

学 位 論 文 題 名

Study on the Mechanisms of Polyglutamine-induced Neuronal Death

(伸長ポリグルタミン鎖により誘導される神経細胞死機構に関する研究)

学位論文内容の要旨

ヒトゲノム中には多くのトリプレットリピート領域がある。これらが翻訳領域内に存在する場合、単一アミノ酸鎖を含むタンパク質を生成する。特に 10 リピート以上のグルタミン鎖 (polyglutamine: polyQ) を含むヒトタンパク質は 46 種類にものぼり、他のアミノ酸と比較して最もリピート領域が多い。一方、1990 年代から 9 種の遺伝性神経変性疾患の原因が、遺伝子中の polyQ をコードする領域の伸長であることが明らかとなった。これらの疾患はポリグルタミン病と総称され、現在では伸長ポリグルタミン鎖自身の毒性が発症に深く関与していると考えられている。しかし、その神経変性機構は未だ解明されていない。本研究は伸長 polyQ により誘導される神経細胞死機構を明らかにすることを目的とし、発生過程におけるプログラム神経細胞死機構との比較によって、培養神経細胞を用いて細胞死経路の同定を行い、新しいカスケードの存在を示した。

発生過程において、哺乳動物の神経細胞はその約半数がアポトーシス機構により脱落する。アポトーシスによる細胞死は細胞自身にプログラムされているが、細胞死プログラムの発動は発生過程の一時期のみに限定され、成体では起こらない。しかし、病的な状況ではアポトーシス経路の正常な制御が行われず、プログラムが発動する可能性がある。第一章では、正常発生に伴う神経細胞死機構との比較により、ポリグルタミンにより誘導される細胞死機構と内在的なアポトーシス機構との相互作用を検討した。この目的のため、化学合成した種々の長さの polyQ ペプチドをラット上頸神経節細胞内に直接導入する方法を開発した。上頸神経節細胞は神経栄養因子欠乏による細胞死カスケードが詳細に研究されているため、本研究に適した材料である。このモデルにおいて、22 残基 (Q22) 以上の polyQ ペプチドは神経細胞死を誘導したが、10 残基 (Q10) のペプチドは全く毒性を示さなかった。Q22 の導入による細胞死経路を解析した結果、アポトーシスに特有の遺伝子発現と、アポトーシスに重要な c-Jun の活性化が確認されたが、cytochrome c の放出、caspase-3/7 の活性化及び核の断片化は全く観察されなかったため、誘導されたアポトーシス経路が頓挫することが示唆された。この結果は caspase 阻害剤により細胞死が抑制されなかったことと一致した。さらに、神経栄養因子作用により誘導される生存シグナルが抑制された。一方、細胞内 Ca^{2+} レベルの上昇、細胞内 ATP レベルの減少、ミトコンドリアの膜電位消失が観察されたことから、polyQ ペプチドはアポトーシスシグナルを惹起するものの、最終的に非アポトーシス様の機構により細胞死を起こすと結論された。

続いて、第一章で見出した細胞内 Ca^{2+} ホメオスタシスの異常を起こす分子機構の解明を行った。この目的のため、ペプチド導入モデルに加え、ハンチントン病の原因遺伝子である変異型 huntingtin (htt) 遺伝子を、培養下の線条体及び大脳皮質神経細胞に強制発現させる系を用いた。 Ca^{2+} ホメオスタシスに関与し、変異型 htt 遺伝子導入による細胞死を抑制する薬剤を探索した結果、リアノジン受容体 (RyR) の阻害剤が神経細胞死を遅延させることを見出した。次に RyR から放出される Ca^{2+} 量の増加を想定し、HEK293t 細胞に htt と RyR1 を共発現させ、カルシウムイメージング法を用いてカフェインによる RyR1 からの

Ca^{2+} の放出量を測定した。予想に反し、変異型 *htt* を発現する細胞では放出量が減少し、最終的には全く応答が見られなくなった。そこで、イノシトール 1,4,5 リン酸受容体の阻害剤の存在下で、小胞体 Ca^{2+} ポンプの阻害剤を投与することにより、基底状態における RyR1 からの Ca^{2+} 放出量を測定した。野生型 *htt* と RyR1 を共発現する細胞では細胞質 Ca^{2+} レベルの変化は全く起こらなかったが、変異型 *htt* と RyR1 を共発現する細胞は Ca^{2+} レベルの上昇を示したことから、変異型 *htt* により RyR1 を介した小胞体 Ca^{2+} の漏出が誘導されることが明らかとなった。さらに、RyR1 の共発現は変異型 *htt* による細胞死を増加させ、増加した細胞死は RyR の阻害剤により抑制された。これらを支持する結果は、大脳皮質神経細胞を用いたペプチド導入モデル、及びハンチントン病モデルマウス由来の線条体、大脳皮質神経細胞においても得られた。以上の結果は、RyR を介した細胞内ストアからの異常な Ca^{2+} の漏出が、変異型 *htt* 遺伝子発現による神経細胞死の要因であることを示唆した。

最後に、第三章では RyR からの Ca^{2+} 漏出の原因となる分子機構について検討した。RyR1 の静止状態を安定化する機能が知られている FK506 binding protein 12 (FKBP12) に着目し、変異型 *htt* の発現が内在性 FKBP12 に影響を及ぼすか、また FKBP12 の強制発現が RyR からの Ca^{2+} 漏出と細胞死を抑制するか検討した。野生型 *htt* を発現する HEK293t 細胞において、内在性 FKBP12 は細胞質に広く分布した。一方、変異型 *htt* を発現する細胞では、変異型 *htt* により形成された凝集体と FKBP12 が共局在した。またそれ以外の領域においても、FKBP12 はドット状、又はチューブ状の異常な局在を示した。よって、変異型 *htt* の発現により FKBP12 の局在が変化し、その結果 FKBP12 の RyR1 からの解離による RyR1 からの Ca^{2+} の漏出が誘導される可能性が示唆された。さらに FKBP12 の強制発現は、変異型 *htt* により誘導される Ca^{2+} 漏出と細胞死を抑制した。FKBP12 の細胞死抑制効果は、線条体及び大脳皮質神経細胞においても確認された。以上から、FKBP12 は変異型 *htt* 遺伝子発現による神経細胞死の抑制において、重要な役割を果たすことが示唆された。

本研究から、polyQ により誘導される RyR からの Ca^{2+} の異常な漏出が、非アポトーシス経路による細胞死の主な要因となることが明らかとなった。さらに、この過程において同時に誘導されるアポトーシス経路は、細胞死の実行には関与しないことが示された。これらの結果は、同一の原因から複数の細胞死経路が誘導される場合があるが、その寄与は全く異なる可能性があることを示した。また、RyR からの Ca^{2+} の漏出により誘導される Ca^{2+} ホメオスタシスの破綻は、細胞内の Ca^{2+} シグナリング全体に影響する可能性があり、特に *in vivo* においては神経情報伝達に重大な影響を与える可能性がある。したがって、神経細胞における Ca^{2+} ホメオスタシスの正常な制御は、神経細胞の生存と機能維持に極めて重要であるといえる。また、病的な状態における神経細胞死機構を解明することは、正常な状態の維持のために何が重要であるかを見出すという観点からも意義があると考えられる。例えば、第三章で示された FKBP12 の細胞保護的な役割は、本研究により初めて示された。さらに、ハンチントン病に効果的な治療法は未だ見出されていない。細胞死経路の詳細な分子機構の解明を目指す基礎的な研究は、治療法の開発のためにも重要な位置を占めると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 池 達 郎

副 査 教 授 浦 野 明 央

副 査 教 授 鈴 木 範 男

副 査 教 授 幸 田 敏 明

学 位 論 文 題 名

Study on the Mechanisms of Polyglutamine-induced Neuronal Death

(伸長ポリグルタミン鎖により誘導される神経細胞死機構に関する研究)

神経系の発達は、非常に高度に制御された「死と生」、「変性と維持」のバランスにより成し遂げられる。これらのバランスが「死」や「変性」側に傾くことは、様々な神経変性疾患の原因となると考えられる。本論文はこのような観点より、ポリグルタミン病という神経変性疾患のモデル系を用いて、「生存」と「変性」のそれぞれの分子メカニズムを探り、神経細胞死の機構の解明を試みている。ポリグルタミン病は、ヒトゲノム中に存在するトリプレット (CAG) リピート領域が異常に伸長し、グルタミン鎖 (polyglutamine: polyQ) に翻訳され、polyQを含むヒトタンパク質が生成することに起因する神経疾患である。

第一章では、発生過程におけるプログラム神経細胞死機構との比較によって、伸長 polyQ により誘導される神経細胞死機構を明らかにすることを目的とし、主に培養神経細胞を用いて細胞死経路の同定を行い、新しいカスケードの存在を示した。この目的のため、化学合成した種々の長さの polyQ ペプチドをラット上頸神経節細胞内に直接導入する方法を開発した。上頸神経節細胞は神経栄養因子欠乏による細胞死カスケードが詳細に研究されているため、本研究に適した材料である。このモデルにおいて、22 残基 (Q22) 以上の polyQ ペプチドは神経細胞死を誘導したが、10 残基 (Q10) のペプチドは全く毒性を示さなかった。Q22 の導入による細胞死経路を解析した結果、アポトーシスは誘導されるものの頓挫することが示唆された。さらに、神経栄養因子作用により誘導される生存シグナルが抑制された。一方で細胞内 Ca^{2+} レベルの上昇、細胞内 ATP レベルの減少、ミトコンドリアの膜電位消失が観察されたことから、非アポトーシス様の機構により細胞死を起こすと結論された。

第二章では、 Ca^{2+} ホメオスタシスの異常を起こす分子機構の特定を行った。この目的のため、ペプチド導入モデルに加え、ハンチントン病の原因遺伝子である変異型 huntingtin 遺伝子を、培養下の線条体及び大脳皮質神経細胞に強制発現させる系を用いた。 Ca^{2+} ホメ

オスタシスに関与し、変異型 huntingtin 遺伝子導入による細胞死を抑制する薬剤を探索した結果、リアノジン受容体 (RyR) の阻害剤が神経細胞死を遅延させることを見出した。さらに野生型 huntingtin と RyR1 を共発現する細胞では細胞質 Ca^{2+} レベルの変化は全く起こらなかったが、変異型 huntingtin と RyR1 を共発現する細胞は Ca^{2+} レベルの上昇を示したことから、変異型 huntingtin により RyR1 を介した小胞体 Ca^{2+} の漏出が誘導されることが明らかとなった。さらに、RyR1 の共発現により変異型 huntingtin による細胞死が増加し、増加した細胞死は RyR の阻害剤により抑制された。これらを支持する結果は、大脳皮質神経細胞を用いたペプチド導入モデル、及びハンチントン病モデルマウス (R6/2 マウス) 由来の線条体、大脳皮質神経細胞においても得られた。以上の結果は、RyR を介した細胞内ストアからの異常な Ca^{2+} の漏出が、変異型 huntingtin 遺伝子発現による神経細胞死の要因であることを示唆した。

第三章では RyR からの Ca^{2+} 漏出の原因となる分子機構について検討した。RyR1 の静止状態を安定化する機能が知られているイムノフィリンである FK506 binding protein 12 (FKBP12) に着目し、変異型 huntingtin の発現が内在性 FKBP12 に影響を及ぼすか、また FKBP12 の強制発現が RyR からの Ca^{2+} 漏出と細胞死を抑制するか検討した。その結果、FKBP12 は変異型 huntingtin 遺伝子発現による神経細胞死の抑制において、重要な役割を果たすことが示唆された。

本論文により示された結果は、以下の3点において特に有意義であると考えられる。

(1) ペプチド導入法という新しいアプローチによってポリグルタミンにより誘導される「生存」と「変性」シグナルの動態を明らかにしたことである。この過程で、アポトーシス経路は誘導されるが、途中で頓挫し、最終的に非アポトーシス経路により細胞死が起こることが明らかになった。(2) Ca^{2+} ホメオスタシスの破綻の主要な原因に関し、ポリグルタミンにより誘導される RyR からの Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release (CICR) が異常に活性化するためであることを世界で初めて明らかにしたことである。異常な CICR は細胞内の Ca^{2+} シグナリング全体に影響すると考えられ、細胞死のみならず、神経情報伝達に重大な影響を与えると考えられる。したがって、神経細胞における Ca^{2+} ホメオスタシスの正常な制御は、神経細胞の生存のみならず、機能維持にも極めて重要であるといえる。(3) イムノフィリン FKBP12 によるポリグルタミン毒性に対する細胞保護的な役割を初めて見出したこと。細胞死経路の詳細な分子機構の解明を目指すこの基礎的な研究は、ハンチントン病をはじめとするポリグルタミン病の治療法につながる非常に重要なものである。審査員一同は本論文が神経生物学及び神経病理学領域の発展に重要な寄与をなすものと考えた。よって著者は、北海道大学博士(理学)の学位を授与される資格があるものと認める。