

論文の内容の要旨

論文題目 アルツハイマー脳老人斑アミロイド結合分子 CLAC の病理学的研究

指導教官 辻 省次 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 12 年 4 月入学

医学博士課程

脳神経医学専攻

氏名 古和 久朋

アルツハイマー病 (AD) 患者脳に特徴的な老人斑アミロイドの主要な構成蛋白質は A β ペプチドである。A β は APP (amyloid precursor protein) より産生され、その C 末端の切断箇所の違いから、42 アミノ酸からなる A β 42 と 40 アミノ酸の A β 40 があり、前者は後者に比して凝集性が高く優先的に蓄積する。老人斑アミロイドは補体 C1q, アポリポ蛋白 E, ヘパラン硫酸プロテオグリカンなどの A β 以外の構成蛋白質を結合していることが知られている。これらの非 A β 成分も AD の発症や老人斑形成に重要な役割を果たす。たとえばアポリポ蛋白 E 遺伝子の多型のひとつである ϵ 4 アレルの存在は AD 発症の遺伝的危険因子となると同時に、アポ E ϵ 4 蛋白は β アミロイドの凝集を *in vivo* で促進する。このように老人斑アミロイド構成成分の解析は AD の病態を考える上で重要である。

CLAC (Collagen-like Alzheimer amyloid component) は、申請者らが AD 脳アミロイド画分を抗原として作成したモノクローナル抗体 (mAb) 9D2 の抗原蛋白として同定した新規の老人斑アミロイド構成蛋白質である。mAb 9D2 を用いて AD 脳大脳皮質を免疫染色すると、主として原始老人斑や典型老人斑の周辺部のアミロイド成分が顆粒状ないし棍棒状の形態で強く染色された。一方、びまん性老人斑やアミロイドコア、

脳血管アミロイドは陰性を示した。大脳新皮質で CLAC は A β と共存し、全 A β 陽性面積中約 60%の領域が CLAC 陽性を示した。CLAC の前駆体蛋白質として同定した CLAC-P (CLAC precursor protein; collagen type XXV) は 1 回膜貫通型の膜結合コラーゲンであり、その細胞外領域は furin により切断され、可溶性 CLAC として分泌される。また *in vitro* の検討から CLAC は線維化 A β と結合するが可溶性 A β とは結合しないこと、CLAC は A β 凝集を抑制することも示されつつある。しかし、CLAC が AD 脳内において一部の老人斑に特異的な分布を示す理由、あるいは老人斑形成過程において CLAC の結合が果たす役割は不明のままであった。そこで私は免疫組織化学的手法を駆使し、CLAC の AD 脳における蓄積形態の詳細な解析を通じて、これらの問題点に洞察を加えることを目的として本研究を行った。

まず各種抗 CLAC 抗体による免疫染色を通常のホルマリン固定剖検脳パラフィン切片において可能とするために、各種の前処理方法を検討し、クエン酸緩衝液 (pH 6.0) 中でマイクロウェーブ処理後 100 μ g/ml proteinase K で 10 分間処理することにより良好な免疫染色性が得られることが分かった。

AD 脳では大脳新皮質以外にも各種の部位に様々な形態の老人斑が出現する。これらの皮質下部位における CLAC の蓄積を検討した。視床下部と視床前核の老人斑は CLAC 陽性を示したが、小脳、線条体、視床前核を除く視床、脳幹の老人斑は CLAC 陰性であった。大脳皮質と同様、びまん性老人斑あるいはアミロイドコア状の形態をとる老人斑には CLAC は蓄積しないことが判明した。

次に PS1, PS2 あるいは APP 遺伝子変異により A β の産生・蓄積が亢進すると考えられる家族性アルツハイマー病 (FAD) 脳について検討した。FAD 大脳皮質の老人斑は孤発性 AD と同様の CLAC 蓄積パターンを示した。FAD 脳に特異的な老人斑のうち、PS1 変異 FAD の一部に認められた cotton wool plaque は CLAC 陰性であったが、Arctic 型 APP 変異 (E693G) 例の大脳皮質に広汎に出現した輪状・顆粒状の老人斑は CLAC 強陽性を示した。

続いて老人斑において初期から蓄積する A β 42、晩期に蓄積する A β 40 と CLAC 蓄積の関係について検討した。連続切片あるいは二重蛍光染色を用いた検討において、全 CLAC 陽性領域の約 80%以上が A β 42 陽性を示した。一方、A β 40 については全 CLAC 陽性面積の約 20%以下で共存するにとどまり、両者の相補的分布が明らかになった。

さらに β アミロイドの物理化学的性状と CLAC 蓄積の関係を知るため、 β -sheet 構造を特異的に認識する蛍光色素 thioflavin S (thioS) の反応性と CLAC の関係を検討した。thioS 陽性領域と CLAC 陽性領域は、びまん性老人斑を除く A β 陽性部分においてほぼ完全な相補的分布を示した。ThioS 陽性部分はほぼ例外な

く A β 40 陽性を示し、A β 40 陽性領域の中で CLAC 陰性領域の一部分のみが thioS 陽性を示した。 β -sheet 構造の密度が高いと考えられる thioS 陽性 β アミロイド線維に対し CLAC は結合しにくいものと考えられた。

CLAC 陽性・陰性 β アミロイド線維の微細構造を比較するために、剖検後迅速に中性ホルマリンで短時間固定した AD 大脳皮質浮遊切片について、1 nm 金コロイド銀増感を用いた pre-embedding 法で CLAC を、オスミウム固定・エポン包埋後の post-embedding 法で A β 40 をラベルし、免疫電顕法により検討した。CLAC 陽性部分には、アミロイド線維が存在するが、線維密度は疎で間隙が目立ち、電子染色性も低かった。一方 CLAC 陰性・A β 40 陽性部位はアミロイド線維の密度が高く、線維径も太く電子染色性が高く、両者の構造には相違が見られることが明らかになった。

CLAC の老人斑における蓄積の継時的変化を明らかにする目的で、9 歳から 71 歳の各年齢で死亡したダウン症 (DS) 患者脳 30 例の大脳新皮質に A β 42, A β 40, CLAC 免疫染色と thioS 染色を行い、陽性面積比率を評価した。A β 蓄積の最初期形態は、30 歳台前半に A β 42 単独陽性を示す純粋なびまん性老人斑であったが、これらは CLAC 陰性であった。30 歳台後半から CLAC は主に原始老人斑に蓄積を開始し、40 歳台には A β 42 蓄積の増加とともに CLAC 蓄積も増加し、つねに後者は前者の約 50%を占めた。A β 40の蓄積は 40 歳台まではごく少量であり 10%以下にとどまった。一方 50 歳を過ぎると A β 40 陽性面積比率が急激に増加したが、A β 42, CLAC はそれ以前と同等のレベルを保持した。AD 脳と同様、CLAC と A β 40 及び thioS 陽性部位には相補性が観察された。

コラーゲンは通常のプロテアーゼに対して抵抗性を示すことから、CLAC 陽性老人斑のプロテアーゼ抵抗性について切片上で検討した。中性緩衝ホルマリンで 24 時間固定した AD 脳パラフィン切片をギ酸処理し、100 μ g/ml proteinase K で 0~8 時間処理後、各種の抗 A β 抗体により免疫染色を行った。いずれの A β 抗体でも処理時間が延長するに従い免疫反応性は低下する傾向を示したが、一部の老人斑は相対的に免疫反応性が保たれる傾向を示した。A β 40 強陽性を示す大型の老人斑では A β 免疫染色性はむしろ迅速かつ高度に低下した。プロテアーゼ抵抗性を示した老人斑を、CLAC 免疫染色のパターンと比較すると、A β 免疫反応性が保持された領域の多くが CLAC 陽性部位と一致すること、プロテアーゼ処理後の A β 染色像はドット状のパターンに変化し、CLAC の染色パターンに類似することが判明した。免疫染色強度の変化を画像計測により評価すると、CLAC 陽性斑では陰性斑に比べて PK 処理後も A β 免疫反応性がより保たれる傾向が明らかになった。

以上の結果から、CLAC の老人斑形成における役割について以下のように考察した。老人斑の最初期形態

であるびまん性老人斑に CLAC は蓄積しないが、この状態における凝集した A β の構造が CLAC の結合に適さないものと考えられる。その後 A β (主に A β 42) の蓄積が進行し、原始老人斑の出現とともに CLAC が蓄積を開始する。CLAC 陽性アミロイドは thioS, A β 40 陰性であること、電顕的にも線維の形態に違いがあり、密度が疎であるなどの特徴を示す。また DS 脳で観察された AD 病理変化の時系列上、50 歳台以降で蓄積量の増加が停止し、CLAC 陰性斑が A β 40, thioS 陽性を示し始めること、さらに CLAC が A β 凝集を抑制するという *in vitro* の実験結果を考え合わせると、CLAC の結合により老人斑アミロイドはそれ以上の A β 蓄積を免れている可能性も考えられる。一方、CLAC 陽性老人斑は組織標本上でプロテアーゼ抵抗性を示すことから、*in vivo* においてもグリア細胞等による分解・除去を受けにくい可能性も推測される。このように CLAC の蓄積はリモデリングを受けにくい、“静的” な性質を老人斑に与える可能性を仮想している。一方 CLAC の結合を免れた老人斑は、A β 蓄積の閾値が低下し、A β 42 に比してアミロイド形成性は高くないが、脳内で大量に産生される A β 40 の蓄積を許容し、 β -sheet 構造の密な老人斑を形成するものと考えた。

本研究を通じて私は、老人斑における CLAC の蓄積が A β 42 の蓄積に引き続いて早期に生じ、大量の A β 40 の流入を阻害するなどして、老人斑を stabilize する可能性を考えた。しかしこの仮説を検証するためには、CLAC-P を脳で発現するトランスジェニックマウスを作出し、 β アミロイド蓄積を生じる APP トランスジェニックマウスと交配するなどの *in vivo* 実験が必要である。また CLAC の結合が β アミロイドの神経細胞障害性に影響を与えるものか否かについても、*in vivo* の検討から明らかにしてゆきたい。