



酸化ストレスに着目したアミロイド β ペプチドの神経細胞毒性発現機構

京都大学大学院農学研究科食品生物科学専攻 助教 村上 一馬

はじめに

アルツハイマー病 (AD) は、大脳皮質や海馬における神経細胞の脱落を特徴とし、認知機能障害を代表的な症状とする神経変性疾患である。最も初期に現れる病理学的特徴として、老人斑が知られている。老人斑の構成成分であるアミロイド β ペプチド (A β) は、本疾患の原因物質と考えられており、40, 42 残基からなる A β 40, A β 42 が存在する。特に、高い凝集能および細胞毒性を示す A β 42 は、AD 発症に重要な役割を果たしている。近年、準安定な凝集中間体であるオリゴマー (2~4 量体) が毒性本体と考えられるようになり、A β 42 オリゴマーが AD の真の原因物質と推定されている (オリゴマー仮説)。

一方、A β 42 の神経細胞毒性は、酸化ストレスと密接に関係していることが知られている。これまで A β 42 あるいはその凝集体を標的とした治療戦略が世界中で鎬を削って進められてきたが、いまだに根本的な治療法は確立されていない。本演者らは、A β 42 の毒性発現に必要な構造情報を無視した治療戦略をとっていることがその理由の一つと考え、A β 42 の毒性立体構造を明らかにするとともに、その構造特異抗体を開発した。さらに、予防・治療薬の開発に不可欠な動物実験を展開し、酸化ストレスを介したオリゴマー形成による神経細胞毒性発現機構の存在を、AD モデルマウスを用いて明らかにした。本講演では、これらの抗 AD 薬開発を指向した *in vitro* と *in vivo* の両面からの研究成果について紹介させていただきたい。

1. A β 42 のラジカル化を特徴とする神経細胞毒性発現機構の解明—「毒性ターン」構造の同定

これまでの A β 42 に関する研究の大きな問題点として、低純度の A β 42 を用いた実験による研究室間での再現性の低さがあった。そこで本演者らはまず、PEG-PS 樹脂を固相担体とし、カルピノにより開発された強力な活性化剤・HATU を用いた Fmoc 法による固相合成を、連続フロー型合成機で行うこ

とにより、それまで困難であった A β 42 の効率的な高純度合成法を確立した。同時に、A β 42 は中性および弱酸性条件下において凝集しやすいことから、塩基性条件下での精製方法を取り入れた。つづいて本演者らは、 β シート構造を取りにくくターン構造を形成しやすいプロリン残基に着目し、本法を用いて A β 42 の系統的なプロリン置換を行った。これらの凝集能ならびに細胞毒性評価の結果、Glu22 と Asp23 残基付近での「毒性ターン」構造を特徴とする毒性コンホマー仮説を提唱した (図 1)。本知見は、遺伝性 AD の変異の多くが Glu22 と Asp23 残基に集中していることをよく説明できる。

また、種々の A β 42 変異体のラジカル産生能と立体構造との関係を電子スピン共鳴 (ESR) 法で調べた結果、「毒性ターン」の形成によって、A β 42 のラジカル化において重要な Tyr10 と Met35 残基が 15 Å 以内に接近し、両残基間の距離は活性の低い A β 40 に比べて 15~20 Å 近いことがわかった。さらに、A β 42 は C 末端領域で逆平行 β シート構造を形成しやすいことから、生成した Met ラジカルは C 末端カルボキシルアニオンによって安定化されることが示唆された。以上より、平衡反応で一部開裂した C 末端のカルボキシルラジカルが毒性を示すという、A β 42 独自の神経細胞毒性発現機構を提唱した (図 1)。

最近、この毒性ターン構造によって、オリゴマー形成能も増大することが明らかになり、さらに株化された培養細胞 (PC12 細胞) だけでなく、ラット初代培養神経細胞を用いた実験でも同様の結果が得られている。本機構は、A β 42 と A β 40 との間で著しく異なる凝集能および神経細胞毒性の差を分子レベルで初めて明快に説明するものであると同時に、未解明の A β 42 のオリゴマー構造に示唆を与えるものである。

2. 毒性ターン構造特異的なモノクローナル抗体の開発と応用

AD 治療戦略において、A β 42 のワクチン療法や抗体投与による受動免疫療法が有望視されているが、重篤な副作用を示すことがあり、臨床試験は慎重に進められている。当研究グループによる固体 NMR 法を用いた実験より、A β 42 には中央部分のターン部位の違いによって 2 種類のコンホマー (毒性コンホマーと非毒性コンホマー: 図 2A) が存在することが明らかになった。そこで副作用の少ない薬剤開発を目指して、A β 42 の毒性コンホマーのみを標的とした立体構造特異抗体の作製を試みた。ハプテンには、毒性ターン構造をミミック (模倣) した配座固定ペプチド (図 2A) を設計し、22 番目付近でターン構造を取りやすい E22P-A β 42 に対して強く反応し、ターンを取りにくい E22V-A β 42 にはほとんど反応しないモノクローン (11A1 と命名) の取得に成功した。一方、22 番目付近のアミノ酸配列をエピトープとした従来の市販抗体 (4G8) も同様に評価したところ、11A1 とは異なり、E22P-A β 42 にはほとんど反応せず、E22V-A β 42 に対して顕著に結合した。

次に、AD 患者の剖検脳 (海馬ならびに前頭葉領域) を用い

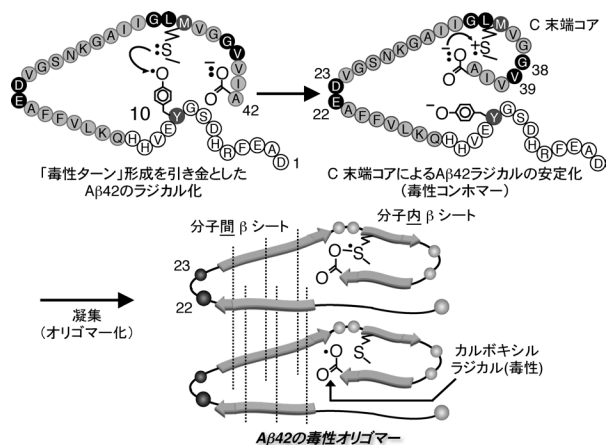


図 1 *In vitro* における A β 42 の神経細胞毒性発現機構ならびに毒性オリゴマーの推定構造

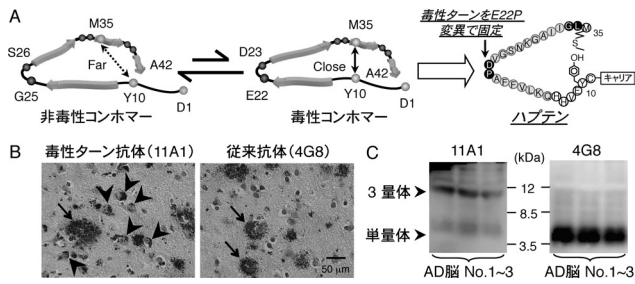


図2 毒性ターンの抗体 (11A1) の (A) 作製戦略ならびに AD 患者脳を用いた (B) 免疫組織染色 (矢頭: 細胞内 A β , 矢印: 細胞外 A β ・老人斑) ならびに (C) ウェスタンブロット

て、11A1 抗体の免疫組織染色実験を行ったところ、4G8 などの従来の市販抗体では染色されない細胞内 A β に対しても 11A1 抗体は反応した (図 2B 矢頭)。また、11A1 抗体は AD 患者脳の抽出物中の A β オリゴマー (3 量体) に対して、強く反応することも明らかになった (図 2C)。近年、AD 発症前に現れる A β オリゴマーは細胞内に多く存在する臨床データが報告されていることから、11A1 抗体は AD 発症の前段階をとらえている可能性がある。ごく最近、11A1 を用いた国内外の複数の研究グループとの共同研究によって、既存抗体では染色が困難とされる細胞内 A β オリゴマーの検出や AD 病態を反映した染色像が報告されており、関連分野の研究者の関心を集めている。以上の結果より、11A1 抗体は有望な AD 治療薬および診断薬になる可能性が高い。

3. 酸化ストレスによる A β 42 の *in vivo* での神経細胞毒性発現機構と機能性食品因子による AD 病態の予防

A β 42 のオリゴマー化は、A β 42 自身が酸化によりラジカル化することが引き金になることが、本演者らの研究によって明らかになった (図 1)。そこで、酸化ストレスに対する修復酵素の一つである CuZn-SOD (細胞質 SOD or SOD1) の欠損マウスと代表的な AD モデルマウス (Tg2576 系統) を交配させることで、AD 病態への酸化ストレスの影響を調べた。SOD1 の欠損マウス自身は、種々の老年病様症状 (加齢黄斑変性、骨粗鬆症、皮膚萎縮、筋萎縮など) を示すことが知られている。その結果、SOD1 が欠損した AD マウスでは脳内の酸化ストレス (細胞質スーパーオキシドラジカル量の亢進など) が増大し、老人斑だけでなく、A β オリゴマー量が顕著に増大した (図 3A)。またオリゴマー量の増大と相関して、空間記憶機能の異常を示す時期が著しく早くなった (図 3B)。興味深いことに、AD 患者の剖検脳抽出物を用いて各種 SOD アイソザイム (SOD1~3) の量を調べたところ、SOD1 のみ非 AD 群に比べて有意に低下していた。本結果は、細胞質における抗酸化機能の低下が AD 発症に関与していることを *in vivo* で初めて実証したものである。

近年、AD は生活習慣病の一種と考えられていること、A β 凝集体の蓄積は 40 代頃から始まることが指摘されていることから、食生活やサプリメントによる AD 予防の必要性が強く望まれている。本演者らは、代表的な抗酸化剤であるビタミン C あるいはマリアアザミに含まれるフラボノイド類であるシリマリ

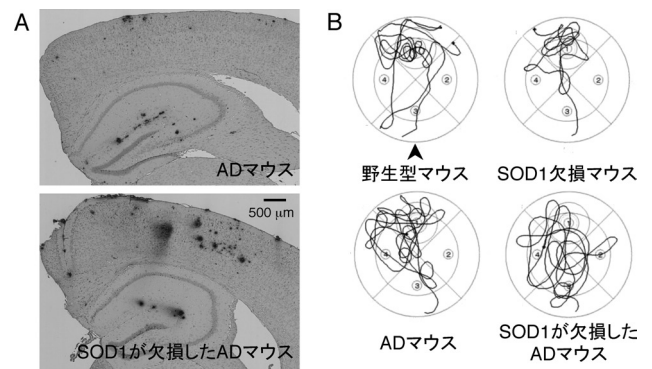


図3 SOD1 が欠損した AD モデルマウスの (A) 老人斑染色、(B) 空間記憶機能テスト

モリス水迷路試験による遊泳の軌跡を示し、矢頭は遊泳の出発地点を指す。SOD1 が欠損した AD マウスは、他の 3 種類のマウス群とは異なり、プール全体に徘徊軌跡が広がっている。

A β 42 のオリゴマー化抑制についての *in vitro* データは数多く報告されているが、動物レベルでの成功例は少ない。

おわりに

現在、AD 治療に向けて多くの薬剤に関する臨床試験が行われているが、そのほとんどが AD 患者を対象とした第 3 相試験ではあまり良好な結果は得られていない。このような状況下、毒性立体構造という独自の視点から開発した抗 A β 「毒性ター」抗体 (11A1) は、停滞している治療開発においてブレークスルーを与える可能性がある。本抗体は、2010 年に国際特許出願され、2012 年 3 月に免疫生物研究所から販売開始された。今後、11A1 抗体を機軸としたさらなる展開が期待される。

謝辞 本研究は、京都大学大学院農学研究科食品生物科学専攻生命有機化学分野ならびに東京都健康長寿医療センター研究所にて行われたものです。本研究を行う機会を与您にいただき、終始ご指導、ご鞭撻をいただきました京都大学教授・入江一浩先生に心より御礼申し上げます。また、学生時代に同分野担当教授としてご指導賜りました大東 肇先生 (現 福井県立大学)、動物実験についてご指導いただきました東京都健康長寿医療センター研究所・清水孝彦先生 (現 千葉大学) に厚く御礼申し上げます。さらに、留学時に A β 研究の新しい方向性について、ご助言賜りました米国カリフォルニア大学ロサンゼルス校・Gal Bitan 先生、豪州メルボルン大学・Kevin J. Barnham 先生に深謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、生命有機化学分野において貴重なご助言をいただきました平井伸博先生および村上 明先生、多大なご協力を賜りました東京都健康長寿医療センター研究所・白澤卓二先生 (現 順天堂大学)、同研究所・村田 央氏、免疫生物研究所・木下憲明博士、同研究所・堀越 (櫻庭) 優子博士、ブルカーバイオスピン・原 英之博士に深く感謝いたします。また、本研究の成果は、増田裕一博士 (現 東北大学)、森本 晃氏をはじめ、生命有機化学分野の卒業生ならびに在学生の努力の賜物であり、共に研究を行っていただいた皆様にも心より感謝申し上げます。最後に、本奨励賞にご推薦くださいました日本農芸化学会関西支部長の京都大学教授・加納健司先生、およびご支援賜りました諸先生方に厚く御礼申し上げます。