

氏名(本籍)	石井一弘(茨城県)		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	博甲第1,927号		
学位授与年月日	平成10年3月23日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	医学研究科		
学位論文題目	Alzheimer病脳でのA β 異常沈着に及ぼすApolipoprotein E4とPresenilin-1変異効果に関する生物学的研究		
主査	筑波大学教授	医学博士	白石博康
副査	筑波大学教授	医学博士	岡戸信男
副査	筑波大学教授	医学博士	坂内四郎
副査	筑波大学教授	医学博士	三輪正直
副査	筑波大学教授	医学博士	能勢忠男

論文の内容の要旨

(目的)

急性疾患や成人病の予防法・治療法が確立されるに従い、高齢化が進み、アルツハイマー病 (Alzheimer's disease; AD) などの神経変性疾患が人口に占める割合が近年、高くなってきた。ADは大部分を占める孤発性アルツハイマー病 (sporadic AD; sAD) と数%の常染色体優性遺伝形式を示す家族性アルツハイマー病 (familial AD; FAD) からなっている。さらにFADは65歳以前に発症する早期発症型FADと65歳以降に発症する晩期発症型FADの2つに分類される。ADの有力な原因仮説として、A β 原因説が唱えられており、これを支持する多くの知見が得られている。

近年、新たにFADの分子生物学的研究から病因蛋白としてApolipoprotein E (ApoE), presenilin 1 (PS1), presenilin 2 (PS2) が発見され、A β とこれら原因蛋白との相互作用がにわかに注目されている。本研究はA β 原因説の確認およびA β の神経細胞毒性実験系を確立し、次にA β とPS1およびA β とApoEとの分子間相互作用による一連の老人斑形成機構の解明を目的とし、研究を行った。

(方法)

1. A β 1-40およびA β 25-35の神経細胞毒性：胎生16-17日齢マウス大脳皮質初代神経細胞を用い、合成ペプチドであるA β 25-35およびA β 1-40の神経細胞毒性を確認した。5%ウマ血清と5%幼牛血清添加のDME M培地に神経細胞を播種し、培養4日目にA β 25-35およびA β 1-40を添加した。培養6日目に抗MAP-2抗体による免疫染色で神経細胞を染色した後、生存神経細胞数を肉眼で計測し、A β 25-35およびA β 1-40の各濃度での生存細胞率を求めた。

2. A β とApolipoprotein Eのgenotype効果：凍結剖検脳の前頭葉を用い、生化学的手法で、ApoEゲノム型とA β 分子種との関係を調べた。sAD患者の凍結剖検脳からA β を蟻酸にて抽出した。次にN末端認識抗体(固相抗体)であるBAN50(抗A β 1-16)とBNT77(抗A β 11-28)、およびC末端認識抗体(標識抗体)であるBA27(抗A β 1-40)とBC05(抗A β 35-43)を用いたsandwich ELISA法で、A β 1-40、A β 1-42、A β X-40、A β X-42を定量した。一方、ApoEのゲノム型決定のため、genomic DNAを凍結脳から抽出し、ApoE部分をPCR法にて増幅した。HhaI制限酵素消化後に電気泳動を行い、positive controlと比較し、ゲノム型を決定した。

3. A β とpresenilin 1のミスセンス変異効果：PS1 (H163R) 患者およびPS1 (Δ exon 9) 患者と3例のsAD患者剖検脳(中側頭回)切片を用い、免疫組織学的定量法で、PS1とA β 分子種との関係を調べた。抗体はA β 40とA β 42を区別するC末端認識抗体Ter-40とTer-42を用いた。免疫組織染色切片の形態学的解析はコンピュータ画像解析装置を使用し、老人斑の全画面に対する比率(area; %)と老人斑の個数を単位面積あたりの個数(density; 個数/mm²)で求めた。

(結果)

1. A β 25-35, A β 1-40の両方に濃度依存的に軸索や神経突起の伸長阻害を伴った、神経細胞毒性が確認された。
2. ApoEの各ゲノム型は ϵ 3/ ϵ 3が20例、 ϵ 3/ ϵ 4が12例、 ϵ 4/ ϵ 4が4例であった。ApoE ϵ 4はsAD脳内におけるA β 1-40およびA β X-40を有意に増加させ、ApoE ϵ 4はsAD脳内におけるA β 1-40/A β 1-42及びA β X-40/A β X-42の比を有意に大きくした。ApoE genotypeのA β 沈着に及ぼす効果はA β のC末端に関連し、N末端は影響されないことがわかった。
3. Ter-42陽性老人斑は面積比および単位あたりの個数の両方ともsADと比較するとPS1 (H163R), PS1 (Δ exon 9)の両方で増加していた。よって、PS1 (H163R), PS1 (Δ exon 9)の脳内でA β 1-42が増加していることがわかった。

(考察)

老人斑形成にはまず律速段階のA β 1-42による核形成が必要である。PS1や β APPの点突然変異では血漿中や脳内でA β 1-42が増加しており、老人斑の核形成が早くなり、AD発症が若年化することが説明できる。次に老人斑の成長相ではA β 1-42の核にA β 1-42とA β 1-40が沈着してアミロイド線維を形成する。ApoE ϵ 4はA β 1-40との結合がApoE ϵ 3より強いとする報告もあるのでA β 1-40に結合してA β 1-40の核への蓄積を促進するのもかもしれない。これは核形成まで健常人と同様な速度で進行し、ApoE ϵ 4が存在すると老人斑成長相で蓄積がより加速され、晩期発症になると考えられる。sADでApoE ϵ 4の個数が増えるごとに発症が8-10年早くなることから、分子レベルでの説明に合致する。本研究は、早期発症のPS1 (Δ exon 9) およびPS1 (H163R) 脳内でA β 1-42が増加していること、ApoE ϵ 4 alleleが増えるに従いA β 1-40が脳内で増加することをあきらかにし、ADの発症の早晚をA β 分子種レベルで証明した。

sADはADの大部分を占め、しかも晩期に発症する。様々の外的・内的要因の影響を受けて成長相が促進されsADとして発症するのであろう。したがって、この成長相を促進させる因子を阻害する物質がより現実的な治療薬になると考えられる。今回確立したA β の神経細胞毒性実験系を用い、治療薬候補物質を検索することが、今後の課題となる。

審査の結果の要旨

本論文は、近年家族性のアルツハイマー病(AD)の病因蛋白として発見されたApoEならびにPS1とアミロイド β 蛋白(A β)との相互作用による老人斑形成機構の解明を目的としたものである。

著者は、まず毒性試験によりA β 25-35とA β 1-40に神経細胞毒性があることを証明した。次に孤発性AD36例のApoEのゲノム型とA β 分子種との関係を調べて、ApoE ϵ 4は孤発性AD脳内におけるA β 1-40およびA β X-40を有意に増加させることを示した。さらに、PS1が存在する早期発症AD(H163Rおよび Δ exon 9)患者と孤発性AD患者の剖検脳(中側頭回)切片を用いてPS1とA β 分子種との関係を調べ、PS1患者の脳内でA β 1-42が増加していることを証明した。

本研究は、早期発症のADの脳内で老人斑の核形成に関与するA β 1-42が増加していること、ApoE ϵ 4対立遺伝子が増えるに従い老人斑の核に沈着するA β 1-40が脳内で増加することを明らかにした。すなわちADのA β 原因仮説を検証し、その発症の早発・遅発をA β 分子種レベルで証明し、さらにADの治療薬の開発可能性を示し

た点で優れた論文である。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。