

学 位 論 文 題 名

老人斑アミロイドに存在する80kDa 抗原の解析

学位論文内容の要旨

1. はじめに

老人斑はアルツハイマー病（AD）の代表的な病理変化の一つであり、これまでに様々な側面から膨大な研究がなされてきた。近年アミロイドの主要な構成成分として $\beta/A4$ 蛋白が同定され、 $\beta/A4$ 蛋白の沈着にはじまる一連の過程によって、ADの主な病理変化が統一的に説明できると考えられるようになった。しかしその詳細については明らかではなく、解決すべき問題も多く残されている。一方、アミロイドは $\beta/A4$ 蛋白だけから構成されているのではなく、それ以外にもいくつかの蛋白や酵素が存在することが報告されている。これらの成分は老人斑の形成に関与していると推測されているが、詳しい役割については不明のままである。したがって老人斑アミロイドに関与する新しい成分とその役割を知ることは、老人斑の形成過程を明らかにする上で重要な手がかりを与えるものと考えられる。

このような立場から我々は老人斑アミロイドのより多くの構成成分を明らかにするために、老人斑を認識するモノクローナル抗体(mcAb)を樹立し、抗体が認識するエピトープの解析を行ってきた。本研究では、老人斑アミロイドに80kDaの蛋白が存在し、その蛋白を同定したところSP-40, 40であることが明らかになったので、その意義について考察を加え報告した。

2. 方 法

1) モノクローナル抗体：AD患者脳の脳ホモジネートあるいは粗精製したアミロイドを免疫原として、老人斑アミロイドあるいは老人斑関連構造物を認識する12クローンのマウス mcAb を樹立し実験に用いた。

2) 反応抗原の検索、精製、同定：脳ホモジネートあるいは正常ヒト血漿蛋白（NHP）と、mcAb との反応をウエスタンブロッティングで検討した。エピトープが判明していなかった抗体のうち、2つの抗体が脳ホモジネートおよびNHPの成分と反応した。そこで、NHPを用いて反応抗原の精製を行った。

NHP をポリエチレングリコール #4000 (PEG) を使って分画し、反応抗原を多く含む分画を選択した。次に反応抗体含有 IgG を結合させた免疫アフィニティーカラムを作成した。PEG 反応分画を循環させて反応抗原を特異的に吸着させ、3 M チオシアン化ナトリウム加 PBS で溶出させた。溶出液中の抗原蛋白についてダイレクト・マイクロシーケンスを行い、N 末端からのアミノ酸配列を分析した。さらに蛋白質データベースを検索して、既知の蛋白質のアミノ酸配列との相同性を調べた。

3) 免疫組織学的検討: AD, アルツハイマー型老年痴呆 (SDAT), 成人ダウン症, グァム・パーキンソンデメンチアコンプレックス, 正常対照の脳皮質凍結切片を用いて、関節蛍光抗体法による蛍光染色を行った。

3. 結 果

1) 脳ホモジネートならびに NHP との反応: これまでエピトープが明らかでなかった抗体のうちの 2 つの抗体 (Az 172/4, Az 520/3) がともに、非還元条件下の脳ホモジネートおよび NHP の分子量約 80kDa の抗原と反応していた。脳ホモジネートにおける反応抗原は、NHP に比べやや移動度が大きかったが、疾患による量的、あるいは質的な相違は明らかではなかった。

2) 反応抗原の精製, 同定: PEG を使った NHP の分画では、5~15% 分画に反応抗原が存在していた。この分画を用いて、反応する mcAb Az 172/4 を結合させた免疫アフィニティーカラムにより精製を行った。アフィニティー精製された反応抗原は、非還元状態では分子量約 80kDa 付近にやや幅の広い単一のバンドとして、還元すると約 40kDa の 3~4 本のバンドとして検出された。次にアフィニティーカラムからの溶出液を還元条件下で電気泳動し、ダイレクトマイクロシーケンスを行った。その結果 N 末端から順にほぼ等量の 2 つずつのアミノ酸が同定され、ヘテロな 2 つのコンポーネントの存在が明らかになった。蛋白質データベースにより検索したところ、正常ヒト血漿蛋白である SP-40, 40 のアミノ酸配列と完全に一致していた。

3) 免疫組織学的検討: SP-40, 40 を認識する抗体による免疫染色では、AD や SDAT の全例の脳において種々の形態のアミロイド沈着構造物が染色された。慢性老人斑, アロミロド・アンギオパチーでは陽性率は低く、定型的老人斑ほど陽性率が高かった。また、背景となる組織が広範かつ瀰漫性に染色されていた。連続切片を用いた検討では、抗 GFAP 抗体で陽性となる老人斑周囲の星状膠細胞が抗 SP-40, 40 抗体によっても同様に染色された。しかし、対照脳では背景の組織を含めて全く染色はみられなかった。

4. 考 察:

以上の結果から、老人斑アミロイドに SP-40, 40 が存在すること、SP-40, 40 は AD や SDAT 脳において星状膠細胞で蛋白として発現されることが明らかとなった。また、初期病変とみなされる瀰漫性老人斑では陽性率が低いものの老人斑アミロイドの集塊が形成されるにつれてアミロイド斑に強く局在しており、SP-40, 40 は老人斑形成に密接に関与していることが示唆された。

SP-40, 40 は動物種を越えて極めてよく保存された、生体にとって不可欠な多機能蛋白であると考えられている。老人斑形成との関係では、補体系の活性化と制御に関する役割と、細胞傷害の際に組織修復に関する役割の 2 つの機能が注目される。

老人斑アミロイドには補体の古典的経路に属する C1q, C3, C4 などの存在が指摘されており、SP-40, 40 は活性化された補体系の制御のために出現している可能性がまず考えられる。

第 2 に、細胞傷害、あるいは細胞死によって引き起こされる組織修復の過程で出現する可能性が挙げられる。中枢神経系などにおける細胞の変性や細胞死に際し、病変局所で SP-40, 40 が発現されるという知見が集積されており、組織損傷や細胞死の鋭敏な指標となり修復機転の発動を促すと想定されている。

このように SP-40, 40 は、老人斑形成と細胞傷害・細胞死という AD 脳における 2 つの主要な現象のいずれにも関与している可能性があり、AD 病変成立に重要な役割を担っていると考えられる。さらに詳細な発現機構を明らかにして行くことは、AD の病理過程を理解する上で多くの示唆を与えるものと考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 山 下 格

副 査 教 授 石 橋 輝 雄

副 査 教 授 西 信 三

老人斑はアルツハイマー病 (AD) に特有かつ重要な病変である。すでに老人斑アミロイドの主要構成成分として β /A4 蛋白が同定されているが、その他にもいくつかの蛋白や酵素が存在することが報告されている。しかしこれらの成分の役割については不明のままである。老人斑ア

ミロイドに関与する新しい成分とその役割を知ることは、老人斑の形成過程のみならず AD の病因を明らかにする上で重要な手がかりを与えるものと考えられる。そこで我々はアミロイドのより多くの構成成分を明らかにするために、老人斑を認識するモノクローナル抗体 (mcAb) を樹立し、エピトープの解体を行ってきた。本研究では、老人斑アミロイドに 80kDa の蛋白が存在し、その蛋白を同定したところ SP-40, 40 であることが明らかとなり、併せてその意義について考察を加えた。

方法と結果

1) mcAb : AD 患者脳の脳ホモジネートあるいは粗精製したアミロイドを免疫原として、老人斑アミロイドあるいは老人斑関連構造物を認識する 12 クローンのマウス mcAb を樹立し実験に用いた。

2) 反応抗原の検索、精製、同定 : 脳ホモジネートあるいは正常ヒト血漿蛋白 (NHP) と、mcAb との反応を検討したところ、2 つの抗体 (Az 172/4, Az 520/3) が約 80kDa の抗原と反応した。そこで、NHP を用いて反応抗原の精製を行った。NHP を PEG # 4000 を使って分画し、反応抗原を多く含む画分 (5~15%) を選択し、さらに Az 172/4 含有 IgG を結合させた免疫アフィニティーカラムで精製した。粗精製された抗原は、非還元状態では分子量約 80 kDa 付近に単一のバンドとして、還元すると約 40kDa の 3~4 本のバンドとして検出された。次に粗精製した抗原蛋白について、N 末端からのアミノ酸配列を分析した。その結果 N 末端から順にはほぼ等量の 2 つずつのアミノ酸が同定され、ヘテロな 2 つのコンポーネントの存在が明らかになった。蛋白質データベースにより検索したところ、正常ヒト血漿蛋白である SP-40, 40 のアミノ酸配列と一致した。

3) 免疫組織学的検討 : AD などの大脳皮質の凍結切片を用いて、間接蛍光抗体法による蛍光染色を行った。SP-40, 40 を認識する抗体によって、種々の形態のアミロイド沈着構造物が染色された。しかしすべての $\beta/A4$ 蛋白沈着を染色するわけではなく、定型的老人斑ほど陽性率が高かった。また、背景となる組織が広範かつ瀰漫性に染色されていた。連続切片を用いた検討では、老人斑周囲の抗 GFAP 抗体陽性星状膠細胞が抗 SP-40, 40 抗体によっても同様に染色された。しかし、対照脳では背景の組織を含めて全く染色はみられなかった。

考察 : 以上の結果から、AD 脳において SP-40, 40 は星状膠細胞で蛋白として発現され、アミロイドの集塊が形成されるにつれて老人斑に強く局在することから、老人斑形成に密接に関与していることが強く示唆された。

SP-40, 40 は動物種を越えて極めてよく保存され、多臓器から発現される、生体にとって不

可欠な多機能蛋白であると考えられている。老人斑形成との関係では以下の2つの機能が注目される。老人斑アミロイドには補体の古典的経路に属するC1q, C3, C4などの補体成分の存在が指摘されており、SP-40, 40は活性化された補体系の制御のために出現している可能性が考えられる。第2に、細胞傷害によって引き起こされる組織修復の過程で出現する可能性が挙げられる。中枢神経系などにおける細胞の変性や細胞死に際し、病変局所でSP-40, 40の発現量が増加するという知見が集積されており、修復機転の発動を促すとも想定されている。

このようにADの脳内で産生されているSP-40, 40は、老人斑形成と細胞傷害・細胞死というAD脳における2つの最も重要な現象のいずれにも関与している可能性があり、ADの病変成立に重要な役割を担っていることが示唆された。

以上の発表に際し各教授より質問を受け回答した。

石橋輝雄教授。1) シークエンシングを行ったのはどのバンドか。-還元条件下で40kDaに見られた数本のバンドである。2) 複数のバンドを一括して分析したのはなぜか。-抗体がそのいずれのバンドとも反応していたためである。3) 脳から抗原を精製・分析したか。-行っていない。4) アミロイドに存在するSP-40, 40は、脳由来、血管由来のいずれと考えられるか。-脳由来と考えられる。

西 信三教授。1) 正常ではこの蛋白はどこで産生されているか。-種々の臓器で発現され分泌されている。2) 対照脳では免疫染色で陽性構造がみられなかったのに、ウエスタンでは抗原が認められているのはなぜか。-実際に脳蛋白中の含有量に差がないのかどうか。調整方法を変えて検討したい。

本研究は、老人斑を認識するmcAbを樹立し、反応抗原を精製して、蛋白成分SP-40, 40の存在を認め、その意義について検討したもので、老人斑形成の機序の解明に寄与するところが大きく、博士の学位に値するものと判定された。