

(論文内容の要旨)

パーキンソン病は中脳黒質ドパミンニューロンの変性・脱落を特徴とする神経変性疾患である。残存するニューロン内にLewy小体と呼ばれる細胞質封入体が観察されており、パーキンソン病の病態形成にタンパクの品質管理障害の関与が推定されている。実際、孤発性パーキンソン病患者の剖検脳において、転写因子やシグナル伝達タンパクおよびmisfoldタンパクの分解に関与するユビキチン-プロテアソーム系の活性が低下していることや、常染色体劣性遺伝性若年性パーキンソン症候群の原因遺伝子産物であるparkinがユビキチンリガーゼであることが報告されている。しかし、プロテアソーム活性の低下は異常タンパクの蓄積を誘発する一方、細胞保護因子を誘導することも報告されており、プロテアソーム活性が細胞死に与える影響については不明な点が多い。そこで、本研究において著者は、細胞死の過程におけるプロテアソームの役割、およびプロテアソーム活性の低下がドパミンニューロン死に与える影響について研究を行った結果、以下の新知見を得た。

第一章 細胞死とプロテアソーム活性の関係

細胞死とプロテアソーム活性の関連を明らかにするため、プロテアソーム感受性蛍光タンパクZsProSensor-1をラット副腎髄質褐色細胞腫由来PC12細胞に強制発現させた。通常条件ではZsProSensor-1はプロテアソームにより分解されているためほとんど蛍光を発しなかったが、プロテアソーム阻害薬処置により蓄積し蛍光強度が増大した。フローサイトメトリーにより、プロテアソーム活性が低下した細胞をZsProSensor-1の緑色蛍光強度を指標として判別し、細胞の生死はpropidium iodideを用い評価することで、細胞単位での解析を行った。疫学調査によりパーキンソン病の危険因子であることが示唆されている除草剤のパラコート処置すると、遅延性の細胞毒性に先行して、プロテアソーム活性が低下した。しかし、プロテアソーム活性が低下した死細胞数の増加は小さかったのに対して、プロテアソーム活性が低下した生存細胞数は顕著に増加した。そこで、パラコート細胞毒性におけるドパミンの関与を検討するために、チロシンヒドロキシラーゼの阻害薬である α -methyl-p-tyrosineにより細胞内ドパミンを枯渇させたところ、パラコート処置による細胞毒性は抑制されたが、プロテアソーム活性が低下した細胞数は影響を受けなかった。次に、プロテアソーム阻害薬を用いてプロテアソーム活性低下を早めた場合、パラコートによる死細胞数の増加が抑制された。以上の結果よりパラコートによるプロテアソーム活性の低下はドパミンを介した細胞死の経路とは無関係であり、むしろ、パラコートによる細胞毒性に対して保護的に働く可能性が示唆された。

第二章 Nrf2-ARE経路を介したプロテアソーム阻害薬による保護作用

パラコート毒性にドパミンが重要な役割を果たすことが示唆されたことから、ドパミン類縁体の神経毒である6-hydroxydopamine (6-OHDA)により誘発される細胞毒性に対して、プロテアソーム活性の低下が与える影響について検討を行った。PC12細胞にプロテアソーム阻害薬を前処置することにより、6-OHDA誘発活性酸素種産生上昇および細胞毒性は抑制された。次に、活性酸素種の除去に重要な役割を果たすグルタチオンに着目し検討を行った。グルタチオンの前駆体であるN-acetyl-L-cysteine処置によってグルタチオン量を増大させると、

6-OHDA毒性を顕著に抑制し、また、プロテアソーム阻害薬は濃度依存的にグルタチオン含有量を増大させた。次いで、プロテアソーム阻害薬によるグルタチオン含有量上昇の作用機序を検討した。プロテアソーム阻害薬はグルタチオン合成の律速酵素であるγ-glutamylcysteine synthetaseのmRNA量を増大させた。その転写増加には、プロモーター領域であるantioxidant response element (ARE)への転写活性化因子であるNF-E2-related factor 2 (Nrf2)の結合が重要である。そこで、Nrf2-ARE経路の関与について検討を行ったところ、プロテアソーム阻害薬がNrf2の蓄積を引き起こした。また、プロテアソーム阻害薬はNrf2の核内移行を惹起したが、p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK)の阻害薬の同時適用により抑制された。さらに、プロテアソーム阻害薬によるグルタチオン量増大および細胞保護作用は、p38 MAPKの阻害薬の同時適用により抑制された。これらの結果より、ドパミンニューロンにおけるプロテアソーム活性の低下は、Nrf2の蓄積とp38 MAPKの活性化を介して、Nrf2-ARE経路によりグルタチオン量を増大させることで細胞保護作用を示すことが示唆された。

第三章 中脳初代培養細胞におけるHO-1を介したプロテアソーム阻害薬の保護作用

パーキンソン病患者の剖検脳においてLewy小体にheme oxygenase-1 (HO-1)が局在することや、黒質におけるアストロサイトのHO-1免疫染色性が対照群に比べて高いことが報告されている。そこで、プロテアソーム活性低下による細胞保護作用機序について、保護因子としての機能を果たすHO-1に着目し、アストロサイトを含むラット胎仔由来中脳初代培養細胞を用いて検討を行った。プロテアソーム阻害薬を前処置すると、6-OHDA誘発ドパミンニューロン死に対し抵抗性を示した。プロテアソーム阻害薬により、主にアストロサイトでHO-1タンパク量が増加し、ドパミンニューロンにおいては僅かな上昇しか観察されなかった。プロテアソーム阻害薬による保護作用はHO-1阻害薬であるzinc protoporphyrin IXの同時適用によって抑制された。さらに、HO-1によるhemeの分解生成物であるビリルビン、一酸化炭素は6-OHDA誘発ドパミンニューロン死を抑制した。次に、プロテアソーム阻害薬によるHO-1量上昇機序について検討したところ、HO-1 mRNA量が上昇し、新規合成が促進していることが示唆された。PC12細胞に外因性にFLAG-HO-1を強制発現させ、プロテアソーム阻害薬を処置すると、FLAG-HO-1量が増大し、FLAG抗体による免疫沈降を行うことでユビキチン化HO-1が検出された。さらに、プロテアソーム阻害薬によりHO-1の分解速度が低下することを確認した。したがって、HO-1はユビキチン-プロテアソーム系により分解されていることが示唆された。以上の結果より、プロテアソーム活性の低下により、新規合成の亢進および分解の抑制を介してアストロサイトで増加したHO-1は間接的にドパミンニューロンに対する保護作用に寄与することが示唆された。

以上、著者は、ドパミンニューロン系の細胞死の過程においてプロテアソーム活性低下が細胞保護的役割を果たすこと、および、その機序として、Nrf2-ARE経路によるグルタチオンの新規合成に加えて、HO-1の蓄積を介した保護作用が重要な役割を果たすことを明らかにした。本研究の成果は、パーキンソン病の発症機構および病態の解明に寄与するものであり、新しい治療法の開発など臨床応用に結びつく有用な基礎的知見を提供するものである。

(論文審査の結果の要旨)

パーキンソン病は中脳黒質ドパミンニューロンの変性・脱落を特徴とする神経変性疾患である。残存するニューロン内に **Lewy** 小体と呼ばれる細胞質封入体が観察されており、パーキンソン病の病態形成にタンパクの品質管理障害の関与が推定されている。プロテアソーム活性の低下は異常タンパクの蓄積を誘発する一方、細胞保護因子を誘導することも報告されており、プロテアソーム活性が細胞死に与える影響については不明な点が多い。そこで、本研究において申請者は、細胞死の過程におけるプロテアソームの役割、およびプロテアソーム活性の低下がドパミンニューロン死に与える影響について研究を行った結果、以下の新知見を得た。

第一章 細胞死とプロテアソーム活性の関係

細胞死とプロテアソーム活性の関連を明らかにするため、プロテアソーム感受性蛍光タンパク **ZsProSensor-1** をラット副腎髄質褐色細胞腫由来 **PC12** 細胞に強制発現させた。パラコート処置すると、遅延性の細胞毒性に先行して、プロテアソーム活性が低下した。しかし、プロテアソーム活性が低下した死細胞数の増加は小さかったのに対して、プロテアソーム活性が低下した生存細胞数は顕著に増加した。そこで、パラコート細胞毒性におけるドパミンの関与を検討するために、チロシンヒドロキシラーゼの阻害薬により細胞内ドパミンを枯渇させたところ、パラコート処置による細胞毒性は抑制されたが、プロテアソーム活性が低下した細胞数は影響を受けなかった。プロテアソーム阻害薬を用いてプロテアソーム活性低下を早めた場合、パラコートによる死細胞数の増加が抑制された。以上の結果よりパラコートによるプロテアソーム活性の低下はドパミンを介した細胞死の経路とは無関係であり、むしろ、パラコートによる細胞毒性に対して保護的に働く可能性が示唆された。

第二章 Nrf2-ARE 経路を介したプロテアソーム阻害薬による保護作用

パラコート毒性にドパミンが重要な役割を果たすことが示唆されたことから、ドパミン類縁体の神経毒である **6-hydroxydopamine (6-OHDA)** により誘発される細胞毒性に対して、プロテアソーム活性の低下が与える影響について検討を行った。**PC12** 細胞にプロテアソーム阻害薬を前処置することにより、**6-OHDA** 誘発活性酸素種産生上昇および細胞毒性は抑制された。グルタチオンの前駆体処置によりグルタチオン量を増大させると **6-OHDA** 毒性が抑制され、プロテアソーム阻害薬は濃度

依存的にグルタチオン含有量を増加した。プロテアソーム阻害薬はグルタチオン合成の律速酵素の mRNA 量を増大した。その転写増加に重要な役割を果たす Nrf2-ARE 経路の関与について検討を行ったところ、プロテアソーム阻害薬が Nrf2 の蓄積を引き起こし、プロテアソーム阻害薬は Nrf2 の核内移行を惹起し、MAPK 阻害薬の同時適用により抑制された。これらの結果より、ドパミンニューロンにおけるプロテアソーム活性の低下は、Nrf2 の蓄積と p38 MAPK の活性化を介して、Nrf2-ARE 経路によりグルタチオン量を増大させることで細胞保護作用を示すことが示唆された。

第三章 中脳初代培養細胞における HO-1 を介したプロテアソーム阻害薬の保護作用

プロテアソーム活性低下による細胞保護作用機序について、保護因子としての機能を果たす heme oxygenase-1 (HO-1)に着目し、ラット胎仔由来中脳初代培養細胞を用いて検討を行った。プロテアソーム阻害薬は 6-OHDA 誘発ドパミンニューロン死を抑制し、主にアストロサイトにおいて HO-1 タンパク量が増加した。プロテアソーム阻害薬による保護作用は HO-1 阻害薬により抑制され、HO-1 によるヘムの分解生成物であるビリルビン、一酸化炭素は 6-OHDA 誘発ドパミンニューロン死を抑制した。PC12 細胞に外因性に FLAG-HO-1 を強制発現させ、プロテアソーム阻害薬を処置すると、FLAG-HO-1 量が増大し、FLAG 抗体による免疫沈降を行うことでユビキチン化 HO-1 が検出された。さらに、プロテアソーム阻害薬により HO-1 の分解速度が低下することを確認した。以上の結果より、プロテアソーム活性の低下により、新規合成の亢進および分解の抑制を介してアストロサイトで増加した HO-1 は間接的にドパミンニューロンに対する保護作用に寄与することが示唆された。

以上、著者は、ドパミンニューロン系の細胞死の過程においてプロテアソーム活性低下が細胞保護的役割を果たすこと、および、その機序として、Nrf2-ARE 経路によるグルタチオンの新規合成に加えて、HO-1 の蓄積を介した保護作用が重要な役割を果たすことを明らかにした。本研究の成果は、パーキンソン病の発症機構および病態の解明に寄与するものであり、新しい治療法の開発など臨床応用に結びつく有用な基礎的知見を提供するものである。

よって本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成 21 年 2 月 23 日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。