

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 Altered  $\gamma$ -secretase activity in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease  
(軽度認知障害・アルツハイマー病における脳内 $\gamma$ -secretase 活性の変化)

氏名 角田 伸人

認知症の中で最も頻度が高く、代表されるのがアルツハイマー病 (Alzheimer's disease; AD) であり、認知症患者のおよそ 60%以上を占めている。AD は進行性の神経疾患で、病状は記憶障害や実行力障害などの中核症状だけではなく、徘徊、妄想、幻覚など周辺症状に及んでくる。AD 患者の剖検脳では、老人斑、神経原線維変化そして神経細胞の脱落という 3 つの神経病理学的特徴がある。老人斑は、細胞外に分泌されたアミロイド  $\beta$  タンパク質 ( $A\beta$ ) が凝集して細胞外に沈着する。一方、神経原線維変化は、過剰にリン酸化されたタウタンパク質 ( $\tau$ ) が細胞内で重合し、線維化することにより形成される。この細胞内外に見られる 2 つの病変は、時系列的な解析の結果、新皮質においては老人斑が先に形成された後、神経原線維変化が遅れて出現することが知られている。

$A\beta$  は、第 21 番染色体上に存在するアミロイド前駆体タンパク質 (amyloid protein precursor; APP) 遺伝子にコードされており、一回膜貫通型の APP が段階的な切断を受けることによって  $A\beta$  が産生される。はじめに、 $\beta$ -secretase による APP 細胞膜外ドメインの切断を受け、soluble APP  $\beta$  (sAPP  $\beta$ ) を分泌し、 $\beta$ -carboxyl terminal fragment ( $\beta$ CTF) は細胞膜に局在する。 $\beta$ CTF は 99 アミノ酸残基であることから、C99 と呼ばれている。続いて、C99 は $\gamma$ -secretase により細胞膜内で

切断を受け、A $\beta$  とアミロイド  $\beta$  細胞質内ドメイン (amyloid  $\beta$  intracellular domain: AICD) に分解される。この切断によって産生される主な分子種は 40 残基の A $\beta$ 40 であるが、その他 37 から 43 残基の A $\beta$  も産生され、細胞外へ分泌される。

本研究は、AD 病変時系列の最上流に位置する A $\beta$  に注目し、なぜ AD では脳脊髄液 (CSF) 中の A $\beta$ 42 が減少するのか検討した。はじめに、 $\gamma$ -secretase の再構築系を確立し、C99 から産生される A $\beta$  および AICD について解析した。続いて、ヒト脳内における A $\beta$  について解析するため、ELISA 系を構築して CSF 内の A $\beta$  を測定した。CSF の A $\beta$  解析の結果から、軽度認知障害 (MCI) および AD での脳内  $\gamma$ -secretase の活性変化が示唆されたため、剖検脳を用いてヒト脳内の  $\gamma$ -secretase 活性を測定した。本論文は「 $\gamma$ -secretase 再構成系の確立」、「ヒト CSF の A $\beta$  の定量およびヒト脳内  $\gamma$ -secretase 活性測定」の 2 つの項目から成っている。

第 1 章の  $\gamma$ -secretase 再構成系は、Chinese Hamster Ovary (CHO) 細胞の細胞膜に発現している  $\gamma$ -secretase を CHAPSO により膜画分を可溶化し、 $\gamma$ -secretase を含む画分を回収し酵素源とした。一方の基質である C99 も膜タンパク質であるため、Sf9 細胞の細胞膜に発現させた。Sf9 細胞は  $\gamma$ -secretase を発現していないため、C99 を細胞膜に発現しても分解されず、細胞膜に局在している。この C99 を NP-40 存在下で精製して基質とした。これを 0.25% CHAPSO 存在下の  $\gamma$ -secretase へ添加し、A $\beta$  と AICD を産生させる再構成系を確立した。この再構成系において産生された A $\beta$  を urea 入りアクリルアミドゲルで展開した結果、A $\beta$ 40、A $\beta$ 42、A $\beta$ 43、A $\beta$ 45、A $\beta$ 46、A $\beta$ 48 および A $\beta$ 49 の産生を確認した。これらすべての A $\beta$  は、インキュベーション時間とともに直線的に増加していた。また、 $\gamma$ -secretase 阻害剤の L-685,458 および DAPT を添加した結果、阻害剤の濃度依存的にすべての A $\beta$  産生を抑制したことから、これらは  $\gamma$ -secretase によって産生されていることを明らかとした。一方、この再構築実験系で産生された AICD を TOF-MS 解析した結果、49 番目と 50 番目の残基から始まる 49-99 と 50-99 の 2 種類が産生されていた。これらの結果は、細胞の結果と同じであり、再構成系によっても  $\gamma$ -secretase の切断様式に大きな変化が起こっていないことがわかった (Kakuda et al, J. Biol. Chem. 281: 14776-14786, 2006)。高見らはこの再構築系を用いて、A $\beta$  が段階的に産生される stepwise-processing model を提唱した。A $\beta$ 49→A $\beta$ 46→A $\beta$ 43→A $\beta$ 40 という産生経路と A $\beta$ 48→A $\beta$ 45→A $\beta$ 42→A $\beta$ 38 の 2 つの産生経路が存在していることが明らかとなった (Takami et al, J. Neurosci. 29:13042-13052, 2009)。

第 2 章では、stepwise processing model を基にヒト脳内の A $\beta$  について解析を行った。まず CSF に存在する A $\beta$  の分子種について免疫沈降により検討した結果、A $\beta$ 37、A $\beta$ 38、A $\beta$ 39、A $\beta$ 40、A $\beta$ 42 および A $\beta$ 43 が存在していることを確認した。Stepwise processing model より、「A $\beta$ 40 と A $\beta$ 43」、「A $\beta$ 38 と A $\beta$ 42」はそれぞれ「product と precursor」の関係にあるが、既存の ELISA では、A $\beta$ 40 と A $\beta$ 42 の 2 種しか測定できなかった。そこで本研究では、新規の A $\beta$ 38 および A $\beta$ 43 の ELISA を構築した。抗 A $\beta$ 38 モノクローナル抗体および抗 A $\beta$ 43 ポリクローナル抗体と A $\beta$  の N

末端抗体 (82E1) とを組み合わせた ELISA 測定系である。これらの ELISA で測定した結果、健常人と比較して MCI および AD 患者においては、precursor である A $\beta$ 42 のみならず A $\beta$ 43 も減少していた。一方、それぞれの product である A $\beta$ 38 は増加傾向、また A $\beta$ 40 は増加していた。つまり MCI/AD 脳内では  $\gamma$ -secretase の切断効率が上昇し、precursor である A $\beta$ 42 および A $\beta$ 43 を切断し、product の A $\beta$ 38 および A $\beta$ 40 を産生したと考えた。これまでの研究において、A $\beta$ 42 の脳内への蓄積が CSF における減少の原因であると考えられてきた。しかし、健常人および MCI/AD の A $\beta$ 38 と A $\beta$ 42 の測定値の合計は、3 群において有意な差は見られなかった。つまり CSF の A $\beta$ 42 の減少は蓄積のみではなく、切断効率の変化が示唆された。また A $\beta$ 38/42 と A $\beta$ 40/43 の存在比を検討した結果、健常人と比較して MCI/AD では有意に高値を示した。

続いて脳内  $\gamma$ -secretase 活性を測定し、切断効率を比較した。和田らによって、細胞内における  $\gamma$ -secretase 活性の多くは、raft 画分に存在していることがわかっていたため (Wada et al, Biochemistry 42: 13977-13986, 2003)、健常人と MCI/AD の脳内  $\gamma$ -secretase を含む raft 画分を採取して in vitro assay 系にて評価した。剖検脳 (前頭葉; Brodmann areas 9-11) から raft 画分を調製し、第 1 章の in vitro assay 系に従って CHAPSO 存在下で C99 を添加することにより、A $\beta$  を産生させた。産生された各 A $\beta$  の C 末端特異的抗体を用い、ウエスタンブロッティングによって検出・定量した。本研究では、postmortem interval (PMI) が 12 時間以内の症例のみを用いて活性を検討した。A $\beta$ 38/42 および A $\beta$ 40/43 の存在比を測定した結果、それらの比率は CSF の場合と同様に、健常人と比較して MCI/AD では高くなっていた。以上から MCI/AD において、脳内の  $\gamma$ -secretase の切断効率が上昇していることを明らかにした。

これまで MCI/AD における CSF の A $\beta$ 42 の減少について、A $\beta$ 42 が選択的に脳内へ蓄積するためと考えられてきた。本研究では、剖検脳をもちいて  $\gamma$ -secretase の切断効率について検討した結果、MCI/AD 脳内では健常人よりも  $\gamma$ -secretase の切断効率が上昇していることを明らかにした。つまり、MCI/AD 患者の CSF の A $\beta$ 42 減少は脳内への蓄積のみが原因ではなく、 $\gamma$ -secretase の切断効率が上昇して A $\beta$ 42 が A $\beta$ 38 へ切断されている可能性があると考えられた。また A $\beta$ 42 と同様に A $\beta$ 43 も減少しており、切断効率上昇により A $\beta$ 40 が増加している可能性も考えられた。しかし本研究では、この切断効率の変化と脳内 A $\beta$  の蓄積のどちらが先に起こっているのかわからなかった。

また本研究の結果から、現在 AD 治療薬のとして開発されている  $\gamma$ -secretase modulator の効果が小さいと予想される。 $\gamma$ -Secretase modulator は、A $\beta$ 42 を減少させる効果を示す一方で、A $\beta$ 38 を増加させる化合物である。しかし MCI/AD 脳内の  $\gamma$ -secretase は、既に modulator 投与様に変化していることが明らかになったため、MCI/AD 患者に対する  $\gamma$ -secretase modulator の効果はきわめて小さいと考えられる。