

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 堀 由起子

アルツハイマー病 (AD)は、老年期認知症の主因となる神経変性疾患であり、その発症メカニズムとして、アミロイドβペプチド (Aβ)が構造変化を起こして線維化する過程で神経細胞死を招くと考える「アミロイド仮説」が広く支持されている。そのため Aβの線維化過程の解明は、AD の発症メカニズムに即した根本治療法の確立に重要である。特に Aβ線維化過程において形成される可溶性の線維形成中間体は、神経細胞に対し高い障害性を発揮することから、その形成機構が注目されている。

主要なアポタンパク質の1つである apolipoprotein E (apoE)は脳にも発現し、Aβ結合タンパク質の1つとしても知られている。ヒト apoE には3種類の遺伝多型 (ε2、ε3、ε4)が存在し、ε4 アレルは AD 発症の遺伝的危険因子として確立されているが、その発症促進メカニズムには不明な点が多い。apoE は AD 脳に蓄積した fibril Aβと結合していることから、apoE は Aβ線維形成過程に関与し、アイソフォーム特異的な効果を発揮する可能性がある。そこで申請者は、apoE が Aβの線維形成過程に及ぼす影響について、アイソフォームごとに *in vitro* において検討を行った。

Aβ線維形成過程で生じる中間体の中で、申請者は protofibril Aβに注目した。protofibril Aβは (1)17,000 x g の遠心によって上清に回収される、(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。そこで申請者は、既に確立した protofibril Aβの *in vitro* における形成・検出系を発展させ、protofibril Aβ形成に対する apoE の効果を詳細に調べた。さらに protofibril Aβが脳内でアミロイド蓄積に及ぼす影響について、また protofibril Aβ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. Aβ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

まず申請者は apoE が Aβ 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 Aβ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 Aβの形成過程と、引き続いて重合が進んで形成される fibril Aβ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 Aβの線維形成過程を検討すると、protofibril Aβが形成された後、その消失に呼応して fibril Aβの形成が始まることがわかった。次に、apoE のアイソフォーム毎に Aβ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 Aβの存続時間を延長し、その後の fibril Aβの形成が遅延することがわかった。一方、apoE4 の protofibril Aβ 維持効果は最も弱く、fibril Aβの形成が速やかに生じることがわかった。次に、apoE アイソフォームによる Aβ 線維形成過程への影響の相違が、apoE が protofibril Aβ に直接

作用することに起因するかについて検討した。SEC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、有意に高く安定化されていることがわかった。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。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。

申請者は、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。

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。

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

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 マウスへの脳内注入実験により検証した。この目的で、申請者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。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。*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。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と海馬の不溶性 A β 量の生化学的定量を行った。その結果、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認められた。この結果は 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ものであった。

本研究において申請者は、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られた。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。これらの結果は、アルツハイマー病の病態解明とくに apoE を介したアミロイド病理の進展に関して重要な知見を与えるものであり、博士(薬学)の学位に値するものと判定した。