

氏名	いしやま しゅん 石山 駿
学位の種類	博士(医学)
学位授与年月日	2023年3月24日
学位授与の条件	学位規則第4条第1項
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科(博士課程)医科学専攻
学位論文題目	線維化 $\alpha$ シヌクレインの細胞内取り込みおよび細胞間伝播に寄与する受容体の同定
論文審査委員	主査 教授 青木 正志 教授 堂浦 克美 教授 新妻 邦泰

## 論文内容要旨

氏名：石山 駿

本文：

パーキンソン病 (Parkinson's disease: PD) はアルツハイマー病について頻度の高い神経変性疾患であるが、その治療は対症療法に限られ根治療法は未だない。病理学的には異常に線維化し凝集した $\alpha$ シヌクレイン( $\alpha$ -synuclein:  $\alpha$ SYN)の細胞内蓄積が神経変性を惹起すると考えられている。近年凝集 $\alpha$ SYNがプリオン同様に神経細胞間を伝播し、周辺組織へ病変を拡大させるという異常タンパク質伝播仮説(プリオノイド仮説)が提唱され、進行抑制治療ターゲットとしての注目を集めている。凝集 $\alpha$ SYNの細胞間伝播を制御する分子機序については不明な点が多いが、受容体を介したエンドサイトーシスの関与が推定されている。これ迄に複数の分子が $\alpha$ SYN受容体として報告されているが、多くは網羅的探索ではなく、神経細胞で低発現の分子が多い。また、膜タンパク質の単離精製過程で用いられる界面活性剤が、受容体分子の生理的構造やリガンド結合能を妨げ、結果に影響している可能性があった。そこで本研究では、界面活性剤非存在下でマウス全脳由来膜タンパク質ライブラリーを作製し、アフィニティーカラム精製と質量分析を組み合わせ線維化 $\alpha$ SYNの受容体を網羅的に探索した。同定された分子について、培養細胞を用いた共免疫沈降法で2次スクリーニングを実施し、神経細胞に高発現するタイプI膜タンパク質であるSortilinが細胞外の線維化 $\alpha$ SYNと最も強い結合を示す事を確認した。線維化 $\alpha$ SYNの細胞内への取り込みは細胞表面のSortilin発現量に依存し、タイムラプス画像解析により線維化 $\alpha$ SYNとSortilinの内在化およびエンドソームへの輸送が確認された。Sortilinの各細胞外ドメインの欠損実験により、膜貫通領域に近い細胞外のten conserved cysteines (10CC)ドメインが線維化 $\alpha$ SYNとの結合とエンドサイトーシスに関与していることが判明した。さらに10CCドメイン特異的抗体による前処理が、線維化 $\alpha$ SYN取り込みを有意に抑制することを確認した。最後に、PD・レビー小体型認知症患者脳のレビー小体のコア領域にSortilinが存在すること、また、Sortilinの細胞内移動に関与する小胞輸送経路がPD脳の脆弱な神経細胞集団において停滞している可能性がトランスクリプトーム解析で確認された。以上の結果は、Sortilinが線維化 $\alpha$ SYNの主要な神経細胞内受容体であることを示す証拠であり、PDの疾患修飾療法開発に重要な知見をもたらすものである。

## 審査結果の要旨

博士論文題目 .....線維化 $\alpha$ シヌクレインの細胞内取り込みおよび細胞間伝播に寄与する受容体の同定.....

所属専攻・分野名 .....医科学専攻 .....神経内科学分野.....

氏名 .....石山 駿.....

パーキンソン病 (Parkinson's disease: PD) はアルツハイマー病について頻度の高い神経変性疾患であるが、その治療は対症療法に限られ根治療法は未だない。病理学的には異常に線維化し凝集した $\alpha$ シヌクレイン( $\alpha$ -synuclein:  $\alpha$ SYN) の細胞内蓄積が神経変性を惹起すると考えられている。近年凝集 $\alpha$ SYN がプリオン同様に神経細胞間を伝播し、周辺組織へ病変を拡大させるという異常タンパク質伝播仮説 (プリオノイド仮説) が提唱され、進行抑制治療ターゲットとしての注目を集めている。凝集 $\alpha$ SYN の細胞間伝播を制御する分子機序については不明な点が多いが、受容体を介したエンドサイトーシスの関与が推定されている。これ迄に複数の分子が $\alpha$ SYN 受容体として報告されているが、多くは網羅的探索ではなく、神経細胞で低発現の分子が多い。また、膜タンパク質の単離精製過程で用いられる界面活性剤が、受容体分子の生理的構造やリガンド結合能を妨げ、結果に影響している可能性があった。そこで本研究では、界面活性剤非存在下でマウス全脳由来膜タンパク質ライブラリーを作製し、アフィニティーカラム精製と質量分析を組み合わせ線維化 $\alpha$ SYN の受容体を網羅的に探索した。同定された分子について、培養細胞を用いた共免疫沈降法で2次スクリーニングを実施し、神経細胞に高発現するタイプI膜タンパク質である Sortilin が細胞外の線維化 $\alpha$ SYN と最も強い結合を示す事を確認した。線維化 $\alpha$ SYN の細胞内への取り込みは細胞表面の Sortilin 発現量に依存し、タイムラプス画像解析により線維化 $\alpha$ SYN と Sortilin の内在化およびエンドソームへの輸送が確認された。Sortilin の各細胞外ドメインの欠損実験により、膜貫通領域に近い細胞外の ten conserved cysteines (10CC) ドメインが線維化 $\alpha$ SYN との結合とエンドサイトーシスに関与していることが判明した。さらに 10CC ドメイン特異的抗体による前処理が、線維化 $\alpha$ SYN 取り込みを有意に抑制することを確認した。最後に、PD・レビー小体型認知症患者脳のリビー小体のコア領域に Sortilin が存在すること、また、Sortilin の細胞内移動に関与する小胞輸送経路が PD 脳の脆弱な神経細胞集団において停滞している可能性がトランスクリプトーム解析で確認された。以上の結果は、Sortilin が線維化 $\alpha$ SYN の主要な神経細胞内受容体であることを示す証拠であり、PD の疾患修飾療法開発に重要な知見をもたらすものである。

よって、本論文は博士（医学）の学位論文として合格と認める。