孤発性アルツハイマー病の発症機構の解明と新規生化学診断マーカーの開発に係わる薬学的研究

羽田沙緒里

Molecular Pathogenesis of Sporadic Alzheimer's Disease (AD) and Pharmaceutical Research to Develop a Biomarker for AD Diagnosis

Saori Hata

*Hokkaido University, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Laboratory of Neuroscience;
Kita 12, Nishi 6, Kita-ku, Sapporo 060-0812, Japan.*

(Received June 1, 2015)

Alzheimer's disease (AD) is the most common senile dementia. One of the pathological characteristics of AD is the appearance of senile plaques composed of amyloid- β ($A\beta$) depositions. $A\beta$ is generated by consecutive cleavages of $A\beta$ precursor protein (APP) by β - and γ -secretases. The common pathogenesis for familial AD (FAD) is believed to involve misprocessing of APP by γ -secretase, resulting in increased $A\beta_{42}$ peptide deposition. However, little is known about γ -secretase function in sporadic AD (SAD), which is the major type of AD. This may be because $A\beta_{42}$ peptide has highly aggregative properties; therefore it is not easy to estimate the quantitative alteration of net $A\beta_{42}$ in SAD patients. Alcadin is a family of neural type I membrane proteins. Processing of Alcadin by APP α - and γ -secretases results in secretion of non-aggregative peptide, p3-Alc, into CSF and blood. The C-terminuses of $A\beta$ and p3-Alc are altered by FAD-linked genetic mutations in catalytic components of γ -secretase, in association with an increase in minor $A\beta$ and p3-Alc species. Thus p3-Alcs are expected to behave as useful indicators of γ -secretase dysfunction in SAD brain. Quantitative and qualitative analyses of p3-Alcs raise the possibility that γ -secretase dysfunction may exist even in the absence of genetic mutations. p3-Alc peptides may be a novel biomarker for AD and an indicator of γ -secretase dysfunction for drug development.

Key words—Alzheimer's disease (AD); biomarker; alcadin

はじめに

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease; AD) は進行性の神経変性疾患であり、AD 患者の急増が社会的な問題となっているが、根本的な治療法はまだ確立されていない。AD は脳内で神経変性が起こってから、認知症を発症するまでの期間が長く、発症後には神経変性が進行しすぎているため根本的な治療が難しいと考えられる。そのため認知症発症の初期段階あるいは前段階において AD を早期診断できる方法を確認することは、AD の治療薬開発のためにも重要である。

AD は、家族性 AD (familial AD; FAD) と孤発

性 AD (sporadic AD; SAD) に分類され、FAD は原因遺伝子の変異によって、アミロイド β (amyloid- β ; $A\beta$) ペプチドの産生が増加することが発症に関与していると考えられている。一方 AD の大部分を占める SAD は、FAD と同じような病態を示すが、原因遺伝子に変異を持たず、発症メカニズムは多様であると考えられる。 $A\beta$ は AD 患者脳で検出される老人斑の主要構成成分であり、アミロイド前駆体タンパク質 (amyloid- β precursor protein; APP) が細胞外の膜近傍部位において β セクレターゼによる切断を受け、その後細胞膜内領域において γ セクレターゼによる切断を受けることによって産生される。二次切断を行う γ セクレターゼの切断サイトには多様性があり、切断サイトの違いによりメジャー分子種である 40 アミノ酸からなる $A\beta_{40}$ や、マイナー分子種ではあるが凝集性の高い 42 アミノ酸からなる $A\beta_{42}$ などが産生される。

北海道大学大学院薬学研究院神経科学研究室 (〒060-0812 札幌市北区北 12 条西 6 丁目)

e-mail: shata@pharm.hokudai.ac.jp

本総説は、平成 26 年度日本薬学会北海道支部奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

A β 42は凝集することによって可溶性オリゴマー化し、シナプス毒性を発揮するようになる。FADだけではなく、SADにおいてもA β 42が発症に係わっていると考えられているが、A β 42は凝集性が高いため正味の産生量・産生量比を生体内で定量することが難しい。γセクレターゼ切断変化解析するためには、APP以外のγセクレターゼ基質が切断されるメカニズムを解析することが有用であると考えた。そこで、筆者はAPPと同じ様式・切断酵素で代謝されるI型膜タンパク質 alcadein (Alc)に着目し、その代謝産物である p3-Alc の解析を進めてきた。本稿では Alc の γセクレターゼによる切断及び SAD 患者サンプルを用いた p3-Alc の解析結果を概説する。

Alc 代謝と機能

APPはβセクレターゼとγセクレターゼによる二段階の切断によってAβを産生する。これ以外の代謝経路としてAPPはαセクレターゼ及びγセクレターゼによるAβ非産生的代謝も受ける。このどちらの経路により代謝されるかは、APPの細胞内輸送によって決定されると考えられる。それを制御するドメインと想定されるAPPの細胞質領域に結合するタンパク質を探索した結果、X11ファミリーが単離・同定された。¹⁾ X11ファミリーは、X11 (Mint1), X11L (Mint2), X11L2 (Mint3) からなる細胞質アダプタータンパクであり、このうち神経特異的に発現しているX11Lの機能解析を進める過程でX11Lの結合分子として単離・同定されたのがAlcである。²⁾

Alcは、中枢神経系に強い発現を示すI型膜タンパク質であり、ヒトではそれぞれ独立した遺伝子がコードする alcadein α (Alcα), alcadein β (Alcβ), alcadein γ (Alcγ) の3つのファミリー分子として存在する。Alcの生理的機能には未解明な点が多いが、当研究室の解析によってAlcがX11Lを介してAPPと結合することによりAPPの代謝を抑制し、Aβの産生量を減少させること、³⁾ Alcの一次切断産物がAPPの細胞内輸送を変化させること、⁴⁾ APPと同様にAlcが順行性輸送を担うキネシン-1のカーゴ受容体としての機能を有すること⁵⁾を明らかにしてきた。また、Alcは老人斑周辺の腫大神経突起にAβとともに蓄積していること²⁾から、AlcはAD関連タンパク質であると考えられる。

AlcもAPPと同じ代謝様式で二段階の切断を受ける。細胞外の膜近傍領域でαセクレターゼによる一次切断を受けることによって、細胞外に soluble Alc (sAlc) を分泌し、残った Alc C-terminal fragment (CTF) がさらに細胞膜内領域においてγセクレターゼによる二次切断を受けることによって、細胞外に p3-Alc を、細胞内に Alc intracellular domain (ICD) を分泌する (Fig. 1)。二段階の切断によって細胞外に分泌される p3-Alc は、APPにおけるAβに相当するペプチドである。Alcファミリーそれぞれから分泌される p3-Alc は、Alcαから分泌されるものを p3-Alcα, Alcβから分泌されるものを p3-Alcβ, Alcγから分泌されるものを p3-Alcγと呼ぶ。APPと同様に、Alcのγセクレターゼによる切断サイトには多様性があるため、それぞれの p3-Alc にはアミノ酸数の異なる複数の分子種が存在する (Fig. 2)。ヒト脳脊髄液 (cerebrospinal fluid; CSF) 中からはすべての p3-Alc 分子種が検出可能であり、そのうち p3-Alcαと p3-Alcβは、Aβ40に相当する主要分子種、Aβ42に相当するマイナー分子種がAβと同程度量CSF中で存在する。さらに、p3-Alcαと p3-Alcβはヒト血漿中からも検出可能である。Alcは主に中枢神経系に発現しているため、脳内で分泌された p3-Alc の一部が血漿中にも移行していると考えられる。

Alc の γセクレターゼによる切断

APP及びAlcの二次切断を担うγセクレターゼはpresenilin (PS), Nicastrin, Aph1, Pen-2からなる複合体であり、その中で触媒サブユニットであるPSには、これまでにFAD患者の家系において160種類以上の遺伝子変異が見つかった。これらのPSの遺伝子変異体はAPPのγセクレターゼ切断を変化させ、結果としてAβのマイナー分子種であり凝集性の高いAβ42の生成量を増加させるか、主要分子種であるAβ40との産生量比 (Aβ42/40) の変化を引き起こす。培養細胞を用いて p3-Alc の解

羽田沙緒里

北海道大学大学院薬学研究院 神経科学研究室 助教、博士 (生命科学)、日本学術振興会 特別研究員 (DC1) 採用、北海道大学大学院生命科学院 後期博士課程修了。2010年より現職。専門：神経科学。

Fig. 1. Metabolism of Alcadein and APP

Fig. 2. Mass Spectrum of p3-Alc and Aβ Peptides in Human Cerebrospinal Fluid

析を行った結果、FAD PS1 変異体によって Alc ファミリーから分泌されるすべての p3-Alc で、マイナー分子種と主要分子種の産生比率が変化することがわかった。⁶⁾ p3-Alc は Aβ とは異なり凝集性がないことから、生体内における APP の γ セクレターゼ切断変化を反映し得るペプチドであると考えられた。

APP の γ セクレターゼによる切断は、最終産物である Aβ を産生する γ サイトよりも C 末端側にある ε サイトから始まることが示唆されている。γ セクレターゼは、一次切断後まず Aβ49 を産生する部位を切断し (ε 切断と呼ぶ)、さらに 3 アミノ酸ずつ N 末側のサイトを切断し Aβ46, Aβ43 を産生した後、最終的にメジャー分子種である Aβ40 を産生する部位で切断を行う (γ 切断と呼ぶ) と考えられる。これ以外に Aβ48 に相当する部位で ε 切断を行い、同様に Aβ48, Aβ45 を産生した後、マイナー分子種である Aβ42 を産生する部位で切断し、場合によってはさらに Aβ38 を産生する部位まで切

断するという「トリペプチド仮説」が提唱されている。^{7,8)} 同じ γ セクレターゼの基質である Alc も APP と同様のメカニズムで γ セクレターゼによる切断を受けているのかを検証した。APP の γ セクレターゼ切断では、最初の ε 切断がその後の γ 切断サイトをほぼ決定することが示唆されているが、Alc の γ セクレターゼ切断では ε 切断と γ 切断は相関していない可能性が強く示唆された。⁹⁾ Alc と APP の γ セクレターゼ切断機構は違いが認められるため、様々な γ セクレターゼ機能変化が Alc ファミリーの γ セクレターゼ切断産物に現れる可能性がある。

SAD 患者の脳脊髄液・血液中における p3-Alc

培養細胞を用いた実験より p3-Alc のマイナー分子種とメジャー分子種の比率が Aβ42/40 の産生比率の変化と相関したことから、p3-Alc は Aβ とは異なり凝集性がないこと、さらに CSF 中・血漿中のいずれからでも検出可能であることから、p3-Alc は生体内における γ セクレターゼの機能変化を反映する

ペプチドとして有用であると考えた。

AD 患者の CSF 中及び血漿中では、 $A\beta_{42}$ 量が減少するという報告が多い。しかし、これは $A\beta_{42}$ の凝集性が高いため、正味の産生量を反映しているわけではなく、SAD 患者の中には FAD と同様に $A\beta_{42}$ の産生量・産生量比が変化している患者がいるのではないかと仮説を立てた。これを検証するために、SAD 患者の CSF を用いて、p3-Alc α の質的変化解析を行った。p3-Alc α の $A\beta_{42}$ に相当するマイナー分子種は、p3-Alc α_{38} である。認知症の重症度毎に p3-Alc α_{38} の比率を解析したところ、認知症の初期段階（認知症疑い）からその比率が増加していた。¹⁰⁾ さらに、この比率変化は他の神経疾患患者群ではみられなかったことから、AD 患者特異的な変化であることが示された。この結果から、SAD 患者の中には遺伝子変異がなくても、FAD 患者と同様に γ セクレターゼによる基質切断変化が起こっている患者がいる可能性があることがわかった。

次に SAD 患者の CSF 中で p3-Alc が量的に変化しているかを検証するために、p3-Alc α を特異的に定量可能な sELISA 系を作成し、複数の医療機関から供与された CSF を用いて、p3-Alc α の量的解析を行った。その結果、コントロール群と比較して AD 患者群では p3-Alc の量が増加していたコホートと、有意差が認められなかったコホートがあった。有意差がなかったコホートでは、 $A\beta_{42}$ 値 500 pg/mL 以下を AD の診断基準としてカットオフしていた。 $A\beta$ 値を診断基準にした場合の影響を調べるために、 $A\beta_{42}$ の定量値を診断基準としていないコホートで、カットオフを行った場合及びカットオフにより漏れた患者群に関して CSF 中の p3-Alc α 量の比較を行った。その結果、カットオフをした場合の p3-Alc α 値は非 AD と AD 群において有意差がなかったのに対し、カットオフから漏れた患者では AD 群において有意に p3-Alc 量が多く、p3-Alc α 値と $A\beta_{40}$ 値は有意に相関した。¹¹⁾ このことは、 $A\beta_{42}$ 値のカットオフを行った場合に見逃された AD 患者を p3-Alc α の定量によって生化学的に再診断候補として拾い上げることができる可能性を示唆すると考えられる。

CSF よりも採取が容易である血液を用いた診断法が、AD 発症前段階あるいは初期段階の患者をスクリーニングにより診断するためにも重要である。

Alc ファミリーは主に中枢神経系に発現し、CSF 中の p3-Alc α 量と血漿中 p3-Alc α 量は相関していることから、血液中に検出される p3-Alc α は脳の神経細胞由来であり、脳の中の γ セクレターゼ切断変化を血漿中の p3-Alc を検出することにより捉えられる可能性がある。血漿中には p3-Alc 定量時の抗原抗体反応を阻害する物質が存在するため、抽出操作による前処理を行い定量可能となる。複数のコホートで血漿中 p3-Alc α 量の解析を行った結果、コントロール群と比較して SAD 群では p3-Alc α が有意に増加することが明らかとなった。^{12,13)} これは血漿中 $A\beta_{40}$ 量と同様の傾向であった。検体を血漿中 $A\beta_{40}$ の高値群と低値群に分けた場合、AD 患者では両群間で p3-Alc α 値に有意な差があったが、frontotemporal lobar degeneration (FTLD) 患者では有意差がなかった。¹¹⁾ このことから、血漿中 p3-Alc α は AD 特異的な γ セクレターゼ切断変化を捉えられる生化学的診断マーカー候補である可能性がある。

さらに、 $A\beta_{40}$ に相当する主要分子種 p3-Alc α_{35} を特異的に定量可能な sELISA 系を作成し、SAD 患者の血漿中 p3-Alc α_{35} の定量解析を行った。その結果、p3-Alc α_{35} も AD 患者で有意に増加することが明らかになった。現在 AD の治療薬として、ドネペジル塩酸塩（アセチルコリンエステラーゼ阻害薬）が承認されているが、ドネペジル投与患者と非投与患者の p3-Alc α_{35} 量を比較した結果、投与群の方が有意に減少していた。¹⁴⁾ 更なる検証が必要ではあるが、脳内における神経活動の改善効果を血漿中 p3-Alc α が反映している可能性もある。

おわりに

AD 患者の CSF 及び血液中の p3-Alc を解析した結果、原因遺伝子に変異を持たない SAD において

Fig. 3. AD and γ -Secretase Dysfunction

も FAD と同様に、発症の初期段階から γ セクレターゼの機能変化により基質切断変化が起こっている患者が一定割合で存在する可能性が示唆された (Fig. 3). このことから p3-Alc は、AD の診断マーカーとしてのみならず、様々な原因で発症した SAD の中から γ セクレターゼ機能変化が発症に係わっている患者を選別するのに有用である可能性がある。治療薬の開発及び選択にも貢献できる可能性があるため、今後も研究を推進していきたいと考えている。

謝辞 本研究の遂行に際し、北海道大学大学院薬学研究院の鈴木利治教授にご指導を賜り、今野禎子氏、大森智織氏に研究に協力して頂きましたことを心より感謝致します。また、本研究は日本学術振興会 若手研究 (B)、公益財団法人テルモ科学技術振興財団、公益財団法人アステラス病態代謝研究会の研究助成による支援を受けたものであることを付記致します。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Tomita S., Ozaki T., Taru H., Oguchi S., Takeda S., Yagi Y., Sakiyama S., Kirino Y., Suzuki T., *J. Biol. Chem.*, **274**, 2243–2254 (1999).
- 2) Araki Y., Tomita S., Yamaguchi H., Miyagi N., Sumioka A., Kirino Y., Suzuki T., *J. Biol. Chem.*, **278**, 49448–49458 (2003).
- 3) Araki Y., Miyagi N., Kato N., Yoshida T., Wada S., Nishimura M., Komano H., Yamamoto T., De Strooper B., Yamamoto K., Suzuki T., *J. Biol. Chem.*, **279**, 24343–24354 (2004).
- 4) Takei N., Sobu Y., Kimura A., Urano S., Piao Y., Araki Y., Taru H., Yamamoto T., Hata S., Nakaya T., Suzuki T., *J. Biol. Chem.*, **290**, 987–995 (2015).
- 5) Araki Y., Kawano T., Taru H., Saito Y., Wada S., Miyamoto K., Kobayashi H., Ishikawa H. O., Ohsugi Y., Yamamoto T., Matsuno K., Kinjyo M., Suzuki T., *EMBO J.*, **26**, 1475–1486 (2007).
- 6) Hata S., Fujishige S., Araki Y., Kato N., Araseki M., Nishimura M., Hartmann D., Saftig P., Fahrenholz F., Taniguchi M., Urakami K., Akatsu H., Martins R. N., Yamamoto K., Maeda M., Yamamoto T., Nakaya T., Gandy S., Suzuki T., *J. Biol. Chem.*, **284**, 36024–36033 (2009).
- 7) Qi-Takahara Y., Morishima-Kawashima M., Tanimura Y., Dolios G., Hirotsu N., Horikoshi Y., Kametani F., Maeda M., Saido T. C., Wang R., Ihara Y., *J. Neurosci.*, **25**, 436–445 (2005).
- 8) Funamoto S., Morishima-Kawashima M., Tanimura Y., Hirotsu N., Saido T. C., Ihara Y., *Biochemistry*, **43**, 13532–13540 (2004).
- 9) Piao Y., Kimura A., Urano S., Saito Y., Taru H., Yamamoto T., Hata S., Suzuki T., *PLoS ONE*, **8**, e62431 (2013).
- 10) 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., *Ann. Neurol.*, **69**, 1026–1031 (2011).
- 11) Hata S., Taniguchi M., Piao Y., Ikeuchi T., Fagan A. M., Holtzman D. M., Bateman R., Gandy S., Urakami K., Suzuki T., J-ADNI, *Mol. Neurodegener.*, **7**, 16 (2012).
- 12) 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., J-ANDI, *Mol. Neurodegener.*, **6**, 76 (2011).
- 13) Kamogawa K., Kohara K., Tabara Y., Takita R., Miki T., Konno T., Hata S., Suzuki T., *J. Alzheimers Dis.*, **31**, 421–428 (2012).
- 14) Omori C., Kaneko M., Nakajima E., Akatsu H., Waragai M., Maeda M., Morishima-Kawashima M., Saito Y., Nakaya T., Taru H., Yamamoto T., Asada T., Hata S., Suzuki T., J-ADNI, *J. Alzheimers Dis.*, **39**, 861–870 (2014).