

学位論文抄録

SIRT7 Deficiency Protects against $A\beta_{42}$ -Induced Apoptosis through the Regulation of NOX4-Derived Reactive Oxygen Species Production in SH-SY5Y Cells
(SH-SY5Y 細胞における SIRT7 欠損は NOX4 由来活性酸素種の産生制御を介して $A\beta_{42}$ 誘導性アポトーシスを抑制する)

水 谷 浩 徳

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻脳神経内科学

指導教員

植田 光晴 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻脳神経内科学

山縣 和也 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻病態生化学

Abstract of the Thesis

Background and Purpose: Alzheimer's disease (AD) is an age-related neurodegenerative disease that is characterized by irreversible memory loss and cognitive decline. The deposition of amyloid- β ($A\beta$), especially aggregation-prone $A\beta_{42}$, is considered to be an early event preceding neurodegeneration in AD. Sirtuins (SIRT1–7 in mammals) are nicotinamide adenine dinucleotide-dependent lysine deacetylases/ deacylases that regulate diverse biological processes. SIRT1 and SIRT3 play protective roles against AD. However, the involvement of SIRT7 in AD pathogenesis remains unexplored. In this study, we attempted to investigate the role of SIRT7 in $A\beta_{42}$ -induced neurotoxicity *in vitro*.

Methods: First, we reanalyzed the expression profile of sirtuin genes in the brains of AD patients using previously published microarray datasets. We next examined $A\beta_{42}$ -induced cytotoxicity in *SIRT7* knockdown (KD) neuronal SH-SY5Y cells, a human neuroblastoma cell line. Cell death was examined by cleaved (activated) caspase 3 protein, the number of annexin V-positive apoptotic cells, and lactate dehydrogenase (LDH) activity. Cellular and mitochondrial ROS production were assessed by using DCF-DA and MitoSOX Red probes, respectively. To explore the source of ROS production, we focused on NADPH oxidase 4 (NOX4) and examined $A\beta_{42}$ -induced ROS production and cell death in *NOX4* KD SH-SY5Y cells. Finally, we examined the relationship between SIRT7 and NOX4 expression in $A\beta_{42}$ -induced neurotoxicity.

Results: *SIRT7* mRNA expression was increased in the cortex, entorhinal cortex, and prefrontal cortex of AD patients. $A\beta_{42}$ treatment increased cleaved caspase 3 protein, the number of annexin V-positive apoptotic cells, and LDH activity in control SH-SY5Y cells, which was significantly suppressed by *SIRT7* KD. As an upstream signal of apoptosis, intracellular ROS was markedly increased after $A\beta_{42}$ exposure. However, this increase in ROS was suppressed by *SIRT7* KD. In contrast, $A\beta_{42}$ treatment did not increase mitochondrial ROS. *NOX4* KD significantly inhibited $A\beta_{42}$ -induced apoptosis and ROS generation. Concomitant KD of *SIRT7* and *NOX4* did not result in an additional decrease in apoptosis and ROS production compared with *NOX4* KD. $A\beta_{42}$ treatment significantly increased NOX4 protein levels in control cells without affecting *NOX4* mRNA expression, while *SIRT7* KD suppressed the increase in protein expression.

Conclusions: These results demonstrate that SIRT7 deficiency protects against $A\beta_{42}$ -induced apoptosis through the regulation of NOX4-derived ROS production in SH-SY5Y cells. Our findings suggest that the inhibition of SIRT7 may play a beneficial role in AD pathogenesis.

学位論文抄録

[背景・目的] アルツハイマー病 (Alzheimer's disease: AD) は最も頻度の高い認知症の原因疾患である。アミロイド β ($A\beta$)、特に凝集性や神経細胞毒性の高い $A\beta_{42}$ の脳内沈着は AD の早期から見られる特徴的な病理学的変化とされるが、アミロイド病理を起点として神経細胞死への変遷機構については未だ不明な点が多い。一方、長寿関連遺伝子サーチュイン (哺乳類では SIRT1-7) は NAD 依存性脱アセチル化酵素として働き、代謝・がん・老化などに関与する重要な因子である。SIRT1 や SIRT3 は AD 発症に抑制的に作用することが報告されているが、AD における SIRT7 の発現様式や役割は全く不明である。本研究では、 $A\beta_{42}$ 誘導性神経細胞死に着目し AD 発症・進展過程における SIRT7 の役割について検討した。

[方法] 公開データベース NCBI GEO (Gene Expression Omnibus) 上のマイクロアレイデータを再解析し、AD 患者における *SIRT1-7* の発現解析を行った。siRNA を用いて *SIRT7* をノックダウンしたヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y (*SIRT7* KD) 細胞を樹立し、 $A\beta_{42}$ による神経細胞死及び活性酸素種 (ROS) 産生について検討した。細胞死は、切断型 (活性型) カスパーゼ 3 蛋白量、アネキシン V 陽性細胞及び LDH 活性で検討し、細胞内及びミトコンドリアの ROS の検出にはそれぞれ蛍光プローブ DCF-DA 及び MitoSOX Red を用いた。NADPH オキシダーゼ 4 (*NOX4*) をノックダウンした SH-SY5Y (*NOX4* KD) 細胞を樹立し、 $A\beta_{42}$ による ROS 産生と細胞死における *NOX4* の役割及び SIRT7 との関連性について検討した。

[結果] 3 種の独立したマイクロアレイ結果を再解析し、AD 患者の大脳皮質、嗅内野、前頭前皮質において *SIRT7* mRNA 量の有意な発現増加を認めた。また対照細胞では $A\beta_{42}$ 添加により死細胞指標である切断型カスパーゼ 3 蛋白、アネキシン V 陽性細胞、LDH 活性の増加を認めたが、*SIRT7* KD 細胞ではいずれの値も有意に減少した。また対照細胞では $A\beta_{42}$ 添加により細胞内 ROS 産生及び *NOX4* 蛋白量の有意な増加を認めたが、*SIRT7* KD 細胞ではこれらの上昇が有意に抑制されていた。一方、 $A\beta_{42}$ 添加によりミトコンドリア ROS 産生の増加を認めなかった。*NOX4* KD 細胞においても、 $A\beta_{42}$ による ROS 産生及び細胞死の有意な減少を認めたが、このとき *SIRT7* と *NOX4* のダブル KD 細胞では細胞死および ROS 産生において相加的な抑制効果を認めなかった。また $A\beta_{42}$ 添加による *NOX4* 蛋白量の増加時に、*NOX4* mRNA 発現量に変化はなかった。

[考察] 以上のことより SIRT7 は $A\beta_{42}$ による *NOX4* 蛋白量増加過程に関与していることが示されたが、その転写後調節の分子メカニズムについては未だ明らかではない。免疫沈降法により SIRT7 と *NOX4* の直接的な相互作用は確認できなかったため、SIRT7 は他の制御因子を介して間接的に *NOX4* 蛋白を制御していると考えられた。

[結論] SIRT7 欠損は *NOX4* 由来の ROS 産生を抑え、 $A\beta_{42}$ 誘導性神経細胞死を抑制することが示された。SIRT7 の阻害は AD 発症抑制に寄与し得ると考えられた。