

京都大学	博士（医学）	氏名	上田 紗希帆
論文題目	Acute inhibition of AMPA receptors by perampanel reduces amyloid β-protein levels by suppressing β-cleavage of APP in Alzheimer's disease models (ペランパネル急性投与による AMPA 型グルタミン酸受容体の抑制は、アルツハイマー病モデルマウスにおいて APP β 切断を抑制し、アミロイド β タンパク質を減少させる)		
(論文内容の要旨) 【背景】 アルツハイマー病 (AD) は早期からシナプス障害と海馬の神経過剰興奮を示す。この神経過剰興奮は β アミロイドタンパク質 ($A\beta$) 産生とシナプス間隙への放出を惹起し $A\beta$ 病理を悪化させる。本研究では、ADにおける神経過剰興奮の分子病態として AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA) に焦点を当てた。シナプスの AMPAR は AD 病態初期から減少するが、一方で特定の条件下で $A\beta$ が AMPAR の興奮性増大やカルシウム透過性亢進を招く。本研究では、非拮抗型 AMPAR 阻害薬である新規抗てんかん薬ペランパネル (PER) を用い、「AD 病態早期において PER による AMPAR 興奮性制御が $A\beta$ 病理を改善する」という仮説を <i>in vitro</i> および <i>in vivo</i> で検証した。 【方法】 (1) 脳間質液 (ISF) を生体脳より持続的に回収する <i>in vivo</i> microdialysis の手法を用い、APP トランスジェニックマウス (J20) の海馬に 30kDa の孔を持つ微小透析プローブを埋め込み、PER 経口単回投与が海馬の ISF 中の $A\beta$ 動態に与える影響を評価した。(2) PER が $A\beta$ 産生に与える影響を評価するため、2-3 カ月齢 J20 マウスに PER を経口単回投与し、sacrifice 後に分離した海馬から作成したホモジネートで APP 切断に関連するタンパク質をウェスタンブロットで評価した。(3) 既報告に準じ $A\beta$ オリゴマー誘発性神経過剰興奮を呈する野生型マウス胎児大脳皮質由来の初代培養神経細胞を作製し、神経過剰興奮下で APP 切断に PER が与える影響を評価した。 【結果】 (1) $A\beta$ 沈着前の 2-3 カ月齢 J20 マウスにおいて、PER 投与は ISF 中の可溶性 $A\beta$ 40 値および $A\beta$ 42 値を用量依存的に有意に減少させた。 $A\beta$ 40 と $A\beta$ 42 の比は変化しなかった。 γ セクレターゼ阻害薬 (GSI) を用いて $A\beta$ 産生を完全に阻害し、PER 投与前後の ISF 中の可溶性 $A\beta$ 値を ELISA で測定した結果、PER は ISF 可溶性 $A\beta$ 値を変化させなかった。(2) PER は海馬ホモジネート中の変異型 β CTF を減少させ、変異型全長 APP を増加させた。主要な β セクレターゼである BACE1 値は変化しなかった。(3) PER は培地中の可溶性 APP α (sAPP α) を変化させず、可溶性 APP β (sAPP β) 値を減少させた。また、細胞懸濁液での全長型 APP 値を著明に増加させた。 【考察】 $A\beta$ 沈着前の APP マウスにおいて、 <i>in vivo</i> microdialysis を用いて収集した ISF 中の可溶性 $A\beta$ 値は局所の将来的な $A\beta$ 沈着を予測する。本研究は PER が将来の $A\beta$ 負荷を改善させる可能性を示唆する。さらに、PER は β 切断を抑制することで $A\beta$ 産生を減少させ、結果として可溶性 $A\beta$ 値を低下させることを明らかにした。BACE1 総量は PER によって変化しなかった。BACE1 はシナプス前終末部に、AMPA はシナプス後部に主に局在していることから、PER が BACE1 に直接作用するのではなく、過剰な神経興奮を抑制することで BACE1 局在や活性が間接的に変化すると想定される。 【結論】 本研究は、AD 病態モデルにおいて PER による AMPAR の急性阻害が APP の β 切断抑制を介して $A\beta$ 産生を減少させることを <i>in vitro</i> と <i>in vivo</i> の系で初めて示した。本研究の成果は AD 病態における神経過剰興奮を標的とする新規治療戦略の発展に寄与すると考えられる。			

(論文審査の結果の要旨)

本研究は、アルツハイマー病 (AD) の神経過剰興奮性抑制でアミロイド β ($A\beta$) 病理が改善するとの仮説のもと、 α -アミノ-3-ヒドロキシ-5-メチル-4-イソオキサゾールプロピオン酸 (AMPA) 型グルタミン酸受容体阻害薬である抗てんかん薬ペランパネルが $A\beta$ 動態へ与える影響を評価した。家族性アミロイド前駆体タンパク質 (APP) 二重変異のトランスジェニックマウスである J20 の海馬に微小透析膜を埋め込む *in vivo* brain microdialysis 法を用いて、ペランパネル単回経口投与が海馬間質液の可溶性 $A\beta$ 40 および $A\beta$ 42 値を速やかに低下させることを示した。また、J20 の海馬において、ペランパネル投与下で β -セクレターゼ切断を受けた APP の C 末端断片 (β CTF) 低下と全長型 APP 増加を呈し、ペランパネルが APP の β 切断を抑制することを示唆した。 $A\beta$ 存在下の神経興奮性増大を模した初代神経細胞においても、ペランパネル処置により β 切断を受けた可溶性 APP (sAPP β) の低下と全長型 APP 増加がみられ、APP の β 切断抑制効果に合致する結果を示した。

以上の研究は、AD モデルマウスにおいてペランパネルが APP の β 切断抑制によって $A\beta$ を速やかに減少させる効果の機序解明に貢献し、AD の $A\beta$ 病理を改善する新たな疾患修飾療法の可能性を示し、今後の治療法開発に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、令和 6 年 2 月 19 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。