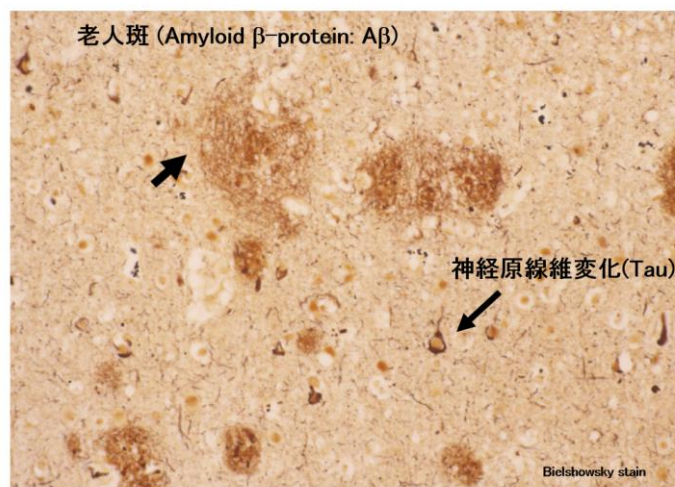


## アルツハイマー病脳に蓄積するアミロイドベータの網羅的解析をイメージングマスマスペクトロメトリー法を用い世界で初めて成功

超高齢化社会を迎えたわが国において、老年期認知症は、極めて重要な国民的課題である。なかでもアルツハイマー病 (Alzheimer's Disease; AD) は、高齢者認知症の主な原因と考えられている。1906年に Alois Alzheimerが最初の症例を報告してから110年が経ち、ADは、高齢者ばかりではなく若年層においても発症する一つの疾患として認められている。AD脳の神経病理像は、1970年代における電子顕微鏡の導入や1980年代の分子レベルでの研究が進んだことにより、明らかになった。なかでもアミロイドベータ ( $A\beta$ ) と呼ばれるペプチドが細胞外に蓄積し老人斑を形成することや、微小管結合タンパク質タウが神経細胞の中で凝集蓄積した神経原線維変化は、ともにADの発症に深くかかわっていると考えられている。この二つの脳内での生化学的イベントが時間経過の中でどのように影響しあってADを発症するのかが研究者たちの中心的な興味であった。現在では、AD脳病理との類似性を指摘されているダウン症患者脳の研究から、老人斑の蓄積が先にあらわれ、神経原線維変化が後に起こっていることが明らかにされている。

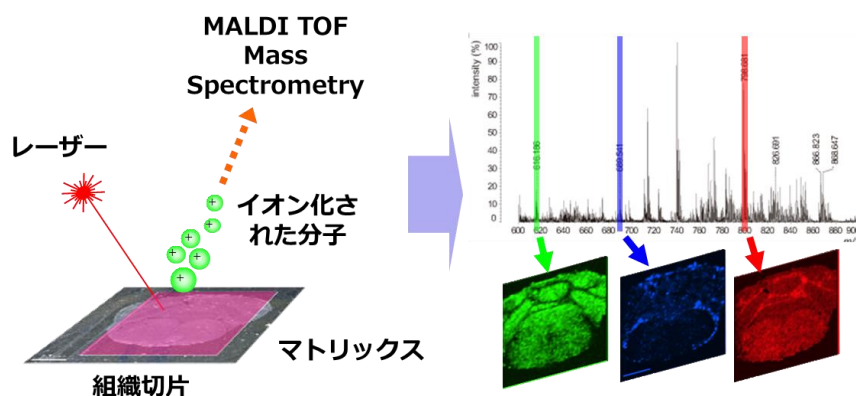
### アルツハイマー病 (AD) の2大脳病理



老人斑は、神経細胞の外に数マイクロメートルから数百マイクロメートルの大きさで脳内にシミのように広がっており、この病変の正体は、いったい何かという問いかけは、ほぼ90年前から始まっている。1920年代後半に、老人斑を主に構成している物質は、アミロイド (でんぷん様物質) と呼ばれるタンパク質であることがわかり、さらに、先述の電子顕微鏡が導入されてから、老人斑の中心にあるのはアミロイドで、ベータシート構造というタンパク質によくある立体構造をもった細い繊維状のものであること、さらに1970年代にはアミロイドとともに様々な物質で構成されていることが判明した。このような病理生化学的研究は、凍結した老人斑のある死後脳をすりつぶし遠心分離機やクロマト

グラフィーを用いて物質を分離精製する手法で繊維などを取り除き純粋なアミロイドだけを取り出し、さらに溶解して分析を重ねるなどのおびただしい実験手技を必要とするが、問題はこのアミロイド物質が強力な試薬にも溶解しない非常に扱いにくい物質であったことである。1984年には、このアミロイドの精製分離が行われ、アミノ酸約40個程度の連なりからなるタンパク質の断片であることとその配列の一部が決定された。この断片のことをアミロイド $\beta$ ペプチド ( $A\beta$ ) と名付け、さらに、この物質はADやダウン症患者脳血管内に蓄積するアミロイドと同じ物質であることも明らかになった。 $A\beta$ は、もっと大きなタンパク質から分解されて生み出されるという仮説のもと、1987年には、アミロイド前駆体タンパク質 (amyloid precursor protein; APP) が単離された。

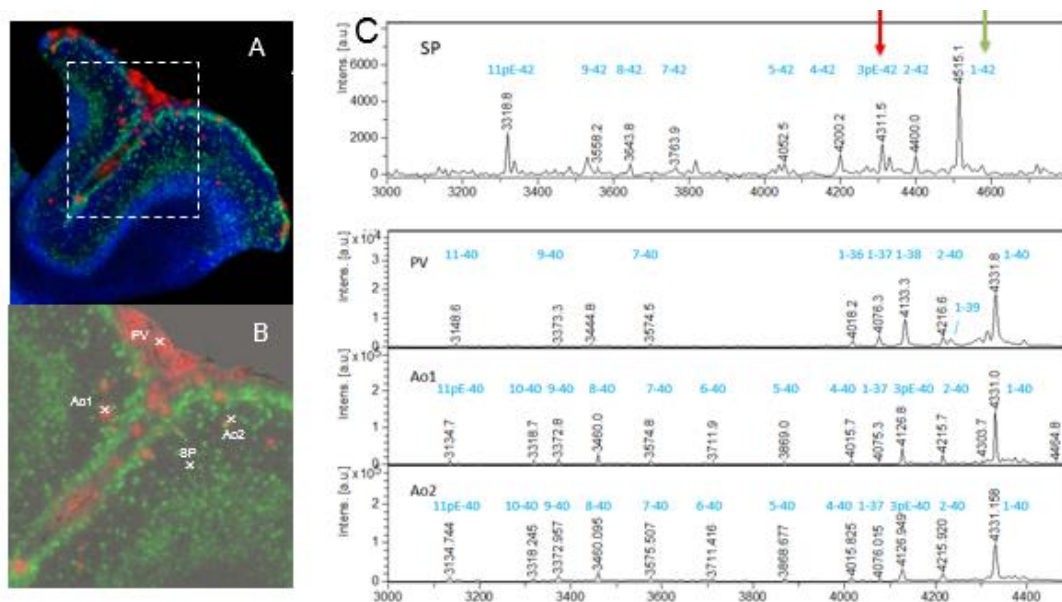
その後、Hardyは、家族性アルツハイマー (Familial AD; FAD) の家系からアミロイド前駆体タンパク質 (APP) の変異を発見し、それをもとにアミロイドカスケード仮説を提唱した。神経細胞で産生されるAPPから $A\beta$ が切り出され神経細胞外に放出されると何らかの理由でこれが神経細胞の周辺に蓄積して老人斑となり、これが神経細胞にダメージを与えるなどの問題を引き起こしシナプスや神経細胞障害がおこり、細胞内部で神経原線維変化、さらに神経細胞の脱落、認知機能の低下を引き起こすという仮説であるが、現在も議論が行われている。井原康夫教授は、これからのAD研究の課題の一つに、アミロイドカスケード仮説の証明を挙げ、これを実現することでアルツハイマー病治療、ひいては認知症治療に大きな進展があるとしている。この仮説は、ヒト脳を対象とした脳病理研究において証明するのが近道と考えられた。



今世紀に入り生命科学への応用のめざましい質量分析法と組織病理学研究を統合したイメージングマススペクトロメトリー (Imaging Mass Spectrometry; IMS) 法は、遺伝子改変マウスなどの疾患モデルを対象とした分子探索の手法として期待されている。一方、IMSは、まさに開発途上の技術であり、特にヒト脳を対象としたタンパク質レベルでのIMSは、難易度も高く、今のところ研究報告例はほとんど見当たらない。われわれは、新しいヒト剖検脳を対象とした病理学的解析手法としてタンパク質レベルでのIMSに注目した。IMSは、通常、組織切片上に存在する物質を直接マトリックス支援レーザー脱離イオン化 (MALDI) 型質量分析計で検出する技術である。IMSにより、それぞれの物質の特定と

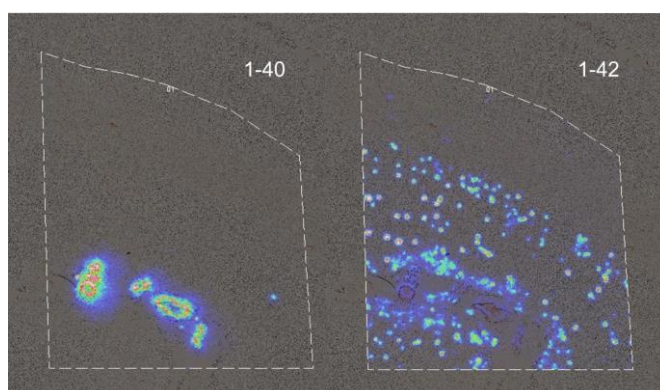
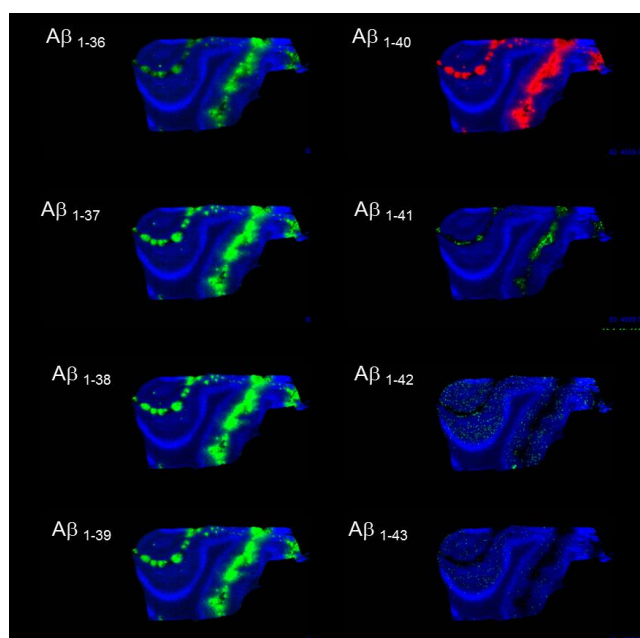
切片上での位置情報を同時に得ることができ、従来の組織・病理学的情報との比較を行うことにより、新しい脳科学研究の戦略を提唱することが可能となる。これまでヒト変異型APPを過剰発現する老齡APP23トランスジェニックマウスは、アルツハイマー病のモデルマウスとして知られている。本マウス脳では大脳皮質を中心に広範なアミロイドプラークを光学画像だけではなく抗体染色においても確認されている。ただしヒト脳内に蓄積するのは、 $A\beta_{1-42}$ であるが、APP23で優位なシグナルは、 $A\beta_{1-40}$ 由来である。これらの事実から、ヒト脳における $A\beta$ の合成や分解についての詳細な分子メカニズム解明をヒト脳において解析することの重要性が示唆される。そこで、われわれは、東京都健康長寿医療センター研究所高齡者ブレインバンク村山繁雄教授らとの共同研究で、ヒトAD脳のIMS法に取り組んだ。

このところ質量分析の技術は長足の進歩を遂げているが、一方で、組織前処理法については、まだまだ開発の余地があるものと考えられた。特に老人斑を形成する $A\beta$ はタンパク質の凝集体で、先述のように、ただでさえ不溶性で扱いにくい物質である。当初、解析対象をマウス脳からヒト脳へ移すことによって生じる技術的問題として、イオン化や組織前処理法において解決すべき課題がたちはだかったが、ブルカー・ダルトクス社の開発した超高速MALDI型質量分析計と、同社 葦澤 崇らとの組織前処理法を新たに独自に開発した（特許取得）ことにより、ヒトAD脳や脳血管にアミロイドの沈着するタイプの脳アミロイド血管症（CAA）をIMS法で解析することに成功した。本研究では、5例のAD脳およびCAA脳と5例の高齡者コントロール脳を対象に老人斑と脳血管への各 $A\beta$ ペプチド分布の結果を網羅的に解析することに成功した。

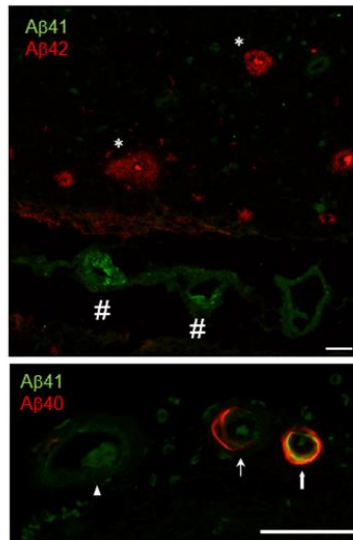


AD 脳の MALDI-IMS の結果。解像度:100 $\mu$ m 下図は、上図破線内の拡大と光学画像の重ね合わせ  
 緑= $A\beta_{1-42}$ , 赤= $A\beta_{1-40}$ , 青= $m/z$  4939.9. 右パネルは、実際の質量分析によって得られたスペクトラ

A $\beta$ には、いくつかのタイプがあることは以前からわかっていたが、主に注目されてきたのは、A $\beta$ 40とA $\beta$ 42であり、とくにA $\beta$ 42は凝集しやすく毒性も強いこと、さらに最近になってA $\beta$ 43もA $\beta$ 42と同様に強い毒性を持つことが報告されていた。これまでのこのような研究は、脳組織や凍結脳から得られたタンパク質抽出液を対象とし抗体を用いた解析に依存してきたため、ペプチド断片の正確な分子量や化学修飾までは正確に判別が困難であった。我々は、IMS法を用い下図に示すように解析対象のA $\beta$ を一挙にアミノ酸一個ずつの違いにまで拡大しそのすべての分子種の脳内分布を明らかにし、新たにA $\beta$ 1-41の存在を突き止め、さらに独自にこの分子を特異的に認識する抗体を用いて、その存在を証明した。また、さらに解像度の良いIMS法によるとA $\beta$ 1-42/43とそれより長さの短いA $\beta$ 1-36, 37, 38, 39, 40, 41は、血管周辺か老人斑か、たった1個のアミノ酸の長さの違いで劇的に分布が異なることが明らかとなった。

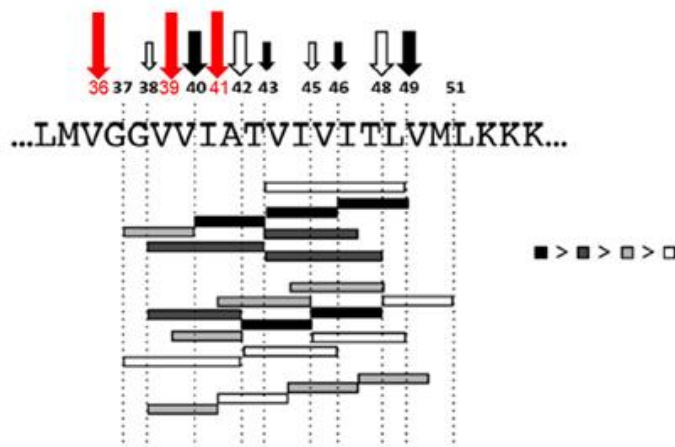


IMS法によるAD/CAA脳内A $\beta$ 1-36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43の脳内局在. パネル上は、100マイクロメートル、パネル下は20マイクロメートルの解像度を示している。



AD脳におけるAβ40, 41, 42の免疫組織化学。Aβ40, 41は、血管、Aβ42は、脳実質内老人斑に蓄積しているIMS法による解析と完全に合致した。

一般にAβは、誰の脳でも産生されている。本研究成果においても、抗体を用いた解析によりコントロールの非病理脳においてもAβ38, 41の血管への蓄積が認められAβ40, 42は、AD脳に特徴的に認められた。井原らは、これまでこのようなアミロイド産生に関して、詳細な生化学的実験を積み重ね、γ-secretaseによる段階的Aβ産生モデルを提唱し、3～4アミノ酸ずつ大きなペプチドから小さなペプチドへと段階的に産生されることや各ペプチドの長さごとの合成系の存在することを提唱していたが、本研究成果により、Aβ1-41の存在を直接証明でき、さらに1アミノ酸ずつ長さの異なるAβの脳内分布を一挙に解明することが出来た。このことは、正常脳からAD脳へと移行する脳神経病理学における課題の証明に大きな糸口となる。



Matsumura et al., JBC VOL. 289, NO. 8, pp. 5109–5121 (2014)を改変

AβのC末端のバリエーション。赤字は、今回の研究成果による。

老人斑を形成することへの危険因子の一つは、加齢であり、 $A\beta$ の産生が上がっているよりは、むしろ分解や排出が滞っている可能性が示唆されてきた。また、孤発性ADのリスク遺伝子であるアポE4は、 $A\beta$ の産生には関わらず、凝集と蓄積を促進することが知られている。今後は、本研究で可能となったIMS法を用いてAD脳の治療や超早期の診断に役立つようなバイオマーカーの探索から予防法への研究、さらに脳疾患全般の病理学研究、とくにタウタンパク質脳病理を理解するための研究を視野に入れて研究開発を継続してゆく予定である。