

2011年7月25日

埼玉医科大学
独立行政法人理化学研究所

アルツハイマー病の発症に関わるアミロイド前駆体タンパク質の新しい代謝経路を発見 －副作用の少ないアルツハイマー病治療薬の開発につながる可能性－

本研究成果のポイント

- アミロイド前駆体タンパク質の新規のアミロイド非産生経路を発見
- 新規の代謝経路はアミロイド前駆体タンパク質の脱リン酸化によって抑制されない
- リン酸化抑制はアルツハイマー病治療薬の新たな創薬の標的となる

埼玉医科大学（山内俊雄学長）と理化学研究所（野依良治理事長）は、アルツハイマー病の発症に関わるアミロイド前駆体タンパク質（APP）^{*1}が、既知のセクレターゼ^{*2}による代謝経路とは異なる経路で代謝されることを明らかにしました。これは、埼玉医科大学医学部（別所正美医学部長）薬理学教室の丸山敬教授、浅井将助教と、東京大学の石浦章一教授、柳下聡介大学院生（現在 理化学研究所 研究員）、理化学研究所の西道隆臣チームリーダー、岩田修永副チームリーダー（現在 理化学研究所 客員研究員）との共同研究による成果です。

アルツハイマー病は、老人性認知症の中でも最も多い原因疾患で、脳内にβアミロイド（Aβ）^{*3}が沈着することを発して、異常にリン酸化したタウが蓄積し、最終的に神経細胞が死滅することによって発症すると考えられています。Aβの前駆体であるAPPは、αまたはβセクレターゼによって代謝を受けてC末端断片（CTF）となり、CTFがγセクレターゼによって代謝を受けて最終的にAβやAPP細胞内領域（AICD）になります。これまで、塩化アンモニウムなどの薬物によって、γセクレターゼの基質（CTF）と生成物（AICD）が同時に溜まることはわかっていましたが、この現象についての詳細な研究はありませんでした。

今回研究グループは、このγセクレターゼの矛盾する不可解な現象には、CTFとAICDの分解酵素が存在するからではないかと仮定し、塩化アンモニウムなどで阻害されるプロテアーゼに注目して解析を進めました。その結果、これまで考えられていたセクレターゼによる代謝経路とは別に、リソソーム^{*4}などに多く存在するカテプシンB^{*5}によってCTFとAICDが分解されることを特異的な阻害剤CA-074Meを用いて明らかにしました。また、CTFの分解ではγセクレターゼと競合しないこと、γセクレターゼはリン酸化されたCTFを優先的に代謝することを明らかにしました。これらの結果は、APPの細胞内動態や機能についての理解を深めることにつながる可能性があります。また、APPのリン酸化阻害剤や脱リン酸化促進剤は、副作用の少ないアルツハイマー病治療薬の標的になりうることを示唆しています。

本研究は、科学研究費補助金、財団法人島原振興財団、および文部科学省地域イノベーションクラスタープログラム（都市エリア型）の助成を受けて行われたもので、科学雑誌「The FASEB Journal」オンライン版（7月11日付け：日本時間7月12日）に掲載されました。

1. 背景

アルツハイマー病は、老人性認知症の中でも最も多い原因疾患で、脳内に β アミロイド ($A\beta$) が沈着することを発して、異常にリン酸化したタウが蓄積し、最終的に神経細胞が死滅することによって発症すると考えられています。 $A\beta$ の前駆体タンパク質であるAPPの代謝を解明することは、アルツハイマー病の発症機構を明らかにし、治療薬の開発につながることから、精力的に研究が行われてきました。これまでの研究で、細胞膜を1回貫通したタンパク質であるAPPは、 α または β セクレターゼによって切断を受け、残ったC末端断片 (CTF) が γ セクレターゼによって切断されて、最終的に $A\beta$ やAPP細胞内領域 (AICD) になるという代謝経路をたどることがわかっていました (図1)。しかし、リソソームを阻害する塩化アンモニウムなどの薬物によって、 γ セクレターゼの基質 (CTF) と生成物 (AICD) が同時に溜まることも知られていましたが、この現象についての詳細な研究はありませんでした。

2. 研究手法と成果

(1) カテプシンBによるAPPの新しい代謝経路

今回研究グループは、 γ セクレターゼ活性が完全に欠損しているマウス胎児線維芽細胞^{*6}を用いて、塩化アンモニウム処理によってAPPのCTFが蓄積することを明らかにしました (図2A)。そこで、CTFとAICDの検出がしやすいように、APPが過剰発現するヒト・ニューログリオーマ由来培養細胞を用いて同様の実験を行ったところ、CTFとAICDが同時に蓄積しました (図2B)。

そこで、どのプロテアーゼが関与しているのかを明らかにするために、塩化アンモニウムで阻害されるリソソーム系のカテプシン群に注目し、各カテプシン阻害剤を用いて調べました。その結果、システインプロテアーゼ阻害剤E-64dとカテプシンB特異的阻害剤CA-074Meのみに効果があることがわかりました (図3)。

また、CA-074Me処理したとき、 α 、 β および γ セクレターゼの活性に変化は認められませんでした (図4)。このことから、既存のセクレターゼに依存しないカテプシンBを介したCTFとAICDの代謝経路があることがわかりました。

(2) カテプシンBと γ セクレターゼの関係

CTFは γ セクレターゼとカテプシンBの基質になることがわかりましたが、両者の関係を調べるために、それぞれの阻害剤を用いて実験を行いました。その結果、CA-074Me単独処理群と比較して、CA-074Meと γ セクレターゼ阻害剤を併用した処理群では、有意にCTFが蓄積することがわかりました (図5A、B)。また、このときに $A\beta$ 産生には影響がなかったことから (図5C)、両者はCTFを競合していないと考えられました。さらに、 γ セクレターゼの重要な基質の一つであるNotch^{*7}に対して調べたところ、CA-074Me処理はNotchの代謝に全く影響を及ぼしませんでした (図6)。このことから、カテプシンBはAPPのみに作用することがわかりました。

(3) γ セクレターゼとリン酸化CTFの関係

カテプシンBと γ セクレターゼがどのように区別してCTFを代謝しているのかを明らかにするために、CTFのリン酸化部位に変異を入れたAPPを細胞に遺伝子導入し、CTFの蓄積を解析しました。その結果、カテプシンB阻害ではリン酸化部位の変異による変化はありませんでしたが、 γ セクレターゼ阻害では変異があることによってCTFの蓄積度が減少することがわかりました(図7A、B)。さらに、リン酸化を特異的に認識する抗体を用いた解析によっても、 γ セクレターゼ阻害でリン酸化CTFとCTFの割合が増加することがわかりました(図7C、D)。

3. 今後の期待

今回、これまで見過ごされていたCTFとAICDを代謝する酵素の存在が明らかになりました。アルツハイマー病の原因物質と考えられている $A\beta$ と同じように、CTFやAICDの毒性も報告されています。カテプシンBの活性調節によって、これらの毒性が軽減される可能性があることを示唆しています。また、依然として不明な点が多いAPPの細胞内動態や機能についての理解を深めることにつながる可能性があります。

さらに、 γ セクレターゼがリン酸化したCTFを優先的に代謝していることが判明しました。 γ セクレターゼ阻害剤はアルツハイマー病治療薬の有力な候補でしたが、昨年臨床試験が中止となりました。低濃度では $A\beta$ を増加させ、高濃度では別の基質(Notchなど)の代謝も阻害してしまうという、適用可能な濃度範囲が非常に限られていることが原因かもしれません。一方、CTFのリン酸化阻害を標的とした薬剤の場合、 γ セクレターゼの他の基質には影響を及ぼさないのでAPPに限られ副作用が少ないことが予想されると同時に、APPのリン酸化を担う酵素は神経原線維変化の構成成分であるタウもリン酸化するので、タウのリン酸化も阻害するという相乗的な効果が期待されます。

<報道担当・問い合わせ先>

(問い合わせ先)

埼玉医科大学

医学部 薬理学教室

助教 浅井 将 (あさい まさし)

TEL: 049-276-1157 FAX: 049-276-1585

(報道担当)

学校法人埼玉医科大学 広報室

TEL: 049-276-2125 FAX: 049-276-2127

理化学研究所 広報室 報道担当

TEL: 048-467-9272 FAX: 048-462-4715

<補足説明>

※1 アミロイド前駆体タンパク質 (APP)

膜を1回貫通しているタンパク質で、全身に発現が認められている。主に、695個のアミノ酸残基からなる神経細胞特異的な型と、751個または770個のアミノ酸残基からなる神経細胞以外の型がある。細胞接着や細胞成長抑制、また代謝されて分泌された可溶性の断片 (sAPP) は栄養因子などの機能を有することが報告されている。APP遺伝子が欠損したマウスは生存可能であり、機能についてはまだ不明な点が多い。

※2 セクレターゼ

APPを代謝する酵素として仮想的に名付けられたが、現在では α 、 β および γ セクレターゼの実態がそれぞれ判明してきている。 β セクレターゼはBACEと呼ばれるアスパラギン酸プロテアーゼで、 γ セクレターゼはプレセニリンを活性中心とした4つの分子からなる複合体である。 β および γ セクレターゼによってA β が産生されるため、それぞれの阻害剤がアルツハイマー病治療薬の候補となっている。 α セクレターゼはA β の内部でAPPを切断するため、 α セクレターゼによって代謝されるとA β が産生されない。

※3 β アミロイド (A β)

アルツハイマー病に特徴的な病理像の一つである老人斑の構成成分として発見され、家族性アルツハイマー病でも産生能および分解能が変化することから、アルツハイマー病の主因物質として考えられている。 β セクレターゼによる代謝でAPPからCTFが生じ、膜に残ったCTFを γ セクレターゼが代謝してA β が産生される。約40アミノ酸残基からなるペプチドである。

※4 リソソーム

酸性の細胞内小器官の一つで、水解小体 (すいかいしょうたい) とも呼ばれる。生体膜に包まれた構造体で、内部に多くの加水分解酵素を持ち、膜内に取り込まれた分子が分解される。

※5 カテプシンB

リソソームを中心に、エンドソームなどの酸性小器官に存在するシステインプロテアーゼで、システインプロテアーゼ阻害剤E-64dや、カテプシンB特異的阻害剤CA-074、CA-074Meによって阻害される。エンドペプチダーゼおよびエキソペプチダーゼの両活性が報告されている。

※6 マウス胎児線維芽細胞

マウスの胎児から単離された細胞で、株化した培養細胞と同じように増殖能力を持つ。遺伝子欠損マウスが胎生致死の場合、不死化した線維芽細胞 (MEF) を用いて、その機能を解析することが多い。

※7 Notch

発生や分化に関係するシグナル伝達を担う分子で、 γ セクレターゼに代謝された Notch の CTF (NICD) が核内に移行して遺伝子の発現を調節する。 γ セクレターゼ阻害剤によって Notch を介するシグナルが遮断されると、重篤な副作用が引き起こされる。

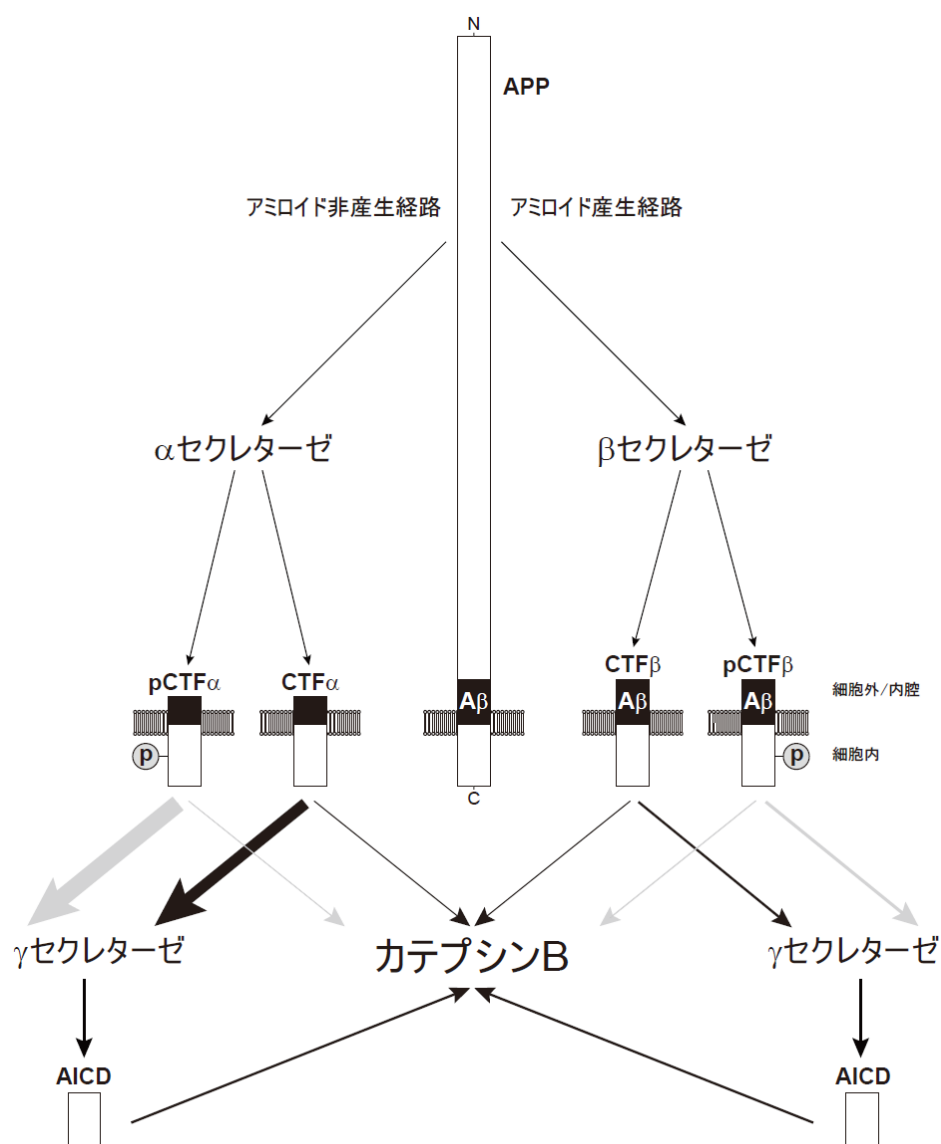


図1 セクレターゼによる APP 代謝とカテプシン B による新しい代謝経路

これまで、APP は α 、 β および γ セクレターゼによる代謝のみが考えられていたが、今回新たにカテプシン B も CTF と AICD を分解することが明らかになった。「p」はリン酸基を意味する。CTF から伸びる矢印の太さは代謝される量を相対的に表している。

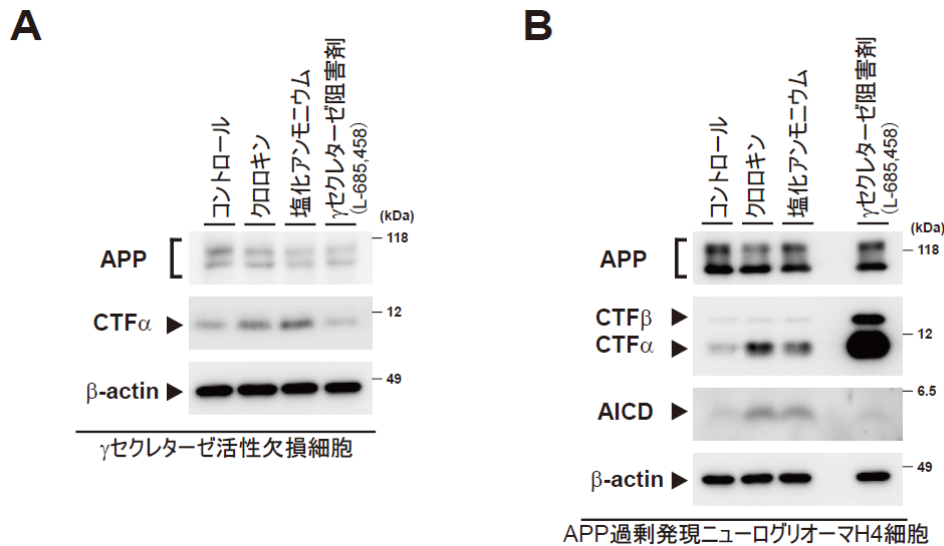


図2 塩化アンモニウムによる γ セクレターゼの基質(CTF)と生成物(AICD)の蓄積

(A) γ セクレターゼ活性が完全に欠損したマウス胎児線維芽細胞 (MEF) を塩化アンモニウムで処理すると α セクレターゼで代謝されたCTFが蓄積した。
(B) APPが過剰に発現するニューログリオーマH4細胞を塩化アンモニウムで同様に処理すると、CTFとAICDが蓄積した。

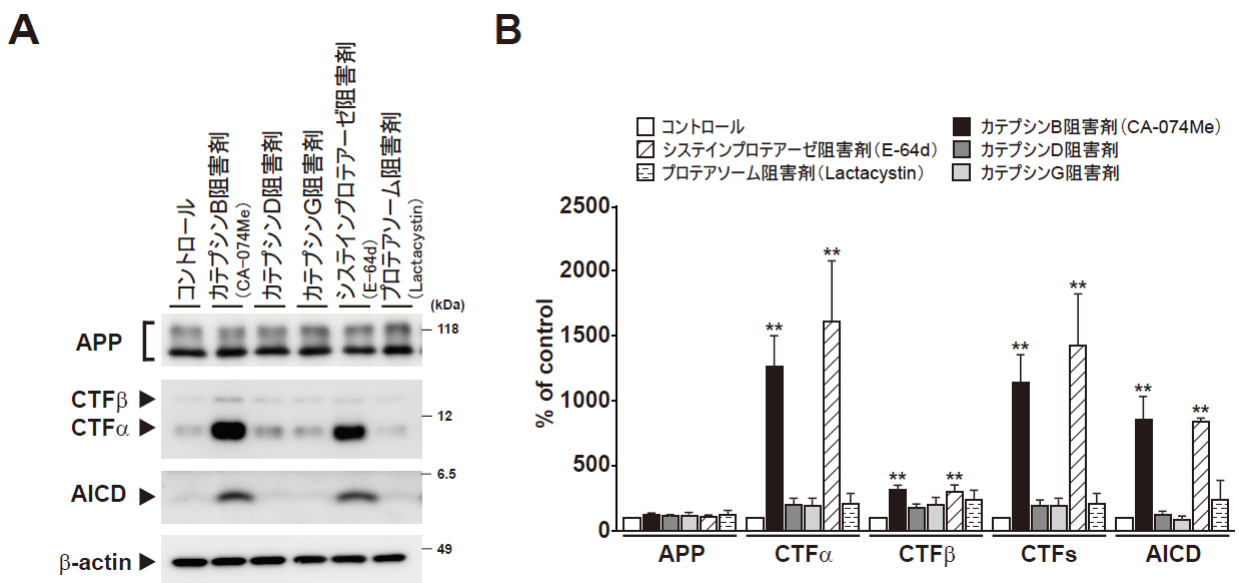


図3 システインプロテアーゼ阻害剤 E-64d とカテプシン B 特異的阻害剤 CA-074Me による CTF と AICD の蓄積

塩化アンモニウムで阻害されるリソソーム系プロテアーゼのうち、システインプロテアーゼのカテプシンBを阻害したときのみCTFとAICDが蓄積した。カテプシンBが主なCTFとAICDであると考えられた。ウェスタンブロッティング法*で検出し(A)、そのバンドのシグナル強度を定量した(B)。

* 電気泳動によってタンパク質を分離し、特異的な抗体を利用することで、目的とするタンパク質を検出・定量する方法

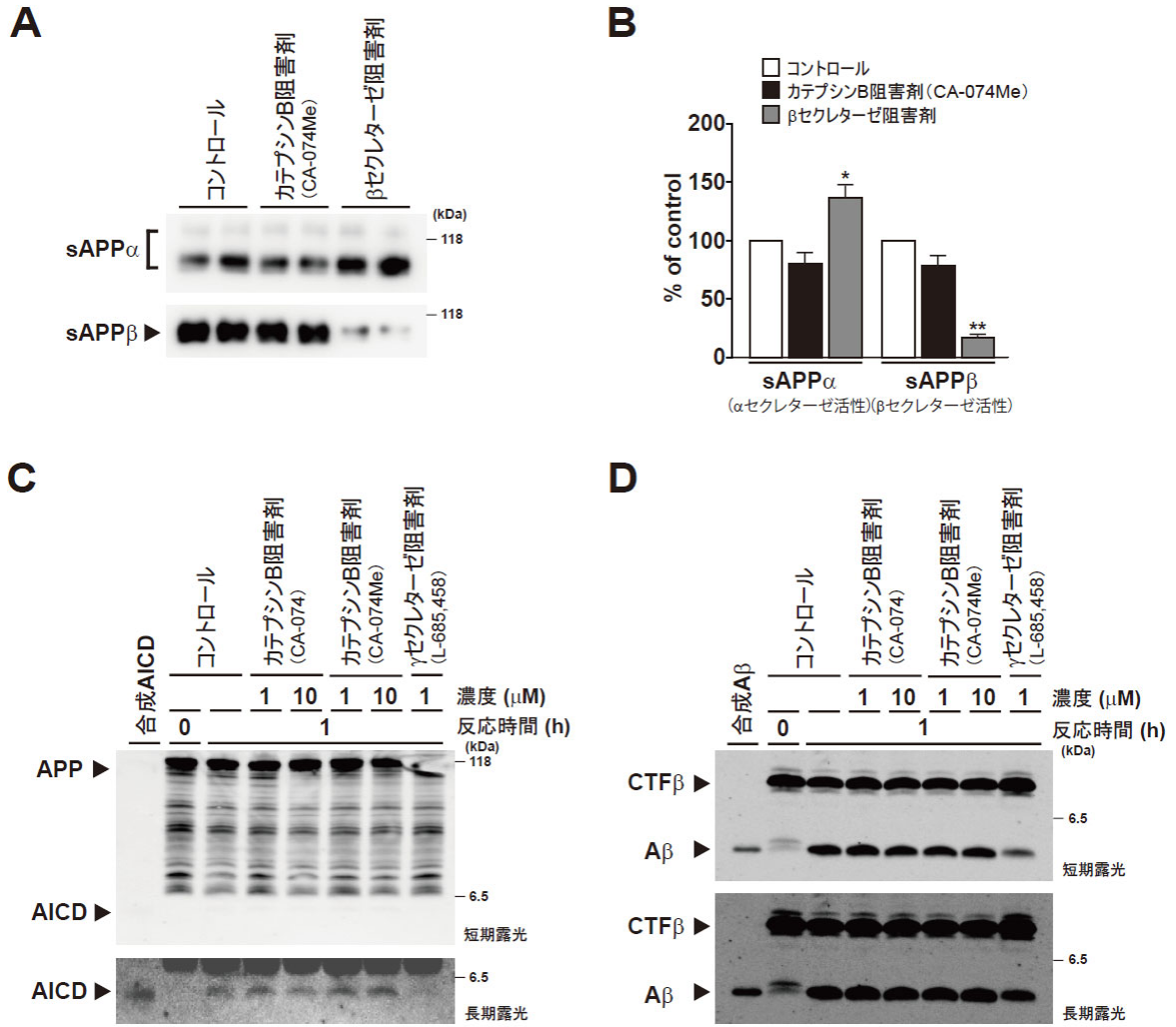


図 4 CA-074Me によるカテプシン B 阻害時の各セクレターゼ活性に対する影響

(A、B) CA-074Me でカテプシン B を阻害しても、 α および β セクレターゼによって分泌される sAPP 量には変化が認められなかった。
 (C、D) 膜画分を CA-074Me で処理しても γ セクレターゼ活性は残存し、AICD や A β を産生した。

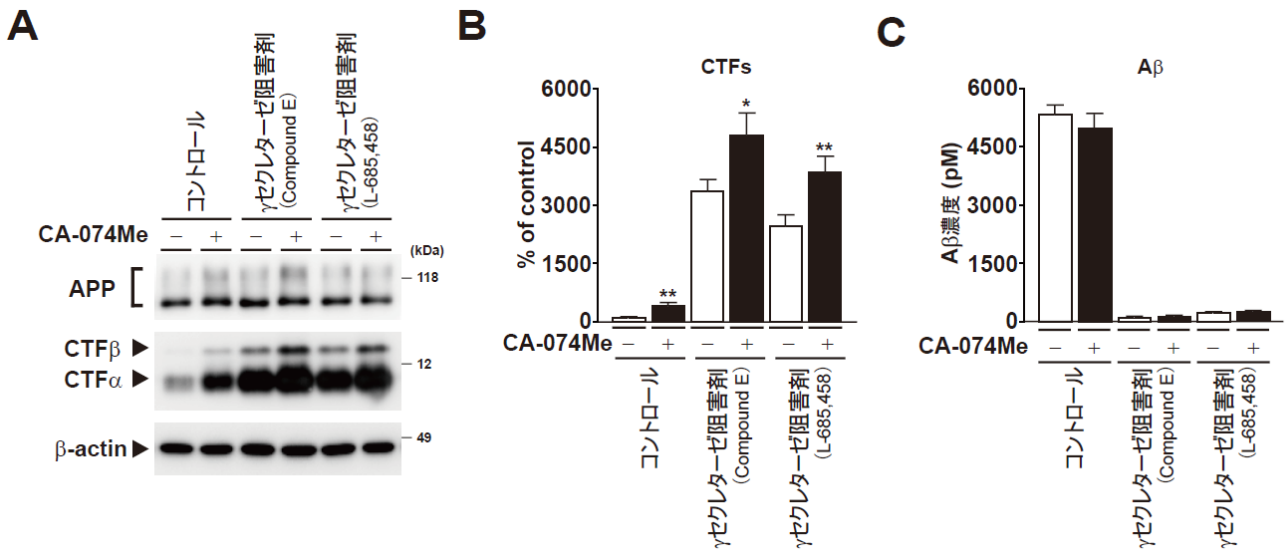


図5 カテプシンBとγセクレターゼは基質としてCTFを競合しない

(A、B) CA-074Me 単独処理と比較して、γセクレターゼ阻害剤との併用時ではCTFの蓄積が有意に増加した。

(C) 培地中に分泌されるAβ量をELISA法**で測定した。CA-074Me 単独処理とγセクレターゼ阻害剤との併用処理で、有意差が認められなかったことから、基質としてCTFを競合していないことがわかる。

** ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) の略。
試料中に含まれる微量サンプルを特異的に検出・定量する方法

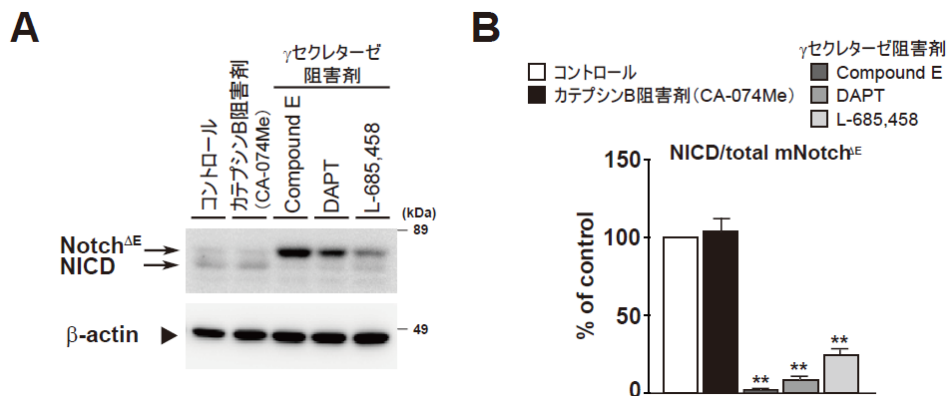


図6 カテプシンB阻害はNotchの代謝に影響を与えない

CA-074MeでカテプシンBを阻害すると、γセクレターゼによって代謝されたNotchの細胞内領域NICDが産生されたが、γセクレターゼ阻害剤では産生されなかったことから、Notchの代謝には影響がないことがわかる。Compound E、DAPT、L-685,458は代表的なγセクレターゼ阻害剤である。

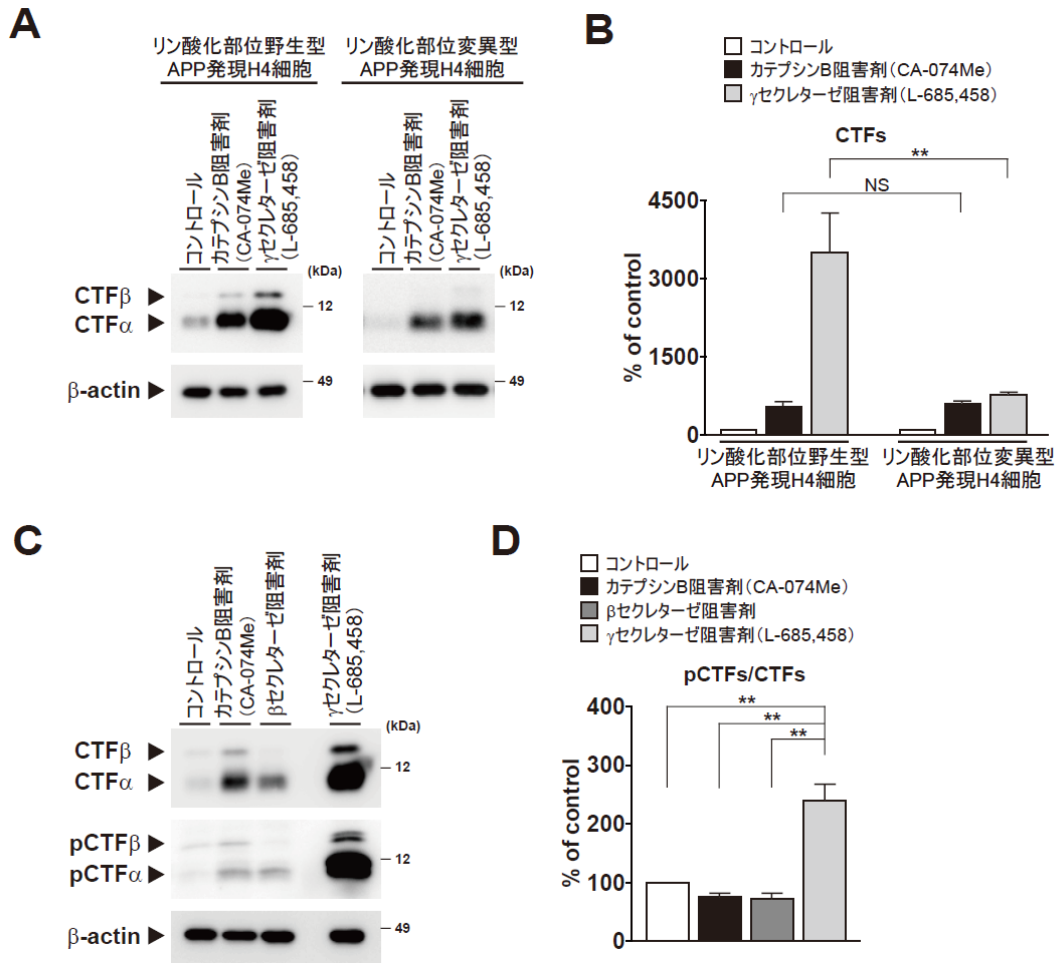


図 7 カテプシン B 阻害は Notch の代謝に影響を与えない

(A、B) リン酸化部位に変異を導入したAPPではγセクレターゼ阻害によって蓄積するCTFが有意に減少した。一方、カテプシンB阻害では有意な差は認められなかった。

(C、D) リン酸化されたCTF (pCTF) を特異的に認識する抗体を用いて検出し、pCTFと全CTFの割合を比較した。その結果、CA-074Meとβセクレターゼ阻害剤ではコントロールと有意差がなかったが、γセクレターゼ阻害剤だけ有意に増加した。