

審査の結果の要旨

氏名 林 幾 雄

γ セクレターゼは β -amyloid precursor protein (APP) の膜内配列を切断し、amyloid β peptide ($A\beta$) の産生を行うことから、アルツハイマー病 (AD) 発症に重要な膜内プロテアーゼと考えられる。一方、 γ セクレターゼによる膜内配列切断は、発生・分化に重要な役割を果たす Notch シグナリングの活性化にも必須であり、近年、Notch シグナリングの異常亢進による細胞の癌化が報告されている。したがって、 γ セクレターゼは AD と癌という二大疾患において重要な創薬ターゲットと考えられる。

γ セクレターゼは活性中心サブユニットである PSEN (presenilin, PS) と、NCSTN (nicastrin, NCT)、APH-1、PEN-2 から構成される、高分子量膜蛋白質複合体がその本体である。そのうち NCT は I 型 1 回膜貫通蛋白質であり、他の構成因子と異なり、大きな細胞外ドメイン (NECD) を有する。ごく最近、NECD は γ セクレターゼ基質の受容体として機能することが指摘された。すなわち、NECD と基質の相互作用は、 γ セクレターゼを標的とする創薬戦略における新たな標的分子機構と考えられる。これまでに、Sf9-baculovirus 発現系において膜蛋白質を発現させた際、感染細胞から生じる発芽型ウイルス粒子 (BV) 上に、適切な修飾を受けた活性型膜蛋白質がディスプレイされ集積することが報告されている。したがって、膜蛋白質を発現したリコンビナント BV は、活性を持つ膜蛋白質を特異的に認識する抗体の作製に適した免疫原と考えられる。そこで申請者は NCT を発現させた BV を免疫原として抗 NCT モノクローナル抗体を作製し、その機能解析を行った。

(1) 抗 NCT モノクローナル抗体の作製と性状解析

生化学的解析

ヒト NCT を発現する組み換えバキュロウイルスを、BV のエンベロープ蛋白質である gp64 を発現するトランスジェニックマウスに対して免疫し、複数の陽性クローンを得た。欠損変異体を用いた解析から、いずれの抗体も NECD 部分を認識していることが確認された。NCT は NECD 部分において N 結合型糖鎖付加を受け、細胞内輸送とフォールディングの状態に応じ、Endo H 感受性の未成熟型 NCT (imNCT) から Endo H 耐性の成熟型 NCT (mNCT) へと修飾が進展することが知られている。このうち成熟型 NCT のみが、すべての構成因子を含む活性型 γ セクレターゼ複合体に含まれる。しかし現在までに NECD 部分にエピトープ領域を持ち、成熟型 NCT を認識できる抗体は作出されていなかった。そこで、得られたモノクローナル抗体が活性型 γ セクレターゼ複合体に含まれる成熟型 NCT を認識できるかどうかを、免疫沈降実験により確認した。HeLa 細胞膜可溶画分を抗 NCT モノクローナル抗体 (A52xxA) または抗 NCT 細胞内領域抗体 N1660、抗 PS1 抗体 G1L3 で免疫沈降し、各構成因子に対する抗体でイムノプロット解析した。その結果、BV から得られたモノクローナル抗体は、未成熟型 NCT のみを免疫沈降する群 (A5201s: A5201A、A5202A、A5217A、A5220A) と未成熟型および成熟型 NCT をともに免疫沈降する群 (A5226s: A5215A、A5218A、A5226A) を含んでいた。また A5226s は PS1、APH-1、PEN-2 のいずれも共沈降したのに対し、A5201s は少量の APH-1aL しか共沈降しなかった。これらの結果から、A5226s のエピトープ部位は活性型 γ セクレターゼ複合体に含まれる成熟型 NCT 上に露出しているのに対し、A5201s の結合部位は複合体の形成に伴う NCT の構造変化により、成熟型 NCT 上ではマスクされていることが示唆された。

免疫細胞化学

免疫沈降において異なる反応性を示した A5201A および A5226A が認識する NCT が、どのような細胞内局在を示すかについて、培養細胞を用いた免疫染色によって検討した。いずれの抗体も NCT ノックアウトマウス線維芽細胞 (NKO 細胞) では反応性を示さなかった (data not shown)。野生型 NCT を発現させた NKO 細胞では、A5201A は ER マーカーと一致する細胞内膜系の染色像を示したのに対し、A5226A は顆粒状の染色像を示した。A5226A が認識する顆粒状構造は脂質ラフトのマーカーであるコレラトキシニンサブユニット B の染色とよく一致した。ER には未成熟型 NCT が局在すること、また脂質ラフトには活性型 γ セクレターゼが局在するとの報告から、これらの結果は免疫沈降の結果と同様、A5201A は未成熟型 NCT を認識し、A5226A は成熟型 NCT を認識することを示すと考えられた。

(3) *in vitro* γ セクレターゼ活性に与える影響の検討

A5218A および A5226A は活性型 γ セクレターゼ複合体に含まれる成熟型 NCT と結合することから、これらの A5226s 抗体が γ セクレターゼの活性に影響を与える可能性を考えた。そこで人工基質を用いた *in vitro* γ セクレターゼ反応系に A5201A、A5218A、A5226A を添加して、*de novo* 合成された A β 量を指標に γ セクレターゼ活性の変化を測定した。その結果、A5218A および A5226A を終濃度 10 $\mu\text{g/ml}$ 添加した場合に、 γ セクレターゼ活性が約 20% 阻害された。さらにこれらの抗体は、*in vitro* において基質と NCT との結合を阻害した。これらの結果から、成熟型 NCT と結合する抗体は、NECD と基質の結合阻害を介して、 γ セクレターゼ活性を阻害することが示唆された。

(4) γ セクレターゼ活性依存的な癌細胞の増殖に与える影響

γ セクレターゼ活性阻害活性を示した A5226A が γ セクレターゼ活性依存的な癌細胞の増殖を阻害するかどうかについて検討した。まず、低分子量 γ セクレターゼ阻害剤 DAPT を用いて酵素活性依存的に増殖する株をスクリーニングしたところ、非小細胞性肺癌由来 A549 細胞が DAPT 感受性を示し、100 μM DAPT 処理 72 時間で細胞増殖が約 20% 抑制された。一方、HeLa 細胞は DAPT 感受性を示さなかった。次に、A5226A を A549 または HeLa 細胞の培地中に加えて 96 時間培養した。その結果、A549 細胞の増殖は A5226A の濃度依存的に阻害され、100 $\mu\text{g/ml}$ で約 50% の抑制がみられた。一方、マウス IgG 画分は A549 細胞の増殖に影響を与えなかった。これらの結果から、A5226A 抗体は γ セクレターゼ活性依存的な A549 細胞の増殖を抑制する活性を有することが示唆された。

本研究において、申請者は NCT を発現する BV を免疫原として作製した抗 NCT 抗体のうち A5218A および A5226A が (1) γ セクレターゼ複合体を保った条件下で成熟型 NCT と結合すること、(2) *in vitro* において γ セクレターゼ活性を阻害すること、(3) γ セクレターゼ活性依存的な癌細胞の増殖を抑制することを明らかにした。現在までに NCT を標的とする γ セクレターゼ阻害剤の報告はなく、申請者の観察は、NCT が γ セクレターゼ阻害剤の標的となる可能性を初めて示すものである。以上、本研究の内容はアルツハイマー病ならびに癌の治療標的としての γ セクレターゼと NCT について重要な情報をもたらすものであり、博士 (薬学) の学位に値するものと判定した。