

京都大学	博士（医学）	氏名	山川健太郎
論文題目	Dopamine facilitates α -synuclein oligomerization in human neuroblastoma SH-SY5Y cells (ドパミンはヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞において α シヌクレインオリゴマー形成を促進する)		
(論文内容の要旨)			
<p>【背景】パーキンソン病は中脳黒質ドパミン作動性ニューロンの選択的細胞死を特徴とする神経変性疾患である。病理学的には線維状に凝集した α シヌクレインを主成分とする細胞内封入体（レヴィ小体）がドパミン作動性ニューロン内に出現する。α シヌクレイン遺伝子の二重複、三重複、点突然変異によって家族性パーキンソン病が発症するが、これらの遺伝子変異はいずれも α シヌクレインの凝集を促進させるものと考えられている。α シヌクレインがどのような細胞毒性を有しているかは不明であるが、近年、部分的に凝集した α シヌクレイン（α シヌクレインオリゴマー）に細胞毒性があるとの仮説が提唱されている。ドパミンは試験管内で精製 α シヌクレインのオリゴマー形成を促進させることが知られているが、培養細胞でこのことは十分に検証されていない。</p> <p>【目的】本研究では始めに培養細胞内で α シヌクレインオリゴマーを検出する方法を確立できるか検討する。次に細胞にドパミンを負荷した時にオリゴマー形成が促進されるか否かを検証し、さらにオリゴマーに毒性があるか否かを検証する。</p> <p>【方法】α シヌクレインを恒常過剰発現させた SH-SY5Y 細胞を実験に用いた。オリゴマーの検出は、細胞溶解液をサイズ排除クロマトグラフィーで分取した後にウェスタンブロットで行なった。LDH 放出量の測定により細胞毒性の評価を行なった。アポトーシスの評価はウェスタンブロットによる活性型カスパーゼ 3 の検出にて行なった。</p> <p>【結果】サイズ排除クロマトグラフィーとウェスタンブロットを組み合わせることで細胞内の 4 量体までの α シヌクレインオリゴマーを検出することができた。α シヌクレインを過剰発現させた SH-SY5Y 細胞をドパミン（100 μM）に 6 時間曝露したところオリゴマー量が明らかに増加した。同じサンプルをサイズ排除クロマトグラフィーで分離せずウェスタンブロットのみで検出したところ、ドパミンによるオリゴマー量の増加を検知できなかった。このことよりサイズ排除クロマトグラフィーによる前処理が微量のオリゴマー量の変化の検出に有用であることが示された。細胞をドパミンに 6 時間曝露した後、ドパミンを含まない培地でさらに 24 時間培養しても、細胞内の増加したオリゴマー量に変化はみられなかったが、この時 LDH 放出量の増加やカスパーゼ 3 の活性化は観察されなかったため、細胞死、アポトーシスとも生じなかったものと考えられた。</p> <p>【考察】本研究では、培養細胞における高感度の α シヌクレインオリゴマーの検出方法を確立することができた。この方法は剖検脳や実験動物サンプルへの応用も可能であり、今後のパーキンソン病研究に寄与するところがあるものと考えられた。ドパミンが培養細胞においても α シヌクレインオリゴマー形成を促進することが確認されたことから、患者脳においてドパミンが α シヌクレイン凝集の危険因子になる可能性があることが示唆された。ドパミンによって形成された α シヌクレインオリゴマーは少なくとも短時間のうちに細胞死やアポトーシスを引き起こすことはなく、このこと</p>			

は今後 α シヌクレインがどのような細胞毒性を持つか解明する上で、重要な知見を与えるものと考えられた。

【結論】サイズ排除クロマトグラフィーによる前処理を行なうことで、ウェスタンブロットでの α シヌクレインオリゴマーの検出感度をより高めることができる。ドパミンは SH-SY5Y 細胞において、 α シヌクレインオリゴマー形成を促進する。ドパミン負荷により形成された α シヌクレインオリゴマーは、少なくともその後 24 時間にわたり細胞内に存続するが、細胞死もアポトーシスも惹起しない。

(論文審査の結果の要旨)

パーキンソン病における中脳黒質ドパミン作動性ニューロンの選択的細胞死に、 α シヌクレイン凝集とドパミンが重要な役割を果たしていると考えられている。 α シヌクレインがどのような毒性を有するかは不明であるが、近年、部分的に凝集した α シヌクレイン（ α シヌクレインオリゴマー）に細胞毒性があるとの仮説が提唱されている。本研究では、培養細胞内の α シヌクレインオリゴマーを高感度に検出する方法を確立し、その上で細胞内におけるドパミンと α シヌクレイン凝集との関係、また α シヌクレインオリゴマーと細胞毒性との関係について検討した。実験には α シヌクレインを恒常過剰発現させた SH-SY5Y 細胞を用いた。サイズ排除クロマトグラフィーとウェスタンブロットを組み合わせることで、細胞内の 4 量体までのオリゴマーを検出することができた。細胞をドパミン（100 μ M）に 6 時間曝露したところ、オリゴマー量が明らかに増加し、ドパミンが α シヌクレイン凝集の促進要因である可能性が示唆された。細胞をドパミンに 6 時間曝露した後、ドパミンを含まない培地でさらに 24 時間培養しても、細胞内の増加したオリゴマー量に変化はみられなかったが、この時 LDH 放出量の増加やカスパーゼ 3 の活性化は観察されず、ドパミンによって形成されたオリゴマーが、短時間の内には細胞死やアポトーシスを生じさせない可能性が示唆された。

以上の研究はドパミンおよび α シヌクレインの毒性解明に貢献し、パーキンソン病の研究に寄与するところが多い。したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものとする。なお、本学位授与申請者は、平成 22 年 1 月 14 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降