

氏 名	間 藤 尚 美
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	論医博第 1852 号
学位授与の日付	平成 16 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	Overexpression of CYP2D6 Attenuates the Toxicity of MPP ⁺ in Actively Dividing and Differentiated PC12 Cells (チトクローム P450 2D6 の過剰発現は活発に分裂するおよび分化した PC12 細胞に対する MPP ⁺ の毒性を軽減する)
論文調査委員	(主査) 教授 成 宮 周 教授 中 村 孝 志 教授 鈴 木 茂 彦

論 文 内 容 の 要 旨

パーキンソン病 (PD) は多因子疾患で、遺伝的素因や環境因子が発症に関与していると考えられている。遺伝的素因については、一部は α シヌクレインやパーキン遺伝子の変異により家族性に発症するが、孤発例においても、発症に遺伝的危険因子の関与が示唆されている。このうちチトクローム P450 2D6 (CYP2D6) 遺伝子が PD の発症に関与していることが、マイクロサテライト多型を用いたわれわれの解析によって明らかになった。一方、環境因子としては、神経毒の関与が示唆されているが、このうち MPTP およびその代謝物 MPP⁺ は、実験的 PD を引き起こす薬物として知られている。本研究は、こうした PD 発症における遺伝的素因と神経毒の関係を明らかにする目的でおこなわれた。

I. ヒト CYP2D6 遺伝子導入 PC12 細胞におけるチトクローム P450 酵素活性の測定

ヒト CYP2D6 cDNA を pcDNA3.1 (-) プラスミドに組み込み、発現ベクターを作成した。この発現ベクターを PC12 細胞にトランスフェクションした後、G418 によるセレクションにてヒト CYP2D6 安定発現細胞株を樹立した。CYP2D6 は主に小胞体に局在しており、精製したミクロゾーム分画に対して、チトクローム P450 酵素活性を測定した。酵素活性は CYP2D6 の代表的な基質である Debrisoquine を ¹⁴C 標識したものをを用い、代謝産物を HPLC にて分析した。これによって CYP2D6 発現細胞におけるチトクローム P450 酵素活性を確認した。

II. MPTP および MPP⁺ の細胞毒性に対する CYP2D6 の保護効果

細胞毒性を MTT 法にて評価したところ、MPP⁺ は MPTP に比較して、PC12 細胞に対する強い細胞毒性を示した。また、神経分化型 PC12 細胞は、未分化型よりも MPP⁺ に対して強い感受性を示した。さらに、ヒト CYP2D6 過剰発現により、MPP⁺ による細胞傷害は軽減したが、その効果は CYP2D6 陽性細胞の比率と相関した。

III. MPP⁺ によるミトコンドリアでの活性酸素の産生亢進と CYP2D6 による軽減効果

ミトコンドリアにおける活性酸素の産生を、還元型 Mitotracker の酸化による蛍光発色により解析した。その結果、MPP⁺ 暴露により PC12 細胞のミトコンドリアにおける蛍光強度の上昇、すなわち活性酸素の産生亢進を認めた。この変化は CYP2D6 過剰発現により軽減した。

以上の結果から、CYP2D6 過剰発現による MPP⁺ の細胞毒性の軽減効果が明らかとなった。このことは、CYP2D6 遺伝子多型 (変異) による酵素活性低下 (poor metabolizer) が、神経毒の解毒作用を低下させ、危険因子として PD 発症に関与していることを示唆する。

論文審査の結果の要旨

パーキンソン病 (PD) は多因子疾患と考えられているが、孤発性PD患者において、チトクローム P450 2D6 (CYP2D6) 遺伝子多型が発症に関与していることが、マイクロサテライト多型を用いた解析により明らかになっている。一方、発症に外因性神経毒の関与が示唆されているが、このうちMPTPおよび代謝物MPP⁺は、実験的PDを引き起こす薬物として知られている。本研究は、PD発症における遺伝的素因と神経毒の関係を明らかにする目的でおこなわれた。まず、ヒトCYP2D6安定発現PC12細胞株を樹立し、マイクロゾーム分画におけるチトクローム P450 酵素活性を確認した。酵素活性の測定にあたっては、¹⁴C 標識したDebrisoquineを基質とし、代謝産物をHPLCにて分析した。次いで、MTT法による解析の結果、ヒトCYP2D6過剰発現により、MPP⁺による細胞傷害は軽減し、その効果はCYP2D6陽性細胞の比率と相関することを見出した。また、MPP⁺暴露によりPC12細胞のミトコンドリアにおける活性酸素種の産生亢進を認めたが、この変化はヒトCYP2D6過剰発現により抑制された。

以上の研究は、PD発症における遺伝的素因と環境因子（外因性神経毒）の関係を実験的に立証したもので、PDの病因解明に貢献し、治療・予防法開発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認める。

なお、本学位授与申請者は、平成16年3月2日実施の論文内容とそれに関連した研究分野の試問を受け、合格と認められたものである。