

論文の内容の要旨

論文題目 アルツハイマー病に特異的に作用する
 神経細胞死拮抗因子 Humanin の解析

氏 名 新 倉 貴 子

アルツハイマー病 (AD) は痴呆を主徴とする進行性の神経変性疾患で、有病率が加齢と共に増加することから、早期診断、及び、根治的治療法の確立への希求が社会の高齢化に伴い著しく高まっている。AD は特定の原因が不明の孤発性 AD と遺伝子の変異が原因である家族性 AD (FAD) に分類される。脳の病理学的所見としては異常構造物である老人斑、神経原線維変化、神経細胞死が認められる。AD は神経細胞の脱落による欠失障害と考えられることから、神経細胞死は AD 治療法開発の重要な標的である。FAD 患者数は AD 全体の 1% 以下でしかないが、遺伝子の変異が原因である単一遺伝子病であることから、病態の分子レベルでの研究にとりわけ適している。FAD の原因遺伝子として今までにアミロイド前駆体蛋白 (APP)、プレセニリン (PS) 1 及び PS 2 が発見されている。FAD の原因遺伝子の変異体は神経細胞死を直接誘導できるが、その細胞死機構の詳細な解析により、遺伝子や変異体の種類によって細胞死を誘導する細胞内経路が異なることが明らかにされてきている。そこで、細胞死機構にはとらわれずに神経細胞死抑制分子を探索する無作為スクリーニングを実施した。

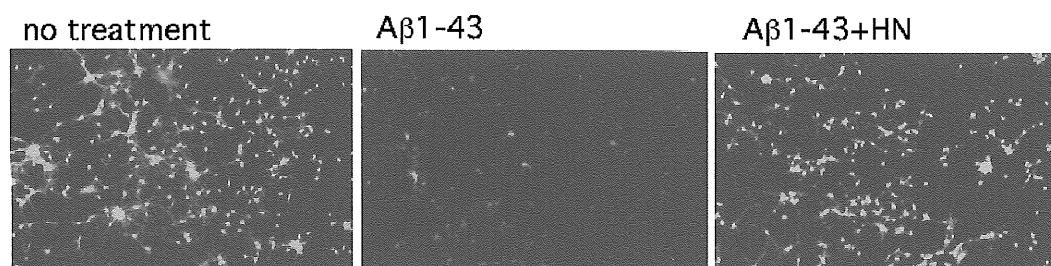
HN は AD の細胞死侵害刺激に特異的な細胞死抑制因子である

FAD の原因である第 642 番目の Val が Ile に置換した APP 変異体、V642I-APP の惹起

する細胞死に拮抗しうる因子を探索する機能的スクリーニングを実施し、新規の因子ヒューマニン (Humanin:HN) を得た。HN はアミノ酸 24 残基から成るポリペプチドで、配列は MAPRGFSCLLLLTSEIDLPKRRA である。HN の合成ペプチドを V642I-APP cDNA を導入した培養神経細胞 F11 の培地に添加すると、V642I-APP が惹起する細胞死を用量依存的に抑制し、1-10 μ M で空ベクターを導入した陰性対照と同程度の細胞死率にまで抑制した。また、第 14 番目の Ser (Ser14)を Gly に置換する (Humanin G: HNG)と 1000 分の 1 の濃度である 10nM で完全な細胞死抑制活性を示した。一方、Cys8 を Ala に置換すると活性は完全に消失した。

HN は FAD 遺伝子変異体である 4 種類の APP 変異体、5 種類の PS1 変異体、2 種類の PS2 変異体が培養神経細胞 F11 に惹起する細胞死を全て抑制した(表 1)。また、老人斑の主な構成成分であるベータアミロイド(A β)が初代神経細胞に誘導する細胞毒性については、HN 前処理により細胞死も神経突起の変性も完全に阻止された(図 1)。更に、APP 細胞外領域を認識する抗 APP 抗体が初代神経細胞に誘導する細胞死も抑制した。一方、ハンチントン病や脊髄小脳変性症の原因とされる長鎖ポリグルタミン(Q79)、家族性筋萎縮性側索硬化症の原因遺伝子の SOD1 変異体、抗癌剤のエトポシド、クロイツフェルト・ヤコブ病の原因のプリオンペプチドが惹起する神経細胞死には HN は全く効果がなかった。これらの結果から、HN は AD の侵害刺激に特異的な細胞死抑制因子であると示唆された。

図 1 A β による初代神経細胞死に対する HN の効果



マウス大脳皮質初代神経細胞の蛍光顕微鏡像。Calcein-AM により生細胞を可視化した。細胞は 25 μ MA β 1-43 処理により死滅するが(中央)、10 μ M HN 存在下(右)では未処理細胞(左)と同様に、細胞体、神経突起ともにほぼ完全な形態を保っている。

表 1 HNが有効なAD関連細胞侵害因子

細胞死誘導因子	細胞	HNが有効な細胞死誘導因子の内容				
APP変異体	培養神経細胞F11	V642I	K595N/M596L	A617G	L648P	
PS1変異体	培養神経細胞F11	M146L	H163R	A246E	L286V	C410Y
PS2変異体	培養神経細胞F11	N141I	M239V			
抗APP抗体	大脳皮質初代神経細胞	22C11				
A β ペプチド	大脳皮質初代神経細胞	A β 1-42	A β 1-43	A β 25-35		

HN の 1 次構造と活性との関連性

HN の欠損変異体を用いて V642I-APP の誘導する細胞死への抑制効果を調べたところ、HN の活性に必要な最小領域は Pro3 から Pro19 までの 17 残基であった。この 17 残基のうち、Pro3, Cys8, Leu9, Leu12, Thr13, Ser14, Pro19 を Ala に置換すると活性が消失し、これら 7 残基が必須であることがわかった。

HN の Cys8 の Ala への置換体や SH 基を S-S 結合させた 2 量体 HN は細胞死抑制効果が消失または低減した。Cys8 の他のアミノ酸への置換体を用いて V642I-APP の誘導する細胞死への効果を調べたところ、塩基性アミノ酸 Lys と Arg の置換体は Cys とほぼ同様の細胞死抑制活性を示した。よって、SH 基を持たない Lys または Arg への Cys8 の置換体は生体内修飾の影響を受けず、生体への投与に適すると考えられた。

生体内での蛋白質分解酵素への耐性を考慮し、HN 配列中のトリプシンとキモトリプシンの切断部位、Arg4 と Phe6 を Ala に置換した HNG (AGA-HNG) の効果を HNG と比較した。AGA-HNG は HNG の 3 から 10 倍の活性を示し、現時点で最も活性の強い HN 誘導体であることがわかった。

以上の構造活性相関は FAD 変異体と A β による細胞死において共通であったことから、HN は同一の機序でこれら全ての細胞死に拮抗すると推察された。

HN の作用機序

HN は A β の細胞毒性に拮抗するので、HN が FAD 変異体の誘導する細胞死を抑制する作用機序は A β の産生抑制ではないかと考えられた。A β 産生増加をもたらす K595N/M596L-APP を導入した培養神経細胞 F11 から分泌される A β の量を HN 存在下で測定したところ、細胞毒性のある A β 42 も細胞毒性のない A β 40 も HN および HNG の存在下で産生量の変化は認められず、HN は A β 産生には関与しないと考えられた。

HN 遺伝子を細胞に導入すると HN は細胞外に分泌される。Leu9 の Arg への置換体 (HNR) は細胞内には発現するものの細胞外への分泌能は消失し、細胞死抑制効果も認められなかった。しかし、HNR 合成ペプチドを V642I-APP を導入した細胞に添加すると細胞死が抑制された。このことから、HN は細胞外からのみ作用することが示唆された。さらに、放射性標識した HNG は F11 細胞に特異的に結合し、HN の特異的な結合分子が細胞外に存在することが示唆された。

HN による細胞内反応を知るため、アポトーシスの際活性化されるプロテアーゼ、caspase3 について調べた。アポトーシス型の細胞死を惹起する V642I-APP による caspase3 の活性化は HN 存在下では認められず、HN の細胞死抑制効果が caspase カスケードの

上流に働くことを示唆した。また、細胞内シグナル伝達因子の阻害剤として、wortmannin、PD98059、genistein について調べたところ、HN の細胞死拮抗作用は genistein のみで抑制された。よって、HN は PI-3 キナーゼや MAP キナーゼではなく、チロシンキナーゼによって細胞死抑制活性を起こすと考えられた。さらに、チロシンキナーゼのひとつ JAK キナーゼの阻害剤 AG490 が初代神経細胞への A β の毒性に対する HN の拮抗作用を阻止したことから、HN の細胞死抑制活性は JAK/STAT 系を介すると推察された。

初代神経細胞への A β の細胞毒性に拮抗しうる因子として、insulin-like growth factor I (IGF-I)、basic fibroblast growth factor (bFGF)、activity-dependent neurotrophic factor 9 (ADNF9) が報告されている。FAD 遺伝子変異体による細胞死に関しては、V642I-APP には全ての因子が拮抗したが、NL-APP に拮抗したのは ADNF9 だけであった。PS1 と PS2 の変異体に対しては全ての因子が拮抗しなかった。IGF-I 及び bFGF は抗アポトーシス作用を持つことから、これらの因子はアポトーシスによる細胞死のみを抑制すると考えられた。一方、全ての FAD 変異体遺伝子による細胞毒性に拮抗できる HN は AD に関する侵害刺激によるアポトーシス、非アポトーシス両方の細胞死を抑制しうると推察された。

HN の細胞死抑制効果は AD の侵害刺激に対して高い特異性が認められ、HN がより副作用の低い AD 治療薬となることを示唆した。HN の活性はその 1 次構造に依存しており、アミノ酸の置換により活性の高い誘導体を得られたことから、より低濃度で活性を持つ HN 誘導体を作成して臨床応用できる可能性が示唆された。HN は A β の産生を阻害せず、むしろ細胞外の特定の分子に結合して細胞死抑制活性を起こすと考えられた (図 2)。このことから、HN は A β を標的とした他の治療法、A β 産生阻害剤などの併用によってより広範な AD 治療に役立つと考えられた。HN の生体内での安定性や毒性、作用機序の詳細な解明などの検討が今後の課題であるが、今回明らかにした HN の特性は HN が新しい AD 治療薬のシードとして期待できる因子であることを示すものである。

図 2. HNによる神経細胞死抑制の作用標的的模式図

ADにおける神経細胞死は FAD変異体によって直接誘導される細胞死と A β の毒性による細胞死の2種類があると考えられる。HNはこの両方の細胞死を抑制するが、A β 産生には影響しない。

