

京都大学	博士 (医学)	氏名	林 貴大
論文題目	Involvement of mTOR pathway in neurodegeneration in NSF-related developmental and epileptic encephalopathy (NSF 関連発達性てんかん性脳症の神経変性における mTOR 経路の関与)		
(論文内容の要旨) 【緒言】 小胞輸送は様々な生理現象に不可欠であり、小胞と細胞膜の融合は N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor (SNARE) により調節される。神経細胞では、シナプス小胞とターゲットとなる細胞膜の SNARE 同士が複合体を形成し、神経伝達物質が放出される。AAA ファミリーATPase である N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) は六量体を形成して SNARE 複合体を解離させ、各 SNARE 分子は次の神経伝達物質放出に再利用される。 SNARE に関わる分子の異常は、てんかんと神経変性を特徴とする発達性てんかん性脳症 (developmental and epileptic encephalopathy, DEE) を引き起こす。近年、NSF 遺伝子のヘテロ接合性バリエントが DEE に関連することが報告されたが、その病態解明は十分でなく治療法も開発されていない。 【目的】 NSF 関連 DEE の病態を解明し、治療ターゲットとなる分子や経路を同定する。 【方法】 患者に同定されたバリエントを持つ NSF を神経分泌モデルである PC12 細胞に強制発現させ、分泌小胞やオートファジーを解析した。次に、患者由来 iPS 細胞から神経細胞を分化誘導し、解析を行った。 【結果】 3人の患者に3種類の <i>de novo</i> ヘテロ接合性バリエントを同定した。2バリエント (P563L と A459T) はバースト・サプレッション脳波を示す DEE を、1バリエント (E715K) は幼児期のみのもろ性対麻痺といった軽症の表現型に関連していた。 まず、PC12 細胞を用いて、カリウムによる放出刺激前後での小胞を免疫染色や電子顕微鏡により評価した。P563L と A459T 株 (DEE 株) では小胞膜蛋白が細胞表面に滞留し、刺激による小胞径の拡大も障害されていたが、野生型 NSF 強制発現により改善した。これらの結果から、NSF 関連 DEE ではシナプス小胞蛋白の再利用が障害されている可能性が示唆された。 次に、様々な神経変性と関連しその過程に膜融合が必要であるオートファジーについて評価した。DEE 株では、オートファジー活性化やオートライソゾーム形成が障害され、mTOR 経路は活性化していた。また、DEE 株では神経突起の変性を認めた。これらの現象は野生型 NSF 強制発現や mTOR 阻害剤であるラパマイシン投与により改善した。さらに、P563L 患者から樹立した iPS 細胞を神経細胞に分化させたところ、同様にオートファジー異常と神経突起の変性を認め、ゲノム編集による病的バリエントの修復やラパマイシン投与により改善した。これらの結果から、NSF 関連 DEE の神経変性において mTOR 経路の過剰な活性化が関与していると考えられる。 NSF が SNARE 複合体を解離させる機序として、各単量体の構造変化が隣接する単量体の構造変化を順に引き起こす rotary hydrolysis model が提唱されている。NSF の 563 番目のプロリンと 459 番目のアラニンは構造変化で大きく動く場所に位置しており、構造変化の伝播に重要である可能性が示唆された。六量体のうち1つでも構造変化が障害されると伝播が停止するため、DEE に関連するバリエントはドミナントネガティブ効果を持つと考えられる。 【結論】 NSF 関連 DEE では mTOR 経路依存的に小胞分泌やオートファジーが障害されており、mTOR 阻害剤が治療候補となる可能性を見出した。本研究により、DEE 病態や NSF 機能の理解がさらに深まったと考えられる。			

(論文審査の結果の要旨) 細胞膜融合における膜蛋白質の再利用に必須である N-エチルマレイミド感受性因子 (NSF) の異常は、発達性てんかん性脳症に関連する。本研究はその病態解明を目的とし、NSF 遺伝子バリエントの解析を行った。 病的バリエントを持つ NSF を導入した神経分泌モデル細胞では、小胞分泌刺激後に小胞膜蛋白質が細胞表面に停滞し、小胞径の拡大が障害されていた。これらから、小胞膜蛋白質の再利用が障害されていることが示唆された。また、病的バリエント導入細胞株や患者 iPS 細胞由来神経細胞において、オートファジー活性化およびオートリソソーム形成が障害され、神経突起がビーズ状変性を来していた。これらの現象は mTOR 阻害剤であるラパマイシン投与により改善したことから、NSF 関連発達性てんかん性脳症の病態には mTOR 経路が関与していることが示唆された。 NSF は環状 6 量体を形成し、構造変化が隣に伝わることで ATP を加水分解する。構造解析では、病的バリエントの位置は単量体 NSF の構造変化に関わる位置に存在し、構造変化の伝播を停止させる可能性が示唆された。従って、これらの病的バリエントはドミナントネガティブ効果を持つと考えられる。 本研究は NSF 関連発達性てんかん性脳症の病態メカニズムを明らかにし、mTOR 阻害剤が治療候補となる可能性を初めて見出した。これらは発達性てんかん性脳症の研究に寄与するところが多い。 したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。 なお、本学位授与申請者は、令和 6 年 1 月 18 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降