

これらの結果より、本変異によるADの発症は家族性ADでは初めての劣性遺伝で生じている可能性が示唆された。これまでに知られている家族性ADの変異がいずれも、脳内でのA β 蓄積を増加させるメカニズムによって優性遺伝での発症をひき起こしていたのに対して、本変異はまったく別のメカニズムで発症に寄与している可能性が考えられた。

変異の効果

本変異をもつAPPから産生されるA β について調べるために培養細胞に変異APP遺伝子を導入し、細胞から分泌されたA β の質量分析を行った。その結果、本変異APPより産生されるA β は、推測されたとおり22番目のグルタミン酸を欠失した変異A β であった。

われわれはさらに、本変異によるA β 産生への影響について解析を行った。先ほどと同様に変異APP遺伝子を導入された培養細胞から分泌されるA β 量を野生型APPの場合と比較した。発現しているAPP量に差はない状態で、A β 40の分泌量もA β 42の分泌量も本変異によって低下していた。さらにその際のA β 42/A β 40比には野生型と変異型との間で違いはなかった。この変異によるA β 分泌の低下は、実際に本変異によるAD患者のCSF中のA β 量が低下していることから確かめられた。

A β の22番目およびその前後のアミノ酸に生じるミスセンス変異は、ネプリライシンやIDE (insulin-degrading enzyme)などのA β 分解酵素に対して耐性となることが知られている¹²⁾¹³⁾。そこで、本変異A β をネプリライシンやIDEとともにインキュベートした後、ウエスタンブロットによって分解されずに残ったA β 量を測定した。その結果、本変異A β は野生型A β と比べて半分程度しか分解されておらず、本変異によりA β の分解酵素耐性が上昇することが確認された。

次に、本変異のA β 凝集性への影響について検討を行った。フィブリル中の β シート構造を検出するチオフラビンアッセイにおいて、本変異A β のフィブリル形成は1週間のインキュベートにおいても観察されなかった。このことは電子顕微鏡による観察によっても確認された(図2-A)。さらにウエスタンブロットにおいて、分子サイ

ズの違いによって多量体を直接みることで本変異A β のオリゴマー化についても検討した(図2-B)。野生型A β は1週間のインキュベートによって急速にモノマーが減少し、オリゴマー形成もわずかに認められるのみであった。おそらくこれは、これらの低分子量会合体がフィブリル形成に使われたためであると考えられた。これに対し本変異A β は、溶解直後からダイマー、トリマー、テトラマーなどの低分子オリゴマーを多量に形成し、これらのオリゴマーは1週間のインキュベート中安定に存在し続けた。これらの結果より本変異によってA β は素早いオリゴマー形成を行い、さらにフィブリル凝集は起こさずに、むしろオリゴマーの状態で安定化することが示された。このオリゴマー形成の促進は、実際の本変異によるAD患者のCSF中に多くのオリゴマーが存在したことによっても確認された。

アミロイドイメージング

AD患者の脳にはA β フィブリルの沈着により形成される老人斑が多量に存在することが知られている。本変異によりA β が本当にフィブリルを形成しないのならば、本変異を有する患者の脳内では老人斑はどうなっているのでしょうか。剖検が不可能な本症例において脳内のアミロイド沈着を調べるため、われわれは、A β フィブリルに特異的に結合するPittsburgh compound-B (PIB)をトレーサーとするPIB-PETを行った。その結果、*in vitro*での検討と同様に、本症例患者の脳では、通常のADでみられるような強いシグナルは検出できず、わずかなシグナルが小脳、側頭葉、後頭葉から得られたのみであった。つまり、本変異は脳へのA β フィブリルの沈着なしに、おそらくA β オリゴマーのみでADの臨床症状をひき起こしていると考えられた。

シナプス毒性

次にわれわれは、本変異A β の毒性について検討した¹⁴⁾。まず、神経系培養細胞へのA β 添加による細胞毒性をMTTアッセイで測定した。その結果、野生型A β が濃度依存的に細胞毒性を発揮したのに対し、本変異A β は高濃度においてわずかな細胞毒性を示しただけであった。フィブリ

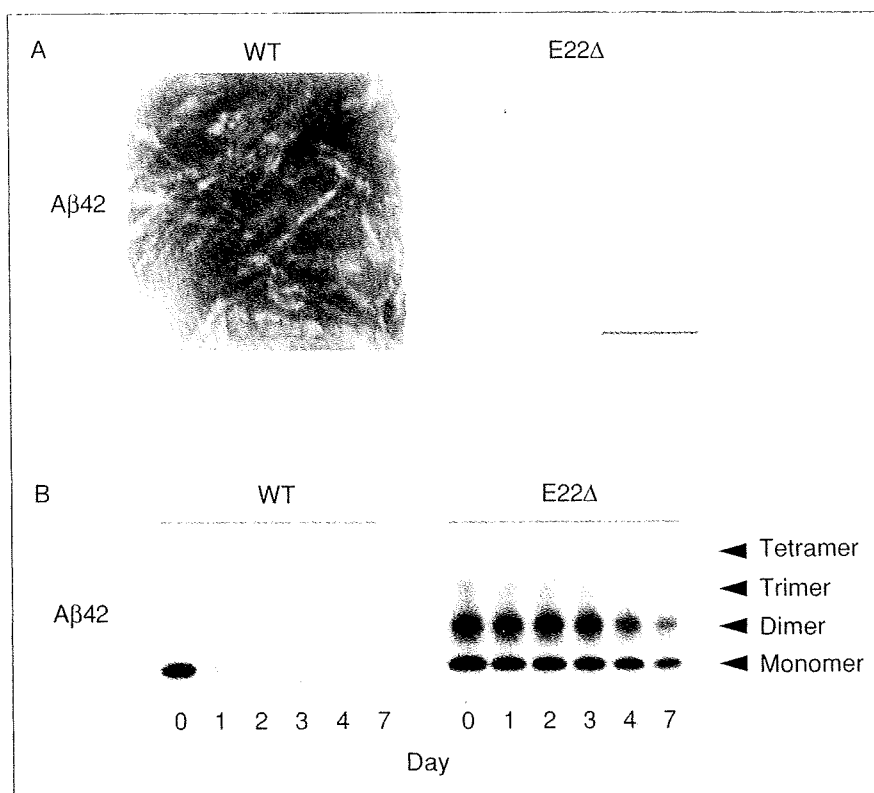


図2 変異Aβの凝集

A: 合成ペプチドをPBSで溶解し、100μMの濃度で1週間インキュベートしたものを電子顕微鏡で観察した。野生型Aβ42はフィブリルを形成したが、変異型Aβ42はまったく形成しなかった。Scale bar: 100nm。B: 合成ペプチドをPBSで溶解し、100μMの濃度でインキュベートして経時的にサンプリングしウエスタンブロットを行った。野生型Aβ42よりも変異型Aβ42でより多くのオリゴマーが安定して検出された。

ルを形成しない本変異Aβによっては細胞毒性は観察されないというこの結果は、細胞死を誘導するような毒性はフィブリルによって引き起こされるとするこれまでの考え方と一致している。一方、オリゴマーについてはシナプス障害を引き起こすことが報告されている³⁾⁴⁾。そこで次に、本変異Aβのシナプスへの影響を調べるためにマウス海馬のスライス培養に対してAβの添加を行った。すると、本変異Aβは野生型のものよりも強く前シナプスマーカー蛋白であるシナプトフィジンを減少させることが観察された。添加Aβ濃度が低濃度の場合、野生型Aβは神経細胞に対し栄養因子的に働いてシナプトフィジンを上昇させたが、本変異Aβについてはこのような効果は観察されなかった。さらにわれわれは、ラットの脳室にこれらAβを注入し海馬LTPを*in vivo*で測定した。やはりここでも本変異Aβが強くLTPを阻害しており、シナプス障害が生じているこ

とが確認された。これらの結果は、変異によってオリゴマー化したAβが脳内においてシナプス障害を引き起こすことが、本変異によるAD発症のメカニズムの一つであることを示している。

本変異APPを発現する細胞からのAβの分泌量は野生型APPに比べ低下していたが、本変異はβおよびγセクレターゼによるAPPの切断を阻害しなかった¹⁵⁾。本変異APPを発現させた培養細胞におけるAβの細胞内局在を免疫細胞化学的に観察したところ、本変異Aβは細胞内オルガネラに蓄積しており、それによりERストレスを介したアポトーシスシグナルが誘導されていた。本変異によるAβの過剰なオリゴマー形成が、その細胞内輸送に影響を与え、その結果、分泌が低下したのかもしれない。細胞外におけるAβオリゴマーの毒性だけではなく、Aβの細胞内蓄積による毒性も、AD発症に重要である可能性が示唆された。

まとめ：本変異の意義と オリゴマー仮説

今回われわれは、家族性Alzheimer病(AD)患者において、*APP*遺伝子上に初めての欠失型変異を同定した。この変異はA β 領域内にあり、産生されるA β の分泌低下やフィブリル形成の消失、オリゴマー化の促進、分解酵素耐性などをもたらした。とくにそのオリゴマー形成能の高さと、形成されるオリゴマーがシナプス障害を誘導することから、ヒトの脳内においてもこれまで動物モデルで示されてきたのと同様に、A β オリゴマーによるシナプス障害が生じていることを示唆している。

ADの脳内にはA β オリゴマーとA β フィブリルが同時に存在しており、どちらのA β がその病理・症状をひき起こすのかを明確に答えることは、これまで不可能であった。本変異はA β フィブリルがなくてもADが発症するという驚きとともに、A β オリゴマーによる毒性のみで従来のADと同様の臨床症状が起こることを示した点で、オリゴマー仮説を支持する有力な証拠を提供すると考えられる。

文 献

- 1) Cleary JP, Walsh DM, Hofmeister JJ, et al. Natural oligomers of the amyloid- β protein specifically disrupt cognitive function. *Nature Neurosci* 2005 ; 8 : 79-84.
- 2) Lesné S, Koh MT, Kotilinek L, et al. A specific amyloid- β protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* 2006 ; 440 : 352-7.
- 3) Shankar GM, Bloodgood BL, Townsend M, et al. Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *J Neurosci* 2007 ; 27 : 2866-75.
- 4) Lacor PN, Buniel MC, Furlow PW, et al. A β oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2007 ; 27 : 796-807.
- 5) Kuo YM, Emmerling MR, Vigo-Pelfrey C, et al. Water-soluble A β (N-40, N-42) oligomers in normal and Alzheimer disease brains. *J Biol Chem* 1996 ; 271 : 4077-81.
- 6) Gong Y, Chang L, Viola KL, et al. Alzheimer's disease-affected brain : presence of oligomeric A β ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003 ; 100 : 10417-22.
- 7) Terry RD, Masliah E, Salmon DP, et al. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease : synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol* 1991 ; 30 : 572-80.
- 8) Masliah E, Mallory M, Alford M, et al. Altered expression of synaptic proteins occurs early during progression of Alzheimer's disease. *Neurology* 2001 ; 56 : 127-9.
- 9) McLean CA, Cherny RA, Fraser FW, et al. Soluble pool of A β amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1999 ; 46 : 860-6.
- 10) Lue LF, Kuo YM, Roher AE, et al. Soluble amyloid β peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 1999 ; 155 : 853-62.
- 11) Tomiyama T, Nagata T, Shimada H, et al. A new amyloid β variant favoring oligomerization in Alzheimer's-type dementia. *Ann Neurol* 2008 ; 63 : 377-87.
- 12) Tsubuki S, Takaki Y, Saido TC. Dutch, Flemish, Italian, and Arctic mutations of APP and resistance of A β to physiologically relevant proteolytic degradation. *Lancet* 2003 ; 361 : 1957-8.
- 13) Morelli L, Llovera R, Gonzalez SA, et al. Differential degradation of amyloid β genetic variants associated with hereditary dementia or stroke by insulin-degrading enzyme. *J Biol Chem* 2003 ; 278 : 23221-6.
- 14) Takuma H, Teraoka R, Mori H, et al. Amyloid β E22 Δ variant induces synaptic alteration in mouse hippocampal slices. *Neuroreport* 2008 ; 19 : 615-9.
- 15) Nishitsuji K, Tomiyama T, Ishibashi K, et al. The E693 Δ mutation in amyloid precursor protein increases intracellular accumulation of amyloid beta oligomers and causes endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in cultured cells. *Am J Pathol* 2009 ; 174 : 957-69.

