The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Zinc-Dependent Activation of the Plasma Kinin-Forming Cascade by Aggregated β Amyloid Protein
Author(s)	芝山, 洋二
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42856
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【38】

氏　　名	芝山洋二（しばやまようじ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　15634　号
学位授与年月日	平成12年6月2日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学　位　論　文　名	Zinc-Dependent Activation of the Plasma Kinin-Forming Cascade by Aggregated β Amyloid Protein （凝集βアミロイドプロティンによる血漿キニン産生カスケードのZnイオン依存的な活性化）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　永井　克也 （副査） 教　授　吉川　和明　　教　授　岡本　光弘

論文内容の要旨

（目的）

アルツハイマー型痴呆症（AD）で見られる脳内血管および細胞外に沈着するβアミロイドプロティン（Aβ）と血管機能の変化との関係についてはこれまで明らかにされていない。ADでは、炎症タンパク質の出現、補体系の活性化、炎症サイトカインの関与、さらにNSAIDs（Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs）による治療効果、など炎症との関連を示す報告がされている。そこでAβと、血漿での炎症物質であり血管透過性亢進作用があるブラジキニンとの関わりを明らかにする目的で、in vitroでの凝集Aβによる血漿キニン産生カスケードの活性化について検討した。

（方法）

・凝集Aβの調製

保存Aβ（Aβ38：1-38、Aβ40：1-40、またはAβ42：1-42）溶液（5mg/mLジメチルフォルマミド溶液）をHBS（N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルフォン酸緩衝生理食塩液）で10倍に希釈し、ポリエチレングリコールで洗浄した浮遊細胞用96穴マイクロプレート中で37℃でインキュベートして凝集Aβを調製した。凝集は、光学顕微鏡（倍率×100）にて観察した。

・血漿キニン産生系の測定

-プレカリクレイン（PK）の活性化

ヒト精製タンパク質（ハーゲマン因子：FXII（Hageman Factor）、高分子キニノーゲン：HK（high molecular weight kininogen）、PK（Prekallikrein））を用いた系と、希釈した正常ヒト血漿を用いた系で実験を行った。前者は、ポリエチレングリコールで洗浄した浮遊細胞用96穴マイクロプレートに終濃度がそれぞれ1μg/mL（HBS緩衝液）のFXII、HK、PK、50μMの$ZnCl_2$、プレインキュベートしたAβ適宜量を添加し、0.6mMクロモザイムPK（カリクレインの合成基質）を加え、直ちにマイクロプレートリーダーにより毎分のOD405nmを測定しカリクレイン変換を測定した。後者は、10倍希釈した正常ヒト血漿を、凝集Aβ、$ZnCl_2$、0.6mMクロモザイムPKとインキュベートし、マイクロプレートリーダーでカリクレイン変換を測定した。

-BK（bradykinin）産生の測定

ヒト精製タンパク質を用いた系で、凝集Aβ40を用いて上記条件でインキュベートし、EDTA、ポリブレン、1,10-

オルトフェナンスロリン、アプロチニン、大豆トリプシンインヒビターからなるインヒビター溶液を添加して反応を停止した後、反応液100μl中のBKをRIA法によって測定した。HK分解の測定は、5倍希釈血漿と凝集Aβ42をインキュベートした後、インヒビター溶液添加で反応停止し、10%SDS-PAGE、抗ヒトHK-軽鎖抗体によるウェスタンブロットにて行った。

・凝集AβとFXIIとHKとの結合

Aβ40をニトロセルロース膜にドットブロットし、ビオチン化FXII、HKとインキュベートし、それぞれの結合はABC染色法によって測定した。

（成績）

A）凝集Aβによる血漿キニン産生系活性化におけるZnイオン依存性

1）精製タンパク質系において、3日間インキュベートして得られた凝集Aβ38によるカリクレイン変換が見られ、血漿キニン産生系が活性化された。この作用は、凝集Aβ濃度依存性、Znイオン依存性、FXII依存性を示し、HKは活性化を亢進した。

i）50μMZnイオン添加時に凝集Aβ38が10-100μg/mLの濃度域で凝集Aβ濃度依存的血漿キニン産生系の活性化が観察されたが、Aβ38のモノマー（可溶Aβ）では活性化は認められなかった。Aβ38、40、42では、長鎖のものほど凝集しやすく、また活性化能も強かった。AβフラグメントであるAβ28（1-28）は凝集せず、また活性化も認められなかった。

ii）凝集Aβ40が50μg/ml濃度の時にZnイオン依存的血漿キニン産生系の活性化がZnイオン濃度25-100μMで認められたが、200μMでは抑制が観察された。本カスケードの活性化剤であるデキストラン硫酸（DS）の場合、Znイオン依存性は認められなかった（Znイオンによる亢進は認められた）。他のカチオンでは、Fe^{++}, Al^{+++}, Cu^{++}による影響は認められなかったが、Co^{++}で血漿キニン産生系の活性化が認められた。

iii）Aβによる活性化は反応液にFXIIを加えないと開始しない。それぞれのタンパク質因子に関しては、FXIIと凝集Aβ、Znとをインキュベートすることによりゆっくりとした FXIIの自己活性化（活性型FXIIを測定、速度は数時間を要する）を示し、HKは、FXIIの活性化を早め、この活性化はPKを添加するとさらに加速した。この変化はDSでも観察される。

2）カスケード活性化によるBK産生は、精製タンパク質系で凝集Aβ42の場合でインキュベート4.5分後から産生が見られ、15分で反応液中の全HKに相当するBKが産生した。

3）ヒト血漿系において、10倍希釈した血漿に凝集Aβ40を添加しインキュベートすることにより、カスケードの活性化をカリクレインの変換で確認した。5倍希釈した血漿と凝集Aβ40とをインキュベートすることによりHKの分解が確認された。このことから、C1インヒビターなどの内在性プロテアーゼインヒビターがある血漿においても凝集Aβによる活性化が生じることが明らかとなった。

B）凝集AβとFXII、HKのZnイオン依存的結合

Aβ40を膜にドットブロットし、ビオチン化FXIIとHKの結合を検討したところ、Znイオン存在下で結合した。その結合はAβとのプレインキュベート時間に依存して強く、このことから両タンパク質とも凝集Aβにより強く結合し、またカスケードの活性化と同様に結合もAβ38よりAβ40の方が強いことが観察された。

（総括）

以上の結果をまとめると、

1）Aβによる血漿キニン産生カスケードの活性化とBK産生はZnイオン依存性を示した。

2）凝集Aβは血漿キニン産生カスケードの活性化作用を有するが、Aβモノマーは有しない。

3）凝集Aβと希釈ヒト血漿のインキュベートにより血漿キニン産生カスケードの活性化とHKの分解が確認された。

4）凝集AβはFXII, HKと結合するが、Aβモノマーは結合しない。また、この結合はZnイオン依存的である。

5）血管に沈着したAβは凝集Aβ39、40、42であり、いずれも血漿キニン産生カスケード活性化能を示した。さらに長鎖のものほど活性化作用、およびFXII、HKとの結合は強い。

これらの事実は、血管内壁にAβが沈着したり、血管から血漿成分が浸出した時には脳組織の細胞外に沈着した

Aβによりキニン産生が亢進する可能性を示唆し、アルツハイマー症の発症および進展にBKが関与する可能性を示す。

論文審査の結果の要旨

アルツハイマー型痴呆症（AD）ではβアミロイドタンパク質（Aβ）の沈着の他に、炎症タンパク質の出現、補体系の活性化、炎症性サイトカインの関与などの炎症性変化が存在する。そこで、炎症物質であるブラディキニンとAβとの関係を明らかにするために、本研究ではin vitroの系で血漿キニン産生カスケードとAβの関連について検討し、1）モノマーではなく凝集Aβが亜鉛イオン依存性に血漿キニン産生カスケードを活性化する、2）凝集Aβとヒト血漿のインキュベーションによりキニン産生カスケードの活性化、高分子キニノーゲンの分解が起こる、3）凝集Aβはハーゲマン因子、高分子キニノーゲンなどと亜鉛イオン依存的に結合する、4）血管に沈着するAβ39、40、42の何れもが活性化する、などを明らかにし、Aβがキニン産生を亢進して生じるブラディキニンがADの発症に関与する可能性を示唆した。本研究はADの炎症性変化におけるAβの果たす新たな役割を示唆するものである。よって、博士（医学）の学位授与に値すると考えられる。