

審査の結果の要旨

氏名 橋本唯史

アルツハイマー病 (AD) は初老期に発症し、進行性の認知記憶障害を主症状とする神経変性疾患である。AD 患者脳では広汎な神経細胞死に加え老人斑と呼ばれるアミロイド蓄積が出現する。老人斑アミロイドは主に amyloid β -peptide ($A\beta$) が凝集、線維化して蓄積したものである。 $A\beta$ はその前駆体蛋白 APP よりまず β -secretase、次いで γ -secretase によって 2 段階の切断を受け分泌されたものであり、 γ -secretase の切断部位の多様性により主に 40 番バリンドで終わる $A\beta_{40}$ と 42 番アラニンで終わる $A\beta_{42}$ の分子種が存在する。 $A\beta_{42}$ は $A\beta_{40}$ に比べ凝集性が高く、AD 脳において最初期に蓄積する分子種である。さらに AD の一部に存在する常染色体優性遺伝形式を示す家族性 AD の病因遺伝子として APP 及び γ -secretase の活性中心である presenilin 1, presenilin 2 が同定され、それらの変異が $A\beta_{42}$ の産生を亢進させる効果を持つことがわかった。これらの知見から AD 発症メカニズムとして細胞外に分泌された $A\beta$ が凝集、線維化するのに伴い神経細胞死が生じると考えるアミロイド仮説が提唱されている。

免疫組織化学的な検討から老人斑には $A\beta$ 以外に多くの非 $A\beta$ 成分が蓄積していることが知られており、これらの成分は $A\beta$ の凝集、蓄積、または代謝に影響を与えている。Apolipoprotein E (apoE) は *in vivo* レベルで $A\beta$ の凝集を加速することが知られ、また疫学調査から apoE に存在する $\epsilon 2, \epsilon 3, \epsilon 4$ の 3 つの遺伝多型のうち $\epsilon 4$ アレルが AD の危険因子となることが示されている。このように老人斑に蓄積する非 $A\beta$ 成分は $A\beta$ との相互作用を介してアミロイド蓄積に影響を与えていることが考えられ、その研究は AD 発症メカニズムを明らかにする上で重要である。

申請者は老人斑に含まれる非 $A\beta$ 成分を同定することを目的として、AD 脳老人斑アミロイドをマウスに免疫し、モノクローナル抗体 mAb9D2 を得た。MAb9D2 は老人斑アミロイドを特異的に認識し、生化学的解析により AD 脳老人斑の不溶性アミロイド画分に約 50 kDa と 100 kDa のバンドを認識した。そして AD 脳老人斑アミロイドを精製し、その抗原として新規蛋白質 CLAC (collagenous Alzheimer amyloid plaque component) を同定した。さらにヒト脳 cDNA library より CLAC をコードする前駆体蛋白 CLAC-P (CLAC precursor protein) をクローニングした。CLAC-P は膜貫通領域を持ち、II 型の配向性を持つ膜貫通型コラーゲンであり、神経細胞特異的な発現が確かめられた。また CLAC の老人斑への蓄積は $A\beta_{42}$ の蓄積に次いで生じる早期病変であるが、 $A\beta_{40}$ がその後蓄積し形成する蛍光色素 thioflavin S 陽性の β シート構造が豊富なアミロイド線維には蓄積しないことも分かった。これらの結果は CLAC が $A\beta$ 線維に対し高い親和性を持ち、早期から AD の病態に関与していることを示唆したが、アミロイド蓄積に対しどのような影響を及ぼしているかは不明であった。そこで申請者は CLAC が AD 発症に及ぼす影響を検討することを目的とし、まず CLAC が CLAC-P から産生する代謝様式について検討し、さらに CLAC と $A\beta$ の相互作用メカニズムを明らかにし、CLAC が $A\beta$ の凝集過程に与える影響について検討した。

(I) CLAC の産生様式に関する検討

AD 脳アミロイド画分から粗精製した CLAC に対し CLAC-P の各 NC 領域を抗原として作製した特異抗体でイムノブロット解析したところ、細胞外領域に対する抗体では 50, 70, 100 kDa のバンドを認識したのに対し、細胞内領域に対する抗体で認識されるバンドは認められなかった。またヒト CLAC-P 遺伝子を恒常発現した HEK293 細胞では約 80 kDa の CLAC-P 全長蛋白質に加え、培養上清中に約 70 kDa の分泌型 CLAC-P (sCLAC) を認めた。これらの結果から一回膜貫通型蛋白である CLAC-P がプロテアーゼ作用により切断を受け、細胞外領域を分泌する可能性が示唆された。そこで CLAC-P の細胞外部分の $_{107}\text{KIRIAR}_{112}$ 領域に注目した。この配列は proprotein convertase family の 1 つである furin の認識配列 (BXXBXX; B はリジンまたはアルギニン残基) であり、CLAC-P は furin によって 112 番アルギニンと 113 番 グルタミン酸の間で切断を受けカルボキシ断片が sCLAC として分泌される可能性を考えた。

そこで furin 活性を欠く CHO-K1 由来細胞株である RPE.40 細胞にヒト CLAC-P cDNA を遺伝子導入したところ、培養上清中の sCLAC 分泌が消失し、さらに furin をレスキューすると分泌が回復することが示された。また $_{107}\text{KIRIAR}_{112}$ を KIAIAA と置換した変異型 CLAC-P (RAmt) を COS-1 細胞に遺伝子導入するとやはり sCLAC の分泌が消失し、CLAC-P は furin によって切断を受け、細胞外領域を分泌することが確かめられた。sCLAC のアミノ末端にはグルタミン酸残基が露出することから、翻訳後修飾を受けアミノ末端がピログルタミン酸化する可能性を考えた。そこで 113 番ピログルタミン酸断端特異抗体を作製し検討したところ AD 脳アミロイド画分で 50, 100 kDa のポリペプチドが認識され、AD 脳内において CLAC の一部は 113 番ピログルタミン酸から始まっていることがわかった。

さらに *in vivo* レベルの検討を目的として、神経細胞特異的発現が知られる Thy1.2 プロモーターを用いヒト CLAC-P 遺伝子を神経細胞に過剰発現するトランスジェニックマウス (CLAC Tg) を作出した。CLAC Tg において CLAC-P mRNA は脳特異的に発現し、マウス脳の膜画分に CLAC-P 蛋白の発現が認められた。また免疫組織化学的な検討で CLAC-P の細胞内領域に対する抗体では神経細胞の細胞体が染色されたのに対し、細胞外領域に対する抗体では細胞体の染色に加え細胞外に斑状の蓄積物が観察された。この構造物は 113 番ピログルタミン酸特異抗体においても陽性であった。この結果はマウス脳神経細胞においても CLAC-P は 112 番アルギニンと 113 番 グルタミン酸の間で切断を受け、細胞外領域を分泌することを示唆した。

以上の結果から CLAC-P は細胞内において furin により切断を受け、その細胞外領域を sCLAC として分泌すること、分泌された sCLAC は凝集し、CLAC として老人斑に蓄積すること、また CLAC の一部はアミノ末端ピログルタミン酸化修飾を受けることを明らかにした。

(II) sCLAC と A β との相互作用に関する検討

CLAC は AD 脳において老人斑アミロイドに蓄積することから、線維化した A β と直接相互作用することが予測された。そこで両者の結合を評価する *in vitro* A β 結合アッセイ系を樹立した。予め凝集させた合成 A β ペプチドをマルチタイタープレートに固定し、CLAC-P を恒常発現させることにより

sCLAC を分泌する HEK293 細胞の培養上清をアプライシオンキュベート後、両者の結合を抗 CLAC-P 抗体で評価した。その結果 sCLAC は凝集 A β と結合することが示された。そこで sCLAC を含む培養上清を、凝集 A β あるいは可溶性 A β で前吸収させた後 A β 結合アッセイを行ったところ、凝集 A β は sCLAC と固定した A β との結合を阻害したのに対し、可溶性 A β は阻害できなかった。この結果は sCLAC が凝集した A β と特異的に結合することを示唆した。

次に sCLAC のコラーゲン様 3 重らせん構造の重要性を検討するため、sCLAC を含んだ培養上清を加熱により構造を変性させた後に A β 結合アッセイを行った。sCLAC のコラーゲン様 3 重らせん構造の変性はトリプシン消化実験により評価し、sCLAC はコラーゲン構造が変性すると同時に A β と結合できなくなることがわかった。さらに CLAC-P は膜貫通型コラーゲンファミリーで保存された coiled-coil ドメインを膜貫通領域の近傍及び NC3 領域に保持しており、これらのドメインはコラーゲン様 3 重らせん構造を形成するのに重要であると考えられている。そこで coiled-coil ドメインに重要な 1 位及び 4 位の疎水性アミノ酸をリジン残基に置換した変異体を作製し検討したところ、やはり構造が保持できなくなり、また A β との結合能も失われた。これらの結果から sCLAC のコラーゲン様 3 重らせん構造は A β との結合に必須であるとわかった。

さらに sCLAC と A β の相互作用の機序を明らかにするため、まず A β 結合アッセイの反応液中に 0.5 M NaCl を添加したところ結合は阻害された。またこれまでに sCLAC はヘパリンと結合することを見出していたことから、A β 結合アッセイの反応液中にヘパリンを添加したところ、濃度依存的に結合が阻害された。ヘパリンは塩基性アミノ酸が豊富な領域に静電的に結合すると考えられており、sCLAC と A β との結合は sCLAC のコラーゲン配列の塩基性アミノ酸クラスター領域を介していることが予測された。

また sCLAC と A β の結合が、培養上清中の夾雑物を介していないことを確認するため、CLAC-P のカルボキシ末端に FLAG tag を付加し、抗 FLAG 抗体アフィニティーカラムを用いて sCLAC を精製し、A β 結合アッセイを行った。その結果精製 sCLAC は凝集した A β と結合し、さらに COL1 領域の塩基性アミノ酸クラスター領域を欠いた変異体 sCLAC (COL1mt) では結合が低下した。

以上の検討から sCLAC はコラーゲン様 3 重らせん構造をとって凝集した A β と結合し、その結合に COL1 ドメインの塩基性アミノ酸クラスター領域が重要な役割を果たすことが分かった。

(III) sCLAC が A β の凝集に与える影響の検討

sCLAC は A β と直接結合することから A β の凝集・線維化に何らかの影響を与える可能性が考えられた。そこで β シート構造を特異的に認識する蛍光色素 thioflavin T (thioT) を用いた定量的な *in vitro* A β 凝集アッセイにより検討した。

DEAE カラム、ヘパリンカラム、逆相 HPLC を組み合わせ培養上清中から精製した sCLAC を合成 A β ペプチドと混和し 37 °C でインキュベートしたところ、A β の凝集が抑制されることがわかった。*In vitro* における A β の凝集過程は、可溶性 A β が緩徐に立体構造変化して凝集核を形成する nucleation phase と、一旦形成された凝集核に A β が次々に結合してに線維を伸長させる elongation phase からなる。

A β 1-42 ペプチドは凝集核形成能が高いことからこの両過程が同時に進行し、sCLAC の凝集抑制効果が A β 凝集過程のどこに作用したか判断することが困難である。そこで凝集核形成能の低い A β 1-40 を用いた A β 凝集アッセイを行い、A β 凝集の nucleation phase に及ぼす sCLAC の影響について検討した。その結果 sCLAC はアッセイ開始数時間における nucleation phase では A β 凝集に影響を与えないが、その後の elongation phase において凝集を抑制することがわかった。さらにこのアッセイ開始時に予め作製した A β 線維を凝集核として添加した。この方法により nucleation phase をバイパスして elongation phase だけを評価することが可能である。その結果やはり sCLAC は A β の凝集を elongation phase において抑制することが示された。

以上の検討から、*in vitro* において sCLAC は A β の凝集過程を特に elongation phase において抑制する効果があることが分かった。sCLAC は凝集した A β と結合することから、sCLAC は A β が凝集する際に形成される何らかの特異な立体構造変化を生じた凝集中間体に結合し、その後の凝集を抑制する可能性が考えられた。

以上本研究において、申請者は AD 脳老人斑に特異的に蓄積する新規老人斑アミロイド蛋白 CLAC について、CLAC が前駆体蛋白 CLAC-P から furin によって切断され分泌された断片であること、凝集した A β と特異的に結合すること、A β の凝集を特に elongation phase において抑制することを明らかにした。これらの結果は CLAC が β アミロイド形成に対し抑制的に働く可能性を示唆する。これらの成果はアルツハイマー病の分子病態解明ならびに新規治療法開発に大きな示唆を与えるものであり、博士（薬学）の学位に相応しいものと判定した。