

博士論文（要約）

神経変性疾患における脂肪酸結合タンパク質の役割解明及び創薬

(Investigation and drug discovery targeting fatty acid-binding proteins in neurodegenerative diseases)

令和 4 年度

東北大学 大学院薬学研究科

生命薬科学専攻 薬理学分野

程 岸

【題目】：神経変性疾患における脂肪酸結合タンパク質の役割解明及び創薬

【研究背景】：

1. 神経変性疾患

神経変性障害は、軸索、樹状突起またはシナプスの構造と機能の変性に続く神経細胞の進行性の悪化を特徴とし、最終的には神経細胞の脱落または白質障害につながる。その中で、最も慢性的で加齢に伴う神経変性疾患に、脳の神経細胞死によって引き起こされるアルツハイマー病 (AD) とパーキンソン病 (PD) およびその他のオリゴデンドログリア関連疾患である多系統萎縮症 (MSA) やクラッペ病 (KD) などがある。PD は、世界で最も一般的かつ重篤な運動障害疾患であり、60 歳以上の成人の約 1% が罹患している。この病気は黒質ニューロンの選択的喪失に起因しているが、詳しい原因はいまだ不明である。PD の主要な特徴は、安静時振戦、硬直、および動作緩慢である。姿勢の不安定性 (基本的な特徴と診断される場合もある) は非特異的であり、通常、初期の疾患、特に若い患者には見られない。PD の顕著な病理学的特徴としては、黒質緻密部のドーパミンニューロンの不可逆的な変性およびレビー小体 (LB) やレビー神経突起 (LN) などの細胞質内糸状封入体の存在が挙げられる。140 アミノ酸のタンパク質である α -シヌクレイン (α Syn) は、通常ニューロンのシナプス前終末に見られるが、その誤った折り畳みと凝集は、散発性および遺伝性 PD の両方で LB および LN を形成し、神経変性細胞死の引き金となる。多系統萎縮症 (MSA) は、進行性自律神経不全、パーキンソン症候群、およびさまざまな組み合わせの小脳および錐体路の病変・症候を特徴とする成人発症の致命的な神経変性疾患である。パーキンソニズムが顕著な場合はパーキンソン病サブタイプとして分類され、小脳性運動失調が顕著な場合は小脳サブタイプとして分類される。MSA の病理学的特徴は、誤って折りたたまれた α Syn からなるグリア細胞質内封入体である。このような変化はオリゴデンドロサイト (OLG) の変性と脱髄を誘発し、またグリア細胞からニューロンへの栄養供給も障害される。

2. α -シヌクレイン

α Syn は分子量 15,000 のタンパク質であり、140 アミノ酸で構成され、帯電した N 末端領域 (1-60)、非アミロイドベータ成分として知られている中央の疎水性領域 (NAC) (61-95) 及び α -シヌクレインの凝集と関与している強酸性の C 末端ドメイン (96-140) を含む 3 つの異なる領域で構成される。 α -シヌクレインは、中枢神経系 (CNS) で豊富に発現する天然変性タンパク質であり、最初に可溶性および単量体型として *in vitro* で精製された。通常、無秩序なタンパク質は、誤った折り畳みと凝集を回避する荷電残基とプロリンが豊富な一次配列を持っている。しかし、突然変異によりその環境条件が変化し、 α -シヌクレインの本来のコンパクトな折り畳みが乱れ、凝集 (線維化) を引き起こされる。これまでに、 α -シヌクレインの 6 つの点突然変異 (A53T、A30P、A53E、E46K、G51D、および H50Q) がシヌクレイノパチーに関連していると報告されている。A53T、E46K、および

H50Q 変異の α -シヌクレインは凝集しやすいのに対し、A30P 変異の α -シヌクレインはオリゴマー化しやすいことが報告されている。

3. 脂肪酸結合タンパク質

細胞では、炭素原子の数が少ない脂肪酸は水溶性であるが、炭素原子の数が 12 以上の長鎖脂肪酸 (LCFAs) は水に不溶性である。したがって、LCFAs を細胞内に移動させるためには、LCFAs に結合して可溶化する脂肪酸結合タンパク質 (FABPs) が必要である。FABP ファミリーは、分子量が 14~15 kDa の低分子量細胞内タンパク質であり、哺乳類では最大 12 種類が同定されている。

その中で、心臓型 (FABP3)、脳型 (FABP7)、表皮型 (FABP5) の 3 つの FABP が脳で発現している。FABP3 は心臓から最初に単離されたが、体内の組織や細胞に広く発現し、心臓に加えて脳、骨格筋、乳腺、卵巣にも発現する。FABP3 は、AA などの n-6 不飽和脂肪酸に高い親和性を示す。また、エポキシエイコサトリエン酸、AA 代謝物に結合し、その半減期を延長する。FABP5 は表皮、肝臓、脂肪細胞で広く発現している。FABP7 と同様に、胚性脳の神経細胞とグリア細胞で高発現するが、成熟した脳では減少する。mRNA の発現は神経新生 (E17) から神経分化過程 (E19) でピークに達し、シナプス形成期 (P5-P10) に発現が減少し、神経細胞の移動と分化に関与すると考えられている。FABP7 は、星状細胞の神経幹細胞と海馬の顆粒細胞層に局在する。FABP7 は、出生後の胚性脳で高い発現レベルを示し、成熟した脳、星状細胞、および OPCs では発現レベルが低下する。FABP7 遺伝子ノックアウトマウスを用いた分析では、FABP7 が星状細胞への n-3 長鎖不飽和脂肪酸の取り込みに関与していることが示された。また、FABP3 及び FABP7 の発現が、パーキンソン病、アルツハイマー病、およびその他の神経障害を含む神経変性障害の患者の血清および脳脊髄液 (CSF) で増加することが報告されている。

【研究方法】：本研究では、FABP3 を過剰発現させた Neuro-2A 細胞をアラキドン酸 (AA) で刺激し、 α Syn のオリゴマー化が亢進することを確認した。次に、リコンビナント FABP3 の精製タンパク質を用いた 8-アニリノナフタレン-1-スルホン酸 (ANS) アッセイを用いて、FABP3 の脂肪酸結合ドメインに結合する FABP3 リガンドを創製した。FABP3 リガンドの活性は、Neuro-2A 細胞を用いて AA 誘導による α Syn オリゴマー化に対する効果を免疫ブロット及び蛍光染色で確認した。また、シヌクレイノパチーモデル培養細胞およびミエリンプロテオリピドタンパク質 (PLP) 誘導多系統萎縮症マウスにを用いて FABP7 が α Syn と共局在し複合体を形成することを検討した。合成された FABP7 リガンド 6 (MF6) は、ANS アッセイ及び水晶振動子微量天秤 (QCM) アッセイを使用して、FABP7 に対する親和性を確認した。培養細胞系でサイコシン (10 μ M) によるホスホリパーゼ A2 (PLA2) の活性化を用いて内在性 α Syn と FABP7 のオリゴマー化レベルを確認し、KG-1C ヒトオリゴデンドログリア細胞とオリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPCs) の両方で細胞死を検討した。続いて、OLG が KG-1C ヒトオリゴデンドログリア細胞とマウス

OPCs の両方でサイコシン処理によってどのように誘導されるか検討した。ミトコンドリアにおける脂肪酸結合タンパク質 5 の機能を検討するために、電位依存性陰イオンチャネル (VDAC-1) と Bcl-2 関連 X タンパク質 (BAX) を用いて、ミトコンドリアのマクロポア形成を確認した。

【研究結果】：本研究は神経変性疾患における FABP の役割を注目した。FABP3 はドパミン神経細胞に発現し、ドパミン神経細胞における α Syn の凝集及びオリゴマー化を促進した。さらに、その作用は AA の投与により増強されました。一方、FABP3 をターゲットする特異リガンド (リガンド 1、7、8) は有意的に FABP3 による α Syn の凝集及びオリゴマー化を阻害し、細胞保護的に働きことを証明した。

FABP7 はグリア細胞あるいは OLG に沢山発現し α Syn の凝集を促進した。臨床的な証拠では、FABP7 は MSA 患者の血液で有意に変化する。また、PLP マウスに FABP7 と α Syn の共局在は確認された。一方、試験管内での実験では、FABP7 は α Syn を普通の凝集より高い分子量の凝集体を作り、その凝集体はマウスに対し著しい運動機能障害を示した。その原因は、作られた凝集体はグリア細胞あるいは OLG に選択的に取り込まれ、OLG 細胞死を促進することが考えられる。FABP7 を抑制するため開発した FABP7 のリガンド (リガンド 6) は FABP7 と α Syn の結合をブロックし、凝集体レベルを抑制することで OLG 細胞死を改善した。

一方、OLG に発現する FABP5 はミトコンドリアストレスの状況でミトコンドリアの中に蓄積した。蓄積した FABP5 は VDAC-1 及び BAX の凝集を制御しミトコンドリアマクロポアの形成を促進した。ミトコンドリアマクロポアの形成に伴い、シトクロム C 及び mtDNA の分泌も促進され、ミトコンドリアロスや OLG 細胞死を誘導した。並びに、インヒビターや shRNA による FABP5 の抑制はミトコンドリアマクロポアの形成を抑制し OLG 細胞死を改善した。

【結論】：以上のことから、FABP3 や FABP5 及び FABP7 をそれぞれターゲットするリガンドがそれぞれの関連疾患に治療効果を示した。今後、FABPs のリガンドが新規治療薬となる可能性が十分考えられる。

【考察】：本研究では、FABP7 は α Syn の凝集を促進し分子量及び毒性の高い凝集体を作ることが明らかにした。その凝集体は嗅球に 100%、基底核に 35%、皮質に 60%、小脳に 10% の OLG 細胞に選択的に取り込まれる。しかし、その機序は不明である。神経細胞においては、FABP7/ α Syn の凝集体は見られない。即ち、OLG 細胞における特異的な受容体が存在し (神経細胞に発現されていないあるいはレベルが低い)、FABP7/ α Syn の凝集体の取り込みに関与する可能性が高い。その受容体を検索し、より MSA の発病メカニズムを理解することが、病気を治す治療薬の開発に向けて、解決策を提供できる。

今後では、MSA 患者の脳組織や PLP マウスを用いて、一つずつ FABP7 の結合タンパク質やエンドサイトーシスの関連タンパク質や MSA で有意的に変化したタンパク質などから FABP7/ α Syn の凝集体の取り込みを制御する受容体を検討する予定である。