

(様式4)

学位論文の内容の要旨

氏名 大和田 竜司



(学位論文のタイトル)

Exogenous polyserine and poly-leucine are toxic to recipient cells

(外因性ポリセリンおよびポリロイシンは細胞毒性を有する)

(学位論文の要旨)

【背景と目的】

ハンチントン病などのポリグルタミン (polyQ) 病は、原因タンパクの基となる遺伝子内のCAG配列が異常にリピートするためにグルタミンが異常にリピートしたpolyQを含む原因タンパクが翻訳され、これが患者の神経細胞内で凝集して、ある細胞から別の細胞へ伝播し、毒性を発揮する。

一方で、リピート関連非AUG依存性翻訳 (RAN translation) とは、RNAに長いリピート配列があると、翻訳開始地点であるAUG開始コドンが必要とせず、そのリピート部位を基に翻訳を開始する現象のことである。AUG開始コドンがないために本来polyQとして翻訳されるはずのCAGリピートから、ポリアラニン、ポリセリン (polyS)、ポリロイシン (polyL)、ポリシスチンを含むタンパクが翻訳される。実際に、ハンチントン病患者の脳内にそれらの凝集体が存在することが報告されているが、polyQのように別の細胞へ伝播するのか、伝播するとして、毒性を発揮するかどうかは明らかになっていない。

本研究では、人工的に合成し凝集させた外因性のpolyS、polyLペプチドが (1) *in vitro*で細胞に侵入して細胞死や形態異常を引き起こすか。 (2) マウスの細胞に侵入して脳機能に影響を及ぼすか。を明らかにすることを研究の目的とした。

【方法】

以下の配列のペプチドを用い、13Sとscrambled serineは37°Cで48時間振盪して凝集させた。

- 5-TAMRA-KKWSSSSSSSSSSSSSKK (13S)
- 5-TAMRA-KKWLLLLLLLLLLLLLLK (13L)
- 5-TAMRA-SSSKSSKSSSSWSSSKS (scrambled serine)

神経成長因子で分化させた神経様細胞株 (PC12)、アストロサイト細胞株 (KT-5) の培養液中に、上記のペプチドとコントロールとしてTAMRAを添加して細胞の形態を測定し、細胞の生存率を求めた。形態の測定は、PC12では突起の長さの合計と分岐の数を、KT-5アストロサイトでは細胞体の面積と突起の長さの平均を定量した。また電子顕微鏡観察も行った。

次に、定位脳手術によりアダルトマウスの側脳室にこれらのペプチドを注射し、翌日に組織の観察と行動テストを行った。

【結果】

(1) 13Sと13LはPC12に侵入して、13Sは神経突起を退縮させる。

培養液中に加えた13Sと13Lは自発的にPC12に侵入した。13Sを添加したPC12では、TAMRAと比較して神経突起が短く、分岐数が減少していた。細胞死には影響しなかった。

(2) 13Sと13LはKT-5アストロサイトに侵入して、形態変化と細胞死を引き起こす。

培養液中に加えた13Sと13Lは自発的にKT-5アストロサイトに侵入した。TAMRAと比較して、13Sは細胞体の面積が大きく、13Lは突起の長さの平均が長かった。また、scrambled serineも細胞体の面積は大きかった。さらに、ペプチドを添加した群では細胞生存率が下がった。

(3) 13Sはマウス脳の広範囲に空胞変性を引き起こす。

マウス側脳室にペプチドを注射すると、13Sと13Lが側脳室周囲の細胞内に存在することが確認された。また、13Sを注射したマウスの大脳皮質、海馬、線条体、嗅内野など広範囲に空胞変性がみられた。情動に関係する嗅内野では13S、13Lで空胞変性がみられた。

(4) 13Sと13Lはマウスの行動を変化させる。

不安に関連する高架式十字迷路テストでは、13Sと13Lを注射したマウスはscrambled serineと比較して開放脚にいる時間が短く、TAMRA、scrambled serineと比較して開放脚に入った回数の割合が少なかった。鬱、ストレスコーピングに関連する強制水泳テストでは、13Sと13Lを注射したマウスはTAMRA、scrambled serineと比較して無動時間が長かった。これらは、13Sと13Lを注射したマウスの不安の亢進および鬱またはストレスコーピングの異常を意味する。

13S注射マウスの空胞変性は線条体、運動野、海馬でもみられ、これらの領域は運動活性に関与するため、オープンフィールドテストを行った。13Sと13Lはscrambled serineと比較して総移動時間が短かったが、TAMRAとの比較では有意差はなかった。また、他の項目では有意差はなかった。

【考察】

ポリグルタミン病において、凝集したpolyQを含むタンパクが他の細胞へ伝播することは病理学的にも極めて重要な特性である。今回外因性の13S、13Lが自発的に細胞内部に侵入したことで、polyS、polyLを含むタンパクでも他細胞への伝播が起こる可能性を示した。また、13SはPC12とKT-5の、13LはKT-5の形態を変化させ、どちらもKT-5に細胞死を引き起こしたことから、RAN translationにより生成されたタンパクの凝集体がポリグルタミン病の病態に寄与している可能性がある。

13Sと13Lを注射したマウスでは空胞変性と恐怖状況下での不安の亢進と鬱またはストレスコーピング異常がみられた。しかしながらその関連性については不明な点があり、今後明らかにしていく必要がある。