

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	手塚 敏之
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大院博 (医) 第621号
学位授与の日付	平成27年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博士論文名	高グルコース状態がアルツハイマー病関連アミロイド β 産生に及ぼす影響
論文審査委員	主査 教授 笹岡 俊邦 副査 教授 西澤 正豊 副査 教授 五十嵐 博中

博士論文の要旨

背景と目的

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease: AD) は認知症の最大の原因疾患である。ADの主要な病理変化はアミロイド β (Amyloid- β : A β) の蓄積である。アミロイド前駆体蛋白 (Amyloid precursor protein: APP) は、 β -secretase で切断され β -CTF (C-terminal fragment) が生じ、 β -CTF はさらに γ -secretase により切断されA β が産生される (A β 産生経路)。一方、APPが α -secretase により切断され α -CTFが生じる場合はA β が産生されない (A β 非産生経路)。後天的環境因子がAD発症のリスクになることが数多くの疫学研究により報告されている。住民コホート研究である久山町研究では、糖尿病によるAD発症のリスクは約2倍と報告されている。糖尿病と診断されない方でも、空腹時血糖が高い程、認知症発症のリスクが高まるとの報告もある。これらを背景に申請者は、糖尿病がAD発症のリスクとなる分子機序を明らかにすることを目的に、高グルコース状態がAPPおよびA β の代謝に及ぼす影響について、神経系培養細胞を用いて検討した。

方法

Neuro2a マウス神経芽腫細胞 (N2a 細胞) と、APP Sweden 型変異を安定発現するN2a細胞 (N2a APP-swe 細胞) を使用した。グルコース濃度 50, 100, 200, 400 mg/dL の条件で24時間培養した後に、細胞ライセイトと培養上清を回収した。ウェスタンブロット法で目的とする蛋白の検出を行い、densitometry による半定量解析を行った。N2a細胞の培養上清中の内在性A β を定量するため、サンドイッチELISAを用いた。各グルコース濃度における変化は、グルコース 50 mg/dL を基準とした相対値で検討した。統計解析はSPSS 12.0 J を用いて分散分析 (ANOVA) を行い、 $p < 0.05$ を有意と判定した。

結果

N2a APP-swe 細胞を高グルコース条件 (200 mg/dL 以上) で培養すると \sim 110 kDa のAPP-FL (full length) と培養上清中の \sim 4 kDa のA β が増加し、 \sim 15 kDa のAPP-CTFは減少した。それぞれのバンドを半定量化して解析すると、APP-FL/actinはグルコース 50 mg/dL 条件下に比べて、200, 400 mg/dL 条件下で有意に増加した。一方、APP-CTF/FLは200, 400 mg/dL 条件下で有意に減少した。A β /APP-FLは100, 200, 400 mg/dL 条件下で有意に増加した。内在性APPを発現するN2a細胞においても同様に、高グルコース条件でAPP-FL

は増加し、APP-CTF は減少した。半定量解析を行うと、APP-FL/actin はグルコース 50 mg/dL 条件下に比べて、400 mg/dL 条件下で有意に増加した。一方、APP-CTF/FL は 100, 200, 400 mg/dL 条件下で有意に減少した。ELISA で測定した内在性 A β 40, A β 42 は、いずれもグルコース 200, 400 mg/dL 条件下で有意に増加した。A β 42/40 の比率は、グルコース濃度による変化は見られなかった。

考察

本研究により、高グルコース条件で神経細胞において A β 産生が高まることが示唆された。高グルコース状態が A β を増加させる分子機序として、以下のことが考えられる。第一に、高グルコースによる APP 切断酵素への影響が考えられる。APP-FL を主に切断するのは α -secretase であり、APP-CTF が減少した原因として、 α -secretase の活性低下が考えられる。また、A β が増加したことから、 γ -secretase の活性亢進が生じている可能性も考えられる。第二に、高グルコース条件により APP-FL が増加することが、A β 増加の一因になっている可能性が考えられる。しかし、高グルコース条件で A β /APP-FL は有意に増加しており、APP-FL の増加のみで A β 産生亢進を説明するのは困難であろう。既報によれば、高グルコース条件で APP-FL の mRNA 発現量は変化しないと報告されている。第三として、高グルコース条件で A β 分解が遅延している可能性がある。シクロヘキシミドでタンパク合成を阻害した既報では、高グルコース条件で APP-FL の分解が抑制されたと報告している。また、高グルコース状態で蛋白分解に関わるプロテアゾームやライソゾームの働きが低下するという報告がある。今後このような可能性についての検証が必要である。

高グルコース状態が APP および A β の代謝に影響を及ぼし、A β 蓄積を促進させる方向に働くのであれば、高グルコース状態を抑制することで AD 病態を改善させることが可能かもしれない。例えば、高グルコース状態を改善させる糖尿病治療薬が AD 治療薬として応用できる可能性がある。糖尿病治療薬の中でも PPAR- γ 作動薬やインクレチン関連製剤は、AD モデル動物における A β 蓄積を軽減する効果が報告されており、本研究で示されたグルコースを介した抗 A β 作用がその薬効の機序となっている可能性が考えられる。

審査結果の要旨

アルツハイマー病 (AD) の主な病理変化はアミロイド β (A β) の蓄積である。アミロイド前駆体蛋白 (APP) は、 β -secretase で切断され β -CTF (C-terminal fragment) が生じ、 β -CTF は γ -secretase により切断され A β が産生される (A β 産生経路)。一方、APP が α -secretase により切断され α -CTF が生じる場合は A β が産生されない (A β 非産生経路)。本研究は AD 発症のリスク因子と考えられる糖尿病に着目し、AD 発症分子機序の解明を目的に、Neuro2a 細胞 (N2a 細胞) と APP Sweden 型変異を導入した N2a 細胞 (N2a APP-swe 細胞) を使用し、高グルコース条件で培養後、目的蛋白の定量解析を行った。N2a 細胞及び N2a APP-swe 細胞とも高グルコース条件で培養後、細胞内の全長 APP と培養上清中の A β が増加し、APP-CTF は減少した。

本研究では高グルコース条件で神経細胞において A β 産生が高まることを見出した。この分子機序として、第一に APP-FL 産生増加と α -secretase の活性低下による A β 産生経路への促進、第二に γ -secretase の活性亢進による A β 産生増加、第三に高グルコース条件での A β 分解の遅延の可能性を考察した。

また、上記の培養細胞の実験系で、糖尿病治療薬およびインスリンの投与による A β 産生抑制の効果を検討した。

以上、本研究において AD 発症分子機構の研究に有用な実験系を構築し、リスク因子の影響と治療薬の効果を検討した点に、学位論文として価値を認める。