



Title	Extracellular transportation of α -synuclein by HLA class II molecules
Author(s)	大藺, 達彦
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/92049
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

Synopsis of Thesis

氏 名 Name	大 藺 達 彦
論文題名 Title	Extracellular transportation of α -synuclein by HLA class II molecules (HLAクラスII分子によるアルファシヌクレインの細胞外輸送)
<p>論文内容の要旨</p> <p>〔目 的(Purpose)〕</p> <p>パーキンソン病 (Parkinson's Disease, PD) は、黒質におけるドーパミン作動性ニューロンの減少と、主にαシヌクレインの凝集体からなるレビー小体の出現を特徴とする神経変性疾患である。αシヌクレインをコードする遺伝子 <i>SNCA</i> のミスセンス変異や重複が家族性PDを引き起こすことが知られており、病的なαシヌクレインの細胞間伝播が病状進行に重要な役割を果たすことが示唆されているが、細胞間伝播の機序に関しては不明な点も多い。</p> <p>ゲノムワイド関連解析では抗原提示に関わるヒト白血球抗原(Human Leukocyte Antigen, HLA)クラスII遺伝子がPDと関連すると報告されている。HLAクラスII遺伝子の1つであるHLA-DRB5*01:01はPDの危険因子であると指摘されたが、議論の余地も多い。HLA-DRB1*01:01を感受性アリル、HLA-DRB1*04:01やHLA-DRB3*02:02を保護的アリルとする論文もわずかながらみられる。しかしながら、HLAクラスII分子とパーキンソン病の関連メカニズムは依然として不明である。HLAクラスII分子の古典的な機能は、CD4陽性T細胞へのペプチド抗原の提示である。この従来の機能に加えて、HLAクラスII分子が細胞内のミスフォールドしたタンパク質をペプチド断片化することなく細胞表面に輸送することが近年発見された。これらの知見に基づき、本研究ではPDリスクアリルを有するHLAクラスII分子は異常なαシヌクレインの細胞外輸送に関与すると仮説を立て、検証を行った。</p> <p>〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕</p> <p>まずHLAクラスII分子がαシヌクレインと直接結合し、細胞表面にαシヌクレインを輸送するかについて検討した。HEK293T細胞にHLA-DRB5*01:01アリルを有するHLAクラスII、αシヌクレインの遺伝子導入を行い、フローサイトメトリー法や免疫共沈降法を用いて全長のαシヌクレインタンパクがHLAクラスII分子と直接結合し、細胞表面へ輸送されることを確認した。次に複数の抗αシヌクレイン抗体を用い、HLAクラスII分子と結合するαシヌクレインの構造を解析したところ、HLA-DRB5*01:01アリルを有するHLAクラスII分子が構造的に異常なαシヌクレインと結合し細胞表面へ輸送することを認めた。次にHLA-DRB1*01:01、HLA-DRB1*04:01、HLA-DRB3*02:02アリルを加えた4つのアリル間でαシヌクレインの細胞表面輸送の効率を比較したところ、HLA-DRB5*01:01によって構造的に異常なαシヌクレインは効率的に細胞表面に移行することが判明した。</p> <p>HLAクラスII分子は細胞外小胞(Extracellular vesicle, EV)で検出されるため、αシヌクレイン/HLAクラスII複合体はEVに存在すると仮定し、EV画分中のαシヌクレイン/HLAクラスII複合体を分析した。αシヌクレイン安定発現HEK293T細胞にHLAクラスII分子を遺伝子導入し、超遠心法により上清からEV画分を分離した。αシヌクレイン/HLAクラスII複合体を検出するためにimmunoprecipitation followed by flow cytometry (IP-FCM)法を用いた。HLA-DRB5*01:01アリルは、EV画分中のαシヌクレイン/HLAクラスII複合体の量を顕著に増加させた。</p> <p>次に、内因性のαシヌクレインとHLAクラスIIが複合体を形成し、EV画分に含まれるか検討した。疫学的メタアナリシスにより、PDとメラノーマの関連が示唆されており、メラノーマはαシヌクレインとHLAクラスII分子を恒常的に発現していることが知られている。このためHLA-DRB5*01:01を有するヒトメラノーマ細胞株であるA2058細胞と、そのHLAクラスII発現調整遺伝子のノックアウト細胞を樹立し解析を行った。近接ライゲーション法を用いて細胞内でαシヌクレインとHLAクラスIIは複合体を形成することを確認した。さらに、A2058細胞のEV画分中において、異常構造αシヌクレイン/HLAクラスII複合体が検出された。</p> <p>〔総 括(Conclusion)〕</p> <p>本研究においてHLAクラスII分子による細胞表面・細胞外へのαシヌクレイン輸送という新しい機能を示した。さらに、αシヌクレインとの結合能はHLAクラスIIのアリルによって異なり、HLA-DRB5*01:01を有するHLAクラスII分子は異常なαシヌクレインと結合し細胞外に輸送していることがわかった。PDの感受性アリルと一致している点や内因性の発現量でも検出可能な点からは、細胞外小胞に含まれるαシヌクレイン/HLAクラスII複合体がαシヌクレインの細胞間伝播に関与する可能性を示唆した。</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 大 藁 達彦	
論文審査担当者	(職) 氏 名
	主 査 大阪大学教授 望 月 秀 樹
	副 査 大阪大学教授 島 田 昌 一
	副 査 大阪大学教授 山 下 俊 英
論文審査の結果の要旨	
<p>パーキンソン病 (Parkinson's Disease, PD) において、異常 α-シヌクレインの細胞間伝播は病状進行にきわめて重要な役割を果たすと考えられているが、その機序に関しては不明である。ゲノムワイド関連解析により、ヒト白血球抗原 (Human Leukocyte Antigen, HLA) クラスII遺伝子がPDに関連する遺伝子であることが明らかにされているが、HLAクラスII分子とPDの関連機序は明らかでない。本論文ではHLAクラスIIが細胞内に存在する α-シヌクレインの細胞外輸送に関与する新たな機能を明らかにした。HLAクラスII分子と α-シヌクレインは複合体を形成し、HLAクラスIIのアリル間で細胞表面への輸送効率は変化した。PDリスクアリルとされるHLA-DRB5*01:01は、異常構造の α-シヌクレインを細胞表面や細胞外小胞に大幅に移動させた。異常 α-シヌクレイン/HLAクラスII複合体は、内因性の α-シヌクレインとHLA-DRB5*01:01を発現するA2058細胞株でも検出された。本論文はHLAクラスII分子の従来とは異なる機能を示し、HLAクラスII分子とPDとの関連に光を当てるものであり、学位に値するものと認める。</p>	