

## 論文の内容の要旨

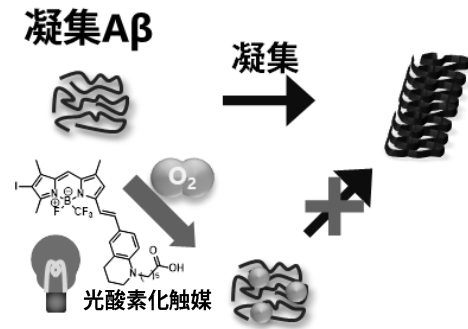
論文題目 アルツハイマー病治療を目指した光酸素化アミロイド $\beta$ の動態解析

氏名 小澤 柊太

### 【序論】

アルツハイマー病 (AD) は認知症の主たる原因疾患である。AD に特徴的な病理学的所見の一つとして老人斑が知られている。老人斑は、異常に凝集したタンパク質が細胞外に蓄積したものであり、アミロイド $\beta$  ペプチド ( $A\beta$ ) を主要構成成分とする。これまでの遺伝学的知見から、 $A\beta$  の凝集及び蓄積が AD 発症の原因であるとする「アミロイド仮説」が広く支持されている。 $A\beta$  の凝集・蓄積は AD 発症の 10 年以上前から開始しているため、AD 発症前段階において、 $A\beta$  のさらなる凝集を阻害することや、凝集・蓄積した  $A\beta$  を効率よく代謝することが、AD の予防・治療戦略として有用である。

そこで我々は  $A\beta$  の凝集を制御することを目的に、有機合成化学教室との共同研究により、 $A\beta$  に人工的に酸素修飾を加える「光酸素化」法を考案した (図 1)。本法は、光によって活性化される低分子化合物「光酸素化触媒 (cat.)」を用いて、凝集  $A\beta$  選択的に酸素修飾する。これまで、合成  $A\beta$  ペプチドに対する光酸素化は凝集  $A\beta$  のさらなる凝集を阻害することが明らかになっていた。しかし、生体内において光酸素化反応が可能かどうか、また光酸素化凝集  $A\beta$  の体内動態については不明であった。そこで私は、*in vivo* における光酸素化の薬効評価および光酸素化凝集  $A\beta$  の脳内代謝について解析し、AD の予防・治療戦略としての光酸素化の有用性について検討した。



### 光酸素化による低凝集化

図 1. 凝集  $A\beta$  の光酸素化

### 【方法・結果】

#### 1. AD モデルマウスに対する *in vivo* 光酸素化の生化学的解析

月齢依存的に脳内に  $A\beta$  が凝集・蓄積する AD モデルマウス (Saito *et al.*, 2014) を用い、凝集  $A\beta$  に対してマウス脳内での光酸素化が可能かどうかを検討した。AD モデルマウスの右海馬領域に外科的にガイドカテーテルを挿入し、1 日 1 回の触媒の投与と光ファイバーによる光照射を 7 日間行った。その後、当該海馬領域をサンプリングし、生化学的解析により反対側左海馬領域と比較した (図 2)。その結果、光酸素化反応特異的な 10 kDa  $A\beta$  バンドが

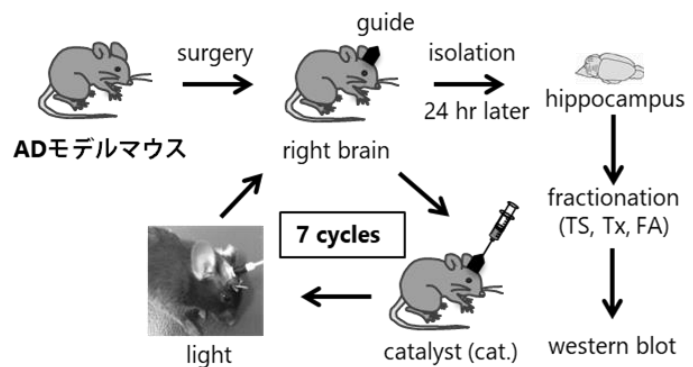


図 2. *in vivo* 光酸素化の方法

より反対側左海馬領域と比較した (図 2)。その結果、光酸素化反応特異的な 10 kDa  $A\beta$  バンドが

検出され、*in vivo* 光酸化反応が進行したことが示唆された。加えて、光酸化特異的な脳内 A $\beta$  量の減少が確認され（図 3）、脳内における凝集 A $\beta$  に対する光酸化は、凝集抑制のみならず、凝集 A $\beta$  の代謝を促進する可能性が示唆された。

## 2. 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

光酸化された凝集 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、予め光酸化を行った上で野生型マウス脳内へ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。その結果、光酸化した場合に 5 kDa、10 kDa A $\beta$  分子種の残存量は共に著減したことから、光酸化は凝集 A $\beta$  の代謝を亢進させることが明らかになった。

脳内免疫を担当する細胞であるミクログリアは A $\beta$  を細胞内に取り込み、endolysosomal pathway を介して分解する。そこで光酸化凝集 A $\beta$  の代謝亢進にミクログリアが関与する可能性を考えた。CSF1R 阻害剤である PLX3397 の投与により脳内ミクログリアを欠失させた上で、光酸化凝集 A $\beta$  の脳内代謝を解析した。その結果、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化凝集 A $\beta$  と非修飾凝集 A $\beta$  の比が上昇し（図 4）、光酸化凝集 A $\beta$  の代謝亢進が阻害されたことが明らかとなった。すなわち、光酸化による凝集 A $\beta$  代謝の亢進にミクログリアが関与していることが示唆された。

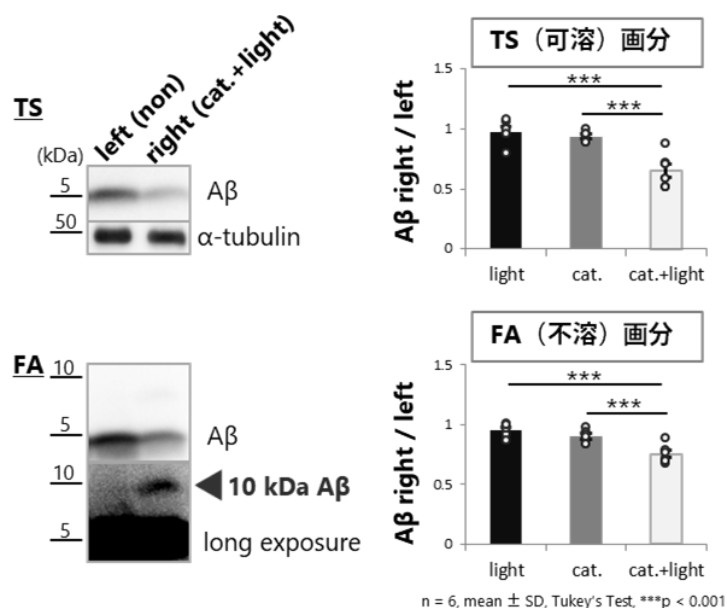


図 3. *in vivo* 光酸化による A $\beta$  量の減少

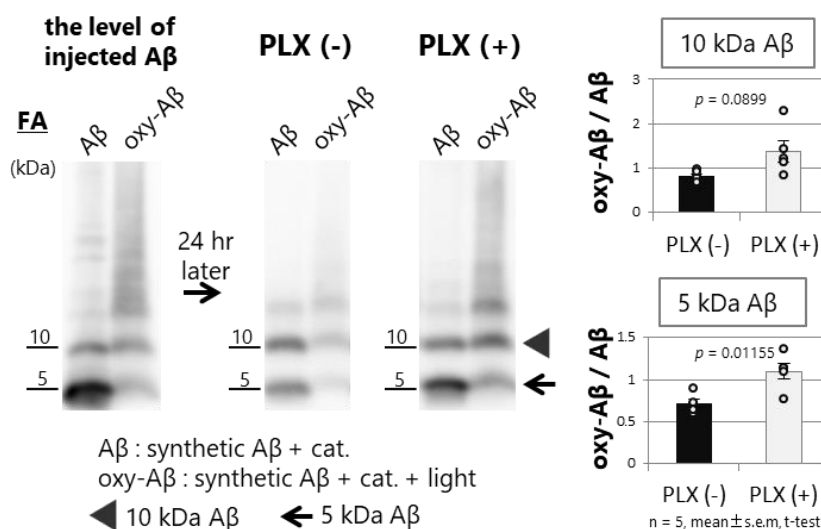


図 4. PLX 投与による光酸化 A $\beta$  代謝亢進の阻害

## 3. 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

ミクログリアによる光酸化凝集 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。まず光酸化の A $\beta$  取込過程における影響を検討するため、光酸化凝集 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。その結果、光酸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。

MG6 細胞内において光酸化凝集 A $\beta$  が主に lysosome に局在していたことから、lysosome における分解機構が亢進する可能性について検討を行った。まず光酸化凝集 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。その結果、非修飾凝集 A $\beta$  と比較して光酸化凝集 A $\beta$  の細胞内残存量は有意に減少した (図 5)。さらに、この光酸化凝集 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。これらのことから、光酸化はミクログリアによる凝集 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し、凝集 A $\beta$  の代謝を亢進させることが示唆された。

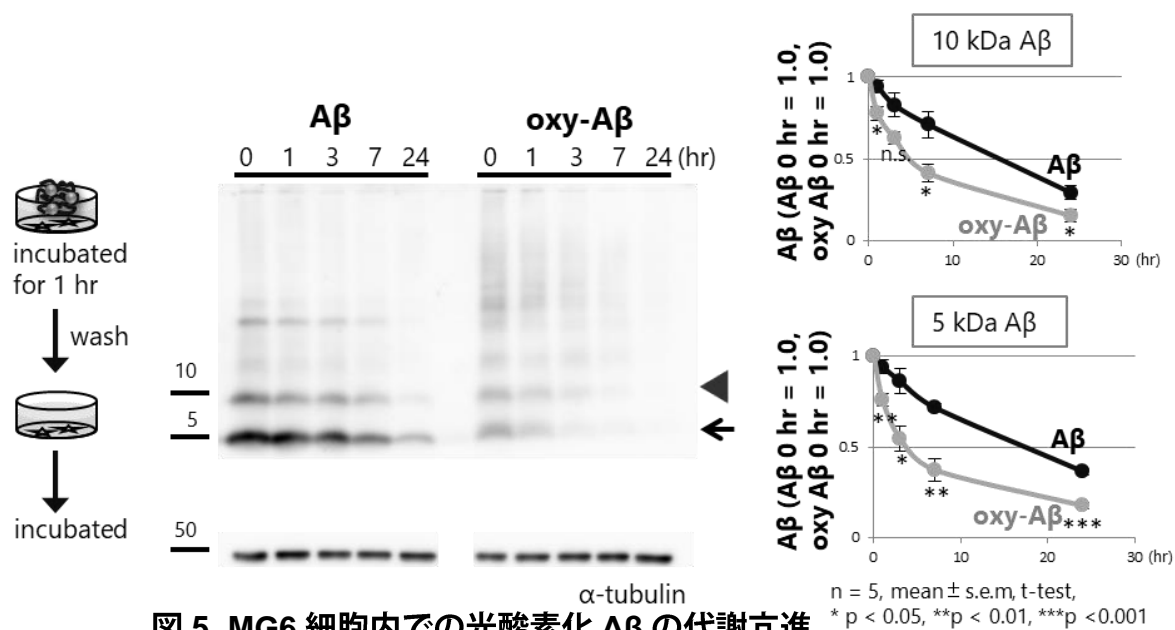


図 5. MG6 細胞内での光酸化 A $\beta$  の代謝亢進

#### 【総括】

本研究において、光酸化は凝集抑制効果のみならず、生体内においては凝集 A $\beta$  の代謝を亢進する効果をもつことが明らかになった。またその代謝亢進機構として、ミクログリアによる endolysosomal pathway における分解が促進されていることが示唆された (図 6)。

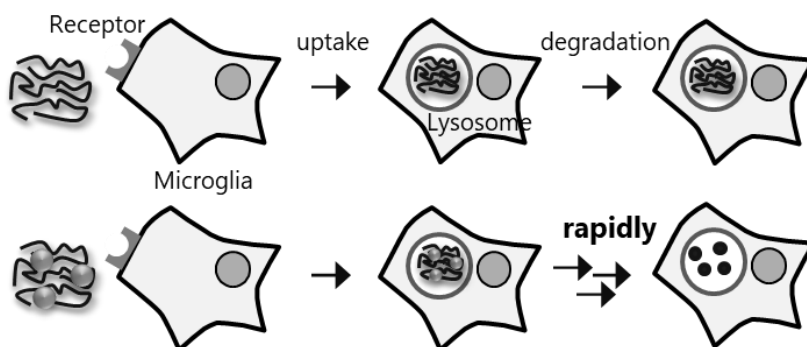


図 6. ミクログリアによる光酸化 A $\beta$  の代謝亢進機構

光酸化凝集 A $\beta$  特異的なミクログリア活性化によって A $\beta$  分解酵素の発現量が上昇した可能性や、光酸化凝集 A $\beta$  に対して特定の分解酵素が高い親和性を示し分解した可能性が考えられる。今後は、光酸化凝集 A $\beta$  を分解する酵素の同定を行うと共に、光酸化凝集 A $\beta$  刺激特異的な活性化などのミクログリアの応答・変化についても検討したい。

以上より、生体内における凝集 A $\beta$  に対する光酸化反応は、凝集 A $\beta$  の脳内動態を制御することによって AD の治療・予防法として有用である可能性が示唆された。