

(論文内容の要旨)

原因タンパク質がアミロイドと呼ばれる線維を形成して沈着し、臓器に様々な機能障害を引き起こす疾患は、アミロイドーシスとして総称されている。アミロイドーシスの治療法の確立のためにはアミロイド線維の形成・沈着の機序を解明することが急務であるが、未解明な部分が多いのが現状である。アミロイド原性タンパク質は生理的には低濃度で存在し、自発的な凝集が起こることは考え難く、病態特有の凝集機構が存在することは容易に想像される。これまでに、アルツハイマー病原因タンパク質であるアミロイド β タンパク質 ($A\beta$) や、II型糖尿病患者の膵臓ランゲルハンス島に蓄積するアミリンなどのアミロイド線維形成において、細胞膜脂質が重要な役割を果たすことが *in vitro* の実験から示唆されているが、生細胞を用いた検証はほとんどなされていない。そこで本研究では $A\beta$ 、アミリンの二種類のアミロイド原性タンパク質に焦点を当て、*in vitro* で提唱されてきたアミロイド線維形成における細胞膜脂質の役割を、生細胞を用いて検証するための評価系を構築し、脂質組成の変化がアミロイド線維形成に与える影響を検討した。

1995年柳澤らは、 $A\beta$ アミロイドを主成分とするびまん性老人斑と量的相関を持って、細胞膜成分である GM1 ガングリオシドと結合した $A\beta$ が検出されることを報告した。ガングリオシドは糖脂質の一種で、生体膜中で、スフィンゴミエリン・コレステロールなどと共に、脂質ラフトと呼ばれる秩序液体相を形成していると考えられている。これまでの研究から、GM1 ガングリオシドはこの脂質ラフト様膜中でコレステロール依存的にクラスターを形成することで、 $A\beta$ との結合能を獲得し、凝集核への構造変化を誘起することで線維形成を促進することが示されている。第1章ではこのようなガングリオシド- $A\beta$ 間の相互作用を生体膜上で観察することを試みた。

まず、ラット褐色細胞種由来 PC12 細胞膜中のガングリオシドを、蛍光標識したコレラトキシンBサブユニット (CTX-B) により染色すると、細胞膜上では不均一な染色像がみられ、ガングリオシドリッチな領域 (GRD) が観察された。そこで、蛍光色素フルオレセインで標識した $A\beta$ (FL- $A\beta$) の結合を観察したところ、GRD に特異的に結合し、時間依存的に蓄積することが明らかとなった。また、培地中でインキュベートした FL- $A\beta$ を短時間投与しても、結合が観察されなかったことから、 $A\beta$ の結合・蓄積は細胞膜を介して起こることが示された。さらに、死細胞染色により、FL- $A\beta$ の蓄積による細胞死、ネクローシスを示唆する染色像が得られた。メチル β シクロデキストリンにより細胞膜中のコレステロールを引き抜くと、GRD が消滅した均一な染色像が得られ、 $A\beta$ の結合も観察されなかった。以上の結果より、生体膜への $A\beta$ の結合・蓄積も、コレステロール依存的に、ガングリオシドを介して引き起こされることが示された。

第2章では、蛍光色素を付加しない、native $A\beta$ を用いてアミロイド線維の蓄積をモニターする方法の開発を試みた。また、神経細胞特異的に蓄積する $A\beta$ の特性を考察するため、神経成長因子 (NGF) により分化誘導をした PC12 細胞と $A\beta$ との相互作用を検討した。

三種のアミロイド線維染色試薬、チオフラビンT、チオフラビンS、コンゴレッドを用いて生細胞膜上で形成される native $A\beta$ アミロイドの検出を試みたところ、チオフラビンT、チオフラビンSは $A\beta$ 非存在下で細胞内に取り込まれ蛍光を発したことから、コンゴレッドが適切であることがわかった。

NGF 分化誘導後の PC12 細胞において、GRD は細胞体・神経突起先端部に分布し、また、コレステロールリッチな領域に分布する、フルオレセインで標識したコレステロールポリエチレングリコール誘導体が GRD と共局在することから、GRD はコレステロールリッチでもある

ことが示された。Native A β アミロイドは FL-A β と同様に、GRD に時間依存的に蓄積し、細胞毒性を発現した。細胞毒性は線維形成後に発現することから、毒性体はアミロイド線維であると考えられる。さらに、分化によって蓄積量・細胞毒性が顕著に増大したことから、分化誘導前後における GM1、コレステロールの含有量を調べたところ、両成分とも分化誘導により大きく増加していた。分化誘導後の細胞を HMG-CoA (ヒドロキシメチルグルタリルコエンザイム A) 還元酵素阻害剤であるコンパクチンにより処理したところ、コレステロールのみならず、GM1 含有量も約50% に低下し、A β の結合はほとんどみられなくなった。以上の結果より、A β の持つ神経細胞に対する毒性が、脂質ラフト中でガングリオシドによって誘起されるアミロイド線維形成によってもたらされることを生細胞を用いて検証できた。

第3章では脂質ラフトが A β 以外のアミロイド線維形成の足場としてはたらく可能性を検討した。アミリンはこれまでに、酸性リン脂質であるホスファチジルグリセロール (PG)、ホスファチジルセリン (PS) などと相互作用してアミロイド線維を形成することが、モデル膜を用いた実験より明らかとなっているが、これらの脂質の生体膜外葉での含有率は非常に低く、生理的な現象として考え難い。そこで、ホスファチジルコリン (PC) に対し、酸性脂質である PG, PS, GM1 を混合したモデル膜、GM1 を含む脂質ラフト様膜をそれぞれアミリンとインキュベートし、チオフラビンTによって線維形成をモニターしたところ、GM1 を含む脂質ラフト様膜がアミリンの線維形成を最も促進した。

また、アミリンは PC12 細胞とインキュベートすると、A β 同様 GRD に蓄積し、アミロイドを形成して細胞毒性を発現した。CTX-B による染色をうけないチャイニーズハムスター卵巣由来 CHO 細胞にアミリンを投与しても、アミロイド線維の蓄積は確認されなかったことから、酸性リン脂質の負電荷よりも、脂質ラフト中に存在するガングリオシドが重要であると考えられる。

以上、脂質ラフト中に存在するガングリオシドが少なくとも A β やアミリンに対して、アミロイド線維形成の足場となりうることが示唆された。これらの結果はアミロイドーシスの発症機序に関して有用な知見を与えるものである。

(論文審査の結果の要旨)

原因タンパク質がアミロイドと呼ばれる線維を形成して沈着し、臓器に様々な機能障害を引き起こす疾患は、アミロイドーシスとして総称されている。アミロイドーシスの治療法の確立のためにはアミロイド線維の形成・沈着の機序を解明することが急務であるが、未解明な部分が多いのが現状である。本論文では、アルツハイマー病原因タンパク質であるアミロイド β タンパク質 ($A\beta$) と II 型糖尿病患者の膵臓ランゲルハンス島に蓄積するアミリンの二種類のアミロイド原性タンパク質に焦点を当て、アミロイド線維形成における細胞膜脂質の役割を、生細胞を用いて検証するための評価系を構築し、脂質組成の変化がアミロイド線維形成に与える影響を検討している。

第 1 章では、ラット褐色細胞種由来 PC12 細胞を用い、蛍光色素フルオレセイン標識 $A\beta$ (FL- $A\beta$) の蓄積を可視化している。PC12 細胞膜中のガングリオシドを、蛍光標識したコレラトキシン B サブユニット (CTX-B) により染色すると、細胞膜上では不均一な染色像がみられ、ガングリオシドリッチな領域 (GRD) が観察された。FL- $A\beta$ は、この GRD に特異的に結合し、時間依存的に蓄積することが明らかとなった。また、培地中でインキュベートした FL- $A\beta$ を短時間投与しても、結合が観察されなかったことから、 $A\beta$ の結合・蓄積は細胞膜を介して起こることが示された。また、メチル β シクロデキストリンにより細胞膜中のコレステロールを引き抜くと、GRD が消滅した均一な染色像が得られ、 $A\beta$ の結合も観察されなかった。以上の結果より、生体膜への $A\beta$ の結合・蓄積が、コレステロール依存的にガングリオシドを介して引き起こされることが示された。

第 2 章では、蛍光色素を付加しない、native $A\beta$ を用いてアミロイド線維の蓄積をモニターする方法の開発を試みている。まず、アミロイド線維の観察にはコンゴレッドが適切であることを見いだした。次に神経成長因子 NGF 分化誘導後の PC12 細胞上で、native $A\beta$ アミロイドは FL- $A\beta$ と同様に、GRD に時間依存的に蓄積し、細胞毒性を発現することを見いだした。細胞毒性は線維形成後に発現することから、毒性体はアミロイド線維であると考えられた。細胞をコンパクチンにより処理したところ、コレステロールのみならず、GM1 含有量も約 50% に低下し、 $A\beta$ の結合はほとんどみられなくなった。以上の結果より、 $A\beta$ の持つ神経細胞に対する毒性が、脂質ラフト中でガングリオシドによって誘起されるアミロイド線維形成によってもたらされることを生細胞を用いて検証した。

第 3 章では脂質ラフトが $A\beta$ 以外のアミロイド線維形成の足場としてはたらく可能性を検討するため、アミリンと PC12 細胞との相互作用を調べている。アミリンは $A\beta$ 同様、GRD に蓄積し、アミロイドを形成して細胞毒性を発現することを見いだした。CTX-B による染色をうけないチャイニーズハムスター卵巣由来 CHO 細胞にアミリンを投与し

ても、アミロイド線維の蓄積は確認されなかったことから、酸性リン脂質の負電荷よりも、脂質ラフト中に存在するガングリオシドが重要であると考えられる。

以上、脂質ラフト中に存在するガングリオシドが少なくとも A β やアミリンに対して、アミロイド線維形成の足場となりうることが示唆された。これらの結果はアミロイドーシスの発症機序に関して有用な知見を与えるものである。

よって本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成21年2月23日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。