

Title	Identification of small peptides in human cerebrospinal fluid upon amyloid β degradation
Author(s)	水田, 直樹
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/61551
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

論 文 内 容 の 要 旨
Synopsis of Thesis

氏 名 Name	水田 直樹
論文題名 Title	Identification of small peptides in human cerebrospinal fluid upon amyloid β degradation (ヒト脳脊髄液中のアミロイド β 分解物の測定)
論文内容の要旨	
<p>〔目的(Purpose)〕</p> <p>アミロイドβ ($A\beta$) はアミロイド前駆体タンパク質がβセクレターゼとγセクレターゼで2段階に切断されることで生じる。この$A\beta$は老人斑の主要構成成分であり、この$A\beta$の産生および分解の異常がアルツハイマー病 (AD)の発症に深く関係していると言われている。$A\beta$の産生抑制、分解促進、凝集阻害はいずれもAD根治治療開発のターゲットである。今回は$A\beta$の分解について注目した。ヒト脳内での$A\beta$の分解については、Neprilysin やInsulin-degrading enzymeなどのendopeptidase が関与していることが考えられているが、$A\beta$が数残基単位に分解されたペプチド(以下$A\beta$分解物)の測定がされていないため、それらの脳内活性を測定することができない。もし、ヒト脳内で$A\beta$分解物が認められれば、$A\beta$分解機構が詳しくわかり、さらにAD治療に応用できるかもしれない。そこで、今回ヒト脳脊髄液 (CSF) 中に$A\beta$分解物の探索を行うこととした。</p> <p>〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕</p> <p>液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析 (LC/MS-MS) を用いて、CSF中の3-5アミノ酸数残基からなる$A\beta$分解物を定量できる系を構築した。CSFを熱処理とTCA沈殿で除タンパクし、$A\beta$分解物が含まれる分画をHPLCにて分離精製し、CSF中の主要な分子種である$A\beta$ 40のC末側数残基と同じ組成のペプチドが存在するかLC/MS-MSで確認し、定量を行った。</p> <p>すると、CSF中に$A\beta$ 40の分解により生じるペプチドのGGVV (Gly-Gly-Val-Val) とGVV (Gly-Val-Val) が検出された。CSF中のGGVV、GVV量はCSF中$A\beta$ 40量の7.6 ± 0.81、$1.5 \pm 0.18\%$に相当した。CSF中に認められたこれらペプチドが$A\beta$由来であるかどうかを調べるため培養細胞を用いた実験を行った。</p> <p>ヒト胎児腎細胞 (HEK細胞) 培養上清には$A\beta$はほとんど確認されずまたGVV、GGVVも認められないが、$A\beta$産生が増加するFAD (家族性AD) 変異を導入したHEK細胞 (Swedish β APP HEK細胞) の培養上清を測定したところ、驚くべきことにCSFと同様のGVVとGGVVがGGVV優位で存在することが確認できた。このことから、ヒト脳内で認められた現象が本実験系で再現されたと考えた。次に、$A\beta$産生阻害剤をこのSwedish β APP HEK細胞に作用させた。すると細胞培養上清中のこれらペプチドの産生が強く阻害された。これらの結果から、本培養細胞系で認められたGVV、GGVVは$A\beta$由来のペプチドであることが推測された。産生量の多いGGVVを産生する酵素がこれまでによく知られている$A\beta$分解酵素であるInsulin-degrading enzyme (IDE)もしくはNeprilysinであるか調べた。これら酵素の遺伝子をそれぞれSwedish β APP HEK細胞に発現させると、いずれも細胞培養上清中の$A\beta$量が低下したが、GGVV量は増加しなかった。つまりGGVVの産生にIDEとNeprilysinが関与していないことが示された。</p> <p>次にマウス脳内でこれらペプチドが生成しているのか調べた。コントロールマウス脳内にはGGVV、GVVは認めないのだが、Swedish β APP遺伝子導入マウス脳内にはCSFと同様のGVVとGGVVが、GGVV優位で存在することが確認できた。したがってマウス脳内で認められたGGVV、GVVは$A\beta$由来のペプチドであると推測された。これらの結果からCSF中に認められたGGVV、GVVは$A\beta$由来の可能性が高いと考えられた。</p> <p>〔総括(Conclusion)〕</p> <p>今回、Neprilysin や IDE を介さない$A\beta$分解機構を見つけた。この仕組みはヒト脳内でも一定の$A\beta$の分解の役割を担っていることが示唆された。</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 水田 直樹

	(職)	氏名
論文審査担当者	主査	大阪大学教授 池田 亨
	副査	大阪大学教授 下口 雅之
	副査	大阪大学教授 島田 昌一

論文審査の結果の要旨

ヒト脳内でのアミロイド β ($A\beta$) の分解機構はアルツハイマー病の病因解明に重要であるが、実際の機序は明らかではない。今回 $A\beta$ の分解によって生じるC末側数アミノ酸残基を液体クロマトグラフ質量分析をもちいることで、ヒト脳脊髄液 (CSF) 中に求めた。すると、CSF中に $A\beta$ 40の分解により生じるペプチドのGGVV (Gly-Gly-Val-Val) とGVV (Gly-Val-Val) が確認された。Swedish β APPを強制発現させた培養細胞の上清中とSwedish β APP遺伝子導入マウス脳内でもGGVV、GVVが存在することが認められた。一方、 β APPを強制発現させてない培養細胞の上清中とコントロールマウス脳内にはGGVV、GVVは認めなかった。このことからこれらペプチドは $A\beta$ 由来のペプチドであると推測された。 $A\beta$ 分解に主要な役割を果たしている Neprilysin もしくは Insulin-degrading enzyme (IDE) を細胞に発現させてもGGVV、GVV量は増加しなかった。今回、Neprilysin や IDE を介さない $A\beta$ 分解機構を見つけた。この仕組みはヒト脳内でも一定の $A\beta$ の分解の役割を担っていると思われた。

本研究はこれまでに報告のないCSF中のアミノ酸残基のペプチドの定量を可能とし、アミロイド β の分解の理解に新たな足がかりを与えるもので、学位に値するものと認める。