

# 論文概要

○論文題目 TFEBによるオートファジー-リソソーム経路の促進がアミロイド  
β蛋白の生成過程に与える影響に関する研究

○指導教員 人間総合科学研究科 疾患制御医学専攻 玉岡 晃 教授

(所属) 筑波大学大学院 人間総合科学研究科 疾患制御医学専攻

(氏名) 山本 詞子

**目的：**アルツハイマー病 (Alzheimer's disease; AD) は高齢者の認知症で最も多い神経変性疾患である。AD の病態においては、アミロイド $\beta$ 蛋白 ( $A\beta$ ) の蓄積が中核的な役割をもつと考えられている。 $A\beta$ はアミロイド前駆体蛋白 (amyloid precursor protein; APP) がまず $\beta$ -セクレターゼ (BACE1) によって切断され、その結果生成された $\beta$ -C 末端断片 (C-terminal fragment; CTF) が $\gamma$ -セクレターゼ複合体によって切断され生成される。 $A\beta$ 蓄積の機序は十分に解明されていないが、 $A\beta$ の生成とクリアランスのバランスが崩れることによって $A\beta$ が蓄積し、細胞外  $A\beta$ 斑の形成やシナプス障害、タウの異常を引き起こすと考えられている。更に、 $A\beta$ のみならず、 $\beta$ -CTF そのものにも毒性があるという説もあり、AD 病態への関与が示唆されている。オートファジーは細胞内の不要物を代謝し、正常な細胞機能を保つ重要な機能を担っている。近年、AD 患者脳や AD モデルマウス脳においてオートファゴソームやリソソームの障害された病理像を認めることが報告され、その他の報告からもオートファジー-リソソーム経路 (autophagy-lysosomal pathway; ALP) の障害が AD の病態に関与していることが示唆されている。ALP の主要な制御因子として Transcription factor EB (TFEB) があり、その活性化により ALP は促進される。AD 患者脳における TFEB の変化については増減いずれの報告もあり、議論中である。また TFEB が APP や  $A\beta$ に与える影響については不明な点が多く、TFEB が AD の病態に有益な影響を与えるか否かは分かっていない。本研究では、TFEB による ALP の促進が  $A\beta$ の産生過程に与える影響やその機序について、初代培養神経細胞のモデル系を用いて検討した。

**対象と方法：**長期培養したラット初代培養大脳皮質神経細胞を用いた。培養 15 日目に TFEB の組換えアデノウイルスまたは empty アデノウイルスを発現させ、3 日後に APP, APP セクレターゼ、リソソーム関連蛋白などをウェスタンブロットによって解析した。事前に導入を行っていない細胞 (basal condition) に TFEB のみ発現させた神経細胞に加えて、TFEB 導入の 1 日前 (培養 14 日目) に野生型 APP もしくは $\beta$ -CTF が発現する組換えアデノウイルスを導入した神経細胞も用いて検討を行った。CTFs の解析は免疫沈降-ウェスタンブロットによって行った。培養上清中の  $A\beta$ 40,  $A\beta$ 42 分泌量はサンドイッチ ELISA 法で測定した。さらに、ADAM10 の mRNA レベルは半定量的 RT-PCR で解析した。

**結果：**TFEB 発現細胞では対象と比べて、リソソーム関連蛋白である LAMP-1 やカテプシン D の蛋白レベルが有意に増加していた。Basal condition の神経細胞において、

TFEB は APP, BACE1,  $\gamma$ -セクレターゼ複合体 (プレセニリン 1, 2, ニカストリン, APH-1, PEN-2) にはほとんど影響しなかったが, ADAM10 レベルを有意に増加させた. APP 発現神経細胞,  $\beta$ -CTF 発現神経細胞においても同様の結果であった. APP 発現細胞では, TFEB によって $\alpha$ -CTF は対照と比較して 60%程度増加しており,  $\beta$ -CTF も軽度に増加していた.  $\beta$ -CTF 発現細胞では, TFEB は $\beta$ -CTF を対照の約 2 倍に増加させた. A $\beta$ 40 の分泌量は, basal condition では TFEB 発現によって, 軽度 (22%) 低下していたが, APP もしくは $\beta$ -CTF 発現細胞では, TFEB の発現によって対照よりも増加していた. また,  $\beta$ -CTF 発現細胞においては $\beta$ -CTF の蛋白レベルはプロテアソーム阻害時には著明に増加したが, リソソーム阻害時にはほとんど増加しなかった. ADAM10 の mRNA レベルは TFEB 発現によって変化しなかった.

**考察:** 本研究では, 初代培養神経細胞を長期間培養し, 十分に成熟した神経細胞での検討が可能であった. また, TFEB は ALP のカスケードのうち比較的下流に作用するため, ALP と AD の病態の関連性を検討することについて適した実験系であると考えられた. この実験系において, TFEB は ADAM10 の蛋白レベルを増加させた. その機序として, ADAM10 mRNA レベルは TFEB によって変化がなかったことから, 転写後レベルでの制御によるものと考えられた. TFEB は $\beta$ -CTF のレベルも増加させ, その効果にはプロテアソーム系における $\beta$ -CTF の異化の変動が関与していることが示唆された. これらの結果から, TFEB は, ADAM10 増加を介して $\alpha$ -CTF を増やす効果と, プロテアソーム系を変化させることによって $\beta$ -CTF を増加させる効果を持ち, A $\beta$ 生成に影響を与えることが示唆された. TFEB による ALP 促進は神経細胞の A $\beta$ 生成に対して, 増減両方向の影響を及ぼすようである. そのため, TFEB が A $\beta$ 生成に与える影響は APP や $\beta$ -CTF の発現の程度によって異なると考えられた. 本研究は, AD の病態に果たす TFEB と ALP の役割について新たな知見を示し, 治療法開発の上で重要な示唆を与えると考えられた.

**結論:** 長期培養神経細胞において, TFEB による ALP の促進は, A $\beta$ 産生過程に対して, APP の $\alpha$ 切断の増加と,  $\beta$ -CTF の代謝経路修飾によると思われる $\beta$ -CTF の増加という二重の効果を持ち, A $\beta$ 産生に対しては APP,  $\beta$ -CTF の発現量に応じて, 異なる影響を及ぼすことが示唆された.