

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	NAZERE KEYOUMU
学位授与の条件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
論文題目 Amyloid Beta Is Internalized via Macropinocytosis, an HSPG- and Lipid Raft-Dependent and Rac1-Mediated Process (アミロイドベータは HSPG および脂質ラフト依存性に Rac1 が媒介するマクロピノサイトーシスの経路により内在化される)			
論文審査担当者			
主査	教授	相澤 秀紀	印
審査委員	教授	岡本 泰昌	
審査委員	准教授	齋藤 敦	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>アルツハイマー病は最も頻度の高い認知症疾患であるが、その根本的治療法は存在しない。神経細胞外に存在する老人斑はその病理学的な特徴の一つであり、その主成分は 42 個のアミノ酸からなるアミロイド β ペプチド ($A\beta 42$) である。$A\beta$ は容易に不溶化し、老人斑としての脳内沈着を介しアルツハイマー病の病態が進行する (アミロイド仮説)。一方、不溶化した $A\beta$ に加え、オリゴマー化した可溶性の $A\beta$ ($oA\beta 42$) も神経細胞を障害する作用を有すること、さらに $oA\beta 42$ が細胞内にも存在することが最近明らかにされている。細胞内に $oA\beta 42$ が存在する機序については、①細胞内で産生された $oA\beta 42$ が先に細胞内 $A\beta 42$ として蓄積した後に細胞外に排出され不溶性の老人斑として蓄積する、もしくは②細胞外で産生された可溶性 $oA\beta 42$ が老人斑の形成後も残存して細胞内に取り込まれるという 2 つの可能性が考えられる。本研究では、後者に着目し、特定のエンドサイトーシス機構が $oA\beta 42$ の内在化に関与しているか細胞実験系をもちい検討した。</p> <p>蛍光標識された合成 $A\beta 42$ をオリゴマー化し、$oA\beta 42$ を作成した。実験対照として、モノマー化した $A\beta 42$ ($mA\beta 42$) をもちいた。異なる濃度・時間で、$mA\beta 42$ ならびに $oA\beta 42$ を神経系の Neuro2A、SH-SY5Y 細胞株に添加し、細胞内の $A\beta 42$ 取り込みを蛍光顕微鏡で観察し定量した。$oA\beta 42$ の取り込みに、膜ドメインである脂質ラフトが関与するのかを明らかにするため、シクロデキストリン ($M\beta CD$) をもちいてラフトをあらかじめ崩壊させたのち、同様の実験を行った。さらに、細胞表面に存在するヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) の関与を明らかにするため、HSPG の阻害剤ヘパリン投与ならびにトリプシン処理より HSPG を切断する前処置を行ったのち、同様の実験を行った。最後に、脂質ラフトや HSPG が関与するエンドサイトーシスの下流の制御因子として低分子量 GTPase である ADP リボシル化因子タンパク質 6 (Arf6) や Rac1 が関与することから、$oA\beta 42$ 投与後の Arf6、Rac1 の活性を吸光度ベースの活性化アッセイにより経時的に測定した。</p> <p>結果は次のごとくまとめられる：Neuro2A 細胞は濃度および時間依存的に $oA\beta 42$ を内在化した。内在化した $oA\beta 42$ の量は、$mA\beta 42$ のそれと比較して有意に高かった。エンドサイトーシスの様式の一つであるマクロピノサイトーシス (MP) を標識するデキストランと共に $oA\beta 42$ を Neuro2A 細胞ならびに SH-SY5Y 細胞に投与したところ、デキストランと $oA\beta 42$ は細胞内で共局在し、MP 阻害剤である ethyl-isopropyl amiloride ならびに Wortmannin 処理を行ったところ $oA\beta 42$ の内在化は抑制された。さらに、脂質ラフトを崩壊させる条件、ならびに HSPG をヘパリンで阻害もしくはトリプシンで切断した条件下で $oA\beta 42$ の内在化が阻害された。MP の際は低分子量 GTPase の Arf6 や Rac1 の活性が一過性に上昇する。そこで、$oA\beta 42$ 投与後にそれらの活性を測定したところ、Arf6 活性に有意な変化は見られなかった一方、Rac1 の活性が 7 分後に 3.0 倍上昇した。さらに、Arf6、Rac1 それぞれの阻害剤を使用した実験では、後者でのみ Neuro2A 細胞における $oA\beta 42$ の内在化が 61.4%減少した。</p> <p>以上の結果から、$oA\beta 42$ は、脂質ラフト、HSPG 依存性に Rac1 制御性の MP により細胞に取り込まれることが明らかとなった。本論文は、$oA\beta 42$ の内在化機序の一端を明らかにし、得られた知見は MP を標的としたアルツハイマー病治療法開発</p>			

の礎となり得るものである。よって審査委員会委員全員は、本論文が NAZERE 氏に博士（医学）の学位を授与するに十分な価値があるものと認めた。