

## 論文の内容の要旨

論文題目 ヒトアポリポタンパク質 E が

脳内 A $\beta$  ダイナミクスに与える影響の解析

氏名 粉川 明日香

### 【序文】

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease; AD) 発症のリスク遺伝子として、*apolipoprotein E (APOE)* が知られている。ヒト *APOE* 遺伝子には 3 種の遺伝子多型  $\epsilon 2$ 、 $\epsilon 3$ 、 $\epsilon 4$  が存在する。アレル頻度が 80 数%と最も高い  $\epsilon 3$  アレルに対し、 $\epsilon 4$  アレルの頻度は約 10% であるが、AD の発症率は  $\epsilon 4$  アレルを 1 つ保有すると約 3 倍、2 つ保有すると約 12 倍に上昇し、アレル数依存的に発症年齢が早まる。*APOE* 遺伝子がコードする apoE タンパク質は、血液中で脂質輸送に関与するタンパク質として知られてきたが、apoE が AD 発症に寄与するメカニズムは十分に明らかになっていない。本論文においては、apoE が AD 発症の鍵分子である A $\beta$  と相互作用し、脳内における A $\beta$  のダイナミクス、即ちその産生、凝集・蓄積、クリアランス (除去) のいずれかの過程に影響を与えることによりその蓄積を促進している可能性を検討した。

### 【結果】

#### 1. apoE が A $\beta$ 蓄積に与える影響の検討

ヒト *APOE3* ノックインマウスをヒトアミロイド前駆体 (APP) トランスジェニック (tg) マウス (*APP/PS1* マウス系統) と交配し、9 か月齢時の梨状皮質に占める A $\beta$  免疫染

色陽性領域を画像解析により定量化した。内因性マウス apoE のみ、apoE3 をヘテロないしホモで発現する APP/PS1 マウスを比較したところ、APOE3 アレル数依存的に脳 A $\beta$  蓄積が減少することを見出した。一方 APOE2 或いは APOE4 ノックインマウスと APP/PS1 マウスを交配したところ、脳 A $\beta$  蓄積の程度は APOE3 ノックインマウスと同程度であった。また、APOE ノックアウトマウスと APP/PS1 マウスを交配すると A $\beta$  斑がびまん性の形態に変化したことから、apoE は A $\beta$  斑の蓄積形態を規定すること、特にコンパクトな斑状の形態の維持に関与すると考えられた。

## 2. apoE が A $\beta$ クリアランスに与える影響の検討

3 か月齢 APP/PS1 マウスの海馬間質液中に放出された A $\beta$  量を 1,000 kDa カットオフプローブの *in vivo* microdialysis 法を用いて測定し、さらに  $\gamma$ -secretase 阻害剤を還流することで A $\beta$  の半減期を算出した。その結果、A $\beta$  定常濃度及び A $\beta$  半減期は内因性マウス apoE 及び apoE3 を発現する APP/PS1 マウス間で有意な差は認められず、異なる遺伝子型の apoE が A $\beta$  の脳内産生及びクリアランスに与える影響に差があることを示すことはできなかった。

## 3. apoE が A $\beta$ 凝集に与える影響の検討

A $\beta$  が  $\beta$  シート構造をとって線維を形成する過程は A $\beta$  斑の出現に先行して重要なステップであるが、*in vivo* で A $\beta$  の線維形成を測定することは困難である。そこで  $\beta$  シート構造を特異的に認識する蛍光色素 thioflavin T (ThT) を用いた *in vitro* A $\beta$  凝集実験により、apoE が A $\beta$  凝集に与える影響を検討した。リコンビナント A $\beta$  を単独、或いは apoE3、apoE4、マウス apoE と混和してインキュベーションし、ThT を添加した時の蛍光強度を測定することにより A $\beta$  凝集を評価した。その結果 A $\beta$  単独に比べ、apoE の共存下では A $\beta$  凝集開始が遅延し、その A $\beta$  凝集抑制効果は apoE3、apoE4、マウス apoE の順に高いことが示された。

さらに、A $\beta$  凝集核に富んだ高齢マウス脳 TBS 可溶画分を 3 か月齢 APP/PS1 マウス脳に接種する *in vivo seeding* 実験を実施し、apoE が A $\beta$  線維伸長過程に与える影響を *in vivo* レベルで検討した。A $\beta$  凝集核を海馬に接種した APP/PS1 マウスでは非接種側に比べて A $\beta$  蓄積が増大する傾向を示した。一方 APOE3 ノックイン APP/PS1 マウスにおいては、A $\beta$  凝集核の接種は A $\beta$  蓄積を有意に増大させなかった。これらの結果から、apoE3 はマウス apoE に比して、A $\beta$  の脳内蓄積を抑制する効果がより強いことが示唆された。

#### 4. apoE と A $\beta$ の相互作用の検討

ヒト apoE とマウス apoE 間で、A $\beta$  との相互作用に違いがあるかを *in vitro* で検討した。液相中で A $\beta$  と apoE の相互作用を測定するため、split-luciferase complementation assay を利用して新規の apoE/A $\beta$  複合体発光モニタリング系を樹立した。Gaussia luciferase のアミノ末端断片 (“luci”) を apoE のカルボキシ末端に融合させた cDNA (apoE-luci)、及び A $\beta$  を効率的に分泌させるために、BRI 前駆体タンパク質と luciferase のカルボキシ末端断片 (“ferase”) を A $\beta$  のアミノ末端に融合させた cDNA (BRI-ferase-A $\beta$ ) を作出した。apoE と A $\beta$  が相互作用すると luciferase が再構築され、発光を呈することが期待された。

脳内で apoE は主にアストロサイト、A $\beta$  は神経細胞で産生・分泌され、両者は細胞外で相互作用すると考えられる。そこで apoE3-luci、apoE4-luci 或いはマウス apoE-luci と BRI-ferase-A $\beta$  をそれぞれ別個に遺伝子導入した HEK293 細胞の培養上清を混和して、両者の相互作用を検討した。その結果、apoE4-luci と BRI-ferase-A $\beta$  を混和した場合、apoE3-luci と BRI-ferase-A $\beta$  の混和時に比して luciferase の発光が有意に低かったことから、apoE4 は apoE3 に比べて A $\beta$  との相互作用が弱いことが示唆された。一方、マウス apoE-luci と BRI-ferase-A $\beta$  の相互作用は、apoE3-luci と BRI-ferase-A $\beta$  のそれと同程度であった。

R61T 変異を apoE4 に導入すると、apoE4 の立体構造が apoE3 様になると推定されている。R61T 変異型 apoE4-luci は apoE3-luci と同程度に BRI-ferase-A $\beta$  と相互作用した

ことから、apoE と A $\beta$  の相互作用は、apoE の立体構造に起因する可能性が示唆された。

## 5. 細胞外 apoE タンパク質量の検討

apoE タンパク質の安定性を比較するため apoE3、apoE4、apoE4 (R61T) を発現する HEK293 細胞のライセート及び培養上清中の apoE 量をイムノブロット法により検討した。その結果、ライセート中の apoE3、apoE4 及び apoE4 (R61T) の量は同程度であるのに対して、培養上清中では apoE4 量が apoE3、apoE4 (R61T) に比して低かった。

続いて、*APOE3* 及び *APOE4* ノックインマウスの海馬間質液を *in vivo* microdialysis 法により回収し、脳の細胞外腔に分泌された apoE 量を検討した。その結果 *APOE3* ノックインマウス脳間質液中の apoE 量は *APOE4* ノックインマウスに比して、統計学的に有意ではないが高い傾向を示した ( $p=0.51$ )。これらの結果から細胞外へ放出された apoE4 は apoE3 に比して不安定である可能性、あるいは apoE4 が apoE3 に比して放出の程度が低い可能性が考えられた。

### 【まとめ】

本論文において AD 発症の遺伝的危険因子である apoE に関して、ヒト apoE3 はマウス apoE に比して脳における A $\beta$  蓄積を減少させる作用を有することを見出した。A $\beta$  の脳内代謝において、apoE3 とマウス apoE が A $\beta$  のクリアランスに異なる影響を与えることは認められず、apoE3 またはマウス apoE を発現する AD モデルマウスで A $\beta$  蓄積が著しく異なった原因は、apoE3 がマウス apoE と比べて A $\beta$  凝集核形成及び線維伸長過程を抑制することに起因する可能性が考えられた。これらの結果は、apoE3 が AD 病態の発症に対し防御的に働く因子である可能性を示唆し、今後 apoE3 の A $\beta$  に対する作用を増強する、新たな AD 予防・治療法の開発を試みたい。