

論文の内容の要旨

東京大学大学院農学生命科学研究科

平成 12 年度博士課程 入学

氏 名：木村 展之

指導教官：吉川 泰弘

論文題目：Investigations of age-related changes of Alzheimer's disease-related proteins in cynomolgus monkey brains and the affection of amyloid beta peptide to neural cells *in vitro*.

(カニクイザル脳組織を用いたアルツハイマー病関連蛋白の加齢性変化および *In vitro* でのアミロイド β の神経系細胞に対する影響)

(要旨)

高齢化社会を迎え、加齢性神経変性疾患であるアルツハイマー病 (AD) は世界的な問題となりつつある。AD はヒト特有の疾患であり、老人斑 (SP) および神経原線維変化 (NFT) を主病変とする脳疾患である。SP は大脳新皮質におけるアミノ酸数 39-43 のアミロイド β 蛋白 (A β) の沈着病変であり、NFT は神経細胞内に微小管結合蛋白タウが異常リン酸化・凝集する病変である。老齢カニクイザルは自然発症的に大脳に SP 形成が確認され、A β のアミノ酸配列もヒトと 100%一致し、AD 病態および神経系の加齢性変化の検索に極めて有用な動物種であると考えられる。

本研究ではカニクイザル脳組織を用い、AD 関連蛋白群の加齢性変化を免疫組織化学的・生化学的に検索し、加齢によりどのような変化が生じているのかを初めて明らかにした (第 1 章)。また、ラット、カニクイザル初代培養系を用い A β の神経系細胞に対する影響を検索するとともに、げっ歯類および霊長類神経系細胞の A β に対する反応性の種差について検索した (第 2 章)。

(第 1 章) (A) Presenilin1 蛋白 (PS1) はアミロイド前駆体蛋白 (APP) から A β が切断産生される際に働く γ セクレターゼ複合体を形成する因子の一つで、若年性に発症する家族性 AD (FAD) の 80%以上がこの PS1 変異によるものである。PS1 には相同性の高い Presenilin2 蛋

白 (PS2) が存在し、PS2 変異もまた FAD 原因因子のひとつである。そこで、両 PS 蛋白 (PSs) について加齢性変化を検索した。この結果、PSs は主に神経細胞胞体内に顆粒状染色像として確認され、大型神経突起にも存在することが明らかになった。また、PSs は SP 付随腫大神経突起における蓄積が確認され、PSs がカニクイザル脳においてヒトと同様に老人斑形成に深く関与していることが示唆された。腫大神経突起における陽性数および染色強度は PS1 の方が顕著であった。生化学的検索より、PS1 は加齢に伴い核付随 ER および神経終末に蓄積することが明らかになった。一方、PS2 は同様の加齢性変化を示さず、蛋白発現量も PS1 に比べて著しく低レベルであった。このことから、カニクイザル脳ではヒトと同様、PS1 が主な PS 蛋白であり、加齢性に蓄積することにより老人斑形成に深く関与していることが示唆された。

(B) SP 関連蛋白として APP、アポリポ蛋白 E (ApoE)、NFT 関連蛋白としてタウ、タウキナーゼである GSK3 β および CDK5、CDK5 活性化因子 p35 および p25 について加齢性変化を検索した。免疫組織化学的検索の結果、APP および ApoE は SP に存在することが明らかになった。しかし、APP が PSs と同様に腫大神経突起のみに蓄積が確認されたのに対し、ApoE は SP 全体を覆うように分布した。APP と PSs の SP における局在が一致したことは、A β 産生が神経突起部においても生じる可能性を示唆する重要な結果であると考えられる。ApoE は A β と結合・輸送するリポ蛋白であり、SP 全体を覆う染色像は ApoE と結合した A β が凝集・蓄積した結果、老人斑が形成されたという可能性を示唆している。他方、カニクイザル脳組織では NFT は確認されなかった。生化学的検索より、APP は加齢性に神経終末において蓄積することが明らかになった。APP は APP695・APP751・APP770 という 3 種の分子種を持ち、脳内では主に APP695 と APP751 が発現することが知られている。カニクイザル脳では APP695 が主要な APP であり、加齢と共に APP751 の発現が上昇することを初めて明らかにした。このことから、APP751 が老人斑形成に深く関与している可能性が示唆された。ApoE はミクロゾーム分画において有意な蛋白量上昇が見られた。これは加齢と共に ApoE 産生量が上昇し、より多くの A β と結合・輸送することを示唆している。NFT 関連蛋白群 (タウ、タウキナーゼ、p35、p25) は APP と同様、神経終末分画において有意な加齢性蓄積が見られた。本研究にて NFT は確認されなかったが、ヒトでは NFT が SP よりも老年期に確認される病変であることから、さらなる「加齢」にり、NFT 関連蛋白群の蓄積が NFT 形成に繋がるのかもしれない。

(C) 老齢のヒト脳および AD 患者脳では神経細胞内に A β が蓄積し、この細胞内 A β 蓄積が AD 病態に深く関与しているのではないかと大きな注目を浴びている。そこで私は細胞内 A β に注目し、脳内局在および加齢性変化を検索した。その結果、PFA 固定・過ヨウ素酸前処理・オートクレーブ処理の組み合わせにより、若齢カニクイザル脳における細胞内 A β の染色に成功した。細胞内 A β は主に大型錐体神経細胞の胞体内および大型神経細胞の突起に顆粒状に存在し、老齢個体の神経細胞内ではやや凝集して偏在することが明らかになった。A β 40、42 および 43 各分子種に染色性の差異は見られなかった。また、細胞内 A β 陽性細胞数の加齢に伴う顕著な増加はみられなかった。生化学的検索より、マイクロゾーム分画で加齢性に A β 42 蛋白量が増加し、A β 43 蛋白量が顕著に減少していた。A β 40 および総 A β 量に変化が見られなかったこと

から、カニクイザル脳では主に A β 40 と 43 が産生されており、加齢性に A β 42 産生量が増加することが明らかになった。神経終末分画では総 A β 量の加齢に伴う増加が見られ、A β 分子種によらず加齢性蛋白量増加が確認された。第 1 章 (A)・(B) の結果も含め、神経終末分画におけるこれら AD 関連蛋白の蓄積は、神経終末における蛋白輸送および細胞内の蛋白代謝能低下に由来しているのではないかと考えられる。また、このような細胞内蛋白代謝の制御不能が神経細胞全体の機能低下および細胞死に繋がる可能性がある。

(第 2 章) (A) これまで *in vitro* で A β の神経毒性に関する様々な研究が行われてきたが、多くは生体内に比べ過剰濃度 (10 μ M 以上) の A β を用いた急性作用 (24 時間以内) を検索したものである。しかし、生体内ではごく少量の A β が長い時間をかけて蓄積し加齢性 AD が引き起こされると考えられる。そこで私は、比較的低濃度 (2 および 5 μ M) の A β をラットおよびカニクイザル胎仔大脳皮質初代培養系に加え、最大 14 日間にわたる A β の神経系細胞に与える影響を組織学および生化学的に検索した。本実験で用いた培養系には神経細胞のみならず各種グリア細胞も存在しており (神経細胞が 9 割以上を占める)、実際の脳内に近い状態で検索できるという利点がある。神経細胞に与える影響として、アポトーシス検索および Synaptophysin、APP の C 末端断片 (β CTF) および GSK3 β に関する生化学的検索を行った。ラット、カニクイザル培養系ともに、A β 添加 14 日後でもアポトーシス細胞の有意な増加は見られず、各種蛋白群の蛋白発現量に変化は見られなかった。このことから、本実験で用いた濃度では A β による神経細胞の傷害および反応は生じていないことが明らかになった。一方、ラット、カニクイザル培養系ともに、アストログリア (AG) 関連蛋白である GFAP および ApoE 蛋白量の有意な増加が見られ、増加度はラットの方が顕著であった。また、より毒性の高い分子種である A β 42 添加群において有意な蛋白発現上昇が確認された。

このことから、A β が蓄積し始める加齢および AD 進行初期においては、神経細胞よりもむしろ AG の対 A β 反応が主に生じていることが示唆された。

(B) A β が直接 AG を刺激しているのかどうかを確認するため、Conditioned-Medium (CM) 実験系を用いて AG の対 A β 反応経路を検索した。(神経細胞を主構成成分とする初代培養系に A β を添加・培養した後の培養液を CM として用いた。) CM をラットおよびカニクイザル AG 単独培養系に加えた群と、直接 A β を添加した AG 単独培養系を比較し、A β が直接 AG を刺激しているのか、あるいは A β により刺激された神経細胞由来の何らかの液性因子によって AG が刺激されているのかを検索した。この結果、ラットおよびカニクイザル AG は直接 A β に刺激されることで活性化が生じる (GFAP 増加) ことが明らかになった。一方、ApoE 産生経路には両者に種差が見られた。ラット AG は CM 添加群において ApoE 産生量の有意な増加が見られたのに対し、カニクイザル AG は直接 A β を添加した群でのみ、ApoE 産生量の有意な増加が確認された。以上の結果より、最終的なヒトへの外挿を考慮すると、本実験で用いたカニクイザル培養系は極めて有用な実験系である可能性を持っていることが示唆された。

(C) A β が種々の神経毒性を持っていることは過去の研究により明らかになっているが、生体内での機能は未だ不明である。昨今の研究により、ロイシンリッチリピート構造 (LRR) を持

つ蛋白 Lib が、A β 添加により遺伝子発現が上昇することが *in vitro* で確認された。そこで私は、A β の生体内機能を明らかにする目的として、Lib と同じく LRR を持つ LGI3 のラットにおける塩基配列およびアミノ酸配列を明らかにし、ラット培養系にて A β 添加による同遺伝子発現の検索を行った。LGI3 はヒト遺伝性癲癇患者で発見された遺伝子 LGI1 のファミリーであり、未だ脳内での機能は明らかになっていない。塩基配列同定の結果、ラット LGI3 はアミノ酸レベルでヒトと 90%以上の相同性を持つことが明らかになり、ラット脳組織では主に大脳皮質で発現していることが明らかになった。ラット初代培養系および AG 単独培養系を用いた分子生物学的検索より、ラット LGI3 は主に AG で発現することが明らかになった。A β 40 添加により、ラット AG 単独培養系で有意な LGI3 発現上昇が確認された。A β 40 は生体内で恒常的に産生される A β 分子種であることから、LGI3 は A β の脳内における正常機能に関与していることが示唆された。また、A β を主に産生するのは神経細胞であり、LGI3 が主に AG にて発現する遺伝子であることから、LGI3 は A β を介した神経細胞-AG の細胞間相互作用に関与しているのではないということが示唆された。本研究は A β の生体内機能ひいては存在意義を明らかにするために新たな一石を投じた研究である。