167　脳アミロイド血管症の進行抑制因子SRPX1の機能解析

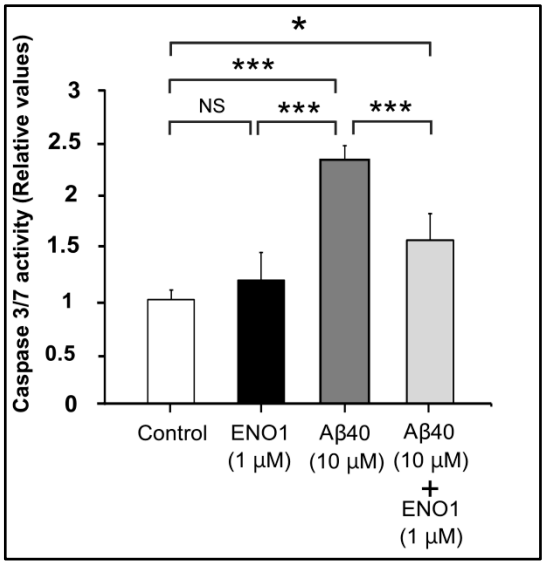
井上　泰輝

【目的】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、Aβ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 Aβ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。我々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。この中から我々はSRPX1 に着目し、そのアポトーシス誘導効果が CAA 病態の中核を成す可能性を *in vitro* で示した。本研究では、この効果を生体内で検証すべく CAA モデルマウスである APP23 マウスと *SRPX1* ノックアウトマウスを交配させ、アポトーシス抑制を介し CAA が改善するか否かを検討する研究スキームを描いていた。しかし、*SRPX1* のコンディショナルノックアウトマウスの作製に当初の予想以上の時間を要することが判明したこと、SRPX1 を CAA のバイオマーカーとして想定していたが、ELISA 法において検出感度以下となったことから、新たにα－エノラーゼに着目した研究を展開した。α－エノラーゼは、我々の先行研究においても同定されており、解糖系酵素として広く研究されているが、近年、熱ショックタンパク質や低酸素ストレスタンパク質としての多面的機能が指摘されつつある。α－エノラーゼが解糖系酵素以外の機能を有している可能性を想定し、その機能解明を目指した研究を行った。

【方法】チオフラビン T はアミロイド線維のβシート構造を認識するが、この吸光度を測定することによって、その上昇が Aβの線維形成を示す。そこで、Aβにα－エノラーゼを添加した際のチオフラビン T の吸光度を測定し線維形成阻害効果について検証を行った。また、脳平滑筋培養細胞を用いて、α－エノラーゼの Aβ細胞毒性軽減効果をカスパーゼ 3/7 の活性を指標に評価した。

【結果】α－エノラーゼが Aβ線維形成を抑制し、Aβの細胞毒性を抑制した。さらに、α－エノラーゼを CAA モデルマウスの脳内へ投与し、病態改善効果を立証した。

α－エノラーゼ（ENO1）による細胞毒性抑制効果



167. 脳アミロイド血管症の進行抑制因子 SRPX1 の機能解析

井上　泰輝

熊本大学 大学院生命科学研究部 脳神経内科学分野

Key words：脳アミロイドアンギオパチー，アミロイドβ，アミロイドーシス，プロテオミクス，アルツハイマー病

緒　言

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、Aβ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 AD 同様に、CAA 患者も増加が確実視される中、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 Aβ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。例えば、CAA と同様に Aβを原因タンパク質とする AD では、その特徴的な病理学的所見である老人班における Aβとの共存タンパク質が広く研究されている。その最たるものは、アポリポプロテイン E（ApoE）であるが、Aβの毒性を増強させ、AD の病態進行に影響を与えることが明らかとなった［1］。他、ApoE の遺伝子多型においてε4 が AD の最大の危険因子であるという遺伝的な関連性も示された［1］。ところが、これらの諸課題を解決する鍵となる 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。我々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。この中から我々は SRPX1 に着目し、そのアポトーシス誘導効果が CAA 病態の中核を成す可能性を *in vitro* で示した［2］。本研究では、この効果を生体内で検証すべく CAA モデルマウスである APP23 マウスと *SRPX1* ノックアウトマウスを交配させ、アポトーシス抑制を介し CAA が改善するか否かを検討する研究スキームを描いていた。しかし、*SRPX1* のコンディショナルノックアウトマウスの作製に当初の予想以上の時間を要することが判明したこと、SRPX1 を CAA のバイオマーカーとして想定していたが、ELISA 法において検出感度以下となったことから、SRPX1 の研究から研究対象となる分子を変更した。我々は、先行研究において同時に複数の共存タンパク質を同定しており［2］、新たにα－エノラーゼに着目した研究を展開した。α－エノラーゼは、解糖系酵素として広く研究されているが、近年、熱ショックタンパク質や低酸素ストレスタンパク質としての多面的機能が指摘されつつある。さらに、我々の先行研究では CAA 罹患血管において、α－エノラーゼ以外の解糖系酵素は上昇しておらず、α－エノラーゼが解糖系酵素以外の機能を有している可能性を想定し、その機能解明を目指した研究を行った。

方法および結果

1.　α－エノラーゼによるAβ線維形成抑制効果の検討

チオフラビン T はアミロイド線維のβシート構造を認識するが、吸光度の上昇が Aβの線維形成を示す。Aβ単独では、時間経過ともにチオフラビン T の吸光度が上昇するが、α－エノラーゼを同時に添加した際、吸光度が上昇せず線維形成が抑制されていることが示された（図 1A、B）。次に、透過型電子顕微鏡で観察するとα－エノラーゼ添加群では、Aβの線維を認めなかった（図 1C）。培養細胞を用いてカスパーゼ活性を指標とした細胞毒性に着目した研究では、我々が樹立した脳血管平滑筋培養細胞に Aβとα－エノラーゼを添加し、細胞毒性軽減効果の検討を行った。すると、Aβ添加によって誘発されるカスパーゼ活性が、Aβとα－エノラーゼの同時投与によって有意に抑制され、アポトーシスが軽減することを示した（図 2）（投稿中）。

さらに、α－エノラーゼの病態改善効果を生体内で検証するため、高齢 20 ヶ月の APP23 マウスの海馬にα－エノラーゼを 7 日間の日程で持続投与した。同モデルマウスは 6 ヶ月齢より CAA が出現する。脳定位固定装置を用い、麻酔下にマウスの海馬に 30 ゲージの薬物注入用カニューレを挿入し、持続注入用ポンプ、カニューレを組み合わせたシステムを用いて、α－エノラーゼの組換えタンパク質を 7 日間連続投与した。投与終了後 Y-迷路試験を行ったところ、α－エノラーゼ投与群において認知機能が優位に改善した（図 3）（投稿中）。

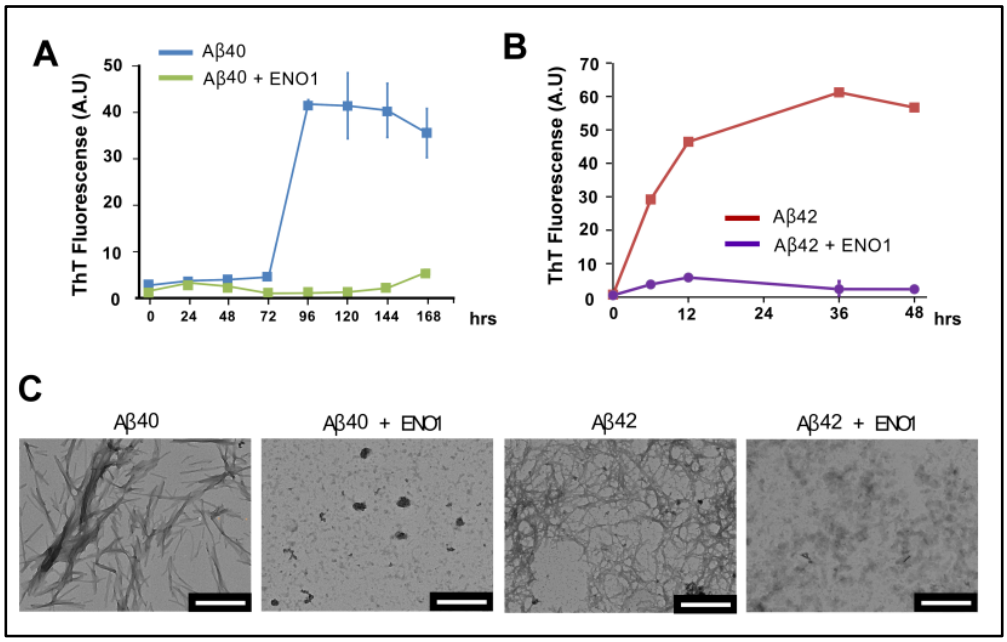


図 1.　α－エノラーゼ（ENO1）による線維形成抑制効果

α－エノラーゼ（ENO1）の投与によって、Aβ40（A）と Aβ442（B）の双方の線維形成が抑制された。このことは透過型電子顕微鏡でも証明された（C）。スケールバー：5μm。

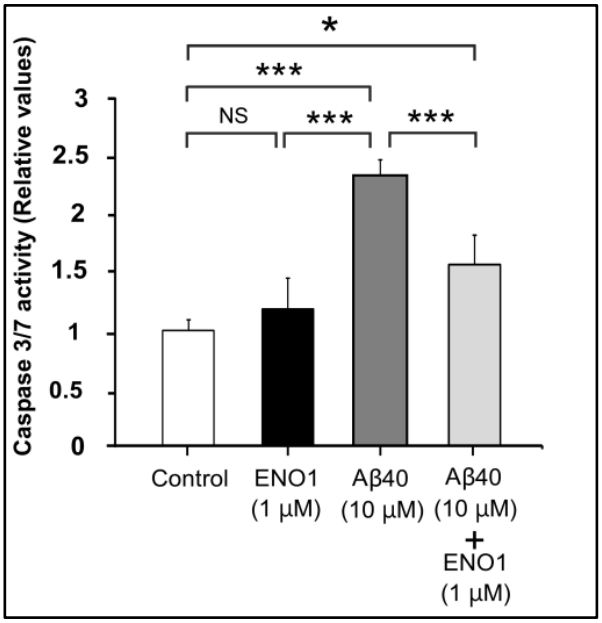


図 2.　α－エノラーゼ（ENO1）による細胞毒性抑制効果

α－エノラーゼ（ENO1）の投与によって、Aβ40 によって惹起される細胞毒性（カスパーゼ 3/7 活性）が抑制された。

Tukey の多重比較検定、*P＜0.05、**P＜0.001、***P＜0.0001。

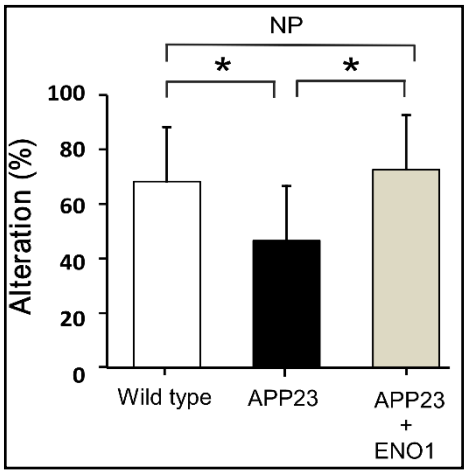


図 3. Y 迷路試験による認知機能評価

*P<0.05、Tukey の多重比較検定。

α－エノラーゼ（ENO1）を投与したマウスの認知機能が改善した。

考　察

Aβ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 Aβ線維が強力な細胞毒性を示す。我々の検討によりα－エノラーゼが Aβ線維形成を抑制し、Aβの細胞毒性を軽減するというこれまでに報告のない新しい知見を見出した。さらに、α－エノラーゼを CAA モデルマウスの脳内へ投与し、病態改善効果を立証した。AD の脳組織において、α－エノラーゼは、高血糖によるグルコシル化、酸化ストレスのマーカーであるカルボニル化などの翻訳後修飾の上昇が見出されているが［3]、AD の発症と進行への影響については、解明されていない。他方、血管細胞に焦点を当てた研究では低酸素環境下でストレスタンパク質としてα－エノラーゼの発現の亢進が確認されているが［4]、その生物学的意義は不明である。CAA は AD 患者では必発であり、かつ加齢に伴う動脈　硬化と相まって、認知機能障害を悪化させる脳血管障害であるが、未だ認知度が十分ではなく、研究開発も不十分である。神経疾患では、むしろ神経細胞死の細胞内機構が着目され、細胞の生存、活動の源を供給する血管系に対する着目度が低い点もその一因と考える。しかし、人体最大の臓器である血管系の分子機構の理解を抜きには CAA のみならず AD など老化関連疾患の病態解明、治療開発は困難であると考える。昨今、Aβの最終排出経路として脳血管が注目されており、脳血管に焦点を充てた研究が広く神経疾患の治療開発の糸口になる可能性がある。また、神経変性疾患の治療研究において、新規化合物を用いた治療薬の提案がしばしばみられるが、化合物による *in vitro* での直接的な Aβ毒性制御に基づく治療戦略は、*in vivo* の研究において生体内での毒性発現が生じ臨床応用の障壁となる。我々が着目するα－エノラーゼは生来人類が備え持つ解糖系酵素であり、α－エノラーゼの Aβの線維化抑制、毒性軽減効果という新しい作用機序に立脚した CAA 治療応用を目指す本研究は、その安全性からも実用化の意義が大きい。

共同研究者・謝辞

本研究を遂行するにあたり、有益なご指導、ご助言を賜りました長崎国際大学アミロイドーシス病態解析学研究室教授の安東由喜雄先生に御礼を申し上げます。

文 献

1) Ma, J., Yee, A., Brewer, H. et al. Amyloid-associated proteins α1-antichymotrypsin and apolipoprotein E promote assembly of Alzheimer ß-protein into filaments. Nature.1994; 372,: 92–4. PMID: 7969426 DOI: 10.1038/372092a0

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. 2017; 134: 605-17. PMID: 28478503 DOI: 10.1007/s00401-017-1720-z

3) Àngels Díaz-Ramos, Anna Roig-Borrellas, Ana García-Melero, Roser López-Alemany. α-Enolase, a Multifunctional Protein: Its Role on Pathophysiological Situations. J Biomed Biotechnol. 2012; 2012; 156795 PMID: 23118496 DOI: 10.1155/2012/156795

4) R M Aaronson, K Graven, M Tucci, R J McDonald, H W Farber. J Biol Chem. 1995; 270: 27752-7. PMID: 7499243 DOI: 10.1074/jbc.270.46.27752.