The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	パーキンソン病の創薬標的としての新規ミトコンドリア蛋白質p13の機能解析
Author(s)	井上, 直紀
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/69514
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

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（井上　直紀）	
論文題名	パーキンソン病の創薬標的としての新規ミトコンドリア蛋白質p13の機能解析

論文内容の要旨

パーキンソン病(Parkinson's disease, PD)は、60歳以上の1%が罹患し、中脳黒質のドパミン神経細胞死によって運動障害が引き起こされる進行性の神経難病である。PD患者に対しては、ドパミンモデュレイター等が第一選択薬として使用されるが、進行するドパミン神経細胞死への影響は十分ではない。したがって、ドパミン神経細胞死そのものを遅らせる、あるいは防ぐことができる根本的な治療法や予防法の確立が焦眉の課題となっている。一方ドパミン神経細胞死と関連する細胞反応において、ミトコンドリアの機能障害は、孤発性PDと遺伝性PDの共通の分子病態の一つとして注目されており、ミトコンドリアの機能制御は、ドパミン神経細胞死を防ぐ新たなPD治療法の開発につながるものと期待されている。

当研究室では、Ⅱ型糖尿病病態下で発現減少する13-kDaの新規因子p13を同定し、p13の過剰発現マウスの作製と解析により、同病態とp13との関連を明らかにするとともに、p13がミトコンドリアに局在すること等を見出してきた。一方で他の研究グループによって、ヒトp13 (C7orf55)は、ミトコンドリア呼吸鎖複合体Ⅰ(complexⅠ)等と物理的に相互作用する可能性が示された。これらの結果から、p13はミトコンドリアに局在し、その機能ならびに細胞機能を調節する新たな細胞内因子であると考えられる。しかし、p13の発現制御や作用機構、PD病態との関連は明らかでない。本研究では、p13によるミトコンドリアの機能制御はPDの新たな創薬標的となりうる、という作業仮説を立て、*in vitro*および*in vivo*におけるp13の機能解析を行った。

まず、ヒト由来のドパミン神経系細胞株SH-SY5Y細胞を用い、ミトコンドリア膜電位(ΔΨm)やアポトーシスに対し、p13の発現制御が与える影響を評価した。p13の過剰発現は、定常状態およびPD毒のrotenoneを処置した*in vitro* PDモデルにおいて、ΔΨmを低下させ、アポトーシスを増加させた。一方p13のノックダウンは、定常状態における各パラメータには有意な変化を及ぼさず、rotenoneによるΔΨmの低下、アポトーシスの増加をいずれも有意に抑制した。なお、別のcomplexⅠ阻害剤(MPP^+)を用いた実験、マウスp13を過剰発現させるレスキュー実験、そしてPD原因遺伝子であるPINK1をノックダウンした遺伝性の*in vitro* PDモデルを用いた実験の結果を併せ、本研究によって、p13のノックダウンは、*in vitro* PDモデルでのミトコンドリアならびに細胞の機能障害に対して普遍的な保護効果を示すことを明らかにした。

次にrotenoneを処置したSH-SY5Y細胞において、p13のノックダウンがcomplexⅠの活性ならびに複合体形成(アセンブリー)に与える影響を調べた。その結果、p13のノックダウンは、定常状態での両指標には有意な変化を及ぼすことなく、rotenoneによるcomplexⅠの活性低下ならびにアセンブリー障害を有意に抑制した。また、SH-SY5Y細胞において、過剰発現させたp13、内在性のp13はともにcomplexⅠと共免疫沈降された。これらの結果から、神経系においてp13は、complexⅠとの物理的な相互作用を通じ、そのアセンブリーと活性を、PD病態選択的に調節することによって、ミトコンドリアや細胞の機能障害を防ぐ可能性を示した。

続いて、CRISPR/Cas9システムを用いてp13欠損マウスを作製し、p13ノックダウンの保護効果を*in vivo*で検証した。まずrotarod testを用いて運動能力を評価したところ、PD毒であるMPTPによって既報の通り、野生型マウスの運動能力は大きく障害されたが、p13ヘテロ欠損($p13^{+/-}$)マウスではMPTPによる運動障害が認められなかった。次に、MPTPを投与した野生型と$p13^{+/-}$マウスの黒質におけるドパミン神経細胞死を組織化学的手法により評価した結果、MPTPによるドパミン神経細胞数の減少は、$p13^{+/-}$マウスではほぼ完全に抑制された。さらに、マウス脳サンプルを用いた検討でも、p13はcomplexⅠと共免疫沈降され、$p13^{+/-}$マウスの中脳サンプルではMPTPによるcomplexⅠの活性低下やアセンブリー障害が抑制された。以上より、p13ノックダウンによるcomplexⅠの機能維持が、ドパミン神経細胞死やミトコンドリア障害のみならず、運動障害の抑制にもつながることを*in vivo*で実証された。

さらに、ルシフェラーゼシステムを用いたp13発現制御化合物のスクリーニング系を構築し、作用標的が既知である2,320個の化合物について検討を行った結果、p13のmRNA発現を促進あるいは抑制する化合物を計12種同定した。なお

p13の発現を抑制する化合物4種は全て、細胞内の酸化ストレスを増加させた。したがって、Ⅱ型糖尿病とPDの動物モデルで得た知見を併せ、p13は細胞内の酸化ストレス等によって発現抑制を受ける特性がある可能性が見出された。

以上の成果は、p13のノックダウンがPDを防ぐ新たな治療法になることを示すものであり、complexⅠの機能制御によってPDのドパミン神経細胞死ならびに運動障害を防ぎうる、既存薬とは異なる治療機構を提案するものと言える。今後、p13によるcomplexⅠのアセンブリー調節機構の解析や進行性のPDモデルを用いた検討を加えて行うことによって、ミトコンドリアならびにドパミン神経細胞の保護を目指した新たなPD治療法の開発に貢献できると考える。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　井上　直紀　）		
論文審査担当者	（職）	氏　名
主 査	教授	橋本　均
副 査	教授	藤尾　慈
副 査	教授	辻川　和丈

論文審査の結果の要旨

「パーキンソン病の創薬標的としての新規ミトコンドリア蛋白質p13の機能解析」と題する論文において学位申請者は、*in vitro*および*in vivo*の実験的なパーキンソン病（Parkinson's disease, PD）モデルを用いたp13の機能解析と、p13の発現制御化合物のスクリーニングを実施し、PDにおけるp13の創薬標的としての可能性を見出した。この研究は、新規ミトコンドリア蛋白質p13の機能解明や、PDの根本的治療法につながる脳ドパミン神経細胞の保護機構の解明に貢献すると考えられる。

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。

PDは60歳以上の1%が罹患する神経難病であり、超高齢社会を迎えた現代において、その病態解明と根本的治療法の確立が急務とされている。PDの分子病態は中脳ドパミン神経の進行性細胞死であるが、ドパミン補充療法などの既存の薬物療法は、同細胞死やその進行を抑制できない。一方で近年、ドパミン神経細胞死と関連し得るミトコンドリアの機能不全が注目されている。ミトコンドリア蛋白質p13は中脳で高発現しているが、PDとの関連は明らかでない。本学位論文において学位申請者は、以下のことを明らかにした。

1. ヒト由来のドパミン神経系細胞株SH-SY5Y細胞において、p13の過剰発現ならびにノックダウンを実施し、p13のノックダウンがPD病態下におけるミトコンドリアの機能不全やドパミン神経細胞死を抑制することを明らかにした。
2. p13欠損マウスを作製し、そのヘテロ欠損マウスが*in vivo* PDモデルにおける黒質ドパミン神経の脱落や運動障害を示さないことを明らかにし、p13の発現抑制による神経細胞の保護効果がマウスの組織・行動レベルでも認められることを示した。
3. p13がミトコンドリアの呼吸鎖複合体 I （complex I）と相互作用すること、p13の発現抑制がPD病態下におけるcomplex I 障害を抑制することを*in vitro*、*in vivo*で明らかにし、p13の作用点がcomplex I の活性制御にある可能性を示した。
4. ルシフェラーゼシステムを用いたp13発現制御化合物のスクリーニング系を構築して、作用標的が既知である2,320種の化合物の中から、*p13*のmRNA発現を促進あるいは抑制する化合物を12種同定するとともに、p13の発現制御の特性として酸化ストレスとの関連性を示唆した。

以上の結果は、p13の発現抑制がPDを防ぐ新たな治療標的になることを示すとともに、p13を介したcomplex I の活性制御がドパミン神経細胞死を防ぐという、PDに対する既存薬とは異なった治療戦略を提供するものと考えられる。また本研究の成果は、p13を含めた様々なミトコンドリア機能調節因子がPDの新しい創薬標的分子となることを支持し、PDの根本的治療法としてのドパミン神経の保護機構の解明に貢献すると考えられることから、博士（薬科学）の学位論文に値するものと認める。