



# 論文内容要旨

## 【目的】

Human amyloid  $\beta$ -peptide (hA $\beta$ ) の脳実質および毛細血管壁への沈着はアルツハイマー型認知症 (AD), アミロイドアンギオパチー (CAA) といった重篤な脳機能障害を引き起こすと考えられる。正常時, hA $\beta$  は中性エンドペプチダーゼによる代謝分解および血液脳関門 (BBB) を介した循環血液中へのクリアランスによって脳内から除去される。循環血液中に排出された hA $\beta$  の多くは albumin, lipoprotein と結合して存在し, その消失半減期は 1.2-15 分と非常に早い。hA $\beta$  の末梢クリアランスは血液中 hA $\beta$  レベルを維持し, BBB を介した脳内への hA $\beta$  の移行を制限するために重要な役割を果たす。血液中に投与した hA $\beta$  は投与後 120 分で 60% が肝臓に移行することから, 肝臓は hA $\beta$  の末梢クリアランス臓器として重要な役割を果たすと考えられるが, 肝臓における hA $\beta$  輸送の分子機構は殆ど明らかになっていない。本研究では, 血液中 hA $\beta$  の主要分子である hA $\beta$  (1-40) の肝臓への取り込み特性を解析し, 関与する輸送分子を同定することを目的とした。さらに, hA $\beta$  (1-40) の肝クリアランスに対する老化の影響, および輸送分子の発現, 機能を制御する因子について解析した。

BBB を介したマウス脳内からの hA $\beta$  (1-40) の血液中への排出輸送には low-density lipoprotein (LDL) receptor 遺伝子ファミリーに属する LDL receptor-related protein 1 (LRP-1) が関与すると考えられている。一方, 当研究室ではラット脳実質からの hA $\beta$  (1-40) の消失に対して, LDL receptor 遺伝子ファミリーの阻害分子である RAP の阻害効果が低いことを見出し, BBB を介した hA $\beta$  (1-40) の排出輸送に LRP-1 以外の未知の分子が関与する可能性を示した。本研究では, BBB を介した hA $\beta$  (1-40) の輸送に関与する新規分子を明らかにするため, affinity crosslink 法を用いてマウス脳毛細血管に発現する hA $\beta$  (1-40) 結合タンパク質を包括的に同定することを目的とした。

## 【方法】

肝取り込みの解析: ラット, マウスの門脈から [<sup>125</sup>I] hA $\beta$  (1-40), [<sup>3</sup>H] water を含む生理緩衝液を bolus 投与し, 一定時間後に肝臓内の放射活性を測定した。Liver uptake index 法に従い, 肝取り込み速度を算出した。また, 留置針を門脈に刺し, 各種濃度の insulin 溶液を 5  $\mu$ l / (min $\cdot$ g of liver) の一定速度で投与した。

Affinity crosslink 法: ddY 系マウス的大脑, 脳毛細血管および温度感受性 SV40 T 抗原遺伝子導入トランスジェニックマウス由来の脳毛細血管内皮細胞株 (TM-BBB4) から調製した粗膜タンパク質画分と, ビオチニル化 hA $\beta$  (1-40) [bio-LC-hA $\beta$  (1-40)] を反応させた。特性の異なる 6 種のクロスリンカーを用いて bio-LC-hA $\beta$  (1-40) 複合体を架橋し, 固相化 streptavidin を用いて複合体を精製した。SDS-PAGE および銀染色を行った後, bio-LC-hA $\beta$  (1-40) 特異的なバンドを切り出し, トリプシン消化後に LC-MS/MS を用いて質量分析を行った。

## 【結果・考察】

### 肝臓における hA $\beta$ (1-40) の取り込みに関与する分子の同定

摂食ラットにおいて、 $[^{125}\text{I}]$  hA $\beta$  (1-40) の肝臓への取り込みは濃度依存的な飽和性を示した (50% saturation concentration =  $302 \pm 35$  nM)。 $[^{125}\text{I}]$  hA $\beta$  (1-40) の取り込みは非標識の  $10 \mu\text{M}$  hA $\beta$  (1-40) の前処理によって有意に阻害され、非標識体を前処理する投与間隔を延長することで取り込みは時間依存的に回復した ( $t_{1/2}$ : 10.5 min)。この半減期は肝臓における hA $\beta$  (1-40) 受容体のリサイクリングを反映すると考えられ、hA $\beta$  (1-40) の肝臓への取り込みに受容体介在型エンドサイトーシスが関与することが示唆された。

$[^{125}\text{I}]$  hA $\beta$  (1-40) の取り込みは  $20 \mu\text{M}$  hA $\beta$  (1-40) , hA $\beta$  (1-42) の共存下でそれぞれ 64, 24% 阻害された。一方、hA $\beta$  (40-1) , hA $\beta$  (42-1) の共存下では有意な阻害は認められず、アミノ酸配列への選択性が示された。また、 $[^{125}\text{I}]$  hA $\beta$  (1-40) の取り込みは  $20 \mu\text{M}$  hA $\beta$  (1-28) , hA $\beta$  (12-28) , hA $\beta$  (17-40) の共存下で有意に阻害されたが、hA $\beta$  (1-11) , hA $\beta$  (1-16) , hA $\beta$  (25-35) の共存下では阻害されなかった。この阻害スペクトルから、hA $\beta$  (1-40) の肝臓への取り込みに関与する受容体は hA $\beta$  の 17-24 番目のアミノ酸配列 (LVFFAEDV) を認識することが示唆された。

$[^{125}\text{I}]$  hA $\beta$  (1-40) の取り込みは  $2 \mu\text{M}$  RAP によって 48% 阻害され、LDL receptor 遺伝子ファミリーの関与が示された。LDL receptor 遺伝子ファミリー、特に LRP-1 の脳および肝臓における発現が顕著に抑制される RAP 遺伝子欠損マウスにおいて、 $[^{125}\text{I}]$  hA $\beta$  (1-40) の肝臓への取り込みは野生型と比較して 48% 低下した。さらに、特異的 siRNA を用いてマウス肝臓における LRP-1 タンパクの発現を抑制することで、hA $\beta$  (1-40) の取り込みは scrambled siRNA を導入した対照群と比較して 64% 低下した。したがって、LRP-1 は肝臓における hA $\beta$  (1-40) の取り込みに主要な分子として関与することが示された。

13 ヶ月齢のラットにおける  $[^{125}\text{I}]$  hA $\beta$  (1-40) の肝臓への取り込みは 7 週齢と比較して 24% 減少し、hA $\beta$  (1-40) の肝クリアランスが老化に伴って低下することが示された。肝臓における LRP-1 タンパクの発現は若齢ラットと比較して 25% 低下したことから、老化に伴う LRP-1 の発現の低下は hA $\beta$  (1-40) の肝クリアランスの低下を誘導する可能性が示された。

以上の結果から、血液中の遊離型 hA $\beta$  (1-40) は LRP-1 介在型エンドサイトーシスを介して肝臓に取り込まれることが示された。さらに、老化に伴ってラット肝臓における LRP-1 の発現および hA $\beta$  (1-40) の取り込みが低下することが示され、老化に伴う血液中 hA $\beta$  濃度の上昇の一要因となる可能性が示された。

### Insulin による LRP-1 を介した hA $\beta$ (1-40) の肝クリアランスの制御

Insulin シグナルが慢性的に低下する II 型糖尿病と弧発性 AD の発症には疫学的に相関があることが報告されているが、insulin シグナルの低下と hA $\beta$  の脳内沈着の関連を説明しうる分子機構は不明である。本研究では、LRP-1 を介した hA $\beta$  (1-40) の肝クリアランスに対する insulin の影響を解析した。48 時

間絶食させたラットの門脈から insulin を定速投与することで、肝臓の plasma membrane における LRP-1 の発現は時間依存的に上昇し、10 分で未処置群の 2.2 倍に達した。この時、whole cells lysate における発現は変動せず、細胞内から細胞膜への LRP-1 のソーティングが促進されたことが示された。細胞膜における LRP-1 の局在量と相関して、 $[^{125}\text{I}] \text{hA}\beta (1-40)$  の肝臓への取り込みは insulin によって時間依存的に上昇し、10 分で未処置群の 1.6 倍に達した。取り込みの上昇は  $2 \mu\text{M}$  RAP の前処理によってほぼ完全に抑制されたことから、insulin は見かけの LRP-1 機能を活性化したことが示された。また、 $[^{125}\text{I}] \text{hA}\beta (1-40)$  取り込みの活性化は insulin の濃度依存的であった ( $\text{EC}_{50} = 230 \text{ pM}$ )。

血液中の insulin 濃度は食餌の摂取によって大きく変動する。摂食ラットの肝臓では、plasma membrane における LRP-1 の局在量は絶食ラットの 2.2 倍であり、また  $[^{125}\text{I}] \text{hA}\beta (1-40)$  の肝臓取り込みは絶食下と比較して 1.8 倍に上昇した。摂食ラットの血液中 insulin 濃度は  $250 \pm 2.2 \text{ pM}$  であり  $\text{EC}_{50}$  とほぼ等しいことから、食餌による  $\text{hA}\beta (1-40)$  の取り込みの活性化は血液中の insulin を介した作用である可能性が示された。

以上の結果から、食餌およびそれに伴う血液中 insulin 濃度の上昇は肝臓における LRP-1 のシヌソイド細胞膜へのソーティングを促進し、 $\text{hA}\beta (1-40)$  の肝臓クリアランスを活性化することが明らかとなった。また、insulin 抵抗性を伴う II 型糖尿病患者では  $\text{hA}\beta (1-40)$  の肝臓クリアランスの低下によって、 $\text{hA}\beta (1-40)$  の脳内沈着が加速される可能性が示された。

#### 脳毛細血管に発現する $\text{hA}\beta (1-40)$ 結合タンパク質の包括的な同定

BBB を介した  $\text{hA}\beta (1-40)$  の輸送に関与する新規分子を同定するため、affinity crosslink 法を用いて脳毛細血管に発現する  $\text{hA}\beta (1-40)$  結合タンパク質の包括的な同定を行った。その結果、マウス大脳から 64、脳毛細血管から 22、TM-BBB4 細胞から 1、重複を除いて合計 77 の既知タンパク質を同定した。また、このリストには大脳から 17、脳毛細血管から 10、重複を除いて 23 の細胞膜タンパク質が含まれた。

本研究では、既知の  $\text{hA}\beta (1-40)$  結合タンパク質である tubulin  $\beta 3$ , similar to glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase を同定した。一方、BBB を介した  $\text{hA}\beta (1-40)$  の輸送に関与する既知分子は、恐らく銀染色の感度以下であったために同定されなかった。また、guanine nucleotide binding protein (G protein) のサブタイプである  $G\alpha_0$ ,  $G\alpha_{14}$ ,  $G(i)\alpha$ ,  $G\beta_2$  が同定されたことから、BBB を介した  $\text{hA}\beta (1-40)$  の輸送に G protein 共役型受容体に関与する可能性が考えられた。Gi 共役型受容体である *N*-formyl peptide receptor family-like (FPRL) のヒト、マウスカウンターパートはマイクログリアにおける可溶性  $\text{hA}\beta (1-42)$  の内在化および炎症シグナルの惹起に関与することが報告されている。当研究室の伊藤らが BBB を介した  $\text{hA}\beta (1-40)$  の消失に対する FPRL の関与を解析した結果、ラット脳内からの BBB を介した  $\text{hA}\beta (1-40)$  の排出輸送に FPRL が 59% 関与し、脳内  $\text{hA}\beta (1-40)$  の血液中へのクリアランスに重要な役割を果たす分子であることが示唆された。

#### 【結論】

本研究では、肝臓および BBB における hA $\beta$  (1-40) のクリアランスに関与する分子について解析を行った。その結果、血液中の遊離型 hA $\beta$  (1-40) の肝臓への取り込みに LRP-1 介在型エンドサイトーシスが主要な機構として関与し、老化に伴って LRP-1 の発現および hA $\beta$  (1-40) の肝クリアランスが低下することを明らかにした。また、insulin は肝臓における LRP-1 のシヌソイド細胞膜へのソーティングを促進し、LRP-1 を介した hA $\beta$  (1-40) の肝クリアランスを活性化することを明らかにした。さらに、affinity crosslink 法を用いて脳毛細血管に発現する hA $\beta$  (1-40) 結合タンパク質を包括的に解析し、BBB における新規 hA $\beta$  (1-40) 輸送分子の同定のために重要な知見を与えた。本研究で得られた成果は、肝臓および BBB における hA $\beta$  クリアランスの分子機構を明らかにし、hA $\beta$  の脳内沈着を防ぐ新しい薬物治療法の開発に繋がると考えられる。

## 審査結果の要旨

Human amyloid  $\beta$ -peptide (hA $\beta$ ) の脳内沈着は神経変性を引き起こし、Alzheimer's disease (AD) の原因となる。正常時、hA $\beta$  はプロテアーゼによる代謝分解および、血液脳関門を介した循環血液中への排出輸送機構によって脳内から消失すると考えられる。また、肝臓は血液中 hA $\beta$  の末梢クリアランス臓器として重要な役割を果たす。本研究では、hA $\beta$  の主要な分子種である hA $\beta$  (1-40) の肝臓および血液脳関門における輸送の分子機構を解明することを目的とした。

Liver uptake index 法を用い、hA $\beta$  (1-40) が濃度依存的かつ、アミノ酸配列に選択的にラット肝臓に取り込まれることを示した。siRNA を用いて low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP-1) の発現を抑制することで、hA $\beta$  (1-40) の取り込みは有意に低下し、hA $\beta$  (1-40) は LRP-1 を介して肝臓に取り込まれることが示された。高齢のラットでは、肝臓における LRP-1 の発現および hA $\beta$  (1-40) の取り込みが低下した。老化に伴う LRP-1 を介した hA $\beta$  (1-40) の肝輸送の低下は、hA $\beta$  沈着を加速する一要因になると考えられる。絶食下ラットに insulin を定速投与することで、肝実質細胞における LRP-1 の細胞内から細胞膜へのソーティングが促進されることを示した。LRP-1 の細胞内局在の変動と相関し、insulin によって LRP-1 を介した hA $\beta$  (1-40) の取り込みが誘導された。したがって、insulin は LRP-1 の細胞膜における発現を上昇させることで、hA $\beta$  (1-40) の肝輸送を活性化することが示された。Insulin 抵抗性を伴う II 型糖尿病では、hA $\beta$  (1-40) の肝クリアランスの低下によって、hA $\beta$  の沈着が加速される可能性が考えられる。

LRP-1 は血液脳関門を介した脳内 hA $\beta$  (1-40) の血液中への輸送に関与することが報告されているが、当研究室では LRP-1 の関与は低いことを見出している。血液脳関門を介した hA $\beta$  (1-40) の輸送を担う新規分子を同定するため、hA $\beta$  (1-40) 結合分子のプロテオミクス解析を行った。マウス脳および脳毛細血管の粗膜タンパク質画分とビオチン化 hA $\beta$  (1-40) を反応させ、アビジンカラムを用いて hA $\beta$  (1-40) 結合タンパク質を精製した。LC-MS/MS 解析によって、hA $\beta$  (1-40) 結合タンパク質としてマウス脳から 64、脳毛細血管から 22 の既知タンパク質を同定した。

以上、本研究では、血液中 hA $\beta$  (1-40) の肝臓への取り込みに LRP-1 が主要な分子として関与し、insulin によって hA $\beta$  (1-40) の肝クリアランスが制御されることを明らかにした。さらに、血液脳関門を介した hA $\beta$  (1-40) の排出輸送に関与するタンパク質を包括的に解析し、新規 hA $\beta$  (1-40) 輸送分子の同定のために重要な知見を与えた。これらの知見は、AD の薬物治療研究の発展に大きく貢献すると考えられ、本研究の業績は高く評価できる。

よって、本論文は博士（薬学）の学位論文として合格と認める。