

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07969

研究課題名(和文) プロテアソーム・トレランスを基盤とした認知症治療薬開発の研究

研究課題名(英文) Research on development of cognitive therapeutic drugs based on proteasome tolerance

研究代表者

阪上 由香子 (Sakagami, Yukako)

大阪大学・キャンパスライフ健康支援・相談センター・招へい教員

研究者番号：90817412

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：異常なタンパク質が神経細胞内で集まると、プロテアソームの働きが低下し、神経変性疾患の原因となる。プロテアソームの機能を活性化する方法を研究し、「プロテアソーム耐性」という現象を報告した。低用量の阻害剤でプロテアソームを活性化させると、高用量の阻害剤に対して抵抗力を示した。また、転写因子のNrf2がプロテアソームに影響を与え、タウタンパク質の蓄積を減少させることも明らかにした。これらの結果は、Nrf2が「プロテアソーム耐性」の原因であり、神経変性疾患の治療の標的となる可能性を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

異常なタンパク質の凝集はユビキチン・プロテアソームシステムの機能を妨げる。プロテアソームの低下は神経変性疾患に関連し、細胞内で異常なタンパク質が蓄積し、神経細胞の死につながる。そのため、プロテアソームの活性化は神経変性疾患の治療法として有望と考えられる。私たちの結果は、Nrf2が「プロテアソーム耐性」を誘導する原因遺伝子の1つであることを示している。この遺伝子の誘導は、神経細胞がプロテアソーム阻害または毒性タンパク質の過剰発現の条件を生き残るための効率的な手段となる。

研究成果の概要(英文)：When abnormal proteins accumulate in nerve cells, proteasome function is impaired, leading to neurodegenerative diseases. We studied methods for activating proteasome function and reported a phenomenon called "proteasome resistance". Activating the proteasome with low-dose inhibitors made it resistant to high-dose inhibitors. We also found that the transcription factor Nrf2 affects the proteasome and reduces tau protein accumulation. These results suggest that Nrf2 is responsible for "proteasome resistance" and may be a therapeutic target for neurodegenerative diseases.

研究分野：精神神経医学

キーワード：プロテアソーム ユビキチン タウ Nrf2

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞内の異常なタンパク質の蓄積は細胞機能を妨げ、細胞をアポトーシスに導く可能性がある。26S プロテアソームは、損傷したタンパク質またはミスフォールドしたタンパク質の分解に関与する。プロテアソームは、4つの環の円筒形のスタックからなるタンパク質分解活性のある20S コア複合体を含む、大きなマルチサブユニット複合体である。7つのβサブユニットで形成された2つの内側の環は光分解活性を持ち、αサブユニットの2つの外側の環は構造を維持する。20S プロテアソームは酸化タンパク質を直接分解できるが、ユビキチン化は26S複合体全体による認識と代謝回転のために多くのタンパク質をマークする。しかし、凝集した異常タンパク質はユビキチン-プロテアソームシステム(UPS)の機能を直接損う。タンパク質分解能力の低下は、パーキンソン病、アルツハイマー病(AD)、筋萎縮性側索硬化症などのいくつかの神経変性疾患に関連しており、細胞内に異常なタンパク質が蓄積するとニューロンの死につながる。UPSの変化とプロテアソーム活性の低下は、これらの疾患の一部に関連している。すなわち、神経変性疾患では、異常なタンパク質の蓄積がプロテアソームに負荷をかけ、神経細胞死を引き起す。

### 2. 研究の目的

プロテアソーム機能を活性化する方法が神経変性疾患の治療法となる可能性がある。そこで私たちは、神経変性疾患の治療法を探索するために、プロテアソームの機能を活性化する方法を研究した。

### 3. 研究の方法

#### プロテアソーム阻害剤 神経細胞死の治療と解析

細胞を対照として擬似洗浄するか、または様々な濃度のエポキシマイシンまたはラクタシスチンで8時間前処理し、次いで条件培地で24時間培養した。その後、高用量のプロテアソーム阻害剤に24時間曝露した後、細胞生存率をLDH放出によって測定した。

#### プロテアソーム活性アッセイ

示された刺激の後、約 $5 \times 10^6$ 個の細胞を溶解バッファー(50nM Tris-HCl (pH 7.5)、100mM NaCl、0.2% CHAPS、5mM EDTA、1mM EGTA、3mM Na<sub>3</sub>N、およびプロテアーゼ阻害剤カクテル(Sigma))で溶解した。そして細胞抽出物は、45,000 rpm、120,000 gで30分間、4で遠心分離した。プロテアソーム活性は、Suc-LLVY-amc (Succinyl -Leu-Leu-Val-Tyr-7-amino-4-methylcoumarin) (Bachem, Bubendorf、スイス) および Z-LLE-amc (Z-Leu-Leu-Glu-7-amino-4-methylcoumarin) および ZBoc-LRR-amc (ZBoc-Leu-Arg-Arg-7-amino-4-methylcoumarin) を基質として使用する。80ミリリットルの細胞抽出物と100μLの50nM基質を混合し、37で15分間インキュベートした。放出された7-amino-4-methylcoumarin (AMC)の蛍光を、励起波長380 nm および発光波長450 nmで測定した。

#### マイクロアレイ分析

マイクロアレイ解析は、Affymetrix 発現解析技術マニュアルに従い、7台のAffymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Arrayを用いて実施した。以下の対照および処理を使用した:偽洗浄を対照として使用し、100nM エポキシマイシンで1時間、4時間または8時間処理し、500nM ラクタシスチンで1時間、4時間または8時間処理した。各サンプルからの全RNAを、QIAGEN RNeasy Miniキット(Qiagen、カリフォルニア州サンタクララ)を使用して抽出した。相対的なmRNA発現レベルは、Affymetrix Microarray Suite 5.0ソフトウェアを使用して、コントロールと比較したシグナル対数比として表された。2倍の変化を示す遺伝子が特定され、その後の分析に組み込まれた。

#### リアルタイム定量的RT-PCR

全RNAは、Qiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen、カリフォルニア州サンタクララ)を使用して抽出した。A260/A280吸収比が1.9を超えるRNAサンプルを、High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA)を使用してcDNA合成に供した。リアルタイム定量的PCRをABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems)で実行し、ヒトのPSMB1、PSMB6、NFE2L2、およびGAPDH遺伝子のプライマー/プローブセットをTaqMan Gene Expression Assay Products (Applied Biosystems)から購入した。すべての定量的PCR反応を複製し、増幅の中間対数期の閾値におけるPSMB1、PSMB6またはNFE2L2 cDNAの量とGAPDH

内部対照 cDNA の量の比を使用して、各遺伝子 mRNA の量を比較した。

#### 4 . 研究成果

私たちは、プロテアソームの機能を活性化する新たな手段を見つけるために、プロテアソームの活性を促進する現象に注目した。細胞をプロテアソーム阻害剤で処理すると、用量依存的に細胞死が示された。しかし、低用量のプロテアソーム阻害剤で8時間前処理した細胞は、偽洗浄した細胞よりも高い生存率を示した。エポキシマイシン(100nM)で24時間投与した後、20nMのエポキシマイシンで前処理すると生存率が大幅に増加した。生存率は、それぞれラクタシスチン(500nMまたは1000nM)処理の24時間後に500nMのラクタシスチンで前処理することによっても有意に増加した。さらに、低用量のプロテアソーム阻害剤で前処理すると、エポキシマイシンとラクタシスチンの両方が、高用量のプロテアソーム阻害剤で24時間処理したにもかかわらず、細胞のGFPuタンパク質を分解できた。これらのデータは、低用量のプロテアソーム阻害剤による前処理により、高用量のプロテアソーム阻害剤に対する耐性が細胞に与えられることを示唆している。私たちはこの現象を「プロテアソーム耐性」と呼ぶ。

私たちは、「プロテアソーム耐性」はプロテアソーム発現の増加に起因すると考えた。そこで、プロテアソームサブユニットの発現レベルを測定し、「プロテアソーム耐性」がプロテアソーム発現の増加によってもたらされるかどうかを調べた。ヒト神経芽腫 SH-SY5Y 細胞を、0nM、10nM、または 100nM のプロテアソーム阻害剤エポキシマイシンとともに 12 時間インキュベートした。次に、全 RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR によりプロテアソームサブユニット PSMB1 または PSMB6 の発現レベルを測定した。PSMB1 は 10nM のエポキシマイシンによって有意に増加したが、100nM のエポキシマイシンでは有意性は達成されなかった。PSMB6 は、10nM および 100nM のエポキシマイシンの両方で有意に増加した。

「プロテアソーム耐性」をさらに分析するために、タウの過剰発現に対する「プロテアソーム耐性」の影響をモニタリングした。SK-N-SH 細胞は、20nM のエポキシマイシンで8時間前処理することによって「プロテアソーム耐性」を誘導され、その後条件培地で24時間培養された。次に、細胞にタウ発現プラスミドを一時的にトランスフェクトした。24時間のインキュベーション後、細胞溶解物を抗タウ抗体を用いてイムノプロットングを実施した。細胞に「プロテアソーム耐性」を誘導すると、偽洗浄した細胞と比較してタウタンパク質の蓄積が減少した。

プロテアソームサブユニットの上方制御に関与する因子を調査するために、プロテアソーム阻害剤処理時に発現される遺伝子のマイクロアレイ分析を実施した。各 Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array を使用して、プロテアソーム阻害剤で処理したヒト神経芽腫由来 SH-SY5Y 細胞の遺伝子発現プロファイルを検討した。マイクロアレイ分析のために、誘導されたプロテアソーム サブユニット発現レベルを反映する 3 つのプロテアソーム阻害剤治療期間が選択された。20nMのエポキシマイシンまたは500nMのラクタシスチンで1時間、4時間、または8時間処理した後、データのクラスター分析により、同じ時点でのエポキシマイシンとラクタシスチン間の関係は、異なる時点での同じ薬剤間関係よりもはるかに緊密であることが明らかになった。エポキシマイシン治療群とラクタシスチン治療群の両方で発現レベルが上方制御されている転写因子を検索した。その中でも Nrf2 をエンコードする NFE2L2 に注目して解析した。各条件における NFE2L2 の発現レベルをリアルタイム PCR により測定した。プロテアソーム阻害剤の各用量および種類は、4 時間および 8 時間で対照と比較して NFE2L2 の有意な発現増加を示した。

プロテアソーム機能に対する Nrf2 の効果を検出するために、SH-SY5Y 細胞で Nrf2 の過剰発現を実行した。細胞に Nrf2 発現ベクターをトランスフェクトし、24 時間インキュベートした後、プロテアソーム サブユニットの発現レベルとプロテアソーム活性を測定した。プロテアソームサブユニット PSMB1 および PSMB6 の両方の発現レベルは、Nrf2 過剰発現によって有意に増加した。Nrf2 トランスフェクト細胞ではすべてのプロテアソーム活性が加速された。次に、「プロテアソーム耐性」によってタウの蓄積と細胞毒性が軽減されるタウに対する Nrf2 の効果を確認した。Nrf2 およびタウを SH-SY5Y 細胞で 24 時間コトランスフェクトした後、細胞溶解物を抗タウ抗体を用いて免疫プロットングを実施した。Nrf2 過剰発現によりタウの蓄積は「プロテアソーム耐性」と同様に減少した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	工藤 喬  (Kudo Takashi)  (10273632)	大阪大学・キャンパスライフ健康支援・相談センター・教授    (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関