

氏 名（本籍）	こ 小 ばやし 林 みち 理 こ 子
学 位 の 種 類	博 士（医 学）
学 位 記 番 号	医 博 第 2 2 3 5 号
学位授与年月日	平 成 17 年 3 月 25 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 専 攻	東北大学大学院医学系研究科 （博士課程）医科学専攻
学 位 論 文 題 目	$\alpha$ -synuclein 過剰発現モデルにおける蛋白凝集体 形成と細胞死の関連

（主 査）

論 文 審 査 委 員	教授 糸 山 泰 人	教授 阿 部 俊 明
	教授 大 隅 典 子	

## 論文内容要旨

$\alpha$ -synuclein 蛋白はパーキンソン病やアルツハイマー病、多系統萎縮症などで病理学的特徴とされる Lewy 小体, Lewy neurites, glial cytoplasmic inclusion (GCI) の主要構成成分でありその構造変化がパーキンソン病などのシヌクレイノパチーにおける神経細胞死に何らかの影響を及ぼしていると考えられてきた。最近の知見から様々な reactive oxygen species (ROS) と  $\alpha$ -synuclein との相互作用がシヌクレイノパチーの発病, 進行に重要な役割を持つことが示唆されているが,  $\alpha$ -synuclein 蛋白の病的代謝過程はまだ明らかでなく, 細胞内凝集体の病的意義も明らかにされていない。

本研究では  $\alpha$ -synuclein を過剰発現させた SH-SY5Y 細胞に様々な ROS を作用させ  $\alpha$ -synuclein 細胞内凝集体モデルを作成した。次にこのモデルを使い, さらに redox inactive な三価鉄を添加またはキレートすることにより細胞内凝集体形成を促進または抑制し, 免疫組織学的手法や MTT assay 法を用いて, 細胞内凝集体形成と神経細胞死との関連について検討した。

得られた細胞内凝集体は ubiquitin, nitrotyrosine, Hsp27,  $\alpha$ -B crystallin 陽性, thioflavin S 染色陽性で Lewy 小体や GCI 類似の性質を再現していることが確認された。また, 一酸化窒素 (NO) と rotenone 同時曝露下でさらに三価鉄を添加するとこの凝集体形成は促進され, caspase 3 の活性化は抑制された。三価鉄をキレートすると凝集体形成は抑制され, caspase 3 が活性化された。二重免疫染色の結果, 凝集体陽性細胞では caspase 3 活性化が認められなかった。

以上のことから  $\alpha$ -synuclein 細胞内凝集体形成は ROS 曝露下においてはむしろ細胞保護的に働くことが示唆された。 $\alpha$ -synuclein 蛋白は fibril 構造をもつ凝集体を形成する過程でより細胞毒性の強い中間体, protofibril を形成することが知られている。本モデルにおいては, 凝集体形成が促進されることにより ROS 曝露で生じた protofibril がより毒性の低い fibril 構造に導かれ, 細胞保護性を示したと推察された。

$\alpha$ -synuclein 凝集体形成は ROS 存在下では細胞保護的に働くことがわかった。シヌクレイノパチーにおける封入体形成も同様に細胞保護的機序で形成されている可能性がある。

## 審査結果の要旨

$\alpha$ -synuclein 蛋白はパーキンソン病やアルツハイマー病、多系統萎縮症などで病理学的特徴とされる Lewy 小体, Lewy neurites, glial cytoplasmic inclusion (GCI) の主要構成成分でありその構造変化がパーキンソン病などのシヌクレイノパチーにおける神経細胞死に何らかの影響を及ぼしていると考えられてきた。最近の知見から様々な reactive oxygen species (ROS) と  $\alpha$ -synuclein との相互作用がシヌクレイノパチーの発病、進行に重要な役割を持つことが示唆されているが、 $\alpha$ -synuclein 蛋白の病的代謝過程はまだ明らかでなく、細胞内凝集体の病的意義も明らかにされていない。

本研究では  $\alpha$ -synuclein を過剰発現させた SH-SY5Y 細胞に様々な ROS を作用させ  $\alpha$ -synuclein 細胞内凝集体モデルを作成した。次にこのモデルを使い、さらに redox inactive な三価鉄を添加またはキレートすることにより細胞内凝集体形成を促進または抑制し、免疫組織学的手法や MTT assay 法を用いて、細胞内凝集体形成と神経細胞死との関連について検討した。

得られた細胞内凝集体は ubiquitin, nitrotyrosine, Hsp 27,  $\alpha$ -B crystallin 陽性, thioflavin S 染色陽性で Lewy 小体や GCI 類似の性質を再現していることが確認された。また、一酸化窒素 (NO) と rotenone 同時曝露下でさらに三価鉄を添加するとこの凝集体形成は促進され、caspase 3 の活性化は抑制された。三価鉄をキレートすると凝集体形成は抑制され、caspase 3 が活性化された。二重免疫染色の結果、凝集体陽性細胞では caspase 3 活性化が認められなかった。

以上のことから  $\alpha$ -synuclein 細胞内凝集体形成は ROS 曝露下においてはむしろ細胞保護的に働くことが示唆された。 $\alpha$ -synuclein 蛋白は fibril 構造をもつ凝集体を形成する過程でより細胞毒性の強い中間体, protofibril を形成することが知られている。本モデルにおいては、凝集体形成が促進されることにより ROS 曝露で生じた protofibril がより毒性の低い fibril 構造に導かれ、細胞保護性を示したと推察された。

$\alpha$ -synuclein 凝集体形成は ROS 存在下では細胞保護的に働くことがわかった。シヌクレイノパチーにおける封入体形成も同様に細胞保護的機序で形成されている可能性がある。

よって、本論文は博士 (医学) の学位論文として合格と認める。