

【トピックス】

アルツハイマー病様神経毒性におけるアミロイド β コンホマーの役割

泉尾 直孝¹⁾、村上 一馬²⁾、久米 利明³⁾、前田 雅弘⁴⁾、入江 一浩²⁾、清水 孝彦¹⁾

¹⁾ 千葉大学大学院医学研究院先進加齢医学 ²⁾ 京都大学大学院農学研究科生命有機化学

³⁾ 京都大学大学院薬学研究科薬品作用解析学 ⁴⁾ 免疫生物研究所

1. はじめに

アルツハイマー病 (AD) は、記憶、学習、見当識などの認知機能における障害を中心症状とする緩徐進行性の神経変性疾患である。認知機能を司る大脳皮質や海馬において神経細胞の脱落が見られ、老人斑の蓄積、神経原線維変化を特徴的な病理学的所見とする。本疾患の病態形成において、老人斑の構成成分であるアミロイド β ($A\beta$) の関与を指摘する「アミロイド仮説」が知られている。神経脱落においても $A\beta$ の関与が推定されることから、 $A\beta$ による神経変性を標的とした治療薬開発は、本疾患の根本的克服になりうると考えられる。 $A\beta$ はアミロイド前駆タンパク質 (APP) から β -secretase および γ -secretase という 2 種類の酵素により切り出され生成する (Fig. 1 A)。生成物は、主にそれぞれ 40 および 42 のアミノ酸残基よりなる $A\beta_{1-40}$ ($A\beta_{40}$) と $A\beta_{1-42}$ ($A\beta_{42}$) により構成される [1]。 $A\beta_{42}$ は $A\beta_{40}$ に比べ産生比は低いものの、より高い凝集能と強力な神経毒性を有することから、AD の病態形成に特に重要であると考えられている。アミロイド仮説は、① $A\beta$ 分子種のうち高い凝集能と神経毒性を有する $A\beta_{42}$ の産生亢進が家族性 AD の原因となること、② $A\beta$ の産生減少を誘導する家族性変異は AD 発症を遅延すること [2]、③ $A\beta$ の凝集中間体であるオリゴマーがシナプス毒性を引き起こすことなどから強く支持されている。しかしながら、 $A\beta$ が本疾患の原因であることを示す決定的な証拠は未だ得られていない。

$A\beta$ は random coil 構造あるいは α -helix 構造を中心に存在し、 β -sheet 構造への転移を経て凝集し、アミロイド線維を形成することが知られている [3, 4]。一方、 $A\beta$ は凝集体による神経毒性やシナプス毒性のみならず、むしろ単量体では神経活動賦活作用、免疫機能調節作用などの多様な作用を有することも近年明らかとなってきている [5, 6]。このような $A\beta$ の作用の多様性は、 $A\beta$ の立体構造の多様性に起因すると考えられ、AD における $A\beta$ の病理的機能を解明するためには、毒性を発現する立体

構造に着目することが必要である。本稿では、 $A\beta_{42}$ の毒性発現と立体構造の関係について説明する。

2. $A\beta$ の立体構造におけるターン構造の重要性

$A\beta_{42}$ は多様な立体構造を有することから、X 線構造解析や NMR などによる立体構造の解析が非常に困難であった [7, 8]。しかしながら、AD 病態の進行や神経毒性発現に重要な立体構造を明らかにすることは、その治療法や診断法を開発するうえで重要な意義をもつ。以前、Williams らは、プロリン残基が β -sheet 構造をとりにくく、ターン構造を形成しやすいことを利用して、 $A\beta_{40}$ の凝集と関連する分子内ターン構造について明らかにした [9]。これに対し我々の研究グループは、AD 病態との強い関連性が疑われる $A\beta_{42}$ におけるターン構造について同様に解析した。すなわち、 $A\beta_{42}$ のアミノ酸残基を系統的にプロリン置換した変異体を合成し、Glu22-Asp23 付近にターン構造を形成しやすい E22P- $A\beta_{42}$ と Gly25-Ser26 付近にターン構造を形成しやすい G25P- $A\beta_{42}$ が熱力学的に安定であることを示した [10, 11]。また、野生型 $A\beta_{42}$ (Wt- $A\beta_{42}$) の凝集体に対して固体 NMR 法を用いた立体構造解析を行ったところ、Glu22-Asp23 付近においてターン構造を有するコンホマー、および Gly25-Ser26 付近においてターン構造を有するコンホマーが含まれることが明らかとなった [11]。さらに、E22P- $A\beta_{42}$ は、高い凝集能と PC12 細胞に対する強力な毒性を示したのに対し、G25P- $A\beta_{42}$ の凝集能は低く、また細胞毒性をほとんど示さなかった [10, 11]。以上の知見から、 $A\beta_{42}$ の多様な立体構造のうち、Glu22-Asp23 付近においてターン構造を有するコンホマー、および Gly25-Ser26 付近においてターン構造を有するコンホマーは、AD 病態における老人斑の形成に何らかの役割を担っている可能性が示唆され、特に前者のコンホマーは神経毒性に関与していることが想定される。遺伝性 $A\beta_{42}$ 変異 (Dutch, Italian, Arctic, Iowa, Osaka 家系) が、22-23 番目に集中していることも上記の仮説を支持している。そこで我々は、Glu22-Asp23 付近においてターン構造を有するコンホマーを「毒性コンホマー」、Gly25-Ser26 付近においてターン構造を有するコンホマーを「非毒性コンホマー」とそれぞれ名付けた (図 1 B) [11, 12]。

これまでに $A\beta_{42}$ の凝集および毒性発現についてラジカル化反応の関与が指摘されており、特に 10 番目のチ

連絡先：泉尾直孝 〒260-8670

千葉県千葉市中央区亥鼻 1-8-1

TEL：043-222-7171 (内線 7947)

FAX：043-226-2095

E-mail：ntk.izuo@chiba-u.jp

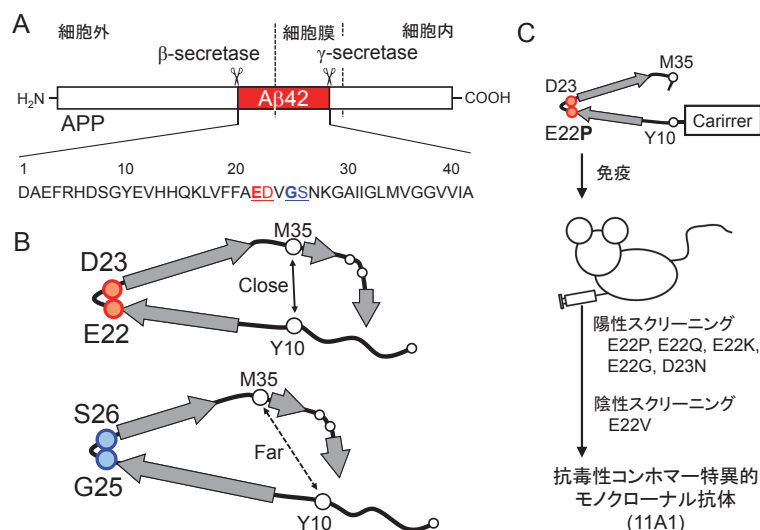


Fig. 1 Aβ42 の毒性コンホマー. (A) Aβ42 の産生とアミノ酸配列. (B) Aβ42 の毒性コンホマー (上) および非毒性コンホマー (下) (文献 [11] の図を改変). (C) 抗毒性コンホマー特異的抗体の作製.

ロシン残基および 35 番目のメチオニン残基のラジカル化が重要と考えられている [13, 14]。そこで、本ラジカル化ならびに、Aβ42 の凝集および毒性発現に対するターン構造の位置の関与について、Tyr10 および Met35 に着目して解析した。Tyr10 および Met35 の側鎖は酸化され、それぞれフェノキシラジカルおよび硫黄ラジカルを産生する。我々は、10 位のチロシンをフェニルアラニンに、35 位のメチオニンをノルバリンに置換した変異体 (Y10F- Aβ42 および M35N- Aβ42) をそれぞれ合成しラジカル化を抑制したところ、Aβ42 の凝集および毒性発現が抑制された [15, 16]。さらに、E22P-Aβ42 の Tyr10 および Met35 にスピラベルを導入し、これらの空間距離を電子スピン共鳴法により測定したところ、両残基の距離はラジカル転移反応が十分起こりうる 15 Å 以下の距離にあることが判明した [16, 17]。以上の結果より、Aβ42 の 22, 23 番目付近においてターン構造を有する毒性コンホマーでは、Tyr10 と Met35 の距離が近接しており、ラジカル供与反応を介して凝集および毒性発現を誘起するものと考えられる。

3. Aβ の毒性コンホマーに対する立体構造特異的抗体の開発

AD 病態における Aβ42 の毒性コンホマーの役割について詳細な検討を可能にするため、Aβ42 の毒性コンホマーを標的とした立体構造特異抗体の作製を試みた。Aβ42 の毒性発現に重要である Tyr10-Met35 領域に、Glu22 をプロリンに置換することでターン構造形成を誘導した部分ペプチド (E22P-Aβ10-35) をキャリアタンパク質に結合し、BALB/c マウスを免疫した (図 1C) [18]。得られた 45 のクローンのうち、ターン構造を形成しやすい E22P-Aβ42、E22Q-Aβ42 (Dutch 変異)、E22G-Aβ42 (Arctic 変異)、E22K-Aβ42 (Italian 変異)、

D23N-Aβ42 (Iowa 変異) に反応する 7 つのクローンを選別し、さらにターン構造を形成しにくい E22V-Aβ42 に対する反応性が低い 11A1 を、毒性コンホマー選択的なモノクローナル抗体として選別した (図 1B) [18]。11A1 は、AD 患者剖検脳の海馬切片および AD モデルマウスである Tg2576 系統の脳切片に対する免疫組織化学染色において、細胞外に存在する老人斑を認識した [18]。興味深いことに 11A1 は、AD 患者剖検脳の海馬神経細胞の内部、さらには AD 患者由来 iPS 細胞から分化誘導した神経細胞の内部においても染色性を示した [18, 19]。これらの知見から、Aβ42 の毒性コンホマーが AD 患者の脳内において増加していることが明らかとなり、さらに神経細胞内部においても蓄積していることが示唆される。

4. 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 の毒性コンホマーが神経細胞に与える作用を明らかにするため、ラット由来の初代培養大脳皮質神経細胞を用いて、神経毒性を 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay により、細胞内酸化ストレスを 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) assay により評価した。E22P-Aβ42 を毒性コンホマーの構造模倣体として用いたところ、5-20 μM の濃度で野生型 Aβ42 (Wt-Aβ42) よりも強力な神経毒性 (図 2A) および細胞内酸化ストレス上昇を示した [20]。また、Wt-Aβ42 (20 μM) は処置後 24 時間から酸化ストレスの上昇および 36 時間から神経毒性 (図 2A) を発現したのに対し、E22P-Aβ42 (20 μM) は処置後 4 時間から酸化ストレスの上昇および 8 時間から神経毒性 (図 2A) を発現した [20]。Wt-Aβ42 および E22P-Aβ42 における毒性コンホマーの形成について調べるため、Aβ42 (20 μM)

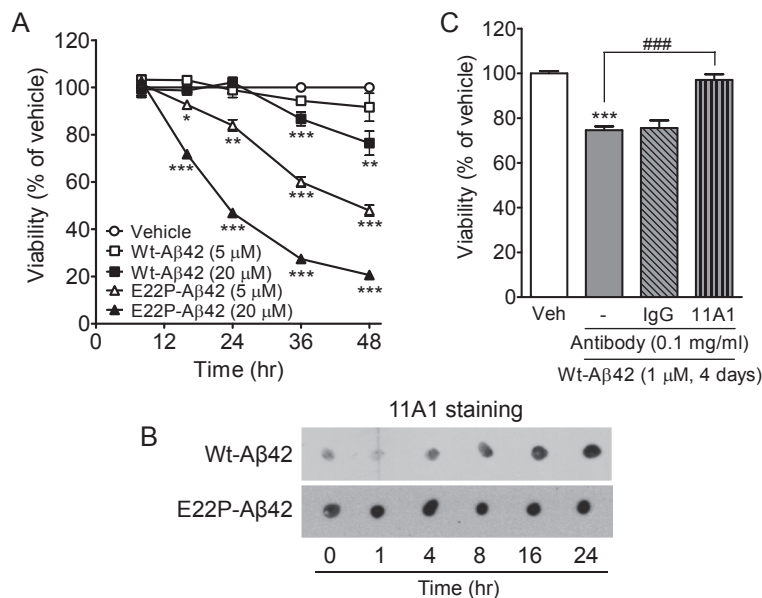


Fig. 2 Aβ42 誘発神経毒性における毒性コンホマー形成の重要性. (A) Wt-Aβ42 および E22P-Aβ42 の初代培養神経細胞に対する毒性. *, p < 0.05, **, p < 0.01, ***, P < 0.001 vs veh. (B) Aβ42 溶液における毒性コンホマーの形成. (C) 毒性コンホマーの中和除去が初代培養神経細胞における Aβ42 誘発毒性に与える影響. ***, P < 0.001 vs veh; ###, p < 0.001.

溶液中の毒性コンホマーを、11A1 を用いて継時的に検出した。Wt-Aβ42 では 4-24 時間にかけて 11A1 の免疫反応性が増加したのに対し、毒性コンホマー模倣体である E22P-Aβ42 においては Aβ42 の溶解時である 0 時間の時点で高い免疫反応性を示した (図 2B) [20]。これらの結果より、Aβ42 が自発的に毒性コンホマーを形成することが、細胞内酸化ストレスの上昇および神経毒性に先行して起こることが明らかとなった。さらに、11A1 を Aβ42 の毒性コンホマーに対する中和抗体として用いたところ、初代培養神経細胞における Wt-Aβ42 および E22P-Aβ42 誘発神経毒性を完全に抑制した (図 2C) [21]。以上のことから、Aβ42 の神経毒性の発現には、毒性コンホマーの形成が重要であることが示唆される。

次に Aβ42 の遺伝性変異体における毒性コンホマーの役割について解析した。遺伝性の脳血管性アミロイドシスの原因変異であり Italian 型変異体と知られる E22K-Aβ42 [22]、および家族性の若年性アルツハイマー病の原因変異であり Arctic 型変異体として知られる E22G-Aβ42 [23, 24] に対して、11A1 を用いたドットプロットを行ったところ、毒性コンホマーの形成が確認された [20]。さらにこれらの遺伝性変異 Aβ42 は、強力な神経毒性および細胞内酸化ストレスの上昇を示した [20]。以上の結果より、遺伝性変異 Aβ42 の毒性発現においても毒性コンホマーが重要であることが示唆される。

5. Aβ42 誘発神経毒性における非毒性コンホマーの作用

AD 患者の脳内には、毒性コンホマー以外にも様々

な Aβ42 のコンホマーが存在すると考えられる。そこで、Gly25-Ser26 付近においてターン構造を有するコンホマーである「非毒性コンホマー」に着目し、G25P-Aβ42 を構造模倣体としてその作用を検討した。Aβ42 の凝集を thioflavin T assay を用いて評価したところ、G25P-Aβ42 は単独では凝集を示さず、さらに G25P-Aβ42 の Wt-Aβ42 への添加は Wt-Aβ42 の凝集を抑制した [21]。また、G25P-Aβ42 は単独では初代培養神経細胞に対して毒性を発現しないが、G25P-Aβ42 を Wt-Aβ42 へ添加することで、Wt-Aβ42 により誘発される神経毒性を抑制した (図 3) [21]。この結果は、Aβ42 の非毒性コンホマーは Aβ

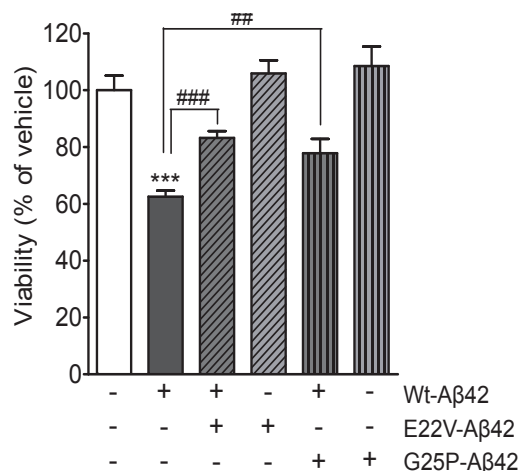


Fig. 3 初代培養神経細胞における Aβ42 誘発毒性に対する G25P-Aβ42 および E22V-Aβ42 の保護作用. 各種 Aβ42 は、10 μM の濃度で 48 時間処置した. ***, P < 0.001 vs veh; ##, p < 0.01; ###, p < 0.001.

42 の凝集および神経毒性に抑制的な機能を有することを示している。さらに、Glu22-Asp23 付近においてターン構造の形成しにくい変異体である E22V-A β 42 を用いて同様の解析を行ったところ、強力な凝集および神経毒性の抑制作用を示した (図 3) [21]。これらの結果から、A β 42 の凝集および神経毒性の発現に重要である毒性コンホマーは、他のコンホマーと相互作用することでその機能が抑制されていることが示唆される。

6. おわりに

本研究では、A β 42 の多様な立体構造の中から、A β 42 の凝集および毒性発現に重要である「毒性コンホマー」および「非毒性コンホマー」を同定した。さらに毒性コンホマーに対する立体構造選択的なモノクローナル抗体を開発することで、毒性コンホマーが AD 患者脳内に存在することが明らかとなった。A β 42 の毒性コンホマーは、その強力な神経毒性およびシナプス毒性 [25] から AD 病態形成への中心的関与が示唆され、また一方、非毒性コンホマーは A β 42 の凝集および神経毒性を抑制することから、毒性コンホマーと非毒性コンホマーの存在バランスの破綻が病態形成の引き金となることも想定される (図 4)。今後、AD モデルマウスや AD 患者由来の iPS 細胞を用いた詳細な検討を行い、この仮説を検証する必要がある。AD の発症は食事や運動などの生活習慣の影響を強く受けることが知られており [26, 27]、特に生活習慣病などに惹起される全身性の慢性的な炎症状態は脳内環境を変化させ、アミロイド沈着を促進することが報告されている [28, 29]。こういった生活習慣に連動した脳内環境の変化にตอบสนองして、A β 42 の毒性コンホマーおよび非毒性コンホマーのバランスが変化し、AD

の発症リスクが変動するのかもしれない (図 4)。

近年、A β の除去を目的とした抗 A β 抗体による受動免疫療法の臨床試験が相次いで失敗に終わった [30, 31]。これについては様々な原因が考察されているが、非特異的な A β 42 の除去により、毒性コンホマーの除去が不十分であった可能性、および AD 病態進行に抑制的な非毒性コンホマーの機能が失われた可能性も考えられる。毒性コンホマーを特異的に認識する抗体は、有効な AD 治療および診断の標的になりうると考えられ、現在その有効性について AD モデルマウスを用いて検証実験を行っている。また毒性コンホマーの形成阻害薬あるいは非毒性コンホマー構造模倣薬も新規の AD 治療戦略として期待される。

7. 謝辞

本研究は、JSPS 科研費 21248015, 26221202 の助成を受けたものです。

1. Haas, C., and Selkoe, D. J. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide. *Net. Rev. Mol. Cell Biol.* 8:101-112, 2007.
2. Jonsson, T., Atwal, J. K. et al. *Nature* 488:96-99, 2012.
3. Tomaselli, S., Esposito, V. et al. The alpha-to-beta conformational transition of Alzheimer's A β 42 peptide in aqueous media is reversible: a step by step conformational analysis suggests the location of beta conformation seeding. *ChemBioChem* 7: 257-267, 2006.

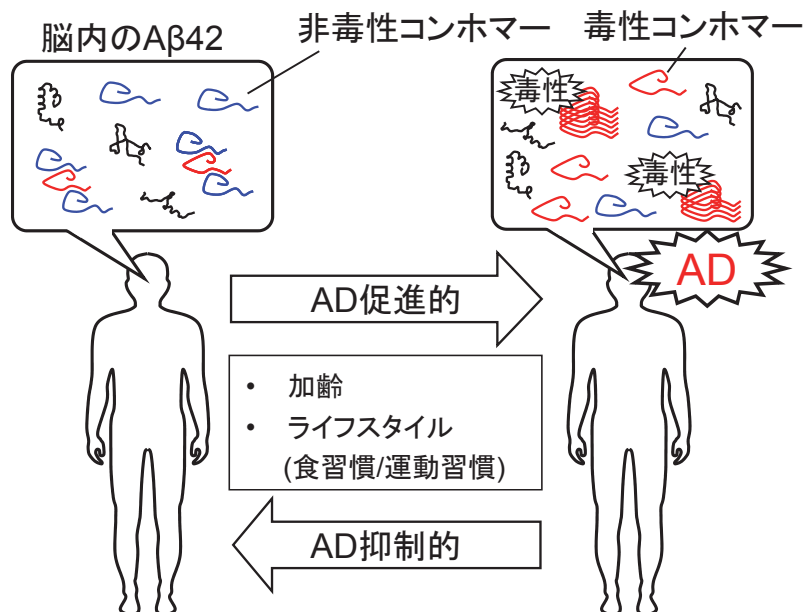


Fig. 4 A β 42 コンホマーの平衡破綻と AD 発症の関連図 (作業仮説)。生理的条件下においては、A β 42 の非毒性コンホマーが毒性コンホマーと相互作用し、毒性コンホマーによる毒性発現を抑制すると考えられる。加齢などの AD 発症の危険因子は脳内環境を変化させ、毒性コンホマーの凝集および毒性が増大し、AD 病態が進行すると想定される。

4. Ohnishi, S., and Takano, K. Amyloid fibrils from the viewpoint of protein folding. *Cell Mol. Life Sci.* 61: 511-24, 2004.
5. Puzzo, D., Privitera, L. et al. Picomolar amyloid-beta positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus. *J. Neurosci.* 28: 14537-14545, 2008.
6. Soscia, S. J., Kirby, J. E. et al. The Alzheimer's disease-associated amyloid beta-protein is an antimicrobial peptide. *PLoS One* 5: e9505, 2010.
7. Irie, K., Murakami, K. et al. Structure of beta-amyloid fibrils and its relevance to their neurotoxicity: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J. Biosci. Bioeng.* 99: 437-447, 2005.
8. Tycko, R. Amyloid Polymorphism: Structure Basis and Neurobiological Relevance. *Neuron* 86: 632-645, 2015.
9. Williams, A. D., Portelius, E. et al., Mapping abeta amyloid fibril secondary structure using scanning proline mutagenesis. *J. Mol. Biol.* 335: 833-842, 2004.
10. Morimoto, A., Irie, K., et al. Analysis of the secondary structure of beta-amyloid (A β 42) fibrils by systematic proline replacement. *J Biol. Chem.* 279: 52781-52788, 2004.
11. Masuda, Y., Uemura, S. et al. Identification of physiological and toxic conformations in A β 42 aggregates. *ChemBioChem* 26: 287-95, 2009.
12. Murakami, K., Masuda, Y., et al. The turn formation at positions 22 and 23 in the 42-mer amyloid beta peptide: the emerging role in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Geriatr. Gerontol. Int.* 10 Suppl 1: S169-79, 2010.
13. Barnham, K. J., Masters, C. L. et al. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3: 205-214, 2004.
14. Butterfield, D. A. Amyloid beta-peptide [1-42]-associated free radical-induced oxidative stress and neurodegeneration in Alzheimer's disease brain: mechanisms and consequences. *Curr. Med. Chem.* 10: 2651-2659, 2003.
15. Murakami, K. Irie, K. et al. Formation and stabilization model of the 42-mer A β radical: implications for the long-lasting oxidative stress in Alzheimer's disease. *J. Am. Chem. Soc.* 127: 15168-15174, 2005.
16. 村上一馬, 清水孝彦ら アミロイド β (A β 42)の毒性コンホメーションの提唱, 基礎老化研究 32: 25-29, 2008.
17. Murakami, K., Hara, H., et al. Distance measurement between Tyr10 and Met35 in amyloid beta by site-directed spin-labeling ESR spectroscopy: implications for the stronger neurotoxicity of A β 42 than A β 40. *ChemBioChem* 8: 2308-2314, 2007.
18. Murakami, K., Horikoshi-Sakuraba, Y. et al. Monoclonal Antibody Against the Turn of the 42-Residue Amyloid β -Protein at Positions 22 and 23. *ACS Chem Neurosci.* 1: 747-756, 2010.
19. Kondo, T., and Asai, M. et al. Modeling Alzheimer's disease with iPSCs reveals stress phenotypes associated with intracellular A β and differential drug responsiveness. *Cell Stem Cell* 12: 487-496, 2013.
20. Izuo, N., Kume, T. et al. Toxicity in rat primary neurons through the cellular oxidative stress induced by the turn formation at positions 22 and 23 of A β 42. *ACS Chem Neurosci.* 3: 674-681, 2012.
21. Izuo, N., Murakami, K. et al. Non-toxic conformer of amyloid β may suppress amyloid β -induced toxicity in rat primary neurons: implications for a novel therapeutic strategy for Alzheimer's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 438: 1-5, 2013.
22. Bugiani, O., Giaccone, G. et al. Hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis associated with the E693K mutation of APP. *Arch. Neurol.* 67: 987-995, 2010.
23. Nilsberth, C., Westlind-Danielsson, A. et al. The 'Arctic' APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced A β protofibril formation. *Nat. Neurosci.* 4: 887-893, 2001.
24. Kamino, K., Orr, H. T. et al. Linkage and mutational analysis of familial Alzheimer disease kindreds for the APP gene region. *Am. J. Hum. Genet.* 51, 998-1014.
25. Suzuki, T., Murakami, K. et al. E22 Δ Mutation in Amyloid β -Protein Promotes β -Sheet Transformation, Radical Production, and Synaptotoxicity, But Not Neurotoxicity. *Int. J. Alzheimers Dis.* 2011: 431320, 2010.
26. Biessels, G. J., Staekenborg, S., et al., Risk of dementia in diabetes mellitus: a systematic review. *Lancet Neurol.* 5: 64-74, 2006.
27. Erickson, K. I., Weinstein, A. M., et al., Physical activity, brain plasticity, and Alzheimer's disease. *Arch. Med. Res.* 43: 615-621, 2012.
28. Matsuzaki, T., Sasaki, K., et al., Insulin resistance is associated with the pathology of Alzheimer disease: the Hisayama study. *Neurology* 75: 764-770, 2010.
29. Takeda, S., Sato, N., et al., Diabetes-accelerated memory dysfunction via cerebrovascular inflammation and A β deposition in an Alzheimer mouse model with diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 107: 7036-7041, 2010.
30. Doody, R. S., Thomas, R. G. et al. Phase 3 trials

of solanezumab for mild-to-moderate Alzheimer's disease. N. Engl. J. Med. 370 : 311-321, 2014.

31. Salloway, S., Sperling, R. et al. Two phase 3 trials

of bapineuzumab in mild-to-moderate Alzheimer's disease. N. Engl. J. Med. 370 : 322-333, 2014.