

博士学位論文審査要旨

2013年 2月 20日

論文題目：24S-hydroxycholesterol 誘導性細胞死の分子メカニズムの解析

学位申請者：山中 一哲

審査委員

主査：同志社大学大学院生命医科学研究科 教授 野口 範子

副査：同志社大学大学院生命医科学研究科 教授 西川 喜代孝

副査：同志社大学大学院生命医科学研究科 教授 小林 聡

要 旨：

24S-hydroxycholesterol (24S-OHC) は、脳内のコレステロール恒常性維持を担う一方で、細胞毒性をもち、アルツハイマー病などの神経変性疾患との関連が示唆されている。

本論文は、24S-OHC による細胞死の分子メカニズムを解析し、神経細胞特異的な細胞死形態をとることを示したものである。24S-OHC で処理した神経細胞では、Caspase-3 の活性化や核の凝集などアポトーシスの特徴は認められず、また、ネクローシスや autophagic cell death の可能性も否定された。そこで、アポトーシス抑制条件下で起きる代替的なプログラム細胞死であるネクローシスに着目し、この過程で活性化される receptor interacting protein kinase-1 の特異的阻害剤である Necrostatin-1 や siRNA 法を用いて、24S-OHC による神経細胞死はネクローシスであることを明らかにした。さらに、24S-OHC は SH-SY5Y 細胞などの神経系の細胞においてネクローシスを誘導し、免疫系の Jurkat 細胞ではアポトーシスを誘導することがわかった。神経細胞において 24S-OHC によってネクローシスが選択的に誘導されるのは、Caspase-8 の発現が非常に低いことに起因すると考えられた。Jurkat 細胞においても全 caspase 阻害剤存在下では、24S-OHC はネクローシスを誘導した。Caspase-8 は 24S-OHC が誘導する細胞死が、アポトーシスもしくはネクローシスのどちらの経路をとるかを決定するスイッチングの役割を果たしていることが示された。神経細胞の 24S-OHC 誘導性ネクローシスには、活性酸素種や小胞体ストレスが関与しないことがわかった。一方、24S-OHC 処理細胞では、Acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase 1 (ACAT1) 活性により 24S-OHC のエステル体が生成し、脂肪滴が形成されるが、この脂肪滴形成が細胞死に深く関与していることを示した。Jurkat 細胞において ACAT1 を阻害すると、アポトーシスとネクローシスのどちらも抑制されることから、24S-OHC のエステル体形成は両者の分岐点より上流に位置すると考えられた。

本研究は、脳で産生されるコレステロール酸化物が誘導する神経細胞死はネクローシスであること、そして、脂質代謝変化がそのシグナルの引き金になることが示し、神経変性疾患の予防・治療に向けた新規のストラテジー創出に貢献するものと考えられる。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

2013年 2月 20日

論文題目：24S-hydroxycholesterol 誘導性細胞死の分子メカニズムの解析

学位申請者：山中 一哲

審査委員

主査：同志社大学大学院生命医科学研究科 教授 野口 範子

副査：同志社大学大学院生命医科学研究科 教授 西川 喜代孝

副査：同志社大学大学院生命医科学研究科 教授 小林 聡

要 旨：

上記審査委員は、山中一哲氏に対する総合試験を、2013年1月30日午後4時より口頭発表60分、質疑応答60分、そして、口頭試問30分の構成で実施した。

総合試験において学位申請者は、提出された論文の内容に関する質問および諮問に的確に応答し、研究の内容と意義、研究方法、解析法について十分な理解を示すとともに、研究の背景について専門知識を有していることを示した。本研究の実験はすべて本申請者が行ったものであり、また、データの再現性について申請者自身が厳しく追求しており、信頼性の高い結果を提示していることが示された。実験方法については、分子生物学、生化学的解析に加えて、高度な分析化学的方法から動物実験に至るまで多岐におよぶが、いずれも原理および手法を確実に修得し、結果につなげていることが示された。

申請者は自コースの「特殊研究」を履修し、研究科内に設置されている授業科目から合計4単位以上を履修していた。語学試験「英語」は入学時に高得点で合格しており、また、国際学会においてポスター発表を行い有意義な議論をおこなった。さらに、参考論文である学術雑誌J. Biol. Chem.およびRSC Advancesへの投稿論文の執筆内容から、申請者が研究遂行上必要な読解能力と作文能力を有することが確認された。よって、総合試験の結果は合格と認める。

博士学位論文要旨

論文題目： 24S-hydroxycholesterol 誘導性細胞死の分子メカニズムの解析

氏名： 山中 一哲

要旨：

24S-OHC は、神経細胞特異的に発現している cholesterol 24-hydroxylase (CYP46A1) によって酵素的に合成される。24S-OHC はコレステロールとは異なり、血液脳関門を通過することができる。CYP46A1 によって、脳内の過剰なコレステロールは 24S-OHC に変換され、血液循環へと排出されることで、脳内のコレステロール恒常性が維持されている。また、24S-OHC は Liver X receptor (LXR) のリガンドとして作用し、コレステロール排出に関わるタンパク質の誘導や脂肪酸合成酵素の誘導などに関与している。このように 24S-OHC は脳内の脂質代謝に重要な役割を担っている。一方で近年、24S-OHC と神経変性疾患との関連が示唆されている。アルツハイマー病 (AD) 患者や軽度認知症患者の脳脊髄液中や血漿中で健常者群に比べ 24S-OHC が増加しているという報告がある。また、CYP46A1 が AD 患者脳内の老人斑周辺で高発現していることも報告されている。さらに、24S-OHC が神経細胞毒性を示し、これが神経変性疾患に関与している可能性が示唆されている。しかし、その細胞障害メカニズムは明らかではない。

博士前期課程の研究で、24S-OHC の細胞障害メカニズムを解明するため、ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞およびラット胎仔脳由来初代神経細胞における細胞死形態を解析した。その結果、アポトーシスの特徴である Caspase-3 の活性化や核の凝集は認められなかった。細胞膜破綻は起きていたが、ネクロトーシスの特徴である細胞死初期段階での ATP の枯渇は認められなかった。Caspase 非依存的な細胞死であるため、Autophagic cell death の可能性を考え、阻害剤を用いて検討したが、細胞死抑制効果は認められなかった。ネクロトーシスの特異的阻害剤である Necrostatin-1 (Nec-1) を用いて検討したところ、有意な細胞死抑制効果が認められた。これらの結果から 24S-OHC によってネクロトーシスが誘導されると考えた。

ネクロトーシスは、アポトーシス抑制条件下で起きる代替的なプログラム細胞死として近年見出された細胞死形態である。形態的特徴はネクロトーシス様だが、細胞が持つシグナル経路によって制御されている点で異なっている。ネクロトーシスの遂行には RIPK1 の自己リン酸化が重要であり、Nec-1 はこのリン酸化を抑制する。また、アポトーシス誘導時に Caspase-8 が RIPK1 を切断してネクロトーシスを抑制することが知られており、アポトーシス・ネクロトーシスの分岐には Caspase-8 が重要である。

そこで、SH-SY5Y 細胞における 24S-OHC 誘導性細胞死において、RIPK1 および Caspase-8 の関与について検討を行った。siRNA により RIPK1 の発現量を低下させた細胞では、24S-OHC 誘導性細胞死に対して、有意な抑制効果が認められた。Nec-1 処理や RIPK1 のノックダウンによって細胞死が抑制されることから、SH-SY5Y 細胞や初代神経細胞において 24S-OHC がネクロトーシスを誘導することが明らかとなった。また、SH-SY5Y 細胞や初代神経細胞では、Caspase-8 が発現していることが知られている Jurkat 細胞と比較して、Caspase-8 の発現量が著しく低いことが示された。このことから、SH-SY5Y 細胞や初代神経細胞では Caspase-8 による RIPK1 の分解が起こらないため、アポトーシスではなくネクロトーシス経路が誘導されやすいと考えられた。

ネクロトーシスには活性酸素種 (ROS) が重要という報告と ROS は関与しないという報告があるため、24S-OHC 誘導性細胞死における ROS の関与を検討した。様々な抗酸化物質を用いて 24S-OHC による細胞死への影響を検討したが、いずれも抑制効果は認められなかった。また、

ROS や過酸化脂質を検出する蛍光プローブを用いて検討したが、いずれも検出されなかった。これらの結果から、24S-OHC 誘導性細胞死において、ROS の関与は認められないことが明らかとなった。

24S-OHC 処理細胞を顕微鏡下で観察した結果、脂肪滴様の構造物の形成が認められた。このことから、細胞死誘導時に脂質代謝の変化が起きていると考え、脂質についての解析を試みた。SH-SY5Y 細胞を用いて検討した結果、24S-OHC 処理細胞の細胞死初期段階で Nile red 染色陽性の脂肪滴が観察された。Nile red はコレステロールエステルなどの中性脂質を染色する蛍光色素であるため、24S-OHC 処理により中性脂質が蓄積していると考えた。神経細胞で発現していると考えられるコレステロールをエステル化する酵素である Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase 1 (ACAT1) の選択的阻害剤で処理した結果、脂肪滴の形成が抑制され、同時に細胞死も有意に抑制された。siRNA を用いた ACAT1 ノックダウン細胞においても阻害剤と同様に、脂肪滴形成や細胞死抑制効果が認められた。これらの結果から、ACAT1 が 24S-OHC 誘導性細胞死に関与することが明らかとなった。そこで、ACAT1 によって生成され得るコレステロールエステルもしくは 24S-OHC のエステル体が、細胞死の初期段階において形成されているか検討するために、ガスクロマトグラフ質量分析法および高速液体クロマトグラフィー分析法を用いて脂質の定量を行った。その結果、24S-OHC 処理細胞では、コレステロールエステルの増加は認められず、24S-OHC のエステル体が形成されていることが明らかとなった。これらの結果から、24S-OHC 誘導性細胞死に、24S-OHC のエステル体の形成が関与することが示唆された。

24S-OHC がリガンドとなる LXR は、脂肪酸生合成において重要な役割を果たしているため、細胞死への影響を検討した。siRNA を用いた LXR β ノックダウン細胞において有意に細胞死が抑制された。さらに脂肪酸に関して検討するため、脂肪酸生合成酵素である Fatty acid synthase (FAS) と脂肪酸不飽和化酵素である Stearoyl-CoA desaturase (SCD) の阻害剤を用いた。その結果、FAS 阻害剤は細胞死への影響は認められなかったが、SCD 阻害剤は有意に細胞死を抑制した。これらの結果から、脂肪酸組成も 24S-OHC 誘導性細胞死に関与している可能性が考えられた。

24S-OHC と同じオキシステロールである 7-ketocholesterol はマクロファージに小胞体ストレスを引き起こし、細胞死を誘導することが報告されている。また当研究室で、低濃度の 24S-OHC による小胞体ストレスの誘導が見出されている。さらに、脂肪酸によって誘導された小胞体ストレスが Death-receptor を介して細胞死を誘導することも報告されている。これらの報告から、24S-OHC 誘導性細胞死に小胞体ストレスが関与している可能性が考えられた。24S-OHC 処理によって IRE1 α のリン酸化や ATF6 の切断、CHOP の誘導といった小胞体ストレス応答に見られる特徴が認められたため、小胞体ストレスが誘導されていることが示された。しかし、小胞体ストレスによる細胞死において中心的な役割を果たす CHOP を siRNA を用いてノックダウンしても、24S-OHC 誘導性細胞死に影響しないこと、ACAT 阻害剤による細胞死抑制条件下でも CHOP が誘導されていたことから、24S-OHC 誘導性細胞死と小胞体ストレスとの間には関連がないと考えられた。

SH-SY5Y 細胞では Caspase-8 の発現が低いためにネクロトーシスが誘導されるという仮説を元に、Caspase-8 が発現している Jurkat 細胞に 24S-OHC を処理した場合アポトーシスが誘導されるか検討した。その結果、通常の Jurkat 細胞において 24S-OHC はアポトーシスを誘導し、全 Caspase 阻害剤である ZVAD 存在下ではネクロトーシスを誘導したことから、上述の仮説が裏付けられた。さらに、Jurkat 細胞において 24S-OHC は ZVAD の有無に関わらず、脂肪滴の形成や ACAT 阻害剤による細胞死抑制効果が認められた。このことから、24S-OHC のエステル体形成というイベントが、アポトーシスとネクロトーシスの分岐点より上流に位置していることが示唆された。

以上の結果から、24S-OHC は SH-SY5Y 細胞などの神経系の細胞において、ネクロトーシス

を誘導することが分かり、これには ROS や小胞体ストレスが関与しないことが明らかとなった。24S-OHC により SH-SY5Y 細胞や初代神経細胞ではネクローシス、Jurkat 細胞ではアポトーシスが誘導されるのは、各々の細胞における Caspase-8 の発現量の違いが原因であることが示唆された。24S-OHC 処理細胞では ACAT1 活性により 24S-OHC のエステル体が形成され、この形成が細胞死に深く関与していることが示唆された。Jurkat 細胞において ACAT の阻害がアポトーシスとネクローシスのどちらも抑制することから、両者の分岐点より上流のイベントとして、24S-OHC のエステル体形成があると考えられる。24S-OHC のエステル体形成からアポトーシスおよびネクローシスが遂行されるまでの過程には、24S-OHC のエステル体自身が細胞死を誘導する、もしくは 24S-OHC のエステル体が形成される過程が細胞死を導くという 2 つの可能性がある。