

博士學位論文審査要旨

2016年2月13日

論文題目: The novel mechanism of cell death induced by 24(S)-hydroxycholesterol
24(S)-hydroxycholesterol 誘導性細胞死メカニズムの解析

学位申請者: Diep-Khanh Ho Vo

審査委員:

主査: 生命医科学研究科 教授 野口範子

副査: 生命医科学研究科 教授 西川喜代孝

副査: 生命医科学研究科 教授 小林 聡

要 旨:

脳内で過剰になったコレステロールは、神経細胞に特異的に発現している酵素 (CYP46A1)により、24S-hydroxycholesterol (24S-OHC)に変換されて血液循環へ排出される。24S-OHCは脳のコレステロール代謝に重要な役割を担っている。一方で、24S-OHCは神経変性疾患発症との関係が注目されており、野口研究室では、ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞などの神経細胞に24S-OHCを添加すると、小胞体(ER)に存在する酵素 Acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase (ACAT)の作用によりエステル体に変換され、脂肪滴様構造を形成したのち、ネクロトーシス様の細胞死が誘導されることを明らかにした。本研究は、SH-SY5Y 細胞とリンパ球系 Jurkat 細胞を比較しながら、24S-OHC 誘導性ネクロトーシスのメカニズムを明らかにすることを目的とした。TNF α で誘導されるネクロトーシスには、3つのタンパク質 receptor interacting protein kinase 1 (RIPK1)、RIPK3、そして mixed lineage kinase domain-like (MLKL)が働くことが知られているが、24S-OHC が誘導するネクロトーシスでは、いずれの細胞でもRIPK1は関与するが、MLKLは関与しないことを明らかにした。また、RIPK3はSH-SY5Y細胞には発現していないがJurkat細胞では24S-OHC 誘導性細胞死に関与していることを示した。

次に、24S-OHC 添加により形成される脂肪滴様構造は、オレイン酸などの脂肪酸を添加した場合に形成される脂肪滴とは異なり、ER 膜中に埋め込まれたかたちで存在することを電子顕微鏡画像から明らかにした。この結果を受け、24S-OHC 刺激細胞内では、ER ストレスが誘導され、それが細胞死シグナルに結びつくという仮説をたて、3つの ER ストレス応答タンパク質 (IRE1、ATF6、PERK) の活性化 (リン酸化) とそれぞれの下流のタンパク質の活性化を調べた。24S-OHC 刺激によりこれら応答タンパク質が活性化されること、そしてACAT 阻害剤によりいずれも抑制されることを示した。本研究において、細胞死に直接繋がるタンパク質の同定には至らなかったが、24S-OHC のエステル体の ER 膜への蓄積が ER ストレス応答を誘導し、これらが24S-OHC が誘導する細胞死シグナルと同時に活性化することが明らかとなった。

よって、本論文は、博士 (理学) (同志社大学) の学位を授与するにふさわしいものであると認められる。

総合試験結果の要旨

2016年2月13日

論文題目: The novel mechanism of cell death induced by 24(S)-hydroxycholesterol
24(S)-hydroxycholesterol 誘導性細胞死メカニズムの解析

学位申請者: Diep-Khanh Ho Vo

審査委員:

主査: 生命医科学研究科 教授 野口範子

副査: 生命医科学研究科 教授 西川喜代孝

副査: 生命医科学研究科 教授 小林 聡

要 旨:

2016年1月27日16時15分より、総合試験をおこなった。

副査から、小胞体(ER)ストレスに関する理解度をはかるための質問がなされた。また、申請者が実証を試みた仮説とは異なり、ER ストレスが細胞死シグナルに関与しない場合や、ER ストレスが細胞死とその防御の両方に働いている場合などについて質問がなされた。申請者はこれらに対して、審査発表では述べなかった実験結果に触れながら的確に回答した。これに関連して、主査から、タンパク質分解機構の関与とその阻害剤の効果について質問され、自身のデータと研究室のデータから考えられる説明をおこなった。

また、24S-OHC によって形成される脂肪滴様構造が一般的な脂肪滴の形成とは異なる理由についての質問に対して、脂肪滴に関する基礎理解を基に、コレステロールと 24S-OHC の親水性の違いなど構造に起因することなどを示し説明をおこなった。24S-OHC が ACAT の作用によりエステル化されるために必要な脂肪酸の由来についての質問に対して、十分とはいいがたいが、所属研究室のデータを基に自身の考えを述べた。

申請者はベトナムからの留学生で英語を母国語としないが、入学試験時に小論文および面接は英語を用いて行い合格しているため、語学試験の対象とはならない。また、論文作成も発表も英語で行っており、十分な英語力をもっていることは今回の発表においても明らかである。

よって、総合試験の結果は合格であると認める。

博 士 学 位 论 文 要 旨

論 文 題 目 : The novel mechanism of cell death induced by 24(S)-hydroxycholesterol
氏 名 : Diep-Khanh Ho VO

要 旨 :

24(S)-hydroxycholesterol (24S-OHC), which is enzymatically produced in the brain, is known to play an important role in maintaining brain cholesterol homeostasis. However, 24S-OHC has been known to possess a potent neurotoxicity and to be involved in neurodegenerative diseases. The previous studies in my laboratory reported that 24S-OHC induces a type of non-apoptotic programmed necrosis in neuronal cells expressing little caspase-8. Necroptosis has been characterized as a type of programmed necrosis in which activation of receptor-interacting protein kinase 1 (RIPK1), RIPK3, and mixed lineage kinase domain-like (MLKL) is involved in the signaling pathway.

In the present study, I investigated the involvement of these three proteins in 24S-OHC-induced cell death. I found that RIPK1 but neither RIPK3 nor MLKL was expressed in human neuroblastoma SH-SY5Y cells, while all three proteins were expressed in human T lymphoma caspase-8-deficient Jurkat (Jurkat^{Cas8^{-/-}}) cells. In Jurkat^{Cas8^{-/-}} cells, tumor necrosis factor α (TNF α)-induced cell death was significantly suppressed by treatment with the respective inhibitor of RIPK1, RIPK3, and MLKL. In contrast, only RIPK1 inhibitor showed significant suppression of 24S-OHC-induced cell death in Jurkat^{Cas8^{-/-}}, and even this was less prominent than was observed in TNF α -induced cell death. In Jurkat^{Cas8^{-/-}} cells, knockdown of either RIPK1 or RIPK3 caused moderate but significant suppression of 24S-OHC-induced cell death, but no such effect was observed as a result of knockdown of MLKL. Collectively, these results suggest that, for both SH-SY5Y cells and Jurkat^{Cas8^{-/-}} cells, 24S-OHC-induced necroptosis-like cell death is dependent on RIPK1 but not on MLKL.

Moreover, the previous studies in my laboratory have shown that acyl-CoA:cholesterol acyltransferase 1 (ACAT1) esterifies 24S-OHC to be 24S-OHC esters and that lipid droplets (LDs)-like structures were formed at an early stage in 24S-OHC-treated cells. The results have also shown that LDs-like structures formation induced by 24S-OHC correlated with the induction of cell death. In the present study,

24S-OHC-induced LDs-like structures were compared with typical triglyceride (TG)-enriched LDs, which was induced by oleic acid (OA) in SH-SY5Y cells. OA-induced LDs were abundant and existed in the whole cytoplasm while a limited number of LDs-like structures was observed in response to 24S-OHC. By using electron microscopy analysis, 24S-OHC-induced-LDs-like structures localized at the endoplasmic reticulum (ER) and associated with the swollen ER. Furthermore, an ACAT inhibitor, F12511, suppressed 24S-OHC-induced LDs-like structures. These results highlight that 24S-OHC induces the formation of ACAT-dependent LDs-like structures along with swollen ER in SH-SY5Y cells, which are characterized as distinct features of typical OA-induced LDs.

In addition, I detected that 24S-OHC induced ER stress by the activation of the unfolded protein response (UPR) signaling pathways and that ACAT inhibitor inhibited these signals in SH-SY5Y cells. Esterified-24S-OHC induced the phosphorylation of inositol-requiring protein-1 α (IRE1 α), which initiated diverse downstream signaling of the UPR through unconventional splicing of the transcription factor *XBP-1* and the reduction of a RIDD substrate, Angiopoietin-like 3 (*ANGPTL3*). However, an inhibitor of IRE1 α enzyme activity, 4 μ 8C, inhibited the *XBP-1* splicing but not the reduction of *ANGPTL3* and failed to suppress the cell death induced by 24S-OHC. Activating transcription factor 6 (ATF6) was also cleaved to release the N-terminal domain into the nucleus where it acted as a transcription factor in 24S-OHC-treated cells. Additionally, esterified-24S-OHC also induced the phosphorylation of protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase (PERK) resulting in the phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 (eIF2 α). Also, chaperone proteins like Calreticulin and Binding Immunoglobulin (BiP) or Protein glucose-regulated protein 78 (GRP78) were degraded during 24S-OHC-induced ER stress in SH-SY5Y cells.

Although C/EBP homologous protein (CHOP) has been abundantly reported as an important protein involved in ER-stress-induced cell death, the previous results in my laboratory showed that knockdown of CHOP did not affect 24S-OHC-induced cell death in SH-SY5Y cells. I also examined the downstream effects of IRE1 α via stimulating the activation of Apoptotic-Signaling Kinase-1 (ASK1) and p38 to promote cell death. The results illustrated that the inhibitors of ASK1 and p38 did not prevent 24S-OHC-induced cell death in SH-SY5Y cells. To determine the possibility of ER stress due to the accumulation of unfolded proteins, small molecular chemical chaperone 4-Phenylbutyric acid (4-PBA)

which acts like chaperones in promoting protein folding to recover ER stress was employed. Unfortunately, co-treatment with 4-PBA could not inhibit 24S-OHC-induced cell death in SH-SY5Y cells. Taken together, these data indicate that CHOP, ASK1 and p38 are not involved in the mechanism of 24S-OHC-induced cell death in SH-SY5Y cells.

I therefore conclude that, in the absence of caspase-8 activity, 24S-OHC induces a necroptosis-like cell death, which is RIPK1-dependent but MLKL-independent. Furthermore, it is supposed that LDs-like structures formation induced by 24S-OHC at ER cause ER stress via the activation of the UPR signaling pathways, subsequent to cell death. However, the results showed that CHOP is not the important mediator of the cell death machinery and ASK1 and p38 are not required in response to 24S-OHC-induced cell death in SH-SY5Y cells.