

## アルツハイマー病の分子病態

～特にアミロイドβ蛋白を中心に～

玉岡 晃

筑波大学医学医療系神経内科学

## Pathogenesis of Alzheimer's Disease with Special Reference to Amyloid β Protein

Akira Tamaoka

Department of Neurology, Faculty of Medicine, University of Tsukuba

## 1. はじめに

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease; AD) は認知症の原因疾患の中で最も頻度が高く、潜行性に発症し、緩徐に進行する原因不明の神経変性疾患である。ADの神経病理学的な特徴は、海馬や大脳皮質の萎縮が見られ、顕微鏡的には神経細胞の脱落、老人斑や神経原線維変化の沈着が広範に認められる点である。老人斑や神経原線維変化の主要構成成分としては、アミロイドβ蛋白 (amyloid β protein; Aβ) と高度にリン酸化されたタウ蛋白がそれぞれ同定されている。以下のような知見によりAβの脳内沈着はADの発症機序においてタウよりも上流に位置し、ADの病因により密接に関連した現象であろうと推測されている。すなわち、①Aβ沈着である老人斑は神経原線維変化に比べてADに対する疾患特異性が高いこと、②主に非線維性のAβ沈着である瀰漫性老人斑はAD脳の最初期病変であること、③常染色体性優性遺伝形式をとる家族性ADのなかに、Aβ前駆体 (amyloid precursor protein; APP) の点突然変異や重複が疾患と連鎖して見出されていること、④Aβ、特に重合したAβ凝集体が神経毒性を有すること、などである。このAβを中心に据えたAD発症機構に関する仮説はアミロイドカスケード仮説<sup>1</sup>と呼ばれている。アミロイドカスケード仮説を基盤とした治療法(βセクレターゼ阻害薬、γセクレターゼ阻害薬、αセク

レターゼやAβ分解酵素の活性化、Aβ免疫療法、Aβ凝集阻害薬、抗炎症薬、神経細胞保護薬など)の開発が進められているが、最近では、老人斑などとして沈着した高度に重合したAβではなく、少量が重合した可溶性Aβオリゴマーが主要な病因関連物質と考えられており、これに対する治療(Aβオリゴマー特異的モノクローナル抗体など)も研究開発されている。本稿では、ADの病態におけるAβオリゴマーの病因的意義を中心に、最近の知見を紹介する。

## 2. Aβの構造と凝集

APPは細胞膜受容体類似の糖蛋白で、I型の1回膜貫通型膜蛋白であり、AβはAPPの細胞膜貫通部分から細胞外領域の一部にかけて位置している。1992年Shojiら<sup>2</sup>、Haassら<sup>3</sup>によって相次いで可溶性のAβが発見されたため、これがいかにして不溶化し沈着するかが問題となってきた。1993年、Jarrettら<sup>4</sup>は合成Aβペプチドを用いた重合実験により、C末端が42(43)位で終わるAβ42(43)はC末端が40位で終わるAβ40よりもきわめて凝集しやすく、いったんAβ42(43)が凝集するとそれが核となり、Aβ42(43)のみならずAβ40も重合が促進されていくという現象を見出した。このことが契機となって、ADの発症機序におけるAβ分子種の意義に関する研究が飛躍的に進展した。すなわち、Aβ、特にC末端の長いAβ42やAβ43(long Aβ)の脳内蓄積がADの発症機構における

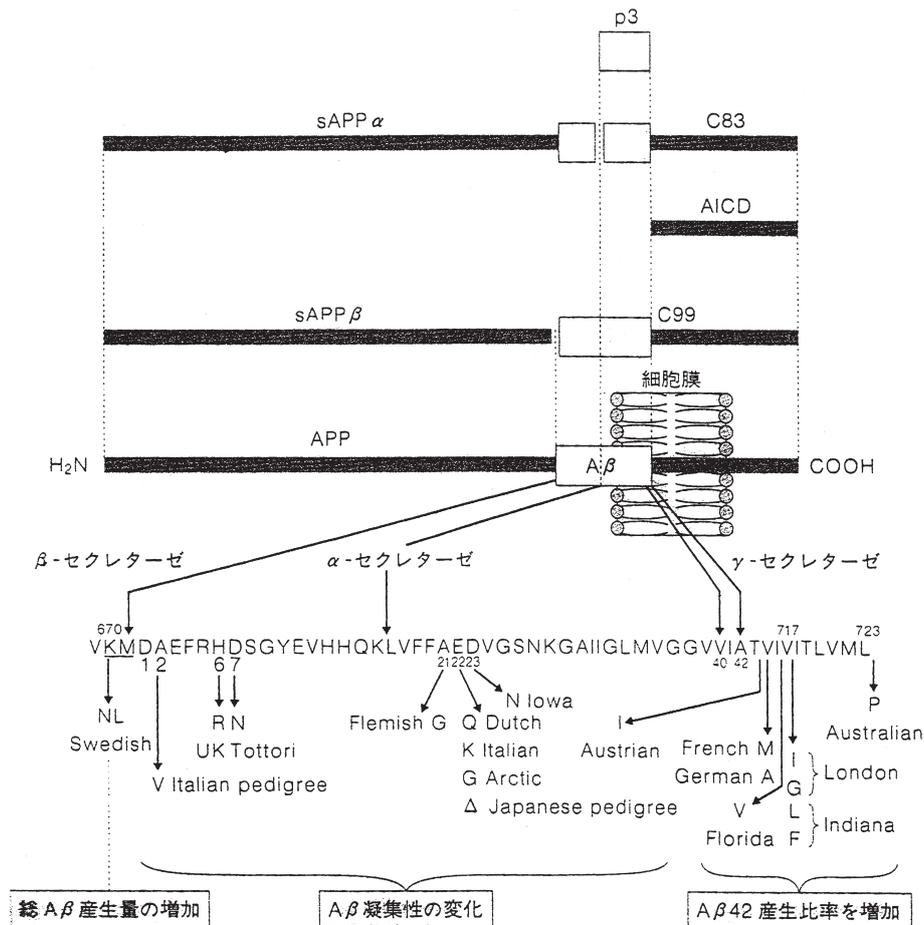


図1 Aβの構造と家族性ADやアミロイドアンギオパチーに関連する変異とその効果  
 APP: amyloid precursor protein, sAPP: secreted APP, AICD: APP intracellular domain, Aβ: amyloid β protein.

重要なステップであることが明らかにされ<sup>5</sup>, すべてのタイプのADにおいてlong Aβの蓄積は共通の病態であることが示唆された<sup>6,7</sup>. long Aβは通常優位に存在するAβ40よりも高度に凝集しやすいことから, この周りにAβ40が線維形成し, 老人斑の芯となるものと考えられている<sup>8</sup>. 一方, Aβの産生を促進されたトランスジェニックマウスではADと同様な神経細胞の変性や認知障害が生じることが示され<sup>9,10</sup>, ADにおけるAβの第一義的な重要性が支持された. また, 凝集したAβが神経毒性に作用することも示されてきた<sup>5</sup>. したがって, より凝集しやすいlong Aβが, より強い毒性を有するものと考えられてきた.

### 3. APPの代謝とAβの産生

APPは生体内で広範に発現しており, AβはAPPの正常代謝産物として大部分の細胞において生成されている. β-セクレターゼはAβのN末端であるAsp+1で切断する蛋白分解酵素に対して命名されたもので

あるが, この分解によってsAPPβと呼ばれる分泌型APP (sAPP) の細胞外領域とC99と呼ばれる99個のアミノ酸部分から成る膜結合型のC末端断片 (C-terminal fragment: CTF) という2種類の断片が生じる. β-セクレターゼによる分解の後, C99は第2のセクレターゼであるγ-セクレターゼの基質となり, AβのC末端が切断されてAβが細胞外に分泌され, C末端断片はAICD (APP intracellular domain) として核に移行し, 転写因子として働く<sup>11</sup>. γ-セクレターゼによって分解されるCTFの膜内切断は, 最初は細胞質に近い部分で生じ, その後3アミノ酸ずつの切断がN末端方向に進み, 最終的にAβが産生される<sup>12</sup>. 最初の切断位置の違いにより, AβのC末端は単一ではなく37~43などのスペクトラムを有している. 正常ではAβ40が優位であるが, Aβ42は全Aβの約10%を占める. 第3のセクレターゼであるα-セクレターゼはAPPをAβの中央部のLeu+17で切断し, sAPPαと呼ばれるsAPPの細胞外領域と83個のアミノ酸からなるC83と呼ばれる膜結合型CTFを生じ,

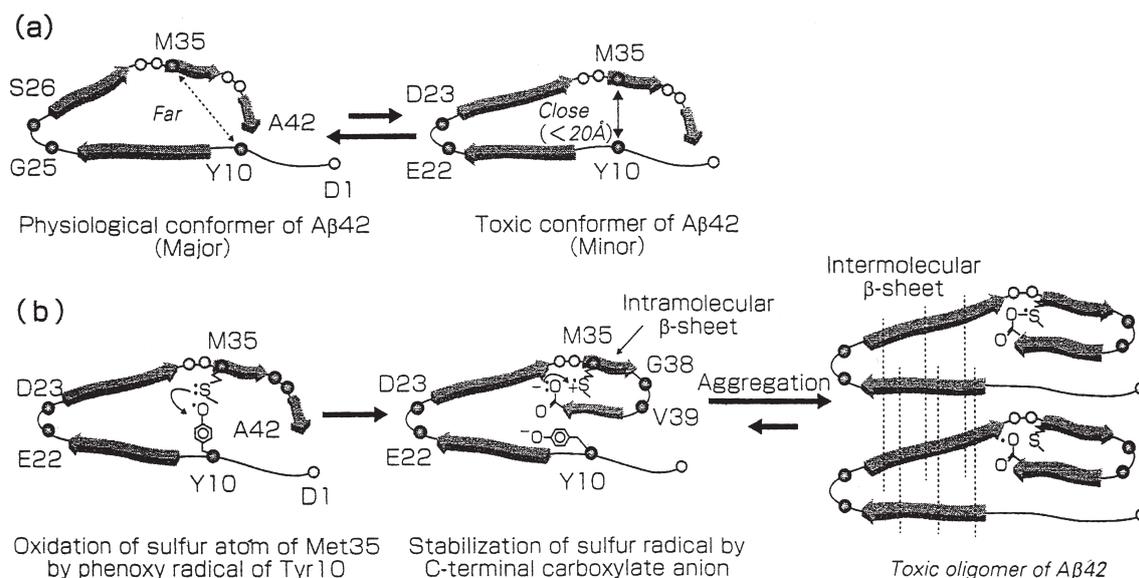


図2 Aβ42の生理的（非毒性）コンフォーマーと毒性コンフォーマー（文献35より引用）

生理的には Gly-25, Ser-26 付近でターンする非毒性コンフォーマーが優位であるが、AD では Glu-22, Asp-23 付近にターン構造を有する毒性コンフォーマーの存在が示されている。この毒性コンフォーマーは Tyr-10 と Met-35 を近接させることにより遷移金属の存在下で Met-35 のイオウ原子を酸化してラジカルを形成する。このラジカルは C 末端のカルボキシル基により安定化され、Aβ のオリゴマー形成が促進される。

C83 はさらに  $\gamma$ -セクレターゼによって分解され、p3 と呼ばれる分子量 3 kDa の断片となる (図1)。

常染色体性優性遺伝の早期発症型家族性 AD (familial AD : FAD) をきたす APP の変異はセクレターゼの作用部位の近傍に存在しており、セクレターゼの分解効率や作用部位に直接的に影響するものと考えられている。例えば、スウェーデン型の APP 変異は Aβ の N 末端直前の LysMet が AsnLeu に二重変異したものであるが、これによって  $\beta$ -セクレターゼの基質分解効率が増加し、Aβ の産生が増えることとなる。 $\gamma$ -セクレターゼの作用部位の近傍にも数種の FAD 変異が同定されており、これらは Aβ42 の産生を増加させる方向に  $\gamma$ -セクレターゼの作用部位をシフトさせている<sup>13</sup>。  $\alpha$ -セクレターゼの作用部位近傍にも FAD 変異は存在し、これらは  $\alpha$ -セクレターゼの分解効率を抑制し、結果として  $\beta$ -セクレターゼの基質としての APP を増加させ、Aβ の産生亢進に結びつけるとともに、凝集性を亢進させる方向に作用している (図1)。 Tomiyama ら<sup>14</sup> によって報告された Osaka 変異型 APP (E693Δ) を有する FAD 家系は、さらに Aβ オリゴマーの重要性を支持する重要な知見を与えた。本変異型 APP からは変異型 Aβ (E22Δ) が産生されるが、この変異型 Aβ は Aβ フィブリルではなく Aβ オリゴマーを主に形成し、Aβ オリゴマーによる毒性のみで神経症状が発症することを示唆した。また、彼らは Osaka 変異型 APP (E693Δ) 遺伝子導入マウス

を作製し、脳内に Aβ オリゴマーが検出され、老人斑以外のすべての AD 病理と認知機能障害が認められることを明らかにした<sup>15</sup>。また、同変異はミトコンドリアをはじめとする細胞内小器官の機能を障害してアポトーシスを誘導することも証明した<sup>16</sup>。以上の知見は Aβ オリゴマーが神経毒性を有するという仮説を強く支持しているものと考えられる。

#### 4. Aβ の病因的意義

##### 1) Aβ オリゴマーの種類

細胞外の沈着物である老人斑が Aβ フィブリルから成る巨大な不溶性凝集物であることや培養神経細胞に Aβ フィブリルを加えると細胞死が生じることより、アミロイドカスケード仮説では当初 Aβ フィブリル→神経細胞死→認知機能低下、というカスケードが考えられていた。しかしながら、Aβ フィブリルによる細胞死誘導に必要な Aβ 濃度が高すぎることや AD の認知機能障害と老人斑の密度 (Aβ フィブリル量) が相関しないことより、このカスケードには難点が指摘されてきた。その後、可溶性 Aβ 量の方が AD の重篤度と相関することや生理的な Aβ 濃度で生じる可溶性 Aβ 凝集体 (Aβ オリゴマー) がシナプス機能を障害することが明らかとなり<sup>17</sup>、Aβ オリゴマー仮説<sup>18</sup> が唱えられるようになった。

## 2) A $\beta$ オリゴマーの毒性機序

A $\beta$  のオリゴマーはその大きさにより、2~3分子からなる low-n オリゴマー<sup>19</sup>、12分子程度の A $\beta$ -derived diffusible ligand (ADDL)<sup>17</sup> や A $\beta$ \*56<sup>20</sup>、50分子以上の線維に近いプロトフィブリル<sup>21</sup> に分類されている。

産生された A $\beta$  は直ちにダイマーやトリマーなどの低分子数が凝集した low-n オリゴマーを形成する。AD やダウン症 (APP の存在する 21 番染色体のトリソミー) 脳の可溶性画分に A $\beta$  ダイマーが検出されている<sup>22</sup>。ADDL や A $\beta$ \*56 は直径 4.8~5.7 nm、分子量 56 Kd、12分子程度の球状オリゴマーであり、AD 脳の可溶性画分では対照の 12 倍に増加していた<sup>23</sup>。A $\beta$  のプロトフィブリルは直径 6~10 nm、長さ 5~160 nm、平均分子量 100 Kd 以上の線維性オリゴマーである。

これらの A $\beta$  オリゴマーのいずれが実際の AD 脳で神経毒性を発揮しているかについては今後のさらなる検討が必要であるが、A $\beta$  オリゴマーが細胞外から細胞膜上のグルタミン酸トランスポーター、インシュリン受容体、アセチルコリン受容体を介して、あるいは NMDA 受容体を阻害することによってシナプス機能を障害するものと推測されている。また、細胞膜でイオンチャンネル様のポアを形成したり、細胞内小器官に蓄積して小胞体ストレスなどを介したりすることによって、アポトーシスを誘導する可能性が考えられている。また、LTP の抑制や LTD の増強より、A $\beta$  オリゴマーが学習・記憶機能の障害作用を有することが示唆され、それがグルタミン酸と密接な関係にあることが明らかとなった。

## 5. 酸化ストレスと A $\beta$ の神経毒性

酸化ストレスとは、活性酸素や活性窒素などによる酸化障害とこれから生体を防御する抗酸化作用とのバランスが崩れて、前者が優勢になった状態であるが、AD 脳においては脂質、蛋白、核酸の酸化障害が認められ、AD の病態において酸化ストレスが注目されている。酸化刺激によって *in vitro* で細胞内 A $\beta$ <sup>24,25</sup>、特に A $\beta$ 42<sup>26</sup> の増加が報告されており、AD の危険因子である ApoE の isoform 依存的な抗酸化作用が関与する可能性が示唆されている<sup>27-30</sup> ことから、酸化ストレスは AD の病態カスケードのかなり上流において重要な意義を有する可能性が考えられている。

免疫組織化学的に神経細胞内にはアミロイド線維は見られず、A $\beta$ 42 は可溶性モノマーもしくはオリゴマーとして蓄積すると考えられている。細胞内に蓄積

した A $\beta$ 42 は ABAD (amyloid  $\beta$  peptide alcohol dehydrogenase) と結合してミトコンドリアを障害しフリーラジカルを惹起することが示されている<sup>31</sup>。A $\beta$ 42 が転写因子である可能性を示唆するものとして、細胞内 A $\beta$ 42 が p53 プロモーターに直接結合し、p53 mRNA の発現を促進することでアポトーシスを誘導することも報告された<sup>32</sup>。これらの知見より、小胞体での過剰産生や酸化ストレスなどが誘因となって細胞内に蓄積した A $\beta$ 42 がミトコンドリア、シナプス、プロテアソームなどの障害を生じるとともに、一部が核に移行して p53 依存性のアポトーシスを促進することが推測されている<sup>33</sup>。また、Glu-22, Asp-23 付近にターン構造を有する毒性コンホマー (生理的には Gly-25, Ser-26 付近でターンする非毒性コンホマーが優位) の存在が示されているが、この毒性コンホマーは Met-35 のラジカル形成能を増強させており、酸化ストレスの観点からも注目を集めている<sup>34-37</sup> (図 2)。

## 6. おわりに

AD の発症機構における A $\beta$  の意義について、アミロイドカスケード仮説から A $\beta$  オリゴマー仮説への変遷を中心に概説した。AD の病因関連物質としての A $\beta$  の分子形態は、不溶性フィブリルから可溶性オリゴマーに転換されたわけであるが、A $\beta$  が重要であるという認識には変化はない。A $\beta$  の脳内蓄積が AD の神経病理学的特徴の一つであることは明確な知見であり、A $\beta$  の生成と凝集や沈着、その神経毒性のメカニズムの解析は AD の病態を解明し根本的な治療法を開発する上で必須の課題である。

## 文 献

1. Hardy JA, Higgins GA: Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 1992; 256: 184-185.
2. Shoji M, Golde TE, Ghiso J et al: Production of the Alzheimer amyloid b protein by normal proteolytic processing. *Science* 1992; 258: 126-129.
3. Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY et al: Amyloid b-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* 1992; 359: 322-325.
4. Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PT Jr: The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: Implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* 1993; 32: 4693-4697.
5. Small DH, McLean CA: Alzheimer's disease and the amyloid beta protein: What is the role of amyloid? *J Neurochem* 1999; 73: 443-449.

6. Scheuner D, Eckman C, Jensen M et al.: Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nature Med* 1996; 2: 864-870.
7. Kuo Y-M, Emmerling MR, Vigo-Pelfrey C et al.: Water-soluble A $\beta$  (N-40,N-42) oligomers in normal and Alzheimer disease brains. *J Biol Chem* 1996; 271: 4077-4081.
8. Jarrett JT, Lansbury PT: Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell* 1993; 73: 1055-1058.
9. Seabrook GR, Rosahl TW: Transgenic animals relevant to Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* 1999; 38: 1-17.
10. Emilien G, Maloteaux J-M, Beyreuther K, Masters CL: Alzheimer disease: mouse models pave the way for therapeutic opportunities. *Arch Neurol* 2000; 57: 176-181.
11. Kimberly WT, Zheng JB, Guenette SY, Selkoe DJ: The intracellular domain of the  $\beta$ -amyloid precursor protein is stabilized by Fe65 and translocates to the nucleus in a notch-like manner. *J Biol Chem* 2001; 276: 40288-40292.
12. Qi-Takahara Y, Morishima-Kawashima M, Tanimura Y et al.: Longer Forms of Amyloid  $\beta$  Protein: Implications for the Mechanism of Intramembrane Cleavage by  $\gamma$ -Secretase. *J Neurosci* 2005; 25: 436-445.
13. Hutton M, Perez-Tur J, Hardy J: Genetics of Alzheimer's disease. *Essays Biochem* 1998; 33: 117-131.
14. Tomiyama T, Nagata T, Shimada H et al.: A new amyloid  $\beta$  variant favoring oligomerization in Alzheimer's-type dementia. *Ann Neurol* 2008; 63: 377-387.
15. Tomiyama T, Matsuyama S, Iso H et al.: A mouse model of amyloid  $\beta$  oligomers: their contribution to synaptic alteration, abnormal tau phosphorylation, glial activation, and neuronal loss in vivo. *J Neurosci* 2010; 30: 4845-4856.
16. Umeda T, Tomiyama T, Sakama N et al.: Intraneuronal amyloid  $\beta$  oligomers cause cell death via endoplasmic reticulum stress, endosomal/lysosomal leakage, and mitochondrial dysfunction in vivo. *J Neurosci Res* 2011; 89: 1031-1042.
17. Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA et al.: Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A $\beta$ 1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 6448-6453.
18. Selkoe DJ: Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* 2002; 298: 789-791.
19. Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV et al.: Naturally secreted oligomers of amyloid  $\beta$  protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 2002; 416: 535-539.
20. Lesné S, Koh MT, Kotilinek L et al.: A specific amyloid- $\beta$  protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* 2006; 440: 352-357.
21. Walsh DM, Lomakin A, Benedek GB, Condron MM, Teplow DB: Amyloid  $\beta$ -protein fibrillogenesis. Detection of a protofibrillar intermediate. *J Biol Chem* 1997; 272: 22364-22372.
22. Shankar GM, Li S, Mehta TH et al.: Amyloid- $\beta$  protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med* 2008; 14: 837-842.
23. Gong Y, Chang L, Viola KL et al.: Alzheimer's disease-affected brain: Presence of oligomeric A $\beta$  ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 10417-10422.
24. Paola D, Domenicotti C, Nitti M et al.: Oxidative stress induces increase in intracellular amyloid  $\beta$ -protein production and selective activation of  $\beta$ I and  $\beta$ II PKCs in NT2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 268: 642-646.
25. Misonou H, Morishima-Kawashima M, Ihara Y: Oxidative stress induces intracellular accumulation of amyloid beta-protein (A $\beta$ ) in human neuroblastoma cells. *Biochemistry* 2000; 39: 6951-6959.
26. Ohyagi Y, Yamada T, Nishioka K et al.: Selective increase in cellular A beta 42 is related to apoptosis but not necrosis. *Neuroreport* 2000; 11: 167-171.
27. Ramassamy C, Averill D, Beffert U et al.: Oxidative damage and protection by antioxidants in the frontal cortex of Alzheimer's disease is related to the apolipoprotein E genotype. *Free Radic Biol Med* 1999; 27: 544-553.
28. Ramassamy C, Averill D, Beffert U, Theroux L et al.: Oxidative insults are associated with apolipoprotein E genotype in Alzheimer's disease brain. *Neurobiol Dis.* 2000 Feb; 7 (1): 23-37.
29. Beffert U, Cohn JS, Petit-Turcotte C et al.: Apolipoprotein E and beta-amyloid levels in the hippocampus and frontal cortex of Alzheimer's disease subjects are disease-related and apolipoprotein E genotype dependent. *Brain Res* 1999; 843: 87-94.
30. Tamaoka A, Miyatake F, Matsuno S et al.: Apolipoprotein E allele-dependent antioxidant activity in brains with Alzheimer's disease. *Neurology* 2000; 54: 2319-2321.
31. Yan SD, Stern DM: Mitochondrial dysfunction and Alzheimer's disease: role of amyloid- $\beta$  peptide alcohol dehydrogenase (ABAD). *Int J Exp Pathol* 2005; 86: 161-171.
32. Ohyagi Y, Asahara H, Chui D-H et al.: Intracellular A $\beta$ 42 activates p53 promoter: a pathway to neurodegeneration in Alzheimer's disease. *The FASEB Journal* 2005; 19: 255-257.
33. Ohyagi Y, Tabira T: Intracellular amyloid b-protein and its associated molecules in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Mini-Reviews in Medical Chemistry* 2006; 6: 1075-1080.
34. Murakami K, Irie K, Ohigashi H et al.: Formation and Stabilization Model of the 42-mer A $\beta$  Radical: Implications for the Long-Lasting Oxidative Stress in Alzheimer's Disease. *J AM CHEM SOC* 2005; 127: 15168-15174.
35. Masuda Y, Uemura S, Ohashi R et al.: Identification of Physiological and Toxic Conformations in A $\beta$ 42 Aggregates. *ChemBioChem* 2009; 10: 287-295.
36. Murakami K, Masuda Y, Shirasawa T, Shimizu T, Irie K: 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 2010; 10 (Suppl. 1): S169-S179.
37. Irie K, Murakami K, Masuda Y et al: The Toxic Conformation of the 42-residue Amyloid  $\beta$  Peptide and Its Relevance to Oxidative Stress in Alzheimer's Disease. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry 2007;

7: 1001-1008.

(受付 : 2012 年 6 月 13 日)

(受理 : 2012 年 7 月 2 日)

---