

称号及び氏名	博士（獣医学）	板倉 正典
学位授与の日付	平成29年3月31日	
論文名	Studies on Pathophysiological Significance of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) Aggregates in Neurological Disorders and Efficacy of GAPDH Aggregation Inhibitor (脳神経疾患における GAPDH 凝集体の病態生理学的意義と GAPDH 凝集阻害剤の有用性に関する研究)	
論文審査委員	主査	竹内 正吉
	副査	小森 雅之
	副査	岡田 利也
	副査	中嶋 秀満

## 論文要旨

### 緒言

グリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素 (GAPDH) は, 様々な生理機能を担う多機能蛋白質であることが知られており, 当研究室ではこれまでに, 酸化ストレス条件下において GAPDH がアミロイド様凝集体を形成し, 細胞死を誘発することを報告している (Nakajima ら, 2007 および 2009). 酸化ストレスとの関わりが深いとされるアルツハイマー病や脳卒中などの脳神経疾患において, 特定蛋白質の凝集とその蓄積が病態形成の原因の一つと考えられている. 興味深い知見として, アルツハイマー病患者の死後脳において, 老人斑中に GAPDH が認められること (Wang ら, 2005), またラット脳卒中モデルにおいて虚血再灌流に伴う GAPDH の過剰発現および蓄積が報告されている (Tanaka ら, 2002). しかし, これらの疾患における GAPDH 凝集体の病態生理学的意義は明らかとされていない. そこで本研究では, アルツハイマー病モデルおよび脳卒中モデルマウスを用いて, GAPDH 凝集体の病態生理学的意義の解明を目的とした. さらに GAPDH 凝集阻害剤を作出し, 脳卒中モデルにおける治療効果を検証した.

## 第一章：アルツハイマー病モデルマウスにおいて GAPDH 凝集体は アミロイドβ蛋白質のアミロイド化を促進する

アルツハイマー病 (AD) は、世界で 200 万人以上が罹患している記憶障害や認知機能障害を主症状とする最も一般的な神経変性疾患である。特徴的な病理所見として、大脳皮質や海馬におけるアミロイドβ蛋白質 (Aβ) を主成分とする老人斑の出現や神経細胞の脱落が認められる。AD の病因としては、加齢に従って増加する Aβ凝集体 (オリゴマーおよびフィブリル) が神経細胞死を惹起するという「アミロイド仮説」が支持されている。近年、Aβ除去といった治療アプローチが盛んに試されてきたが、記憶障害の改善効果が認められないことに加え、重篤な副作用が報告されている。したがって本章では、新規アプローチによる副作用の少ない治療法の開発を目的に、GAPDH 凝集体の AD 病態形成への関与を検討した。

### 第一節 遺伝子改変アルツハイマー病モデルマウスを用いた検討

AD 患者に類似した表現型を示す遺伝子改変マウスである **Triple transgenic mice model of AD (3xTg-AD マウス)** を用いて免疫染色を行った結果、老齢 (9 ヶ月齢) 3xTg-AD マウスの大脳皮質において細胞外 Aβ沈着 (老人斑) が認められ、これは GAPDH シグナル陽性であった。より若齢 (1, 3, 6 ヶ月齢) の 3xTg-AD マウスを用いた検討の結果、海馬 CA3 領域錐体細胞内において GAPDH 凝集体および Aβ凝集体が加齢に従い増加し、これらは共局在していた。さらに 3 ヶ月齢の 3xTg-AD マウスの側脳室内に GAPDH siRNA を投与し GAPDH をノックダウンした結果、海馬不溶性画分に存在する Aβ凝集体量が減少した。以上の結果より、AD 病態形成過程において GAPDH 凝集体が Aβ凝集を促進することが示唆された。

### 第二節 精製蛋白質レベルにおける Abアミロイド化に対する GAPDH 凝集体の作用

一酸化窒素存在下で GAPDH をインキュベートし GAPDH 凝集体を作製した後、Aβ40 と共培養を行った。チオフラビン T を用いて Aβ40 のアミロイド化を経時的に評価した結果、GAPDH 凝集体の添加により Aβ40 のアミロイド化が促進された。さらに GAPDH 凝集体によるアミロイド化促進作用は、コンゴレッド染色、円偏光二色性スペクトルおよび原子間力顕微鏡を用いた形態学的解析法によっても確認された。

### 第三節 Ab毒性に対する GAPDH 凝集体の関与

Aβ40 を GAPDH 凝集体非存在下 (Aβ単独) および 10%GAPDH 凝集体存在下 (**cross seed**) でインキュベートした後、PC12 細胞に処置し 48 時間後の細胞生存率を測定した。その結果、Aβ単独を処置した細胞の生存率は約 70%に減少した。一方、**cross seed** を処置した細胞では、生存率は約 20%であり、Aβ単独処置と比較して有意に細胞生存率が減少した。さらに Aβ単独および **cross seed** をマウスの側脳室内に投与し、HE 染色により神経細胞死の評価を行った。溶媒投与と比較して Aβ単独投与により、海馬 CA3 領域錐体細胞において核濃縮を示す変性細胞が認められ、これらの細胞は **cross seed** 投与により有意に増加した。したがって GAPDH 凝集体は Aβ40 誘発性細胞毒性を増強することが明らかとなった。

以上の結果から、GAPDH 凝集体は Aβ凝集を促進し、Aβ誘発性細胞死を増強するこ

とが明らかとなり、AD 病態形成における GAPDH 凝集体の関与が示唆された。

## 第二章：GAPDH 凝集阻害ペプチドの創製

当研究室では以前に、GAPDH の酸化ストレス誘発性凝集の責任アミノ酸として Cysteine-152 (Cys-152) を同定した (Nakajima ら, 2007) 。この知見に基づき、本章では、GAPDH のアミノ酸配列に相同的な Cys-152 を含む前後 10 アミノ酸を抽出し、GAPDH 凝集阻害剤 (GAPDH Aggregation Inhibitor-1: GAI-1) とし、その効果の検証を行った。さらに、より高い活性を持つ最適化 GAI の探索を行った。

### 第一節 GAPDH 凝集阻害剤 GAI-1 の活性および副作用の評価

GAI-1 存在下で GAPDH をインキュベートし、濁度を指標に GAPDH 凝集阻害活性の評価を行った結果、GAI-1 の濃度依存的な GAPDH 凝集阻害が認められ、その  $IC_{50}$  は約 50  $\mu M$  であった。さらにシステイン単独もしくは逆配列ペプチドを用いた検証の結果、GAPDH 凝集阻害活性は GAI-1 の配列特異的であることが明らかとなった。次に GAI-1 による GAPDH 酵素活性への影響および細胞毒性の評価を行った結果、GAI-1 はこれらの副作用を示さないことが明らかとなった。

### 第二節 最適化 GAI の探索

GAI-1 の配列を基にアミノ酸残基数および側鎖の異なる複数のペプチドを合成し、GAPDH 凝集阻害活性、GAPDH 酵素活性への影響および細胞毒性の評価を行った。その結果、高い GAPDH 凝集阻害活性を持ち ( $IC_{50} = 1.19 \mu M$ )、GAPDH 酵素活性阻害および細胞毒性を示さない GAI-17 を創製することに成功した。さらに蛍光色素標識した GAI-17 を作製し、側脳室内投与後の脳内局在を評価した結果、GAI-17 が神経細胞内特異的に局在することが明らかとなった。

以上より、プロトタイプである GAI-1 を基に、より高い GAPDH 凝集阻害活性を持つ GAI-17 の創製に成功した。さらに側脳室内投与された GAI-17 は神経細胞特異的に取り込まれることが明らかとなり、GAI-17 が脳神経疾患における GAPDH 凝集体の役割を明らかにするための、効果的なツールであることが示唆された。

## 第三章：マウス脳卒中モデルにおける GAPDH 凝集阻害剤による治療効果

脳卒中は、世界における死因の第二位を占めるだけでなく、運動機能障害等の重篤な後遺症を生じる可能性が高い疾患である。一度虚血に陥った脳組織に血液が再還流することで過剰産生されるフリーラジカルや活性酸素種などの酸化ストレスが脳卒中の病態形成過程に大きく寄与することが報告されている。以上を踏まえ、本章では脳卒中モデルであるマウス中大脳動脈閉塞 (MCAO) モデルを用いて、脳卒中病態形成過程における GAPDH 凝集体の関与を検討するとともに、第二章で創製した GAPDH 凝集阻害剤：GAI-17 による治療効果の検証を行った。

### 第一節 脳卒中病態形成過程における GAPDH 凝集体の関与

マウス MCAO モデルを作製し、再還流後の脳梗塞体積を TTC 染色により、GAPDH 凝集体量をウェスタンブロット法により経時的に評価した。その結果、脳梗塞巣は再還流 24 時間後より形成されるのに対し、GAPDH 凝集体は再還流 12 時間後より

認められた。これより脳梗塞巣形成に先立って **GAPDH**凝集体が形成されることが明らかとなった。

## 第二節 **GAPDH**凝集阻害剤による脳卒中治療効果

**MCAO**モデルにおいて、再還流 1 時間前、再還流直後および 12 時間後に **GAI-17**を側脳室内に投与し（前投与実験）、脳梗塞巣体積および神経学的スコアの評価を行った。その結果、**GAI-17**による用量依存的な梗塞巣体積の減少および神経学的スコアの改善が認められた。さらに再還流 3 時間後および 12 時間後に **GAI-17**を投与した後投与実験においても、**GAI-17**が病態改善効果を示すことが明らかとなった。

以上の結果より、酸化ストレス誘発性 **GAPDH**凝集体が脳卒中の病態形成に寄与することが明らかとなり、脳卒中に対する新たな治療戦略として **GAPDH**凝集阻害が有用なアプローチであることが示唆された。

### 総括

1. **GAPDH**凝集体がシードとして働き、**A $\beta$** のアミロイド化を促進することでアルツハイマー病の病態形成に関与することを精製蛋白質、培養細胞および個体レベルにおいて明らかにした。
2. **GAPDH**凝集阻害剤 (**GAI-17**)の創製に成功し、その薬理的性状および脳室内投与した際の脳内局在を明らかにした。
3. **GAPDH**凝集体が脳卒中の病態形成過程に関与することを明らかにし、**GAI-17**投与により病態が改善することを個体レベルにおいて明らかにした。

### 審査結果の要旨

様々な生理機能を担う多機能蛋白質であるグリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素 (**GAPDH**)は、酸化ストレス条件下においてアミロイド様凝集体を形成し、細胞死を誘発することが報告されている。一方、酸化ストレスとの関わりが深いとされるアルツハイマー病や脳卒中などの脳神経疾患において、特定蛋白質の凝集とその蓄積が病態形成の原因の一つと考えられているが、アルツハイマー病患者の死後脳において、老人斑中に **GAPDH**が認められること、またラット脳卒中モデルにおいて虚血再還流に伴う **GAPDH**の過剰発現および蓄積が報告されている。しかし、これらの疾患における **GAPDH**凝集体の病態生理学的意義は明らかにされていない。そこで本研究では、アルツハイマー病モデルおよび脳卒中モデルマウスを用いて、**GAPDH**凝集体の病態生理学的意義の解明を行っている。さらに **GAPDH**凝集阻害剤を作出し、脳卒中モデルにおける治療効果を検証している。

第 1 章では、アルツハイマー病 (**AD**)に対する新規アプローチによる副作用の少ない治

療法の開発を目的に、**GAPDH** 凝集体の **AD** 病態形成への関与を検討した。第 1 節において、**AD** 患者に類似した表現型を示す遺伝子改変マウスである **Triple transgenic mice model of AD (3xTg-AD** マウス)を用いて免疫染色を行い、若齢(1, 3, 6ヶ月齢)の **3xTg-AD** マウスの海馬 **CA3** 領域錐体細胞内に **GAPDH** 凝集体および **AD** の主要な病原蛋白質であるアミロイド $\beta$  (**A $\beta$** ) 凝集体が加齢に従い増加し、これらは共局在していた。さらに 3ヶ月齢の **3xTg-AD** マウスの側脳室内の **GAPDH** をノックダウンした結果、海馬不溶性画分に存在する **A $\beta$**  凝集体量が減少した。以上の結果より、**AD** 病態形成過程において **GAPDH** 凝集体が **A $\beta$**  凝集を促進することを示唆した。第 2 節では、一酸化窒素存在下で **GAPDH** 凝集体を作製した後、**A $\beta$ 40** と共培養を行い、**A $\beta$ 40** のアミロイド化を経時的に評価した結果、**GAPDH** 凝集体の添加により **A $\beta$ 40** のアミロイド化が促進された。さらに **GAPDH** 凝集体によるアミロイド化促進作用は、コンゴレッド染色、円偏光二色性スペクトルおよび原子間力顕微鏡を用いた形態学的解析法によっても確認された。第 3 節では、**A $\beta$ 40** を **GAPDH** 凝集体非存在下 (**A $\beta$**  単独) および **10%GAPDH** 凝集体存在下 (**cross seed**) でインキュベートした後、**PC12** 細胞に処置し **48** 時間後の細胞生存率を測定したところ、**A $\beta$**  単独を処置した細胞の生存率は約 **70%** に減少したが、**cross seed** を処置した細胞では、生存率は約 **20%** であり、有意に細胞生存率が減少した。さらに **A $\beta$**  単独および **cross seed** をマウスの側脳室内に投与した結果、溶媒投与と比較して **A $\beta$**  単独投与により、海馬 **CA3** 領域錐体細胞において核濃縮を示す変性細胞が認められ、これらの細胞は **cross seed** 投与により有意に増加した。したがって **GAPDH** 凝集体は **A $\beta$ 40** 誘発性細胞毒性を増強することが明らかとなった。以上の結果から、**GAPDH** 凝集体は **A $\beta$**  凝集を促進し、**A $\beta$**  誘発性細胞死を増強することが明らかとなり、**AD** 病態形成における **GAPDH** 凝集体の関与が示唆された。

第 2 章においては、**GAPDH** のアミノ酸配列に相同的な **Cys-152** を含む前後 **10** アミノ酸を抽出し、**GAPDH** 凝集阻害剤 (**GAPDH Aggregation Inhibitor-1: GAI-1**) とし、その効果の検証ならびに、より高い活性を持つ最適化 **GAI** の探索を行った。第 1 節では **GAPDH** 凝集阻害剤 **GAI-1** の **GAPDH** 凝集阻害活性の評価を行った結果、**GAI-1** の濃度依存的な **GAPDH** 凝集阻害が認められ、その **IC<sub>50</sub>** は約 **50  $\mu$ M** であった。さらにシステイン単独もしくは逆配列ペプチドを用いた検証の結果、**GAPDH** 凝集阻害活性は **GAI-1** の配列特異的であることが明らかとなった。次に **GAI-1** による **GAPDH** 酵素活性への影響および細胞毒性の評価を行った結果、**GAI-1** はこれらの副作用を示さないことが明らかとなった。第 2 節では、**GAI-1** の配列を基にアミノ酸残基数および側鎖の異なる複数のペプチドを合成し、**GAPDH** 凝集阻害活性、**GAPDH** 酵素活性への影響および細胞毒性の評価を行い、高い **GAPDH** 凝集阻害活性を持ち (**IC<sub>50</sub> = 1.19  $\mu$ M**)、**GAPDH** 酵素活性阻害および細胞毒性を示さない **GAI-17** を創製することに成功した。さらに蛍光色素標識した **GAI-17** を作製し、側脳室内投与後の脳内局在を評価した結果、**GAI-17** が神経細胞内特異的に局在することが明らかとなった。以上より、**GAI-17** が脳神経疾患における **GAPDH** 凝集体の役割を明らかにするための効果的なツールであることを示唆した。

第 3 章においては、脳卒中モデルであるマウス中大脳動脈閉塞 (**MCAO**) モデルを用いて、脳卒中病態形成過程における **GAPDH** 凝集体の関与を検討するとともに、第 2 章で創製した **GAPDH** 凝集阻害剤: **GAI-17** による治療効果の検証を行った。第 1 節では、マウス

MCAO モデルでの再還流後の脳梗塞体積を TTC 染色により, GAPDH 凝集体量をウエスタンブロット法により経時的に評価し, 脳梗塞巣は再還流 24 時間後より形成されるのに対し, GAPDH 凝集体は再還流 12 時間後より認められた。これより脳梗塞巣形成に先立って GAPDH 凝集体が形成されることが明らかとなった。第 2 節では, 再還流 1 時間前, 再還流直後および 12 時間後に GAI-17 を側脳室内に投与し(前投与実験), 脳梗塞巣体積および神経学的スコアの評価を行い, GAI-17 による用量依存的な梗塞巣体積の減少および神経学的スコアの改善が認められた。更に再還流 3 時間後に GAI-17 を投与した後投与実験においても, GAI-17 が病態改善効果を示すことが明らかとなった。以上の結果より, 酸化ストレス誘発性 GAPDH 凝集体が脳卒中の病態形成に寄与することが明らかとなり, 脳卒中に対する新規治療戦略として GAPDH 凝集阻害が有用なアプローチであることが示唆された。

今回の研究において, ①精製蛋白質, 培養細胞および個体レベルにおいて, GAPDH 凝集体がシードとして働き, A $\beta$  のアミロイド化を促進することでアルツハイマー病の病態形成に関与すること, また, ②GAPDH 凝集阻害剤(GAI-17)の創製に成功し, その薬理学的性状および脳室内投与した際の脳内局在を示したこと, 更には, ③個体レベルにおいて GAPDH 凝集体が脳卒中の病態形成過程に関与し, GAI-17 投与により病態が改善することを明らかにし, 脳神経疾患における新たな治療戦略として GAPDH 凝集阻害の可能性を示している。これらの研究成果は, 獣医学および医学における脳神経疾患研究の新たな展開と治療戦略に資するものであり, 本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて, 博士(獣医学)の学位を授与することを適当と認める。