

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名

木村 展之

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* のアミロイド β の神経系細胞に対する影響)

アルツハイマー病(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 は大脳皮質におけるアミロイド 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。老齡カニクイザルは自然発症的に大脳に SP 形成が確認され、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。

本論分では、第 1 章で老人斑関連蛋白の加齢に伴う発現様式を解析している。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因子の一つで、家族性 AD(FAD)の 80%以上が 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 原因のひとつである。両 PS 蛋白(PSs)について加齢性変化を検索したところ、PSs は主に神経細胞に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、老人斑形成に深く関与していることが示唆された。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、蛋白発現量も著しく低レベルであった。

さらに、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。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。また、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。NFT 関連蛋白群は 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。

また、老齡のヒト脳および AD 患者脳では神経細胞内に A β が蓄積し、大きな注目を浴びている。そこで細胞内 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、カニクイザル脳における細胞内 A β の染色に成功した。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、分子種によらず加齢性蛋白量増加が確認された。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で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。

第2章では、*in vitro*の実験系でA β の神経毒性に関して解析を行っている。すなわち、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の A β を用いて急性作用(24 時間以内)を検索したものである。そこで私は、比較的濃度の A β をラットおよびカンクイザル胎仔大脳皮質初代培養系に加え、最大14日間にわたり神経系細胞に与える影響を検索した。神経細胞に関する影響として、Synaptophysin、APP・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、カンクイザル培養系ともに、A β 添加14日後でも各種蛋白群の蛋白発現量に変化は見られなかった。一方、ラット、カン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。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。

また、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。この結果、ラットおよびカンクイザル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添加群においてもApoE産生量の有意な増加が見られたのに対し、カンクイザルAGは直接A β を添加した群でのみ、ApoE産生量の増加が確認された。

さらに、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、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。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、主に大脳皮質で発現していることが明らかになった。また、ラットLGI3は主にAGで発現することが明らかになり、A β 40添加により有意な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。本研究はA β の生体内機能につ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。

以上、本研究ではヒトに近縁なサル類の脳に加齢性変化に伴う老人斑関連蛋白の発現および初代神経培養細胞を用いたA β 蛋白の神経毒性の種差による反応性の違いを明らかにしたものであり、ヒトへの外挿を含め、獣医学領域での貢献が多岐である。よって審査委員一同は、本論文が博士(獣医学)の学位論文として価値あるものと認めた。