

論文の内容の要旨

論文題目 Comparative pathological study on brain lesions relating to dementia of human

(ヒトの認知症に関連する脳病変の比較病理学的研究)

氏名 チェンバーズ ジェームズ

ヒトの代表的な神経変性疾患であるアルツハイマー病の患者は世界中で 2000 万人以上にのぼる。アルツハイマー病の 99%は孤発性で、「老化」が最大のリスク因子とされている。アルツハイマー病患者の脳では、(1) β アミロイド(A β) 蛋白質が細胞外に蓄積した老人斑 (senile plaque: SP) と、(2) 神経細胞内においてタウ蛋白質が過剰にリン酸化されて生じた神経原線維変化 (neurofibrillary tangle: NFT) が形成され、(3) 脳 (特に記憶を司る海馬) の神経細胞が脱落する。これらの病変により認知症を生じた場合にアルツハイマー病と診断される。上記 (1) (2) (3) の順で病変が形成されると考えられたことから、Hardy らは A β の蓄積が原因でタウ蛋白質のリン酸化そして神経細胞死に進行すると考え、「Amyloid 仮説」を提唱した。一方で、認知機能が正常な老人 (生理的老化) の脳にも SP は形成される。現在のところ、上記の病変を加齢性に発現する動物モデルが開発されていないことがアルツハイマー病の病態解明および治療法開発の障害になっている。家族性アルツハイマー病の変異遺伝子を導入したトランスジェニック (Tg) マウスが広く研究に用いられているが、これらのマウスでは孤発性アルツハイマー病の病態は再現されない。そこで、本研究では様々な動物種において自然発生する脳の老化病変をヒトのそれと比較することによって、アルツハイマー病の病態を理解することを試みた。また、主にイヌとネコの脳に生じる老化病変の違いを明確にし、それぞれがヒトの血管型認知症およびアルツハイマー病の病態を再現する動物モデルとして有用であることを示した。

サル、イヌ、クマなど多くの動物種では A β のアミノ酸配列がヒト型 A β と相同であり、加齢性に脳に老人斑を形成することが報告されているが、動物の SP の疾患的意義については不明であった。ヒトのアルツハイマー病では N 末端が切断された A β サブタイプ (A β pN3) が SP を構成し、生理的老化では N 末端が切断されていない A β サブタイプ (A β N1) が SP を構成することが近年あきらかにされた。そこで、第 1 章では A β の N 末端に着目し、動物の SP が生理的な老化現象か、アルツハイマー病に関連した病変であるかを検証した。脳に SP が観察されたアルツハイマー病患者 (ヒト) および老齢サル、イヌ、クマ、Tg マウスの脳について、SP を構成する A β サブタイプを免疫染色により観察した。アルツハイマー病患者の SP は中心部分が A β pN3 強陽性、辺縁部分が A β N1 弱陽性であった。これに対し、14 週齢の Tg マウスの SP は A β N1 で構成され、A β pN3 は認められなかった。サル、イヌ、クマの SP は A β pN3 と A β N1 で構成されていた。次に、1 歳から 20 歳のイヌ (47 頭) の脳を検索したところ、A β の沈着は 8 歳から観察

され、初めは A β N1 が主体で、年齢とともに A β pN3 の沈着が増加した。とくに、嗜銀性凝集物が重度に沈着している個体で A β pN3 の沈着が顕著であった。15 歳以上の老齢犬では SP の中心部に A β pN3、辺縁部に A β N1 が沈着しており、イヌの SP がアルツハイマー病と同じ A β サブタイプで構成されることが明らかになった。また、キツツキ（アカゲラ）の脳においても A β pN3 の沈着がみられたことから、哺乳類以外の動物種においても A β の N 末端が切断されることがわかった。

第 2 章では、リスザルの脳に沈着する A β の分布を血管分布との関連に着目してしらべた。髄膜から大脳皮質に向かう小型動脈とそれから分枝する毛細血管で構成される血管樹を単位として A β が沈着しており、1 つの血管樹の排出機能低下によってその血管の支配域に A β が沈着することが示された。さらに、A β 40 は小型動脈に、A β 42 は毛細血管に沈着していたこと、毛細血管に近接して SP が観察されたことから、凝集性が強い A β 42 が血管周囲排出路（perivascular drainage system）の上流に、それより凝集性が弱い A β 40 が下流部に沈着することが示唆された。

ヒトでは ApoE4 遺伝子型がアルツハイマー病のリスク因子として知られており、ApoE4 遺伝子型を有する個体で毛細血管壁の A β 沈着が重度であることが報告されている。また、ApoE4 と A β の沈着に随伴して大脳白質のミエリンが減少することが報告されている。これに対し、イヌは ApoE4 アリルをホモで有している。第 3 章ではまずイヌの脳血管樹の末端部毛細血管壁に ApoE と結合した A β 42 が沈着することを確認した。さらに、1 歳から 20 歳までのイヌ（51 頭）の大脳白質のミエリンを定量したところ、年齢および毛細血管壁の A β 沈着程度が増加するとミエリン量が有意に減少することがわかった。ミエリンが減少した個体では、白質の軸索に沿ってユビキチン陽性顆粒が多数観察され、大脳白質の血管周囲には酸化脂質を貪食したマクロファージが集塊状に観察された。また、A β が沈着した毛細血管はしばしば内腔が狭小化していた。以上のことから、A β と ApoE4 が大脳深部毛細血管壁に沈着することにより大脳深部の血流が低下し、白質のミエリン脂質が酸化、脱落することが示唆された。

第 4 章では、イエネコの脳の老化病変について検索した。イエネコでは SP の形成および血管壁への A β 沈着は認められず、大脳皮質に A β が微細顆粒状に沈着していた。これらの凝集沈着物は抗 A β pN3 抗体、抗 A β N1 抗体で認識されなかったことから、イエネコの A β の N 末端エピトープは SP を形成する他の動物種と異なることがわかった。アミノ酸配列を調べたところイエネコの A β は 7 番目のアミノ酸がヒト型 A β と異なっており（イエネコ：グルタミン酸、ヒト：アスパラギン酸）、この違いがイエネコで A β の凝集性が低い原因と考えた。一方で、イエネコでは海馬の錐体細胞内に A β が顕著に観察され、同部位の SDS 抽出物を用いた dot blot および Western blot 解析により A β は oligomer の状態で細胞質内に存在することがわかった。また、共焦点顕微鏡を用いた観察により、細胞内 A β の一部は Rab9 陽性の後期 endosome 内に存在することも明らかにした。興味深いことに、A β 沈着を認めた老齢ネコの一部で神経細胞内に過剰リン

酸化タウも観察された。過剰リン酸化タウが観察された細胞、その脳内分布およびタウのアイソフォームはヒトのアルツハイマー病と同じであった。また、細胞内の過剰リン酸化タウの凝集物はガリアス・ブランク染色陽性であり、NFT であると考えた。さらに、海馬に NFT を認めた個体では錐体細胞数が有意に減少していることもわかった。これらのことから、イエネコでは神経細胞内に蓄積した A β oligomer によって NFT が誘導され、それにより海馬の神経細胞が脱落すると考えられ、アルツハイマー病の病態を再現するモデル動物としてのイエネコの有用性が示された。

第5章では、イエネコの近縁種であるツシマヤマネコの脳を検索した。老齡ツシマヤマネコではイエネコと同様に SP は形成されず、A β の N 末端の 7 番目のアミノ酸残基はグルタミン酸であった。さらに、A β 沈着を認めた個体の一部で NFT が観察された。以上から、イエネコやツシマヤマネコなどネコ亜科の動物種ではヒトとは A β のアミノ酸配列が異なるにもかかわらず、アルツハイマー病で見られる NFT が形成されることがわかった。その理由として、ネコ型 A β はヒト型 A β に比べてはるかに NFT 誘導活性が高いためと推察された。

本研究では、まずサルやイヌなどヒト型 A β を産生する動物では A β pN3 が SP を構成することを明らかにした。これらの動物ではアルツハイマー病と同質の SP が形成されるが、NFT の形成や神経細胞脱落はみられない。また、血管樹単位で A β 沈着が観察されたことから、ヒト型 A β を産生する動物に共通した A β 排出経路として血管周囲排出路の存在が示唆された。サルやイヌで NFT が観察されないのはヒトに比べて寿命が短く、NFT を形成する前に死亡するためと考えられる。これに対し、ヒトと異なるアミノ酸配列の A β を産生するネコ亜科の動物では神経細胞内に A β oligomer が蓄積し、これが tau を過剰リン酸化して NFT が形成されるが、細胞外では可溶性が高いため SP は形成しない。したがって、SP は毒性の強い (NFT を形成する) A β oligomer を細胞外で隔離する「ゴミ箱」の役割をしており、アルツハイマー病病理の進行 (NFT による神経細胞死) を抑制しているのではないかと考えられた。