



Title	$A\beta$ induces endoplasmic reticulum stress causing possible proteasome impairment via the ER associated degradation pathway.
Author(s)	金山, 大祐
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/46152">https://hdl.handle.net/11094/46152</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"&gt;https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> >大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	かな やま だい すけ 金 山 大 祐
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 20157 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 18 年 3 月 24 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科未来医療開発専攻
学 位 論 文 名	A $\beta$ induces endoplasmic reticulum stress causing possible proteasome impairment via the ER associated degradation pathway. (A $\beta$ がERストレスを誘導し、ER 関連蛋白分解を介してプロテアソーム障害を惹き起こす)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 武田 雅俊 (副査) 教 授 佐古田三郎 教 授 荻原 俊男

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 〔 目 的 〕

アルツハイマー病 (AD) においては $\beta$ -アミロイド (A $\beta$ ) の蓄積が主要な病理過程であると言われている。また、他の神経変性疾患と同様に AD においてもプロテアソーム活性が障害されていることが死後脳で確認されているが、AD における A $\beta$  蓄積とプロテアソーム障害の機構については未解明である。一方で細胞のストレス応答機構である Unfolded Protein Response (UPR) が AD の病理に関わっているという知見が蓄積されてきている。本研究では、AD において A $\beta$  が UPR を介して細胞障害性を有することを明らかにし、A $\beta$  自体によってプロテアソーム機能が阻害される可能性について調べ、その病理過程の解明に繋げるべく検討を行った。

#### 〔 方法ならびに成績 〕

初めに A $\beta$  が UPR を惹起するか検討した。マウス初代培養細胞に A $\beta$  を負荷し UPR について観察したところ、25  $\mu$ M A $\beta$ 25-35 又は 10  $\mu$ M A $\beta$ 1-40 を負荷した際に UPR の主要経路の一つである PERK 及びその下流の eIF-2 $\alpha$  のリン酸化が起きることが確認された。対照実験として同濃度の A $\beta$  35-25 又は A $\beta$ 40-1 負荷ではこの現象は見られなかった。更に、A $\beta$ 25-35 による BiP 発現誘導も観察された。UPR 介在性アポトーシスシグナルである Caspase-12 活性化も A $\beta$ 25-35 で惹起され、また LDH アッセイにても A $\beta$ 25-35 および A $\beta$ 1-40 負荷による LDH 放出が観察され、その細胞障害性が確認された。以上より A $\beta$  が UPR 誘導と UPR 介在性細胞死誘導を惹起することが示された。

次に A $\beta$  とプロテアソームの関連を検討した。ヒト由来 SH-SY5Y 細胞とプロテアソームの蛍光分解基質 Luc-LLVY-AMC を用いて実験を行ったところ、10  $\mu$ M A $\beta$ 1-40 および 10  $\mu$ M A $\beta$ 1-42 負荷において検出される蛍光強度がどちらも対照と比較して約 50%まで減少した。別のプロテアソーム活性の検討方法として GFP<sup>u</sup> 導入細胞で GFP<sup>u</sup> 蓄積度からプロテアソーム活性の程度を確認する方法を用いたところ、A $\beta$  1-40 濃度依存性に GFP<sup>u</sup> が蓄積する様子が確認され、プロテアソーム障害の誘導が示された。しかし同時に、この GFP<sup>u</sup> 蓄積はプロテアソーム阻害剤のみならず ER ストレス誘導剤 Thapsigargin の負荷にても観察された。UPR とプロテアソームは ER 関連蛋白分解 (ERAD) を介して相互に影響を及ぼすとする説が近年提唱されており、A $\beta$  の細胞障害性について UPR とプロテア

ソームの相互作用の観点から解析する必要が生じた。

そこで次にプロテアソーム阻害剤による UPR 誘導の有無を確認した。プロテアソーム阻害剤 Lactacystin、MG132、ALLN を用いて SH-SY5Y 細胞および Swedish mutant APP 導入 SH-SY5Y 細胞 (SY5Y/swAPP) を処理すると、プロテアソーム阻害剤で BiP が誘導され、その効果は SY5Y/swAPP でより強いことが確認された。また、マウス Caspase-12 と相同である Caspase-4 活性化や eIF-2 $\alpha$  リン酸化も見られた。eIF-2 $\alpha$  については、A $\beta$ 1-40 存在下でより強くリン酸化されることも観察された。

以上から UPR とプロテアソーム障害の相互作用が確認されたが、最後に Thapsigargin 処理に対する細胞の経時的変化を観察したところ、eIF-2 $\alpha$  のリン酸化と BiP の誘導がそれぞれ負荷 15 分後、1 時間後から見られたのに対し、GFP $\mu$  の蓄積は 6 時間後以降にならないと観察されなかった。従って、UPR がプロテアソーム障害より先行して生じることが示唆され、A $\beta$  もまず UPR を起こしてからプロテアソーム障害を起こすことが予想された。

#### [ 総 括 ]

本研究では AD における A $\beta$  の細胞障害性について UPR とプロテアソーム障害の両面から解析を行い、A $\beta$  が双方に作用することを示した。UPR とプロテアソームは ERAD を介して相互に作用するとされているが、実際に細胞内の反応としてこの相互作用を観察した。更には UPR からプロテアソーム障害を来す経時的な推移が確認され、A $\beta$  の細胞への影響についても同じ様式で細胞障害性を惹起している可能性が示唆された。

#### 論文審査の結果の要旨

本研究はアルツハイマー病 (AD) の病理過程の主要な因子である  $\beta$ -amyloid (A $\beta$ ) の神経細胞障害作用の様式について検討したものである。AD の病態に関して、小胞体ストレス応答機構 (UPR) の関与についてはこれまでも変異型プレセニリン 1 が影響するとの研究報告があるが、本研究では A $\beta$  自身が UPR を障害し、細胞死の誘導シグナルも伝達されることを示している。また、A $\beta$  の負荷によってプロテアソーム機能が阻害されることも示しており、これは他の神経変性疾患における病理と AD の共通項を提示し得るものと言える。UPR とプロテアソーム機能の関連についても検討を加えており、小胞体ストレスが小胞体関連蛋白分解 (ERAD) を介し、UPR の反応に遅れてプロテアソーム負荷を生じる状況を示している。

以上より、本研究は AD における A $\beta$  の病理メカニズムの解明に寄与し、博士の学位授与に値するものと考えられる。