

## 論文の内容の要旨

論文題目 アミロイド斑と脳内可溶性 A $\beta$ の相関性に関する研究

氏名 仲 泰史

### 序文

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease : AD) は認知症の原因として最も頻度の高い進行性の神経変性疾患である。AD の病理学的特徴として、大脳新皮質や海馬に出現する老人斑が挙げられる。老人斑はアミロイド $\beta$ ペプチド (amyloid  $\beta$  peptide, A $\beta$ ) を主な構成成分とする不溶なアミロイド線維から成り、A $\beta$ が凝集・線維化し、老人斑として蓄積することが AD 発症の原因と考える「アミロイドカスケード仮説」が提唱されているが、その詳細な発症機序は未だ不明である。老人斑は AD の臨床症状発現の 10-20 年以前から出現し、家族性 AD の遺伝子変異が A $\beta$ の産生の変化を介して発症を招くことから、AD の病因に大きく寄与すると考えられる。しかし老人斑数と神経細胞死に相関がみられないことなどの知見もあり、老人斑が AD の病因・病態に果たす役割は未だ不明である。近年、安定放射性同位体を用いた検討から AD 患者脳では非罹患者と比較して A $\beta$ の産生レベルは同程度だが、クリアランスレベルが低下していることが報告されている、これらの知見から、老人斑は AD 脳の脳内可溶性 A $\beta$ の挙動に影響を与え、AD 発症に関与する可能性を検証することは重要と考えられる。

### 目的

本研究ではアミロイドカスケードの最終状態である老人斑自体が、脳内可溶性 A $\beta$ に及ぼす影響を解明するため、AD 病理のモデルマウスである APP tg マウス脳における A $\beta$ 斑蓄積量と、脳内に存在する可溶性 A $\beta$ の総量、ならびに脳間質液中の A $\beta$ 量の相関関係について解析する。さらに脳可溶画分から可溶性 A $\beta$ オリゴマーを分子サイズごとに分離し、脳内で A $\beta$ 凝集・蓄積に関与する A $\beta$ オリゴマー分子種を同定する。また、A $\beta$ 斑の形態の違いが、脳内の可溶性 A $\beta$ 量に与える影響を解明する。これらの検討から、老人斑が脳内可溶性 A $\beta$ の挙動に与える影響を明らかにする。

### 方法

APP tg マウスは A7 系統を用いた。A7 系統は約 10.5 ヶ月齢より脳内に A $\beta$ 斑蓄積を生じることが確かめられている。18-22 ヶ月齢の APP tg マウスを用い、*in vivo* マイクロダイアリシス法を用いて海馬脳間質液を採取し、脳間質液中 A $\beta$ 42 濃度を測定した。また、リバーサダイアリシス法を用いて A $\beta$ 産生を阻

害する $\gamma$ -secretase 阻害剤を投与し、A $\beta$ 42 濃度の減少カーブから、A $\beta$ 42の半減期を算出した。その後脳を摘出し、半脳をトリス緩衝化生理食塩水 (TBS) 中でホモジェナイズした後に超遠心を行い、上清 (TBS 可溶画分) 中の A $\beta$ 42 量を測定した。他方の半脳からパラフィン切片を作製し、抗 A $\beta$ 抗体による免疫組織化学を行い、A $\beta$ 斑蓄積面積を測定し、海馬の A $\beta$ 斑蓄積面積比率と海馬脳間質液中の A $\beta$ 42 濃度、その半減期、ならびに脳内 TBS 可溶画分中の A $\beta$ 42 量の相関を検討した。

次に A $\beta$ 斑を有する高齢 APP tg マウス脳 TBS 可溶画分を、ゲルろ過クロマトグラフィーを用いて分離し、各フラクション中の A $\beta$ 42濃度を測定し、TBS 可溶画分中に存在する A $\beta$ 分子種を同定した。各 A $\beta$ 分子種の濃度と海馬 A $\beta$ 斑蓄積面積比率の関係を検討し、A $\beta$ 斑蓄積面積量の増加に依存して増加する A $\beta$ 分子種の同定を行った。さらに、TBS 可溶画分中の A $\beta$ 分子種に A $\beta$ 蓄積を誘導する凝集核形成能を持つか否かについて、APP tg マウス脳への注入実験により検討した。また、A $\beta$ 斑を有しない若齢 APP tg マウス脳における TBS 可溶 A $\beta$ 分子種の出現パターンを検討し、高齢 APP tg マウスと比較した。

さらに A $\beta$ 斑形態の違いが脳内可溶性 A $\beta$ の挙動に及ぼす影響を検討するため、老人斑アミロイドと特異的に結合・蓄積する CLAC (collagenous Alzheimer amyloid plaque component) に着目した。CLAC 前駆体タンパク質 (CLAC-P) を神経細胞特異的に発現する CLAC-P tg マウスを APP tg マウスと交配し、APP/CLAC-P 二重 tg マウスを作出し、免疫組織化学により A $\beta$ 斑の蓄積量と形態を検討した。さらに APP/CLAC-P 二重 tg マウスにおいて、海馬 A $\beta$ 斑蓄積面積比率と海馬脳間質液中及び脳内 TBS 可溶画分中の A $\beta$ 42 量の関係を検討した。

## 結果

18-22 ヶ月齢 APP tg マウス脳の脳間質液中 A $\beta$ 42 濃度及び半減期、TBS 可溶画分中 A $\beta$ 42 濃度をそれぞれ海馬 A $\beta$ 斑蓄積面積と比較した結果、脳内可溶性 A $\beta$ 42 量は海馬 A $\beta$ 斑蓄積面積比率と正に相関する傾向、脳間質液中 A $\beta$ 42 濃度及び半減期は海馬 A $\beta$ 斑蓄積面積比率と負に相関する傾向があることが分かった。この結果は、A $\beta$ 斑が脳内の可溶性 A $\beta$ 42 の挙動に影響を与えている可能性を示唆している。

次に 18-22 ヶ月齢 APP tg マウス脳 TBS 可溶画分をゲルろ過クロマトグラフィーで分子サイズごとに分離すると、A $\beta$ 42は 200 - 300 kDa (ピーク 1)、50 - 80 kDa (ピーク 2)、10 - 20 kDa (ピーク 3) の 3 つの異なるピークに溶出された。そこで各ピークと海馬 A $\beta$ 斑蓄積面積比率を比較したところ、ピーク 1A $\beta$ 量は海馬 A $\beta$ 斑蓄積面積比率と正の相関を示したが、ピーク 2A $\beta$ 量は相関を示さなかった。さらにピーク 1A $\beta$ 出現の時期特異性について検討すると、A $\beta$ 斑を有さない若齢 APP tg マウス脳ではピーク 1A $\beta$ はほとんど存在しないが、ピーク 2A $\beta$ は高齢の APP tg マウスと同レベルに存在した。これらの結果から、ピーク 1A $\beta$ は A $\beta$ 斑蓄積に依存して出現する分子種であるが、ピーク 2A $\beta$ は A $\beta$ 斑蓄積に依存しない分子種であることが分かった。さらに、ピーク 1A $\beta$ の凝集核形成能について検討するため、ピーク 1A $\beta$ を 10.5 カ月齢 APP tg マウスの海馬に注入し、4 か月後に海馬における A $\beta$ 蓄積比率を検討すると、PBS を注入した対側と比較して有意に A $\beta$ 蓄積が増加した。この結果は、ピーク 1A $\beta$ が A $\beta$ 蓄積の凝集核形成能を有することを示唆するものと考えた。

次に APP tg マウスと CLAC-P tg マウスを交配して作出した APP/CLAC-P 二重 tg マウス脳を免疫組織化学的に解析したところ、APP/CLAC-P 二重 tg マウス脳では APP tg マウスに比べ、境界不明瞭なびまん性 A $\beta$ 斑が減少し、境界明瞭でコンパクトな中・小型サイズの A $\beta$ 斑の数が増加した。そこで A $\beta$ 斑蓄積面積を定量した結果、APP/CLAC-P 二重 tg マウス脳では APP tg マウス脳に比べ、A $\beta$ 斑蓄積面積が有意に低下していた。一方、 $\beta$ -sheet 構造に特異的に結合する蛍光色素 thioflavin S による染色を行い、陽性シグナル数を定量した結果、APP/CLAC-P 二重 tg マウス脳では APP tg マウス脳に比べ thioflavin S 陽性シグナル数が有意に増加していた。これらの結果は、CLAC が A $\beta$ 蓄積のコンパクト化を促進する因子である可能性を示唆している。そこで 18-22 ヶ月齢の APP/CLAC-P 二重 tg マウスにおいて、脳間質液中 A $\beta$ 42 濃度及び TBS 可溶画分中 A $\beta$ 42 濃度を測定した結果、APP tg マウスと比較して脳間質液中 A $\beta$ 42 濃度が有意に低いことがわかった。一方 TBS 可溶画分中 A $\beta$ 42 濃度は同程度であった。これらの結果から A $\beta$ 斑蓄積形態の違いにより、脳内可溶性 A $\beta$ の挙動が異なる可能性を見出した。

## 考察・結語

本研究において、APP tg マウス脳では、A $\beta$ 斑蓄積量の増加に比例して、TBS 可溶画分中の A $\beta$ 42 量は増加し、脳間質液中 A $\beta$ 42 濃度が減少する傾向があることを見出した。さらに、APP tg マウス脳 TBS 可溶画分中から、A $\beta$ 斑蓄積依存的に出現し、A $\beta$ 蓄積誘導能を有する 200 kDa 以上のサイズを持つピーク 1 A $\beta$ を同定した。これらの結果は、A $\beta$ 斑が脳間質液中の A $\beta$ を減少させる一方で、可溶性ピーク 1 A $\beta$ を増加させたことを示し、A $\beta$ 斑は脳内可溶性 A $\beta$ の挙動に影響を与える作用がある可能性を示唆した。今後 A $\beta$ 斑が脳内可溶性 A $\beta$ と直接作用して、その挙動を変化させうるか、アミロイド斑と A $\beta$ の結合実験等の検討を行い、その因果関係を明らかにする。

また、本研究において APP tg マウスにおける CLAC-P の過剰発現が、びまん性 A $\beta$ 斑を減少させ、 $\beta$ -sheet 構造の豊富な thioflavin S 陽性を呈するコンパクトな A $\beta$ 斑を増加させたことから、CLAC は A $\beta$ 蓄積の成熟度を高める因子であると考えた。さらに APP/CLAC-P 二重 tg マウス脳では、APP tg マウス脳に比べ脳間質液中 A $\beta$ 濃度が低かったことから、コンパクトな A $\beta$ 斑はびまん性 A $\beta$ 斑に比して、脳内可溶性 A $\beta$ の挙動に与える作用がより強い可能性があると考えられた。

以上、本研究では、A $\beta$ 斑が、脳内可溶性 A $\beta$ の挙動に関与する可能性を *in vivo* レベルで示唆した。この結果は、老人斑の形成が、単なる終末的な結果ではなく、AD の病理・病態に影響を与える重要なイベントであることを示唆している。今後本研究で同定した A $\beta$ 蓄積を誘発する可溶性ピーク 1 A $\beta$ の形成機序を解明するとともに、他の可溶性 A $\beta$ 分子種やアミロイド斑との関係を明らかにし、老人斑が脳内可溶性 A $\beta$ に作用することにより、AD 発症に関わる分子機序を解明したい。