

審査の結果の要旨

氏名 浅見麻乃

アルツハイマー病 (AD) の脳には、細胞外のアミロイド線維の蓄積からなる老人斑、異常にリン酸化されたタウ蛋白質が細胞内に蓄積した神経原線維変化ならびに神経細胞死が特徴的な病理学的変化として出現する。老人斑の主要構成成分であるアミロイド β ペプチド ($A\beta$) は、1回膜貫通型のアミロイド前駆体蛋白質 (APP) から切り出されるアミノ酸 39-43 残基の蛋白質断片で、そのカルボキシ (C) 末端側の 11-15 残基には APP の膜貫通部位が含まれるため、極めて疎水性の高い 1 次構造を持つ。AD 脳から抽出される $A\beta$ には C 末端の異なる 2 種類の分子種、 $A\beta$ 1-40 と $A\beta$ 1-42 が含まれることが知られていたが、それらの物理化学・生化学的性質と AD 発症の関係は不明であった。

本研究において、申請者は $A\beta$ の C 末端を識別する抗体ならびに $A\beta$ 40, $A\beta$ 42 を定量する ELISA 系を構築し、AD の病態解析ならびに抗 $A\beta$ 抗体を用いた免疫療法の試みを行った。

1. $A\beta$ 部位特異的マウスモノクローナル抗体の樹立と $A\beta$ 40、 $A\beta$ 42 分別定量系 (サンドイッチ ELISA 法) の開発

申請者はまず、 $A\beta$ 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。抗体の作製にあたっては、得られた抗体をプレートに固定し、HRP 化した免疫原と液相中で反応させるスクリーニングを用いた。得られたモノクローナル抗体 BA27 (免疫原: $A\beta$ 1-40) は $A\beta$ 40 の、BC05 (免疫原: $A\beta$ 35-43) は $A\beta$ 42 (43) の C 末端部をそれぞれ特異的に認識した。さらに、同時に作製したアミノ (N) 末端側に対するマウスモノクローナル抗体、BAN50 (免疫原: ヒト $A\beta$ 1-16) または BNT77 (免疫原: $A\beta$ 11-28) 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。すなわち、BAN50 または BNT77 を共通の 1 次 (捕捉) 抗体として固相化し、HRP 標識した BA27, BC05 を 2 次 (検出) 抗体として用いることによりそれぞれ $A\beta$ 40、 $A\beta$ 42 (43) を定量することが可能となった。BAN50 を用いる系はヒト $A\beta$ に特異的であるが、BNT77 を用いる系はヒト $A\beta$ とげっ歯類 $A\beta$ の両者を測定できるため、正常ラット、マウス由来の組織抽出物や初代神経細胞の培養上清にも適用可能であった。また、総 $A\beta$ 量の定量は同時に作製した BS85 (免疫原: $A\beta$ 25-35) を HRP 標識 2 次抗体として用いることにより可能となった。

2. APP コドン 717 の遺伝子変異による家族性アルツハイマー病の発症機構の解析

$A\beta$ 42 の凝集性は $A\beta$ 40 のそれに比べ非常に高いことが *in vitro* の凝集実験から明らかにされ、老人斑沈着の seed となる可能性が提唱された。そこで申請者は C 末端部の 2 残基の違いがもたらす物理化学・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。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のうち、K670N、M671L (A β の-1 位、-2 位に相当) の二重変異 (スウェーデン型) は、A β 40、A β 42 両者の産生量を 5-6 倍上昇させることが報告され、A β の絶対量の増加が AD 発症の一因となることが示されていたが、APP 上にはこれらの変異以外にも FAD の原因となるアミノ酸変異が他にも存在し、それらの変異による FAD の発症機構は不明であった。これらの APP のアミノ酸変異のうち Val⁷¹⁷ (A β の 46 位に相当) には、V717I (ロンドン型)、V717G、V717F などの複数の FAD の原因となる置換が報告された。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 を用いて測定した。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。高い凝集性を持つ A β 42(43) の産生比率の増加が AD の発症の原因となることが強く示唆された。

3. ヒト神経芽細胞腫 IMR-32 細胞の培養上清に存在する A β の生化学的・免疫化学的解析

生体内において生理的条件下で産生される A β 分子種の量や比率の詳細は不明であった。そこで、野生型の哺乳類培養細胞が産生する 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 の一次構造を解析した。培養上清中の A β を BAN052 抗体 (免疫原: ヒト A β 1-16) を結合した抗体カラムで回収し、ゲルろ過 HPLC および逆相 HPLC で分離したのち、ELISA で A β 反応性が確認された画分について、マスペクトロメトリ (MS) を用いて分析した。BAN50/BA27 ELISA の陽性画分のうち、最も大きなピークから A β 1-40 の MS シグナルが検出され、その他のピークからは A β 1-40 の酸化物および A β 1-37、A β 1-38、A β 1-39 のシグナルが検出された。また BAN50/BC05 ELISA の陽性画分からは、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。

4. アルツハイマー病患者脳における A β 沈着機序の免疫化学的解析

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染色を行った。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などに限られ、BS85 陽性斑の約 3 分の 1 を占めた。また、BA27 陽性の成熟した老人斑ではコアの部分がより強く染色され、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。さらに APP 上に V717I 変異を有する FAD 患者脳皮質 (2 例) を調べた結果、老人斑の大部分は BC05 陽性で BA27 陰性であった。脳皮質における BA27 陽

性斑の占有面積率は孤発性 AD 脳で 1.4% (n=10) であったのに対し、FAD では 0.14% (n=2) と極めて低く、APP のコドン 717 の変異では *in vitro* のみならず *in vivo* においても凝集性の高い A β 42(43) の産生、沈着が優位になることが分かった。

5. A β 42(43) の C 末端に特異的な BC05 抗体の受動免疫によるアルツハイマー病抗体療法に関する検討

AD の新規治療法として近年開発された A β ワクチンは、APP Tg マウス脳のア β 蓄積を劇的に減少させ、認知機能の改善をもたらしたことからヒトでの有用性が期待されたが、臨床治験は、自己免疫性脳炎の副作用によって中断された。このため有効かつ安全な AD 免疫療法の開発は、AD 治療研究における重要課題である。ワクチン療法に引き続き抗 A β 抗体の輸注による受動免疫法が検討されたが、その多くは A β の N 末端に対する抗体の有効性が強調され、A β C 末端に対する抗体はほとんど検討されてこなかった。そこで、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) の選択的なクリアランスが可能かどうかを検討した。APP Tg マウス (Tg2576) の A β 蓄積開始前 (3 ヶ月齢) から蓄積進行期 (12 ヶ月齢) にかけての長期受動免疫 (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 β 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 β 42(43) 濃度はコントロール群の約 44 倍に上昇し (A β 40 濃度はコントロール群の 70%程度に低下)、脳内可溶性 A β 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 β レベルは、A β 40 が 27.3%、A β 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 β 42 レベルを上昇させつつ、脳からの A β の排出を促進する可能性が想定された。ビオチン化 BC05 の腹腔内投与 24 時間後には、投与した抗体の約 0.023%が脳内に移行することを確認し、この BC05 連続投与効果の一部は、脳内に移行した BC05 が直接作用した結果と思われた。また、血漿 A β 42(43) 濃度の高度の上昇は、BC05 による脳内からの排出、および血中に存在する BC05 による血中 A β 42(43) の代謝安定化の結果と考えた。

以上のごとく、本研究において申請者は A β C 末端部分の 2 残基の違いを識別するモノクローナル抗体を樹立し、C 末端長がわずかに異なる A β 40, 42(43) 分子種を高感度に分別定量可能なサンドイッチ ELISA 法を開発した。これらを用いて、APP Val717 の変異は高い凝集性を持つ A β 42(43) の産生比率を増加させることにより FAD を発症させることを見出した。また、生理的条件下の培養細胞からの A β 42(43) の産生比率は、産生 A β 総量の約 10%に過ぎないが、AD 脳における A β の蓄積は高い凝集性を持つ A β 42(43) から開始されることを明らかにした。さらに、A β 42(43) の C 末端に特異的な BC05 抗体の受動免疫による脳内 A β 42(43) の選択的な除去により、トランスジェニックマウス脳における A β の蓄積量の減少を確認し、AD 治療法としての応用の可能性を提示した。

以上のごとく、本研究は C 末端部の 2 アミノ酸残基の違いがもたらす A β 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 β 40 と A β 42(43) を分別的に検出することによりその病態生理の諸相を解明したものであり、AD の病態解明に大きな進歩をもたらした画期的な成果を含むものである。このため、博士 (薬学) の学位に値するものと判定した。