

論文の内容の要旨

論文題目 β アミロイドと興奮性アミノ酸のラット海馬内共注入
による相乗的神経細胞脱落について

氏名 森本 潔

はじめに

アルツハイマー病 (AD) は痴呆を主症状とする進行性の神経変性疾患で、病理的特徴として認知機能に関与する脳部位等での老人斑沈着、神経原線維変化、顕著な神経細胞脱落などがある。老人斑の主要構成成分である β アミロイド ($A\beta$) はアミノ酸 40 残基前後からなるポリペプチドであり、AD 発症原因のひとつと考えられている。その根拠として、1) 病変時系列的に初期に出現する、2) 疾患特異性が高い、3) 家族性 AD にて $A\beta$ の代謝に変化が生じる、4) $A\beta$ は β シート構造をとり線維化することにより *in vitro* 培養神経細胞に対して毒性作用 (MTT 還元能低下) を示すなどが挙げられる。

これまでの問題点は *in vivo* では $A\beta$ の毒性を示すモデルがないことである。現在までに *in vivo* にて、記憶学習に関与するラット海馬などに $A\beta$ を注入し、その神経変性作用について多数調べられたが殆どの場合神経脱落が誘発されない。また、ヒトアミロイド前駆蛋白を過剰発現させたトランスジェニックマウスにおいても $A\beta$ の沈着は確認されるが顕著な神経脱落はおこらないことが報告されている。以上のことは、 $A\beta$ だけでは神経脱落を誘発するには不十分であり、それ以外に何らかの $+\alpha$ のファクターが脱落に関与することを示唆する。このファクターを解明することは AD における神経脱落機構を理解するのに重要であると考えられる。この $+\alpha$ のファクターが何であるかを探るため、私は興奮性神経伝達物質である興奮性アミノ酸に着目した。興奮性アミノ酸のひとつであるグルタミン酸は脳内に豊富に存在し、虚血時などに過剰放出されるとレセプターを介した神経細胞脱

落（興奮毒性）を惹起することが知られている。この興奮毒性に特に脆弱なのが脳皮質や海馬であり、これらの部位はADにおいて神経脱落が顕著な部位でもある。

そこで本研究では、 $A\beta$ の *in vivo*での神経細胞脱落への関与を探るため、 $A\beta$ と共に低用量のイボテン酸（グルタミン酸 N-methyl D-aspartate (NMDA) レセプターアゴニスト）をラット海馬内に同時注入することにより、AD の場合と同様な海馬領域の神経脱落が誘発されるかを組織化学的に検討した。その結果、 $A\beta$ とイボテン酸との共注入により広範囲で神経細胞が脱落することが分かった。このことは、 $A\beta$ が興奮性アミノ酸に対する感受性を増強することにより、神経細胞を脱落させることを示唆する。また、その $A\beta$ の神経脱落促進活性は $A\beta$ の特異的アミノ酸配列よりもむしろ β 構造をとり線維化した高次構造に依存することが分かったので合わせて報告する。

$A\beta$ とイボテン酸とのラット脳内共注入による海馬神経細胞相乗的脱落

$A\beta$ あるいはイボテン酸単独注入によるラット海馬神経細胞への影響

ラット海馬特定位置に $A\beta$ 1-40（単独）を注入し1週間後組織をホルマリン灌流固定した。その脳切片をニッスル染色した結果、注入部位付近に $A\beta$ 様の沈着物が確認されたが海馬神経細胞は殆ど脱落しなかった。イボテン酸単独注入を同様に検討したところ、高用量では神経脱落は起きたが、低用量注入では注入部位付近でわずかに神経細胞が脱落したのみであった（図1）。

$A\beta$ とイボテン酸との共注入によるラット海馬神経細胞の相乗的脱落

$A\beta$ 1-40と低用量イボテン酸を予め混合し、ラット海馬内に共注入し、ニッスル染色を行った。その結果、注入部位のみならず、そこから離れた海馬CA1や歯状回領域の広範囲にわたる神経細胞が脱落した（グリア細胞は脱落せず）（図2A,B）。一方、逆配列の $A\beta$ 40-1あるいはウシ血清アルブミン（BSA）をイボテン酸と共注入しても神経細胞脱落は殆ど起こらなかった（図2C-F）。このことは、この神経細胞脱落が $A\beta$ 特異的であることを示唆する。

$A\beta$ 1-40またはイボテン酸を単独あるいは共注入したときの神経細胞体脱落範囲を以下の方法で定量的に測定した。すなわち、一個体につき全海馬を含む $50\mu\text{m}$ 厚の脳冠状断面切片を収集し、切片を6枚おきに抽出し、各切片について脱落神経細胞層部位を面積として算出し、それを積算して脱落体積とした（図3）。その結果、 $A\beta$ とイボテン酸の共注入による脱落は各々単独注入による脱落の合計をはるかに上回り、この効果が相乗的であることが確認された。図4と5は脱落部位の神経細胞特異的マーカー微小管関連蛋白(MAP2)免疫染色及び神経核および周辺部特異的染色NeuN免疫染色結果である。ニッスル染色の場合と同様にいずれの染色性も、単独注入群に比べて $A\beta$ 1-40とイボテン酸共注入群では広

範囲にわたって顕著に失われており、神経細胞は神経突起も含めて脱落していることが分かった。なお、NMDAもイボテン酸の場合と同様に、 $A\beta$ 1-40との共注入により同様な神経脱落を誘発する。

脱落部位における $A\beta$ の検出

$A\beta$ 1-40とイボテン酸共注入による脱落部位を抗 $A\beta$ 抗体で免疫染色した結果、 $A\beta$ は注入部に沈着しているだけでなく、その周辺の脱落部位にも拡散していることが確認された(図6)。従って、 $A\beta$ は脱落部位まで到達し、そこでイボテン酸との相乗的脱落効果を発揮したものと推定される。但し、周辺脱落部位では沈着部分に比べて染色性が弱く、拡散した $A\beta$ は量的にわずかであると考えられる。

グリア細胞の浸潤

脱落部位でのグリア系細胞の浸潤について各々の細胞に特異的な抗体を用いて検討した。その結果、単独注入に比べて $A\beta$ 1-40とイボテン酸共注入による脱落部位周辺では活性化アストロサイト及びミクログリア(図7)の顕著な浸潤が観察された。このことは、神経細胞脱落が起こった後にこれらの細胞が浸潤した可能性を示唆するが、 $A\beta$ によりミクログリアが活性化され間接的に神経細胞脱落を惹起した可能性も否定できない。

MK-801による相乗的神経細胞脱落抑制

NMDAレセプターアンタゴニストMK-801の $A\beta$ 1-40とイボテン酸共注入による神経脱落に及ぼす影響を調べた。その結果、MK-801は神経脱落をほぼ完全に抑制した(図8, 9)。このことは、共注入による神経脱落が興奮性アミノ酸を介して起こることを示し、 $A\beta$ は神経細胞の興奮性アミノ酸に対する感受性を増強することにより、神経細胞脱落を惹起することを強く示唆する。

そのメカニズムとして、 $A\beta$ により神経細胞の膜電位が正常に保てなくなり、興奮性アミノ酸に対するNMDAレセプターの感受性が亢進するため、少量の興奮性アミノ酸でも細胞内にカルシウムが流入し、神経細胞が脱落した可能性が考えられる。

$A\beta$ とイボテン酸共注入相乗的神経脱落における $A\beta$ 線維構造依存性

線維形成

$A\beta$ 興奮毒性増強作用が $A\beta$ のアミノ酸一次配列によるものなのか、 $A\beta$ が β 構造をとり線維化した高次構造に由来するものかは以上の実験からでは明らかではない。そこで、いわゆる β 構造を有し線維化した蛋白が組織に沈着し、機能傷害を引き起こすアミロイドーシスに注目した。ADも脳アミロイドーシスの一種と考えられている。アミロイドーシス沈着

蛋白としては A β のほかに、膵臓に沈着するアミリンや甲状腺のカルシトニンなどがある (表 1)。これらの蛋白は一次配列上の相同性はないが共通して MTT 還元能を低下させる作用を持つ。ここでは、 β 構造をとり線維構造を保持したアミリン、カルシトニンが A β の場合と同様にイボテン酸との共注入により相乗的神経脱落を誘発するかどうかについて検討した。

まず、セルフリー系におけるチオフラビン T との結合による線維形成を調べた結果、A β 1-40、アミリン、カルシトニンはいずれも線維形成を示したのに対して、A β 40-1 や BSA はほとんど線維形成を示さなかった (図 10)。

β 構造を有し線維化した蛋白とイボテン酸による相乗的神経細胞脱落作用

アミリンあるいはカルシトニンを単独でラット海馬内に注入したが、いずれも顕著な神経細胞脱落を誘発しなかった。一方、低用量のイボテン酸とアミリンまたはカルシトニンを共注入した結果、どちらの場合も A β と同様に相乗的に広範囲の神経細胞を脱落させた (図 11)。

また、抗 MAP2 および抗 NeuN 免疫染色の結果、いずれの共注入群でも神経細胞が神経突起も含めて広範囲にわたり脱落していることが確認された (図 12, 13)。脱落体積を定量的に測定したところ、これらの β 構造を持ち線維化した蛋白およびイボテン酸共注入による脱落は、各々の単独注入における脱落の合計をはるかに上回り相乗的であった。(図 15)。また、MK-801 はこれらの蛋白とイボテン酸共注入による神経細胞脱落をほぼ完全に抑制した (図 14, 15)。以上のことより、アミリン、カルシトニンなどの β 構造を持ち線維化した蛋白も、A β の場合と同様に海馬神経細胞の興奮性アミノ酸に対する感受性を増大させ神経細胞脱落を誘発することが示唆された。

総括

本研究により、*in vivo* においては初めて A β が神経細胞脱落に関与していることを明らかにした。この相乗的神経脱落は、一次配列は異なるが β 構造を有し線維化した蛋白 (アミリン、カルシトニン) によっても共通に惹起され、NMDA レセプターのアンタゴニストによって共通に抑制された。

以上のことから、A β とイボテン酸による *in vivo* における相乗的神経細胞脱落は A β の特異的アミノ酸配列よりもむしろ高次構造 (β 構造をとり線維化したもの) に基づく作用であり、A β は興奮アミノ酸受容体の感受性を上げ、最終的にはその受容体を介して神経毒性を増強することが示唆された。この動物モデルは、A β 毒性を抑制する化合物の評価系として応用できるものと考えられる。