

## 論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名 山川 英訓

本論文提出者は、以下の関連する二つのテーマについて取り組んだ。

1. アルツハイマー病 (AD) の認知機能障害のメカニズムの解析
2. 有望な AD 根本治療薬開発における問題解決

### 1. AD の認知機能障害のメカニズム解析

古くから AD の原因論として、アミロイド仮説広く知られている。その仮説では、凝集性の高い A $\beta$ 42 が凝集体を形成し沈着することで神経変性を誘発し認知機能が障害されるとされていた。しかし研究が進むにつれ、不溶性 A $\beta$  と認知機能障害度が全く相関しないことが明らかとなった。そんな中、合成ペプチド A $\beta$ 42 などで人工的に調製した可溶性 A $\beta$ -oligomer が、病態下の生理的濃度で鋭い認知機能障害を誘導することが報告され、脚光を浴びた。現在でも、人工的な A $\beta$ -oligomer を用いた認知機能障害メカニズム研究は広く行なわれている。しかし、AD の認知機能障害のメカニズム解析をする上で、これらの研究には決定的な難点があった。それは用いた A $\beta$ -oligomer が人工的であるということである。脳内には複数種類の A $\beta$  が存在するため、*in vitro* の均一な条件下で形成された A $\beta$ -oligomer と脳内に実在する A $\beta$ -oligomer はその構成分子も構造も異なることが推測される。そこで本論文提出者は、脳に A $\beta$ -oligomer が実在するのか？ そうだとしたら、それは認知機能を障害するのか？ そうだとしたら、そのメカニズムはどのようなものであるか？ を明らかにするために研究を行った。

まず AD モデルマウス (以下 AD マウス) の脳可溶性画分を野生型マウスの側脳室内に投与し、その 1 時間後の認知機能を Y 迷路短期記憶学習評価系で評価した。その結果、野生型マウスの脳可溶性画分を投与した群と比較して、AD マウスの脳可溶性画分投与群では有意に認知機能が障害されていた。このことから、AD マウスの脳可溶性画分中には認知機能障害誘導分子が存在することが明らかとなった。また、その認知機能障害は、投与した AD マウス脳可溶性画分の用量依存的であり、一過性であった。次に、その分子を同定するために、抗 A $\beta$  抗体と神経毒性を示す高次構造を認識する抗 oligomer 抗体を用いて、AD マウス脳可溶性画分を immunodepletion することで、その認知機能障害誘導能が失われるかを検討した。その結果、抗 A $\beta$  抗体と抗 oligomer 抗体で immunodepletion を行なった場合において、AD マウス脳可溶性画分の認知機能障害誘導能が完全に失われた。このことは、両抗体の共通の抗原である A $\beta$ -oligomer が認知機能障害誘導分子であることを強く示唆している。また、ゲルろ過クロマトグラフィーによって A $\beta$  の monomer と oligomer を分離し、その A $\beta$ -oligomer 含有画分を野生型マウスに投与することによって認知機能障害が誘導され、その認知機能障害度は各画分中の A $\beta$ -oligomer 量に相関していることも確認した。以上のこ

とから、AD マウス脳内の A $\beta$ -oligomer が認知機能障害分子であることが示された。

次に、この脳由来の A $\beta$ -oligomer の認知機能障害のメカニズムを知るための検討を行った。まず、AD 治療薬であるアセチルコリンエステラーゼ (AChE) 阻害剤、アリセプトで AD マウス脳可溶性画分による認知機能障害誘導が拮抗されるか検討した。その結果、アリセプトの用量依存的に、認知機能障害の誘導は完全に拮抗された。このことから、アセチルコリン伝達系が可溶性画分中の A $\beta$ -oligomer により障害されることが示唆された。さらに A $\beta$ -oligomer の作用点を詳細に明らかにするために、AD の認知機能障害との関連性が示唆されているムスカリン M1 受容体の選択的アゴニスト MCN-A-343 で、AD マウス脳可溶性画分による認知機能障害誘導が拮抗されるか検討した。その結果、MCN-A-343 によって、認知機能障害の誘導は完全に拮抗された。以上のことから、脳に実在する A $\beta$ -oligomer は、M1 受容体を介したアセチルコリン伝達系を障害することで認知機能障害を誘導していると考えられる。

先行研究から、人工的 A $\beta$ -oligomer によってホスファチジルイノシトール三リン酸 (PIP<sub>2</sub>) が減少し、その下流のイノシトール三リン酸 (IP<sub>3</sub>) やジアシルグリセロール (DAG) を介したシグナルが減弱することが報告されている。一方、M1 受容体は G<sub>q</sub> タンパク質共役型受容体であり、M1 受容体が活性化するとホスホリパーゼ C が活性化し、PIP<sub>2</sub> の IP<sub>3</sub> や DAG への加水分解が促進され、プロテインキナーゼ C が活性化することが知られている。これらの事実と本研究結果を合わせて考えると、M1 アゴニストは A $\beta$ -oligomer によって減弱した DAG や IP<sub>3</sub> シグナルを増強するため、A $\beta$ -oligomer による認知機能障害を拮抗すると考えられる。

このように、本研究において脳由来の A $\beta$ -oligomer の認知機能障害能を明らかにした実験系を用いて、さらに詳細な A $\beta$ -oligomer による認知機能障害メカニズム解析を行い、その結果と、現在までに蓄積された人工的 A $\beta$ -oligomer 研究結果を照らし合わせることで、真の AD における認知機能障害メカニズムの解明を迅速に成し遂げることができるだろう。そうすることで、より臨床での有効性の高い AD 治療薬の創製が可能になる。

## 2. 有望な AD 根本治療薬開発における問題解決

1 の研究結果の中で、A $\beta$ -oligomer による認知機能障害はその用量依存的に誘導され、一過性のものであることが明らかとなった。このことは、脳内の A $\beta$ -oligomer は何らかのメカニズムによって脳から代謝もしくは排出されることを示している。したがって、A $\beta$  の産生を抑制すれば脳内の A $\beta$ -oligomer は減少し、AD における認知機能障害の改善を実現できると考えられる。そのような A $\beta$  産生抑制薬として最も有望なのが BACE1 阻害剤である。しかし、BACE1 阻害剤には一つ薬効面の懸念があった。それは、AD マウスのゴールドスタンダードである Tg2576 における BACE1 阻害剤の A $\beta$  産生抑制活性は、野生型における活性より約 10 倍弱いということであった。Tg2576 マウスは家族性 AD 変異の入った Swedish 変異型 APP (APP<sup>swe</sup>) 過剰発現マウスである。そのため、Swedish 変異によって BACE1

阻害剤の薬効が減弱していると考えられてきた。事実、細胞系においても APP<sup>swe</sup> 発現細胞に対する BACE1 阻害剤の薬効は、野生型 APP (APP<sup>wt</sup>) 発現細胞に対する薬効よりも 10 倍弱い。しかしながら、Swedish 変異によって BACE1 阻害剤の薬効が減弱するメカニズムについては全く明らかにされていなかった。したがって、その時点では、Swedish 変異によって BACE1 阻害剤の薬効が減弱するのか、AD の病態条件下であるから BACE1 阻害剤の薬効が減弱するのか、判断することができなかった。もし、後者が原因であるとすると、BACE1 阻害剤が AD 患者で明確な治療効果を発揮するためには、10 倍多い投与量が必要となる。このことは単純には、コストと安全性リスクが 10 倍上がることを意味する。そこで、BACE1 阻害剤が Swedish 変異によって薬効減弱するメカニズムを明らかにし、臨床における有効薬効用量を的確に見積もることを目的として研究を行った。

まず、*in vitro* の BACE1 酵素阻害活性試験における Swedish 変異の影響を検討した。その結果、予想に反して *in vitro* においては Swedish 変異によって BACE1 阻害剤の薬効は全く変化しなかった。一方、細胞系では先行研究と同様、Swedish 変異によって約 10 倍薬効が減弱した。そこで、*in vitro* 系と細胞系の違いの中に、Swedish 変異による BACE1 阻害剤の薬効減弱の原因があると考え、様々な検討を行った。まず、*in vitro* 系を細胞系の条件へと近づけることで Swedish 変異による薬効減弱現象を再現しようと試みた。反応時間、基質と酵素の濃度比、pH を変化させたが、*in vitro* 系でその現象を再現することはできなかった。そこで、逆に細胞系を *in vitro* 系に近づけるため検討を行った。APP<sup>swe</sup> 発現細胞で見られる  $\beta$ CTF 蓄積が BACE1 阻害剤の  $A\beta$  産生抑制活性に与える影響や、BACE1 阻害剤の  $\beta$ CTF 産生抑制活性を検討したが、依然として Swedish 変異によって BACE1 阻害剤の薬効は減弱した。そして最終的に、APP が BACE1 によって切断される部位が Swedish 変異によって変化することが BACE1 阻害剤の薬効減弱に繋がるのではないかと考え、細胞内の区画分けを破壊した場合 (Cell-free 系) と BACE1 による APP 切断の細胞内部位を局限させた場合に、Swedish 変異による薬効減弱が起こらなくなるかを検討した。その結果、それらの両方の条件において、Swedish 変異による BACE1 阻害剤の薬効減弱は起こらなくなった。以上のことから、Swedish 変異による BACE1 阻害剤の薬効減弱は、APP が BACE1 による切断を受ける細胞内部位が Swedish 変異によって変化することで起こる現象であることが明らかとなった。

本研究結果から、孤発性 AD 患者の APP は野生型であるため、BACE1 阻害剤の薬効が孤発性 AD 患者で減弱することはないと考えられる。

以上のように本論文提出者は、本研究において AD の認知症発症メカニズムの一端を明らかにし、さらにその治療薬開発に直結する課題解決を成し遂げた。したがって、本審査委員会は本論文提出者を博士 (学術) の学位を授与するにふさわしいものと認定する。