

## 論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（ 医学 ）	氏名	宍戸 丈郎
学位授与の条件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
論文題目			
Synphilin-1 has neuroprotective effects on MPP <sup>+</sup> -induced Parkinson's disease model cells by inhibiting ROS production and apoptosis (Synphilin-1 は MPP <sup>+</sup> 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。)			
論文審査担当者			
主 査 教 授	酒井 規雄	印	
審査委員 教 授	川上 秀史		
審査委員 准教授	飯田 幸治		
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>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 <math>\alpha</math>-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 <math>\alpha</math>-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あるが、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 の機能や生化学的特性を明らかにすることを目的とし、パーキンソン病において、synphilin-1 に神経保護作用があるのか、神経毒性作用があるのかを、パーキンソン病モデル細胞を用いて検討した。</p> <p>方法として、パーキンソン病モデル細胞作製のために、生体内でドパミン細胞死を起こし、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 <i>in vitro</i> でも惹起する 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>)を使用した。MPP<sup>+</sup>による神経毒性に対する synphilin-1 の機能解明のために、ヒト神経芽細胞腫由来の SH-SY5Y で synphilin-1 安定発現株を作成し、実験を行った。Synphilin-1 の MPP<sup>+</sup>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<sup>+</sup>で処理し、トリパンブルー染色で細胞生存率を評価した。MPP<sup>+</sup>投与 12 時間後の細胞生存率はコントロール群で 75.3%±1.97、synphilin-1 群で 89.6%±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<sup>+</sup>投与より誘導されるアポトーシス経路を synphilin-1 が抑制するかを検討した。MPP<sup>+</sup>投与後のアポトーシス様の核の形態変化を評価したところ、synphilin-1 群で有意に抑制された(コントロール群 34.5%±3.68、synphilin-1 群 16.6%±1.32、P=0.0001)。また synphilin-1 がアポトーシス経路における主要な蛋白質である cleaved caspase3 と cleaved poly-ADP-ribose polymerase (PARP)の</p>			

発現を抑制するのかを確認するために、MPP<sup>+</sup>投与 24 時間後の細胞を回収し、Western blotting 法にて、これら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 synphilin-1 がアポトーシス経路のどの過程を抑制するのかを解明するために、活性酸素の産生と、ミトコンドリア機能障害の指標となるシトクローム C のミトコンドリアから細胞質への放出を評価した。2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA) fluorescent probe を用いて、MPP<sup>+</sup>による細胞内の活性酸素産生について検討を行ったところ、MPP<sup>+</sup>投与 24 時間後、synphilin-1 群で活性酸素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 MPP<sup>+</sup>投与後に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<sup>+</sup>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、SH-SY5Y 細胞に synphilin-1 を強発現させると、MPP<sup>+</sup>による活性酸素産生とミトコンドリア機能障害が抑制されることが示された。

本研究は synphilin-1 がパーキンソン病モデル細胞においてミトコンドリア機能を維持しアポトーシスの初期段階を抑制し、細胞保護的に働くことを示しており、パーキンソン病におけるドパミン産生神経細胞死に対しても synphilin-1 がミトコンドリア機能を維持しアポトーシス誘導を抑え、神経保護作用を発揮する可能性が示唆され、パーキンソン病の病態解明の一翼を担う可能性を示した。

よって審査委員会委員全員は、本論文が申請者に博士（医学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。

最終試験の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（ 医学 ）	氏名	宍戸 丈郎
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目			
Synphilin-1 has neuroprotective effects on MPP <sup>+</sup> -induced Parkinson's disease model cells by inhibiting ROS production and apoptosis (Synphilin-1 は MPP <sup>+</sup> 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。)			
最終試験担当者			
主査	教授	酒井 規雄	印
審査委員	教授	川上 秀史	
審査委員	准教授	飯田 幸治	
〔最終試験の結果の要旨〕			
判 定 合 格			
<p>上記3名の審査委員会委員全員が出席のうえ、平成31年1月7日の第77回広島大学研究科発表会（医学）及び平成31年1月8日本委員会において最終試験を行い、主として次の試問を行った。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1 各実験でのMPP<sup>+</sup>投与時間、投与量の違いについての見解</li> <li>2 MPTP投与動物においてレビー小体形成がないこととの関連性</li> <li>3 レビー小体内のsynphilin-1の臨床的意義</li> <li>4 レビー小体内でsynphilin-1が中心部、α-synucleinが辺縁部に局在する意義</li> <li>5 MPP<sup>+</sup>によるオートファジーへの影響との関連</li> </ol> <p>これらに対して極めて適切な解答をなし、本委員会が本人の学位申請論文の内容及び関係事項に関する本人の学識について試験した結果、全員一致していずれも学位を授与するに必要な学識を有するものと認めた。</p>			