

審査の結果の要旨

氏名 大友 岳

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アルツハイマー病などの神経変性疾患においては、血管リスクを背景とした慢性脳低灌流による病態増悪への関与が示されている。本研究では、パーキンソン病においても慢性脳低灌流が病態に関与している可能性を考え、慢性脳低灌流が脳内の  $\alpha$  シヌクレイン ( $\alpha$ Syn) の凝集・蓄積に与える影響について解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. シード依存性の  $\alpha$ 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  $\alpha$ 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。  $\alpha$ Syn 凝集体のシードを細胞に添加することで、内因性  $\alpha$ 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  $\alpha$ Syn シード についても内因性  $\alpha$ Syn 凝集体オルガネラとの関係性を検討した。その結果、  $\alpha$ 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  $\alpha$ 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。
2. 上記のような  $\alpha$ 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 $\alpha$  依存性オートファジーに着目した。BiFC 凝集モデルに対して  $\text{CoCl}_2$  による chemical hypoxia を適用したところ、HIF1 $\alpha$  依存性オートファジーを誘導し、  $\alpha$ Syn シードには影響を与えず、内因性  $\alpha$ Syn 凝集体の分解を促進する可能性が示唆された。
3. 細胞モデルの解析結果を動物モデルで検証すべく、慢性脳低灌流モデルとして野生型マウス (C57BL/6J マウス) に対し両側総頸動脈狭窄 (BCAS) 術を施行した。慢性脳低灌流の状態が保たれていることを、脳表血流の測定および病理学的評価により確認した。また、BCAS が HIF1 $\alpha$  発現を誘導していることを病理学および生化学的に示した。
4. C57BL/6 マウスの右線条体に  $\alpha$ Syn シードを注入し、シード依存性の内因性  $\alpha$ Syn 凝集を再現した。このマウスモデルに、BCAS を適用したところ、神経細胞におけるリン酸化  $\alpha$ Syn の蓄積を有意に減少させ、同時に、内因性  $\alpha$ 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を確認した。また、行動実験では、  $\alpha$ 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。
5. マウスに天然フラボノイドの Chrysin を経口投与することにより、HIF1 $\alpha$  の発現が抑

制され、BCAS 術によるリン酸化  $\alpha$ 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。これにより、 $\alpha$ Syn シードに依存した神経細胞内の内因性  $\alpha$ Syn の凝集が、HIF1 $\alpha$  依存性オートファジーにより分解・除去された可能性が示唆された。

以上、本論文は、シード依存性の  $\alpha$ Syn 凝集を再現した細胞モデルおよび動物モデルに対して **chemical hypoxia** および慢性脳低灌流モデルを適用することで、慢性脳低灌流に伴い、HIF1 $\alpha$  依存性オートファジーによる  $\alpha$ Syn 凝集の分解が促進される可能性を明らかにした。過去の知見においてアルツハイマー病におけるアミロイド  $\beta$  とタウの蓄積病理に対して増悪因子とされる慢性脳低灌流が、神経細胞における  $\alpha$ Syn の蓄積病理に対しては逆に保護的に働く可能性を示した本研究は、これまでに例がなく新たな見解を示している。神経細胞における  $\alpha$ Syn の凝集・蓄積機序の解明に重要な貢献をなすと考えられる。よって本論文は博士（医学）の学位請求論文として合格と認められる。