑を有する高齢 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により分離し、各画分の A β 濃度を、A β 42特異的な ELISA を用いて測定した。A β は分子量 200-300 $\times 10^3$ 、50-60 $\times 10^3$ 、15 $\times 10^3$ の画分に分画され、それぞれ peak 1 A β 画分、peak 2 A β 画分、peak 3 A β 画分とした。A β オリゴマー特異 ELISA と A β オリゴマー特異抗体を用いたドットプロット法で各画分の反応性を検討したところ、peak 1 A β 画分中に A β オリゴマーが含まれることが示唆された。
2. *In vivo* で A β 蓄積を誘発する効果、すなわち 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ことが示唆された。
3. 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。5 ヶ月齢 APP tg 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 脳に同様の高分子量 seed 分子が存在するか確かめるため、AD 脳あるいは高齢非 AD 脳のトリス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 脳の全てにおいて、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 脳の 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。脳の 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 陽性の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。脳実質のアミロイド斑の形態や蓄積量に一定の傾向は認められなかった。AD 脳由来の peak 1 A β 画分が有する seed 能を評価するために、10 ヶ月齢の APP tg 脳左海馬に AD 脳由来の peak 1 A β 画分あるいは非 AD 脳由来の分子量 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 脳由来の peak 1 A β 画分を注入した APP tg では、左海馬に A β 蓄積が観察されたのに対し、A β 40 と A β 42 を含む AD 脳由来の peak 1 A β 画分を注入した APP tg では、peak 1 A β 画分接種側の左海馬で、右海馬に比して A β 蓄積面積の有意な増加はなかった。非 AD 脳由来の分子量 200-300 $\times 10^3$ 画分は seed 能を示さなかった。以上の結果から、AD 脳可溶画分中の peak 1 A β 画分は、A β 蓄積の seed となる A β 分子種を含むことが確かめられたが、seed 能の程度は症例により異なっていた。

以上、本論文はアミロイド斑蓄積を有する APP tg 脳や AD 脳中に、可溶性高分子量 A β オリゴマーが存在し、この分子が脳内で A β 蓄積を誘発する seed 能を有することを初めて明らかにした。本研究は AD 発症初期において、A β 蓄積が時空間的に広がる機序の解明に重要な貢献をなすと考えられる。

よって本論文は博士（医学）の学位請求論文として合格と認められる。