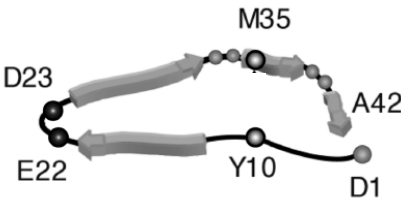
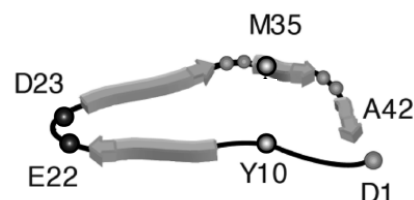


(続紙 1)

京都大学	博士（薬学）	氏名	泉尾 直孝
論文題目	アミロイドβ誘発神経毒性における立体構造の役割と毒性発現機構に関する研究		
（論文内容の要旨） アルツハイマー病は、老人斑の蓄積と神経原線維変化を特徴とする神経変性疾患であり、老人斑の構成成分であるアミロイドβ（Aβ）が神経脱落の危険因子であるとするアミロイド仮説が多くの研究によって支持されている。老人斑を構成するAβのうち、特に毒性が強いことが知られているAβ₁₋₄₂（Aβ42）は、多様な立体構造を有する。近年、Aβ42の22-23位のアミノ酸残基にターン構造を有するコンホマー（毒性コンホマー）が、高い凝集能を有し、またラット副腎髄質由来褐色細胞株であるPC12細胞に対して強力な細胞毒性を発現することが報告された。さらに、この毒性コンホマーはアルツハイマー病患者の剖検脳において存在することも報告されている。毒性コンホマーがアルツハイマー病の病態形成に重要な役割を担うことが推定される。しかしこれまで、毒性コンホマーの神経細胞に対する毒性ならびにその作用機序については不明であった。本研究において著者は、Aβ42毒性コンホマーの神経細胞に対する作用について研究を行った結果、以下の新知見を得た。  Aβ42 “毒性コンホマー”			
第一章 Aβ42誘発神経毒性における毒性コンホマー形成の重要性 Aβ42毒性コンホマーの性質を明らかにする目的で、22位のグルタミン酸残基をプロリン残基に置換することによりターン構造をとりやすくした変異体であるE22P-Aβ42と、バリン残基に置換することによりーン構造をとりにくくした変異体であるE22V-Aβ42を合成し、野生型Aβ42（Wt-Aβ42）との比較検討を行った。まず、Aβ42のターン構造特異的抗体である11A1抗体を用いたドットブロットにより、Wt-Aβ42とE22P-Aβ42は豊富に毒性コンホマーを含有するのに対し、E22V-Aβ42は毒性コンホマーをほとんど含有しないことが明らかとなった。また、Wt-Aβ42において毒性コンホマーの形成は時間依存的に増大した。毒性コンホマーの神経細胞に対する作用は、ラット初代培養大脳皮質神経細胞を用いて検討した。E22P-Aβ42は濃度依存的かつ時間依存的に神経毒性を誘発し、その作用はWt-Aβ42と比較して顕著に強いものであった。一方、E22V-Aβ42は神経毒性を誘発しなかった。次いで、遺伝性のAβ42変異のうち、Italian変異体（E22K-Aβ42）とArctic変異体（E22G-Aβ42）に着目した。E22K-Aβ42は毒性コンホマーを形成しやすいことが報告されており、またグリシン残基はタンパク質の二次構造におけるターン構造中に存在しやすいことが知られていることから、E22G-Aβ42も毒性コンホマーを形成しやすいことが予想される。11A1抗体を用いたドットブロットにより、E22K-			



Aβ42 “毒性コンホマー”

A β 42およびE22G-A β 42は毒性コンホマーを形成することを確認した。さらにE22K-A β 42およびE22G-A β 42はWt-A β 42に比べて強力な神経毒性を惹起した。以上の結果より、A β 42誘発神経毒性には毒性コンホマーの形成が重要であることが示される。

第二章 A β 42毒性コンホマー誘発神経毒性における細胞内酸化ストレスの関与

酸化ストレスは、種々の神経変性疾患の病態形成に重要な役割を果たすことが知られている。A β 42毒性コンホマーにより誘発される神経毒性のメカニズムを、酸化ストレスに着目して解析した。酸化ストレスの原因となる活性酸素種（ROS）の除去薬であるtroloxを初代培養大脳皮質神経細胞に処置したところ、Wt-A β 42およびE22P-A β 42により誘発される神経毒性は減弱した。Wt-A β 42およびE22P-A β 42はともに細胞内ROS量を増加し、E22P-A β 42の作用はWt-A β 42に比べて強力なものであった。一方、E22V-A β 42は細胞内ROS量を増大しなかった。A β 42毒性には、その凝集作用が重要であることが知られていることから、毒性コンホマーにより誘導される神経毒性と酸化ストレスにおける凝集の関与について検討した。凝集阻害薬であるCongo redは、Wt-A β 42およびE22P-A β 42により誘発される神経毒性を減弱し、細胞内ROS量を減少した。毒性コンホマーを形成するE22K-A β 42およびE22G-A β 42はともに細胞内ROS量を増加し、その作用はWt-A β 42と比べて強力であった。以上の結果より、A β 42が毒性コンホマーをとることにより誘発される神経毒性には、細胞内酸化ストレスが重要な役割を果たしており、酸化ストレスの誘導にはA β 42の凝集が関与することが示される。

以上のように著者は、A β 42により誘発される神経毒性において毒性コンホマーの形成と凝集が重要であり、A β 42毒性コンホマーは細胞内酸化ストレスを誘発して神経毒性を発現することを明らかにした。本研究の成果は、アルツハイマー病の発症機構および病態の解明に寄与するものであり、新しい治療法や診断法の開発など臨床応用に結びつく有用な基礎的知見を提供するものである。

(論文審査の結果の要旨)

アルツハイマー病は、老人斑の蓄積と神経原線維変化を特徴とする神経変性疾患であり、老人斑の構成成分であるアミロイド β ($A\beta$) が神経脱落の危険因子であるとするアミロイド仮説が多くの研究によって支持されている。老人斑を構成する $A\beta$ のうち、特に毒性が強いことが知られている $A\beta_{1-42}$ ($A\beta_{42}$) は、多様な立体構造を有する。近年、 $A\beta_{42}$ の22-23位のアミノ酸残基にターン構造を有するコンホマー

(毒性コンホマー) が、高い凝集能を有し、またラット副腎髄質由来褐色細胞株であるPC12細胞に対して強力な細胞毒性を発現することが報告された。さらに、この毒性コンホマーはアルツハイマー病患者の剖検脳において存在することも報告されている。毒性コンホマーがアルツハイマー病の病態形成に重要な役割を担うことが推定される。しかしこれまで、毒性コンホマーの神経細胞に対する毒性ならびにその作用機序については不明であった。本研究において著者は、 $A\beta_{42}$ 毒性コンホマーの神経細胞に対する作用について研究を行った。

$A\beta_{42}$ 毒性コンホマーの性質を明らかにする目的で、22位のグルタミン酸残基をプロリン残基に置換することによりターン構造をとりやすくした変異体であるE22P- $A\beta_{42}$ と、バリン残基に置換することによりターン構造をとりにくくした変異体であるE22V- $A\beta_{42}$ を合成し、野生型 $A\beta_{42}$ (Wt- $A\beta_{42}$) との比較検討を行った。まず、 $A\beta_{42}$ のターン構造特異的抗体である11A1抗体を用いたドットブロットにより、Wt- $A\beta_{42}$ とE22P- $A\beta_{42}$ は豊富に毒性コンホマーを含有するのに対し、E22V- $A\beta_{42}$ は毒性コンホマーをほとんど含有しないことが明らかとなった。また、Wt- $A\beta_{42}$ において毒性コンホマーの形成は時間依存的に増大した。毒性コンホマーの神経細胞に対する作用は、ラット初代培養大脳皮質神経細胞を用いて検討した。E22P- $A\beta_{42}$ は濃度依存的かつ時間依存的に神経毒性を誘発し、その作用はWt- $A\beta_{42}$ と比較して顕著に強いものであった。一方、E22V- $A\beta_{42}$ は神経毒性を誘発しなかった。次いで、遺伝性の $A\beta_{42}$ 変異のうち、Italian変異体 (E22K- $A\beta_{42}$) とArctic変異体 (E22G- $A\beta_{42}$) に着目した。E22K- $A\beta_{42}$ は毒性コンホマーを形成しやすいことが報告されており、またグリシン残基はタンパク質の二次構造におけるターン構造中に存在しやすいことが知られていることから、E22G- $A\beta_{42}$ も毒性コンホマーを形成しやすいことが予想される。11A1抗体を用いたドットブロットにより、E22K- $A\beta_{42}$ およびE22G- $A\beta_{42}$ は毒性コンホマーを形成することを確認した。さらにE22K- $A\beta_{42}$ およびE22G- $A\beta_{42}$ はWt- $A\beta_{42}$ に比べて強力な神経毒性を惹起した。以上の結果より、 $A\beta_{42}$ 誘発神経毒性には毒性コンホマーの形成が重要であることが示される。

酸化ストレスは、種々の神経変性疾患の病態形成に重要な役割を果たすことが知られている。 $A\beta_{42}$ 毒性コンホマーにより誘発される神経毒性のメカニズムを、酸化ストレスに着目して解析した。酸化ストレスの原因となる活性酸素種 (ROS) の除去薬であるtroloxを初代培養大脳皮質神経細胞に処置したところ、Wt- $A\beta_{42}$ およびE22P- $A\beta_{42}$ により誘発される神経毒性は減弱した。Wt- $A\beta_{42}$ およびE22P- $A\beta_{42}$ はともに細胞内ROS量を増加し、E22P- $A\beta_{42}$ の作用はWt- $A\beta_{42}$ に比べて強力なものであつ

た。一方、E22V-A β 42は細胞内ROS量を増大しなかった。A β 42毒性には、その凝集作用が重要であることが知られていることから、毒性コンホマーにより誘導される神経毒性と酸化ストレスにおける凝集の関与について検討した。凝集阻害薬であるCongo redは、Wt-A β 42およびE22P-A β 42により誘発される神経毒性を減弱し、細胞内ROS量を減少した。毒性コンホマーを形成するE22K-A β 42およびE22G-A β 42はともに細胞内ROS量を増加し、その作用はWt-A β 42と比べて強力であった。以上の結果より、A β 42が毒性コンホマーをとることにより誘発される神経毒性には、細胞内酸化ストレスが重要な役割を果たしており、酸化ストレスの誘導にはA β 42の凝集が関与することが示される。

以上、A β 42により誘発される神経毒性において毒性コンホマーの形成と凝集が重要であり、A β 42毒性コンホマーは細胞内酸化ストレスを誘発して神経毒性を発現することを明らかにした。本研究の成果は、アルツハイマー病の発症機構および病態の解明に寄与するものであり、新しい治療法や診断法の開発など臨床応用に結びつく有用な基礎的知見を提供するものである。

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25年2月25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。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 平成 年 月 日以降