

氏 名	中村 善胤
(ふりがな)	(なかむら よしつぐ)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲博医第24号
学位審査年月日	令和4年1月21日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題名	Monoamine Oxidase-B Inhibition Facilitates $\alpha$ -Synuclein Secretion <i>In Vitro</i> and Delays Its Aggregation in rAAV-Based Rat Models of Parkinson's Disease (モノアミノオキシダーゼ-B 阻害は <i>in vitro</i> で $\alpha$ -シヌクレインの細胞外分泌を促進し、アデノ随伴ウイルスベクターによるパーキンソン病ラットモデルにおいて $\alpha$ -シヌクレインの凝集を遅延させる)
論文審査委員	(主) 教授 鰐淵 昌彦 教授 近藤 洋一 教授 小野 富三人

## 学位論文内容の要旨

### 《目的》

Parkinson 病 (PD) は運動緩慢、筋強剛、静止時振戦といった運動症状を主徴とする神経変性疾患である。病理学的に黒質線条体ドパミン神経細胞の変性とレビー小体と呼ばれる神経細胞内異常構造物の出現を特徴とする。レビー小体の主要構成成分は凝集した  $\alpha$ -シヌクレイン ( $\alpha$ S) である。凝集した  $\alpha$ S が細胞間を伝播し脳内で広がることで PD の症状が進行すると考えられている。現在のレボドパ製剤を主とする薬物療法は脳内で不足したドパミンを補うものであり、黒質線条体ドパミン神経細胞の変性を抑制する効果はない。

そのため、PD の進行を抑制する治療法の開発が喫緊の課題となっている。モノアミンオキシダーゼ (MAO) -B はドパミンの分解を担う酵素である。その阻害薬は脳内ドパミン濃度を上昇させることで PD 治療薬として使用される。MAO-B 阻害は他にもドパミン代謝に伴う酸化ストレスの軽減、アポトーシス抑制、ミトコンドリア膜電位の安定化といった効果が知られている。しかし、MAO-B 阻害の  $\alpha$ S 神経毒性に対する効果は不明である。本研究は MAO-B 阻害が  $\alpha$ S の代謝及び神経毒性に与える効果について検討した。

## 《方 法》

MAO-B 阻害による  $\alpha$ S の代謝への影響は、SH-SY5Y 細胞を用いて調べた。 $\alpha$ S の細胞内発現量の解析は細胞抽出液を使用し、細胞外分泌の解析は培養液をトリクロロ酢酸沈殿したサンプルを使用して、ウェスタンブロッティングを行い解析した。MAO-B 阻害による  $\alpha$ S の神経毒性及び凝集体形成への影響は、アデノ随伴ウイルス (rAAV) で  $\alpha$ S を中脳黒質に発現させたラットモデルに MAO-B 阻害薬セレギリンを投与して調べた。神経毒性の解析には、30 $\mu$ m 厚の脳切片を抗チロシン水酸化酵素 (TH) 抗体で免疫染色し、黒質の TH 陽性細胞体数をステレオロジー解析で定量した。 $\alpha$ S 凝集体数の解析には、凝集体を特異的に染色する抗セリン 129 リン酸化  $\alpha$ S 抗体で線条体を染色し、Bregma を中心とした頭尾側計 3 枚の切片で観察される陽性構造物を数えた。

## 《結 果》

タンパク質生合成阻害薬シクロヘキシミドで SH-SY5Y 細胞株を処理すると、細胞内に発現する  $\alpha$ S が減衰する。1mM の MAO-B 阻害薬セレギリンで共処理すると、この減衰は増強された。MAO-B 阻害が  $\alpha$ S の細胞外分泌に影響する可能性を考え、 $\alpha$ S 安定発現 SH-SY5Y 細胞株で細胞外に分泌される  $\alpha$ S 量を調べた。セレギリンは 1nM より  $\alpha$ S の細胞外分泌を促進した。MAO-B 阻害薬ラサギリンも  $\alpha$ S 細胞外分泌を促進した。MAO-B 酵素阻害活性がラサギリンの 1/1000 以下であるラサギリンの S-エナンチオマー TVP-1022 は  $\alpha$ S の細胞外分泌を変化させなかった。MAO-B 発現を siRNA でノックダウンすると  $\alpha$ S の

細胞外分泌が促進された。いずれの処理でも  $\alpha$ S の細胞内発現に変化はなく、細胞膜ダメージを示す LDH 細胞外放出の上昇は認めなかった。これらより、MAO-B の酵素活性阻害は  $\alpha$ S の細胞外分泌を促進させると考えられた。

次に、MAO-B 阻害が作用する  $\alpha$ S 細胞外分泌機構を検討した。 $\alpha$ S は小胞体シグナル配列を持たないため小胞体-ゴルジ装置非依存性の非古典的経路で細胞外に分泌されることが考えられている。非古典的経路の一つである ABC トランスポーターを介した経路について調べた。SH-SY5Y 細胞において MAO-B 阻害薬セレギリン及びラサギリンによる  $\alpha$ S 細胞外分泌の促進効果は ABC トランスポーター阻害薬プロベネシド及びグリブライドで抑制された。MAO-B ノックダウンによる  $\alpha$ S 細胞外分泌の促進効果は、ABC トランスポーター阻害作用を持つレセルピンで抑制された。MAO-B 阻害は ABC トランスポーターを介した  $\alpha$ S の細胞外分泌経路に作用すると考えられた。

MAO-B 阻害がストレス条件下の  $\alpha$ S 細胞外分泌に及ぼす影響を検討するため、SH-SY5Y 細胞株をライソゾーム阻害薬クロロキンで処理した。クロロキン処理は正常では観察されない界面活性剤 (1% Triton X-100) 不溶性  $\alpha$ S の形成を惹起しその細胞外分泌を促進した。この条件にセレギリンを加えると不溶性  $\alpha$ S の分泌がさらに促進され、不溶性  $\alpha$ S の細胞内蓄積が抑制された。正常の可溶性  $\alpha$ S の分泌と細胞内発現に変化はなかった。セレギリンによる不溶性  $\alpha$ S の分泌促進はレセルピンで抑制された。以上より、ライソゾーム阻害下において MAO-B 阻害は ABC トランスポーターを介して不溶性  $\alpha$ S を優先的に細胞外に分泌し、細胞内蓄積を抑制すると考えられた。

$\alpha$ S の神経毒性に対する MAO-B 阻害の効果を調べるため、rAAV で家族性 PD 変異 A53T を持つ  $\alpha$ S を中脳黒質に発現させたラットを用いて検討した。非セレギリン投与群では、黒質の TH 陽性細胞数及び線条体の TH 陽性神経線維密度は rAAV 接種 8 週まで経時的に減少した。rAAV 接種 3 日前よりセレギリン 10mg/kg を連日皮下投与すると、非セレギリン投与群と比べ黒質の TH 陽性細胞数及び線条体の TH 陽性神経線維密度の減少は rAAV 接種 8 週後及び 12 週後で有意に抑制された。次に、 $\alpha$ S の凝集体形成に対する MAO-B 阻害の効果を調べた。セレギリン投与群は rAAV 接種 2、4、8 週後で線条体の抗セリン 129

リン酸化  $\alpha$ S 抗体陽性凝集体の形成を有意に抑制した。MAO-B 阻害は  $\alpha$ S の神経毒性を抑制し凝集体形成を遅延させると考えられた。また、rAAV で野生型  $\alpha$ S をラット中脳黒質に発現させ、2 週間後に予め作製した  $\alpha$ S 凝集物を線条体に接種する  $\alpha$ S 細胞間伝播モデルにおいて、 $\alpha$ S 凝集物の接種 4 日後よりセレギリン 10mg/kg を連日皮下投与したところ、 $\alpha$ S 凝集物接種 6 週間後において線条体の抗セリン 129 リン酸化  $\alpha$ S 抗体陽性凝集体数は非セレギリン投与群より有意に低下した。MAO-B 阻害は  $\alpha$ S 凝集体の細胞間伝播をラットにおいて週単位で遅延させることが示唆された。

### 《考 察》

本研究は  $\alpha$ S 安定発現 SH-SY5Y 細胞株において、1) MAO-B 活性阻害は  $\alpha$ S の細胞外分泌を促進する、2) この分泌は ABC トランスポーターを含む経路を介している、3) MAO-B 阻害はライソゾーム機能障害によって生じる不溶性  $\alpha$ S を優先的に細胞外へ分泌し、不溶性  $\alpha$ S の細胞内蓄積を抑制することをはじめて見出した。これまで  $\alpha$ S はエクソソームを介した経路で細胞外に分泌されることが報告されている。ABC トランスポーターを介する経路とエクソソームとの関連は不明である。ABC トランスポーターは、形質膜またはライソゾームといった膜構造物に埋め込まれている。 $\alpha$ S の細胞外分泌に関わる ABC トランスポーターの細胞内局在を同定することでエクソソームとの関係が解明されることが考えられる。また、MAO-B 活性阻害が  $\alpha$ S の細胞外分泌を促進する機序は不明である。MAO-B 活性阻害により増加する多様なモノアミンが何らかの影響を及ぼす可能性があるが、この問題の解明には  $\alpha$ S 細胞外分泌を担う ABC トランスポーターの調節機構に関する知見を増やしていく必要がある。

本研究の動物実験は、MAO-B 阻害薬による  $\alpha$ S の神経毒性抑制及び凝集体形成の遅延効果をはじめて明らかにした。ラサギリンの臨床研究では、PD の進行を抑制する可能性が示唆されたが結論には至らなかった。PD は診断時に黒質線条体ドパミン神経細胞の約半数が脱落している。 $\alpha$ S 凝集体形成がまだ拡がっていない早期の段階で、MAO-B 阻害薬を投与すれば PD の進行抑制効果が得られるかもしれない。本研究の動物実験では、MAO-B

阻害が  $\alpha$ S の細胞外分泌を促進するか不明である。PD 進行抑制療法の開発を目指して、より詳細な解析を進めて MAO-B 阻害の効果を解明していく必要がある。

#### 《結 論》

MAO-B 阻害は *in vitro* で ABC トランスポーターを介して  $\alpha$ S 細胞外分泌を促進し、*in vivo* で  $\alpha$ S 凝集体形成を遅延させることが示唆された。

## 論文審査結果の要旨

Parkinson 病 (PD) は病理学的に黒質線条体ドパミン神経細胞の変性と  $\alpha$ -シヌクレイン ( $\alpha$ S) 凝集体の出現が特徴であり、神経細胞内における  $\alpha$ S の凝集過程及び凝集した  $\alpha$ S の細胞間伝播が PD の病態に深く関与している。しかし、 $\alpha$ S の凝集抑制療法はまだ開発されていない。本研究では多様な神経保護作用が知られているモノアミンオキシダーゼ (MAO) -B 阻害に着目し、MAO-B 阻害が  $\alpha$ S の代謝及び神経毒性に与える効果を検討した。

$\alpha$ S 安定発現 SH-SY5Y 細胞株において MAO-B 阻害薬セレギリンとラサギリン処理は  $\alpha$ S の細胞外分泌を促進した。siRNA による MAO-B のノックダウンでも  $\alpha$ S の細胞外分泌が促進された。MAO-B 阻害による  $\alpha$ S の細胞外分泌促進は ABC トランスポーター阻害薬によって抑制された。クロロキン処理によるライソゾーム阻害下においてセレギリンは界面活性剤不溶性  $\alpha$ S の細胞外分泌を促進し、細胞内の不溶性  $\alpha$ S の蓄積を抑制した。セレギリンによる不溶性  $\alpha$ S の細胞外分泌促進は ABC トランスポーター阻害薬によって抑制された。

アデノ随伴ウイルス (rAAV) で家族性 PD 変異 A53T- $\alpha$ S を中脳黒質に発現させたラットに MAO-B 阻害薬セレギリンを投与したところ、黒質線条体ドパミン神経細胞の変性が抑制され、抗セリン 129 リン酸化  $\alpha$ S 抗体陽性凝集体の形成が遅延した。rAAV-野生型  $\alpha$ S を中脳黒質に発現させ、その後  $\alpha$ S 凝集体を線条体に接種した  $\alpha$ S 細胞間伝播ラットモデルにおいて、セレギリン投与は抗 129 リン酸化  $\alpha$ S 抗体陽性凝集体の形成を遅延させた。

本研究では、MAO-B 阻害が *in vitro* で ABC トランスポーターを介して  $\alpha$ S 細胞外分泌を促進し、*in vivo* で  $\alpha$ S 凝集体形成及び細胞間伝播を遅延させることをはじめて明らかにした。MAO-B 阻害は、これまで着目されていなかった  $\alpha$ S の細胞外分泌に作用することで、PD の進行抑制に寄与する可能性が示唆された。

以上により、本論文は本学大学院学則第 13 条第 1 項に定めるところの博士 (医学) の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Journal of Neuroscience 41(35): 7479-7491, 2021 Sep

doi: 10.1523/JNEUROSCI.0476-21.2021.