

# 博士学位論文審査要旨

2021年7月4日

論文題目： A Potential Defense Mechanism Against Amyloid Deposition in  
Cerebellum

(小脳におけるアミロイド沈着防御機構の解明)

学位申請者： ALAM MD SHAHNUR

審査委員：

主査： 生命医科学研究科 准教授 舟本 聡

副査： 脳科学研究科 教授 貫名 信行

副査： 大阪市立大学大学院医学研究科 准教授 富山 貴美

要 旨：

アルツハイマー病 (AD) は主要な認知症で、脳内のアミロイドβ (Aβ) の蓄積が発症原因と考えられている。Aβは凝集し細胞毒性を示すことが知られ、脳内のAβ凝集の出現領域と神経変性領域はほぼ一致し、特に大脳皮質でそれらの程度が大きい。一方、小脳はAβ凝集の形成が比較的少なく変性も少ない。申請者は、小脳でAβ凝集が低下している原因を突き止め、その知見を大脳皮質に応用することでAD発症予防に貢献できると考えた。本論文では、これら脳領域でのAβ凝集の出現の違いに着目し、違いが生じる原因について検討した。

まず申請者は、大脳と小脳のAβ凝集量の違いの原因を探るため、Aβ産生やAβ分解について検討したが、いずれの結果も脳領域のAβ凝集の違いを説明するには不十分と判断した。そこで申請者は、大脳と小脳での物質の拡散に注目し、これらの脳領域に蛍光標識Aβを注入し、その挙動を観察した。その結果、小脳に注入したAβは大脳に注入した場合と比較して、5倍ほど拡散範囲が広く、24時間後には大脳の場合と比較してAβ拡散範囲が顕著に減少していた。対照としてアミノ酸配列をランダム化したAβやAβのほぼ10倍の分子量を持つ蛍光標識オボアルブミンを注入すると、いずれの場合も小脳での拡散が顕著であったが、拡散範囲の減少の程度は大脳の場合と同程度であった。このため、小脳では概して物質の拡散が速いが、特にAβの排出が顕著であるとする申請者の結論は極めて妥当なものと判断できる。申請者は、Aβの排出経路を特定するために、髄膜リンパ系との関連を模索し、小脳に注入したAβを深頸リンパ節に顕著に検出した。本論文は、小脳ではリンパ系を介したAβ排出が盛んなためAβ凝集が低下していることを示し、AD発症予防に一つの洞察を与えるものと思われる。

よって、本論文は、博士 (理学) (同志社大学) の学位を授与するにふさわしいものであると認められる。

## 総合試験結果の要旨

2021年7月4日

論文題目： A Potential Defense Mechanism Against Amyloid Deposition in  
Cerebellum

(小脳におけるアミロイド沈着防御機構の解明)

学位申請者： ALAM MD SHAHNUR

審査委員：

主査： 生命医科学研究科 准教授 舟本 聡

副査： 脳科学研究科 教授 貫名 信行

副査： 大阪市立大学大学院医学研究科 准教授 富山 貴美

要 旨：

2021年7月1日(木) 17時15分から17時35分にかけて、主査と副査による非公開の口頭諮問形式の総合試験を実施した。

総合試験では、直前に行われた申請者の博士学位論文公聴会(2021年7月1日(木) 16時から17時15分に実施)で説明のあった研究背景や実験手法、実験結果の解釈ならびに公聴会での質疑応答内容に関する質問がなされた。申請者はこれらに適切に対応し、研究内容や研究手法等に十分な理解を示した。博士学位論文の骨子となる研究成果は、米国学術雑誌 Biochemical and Biophysical Research Communications (BBRC) に筆頭著者として投稿され、査読時に改訂指示を受けることなく掲載が決定した。また、この学術雑誌で発表した内容は、本学リエゾンオフィスが所管する海外向けのホームページにおいて、本学の研究紹介記事としても選定された。これらのことは、申請者が示した研究結果が重要かつ社会的ニーズに答えていることを示唆している。

申請者のこれまでの研究成果の発表件数は、筆頭著者としての共著学術論文が1件(上記 BBRC)、それ以外の共著学術論文が4件、筆頭著者としてのポスター発表が3件である。このうち、昨年度開催された第39回日本認知症学会学術集会(参加者数約3,300人;総演題数約580件)でのポスター発表は、上記 BBRC 誌で発表した内容をもとにしており、同会の奨励賞候補(10件)に選出された。

申請者は、本研究科修了に必要な所定の単位を修得しており、語学(英語)については、入学時の小論文や面接は英語で実施しており、十分な英語力を持っていると判断できる。

よって、総合試験の結果は合格であると認める。

## 博士學位論文要旨

論文題目 : A Potential Defense Mechanism Against Amyloid Deposition in Cerebellum

( 小脳におけるアミロイド沈着防御機構の解明 )

氏名 : ALAM MD SHAHNUR

要旨 : Amyloid- $\beta$  ( $A\beta$ ) is a 38–43 amino acid peptide derived from  $\beta$ -amyloid precursor protein (APP) via sequential cleavages by  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretases. Considerable attention has been paid to this small peptide, because  $A\beta$  is a major component of senile plaques, one of neuropathological hallmarks in Alzheimer's disease (AD) brains. AD is characterized by senile plaques, neurofibrillary tangles composed with tau protein, neuronal loss, and memory loss. Accumulating evidence strongly suggests that  $A\beta$  deposition is highly associated with pathogenesis of AD and that  $A\beta$  is one of druggable targets for prevention and cure of AD. Recently Biogen and Eisai Ltd. indicated that aducanumab, an antibody to aggregated forms of  $A\beta$  delayed cognitive decline of AD patients in a dose dependent manner. U.S. Food and Drug Administration approved aducanumab for AD treatment on the condition of a new post-approval clinical study. This approval would reflect the validity of AD pathogenesis by  $A\beta$ .

There is an obvious tendency that neuropathological features are observed in cerebral cortex (CTX).  $A\beta$  deposition in cerebellum (CBL) is so less that amyloid accumulation visualized with Pittsburgh compound-B in CTX is shown in reference to that in CBL in amyloid imaging. Interestingly, tg2576, an APP transgenic mouse, also exhibited less  $A\beta$  deposition in CBL, although APP is overexpressed under the control of prion promoter. A human APP knock-in mouse with Swedish, Iberian, and Arctic mutations ( $APP^{NL-G-F}$ ) showed little  $A\beta$  deposition in CBL although this AD model mouse produced aggregation-prone  $A\beta_{42}$  predominantly in whole brain. These observations imply the presence of anti-AD mechanism in CBL. In this study, I explored

to figure out the potential mechanism preventing A $\beta$  deposition in CBL.

First, I considered the possibility that A $\beta$  in CBL forms oligomers which is invisible in regular staining technique and that the total amount of A $\beta$  in CBL might be equivalent to that in CTX. To test this possibility, A $\beta$  was extracted in 6M guanidine-HCl from *APP<sup>NL-G-F</sup>* mouse brain tissues for comparison of total A $\beta$  level between CTX and CBL. I found age-dependent elevation of A $\beta$  level in CTX than CBL in AD model *APP<sup>NL-G-F</sup>* mouse. Although no significant difference between CTX and CBL was detected in young mice (1-3-week old), total amount of A $\beta$  in CBL was much lower than that in CTX after 7-week old. Next, I considered the possibility of less A $\beta$  production in CBL. To test this possibility, I focused on interstitial fluid (ISF) A $\beta$ . Because ISF A $\beta$  reflects the levels of extracellular A $\beta$  that is secreted after production and before the deposition. Interestingly, micodiyalysis experiment revealed no significant difference of ISF A $\beta$  level between CTX and CBL of 4-months old *APP<sup>NL-G-F</sup>* mouse. Then I considered the possibility of higher microglial phagocytosis of A $\beta$  in CBL. To test this possibility, I injected HiLyte™ Fluor 555 labeled A $\beta$ 42 (HF-A $\beta$ 42) into brain tissues. Again, I observed no significant difference of HF-A $\beta$ 42 positive microglial cells between CTX and CBL. These results further influenced me to examine the A $\beta$  clearance in CTX and CBL. In order to investigate the A $\beta$  clearance from brain tissues, I injected HF-A $\beta$ 42 stereotaxically into brain tissues and observed the fluorescent distribution in brain slices under the fluorescent microscopy. Interestingly, the diffusion area of HF-A $\beta$ 42 in the CBL expanded about three to six times than CTX. Importantly, the HF-A $\beta$ 42 positive area decreased sharply after 24 hours in CBL. In contrast, A $\beta$  in CTX was constant up to 72 hours. This observation is dependent on A $\beta$ 42 sequence that was confirmed by scramble sequence of A $\beta$ 42 injection in brain tissues. In order to gain insight clearance of high molecular weight protein, I injected Alexa flour-555 conjugated Ovalbumin (Alexa-OVA; 45 kDa) in brain tissues and found the clearance of Alexa-OVA from CTX and CBL was in a similar fashion. Recently meningeal lymphatic system around the brain

has been re-discovered. The cerebrospinal fluid is cleared to outside of central nervous system into deep cervical lymph nodes (DcLNs) after drainage from the basal meningeal lymphatic vessels. To examine whether A $\beta$  injected into brain tissues is drained into DcLNs, I isolated DcLNs from mice injected HF-A $\beta$ 42 and compared fluorescent intensity between CTX-injected and CBL-injected mice. Importantly, HF-A $\beta$ 42 was robustly detected in DcLNs of CBL-injected mice after 2h and decreased over the times from CBL, while that in CTX-injected mice was faint. To confirm whether A $\beta$  is drained into DcLNs in physiological conditions, I examined DcLNs of *APP<sup>NL-F</sup>* mice. Interestingly, I observed a tendency of age-dependent increase of A $\beta$  in DcLNs. So, this data imply that it is highly possible A $\beta$  from CBL cleared and drained into DcLNs rather than the CTX with aging.

My data suggest that diffusion mediated clearance and drainage from CBL is responsible for less A $\beta$  deposition in CBL than CTX. Application of this defense mechanism to CTX would prevent from AD. Although it is not fully clear about A $\beta$  clearance, this finding will draw attention of AD scientist to find out the best possible mechanism after more investigation.