

(論文内容の要旨)

アルツハイマー病は、記憶力の低下や認知機能障害を主な臨床症状とする進行性の神経変性疾患であり、病理学的所見として脳内における神経細胞の脱落・アミロイドβ蛋白質(Aβ)の凝集塊からなる老人斑の沈着・神経原線維変化が観察される疾患である。これまでアミロイド前駆体蛋白質(APP)遺伝子が家族性アルツハイマー病の原因遺伝子の1つとして同定され、その機能解析はAPPから切断されて生じるAβを中心に進められてきた。最近APP intracellular domain (AICD)等のAβ以外の切断断片も生理機能を有し、神経細胞死等に関与することがわかりつつある。従って、アルツハイマー病におけるAPPの機能をより明らかにするためにはAPP自体を中心に解析する必要がある。本研究において著者は、APPを介したシグナル伝達機構の解明を目的として、APPの切断機構および切断断片の役割について詳細に検討し、以下の新知見を得た。

第一章 APP プロセッシングにおけるチロシンリン酸化の関与

APPは一回膜貫通型蛋白質であり、膜貫通領域付近に3箇所の切断部位を有し、α、βおよびγセクレターゼにより切断を受ける。HEK293細胞に広域なチロシンリン酸化阻害剤であるゲニステインを処置したところ、αセクレターゼにより切断されて生じるC83断片が濃度依存的に減少した。APPの細胞内領域には3つのチロシン残基(Tyr653, Tyr682 および Tyr687)が存在する。野生型、欠失変異体およびチロシン残基をアラニン残基に置換した点変異体をHEK293細胞に発現させ、リン酸化の状態を検討したところ、Tyr687が恒常的にリン酸化を受けていることが明らかとなり、チロシンリン酸化を受けないAPPY687A変異体から生じるC83断片が野生型と比較して有意に少ないことが分かった。さらに、C83Y687A変異体をHEK293細胞に発現させると、C83からγセクレターゼにより切断されて生じるAICD断片も野生型と比較して少なかった。これらの結果はAPP Tyr687のリン酸化が阻害されることにより、αおよびγセクレターゼによる切断が阻害されることを示している。αセクレターゼによる切断は細胞膜表面上で起こることが報告されている。そこで細胞膜表面に存在するAPPY687A変異体量を検討したところ、野生型と比較して有意に少なかった。一方、APPY687A変異体を免疫沈降により精製し、試験管内でαセクレターゼと反応させると、野生型と同程度にC83断片の生成量を示した。以上の結果により、APP Tyr687のリン酸化はAPPの局在を制御することにより、αおよびγセクレターゼによる切断を調節していることが明らかとなった。

第二章 小胞体ストレス誘導性細胞死におけるAPPの関与

小胞体ストレスは小胞体内腔に異常蛋白質が蓄積することにより誘導され、神経変性疾患の原因の一つと考えられている。HEK293細胞に小胞体ストレス誘導剤であるツニカマイシンを処置したところ細胞死が惹起され、同時にAPP遺伝子のmRNA量が時間依存的に増加した。一方、APP蛋白質量は時間依存的に減少したが、

切断生成した C83 断片が有意に増加した。C83 断片から切断されて生じる AICD 断片は非常に不安定で内在性断片を検出することは困難である。そこで APP を HEK293 細胞に過剰発現させ、小胞体ストレスを誘導したところ、AICD 断片量の時間依存的な増加が認められた。以上の結果は小胞体ストレスにより C83 断片および AICD 断片が細胞内に蓄積することを示している。AICD 断片は転写活性を持つことが報告されている。そこで APP および AICD 断片を HEK293 細胞に過剰発現し、小胞体ストレスで転写誘導される因子の mRNA 量を検討したところ、いずれの場合においても (C/EBP homologous protein) CHOP 遺伝子の mRNA が特異的に増加した。APP の過剰発現による CHOP mRNA の増加は γ セクレターゼ阻害剤である DAPT によりほぼ完全に抑制された。さらに、レポーター解析およびクロマチン免疫沈降法により AICD 断片の CHOP プロモーター領域への結合が確認された。小胞体ストレスで誘導された CHOP は細胞死を引き起こすことが報告されている。そこで、APP および AICD 断片を HEK293 細胞内に過剰に発現させたところ、96 時間後にはいずれの場合も有意な細胞死を認めた。最後に、APP を siRNA によりノックダウンすると小胞体ストレスで誘導される細胞死および CHOP の増加が抑制された。以上の結果により、APP は小胞体ストレスにより切断を受け、遊離した AICD 断片が CHOP の転写を促進することで細胞死を誘導していることが示された。

第三章 細胞増殖における APP の関与

CHOP は細胞死を引き起こすと同時に細胞増殖を停止させる。HEK293 細胞は低濃度血清中で培養すると、飢餓状態となり増殖が停止する。そこで、HEK293 細胞を 0.5% FBS 含有培地中で 12 時間培養したところ、APP mRNA 量および蛋白質量の有意な上昇を認め、それに伴い CHOP mRNA 量も上昇した。次に、APP の上昇と細胞増殖の関係を解明するために、APP を HEK293 細胞に過剰発現させたところ、細胞増殖の遅延および BrdU 取り込み量の減少が認められた。さらに、siRNA により APP をノックダウンすると細胞増殖の促進が認められた。以上の結果により、飢餓状態におかれた細胞は APP の発現量を上昇させ、CHOP を介して細胞増殖を抑制することが示唆された。

以上、著者は APP Tyr687 のリン酸化が α および γ セクレターゼによる切断を調節することを見出した。また小胞体ストレスにより細胞内 AICD 断片が上昇し、AICD 断片による CHOP の上昇を介した細胞死が誘導されることを明らかにした。さらに、飢餓状態の細胞では APP が増加し、CHOP を介した細胞増殖の抑制が引き起こされることを示唆する結果を得た。本研究の成果はアルツハイマー病の発症機構および病態解析の解明に寄与するものであり、新たな治療法の開発など臨床応用に結びつく有用な基礎的知見を提供するものである。

(論文審査の結果の要旨)

アルツハイマー病は、記憶力の低下や認知機能障害を主な臨床症状とする進行性の神経変性疾患であり、脳内における神経細胞の脱落・アミロイド β 蛋白質(A β)の凝集塊からなる老人斑の沈着・神経原線維変化が観察される。これまでアミロイド前駆体蛋白質(APP)遺伝子が家族性アルツハイマー病の原因遺伝子の1つとして同定され、その機能解析はAPPから切断されて生じるA β を中心に進められてきた。さらに、APP intracellular domain (AICD)などのA β 以外の切断断片も生理機能を有し、神経細胞死などの現象に関与することが示唆されてきた。本研究において申請者は、APPを介したシグナル伝達機構の解明を目的としてAPPの切断機構および切断断片の役割に関する検討を行い、以下の新知見を得た。

第一章 APP プロセシングにおけるチロシンリン酸化の関与

HEK293 細胞に広域なチロシンリン酸化阻害剤であるゲニステインを処置したところ、 α セクレターゼにより切断されて生じるC83断片が濃度依存的に減少した。野生型、欠失変異体およびチロシン残基をアラニン残基に置換した点変異体をHEK293細胞に発現させ、リン酸化の状態を検討したところ、Tyr687が恒常的にリン酸化を受けており、チロシンリン酸化を受けないAPPY687A変異体から生じるC83断片が野生型と比較して少ないことを見出した。さらに、C83Y687A変異体をHEK293細胞に発現させると、C83から γ セクレターゼにより切断されて生じるAICD断片も野生型と比較して少なかった。これらの結果はAPP Tyr687のリン酸化が阻害されることにより、 α および γ セクレターゼによる切断が阻害されることを示している。細胞膜表面に存在するAPPY687A変異体量を検討したところ、野生型と比較して有意に少なかった。一方、APPY687A変異体を免疫沈降により精製し、試験管内で α セクレターゼと反応させると、野生型と同程度にC83断片の生成量を示した。以上の結果により、APP Tyr687のリン酸化はAPPの局在を制御することにより、 α および γ セクレターゼによる切断を調節していることが明らかとなった。

第二章 小胞体ストレス誘導性細胞死におけるAPPの関与

HEK293 細胞に小胞体ストレス誘導薬のツニカマイシンを処置したところ細胞死が惹起され、同時にAPP遺伝子のmRNA量が時間依存的に増加した。一方、APP蛋白質量は時間依存的に減少したが、切断生成したC83断片が有意に増加した。APPをHEK293細胞に過剰発現させ、小胞体ストレスを誘導したところ、AICD断片量の

時間依存的な増加が認められた。APP および AICD 断片を HEK293 細胞に過剰発現し、小胞体ストレスで転写誘導される因子の mRNA 量を検討したところ、C/EBP homologous protein (CHOP) 遺伝子の mRNA が特異的に増加した。APP の過剰発現による CHOP mRNA の増加は γ セクレターゼ阻害薬の DAPT によりほぼ完全に抑制された。さらに、レポーター解析およびクロマチン免疫沈降法により AICD 断片の CHOP プロモーター領域への結合が確認された。APP を siRNA によりノックダウンすると小胞体ストレスで誘導される細胞死および CHOP の増加が抑制された。以上の結果により、APP は小胞体ストレスにより切断を受け、遊離した AICD 断片が CHOP の転写を促進することで細胞死を誘導していることが示された。

第三章 細胞増殖における APP の関与

HEK293 細胞は低濃度血清中で培養すると、飢餓状態となり増殖が停止する。そこで、HEK293 細胞を 0.5% FBS 含有培地中で 12 時間培養したところ、APP mRNA 量および蛋白質量が増加し、それに伴い CHOP mRNA 量も増加した。次いで、APP の上昇と細胞増殖の関係を解明するために、APP を HEK293 細胞に過剰発現させたところ、細胞増殖の遅延および BrdU 取り込み量の減少が認められた。さらに、siRNA により APP をノックダウンすると細胞増殖の促進が認められた。以上の結果により、飢餓状態におかれた細胞は APP の発現量を上昇させ、CHOP を介して細胞増殖を抑制することが示唆された。

以上、申請者は、APP Tyr687 のリン酸化が α $\square$ および γ $\square$ セクレターゼによる切断を調節すること、小胞体ストレスにより細胞内 AICD 断片が上昇し AICD 断片による CHOP の上昇を介した細胞死が誘導されることを明らかにした。一方、飢餓状態の細胞では APP が増加し、CHOP を介する細胞増殖の抑制が引き起こされることを示した。本研究の成果はアルツハイマー病の発症機構および病態解析の解明に寄与するものであり、新たな治療法の開発など臨床応用に結びつく有用な基礎的知見を提供するものである。

よって本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成 21 年 2 月 23 日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。