

解糖系酵素に着目した脳アミロイド血管症の病態解析と治療開発

熊本大学大学院生命科学研究部 脳神経内科学講座 特任助教

井上 泰輝

1. 諸言

脳アミロイドアンギオパチー (cerebral amyloid angiopathy : CAA) は、アルツハイマー病 (Alzheimer's disease : AD) 患者の 90% に随伴し、アミロイド β ($A\beta$) 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る中、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精密に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²。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。そこで、 α -エノラーゼの CAA 病態制御機構の解明、 α -エノラーゼを用いた新しい CAA の治療法開発など臨床応用へ発展させることを目的とした発展的研究を行うこととした。

2. 方法

2.1 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とエチレンジアミン四酢酸 (ethylenediaminetetraacetic acid : EDTA) を用いた。

2.2 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

次に申請者は、 α -エノラーゼによるA β 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 β 線維形成に与える影響を検証した。

3.結果

3.1 α -エノラーゼによるA β 線維形成抑制メカニズムの解明

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 (図1A、緑) が、セリンプロテアーゼ阻害剤 (Pefabloc, 2.5 mM) の添加により、一転して吸光度が上昇した (図1、紫)。このことは透過型電子顕微鏡検討でも示され、 α -エノラーゼによって抑制されるA β 線維形成がPefablocの同時添加において、線維形成に至ることが形態学的に示された (図1B、右下)。ウェスタンブロット法においても、 α -エノラーゼの添加によりA β 線維に該当するバンドが消失するが (図1C、矢印、2レーン) (図1D、右から2つ目の棒グラフ)、Pefabloc (2.5 mM) の添加によってA β 線維に該当するバンドが出現することを確認した (図1C、矢印、3レーン目) (図1D、右から2つ目の棒グラフ)。その他の作用機序を有す

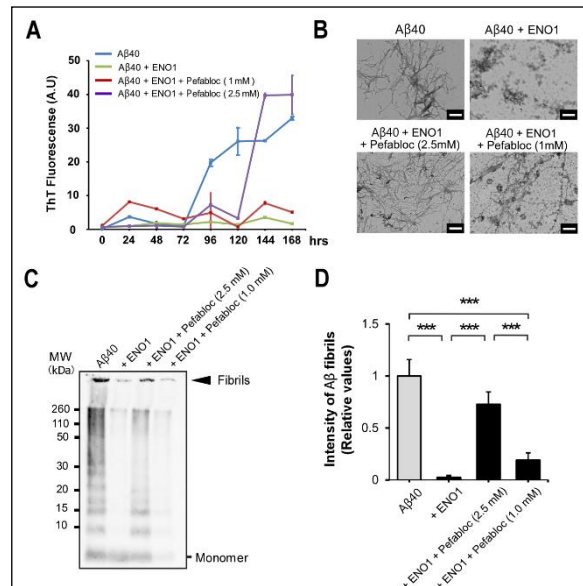


図1 セリンプロテアーゼ阻害剤の影響

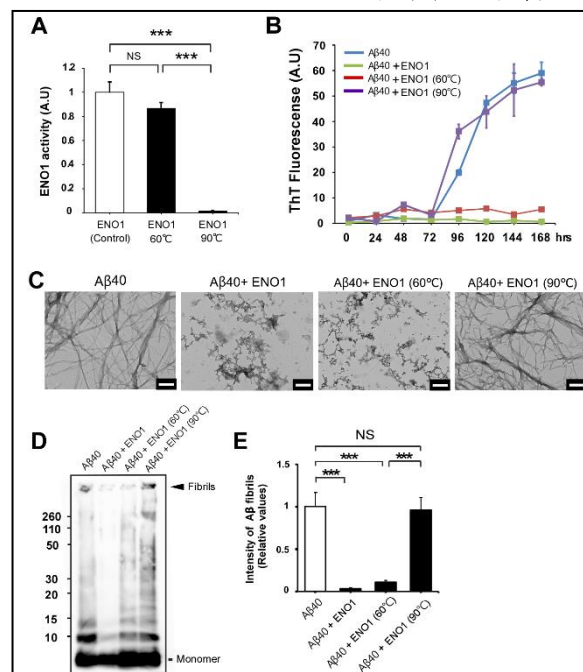


図2 α -エノラーゼの酵素活性の影響

る阻害剤ではこのような現象は認めなかった。

3.2 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

90°Cの熱処理で失活させた α -エノラーゼは、その $A\beta$ 線維形成抑制効果が失われ、線維形成に至ることを示した（図2B、紫）（図2C、右端）。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、 $A\beta$ 線維が確認された（図2D、Eの右端）。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 $A\beta$ 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、 $A\beta$ 病理所見と認知機能の双方とも改善効果がなかった（図3Aの右端、青色のバー、CとDの右端、灰色のバー）。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実証した。

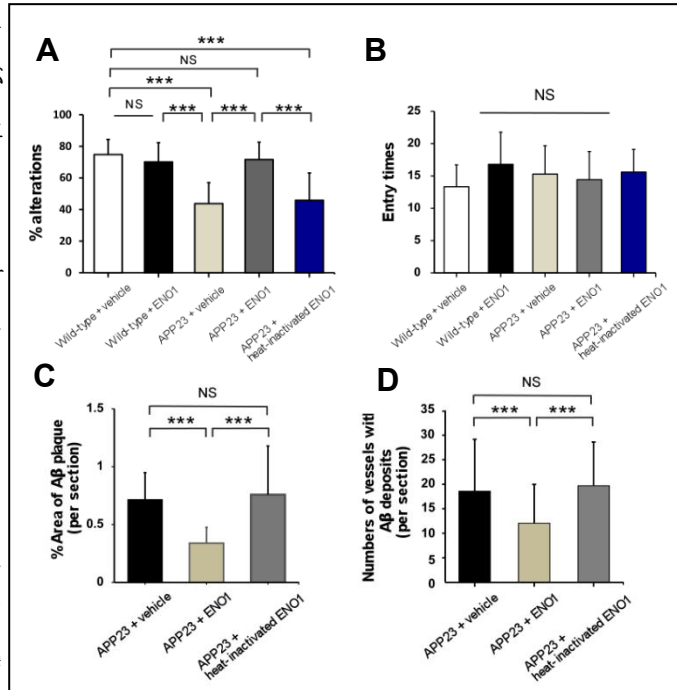


図3 認知機能と病理所見

4. 考察

本研究において、申請者は① α -エノラーゼの $A\beta$ 線維形成抑制にセリンプロテアーゼ作用が関与していること、② α -エノラーゼの $A\beta$ 線維形成抑制に、その酵素活性が関与するという、これまでに報告のない全く新しい作用機序を見出した（論文投稿中）。

先行研究において申請者は、 α -エノラーゼが $A\beta$ による細胞毒性を抑制することを既に示していたがその詳細なメカニズムは不明であった。本研究では、その発展的研究を行い、 α -エノラーゼがセリンプロテアーゼ活性を介して、 $A\beta$ タンパクを切断、断片化させた結果、 $A\beta$ 線維形成能が顕著に減弱、あるいは消失し、 $A\beta$ 線維が減少する可能性を示した。 $A\beta$ は、はじめ単量体として存在するがその毒性は低く、凝集する過程で形成される $A\beta$ 線維が強力な細胞毒性を示す。申請者の検討により α -エノラーゼが $A\beta$ 線維形成を抑制し、 $A\beta$ の細胞毒性を軽減させる可能性を示した。ヒト検体を用いた検討で、AD患者における α -エノラーゼ活性が健常人と比較して減少していることがすでに示されているがその意義は不明であった^{3),4)}。本検討において、 α -エノラーゼの酵素活性減弱がADやCAAの病態進行の可能性に

影響している可能性を示した。

5.結語

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。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ている。

6.文献

- 1) Viswanathan A, Greenberg SM. Cerebral amyloid angiopathy in the elderly. *Ann Neurol*; 70(6): 871–880, 2011.
- 2) Inoue Y, Ueda M, Tasaki M, Takeshima A, Nagatoshi A, Masuda T et al. Sushi repeat-containing protein 1: a novel disease-associated molecule in cerebral amyloid angiopathy. *Acta Neuropathol*. 2017; 134(4): 605-617.
- 3) Sultana R, Boyd-Kimball D, Poon H. F, Cai J., Pierce W. M, Klein J. B et al. 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*. 2006; 27(11): 1564–1576.
- 4) Butterfield DA, Poon HF, St Clair D, Keller JN, Pierce WM, Klein JB et al. Redox proteomics identification of oxidatively modified hippocampal proteins in mild cognitive impairment: insights into the development of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis*. 2006; 22(2): 223-232.

7.成果発表

雑誌論文

- Inoue Y, Ando Y, Misumi Y, Ueda M. Current Management and Therapeutic Strategies for Cerebral Amyloid Angiopathy. *Int J Mol Sci*. 2021; 22(8): 3869.