

---

---

# アミロイド $\beta$ ペプチド代謝とアルツハイマー病

Metabolism of amyloid  $\beta$  peptide and Alzheimer's disease

理化学研究所脳科学総合研究センター  
神経蛋白質制御研究チーム

西道 隆臣\*

---

---

はじめに

任意の疾患を根本的に治療するためには、以下の2点を明らかにすることが必須である。

① 根本的原因

② 原因から発症に至るまでのメカニズム

アルツハイマー病は、大きく「家族性アルツハイマー病」(常染色体優性遺伝し、多くは若年で発症する)と「孤発性アルツハイマー病」(明確な遺伝性が認められず、通常65歳以上の高齢で発症する)に分類される。前者は、原因遺伝子変異が今のところ三つの遺伝子に同定され、その表現型が明らかにされたことによって、脳内におけるアミロイド $\beta$ ペプチド(特に42残基のアミノ酸からなる $A\beta_{1-42}$ )の産生増加が根本的原因であることが解明された。ただし、厳密な意味での家族性アルツハイマー病と診断されるのは、全アルツハイマー病患者の1%以下であり、最も原因解明が急がれるのは患者の99%以上を占める孤発性アルツハイマー病である。なお、明確な優性遺伝の認められない若年性アルツハイマー病患者が日本には1万人以上いると推測されるが、その原因は明らかでない。未同定の遺伝的危険因子の重複、劣性遺伝型の遺伝子変異の存在、(遺伝子変異と相互作用するような)環境危険因子の存在などが、原因として同定される可能性が残されている。

以上のような問題意識に基づいて、我々を含むいくつかのグループが $A\beta$ の代謝システムについて検討を行ってきた。 $A\beta$ はアミロイド前駆体タンパク質(APP: Amyloid Precursor Protein)から産生されるが、家族性とは異なり、孤発性アルツハイマー病では、 $A\beta$ 産生系の明確な上昇が $A\beta$ 蓄積に先行する形では認められない。(むしろ、 $A\beta$ 蓄積によって、APPの発現や $A\beta$ 産生活性が上昇するようである。)また、アルツハイマー病の最大の危険因子は加齢であり、加齢は一般に代謝の上昇よりは低下をとらう。このような理由から、我々は $A\beta$ 分解系が孤発性アルツハイマー病に密接に関わるのではないかと作業仮説を立て、検討を行ってきた。

## $A\beta$ 分解系の同定

$A\beta$ の産生機構については、培養細胞に関連遺伝子を発現させるという、いわゆる分子細胞生物学的的手法によって解明が進んできたが、分解機構は、神経細胞やグリアが複雑に組織を形成する脳内において現行犯で捕捉する必要がある。そこで、我々は、ラジオアイソトープで多重標識した $A\beta$ ペプチド( $A\beta_{1-42}$ )を化学合成し、これを麻醉下のラット脳内(海馬)に注入し、分解過程をフロータイプのシンチレーションカウンターに連結したHPLCを用いて解析した。

---

\* Takaomi C. Saido: Laboratory Head, Laboratory for Proteolytic Neuroscience, RIKEN Brain Science Institute

その結果、中性エンドペプチダーゼ（ペプチドを分子の内側で切断する酵素で至適 pH を中性とするもの）を、主要な分解酵素の候補として同定した<sup>1)</sup>。脳に存在する典型的な中性エンドペプチダーゼはネプリライシンであるので、次にネプリライシンを欠損するノックアウトマウスを用いて、ネプリライシンが主要な A $\beta$  分解酵素であること、および、ネプリライシン活性が低下すると脳内 A $\beta$  レベルが低下することを見いだした<sup>2)</sup>。A $\beta$  レベルは、ホモのノックアウトマウス（ネプリライシン活性が 100% 消失している）で約 2 倍、ヘテロ（50% 消失）では約 1.5 倍上昇していた。このことは、加齢によって部分的にでもネプリライシンの活性が低下すると、脳内の A $\beta$  レベルが上昇することを意味している。ダウン症では、APP 遺伝子発現が 1.5 倍上昇することにより、若齢で A $\beta$  蓄積が始まる。また、最近 APP 遺伝子の重複が家族性アルツハイマー病の原因となることが示された<sup>3)</sup>。この場合も A $\beta$  レベルの上昇は 1.5 倍と考えられるので、これらのことは、脳内の A $\beta$  レベルが厳密に制御されなければならないこと、そして、分解システムの低下は A $\beta$  蓄積、ひいてはアルツハイマー病の原因となることを強く示唆している。

#### 加齢によるネプリライシン発現低下

加齢はアルツハイマー病の最大の危険因子である。したがって、（孤発性）アルツハイマー病の根本的原因は、加齢とともに著しく変化するものであることが予想される。我々は、ネプリライシンノックアウトマウスをネガティブコントロールとして用いることにより、特異的に免疫組織化学を行う方法を確立し、記憶形成に最も重要な海馬において、歯状回（多型細胞層・分子層）および CA3 透明層で、明確なネプリライシン発現低下を見いだした<sup>4)</sup>。また、酵素化学的にも海馬および新皮質でネプリライシン活性が加齢依存的に低下することも確認した。

以上は、実験動物を用いて得られた結果であるが、McGeer らのグループは、病理学的にアルツハイマー病の前段階と定義される（Braak stage II）脳を用いて、海馬および側頭葉においてネプリライシン mRNA の発現が正常コントロールと比較

して約 50% に低下していることを報告した<sup>5)</sup>。これは、A $\beta$  の定常レベルが 1.5 倍上昇していることを意味しており、一般的な家族性アルツハイマー病の表現型に相当する。さらに、A $\beta$  病理が顕著ではない小脳では、ネプリライシン mRNA の発現が海馬・前頭葉と比較してより高いうえに、コントロールとの差が非常に小さい。マウスでの発見が臨床レベルで確認されたと言えよう。

また、アルツハイマー病の前段階である（進行性の）軽度認知障害（MCI: Mild Cognitive Impairment）の髄液において、ネプリライシン活性が正常コントロール群と比較して、有意に低下していることが報告された<sup>6)</sup>。現時点では診断に用いられるほどの感度や精度を有しているわけではないが、髄液中のネプリライシン活性は実質のニューロン由来のものであることが示されており、この結果も、アルツハイマー病発症の前段階でネプリライシン活性が低下していることを示している。

#### ネプリライシンの A $\beta$ シナプス毒性に対する作用

最近、A $\beta$  単量体や線維化 A $\beta$  よりも、A $\beta$  重合体（A $\beta$  oligomers）が、シナプスに作用して神経可塑性を低下させるとの考えが支持されつつある。現在最も頻繁に用いられるアルツハイマー病モデルマウスは、APP を過剰発現するトランスジェニックマウスであるが、これらのマウスは、A $\beta$  だけでなく、可溶性の APP 断片（APPs）や細胞内でシグナル伝達に関与する可能性のある細胞内ドメイン（AICD: APP Intracellular Domain）も過剰に産生する。さらに、APP 自身が軸索輸送に関与するという報告もあり、通常 10 倍以上 APP を過剰発現するトランスジェニックマウスは、厳密な意味で A $\beta$  アミロイドシス特異的なモデルと言うことはできない。たとえば、代表的  $\gamma$  セクレターゼ基質である Notch 受容体を過剰発現した場合、その効果が注目されるのは、核へ移行して転写制御を行う細胞質側断片（NICD: Notch Intracellular Domain）であって、A $\beta$  に対応する部分ではないだろう。しかし、ネプリライシンは、A $\beta$  を分解するのに対して、APP, APPs, AICD を分解することができないので、APP トランスジェニックマウスとネプリライシンノックアウトマ

ウスを交配することによって、 $A\beta$  だけを選択的に上昇させることが可能になる。

実際、そのようなAPP-Tg  $\times$  Nep-KOマウスは、APP, APPs, AICDは変化せず、(SDS-PAGEで確認される)  $A\beta$  2量体を中心とした重合体が、3倍近く上昇していた<sup>7)</sup>。これらのマウスの神経可塑性や認知能力を、in vivoの長期増強実験、および、行動実験で検討したところ、ネプリライシンの欠損によって、全ての実験条件で、著しい能力の低下が認められた<sup>7)</sup>。このことは、ネプリライシンがシナプス毒性のある $A\beta$ 重合体を分解する能力があること、すなわち、脳内におけるネプリライシン活性を上昇あるいは賦活化することによって、軽度認知障害やアルツハイマー病における認知能力の低下を抑制することができる可能性のあることを示している。特に大切なことは、ネプリライシンがプレシナプスに存在し、神経可塑性において最も重要な部位であるシナプスにおける $A\beta$ を分解することである。脳内における $A\beta$ のクリアランス機構としては、ネプリライシン以外のプロテアーゼによる分解や脳血管関門・髄液による輸送の関与も指摘されているが、シナプスで $A\beta$ 定常量を制御することができるのは、ネプリライシンだけである。

#### ヒトネプリライシンcDNAを用いた実験的遺伝子治療

脳内のネプリライシン活性を上昇させる最も直接的な方法は、ウイルスベクターを用いてネプリライシン遺伝子を導入することである。我々は、アデノ随伴ウイルスを用いてヒトネプリライシンを正常マウス・ネプリライシンノックアウトマウス・APPトランスジェニックマウスの海馬および嗅内野に発現させた<sup>8)</sup>。アデノ随伴ウイルスは、非病原性である、炎症反応を引き起こさない、神経細胞のような非分裂細胞にも感染できる、長期間にわたって遺伝子発現を行う、物理的に安定である、などの長所がある。

上記のマウスを用いた実験的遺伝子治療によって、ネプリライシンノックアウトマウスでは、 $A\beta$ レベルが正常レベルまで低下し、APPトランスジェニックマウスでは、 $A\beta$ 病理が顕著に減弱された。この結果と一致して、APPトランス

ジェニックマウスにネプリライシントランスジェニックマウスを交配すると $A\beta$ 病理が完全に消失することが報告されている。ネプリライシンの過剰発現は、これまでネプリライシンの基質とされてきた神経ペプチドの代謝に影響を与えることが危惧されるが、我々が調べた限りでは、ネプリライシンノックアウトマウスやネプリライシントランスジェニックマウスで、おもな神経ペプチドのレベルは変化していない (Iwata et al. 未発表データ)。少なくとも脳内では、 $A\beta$ はかなり選択的なネプリライシンの基質であるといつて良いだろう。

上記の遺伝子治療は、外科的措置を有するため、実際の臨床レベルでアルツハイマー病患者を治療する精神科・神経内科・老人科の医師たちにとっては、あまり現実的ではないかもしれない。しかし、脳の一定領域にウイルスベクターを投与するという操作は、脳神経外科医にとっては、容易い手術であろう。ネプリライシン発現の安全性や副作用については、今後さらに検討されるであり、遺伝子治療は一つのオプションとして残しておくべきであろう。

#### ソマトスタチンによる $A\beta$ 分解系の制御

遺伝子治療の開発に並行して、我々は薬理的に脳内のネプリライシン活性を操作する可能性を探索してきた。その結果、神経ペプチドであるソマトスタチンが、培養神経細胞のネプリライシン活性を上昇させることを見いだした。これはin vitroの観察であるので、ソマトスタチン遺伝子破壊マウスを用いて in vivo における蓋然性を検討したところ、海馬においてソマトスタチンはネプリライシン活性を制御することによって $A\beta$  (特に病原性の高い $A\beta$ 42)の量を調節することを見いだした<sup>9)</sup>。

ソマトスタチンは、ソマトスタチンリセプターを介して作用する。ソマトスタチンリセプターは、G蛋白にカップルするリセプターであるため、格好の創薬の標的である。また、ソマトスタチンリセプターには5種類の(異なる遺伝子の産物である)サブタイプが存在し、その中には脳内に選択的に発現するものがある。このサブタイプだけを活性化する低分子薬剤は、systemic な副作用

用なく、脳内のA $\beta$ レベルを下げる作用があると期待される。また、ソマトスタチン自身に抗認知症作用があることも報告されており、二重の意味でアルツハイマー病に対して予防・治療作用があることが期待される。さらに、脳内のソマトスタチンは加齢によって減少し、孤発性アルツハイマー病患者では顕著に低下することが報告されている。このことは、加齢に伴うソマトスタチンレベルの低下が、ネプリライシン活性を低下させ、A $\beta$ レベルを上昇させることによって、孤発性アルツハイマー病の原因となる可能性を示唆している。これが事実であれば、孤発性アルツハイマー病の原因が初めて解明されることになる。

以上の結果は、ソマトスタチンのような受容体アゴニストを用いることによって、脳内A $\beta$ の代謝を制御し、アルツハイマー病、ひいては、脳老化の予防や治療に応用することができる可能性を示している。

#### MRI による特異的アミロイドイメージング

脳内A $\beta$ の蓄積は、発症の10年以上前に生じるので、これを非侵襲的に可視化することが出来れば、発症前診断や抗A $\beta$ 治療効果評価が可能になる。現在主流のアプローチはPET (Positron Emission Tomography) であり、実用化は時間の問題であるが、装置が高価であることや放射性化合物を使用するという欠点がある<sup>10)</sup>。我々は、このような欠点のない手法としてMRI (Magnetic Resonance Imaging) を用いた特異的アミロイドイメージングの開発を試みた<sup>10)</sup>。通常、MRIは、神経組織の変性や萎縮の観測のために用いられるが、我々は、核磁気共鳴シグナルを発する核種<sup>19</sup>F (天然型フッ素) を含有するアミロイド結合化合物FSB (Floro-Styryl-Benzene) を新規合成し、アルツハイマー病モデルマウスを用いて<sup>19</sup>F由来のシグナルを捕らえることに成功した。実験動物を用いる長所は、FSBが沈着した部分に本当にアミロイドがあったか否かについて、神経病理学的に検討できることである。一方、PETでは今までのところアルツハイマー病患者の脳における老人斑と思われるシグナルを捕らえるところまでは来ているが、本来老人斑がみられない白質や脳幹等にもプローブの沈着がみられ、改善の余地がある

と思われる。今のところ、成功の報告は見られないが、今後マイクロPETを用いた実験動物の観測が可能になれば大きく研究は進展するであろう。

#### おわりに

孤発性アルツハイマー病の根本的原因が解明されたとは言い難いが、A $\beta$ 分解システムの破綻が原因である可能性が高い。そうであれば、分解システムの回復は根本的原因療法となるであろう。さらに、根本的原因から症状発現にまでいたるメカニズムとして、炎症反応、酸化的ストレス、カルバインやカスパーゼ等の活性化・過剰リン酸化タウの蓄積、神経伝達物質の低下等が考えられる。これらの中で、病理学的カスケードの本流に位置する分子を同定し標的とすれば、上記の原因療法と組み合わせることによって、最も効率的にアルツハイマー病およびその前段階にある軽度認知障害の治療となるであろう。

#### 文献

- 1) 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) Iwata, N., Tsubuki, S., Takaki, Y., Shirotani, K., Lu, B., Gerard, N. P., Gerard, C., Hama, E., Lee, H. -J., Saido, T. C. (2001). Metabolic regulation of brain A $\beta$  by neprilysin. *Science*, 292, 1550-1552.
- 3) Rovelet-Lecrux A, Hannequin D, Raux G, Meur NL, Laquerriere A, Vital A, Dumanchin C, Feuillette S, Brice A, Vercelletto M, Dubas F, Frebourg T, Campion D. (2006). APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nature Genet.*, 38, 24-26.
- 4) Iwata, N., Takaki, Y., Fukami, S., Tsubuki, S., Saido, T. C. (2002). Region-specific reduction of A $\beta$ -degrading endopeptidase, neprilysin, in

- mouse hippocampus upon aging. *J. Neurosci. Res.* , 70, 493-500.
- 5) Yasojima K, Akiyama H, McGeer EG, McGeer PL. (2001). Reduced neprilysin in high plaque areas of Alzheimer brain: a possible relationship to deficient degradation of beta-amyloid peptide. *Neurosci. Lett.* 297, 97-100.
- 6) Maruyama M, Higuchi M, Takaki Y, Matsuba Y, Tanji H, Nemoto M, Tomita N, Matsui T, Iwata N, Mizukami H, Muramatsu S, Ozawa K, Saido TC, Arai H, Sasaki H. (2005) Cerebrospinal fluid neprilysin is reduced in prodromal Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 57, 832-842.
- 7) Huang, S. M. , Mouri, A. , Kokubo, H. , Nakajima, R. , Suemoto, T. , Higuchi, M. , Staufenbiel, M. , Noda, Y. , Yamagushi, H. , Nabeshima, T. , Saido, T. C. , Iwata, N. (2006). Neprilysin-sensitive synapse-associated amyloid  $\beta$  peptide oligomers impair neuronal plasticity and cognitive function. *J. Biol. Chem.* , 281. 17941-17951.
- 8) Iwata, N. , Mizukami, H. , Shirotani, K. , Takaki, Y. , Muramatsu, S. , Gerard, N. , Gerard, C. , Ozawa, K. , Saido, T. C. (2004). Presynaptic localization of neprilysin contributes to efficient clearance of amyloid  $\beta$  peptide in mouse brain. *J. Neurosci.* , 24, 991-998.
- 9) Saito, T. , Iwata, N. , Tsubuki, S. , Takaki, Y. , Takano, J. , Huang, S. -H. , Suemoto, T. , Higuchi, M. , Saido, T. C. (2005). Somatostatin regulates brain amyloid  $\beta$  peptide A $\cdot$ 42 through modulation of proteolytic degradation. *Nature Med.* , 11. 434-439.
- 10) Higuchi, M. , Iwata, N. , Matsuba, Y. , Sato, K. , Sasamoto, K. , Saido T. C. (2005). 19F- and 1H-MRI detection of amyloid- $\beta$  peptide in vivo. *Nature Neurosci.* , 8, 527-533.

この論文は、平成16年10月16日(土) 第15回中部老年期痴呆研究会で発表された内容です。