

れる、(2)ゲル濾過により 200 kDa 以上の分子サイズに分画される、(3)超微細形態的に、直径 6 - 8 nm、長さ 200 nm 以下の湾曲した短い線維状の構造物として観察される、そして(4)神経細胞に対し毒性を持つ、などの特徴を有する (Fig.1)。そこで私は、修士課程において確立した protofibril A β の *in vitro*における形成・検出系を発展させ、protofibril A β 形成に対する apoE の効果を詳細に調べることにした。さらに protofibril A β が脳内でアミロイド蓄積に及ぼす影響について、また protofibril A β に対する apoE のアイソフォーム特異的な効果について、トランスジェニック(tg)マウスを用いて *in vivo* の検討を進めた。

[方法・結果]

1. A β 線維形成過程に対する apoE のアイソフォーム特異的な効果

まず apoE が A β 線維形成過程に及ぼす影響について検討した。この目的で、ゲル濾過と、 β -sheet 構造をとる、線維化が進行した A β を検出する蛍光色素 Thioflavin T の蛍光値測定を組み合わせることにより、protofibril A β の形成過程と、引き続いて重合が進んで形成される fibril A β の形成を同時に評価する実験系を確立した。まず apoE 非存在下での A β の線維形成過程を検討すると、protofibril A β が形成された後、その消失に呼応して fibril A β の形成が始まることがわかった (Fig.2A)。次に、apoE のアイソフォーム毎に A β 線維形成過程に対する影響を検討すると、apoE2、apoE3 の添加は protofibril A β の存続時間を延長し、その後の fibril A β 形成の開始が遅延することがわかった (Fig.2A)。一方、apoE4 の protofibril A β 維持効果は最も弱く、fibril A β の形成が速やかに生じることがわかった (Fig.2A)。次に、apoE アイソフォームによる A β 線維形成過程への影響の相違が、apoE が protofibril A β に直接作用すること起因するかについて検討した。ゲル濾過によって、apoE 存在下で形成された protofibril A β を単離し、その存続時間を検討した結果、apoE3 の存在下で形成された protofibril A β は、apoE 無添加あるいは apoE4 添加に比べ、有意

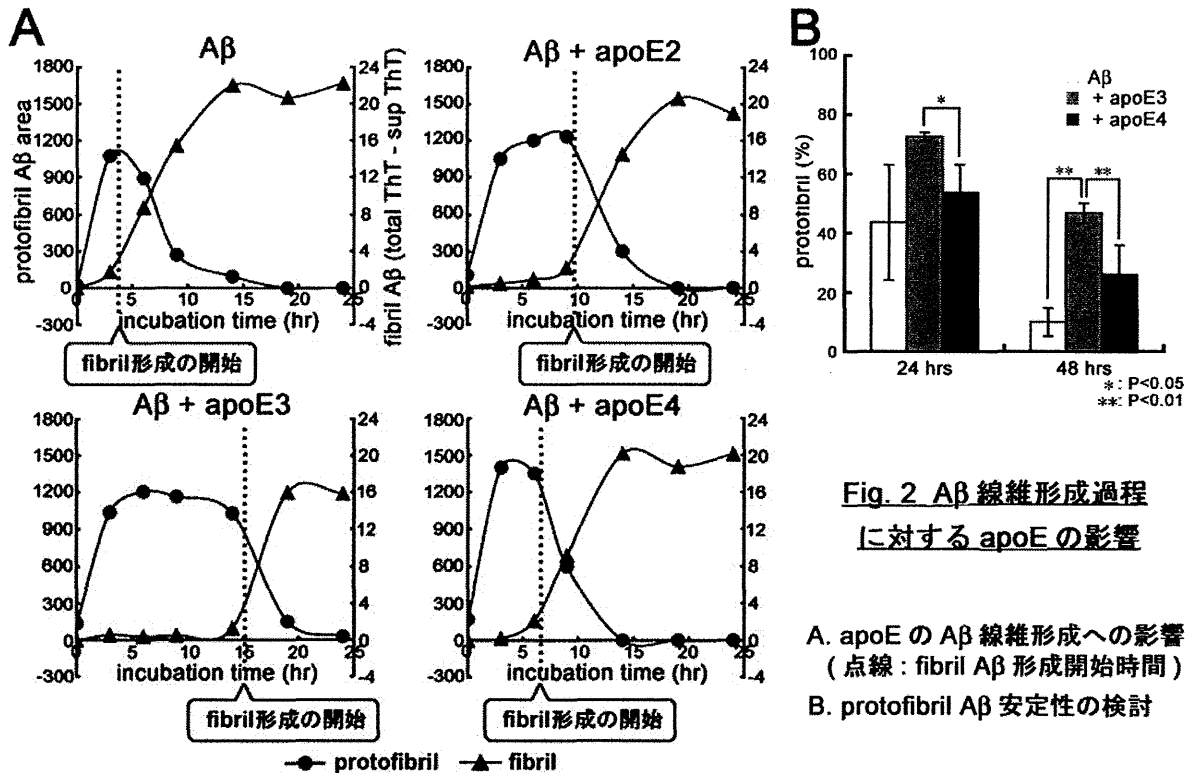


Fig. 2 A β 線維形成過程に対する apoE の影響

A. apoE の A β 線維形成への影響 (点線: fibril A β 形成開始時間)
B. protofibril A β 安定性の検討

に高く安定化されていることがわかった (Fig.3B)。以上の結果から、apoE は protofibril A β に直接作用し、アイソフォーム特異的な安定化効果を発揮することが示唆された。

2. A β -apoE SDS 耐性複合体に関する検討

apoE は protofibril A β に直接作用することが考えられたことから、次に apoE と protofibril A β の結合について検討した。SEC によって分画した protofibril A β を SDS-PAGE により分離した結果、protofibril A β 画分中に、SDS に安定な A β -apoE 複合体と考えられるバンドが見出された (Fig.3A)。この複合体量は、apoE4 を添加した場合には、apoE3 の場合と比べて少なかった (Fig.3A)。

apoE アイソフォームごとに A β -apoE SDS 耐性複合体量に違いが生じた原因の1つとして、各複合体の安定性が異なる可能性を考えた。そこで A β をよく溶解する溶媒である HFIP に対する複合体の安定性を apoE のアイソフォームごとに検討すると、apoE2、apoE3 の添加により形成された複合体は高濃度の HFIP に対しても安定であったのに対し、apoE4 を含む複合体の安定性は有意に低かった (Fig.3B,C)。

以上の *in vitro* における検討結果から、apoE アイソフォーム特異的に protofibril A β 画分中で A β -apoE SDS 耐性複合体に表される結合が形成されると共に、protofibril A β が安定化され、fibril A β の形成が抑制されるものと考えた。

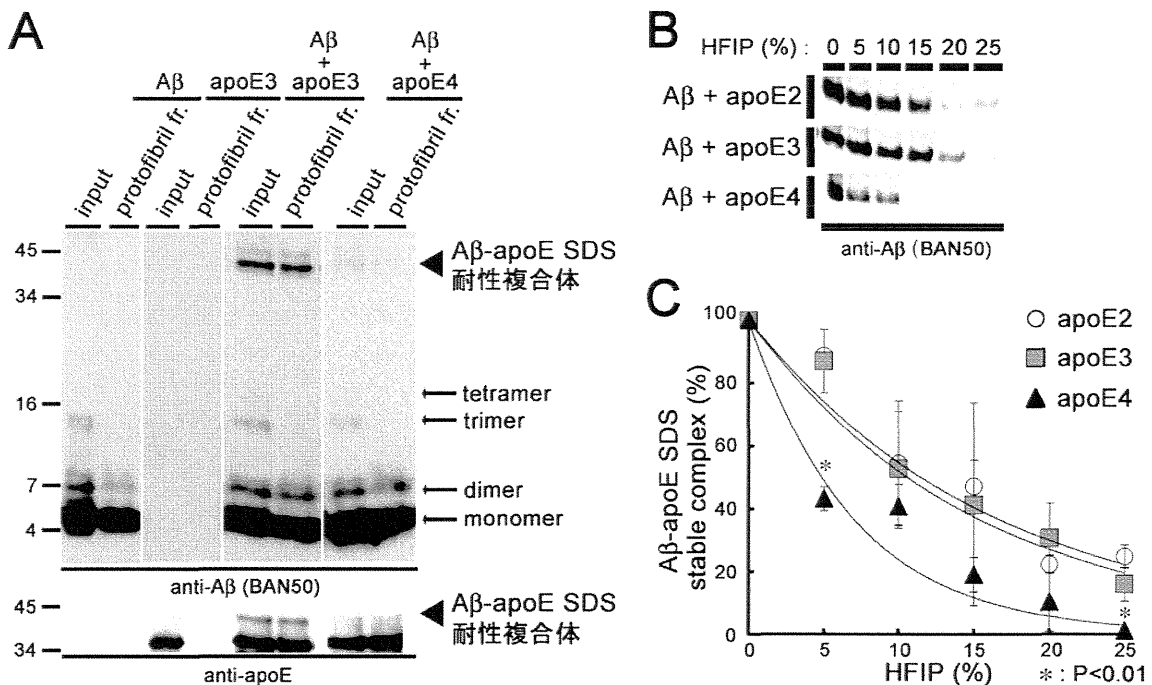


Fig. 3 A β -apoE SDS 耐性複合体に関する検討

A. A β -apoE SDS 耐性複合体の検出

B,C. HFIP に対する安定性 (B: WB, C: B の定量化グラフ)

3. protofibril A β の *in vivo* におけるアミロイド形成促進効果と apoE の影響に関する検討

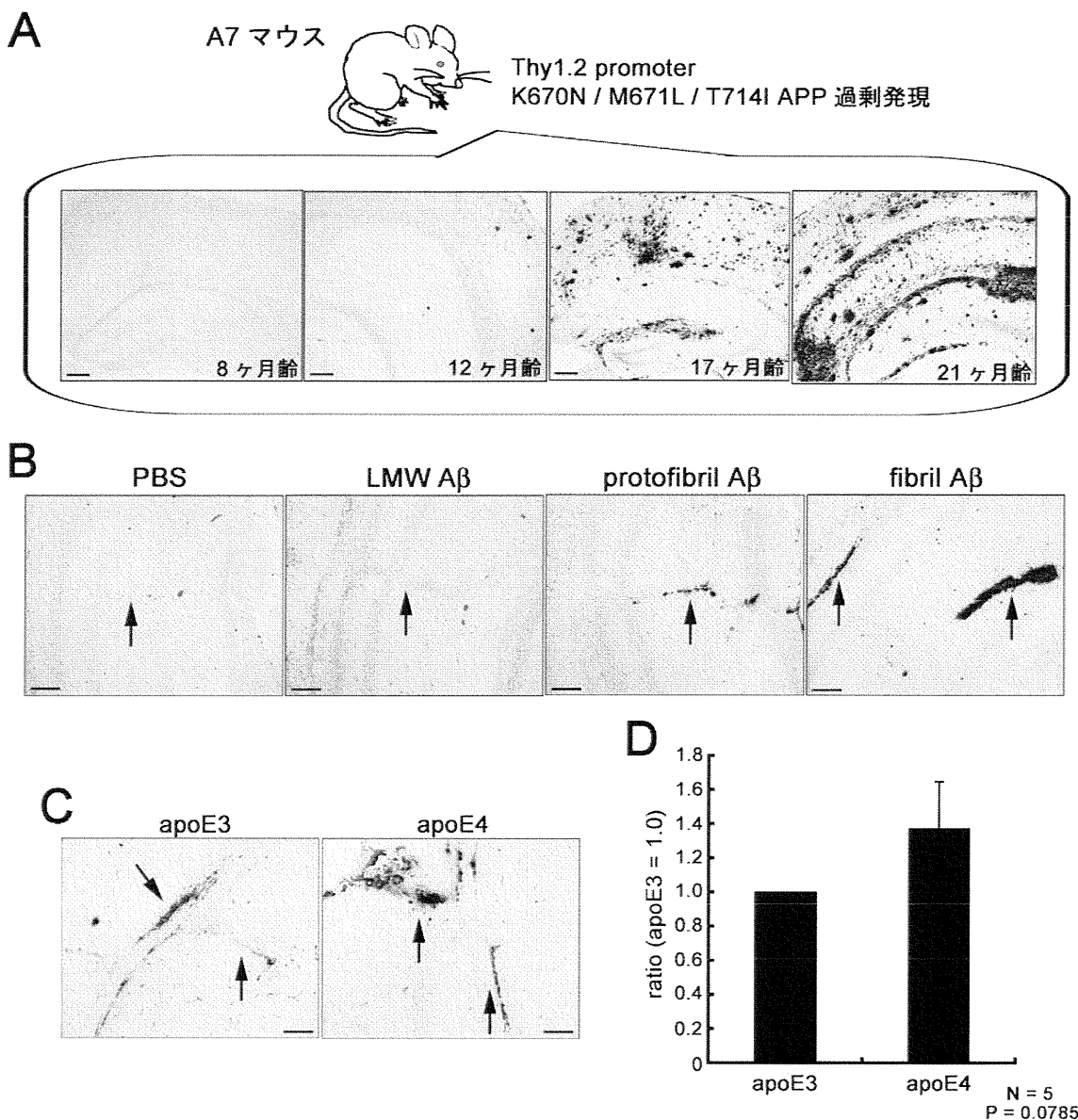


Fig. 4 *in vivo* における protofibril A β seed 効果と apoE の影響に関する検討

- A. A7 マウス脳における加齢依存的 A β 蓄積 (scar bar = 100 μ m)
 B. A β 重合核注入部位における A β 蓄積 (矢印) (scar bar = 100 μ m)
 C. apoE 存在下で形成させた protofibril A β 注入部位における A β 蓄積 (矢印)
 (scar bar = 100 μ m)
 D. apoE 存在下で形成させた protofibril A β 注入による不溶性 A β 量の定量
 ratio (apoE3 = 1.0)

前項までの *in vitro* の検討において、protofibril A β 形成に引き続いて、これと相補的な形で fibril A β の形成が生じたという観察結果から、形成された protofibril A β を重合核として monomer A β の重合が起こり、fibril A β の形成が進行するものと推測した。そこで、*in vivo* の脳内でも、protofibril A β が線維形成の重合核 (seed) 効果を有するかについて tg マウス脳への A β 注入実験により検証した。この目的で、私は家族性変異型ヒト APP 遺伝子を神経細胞に過剰発現する tg マウス (A7 マウス) を作出した。A7 マウスでは約 9 ヶ月齢

から加齢依存的に A β が脳内にアミロイド斑として蓄積する (Fig.4A)。アミロイド斑形成が生じる前の、8ヶ月齢 A7 マウス脳に、fibril、 protofibril、 低分子量 (LMW)の3種の異なる重合状態の A β を注入後、12ヶ月齢で A β 蓄積を免疫組織化学的に検出し、アミロイド形成に対する seed 効果を評価した。その結果、fibril A β 、 protofibril A β はともに注入部位近傍の A β 蓄積を増加させ、その効果は fibril A β でより高かった (Fig.4B)。 *in vitro* で A β 線維形成の核として作用しない LMW A β を注入した場合には、A β 蓄積は全く誘発されなかった (Fig.4B)。以上の結果から、protofibril A β は *in vivo* においてもアミロイド形成の seed 効果を有することが分かった。さらに、*in vivo* での protofibril A β の seed 効果に対する apoE の影響について検討した。apoE3 あるいは apoE4 存在下で形成させた protofibril A β を A7 マウス脳の左右半球にそれぞれ注入し、免疫組織化学的検討 (図表 4C) と海馬の不溶性 A β の生化学的定量 (図表 4D)を行った。その結果、統計学的に有意差は認められないものの、apoE4 存在下で形成させた protofibril A β の注入により不溶性 A β 量が増加する傾向が見られた。これらの結果は apoE が *in vivo* でも protofibril A β の seed 効果をアイソフォーム特異的に modulate し、apoE4 はアミロイド蓄積量を増加させる可能性を示唆する。

[まとめ]

本研究において私は、apoE がアイソフォーム特異的に、安定性の異なる A β -apoE SDS 耐性複合体を *in vitro* で形成すること、また形成された複合体の量に応じた protofibril A β の安定化効果があることを見出した。さらに tg マウス脳内への注入実験により、protofibril A β は *in vivo* でアミロイド形成の seed 効果を持つこと、apoE は *in vivo* でもその seed 効果を modulate する可能性があることを示した。これらの結果から、A β 線維形成過程において、apoE3 は protofibril A β を安定化することにより、protofibril A β の seed 効果を抑制し、fibril A β の形成を抑制する作用を有すると考えた。一方 apoE4 は、その seed 効果の抑制効果が減弱し、fibril A β の形成を早期に生じやすいものと考えた。そのため apoE4 の存在下ではアミロイド形成が促進され、AD の遺伝的危険因子として働く可能性が想定された。