

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)	氏名	小川 弘太
学位授与の要件	学位規則第4条第1・2項該当		
論 文 題 目			
Mutant γ PKC that causes spinocerebellar ataxia type 14 upregulates Hsp70, which protects cells from the mutant's cytotoxicity (脊髄小脳失調症 14 型を引き起こす変異 γ PKC は Hsp70 の発現を上昇させ、変異 γ PKC の細胞毒性から保護する。)			
論文審査担当者			
主 査	教授	橋本 浩一	印
審査委員	教授	川上 秀史	
審査委員	准教授	丸山 博文	
〔論文審査の要旨〕			
<p>脊髄小脳失調症 14 型 (SCA14) の原因遺伝子として γPKC が同定されており、現在までに 20 種類以上の家系で異なる γPKC 遺伝子のミスセンス変異が報告されている。変異遺伝子から発現する変異 γPKC の機能異常が SCA 1 4 発症に重要な役割を果たしていると考えられるが、その詳細な機序は明らかでない。これまでの研究から、GFP 融合 SCA14 変異 γPKC (変異 γPKC-GFP) を培養細胞に発現させると、変異 γPKC の凝集体が形成され、細胞死が誘発されることが明らかとなっている。このような凝集体形成は、SCA 1 4 だけでなく、他の多くの神経変性疾患においても、観察される現象であり、神経変性疾患の共通の発症メカニズムではないかと考えられている。近年、神経変性疾患原因蛋白質の凝集体形成や細胞毒性が、heat shock protein (Hsp) などの分子シャペロンで抑制されると報告されている。本研究では、変異 γPKC の凝集体形成や細胞毒性における、分子シャペロンの役割について検討した。</p> <p>野生型 (WT)、変異 (S119P、G128D) γPKC-GFP を、アデノウイルスベクターを用いて SH-SY5Y 細胞に発現させ、培養二日後の細胞において分子シャペロンの Hsp40、Hsp70、Hsp90 の発現量を Western Blot で解析したところ、変異 γPKC-GFP を発現させた細胞では WT を発現させた細胞に比べて Hsp70 の発現が有意に増加していた。さらに、γPKC-GFP 発現 SH-SY5Y 細胞を抗 Hsp70 抗体で蛍光免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察し</p>			

たところ、変異 γ PKC-GFP 発現細胞では Hsp70 の発現増大が観察された。Hsp70 の発現増大は、変異 γ PKC-GFP の凝集体の有無にかかわらず観察された。また、Hsp70 は、変異 γ PKC-GFP の凝集体がある細胞では凝集体に集積していた。同様の結果は、初代培養マウスプルキンエ細胞を用いた検討でも確かめられた。

変異 γ PKC-GFP 発現 SH-SY 5Y 細胞における Hsp70 の発現増大の役割を検討するため、siRNA により Hsp70 の knock down を行った。Hsp70-siRNA により、変異型 γ PKC-GFP 発現量が有意に増大し、WT γ PKC-GFP でも増加傾向を示した。次に、その機序を明らかにするため、siRNA 処置により γ PKC-GFP の分解が影響を受けるかを検討した。 γ PKC-GFP 発現細胞において、tet-off システムにて γ PKC-GFP の発現を停止させ、24 時間後の γ PKC-GFP の残存量を検討したところ、変異 γ PKC-GFP は Hsp70-siRNA により、残存量が有意に増大しており、分解が抑制されることが明らかとなった。さらに、変異 γ PKC-GFP 発現細胞の凝集体形成を共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、Hsp70-siRNA を処置することで、変異 γ PKC-GFP の凝集体形成が有意に増強することが明らかとなった。最後に、LDH assay により細胞毒性を検討した。 γ PKC-GFP を発現していない細胞及び WT γ PKC-GFP 発現細胞では、Hsp70-siRNA を処置しても細胞毒性に影響がなかった。しかしながら、変異 γ PKC-GFP 発現細胞では、Hsp70-siRNA 処置により、細胞毒性が有意に増悪した。

以上の結果から、本論文は分子シャペロンの Hsp70 は変異 γ PKC の分解を促進し、その凝集体形成や細胞毒性から細胞を保護する役割を持つことを示し、Hsp70 は、SCA14 の治療標的となりうる可能性を示唆している。このことは、神経薬理学・神経内科学の研究領域において重要な知見となる。よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士(医学)の学位を授与するに十分な価値があるものと認めた。