

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

おかばやし さち
申請者氏名 岡林 佐知

アルツハイマー病 (AD) の主病変である老人斑 (SP) は、アミロイド前駆体蛋白 (APP) の切断によって産生されるアミロイド β 蛋白 ($A\beta$) の凝集沈着病変であり、この $A\beta$ の産生抑制または蓄積した $A\beta$ の効率的な除去が、AD 治療薬開発の焦点となっている。本研究では、アストログリアにおいて $A\beta$ 反応性に発現上昇することが確認されている LGI3 (Leucine-rich glioma inactivated 3) に着目し、その機能について詳細な検索を行った。

グリア細胞による $A\beta$ 貪食は、エンドサイトーシスと呼ばれる一連の膜融合輸送系によって支配されているため、第 1 章ではラットアストログリア初代培養系を用いて、LGI3 とエンドサイトーシスおよび $A\beta$ 貪食機能との関係について検索した。LGI3 は主に細胞膜近辺に確認され、エンドサイトーシス小胞の細胞内輸送を阻害したところ、LGI3 の小胞内蓄積が確認されたことから、LGI3 が実際にエンドサイトーシス経路に局在することが証明された。次に、LGI3 特異的 siRNA をラットアストログリア細胞に導入してノックダウン解析を行ったところ、 $A\beta$ 貪食が著しく低下したことから、LGI3 がアストログリアによる $A\beta$ 貪食機能に必須の因子であることが明らかになった。また、LGI3 のノックダウンは、トランスフェリンの細胞内取り込みも著しく低下させた。 $A\beta$ の取り込みとトランスフェリンの取り込みは異なるエンドサイトーシス経路によると考えられているため、LGI3 は $A\beta$ 貪食のみならず、エンドサイトーシス機能そのものに必須の因子である可能性が示唆された。

第 2 章では神経細胞における LGI3 の機能を明らかにするため、神経細胞系セルラインである Neuro2a 細胞を用いたノックダウン解析を行った。その結果、神経細胞においても LGI3 がエンドサイトーシスに必須の因子であることが明らかとなった。さらに、マウス脳組織を用いた検索の結果、LGI3 は in vivo においても神経細胞やグリア細胞の細胞膜を中心に発現しており、第 1 章での局在性と一致していた。次に、エンドサイトーシス関連蛋白であるクラスリンおよびフロチリン 1 と LGI3 との関係について検索したところ、LGI3 とクラスリンは細胞膜付近でのみ部分的に共在していたのに対し、フロチリン 1 は Neuro2a 細胞のみならずマウス脳組織においても LGI3 とほぼ完全に共在しており、マウス脳抽出物を用いた免疫沈降試験によって、LGI3 がフロチリン 1 と複合体を形成していることが証明された。また、Neuro2a 細胞を用いたノックダウン解析では、

LGI3 の発現抑制がフロチリン 1 の蛋白量減少を引き起こし、フロチリン 1 の発現抑制もまた LGI3 の蛋白量減少を誘導したことから、LGI3 とフロチリン 1 は、複合体を形成することによって蛋白構造の安定性を維持していることが示唆された。さらに、LGI3/F1o1 の発現抑制は APP の細胞内局在を変化させることで、A β 産生を低下させることが明らかとなった。

第 3 章では、SP や NFT が加齢性に再現されるカニクイザル脳組織を用いて、LGI3 と加齢性 AD 病変との関係について検索した。免疫染色の結果、カニクイザル脳組織においても第 1&2 章と同様の LGI3 局在およびクラスリンやフロチリン 1 との共在性が確認された。さらに、アストログリアに貪食された A β と LGI3 との細胞内共在も確認されたことから、*in vivo* でも LGI3 がアストログリアによる A β 貪食に関与していることが明らかになった。一方、SP と LGI3 との共在は認められず、LGI3 は SP 形成には関与していないと考えられた。カニクイザル脳抽出物を用いた生化学的検索の結果、脳内では加齢に伴い LGI3 が増加することが明らかとなった。カニクイザル脳組織では、加齢に伴いエンドサイトーシス機能が低下し、A β が蓄積することが確認されている。即ち、エンドサイトーシス機能低下とアストログリアによる LGI3 の発現量上昇が、複合的に LGI3 増加を促している可能性が示唆された。また、カニクイザル脳抽出物を用いた免疫沈降試験では、LGI3 とフロチリン 1・クラスリン双方との複合体形成が確認されたことから、LGI3 はクラスリン依存性経路と脂質ラフト依存性経路の双方に関与しているという第 1・2 章の考察を支持する結果が得られた。

本研究により、LGI3 はエンドサイトーシスという膜融合輸送機能を介することによって、アストログリア・神経細胞の双方において、AD 病態に深く関与していることが明らかとなった。これらのことから、LGI3 が AD 治療の新たな創薬ターゲットとなる可能性が示唆されたとともに、エンドサイトーシスという生理学的機能そのものの解明にも大きく貢献できたと考えた。よって審査委員一同は本論文が博士（獣医学）の学位を授与するに値するものと認めた。