

論文の内容の要旨

論文題目

アルツハイマー病血漿バイオマーカー分子 APP669-711 の産生機構解明

氏 名 松崎 将也

【序論】

世界的に高齢化が進み、現在では 5000 万人以上もの認知症患者が存在すると推計されている。とりわけアルツハイマー病 (AD) は認知症の中で最も多い神経変性疾患であり、早急な対策が求められている。これまでの研究から、AD 患者脳特異的に蓄積するアミロイド β ($A\beta$) は発症に最も深く関与すると考えられ、 $A\beta$ に対する様々な創薬研究が行われてきたが、多くの治験が失敗に終わっている。一方、AD 発症の 10 年以上前から脳内で $A\beta$ 蓄積が開始しており、抗 $A\beta$ 療法は認知症の前段階である軽度認知障害 (MCI) さらにはプレクリニカル AD で開始するべきだと考えられている。すなわち脳内 $A\beta$ 蓄積を反映し、MCI やプレクリニカル AD を簡便に判定できるバイオマーカーが必要とされている。近年、ヒト血漿中で $A\beta$ 関連ペプチドである APP669-711 ($A\beta$ (-3)-40) が超高感度 IP-MS 法により見出され (Kaneko et al., *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 2014)、血中 APP669-711/ $A\beta$ 1-42 比と $A\beta$ 1-40/ $A\beta$ 1-42 比を組み合わせたバイオマーカーにより、少量の血液から脳内 $A\beta$ 蓄積の有無をアミロイド PET に匹敵する精度で判定可能であることが示された (Nakamura et al., *Nature* 2018)。APP669-711 は $A\beta$ と同様にアミロイド前駆体タンパク (APP) の部分断片であるが、その産生機構や病態との関連は一切不明であった。そこで、APP669-711 の産生機構と脳内病理と連動するメカニズムを解明することで、AD 早期診断バイオマーカーとしての生物学的根拠を確立することができると考えた。

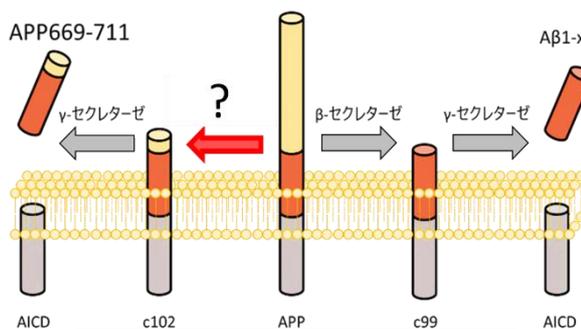


図 1. APP プロセッシングによる $A\beta$ 関連ペプチドの産生

【方法と結果】

1. 培養細胞を用いた APP669-711 産生に関する薬理的解析

当教室において、APP669-711 はグリア由来培養細胞以外の様々なヒト由来培養細胞から分泌されており、その産生機構には何らかの細胞特異性があること、APP669 位 ($A\beta$ (-3)位) 切断にはメタロプロテアーゼが関与し、次いで γ セクレターゼにより APP669-711 を主とした様々な C 末端長をもつ APP669-x ペ

プチド群が産生されることが示唆されていた(吉澤 遥太 修士論文)。しかしこれまでの解析では、IP-MS 法を行うにあたり、ヒト A β 1 位を含む N 末側領域を特異的に認識する抗体が用いられていた。一方、A β の N 末端長には多様性が存在すること、またヒト A β とマウス A β は N 末側領域において 3 アミノ酸異なることが知られている。そこで私は、まず様々な培養細胞における内因性 APP669-x および A β 関連ペプチド産生に対する各種プロテアーゼ阻害薬の影響を、A β 内部配列に対する抗体を利用した IP-MS 法により網羅的に解析した。その結果、マウス神経芽細胞腫由来 Neuro2a の培養上清中から、APP669-711 と同様にメタロプロテアーゼ阻害薬 GM6001 で産生が阻害され、 β セクレターゼ阻害薬 MBSI で産生量がほとんど変化しない A β 12-40 や A β 12-42 を見出した。この APP669 位と A β 12 位近傍のアミノ酸配列が類似していることから、切断には同じ配列特異性を示すプロテアーゼが関与しているのではないかと考えた。近年、A β 12-40 の産生酵素として ADAMTS4 が報告されていたことから(Walter et al., *Acta Neuropathol* 2019)、APP669-711 産生を担うプロテアーゼの候補として ADAMTS4 に着目し解析を進めた。

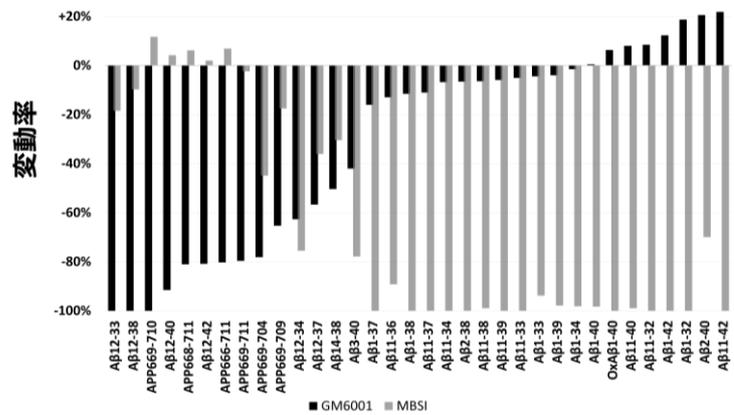


図 2. Neuro2a 細胞の培養上清中 A β 関連ペプチドの網羅的解

2. ADAMTS4 が APP669-711 産生に与える影響

ADAMTS4 が APP669-711 産生に与える影響を検討するため、HEK293A 細胞に APP と ADAMTS4 を共発現した過剰発現実験や、内在性の APP669-711 産生が検出できる肺胞基底上皮腺癌細胞由来 A549 細胞における ADAMTS4 ノックアウト実験により検討した。その結果、ADAMTS4 過剰発現により、APP669-711 産生量の増加が観察された。さらに ADAMTS4 ノックアウト A549 細胞では、APP669-711 産生量の減少が認められたが、GM6001 処理によりさらに減少した。以上の結果から、APP669 位の切断には ADAMTS4 が関与すること、一方 ADAMTS4 以外の酵素も関与している可能性が示唆された。

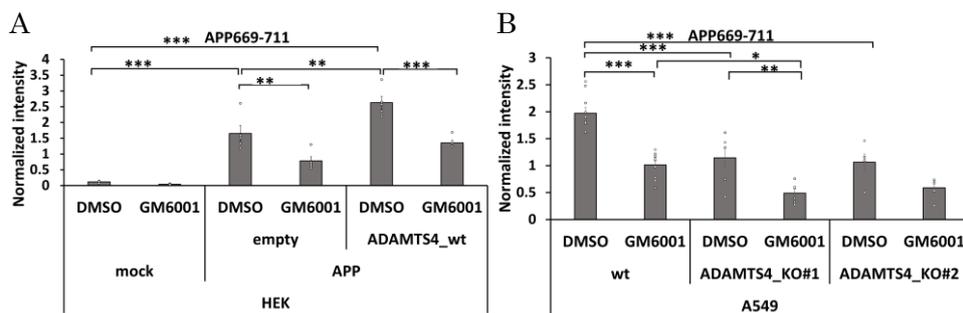


図 3. ADAMTS4 の過剰発現/ノックアウトによる APP669-711 産生量への影響

A: HEK293A 細胞への APP と ADAMTS4 の過剰発現実験

B: A549 細胞の内因性 ADAMTS4 のノックアウト実験

3. マウス血漿中内因性 APP669-711 の検討

これまで、ヒト血漿中から同定された APP669-711 が、マウス血中にも存在しているかについては不明であった。そこでマウス A β 特異抗体を利用し IP-MS 法により野生型マウス血漿を解析した結果、内因性

A β に加えて内因性 APP669-711 が検出された。そこでヒトにおいて脳内老人斑蓄積バイオマーカーとして報告されている血中 APP669-711/A β 1-42 比の上昇が、脳内 A β 蓄積が認められる AD モデル動物 APP/PS1 マウスにおいても確認されるかどうか検討した。APP/PS1 マウスは、ヒト Sweden 変異型 APP および Δ Exon 変異型 PS1 を神経系特異的 Prion プロモーターにより過剰発現しているマウスである。Sweden 変異は A β (-2)および A β (-1)位への二重変異であり、 β セクレターゼによる切断を亢進させ A β 1-x の産生量を数倍以上上昇させることから、まず Sweden 変異が APP669 位の切断に与える影響を培養細胞系により検討した。その結果、Sweden 変異により APP669-711 産生が消失することが明らかとなった。すなわち、APP/PS1 マウスにおける内因性マウス APP669-711 およびマウス A β の挙動は、過剰発現させたヒト APP に由来するのではなく、ヒト A β アミロイドの脳内蓄積により生じる病的現象を反映していると考えられる。そこで脳内 A β が蓄積していない若齢(2 ヶ月齢)および十分に蓄積している老齢(23-25 ヶ月齢)マウスの血漿を IP-MS 法により解析した。その結果、血漿中マウス APP669-711/マウス A β 1-42 が老齢マウスで上昇していることが認められた。以上の結果より、この血中バイオマーカーは脳内の A β 蓄積と関連して変化することが示唆された。

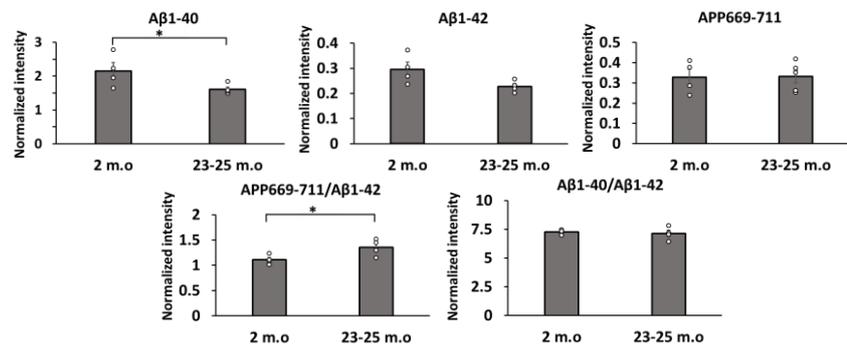


図 4. APP/PS1 マウスの血漿中 APP669-711 の検出と APP669-711/A β 1-42 比の比較

4. APP669 位断端特異的認識抗体を用いた APP669-x ペプチドの解析

次に APP669 位切断断端を特異的に認識する抗体の作出を目的として、A β (-3)-4 に相当するペプチドを用いてウサギに免疫し、得られた抗血清について抗原ペプチドで精製した。A β 1-x の前駆体である c99 や APP669-x の前駆体である c102 の過剰発現細胞ライゼートを用いて検討し、APP669 位切断断端を特異的に検出できる精製ポリクローナル抗体を得ることができた。これらの抗体を用いて、APP/PS1 マウス脳を解析した。その結果、ヒト A β 蓄積が認められる老齢 APP/PS1 マウス脳のギ酸可溶画分において、内因性マウス A β に加えて APP669 位切断断端抗体に反応する 4 kDa のペプチドが検出された。また脳組織切片において、APP669 位切断断端特異抗体によりヒト A β 斑と共局在する斑様構造が染色された。

これらの結果より、マウス脳内でも APP669 位切断が起こり APP669-x ペプチドが産生されていること、またマウス A β に加え、マウス APP669-x ペプチドもヒト A β 斑に蓄積していることが示唆された。

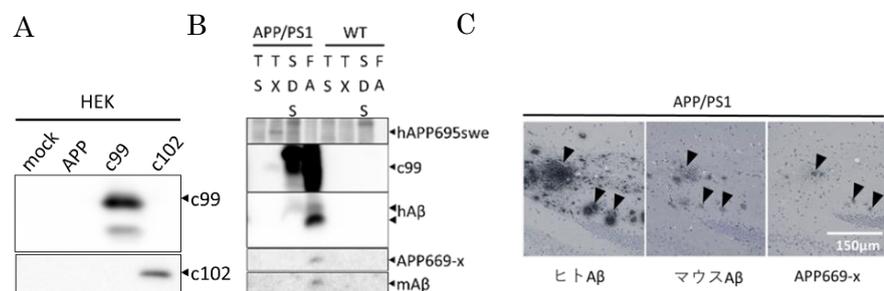


図 5. APP669 位断端特異抗体による APP669-x の検出

- A: 断端特異抗体の交差性の検討
- B: マウスの脳ライゼートのウエスタンブロット
- C: APP/PS1 マウスの脳切片の免疫染色

【総括】

本研究より、APP669-711 産生酵素の1つとして ADAMTS4 を見出した。また、内因性マウス APP669-711 の検出法を確立した。これまでにマウス個体やマウス由来細胞サンプルから APP669-711 を発見したという報告はなされていなかった。本研究において、AD モデルマウスでも血漿中 APP669-711/A β 1-42 の変動が脳内 A β 蓄積と相関することが示された。加えて、APP669 位切断ペプチドが高齢マウス脳内においても蓄積し、A β 斑に巻き込まれていることも示唆され、APP669-711 の産生機構と脳内病理と連動する分子病態連関の解明に繋がる点で非常に有意義である。今後 ADAMTS4 発現細胞と脳内 APP669-x ペプチドの詳細な生化学的解析を進め、血漿中 APP669-711/A β 1-42 が脳内病態によって変動するメカニズムを更に明らかにしたい。

なお本研究を遂行するにあたり、金子直樹先生、岩本慎一先生、田中耕一先生(島津製作所)に IP-MS 法による解析を行っていただきました。心から感謝いたします。