

2001年5月21日  
独立行政法人 理化学研究所

## 孤発性アルツハイマー病の原因解明に大きく前進

### - 分解酵素の低下がアミロイド蓄積を促進することを実証 -

理化学研究所（小林俊一理事長）は、ハーバード大学と共同で、全アルツハイマー病の9割以上を占める“孤発性アルツハイマー病”の原因解明に大きく貢献する成果を挙げました。理研脳科学総合研究センター（伊藤正男所長）神経蛋白制御研究チームの西道隆臣チームリーダーらの研究グループによる研究成果です。

本研究では、アルツハイマー病の原因物質であるβアミロイドを分解する酵素としてネプリライシンを同定し、遺伝子改変動物（ネプリライシンノックアウトマウス）を用いて、分解酵素の活性低下が脳内のβアミロイドレベルを上昇させることを実証しました。これは、老化にともなって脳内の分解酵素活性が低下することによってβアミロイドが蓄積し、アルツハイマー病を引き起こす可能性があることを強く示唆するものです。さらに、本研究では、アルツハイマー病の新たな原因遺伝子の存在も予測しました。

本研究成果は、世界のアルツハイマー病研究の流れを変えるほどの重要な意味を持っており、米国の科学雑誌「Science」5月25日号で発表されます。

## 1. 背景

脳内におけるβアミロイドの蓄積は、アルツハイマー病にいたる病理学的なカスケード\*の引き金を引くと考えられています。この蓄積は、加齢にともなって加速することが知られていますが、その機構は分かっていません。この蓄積を抑制することができれば、アルツハイマー病を予防し、多くの人間の尊厳を守ることができると考えられています。

このβアミロイドは、病気の原因である一方で生理的存在でもあります。すなわち、定常的に体内で合成・分泌されており、正常状態では速やかに分解されて蓄積されないと考えられています。この分解能力が老化にともない低下すれば、蓄積の原因となります。逆に、分解能力を増強すれば、蓄積を抑制し、老化の速度を減速することができます。しかしながら、分解のメカニズムについては未知の点が多く、病気との関連も分かっていません。

アルツハイマー病は、優性遺伝する“家族性アルツハイマー病”と、そうではない“孤発性アルツハイマー病”の2つに分類されます。家族性アルツハイマー病の原因遺伝子として同定されたAPP（アミロイド前駆体タンパク質）とプレセニリン1、プレセニリン2は、全アルツハイマー病患者の0.1%程度しか説明することができません。一方、アルツハイマー病の大半を占める“孤発性アルツハイマー病”の原因は依然として不明でした。

## 2. 研究手法

理研脳科学研究センター・神経蛋白制御研究チームでは、特定のβアミロイド分

解酵素の存在を予測し、その遺伝子を改変した動物（ノックアウトマウス）を用いて実験を進めました。

脳内のβアミロイド分解については、2つの方法で調べました。1つは、放射性標識したβアミロイドペプチド（Aβ）を脳内に投与し、その分解過程を高速液体クロマトグラフィーで調べる方法です（図3～5）。もう一つは、非常に感度の高い酵素抗体法（武田薬品工業より供与）を用いて、内在性のAβ存在量を測定する方法です（図6、7、9）。ネプリライシンがAβの分解を担っているならば、遺伝子ノックアウト動物では、この二つの方法において分解の抑制が観測されると考えられます。

### 3. 研究成果

実験の結果、以下のことが分かりました。

- 放射性標識Aβの分解が、ネプリライシンノックアウトで顕著に減速していました。ネプリライシンが主要なAβ分解酵素であることを示しています。
- ネプリライシンノックアウトマウスにおいて、内在性Aβの量が約2倍に上昇していました。ネプリライシンが内在性Aβの分解を担うことを示しています。
- ネプリライシン遺伝子が半分だけ欠損しているヘテロのノックアウトマウスにおいても分解の抑制が見られました。分解の抑制は、ネプリライシンの遺伝子量に逆相関しています。これは、脳内のネプリライシン活性が部分的に低下するだけで、Aβの量が増加し、蓄積が促進されることを意味しています。
- ネプリライシンノックアウトマウスの脳内におけるAβ含量は、海馬でもっとも高く、小脳でもっとも低いという結果が得られました。これは、アルツハイマー病の病理像とよく相関します。さらに、McGeerら（University of British Columbia [加]）が本研究グループの成果に基づいて、アルツハイマー病患者の脳におけるネプリライシンの発現を検討したところ、特に海馬で発現が低下していることを見いだした報告ともよく一致しています。

これらのことから、分解酵素の低下がアミロイド蓄積の原因となり、分解活性を上昇させることによって蓄積を抑制できることを始めて実験的に実証しました。

### 4. 今後への期待

本研究により老化にともなう脳内のネプリライシンの活性あるいは発現の低下がβアミロイドの量を上昇させ、アルツハイマー病を引き起こす可能性があることが強く示唆されました。このことから、今後、以下のような発展が期待されます。

- 新たな遺伝的危険因子の予測

ネプリライシンの遺伝子発現は、組織特異的に制御されています。神経細胞は、タイプ1のmRNAを発現していますので、この発現制御に関わる遺伝子領域における変異や、多型はアルツハイマー病の発症リスクに影響を与えると推測されます。

- 危険因子の同定と除去による予防  
ネプリライシンの発現や活性を低下させるものは危険因子となりえます。これらを同定し、除去することによって発症のリスクを抑えることができます。
- 活性あるいは発現の制御による発症の抑制  
遺伝子治療あるいは遺伝子転写制御によって、脳内のネプリライシンの発現を選択的に上昇させることができれば、孤発性アルツハイマー病だけでなく、家族性アルツハイマー病の発症を抑制することができると期待されます。
- 発症全診断  
脳の老化に伴ってネプリライシンの発現が低下するならば、その存在量を定量する事によって各個人の発症リスクを事前に予測することができます。

(問い合わせ先)

独立行政法人理化学研究所

脳科学総合研究センター 神経蛋白制御研究チーム

チームリーダー

西道 隆臣

Tel : 048-467-9715 / Fax : 048-467-9716

Mail : [saido@brain.postman.riken.go.jp](mailto:saido@brain.postman.riken.go.jp)

脳科学総合研究センター

脳科学研究推進部

田中 朗彦

Tel : 048-467-9596 / Fax : 048-462-4914

(報道担当)

独立行政法人理化学研究所 広報室

嶋田 庸嗣

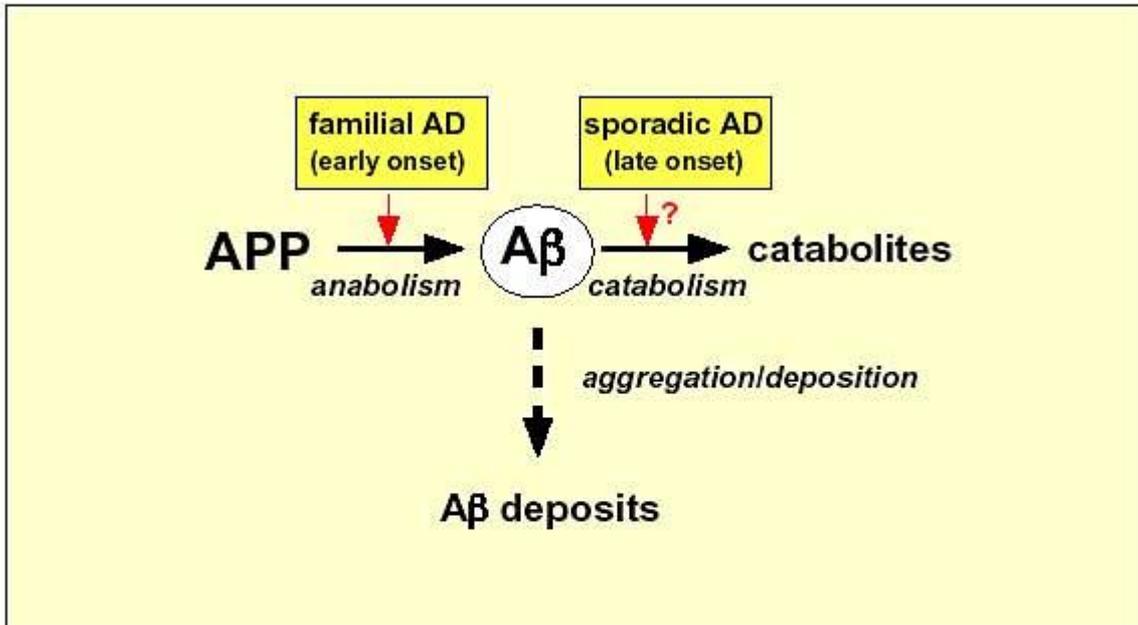
Tel : 048-467-9272 / Fax : 048-462-4715

## <補足説明>

### ※ カスケード

アルツハイマー病は、アミロイド蓄積から始まり、細胞内タンパクの蓄積や炎症反応、そして、神経細胞の機能不全や変性といった複雑な経路を経て、痴呆発症へいたると考えられる。この経路全体をアルツハイマー病のカスケードと称す（参考図参照）。

図1 脳内のA $\beta$ 存在量は合成と分解のバランスによって決まる。



家族性アルツハイマー病では $\beta$ アミロイドの合成が上昇することによって、脳内に蓄積する。しかし、家族性アルツハイマー病は、全アルツハイマー病患者の1%以下である。大半を占める孤発性アルツハイマー病では、 $\beta$ アミロイド合成の上昇は認められない。分解の低下が蓄積の原因であることが予想される。

図2 分解活性を上昇させることにより蓄積を抑制できる。

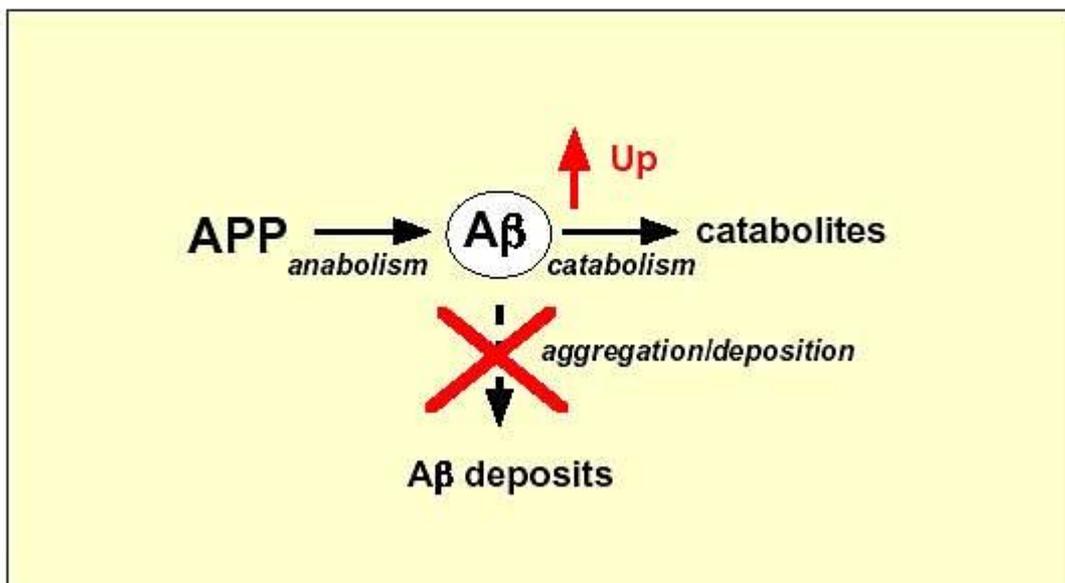


表1 これまでの研究成果

---

1. ある種の中性エンドペプチダーゼがA $\beta$ の分解の律速を担う。  
この分解酵素は、ホスホラミドンおよびチオルファンという薬剤によって阻害される。

Iwata, N., Tsubuki, S., Takaki, Y., Watanabe, K., Sekiguchi, M., Hosoki, E., Kawashima-Morishima, M., Lee, H.-J., Hama, E., Sekine-Aizawa, Y., Saido, T.C. (2000). Identification of the major A $\beta$  1-42-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: Suppression leads to biochemical and pathological deposition. *Nature Med.*, 6, 143-151.

2. 脳内には少なくとも6種類の中性エンドペプチダーゼファミリーのメンバーが存在すること、さらに、その中でネプリライシンが最もA $\beta$ 分解作用の強いことを分子生物学的に確認した。

Shirotani, K., Tsubuki, S., Iwata, N., Takaki, Y., Harigaya, W., Maruyama, K., Kiryu-Seo, S., Kiyama, H., Iwata, H., Tomita, T., Iwatsubo, T., Saido, T.C. (2001). Neprilysin degrades both amyloid  $\beta$  peptide 1-40 and 1-42 most rapidly and efficiently among thiorphan- and phosphoramidon-sensitive endopeptidases. *J. Biol. Chem.*, in press (<http://www.jbc.org/cgi/reprint/M008511200v1>).

3. 脳内の中性エンドペプチダーゼ活性の大半をネプリライシン活性が占める。

Takaki, Y., Iwata, N., Tsubuki, S., Taniguchi, S., Toyoshima, S., Lu, B., Gerard, N.P., Gerard, C., Lee, H.-J., Shirotani, K., Saido, T.C. (2000). Biochemical identification of the neutral endopeptidase family member responsible for the catabolism of amyloid  $\beta$  peptide in brain. *J. Biochem.*, 128, 897-902.

---



[仮説]

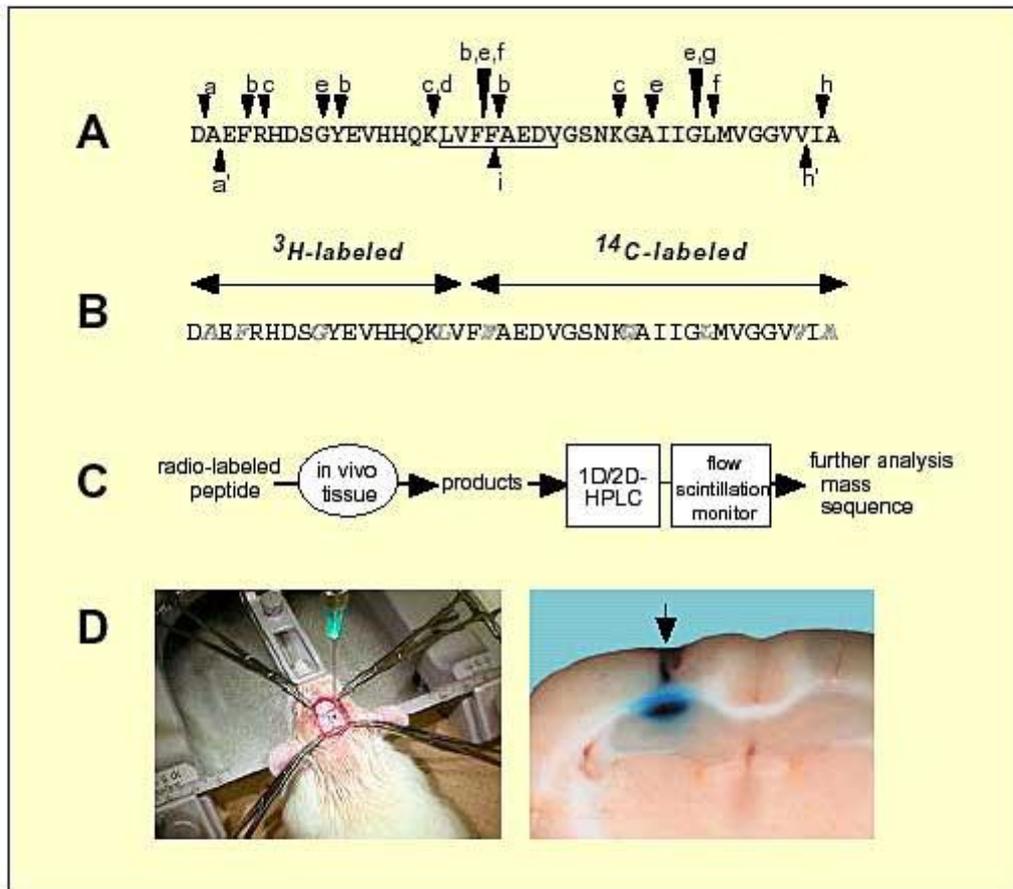
脳内の主要なA $\beta$ 分解酵素はネプリライシンである。



[実験]

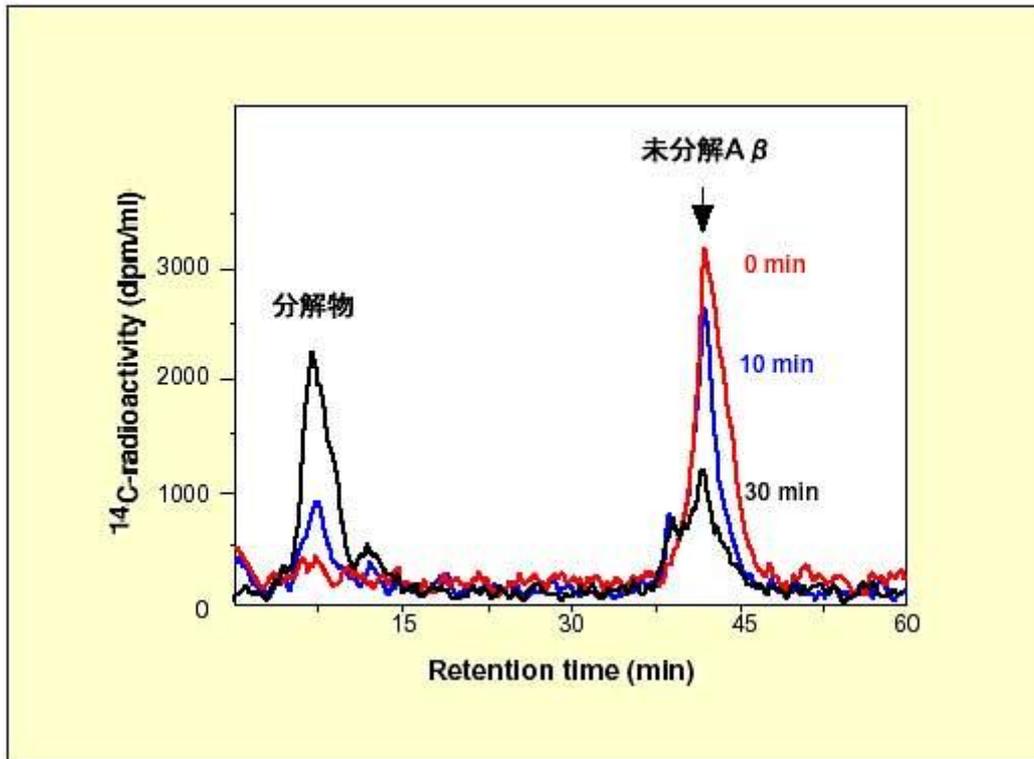
ネプリライシン遺伝子ノックアウトマウスの解析

図3 ベータアミロイドの分解を解析する実験系



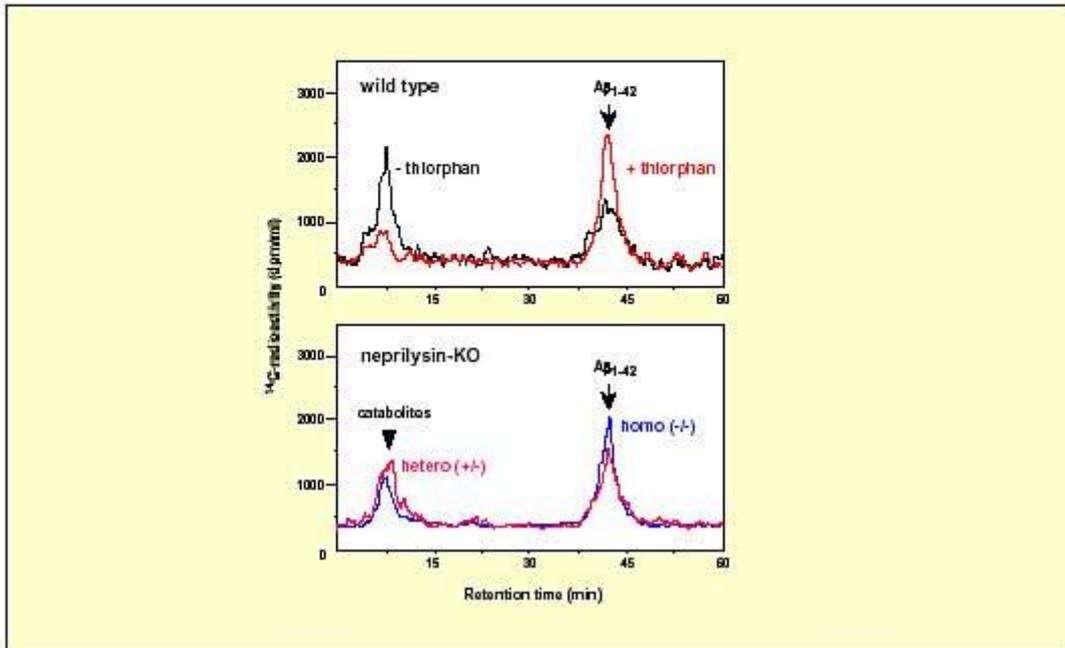
パネルAは、βアミロイドが種々の分解酵素から切断されうる部位を示す。このように分子全域に渡っているので、あらゆる可能性を見逃さないようにアイソトープ標識を行った。パネルBで示すように、合計9カ所のアミノ酸残基で標識したペプチドを合成した。片側（アミノ末端側）を<sup>3</sup>Hで、もう片側（カルボキシル末端）を<sup>14</sup>Cで多重標識した。この標識ペプチドを、パネルCで示すように、動物脳内に投与し、産物を抽出した後、HPLC（高速液体クロマトグラフィー）で分離し、さらに解析を行った。パネルDは、麻酔をかけたラット脳に実際にペプチドを投与する様子、そして、投与されたものが標的の海馬CA1領域に達することを示す。

図4 放射性標識Aβの経時的分解



脳内に投与したAβペプチドは約30分で大半が分解される。

図5 ネプリライシンノックアウトマウスにおけるAβ分解



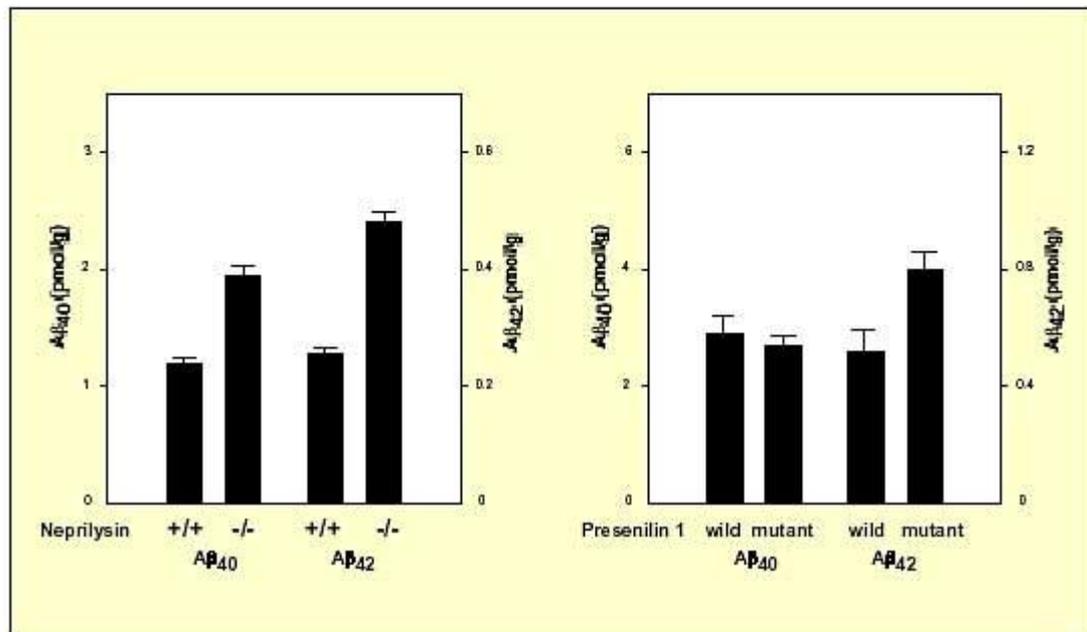
ネプリライシンノックアウトマウスでは、Aβ分解が顕著に減速する。

1. ネプリライシンが主要な分解酵素である。
2. その作用が律速を担う。
3. ネプリライシン以外に分解作用を有する酵素が存在する。



内在性のAβにも同様の作用を有するか？

図6 ネプリライシンノックアウトマウスの脳ではAβの量が上昇している。



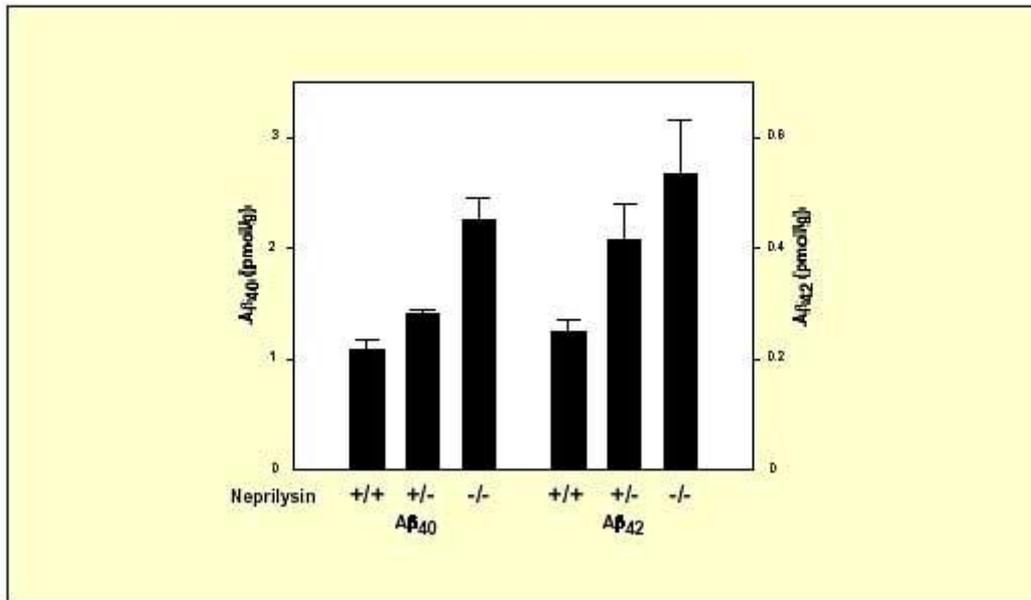
家族性アルツハイマー病の中で最もアグレッシブといわれるプレセニリンの変異は、Aβ42の量を約1.5倍上昇させることによってAβ蓄積を引き起こす。ネプリライシン遺伝子の欠損は、Aβ40およびAβ42両方の量を2倍に上昇させる。



ネプリライシンは、内在性Aβの分解も担う。

注) Aβ40, Aβ42: 40および42番目のアミノ酸で終了するAβペプチド。Aβ42の方が病原性が強いと考えられる。

図7 ネプリライシンの遺伝子量とAβ含量は逆相関する。



ネプリライシンの活性が半分に低下しても、Aβの量が増加する。



老化に伴うネプリライシン活性の低下が、Aβ蓄積の原因となり得ることを強く示唆。

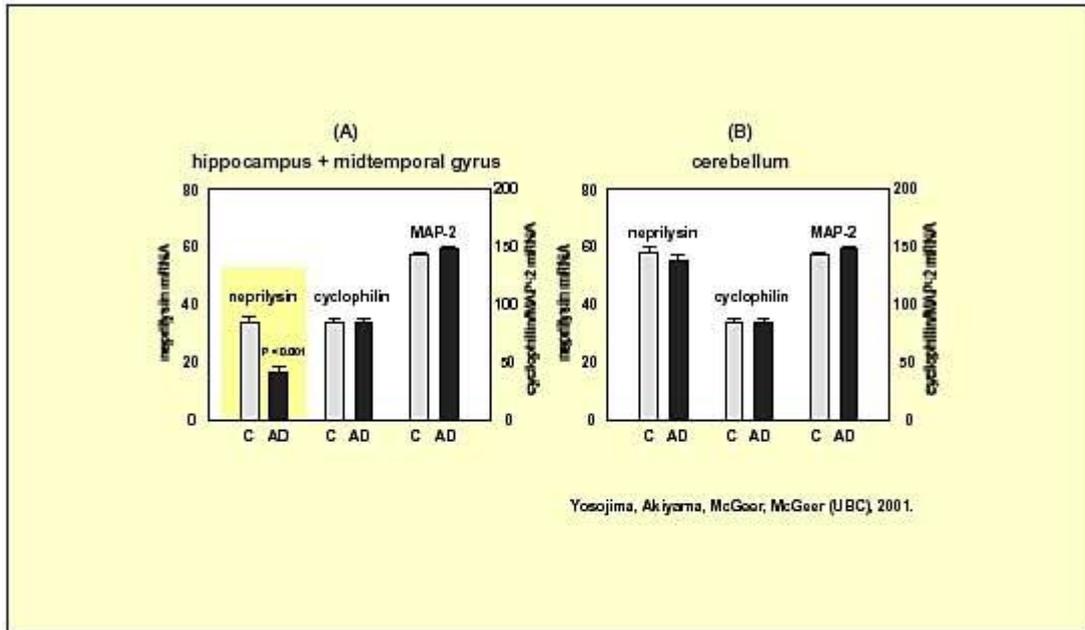


アルツハイマー病患者の脳でネプリライシン活性が低下しているか？



我々の発見をもとに、カナダのグループ (McGeerら) が臨床標本を用いて検討。

図8 アルツハイマー病患者の脳では選択的にネプリライシンの発現が低下している。

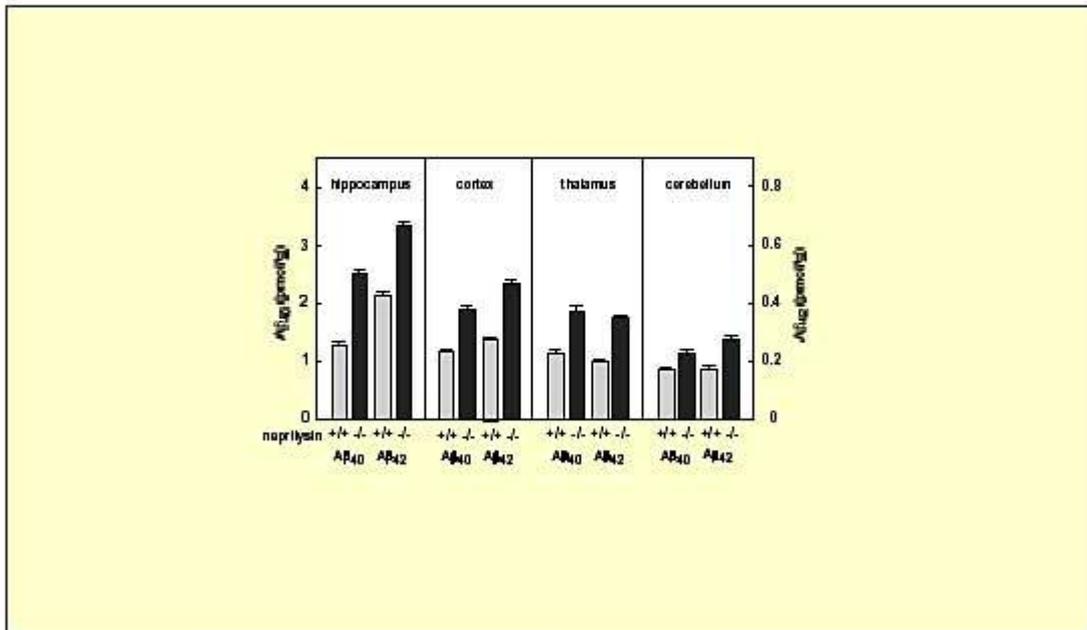


アルツハイマー病では、海馬や大脳皮質の側頭葉で顕著なアミロイド蓄積が見られるのに対して、小脳での蓄積は微弱である。これに相関して、海馬や側頭葉でネプリライシンの発現が選択的に低下している。その他の蛋白質の発現は低下していないことから、ネプリライシンの低下は神経変性（神経細胞死）の結果ではないと考えられる。



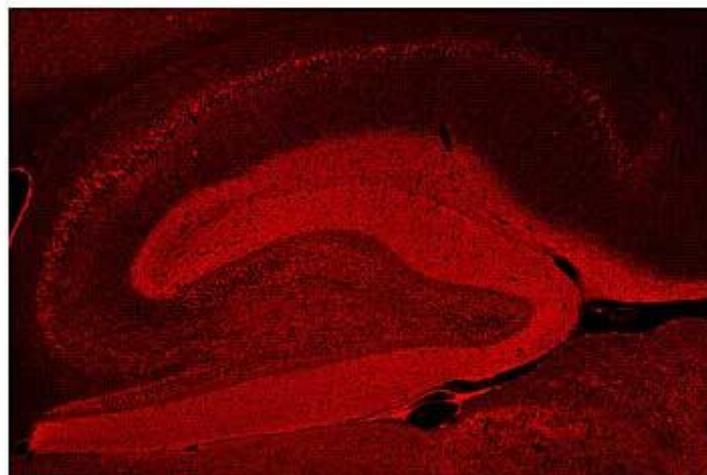
この傾向がマウスでも認められるか？

図9 ネプリライシンノックアウトマウスのA $\beta$ 含量は海馬で最も高く小脳で最も低い。



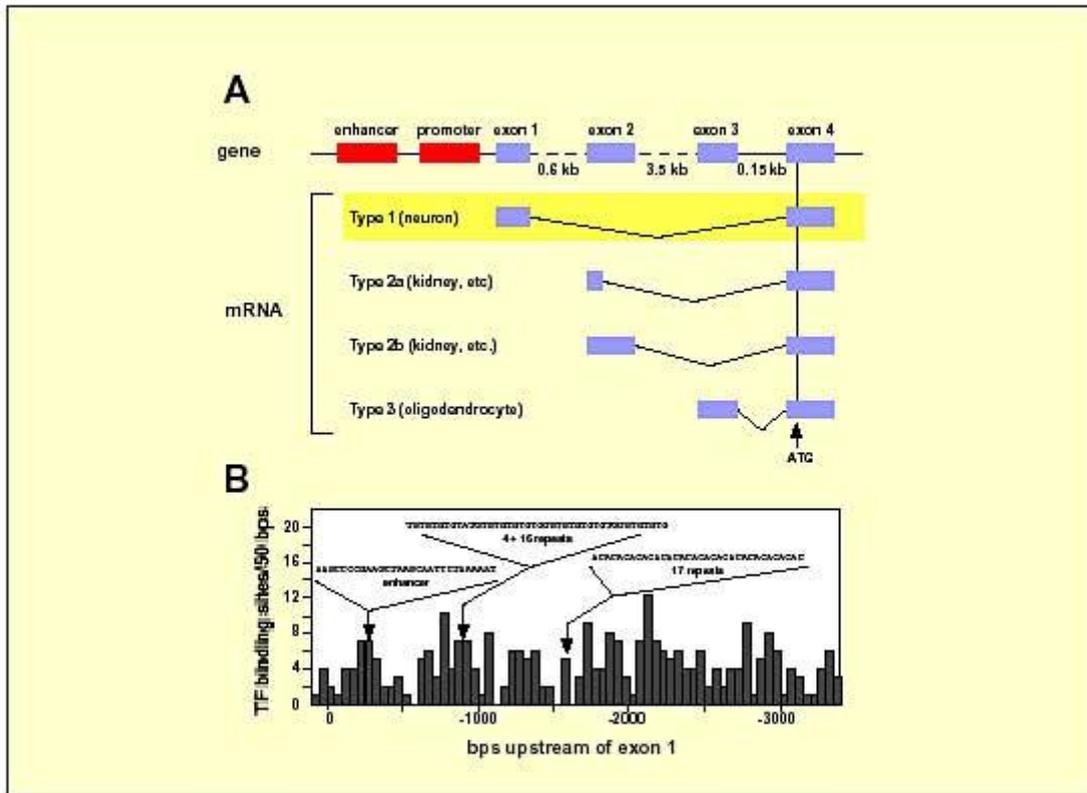
ヒト脳におけるアルツハイマー病病理によく相関している。

図10 ネプリライシンは海馬の神経細胞に存在する。



(写真：深見真二郎・渡辺かおり・岩田修永)

図 1 1 新たな遺伝的危険因子の存在の予測



ネプリライシンの遺伝子発現は、組織特異的に制御されている。神経細胞はタイプ1のmRNAを発現しているため、この発現制御に関わる遺伝子領域における変異や多型はアルツハイマー病の発症リスクに影響を与えると推測される。

## 結論

1. ネプリライシンの活性低下はA $\beta$ の蓄積を促進し、アルツハイマー病の原因となり得る。
2. ネプリライシンの活性低下を抑制する、あるいは、上昇させることによって、A $\beta$ の蓄積を抑制し、アルツハイマー病を予防することが可能になると予想される。

## 医学的応用

1. ネプリライシンの発現や活性を低下させるものは危険因子となり得る。これらを同定し、除去することによって発症のリスクを抑えることができる。
2. 遺伝子治療あるいは遺伝子転写制御によって、脳内のネプリライシンの発現を選択的に上昇させることが出来れば、孤発性アルツハイマー病だけでなく家族性アルツハイマー病の発症を抑制することが出来ると期待される。
3. 発症全診断への応用。脳の老化に伴ってネプリライシンの発現が低下するならば、その存在量を定量する事によって各個人の発症リスクを事前に予測することが出来る。

参考図

アルツハイマー病カスケードとアミロイドβ (Aβ)代謝

神経蛋白制御研究チーム  
(西道隆臣チームリーダー)



\* Aβは約40のアミノ酸残基よりなるペプチドである。