

# 論文内容要旨

低濃度 MPP<sup>+</sup>によるグルコース飢餓を介した  
オートファジー機構の異常

主指導教員：高野 幹久 教授  
(基礎生命科学部門 医療薬剤学)

副指導教員：杉山 政則 教授  
(未病・予防医学共同研究講座)

副指導教員：古武 弥一郎 准教授  
(応用生命科学部門 生体機能分子動態学)

坂本 修一郎

(医歯薬保健学研究科 薬科学専攻)

## 低濃度 MPP<sup>+</sup>によるグルコース飢餓を介したオートファジー機構の異常

平成 25 年度入学 坂本 修一朗

主指導教員 高野 幹久

### 【序論】

パーキンソン病(PD)は中脳黒質ドパミン神経の選択的脱落を特徴とする神経変性疾患である。その発症メカニズムに関しては、PD 関連神経毒 MPP<sup>+</sup>を用いた研究により多くの仮説が提唱されてきたが未だ解明されていない。これら仮説の多くは高濃度 MPP<sup>+</sup>曝露による急性細胞死の評価から提唱されている。しかし、PD 患者の脳内で起こる神経細胞死は慢性進行性であり、高濃度 MPP<sup>+</sup>曝露による急性細胞死が実際の病態を反映できていない可能性が考えられる。

PDの発症とオートファジー異常には密接な関係があると考えられている。オートファジーは不要な細胞質成分をリソソームにより分解する機構であり、飢餓を始めとする様々なストレスで誘導される。これまでに高濃度MPP<sup>+</sup>曝露(数 mM)により、オートファジーの過程で認められるオートファゴソームの分解阻害が報告されている。一方で、我々のグループでは従来よりも低濃度のMPP<sup>+</sup>曝露(10, 200 μM)による慢性進行性細胞死のメカニズム解明を行っており、高濃度MPP<sup>+</sup>曝露とは異なるメカニズムでオートファゴソーム分解を阻害することを報告した<sup>1)</sup>。しかしながら、低濃度MPP<sup>+</sup>曝露によるオートファジー機構に対する影響の全貌は不明である。本研究ではMPP<sup>+</sup>の低濃度曝露と高濃度曝露による細胞毒性を比較し、その結果見出された低濃度曝露によるグルコース飢餓ストレスがオートファジー機構へ及ぼす影響を評価した。

### 【結果】

#### MPP<sup>+</sup>が細胞生存率へ及ぼす影響

低濃度 MPP<sup>+</sup>(10, 200 μM)を細胞へ曝露した結果、48 時間後に有意な細胞生存率の低下が認められた。一方、高濃度 MPP<sup>+</sup>(2.5, 5 mM)曝露群においては、6 時間後で既に有意な細胞生存率の低下が認められた。

#### MPP<sup>+</sup>が細胞のグルコース消費へ及ぼす影響

培地中のグルコース量を測定した結果、低濃度曝露群において、200 μM MPP<sup>+</sup>では 24 時間後から有意なグルコース量の減少が認められ、10 μM MPP<sup>+</sup> では 36 時間後に有意な減少が認められた。一方で、高濃度曝露群ではグルコース量の有意な減少は認められなかった。

#### グルコース補給が MPP<sup>+</sup>毒性へ及ぼす影響

低濃度曝露群において細胞生存率の低下の開始と培地中グルコースの枯渇が同時に認められたため、グルコース補給による MPP<sup>+</sup>毒性への影響を確認した。その結果、低濃度曝露群ではグルコース補給により細胞生存率の低下が有意に抑制された。一方で、高濃度曝露群においては細胞生存率の変化が認められなかった。

#### グルコース補給が低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露によるオートファゴソーム分解阻害へ及ぼす影響

グルコース補給が低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露によるオートファゴソームの分解阻害へ及ぼす影響を評価した。その結果、グルコース補給は低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露による LC3-II (オートファゴソームマーカー)の発現上昇を有意に抑制した。p62 はオートファジーの選択的基質である。低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露が

オートファゴソーム分解を阻害した結果、p62 も細胞内に蓄積し、凝集する<sup>1)</sup>。グルコース補給は低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露による凝集体型 p62(1% NP-40 不溶性画分)の蓄積も有意に抑制した。

#### 低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露がオートファジー誘導へ及ぼす影響

オートファジーは飢餓に応答して誘導される。そこで、低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露によるグルコース飢餓がオートファジーを誘導するか否かを検討した。ウェスタンブロット解析の結果、グルコース飢餓によるオートファジー誘導時に認められるリン酸化 AMPK の増加とリン酸化 mTOR の減少が認められた。また、それらはグルコース補給により抑制された。更に、細胞蛍光免疫染色により、オートファジー誘導時にのみ認められる ATG16L のドット状構造の増加も認められた。これらの変化は、MPP<sup>+</sup>曝露後 36 時間で既に認められた。

#### オートファジー誘導の抑制が低濃度 MPP<sup>+</sup>毒性へ及ぼす影響

ATG5 はオートファジーの進行に重要なタンパク質であり、ATG5 の発現抑制によりオートファジー誘導を阻害することができる。siRNA を用いた ATG5 ノックダウンは低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露による LC3-II のタンパク質発現上昇を抑制した。更に、ATG5 ノックダウンにより、低濃度曝露による細胞生存率の低下が有意に抑制された。また、オートファジー誘導阻害剤である 3-Methyladenine と MPP<sup>+</sup>の併用においても同様に細胞生存率の低下の有意な抑制が認められた。

#### **【総括】**

MPP<sup>+</sup>の低濃度曝露と高濃度曝露では異なるメカニズムで細胞死が誘導され、低濃度曝露ではグルコース飢餓依存的な細胞死が誘導されることが明らかとなった。更に、低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露による細胞死には、グルコース飢餓を介したオートファジー誘導とオートファゴソーム分解阻害の併発が関与することも示唆された。今後、PD 発症におけるオートファジー異常のメカニズム解明に繋がることを期待できる。

#### **【参考文献】**

- 1) Miyara et al. J Neurochem. 2016; 139; 294-308.