

氏名	寺田 真		
学位の種類	博士（医学）		
学位記番号	博甲第 8711号		
学位授与年月	平成 30年 3月 23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	α-Synuclein の truncation がプリオン様伝播に及ぼす影響についての研究		
主査	筑波大学教授	博士（医学）	新井 哲明
副査	筑波大学准教授	博士（医学）	矢作 直也
副査	筑波大学講師	博士（理学）	梶 和子
副査	筑波大学助教	博士（医学）	宮寺 浩子

論文の内容の要旨

寺田真氏の学位論文は、α-synuclein(αS)の truncation が患者脳の病理像形成および異常 αS のプリオン様伝播に及ぼす影響を検討したものである。その要旨は以下のとおりである。

αS は 140 アミノ酸からなる可溶性蛋白であるが、パーキンソン病や多系統萎縮症等の神経変性疾患患者脳においてアミロイド様線維構造をとって凝集蓄積する。これらの凝集蓄積物の密度や分布が、神経変性の程度や臨床症状と相関することから、異常 αS の凝集蓄積が神経変性を誘導する本質的変化と考えられ、これらの疾患を α-synucleinopathy と総称する。近年の知見の集積により、αS、tau、TDP-43 等の異常凝集蛋白が構造変換の連鎖を介して伝播する「プリオン様伝播」が、多くの神経変性疾患の病理過程に関与していることが明らかになりつつある。プリオン病では、病理変化や潜伏期間などの性質が異なる株（ストレイン）が存在し、その違いは凝集プリオンの構造の違いによるという仮説が提唱されている。そのアナロジーから、α-synucleinopathy における臨床症状や病理像の違いも異常 αS のストレインの違いによる可能性が指摘されているが、同じ一次構造の野生型 αS から構造の異なる αS 凝集体が生じる機序は明らかにされていない。患者脳の解析から、αS の truncation が αS の凝集を促進する可能性が示唆されているが、truncation の違いが αS のプリオン様伝播に及ぼす影響についての知見は乏しい。以上から、著者は本研究において、プリオン様伝播の初期変化として αS の truncation を仮定し、truncation の違いが αS 線維の構造変化およびプリオン様伝播を介する病理像形成に及ぼす影響について系統的に比較検討している。

著者は、まず αS の truncation が全長 αS に対するシーディング活性に及ぼす影響を明らかにすることを目的に、全長野生型ヒト αS の最 C 末端あるいは最 N 末端から 10 残基ずつ段階的に欠損させた 6 種類のリコンビナント蛋白を作製した。そして、各々を振盪により線維化してシードとし、N 末端に FLAG タグを付加した全長ヒト αS を過剰発現させたヒト神経芽細胞腫由来細胞株（SH-SY5Y 細胞）に 150 nM の各シード αS を 2 日間作用させ、細胞内の不溶性 αS 凝集体形成を蛍光免疫染色および免疫

プロットにより検討した。その結果、野生型と比べてC末端20残基の欠損はシーディング活性を低下させ、逆にN末端10残基あるいは30残基の欠損はシーディング活性を上昇させることを明らかにしている。

次いで著者は、 α Sのtruncationとそれによるシーディング活性の違いが、 α Sのプリオン様伝播およびその結果生じる病理像に及ぼす影響をin vivoで検討するため、野生型マウス(C57BL/6J)の右線条体に10 μ gの各シード α Sを接種し、3ヶ月後に脳内の α S病理形成を免疫組織化学および免疫プロットで解析した。その結果、細胞モデルでの検討でシーディング活性が低かったC末端領域の欠損はリン酸化 α S病理形成を著しく減少させたのに対し、シーディング活性が高かったN末端10残基あるいは30残基の欠損はリン酸化 α S病理の高度形成を誘導することを明らかにしている。

著者はさらに、このような α Sのtruncationがシーディング活性や病理像形成に影響を及ぼす要因として、truncationがもたらす α S線維の構造変化の違いを想定し、in vitroでの検討を行っている。すなわち、150 μ Mの可溶性の全長ヒト α Sに1 mol%の各シード α Sを添加して線維化し、得られた全長 α S線維の構造特性を、透過型電子顕微鏡観察、チオフラビンT (ThT) 結合アッセイ、プロテイナーゼK (PK) 消化により解析した。さらに、これらの全長 α S線維の細胞毒性およびタウ蛋白に対するクロスシーディング活性を培養細胞モデルで検討した。その結果、各欠損 α S線維のシーディングによって誘導された全長 α S凝集体のThT結合特性やPK耐性バンドパターンは添加したシード毎に異なり、それぞれのシードのThT結合特性やPK耐性バンドパターンと類似した傾向を示すことを明らかにした。また、C末端残基の欠損は、ThT結合特性やPK耐性バンドパターンを著しく変化させ、野生型とは異なる細胞毒性とタウとのクロスシーディング活性を示すことも明らかにしている。

以上の結果から、著者は、 α Sのtruncationが α S線維の構造変化をもたらし、これらの構造多型が全長 α Sに受け継がれることを示すことに成功している。すなわち、truncationにより様々な構造を獲得した α S線維が、培養細胞内や野生型マウス脳内でそれぞれ異なるシーディング活性を示し、 α S病理の重症度に違いを生じたことから、truncationの違いが α Sの凝集伝播においてストレインの多様性をもたらし、ひいては α -synucleinopathy患者脳の病理像の多様性の原因となっている可能性を新たに提示しており、 α -synucleinopathyの病態解明に大きく寄与する結果であると言える。

審査の結果の要旨

(批評)

著者は、 α Sのtruncationが α S線維の構造変化およびプリオン様伝播に及ぼす影響について、細胞生物学、生化学、免疫組織化学、分子生物学等の手法を用いた詳細な検討を行い、次のことを明らかにした。すなわち、 α Sのtruncationの違いが α S線維に異なった構造変化をもたらし、これらの構造多型が伝播の際のストレインの多様性につながり、最終的に α -synucleinopathy患者脳の病理像の多様性の原因となるというものである。神経変性疾患においてこのように原因蛋白のtruncationをprimaryとする知見にはオリジナリティーがあり、 α -synucleinopathy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。ただし、このことを証明するための手段の一つとして、実際の患者脳に疾患特異的な α S断片が存在するかどうかを検証する必要がある、今後の課題と言える。

平成29年12月21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。