

審査の結果の要旨

氏名 森 本 潔

アルツハイマー病は痴呆を主症状とする進行性の神経変性疾患で、その病理的特徴として老人斑沈着、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 アミロイドはアミノ酸40残基前後からなるポリペプチドであり、病変時系列的に初期に出現する病理変化であること、疾患特異性が高いこと、家族性アルツハイマー病にて β アミロイドの代謝に変化が生じること、 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)を示すことなどから、アルツハイマー病発症原因のひとつと考えられている。

これまでの問題点として*in vivo*では β アミロイドの毒性を示すモデルがないことがあげられる。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 β アミロイドを注入し、その神経変性作用について多数調べられたが、神経脱落を誘発するとする報告はほとんどない。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、 β アミロイド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、 β アミロイド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ファクターが神経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アルツハイマー病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 α のファクターが何であるかを探るため、本論文の著者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、これらの部位はアルツハイマー病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、 β アミロイドの*in vivo*での神経細胞脱落への関与を探るため、 β アミロイド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、アルツハイマー病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。さらに、その β アミロイドの神経脱落促進活性の構造特異性についても検討した。

(1) β アミロイド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

ラット海馬特定位置に β アミロイド1-40あるいは低用量のイボテン酸を注入し、1週間後にホルマリン灌流固定した脳切片ニッスル染色においては、海馬神経細胞脱落はほとんど認められなかった。一方、 β アミロイド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すると、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脱落を惹起することが明らかとなった。この神経細胞脱落は、神経細胞特異的マーカー微小管関連蛋白(MAP2)免疫染色、または神経核および核周部特異的染色NeuN免疫染色を用いても確認された。抗 β アミロイド抗体で免疫染色した結果から、 β アミロイドは注入部先端だけでなく、神経脱落部位にも拡散していることがわかった。また、この神経細胞脱落部位にアル

ツハイマー病でも見られるアストロサイト及びミクログリアの顕著な浸潤を認めた。 β アミロイド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定量的に測定した結果、 β アミロイド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ることから、この効果が相乗的であることが明らかとなった。一方、逆配列の β アミロイド40-1あるいはウシ血清アルブミンをイボテン酸と共注入しても顕著な神経細胞脱落を殆ど惹起しなかった。

この β アミロイド1-40とイボテン酸共注入による神経脱落を、NMDAレセプターアンタゴニストMK-801はほぼ完全に抑制した。このことは、共注入により神経脱落が興奮性アミノ酸を介して起こることを示し、 β アミロイド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。脱落メカニズムとして、 β アミロイド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について議論している。

(2) β アミロイドとイボテン酸共注入相乗的神経脱落における線維構造依存性

β アミロイドの興奮毒性増強作用が、 β アミロイドのアミノ酸一次配列によるものなのか、 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。アルツハイマー病も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、脾臓に沈着するアミリンや甲状腺のカルシトニンなどが知られている。これらの蛋白は一次配列上の相同性は低いが、共通してMTT還元能を低下させる作用を持つことが知られている。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、 β アミロイド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。

ラット海馬への注入実験に先立ち、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。その結果、 β アミロイド1-40、アミリン、カルシトニンはいずれも線維形成を認めたのに対して、 β アミロイド40-1やウシ血清アルブミンは線維形成を認めなかった。この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、どちらも β アミロイドの場合と同様に、相乗的に広範囲の神経細胞脱落を惹起した。抗MAP2および抗NeuN免疫染色においても、いずれの共注入群でも神経突起も含めた広範囲にわたる神経細胞の脱落を確認した。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。以上のことは、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、 β アミロイド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を示唆する。

以上本研究により、*in vivo* においては初めて、 β アミロイドが神経細胞脱落に関与していることを明らかにした。ここで示した本相乗的神経脱落は、一次配列は異なるが、 β 構造を有し線維化した蛋白によっても共通に惹起され、この脱落をNMDAレセプターアンタゴニストが共通に抑制することから、 β アミロイド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、 β アミロイドの特異的アミノ

酸配列よりもむしろ高次構造に基づく作用であり、 β アミロイドは興奮性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を示唆する。これらの新知見は、 β アミロイドの毒性を抑制する化合物を評価する動物モデルとしても応用できるもので、アルツハイマー病治療薬の開発に重要な指針を提供するものであり、薬理学、病態生理学の発展に寄与するところが大きく、博士（薬学）の学位に値するものと判断した。