

# 中垣岳大 論文内容の要旨

主 論 文

## FK506 reduces abnormal prion protein through the activation of autolysosomal degradation and prolongs survival in prion-infected mice

FK506 はオートファジーを活性化することで異常型プリオンタンパクの分解を促進し、プリオン感染マウスの生存期間を延長する

中垣岳大、佐藤克也、石橋大輔、布施隆行、佐野和憲、鎌足雄司、桑田一夫、重松和人、岩丸 祥史、竹之内敬人、木谷裕、西田教行、新竜一郎

(Autophagy • Epub ahead of print)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科新興感染症病態制御学系専攻

(主任指導教員：西田教行教授)

### 緒 言

プリオン病は異常型プリオンタンパク (PRNP<sup>Sc</sup>) の蓄積による致死性神経変性疾患である。これまでの研究では、抗マラリア薬キナクリンや硫酸多糖類であるペントサンポリサルフェイトなど、正常型プリオンタンパク (PRNP<sup>C</sup>) から PRNP<sup>Sc</sup> への構造転換を抑制する薬剤が見いだされた。これらの薬剤の効果は限定的であり、PRNP<sup>Sc</sup> の産生を抑制するだけでは治療効果が不十分ではないかと考えられる。そこで我々は PRNP<sup>Sc</sup> の分解経路に着目した。近年、PRNP<sup>Sc</sup> がオートファジーと呼ばれるタンパク分解経路によって代謝されていると報告されている。オートファジーはオートファゴソームと呼ばれる脂質二重膜を形成してタンパク質を囲み、さらにリソソームと結合してオートリソソームとなってタンパク質を分解する経路である。オートファジーの調節機構としては mammalian Target Of Rapamycin (mTOR) を介したものが知られているが、近年、FK506 Binding Protein (FKBP) がオートファジーの制御に関わっていると報告されている。そこで我々は免疫抑制剤 FK506 が FKBP に結合することでオートファジーを活性化すれば、PRNP<sup>Sc</sup> の分解を促進しプリオン病発症を阻止できるか検討した。

### 対象と方法

マウス神経芽細胞腫由来の細胞(Neuro2a: N2a)に PRNP を過剰発現させた N2a58 細胞とマウス PRNP 過剰発現マウスのミクログリア由来の MG20 細胞を準備した。さらにこれらの細胞にマウス順化ヒトプリオン(Fukuoka-1)株を感染させた N2a58/Fukuoka-1 細胞と MG20/Fukuoka-1 細胞を実験に用いた。感染および非感染細胞に FK506 を添加して 48 時間後にタンパクを回収し、ウエスタンブロット法を用いてオートファジー関連因子や PRNP<sup>Sc</sup> の増減を検討した。次に、NH<sub>4</sub>Cl を添加してリソソームを阻害した N2a58/Fukuoka-1 細胞に FK506 を添加した。24 時間培養した後にタンパク質を回収して PRNP<sup>Sc</sup> の増減を確認した。また、FK506 を添加した細胞に Monodancylcadaverine (MDC)を加えてオートリソソームを染色し、その増減を INCell Analyzer で解析した。CD-1 マウスに Fukuoka-1 株を脳内接種し、感染 20 日後および 60 日後から FK506 を腹腔内投与した。感染 20 日後から投与を開始したマウスの一部は発症時(感染 110 日後)に解剖し、PRNP<sup>Sc</sup> の蓄積やミクログリアの増生を免疫染色やウエスタンブロット法を用いて解析した。

## 結 果

N2a58/Fukuoka-1 細胞および MG20/Fukuoka-1 細胞を FK506 で処理したところ、オートファゴソーム形成に必要な LC3-II、ATG12-ATG5、ATG7、BECLIN1(BECN1)の増加が認められた。また、MDC で N2a58/Fukuoka-1 細胞のオートリソソームを染色すると、FK506 処理細胞で MDC の蛍光が増加していた。以上のことから FK506 がプリオン感染細胞においてオートファジーを活性化させることが示唆された。またこれらの細胞では FK506 の濃度依存的に PRNP<sup>Sc</sup> の減少が認められたが、NH<sub>4</sub>Cl によってリソソームを阻害すると PRNP<sup>Sc</sup> の減少は見られなくなった。これらの結果は、FK506 を添加した細胞において、活性化したオートファジーが PRNP<sup>Sc</sup> を分解していることを示唆している。

動物実験では、感染 60 日後から投与を開始したマウスは対象群と比べて生存期間の延長は認められなかったが、感染 20 日後から投与を開始した群では有意な生存期間の延長が認められた。さらに感染 20 日後から投与を開始した群を発症時(感染 110 日後)に解剖したところ、非投与群に比べて脳内の PRNP<sup>Sc</sup> の蓄積が 80%抑制されており、同時にオートファジー関連因子の発現増加が見られた。また、ミクログリアの活性化のマーカーである IBA-1 の発現は脳全体で抑制されていたが、皮質では特にその傾向が顕著であった。

## 考 察

FK506 は PRNP<sup>Sc</sup> の蓄積を抑制することが示された。さらに、オートファジー関連因子の増加も見られ、FK506 がオートファジーを活性化することで PRNP<sup>Sc</sup> の蓄積を阻害することが示唆された。また、FK506 はその免疫抑制作用や神経保護作用が知られており、今回の我々の実験でもミクログリア抑制効果が見られた。オートファジーの活性化とミクログリアの抑制がそれぞれどの程度、治療効果につながっているかは明らかでなく、今後の検討課題でもある。しかし、これまでのプリオン病治療に用いられた薬剤は PRNP の構造転換を抑制するものが多く、FK506 のように機序の異なる薬剤を併用することで有効な治療法の確立につながると期待できる。

(備考) ※日本語に限る。2000 字以内で記述。A4 版。