

論文の内容の要旨

論文題目 アミロイド β ペプチドカルボキシ末端抗体を用いた
 β アミロイドの産生と蓄積に関する研究

氏名 浅見麻乃

アルツハイマー病(AD)の脳に特徴的な病理学的変化として出現する老人斑は、1回膜貫通型のアミロイド前駆体蛋白質(APP)から切り出される39-43アミノ酸残基の蛋白質断片アミロイド β ペプチド($A\beta$)を主な構成成分とする。AD脳から抽出される $A\beta$ にはC末端部の長さが異なる2種類の分子種、 $A\beta(1-40)$ と $A\beta(1-42)$ が含まれることが明らかになっていたが、両者の物理化学・生化学的性質とAD発症の関係は不明であった。

本研究ではまず、 $A\beta$ C末端部分の2-3アミノ酸残基の違いに注目し、異なるC末端を持つ $A\beta$ 分子種の産生・蓄積とAD発症の関係を明らかにすることを目的として、Val⁴⁰で終わる $A\beta 40$ とAla⁴²で終わる $A\beta 42$ を識別することのできるマウスモノクローナル抗体を樹立した。さらに、アミノ(N)末端側に対するマウスモノクローナル抗体を捕捉抗体として用いることにより、 $A\beta 40$ と $A\beta 42(43)$ を分別して定量できる高感度サンドイッチELISAを開発した。そして、C末端部の2アミノ酸残基の違いがもたらす物理化学的・生化学的変化と

AD の発症の関係を明らかにするため、上記の ELISA 測定系と抗体を用いて以下の研究を行った。

まず、野生型の哺乳類培養細胞が内因性の APP を基質として産生する A β 分子種を同定することを目的として、ヒト神経芽細胞腫 IMR-32 細胞が分泌する A β の 1 次構造を解析した。質量分析の結果、最大の UV ピークを与えた A β (1-40) に加え、A β (1-40) の酸化物、A β (1-37)、A β (1-38)、A β (1-39) および A β (1-42) のシグナルが検出された。他の神経芽細胞腫やグリオーマ細胞株の分泌する A β も ELISA を用いて検討した結果、IMR-32 細胞と同様、ヒトまたはげっ歯類由来の培養細胞株からは主に A β (1-40) が分泌されること、高い凝集性を持つ A β 42(43) は分泌される総 A β 量の約 10% を占めることを見出した。

家族性アルツハイマー病 (FAD) をもたらす APP 遺伝子変異によるアミノ酸変異として Val⁷¹⁷ (A β の 46 位に相当) の置換 (V717I、V717F、V717G など) が知られていたが、それらによる FAD の発症機構は不明であった。そこで、これらの Val⁷¹⁷ 変異が細胞の A β 産生に及ぼす効果を調べるため、種々の変異型 APP を一過性発現させたヒト神経芽細胞腫 M17 細胞の培養上清中の A β 濃度を ELISA によって定量した。その結果、Val⁷¹⁷ 変異は、スウェーデン型変異とは異なり、総 A β 量を変化させることなく、A β 42(43) の産生比率を 1.5-1.9 倍上昇させることがわかった。Val⁷¹⁷ 変異は、 γ セクレターゼ切断部位のシフトをもたらし、高い凝集性を持つ A β 42(43) の産生比率を増加させることにより、AD 発症の原因となることを強く示唆した (Suzuki et al., *Science* 264, 1336-1340, 1994)。

AD 脳の老人斑を構成する A β の分子種を調べるため、A β の C 末端に特異的な抗体を用いて AD 患者およびダウン症患者の脳の免疫組織化学を行った。AD 患者の脳皮質では、BS85 抗体 (抗 A β 25-35) 陽性の老人斑は同じく BC05 抗体 (抗 A β 42(43) C 末端) にも陽性であったことから、A β 42(43) はほぼすべての老人斑に含まれると考えられた。一方、BA27 抗体 (抗 A β 40 C 末端) 陽性の老人斑は、成熟したコアを持つ老人斑や脳血管アミロイドに限られ、コアを持たない未成熟の老人斑は弱く染まるのみであったことから、A β 40 は老人斑の成熟に伴って蓄積することが予想された。AD 脳病変の時系列を再現するダウン症脳の検討でも、アミロイド沈着の初期形態と考えられるびまん性老人斑は BC05 陽性で BA27 陰性であったことから、A β の蓄積は凝集性の高い A β 42(43) の沈着から始まると考えられた (Iwatsubo et al., *Neuron* 13, 45-53, 1994; *Ann Neurol* 37, 294-9, 1995)。

最後に、A β 42(43) の C 末端に特異的な抗体 BC05 の受動免疫により、凝集性の高い A

β 42(43)を脳内から選択的に除去することが可能かどうかを検討した。APP Tg マウス (Tg2576)に、 $A\beta$ 蓄積開始前(3ヶ月齢)から蓄積進行期(12ヶ月齢)にかけて長期受動免疫(腹腔内投与、0.5 mg/マウス/週、n=9-10)を行い、血漿中および脳内の $A\beta$ レベルをコントロール群(マウス IgG 投与群)と比較した。その結果、9ヶ月間連続投与後の血漿 $A\beta$ 42(43)濃度はコントロール群の約44倍に上昇し($A\beta$ 40濃度はコントロール群の70%程度に低下)、脳内可溶性 $A\beta$ 42(43)レベルはコントロール群の156%に上昇した。また同時に脳内不溶性 $A\beta$ レベルは、 $A\beta$ 40が27.3%、 $A\beta$ 42(43)が31.5%と低下傾向を示したことから、BC05は脳内可溶性 $A\beta$ 42レベルを上昇させつつ、脳からの $A\beta$ の排出を促進する可能性が想定された。

以上の結果から、本研究において私はC末端部の2アミノ酸残基の違いがもたらす $A\beta$ 42(43)の高い凝集性が、ADの発症に決定的な役割を果たすことを示し、 $A\beta$ 40と $A\beta$ 42(43)を高感度に分別して検出する方法を確立することによりADの病態生理の諸相を解明した。