

## 論文内容要旨

報告 番号	甲 創 第 号	氏 名	大西 恭弥
学位論文題目	神経変性疾患の原因となる小胞輸送系の異常と、小胞輸送系制御による疾患治療への応用に関する研究		
<p>内容要旨</p> <p><b>1. SNARE タンパク質に着目した、老化脳におけるオートファジー活性低下メカニズムの解明</b></p> <p>オートファジーは様々な細胞内成分の分解機構であり、生体の恒常性維持において重要な機能を担っている。オートファジー活性は老化脳において低下することが知られており、様々な神経変性疾患の共通の発症原因と考えられているが、詳細な低下メカニズムは不明である。オートファジーの進行においては SNARE タンパク質と呼ばれる分子の働きが必須だが、この SNARE タンパク質の機能や局在の老化脳における変化は解析されていない。本研究では老化脳におけるオートファジー活性低下メカニズムの解明を目的に SNARE タンパク質に着目した解析を行った。</p> <p>各種 SNARE タンパク質の局在を免疫染色によって解析した結果、老齢マウス脳においてリソソーム局在性 SNARE タンパク質のリソソーム局在が減少し、これに起因すると考えられるオートファジー活性の低下が観察された。この局在変化の原因として、私は老化脳における酸化ストレスによるエンドサイトーシスの抑制が原因であると考え、培養細胞系での再現実験を行った。培養細胞系に酸化ストレスを誘導し、蛍光標識デキストランを用いてエンドサイトーシスを評価した結果、デキストランのリソソームへの輸送が減少し、エンドサイトーシスによる輸送が抑制されていることを確認した。次に、SNARE タンパク質の局在を免疫染色によって解析した結果、酸化ストレスによってリソソーム局在性 SNARE タンパク質のリソソーム局在が減少することが明らかになった。</p> <p>以上の解析から、老化脳における酸化ストレスが VAMP8 のリソソームへの輸送を減少させることで、オートファジーを抑制することが示唆された。</p> <p><b>2. 小胞輸送制御による、より効果的な遺伝子治療法の開発</b></p> <p>遺伝子治療は遺伝子を用いて疾患の治療を行う技術であり、ベクター等を用いて治療用遺伝子を患者細胞に導入することで治療を行う。アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターは遺伝子治療用ベクターの一種であり、高い安全性と生体への感染能を持つ。一般的に AAV ベクターは細胞の小胞輸送系の働きによって細胞に侵入し、遺伝子を導入する。そのため低分子化合物を用いて小胞輸送による AAV ベクターの侵入を促進出来れば、より効果的な遺伝子治療が可能になる。本研究では低分子化合物との併用による、より効果的な遺伝子治療法の開発を目指し、AAV ベクターの細胞内取り込みを促進する化合物の探索及びそのメカニズムの解明を行った。</p> <p>AAV ベクターと種々の小胞輸送関連化合物を培養細胞に共処理し、q-PCR 法によって AAV ベクターの細胞内取り込みを評価した。その結果、エンドサイトーシス阻害剤の共処理によって AAV ベクターの細胞内取り込みは増加した。次にエンドサイトーシス抑制による AAV ベクター取り込み促進メカニズムを検討した結果、エンドサイトーシス抑制がマクロピノサイトーシスを活性化し、AAV ベクターの細胞内取り込みを促進することが明らかになった。さらに、その分子メカニズムを解析した結果、エンドサイトーシスの抑制が成長因子受容体刺激による PI3K 活性化を促進し、マクロピノサイトーシスを活性化させることが明らかになった。</p> <p>以上の解析より、エンドサイトーシスの抑制は PI3K 活性化を介してマクロピノサイトーシスによる AAV ベクターの細胞内取り込みを促進させることが明らかになった。</p>			