

## 審査の結果の要旨

氏名 古和 久朋

本研究はアルツハイマー脳老人斑アミロイドの新規構成蛋白である CLAC (collagen-like Alzheimer amyloid plaque component) の老人斑への蓄積の意義につき明らかにするため、主にヒト剖検脳組織を対象として免疫組織化学的手法を用いた種々の検討を行い、下記の結果を得ている。

1. CLAC はアルツハイマー病 (Alzheimer's disease ; AD) 大脳皮質の弱固定ピプラトーム厚切り切片における免疫染色により、原始老人斑や典型老人斑の周囲に蓄積し、顆粒状ないし糸屑状の染色パターンを示した。この染色パターンを通常ホルマリン固定パラフィン切片で再現するため、各種前処理方法につき検討し、10 mM クエン酸バッファー (pH 6) 中での 550 W 10 分間のマイクロウェーブ処理に加え 10 分間の 100  $\mu$ g/ml proteinase K 処理が最も適切であることを見出した。
2. 孤発性 AD (sAD) および家族性 AD (FAD) の多数症例につき脳各部位のパラフィン連続切片を用いて CLAC と老人斑の主要構成タンパクである A $\beta$ 42 ならびに A $\beta$ 40 との蓄積形式につき比較検討した。その結果大脳皮質および皮質下において、CLAC 蓄積部位のほとんどは A $\beta$ 42 陽性であった。一方、A $\beta$ 40 とはしばしば一致せず陰性であった。この知見は蛍光二重染色を用いた定量的評価によっても確認された。FAD 脳老人斑においても CLAC は sAD でみられた特徴を再現していた。一部の例外として APP Arctic 変異例にみられる ring plaque では CLAC 強陽性であり、また PS1 の一部の変異に見られる cotton-wool plaque は CLAC 陰性であった。
3. CLAC 陽性老人斑と陰性老人斑での相違を明らかにする目的で  $\beta$ -シート構造を特異的に認識するとされる蛍光色素 thioflavin S (thioS) 陽性部位と CLAC 蓄積部位との関連を検討した。その結果、CLAC 陽性部位は thioS 反応性が低く、両者とも陽性を示す部位は CLAC 陽性部位の 5% を占めるに過ぎないことがわかった。この結果を受けて微細形態学的に CLAC 陽性部位と陰性部位との間に相違があるかを検討するため、pre-embedding 法により CLAC を、post-embedding 法により A $\beta$ 42, 40 を免疫染色し、電顕レベルでの観察を行った。この結果、CLAC 陽性蓄積物は線維構造をとるが、CLAC 陰性かつ A $\beta$ 40 陽性、すなわち thioS 陽性部位に相当すると考えられる部位に比べその線維密度が低く、アミロイド線維径も細い傾向が定性的・定量的に示された。

4. CLAC の老人斑への蓄積過程を明らかにする目的で、加齢とともにアルツハイマー病の進行過程を再現すると考えられるダウン症 (DS) 脳 (死亡年齢 9~71 歳全 29 例) を用いた検討を行った。その結果 A $\beta$ 蓄積の最初期形態は、30 歳台前半に A $\beta$ 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 歳台後半になり CLAC は主に原始老人斑に蓄積を開始し、40 歳台には A $\beta$ 42 蓄積の増加とともに CLAC 蓄積も増加し、後者は前者の約 50%を占めた。A $\beta$ 40の蓄積は 40 歳台まではごく少量であり 10%以下にとどまったが、50 歳を過ぎると A $\beta$ 40 陽性面積比率が急激に増加し、同部位の多くで thioS 陽性を示した。この時期の A $\beta$ 42, CLAC はそれ以前と同等のレベルを保持し、CLAC と A $\beta$ 40 及び thioS 陽性部位には相補性も保たれていた。さらに AD 脳と同様脳内の A $\beta$ 斑を多発する FAD 変異をもつヒト APP およびヒト PS 1 を過剰発現させたダブルトランスジェニックマウスを用いた検討では、A $\beta$ 40 強陽性のコア状斑が先行して出現し、後に A $\beta$ 42 単独陽性斑が加わる点は DS での結果と異なっていたが、内因性マウス型 CLAC はヒト老人斑と同様 A $\beta$ 42 陽性斑に蓄積し、A $\beta$ 40, thioS と相補的分布を示した。
5. CLAC がコラーゲン構造を持つこと、コラーゲンは一般的なプロテアーゼに対して耐性を持つことから、CLAC が蓄積した $\beta$ アミロイドにプロテアーゼ抵抗性を与える可能性を考え、4  $\mu$ m 連続切片上でギ酸処理後に 100  $\mu$ g/ml proteinase K を 2 ~ 10 時間処理した後各抗 A $\beta$ 抗体、抗 CLAC 抗体で免疫染色を行い、染色像の変化および CLAC 陽性部位との比較・検討した。その結果、PK 処理後の A $\beta$ 免疫反応性は CLAC 陽性部位に一致して相対的に保たれており、残存する染色像も CLAC のそれに類似していた。またアミロイドコアなど CLAC 陰性で A $\beta$ 40 陽性の $\beta$ -シート密度の高い部位の A $\beta$ 免疫反応性は PK 処理により速やかに消失した。

以上、本論文は新規老人斑構成蛋白である CLAC の AD 脳や DS 脳への蓄積形態を詳細に解析した結果、CLAC は老人斑へ蓄積することにより、さらなる A $\beta$ 蓄積を抑制し $\beta$ -シート構造の豊富な thioS 陽性老人斑への成長を阻害する一方で、同部位の A $\beta$ にプロテアーゼ抵抗性を与えることで、老人斑を安定化している可能性を指摘した。さらに本研究は、元来凝集性の高い A $\beta$ 42 が A $\beta$ 40 に先行して蓄積した部位がその後 thioS 陽性のアミロイド密度の高い老人斑へ発達しないという長年未解決であった問題に対して CLAC 分子の蓄積により説明できる可能性を示した。このように本研究は AD における老人斑の形成過程とその意義の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。