

## 論文の内容の要旨

論文題目 アルツハイマー病発症に関わる BACE1 の機能解析と阻害剤の開発

氏 名 服 部 千 夏

### I. 背景

急速な高齢社会を迎えたわが国では、老人人口の激増とともに痴呆疾患が急増している。現在、わが国では 65 歳以上の痴呆性老人が 100 万人以上おり、その 9 割をアルツハイマー病 (AD) と脳血管性痴呆症の患者が占める。

痴呆の医学的研究が進むにつれ、これまでのところ脳血管性障害については、動脈硬化症の治療や高血圧の管理などによって著しい予防効果があげられ、これに伴う痴呆症状も軽減されつつある。これに対して AD については、いまだ有効な治療法が確立されておらず、その発症機構および原因の解明、さらには治療法・予防法の確立に対する社会的要望が強まっている。

AD は、著明な記憶力障害を中心とした進行性の痴呆を呈する神経変性疾患である。AD 脳における特徴的な病理所見は、1) 神経細胞外における老人斑の出現、2) 神経細胞内における神経原線維変化、3) 神経細胞の脱落による大脳萎縮、の 3 点であり、これらは AD の診断基準としても重視されている。

本研究では、AD に対しての疾患特異性が高く、かつ初期病変である「老人斑の出現」に着目し、老人斑を構成する主要構成成分であるアミロイド  $\beta$  タンパク質 ( $A\beta$ ) の産生が、AD 発症の根本的原因と捉え、 $A\beta$  の産生に関わる主要な酵素である BACE1 (beta-site APP cleaving enzyme 1) の生理的機能について解析し、それに基づいた BACE1 阻害剤を検討した。

## II. 研究内容

A $\beta$  は、前駆体タンパク質である APP (amyloid precursor protein) から切り出される。この APP の代謝には、 $\alpha$ -、 $\beta$ -、そして  $\gamma$ -セクレターゼとよばれる 3 種のプロテアーゼが関与している。通常、脳内では  $\alpha$ - および  $\beta$ -セクレターゼが、基質となる APP をめぐって競合している。正常脳においては、 $\alpha$ -セクレターゼによる APP 切断 (A $\beta$  非産生経路) が主要な経路となっているのに対し、AD 脳においては  $\beta$ -セクレターゼによる APP 切断経路 (A $\beta$  産生経路) の方へバランスが傾いていると考えられている。

このことから、 $\alpha$ -セクレターゼ活性の賦活促進あるいは  $\beta$ -セクレターゼ活性の阻害、もしくは A $\beta$  産生への最後のステップとなる  $\gamma$ -セクレターゼ活性の阻害が、A $\beta$  産生を抑制することになり、現在これに基づいた AD 治療薬の開発が盛んに行なわれている。

本研究ではまず、BACE1 の作用部位として機能的膜ドメイン raft に注目し、BACE1 活性を調節する因子として flotillin-1 (FLOT-1) を発見した。また、BACE1 の作用部位は分泌経路とエンドサイトーシス経路の 2 つあり、前者では ST6Gal I が、後者では APP が基質となっていて、BACE1 はこの 2 つの基質に対して独立に作用している可能性が示唆された。

### II-1. BACE1 相互作用分子の探索

BACE1 による APP 切断は、細胞膜上の raft とよばれる構造で行なわれるとの報告がある。本研究では、raft を構成する主要タンパク質 caveolin-1 (CAV-1)、FLOT-1 と BACE1 との相互作用を検討するため、それら分子間の結合実験を行なった。また、CAV-1 と FLOT-1 を過剰に発現させることにより BACE1 の  $\beta$ -セクレターゼ活性にどのような影響を与えるかを調べた。

免疫沈降法による結合実験の結果、BACE1 は CAV-1 と FLOT-1 の両タンパク質と結合することが分かった。また、CAV-1 と FLOT-1 を過剰発現させることにより、 $\beta$ -セクレターゼ活性が抑制される傾向がみられた。

これらのことから、raft 構成タンパク質である CAV-1 と FLOT-1 は、BACE1 と細胞内で相互作用するが、構成タンパク質の過剰発現により raft 構造が変化し、APP 代謝が強く影響された結果、 $\beta$ -セクレターゼ活性が抑制されたと考えられる。

## II-2. BACE1 の作用部位と阻害剤の解析

BACE1 ノックアウトマウスは、ほとんど行動学的な異常が見られないという報告から、AD 治療薬の標的分子として BACE1 が一層の注目を集めることになった。

一方、近年、BACE1 の生理的基質として糖転移酵素 ST6Gal I が発見され、BACE1 ノックアウトマウスにみられる抗体量の異常が糖鎖変化に基づく可能性が報告された。このことは、AD 治療薬の標的として、BACE1 の働きを抑えすぎると副作用を生ずる可能性を示している。

本研究では、薬剤による副作用という観点から、薬剤の標的となる分子 BACE1 の生理的機能を解析することを目的とし、病的基質 APP と生理的基質 ST6Gal I に対して、前者に選択性のある阻害剤の開発を目指し、*in vitro* および培養細胞レベルでの有効性を検討した。

まず、BACE1 による APP と ST6Gal I の切断の経路について調べるため、エンドサイトーシス阻害剤を用いて、両基質に対する BACE1 活性への影響を比較した。また、コレステロール除去剤を用いて、APP 切断と raft との関係を検討した。さらに、BACE1 阻害剤 KMI-358 を用いて、両基質に対する BACE1 活性への阻害効果を比較した。

この結果、STGal I 切断は分泌経路において起こるのに対し、APP 切断はエンドサイトーシス経路において起こることが確認された。また、この切断経路の違いにより、AD 治療薬としての BACE1 阻害剤について、病的基質 APP に対して選択的に阻害効果をもつ化合物の開発が可能であることが示唆された。