

博士論文（要約）

論文題目 アストロサイト由来アミロイド β 分解酵素Kallikrein-related
peptidase 7の病的機能解明に関する研究

氏 名 建部 卓也

【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 ($A\beta$) 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 $A\beta$ 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。 $A\beta$ クリアランス機構としては、 $A\beta$ 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マイ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 $A\beta$ 分解酵素に関しては、神経細胞由来のネプリライシンやマイ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 $A\beta$ 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 $A\beta$ 分解酵素 Kallikrein-related peptidase 7 (KLK7) の $A\beta$ 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 $A\beta$ 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 $A\beta$ 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 $A\beta$ 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 $A\beta$ 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、 $A\beta$ 分解活性を示すことが示唆された (図 1A-C)。また Maltose binding Protein (MBP) タグを付加したリコンビナント KLK7 を発現・精製し $A\beta$ 分解活性を検討したところ、KLK7 が直接 $A\beta$ を分解するプロテアーゼであることが確認された (図 1D)。

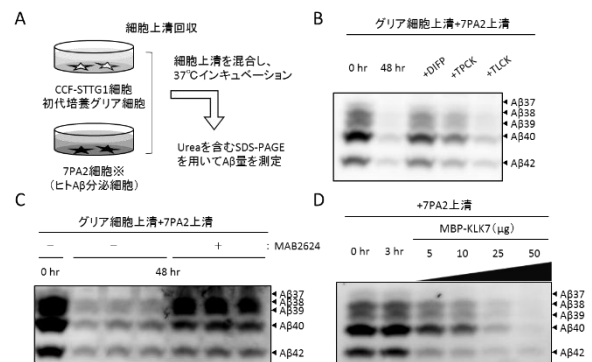


図1 初代培養グリア細胞上清中の $A\beta$ 分解活性にはキモトリプシン型セリンプロテアーゼが関与し、その活性にはKLK7が関与する
(A) 細胞上清を用いた $A\beta$ 分解活性測定方法
(B) 初代培養グリア細胞上清中に各種プロテアーゼ阻害剤を加えた際の $A\beta$ 分解活性変化 (DIPP: セリン, TPCK: キモトリプシン型, TLCK: トリプシン型)
(C) 初代培養グリア細胞上清中にKLK7中和抗体 (MAB2624)を加えることによる $A\beta$ 分解活性
(D) KLK7タンパク質による $A\beta$ 分解活性の検出
※7PA2上清: Chinese Hamster Ovary細胞に $A\beta$ 産生を増加させる家族性AD変異 (V717F)を恒常発現させた細胞の上清

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 $A\beta$ 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j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 (図 2A)。次に WT および *Klk7* KO マウスの脳内内因性 $A\beta$ 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

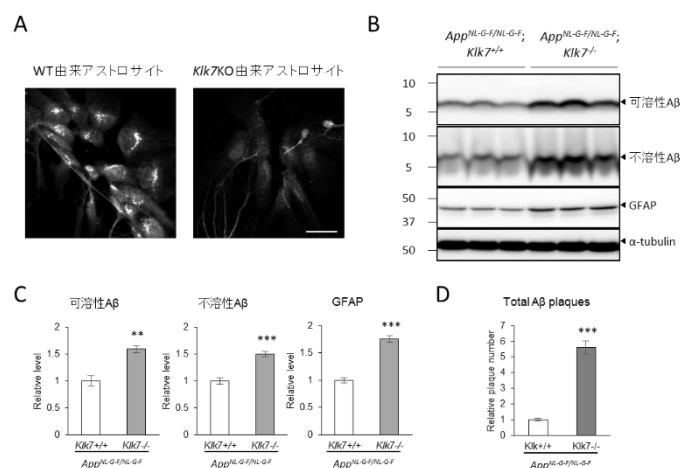


図2 *Klk7*KOマウスを用いた解析
(A) WTおよび*Klk7*KO由来アストロサイトを用いた細胞免疫染色検討 (Bar 50 μm)
(B) *App*^{NL-G-F/NL-G-F};*Klk7*^{+/+}および*App*^{NL-G-F/NL-G-F};*Klk7*^{-/-}の可溶性 $A\beta$ 、不溶性 $A\beta$ および活性化アストロサイト(GFAP)タンパク質のウエスタンブロット解析
(C) ウエスタンブロット解析による可溶性および不溶性 $A\beta$ の定量結果 (*Klk7*^{+/+} n=5, *Klk7*^{-/-} n=4, mean ± s.e.m. ***p<0.001 by Student's t-test)
(D) 大脳皮質における $A\beta$ 斑蓄積 (*Klk7*^{+/+} n=4, *Klk7*^{-/-} n=3, mean ± s.e.m. ***p<0.001 by Student's t-test)

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、 $A\beta$ 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 $A\beta$ 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 (図 2B-D)。また6ヶ月齢においては、脳内可溶性 $A\beta$ 量の生化学的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 $A\beta$ 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、 $A\beta$ 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 $A\beta$ 量への影響

次に *KLK7* の発現もしくは活性上昇を介して $A\beta$ アミロイド病態を改善する可能性を検証する目的で、 $A\beta$ 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 $A\beta$ 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 $A\beta$ 量減少を認めた (図 3)。すなわち、脳内における *KLK7* 活性亢進は $A\beta$ 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。

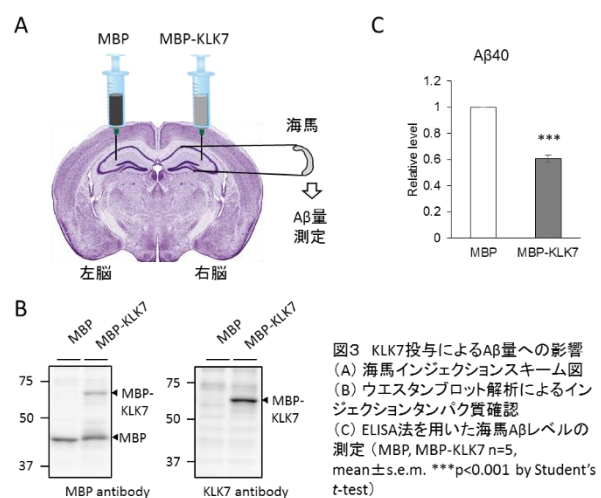


図3 *KLK7*投与による $A\beta$ 量への影響
(A) 海馬インジェクションスキーム図
(B) ウエスタンブロット解析によるインジェクションタンパク質確認
(C) ELISA法を用いた海馬 $A\beta$ レベルの測定 (MBP, MBP-*KLK7* n=5, mean ± s.e.m. ***p<0.001 by Student's t-test)

4. Aβ 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 Aβ 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 Aβ42 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 (図 4A)。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。Aβ 斑が蓄積している 5 ヶ月齢時点において *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 (図 4B)。さらに Aβ 病態の進行に伴って変化を検討するために 13 ヶ月齢の *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 (図 4C)。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、Aβ 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 Aβ 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 Aβ 特異性が存在することを明らかとした。

【総括】

本研究において私は、Aβ 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 Aβ アミロイド病態に強く関与するということが明らかとなり、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 (図 5A、B)。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、Aβ アミロイド病態の増悪化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・治療法開発を目指していきたいと考えている。

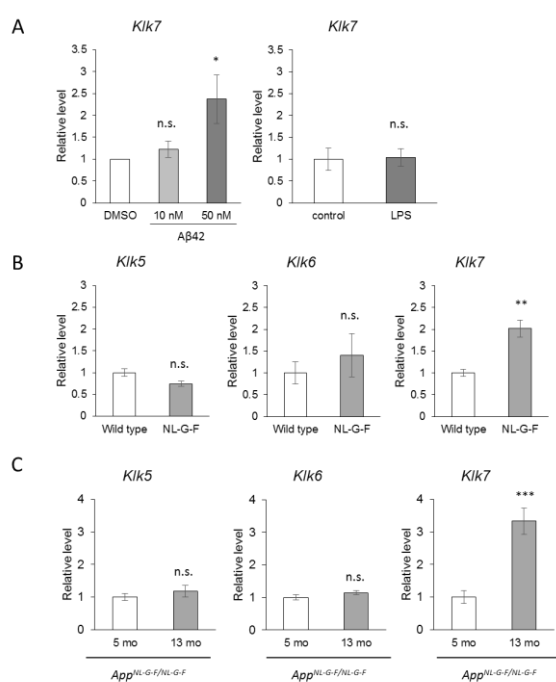


図4 アストロサイトに対するAβ刺激およびADモデルマウスを用いたKLK7発現量変動 (A) 初代培養グリア細胞に対するAβ42およびLPS刺激による*Klk7* mRNA変化 (n=5, mean ± s.e.m. *p<0.05, n.s. not significant, by Student's t-test) (B) 5ヵ月齢のWild typeと*App*^{NL-G-F/NL-G-F}における*Klk5*, 6および7の発現量変動 (n=5-6, mean ± s.e.m. **p<0.01, n.s. not significant, by Student's t-test) (C) 5および13ヵ月齢の*App*^{NL-G-F/NL-G-F}マウスを用いた*Klk5*, 6および7の発現量変動 (n=5-6, mean ± s.e.m. ***p<0.001, n.s. not significant, by Student's t-test)

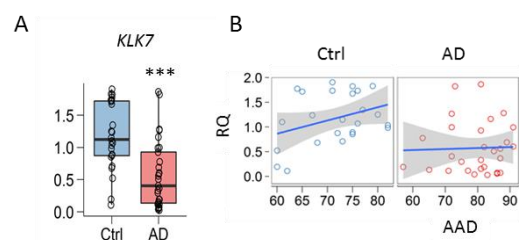


図5 ヒトAD脳におけるKLK7の発現量変動 (A) KLK7の配列内にTaqManプローブを設定し、内在性コントロールGUSBを用いて発現解析を行った。 (B) CtrlとAD患者脳の加齢におけるKLK7発現量変動 (Control n=24, AD n=29, ***p<0.001, Mann-Whitney U-test between Ctrl and AD) (RQ: Relative Quantification, AAD: Age at death)