

論文の内容の要旨

論文題目 慢性脳低灌流が α シヌクレインの蓄積に与える影響についてモデルマウスを用いた検討

氏名 大友 岳

【序文】

パーキンソン病 (PD) は、アルツハイマー病に次いで患者数の多い神経変性疾患で、中脳黒質のドパミン神経細胞や青斑核のノルアドレナリン神経細胞の選択的脱落に起因する特徴的な運動症状と多様な非運動症状をきたす進行性の疾患である。神経細胞の細胞質内における α シヌクレイン (α Syn) の異常凝集体である Lewy 病理の存在が病理学的診断根拠となっており、Lewy 病理は神経回路に沿って脳内で進展することで、緩徐に症状が多岐にわたり進行していくことが知られている。

関連遺伝子の機能解析などにより、様々な病態機序が解明されてきているが、その中でも Lewy 病理の主成分である α Syn の凝集・蓄積が中心に置かれている。 α Syn は主に神経組織内で発現しており、正常型は可溶性のタンパク質だが、何らかの理由で β シート構造をとった不溶性の異常型 α Syn が出現すると、異常型を鋳型に正常型が異常型に変換され、凝集した結果 Lewy 病理として細胞内に蓄積するとされている。さらに、凝集体はオリゴマーとして神経細胞の間を伝播することが知られており、伝播したオリゴマーをシードにして、再び正常型が異常型に変換、凝集していく形でレビー病理が進展していくと考えられている。

孤発性 PD は、複数の遺伝因子と環境因子が複合的に発症に影響を与える多因子疾患であり、以前の疫学研究では様々な環境因子と PD の関連について検討されてきた。PD の発症において、血管リスク因子である喫煙および脂質異常症が保護的に働くのに対して、同じく血管リスク因子の高血圧や糖尿病・肥満は逆にリスク因子となっている可能性があることに着目し、本研究では、PD と血管リスクの関連について検討した。

PD 同様に病原タンパク質が脳内に蓄積する機序が想定されている他の神経変性疾患において、血管リスク因子との関連を過去の知見から振り返ると、アルツハイマー病 (AD) では複数の血管リスクが発症リスクとなることに加え、実際に血管リスクを背景とした慢性脳低灌流が病態の増悪に関与していることが示されており、レビー小体型認知症

(DLB) でも慢性脳低灌流の進行が発症に関与している可能性を示した報告がある。これらの知見は、PD においても血管リスクに伴う慢性脳低灌流が病態に関与している可能性を支持しており、本研究では、慢性脳低灌流が PD の病態に与える影響について、脳内の α Syn の凝集・蓄積に焦点を当てて検討することを目的とした。

【方法】

まず、シード依存性の α Syn 凝集を再現した細胞モデルに、二分子蛍光補完 (BiFC) 法

を用いて内因性 α Syn 凝集を可視化するための新しい細胞モデルを確立した。 α Syn 凝集体のシードを細胞に添加することで、内因性 α Syn の凝集を誘導し、凝集体とオルガネラとの関係性を免疫蛍光染色と Western blot により解析した。 また、シードに 3xFLAG を標識することにより、添加した α Syn シード についてもオルガネラとの関係性を検討した。

次に、C57BL/6 マウスの右線条体に α Syn シードを注入し、シード依存性の内因性 α Syn 凝集を再現した。 このマウスモデルに、慢性脳低灌流モデルである両側総頸動脈狭窄術 (BCAS) を適用し、脳内の α Syn 蓄積病理と行動実験により、慢性脳低灌流が α Syn 凝集に与える影響を検討した。

【結果・考察】

外因性の α Syn シードおよび内因性の α Syn 凝集体とオルガネラとの関係を検討した結果、 α Syn シードがエンドソーム-リソソーム系に分布している一方で、内因性 α Syn 凝集体はオートファジー-リソソーム系に分布しており、別々の分解経路に入ることが示唆された。 このような α Syn の細胞内動態と慢性低灌流を結びつける可能性のあるものとして、低酸素誘導因子 (HIF) 1 α 依存性オートファジーに着目した。 HIF1 α は元々細胞質に局在しており、通常酸素下ではプロリン水酸化酵素の制御を受けてプロテアソームで分解されるが、低酸素下ではプロリン水酸化酵素の活性が低下するため分解されずに核内へ移行し、様々な低酸素応答遺伝子の発現を誘導し、その一環としてオートファジーを誘導すると考えられている。 CoCl_2 による chemical hypoxia は、HIF1 α 依存性オートファジーを誘導し、細胞モデルにおいては、 α Syn シードには影響を与えず、内因性 α Syn 凝集体の分解を促進する可能性が示唆された。

マウスモデルでは、BCAS は HIF1 α 発現の有意な増加を誘導し、神経細胞におけるリン酸化 α Syn の蓄積を有意に減少させた。 同時に、内因性 α Syn の発現量とシードの伝播そのものには BCAS の影響は及んでいないことも確認できたため、内因性 α S の分解に対して BCAS が影響したと考えられた。 また、行動実験では、 α Syn シード依存性の行動障害も BCAS によって軽減されることが確認できた。 さらに、マウスに天然フラボノイドの Chrysin を経口投与し HIF1 α の発現が抑制されることで、BCAS 術によるリン酸化 α Syn 病理と記憶障害の軽減効果が消失することが分かった。

以上より、 α Syn シードに依存した神経細胞内の内因性 α Syn の凝集が、HIF1 α 依存性オートファジーにより分解・除去された可能性が考えられ、脳内における HIF1 α の誘導が PD の進行抑制につながる可能性が示唆された。

【結論】

シード依存性の内因性 α Syn 凝集を再現した細胞およびマウスモデルに対して、低酸素および慢性脳低灌流モデルを適用した。 これらの解析により、慢性脳低灌流に伴い、HIF1 α 依存性オートファジーによる α Syn 凝集体の分解が促進される可能性が示唆された。