

新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

ATN 分類における γ -secretase 活性変化の解析 (継続)

研究代表者 角田 伸人¹⁾

研究分担者 春日 健作²⁾

1) 同志社大学生命医科学部医生命システム学科 2) 新潟大学農研究所遺伝子機能解析学分野

研究要旨

アルツハイマー病 (AD) の神経病理学的特徴の一つには、アミロイド β タンパク質 ($A\beta$) が脳内に蓄積する老人斑がある。しかし臨床において AD と診断された患者の剖検脳でも老人斑が認められない症例もあり、脳病態の分類が見直され始めている。また脳内に $A\beta$ が蓄積するのは、 $A\beta$ の産生が影響するのか、 $A\beta$ の排出が寄与するのかまだ未解明である。本研究は、 $A\beta$ を産生する酵素 γ -secretase について検討することを目的とした。また活性測定を行う前に、あらためて老人斑という構造物についての形態を確認した。これまでは $A\beta$ の中でもアミノ酸残基が 42 の $A\beta_{42}$ が主に老人斑を形成していると考えられてきた。ところが AD モデルマウスで検討した結果、興味深いことにこれまで考えられてきた長い $A\beta$ だけではなく、短い $A\beta$ も蓄積していた。組織の固定方法によって結果が大きく異なることがわかった。

A. 研究目的

AD 脳病態の違いによる脳は、 $A\beta$ 沈着 (A マーカー)、病的タウ蓄積 (T マーカー)、神経変性 (N マーカー) の有無に分類される。本研究は A マーカーの $A\beta$ に着目し、AD と臨床診断されながらなぜ A マーカーに相違があるのか明らかにすることを目的とした。それは $A\beta$ の産生酵素 γ -secretase の活性に違いがあるのか、それとも酵素活性に違いはなく排出に違いがあるのか明らかにするためである。継続してきたこれまでの本研究において、 $A\beta$ の C 末端を特的に認識する抗体を作製した。この抗体で ELISA 測定系の構築を行うと同時に、あらためて老人斑の形態学的な特徴を観察し、どのような $A\beta$ が蓄積しているのか検討した。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

まず、これまでに取得したモノクローナル抗体で、ELISA 測定系の構築を行なった。共同研究者の春日健作先生より ATN 分類された貴重な血漿検体を提供いただき、予備的検討として、数検体を

測定した。

また、老人斑の形態学的な検討を行うため、AD モデルマウスである APP ノックインモデルマウスを使用した。一般的に、免疫染色を行うために脳組織はパラホルムアルデヒド (PFA) かホルマリソで固定される。さらに $A\beta$ を検出するためには、ギ酸による抗原の賦活化を適用する。この組織切片に対し、 $A\beta$ の N 末端特異的抗体および C 末端特異的抗体を用いると、老人斑の見え方が異なる。そのため、組織の固定方法、抗原の賦活化を検討した。

C. 研究結果

これまで角田のヒト脳脊髄液を用いた $A\beta$ の測定では、健常人と比較すると AD では短いアミノ酸残基の $A\beta$ 濃度が高く、長いアミノ酸残基の $A\beta$ が低下していた。この結果は、血漿にも反映すると予想していた。ところが、短い $A\beta$ は検出できる検体と検出限界以下の検体もあった。つまり脳脊髄の状態が血漿では反映はされていないことが

わかった。また老人斑の形態について、固定液をブアン液に変更し、抗原の賦活化はクエン酸バッファーをもちいたオートクレーブ処理に変更した。この結果、PFA でみられたような老人斑の形態はなかった。この方法で蛍光免疫染色を行うと、長い A β は老人斑の中心に凝集していた。また短い A β は、長い A β の周囲に蓄積していた。この蓄積について、どちらが先か検討するため、若齢期の AD モデルマウスで検討した。その結果、どちらの A β も老人斑に検出された。

D. 考察

これまで脳脊髄液でみられてきた A β の比率 (短い A β /長い A β) は、血漿に反映されていない可能性がある。これは検出系の問題なのか、他の要因があるのか継続検討する必要がある。また老人斑の形態について、これまで先行研究では長い A β が蓄積することで老人斑が形成されると考えられてきたが、短い A β も蓄積していることがわかった。これまで見えてこなかった要因のひとつは、検出する抗体がなかったことである。今回、抗体を作製したことで検出の検討が可能となった。また固定液を変更したことで、検出を可能にした。抗体の選択だけではなく、固定方法も適切に行う必要があることがわかった。

E. 結論

本研究の目的である、 γ -secretase 活性変化については、血漿中に短い A β が存在していることを示すことができれば測定系の問題かどうかを確認できる。また老人斑の形態については、これまで見過ごされてきたものがあると思われる。今後は更なる解析を行うことで、老人斑が巻き込んだ A β の分子種のみならず、他のタンパク質についても明らかにできる。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

1. The senile plaque: Morphological differences in APP knock-in mice brains by fixatives. Yoshimura R, Miyasaka T, Funamoto S, Saito T, Saido TC, Ikegawa M, ●Kakuda N. Brain Behav. 2023. 13. e2953. doi: 10.1002/brb3.2953.

2. 学会発表

1. AD モデルマウスにおける老人斑検出の最適化 ●角田伸人、吉村陸哉、宮坂知宏、舟本聡、池川雅哉、斎藤貴志、西道隆臣 日本認知症学会 2023 年 11 月 奈良

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし