

審査の結果の要旨

氏名 山田 薫

アルツハイマー病(AD)は高齢者認知症の原因として最も頻度の高い神経変性疾患であり、その発症機序として、アミロイド β ペプチド(A β)を直接の原因と考えるアミロイド仮説が広く支持されている。通常 A β は毒性のないモノマーの状態では神経細胞から分泌されているが、病的状態においては構造変化を起こし、オリゴマーA β を経て凝集し、その過程で神経細胞死が生じると考えられている。A β は前駆体蛋白質 APP から切り出される約 40 アミノ酸のペプチドであり、脳細胞外腔に分泌された可溶状態の A β は、protease による分解や、血液脳関門 (BBB) を介した血液中への排出(クリアランス)を受けることが知られている。アミロイド仮説に基づいて、A β の産生や凝集の抑制、分解・除去の促進を図る AD の根本療法 (disease-modifying therapy; DMT) の開発が進められている。

AD の DMT のなかで A β 免疫療法が注目されている。AD のモデルマウスであり、加齢依存的に脳内に A β が蓄積する APPトランスジェニック (tg) マウスに予め A β ペプチドを免疫するワクチン療法、あるいは抗 A β 抗体を輸注する受動免疫療法により脳の A β 蓄積が減少し、認知機能障害の進行が軽減することが報告されている。A β を免疫するヒトでの臨床試験でもアミロイドの減少が見られ、A β 免疫療法の臨床応用が期待されている。これまでに抗 A β 抗体が、ミクログリア細胞による β アミロイドの貪食を促進する、あるいは BBB を介した脳からの A β の除去を促進するなど、の仮説が提唱されているが、A β 免疫療法のエフェクターと考えられる抗 A β 抗体が、アミロイド蓄積を抑制する機序については不明の点が多い。そこで申請者は A β 免疫療法における抗 A β 抗体の作用機序について、特に抗 A β 抗体が A β の脳クリアランスに与える影響に着目して解析を行った。

従来の研究により、A β の N 末端にエピトープの存在するモノクローナル抗体 10D5、中央部にエピトープが存在する m266 の慢性的受動免疫により、APPtg マウス脳のアミロイド蓄積が抑制されることが示されている。しかし、10D5 はミクログリアによるアミロイド斑の除去を *ex vivo* において促進するのに対し、m266 にその作用はないとされている。まず各抗体の A β に対する反応性を調べると、10D5 は凝集した A β に対し強く反応したが、m266 の反応性は弱かった。一方、可溶性 A β に対し、m266 は 10D5 に比して高い親和性を有することがわかった。この結果から、10D5 は凝集した A β に、m266 は可溶性 A β に対して作用を及ぼすものと考えられた。

次に抗 A β 抗体が脳から血液中への A β 排出に与える影響について検討した。従来の研究において、m266 を APP tg マウスに慢性投与すると血中 A β 濃度が顕著に上昇するとともに、脳アミロイド蓄積が減少することから、m266 は A β の脳からの排出輸送を促進すると予想されてきた (sink 仮説)。この仮説を検証することを目的に、BEI (Brain Efflux Index) 法を用いて、A β の脳からの除去速度を定量的に比較した。300 μ g の抗 A β 抗体 (10D5, m266) あるいはコントロール抗体を野生型マウス腹腔内に投与し、一定時間後にマウス脳の Par2 領域に ¹²⁵I-A β (1-40)を注入し、脳内残存率 (100-BEI) の経時変化を追跡した。その結果、10D5 は A β の排出に影響を与えなかったが、m266 は A β の排出を遅延させることがわかった。この結果は、sink 仮説とは異なり、抗 A β 抗体は、A β の脳細胞外腔から血中への排出を促進しないことを示すものと考えた。

A β の脳からの排出促進を仮想する sink 仮説では m266 を投与すると、血中の A β 量が増加する

ことをその根拠としている。そこで APPTg マウスに m266 を投与し血中 A β 量を測定したところ、確かに m266 の投与により血中 A β 量の著しい増加が見られた。10D5 にはこのような効果はなかった。しかし、*in vitro* で血漿と A β を混和する実験において m266 を添加すると、A β の分解が阻害された (図 3B)。このことから m266 投与による血中 A β 量上昇は、A β の脳からの排出が促進されたのではなく、m266 抗体による血中 A β の安定化効果に起因する可能性が考えられた。以上の結果から、m266 は従来考えられてきたように末梢血液中で作用するのではなく、一部脳内に移行して作用するのではないかと考えた。

そこで脳内に ^{125}I -A β を inject し、灌流で末梢血液を除去した brain lysate を protein G beads で沈降したところ m266 抗体が脳実質画分中で A β と結合していることが示された。

以上の結果から m266 は一部脳内に移行して、脳内の A β を結合することがわかった。そこで、m266 は A β をモノマーで安定化してその後の凝集過程を阻害する可能性を考え、m266 が A β の凝集過程に与える影響を検討した。まず *in vitro* において合成 A β (1-42)を抗 A β 抗体とインキュベートし、形成されるアミロイド線維量を蛍光色素 Thioflavin T により定量した。m266 は A β の凝集を抑制したが、この効果は 10D5 あるいはコントロール抗体では認められなかった

さらに m266 抗体による A β 凝集抑制効果を *in vivo* で確かめるために、APPTg マウスに抗 A β 抗体を投与して、脳内の A β 量を ELISA で測定した。本検討に用いた ELISA は A β の N 末端に対する抗体を capture 抗体、C 末端に対する抗体を detect 抗体とする sandwich ELISA で、モノマーのみを特異的に検出し、オリゴマー A β は検出されない。そこでオリゴマー A β を含む可溶性 A β 量総量を検出するために、可溶性 A β を含むマウス脳 RIPA 可溶画分に SDS による解離処理を施した。

APPTg マウスに抗 A β 抗体を腹腔内投与して、摘出した脳を RIPA で可溶化した。まずこの RIPA 可溶画分に SDS による解離処理を施し、マウス脳の可溶性 A β 総量を測定した。その結果、いずれの抗体を投与した場合においても可溶性 A β 総量に変化はなかった。次に SDS による解離処理を行う前の RIPA 可溶画分のモノマー A β 量を測定したところ、m266 抗体を投与したマウスにおいてモノマー A β 量が上昇していた。特に凝集性の高い A β (1-42)がモノマーで安定化されていた。10D5 にはこのような効果は認められなかった。

m266 を投与すると可溶性 A β 総量に変化がないにも関わらず、A β モノマーが上昇していたことから、m266 は A β をモノマーの状態で安定化することで、オリゴマー A β の形成を抑制するのではないかと考えた。オリゴマー A β は凝集過程の中間体であり、m266 によるオリゴマー形成抑制が A β 免疫療法のメカニズムであると考えられた。

本研究において申請者は、A β 免疫療法における抗 A β 抗体の作用機構について検討を行い、抗 A β 抗体は脳からの A β 排出を促進しないことを見だし、特にこれまで m266 抗体について想定されてきた、sink 仮説を否定した。さらに m266 の一部が脳内に移行し、モノマーの A β を結合することを見いだした。本研究は、A β 免疫療法の作用機序として新たに、「抗体によるモノマー A β の安

定化とオリゴマー形成の抑制」を提唱するものである。近年、凝集中間体であるオリゴマーがシナプス障害性を有することが注目されている。m266 によるマウス認知機能の改善は m266 によるオリゴマー形成抑制に起因する可能性が考えられる。一方 10D5 にはこのような効果は認められなかった。本研究は、 $A\beta$ 免疫療法において、各種の抗 $A\beta$ 抗体は、 $A\beta$ との反応性の相違により、 $A\beta$ 貪食の促進、アミロイド形成の抑制などの異なる複数のメカニズムを介して $A\beta$ 蓄積を抑制し、認知機能障害の改善に関わる可能性を示唆するものであり、アルツハイマー病の治療研究に新知見を与え、博士(薬学)の学位に相応しいと判定された。