

氏名(本籍)	清水 琢音(東京都)
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	甲第173号
学位授与年月日	令和5年3月15日
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
学位論文題名	プリオン病の神経変性機構の解析および治療薬の開発に向けた基礎的研究
論文審査委員	(主査) 山下 匡 (副査) 上家 潤一 坂上 元栄

論文内容の要旨

【諸言】

ヒトにおけるクロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)、ヒツジやヤギにおけるスクレイピー、ウシにおける牛海綿状脳症を含み、伝達性海綿状脳症としても知られるプリオン病は、正常プリオンタンパク質(PrP^C)が何らかの要因で伝達性を有する異常プリオンタンパク質(PrP^{Sc})に高次構造変換し、中枢神経に蓄積することによって引き起こされる神経変性疾患である。致死性の疾患でありかつ人獣共通感染症でもあることから、医学領域および獣医学領域の双方において重要な疾患である。

ヒトにおけるプリオン病は発症機序から、原因不明の孤発性/特発性、PrPをコードする遺伝子の変異に起因した遺伝性、外部からのPrP^{Sc}の伝播による獲得性(感染性)に大別される。病因タンパク質であるPrPは動物種を超えアミノ酸配列が保存された糖タンパク質であり、中枢神経系や末梢神経系で高発現する。プリオン病の神経変性機構の解明を目的として、PrPの正常な機能の解析が進み、細胞内シグナル伝達や酸化ストレスの制御に関与していることが明らかとなった。しかしながら高次構造変換を通じたPrPの生理的な機能の喪失、もしくは新たな機能の獲得のいずれが神経変性の要因となり得るのかということを含め、プリオン病の神経変性機構は詳細が明らかでない。また、前述のとおりプリオン病はPrPの高次構造変換によって惹起されることから、PrP^{Sc}の産生阻害と分解の亢進を標的とした化合物が治療薬として検討されてきたものの、病気の進行につれてこれらの薬剤に耐性を持ったプリオン株の発生が薬剤の効果が減弱させ、今日において臨床的に十分な効果が得られた治療薬が存在しない。そこで本研究では、PrPの神経変性機構の解析ならびに新規治療薬の創出に向けた基礎的研究を行った。

【第一章：プリオン病におけるプリオンタンパク質のミトコンドリアへの標的化と神経変性機構の解析】

細胞が機能を維持するためには 1 万種を超えるタンパク質が合成され、必要とされる特定の細胞区画に局在する必要がある。タンパク質の細胞内における異所性の局在は細胞機能に影響を及ぼし、様々な疾患の発症要因となることが知られている。PrP はアミノ末端側に小胞体移行配列、カルボキシ末端側に GPI アンカー付加配列を有する分泌系のタンパク質であり、細胞膜上に局在する。一方で PrP が典型的な分泌系のタンパク質としての特徴を持つにも関わらず、PrP を強制発現させた老齢のトランスジェニックマウスにおけるプロテアソーム活性の低下や遺伝性プリオン病を引き起こす PrP の遺伝的な変異は PrP をミトコンドリアに異所性に標的化させ、細胞死を引き起こすことが報告されている。しかしながら PrP がいかにしてミトコンドリアに局在し、神経変性を起こしうるのかについては、詳細が明らかでない。そこで第一章では、PrP のアミノ酸配列中のミトコンドリア局在配列およびミトコンドリアへの標的化に関与する因子の同定を通じて、PrP のミトコンドリアへの標的化機構を明らかとすることを目的とした。さらに PrP のミトコンドリアへの標的化系の構築を通じて、PrP のミトコンドリアへの局在が細胞機能へ及ぼす影響を観察した。

GFP を融合させた様々な長さの PrP のトランケート発現ベクターを構築し、蛍光顕微鏡を用いて PrP の細胞内局在を観察したところ、全長のアミノ酸のトランケートは細胞膜とゴルジ体に局在した。121 番目までのトランケート PrP は細胞質に局在した一方で 139 番目までのトランケート PrP は発現した全ての PrP がミトコンドリアに局在した。このことから、PrP のアミノ酸配列上の 122 番目から 139 番目までの 18 アミノ酸がミトコンドリア局在配列として機能することを見出した。このとき PrP が局在したミトコンドリアは、非神経細胞では正常な細胞内分布を保っていた一方で、神経細胞では正常な細胞内分布を失い、核の周囲に集積していた。また、神経細胞と非神経細胞のミトコンドリアサブコンパートメントの分画を行い、PrP の局在をウェスタンブロットによって検出したところ、PrP は非神経細胞では膜間腔ならびに内膜近傍画分に局在していたのに対し、神経細胞では膜間腔ならびに内膜近傍に加えて、外膜画分にも局在していた。さらにタンパク質のミトコンドリアへの局在には細胞質の因子が必須であることが報告されていることを踏まえ、ミトコンドリア前駆タンパク質の輸入促進効果を有することが知られ、プリオン病の診断マーカーとしても用いられる 14-3-3 タンパク質について、PrP のミトコンドリアへの局在に及ぼす影響を RNA 干渉を用いた実験系によって検討したところ、14-3-3 γ ならびに η の発現阻害は PrP のミトコンドリアへの局在を阻害した。さらに 14-3-3 ζ の発現阻害は、PrP のミトコンドリアへの局在に影響を及ぼさないものの、ミトコンドリアの細胞内分布を正常化させた。また PrP を認識するミトコンドリア外膜上の受容体として、ミトコンドリア前駆タンパク質のミトコンドリア内部への中心的な搬入孔として機能する TOM 複合体との関与を同様の RNA 干渉を用いた実験系にて検討したところ、Tom70 の発現阻害は PrP のミトコンドリアへの局在を阻害した。

以上の結果から、PrP は 122 番目から 139 番目の 18 アミノ酸、14-3-3 γ ならびに η 、Tom70 を介してミトコンドリアに標的化すること、神経細胞特異的にミトコンドリア外膜上に局在した PrP は 14-

3-3c 依存的にミトコンドリアの細胞内分布を破壊させ、ミトコンドリアを核周囲に集積させることを明らかとした。神経細胞において軸索はシグナル伝達等で多量の ATP を要求することから、軸索末端のミトコンドリア供給不全は軸索の退縮を惹起し、プリオン病の急速な神経変性の要因となり得ることが示唆された。

【第二章： 吸入麻酔薬前駆体ヘキサフルオロ-2-プロパノールのプリオン病治療薬への応用に向けた基礎的研究】

前述のとおり、プリオン病は PrP^C が PrP^{Sc} へと高次構造変換することで発症が惹起されると考えられている。第一章で見出されたミトコンドリア局在配列である PrP (122-139) 中の 138 および 139 番目のアミノ酸も遺伝性プリオン病における PrP の線維形成に重要な役割を担うことが報告されており、PrP のミトコンドリアへの異所性の局在と PrP の高次構造変換の関与が考えられる。PrP^{Sc} の産生阻害を目的とした様々な薬剤がプリオン病治療薬として検討されてきた一方で、薬剤の継続的な添加は薬剤耐性を持ったプリオン株の産生をもたらし、臨床的に十分な効果が得られた薬剤が存在しない。フルオロアルコールであるヘキサフルオロ-2-プロパノール (HFIP: Hexafluoro-2-propanol) は吸入麻酔薬であるセボフルランの前駆体である。HFIP をはじめとしたフルオロアルコールは、タンパク質の β -シート構造を破壊して α -ヘリックス構造を誘導する性質を持つことから、タンパク質溶液中の分子間相互作用の変化をもたらシエフェクター分子として機能することが知られている。この性質から、HFIP は Amyloid β (A β) ペプチドのようなペプチド凝集体を溶解する溶媒として用いられている。上述のとおり従来検討されてきた多くの薬剤は薬剤耐性を持ったプリオン株の発生が問題であった。一方で HFIP は強固な α -ヘリックス誘導活性を持つため、PrP^{Sc} を PrP^C へと誘導し PrP^{Sc} の構造を正常化することが可能と考えられる。したがって従来検討されてきた化合物の問題点であった薬剤耐性プリオン株の発生という問題点を解決することが期待される。以上を踏まえて第二章では、組換えタンパク質より作製した PrP 線維およびプリオン病の *in vitro* のモデルとして確立されているスクレイピー持続感染マウス神経芽細胞腫由来細胞株 (ScN2a 細胞) を用いて、HFIP のプリオン病治療薬への応用に向けた基礎的検討を実施した。

組換えタンパク質より作製した PrP 線維を用いて HFIP の添加が線維構造に及ぼす影響を透過型電子顕微鏡を用いて観察したところ、10 mM の HFIP の添加は PrP の線維構造を分岐した三叉の構造に変化させた。さらに 20 mM の HFIP の添加は PrP の線維構造を完全に消失させ、規則構造を持たないアモルファス様の凝集体を形成させた。一方で A β (1-40) 線維への HFIP の添加は線維構造を変化させないものの、濃度依存的に線維どうしの会合を促進させた。また、HFIP の添加がタンパク質の二次構造に及ぼす影響を円偏光二色性スペクトルの測定によって推定したところ、HFIP は A β (1-40) と比較して PrP に対して強い α -ヘリックス誘導活性を有することが示唆された。さらに PrP^{Sc} を持続産生する ScN2a 細胞に HFIP を添加し、PrP^{Sc} の生化学的特徴であるプロテアーゼに対する抵抗性をウェスタンブロットを用いて検出したところ、15 mM 以上の HFIP の添加は PrP のプロテアー

れ抵抗性を有意に減弱させた。このとき、HFIP は PrP の細胞内局在ならびにミトコンドリアの膜電位に影響を及ぼさなかった。最後に HFIP の細胞毒性を評価したところ、HFIP は N2a 細胞と比較して ScN2a 細胞に対して高い毒性を示した。

以上の結果から、HFIP の PrP 線維に対する強い α -ヘリックス誘導活性ならびに PrP^{Sc} を有する細胞への強い細胞毒性を見出した。治療域の狭さや、PrP に対する特異性の問題など、治療薬としての実用化に向けて課題があるものの、HFIP を含めたフッ素化合物がプリオン病治療薬となり得る可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

1. 論文の背景

ヒトにおけるクロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD)、ヒツジやヤギにおけるスクレイピー、ウシにおける牛海綿状脳症を含み伝達性海綿状脳症としても知られるプリオン病は、正常プリオンタンパク質 (PrP^C) が何らかの要因で伝達性を有する異常プリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) に高次構造変換し、中枢神経に蓄積することによって引き起こされる神経変性疾患である。致死性の疾患でありかつ人獣共通感染症でもあることから、医学領域および獣医学領域の双方において重要な疾患である。

2. 論文の内容

プリオン病の神経変性機構の解明を目的として、PrP の正常な機能の解析が進み、細胞内シグナル伝達や酸化ストレスの制御に関与していることが明らかとなった。しかしながら高次構造変換を通じた PrP の生理的な機能の喪失、もしくは新たな機能の獲得のいずれが神経変性の要因となり得るのかということを含め、プリオン病の神経変性機構は詳細が明らかでない。また、前述のとおりプリオン病は PrP の高次構造変換によって惹起されることから、PrP^{Sc} の産生阻害と分解の亢進を標的とした化合物が治療薬として検討されてきたものの、病気の進行につれてこれらの薬剤に耐性を持ったプリオン株の出現が薬剤の効果が減弱させ、今日において臨床的に十分な効果が得られた治療薬が存在しない。そこで本研究では、PrP の神経変性機構の解析ならびに新規治療薬の創出に向けた基礎的研究を行った。

研究 1 プリオン病におけるプリオンタンパク質のミトコンドリアへの標的化と神経変性機構の解析

PrP のアミノ酸配列中のミトコンドリア局在配列およびミトコンドリアへの標的化に関与する因子の同定を通じて、PrP のミトコンドリアへの標的化機構を明らかとすることを目的とした。GFP を融合させた様々な長さの PrP のトランケート発現ベクターを構築し、蛍光顕微鏡を用いて PrP の細胞内

局在を観察したところ、全長のアミノ酸のトランケートは細胞膜とゴルジ体に局在した。

122 番目から 139 番目までの 18 アミノ酸をミトコンドリア局在配列として同定した。また PrP を認識するミトコンドリア側の受容体として、ミトコンドリア前駆タンパク質のミトコンドリア内部への中心的な搬入孔として機能する TOM 複合体との関与を同様の RNA 干渉にて検討したところ、Tom70 の発現阻害は PrP のミトコンドリアへの局在を阻害した。以上の結果から、PrP は 122 番目から 139 番目のアミノ酸、14-3-3 γ ならびに η 、Tom70 を介してミトコンドリアに標的化すること、神経細胞特異的にミトコンドリア外膜に局在した PrP は 14-3-3 ζ 依存的にミトコンドリアの細胞内分布を破綻させ、ミトコンドリアを核周囲に集積させることを見出した。神経細胞はシグナル伝達等で多量の ATP を要求することから、軸索末端のミトコンドリア供給不全は軸索の退縮を惹起し、プリオン病の急速な神経変性の要因となり得ることが示唆された。

研究 2 吸入麻酔薬前駆体ヘキサフルオロ-2-プロパノールのプリオン病治療薬への応用に向けた基礎的研究

フルオロアルコールであるヘキサフルオロ-2-プロパノール (HFIP) は吸入麻酔薬であるセボフルランの前駆体である。HFIP をはじめとしたフルオロアルコールは、タンパク質の β -シート構造を破壊して α -ヘリックス構造を誘導する性質を持つことから、タンパク質溶液中の分子間相互作用の変化をもたらすエフェクター分子として機能することが知られている。組換えタンパク質より作製した PrP 線維を用いて HFIP の添加が線維構造に及ぼす影響を透過型電子顕微鏡を用いて観察したところ、HFIP の PrP 線維に対する強い α -ヘリックス誘導活性ならびに PrP^{Sc} を有する細胞への強い細胞毒性を見出した。治療域の狭さや、PrP に対する特異性の問題など、治療薬としての実用化に向けて課題があるものの、HFIP を含めたフッ素化合物がプリオン病治療薬となり得る可能性が示唆された。

論文審査

1) テーマの立て方

本研究のテーマはプリオンタンパク質の性化学的性質の解明とこれまで確立されていない治療薬の可能性を追求した研究である。入念な事前リサーチにより、タンパク質レベルの欠損が細胞内局在に大きな影響を与えることを見出し、さらにその治療薬の開発に向けた基礎知識の集積を目的とし、研究方針が明確である。

2) 研究の背景

ヒトにおけるプリオン病は発症機序から、原因不明の孤発性/特発性、PrP をコードする遺伝子の変異に起因した遺伝性、外部からの PrP^{Sc} の伝播による獲得性 (感染性) に大別される。病因タンパク質である PrP は動物種を超えアミノ酸配列が保存された糖タンパク質であり、中枢神経系や末梢神経系で高発現する。プリオン病の神経変性機構の解明を目的として、PrP の正常な機能の解析が進み、細

胞内シグナル伝達や酸化ストレスの制御に関与していることが明らかとなった。しかしながら高次構造変換を通じた PrP の生理的な機能の喪失、もしくは新たな機能の獲得のいずれが神経変性の要因となり得るのかということを含め、プリオン病の神経変性機構は詳細が明らかでない。神経変性機序の詳細を明らかにする必要がある。

3) 研究の方法

全長のタンパク質に対し各種トランケート発現ベクターを構築し、蛍光顕微鏡を用いて PrP の細胞内局在を観察した。プリオン病の診断マーカーとしても用いられる 14-3-3 タンパク質について、PrP のミトコンドリアへの局在に及ぼす影響を RNA 干渉を用いた実験系によって検討した。吸入麻酔薬前駆体ヘキサフルオロ-2-プロパノールを用い、組換えタンパク質より作製した PrP 線維を用いて HFIP の添加が線維構造に及ぼす影響を透過型電子顕微鏡を用いて観察した。

4) 研究の結果

膨大な量のデータについて、それを取捨選択し適切に整理し客観的に分析し結果を導き、図表を用いてわかりやすく記載している。また、治療薬に対する基礎的研究も実施し、フッ素化合物がプリオン病治療薬となり得る可能性が示唆された。

(ア) 考察と結論

本研究の前半は、タンパク質と細胞内局在を明らかにしている。さらにその関連タンパク質との関わりも追求している。神経細胞はシグナル伝達等で多量の ATP を要求することから、軸索末端のミトコンドリア供給不全は軸索の退縮を惹起し、プリオン病の急速な神経変性の要因となり得ることを明らかにすることが期待される。後半は、プリオン病治療薬への応用に向けた基礎的研究であるが、これまで見出した知見にさらに改善を加えるべきであり、化合物の改変やその効果判定などの課題が残されている。

(イ) 参考文献

本テーマに関する過去の論文を取捨選択し十分に網羅し、これまでの研究で解明されなかったことを洗い出している。結果を考察するにあたり適切な論文を拾い上げ引用されている。

5) 審査結果

本研究の成果は、プリオン病のタンパク質レベルにおける細胞内挙動の証明と、その治験に基づき、これまで確立されていない治療薬の開発に向けた基礎的研究であり、新たな知見として貢献するものと考えられた。

以上のことから、本論文は博士（獣医学）の学位の授与にふさわしい業績であると判定した。