

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（薬科学）	氏名	坂本 修一朗
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目			
低濃度 MPP ⁺ 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			
論文審査担当者			
主査	教授 小澤 孝一郎	印	
審査委員	教授 樋木 修		
審査委員	教授 森岡 徳光		
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>パーキンソン病（PD）は中脳黒質に局在する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。PD の発症メカニズムに関しては、PD 関連化学物質である MPP⁺を用いた研究により多くの仮説が提唱されてきた。しかしながら、未だに PD の発症メカニズムの全容は不明である。これまでの MPP⁺研究による仮説は、高濃度（数 mM）・短期間曝露による急性細胞死の評価から提唱されている。一方で、PD 患者の脳内で認められる神経細胞死は慢性進行性であるため、従来の高濃度 MPP⁺曝露による急性細胞死が実際の病態を正確に反映できていない可能性が考えられる。そこで従来よりも低濃度の MPP⁺曝露（10, 200μM）による慢性進行性細胞死の発症メカニズム解明を目指した。</p> <p>まず、低濃度 MPP⁺による毒性の特徴を見出すために、低濃度及び高濃度 MPP⁺曝露による細胞生存率への影響を比較した。その結果、低濃度 MPP⁺曝露後 48 時間に有意な細胞生存率の低下が認められた。一方、高濃度 MPP⁺（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。次に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⁺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⁺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。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⁺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。以上の結果から、MPP⁺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。</p> <p>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。また、過去に低濃度の MPP⁺曝露（10, 200 μM）がオートファ</p>			

ゴソーム（オートファジーの過程で認められる構造物）の分解を阻害することが報告されている。そこで次に、低濃度 MPP+曝露によるグルコース飢餓がオートファジー機構へ及ぼす影響を評価した。

始めに、グルコース補給が低濃度 MPP+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+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+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。グルコース補給は低濃度 MPP+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。

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+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 m TOR 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。次に、低濃度 MPP+曝露によるグルコース飢餓を介したオートファジー誘導が細胞死に関与するか否かの確認を行なった。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+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+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。以上の結果から、低濃度 MPP+曝露によるグルコース飢餓は、オートファジー誘導とオートファゴソーム分解抑制を併発させることが明らかとなった。また、これらオートファジー機構の異常が低濃度 MPP+曝露による細胞死に関与することも示唆された。

以上、本論文は、MPP+は曝露濃度により異なるメカニズムで細胞死を誘導することを明らかにした。更に、従来濃度（高濃度）よりも正確な病態の反映が期待できる低濃度曝露において、グルコース飢餓依存的な細胞死を誘導すること、このグルコース飢餓がオートファジー機構に異常をもたらすことを明らかにした。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。よって、審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士（薬科学）の学位を授与するに十分な価値があるものと認めた。