

博士学位論文審査要旨

2022年1月19日

論文題目：APPの細胞内輸送および代謝制御による新規アミロイド β 産生抑制法の確立

学位申請者：佐藤 和佳

審査委員：

主査：生命医科学研究科 教授 西川 喜代孝

副査：生命医科学研究科 教授 野口 範子

副査：脳科学研究科 教授 貫名 信行

要旨：

アルツハイマー病 (Alzheimer's Disease; AD) は、記憶、学習能力の低下を主徴とする神経変性疾患である。AD 発症の前段階より、脳の海馬、新皮質に Amyloid β (A β) と呼ばれるタンパク質が蓄積した凝集体（老人斑）が形成されており、この A β の脳内沈着、凝集が AD の発症の原因と考えられている。従って、A β の産生、蓄積を抑制することは有効な AD 治療戦略となりうる。

A β の前駆体であるアミロイド前駆体タンパク質 (APP) は、小胞体で合成され、一部は細胞膜へ順行輸送される。この細胞膜上にある APP がエンドサイトーシスにより再び細胞内に取り込まれ、輸送される過程で β -および γ -セクレターゼによる連続切断を受け、A β が産生される。本研究では、1) 上記細胞内小胞輸送の制御、2) A β 産生に関わる代謝経路の制御、の 2 つの異なるアプローチから A β の産生・放出を抑制する新たな手法を確立することを目的とする。

研究項目 1) では、APP と志賀毒素 (Stx2a) のエンドサイトーシス機構は、脂質ラフトに存在する糖脂質を介するという点で極めて類似していること、さらに Stx2a は後期/リサイクルエンドソームからリソソームに輸送され効率よく分解される経路を有していること、に着目し検討を行った。その結果、無毒化した mStx2a を用いることで APP のリソソームへの輸送を促進させること、その結果 APP の分解を誘導し、A β 産生を抑制することが可能であること、を見出した。

研究項目 2) では、多価型ペプチドシートスクリーニング法を用いることにより、A β の産生・放出を阻害する 4 価型ペプチド、LME-tet を開発した。LME-tet は、エンドソームでの β -切断を特異的に阻害し、A β 産生を抑制すること、を見出した。さらに、LME-tet は、個体レベルにおいても十分な脳内 A β 蓄積阻害作用を示すことが明らかとなった。興味深いことに、LME-tet は A β 産生抑制だけではなく、凝集抑制という優れた機能を兼ね備えていることから、複数の作用機構を持つ、これまでにない新規の AD 治療薬としての発展が期待できる。

よって、本論文は、博士（理学）（同志社大学）の学位を授与するにふさわしいものであると認められる。

総合試験結果の要旨

2022年1月19日

論文題目：APPの細胞内輸送および代謝制御による新規アミロイドβ産生抑制法の確立

学位申請者：佐藤 和佳

審査委員：

主査：生命医科学研究科 教授 西川 喜代孝

副査：生命医科学研究科 教授 野口 範子

副査：脳科学研究科 教授 貫名 信行

要旨：

総合試験は、2022年1月19日午後6:00から、口頭発表（45分）、質疑応答・口頭試問（45分）の構成で実施した。申請者は総合試験において、神経変性疾患領域、細胞生物学領域、タンパク質構造領域等様々な方面からの質問に関して的確に回答しており、幅広い分野で十分な専門知識を有していることが確認できた。また、各実験について、その目的、意義、研究全体の中での位置付けが十分に理解できていること、各々が慎重に組み合わされて結論が導き出されていること、等博士に相応しい研究スタイルを習得していることが確認できた。さらに、得られた実験結果をベースとして、これまでの文献情報に習熟した上で説得力のある独自性の高いモデルへと発展させる能力を備えていることが確認できた。特に、現在アルツハイマー病治療で問題となっている酵素阻害剤による副作用の問題に答えるべく、ペプチドをベースとした新たな阻害薬を開発することに成功し、さらに新たな創薬コンセプトの創出へと発展させた点は高く評価できる。

申請者は、博士課程（後期）入学時の語学試験（英語）に合格していることから、十分な語学能力を有していると判断される。

よって、総合試験の結果は合格であると認める。

博士学位論文要旨

論文題目：APPの細胞内輸送および代謝制御による新規アミロイドβ産生抑制法の確立

氏名：佐藤和佳

要旨：

アルツハイマー病（Alzheimer's Disease；AD）は、記憶、学習能力の低下を主徴とする神経変性疾患である。AD発症の前段階より、脳の海馬、新皮質にAmyloidβ（Aβ）と呼ばれるタンパク質が蓄積した凝集体（老人斑）が形成されており、このAβの脳内沈着、凝集がADの発症の原因と考えられている。そのため、Aβの産生、蓄積を抑制することは、有効なAD治療戦略となりうる。

Aβの前駆体であるアミロイド前駆体タンパク質（APP）は、小胞体で合成され、一部は細胞膜へ順行輸送される。この細胞膜上にあるAPPがエンドサイトーシスにより再び細胞内に取り込まれ、輸送される過程で β -および γ -セクレターゼによる連続切断を受け、Aβが産生される。この時、APPが β -セクレターゼにより切断されてC99が産生し、このC99が γ -セクレターゼにより切断されてAβ（Aβ40ならびに42）が産生する。産生されたAβは小胞輸送等により細胞外へと放出され、その後、不溶性の凝集体を形成する。従って、この一連の過程のいずれかを制御できればAβの産生・放出を抑制することができると期待される。本研究では、1) 上記細胞内小胞輸送の制御、2) Aβ産生に関わる代謝経路の制御、の2つの異なるアプローチからAβの産生・放出を抑制する新たな手法を確立することを目的とする。

1) APPの細胞内小胞輸送制御によるAβ産生抑制

APP上のAβに相当する領域は、細胞膜上の脂質ラフトに多く存在しているGM1などのスフィンゴ糖脂質（glycosphingolipid; GSL）と結合すること、同じく脂質ラフトに多く存在するコレステロールはこの結合を促進すること、APPはこの脂質ラフトからエンドサイトーシスされること、が示されている。その一方で、O157:H7に代表される腸管出血性大腸菌が産生する志賀毒素（Stx）は、そのBサブユニット5量体を介して標的細胞膜の脂質ラフトに存在するGSLの1種、Gb3に結合しエンドサイトーシスされること、その後ゴルジ体さらに小胞体へと逆行輸送され、小胞体内から毒素活性を担うAサブユニットが細胞質へ移行しタンパク質合成を阻害すること、が示されている。すなわち、両者のエンドサイトーシス機構は脂質ラフトに存在するGSLを介するという点で極めて類似している。

StxにはStx1ならびにStx2の2つのファミリーが存在し、Stx2の方がはるかに個体毒性が強いことが知られている。我々はこれまでに、Stx2の細胞内輸送には上記逆行輸送経路に加え、後期リサイクルエンドソームへの輸送経路が存在すること、そこから多胞体（MVB）の形成を経て、遊離型あるいはエクソソーム結合型Stx2として細胞外に放出されること、このエクソソーム結合型Stx2が個体強毒性の本体であること、を見出している。さらにStx2の一部は、リソソームに輸送され、効率よく分解されることを見出した。

以上のことから、APPを発現した細胞をStx2処理することにより、APPをStx2に特徴的な小胞輸送経路に誘導し、さらにリソソームへの輸送を介して分解を誘導できるのではないかと考え検討を行なった。ここでは、Aサブユニットに変異を導入し無毒化した変異型Stx2（mStx2）を使用した。ヒトAPP安定発現CHO細胞を4°CでmStx2処理したところ、細胞膜上のAPPなら

びに mStx2 の局在は非常によく一致することを見出した。その後、37°C に昇温後の APP の細胞内局在を検討したところ、mStx2 依存的にリソソームマーカーである LAMP1 ならび酸性コンパートメントの指標である Lysotracker と共に局在することを見出した。そこで、細胞内 APP、C99、A β ならびに細胞外に放出される A β に対する mStx2 の効果を検討したところ、いずれも有意に減少することを見出した。このことから、細胞膜上の APP は mStx2 とともにエンドサイトシスされ、同じ小胞に乗って輸送されること、この場合 mStx2 の影響をより強く受け、リソソームへと輸送され効率よく分解されること、その結果、細胞内外の A β が減少する、と考えられた。

これまでに、内在性の膜タンパクである、CD2-associated protein (CD2AP) が APP の初期エンドソームから後期エンドソームさらにリソソームへの輸送を促進し、APP の分解を誘導することが知られている。また、他のアダプタータンパクである sortilin や sortilin-related receptor (SorLA) は直接 APP と結合し、それぞれが独自に APP の輸送を制御することが知られている。その一方で、外部からの刺激によって APP の細胞内輸送を制御し、分解へと誘導する分子はこれまでに報告がなく、mStx2 はそれが可能であることを示した初めての例である。神経細胞膜上にも Gb3 の存在が報告されていることから、mStx2 による脳内 A β の蓄積抑制という新たな治療戦略の可能性が示された。

2) A β 産生に関わる代謝経路の制御による A β 産生抑制

ここでは、A β 産生を抑制するため、A β 産生に関わる代謝経路を制御する分子を開発することとした。これまでに、 β -および γ -セクレターゼを直接の標的とした阻害剤は開発されているが、これら酵素はそれぞれ APP、C99 以外にも複数の分子を生理的な基質としているため、それらの分子の切断を阻害することによる副作用の発現が問題視されている。そこで、ここでは APP、C99、あるいは A β に直接結合することにより、本代謝経路を抑制する分子の同定を試みた。まず、A β の配列は、APP ならびに C99 にも共通して存在することに着目し、A β の部分領域 (A β のアミノ末端から 28 番目の Lys までの領域 : A β 1-28) をプローブとして用い、一連の高親和性ペプチドの取得を目指す。取得したペプチドの中から A β の産生・放出を阻害するペプチドを同定し、その作用機構の詳細を解明する。

高親和性ペプチドの取得にあたっては、APP ならびに A β が多量体を形成しやすい性質を持つことに着目し、独自技術である多価型ペプチドシートスクリーニング法 (特許第 5897178 号、特許第 6422046 号) を用いる。多価型ペプチドライブラーは分岐核構造に 4 本のランダムペプチドが結合した構造を持ち、それ自体がクラスター効果を発揮することができる。多量体構造を取って機能する標的分子との結合活性を指標に本ライブラーをスクリーニングすることにより、高親和性ペプチドを取得することができる。そこで本法を用い、A β 1-28 に対する高親和性結合ペプチドの取得を試みた。

7段階に渡るスクリーニングの結果、19種の4価型高親和性結合ペプチドを同定した。そこで、ヒト APP 安定発現 CHO 細胞を用い、各 4 価型ペプチドの細胞内 C99、A β 、ならびに培養液中の A β に対する効果を検討した。その結果、19種の4価型ペプチドのうちの一つ、LME-tet が細胞外に放出される A β 量を顕著に減少させることを見出した。興味深いことに、LME-tet と同じモチーフを持つモノマート (LME-mono) では細胞外 A β 量の減少効果は全く見られなかった。また、LME-tet は、細胞内で APP、C99、A β に結合する一方で、LME-mono は全く結合しないことから、LME-tet は多価型の相互作用を介してこれら分子に結合し、機能することを明確に示している。このことは、従来のモノマー型ランダムペプチドライブラーからのスクリーニングでは LME-tet 様の活性を示す分子の同定は極めて困難であることを示している。さらに LME-tet の性状を解析したところ、興味深いことに、LME-tet は A β 42 に結合し、その後の線維化ならびに凝集を顕著に抑制することを見出した。すなわち、LME-tet は A β の産生ならびに凝集抑制という 2 つの作用を有することを明らかにした。

次に LME-tet の A β 産生抑制機構について検討を行なった。APP 安定発現 CHO 細胞を 4°C で

LME-tet 处理したところ、細胞膜上の APP と共に局在すること、その後 37°C に昇温すると LME-tet ならびに APP は初期エンドソームマーカーである EEA1 と共に局在すること、すなわち LME-tet は細胞膜上の APP に結合後エンドサイトシスされ、初期エンドソームに輸送されることが示された。次に、APP の β -および γ -セクレターゼによる切断は初期エンドソーム以降で起こることから、細胞内での β -セクレターゼ産物である細胞外 sAPP β 量を測定したところ、LME-tet の濃度依存的に減少していることを見出した。その一方で、APP 以外の基質の β -切断には影響を与えないことから、LME-tet は、APP に直接結合することにより、 β -セクレターゼ活性そのものには影響を与えることなく、 β -セクレターゼによる APP の切断を特異的に阻害していることを示している。このことを確認するために、APP と同じ切断部位を持つ基質を用いてインビトロで β -セクレターゼ活性を測定したところ、LME-tet は濃度依存的に切断を阻害すること、一方で LME-mono は阻害活性を示さないを見出した。また、LME-tet はインビトロで γ -セクレターゼ活性を阻害しない。このことから、LME-tet はクラスター効果を発揮して APP と多価型の強い結合を形成し β -セクレターゼによる切断を阻害すること、その結果 A β 產生を抑制することで細胞外への A β の放出・蓄積を阻害すると考えられた。

最後に AD モデルマウスに対する LME-tet の効果を検討した。家族性 AD 患者にみられる遺伝子変異 を導入した AD モデルマウス (APP^{NLGF} マウス) に、PBS あるいは LME-tet を腹腔内投与 1 週間後に脳を摘出し、大脳皮質及び嗅球を回収した。ホモゲナライズ後、特異的抗体を用いたウエスタンブロッティング法により A β 量を定量した。その結果、LME-tet 处理群ではコントロール群に比べ脳内 A β 蓄積量が顕著に減少することを見出した。

近年、 β -セクレターゼの触媒部位を標的とせず同酵素による APP 切断を特異的に阻害する戦略が注目されている。通常 APP はコレステロールと結合することで二量体形成が抑制されているが、コレステロール合成阻害剤によりその二量体化が促進されること、その結果 β -セクレターゼによる APP 切断が阻害され A β 产生が減少すること、が示されている。また、 β -セクレターゼ阻害剤にステロール構造を付加するとエンドソームに局在する様になること、その結果エンドソームでの β -セクレターゼによる APP 切断が選択的に阻害されること、が示されている。LME-tet はこれらの阻害剤とは異なり、直接 APP と多価型の結合を形成することで APP の多量体化を誘導し、その結果 β -セクレターゼによる APP 切断を阻害していると考えられる。このことから、LME-tet は新規の作用機構をもつ、極めて特異性に優れた APP 切断阻害薬、A β 产生阻害薬として期待できる。