

第 6 号様式

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 (薬学)	氏名	宮良 政嗣
学位授与の要件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
論 文 題 目			
パーキンソン病関連神経毒 MPP ⁺ によるリソソーム機能低下を介したオートファジー阻害			
論文審査担当者			
主 査	教授	小澤 孝一郎	印
審査委員	教授	紙谷 浩之	
審査委員	准教授	森岡 徳光	
〔論文審査の要旨〕			
<p>パーキンソン病 (PD) は、中脳の黒質に存在するドパミン神経の選択的脱落によって引き起こされる運動機能障害を主症状とする神経変性疾患である。PD 患者の脳内においてタンパク質凝集体の蓄積が認められることから、タンパク質分解異常が発症に関与すると考えられているが、未だ PD の原因解明には至っていない。オートファジーとは、オートファゴソームによって囲まれた細胞内成分をリソソームに導き、大規模に分解する細胞内分解機構である。近年、脳特異的オートファジー欠損マウスが神経変性疾患特有のタンパク質凝集体を伴う神経細胞死及び神経変性疾患様症状を示すことが明らかになり、神経変性疾患とオートファジーとの関係が注目されてきている。PD 関連神経毒 MPP⁺は、24 時間以内に有意な細胞死を引き起こす過激な曝露条件下 (SH-SY5Y 細胞においては数 mM) においてオートファゴソーム量の増加を引き起こすことが報告されているものの、その原因に関しては不明な点が多い。本研究では、PD における緩徐性神経細胞死を模倣した曝露条件下 (10 μM 及び 200 μM) において MPP⁺がオートファジーに及ぼす影響を明らかにすると共に、その原因となるメカニズムの解明を目指した。</p> <p>まず、低濃度 MPP⁺が細胞生存率に及ぼす影響を評価した。10 μM 及び 200 μM 曝露後、24 時間において細胞生存率に変化は認められなかったが、48 時間においては有意な低下が認められた。また、10 μM MPP⁺曝露による細胞生存率の低下は緩やかに進行し、8 日後には</p>			

約 57%に低下した。次に、低濃度 MPP⁺が細胞内オートファゴソーム量に及ぼす影響を評価した。低濃度 MPP⁺曝露後、24 時間においてオートファゴソームマーカータンパク質 LC3-II の量に変化は認められなかったが、48 時間においては有意な増加が認められた。また、オートファゴソームを示す LC3 ドット状構造の増加も認められた。オートファゴソーム量の増加は、オートファゴソーム生成促進または分解抑制のいずれかを示している。そこで、両者を区別する方法として広く用いられている LC3-II ターンオーバーアッセイを行った。低濃度 MPP⁺は、過剰量の bafilomycin A₁ (リソソーム分解阻害剤) 存在下において LC3-II の増加を引き起こさなかったことから、オートファゴソーム分解抑制を引き起こしていたことが示された。そこで、低濃度 MPP⁺がオートファジー選択的基質 p62/SQSTM1 の蓄積に及ぼす影響を評価した。低濃度 MPP⁺は、界面活性剤 (1% Nonidet P-40) 可溶性 p62/SQSTM1 の量に変化を及ぼさなかったが、凝集体型であると考えられる 1% Nonidet P-40 不溶性 p62/SQSTM1 の有意な蓄積を引き起こした。次に、オートファジーの下流において重要な役割を果たすリソソームの機能を評価した。低濃度 MPP⁺はリソソーム内酸性度に顕著な変化を及ぼさなかったが、代表的なリソソーム内加水分解酵素であるカテプシン D の活性を有意に低下させた。最後に、リソソーム生合成促進物質が低濃度 MPP⁺誘発オートファジー阻害及び細胞死に及ぼす影響を評価した。リソソーム生合成促進作用が報告されている trehalose 及び rapamycin は、低濃度 MPP⁺誘発オートファジー阻害及び細胞死を一部抑制した。

現在までに、高濃度 MPP⁺によるオートファジー誘導及び阻害の両者を示す報告が存在している。特に、阻害を示す報告において、高濃度 MPP⁺はリソソームの酸性化阻害や膜破壊など過激なリソソームダメージを介してオートファジーを阻害することが示唆されている。一方、本研究において、低濃度 MPP⁺は、過激なリソソームダメージではなく、リソソーム内加水分解酵素の弱い活性低下を介してオートファジーを阻害することが示された。また、リソソーム生合成促進物質を用いた研究から、これらの現象は低濃度 MPP⁺による緩徐性細胞死に関与することが示唆された。

以上の結果から、本論文は、リソソーム内加水分解酵素の「持続的な弱い活性低下」が PD 発症の本質的な原因である可能性を明らかにし、神経変性疾患の研究領域において新たな知見を得た。今後、リソソーム機能低下の詳細なメカニズムの解明によって、より選択的かつ強力な PD の新規治療ターゲット分子の同定が期待される。よって、審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士 (薬学) の学位を授与するに十分な価値があるものと認めた。