



Title	神経変性疾患におけるプロテオスタシス破綻による神経細胞死誘発メカニズムの解明
Author(s)	田邊, 晶子
Citation	大阪大学, 2025, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/101949
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、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

論文内容の要旨

氏 名 (田 邊 (山 室) 晶 子)

論文題名

神経変性疾患におけるプロテオスタシス破綻による神経細胞死誘発メカニズムの解明

論文内容の要旨

パーキンソン病 (PD) や筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、特定の神経群が選択的に変性・脱落する進行性の神経変性疾患である。これらの疾患の進行を抑制する有効な治療法は未だ確立されていないため、早急な治療法の開発が求められているとともに、その開発につながる神経変性のメカニズムの解明が喫緊の課題となっている。

PD や ALS を含む多様な神経変性疾患において、異常なタンパク質の凝集が共通してみられることが明らかとなり、タンパク質の恒常性 (プロテオスタシス) の破綻が神経変性疾患における神経細胞死に関与すると考えられるようになった。また、中枢神経系には、神経細胞の約 5 倍のグリア細胞が存在し、神経細胞の機能維持に重要な役割を果たしているが、近年、このグリア細胞が神経変性疾患の病態進行に関与することが明らかにされてきている。神経変性疾患でみられる神経細胞死のうち、グリア細胞の病的変化を介して引き起こされる神経細胞死は「非細胞自律性」の神経細胞死と呼ばれる。一方、グリア細胞を介さず、神経細胞内の分子メカニズムで引き起こされる細胞死は「細胞自律性」の神経細胞死と呼ばれているが、PD や ALS での「細胞自律性」および「非細胞自律性」の神経細胞死のメカニズムには不明な点が多い。

本研究は、神経変性疾患におけるプロテオスタシスの破綻が引き起こす「細胞自律性」および「非細胞自律性」の神経細胞死のメカニズムを明らかにすることを目的とし、種々の検討を行った。

ユビキチン-プロテアソーム経路 (UPS) は、異常タンパク質および不要タンパク質を分解することにより、プロテオスタシスの中心的な役割を担っている。近年、遺伝性 PD の解析により、 α -synuclein (α -SYN), parkin および UCH-L1 などの UPS に関わる多くの遺伝子の変異が、遺伝性 PD の原因として同定された。興味深いことに、これらの遺伝子はいずれも主に神経細胞に強く発現することが報告されている。また、変異 α -SYN を有する PD 患者由来の iPS 細胞から誘導した神経細胞では、 α -SYN の蓄積とともに UPS 活性の低下がみられ、この UPS の低下が細胞死の引き金になっていることが報告されており、PD における神経細胞死は主にプロテオスタシス破綻を介した「細胞自律性」の神経細胞死であると考えられる。そこで第 1 章では、ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞を用いて UPS 機能破綻による神経細胞死誘発メカニズムの解明を試みた。

SH-SY5Y 細胞において、プロテアソーム阻害剤 MG132 はアポトーシスを誘発し、活性酸素種 (ROS) 検出の蛍光プローブである Dihydroethidium 由来の ethidium 陽性細胞数を増加させた。これらのアポトーシス細胞数の増加および ROS の産生は、抗酸化剤 N-acetylcystein や NADPH oxidase (NOX) 阻害剤である apocynin および diphenyleneiodonium により抑制された。SH-SY5Y 細胞における NOX isoforms の発現について検討したところ、MG132 処置は NOX5 の mRNA およびタンパク質発現量を著明に増加させることが明らかになった。また、NOX5 siRNA を用いて NOX5 mRNA およびタンパク質の増加を阻害することにより、MG132 処置によるアポトーシスが抑制された。これらのことから、SH-SY5Y 細胞において、MG132 処置による ROS 産生とアポトーシスの誘発には NOX5 が関与していることが示唆された。NOX5 の発現誘導メカニズムを明らかにするため、レポータージーンアッセイを行ったところ、MG132 による NOX5 の転写誘導には GATA 結合配列が重要であることが示された。また、MG132 処置により Globin transcription factor 2 (GATA2) タンパク質の発現量が増加した。これらのことから、SH-SY5Y 細胞において、MG132 誘発神経細胞死には転写因子 GATA2 の増加を介した NOX5 の発現誘導が重要であると考えられた。本章では、UPS 機能障害が GATA2-NOX5 経路を介して ROS の産生増加を引き起こし、神経細胞死を誘発することを明らかにした。

ALS は運動神経の選択的脱落による筋力低下と筋萎縮を伴う難治性の神経変性疾患である。遺伝性 ALS の原因遺伝子として同定された変異 SOD1 を発現した ALS モデルマウス (Tg マウス) では、ALS 様の運動神経の変性が見られるが、本モデルマウスを用いた研究において、アストロサイトやミクログリアなどのグリア細胞から変異

SOD1 を除去した Tg マウスでは、病態進行が著明に抑制されたことから、ALS での運動神経細胞死は主に「非細胞自律性」の神経細胞死であると考えられている。また、ALS の治療薬として edaravone が認可されていることから、ALS の運動神経細胞死には細胞外の ROS が深く関与していると考えられている。グリア細胞の一種であるシュワン細胞は、髄鞘を形成するとともに神経細胞保護因子を産生し、神経細胞の機能や生存を支持しているが、ALS の病態に関与しているか否かは明らかにされていない。そこで第 2 章では、ALS における「非細胞自律性」の運動神経細胞死へのシュワン細胞の関与を明らかにするため、ヒト Schwannoma 由来細胞腫 YST-1 細胞およびマウス運動神経細胞株 NSC-34 細胞を用いて、シュワン細胞の運動神経細胞保護作用への変異 SOD1 導入の影響について検討した。NSC-34 細胞への過酸化水素処置により細胞死が誘導されたが、この細胞死は YST-1 細胞の培養上清 (CM) により抑制された。この CM は過酸化水素分解能を有し、この過酸化水素分解能には peroxiredoxin (PRDX) が重要な役割を果たすことが明らかとなった。Tg マウスの腰髄における PRDX の発現を検討した結果、PRDX1 の著明な発現低下が認められた。また、培養シュワン細胞に変異 SOD1 を導入した結果、PRDX1 の著明な発現低下がみられた。さらに、変異 SOD1 を導入したシュワン細胞の CM では、正常な SOD1 を導入したシュワン細胞の CM に比べ、NSC-34 細胞の過酸化水素誘発細胞死に対する保護作用が有意に減弱した。本章では、シュワン細胞由来の PRDX1 が、細胞外 ROS による運動神経細胞の障害に対して保護作用を示すことを明らかにした。また、ALS の病態進行において、シュワン細胞のプロテオスタシス破綻により PRDX1 発現量が低下し、運動神経細胞が脆弱になる可能性があると考えられた。

アストロサイトは神経細胞の生存や機能を支持しており、アストロサイトが環境変化を感知すると、反応性アストロサイトと呼ばれる反応性が増強した状態へとその性質を変化させることが知られている。反応性アストロサイトは、神経細胞傷害的に働く A1 型と神経保護的に働く A2 型の 2 種類に分類されることが報告されている。ALS 患者の剖検例や Tg マウスの腰髄において A1 アストロサイトが増加することが知られているが、その誘導メカニズムについては不明な点が多い。そこで第 3 章では、ALS におけるプロテオスタシス破綻が反応性アストロサイトに与える影響について検討した。Real-time RT-PCR 法により 15 週齢および 20 週齢の Tg マウスの腰髄において、PRDX6 mRNA の発現が有意に増加することを見出した。免疫蛍光組織染色法により、腰髄における PRDX6 の局在について検討したところ、PRDX6 は反応性アストロサイトに局在していること、Tg マウスにおいて著明に発現が増加することが示唆された。20 週齢の野生型 (WT) マウスと Tg マウスの腰髄における炎症性サイトカイン [tumor necrosis factor (TNF), interleukin-1 β (IL-1 β) および interleukin-6 (IL-6)] と A1 アストロサイトマーカーの complement3 (C3) mRNA 発現について検討したところ、Tg マウスの腰髄では、炎症性サイトカインと C3 mRNA の発現量が著明に増加していることが明らかになった。ヒトアストロサイトーマ U-251 MG 細胞およびマウスアストロサイト株 C8-D1A 細胞において、PRDX6 遺伝子を一過性に過剰発現させることにより、TNF, IL-1 β , IL-6 および C3 の mRNA が有意に増加した。これらの結果と同様に、U-251 MG 細胞および C8-D1A 細胞に PRDX6 を安定発現させた細胞株においてもそれらの mRNA 量の増加がみられた。さらに、PRDX6 の Ca²⁺ 非依存性 phospholipase A2 活性を阻害する MJ33 は、PRDX6 の安定発現株においてみられる TNF, IL-1 β , IL-6 および C3 mRNA 発現量の増加を有意に減少させた。ALS 剖検例や Tg マウスの腰髄において、グリア型 glutamate transporter 1 (GLT-1) の発現量が減少していることが報告されている。本研究において、Tg マウスの腰髄では GLT-1a mRNA の発現量が著明に低下しており、PRDX6 の安定発現した U-251 MG 細胞および C8-D1A 細胞においても、GLT-1a mRNA の発現量が低下していた。本章では、ALS においてプロテオスタシス破綻がアストロサイトにおける PRDX6 の発現を増加させ、A1 アストロサイトへの誘導を促し、運動神経細胞の障害の原因となる炎症性サイトカインの産生増加や GLT-1a の発現低下を誘導することを明らかにした。

本研究では、神経変性疾患におけるプロテオスタシスの破綻による「細胞自律性」および「非細胞自律性」の神経細胞死のメカニズム解明を目指した。本研究で見出した ①神経細胞におけるプロテオスタシス破綻による GATA2-NOX5 を介した ROS の産生増加による細胞死の誘発 ②シュワン細胞におけるプロテオスタシス破綻による PRDX1 の発現低下を介した神経細胞保護作用の減弱 および ③アストロサイトにおけるプロテオスタシス破綻による PRDX6 の発現増加を介した A1 アストロサイトへの誘導による炎症性サイトカインの産生増加 といった「細胞自律性」及び「非細胞自律性」の神経細胞死のメカニズムは、PD や ALS での神経細胞死のメカニズムを示すだけでなく、これらの疾患以外のプロテオスタシスの破綻を伴う神経変性疾患の共通メカニズムである可能性が考えられ、本研究は神経変性疾患の分子基盤の解明に寄与するものであると考えられる。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (田 邊 (山 室) 晶 子)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	橋本 均
	副 査	教授	近藤 昌夫
	副 査	教授	池田 賢二

論文審査の結果の要旨

「神経変性疾患におけるプロテオスタシス破綻による神経細胞死誘発メカニズムの解明」と題する論文において学位申請者は、パーキンソン病や筋萎縮性側索硬化症（ALS）での神経細胞死において、異常タンパク質の凝集・蓄積やプロテオスタシスの破綻が神経細胞傷害を引き起こすメカニズムを解析した。その結果、プロテオスタシスの破綻が神経細胞において活性酸素種（ROS）の産生を介して細胞死を誘導するメカニズム、シュワン細胞の神経保護作用を減弱するメカニズムおよびアストロサイトを細胞傷害性（A1）アストロサイトへと誘導するメカニズムを明らかにした。これらの成果は、神経変性疾患での神経細胞死における共通性があるメカニズムを示すものと考えられ、神経変性疾患の分子基盤の理解に貢献すると期待される。

以下、本学位論文で発表された研究成果とその評価を示す。

パーキンソン病やALSは、特定の神経群が選択的に脱落する進行性の変性疾患であるが、現時点においては神経細胞死の誘導メカニズムに不明な点が多く、また根本的な治療法が存在しないため、そのメカニズムの解明による新たな治療標的の探索と早急な治療薬の開発が求められている。これらの疾患での神経細胞死には遺伝的および非遺伝的要因が関与しており、さらに「細胞自律的」および「非細胞自律的」なメカニズムの関与が指摘されている。本学位論文において学位申請者は、異常なタンパク質の凝集・蓄積やプロテオスタシスの破綻に着目し、神経細胞、シュワン細胞およびアストロサイトにおけるプロテオスタシス破綻が、神経細胞傷害を引き起こす「細胞自律的」および「非細胞自律的」なメカニズムを解析し、以下のことを明らかにした。

1. ヒト神経芽細胞腫において、ユビキチン-プロテアソーム機能障害は、転写因子 globin transcription factor 2 (GATA2) を介して NADPH oxidase 5 (NOX5) の発現を誘導し、ROS を産生することにより細胞死の引き金となることを明らかにした。
2. ヒトシュワン細胞株を用いて、シュワン細胞由来の peroxiredoxin 1 (PRDX1) が運動神経細胞の過酸化水素による細胞死に対して保護作用を示すことを明らかにした。さらに、G93A 変異 SOD1 トランスジェニックマウス（ALS モデルマウス）の腰髄において、PRDX1 の減少が運動機能障害の発症前に起こることを明らかにし、シュワン細胞での PRDX1 の減少が運動神経細胞の酸化的ストレスへの脆弱性に関与する可能性を示した。
3. ALS モデルマウスの腰髄アストロサイトにおいて PRDX6 の発現が上昇していることを見出した。また、この発現増加した PRDX6 が、カルシウム非依存性 phospholipase A2 活性を介して細胞傷害性（A1）アストロサイトへの誘導と炎症性サイトカインの産生増加を引き起こすことを明らかにした。さらに、PRDX6 の発現増加により誘導された細胞傷害性（A1）アストロサイトでは、グリア型 glutamate transporter 1 の発現が低下することを示した。

神経細胞における GATA2-NOX5 を介した細胞死のメカニズムは、パーキンソン病におけるドパミン神経細胞死の新たな視点を提示し、また、パーキンソン病の進行と最も強く関連する α -synuclein の蓄積がドパミン神経細胞選択的に影響を与える理由について説明可能なメカニズムを提案している。また、PRDX6 による細胞傷害性（A1）アストロサイトへの誘導は、これまで細胞傷害性（A1）アストロサイトの誘導に中心的な役割を果たすと考えられてきたミクログリアを介さない新規の誘導メカニズムを提示しており、多くの神経変性疾患への関与が指摘されている細胞傷害性（A1）アストロサイトを制御するための新たな治療標的となる可能性がある。

以上、本研究の成果は、神経変性疾患での「細胞自律性」及び「非細胞自律性」の神経細胞死におけるプロテオス

タシスの破綻、特にプロテアソームの機能障害や異常タンパク質の蓄積による細胞死の共通のメカニズムである可能性を示しており、神経細胞-グリア連関の解明および神経変性疾患の分子基盤の解明にも貢献すると考えられることにより、博士（薬学）の学位論文に値するものと認める。