

解糖系酵素に焦点を充てた脳アミロイド血管症の病態解明と治療開発

井上泰輝

熊本大学大学院 生命科学研究部 脳神経内科学講座

【研究の背景】

脳アミロイドアンギオパチー(CAA)は、アルツハイマー病(AD)患者の90%に随伴し、 $A\beta$ が脳血管に沈着、脆弱化し脳出血を発症する。高齢化社会が社会問題となり、CAA患者が増加する一方で、CAAの予防や治療法は未確立であり、その開発は急務である。CAAやADは病原タンパク質である $A\beta$ が脳に沈着するアミロイドーシスという疾患概念に含まれる。アミロイドーシスは、難溶性のタンパク質であるアミロイド線維が全身諸臓器の細胞外に沈着し、様々な機能障害を起こす疾患群の総称でありADとCAAを総じて脳アミロイドーシスと呼ぶ。近年、アミロイドーシスの研究領域では、病原タンパク質と共存するタンパク質が分子基盤の解明と治療薬開発の鍵として認識されるようになった。しかし、CAAの共存タンパク質の研究は、これまで日本、および諸外国を含め報告がなかった。申請者はこの問題を解明すべく、世界に先駆けてCAAにおける共存タンパク質を同定した。具体的には、CAA罹患血管から、レーザーマイクロダイセクションを用い、切り出した脳血管に含まれるタンパク質のプロテオミクス解析を行い、CAA罹患血管に特異的に発現する分子を同定した。その中で、 $A\beta$ に次いで2番目に多く発現する α -エノラーゼに着目し検討を行い、 α -エノラーゼが① $A\beta$ の線維形成を抑制② $A\beta$ 線維を分解、さらに③ $A\beta$ の細胞毒性を抑制するというこれまでに報告のない全く新しい作用機序を見出し、治療応用への可能性を示した。

【目 的】

α -エノラーゼがCAAの病態をいかに制御するかを解析し、 α -エノラーゼを用いた新しいCAA治療法開発へ発展させること。

【方 法】

1. α -エノラーゼによる $A\beta$ 線維形成抑制メカニズムの解明

申請者は α -エノラーゼの $A\beta$ 毒性制御機構の解明に向け、 α -エノラーゼがプロテアーゼ作用を介して、 $A\beta$ タンパクを切断するとの仮説を立てた。そこで、複数のプロテアーゼ阻害剤を用いて、 α -エノラーゼによる $A\beta$ 線維形成抑制効果が減弱するか否かを検討した。セリンプロテアーゼ阻害剤としてPefabloc、アスパラギン酸プロテアーゼ阻害剤としてPepstatinA、システインプロテアーゼ阻害剤としてE-64、金属プロテアーゼとしてPhosphoramidonとEDTAを用いた。

2. α -エノラーゼの酵素活性が $A\beta$ 線維形成メカニズムに与える影響の解明

次に、 α -エノラーゼによる $A\beta$ 線維形成抑制能は、その酵素活性に依存するとの仮説を立てた。そこで、 α -エノラーゼに対して90°C、5分間の熱処理を加え、その酵素活性および $A\beta$ 線維形成に与える影響を検証した。

【結 果】

セリンプロテアーゼ阻害剤であるPefabloc SCを用いた検討で、 α -エノラーゼの線維形成抑制効果が阻害されることをチオフラビンT吸光度を用いた解析により証明した。チオフラビンTはアミロイドの β シート構造を認識し、それに応じて吸光度

が上昇し線維形成を間接的にモニタリングする測定手段である。 α -エノラーゼの添加により抑制されていた吸光度の上昇が、Pefabloc の添加により、一転して吸光度が上昇した。これは、 α -エノラーゼによる線維形成抑制効果が Pefabloc の同時添加において抑制され、線維形成に転じたことを示すものである。同様の現象は、透過型電子顕微鏡を用いた形態学的解析においても確認した。セリンプロテアーゼ以外の阻害剤ではこのような抑制現象は認めなかった。

α -エノラーゼの酵素活性が A β 線維形成メカニズムに与える影響の解明

90°Cの熱処理で失活させた α -エノラーゼは、その A β 線維形成抑制効果を失い、線維形成に至ることを示した。さらに、ウェスタンブロット法においても、90°Cの熱処理で失活させた α -エノラーゼを添加した群において、A β 線維に相当するバンドが確認された。申請者は、 α -エノラーゼを脳内へ注入ポンプを用いて持続投与した CAA/AD トランスジェニックマウスの脳血管、脳実質への A β の沈着が減少すること、さらに認知機能も有意に改善することを先行研究で示した。そこで、95°C5 分の熱処理によって酵素活性を完全に失活させた α -エノラーゼをマウス脳内へ持続投与したところ、A β 病理所見と認知機能の双方とも改善効果がなかった。つまり、病態改善効果が α -エノラーゼの酵素活性に依存することを生体内においても実証した。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

α -エノラーゼによる A β 線維形成抑制にはセリンプロテアーゼ作用が関与することを証明した。また、 α -エノラーゼの A β 線維形成抑制には、その酵素活性が関与した。 α -エノラーゼの酵素活性を応用した創薬への展望を開いた。

【参考・引用文献】

1. Viswanathan A, Greenberg SM. Cerebral amyloid angiopathy in the elderly. *Ann Neurol* ; 70:871-880, 2011.
2. Inoue Y, Ueda M, Tasaki M, Takeshima A, Nagatoshi A, Masuda T, Misumi Y, Kosaka T, Nomura T, Mizukami M, Matsumoto S, Yamashita T, Takahashi H, Kakita A, Ando Y. Sushi repeat-containing protein 1: a novel disease-associated molecule in cerebral amyloid angiopathy. *Acta Neuropathol*; 134: 605-617, 2017.
3. Sultana R., Boyd-Kimball D., Poon H. F., Cai J., Pierce W. M., Klein J. B., Merchant M., Markesbery W. R., and Butterfield D. A. Redox proteomics identification of oxidized proteins in Alzheimer's disease hippocampus and cerebellum: an approach to understand pathological and biochemical alterations in AD. *Neurobiol Aging*; 27: 1564-1576, 2006.
4. Butterfield DA, Poon HF, St Clair D, Keller JN, Pierce WM, Klein JB, Markesbery WR. Redox proteomics identification of oxidatively modified hippocampal proteins in mild cognitive impairment: insights into the development of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis*; 22: 223-232, 2006.