

論文内容要旨

Synphilin-1 has neuroprotective effects on MPP⁺-induced Parkinson's disease model cells by inhibiting ROS production and apoptosis

(Synphilin-1 は MPP⁺を用いたパーキンソン病モデル細胞において、活性酸素産生やアポトーシスを抑制することによる神経細胞保護作用を有している。)

Neuroscience Letters, 690(1): 145-150, 2019, in press.

主指導教員：丸山 博文教授

(医歯薬保健学研究科 脳神経内科学)

副指導教員：栗栖 薫教授

(医歯薬保健学研究科 脳神経外科学)

副指導教員：細見 直永准教授

(医歯薬保健学研究科 脳神経内科学)

宍戸 丈郎

(医歯薬学総合研究科 創生医科学専攻)

パーキンソン病はアルツハイマー病に次ぎ 2 番目に多い原因不明の神経変性疾患である。病理学的には、選択的に中脳のドパミン産生神経細胞が脱落し、細胞内封入体であるレビー小体が形成されることが知られている。レビー小体の主要な構成成分は α -synuclein であり、その結合蛋白として Synphilin-1 は同定された。レビー小体内で α -synuclein が周辺部に存在するのに対し、Synphilin-1 はレビー小体の中心部に存在しているが、その機能についてはまだ解明されていない。本研究では、Synphilin-1 がパーキンソン病発症において、神経保護的に機能するのか、もしくは神経細胞死を惹起する方向に機能するのかを *in vitro* の系で検討した。方法として、我々はまずドパミン系神経細胞として使用される SH-SY5Y 細胞を用いて Synphilin-1 安定発現株を作成した。パーキンソン病モデル細胞として、生体内でドパミン細胞死を起し、パーキンソン症状を惹起する 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)の代謝産物であり、ドパミン細胞死を *in vitro* でも惹起する 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺)を用いて細胞を処理した。Synphilin-1 の MPP⁺による神経細胞死に対する効果を調べるため、Synphilin-1 発現細胞株とコントロール細胞株を MPP⁺で処理し、トリパンブルー染色で細胞の生存率を評価した。MPP⁺投与 12 時間後の細胞生存率はコントロール群で $75.3\% \pm 1.97$ 、Synphilin-1 群で $89.6\% \pm 1.13$ であり、Synphilin-1 により細胞死が有意差をもって抑制された ($P=0.0009$)。次に MPP⁺投与後の核の形態を評価したところ、MPP⁺投与によりアポトーシスの際に認められる核の断片化や凝集化が Synphilin-1 群で有意に抑制された (コントロール群 $34.5\% \pm 3.68$ 、Synphilin-1 群 $16.6\% \pm 1.32$ 、 $P=0.0001$)。次に Synphilin-1 がアポトーシス経路を抑制するかを確認するために、MPP⁺投与 24 時間後の細胞を回収し、Western blotting 法にて、アポトーシスマーカーである cleaved caspase-3 と cleaved poly-ADP-ribose polymerase (PARP)の蛋白発現を定量化し比較した。その結果、Synphilin-1 群で cleaved caspase-3、cleaved PARP の蛋白発現がともに有意に抑制された (cleaved caspase-3:コントロール群 12.37 ± 1.44 、Synphilin-1 群 5.87 ± 1.26 、 $P=0.0115$ 、cleaved PARP:コントロール群 36.8 ± 6.34 、Synphilin-1 群 17.29 ± 3.28 、 $P=0.0203$)。さらに 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA) fluorescent probe を用いて、MPP⁺による細胞内の活性酸素の産生について検討を行った。その結果、MPP⁺投与 24 時間後、Synphilin-1 群で活性酸素の産生がコントロール群に比し有意に抑制された(コントロール群 159.4 ± 11.6 、Synphilin-1 群 136.1 ± 4.41 、 $P=0.0097$)。またミトコンドリアの機能障害の評価として、シトクローム C の細胞質内への放出を評価した。MPP⁺を投与し、それぞれの細胞から細胞質内分画とミトコンドリア分画を抽出し、Western blotting 法でシトクローム C の発現を評価したところ、Synphilin-1 群で MPP⁺投与により誘導される細胞質内へのシトクローム C の放出が抑制された。以上の結果より、Synphilin-1 は MPP⁺による神経細胞死を抑制し、その機序としてアポトーシス経路が抑制されることが示唆された。Synphilin-1 により活性酸素の産生が抑制されていることから、アポトーシス経路の早期の段階で保護的に機能している可能性がある。これらの結果から、Synphilin-1 はパーキンソン病において、活性酸素産生やアポトーシス経路を抑制することにより、神経細胞保護的に機能している可能性が示唆された。