

氏名	山本 詞子		
学位の種類	博士 (医学)		
学位記番号	博甲第 9200 号		
学位授与年月	平成 31年 3月 25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	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		
主査	筑波大学教授	博士 (医学)	新井 哲明
副査	筑波大学教授	博士 (医学)	島野 仁
副査	筑波大学准教授	博士 (医学)	増田 知之
副査	筑波大学助教	博士 (理学)	水野 智亮

論文の内容の要旨

山本詞子氏の博士学位論文は、オートファジー-リソソーム経路 (autophagy-lysosomal pathway; ALP) の主要な制御因子である Transcription factor EB (TFEB) による ALP の促進が、アミロイドβ蛋白 (Aβ) の産生過程に与える影響およびその機序を検討したものである。その要旨は以下のとおりである。

(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、Aβの蓄積が中核的な役割をもつと考えられている。Aβはアミロイド前駆体蛋白 (amyloid precursor protein; APP) がまずβ-セクレターゼ (BACE1) によって切断され、その結果生成されたβ-C 末端断片 (C-terminal fragment; CTF) がγ-セクレターゼ複合体によって切断され生成される。Aβ蓄積の機序は十分に解明されていないが、Aβ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 Aβが蓄積し、老人斑の形成、シナプス障害、タウの異常等を引き起こすと考えられている。さらに、Aβのみならず、β-CTF そのものにも毒性があるという報告もあり、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に関連した病理像を認めることが報告され、ALP の障害が AD の病態に関与していることが示唆され、注目されている。ALP の主要な制御因子である TFEB は、その活性化により ALP を促進する作用を有する。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、一致した見解が得られていない。また TFEB が APP や Aβ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明らかではない。著者は、TFEB による ALP の促進が Aβの産生過程に与える影響やその機序を明らかにすることを目的に、初代培養神経細胞のモデル系を用いた検討を行っている。

(方法) 著者は、長期培養したラット初代培養大脳皮質神経細胞を用いている。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ている。さらに著者は、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、TFEB 導入の 1 日前 (培養 14 日目) に野生型 APP もしくは β -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ている。著者は、CTFs の解析は免疫沈降-ウエスタンブロットによって行い、培養上清中の $A\beta_{40}$, $A\beta_{42}$ 分泌量はサンドイッチ ELISA 法で測定している。さらに、ADAM10 の mRNA レベルは半定量的 RT-PCR で解析している。

(結果) 著者は、TFEB 発現細胞で対象と比べて、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ることを明らかにしている。続いて著者は、Basal condition の神経細胞において、TFEB が APP, BACE1, γ -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) にはほとんど影響を与えないが、ADAM10 のレベルを有意に増加させることを明らかにしている。また、APP 発現神経細胞、 β -CTF 発現神経細胞においても同様の結果であったとしている。さらに著者は、APP 発現細胞では TFEB によって α -CTF は対照と比較して 60%程度増加していること、 β -CTF も軽度に増加していること、 β -CTF 発現細胞では β -CTF を対照の約 2 倍に増加していること、 $A\beta_{40}$ の分泌量が basal condition では TFEB 発現によって軽度 (22%) 低下するが、APP もしくは β -CTF 発現細胞では TFEB の発現によって対照よりも増加することを明らかにしている。また、 β -CTF 発現細胞において β -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するが、リソソーム阻害時にはほとんど増加しないこと、ADAM10 の mRNA レベルは TFEB 発現によって変化しないことも明らかにしている。

(考察) 本研究は、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点、及び TFEB は ALP のカスケードの中で下流に作用するために 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った点が利点であると思われる。この実験系において、TFEB が ADAM10 の蛋白レベルを増加させた機序として、著者は ADAM10 mRNA レベルが TFEB によって変化していないことから、転写後レベルでの制御によるものと考察している。また、TFEB は β -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 β -CTF の異化の変動が関与していることが示唆されることから、著者は、TFEB が ADAM10 の増加を介して α -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 β -CTF を増加させる効果を持つことで、 $A\beta$ 生成に影響を与える可能性を明らかにしたといえる。すなわち、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効果をも有し、TFEB が $A\beta$ 生成に与える影響は APP や β -CTF の発現の程度によって異なることが示唆される。以上から、著者は、本研究によって 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呈示している。

審査の結果の要旨

(批評)

著者は、アルツハイマー病 (Alzheimer's disease; AD) の病態に関する主要な仮説であるアミロイド仮説に則り、特にアミロイド β 蛋白 ($A\beta$) の産生過程に与えるオートファジー-リソソーム経路 (autophagy-lysosomal pathway; ALP) の影響およびその機序について、細胞生物学、生化学、免疫組織化学、分子生物学などの手法を用いた検討を行った。その結果、長期培養神経細胞において、Transcription factor EB による ALP の促進は、 $A\beta$ 産生過程に対して、アミロイド前駆体蛋白 (amyloid precursor protein; APP) の α 切断の増加と、 β -C 末端断片 (C-terminal fragment; CTF) の代謝経路修飾によると思われる β -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 あるいは β -CTF の発現量に応じて異なる影響を及ぼすことを明らかにした。以上の知見は、AD の病態解明および今後の治療法開発に対して重要な示唆を与えるものである。

平成 30 年 12 月 26 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った、その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。