

# 関連ペプチド解析によるアルツハイマー病発症機構解明

北海道大学大学院 薬学研究院 神経科学研究室  
羽田 沙緒里

## 1. はじめに

アルツハイマー病 (AD) は認知機能障害を伴う進行性の神経変性疾患である。AD は原因遺伝子に変異を持つ家族性 AD と、そのような遺伝子変異を持たない孤発性 AD に分けられ、このうち孤発性 AD が 90%以上を占めると考えられている。孤発性 AD の発症機構には未解明な点が多く残されており、早期診断法や根本的治療法も確立されていない。AD は脳内において神経細胞死などの病態変化が起こってから認知症を発症するまでに 10~15 年かかると推測されており、認知症発症後の治療薬投与では根本的治療が難しいと考えられる。そのため、根本的治療法開発のためにも、AD 発症のメカニズム解明と早期診断法の確立が重要となる。

AD 患者の脳では病理学的な特徴として老人斑と神経原線維変化の蓄積が見られる。老人斑はアミロイド  $\beta$  ( $A\beta$ ) が主要構成成分であり、神経原線維変化はリン酸化 Tau タンパク質が主要構成成分である。 $A\beta$  は、I 型膜タンパク質であるアミロイド前駆体タンパク質 (APP) が細胞膜近傍で一次切断を受け、膜貫通領域で  $\gamma$  セクレターゼによる二回目の切断を受けることによって産生される。 $\gamma$  セクレターゼの切断サイトには多様性があり、その違いにより 40 アミノ酸の「 $A\beta 40$ 」および 42 アミノ酸の「 $A\beta 42$ 」が主に分泌される。これらのうち量的にマイナーな分子種である  $A\beta 42$  は、凝集しやすく、オリゴマー化することによって神経毒性を發揮することが明らかになっている。また家族性 AD 患者は  $A\beta 42$  の産生量・量比を変化させる遺伝子変異を持っているため、家族性 AD の発症には  $A\beta 42$  生成の質的・量的変化が関与していると考えられている。一方、孤発性 AD の発症機構は多様であると考えられる。私は原因遺伝子に変異がない孤発性 AD 患者でも、家族性 AD 患者と同様に  $\gamma$  セクレターゼ切断変化による  $A\beta 42$  生成の質的・量的変化が起こり、それが発症原因となっている患者がいるのではないかと、という仮説を立てた。しかし、 $A\beta 42$  は凝集性が高いため、患者サンプルを用いて  $A\beta$  の正味の量的変化 ( $A\beta 42$  量の増加) ・質的変化 ( $A\beta 42$  量比の増加) を捉えることは難しい。実際に、多くの孤発性 AD 患者の脳脊髄液 (CSF) 中に存在する  $A\beta 42$  量は健常人と比較して有意に少ない。

当研究室で単離同定された I 型膜タンパク質 Alcadin (Alc) は、細胞質アダプタータンパク質 X11L を介して APP と複合体を形成する。APP-X11L-Alc の複合体形成によって APP の代謝が安定化されることや、AD 患者脳においても APP と Alc は共局在すること、さらに Alc は老人斑周辺の神経腫大突起に局在することから、Alc は AD に関連するタンパク質であると考えられる。Alc は APP と同様に、細胞膜近傍で一次切断を受け、細胞膜内領域で  $\gamma$  セクレターゼによる切断を受けることによって、 $A\beta$  様のペプチドである「p3-Alc」を分泌する (図)。

$\gamma$  セクレターゼの触媒サブユニットである Presenilin (PS) の遺伝子変異によって APP の  $\gamma$  セクレターゼ切断が変化し、 $A\beta 42$  の産生量あるいは産生量比が変化する。培養細胞を用いた実験から、このように APP の  $\gamma$  セクレターゼ切断を変化させる PS 変異体は、Alc の  $\gamma$  セクレターゼ切断も変化させ、 $A\beta 42$  に相当するマイナー p3-Alc 分子種の産生量比増加が  $A\beta 42$  量比の増加と相関することが明らかとなった。また、p3-Alc は  $A\beta 42$  とは異なり凝集性がないため、生体内における APP の  $\gamma$  セクレターゼ切断変化を捉えるマーカーとして p3-Alc を使用できるのではないかと考えた。Alc ファミリーのうち Alc  $\alpha$  から分泌される p3-Alc  $\alpha$  は 35 アミノ酸からなるメジャー分子種 p3-Alc  $\alpha$  35 に対し、38 アミノ酸からなる p3-Alc  $\alpha$  38 が  $A\beta 42$  に対応するマイナー分子種である。AD 患者における CSF 中の p3-Alc  $\alpha$  38 の産生比率の変化を調べるために、国内外の複数の機関から供与された CSF を Clinical dementia rating (CDR) 別に解析した。その結果、CDR 0.5 (認知症疑い) および CDR 1 (軽度認知症) の AD 患者群では、CDR 0 (正常) や他の神経疾患群と比較して p3-Alc  $\alpha$  38 の割合が有意に増加していた(1)。孤発性 AD の発症初期段階から  $A\beta 42$  に対応する p3-Alc  $\alpha$  38 の増加が見られたことから、一定数の孤発性 AD 患者では、PS1 遺伝子に変異を持つ家族性 AD 患者と同様に、 $\gamma$  セクレターゼによ

る基質切断変化が起こっている可能性が示唆された。さらに、p3-Alcの前駆体タンパク質である Alcadein の $\gamma$ セクレターゼによる切断変化は、APP よりも感度良く検出できることを示唆するデータも得ているため、 $\gamma$ セクレターゼの基質切断変化と AD の関連性を検証するのに適していると考えられた。

以上のことより、本研究は AD 関連タンパク質である Alcadein の $\gamma$ セクレターゼによる切断変化解析を行うことによって、孤発性 AD の発症機構を解明することを目的として研究を行った。

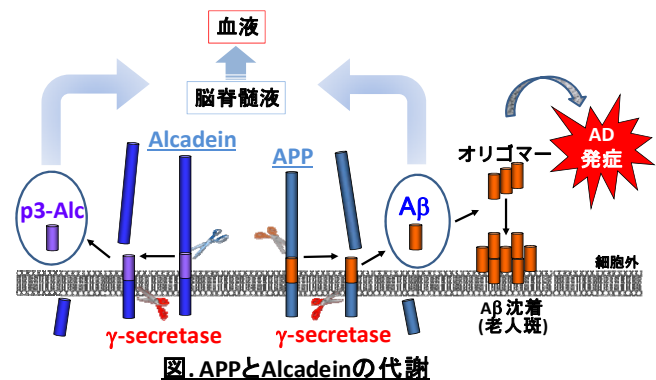


図. APPとAlcadeinの代謝

## 2. 方法

本研究では $\gamma$ セクレターゼの基質切断変化と孤発性 AD 発症メカニズムの関連性を検証するために、ヒトサンプルを用いた p3-Alc の定量解析を行った。

これまでに、毒性ペプチド A $\beta$ 2 に相当するマイナー p3-Alc $\alpha$  の産生比率が、孤発性 AD 患者において増加することを見出した。これは免疫沈降により回収した p3-Alc $\alpha$  を TOF-MS 解析し、そのスペクトルから各ピークの相対的な比率を計算するという方法で解析を行った結果であり、この系は量的変化解析や多数サンプルの質的変化解析には向かないという欠点がある。これを解消するために p3-Alc $\alpha$  特異的抗体を用いた sELISA による定量系を確立した。これまでに確立した定量系は p3-Alc $\alpha$  のトータルを定量できる系と、主要分子種である p3-Alc $\alpha$  35 を断端特異的に認識する抗体を用いた系である。いずれの系においても、CSF は希釈のみで定量可能であった。しかし、血液を用いた定量では血中に反応阻害物質が存在するため、希釈のみで定量することはできない。そのため、抽出操作をおこない、そのサンプルに関して定量を行った。実際の方法は、クロロホルムとメタノールの混合液で血液から抽出操作を行い、その水相を乾固し、ELISA 用のバッファーで再溶解したものを定量用のサンプルとした。二種類の sELISA 系を用いて、孤発性 AD 患者 CSF・血中の p3-Alc を定量し、認知症の進行度合い等の関連を解析することによって、孤発性 AD と  $\gamma$ セクレターゼ基質切断機能変化の関連を探った。

## 3. 結果

### ①CSF中のp3-Alc $\alpha$ totalの定量解析

複数の医療機関から供与された CSF サンプルの解析を行った。その結果、CSF 中の p3-Alc $\alpha$  量が AD 患者において有意に増加しているコホートと、増加が顕著ではないコホートがあった。有意差がないコホートでは A $\beta$  42 値の低下を AD 診断の指標としていたため、A $\beta$  42 を診断の指標としていないコホートに関して A $\beta$  42 の低値群、高値群に分類して p3-Alc $\alpha$  量の解析を行った。その結果、低値群では同じように有意差がなかったが、高値群では CSF 中の p3-Alc $\alpha$  が AD 患者において有意に増加していた(2)。

### ②血漿中のp3-Alc $\alpha$ totalの定量解析

複数の医療機関から供与された血液サンプルの p3-Alc $\alpha$  total の定量解析を行った。3つのコホート血漿サンプルを解析した結果、すべてのコホートで血漿中の p3-Alc $\alpha$  total 量が AD 患者において有意に増加した。また、AD 患者において血漿中 A $\beta$  量と p3-Alc $\alpha$  量が有意に相関した。さらに血中 A $\beta$  の高値群と低値群に分類し p3-Alc $\alpha$  量を比較した場合、AD 患者では A $\beta$  40 高値群で p3-Alc $\alpha$  量が有意に多かったのに対し、他の神経疾患患者では有意な違いはなかった(3)。

### ③血漿中のp3-Alc $\alpha$ 35量の定量解析

p3-Alc $\alpha$  35 を特異的に定量可能な sELISA の系を用いて、複数の医療機関から供与された血漿サンプルの定量解析を行った。主要分子種である p3-Alc $\alpha$  35 の量は、p3-Alc $\alpha$  total と有意に相関することが明らかとなった。血漿中 p3-Alc $\alpha$  35 は加齢に伴って増加する傾向があったため、非 AD 群と AD 群において age-matched な状態で比較解析を行った。その結果、AD 群において血漿中 p3-Alc $\alpha$  35 が有意に増加していた。また、AD 患者群の中で AD 治療薬である ドネペジル投与群と非投与群において血漿中 p3-Alc $\alpha$  35 量を比較した結果、投与群の p3-Alc $\alpha$  が有意に減少

していることがわかった(4)。

#### 4. 考察

p3-Alcは、A $\beta$ 分泌に必要な酵素 ( $\gamma$ セクレターゼ) の機能変化による基質切断変化を反映するペプチドである。CSF、血漿中のp3-Alc $\alpha$ の定量解析より、発症メカニズムが多様である孤発性AD患者において、一定数の患者では $\gamma$ セクレターゼ切断機能変化が起こっていることを示唆するデータが得られた。

CSF中のp3-Alcの定量解析では、A $\beta$  42高値群ではp3-Alcが有意に増加していたことから、 $\gamma$ セクレターゼによる基質切断変化が起こっている患者をp3-Alcの定量によって捉えられることが示唆された。A $\beta$ 値が低下していないことにより見落とされてしまったAD患者をp3-Alc値の定量によって再度診断できる可能性もある。

血漿中のp3-Alc $\alpha$  total量の解析から、すべてのコホートでp3-Alc $\alpha$ 量がAD患者で有意に増加していたことや、A $\beta$  40高値・低値群の比較ではADのみでp3-Alc量が有意に変化していたことから、p3-Alc $\alpha$ 量の増加は疾患特異的であり、ADに関連した $\gamma$ セクレターゼ切断機能変化を捉えるマーカーとしてp3-Alcが有用であることが示された。

また血漿中p3-Alc $\alpha$  35の定量解析より、ドネペジル (コリンエステラーゼ阻害剤) 投与群においてp3-Alc $\alpha$ 量が有意に減少していたことから、投与・非投与の単純な比較は難しいが、治療薬の効果によって脳内の環境が改善し、それにより $\gamma$ セクレターゼの切断が正常な状態に近づいた影響を見ている可能性もある。

本研究によって、遺伝子変異を持たない孤発性ADに患者でも $\gamma$ セクレターゼの機能変化が起こり、それが発症に関わる患者がいる可能性があることがわかった。また発症の初期段階からp3-Alcが質的にも量的にも変化することや、治療薬の有無によっても量的に変化したことから、p3-Alcは発症メカニズムの解明のためのツールだけではなく、 $\gamma$ セクレターゼによる切断変化が起こっている患者を捉えられることから新規診断マーカーや治療薬選択のためのマーカーとしても有力であり、また p3-Alc値の定量・定性によるAD発症予備群の検出できる可能性も示唆された。今後も解析を続けていきたいと考えている。

#### 5. 発表論文

1. **Hata, S.**, Fujishige, S., Araki, Y., Taniguchi, M., Urakami, K., Peskind, E., Akatsu, H., Araseki, M., Yamamoto, K., Martins, R. N., Maeda, M., Nishimura, M., Levey, A., Chung, K. A., Montine, T., Leverenz, J., Fagan, A., Goate, A., Bateman, R., Holtzman, D. M., Yamamoto, T., Nakaya, T., Gandy S., Suzuki, T. (2011) Alternative processing of  $\gamma$ -secretase substrates in common forms of mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: Evidence for  $\gamma$ -secretase dysfunction. *Ann. Neurol.* 69, 1026-1031.
2. **Hata, S.**, Taniguchi, M., Piao, Y., Ikeuchi, T., Fagan, A. M., Holtzman, D. M., Bateman, R., Gandy, S., Urakami, K., Suzuki, T., J-ADNI (2012) Multiple  $\gamma$ -secretase product peptides are coordinately increased in concentration in the CSF of a subpopulation of sporadic Alzheimer's disease subjects. *Mol. Neurodegener.* 7, 16.
3. §Konno, T, §**Hata, S.**, Hamada, Y, Horikoshi-Sakuraba, Y, Nakaya, T, Saito, Y, Yamamoto, T, Yamamoto, T, Maeda, M, Ikeuchi, T, Gandy, S, Akatsu H., Suzuki T. (2011) Coordinated increase of  $\gamma$ -secretase reaction products in the plasma of some female Japanese sporadic Alzheimer's disease patients: quantitative analysis of p3-Alc $\alpha$  with a new ELISA system. *Mol. Neurodegener.* 6:76. (§ Equal contribution)
4. Omori, C., Kaneko, M., Nakajima, E., Akatsu, H., Waragai, M., Maeda, M., Morishima-Kawashima, M., Saito, Y., Nakaya, N., Taru, H., Yamamoto, T., Asada, T., §**Hata S.**, §Suzuki T., J-ADNI. Increased levels of plasma p3-Alc $\alpha$ 35, a major fragment of Alc $\alpha$  by  $\gamma$ -secretase cleavage, in Alzheimer's disease *J. Alzheimer Dis. in press* (DOI 10.3233/JAD-131610) (§Co-corresponding author)