

博士論文（要約）

アストロサイト由来新規アミロイド β 分解酵素
Kallikrein-related peptidase 7 の発現制御機構の解析

須藤 優喜

【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、認知症の中で最も頻度の高い疾患である。AD の病理学的特徴としてアミロイド β ($A\beta$) を主要構成成分とする老人斑の蓄積が挙げられ、 $A\beta$ の蓄積、凝集が AD の発症、進行に深く関与するという「アミロイド仮説」が広く支持されている。家族性の AD 患者で見られる遺伝子変異が $A\beta$ 産生量や凝集性を増加させることが知られている一方で、AD の 99% 以上を

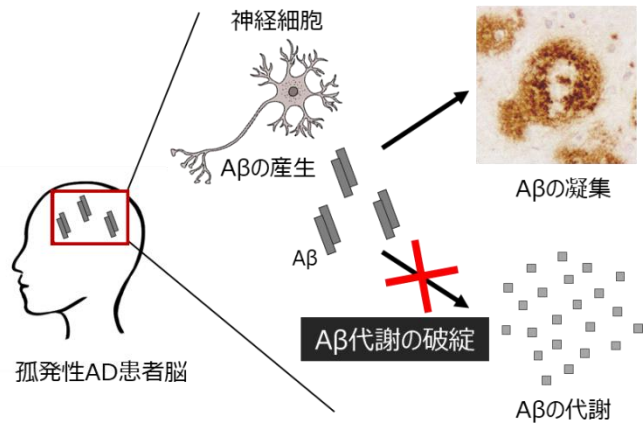


図 1. 孤発性 AD において $A\beta$ 代謝の破綻が見られる

占める孤発性 AD 患者において、脳内における $A\beta$ 代謝が低下していることが示された (Mawuenyega *et al.*, Science 2010、図 1)。このことから、脳内 $A\beta$ 代謝機構の解明とその活性化が孤発性 AD の病態解明、及び AD に対する新規創薬として応用できることが期待される。

$A\beta$ 代謝機構の 1 つとしてプロテアーゼによる分解が挙げられる。当研究室ではアストロサイトが分泌する $A\beta$ 分解酵素 Kallikrein-related peptidase 7 (KLK7) を同定し、KLK7 が AD 病態に与える影響を解析してきた。Klk7 ノックアウトマウスでは脳内 $A\beta$ 量が増加すること、また AD 患者脳では KLK7 発現量が半減していることが示唆され、KLK7 は脳内 $A\beta$ 代謝に関与する、AD 発症に重要な因子であることが明らかとなった (Kidana *et al.*, EMBO Mol Med 2018)。このことから、KLK7 の発現及び活性上昇は AD 病態の改善につながることを期待され、発現量を上昇させる候補化合物として NMDA 受容体アンタゴニストであるメマンチンを見出した。しかしながら、メマンチンがどのようにアストロサイトにおける KLK7 発現を制御しているかは明らかになっていない。そこで今回はメマンチンに着目して、KLK7 発現制御機構の解析を行った。

【方法・結果】

1. メマンチンは KLK7 の転写を活性化させる

ヒト KLK7 遺伝子上流のプロモーター領域 (238 bp および 749 bp) を含んだルシフェラーゼプラスミドを作製しヒトグリオーマ由来 H4 細胞において安定発現株を作製し、メマンチンが KLK7 の転写制御に関与するかを検証した (図 2-A)。その結果、両レポーターにおいてメマンチン投与で転写活性の増強が認められた (図 2-B)。このことから、メマンチンは KLK7 遺伝子上流 238 bp のプロモーター領域を介して転写を活性化させることが示唆された。

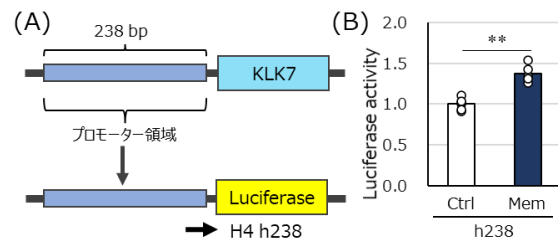


図 2. メマンチンは転写活性を増強する

(A) ルシフェラーゼアッセイの概略図

(B) H4 安定発現株にメマンチンを投与しルシフェラーゼアッセイを行った (n=4, Error bar=SEM, **p<0.01 by Student's-t test)

2. メマンチンへの応答には NF-κB 経路が必須である

次にメマンチンが関与する遺伝子領域および転写因子の解析を行った。*KLK7* 遺伝子上流 238 bp の配列中に SOX-9、GATA-3、NF-κB、SP1、TATA 結合配列が含まれていることから、各結合配列の欠損変異体を作製し、その安定発現株に対してメマンチンを投与した (図 3-A)。その結果、NF-κB 結合配列欠損変異体においてメマンチン誘導性の転写活性の増強が消失した (図 3-B)。このことから、*KLK7* の転写制御には NF-κB 経路が関与している可能性が考えられた。

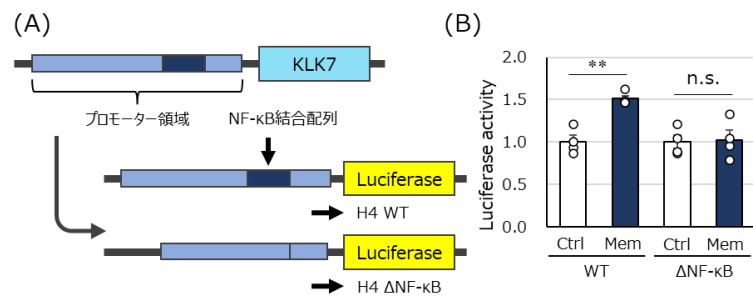


図 3. メマンチンは NF-κB 経路を介して転写活性を増強する

(A) 転写因子結合欠損変異体の概略図

(B) H4 安定発現株に対しメマンチンを処理しルシフェラーゼアッセイを行った (n=4, Error bar=SEM, n.s. not significant $p > 0.05$ ** $p < 0.01$ by Student's *t* test)

3. IKK 阻害剤はアストロサイトにおける *Klk7* 発現量を増加させ Aβ 分解活性を増強する

次に NF-κB 経路がメマンチン応答性の *KLK7* 発現制御機構に関与しているかを検証するために薬理的解析を行った。NF-κB は生理的条件化において IκB タンパク質と結合することで不活性化されているが、IκB kinase (IKK) によりリン酸化されることで活性化状態となることが知られている。そのため IKK 活性を阻害することにより、NF-κB 経路を抑制することができる。そこで IKK 阻害剤のひとつである IKK-16 を用いて NF-κB 経路を阻害した際に、初代培養アストロサイトで *Klk7* mRNA 発現量及び Aβ 分解能に変化が見られるかを検証した。

その結果、IKK-16 投与により *Klk7* mRNA 発現量の上昇が確認された (図 4-A)。またこのとき Aβ 分解能についても亢進していることが明らかになった (図 4-B)。同様の影響は NF-κB の核内移行を抑制することで NF-κB 経路を抑制する阻害剤 JSH-23 処理でも認められた。これらのことから、

アストロサイトにおける *KLK7* の発現は NF-

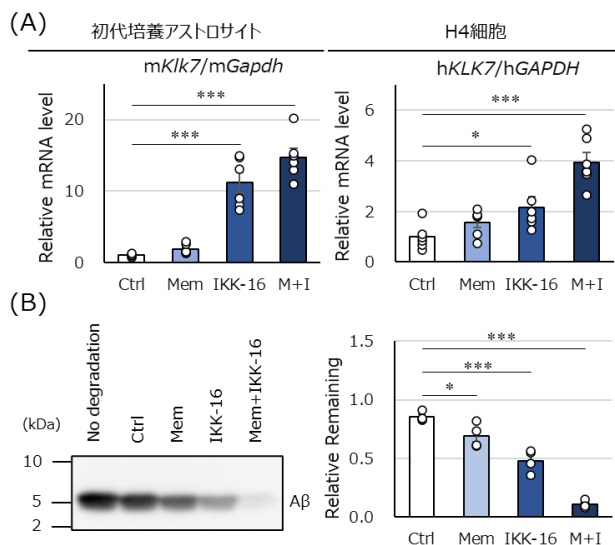


図 4. IKK-16 は *Klk7* 発現量を上昇させる

(A) 初代培養アストロサイトおよび H4 細胞にメマンチン、IKK-16 を投与し *Klk7* 発現量を測定した (n=5-6, mean±SEM, * $p < 0.05$ *** $p < 0.001$ by Tukey's test)

(B) 初代培養アストロサイトに合成 Aβ40 とメマンチン、IKK-16 を投与し 48 時間後に残存する Aβ量を測定した

κB 経路によって負に制御されていることが示唆された。

4. *In vivo* における IKK 阻害剤投与は、*Klk7* 発現量を増加させ、脳内 A β 量を減少させる

脳内における NF- κ B シグナル経路が *Klk7* 発現量及び A β 分解活性に与える影響を検証した (図 5-A)。野生型マウスの海馬に IKK-16 をインジェクションしたところ、*Klk7* mRNA の発現が顕著に上昇した (図 5-B)。そこで AD モデルマウス *App*^{NL-G-F/NL-G-F} マウスの海馬に IKK-16 をインジェクションし脳内 A β 量を検証した。その結果、可溶性および不溶性 A β の顕著な減少が認められた (図 5-C)。このとき A β 産生に関与するタンパク質である A β 前駆体タンパク質 (APP) や BACE1 などのタンパク量に変化は見られなかった。一方 *Klk7* ノックアウトマウスと *App*^{NL-G-F/NL-G-F} マウスを掛け合わせた二重遺伝子改変マウスに対して IKK-16 をインジェクションしたところ、脳内 A β 量は変化しなかった。これらの結果から、マウス脳内においても IKK 阻害剤による NF- κ B 経路の阻害により、KLK7 による A β 分解が促進されることが示唆された。

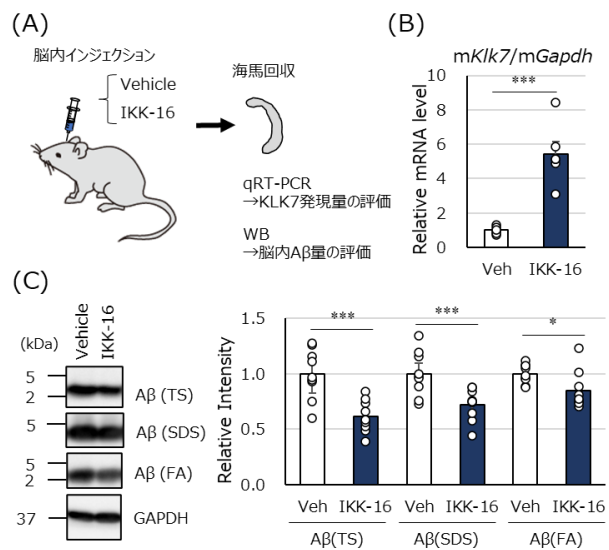


図 5. IKK-16 インジェクションは *Klk7* 発現量を上昇させる

(A) IKK-16 の脳内インジェクションの概略図

(B) 野生型マウスにインジェクションし 24 時間後に回収し qRT-PCR により KLK7 発現量を測定した (n=6, mean±SEM, ***p<0.001 by paired t-test)

(C) *App*^{NL-G-F/NL-G-F} マウスにインジェクションし 48 時間後に回収し脳内 A β 量を測定した (n=9, mean±SEM, *p<0.05 ***p<0.001 by paired t-test)

【総括】

本研究により、アストロサイトにおける A β 分解酵素 KLK7 の発現制御機構として NF- κ B 経路が関与していることを見出した。NF- κ B 経路は免疫応答に関与することが知られており、アストロサイトにおける脳内炎症や細胞外の環境変化への応答に関与している可能性が考えられた。

また IKK 阻害剤である IKK-16 により NF- κ B 経路を阻害すると *Klk7* 発現量が上昇し A β 分解活性が亢進したことから、KLK7 の発現は恒常的に負に制御されている可能性が示唆された (図 6)。今後は末梢からの脳内の NF- κ B 経路を制御できるか、また A β 病態以外の AD 病理に関しても改善が見られるかについても検討したい。

以上より、NF- κ B 経路阻害による KLK7 発現上昇を戦略とした AD の新規創薬ターゲットの開発が期待される。

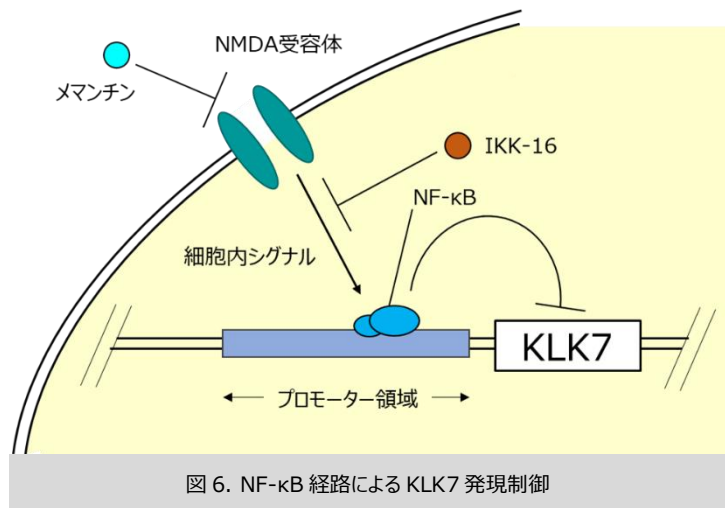


図 6. NF- κ B 経路による KLK7 発現制御