

【序論】

アルツハイマー病 (AD) は進行性の神経変性疾患であり、AD 脳における病理学的特徴の一つとして、老人斑と呼ばれる細胞外タンパク質凝集体の蓄積が挙げられる。この老人斑は主に神経細胞から分泌されるアミロイド β ($A\beta$) を主成分とし、家族性 AD にみられる多くの遺伝子変異が $A\beta$ 産生を亢進させること、一方 $A\beta$ 産生量を低下させる遺伝子バリエーションが AD 発症リスクの減少に相関することから、脳内 $A\beta$ 量の上昇が AD 発症に寄与すると考えられている。また、全患者の 99%以上を占める孤発性 AD においては $A\beta$ クリアランス速度の低下が報告されており、その制御機構の破綻が AD 発症要因の一つであることが示唆されている。一方で、脳内 $A\beta$ クリアランスにはアストロサイトなどのグリア細胞が $A\beta$ 分解酵素を産生することで、大きく関与している。しかし、その産生や活性を制御するメカニズムについては不明である。

したがって、本論文では $A\beta$ クリアランスの制御機構の一端を解明すべく、グリア細胞による $A\beta$ 分解を制御するシグナルの同定を目的に研究を遂行した。

【方法・結果】

1. 脂質メディエータースクリーニングによる $A\beta$ 分解制御分子の探索

アストロサイトは炎症応答性の細胞であり、生理活性物質の一種である炎症性脂質メディエーターによって、多様な表現型の変化を引き起こすことが知られている。また、AD 脳において炎症性脂質メディエーターを産生する複数の酵素の発現上昇が報告されている。これらのことから、本研究では $A\beta$ 分解を制御する候補分子として炎症性脂質メディエーターに着目し、スクリーニングを行った。また、これまでの研究からヒトアストロサイト由来培養細胞株である CCF-STTG1 細胞の培養上清中に $A\beta$ 分解活性があることが報告されていた。そこで、スクリーニングでは、各種炎症性脂質メディエーターを 24 時間投与した CCF-STTG1 細胞の培養上清と $A\beta$ を混合し、37°C で振盪後、残存する $A\beta$ 量を定量することで、 $A\beta$ 分解活性を評価した。このとき、脂質メディエーターとしては脳に豊富に存在する脂質であるアラキドン酸およびドコサヘキサエン酸 (DHA) 由来の炎症性脂質メディエーターなど計 16 種類を用い、基質となる $A\beta$ についてはより生理条件に近いものを使用するために、 $A\beta$ を分泌する細胞である 7PA2 細胞の培養上清を用いた。スクリーニングの結果、今回用いた全ての DHA 由来脂質メディエーター (14-HDoHE、17-HDoHE、20-HDoHE) の投与によって、有意に $A\beta$ 分解活性が低下することを見出した。

2. DHA 由来脂質メディエーター受容体と CCF-STTG1 細胞の $A\beta$ 分解活性の関係

上記スクリーニングの結果を踏まえ、DHA 由来脂質メディエーターをリガンドとする受容体が、 $A\beta$ 分解活性の制御に関与することが考えられた。そこで、既知の DHA 由来脂質メディエーター受容体である GPR40 と GPR120 に着目した。これらの受容体をそれぞれ CCF-STTG1 細胞に過剰発現させ、 $A\beta$ 分解活性を評価したところ、GPR120 過剰発現細胞でのみ $A\beta$ 分解活性の有意な低下が認められた。さらに、GPR120 選択的アンタゴニストである AH7614 の投与は、 $A\beta$ 分解活性を有意に亢進させた。これらの結果から、GPR120 シグナルが $A\beta$ 分解活性を抑制することが示唆された。

3. GPR120 によるグリア細胞の $A\beta$ 分解活性制御機構

GPR120 は末梢組織においてマクロファージなどの炎症性応答に関与することが知られているが、脳における機能は明らかではない。そこで初代培養グリア細胞の $A\beta$ 分解活性に対する GPR120 シグナルの影響を検討した。まず、マウス由来初代培養グリア細胞に対して AH7614 と

基質となる 7PA2 細胞培養上清を共投与し、48 時間後の培地中における残存 A β を定量した。その結果、AH7614 投与により有意に残存 A β 量が低下した。このことから GPR120 の阻害により、グリア細胞による A β 分解が活性化されたことが示唆された。この現象に関連する分子を同定するために、qRT-PCR により、既知の A β 分解酵素およびその内因性調節分子の発現量を比較した。その結果、A β 分解酵素である Matrix metalloproteinase (MMP) 2、MMP9、MMP14 について AH7614 投与による発現量の有意な上昇が認められた。また、これら MMP の内因性阻害分子である Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) 3 と TIMP4 の発現量については低下することが分かった。さらに、AH7614 投与による初代培養グリア細胞の A β 分解活性の上昇は、MMP の広範なインヒビターである GM6001 の投与により抑えられた。以上から、GPR120 シグナルが MMP2、MMP9、MMP14、TIMP3、TIMP4 の発現を調節することで、グリア細胞による A β 分解を抑制することが示唆された。

4. AD モデルマウスへの GPR120 選択的アンタゴニスト投与による脳内 A β への影響

続いて、AD モデルマウス APP/PS1 を用いて、GPR120 シグナルによる A β 分解制御が脳内 A β 動態に与える影響を検証した。DHA が豊富に存在する脳内環境では常に GPR120 シグナルが活性化している可能性があるため、GPR120 の阻害によって A β 分解を亢進できると考えられる。そこで AH7614 を APP/PS1 マウスに脳内注射し、24 時間後の脳内 A β 量の変化を評価したところ、有意な TBS 可溶性 A β の減少が認められた。このとき、A β の前駆体タンパク質である APP と、その中間産物である C99 のタンパク量に変化がなかった。一方で、GM6001 の脳内注射は、AH7614 による脳内 A β 量の減少を抑制した。これらの結果から、マウス脳内においても、GPR120 の阻害が MMP を活性化し、A β 分解の亢進を引き起こすことが示唆された。

【総括】

以上、本研究により、グリア細胞における A β 分解機構の新規制御因子として、DHA 由来脂質メディエーター受容体である GPR120 を同定した。さらに、GPR120 シグナルが A β 分解酵素 MMP2、MMP9、MMP14 およびそれらの内因性阻害分子である TIMP3、TIMP4 の発現を調節することで、脳内 A β 分解活性を抑制していることが示唆された。すなわち、脳内での GPR120 はグリア細胞における炎症応答と細胞外環境の制御に関与していると考えられた。また、GPR120 のシグナルが MMP 類と TIMP 類の発現を制御することは全く新しい発見であり、AD だけでなく様々な疾患に関与している可能性がある。

加えて、脂質メディエーターを産生する酵素であるホスホリパーゼや、脂質メディエーターを異なる脂質メディエーターに変換する役割をもつ Lipoxygenase や Cyclooxygenase といった脂質代謝酵素は AD と関連していることが報告されており、AD と健常者との間では脳内の脂質メディエーターの組成が異なると考えられる。これらの酵素のうちいくつかは A β 蓄積に伴って発現が上昇することが示されているため、AD の進行期には GPR120 のリガンドとなる脂質メディエーターの産生が増加する可能性がある。したがって、A β 蓄積に応答した脂質メディエーターの産生増加が、GPR120 を介して A β 分解を抑制することで、AD における A β クリアランス低下の要因の一つになっていることが考えられる。

さらに、GPR120 選択的アンタゴニストの投与がマウス脳内の A β を減少させたことは、GPR120 が脳内で恒常的な活性を持っていることと、新たな AD の創薬ターゲットとなり得ることを示唆しており、重要な研究成果であると言える。

よって本論文は博士（薬科学）の学位請求論文として合格と認められる。