

氏名・(本籍)	やす たか ゆう き (福岡県) 安 高 勇 気 (福岡県)		
学位の種類	博士 (薬学)		
報告番号	甲第1560号		
学位授与の日付	平成27年3月24日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 (課程博士)		
学位論文題目	脳神経血管機構におけるプリオン蛋白質の役割		
論文審査委員	(主 査) 福岡大学	教授	二 神 幸次郎
	(副 査) 福岡大学	教授	片 岡 泰 文
	福岡大学	教授	岩 崎 克 典

内 容 の 要 旨

【諸言】

プリオン蛋白質には、病原性のない正常型プリオン蛋白質PrP^C (Cellular prion protein) と病原性のある異常型プリオン蛋白質PrP^{Sc} (Scrape prion protein) の2種類が存在し、PrP^{Sc}はPrP^Cの高次構造変化によって形成される。PrP^{Sc}は牛で認められる狂牛病やヒトにおけるクロイツフェルト・ヤコブ病などのプリオン病の原因物質の一つであることが報告されており、その細胞毒性や高次構造変化機序については精力的に研究が進められ、その病態生理機能は明らかにされつつある。一方、PrP^Cの生理機能については不明な点が多い。PrP^Cはあらゆる臓器に発現しており、特に神経細胞に多く発現が認められている。神経細胞では銅の細胞内取り込みや細胞接着などに関与することが報告されている。また、本研究に先立ち、当研究室ではPrP^Cが脳血管内皮細胞に発現し、その細胞の遊走能維持に関与することを明らかにした。これらのことから、PrP^Cは神経細胞、脳血管内皮細胞において生理作用を示し、その発現変化はこれら細胞の機能に大きく影響することが示唆された。神経細胞と脳血管内皮細胞は中枢神経系維持に重要である脳神経血管機構の構成細胞であり、これらの細胞におけるPrP^Cの発現を調節する因子ならびにPrP^C発現が変化した場合の細胞機能変化を捉えることは、中枢神経系疾患発症機序やその薬物治療機序の解明に繋がると考えられる。

そこで、本研究では神経細胞と脳血管内皮細胞におけるPrP^Cの生理機能解明とその発現調節因子同定を目的とした。第一章では神経細胞におけるatorvastatinによる神経突起伸長とPrP^C発現について検討を行った。第二章では脳血管内皮細胞における腫瘍壊死因子 α (Tumor Necrosis Factor α ; TNF α) のA β 輸送能とPrP^C発現に対する作用について検討を行った。

第1章 atorvastatinによる神経突起伸長に対するプリオン蛋白質の役割

【背景・目的】

HMG-CoA還元酵素阻害剤 (スタチン) は末梢でのコレステロール合成阻害作用を有し、脂質異常症患者

者へ幅広く使用されている。一方、スタチンは Alzheimer's disease (AD) の進行リスク低下に関与することが近年報告されていることから、スタチンは中枢神経系疾患にも有用であることが示唆された。神経細胞を用いた研究では、スタチンは上皮成長因子受容体の活性化や RhoA シグナルの抑制を介して神経突起伸長を促進することが報告されているが、まだその詳細な機序は明らかではない。神経突起伸長を促す神経成長因子は PrP^c 発現増加を誘導することが報告されているため、スタチンが PrP^c 発現に作用し、その神経突起伸長に関与することが想起される。そこで、本章では臨床で広く使用されているスタチン系薬剤 atorvastatin の PrP^c 発現に対する作用と PrP^c の atorvastatin 誘導神経突起伸長に対する影響を検討した。

【結果・考察】

Neuro2a (N2a) 細胞 (マウス神経芽細胞腫) に atorvastatin を処置した結果、時間・濃度依存的に神経突起伸長細胞の数を増加させた。また、atorvastatin は濃度依存的に PrP^c 発現量を増加させ、10 μ M から有意な増加が認められた (図1)。atorvastatin はメバロン酸経路を遮断することから、メバロン酸経路中間代謝物の類似物である farnesol を補充し、メバロン酸経路の再生を行った結果、atorvastatin 誘導神経突起伸長は抑制され、PrP^c 発現量も減少した。そこで、atorvastatin 誘導神経突起伸長に PrP^c 発現が関与するか検討するため、PrP^c を過剰発現させた N2a 細胞 (NP01、NP03) に atorvastatin の処置を行った。mock 細胞 (PrP^c 遺伝子を導入していない N2a 細胞) と比較し神経突起伸長細胞数は有意に増加した (図2)。より詳細な機序を明らかにするために、細胞骨格制御のシグナルに関わる Rho family G 蛋白の発現について検討を行った。atorvastatin は突起伸長促進作用を示す Cdc42 の発現量を増加させ、farnesol の共処置は Cdc42 発現量を減少させた。さらに、atorvastatin を処置した NP01 と NP03 は、同処置の mock 細胞と比較して、Cdc42 発現量の増加が認められた。

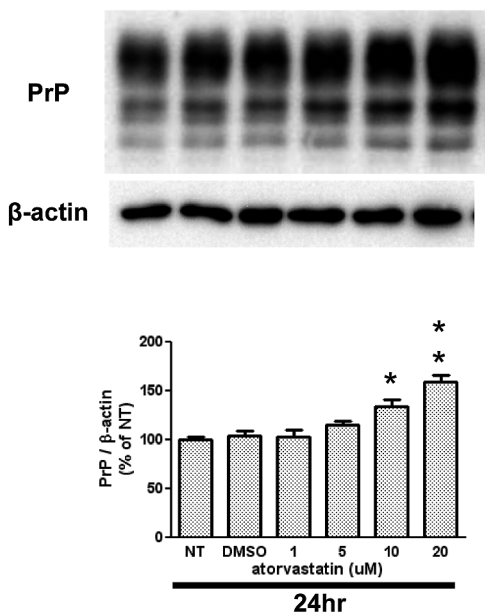


図1 N2a細胞における atorvastatin の PrPC に対する作用
mean \pm S.E. * p <0.05 and ** p <0.01, significantly different from vehicle (DMSO)

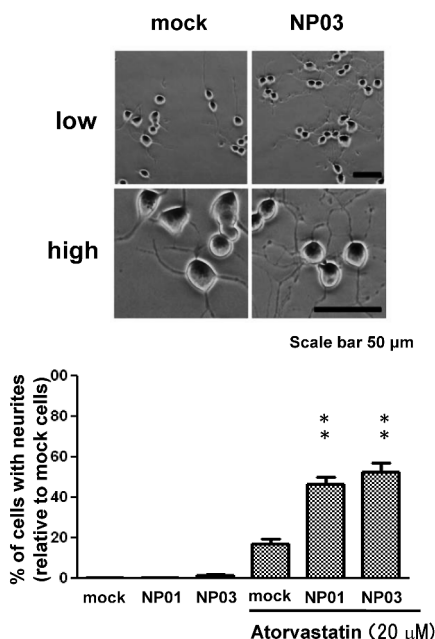


図2 PrP^c 過剰発現細胞における atorvastatin 処置による神経突起伸長細胞数
mean \pm S.E. ** p <0.01, significantly different from mock

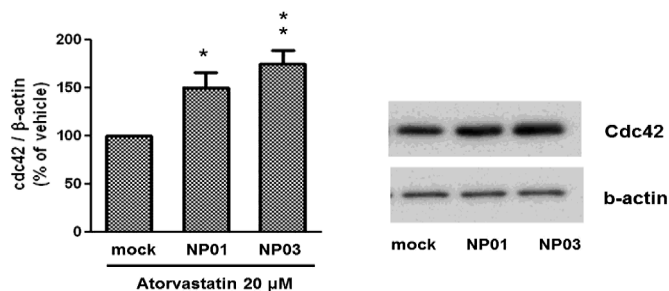


図3 PrP^c過剰発現細胞における Atorvastatin 処置後の Cdc42 発現量 mean ± S.E. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, significantly different from mock

以上より、atorvastatin は PrP^c 発現量を増加させること、また、PrP^c 発現量の増加は atorvastatin による神経突起伸長を増強することが明らかとなった(図3)。また、PrP^c 発現が Cdc42 発現量増加を導き、神経突起伸長を促進することが示唆された。PrP^c による Cdc42 発現量増加機序は不明であるため、PrP^c と Cdc42 を繋ぐシグナル解明が今後の検討課題である。スタチンによる AD 進行リスク低下機序について、本研究結果から PrP^c を介した神経突起伸長が AD で認められる神経細胞障害に対して改善的に関与することが提案できる。

第2章 脳血管内皮細胞の Aβ 輸送における PrP^c の寄与と PrP^c 発現に対する TNF α の作用

【背景・目的】

AD 患者の血清では TNF α を含むサイトカイン量の増加が認められている。抗 TNF α 抗体の投与は AD 治療臨床研究において認知機能改善を示し、AD モデルマウスでは老人斑を減少させた。これらの報告から、TNF α は老人斑の構成分子である β -amyloid (A β) の脳内蓄積を導き、認知機能を低下させることが示唆される。しかし、TNF α が A β の蓄積にどのように寄与しているかは明らかではない。

脳内 A β の蓄積には、脳内での A β 産生増加と脳外への A β 排泄低下によることが提案されている。脳血管内皮細胞は複数の A β 輸送分子を発現しており、脳内から A β を細胞内に取り込んだのち、細胞外へ A β を排出することで、A β を脳内から脳外へと排泄している。また、血管を構築する脳血管内皮細胞は血清中に増加した TNF α の主な標的細胞であることが考えられる。このことから、TNF α の脳血管内皮細胞に対する作用が A β 輸送を阻害し、脳外への A β 排泄低下を招くことが想起される。

A β 輸送分子には細胞外排出に寄与する P-glycoprotein (P-gp) や細胞内取り込みに寄与する low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) の存在が認められている。また、神経細胞において PrP^c が A β と結合することが知られているが、脳血管内皮細胞の A β 輸送における PrP^c の役割は解明されていない。そこで、本章では脳血管内皮細胞の A β 輸送に着目し、TNF α の PrP^c 発現に対する作用と、PrP^c の A β 輸送への影響を検討した。

【結果・考察】

マウス脳毛細血管内皮細胞株 (MBEC4 細胞) に TNF α を処置した結果、PrP mRNA および PrP^c の発現量は濃度依存的に減少し(図4)、P-gp mRNA および P-gp 発現量は増加を示した。しかし、LRP1 の発現量変化は認められなかった。また、TNF α 処置はラジオリラベル化 A β を付加した時の細胞内 A β 蓄積量を用量依存的に減少させた。この細胞内 A β 蓄積量減少には P-gp 発現増加による A β 細胞外排出と PrP^c 発現量減少による A β 細胞内取り込みが寄与していることが示唆された。そこで、P-gp の阻害剤である verapamil を処置し、細胞内 A β 蓄積量を測定した。P-gp 基質である calcein を用いた検討から、P-gp が阻害される verapamil 濃度を使用した。verapamil は細胞内 A β 蓄積量を増加させたが、

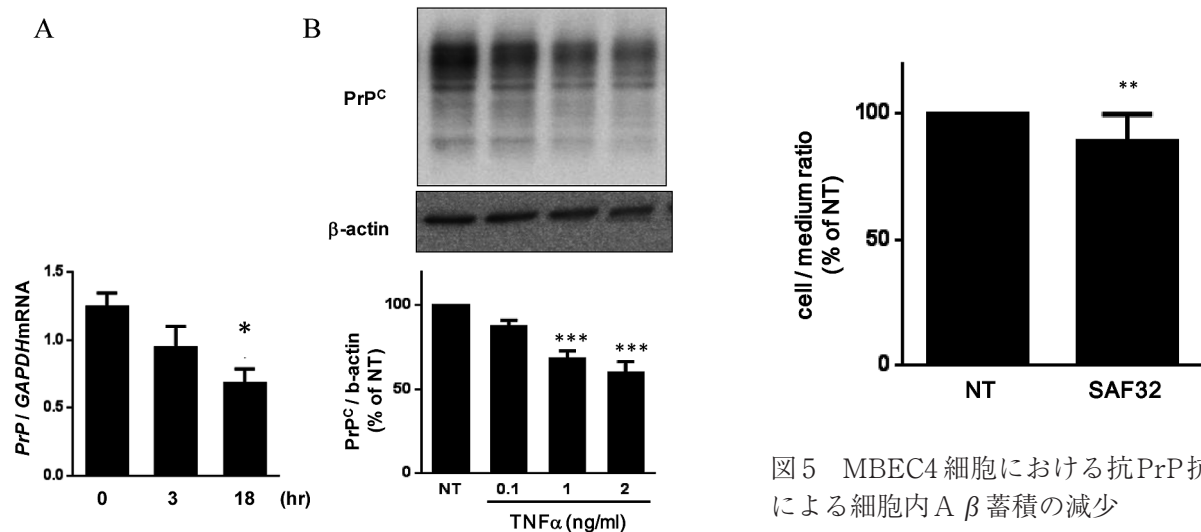


図4 MBEC4細胞におけるTNF α によるPrP mRNA (A)およびPrP^c (B)に及ぼす効果

* $p < 0.05$, significantly different from 0 h. *** $p < 0.001$, significantly different from NT (non-treatment)

図5 MBEC4細胞における抗PrP抗体による細胞内A β 蓄積の減少
mean \pm S.E. ** $p < 0.01$, significantly different from NT (non-treatment)

TNF α によるA β 蓄積量減少は維持されたままであった。

この減少はPrP^c発現量減少に起因することが示唆されたため、MBEC4細胞においてPrP^cがA β 細胞内取り込みに関与するか抗PrP抗体(SAF32)を用いて検討を行った。SAF32によるPrP^cのマスキングは細胞内A β 蓄積量を減少させた(図5)。以上のことから、TNF α によるMBEC4細胞内A β 蓄積量減少の一部は、PrP^c発現量減少によるA β の細胞内取り込みの低下に起因することが示唆された。脳血管内皮細胞のA β 細胞内取り込みはA β 脳外排泄の起点となるため、TNF α によるPrP^c発現量減少を介したA β 細胞内取り込みの低下は、A β の脳内蓄積に大きく寄与すると考えられる。本研究結果は、ADにおける抗TNF α 抗体治療の新たな作用機序を提案するものである。

【総括】

本研究では、脳神経血管機構構成細胞(神経細胞・脳血管内皮細胞)におけるPrP^cの生理機能解明とPrP^cの発現調節因子同定を試みた。第1章では、ADの進行リスクを低下させるスタチンがPrP^c発現量を増加させ、スタチン誘発神経突起伸長に対してPrP^c発現増加が促進的に作用することを明らかにした。第2章では、脳血管内皮細胞におけるA β 細胞内取り込みがPrP^cを介して行われることを明らかとし、TNF α によるPrP^c発現量減少がA β 細胞内取り込みを低下させることを提案した。以上のことから、ADにて有効性が認められる薬剤やAD病態下で変動が認められる生体分子がPrP^c発現変化を介して、AD病態の改善や増悪に影響することが示唆された(図6)。本研究結果は、脳神経血管機構構成細胞におけるPrP^cの生理機能の一つとして、AD病態に対して生体保護作用があることを提案するものである。

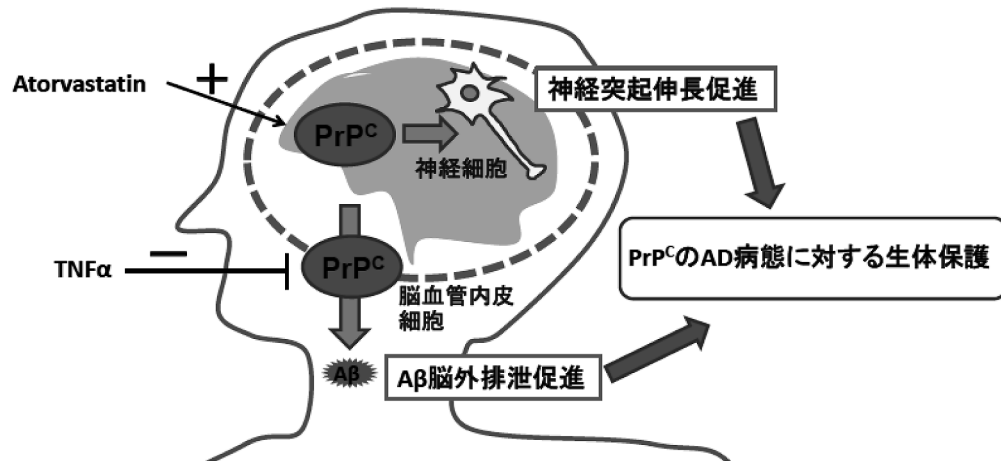


図6 脳神経血管機構構成細胞における PrP^c の AD 病態に対する機能
 神経細胞の PrP^c は神経突起伸長作用に促進的に働く。脳血管内皮細胞の PrP^c は A β 排泄に促進的に働く。

審査の結果の要旨

プリオン蛋白質には、病原性のない正常型プリオン蛋白質 PrP^c (Cellular prion protein) と病原性のある異常型プリオン蛋白質 PrP^{sc} (Scrape prion protein) の2種類が存在し、PrP^{sc} は PrP^c の高次構造変化によって形成される。PrP^{sc} は牛で認められる狂牛病やヒトにおけるクロイツフェルト・ヤコブ病などのプリオン病の原因物質であることが報告されており、その細胞毒性や高次構造転換機序については精力的に研究が進められ、その病態生理機能が明らかにされつつある。一方、PrP^c の生理機能については不明な点が多い。PrP^c はあらゆる臓器に発現しており、特に神経細胞に多く発現が認められる。神経細胞では銅の細胞内取り込みや細胞接着などに関与することが報告されている。また、本研究に先立ち、当研究室では PrP^c が脳血管内皮細胞に発現し、その細胞の遊走能維持に関与することを明らかにした。これらのことから、PrP^c は神経細胞、脳血管内皮細胞において生理作用を示し、その発現変化はこれら細胞の機能に大きく影響することが示唆された。神経細胞と脳血管内皮細胞は中枢神経系維持に重要である脳神経血管機構の構成細胞であり、これらの細胞における PrP^c の発現を調節する因子ならびに PrP^c 発現が変動した際の各構成細胞の機能変化を捉えることは、中枢神経系疾患発症機序やその薬物治療機序の解明に繋がると考えられる。

本論文では、第一章において神経細胞の atorvastatin による神経突起伸長と PrP^c 発現について検討を行った。第二章では脳血管内皮細胞における tumor Necrosis Factor α (TNF α) の β -amyloid (A β) 輸送能と PrP^c 発現に対する作用について検討を行った。

第一章では、atorvastatin が PrP^c 発現量を増加させること、また、PrP^c 発現量の増加は atorvastatin による神経突起伸長を増強することを明らかにした。また、この PrP^c 発現亢進が Cdc42 発現量増加を導き、神経突起伸長を促進することを示した。スタチンによる Alzheimer's disease (AD) 進行リスク低下機序において PrP^c を介した神経突起伸長が関与することを初めて示唆する実験証拠を提示した点で高く評価された。

第二章では、TNF α による MBEC4 細胞内 A β 蓄積量減少の一部が、PrP^c 発現量減少による A β 取り込みの低下に起因することを突き止めた。脳血管内皮細胞の A β 細胞内取り込みは A β 脳外排泄を制

限している。従って、TNF α による PrPC 発現量減少を介した A β 細胞内取り込みの低下は、A β の脳内蓄積に大きく寄与すると考えられる。本研究成果は、AD患者で増加する血清中TNF α が老人斑の構成分子である A β の脳内蓄積を誘導する機構に脳血管内皮細胞の PrP^c機能障害という新たな機序を提示した点で画期的である。また AD における抗TNF α 抗体治療の新たな可能性を示す優れた成果であると評価できる。

以上、本論文は脳神経血管機構構成細胞に発現する PrP^c が AD 病態形成・進展を抑制している可能性を明らかにしたものであり、学位論文として適格かつ高質であると判定した。また、公聴会審査における申請者の質疑応答は、学位を授与するに応分の能力を証明するものと結論した。