

博士論文

アルツハイマー病治療を目指した  
光酸素化アミロイド $\beta$ の動態解析

小澤 柊太

## 目次

I	序章 .....	4
A	アルツハイマー病.....	4
B	APP 遺伝子上に点突然変異を有する家族性 AD 家系の発見と解析.....	4
C	アミロイド仮説 .....	5
D	オリゴマー仮説 .....	5
E	脳内 A $\beta$ クリアランス.....	5
F	A $\beta$ のクリアランス経路.....	6
G	アミロイド仮説をもとにした AD の予防・治療法 .....	6
H	アミロイド免疫療法.....	7
I	A $\beta$ の修飾.....	8
J	A $\beta$ の光酸素化.....	9
K	光酸素化触媒の発展.....	9
L	BAP-1 を基本骨格とする光酸素化触媒.....	9
M	AD モデルマウスについて .....	10
N	本研究の目的－光酸素化触媒に関して解決すべき問題点.....	10
II	方法 .....	12
A	光酸素化触媒.....	12
B	AD モデルマウス .....	12
C	野生型マウス .....	12
D	ヒト脳サンプル .....	13
E	生化学的解析 .....	13
E-1	A $\beta$ ペプチドの <i>in vitro</i> 光酸素化と過酸化水素による酸化 .....	13
E-2	マウス脳の摘出・保存方法.....	13
E-3	マウス脳ライセートの作製.....	14
E-4	マウス脳ライセートの <i>in vitro</i> 光酸素化.....	14
E-5	ヒト脳ライセートの作製 .....	14
E-6	ヒト脳ライセートの <i>in vitro</i> 光酸素化 .....	14
E-7	マウス脳に対するガイド挿入手術.....	14
E-8	光酸素化触媒の注入と光刺激 ( <i>in vivo</i> 光酸素化) .....	15
E-9	野生型マウス脳内への A $\beta$ injection 実験.....	15
E-10	PLX3397 (CSF1R 阻害剤) の投与.....	15
E-11	<i>in vivo</i> マウス脳、及びヒト AD 脳の生化学的解析のための分画操作 .....	16
E-12	マウスミクログリア細胞株 MG6 またはヒトニューログリオーマ細胞株 H4 を用いた A $\beta$ の取込・分解の検討.....	16

E-13	SDS-PAGE のためのサンプル調製 .....	16
E-14	SDS-PAGE .....	17
E-15	ウェスタンブロッティング (WB) による解析 .....	17
F	MALDI-TOF-MS (MS) による解析 .....	18
G	免疫細胞化学的解析 .....	18
H	免疫組織化学的解析 .....	19
F	抗体・試薬関連 .....	19
III	結果 .....	21
A	<i>in vitro</i> 光酸化後の A $\beta$ の MALDI-TOF-MS 解析 .....	21
B	<i>in vitro</i> 光酸化反応後のウェスタンブロッティング (WB) 解析 .....	21
C	<i>in vivo</i> 複数回光酸化のウェスタンブロッティング解析 .....	22
D	野生型マウス脳内インジェクションによる光酸化凝集 A $\beta$ の代謝検討 .....	22
E	ミクログリア欠失マウス脳内での光酸化凝集 A $\beta$ の代謝検討 .....	23
F	マウスミクログリア細胞株 MG6 を用いた光酸化凝集 A $\beta$ の代謝亢進機構の解析 .....	23
IV	考察 .....	25
A	本結果のまとめ .....	25
B	結語 .....	27
V	参考文献 .....	28
	図表 .....	34
	謝辞 .....	63

# I 序章

## A アルツハイマー病

アルツハイマー病 (AD) は認知症の主たる原因疾患で、近年大きな社会問題となっている。臨床症状として、記憶障害、見当識障害、判断力の低下などが現れる。また、病理学的な所見として、大脳皮質を中心に広範な神経細胞の脱落に加えて、細胞外に老人斑、細胞内に神経原線維変化と呼ばれる異常構造物が確認される。

神経原線維変化の主要構成成分は高度にリン酸化され線維化した微小管結合タンパク質タウである。老人斑の主要構成成分はアミロイド  $\beta$  ペプチド ( $A\beta$ ) である。 $A\beta$  は前駆体タンパク質である APP が、 $\beta$ -secretase と  $\gamma$ -secretase による段階的な切断を受けて産生される。この  $\gamma$ -secretase による切断部位の違いに伴い、カルボキシ末端に多様性が生じ、全長の異なる複数の  $A\beta$  種が存在する。 $A\beta$  はその疎水性の高さから、凝集性が高い分子であるが、その中でも、特に 42 アミノ酸からなりカルボキシ末端の残基がアラニンで終わる  $A\beta_{42}$  の凝集性が、40 アミノ酸からなりカルボキシ末端がバリンで終わる  $A\beta_{40}$  に比して高い。

これまでに常染色体優性遺伝形式を示す家族性 AD 家系において、APP 遺伝子上に点突然変異が見出されている。この点突然変異により、 $A\beta$  産生やその凝集性が亢進することが知られている (図 1)。

## B APP 遺伝子上に点突然変異を有する家族性 AD 家系の発見と解析

最初に見つかった変異は London 変異 (V717I) である<sup>1</sup>。第 21 番染色体上に存在する APP の点突然変異のうち、London 変異は、 $\gamma$ -secretase の切断部位近傍に存在する。 $\gamma$ -secretase の切断部位近傍に存在する変異は、いずれも  $A\beta_{42}/A\beta_{40}$  比率を上昇させることが知られている。Iberian 型変異 (I716F) もそのうちの一つであり、同様の機序で AD 病態を加速させる<sup>2,3</sup>。

$\beta$ -secretase 切断部位近傍に点突然変異をもつ家系も発見されている。これらの変異は、 $A\beta$  産生を増加させる。Swedish 変異 (K670N / M671L) は、ここに分類される<sup>4</sup>。

上記の  $A\beta$  領域周辺に存在する変異は、毒性をもつ  $A\beta$  の量的な増加をもたらし、AD 発症を導くことが示唆される。

一方、 $A\beta$  領域内部に点突然変異をもつ家系も存在する。Arctic 変異 (E693G) は、 $A\beta$  線維形成過程の中間段階で生じるプロトフィブリルの形成を亢進・安定化することが知られ

ている<sup>5,6</sup>。このような A $\beta$  領域内部の変異では、A $\beta$  の量的な増加を伴わない。つまり、A $\beta$  の質的な変化、凝集性の亢進によって AD 発症を導く可能性を示唆している。

また、AD 及び老化による認知機能低下に対して防御的に作用する変異として、Icelandic 変異 (A673T) が存在する<sup>7</sup>。この変異は  $\beta$ -secretase による APP の切断を低下させ、A $\beta$  産生を約 40%低下させることが知られている。

## C アミロイド仮説

上述の遺伝学的知見から、A $\beta$  の凝集及び蓄積が AD 発症の原因と考える「アミロイド仮説」が広く支持されている<sup>8</sup> (図 2)。蓄積 A $\beta$  に対するアミロイド PET イメージング解析から、認知機能低下がみられない AD 発症以前から、脳内に A $\beta$  が不溶なアミロイドとして蓄積していることが明らかとなっており、AD 発症カスケードの最上流に位置する現象であると考えられている。

## D オリゴマー仮説

A $\beta$  は APP の代謝により産生され細胞外へモノマーとして分泌される。その後構造変化を起こし、オリゴマーを形成、最終的には不溶性のアミロイド線維となる。この凝集過程における中間体、可溶性オリゴマーが最も毒性の高い分子種と考える「オリゴマー仮説」が知られている。これは、アミロイド線維の蓄積と認知症症状の重篤さの相関に比して、可溶性の A $\beta$  量とシナプスの消失、認知機能不全に強い相関がみられることに起因する仮説である<sup>9</sup>。

実際にこの仮説の検証が様々な方法で行われてきた。APP V717F を過剰発現する細胞から分泌される A $\beta$  オリゴマーをラット脳に注射すると、海馬におけるシナプスの長期増強作用が著しく阻害された<sup>10</sup>。この分泌 A $\beta$  にはアミロイド線維は含まれていなかった。同様に、AD 患者脳から抽出された可溶性 A $\beta$  オリゴマーもまた *in vivo* において、シナプスの長期増強作用を阻害した。加えて、記憶障害をも引き起こすことが示された<sup>11</sup>。

さらに、オリゴマー仮説を支持する知見として、APP E693 $\Delta$ 点突然変異をもつ、劣性遺伝形式を示す家族性 AD 家系が新たに発見された<sup>12</sup>。この変異をもつ A $\beta$  は特徴的な性状を有しており、アミロイド線維を形成せずに、オリゴマー形成を促進する。この A $\beta$  オリゴマーもまた *in vivo* においてシナプスの長期増強作用を阻害した。以上より、AD における認知機能の低下は、可溶性の A $\beta$  オリゴマーに起因するということが示唆される。

## E 脳内 A $\beta$ クリアランス

前述の通り、家族性 AD では A $\beta$  の総量、あるいはより凝集性の高い A $\beta$  種の産生が病態形成の原因として考えられている。しかしながら、遺伝子変異を伴わない孤発性 AD 患者では、A $\beta$  産生量の増加が AD 発症に寄与しているという証拠は存在しない。一方で、孤発性 AD 患者では健常人と比較し A $\beta$  産生量に違いはないものの、クリアランス能力が減少していることが確認された<sup>13</sup>。この知見から、A $\beta$  クリアランス能力の減少に伴う脳内での蓄積進行の可能性が示唆され、孤発性 AD における A $\beta$  クリアランスの重要性が示された。

## F A $\beta$ のクリアランス経路

A $\beta$  の分解酵素としてこれまで Neprilysin (NEP) や Insulin degrading enzyme (IDE)、Kallikrein-related peptidase 7 (KLK7) などが知られている。AD モデルマウスを用いたこれら分解酵素のノックアウト実験において、有意に A $\beta$  の沈着が増加することが確認されている<sup>14-16</sup>。

また、血液脳関門を介した A $\beta$  の排出機構の存在も確認されている。ラットに対して A $\beta$  を脳内注射後、半減期約 25 分で血中に排出されることが実験により示されている<sup>17</sup>。この機構において A $\beta$ 42 は A $\beta$ 40 に比べ脳からの排出が抑制されていることも確認された<sup>18</sup>。A $\beta$ 42 は A $\beta$ 40 に比べ  $\beta$  シート含有率が高いことから、血液脳関門における A $\beta$  輸送体との親和性が減少したためと考えられている。

この A $\beta$  輸送体として LDL receptor-related protein 1 (LRP1) が知られている。血液脳関門を構成する血管内皮細胞に発現が見られ、AD 患者脳で発現レベルが減少しているという報告がある<sup>19</sup>。一方、活性化アストロサイトにおいては、LRP1 の mRNA レベルの上昇が確認されている<sup>20</sup>。健常脳では、LRP1 は post synapse で見られ、活性化アストロサイトでは見られなかった<sup>21</sup>。このことから、LRP1 の発現は AD 脳において、時間・空間的に制御されている可能性が示唆される。

さらに、老人斑周辺に集積が見られるミクログリアが、様々な受容体を介して A $\beta$  を内在化しクリアランスに寄与することも知られている<sup>22-25</sup>。アストロサイトについても同様に内在化により A $\beta$  を除去する機構が知られている<sup>26</sup>。

上記以外にも様々な A $\beta$  クリアランス経路の存在が確認されている。A $\beta$  の蓄積は、これらクリアランス経路の破綻に由来すると考えられ、A $\beta$  の代謝過程を標的とした AD 治療の重要性が示唆される。

## G アミロイド仮説をもとにした AD の予防・治療法

上述の「アミロイド仮説」が有力であることから、近年 AD 病態の進行を防ぐものとして、A $\beta$  凝集阻害療法、A $\beta$  産生抑制療法、アミロイド免疫療法などに関して研究が遂行されている。

A $\beta$  凝集阻害効果を持つ分子の一つに、赤ワイン関連のポリフェノールが存在する。AD モデルマウスに対して、アミロイド蓄積以前からブドウ由来のポリフェノールを投与することで、認知機能の低下と可溶性オリゴマーの形成を阻害した<sup>27</sup>。その他にも、ターメリックの主成分であるクルクミンにも同様の A $\beta$  凝集阻害効果があることが示されている<sup>28,29</sup>。臨床試験においては、AD 患者に対して 6 ヶ月間の投与で、脳内アミロイド蓄積が不安定化した。しかし、認知機能改善には至らなかった<sup>30</sup>。これらの分子は、主に凝集タンパク質間での相互作用を標的とし、新たな凝集体の形成を抑制すると考えられるため、既に凝集・蓄積した A $\beta$  には大きく作用できなかったと思われる。

A $\beta$  産生抑制方法として、APP の切断を担う二つの酵素、 $\beta$ -secretase と  $\gamma$ -secretase が標的タンパク質として挙げられる。しかしながら、これらの酵素の阻害剤についても未だ実用可能なものは存在しない。 $\beta$ -secretase 阻害剤の verubecestat はラットやサルを用いた *in vivo* 実験では A $\beta$  量を有意に低下させたが、軽度・中等度の AD 患者には有効な臨床効果が得られなかった<sup>31</sup>。同じく elenbecestat は早期 AD 患者に対する有効性を示すことができなかった<sup>32</sup>。

これらの治療法の治験が失敗した理由の一つとして、AD 発症と老人斑蓄積の時間的相違が想定されている。老人斑蓄積をイメージングできるアミロイド PET の開発とその応用、そして前述した家族性 AD 家系患者におけるバイオマーカーの前向きな解析から、AD 発症の 10-20 年前からアミロイドの蓄積が開始していると考えられるようになった。この時期は、脳内病理形成は進んでいるものの脳機能の低下は認められないため発症には至っていない。しかしこれら健常者はその後 AD を発症するリスクが高いことも明らかとなっている。このため、このアミロイド蓄積を示す未発症期はプレクリニカル AD と呼ばれている<sup>33</sup>。そのため、上記二つの介入方法は、AD 患者に対する治療法として既に手遅れであったと考えられる。

## H アミロイド免疫療法

AD モデルマウスにおいて、active、passive immunization 共に抗 A $\beta$  抗体によって脳内アミロイドの蓄積を阻害・低下させ<sup>34,35</sup>、AD モデルマウスの認知機能低下を抑制したことが示されている<sup>36-38</sup>。これらの結果から、A $\beta$  に反応する抗体医薬の開発が進められている。

full-length のヒト A $\beta$ 42 を用いた AD モデルマウスに対する active immunization では、高齢期に vaccinated されたマウス脳内での顕著な A $\beta$  蓄積量の減少が見られ、若齢期に vaccinated されたマウス脳内では、高齢期での A $\beta$  蓄積の形成がほぼ完全に阻害された<sup>34</sup>。active immunization による治療戦略 Phase 3 にて CAD106 を用いて引き続き行われている<sup>39</sup>。

抗 A $\beta$  抗体を用いた passive immunization による治療戦略は、複数で Phase 3 へ進んだ。最初にこの段階に進んだ bapineuzumab は A $\beta$  の N 末端を認識するヒト化抗体で、可溶性 A $\beta$  と線維状 A $\beta$  に結合し、ミクログリアによるファゴサイトーシスを促進する。この抗体は

mild-to-moderate の AD 患者に対して試験されたが、認知機能の低下を抑制することはできなかった<sup>40</sup>。

Solanezumab は A $\beta$  の mid domain を認識し、可溶性 A $\beta$  のみに結合可能なヒト化抗体である。mild-to-moderate の AD 患者に対する 2 つの Phase 3 試験では、A $\beta$  蓄積量の減少、認知機能の低下共に抑制することができなかった<sup>41</sup>。mild な AD 患者に対する 3 番目の Phase 3 試験でも、主要評価項目を達成できなかった<sup>42</sup>。

Aducanumab は凝集 A $\beta$  を標的とするヒト抗体で、Phase 1b 試験において prodromal or mild な AD 患者の認知機能の低下抑制できることが確認された<sup>43</sup>。2 つの Phase 3 試験では有効性を示すことができず中止されたが、1 つの試験では、高用量投与群において認知機能の低下を遅らせる効果が示唆され、米国の食品医薬品局にて承認審査中である。

Gantenerumab は老人斑内の A $\beta$  線維に結合するヒト抗体で、Phase 3 試験において高用量で 2 年間投与された患者を分析すると、A $\beta$  の蓄積量が著減することが確認された。これを受けて、very mild-to-mild な AD 患者に対する高用量 Phase 3 試験が行われている<sup>44</sup>。

BAN2401 は可溶性の A $\beta$  プロトフィブリルを認識するヒト化抗体で、Phase 2 試験において A $\beta$  蓄積の減少、ならびに認知機能の低下を抑制することが確認された。これを受けて、very mild-to-mild な AD 患者に対する Phase 3 試験が始まっている<sup>45-47</sup>。

また、いくつかの抗 A $\beta$  抗体は、より早期の予防を目指した研究に用いられている。DIAN-TU では上記の solanezumab と gantenerumab を用いて家族性 AD 患者に対する Phase 2/3 試験を行っている<sup>48</sup>。また、BAN2401 を用いて、プレクリニカル AD および脳内 A $\beta$  蓄積が境界域レベルの早期プレクリニカル AD に対する Phase 3 試験も行われている。

以上より AD の治療・予防には、プレクリニカル AD に対し、凝集 A $\beta$  を標的とした戦略が最も有効なものの一つであると考えられる。

## I A $\beta$ の修飾

A $\beta$  は産生後、様々な修飾を受けることが知られている。その中でも、第 1、第 2 アミノ酸残基の切断と第 3 残基のグルタミン酸がピログルタミル化を受けた 3pyroE-A $\beta$  が、老人斑を構成する A $\beta$  種において最も多いことが知られ、3pyroE-A $\beta$ 42 が A $\beta$ 42 種において 25% を占めている<sup>49,50</sup>。このピログルタミル化を行う酵素である glutaminyl cyclase は AD で増加していることが確認されている<sup>51</sup>。AD モデルマウスにおいて、この酵素の活性を阻害すると、A $\beta$  斑が減少し、認知機能低下が抑制された。またこの 3pyroE-A $\beta$  は疎水性が非常に高く、凝集性も高いことが示されている<sup>52</sup>。最近、3pyroE-A $\beta$  に対する特異抗体 donanemab が開発され、臨床試験において脳内 A $\beta$  蓄積を減少させることも示された。

他にも、A $\beta$  の第 10 残基の Tyr がニトロ化された分子種が、AD で影響を受けやすい海馬や皮質に多いことが知られている<sup>53</sup>。また APP 過剰発現マウスを用いた検討においては、Tyr のニトロ化が A $\beta$  凝集を促進するという結果が得られている<sup>54</sup>。



また、A $\beta$  の第 8 残基の Ser がリン酸化を受けると、オリゴマーの形成が促進され毒性が高まることも知られている。加えて、A $\beta$  分解酵素に対し抵抗性をも獲得した<sup>55,56</sup>。実際にこの分子種は AD 脳の老人斑、血管アミロイドに沈着が見られている<sup>57</sup>。

一方、AD 患者脳の老人斑の質量分析において、第 35 残基の Met が酸化修飾を受けた分子種の存在が確認されている<sup>58</sup>。この酸化 A $\beta$  は、凝集性・毒性共に低い分子種であることが *in vitro* において示されている<sup>59,60</sup>。

## J A $\beta$ の光酸素化

上述の、「酸素修飾された A $\beta$  の低凝集性」に着目し、人工的に A $\beta$  に酸素付加を施す試みがなされた。A $\beta$  の酸素化を触媒する分子としてビタミン B2 であるリボフラビンが採用された。リボフラビンは光刺激によって活性化され、エネルギーを放出する過程で酸素を一重項状態に遷移させ、スルフィドをスルフォキシドへ酸化することが知られている<sup>61</sup>。実際に A $\beta$  に対して、A $\beta$  結合部位を付加したリボフラビンを介した酸素修飾が行われ、A $\beta$  の凝集性と細胞毒性が低下したことが示された<sup>62</sup>。

以上より、A $\beta$  の酸素化は AD 治療・予防戦略の一つとなり得ることが期待される。

## K 光酸素化触媒の発展

A $\beta$  の酸素化を AD の治療・予防戦略とするため、特異性の向上および凝集 A $\beta$  を標的とする必要があった。脳内における A $\beta$  の割合は決して高いものではなく、生体内では予期しない副反応が生じる可能性が考えられる、加えて、先述の通り既に凝集・蓄積した A $\beta$  を標的とすることが AD の予防・治療戦略として有効であると考えられるためである。そこで A $\beta$  凝集体が cross- $\beta$  sheet 構造を有していることに着目し、この構造に結合した際にのみ光刺激による酸素化活性を有する触媒が開発され、実際に A $\beta$  の凝集性・毒性を低下させることが示された<sup>63</sup> (図 3)。

A $\beta$  に対する特異性の高さに加えて、光の透過性も問題となる。長波長光はより侵襲性が低く透過性が高いため、長波長光により活性化される触媒の方が望ましい。そこで、A $\beta$  凝集体に対する probe である BODIPY 骨格を有する BAP-1<sup>64</sup> が 600 nm の波長で活性化可能であること、また BODIPY はその合成方法や特性に関して広く研究がなされており誘導化が容易であることに着目し、開発が進められた。

## L BAP-1 を基本骨格とする光酸素化触媒

BAP-1 もまた、凝集 A $\beta$  の cross- $\beta$  sheet 構造に結合することで、分子内の回転が阻害される化合物である。光の吸収により励起一重項状態となるが、基底状態に遷移する際、凝集 A $\beta$

に結合していると回転によるエネルギーの消失を回避し、蛍光を発する。このメカニズムを利用し、光酸素化触媒の開発が行われた。蛍光として放出していたエネルギーを使って三重項状態の酸素を一重項状態へ活性化させるために、重原子であるヨウ素が付加された。重原子の一つであるヨウ素は、励起一重項状態の触媒を励起三重項状態へ遷移する確率を高める。励起三重項状態の触媒が基底状態に遷移する際放出されるエネルギーを介して、酸素は一重項状態へ活性化される (図 4)。

光酸素化触媒は、有機合成化学教室の清水裕介修士の検討により、最大吸収波長 651 nm で活性化され、凝集 A $\beta$  に対して選択的に酸素を付加することがわかっている (図 5)。また、*in vitro* において A $\beta$  の凝集性・毒性を低下させ有用性が示された (図 6、7)。しかし、*in vivo* における薬効評価は未だなされていない。

## M AD モデルマウスについて

AD 病態、発症メカニズムの解明のため、これまで様々なモデルマウスが作出されてきた。アミロイド仮説の観点から、第一世代と呼ばれる家族性 AD 変異を導入した APP 遺伝子を過剰発現させた APP トランスジェニックマウスが使用されてきた。例えば、APP/PS1 マウスは、A $\beta$  配列中に変異はなく、Swedish 変異をもつ APP、並びに exon 9 が欠失した presenilin 1 を過剰発現することで、月齢依存的に脳内で A $\beta$  が凝集・蓄積する<sup>65</sup>。しかし、それには数多くの問題点が存在している。A $\beta$  以外にも、APP とその切断断片が過剰発現していること、また APP の過剰発現により軸索輸送の障害が懸念されることなどが挙げられる。これらの障害を克服するため、APP を過剰発現させないノックイン手法により App<sup>NL-F/NL-F</sup> マウス、App<sup>NL-G-F/NL-G-F</sup> マウスが作出された<sup>66</sup>。App<sup>NL-F/NL-F</sup> は第二世代と呼ばれ、前述の家族性変異である Swedish 型変異と Iberian 変異が導入された。第三世代と呼ばれる App<sup>NL-G-F/NL-G-F</sup> はさらに Arctic 変異が加えられ、より早い、2 ヶ月齢から A $\beta$  斑の蓄積が生じる。

## N 本研究の目的—光酸素化触媒に関して解決すべき問題点

合成 A $\beta$  ペプチドを用いた *in vitro* の実験系においては、光酸素化触媒は実際に A $\beta$  を光酸素化することができた。しかし、生体内にはタンパク質、脂質など様々な物質が存在しており、それらの障害を越えて A $\beta$  を光酸素化できるかは不明である。また、光酸素化触媒が A $\beta$  病態の進行を抑制できるかについても不明であった。

加えて、光酸素化は A $\beta$  に対して直接化学的に修飾を加えるため、体内動態に変化が生じる可能性も示唆される。A $\beta$  の構造に変化を与えることで、生体内では低凝集化以上の効果を持つ可能性も期待される。

このことから、光酸素化触媒が生体内で薬効を発揮しうるか、加えて、光酸素化  $A\beta$  の体内動態を知ることは、 $A\beta$  の光酸素化が AD の治療・予防に有用であることを示す上で必要であると考えられる。

## II 方法

### A 光酸素化触媒

光酸素化触媒は 1 mM/DMSO 溶液で、-30℃で保存した。使用時には適当な量を PBS 溶液に加えた。また、本触媒は東京大学有機合成化学教室の金井求先生、相馬洋平先生よりご供与いただいた。また、図 8 で示したように清水裕介修士により 2 種類の光酸素化触媒が開発され、A $\beta$  に対する酸素化活性に差がないことが示されている。本実験では、大量の光酸素化触媒を用いることが予想されたため、比較的合成の容易な B を用いて検討を行った。

### B AD モデルマウス

本実験において *App*<sup>NL-G-F/NL-G-F</sup> マウス、APP/PS1 マウスを AD モデルマウスとして使用した。

*App*<sup>NL-G-F/NL-G-F</sup> マウスは、序論で述べた通り、マウス *App* 遺伝子に対してノックイン技法を用い作製された。A $\beta$  産生を上昇させる Swedish 変異 (K670N, M671L)、A $\beta$ 42/40 比率を上昇させる Iberian 変異 (I716F)、A $\beta$  の凝集性を上昇させる Arctic 変異 (E693G) の三つの家族性変異をもち、ヒトの A $\beta$  を産生する<sup>66</sup>。本マウスは理化学研究所脳科学総合研究センター、西道隆臣チームリーダー、斉藤貴志副チームリーダー（現名古屋市立大学認知症科学分野教授）よりご供与いただいた。

APP/PS1 マウスは、A $\beta$  配列中に変異はなく、Swedish 変異をもつ APP、並びに exon 9 が欠失した presenilin 1 を過剰発現することで、月齢依存的に脳内で A $\beta$  が凝集・蓄積する<sup>65</sup>。

動物実験の実施にあたっては、「動物の愛護及び管理に関する法律」など法令等に基づいて定められている「東京大学動物実験実施マニュアル」および「薬学部動物研究施設利用の手引き」にさだめる事項を遵守し、東京大学大学院薬学系研究科の承認をえて（protocol no.: P31-11）、動物の健康管理と動物福祉に常に配慮して実施した。

### C 野生型マウス

本実験において、C57BL/6J マウスを野生型マウスとして使用した。C57BL/6J マウスは日本 SLC 社より購入し、搬入から 3 ないし 4 日後に実験用に使用した。

## D ヒト脳サンプル

アルツハイマー病ならびに健常者の脳サンプルについては、the University of Pennsylvania Alzheimer's Disease Core Center (ADCC) and the Center for Neurodegenerative Disease Research (CNDR)の Dr. Virginia Man-Yee Lee、Dr. John Q. Trojanowski よりご供与いただいた。診断は ADCC-CNDR にて症状、病態進行に基づき行われた<sup>67,68</sup>。全サンプルは側頭皮質由来であり、使用にあたっては ADCC-CNDR、東京大学薬学系研究科の倫理委員会の承認（protocol no.: 2-1）のもと行われた。

## E 生化学的解析

### E-1 A $\beta$ ペプチドの *in vitro* 光酸素化と過酸化水素による酸化

Human 合成 A $\beta$ 1-42 ペプチド（ペプチド研究所）は 1 mg/mL となるように 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP ; 関東化学) に溶解し、21 G の注射針を用いて吸引し、0.20  $\mu$ m (Merck Millipore) のフィルターでろ過した後、4°C で保存した。以上の操作はすべて氷上で行った。また、HFIP 内の A $\beta$  は凝集しないことが知られている。

A $\beta$  溶液を必要量分取し、凍結乾燥により HFIP を蒸発させた。凍結乾燥後の A $\beta$  に対して、dimethyl sulfoxide (DMSO ; FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) を室温で添加し、DMSO の終濃度が 2% (v/v) となるように PBS を加えて調整した。これを 21 G の注射針を用いて吸引し、0.20  $\mu$ m のフィルターでろ過し調製した。37°C でインキュベートした後、DMSO に溶解した光酸素化触媒を加え、660 nm の光を LED パネル (Varole) を用いて照射した。

以降用いられる、非修飾凝集 A $\beta$  と光酸素化凝集 A $\beta$  は以下の通り作成した。2% DMSO/PBS 溶液中の A $\beta$  (40  $\mu$ M) を 37°C で 2 時間インキュベートした。その後、光酸素化触媒を 10  $\mu$ M 添加し、光照射を 30 min 行った。この際、光照射の有無により、非修飾凝集 A $\beta$  と光酸素化凝集 A $\beta$  に分類した。

酸化 A $\beta$  の作製のために、CuSO<sub>4</sub> (25  $\mu$ M; FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation)、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (250  $\mu$ M; FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) を 2% DMSO/PBS 溶液中の A $\beta$  に加え、24 時間室温でインキュベートした。

### E-2 マウス脳の摘出・保存方法

マウスをイソフルランにより麻酔後、10 mL の PBS (8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 2 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 130 mM NaCl) で還流し、断頭して脳を摘出した。

生化学的解析のために、液体窒素で一時的に凍結させ、 $-80^\circ\text{C}$ で保存した。

### E-3 マウス脳ライセートの作製

摘出したマウス脳の重量の測定後、10 倍量 (v/w) の PBS を加え、ホモジナイズした。sonication (Output : 2, Duty Cycle 90, 30 sec) した後、100-150  $\mu\text{L}$  ずつ分注し、 $-80^\circ\text{C}$ で保存した。

### E-4 マウス脳ライセートの *in vitro* 光酸素化

前述の通り、ホモジナイズし凍結保存した脳ライセートを融解し、光酸素化触媒を加えた。その後、660 nm の光を LED パネルを用いて照射した。

### E-5 ヒト脳ライセートの作製

アルツハイマー病患者 (age: 49, postmortem interval: 16 hrs) と健常者 (age: 47, postmortem interval: 12 hrs) 由来の側頭皮質に、それぞれ 10 倍量 (v/w) の TS buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, cOmplete EDTA+ (Merck Millipore)) を加え、ホモジナイズした。sonication (Output : 2, Duty Cycle 90, 30 sec) した後、100-150  $\mu\text{L}$  ずつ分注し、 $-80^\circ\text{C}$ で保存した。

### E-6 ヒト脳ライセートの *in vitro* 光酸素化

前述の通り、ホモジナイズし凍結保存した脳ライセートを融解し、光酸素化触媒を加えた。その後、660 nm の光を LED パネルを用いて照射した。

### E-7 マウス脳に対するガイド挿入手術

マウスにソムノペンチル (共立製薬) (PBS : ソムノペンチル=9 : 1) を注射針を用いて腹腔内投与し、麻酔を施した。マウス脳を固定し、頭部皮下にリドカイン (アストラゼネ

カ) を注入し、部分麻酔も行った。首から眼瞼にかけて皮膚を切開後、余分な水分をふき取った。ブレグマを中心に AP: -2.0 mm, ML: -1.5 mm の座標にドリルを用いて穴を開けた。その後、ガイドの先端が脳表に触れる位置から DV: -1.3 mm にガイド (Invivo1) を挿入した。歯科用セメント (GC) を用いてガイドを固定後、医療用糸を用いて皮膚を縫合した。

#### E-8 光酸素化触媒の注入と光刺激 (*in vivo* 光酸素化)

ガイド挿入後 2 日以上おいたマウスに対して、ソムノペンチルで麻酔した。ガイドを通して針を差し込み、光酸素化触媒を 50  $\mu$ M/PBS, 0.30  $\mu$ L/min, 15 min インジェクションし、1 分間静置した。次に、同じくガイドを通して光ファイバー (doric) を挿入し、635 nm, 1.5-1.7 mW, 30 min 照射した。その後、マウスをケージに戻し、麻酔から回復するのを確認した。以上の工程を一日一回、計 7 回行った後、前述の方法で脳を摘出し、インジェクション部位である海馬の前方領域 (全海馬の半分) を反対側の左海馬と共に取り出し、-80°C で保存した (図 9)。

#### E-9 野生型マウス脳内への A $\beta$ injection 実験

先述の通り、ソムノペンチル・リドカインにより麻酔後、ブレグマを中心に AP: -2.0 mm, ML:  $\pm$ 1.5 mm の座標にドリルを用いて穴を開けた。その後、ガイドの先端が脳表に触れる位置から DV: -1.7 mm に注射針を挿入し、0.3  $\mu$ L/min の速さで 4.5  $\mu$ L ずつ左右海馬に非修飾凝集 A $\beta$  と光酸素化凝集 A $\beta$  をインジェクションした。24 時間後インジェクション部位である両海馬の前方領域 (全海馬の半分) を摘出し、-80°C で保存した。

#### E-10 PLX3397 (CSF1R 阻害剤) の投与

PLX3397 は名古屋大学大学院創薬科学研究科の小池礼子先生、横島聡先生、福山透先生により合成されご供与いただいた<sup>69</sup>。PLX3397 を混和した食餌の作製は、Research Diets Inc. により行われた。

PLX3397 混和食餌 (290 mg/kg in AIN-76A) を既報を参考に、5 週齢の雄の C57BL/6J に 3 週間与えた後、脳を摘出し、免疫組織化学的にミクログリアの欠失を確認した<sup>70</sup>。injection 実験は、PLX3397 を 3 週間投与後前述の通りに行った。

**E-11 *in vivo* マウス脳、及びヒト AD 脳の生化学的解析のための分画操作**

マウスサンプルについては摘出した右海馬、左海馬共に質量を測定し、10 倍量 (v/w) の TS buffer を加えホモジナイズした。ヒトサンプルについては上述の通り作成したものを使用した。試料を遠心管に移し、超遠心機を用いて 260,000 x g, 20 min, 4°C で遠心し、上清を TS 画分 (可溶性画分) とした。残存したペレットに対して、2% Triton X-100 (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) /TS を先ほどと同量加えホモジナイズした。上述と同条件で超遠心し、上清を回収した。残ったペレットに対して、70% ギ酸 (FA; FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) を 200  $\mu$ L ずつ加え、sonication (Output : 2, Duty Cycle : 90, 10 sec) し、遠心管に移して超遠心した。上清を回収し、1-2 時間凍結乾燥後、脳質量と同量の DMSO に再溶解し、FA 画分 (不溶性画分) とした。

**E-12 マウスミクログリア細胞株 MG6 またはヒトニューログリオーマ細胞株 H4 を用いた A $\beta$  の取込・分解の検討**

MG6 (RCB2403) 細胞<sup>71,72</sup> は RIKEN Bioresource Center より得られた。MG6 細胞は DMEM (Thermo Fisher Scientific) + 10% fetal bovine serum (Thermo Fisher Scientific) + penicillin/streptomycin (Thermo Fisher Scientific) + 0.1 mM 2-mercaptoethanol (Merck Millipore) + 10  $\mu$ g/mL insulin (Merck Millipore) を使用し、37°C・5% CO<sub>2</sub> 下で維持された。

H4 (#HTB-148) 細胞<sup>73</sup> は ATCC より購入した。H4 細胞は DMEM + 10% fetal bovine serum + penicillin/streptomycin を使用し、37°C・5% CO<sub>2</sub> 下で維持された。細胞は 24 well plate に 1.0  $\times 10^5$ /well でまかれ、一晩インキュベート後実験を行った。

取込の検討は以下の通り行った。MG6 細胞培地に 500 nM の非修飾凝集 A $\beta$  または光酸素化凝集 A $\beta$  を加え、3 時間後までインキュベートした。

分解の検討は以下の通り行った。MG6 細胞培地に 500 nM の非修飾凝集 A $\beta$  または光酸素化凝集 A $\beta$  を加え、1 時間インキュベート後、PBS で wash、培地交換を行い、24 時間後までインキュベーションした。Leupeptin (50  $\mu$ M, Merck Millipore) は培地交換の際に加えられた。

**E-13 SDS-PAGE のためのサンプル調製**

A $\beta$  ペプチドは超遠心機を用いて 260,000 x g, 20 min, 4°C で遠心し、上清を回収し、sample buffer (1% 2-mercaptoethanol (Merck Millipore), 2% SDS (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation), 80 mM Tris-HCl pH 6.8 (Invitrogen), 15% glycerol (FUJIFILM Wako Pure Chemical



Corporation), Brilliant green (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation), Coomassie blue G-250 (Nakarai tesque)) を加えた。ペレットも PBS で回収し、sample buffer を加えた。両サンプル共に 100°C で 5 分間 boil したものを SDS-PAGE 用サンプルとした。

マウス脳ライセートは光酸素化反応後、終濃度が 70% となるようにギ酸を加え、sonication (Output : 2, Duty Cycle 90, 30 sec) した。凍結乾燥後、DMSO に溶解し、9 倍量の 1×sample buffer を加えた。100°C で 5 分間 boil したものを SDS-PAGE 用サンプルとした。

MG6 細胞は sample buffer により回収し、100°C で 5 分間 boil したものを SDS-PAGE 用サンプルとした。

*in vivo* サンプルに関しては、TS 画分、FA 画分共に BCA アッセイキットを用いてタンパク量を定量した。TS サンプルには sample buffer の終濃度が 1 となるように調製した。FA サンプルには 9 倍量の 1×sample buffer を加えた。両サンプル共に、100°C で 5 分間 boil したものを SDS-PAGE 用サンプルとした。

#### E-14 SDS-PAGE

目的のタンパク質の大きさに応じて、以下の組成のゲルを使用した。

Tris/Glycine gel 10% :  $\alpha$ -tubulin, Tris/Tricine gel 15% : A $\beta$

Tris/Glycine ゲルは、Running buffer (250 mM Tris base, 2 M Glycine, 1% SDS) を用いた。

Tris/Tricine ゲルは陽極 buffer (2 M Tris base pH8.9)、陰極 buffer (1 M Tris base, 1 M Tricine, 1% SDS) を用いた。stacking gel は 50 V, 30 min、running gel は 120 V, 40 min で泳動した。分子量マーカーには、Precision Plus Protein Standards dual color (Bio-Rad, California, USA) を用いた。本マーカーは 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15, 10, 5, 2 kDa の分子量が検出される。

#### E-15 ウェスタンブロッティング (WB) による解析

SDS-PAGE 後、タンパク質を 250 mA, 120 min の電流で PVDF membrane (Merck Millipore) に転写した。転写後、A $\beta$  を検出する際にはメンブレンを PBS で 5 分間煮沸した。次に 5% スキムミルク (DIFCO) を含む 0.1% Tween 20/TS (TS-Tween ; 関東化学) にメンブレンを浸し、30 min ブロッキングを行った。TS-Tween で wash 後、TS-Tween あるいは、Immuno-enhancer Reagent A (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) で一次抗体を希釈し、4°C で一晩振盪した。TS-Tween で 3 回 wash 後、TS-Tween あるいは Immuno-enhancer Reagent B (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) で二次抗体を希釈し、室温で 1 時間振盪した。TS-Tween で 3 回 wash 後、イムノスター (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) あるいは SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific) によ

って発色し、Image Quant LAS4000 (GE Healthcare) を用いて検出した。

## F MALDI-TOF-MS (MS) による解析

A $\beta$  ペプチドは前述の PBS に溶解したものを分取し MS 用サンプルとした。App<sup>NL-G-F/NL-G-F</sup> の脳ライセートは PBS 溶液に、終濃度が 70% (v/v) となるように FA を加え、sonication (Output : 2, Duty Cycle : 90, 10 sec) した。次に、凍結乾燥により溶媒を乾燥させ、6 M 尿素溶液で再溶解したものを MS 用サンプルとした。

それぞれの MS 用サンプルに対し、次の精製操作を行った。逆相カラムの詰まった Ziptip  $\mu$ -C18 (Merck Millipore) をピペットマンに装着し、10  $\mu$ L のアセトニトリル (ACN) を吸いカラムを洗浄後、液を捨てた。同様に 0.1% トリフルオロ酢酸 (TFA) でカラムを洗浄した。続いて、MS 用サンプル内でピペッティングを繰り返し、タンパク質をカラムに吸着させた。再び 0.1% TFA でカラムを洗浄した。MS plate に、ACN/0.1% TFA = 1 溶液に終濃度が 10  $\mu$ g/ $\mu$ L となるように 2-Cyano-3-(4-hydroxyphenyl)acrylic Acid (Merck Millipore) を溶解したマトリックス溶液を乗せ、ピペッティングによりカラム上のタンパク質をマトリックスと混和させた。ドライヤーを用いて溶媒を乾燥させた後、MALDI-TOF-MS (Shimadzu) により解析を行った。

## G 免疫細胞化学的解析

本実験には、蛍光物質に標識された合成 A $\beta$  ペプチドを使用した。HilyteFluor488-labeled 凝集 A $\beta$  を作成するため、標識のない A $\beta$  と HilyteFluor488-labeled A $\beta$  (anaspec) を 20 : 1 の割合で混ぜ、2 時間 37°C でインキュベートした。その後、E-1 の通り光酸素化触媒を加えて、光照射し HilyteFluor488-labeled 光酸素化凝集 A $\beta$  を作成した。

MG6 細胞は  $2.0 \times 10^5$  cells/well にて glass coverslip の上にまかれ、一晚インキュベートした。その後、500 nM の HilyteFluor488-labeled 光酸素化凝集 A $\beta$  を 1 時間培地中に加え、wash し培地交換後、さらに 3 時間インキュベートした。その後 4% PFA/PBS で固定し、PBS にて wash、浸透化のために 0.1% Triton X-100/PBS で 5 分間インキュベートし、10% normal donkey serum にて 30 分間ブロッキングを行った。一次抗体液にて 1 時間インキュベート後、二次抗体液でインキュベートし、ProLong Diamond (Thermo Fisher Scientific) にて封入し、super-resolution microscopy (ZEISS LSM980 with Airyscan 2 detector) にて観察を行った。

## H 免疫組織化学的解析

還流後全脳を摘出し、4% PFA/PBS で 24 時間室温で振盪後、PBS で wash し、30% sucrose 溶液に置換した。48 時間室温で振盪後、4℃にて保存した。30% sucrose (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) 溶液から脳を取り出し、ミクロトームにて 30  $\mu$ m 厚の凍結切片を作成した。切片は 30%グリセロール (FUJIFILM WAKO PURE CHEMICAL CORPORATION) /PBS に入れ、-30℃で保存した。

脳切片にブロッッキング溶液を加え室温で 30 分インキュベート後、一次抗体液に浸し、4℃にて一晩インキュベートした。その後 PBS で wash し、二次抗体液に浸し、室温にて 1 時間インキュベートした。PBS で wash 後封入し、confocal microscope (TCS-SP5, Leica) にて観察を行った。

## F 抗体・試薬関連

ウェスタンブロッティング、組織免疫染色には以下の抗体を用いた。

抗 A $\beta$  抗体

82E1 (マウスモノクローナル抗体) : A $\beta$  N 末端 (IBL) (2500 倍希釈で使用)

抗  $\alpha$ -tubulin 抗体

DM1A (マウスモノクローナル抗体) (Merck Millipore) (2500 倍希釈で使用)

抗チロシンダイマー抗体

1C3 (マウスモノクローナル抗体) (Japan institute for the Control of Aging, NIKKEN SEIL. Co, Ltd.) (1000 倍希釈で使用)

ウェスタンブロッティング用二次抗体

Peroxidase AffiniPure Sheep Anti-Mouse IgG (H+L) (Jackson Immuno Research Laboratories) (5000 倍希釈で使用)

抗ミクログリアマーカー抗体

抗 Iba1 (019-19741、ラビットモノクローナル抗体) (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) (1000 倍希釈で使用)

抗リソソームマーカー抗体

抗 CD68 (ラットモノクローナル抗体) (Bio-Rad) (100 倍希釈で使用)

細胞免疫染色用二次抗体

抗ラット IgG 抗体 (Alexa Fluor 546 conjugated anti-rat IgG) (Thermo Fisher Scientific) (500 倍希釈で使用)

組織免疫染色用二次抗体

抗ラビット IgG 抗体 (Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (H+ L)) (Invitrogen) (1000 倍希釈で使用)

### III 結果

#### A *in vitro* 光酸素化後の A $\beta$ の MALDI-TOF-MS 解析

まず初めに、野生型合成 A $\beta$  ペプチドに対する光酸素化を行った。あらかじめ 37°C で一晩インキュベートし凝集させた野生型合成 A $\beta$  ペプチドに対し、10  $\mu$ M の光酸素化触媒を加え、660 nm の光照射を 30 分行う光酸素化により、MALDI-TOF-MS において、分子量が 16、32、48、64 Da 増加した A $\beta$  のシグナルが検出されたことから、A $\beta$  が酸素付加されたと考えられた (図 10)。しかし、AD モデルマウス脳内で凝集・蓄積している A $\beta$  に対して光酸素化が進行するかは不明であった。そこで、アミロイド蓄積が認められる *App*<sup>NL-G-F/NL-G-F</sup> マウスの脳ライセートを用いて検討した。7 ヶ月齢の雄マウスの脳ライセートに、50  $\mu$ M の光酸素化触媒を添加し、660 nm の光照射を 4 時間行った。MALDI-TOF-MS により解析を行った結果、A $\beta$  ペプチドを用いた時と同様に、AD モデルマウスの A $\beta$  においても酸素付加体シグナルが検出された (図 11)。このことから、*App*<sup>NL-G-F/NL-G-F</sup> マウス脳内の A $\beta$  に対しても光酸素化が可能であることが示唆された。

#### B *in vitro* 光酸素化反応後のウェスタンブロッティング (WB) 解析

これまで、光酸素化の進行は MALDI-TOF-MS を用いた検討でのみ確認されていた。しかし、A $\beta$  に対する酸素修飾が、A $\beta$  に構造的・質的变化をもたらす可能性が考えられることから、WB 解析によっても光酸素化の進行を検出できるのではないかと推測した。

野生型合成 A $\beta$ 42 ペプチドに対する光酸素化により、抗 A $\beta$  抗体を用いた検出において、光酸素化特異的に単量体 A $\beta$  と考えられる 5 kDa のバンドが減少した。加えて、10 kDa 辺りのバンドの反応性が増加した (図 12A)。今後、このペプチドを 10 kDa oxy-A $\beta$  として定義する。

この 10 kDa oxy-A $\beta$  が 10 番目のチロシンを介したクロスリンク体であることを確認するため、以下の実験を行った。

チロシンを介したクロスリンク体は、過酸化水素と銅により形成されることが知られている<sup>74</sup>。そしてこのクロスリンク体は抗チロシンダイマー抗体により検出可能であった。本抗体を光酸素化 A $\beta$  に対しても使用することで、10 kDa oxy-A $\beta$  構造の解明を目指した。

その結果、10 kDa oxy-A $\beta$  は本抗体により検出されなかった (図 12B)。このことから、10 kDa oxy-A $\beta$  は酸化により形成される A $\beta$  dimer とは異なる構造体であることがわかった。

また、この 10 kDa oxy-A $\beta$  は *App*<sup>NL-G-F/NL-G-F</sup> マウス、APP/PS1 マウスの脳ライセートに対

する光酸素化においても、反応特異的に確認された (図 13)。以上のことから、光酸素化が凝集 A $\beta$  の構造あるいは生化学的性質の変化を引き起こしたことが示唆された。

また重要なことに、ヒト AD 脳由来の A $\beta$  に対する光酸素化においても 10 kDa oxy-A $\beta$  は観察された (図 14)。このことは、孤発性 AD 患者に蓄積する A $\beta$  に対しても光酸素化が進行可能であることを示している。

### C *in vivo* 複数回光酸素化のウェスタンブロッティング解析

*App*<sup>NL-G-F/NL-G-F</sup> マウスの脳ライセート中の A $\beta$  に対しても光酸素化が可能であることが示されたが、*in vivo* においても光酸素化を引き起こせるかは不明であった。さらに、上述の通り光酸素化が A $\beta$  の生化学的性質を変化させていることが考えられることから、その体内動態にも変化が生じる可能性が予想される。この仮説を検証するため、図 9 に示すように、右海馬に挿入したガイドを通して光酸素化反応を複数回行う *in vivo* 光酸素化を行った。触媒は PBS で 50  $\mu$ M に希釈し、4.5  $\mu$ L の触媒を 15 分かけて右海馬に投与後、光ファイバーにて 30 分間光刺激を行った。コントロールとして、反対側の左海馬には手術を行わず、左海馬に対する右海馬の A $\beta$  量比を WB により得られたバンドの densitometry から定量した (図 15)。TS 画分には、可溶性の A $\beta$  が含まれており、モノマーや可溶性オリゴマーが存在する。FA 画分には不溶性の A $\beta$  が含まれており、凝集し線維化した A $\beta$  が存在する。

まず、不溶性の A $\beta$  が含まれる FA 画分において、10 kDa oxy-A $\beta$  が検出された。このことは、生きたマウス脳内においても光酸素化が進行したことを示唆している。また、光酸素化を行ったマウス群では、触媒の投与のみで光照射を行わなかったマウス群に比べ、TS 画分・FA 画分共に A $\beta$  量が有意に減少した。このことは、光酸素化により可溶性のモノマーやオリゴマー、不溶性の凝集 A $\beta$  共に代謝が促進された可能性を示唆している。

### D 野生型マウス脳内インジェクションによる光酸素化凝集 A $\beta$ の代謝検討

光酸素化された凝集 A $\beta$  の代謝を確認するため、合成 A $\beta$  ペプチドを凝集させ、予め光酸素化を行った上で野生型マウスの右海馬へインジェクションした (図 16)。コントロールとして、左海馬に非修飾凝集 A $\beta$  をインジェクションし、24 時間後に残存する A $\beta$  量を検討した。検討は、5 kDa、10 kDa A $\beta$  分子種について行った。またこの際、非修飾凝集 A $\beta$  と光酸素化凝集 A $\beta$  を野生型マウス脳ライセートと混和し、分画操作・WB 解析したものを規格化用に準備した。

その結果、光酸素化した場合に TS 画分、FA 画分共に 5 kDa、10 kDa A $\beta$  分子種の残存量が著減した (図 17)。このことから、光酸素化は可溶性オリゴマーや、不溶性の凝集 A $\beta$  共

にその代謝を促進させることが確認された。

## E ミクログリア欠失マウス脳内での光酸素化凝集 A $\beta$ の代謝検討

光酸素化凝集 A $\beta$  の代謝亢進に脳内免疫担当細胞であるミクログリアが関与する可能性を考えた。ミクログリアは凝集 A $\beta$  を細胞内に取り込み、endolysosomal pathway を介して分解することが知られている。

そこで、野生型マウス脳内のミクログリアを薬理的に欠失させる目的で、CSF1R 阻害剤である PLX3397 混和食餌を 3 週間与えた。ミクログリアが欠失したことは、免疫組織化学的に解析を行い確認した (図 18)。

ミクログリア欠失マウスに対して、前述の通り非修飾凝集 A $\beta$  と光酸素化凝集 A $\beta$  をインジェクションし、24 時間後に残存する A $\beta$  量について検討した (図 19)。

その結果、FA 画分において PLX3397 投与により、インジェクション 24 時間後に残存する光酸素化凝集 A $\beta$  と非修飾凝集 A $\beta$  の比が上昇した (図 20C、D)。このことから、PLX3397 の投与により、不溶性の光酸素化凝集 A $\beta$  の代謝亢進が阻害されたことが明らかとなった。

また、TS 画分においては PLX3397 投与により、インジェクション 24 時間後に残存する光酸素化凝集 A $\beta$  と非修飾凝集 A $\beta$  の比に変化はなかった (図 20A、B)。このことから、PLX3397 の投与は、可溶性の光酸素化凝集 A $\beta$  の代謝亢進に影響を与えないことが明らかとなった。

以上のことから、不溶性の光酸素化凝集 A $\beta$  の代謝亢進にはミクログリアが関与すること、また可溶性の光酸素化凝集 A $\beta$  の代謝亢進にはミクログリア以外の代謝経路が関与することが示唆された。

## F マウスミクログリア細胞株 MG6 を用いた光酸素化凝集 A $\beta$ の代謝亢進機構の解析

ミクログリアによる光酸素化凝集 A $\beta$  の代謝亢進機構を詳細に解析するため、マウスミクログリア培養細胞株である MG6 細胞を用い解析を行った。

まず光酸素化の A $\beta$  取込過程における影響を検討するため、光酸素化凝集 A $\beta$  を培地に添加し、時間経過毎に細胞内に取り込まれた A $\beta$  量を確認した (図 21A)。検討はこれまでと同様に 5 kDa、10 kDa A $\beta$  分子種について行った。またこの際、非修飾凝集 A $\beta$  と光酸素化凝集 A $\beta$  を細胞に投与せずそのまま WB 解析したものを規格化用に準備した。

その結果、光酸素化の有無による凝集 A $\beta$  の細胞内取込量に差は見られなかった (図 21B、C)。

また免疫細胞化学的解析から、光酸素化凝集 A $\beta$  が CD68 陽性のリソソームと共局在する

ことが明らかとなったので (図 22)、光酸素化により細胞内での分解が亢進した可能性について検討した。まず光酸素化凝集 A $\beta$  を培地に添加 1 時間後に培地を交換し、時間経過毎に細胞内に残存する A $\beta$  量を観察した (図 23A)。

その結果、非修飾凝集 A $\beta$  と比較して光酸素化凝集 A $\beta$  の細胞内残存量は有意に減少した (図 23B、C)。さらに、この光酸素化凝集 A $\beta$  の代謝亢進は、主要な lysosome プロテアーゼに対する阻害剤である leupeptin の投与により完全に消失した (図 24)。それに加えて、光酸素化凝集 A $\beta$  の代謝亢進は、ヒトアストロサイトーマである H4 細胞内では観察されなかった (図 25)。

これらのことから、光酸素化は凝集 A $\beta$  の細胞内取込過程に影響は与えないが、細胞内での endolysosomal pathway を介した分解過程に影響すること、ならびにこの代謝亢進にはアストロサイトではなくミクログリアが重要な役割を果たすことが示唆された。



## IV 考察

### A 本結果のまとめ

*App*<sup>NL-G-F/NL-G-F</sup>マウスの脳ライセートに対して光酸素化を行った結果、MALDI-TOF-MS 解析にて酸素付加体シグナルが検出されたこと、加えて 10 kDa oxy-A $\beta$  が検出されたことから、光酸素化が A $\beta$  の構造を変化させ、生化学的性質を変えていることが示唆された。この 10 kDa oxy-A $\beta$  はヒト AD 脳ライセートを光酸素化した際にも確認された。すなわち、ヒト AD 脳に蓄積した A $\beta$  についても光酸素化が可能であることが示唆された。*in vivo* において光酸素化により A $\beta$  量が減少したことは、この生化学的性質の変化に起因する可能性が考えられる。そこでモデルマウスおよび培養細胞系での解析により、光酸素化凝集 A $\beta$  の代謝亢進にミクログリアが関与することが明らかとなり、その代謝亢進機構として、endolysosomal pathway を介した細胞内分解が寄与することが示唆された（図 26）。

本触媒による A $\beta$  の光酸素化では、10 番目の tyrosine、13、14 番目の histidine、35 番目の methionine が酸素修飾を受ける。一般的に、histidine の酸素化はタンパク質のクロスリンクや不活化を誘導することが知られている<sup>75</sup>。光酸素化により生じた 10 kDa oxy-A $\beta$  やスミアバンドは抗チロシンダイマー抗体で認識されなかったことと合わせて考慮すると、histidine の酸素修飾が構造変化を引き起こした可能性が考えられる。さらに、ヒト AD 脳における老人斑の解析から、methionine が酸素化された A $\beta$  は観察されるが、histidine が酸素化されたものは発見されていない<sup>76</sup>。このことから、histidine が酸素化された A $\beta$  はヒト AD 脳内で代謝された可能性が示唆される。

また、本研究により明らかとなったミクログリアによる光酸素化凝集 A $\beta$  の分解促進機構に関して、2つの仮説を考えている。

1 つ目は、光酸素化凝集 A $\beta$  の刺激に伴い、ミクログリアの性質が変化することで A $\beta$  の代謝を促進した可能性である（図 27A）。A $\beta$  の刺激に伴い、ミクログリア内の A $\beta$  分解酵素である cathepsin B の発現量が上昇することが知られている<sup>77</sup>。また、リソソームの酸性化が引き起こされ、A $\beta$  分解に適した環境が構築される<sup>78</sup>。His の酸素化に伴い、上記に関わる受容体との親和性が変化し、最終的なシグナル応答が変化することでこれらの過程が促進した可能性が考えられる。

2 つ目は、光酸素化による凝集 A $\beta$  の構造変化が、特定の分解酵素との親和性を高めることで、分解亢進に至った可能性である（図 27B）。上記の cathepsin B に加えて、ミクログリア内セリンプロテアーゼである tripeptidyl peptidase 1 (TPP1) が、凝集 A $\beta$  を分解できることが知られている<sup>79</sup>。光酸素化により、His に対して親水基の酸素が付加されることで、凝集 A $\beta$  の疎水性が低下し、凝集 A $\beta$  の構造・生化学的性質の変化が生じたことが予想され、

この変化を通じて既知の A $\beta$  分解酵素との親和性が上昇した可能性が考えられる。また、ヒトアストロサイトマ細胞株 H4 では光酸素化凝集 A $\beta$  の代謝亢進が確認されなかったことから、リソソーム内分解酵素の発現量や種の違いを検討することで、光酸素化凝集 A $\beta$  を選択的に分解する酵素が発見できるかもしれない。

また本実験から、光酸素化が可溶性 A $\beta$  の代謝も亢進させる一方で、この機構にはミクログリアが関与しないことが明らかとなった。このことは、別の A $\beta$  代謝経路が、光酸素化可溶性 A $\beta$  の代謝亢進に関与することを示唆している（図 28）。その経路の一つに血液脳関門を介した末梢への排出機構が考えられる。A $\beta$ 42 よりも疎水性アミノ酸の 2 つ少ない A $\beta$ 40 が LRP1 を介してより速く末梢へ排出されることが知られている<sup>18,80</sup>。光酸素化は His に親水基の酸素を付加することで、A $\beta$ 42 の疎水性を低下させ、受容体との親和性を高めた結果末梢への排出を促進させた可能性が考えられる。その他にも glymphatic/lymphatic systems を介した排出<sup>81</sup>、分泌型 A $\beta$  分解酵素による分解等に関与した可能性も否定できず<sup>82,83</sup>、これらが不溶性の光酸素化凝集 A $\beta$  の代謝亢進についても関与した可能性も考えられる。今後詳細な解析によって、光酸素化による A $\beta$  代謝亢進の分子機構を明らかにしていきたい。

本研究では光ファイバーの挿入や開頭した上で光酸素化触媒を投与することで A $\beta$  の光酸素化を達成している。このような手法は非常に侵襲性が高く、そのまま脳全体を対象とした治療法としての開発は困難である。そこで、非侵襲的な方法での光酸素化を目指して、血液脳関門透過可能な光酸素化触媒が開発された (Nagashima *et al.*, 2020 under revision)。本触媒を用いた非侵襲的な光酸素化により、AD モデルマウス海馬の A $\beta$  蓄積量が減少することが確認された（図 29）。

AD 発症プロセスにおいて、大脳皮質の凝集 A $\beta$  が重要な役割を果たすことが知られている<sup>84</sup>。また最近、大脳皮質の凝集 A $\beta$  が、もう一つの病理であるタウ蓄積の広がりにも寄与することが AD モデルマウスの検討により明らかとなった。このことから、大脳皮質の凝集 A $\beta$  量を減らすことができれば AD 病態の進行を抑制できる可能性が示唆され、脳表に光を到達させられれば、光酸素化が AD の予防・治療に有効であると考えられる。そこで、より生体透過性の高い近赤外光が利用できる光酸素化触媒の開発も行われている<sup>85</sup>。さらに現在、脳の深部での酸素化を目指し、超音波を用いた酸素化についても検討中である<sup>86,87</sup>。実際に本方法でも A $\beta$  を酸素化することに成功しており、今後の発展が期待される。

また、AD 脳内ではミクログリアの活性が変化していることや、老化に伴ってミクログリアにおける遺伝子発現プロファイルが変わることが知られている。しかし抗 A $\beta$  抗体に関する知見から、AD 患者脳内で凝集 A $\beta$  量を減らせること、またモデルマウスに対する前臨床試験から、この A $\beta$  の代謝にミクログリアが関与することが示唆されている。したがって AD 患者脳内であってもミクログリアの再賦活化もしくは A $\beta$  のオプソニン化を介した A $\beta$  代謝促進のアプローチが可能であると考えられ、光酸素化の有用性が示唆される。

一方、本研究で用いられた光酸素化触媒により、タウタンパク質の凝集抑制<sup>88</sup>、パーキンソン病の原因物質であるシヌクレインの凝集抑制も可能なことが明らかとなった。加えて、

末梢性アミロイドーシスの原因であるアミリンやトランスサイレチンなども光酸素化可能な触媒が開発されている<sup>63</sup>。これら末梢性アミロイドーシスに対してはアクセスが比較的容易であることから、本触媒の活用が期待できる。今後、光酸素化触媒によるアミロイド除去を用いた疾患治療法の具体化についても、検討を進めていきたい。

## B 結語

常染色体優性遺伝形式を示す家族性 AD 家系における、*APP* 遺伝子上の点突然変異に関する多くの研究から、 $A\beta$  の凝集及び蓄積が AD 発症の原因と考える「アミロイド仮説」が支持されている。この仮説をもとに様々な治療法が考えられ、凝集  $A\beta$  を除去することが、治療戦略の一つとなり得ることが示唆されている<sup>43</sup>。この「凝集  $A\beta$  の除去」を最大限効率よく行うことのできる方法論の確立は、AD 治療の可能性をさらに広げるものと考えられる。

私は本研究において、 $A\beta$  の光酸素化に着目することにより、新たな AD 治療法の可能性を提示した。 $A\beta$  の光酸素化は  $A\beta$  の構造を変化せしめ、その凝集性と毒性を低下させることが明らかとなった。また、*in vivo* においては、凝集した  $A\beta$  並びに、可溶性のオリゴマーまで、光酸素化により除去できる可能性が示された。

以上の知見は、AD の予防・治療法として、 $A\beta$  に直接化学的修飾を加える光酸素化が有用となる可能性を示唆する。未だ不明な点が多いが、光酸素化はアミロイドの凝集・蓄積が原因となる全ての病気に対し、有効な方法論となり得る可能性がある。今後、 $A\beta$  を始めとする光酸素化タンパク質の性状・動態解析により詳細が明らかとなることを期待する。

## V 参考文献

1. Goate, A. *et al.* Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* **349**, 704–6 (1991).
2. Lichtenthaler, S. F. *et al.* Mechanism of the cleavage specificity of Alzheimer's disease gamma-secretase identified by phenylalanine-scanning mutagenesis of the transmembrane domain of the amyloid precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 3053–3058 (1999).
3. Guerreiro, R. J. *et al.* Genetic screening of Alzheimer's disease genes in Iberian and African samples yields novel mutations in presenilins and APP. *Neurobiol. Aging* **31**, 725–731 (2010).
4. Mullan, M. *et al.* A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of  $\beta$ -amyloid. *Nat. Genet.* **1**, 345–347 (1992).
5. Kamino, K. *et al.* Linkage and mutational analysis of familial Alzheimer disease kindreds for the APP gene region. *Am. J. Hum. Genet.* **51**, 998–1014 (1992).
6. Nilsberth, C. *et al.* The 'Arctic' APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced A $\beta$  protofibril formation. *Nat. Neurosci.* **4**, 887–893 (2001).
7. Jonsson, T. *et al.* A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature* **488**, 96 (2012).
8. Selkoe, D. J. & Hardy, J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol. Med.* (2016). doi:10.15252/emmm.201606210
9. McLean, C. A. *et al.* Soluble pool of A $\beta$  amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* **46**, 860–866 (1999).
10. Walsh, D. M. *et al.* Naturally secreted oligomers of amyloid  $\beta$  protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* **416**, 535–539 (2002).
11. Shankar, G. M. *et al.* Amyloid- $\beta$  protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat. Med.* **14**, 837–842 (2008).
12. Tomiyama, T. *et al.* A new amyloid  $\beta$  variant favoring oligomerization in Alzheimer's-type dementia. *Ann. Neurol.* **63**, 377–387 (2008).
13. Mawuenyega, K. G. *et al.* Decreased clearance of CNS beta-amyloid in Alzheimer's disease. *Science* **330**, 1774 (2010).
14. Madani, R. *et al.* Lack of neprilysin suffices to generate murine amyloid-like deposits in the brain and behavioral deficit in vivo. *J. Neurosci. Res.* **84**, 1871–1878 (2006).
15. Farris, W. *et al.* Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 4162–7 (2003).
16. Kidana, K. *et al.* Loss of kallikrein-related peptidase 7 exacerbates amyloid pathology in

- Alzheimer's disease model mice. *EMBO Mol. Med.* e8184 (2018).  
doi:10.15252/emmm.201708184
17. Shibata, M. *et al.* Clearance of Alzheimer's amyloid- $\beta$ 1-40peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier. *J. Clin. Invest.* **106**, 1489–1499 (2000).
  18. Deane, R. *et al.* LRP/amyloid  $\beta$ -peptide interaction mediates differential brain efflux of A $\beta$  isoforms. *Neuron* **43**, 333–344 (2004).
  19. Kang, D. E. *et al.* Modulation of amyloid  $\beta$ -protein clearance and Alzheimer's disease susceptibility by the LDL receptor-related protein pathway. *J. Clin. Invest.* **106**, 1159–1166 (2000).
  20. Matsui, T. *et al.* Expression of APP pathway mRNAs and proteins in Alzheimer's disease. *Brain Res.* **1161**, 116–123 (2007).
  21. Shinohara, M., Petersen, R. C., Dickson, D. W. & Bu, G. Brain regional correlation of amyloid- $\beta$  with synapses and apolipoprotein e in non-demented individuals: Potential mechanisms underlying regional vulnerability to amyloid- $\beta$  accumulation. *Acta Neuropathol.* **125**, 535–547 (2013).
  22. Paresce, D. M., Ghosh, R. N. & Maxfield, F. R. Microglial cells internalize aggregates of the Alzheimer's disease amyloid  $\beta$ -protein via a scavenger receptor. *Neuron* **17**, 553–565 (1996).
  23. Tahara, K. *et al.* Role of toll-like receptor signalling in Abeta uptake and clearance. *Brain* **129**, 3006–19 (2006).
  24. Mandrekar, S. *et al.* Microglia Mediate the Clearance of Soluble A $\beta$  through Fluid Phase Macropinocytosis. *J. Neurosci.* **29**, 4252–4262 (2009).
  25. Li, H. *et al.* P2Y4 receptor-mediated pinocytosis contributes to amyloid beta-induced self-uptake by microglia. *Mol. Cell. Biol.* **33**, 4282–93 (2013).
  26. Lee, S. J., Seo, B. R. & Koh, J. Y. Metallothionein-3 modulates the amyloid  $\beta$  endocytosis of astrocytes through its effects on actin polymerization. *Mol. Brain* **8**, (2015).
  27. Wang, J. *et al.* Grape-Derived Polyphenolics Prevent A $\beta$  Oligomerization and Attenuate Cognitive Deterioration in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J. Neurosci.* **28**, 6388–6392 (2008).
  28. Frautschy, S. A. *et al.* Phenolic anti-inflammatory antioxidant reversal of A $\beta$ -induced cognitive deficits and neuropathology. *Neurobiol. Aging* **22**, 993–1005 (2001).
  29. Lim, G. P. *et al.* The curry spice curcumin reduces oxidative damage and amyloid pathology in an Alzheimer transgenic mouse. *J. Neurosci.* **21**, 8370–8377 (2001).
  30. Baum, L. *et al.* Six-month randomized, placebo-controlled, double-blind, pilot clinical trial of curcumin in patients with Alzheimer's disease. *Journal of Clinical Psychopharmacology* **28**, 110–113 (2008).
  31. Kennedy, M. E. *et al.* The BACE1 inhibitor verubecestat (MK-8931) reduces CNS  $\beta$ -amyloid in

- animal models and in Alzheimers disease patients. *Sci. Transl. Med.* **8**, 363ra150-363ra150 (2016).
32. Panza, F. *et al.* BACE inhibitors in clinical development for the treatment of Alzheimer's disease. *Expert Review of Neurotherapeutics* (2018). doi:10.1080/14737175.2018.1531706
  33. Sperling, R. A., Mormino, E. C. & Johnson, K. A. The evolution of preclinical Alzheimer's disease: Implications for prevention trials. *Neuron* **84**, 608–622 (2014).
  34. Schenk, D. *et al.* Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* **400**, 173–7 (1999).
  35. Bard, F. *et al.* Peripherally administered antibodies against amyloid  $\beta$ -peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nat. Med.* **6**, 916–919 (2000).
  36. Janus, C. *et al.* A $\beta$  peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease. *Nature* **408**, 979–982 (2000).
  37. Morgan, D. *et al.* A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature* **408**, 982–985 (2000).
  38. Dodart, J. C. *et al.* Immunization reverses memory deficits without reducing brain A $\beta$  burden in Alzheimer's disease model. *Nat. Neurosci.* **5**, 452–457 (2002).
  39. Vandenberghe, R. *et al.* Active A $\beta$  immunotherapy CAD106 in Alzheimer's disease: A phase 2b study. *Alzheimer's Dement. Transl. Res. Clin. Interv.* (2017). doi:10.1016/j.trci.2016.12.003
  40. S., S. *et al.* Two phase 3 trials of Bapineuzumab in mild-to-moderate Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* (2014).
  41. Doody, R. S., Farlow, M. & Aisen, P. S. 'Phase 3 trials of solanezumab for mild-to-moderate Alzheimer's disease': Dr Doody and colleagues reply. *N. Engl. J. Med.* (2014).
  42. Honig, L. S. *et al.* Trial of Solanezumab for Mild Dementia Due to Alzheimer's Disease. *N. Engl. J. Med.* (2018). doi:10.1056/nejmoa1705971
  43. Sevigny, J. *et al.* The antibody aducanumab reduces A $\beta$  plaques in Alzheimer's disease. *Nature* **537**, 50–56 (2016).
  44. Ostrowitzki, S. *et al.* A phase III randomized trial of gantenerumab in prodromal Alzheimer's disease. *Alzheimer's Res. Ther.* (2017). doi:10.1186/s13195-017-0318-y
  45. Logovinsky, V. *et al.* Safety and tolerability of BAN2401 - A clinical study in Alzheimer's disease with a protofibril selective A $\beta$  antibody. *Alzheimer's Res. Ther.* (2016). doi:10.1186/s13195-016-0181-2
  46. A., S. *et al.* Design of a Bayesian adaptive phase 2 proof-of-concept trial for BAN2401, a putative disease-modifying monoclonal antibody for the treatment of Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia: Translational Research and Clinical Interventions* (2016).
  47. Swanson, C. J. *et al.* TREATMENT OF EARLY AD SUBJECTS WITH BAN2401, AN

- ANTI-A $\beta$  PROTOFIBRIL MONOCLONAL ANTIBODY, SIGNIFICANTLY CLEARS AMYLOID PLAQUE AND REDUCES CLINICAL DECLINE. *Alzheimer's Dement.* (2018). doi:10.1016/j.jalz.2018.07.009
48. Bateman, R. J. *et al.* The DIAN-TU Next Generation Alzheimer's prevention trial: Adaptive design and disease progression model. *Alzheimer's Dement.* (2017). doi:10.1016/j.jalz.2016.07.005
  49. Saido, T. C. *et al.* Dominant and differential deposition of distinct beta-amyloid peptide species, A beta N3(pE), in senile plaques. *Neuron* **14**, 457–466 (1995).
  50. Harigaya, Y. *et al.* Amyloid  $\beta$  protein starting pyroglutamate at position 3 is a major component of the amyloid deposits in the Alzheimer's disease brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **276**, 422–427 (2000).
  51. Schilling, S. *et al.* Glutaminyl cyclase inhibition attenuates pyroglutamate A $\beta$  and Alzheimer's disease-like pathology. *Nat. Med.* **14**, 1106–1111 (2008).
  52. Schilling, S. *et al.* On the seeding and oligomerization of pGlu-amyloid peptides (in vitro). *Biochemistry* **45**, 12393–12399 (2006).
  53. Hensley, K. *et al.* Electrochemical analysis of protein nitrotyrosine and dityrosine in the Alzheimer brain indicates region-specific accumulation. *J. Neurosci.* **18**, 8126–8132 (1998).
  54. Kummer, M. P. *et al.* Nitration of tyrosine 10 critically enhances amyloid  $\beta$  aggregation and plaque formation. *Neuron* **71**, 833–844 (2011).
  55. Kumar, S. & Walter, J. Phosphorylation of amyloid beta (A $\beta$ ) peptides - A trigger for formation of toxic aggregates in Alzheimer's disease. *Aging (Albany, NY)*. **3**, 803–812 (2011).
  56. Kumar, S. *et al.* Extracellular phosphorylation of the amyloid  $\beta$  2-peptide promotes formation of toxic aggregates during the pathogenesis of Alzheimer's disease. *EMBO J.* **30**, 2255–2265 (2011).
  57. Ashby, E. L. *et al.* Investigation of A $\beta$  phosphorylated at serine 8 (pA $\beta$ ) in Alzheimer's disease, dementia with Lewy bodies and vascular dementia. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **41**, 428–444 (2015).
  58. Näslund, J. *et al.* Relative abundance of Alzheimer A beta amyloid peptide variants in Alzheimer disease and normal aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 8378–82 (1994).
  59. Hou, L., Kang, I., Marchant, R. E. & Zagorski, M. G. Methionine 35 oxidation reduces fibril assembly of the amyloid a $\beta$ -(1-42) peptide of Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* **277**, 40173–40176 (2002).
  60. Johansson, A. S. *et al.* Attenuated amyloid- $\beta$  aggregation and neurotoxicity owing to methionine oxidation. *Neuroreport* **18**, 559–563 (2007).
  61. Dad'ová, J., Svobodová, E., Sikorski, M., König, B. & Cibulka, R. Photooxidation of Sulfides to Sulfoxides Mediated by Tetra-O-Acetylriboflavin and Visible Light. *ChemCatChem* **4**, 620–623

- (2012).
62. Taniguchi, A. *et al.* Attenuation of the aggregation and neurotoxicity of amyloid- $\beta$  peptides by catalytic photooxygenation. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **53**, 1382–1385 (2014).
  63. Taniguchi, A., Shimizu, Y., Oisaki, K., Sohma, Y. & Kanai, M. Switchable photooxygenation catalysts that sense higher-order amyloid structures. *Nat. Chem.* **8**, 974–982 (2016).
  64. Ono, M., Watanabe, H., Kimura, H. & Saji, H. BODIPY-based molecular probe for imaging of cerebral  $\beta$ -amyloid plaques. *ACS Chem. Neurosci.* **3**, 319–324 (2012).
  65. Jankowsky, J. L. *et al.* Co-expression of multiple transgenes in mouse CNS: A comparison of strategies. *Biomolecular Engineering* (2001). doi:10.1016/S1389-0344(01)00067-3
  66. Saito, T. *et al.* Single App knock-in mouse models of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci* **17**, 661–663 (2014).
  67. Arnold, S. E. *et al.* Olfactory epithelium amyloid- $\beta$  and paired helical filament-tau pathology in Alzheimer disease. *Ann. Neurol.* (2010). doi:10.1002/ana.21910
  68. Takasugi, N. *et al.* BACE1 activity is modulated by cell-associated sphingosine-1-phosphate. *J. Neurosci.* (2011). doi:10.1523/JNEUROSCI.6467-10.2011
  69. Tap, W. D. *et al.* Structure-Guided Blockade of CSF1R Kinase in Tenosynovial Giant-Cell Tumor. *N. Engl. J. Med.* (2015). doi:10.1056/nejmoa1411366
  70. Pittman Elmore, M. R. *et al.* CSF1 receptor signaling is necessary for microglia viability, which unmasks a cell that rapidly repopulates the microglia- depleted adult brain. *Neuron* (2014). doi:10.1016/j.neuron.2014.02.040
  71. Takenouchi, T., Ogihara, K., Sato, M. & Kitani, H. Inhibitory effects of U73122 and U73343 on  $\text{Ca}^{2+}$  influx and pore formation induced by the activation of P2X7 nucleotide receptors in mouse microglial cell line. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1726**, 177–186 (2005).
  72. Nakamichi, K. *et al.* Suppressive effect of simvastatin on interferon- $\beta$ -induced expression of CC chemokine ligand 5 in microglia. *Neurosci. Lett.* **407**, 205–210 (2006).
  73. Asai, M. *et al.* Efficient four-drug cocktail therapy targeting amyloid- $\beta$  peptide for Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Res.* (2010). doi:10.1002/jnr.22503
  74. Atwood, C. S. *et al.* Copper Mediates Dityrosine Cross-Linking of Alzheimer ' s Amyloid-  $\beta$  Copper Mediates Dityrosine Cross-Linking of Alzheimer ' s Amyloid-. **43**, 560–568 (2004).
  75. Gracanin, M., Hawkins, C. L., Pattison, D. I. & Davies, M. J. Singlet-oxygen-mediated amino acid and protein oxidation: Formation of tryptophan peroxides and decomposition products. *Free Radic. Biol. Med.* (2009). doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.04.015
  76. Roher, A. E. *et al.* APP/A $\beta$  structural diversity and Alzheimer's disease pathogenesis. *Neurochemistry International* (2017). doi:10.1016/j.neuint.2017.08.007
  77. Gan, L. *et al.* Identification of Cathepsin B as a Mediator of Neuronal Death Induced by A $\beta$ -activated Microglial Cells Using a Functional Genomics Approach. *J. Biol. Chem.* (2004).



- doi:10.1074/jbc.M306183200
78. Majumdar, A. *et al.* Activation of microglia acidifies lysosomes and leads to degradation of Alzheimer amyloid fibrils. *Mol. Biol. Cell* (2007). doi:10.1091/mbc.E06-10-0975
  79. Solé-Domènech, S. *et al.* Lysosomal enzyme tripeptidyl peptidase 1 destabilizes fibrillar A $\beta$  by multiple endoproteolytic cleavages within the  $\beta$ -sheet domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2018). doi:10.1073/pnas.1719808115
  80. Deane, R., Bell, R., Sagare, A. & Zlokovic, B. Clearance of Amyloid- $\beta$  Peptide Across the Blood-Brain Barrier: Implication for Therapies in Alzheimers Disease. *CNS Neurol. Disord. - Drug Targets* (2009). doi:10.2174/187152709787601867
  81. Tarasoff-Conway, J. M. *et al.* Clearance systems in the brain - Implications for Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology* **11**, 457–470 (2015).
  82. Saido, T. & Leissring, M. A. Proteolytic degradation of amyloid  $\beta$ -protein. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2**, a006379 (2012).
  83. Kikuchi, K., Kidana, K., Tatebe, T. & Tomita, T. Dysregulated Metabolism of the Amyloid- $\beta$  Protein and Therapeutic Approaches in Alzheimer Disease. *J. Cell. Biochem.* **118**, 4183–4190 (2017).
  84. He, Z. *et al.* Amyloid- $\beta$  plaques enhance Alzheimer's brain tau-seeded pathologies by facilitating neuritic plaque tau aggregation. *Nat. Med.* (2018). doi:10.1038/nm.4443
  85. Ni, J. *et al.* Near-Infrared Photoactivatable Oxygenation Catalysts of Amyloid Peptide. *Chem* (2018). doi:10.1016/j.chempr.2018.02.008
  86. Rabut, C. *et al.* Ultrasound Technologies for Imaging and Modulating Neural Activity. *Neuron* (2020). doi:10.1016/j.neuron.2020.09.003
  87. Rezai, A. R. *et al.* Noninvasive hippocampal blood–brain barrier opening in Alzheimer's disease with focused ultrasound. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2020). doi:10.1073/pnas.2002571117
  88. Suzuki, T. *et al.* Photo-oxygenation inhibits tau amyloid formation. *Chem. Commun.* (2019). doi:10.1039/c9cc01728c

図表

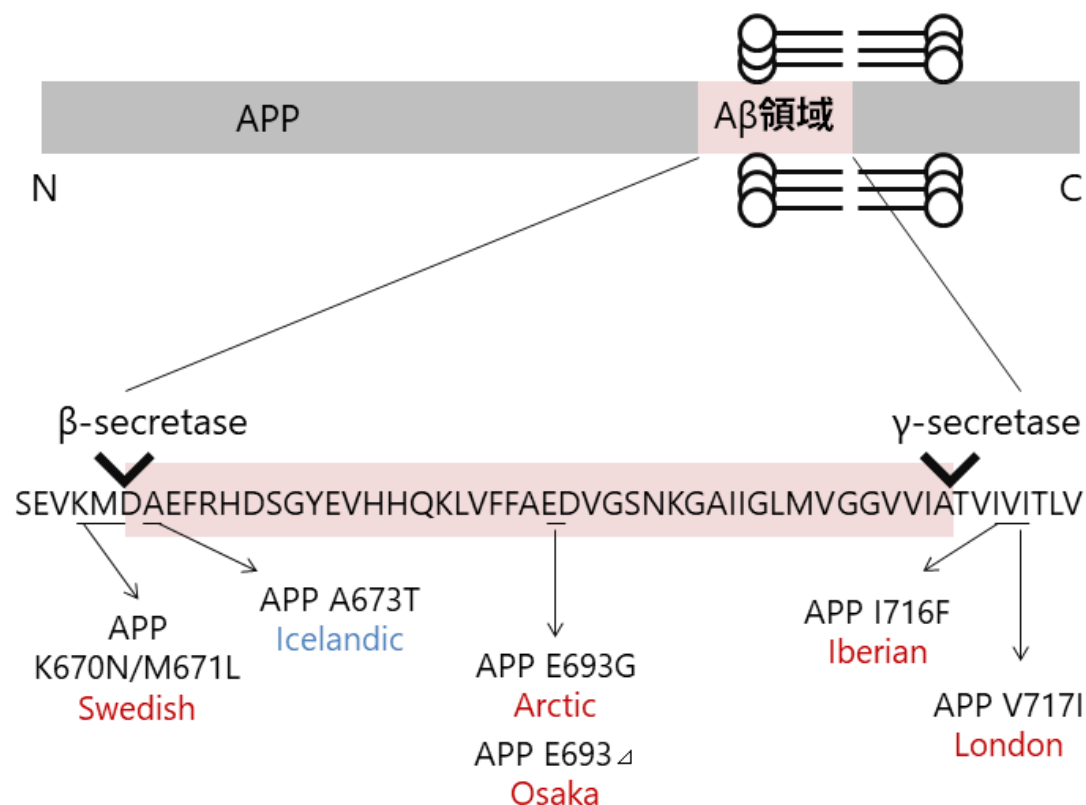


図1. Aβの産生機構と主なAPP遺伝子上の家族性AD変異

APP遺伝子上に存在するADの家族性AD変異（赤字）と、AD及び老化による認知機能低下に対して防御的に作用する変異（青字）を示した。

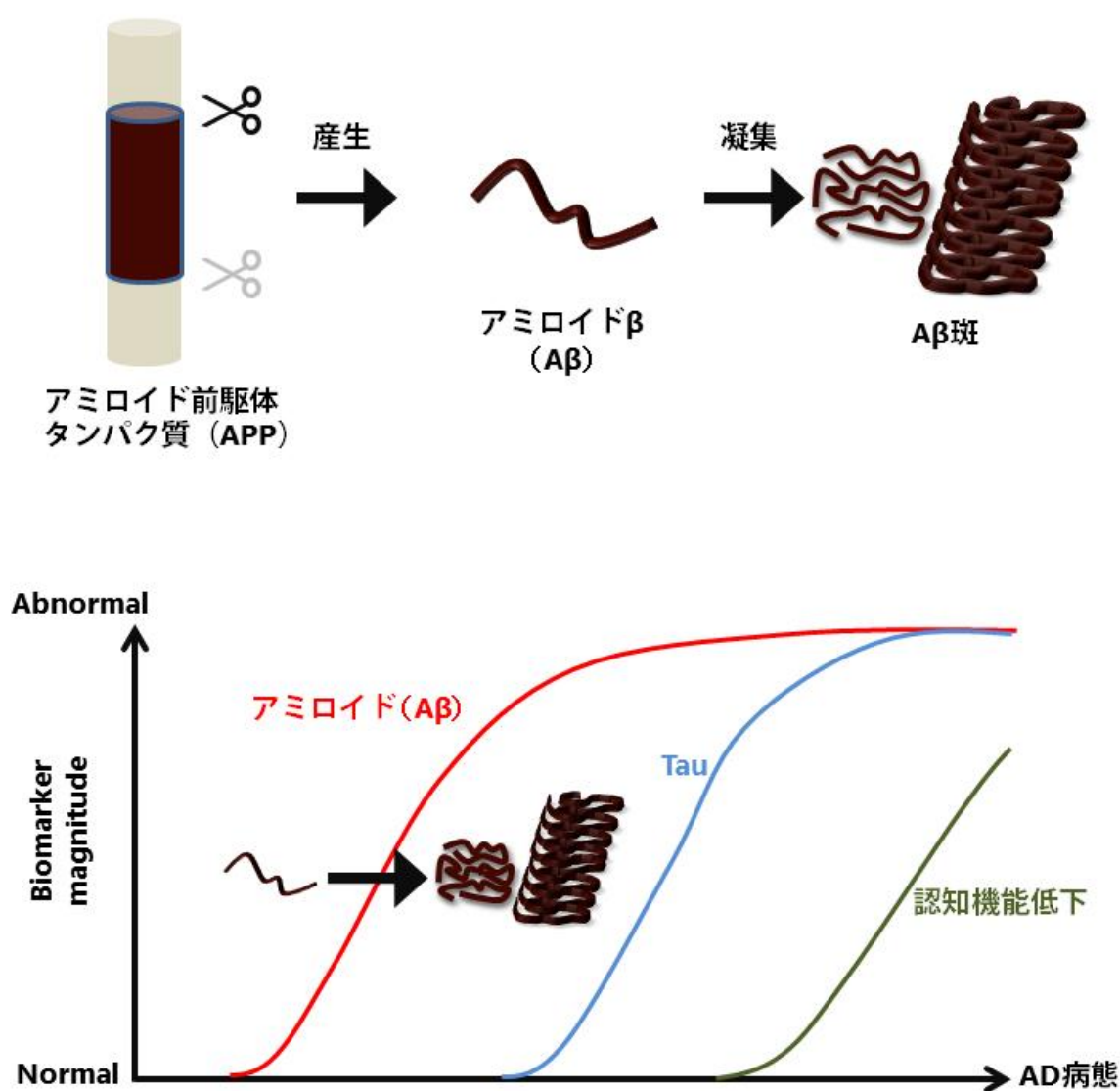
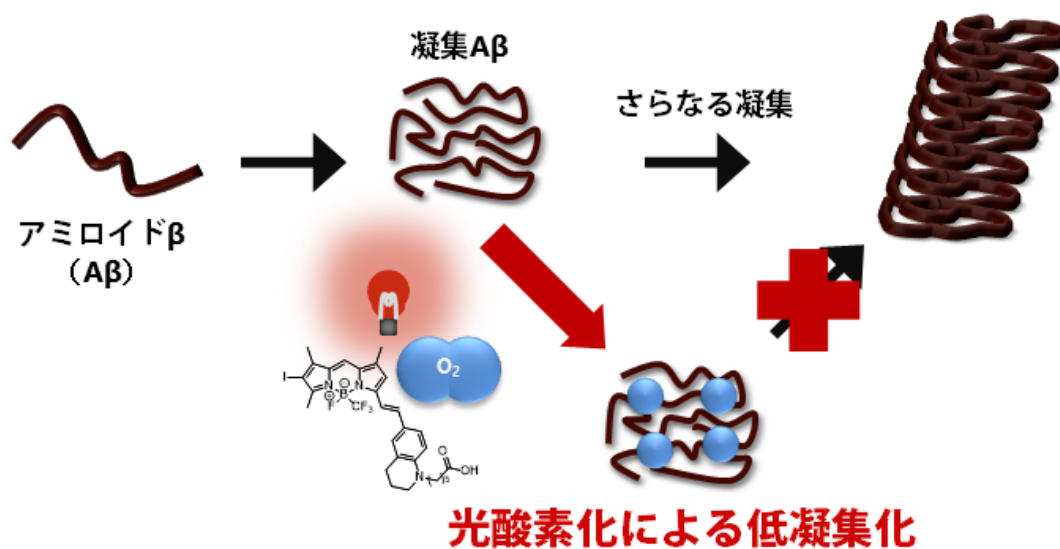


図2. アミロイド仮説

産生された $A\beta$ が凝集・蓄積することがAD発症カスケードの最上流であるとするアミロイド仮説が広く支持されている。



### 図3. 光酸化による凝集体形成制御の方法

光酸化触媒は、凝集Aβが有するcross-β sheetを認識し、そこに結合した際にのみ光刺激によってAβを酸素化する。光酸化Aβは低凝集性・低毒性であることが*in vitro*の検討により明らかになっている。

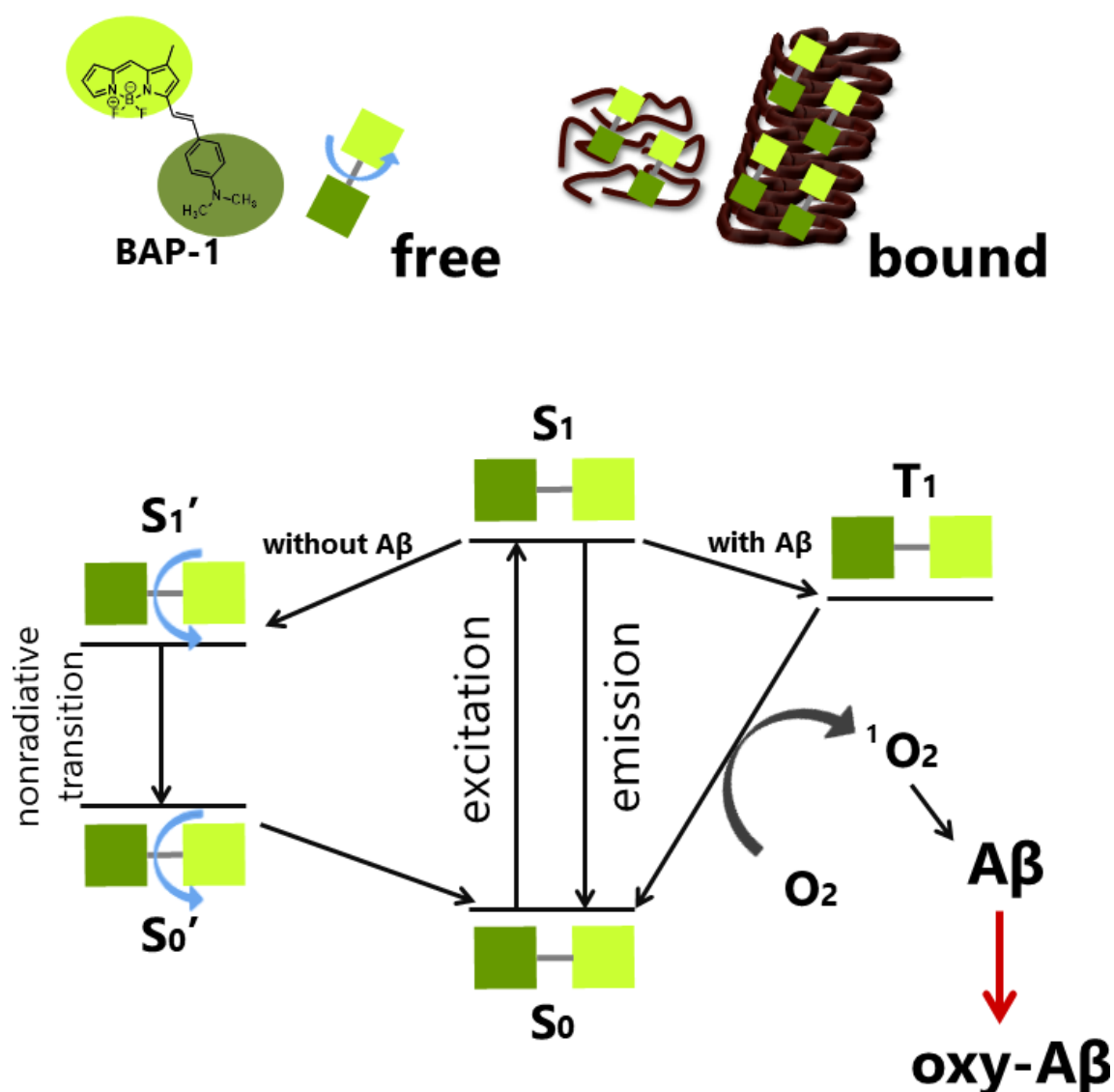
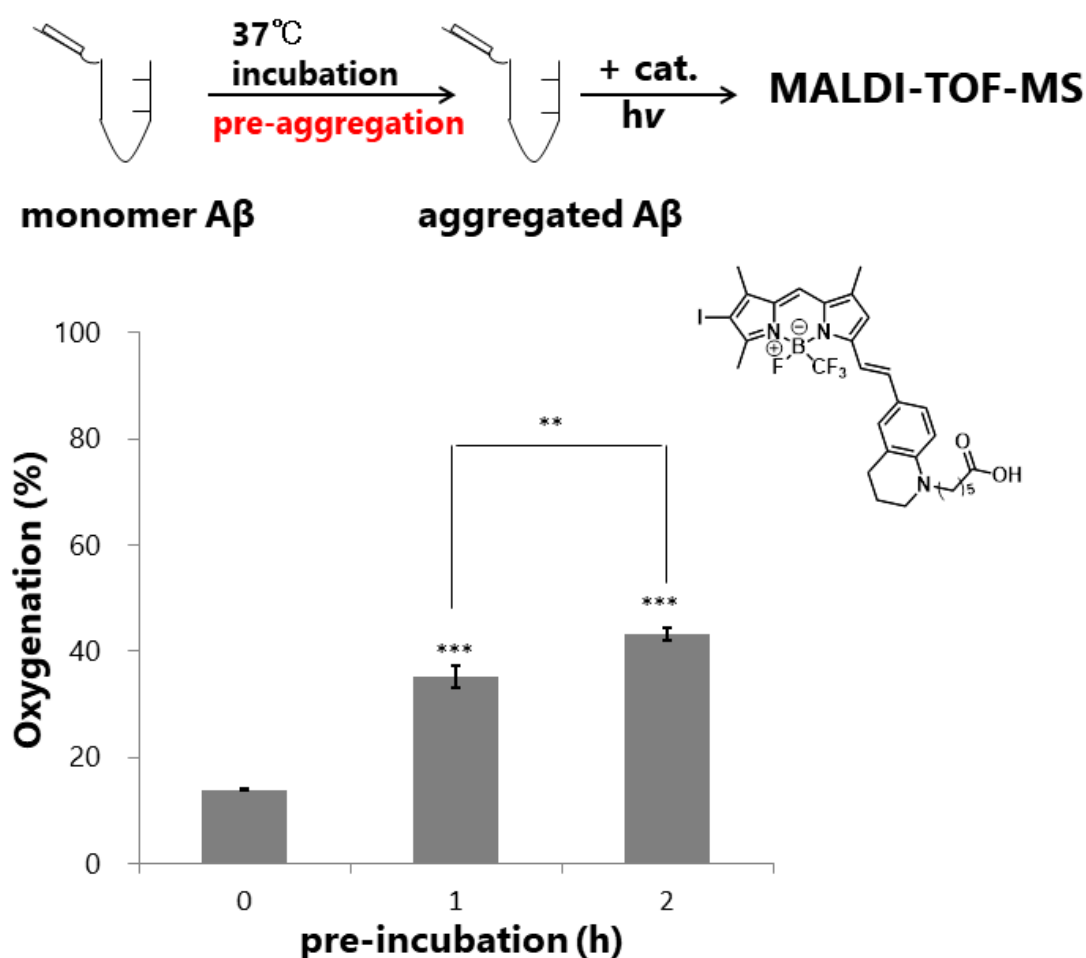


図4. 光酸素化触媒によるAβ酸素化の機構

BAP-1はAβ非存在下では、光照射により一重項励起状態 $S_1$ に励起されても、分子内の回転によりエネルギーを消費し、基底状態 $S_0$ に戻るため蛍光を発しない（左側の経路）。凝集Aβのcross-β sheet構造に結合すると、この回転が抑制され、蛍光を示す（中央の経路）。ヨウ素のような重原子は、 $S_1$ から三重項励起状態 $T_1$ への遷移確率を高め、結果として一重項状態の酸素を発生させ、Aβを酸素化する（右側の経路）。



## 図5. 凝集Aβに対する光酸素化

予めAβを凝集させた後、光酸素化を行った。このpre-aggregationが長いほど、光酸素化が促進した

(n = 3, mean  $\pm$  SD, \*\* p < 0.01 and \*\*\* p < 0.001 vs. 0 h or in the indicated pair (Tukey's test), catalyst (2.5  $\mu\text{M}$ ), A $\beta_{1-42}$  (10  $\mu\text{M}$ ) in DMEM (pH 7.4), 660 nm light (10 mW), 37°C, 15 min)。

清水裕介修士による検討

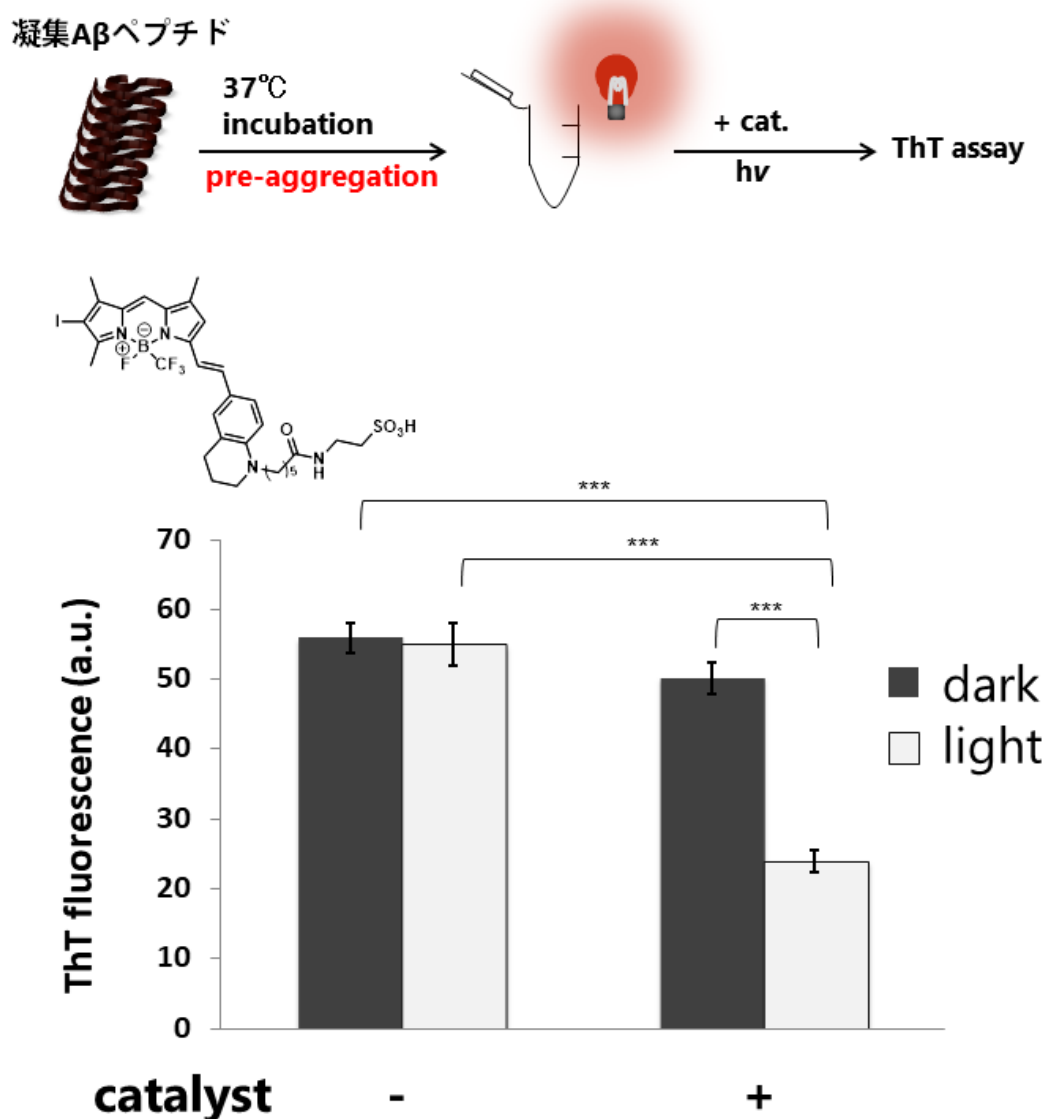


図6. 光酸素化によるAβの凝集阻害

チオフラビンT (ThT) による凝集Aβ定量評価。予め37°Cで1時間凝集させたAβに触媒を加え、660 nmの光を照射した。サンプルとThTを混合し、その蛍光を測定した。光酸素化によりAβの凝集性が低下した (n = 3, mean ± SD; \*\*\*p < 0.001 by Tukey's test)。

清水裕介修士による検討

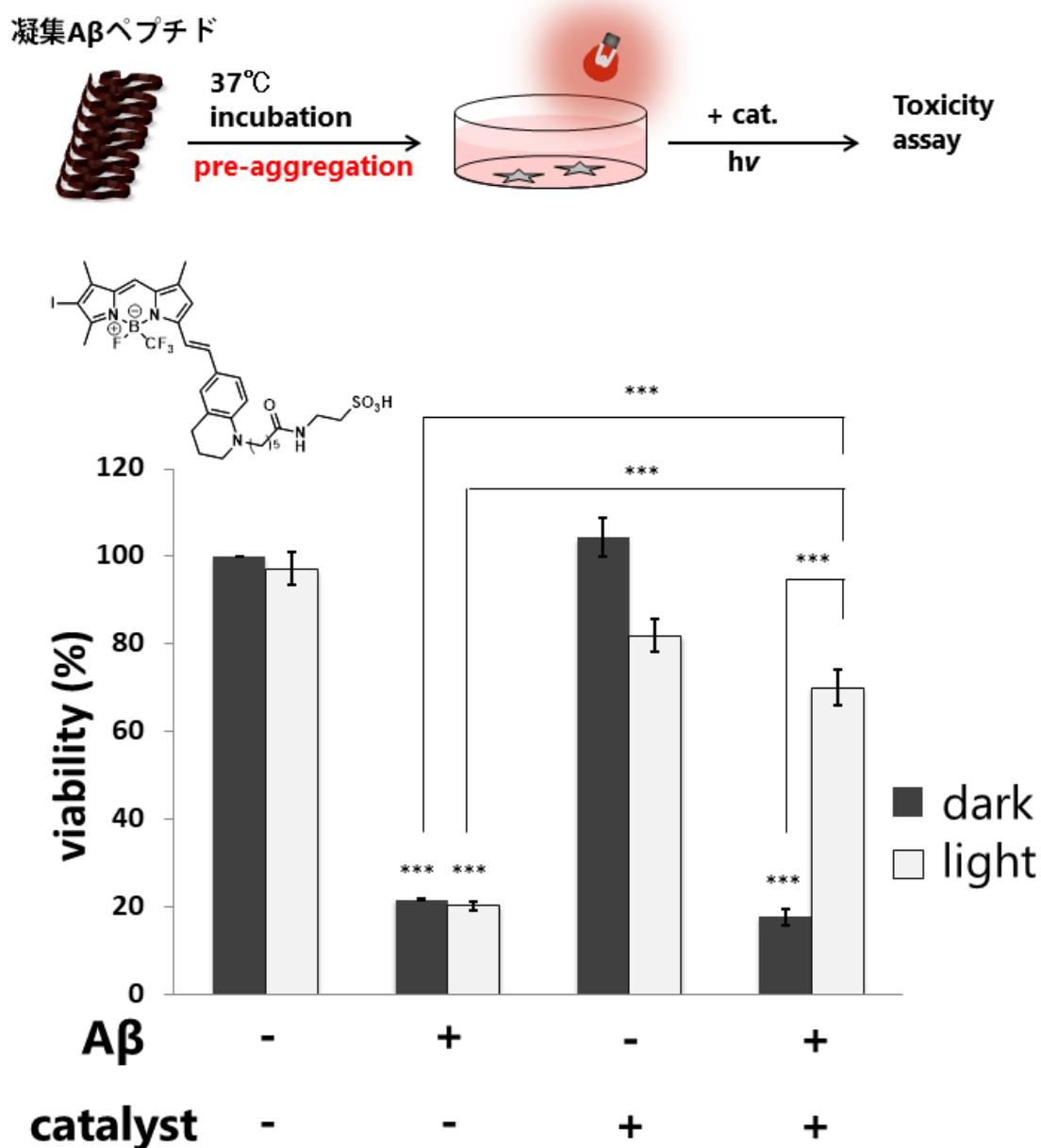
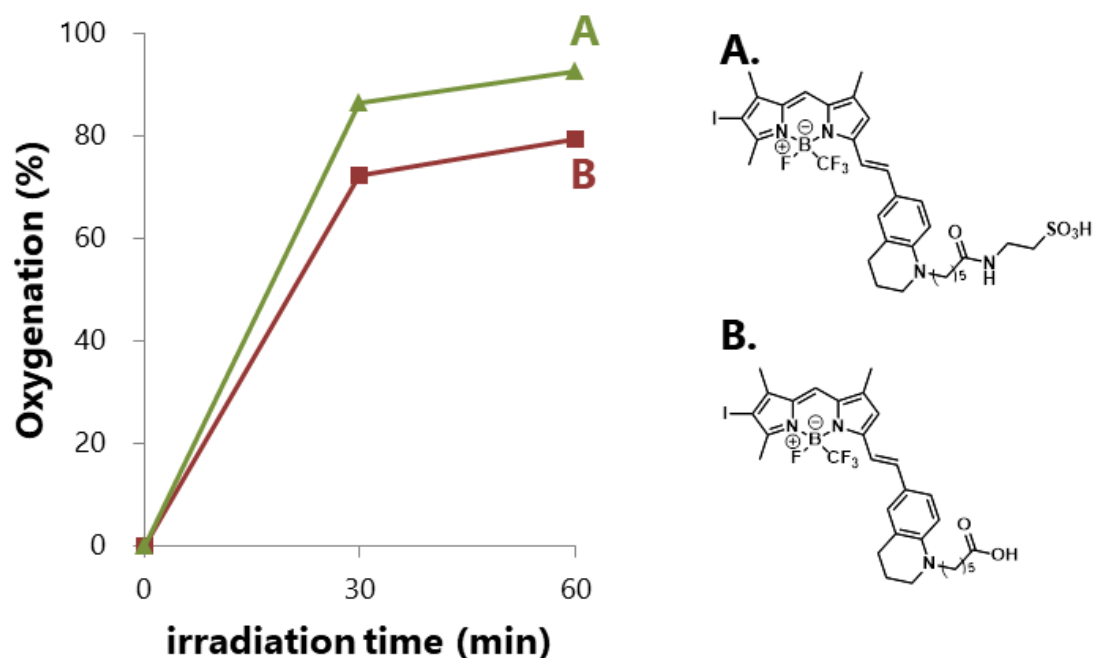


図7. 光酸素化によるAβの低毒性化

Aβを含む培地に触媒を加え、5分間光を照射した後、その培地でPC12細胞を2日間培養した。細胞生存率はWST8により解析した。光酸素化によりAβの毒性が低下した (n = 3, mean ± SD; \*\*\*p < 0.001 by Tukey's test)。

清水裕介修士による検討



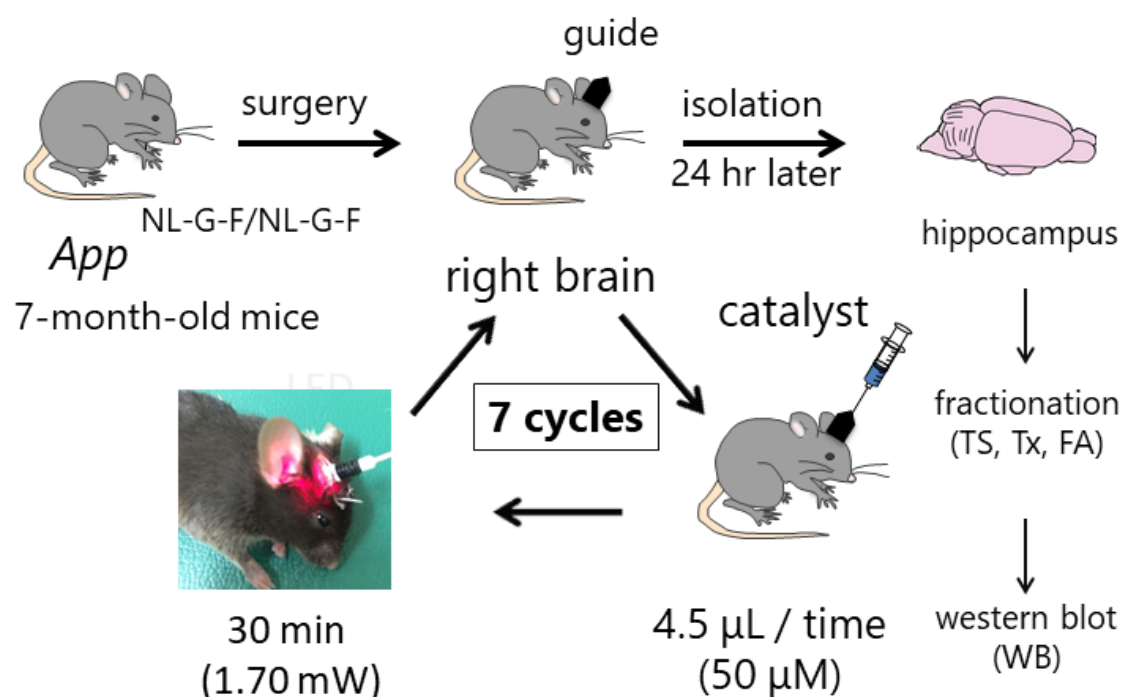


catalyst (2.5  $\mu$ M), A $\beta_{1-42}$  (10  $\mu$ M) in DMEM (0.1% HS) pre-aggregation = 2 h, 660 nm light (12 mW), 37°C

## 図8. 2つの光酸素化触媒のA $\beta$ に対する酸素化活性

光酸素化触媒A,BによるA $\beta$ の酸素化後、MALDI-TOF-MSにより酸素化された割合を計算した。A,B間のA $\beta$ に対する酸素化活性に大きな差が見られないことから、本実験では合成の容易なBを用いて検討を進めることとした。

清水裕介修士による検討



## 図9. *in vivo*光酸素化の方法

7ヶ月齢のADモデルマウスに対する光酸素化のプロトコル。ガイドを外科的に右脳海馬に挿入し、そのガイドを通して触媒の注入と光照射を行った。反応を7回繰り返した後海馬を摘出し、超遠心とホモジナイズを繰り返し分画した。

TS : Tris buffer (可溶性画分)、Tx : 2% Triton-X / TS buffer (膜タンパク質画分)、FA : 70%ギ酸 (不溶性画分)

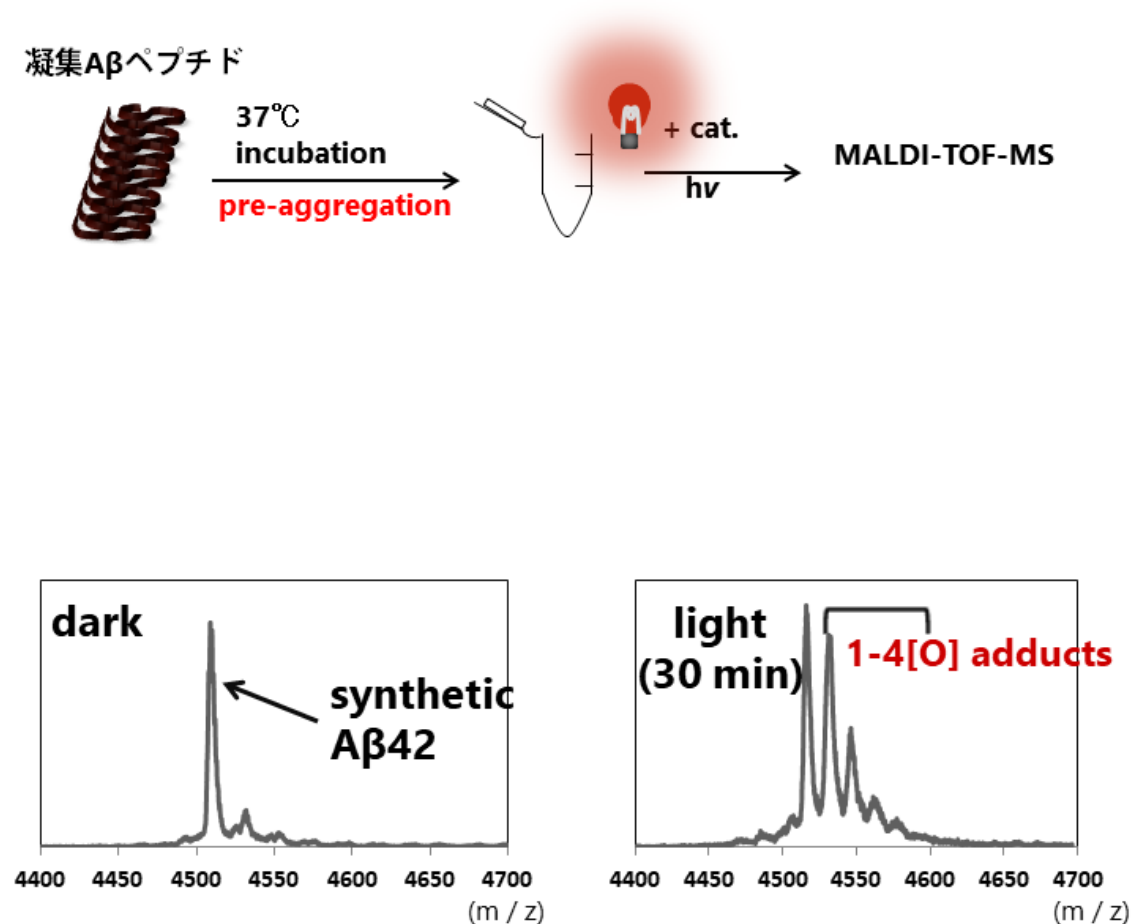


図10. MALDI-TOF-MSによる光酸素化A $\beta$ の検出

予め37°Cで1時間凝集させた合成A $\beta$  (20  $\mu$ M) に対し触媒 (10  $\mu$ M) を加え、660 nmの光を30 min 照射した後、MSで検出した。光酸素化により、酸素付加体シグナルが確認された。

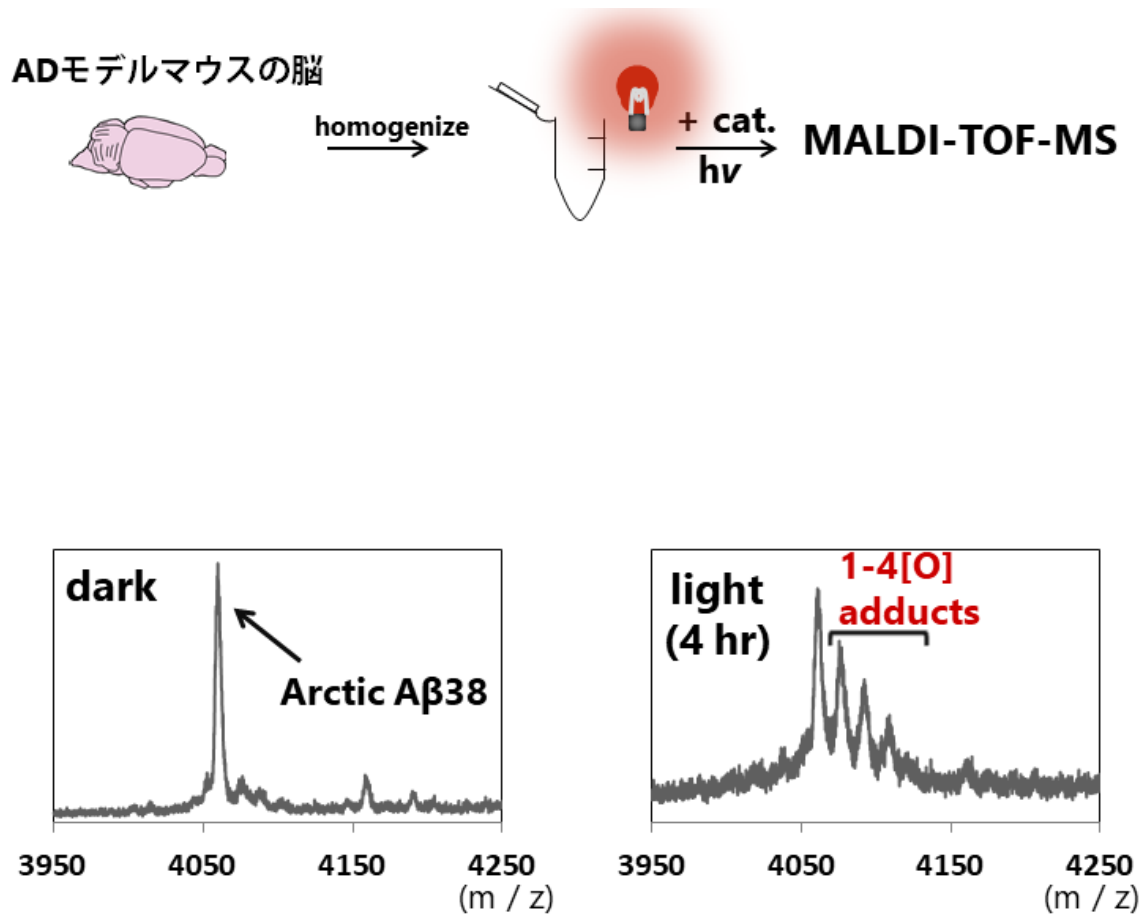
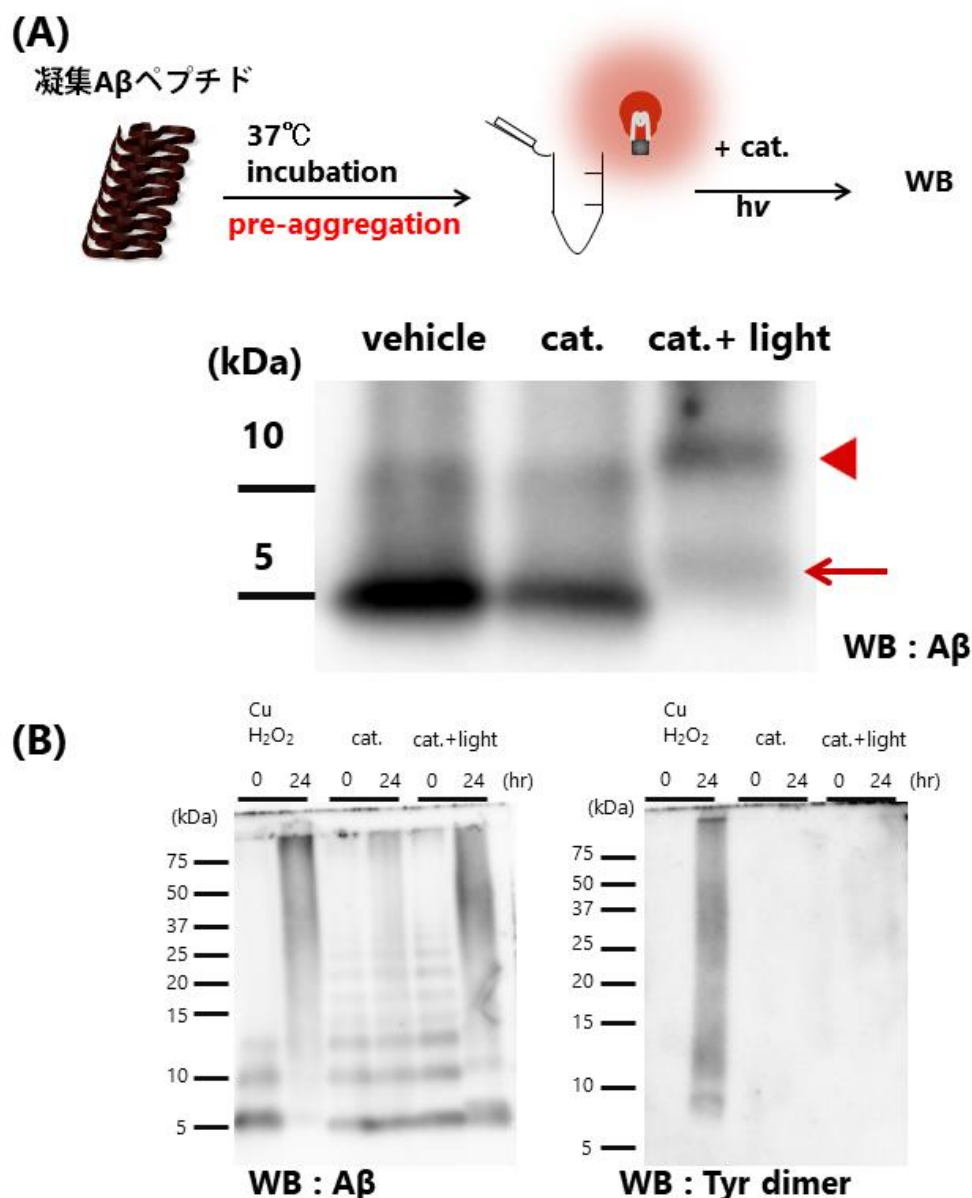


図11. ADモデルマウスの脳ライセートを用いたMALDI-TOF-MSによる光酸素化A $\beta$ の検出

7ヶ月齢のApp<sup>NL-G-F/NL-G-F</sup>マウスの脳をPBSでホモジナイズした。脳ライセートに触媒を加えた後、660 nmの光を照射した。MALDI-TOF-MSにより光酸素化A $\beta$ が検出された。

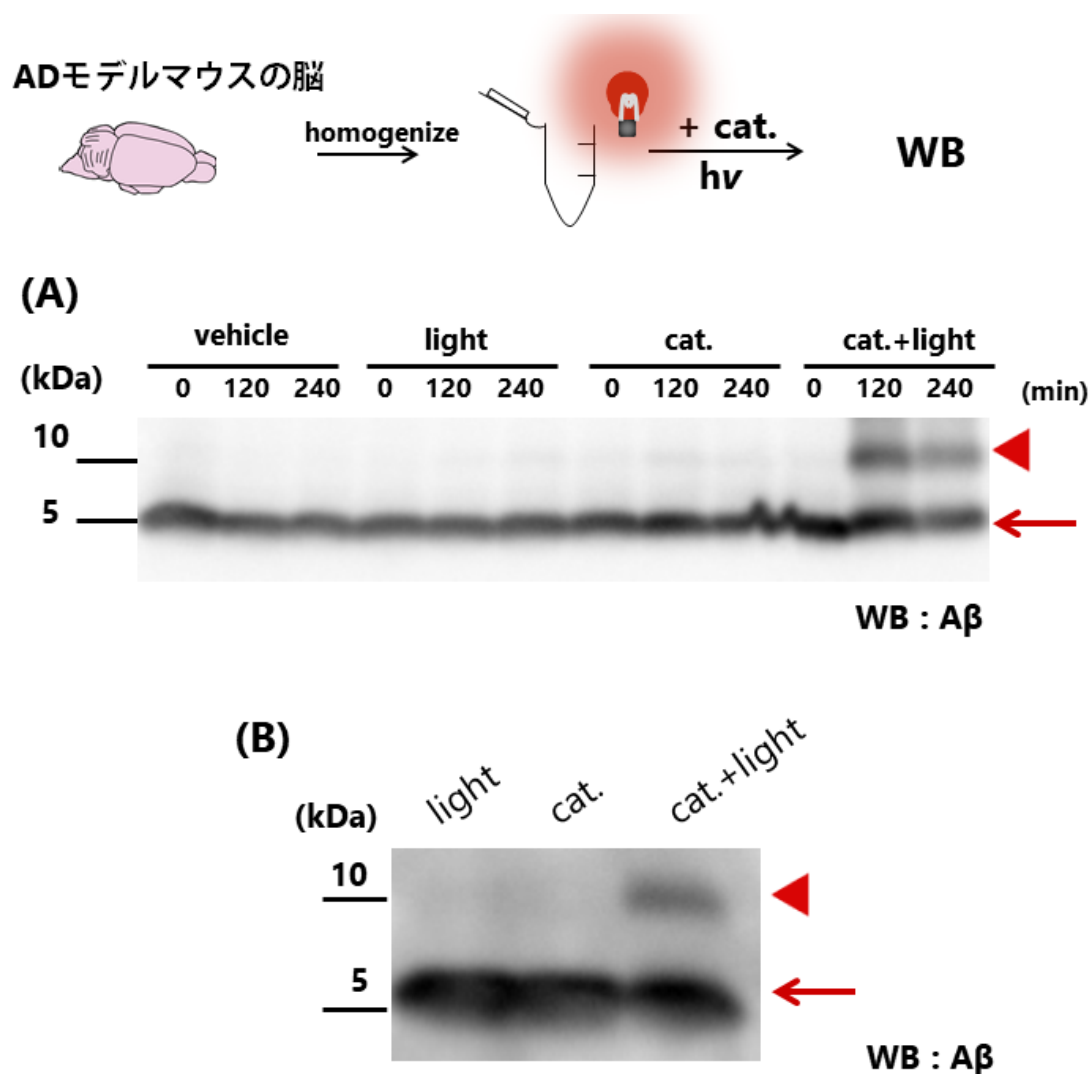


**図12. A $\beta$ ペプチドの光酸素化による10 kDa oxy-A $\beta$ の検出**

(A) 合成A $\beta$ 1-42 (10  $\mu$ M) を一晩37°Cでインキュベートした後、光酸素化触媒を10  $\mu$ M加え、660 nmの光を24時間照射した。10 kDa oxy-A $\beta$ が検出された。

矢印：A $\beta$ モノマー、矢頭：10 kDa oxy-A $\beta$ バンド、WB：82E1

(B) 合成A $\beta$ 1-42 (10  $\mu$ M) に銅・過酸化水素を加えて酸化した。酸化A $\beta$ では抗チロシンダイマー抗体によりバンドが検出されたが、光酸素化A $\beta$ では検出されなかった。



**図13. ADモデルマウスの脳ライセートを用いたWBによる10 kDa oxy-A $\beta$ の検出**

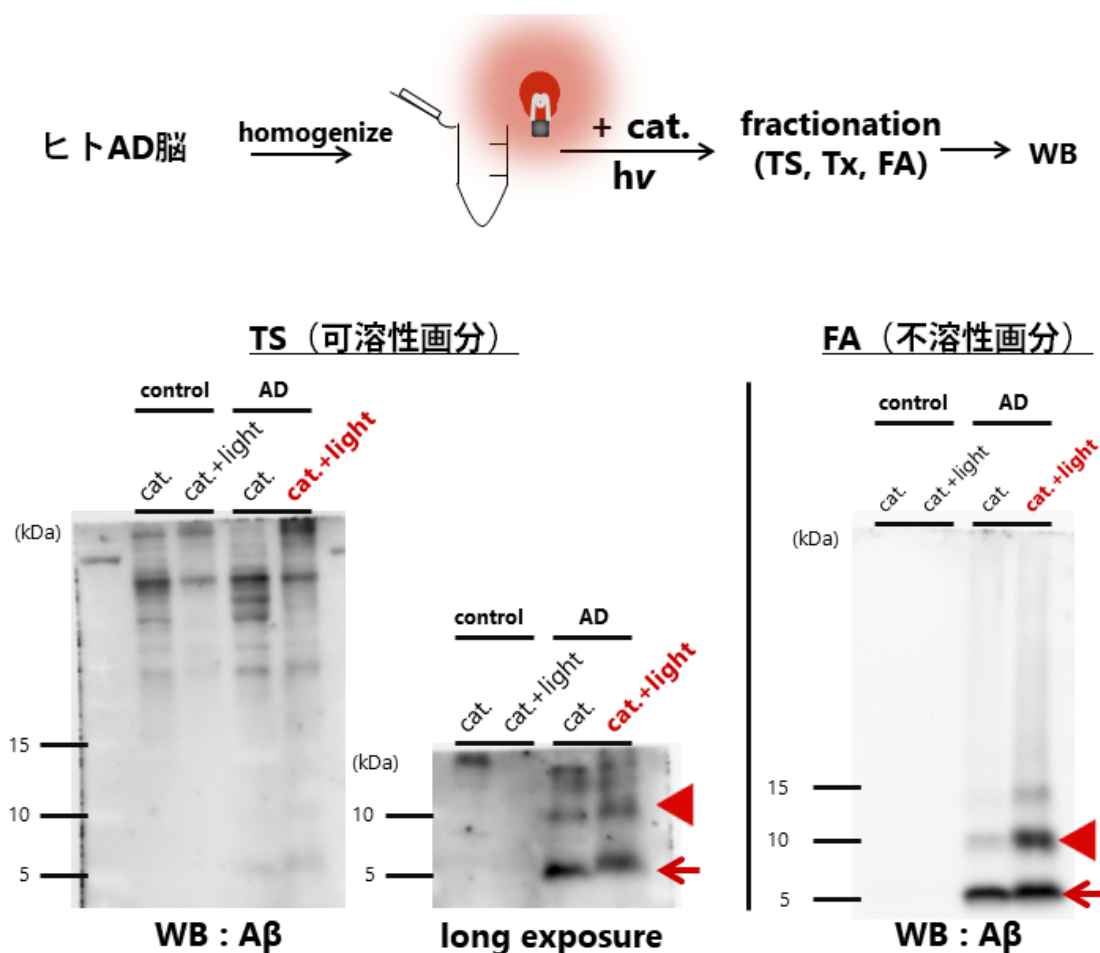
ADモデルマウスの脳をPBSでホモジナイズした。脳ライセートに触媒を加えた後、660 nmの光を照射した。

ウェスタンブロッティング (WB) による解析。

(A) *App*<sup>NL-G-F/NL-G-F</sup>マウス (7ヶ月齢) (B) APP/PS1マウス (14ヶ月齢)

光酸素化特異的に10 kDa oxy-A $\beta$ バンドが検出された。

矢印 : A $\beta$ モノマー、 矢頭 : 10 kDa oxy-A $\beta$ バンド、 WB : 82E1



**図14. ヒトAD患者脳ライセートを用いたWBによる  
10 kDa oxy-Aβの検出**

ヒトAD脳をTSでホモジナイズした。脳ライセートに触媒を加えた後、660 nmの光を照射した。その後超遠心とホモジナイズを繰り返し分画した。ウェスタンブロッティング (WB) による解析。  
光酸素化特異的に10 kDa oxy-Aβバンドが検出された。  
矢印 : Aβモノマー、矢頭 : 10 kDa oxy-Aβバンド、WB : 82E1

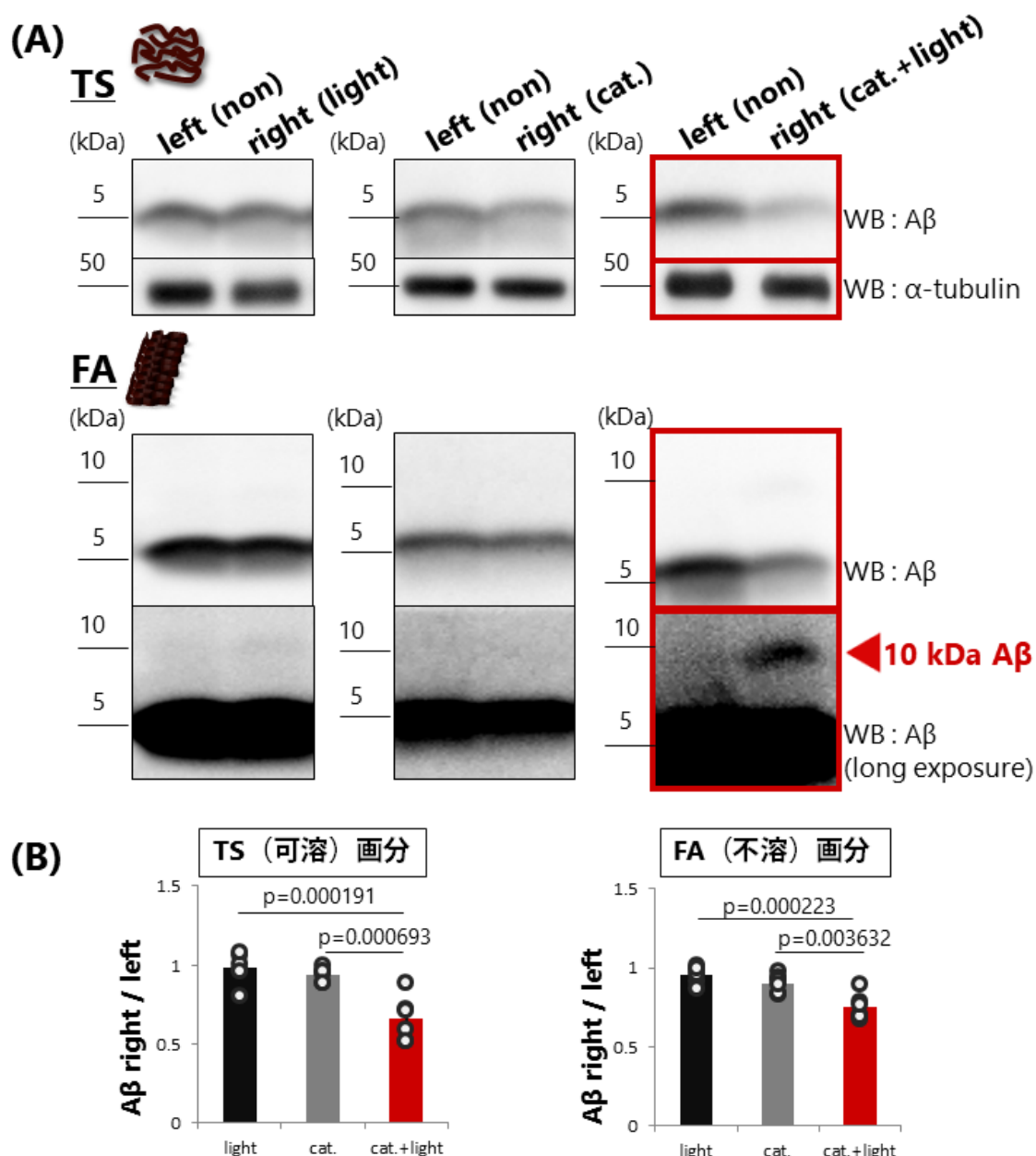
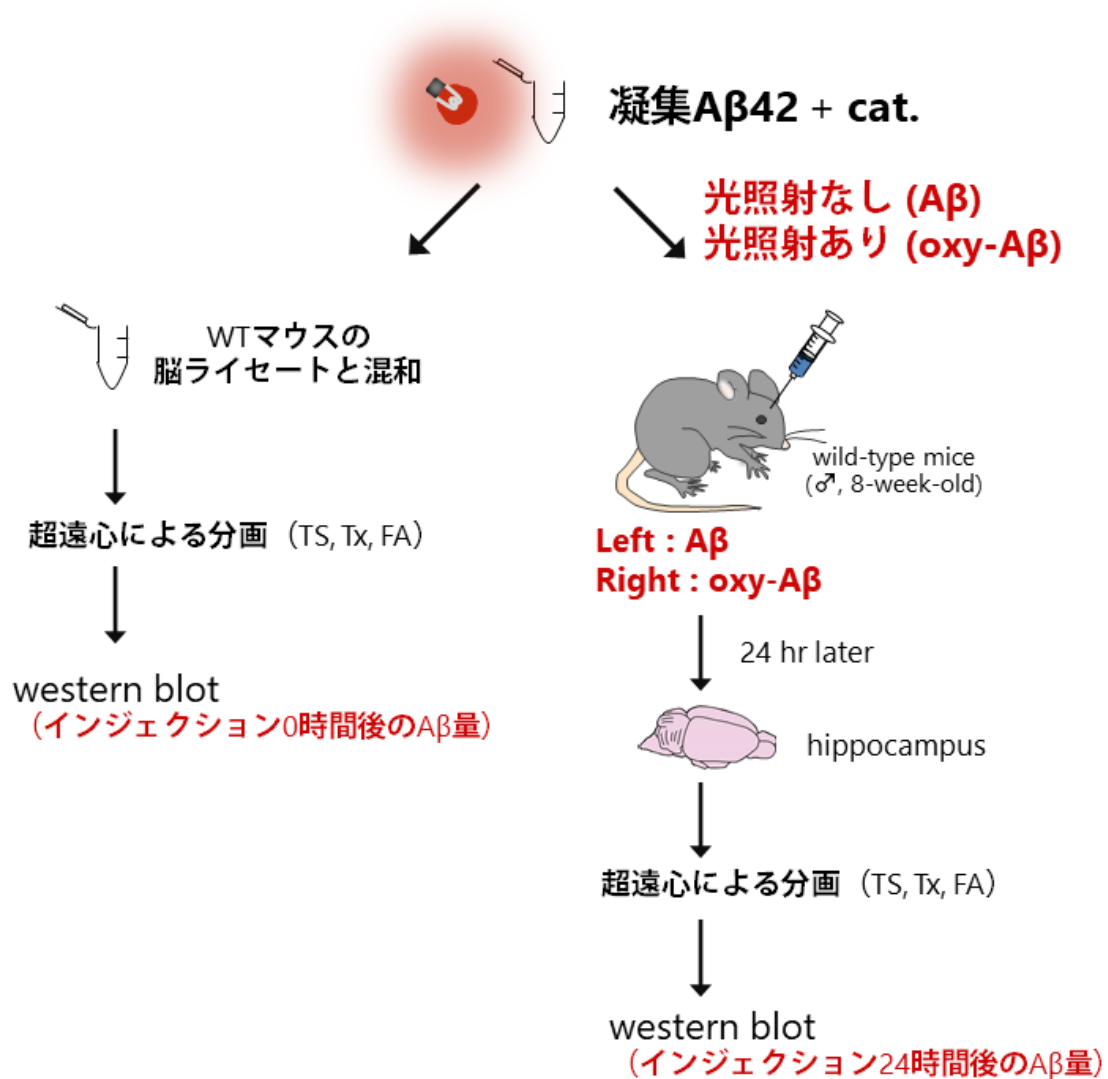


図15. *in vivo* 光酸素化によるA $\beta$ 量の減少

(A) TS、FA画分のWBによる解析。FA画分に10 kDa oxy-A $\beta$ バンドが検出された。矢頭：10 kDa oxy-A $\beta$ バンド

(B) TS、FA画分のA $\beta$ のdensitometryによる定量結果。左海馬のA $\beta$ 量で規格化した。光酸素化特異的にA $\beta$ 量が減少した (n = 6 (♂ = 3, ♀ = 3), mean  $\pm$  SD, Tukey's Test)。





## 図16. 光酸素化凝集A $\beta$ の代謝検討方法

合成A $\beta$ ペプチドを予め2時間インキュベートし、触媒を添加後光照射の有無により非修飾凝集A $\beta$  (A $\beta$ ) と光酸素化凝集A $\beta$  (oxy-A $\beta$ ) を作成した。左海馬にA $\beta$ 、右海馬にoxy-A $\beta$ をインジェクションし24時間後の残存A $\beta$ 量を比較検討した。またこの際、oxy-A $\beta$ とA $\beta$ を野生型マウス脳ライセートと混和し、分画操作・WB解析したものを疑似的にインジェクション0時間後のA $\beta$ 量とした。

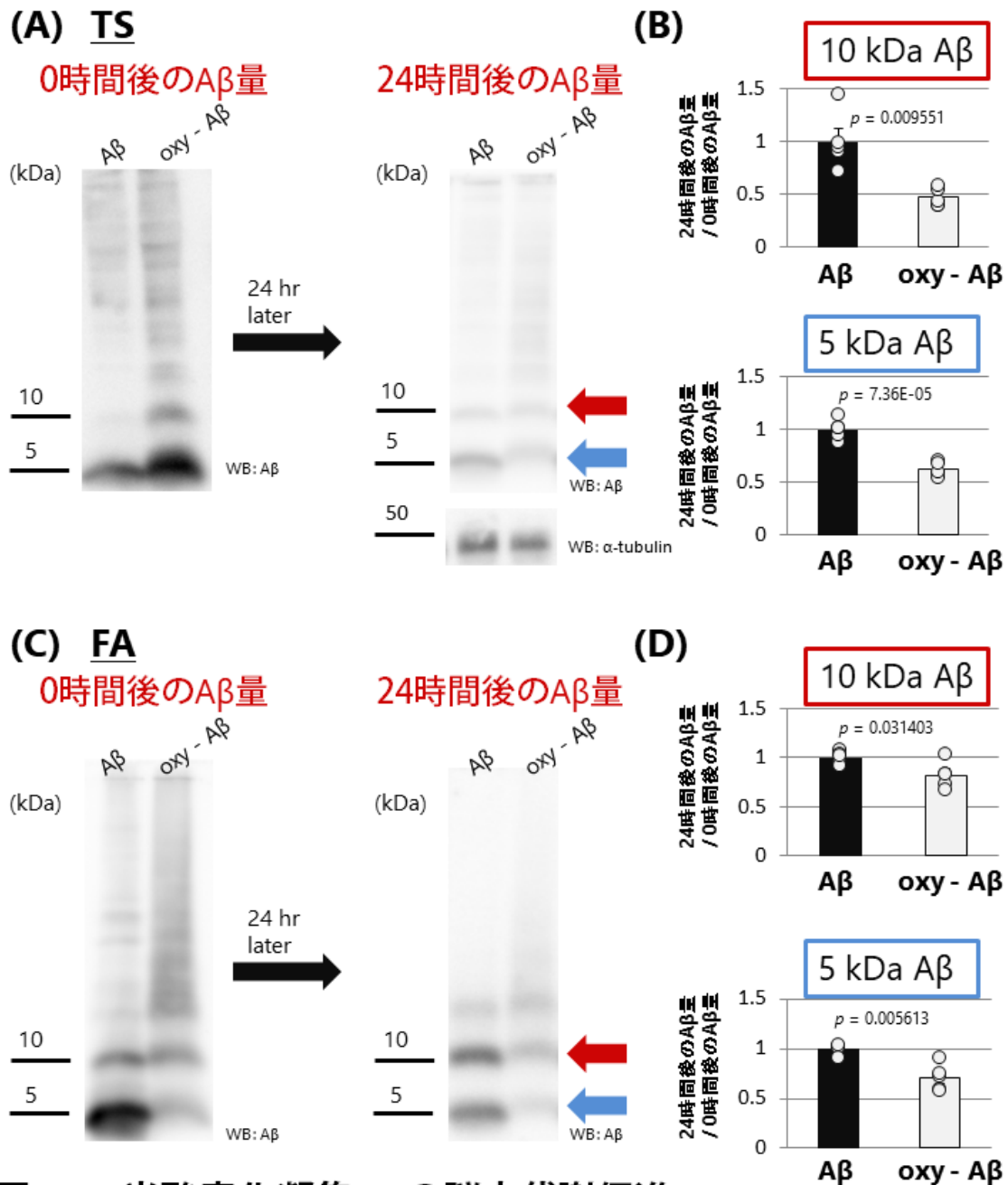
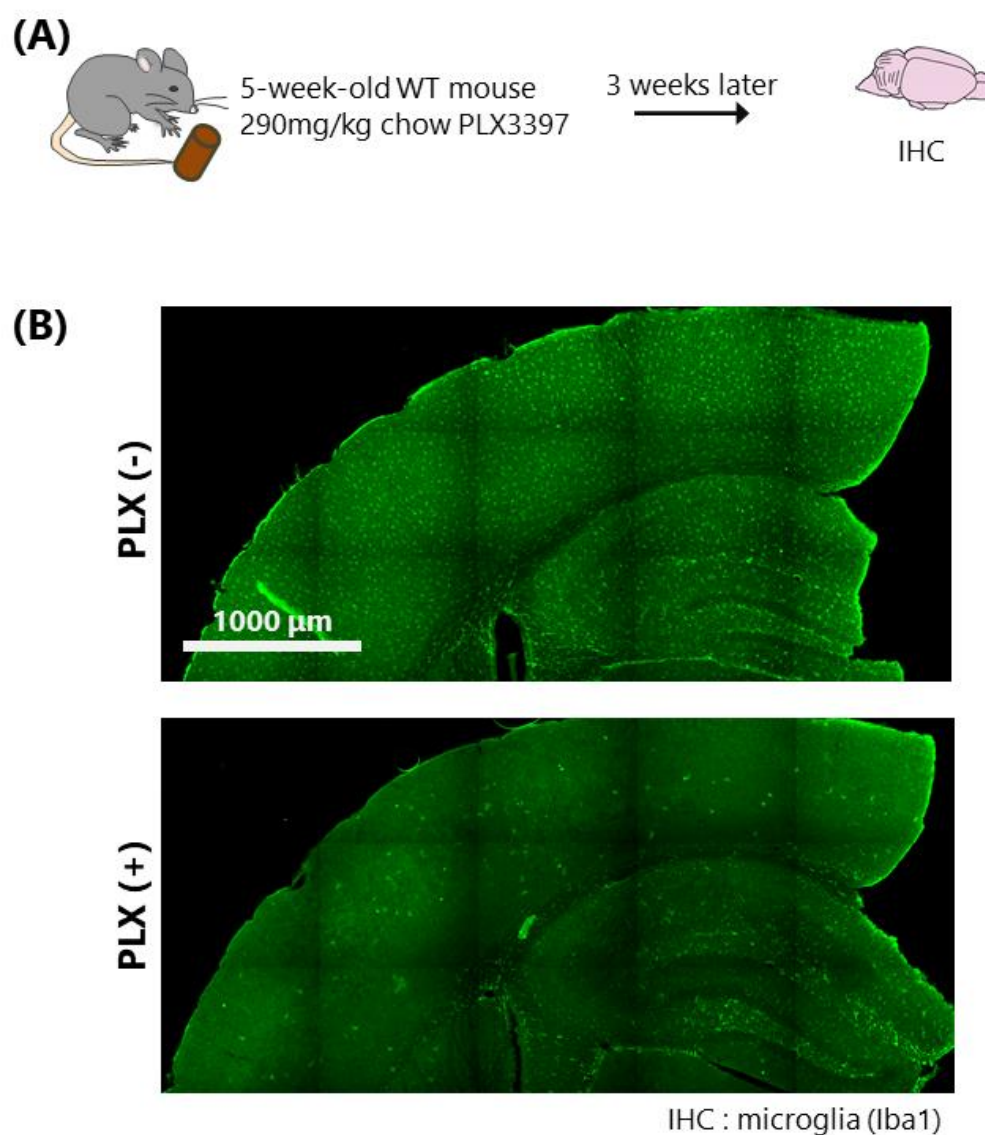


図17. 光酸素化凝集Aβの脳内代謝促進

(A) TS画分のWBによる解析。青矢印: 5 kDa Aβ種、赤矢印: 10 kDa Aβ種  
 (B) TS画分のAβのdensitometryによる定量結果。24時間後のAβ量を0時間後のAβ量で規格化した。光酸素化が可溶性Aβの代謝を促進した ( $n = 5$ , mean  $\pm$  s.e.m, t-test)。  
 (C) FA画分のWBによる解析。青矢印: 5 kDa Aβ種、赤矢印: 10 kDa Aβ種  
 (D) FA画分のAβのdensitometryによる定量結果。24時間後のAβ量を0時間後のAβ量で規格化した。光酸素化が不溶性Aβの代謝を促進した ( $n = 5$ , mean  $\pm$  s.e.m, t-test)。



## 図18. PLX3397投与による脳内ミクログリアの欠失

- (A) PLX3397投与によるミクログリアの欠失方法。
- (B) PLX3397投与後マウス脳の免疫組織化学的解析。PLX3397の投与によりミクログリアの数が減少した。IHC : Iba1

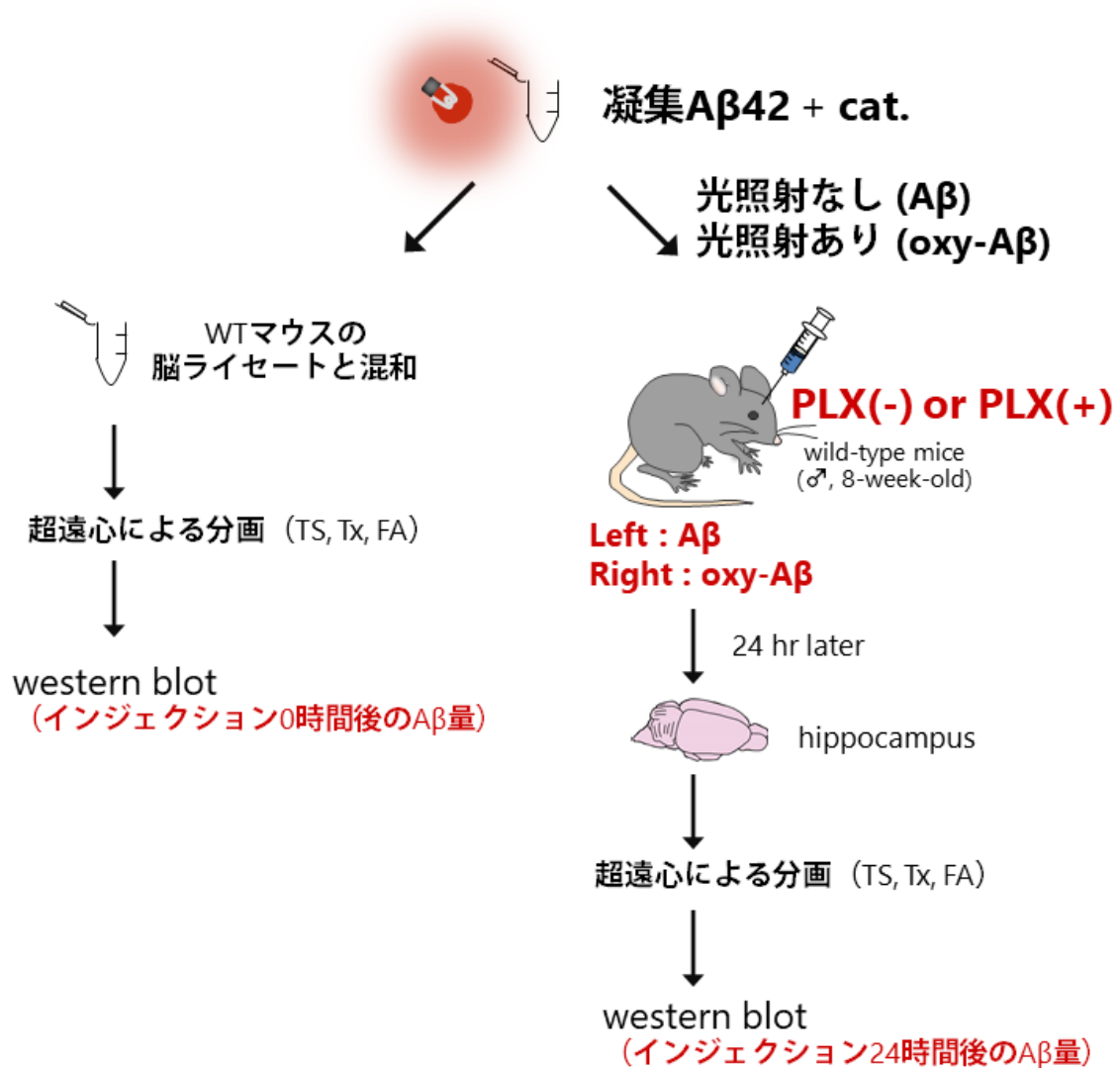
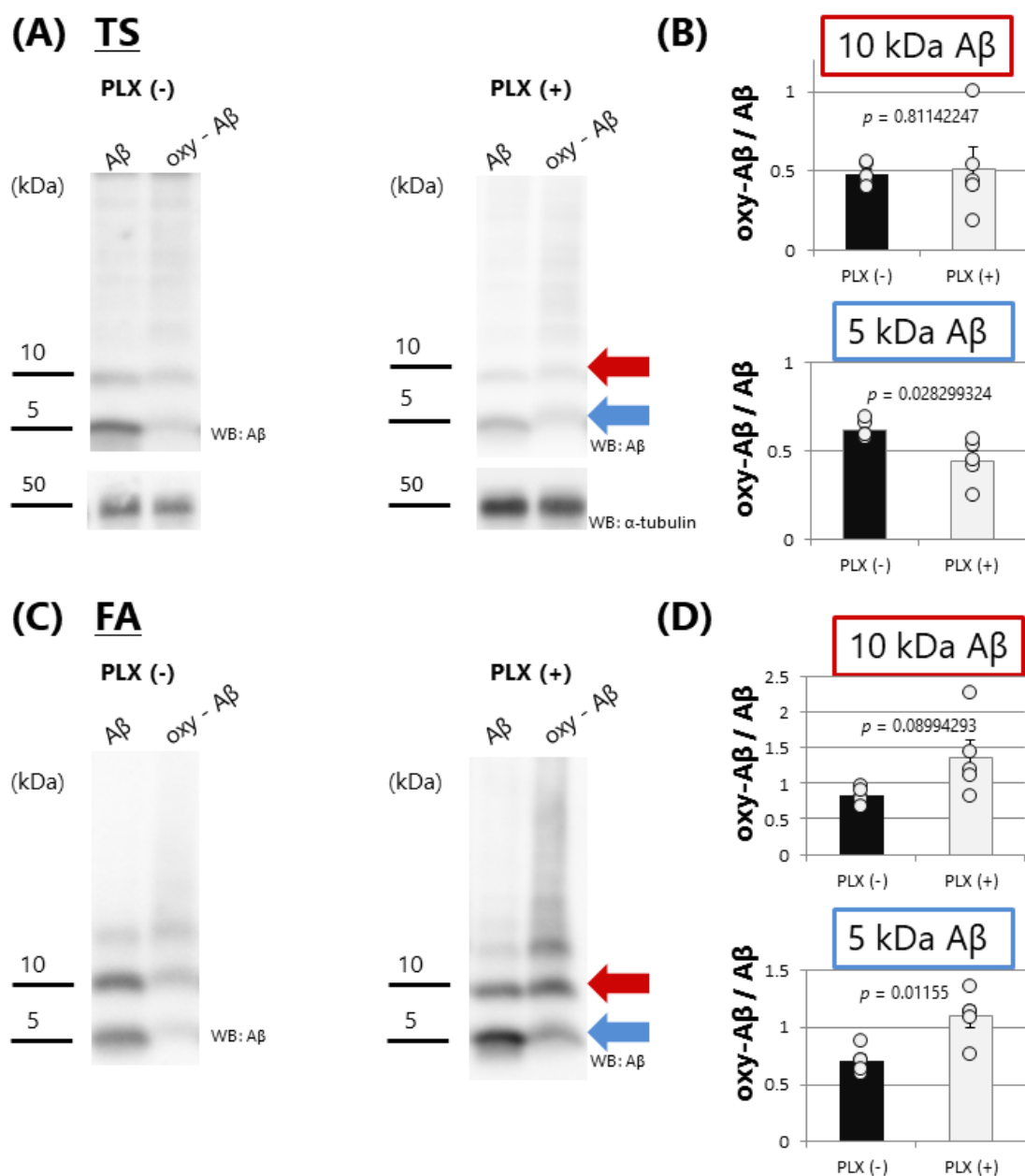


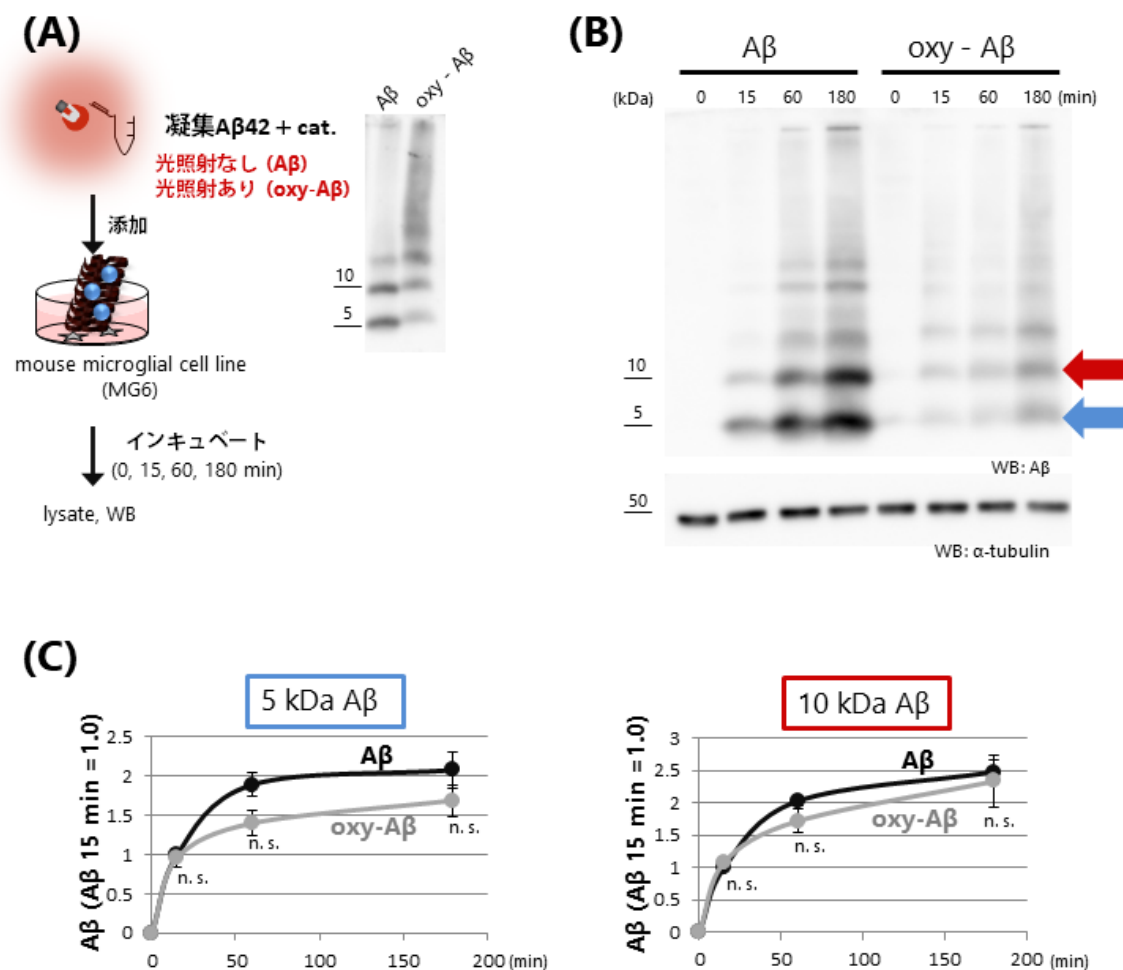
図19. PLX3397投与有無による光酸素化凝集A $\beta$ の代謝検討方法

合成A $\beta$ ペプチドを予め2時間インキュベートし、触媒を添加後光照射の有無により非修飾凝集A $\beta$  (A $\beta$ ) と光酸素化凝集A $\beta$  (oxy-A $\beta$ ) を作成した。PLX3397投与マウスの左海馬にA $\beta$ 、右海馬にoxy-A $\beta$ をインジェクションし24時間後のoxy-A $\beta$ /A $\beta$ 比を非投与マウスと比較検討した。



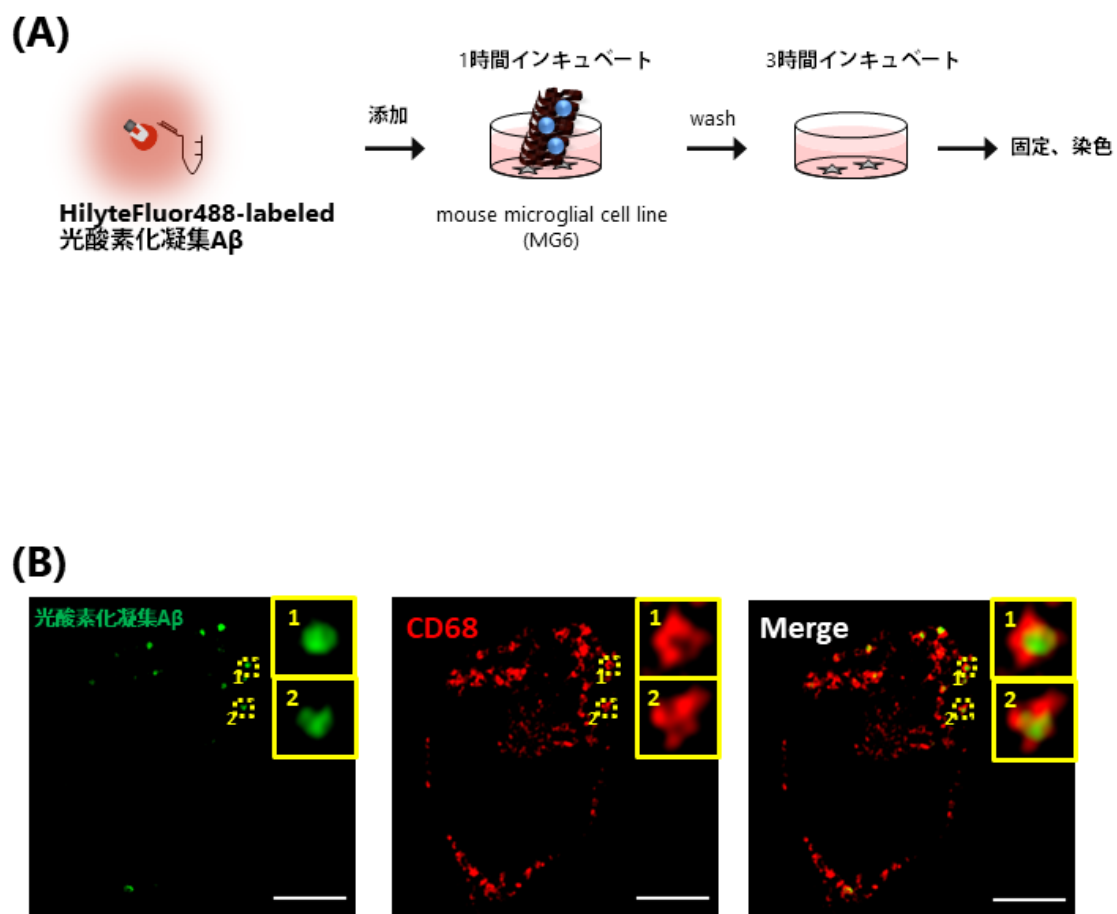
**図20. PLX3397投与による不溶性光酸素化凝集Aβの代謝促進の阻害**

(A) TS画分のWBによる解析。青矢印: 5 kDa Aβ種、赤矢印: 10 kDa Aβ種  
 (B) TS画分のAβのdensitometryによる定量結果。oxy-Aβ/Aβ比の比較。PLX3397投与により光酸素化凝集Aβの代謝亢進は阻害されなかった ( $n = 5$ , mean  $\pm$  s.e.m, t-test)。  
 (C) FA画分のWBによる解析。青矢印: 5 kDa Aβ種、赤矢印: 10 kDa Aβ種  
 (D) FA画分のAβのdensitometryによる定量結果。oxy-Aβ/Aβ比の比較。PLX3397投与により光酸素化凝集Aβの代謝亢進が阻害された ( $n = 5$ , mean  $\pm$  s.e.m, t-test)。



**図21. 光酸素化がミクログリアのAβ取込過程に与える影響の検討**

(A) マウスミクログリア細胞株MG6によるAβ取込過程の検討方法。  
 (B) 細胞内AβのWB解析。青矢印：5 kDa Aβ種、赤矢印：10 kDa Aβ種  
 (C) 細胞内Aβのdensitometryによる定量結果。Aβ添加15分後の細胞内Aβ量を1.0とし、比較検討した。光酸素化はMG6のAβ取込過程に影響を与えなかった (n = 5, mean ± s.e.m, t-test, n. s. : p > 0.05)。



## 図22. 光酸素化凝集Aβのリソソーム局在確認

(A) 光酸素化凝集Aβの免疫細胞化学的解析方法。

(B) MG6細胞のZ-stack image。光酸素化凝集Aβがリソソームに局在することが確認された。

緑：光酸素化凝集Aβ、赤：CD68 (phagolysosome marker)、Scale Bar = 5 μm

王文博修士による検討



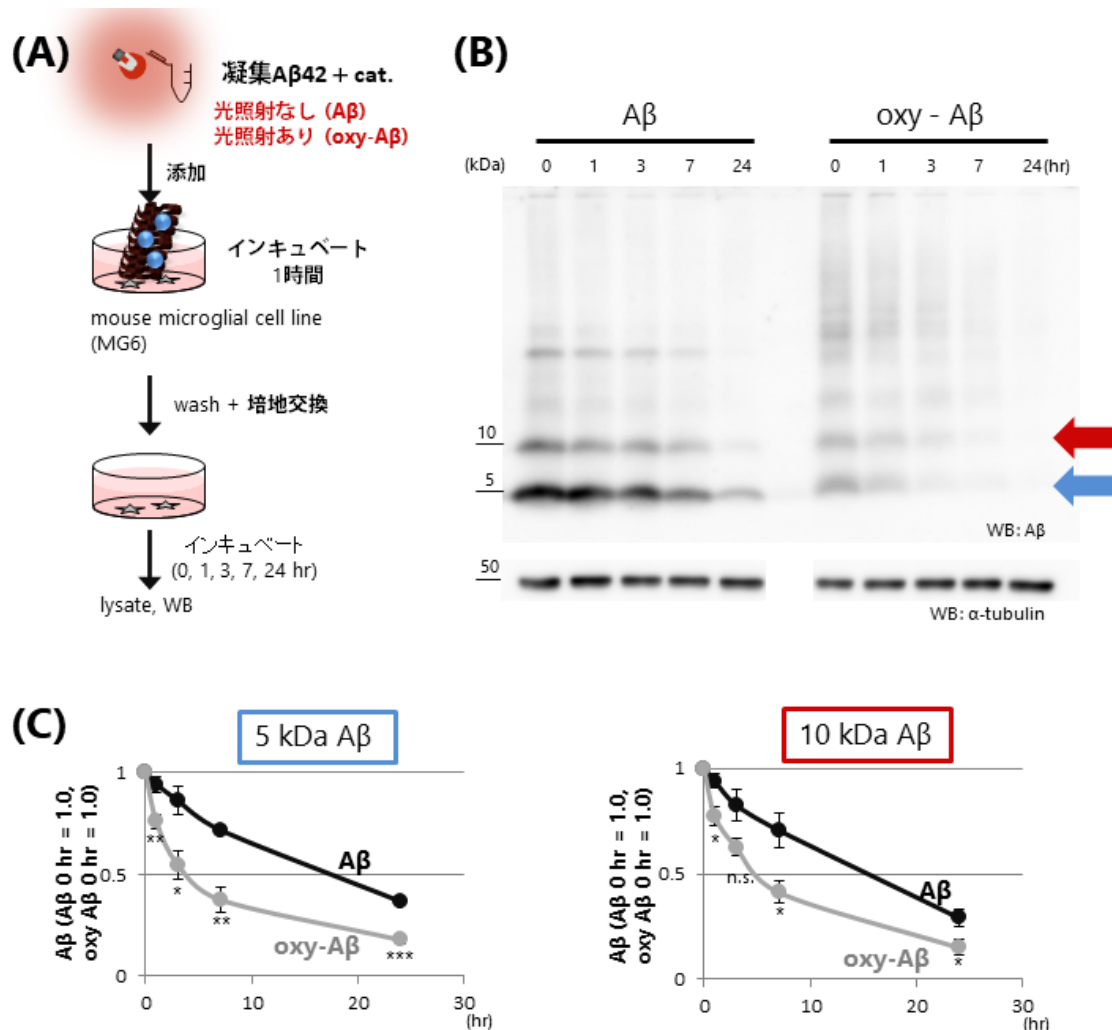
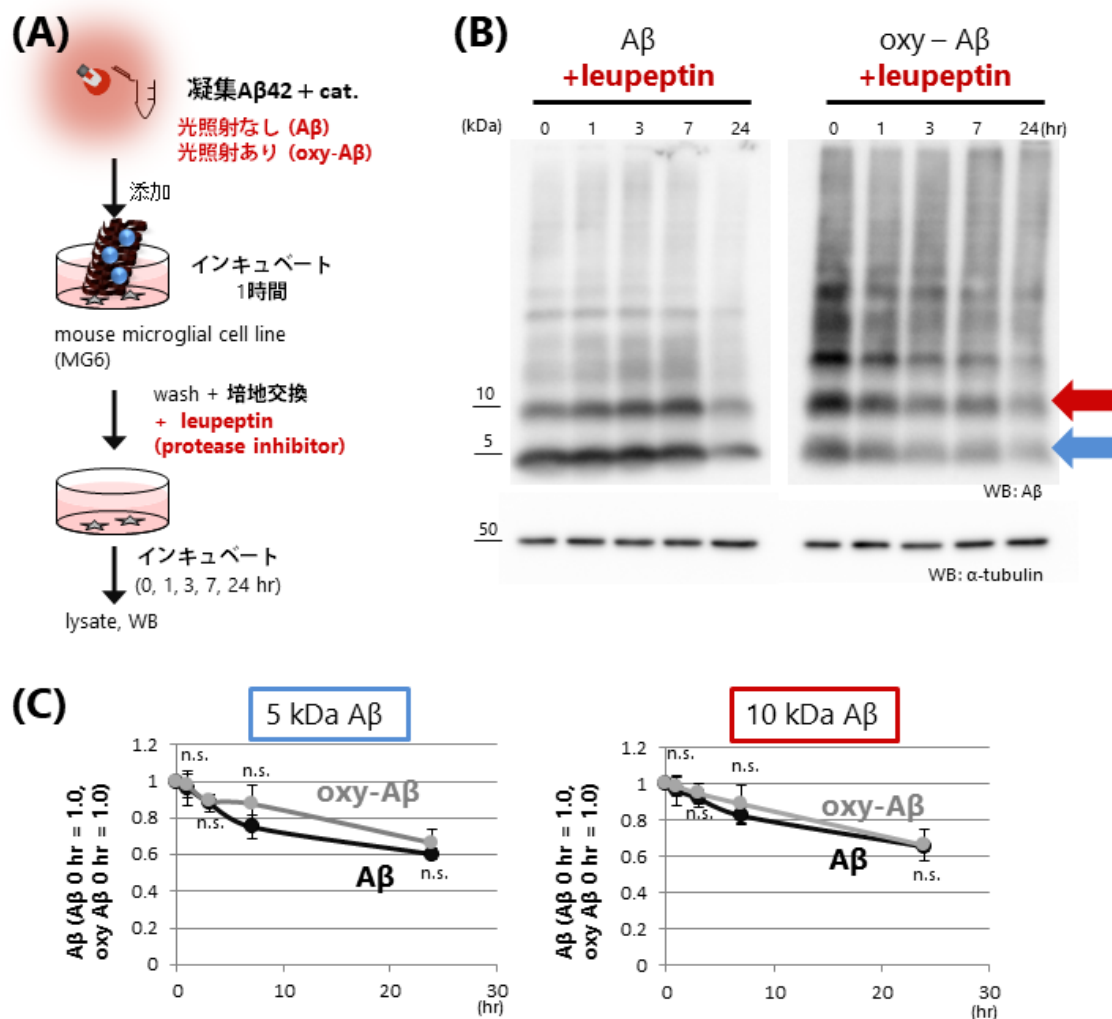


図23. 光酸素化がミクログリアのAβ分解過程に与える影響の検討

(A) マウスミクログリア細胞株MG6によるAβ分解過程の検討方法。  
(B) 細胞内AβのWB解析。青矢印 : 5 kDa Aβ種、赤矢印 : 10 kDa Aβ種  
(C)細胞内Aβのdensitometryによる定量結果。Aβ添加1時間後washしてすぐの細胞内Aβ量を1.0とし、比較検討した。光酸素化によりMG6細胞でのAβ分解過程が促進されることが明らかとなった (n = 5, mean ± s.e.m, t-test, \* p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001)。





**図24. 光酸素化凝集A $\beta$ の分解亢進がendolysosomal pathwayに依存するかの検討**

(A) リソソーム酵素阻害剤leupeptinを用いたA $\beta$ 分解過程の検討方法。  
 (B) 細胞内A $\beta$ のWB解析。青矢印 : 5 kDa A $\beta$ 種、赤矢印 : 10 kDa A $\beta$ 種  
 (C) 細胞内A $\beta$ のdensitometryによる定量結果。A $\beta$ 添加1時間後washしてすぐの細胞内A $\beta$ 量を1.0とし、比較検討した。光酸素化凝集A $\beta$ の分解促進にendolysosomal pathwayが関与することが示唆された (n = 3, mean  $\pm$  s.e.m, t-test, n. s. : p > 0.05)。

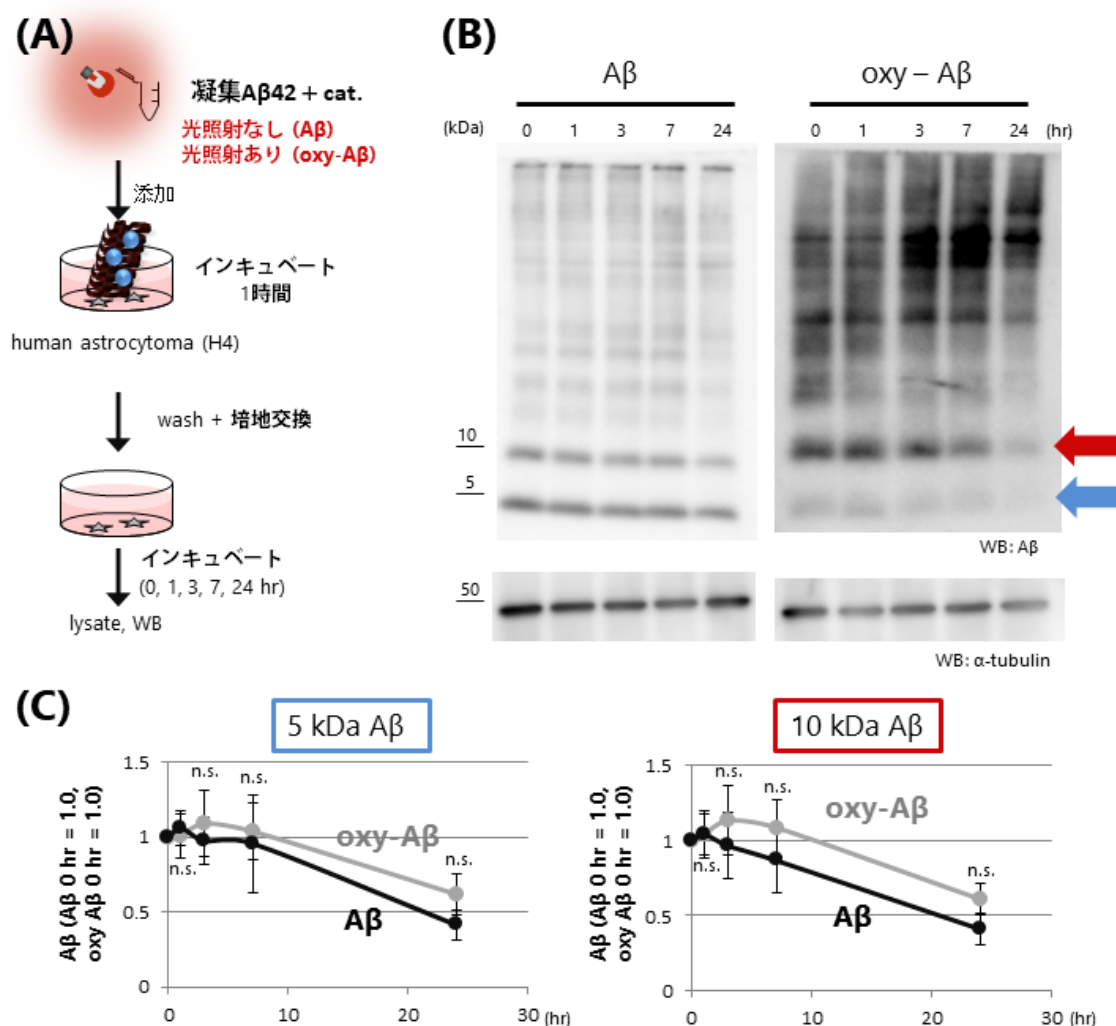
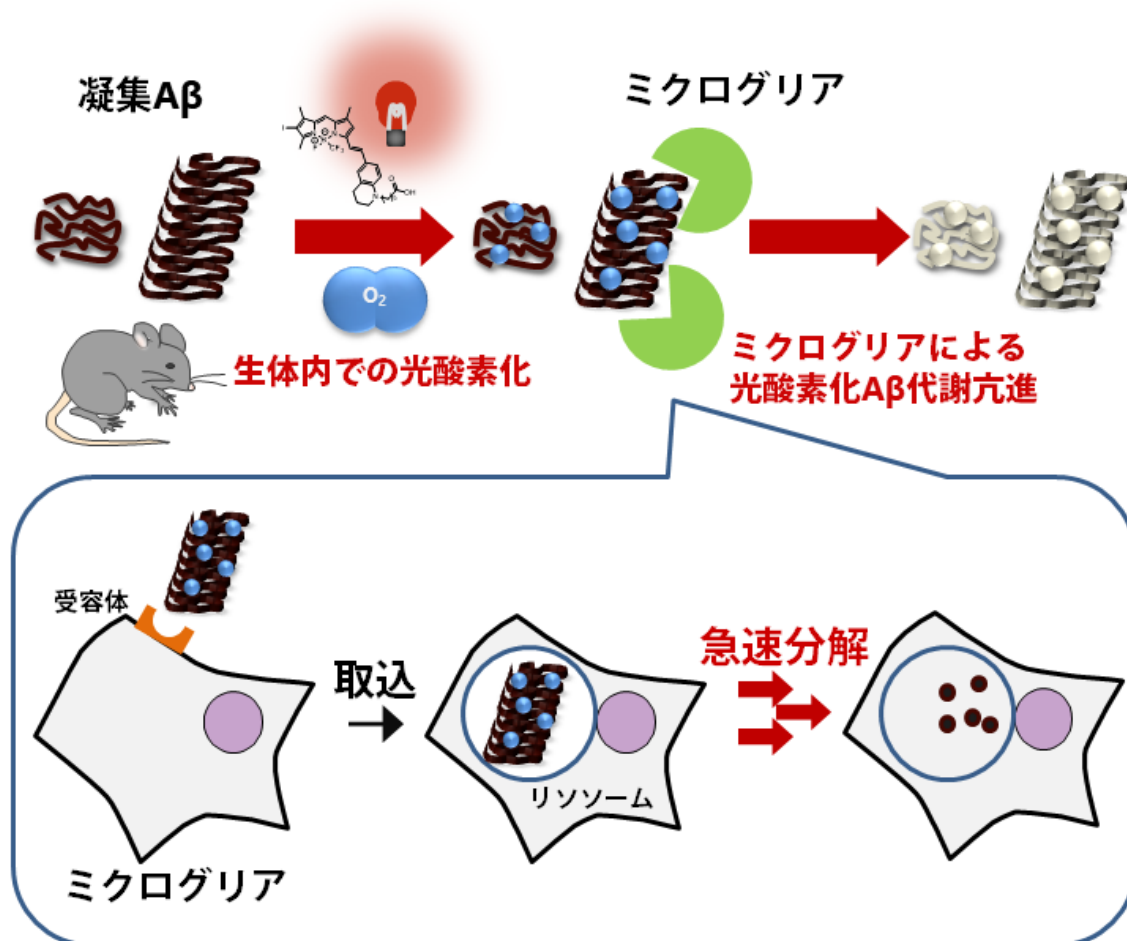


図25. 光酸素化がアストロサイトのAβ分解過程に与える影響の検討

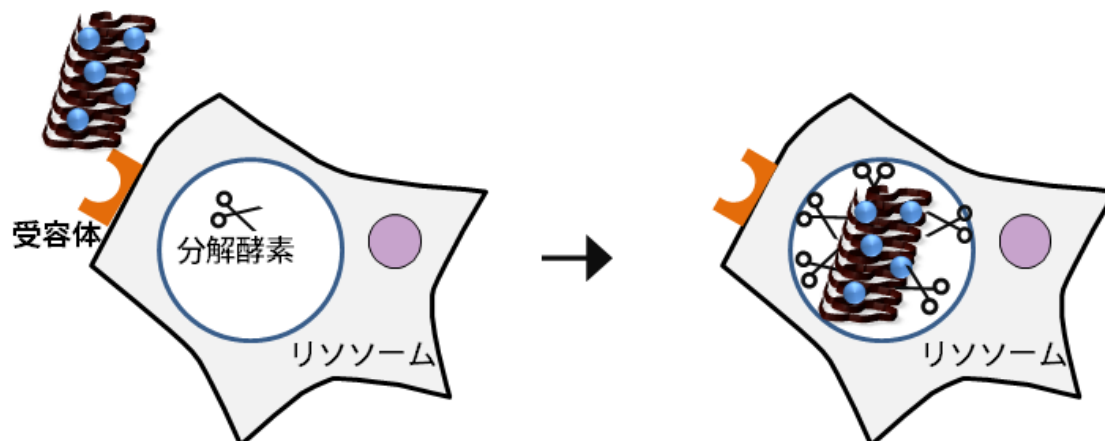
(A) ヒトアストロサイトーマ細胞株H4によるAβ分解過程の検討方法。  
(B) 細胞内AβのWB解析。青矢印：5 kDa Aβ種、赤矢印：10 kDa Aβ種  
(C) 細胞内Aβのdensitometryによる定量結果。Aβ添加1時間後washしてすぐの細胞内Aβ量を1.0とし、比較検討した。H4細胞内では光酸素化によるAβ分解過程の促進は確認されなかった (n = 3, mean ± s.e.m, t-test, n.s.: p > 0.05)。



## 図26. 本研究のまとめ

生体内で光酸化が進行可能であること、また光酸化は凝集Aβの代謝を促進することが明らかとなった。  
この光酸化凝集Aβの代謝促進機構として、ミクログリアが関与すること、及びミクログリアによる光酸化凝集Aβの代謝機構として、細胞内分解が関与することが明らかとなった。

(A) 光酸素化A $\beta$ により、  
ミクログリアのA $\beta$ 分解酵素の発現量が上昇する。



(B) 光酸素化に伴うA $\beta$ の構造変化により、  
特定の酵素が光酸素化凝集A $\beta$ をより速く分解する。

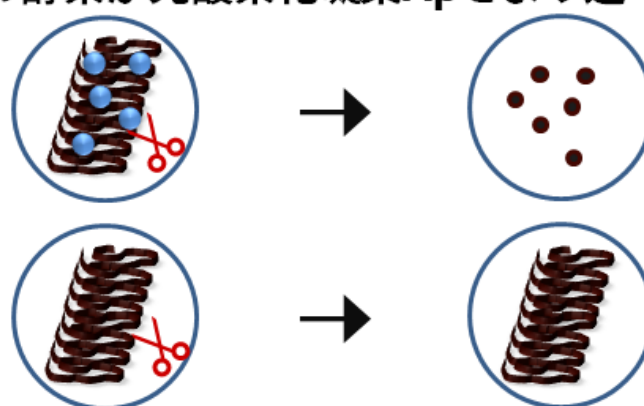


図27. 光酸素化による不溶性A $\beta$ 代謝促進の想定機構

(A) A $\beta$ の刺激に伴い、ミクログリア内A $\beta$ 分解酵素であるcathepsin Bの発現量が上昇することが知られている (Gan L. *et al.*, 2004)。また、リソソームの酸性化が引き起こされ、A $\beta$ 分解に適した環境が構築されることも知られている (Majumdar *et al.*, 2007)。  
これらの過程が、光酸素化凝集A $\beta$ の刺激により促進した可能性が考えられる。

(B) 光酸素化による凝集A $\beta$ の構造変化により、特定の酵素との親和性が高まって分解亢進に至った可能性が考えられる。

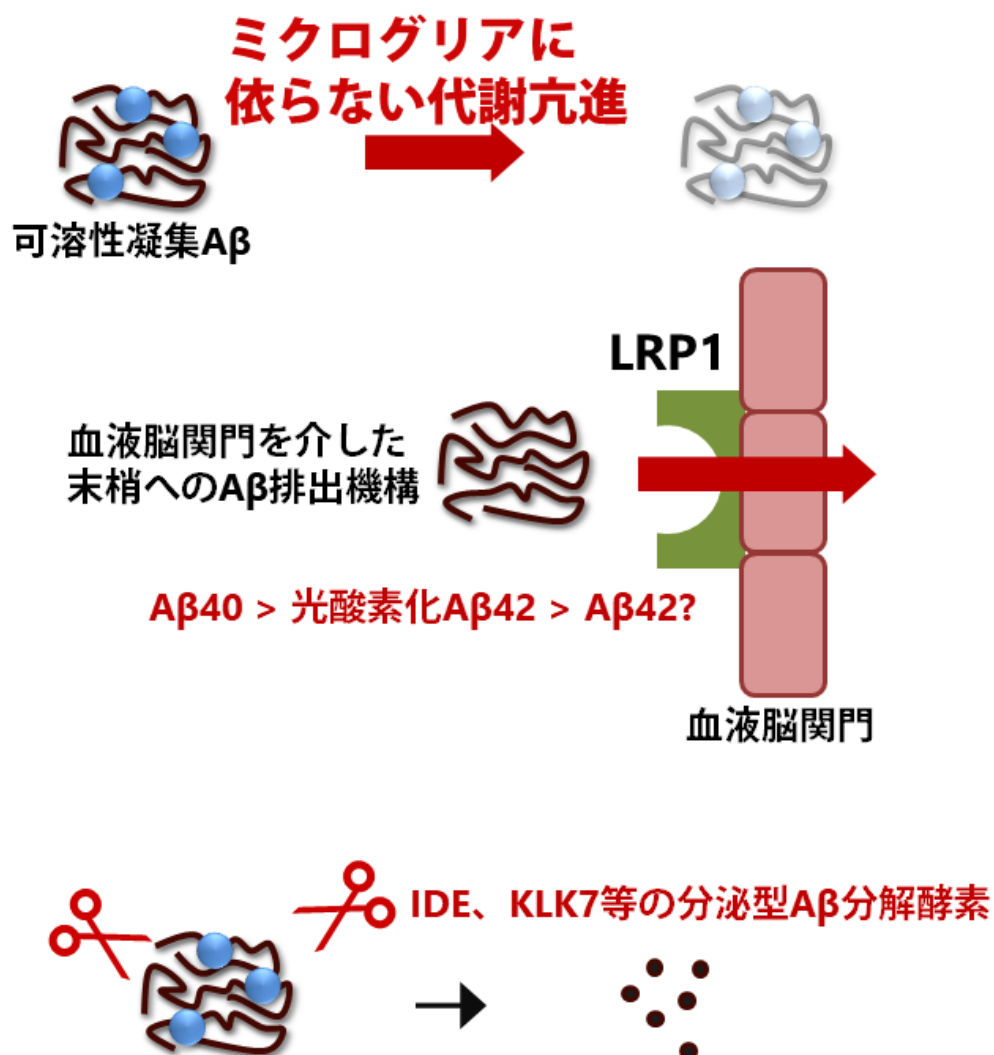


図28. 光酸素化による可溶性Aβ代謝促進の想定機構

可溶性光酸素化凝集Aβの代謝亢進には、ミクログリアが関与しないことが明らかとなったため、別の機構で代謝された可能性が考えられる。LRP1を介した血液脳関門からの末梢への排出では、疎水性のより低いAβ40がAβ42よりも速く代謝されることが知られている（Deane, R. 2009）。光酸素化によりAβが親水性に傾くことで、代謝されやすくなった可能性がある。

その他にも、分泌型Aβ分解酵素との親和性の上昇、glymphatic/lymphatic systemsを介した末梢への排出等が関与する可能性も考えられる。

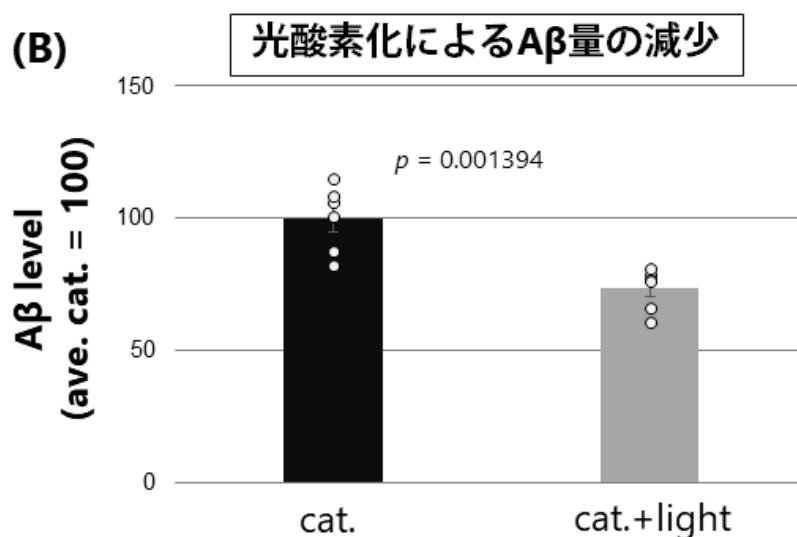
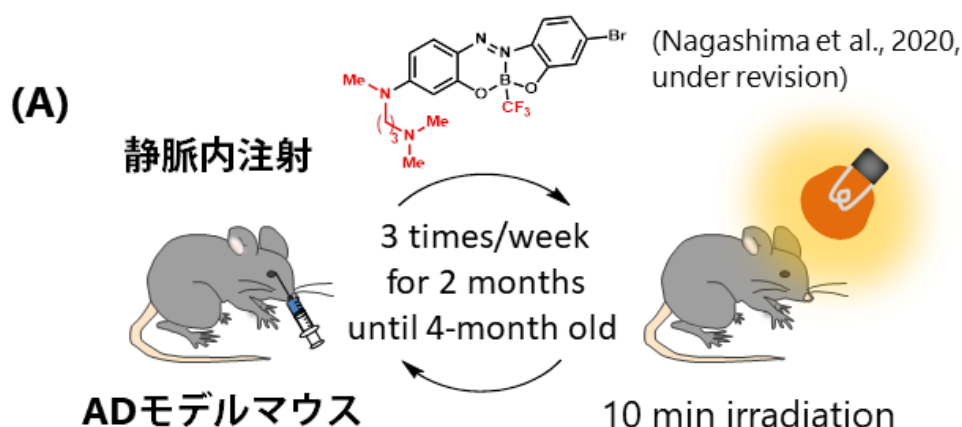


図29. 血液脳関門透過可能触媒による非侵襲的光酸化

(A) 非侵襲的光酸化の方法。 *App*<sup>NL-G-F/NL-G-F</sup>マウスの眼窩静脈叢に光酸化触媒を注射し、光照射をマウスの頭上から行った。この操作を2か月間、週3回繰り返した後、脳を取り出し生化学的に解析した。

(B) FA画分のAβのdensitometryによる定量結果。触媒投与あり光照射なし群に比較して、光酸化群でAβ量が減少した (n = 6, t-test)。

永島臨博士による検討

## 謝辞

本研究の遂行にあたり、懇切丁寧にご指導いただきました、東京大学大学院薬学系研究科機能病態学教室 富田泰輔教授に、この場を借りて厚く御礼申し上げます。

本研究で用いた  $App^{NL-G-F/NL-G-F}$  マウスをご供与いただいた、理化学研究所脳科学総合研究センター、西道隆臣チームリーダー、斉藤貴志副チームリーダーに厚く御礼申し上げます。

本研究で用いた PLX3397 をご供与いただいた、名古屋大学大学院創薬科学研究科の小池礼子先生、横島聡先生、福山透先生に厚く御礼申し上げます。

本研究で用いたヒト脳サンプルをご供与いただいた、University of Pennsylvania School of Medicine Center for Neurodegenerative Disease Research の Dr. Virginia Man-Yee Lee, Dr. John Q. Trojanowski に厚く御礼申し上げます。

また、光酸素化触媒をご供与いただきました東京大学有機合成化学教室の金井求教授、相馬洋平グループリーダーにも厚く御礼申し上げます。定期的に行っていただきましたディスカッションでは、多くの助言や提案をいただき、着実に研究を遂行することができました。

機能病態学教室の皆様にも大変お世話になりました。伊藤弦太特任講師、堀由起子講師、高鳥翔助教、樽谷愛理特任助教にはディスカッションの際に多くの助言や提案をいただきました。学生の皆様にも、楽しい研究生生活を過ごすことができたこと感謝申し上げます。

最後に、研究生生活を送るにあたり、支えてくれた妻の小澤七望、家族、友人に感謝いたします。

令和2年12月18日