

【序論】

アルツハイマー病(AD)は高齢者の認知症の原因として最も頻度の高い神経変性疾患であり、AD患者が年々増加している現在、その治療法・予防法の確立は急務となっている。これまでの研究から、ADの病理学的特徴である老人斑を構成しているアミロイドβペプチド(Aβ)の凝集および蓄積がADの発症と深く関連しているという「アミロイド仮説」が広く支持されている。また近年の研究から孤発性AD患者ではAβの産生増加ではなく脳内でのクリアランスの低下が発症に寄与していることが示唆されている。Aβクリアランス機構としては、Aβ分解酵素による直接的な分解に加え、血液脳関門を介した排出やミクログリアによる貪食機構が明らかとなっている。今回着目したAβ分解酵素に関しては、神経細胞由来のネプリライシンやミクログリア由来のインシュリン分解酵素などが同定されているが、脳内に最も多く存在する細胞種であるアストロサイトの寄与についてはほとんど解析されていない。私はこのアストロサイトが関与するAβ分解活性に着目し、当研究室により発見されたアストロサイト由来Aβ分解酵素Kallikrein-related peptidase 7 (KLK7)のAβ病態への関与を*In vitro* および*In vivo* モデルを用いて解析し、KLK7を介した治療的介入の可能性について研究を遂行した。

【方法と結果】

1. ヒトアストロサイトーマおよび初代培養グリア細胞を用いたAβ分解活性検討

これまでの検討から、ヒトアストロサイトーマ CCF-STTG1 細胞の上清中にAβ分解活性が認められ、その活性に亜鉛感受性キモトリプシン型セリンプロテアーゼが関与しているということが見出され、その候補分子としてKLK7が想定されていた(木棚 究博士論文)。私はアストロサイトによるAβ分解におけるKLK7の関与を明らかにするために、マウス初代培養グリア細胞を得て、その培養上清について各種プロテアーゼ阻害剤およびKLK7中和抗体を用いて検討した。その結果、初代培養グリア細胞上清におけるAβ分解活性はキモトリプシン型セリンプロテアーゼ阻害剤およびKLK7中和抗体によって抑制された。このことから、グリア細胞からもKLK7が分泌され、Aβ分解活性を示すことが示唆された。またMaltose binding Protein (MBP) タグを付加したりコンビナントKLK7を発現・精製しAβ分解活性を検討したところ、KLK7が直接Aβを分解するプロテアーゼであることが確認された。

2. *Klk7* ノックアウト (KO) マウスを用いた解析

KLK7が*in vivo*においてAβ病態形成に重要な分子であるか検討を行うため、*Klk7* KOマウスを作出し、解析を行った。*Klk7* KOマウスは発生過程において異常を認めなかった。そこで初代培養アストロサイトを得て細胞免疫染色法で検討したところ、野生型(Wild Type; WT)マウス由来アストロサイトにおいてKLK7抗体陽性の顆粒状構造が認められ、*Klk7* KO由来アストロサイトでは反応性が消失した。次にWTおよび*Klk7* KOマウスの脳内内因性Aβ量を測定したところ、雌雄とも約1.5倍の上昇が認められた。更にADモデルマウスである*App*^{NL-G-F/NL-G-F} ノックインマウスとの掛け合わせを行い、Aβ斑の出現時期である3ヶ月齢で解析したところ、*Klk7* KOで可溶性および不溶性タンパク質の増加、そしてAβ斑蓄積の亢進が認められた。また活性化アストロサイトの指標であるGFAPの増加も見られた。また6ヶ月齢においては、脳内可溶性Aβ量の生化学的な差異は認められなかったが、ADの進行に伴いTauタンパク質の異常リン酸化が増加することが知られていることからTauタンパク質のリン酸化を検討したところ、*Klk7* KOで

亢進が認められたことから、KLK7がA β 蓄積に続くAD分子病態進行過程にも影響を与えることがわかった。以上の結果より、KLK7はアストロサイトに由来する、A β アミロイド病態を制御する重要な因子であることが明らかとなった。

3. *In vivo*でのKLK7投与によるA β 量への影響

次にKLK7の発現もしくは活性上昇を介してA β アミロイド病態を改善する可能性を検証する目的で、A β 分解活性を示すリコンビナントKLK7を脳内にインジェクションし、脳内A β 量への影響を検討した。特に内因性KLK7の影響を排除するため、*Klk7* KOマウスの海馬に対して、MBPもしくはMBP-KLK7を注入し解析した。その結果、MBP-KLK7投与群において有意に約40%の脳内内因性A β 量減少を認めた。すなわち、脳内におけるKLK7活性亢進はA β アミロイド病態そしてAD発症に対して治療効果を発揮する可能性があると考えられた。

4. A β 刺激によるKLK7発現量の変動

AD患者脳において老人斑周囲のアストロサイトは活性化状態となり、グリオシスを呈する。そこでA β 刺激および蓄積による*Klk7* mRNAの発現変動について検討した。初代培養グリア細胞に対して毒性分子種であるA β 42処理を行い、qRT-PCR法を用いて測定したところ*Klk7*発現量が有意に上昇した。この時、一般的に炎症性刺激として用いられるLPSを投与しても*Klk7*発現量の上昇は認められなかった。次にADモデルマウス脳における*Klk7* mRNAの発現量を検討した。A β 斑が蓄積している5ヵ月齢時点において*App*^{NL-G-F/NL-G-F}マウスで脳内*Klk7*発現量が有意に増加していた。さらにA β 病態の進行に伴って変化を検討するために13ヵ月齢の*App*^{NL-G-F/NL-G-F}マウスを用いて解析した結果、更なる*Klk7*発現量上昇が認められた。一方、*Klk5*や*Klk6*など他のKLKファミリー分子の発現量に関しては、A β に関連した変化は*in vitro*、*in vivo*ともに認められなかった。すなわち、KLK7はA β アミロイド病態進行に伴って発現変動する炎症性プロテアーゼであり、その応答性にはA β 特異性が存在することを明らかとした。

【総括】

本研究において、A β 分解酵素の候補として発見されたKLK7が*In vitro*および*In vivo*においてA β アミロイド病態に強く関与するということが明らかとし、KLK7活性の亢進がAD治療法となりうることを本研究より示唆した。新潟大学池内健教授との共同研究によりAD患者脳においてKLK7 mRNA発現レベルは有意な低下を示すことが明らかとなっている。一方、健常高齢者では加齢に伴ってKLK7の発現量が上昇する傾向が認められている。ADモデルマウスの月齢を追った解析と合わせて考えると、A β アミロイド病態の増悪に伴って発現量が上昇するが、AD患者脳においては次第に脳内環境（炎症反応、神経毒性など）が変化し、KLK7の発現が低下する方向へシフトするという可能性が示唆された。今後、KLK7の発現調節メカニズムの解明やAD病態の進行に伴う発現Dynamicsの分子機構解明を通して、アストロサイトを創薬標的細胞とした、KLK7活性亢進による画期的AD予防・治療法開発に繋がることが期待される。以上の通り、本研究はADの治療薬および診断薬開発に大きく資するものであり、博士（薬学）の学位に相応しいものと考えられる。