

学位論文題名

Alcadein 代謝産物 p3-Alc の γ 切断サイトの解析による 孤発性アルツハイマー病発症機構の解明

学位論文内容の要旨

【序論】

Alcadein (Alc)は主に神経系に発現する I 型膜タンパク質であり、細胞質タンパク質 X11L を介して、アルツハイマー病 (AD) 原因因子の一つであるアミロイド前駆体タンパク質 (APP) と複合体を形成する。APP は β - または α -セクレターゼによる一次切断後、 γ -セクレターゼによる二次切断を受けることで、 $A\beta$ または p3 ペプチドを分泌する。 $A\beta$ は AD の病理学的特徴である老人斑の主要構成成分であり、 γ -セクレターゼの切断部位の違いにより $A\beta_{40}$ と $A\beta_{42}$ が主に生成する。特に、凝集性や神経毒性が高い $A\beta_{42}$ がアルツハイマー病発症に関与していると考えられているが、その凝集性の高さから AD 患者における $A\beta$ の質的な変化をとらえることは難しい。Alc は α -セクレターゼによる一次切断を受けた後 γ -セクレターゼによる二次切断されるという APP 様の代謝を受けることにより、細胞外に p3-Alc を分泌する。APP と Alc は代謝様式の類似性を持ち、AD 病態脳において APP と Alc が共局在することが明らかになっていることから、Alc の代謝を解析することにより、AD 発症機構の解明や新規バイオマーカーの開発につながる可能性があると考えられる。本研究では、Alc の二段階切断産物 p3-Alc の γ 切断サイトの解析を行った。

【結果と考察】

Alc と APP の γ 切断の相関性

培養細胞の上清中に分泌された p3-Alc を免疫沈降後、MALDI TOF/MS 解析を行い、p3-Alc のアミノ酸配列の決定を行った。その結果、 γ -セクレターゼ切断サイトの異なる複数のペプチドが分泌されていることが明らかとなった。

家族性 AD 患者において、 γ -セクレターゼの触媒サブユニットである PS1 に遺伝子変異が見つかっており、その多くは APP の γ 切断に変化を引き起こし、病原性や神経毒性の高い $A\beta_{42}$ の生成量増加をもたらす。これらの変異体が Alc の γ 切断に対する影響を検討した。その結果これらの変異体は Alc の γ 切断の変化も引き起こすことを明らかとした。この変化は APP と Alc

さらには A β C ファミリー間でまったく同じではなかったことから、A β C ファミリーの γ 切断変化を検出することによってさまざまな γ 切断機能変化を捉えることができることが示唆した。

ヒト生体内での A β C の γ 切断

AD 患者の脳で見られる老人斑の A β 42 は凝集性が高く、生体内での正味の質的变化は捉えにくい。凝集性のない p3-A β C が生体内での γ 切断の質的变化を検出できれば γ セクレターゼの機能変化をとらえることができる診断マーカーとなる。

ヒトの脳脊髄液 (CSF) から、p3-A β C を免疫沈降によって回収し、MALDI TOF/MS で検出を行った。その結果、培養細胞と同じ γ 切断サイトで二次切断を受ける p3-A β C ペプチドの存在を確認できた。また PS1 遺伝子変異を持つヒトの CSF 中からの p3-A β C を解析した結果、ヒト生体内においても、p3-A β C は培養細胞と同様の γ 切断変化を捉えることができることを示した。

孤発性 AD 患者における p3-A β C の γ 切断の変化

次に孤発性アルツハイマー病患者の CSF 中の p3-A β C の γ 切断サイトにどのような変化がみられるのかを検証した。国際的な認知症の評価基準である CDR (Clinical Dementia Rating) は、正常の 0 から、重症度の 3 までの 5 段階で行われ、CDR 0.5 は、最軽度アルツハイマー型認知症と位置づけられている。

私は CDR 0 と、CDR 0.5 と CDR 1、他の神経疾患群の CSF サンプル (n=158) について p3-A β C の γ 切断サイトについての解析を行った。p3-A β C を IP-TOF/MS により検出し、A β 40 と A β 42 はそれぞれ sELISA により定量した。培養細胞を用いた実験において A β 42/40 との相関性が最も高かった p3-A β C 38/35 のピーク比を求めて、それぞれを A β 42/40 比に対してプロットした結果、CDR 0.5 と CDR 1 の軽度 AD 患者群において、p3-A β C 38/35 と A β 42/40 の間に正の相関がみられた。この傾向は、PS1 変異体を発現させた培養細胞から分泌された p3-A β C と同じ傾向であった。一方、コントロール群 (CDR 0) と他の神経疾患群においては、軽度の AD 群とは異なる相関傾向がみられた。AD 群と、コントロール群および他の神経疾患群の傾きには統計的に有意差があった。

これらのことより、PS 遺伝子に変異を持たない一定数の孤発性アルツハイマー病患者においても、発症初期から γ セクレターゼの切断が変化している可能性があることを示唆した。

【まとめ】

本研究では、一定数の孤発性 AD 患者の発症機構として、PS に遺伝子変異がなくても γ セクレターゼの機能変化が関与することを示唆し、また p3-A β C が γ セクレターゼの機能変化を検出するマーカーとなりうることを示した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 鈴 木 利 治
副 査 教 授 有 賀 寛 芳
副 査 准教授 山 本 融
副 査 講 師 米 田 宏

学 位 論 文 題 名

Alcadin 代謝産物 p3-Alc の γ 切断サイトの解析による 孤発性アルツハイマー病発症機構の解明

Alcadin ファミリーは、進化的に保存され神経で強く発現する I 型膜タンパク質であり、ヒトおよびマウスでは独立の遺伝子がコードする Alcadin α (Alc α)、Alcadin β (Alc β) および Alcadin γ (Alc γ) の 3 種類からなる。Alcadin は、脳神経細胞で細胞質アダプター分子 X11-like (X11L) との結合を介して、家族性アルツハイマー病 (FAD) 原因遺伝子であるアミロイド前駆体タンパク質 APP と三量体を形成する。APP と Alc は、脳内分布と神経細胞におけるキネシン-1 カーゴとしての機能が相同もしくは相似である。また、Alc はアルツハイマー病 (AD) 患者脳内の老人斑周辺部に存在する腫大神経突起部に APP と集積して共局在することから、AD 発症に関わるタンパク質であると考えられている。これまでに、Alc は APP と同じ代謝制御を受けることが明らかになってきたが、その代謝様式の詳細は未解明であった。本論文の前半では、3 種類の Alc (以下、Alcs) が APP の α セクレターゼである ADAM10 および ADAM17 で一次切断を受け、さらに γ セクレターゼによる膜内切断を受ける事を実証し、その切断サイトを MALDI-MS/MS 解析により決定した。2 回の連続する切断により APP の p3 分子に相当する p3-Alc が生成する事を見だし、Alc α 由来の p3-Alc α 、Alc β 由来の p3-Alc β 、Alc γ 由来の p3-Alc γ の全一次構造を決定した。さらに、FAD 原因遺伝子である γ セクレターゼの活性ユニットプレセニリン 1 (PS1) の発症性変異が Alc の切断サイトを変化させるが、その変化の度合いは変異の場所と Alc ファミリーにより様々な程度で表れることを示した。変化した切断部位を全て同定した。PS1 遺伝子変異により生成した minor p3-Alc 分子種の major 分子種に対する割合は、同じく変異により APP から生成量が変化する発症性 minor A β 42 の major A β 40 に対する比率 (A β 42/40 比) と強い相関性を示した。これは、 γ セクレターゼの機能変化が、基質タンパク質の切断変化に及ぼす感受性が一様では無いことを示し、かつ Alc が γ セクレターゼの様々な機能変化を検出しやすい基質であることを示した初めての成果である。

論文の後半では、この成果を受けて各 p3-Alc 分子種に対する様々な特異抗体を作製し、ヒト脳脊髄液 (CSF) を用いた p3-Alc 微量成分の解析に取り組んだ。158 検体のヒト CSF より抗体を用いて回収した p3-Alc α を MALDI-TOF/MS 法で解析し、p3-Alc α の minor/major 分子種比率を解析したところ、AD 患者 (CDR 0.5 および 1) では、PS1 変異を細胞に発現させた場合と同様に A β 42/40 比率と正の相関を示した、これに対し、同年齢健康人および他の神経疾患の患者では負の相関を示し、統計学的に相関性が AD 患者に特徴的であることを明らかにした。これは、PS 遺伝子に変異を持たない孤発性 AD 患者で γ セクレターゼの機能変化を示した初めての例である。すなわち、本研究は、一定の割合の孤発性 AD 患者の発症原因として、PS 遺伝子の変異に依存しない γ セクレターゼの機能変化があることが初めて示した。

本論文の成果は、発症原因が不明(おそらく多様)である孤発性 AD の患者群に対して、一つの発症原因を示し、生化学的診断法と適切な薬物療法を確立する道を拓いた極めて独創的かつ先進的な研究であり、創薬過程における効果の検定を含む患者の治療法や病気の予防法の開発に大きく貢献する、薬学領域の博士号に相当する価値の高い研究である。

これは、ようするに、著者は p3-A β の生成機構を生化学的に解明し、その物性を明らかにした上で、p3-A β が凝集性を示さない特性を利用してヒト CSF 中の p3-A β 分子種を詳細に解析することにより、発症原因が不明であった孤発性 AD 患者の一定割合の発症原因が遺伝子変異に依存しない γ セクレターゼによる膜内切断変化であることを示唆した。その成果は、 γ セクレターゼの機能変化によって発病する AD 患者を同定し、これまで、発症原因が不明の孤発性 AD 患者で行われて、一定した効果が得にくかった薬物の治験を、発症原因別に分けて行う事で再評価が得られることが可能であることを示唆したなど、診断・創薬に貢献することが大いなるものがある。

よって著者は、薬学領域の大学院課程である生命医薬科学コース博士課程を修了し、北海道大学博士(生命科学)の学位を授与される資格があるものと認める。