

Title	アルツハイマー病脳におけるアミロイド前駆体蛋白C 末端部分エピトープの異常蓄積について
Author(s)	大河内, 正康
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/38972
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	おおこうち まさ やす 大河内 正 康
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 11799 号
学位授与年月日	平成7年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科内科系専攻
学位論文名	アルツハイマー病脳におけるアミロイド前駆体蛋白C末端部分 エピトープの異常蓄積について
論文審査委員	(主査) 教授 西村 健 (副査) 教授 柳原 武彦 教授 祖父江憲治

論文内容の要旨

【目的】

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease: AD) 脳の大脳皮質では大量の老人斑と神経原線維変化をともなう神経細胞の脱落が認められる。老人斑に沈着するアミロイド線維の構成蛋白はアミロイド β 蛋白前駆体 (amyloid β protein precursor: APP) から切り出される38-43アミノ残基のアミロイド β 蛋白 (amyloid β protein: A β) であることが明らかにされ、APPのプロセシングによりA β が生成されアミロイド線維を形成することがADの重要な病理過程と考えられている。

APPは脳以外の多くの組織においても発現しており、生理的条件下では少量のA β も産出されているが、大部分のAPPは異なるプロセシングを受けておりC端部分が切断されたN端側の分子は細胞外に放出され、プロテアーゼ阻害剤相同部分を有する分泌型APPはプロテアーゼネキシンIIとして細胞の増殖や分化を調節している。しかしながら、細胞内に残存するC端断片の動態や機能に関する知見は少ない。APPは1回膜貫通型の受容体蛋白としての構造を有しており、膜表面に存在する全長型APPが細胞外からのシグナルに対応して機能しているとも考えられるが、受容体蛋白としてのAPP分子の機能を考える場合にも細胞内に位置するC末端側部分の動態を明らかにすることが重要である。本研究では、このような知見に基づきAD脳におけるAPPのC端部分の分布について検討した。

【方法ならびに成績】

APP分子C末端断片の動態を検討するために、Multiple Antigen Peptide (MAP) 構造をもつAPP分子のC末端アミノ酸14残基合成ペプチド (APP 682-695, YENPTYKFFEQMON) に対するモノクローナル抗体 5E12 (IgG), 5E10 (IgM), 6H12 (IgM) 及びポリクローナル抗体 (R2B) を作製した。これらの抗体はいずれもELISA法でAPPのC末端14残基のMAPペプチド及び単鎖ペプチドと反応し、ウェスタン法で血小板及び培養皮膚線維芽細胞中の全長型APPに対応すると考えられる共通の140kDaバンドを認識した。これらの抗体を用いてAD脳の海馬を含む側頭葉領域での免疫組織化学的検索を行ったところ、R2B及び6H12に陽性所見が認められた。

抗血清R2Bでは皮質の神経細胞及びその周辺に多数の顆粒状蓄積物が染色された。またAD脳の血管壁周囲も陽性に染色された。

一方、モノクローナル抗体6H12では海馬周辺を中心に典型的な老人斑とは異なる斑状の細胞外構造物が認められ

た。この構造物は健常者脳では殆ど認められず、ADに特徴的と考えられた。また、R2Bの認識する構造物とは形態、出現頻度、部位ともに異なっていた。AD脳連続切片を用いた検討では、このAPP分子C末端14残基配列に対するモノクローナル抗体で染色された異常構造物は抗A β 抗体では染色されず、老人斑に関連すると考えられるカテプシンDに対する抗体及び神経原線維変化に関連すると考えられるシナプトフィジンに対する抗体でも染色されなかった。

AD脳ホモジネートの各抗体を用いたウエスタンブロットによる検討では、白質において5E10、5E12、6H12抗体は50KDa及び45KDaの共通するバンドを認識した。皮質では、6H12は他の2抗体では殆ど認識されない23、29、30KDaのバンドを染色した。この結果から、6H12の染色する構造物の成分としてA β を含んだAPPのC端部分断片が存在する可能性が示唆された。

免疫組織化学的検討による結果の相違が、6H12がAPPのC端部分エピトープの特殊な二次構造を認識していることにより生じている可能性について、APPのC端部分アミノ酸14残基の単鎖合成ペプチドの再構成物に対する免疫電顕による検討を行った。APP分子C末端14残基配列はin vitroにおいてフィラメント様構造物及びアモルファス構造物を形成した。この構造物の免疫電顕の結果、R2Bは直径7-10nmのフィラメント様構造物と結合したが、6H12はフィラメント様構造物ではなく、むしろアモルファスな構造物を強く認識した。これは6H12とR2Bの認識するコンフォメーションが異なることを示しており免疫組織化学の結果と一致した。

【総括】

- 1) APPのC端部分14残基のMAPペプチドに対するモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体を作成した。
- 2) AD脳を用いた免疫組織化学では、ポリクローナル抗体R2Bは神経細胞及びその周辺の顆粒状沈着物を染色した。
- 3) モノクローナル抗体6H12による免疫組織化学では、AD脳内に老人斑とは異なる斑状細胞外構造物が認められた。この構造物中にはA β 部分を含んだAPPのC端部分が存在する可能性が示唆された。
- 4) 連続切片を用いた検討では、6H12により染色される斑状細胞外構造物は、抗A β 抗体、抗カテプシン抗体、抗シナプトフィジン抗体で染色されなかった。
- 5) AD脳ホモジネートを用いてウエスタン法で検討したところ、モノクローナル抗体6H12は23、29、30KDaのバンドを認識した。
- 6) APPのC端部分14残基の単鎖ペプチドはin vitroでフィラメント構造を形成したが、免疫電顕による検討では6H12抗体はこのフィラメント構造と反応しなかった。

論文審査の結果の要旨

アルツハイマー病脳の老人斑中に β アミロイド蛋白が蓄積していることは周知の事実であるが、その生成過程についてはよくわかっていない。本研究は、アミロイド前駆体蛋白(APP)のC末端14アミノ酸残基をリジン残基で架橋したMultiple Antigen Peptide構造をもつ合成ペプチドを抗原としてポリクローナル抗体とモノクローナル抗体を作成し、アルツハイマー病脳の海馬を含む側頭葉領域での免疫組織化学的検索を行ったものである。

モノクローナル抗体6H12は海馬の歯状回周辺を中心に老人斑と異なる斑状の細胞外構造物の集積像を染色し、この構造物は健常者脳では認められずアルツハイマー病に特徴的と考えられた。

また、アルツハイマー病脳ホモジネートのウエスタン法による検討では、6H12は20-30KDaの分子量を示す特徴的なバンドを認識したことから、アルツハイマー病脳では β アミロイド蛋白部分を含んだAPPのC末端部分断片が集積し異常構造物を形成している可能性が示唆された。

これらの知見は、アルツハイマー病の病態を理解する上で重要であり、学位に値するものとする。