

# 科技部補助專題研究計畫成果報告 期末報告

探討  $\beta$  類澱粉蛋白對於  $\alpha$ -Synuclein 所導致神經毒性之分子機轉研究

計畫類別：個別型計畫  
計畫編號：NSC 102-2314-B-040-005-  
執行期間：102年08月01日至103年07月31日  
執行單位：中山醫學大學醫學研究所

計畫主持人：賴德仁  
共同主持人：李俊德、林志立  
計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理人員：鄭毓仕  
碩士班研究生-兼任助理人員：張琇涵  
博士班研究生-兼任助理人員：李欣樺

報告附件：出席國際會議研究心得報告及發表論文

處理方式：

1. 公開資訊：本計畫可公開查詢
2. 「本研究」是否已有嚴重損及公共利益之發現：否
3. 「本報告」是否建議提供政府單位施政參考：否

中華民國 103 年 10 月 31 日

中文摘要：路易氏體失智症(Dementia with Lewy bodies, DLB)及阿茲海默症(Alzheimer's disease, AD)是兩種常見的老年認知障礙疾病，其病理特徵是患者腦部分別會有 amyloid  $\beta$  ( $A\beta$ )沈積或  $\alpha$ -synuclein 蛋白質聚集的現象。然而令人感到興趣的是，多數的 DLB 病患會顯現與 AD 腦部相似的病理特徵，同時分析 DLB 的路易氏體成分也會發現  $\alpha$ -synuclein 與  $A\beta$  這兩個蛋白是經常性的共位聚集。事實上越來越多的證據已指出，DLB 與 AD 兩者之間似乎存在著某些相似的致病過程，特別是  $A\beta$  與老化這兩個因素很可能在誘發路易氏體生成作用中扮演著關鍵性的促進角色，然而目前對於  $A\beta$  是如何影響細胞內  $\alpha$ -synuclein 的聚集、廓清與神經毒性等分子機制並不十分明瞭。為了釐清以上的問題，我們利用實驗室自行發展出來的  $\alpha$ -synuclein 條件表現細胞培養模式，用來模擬 DLB 的病程進展中  $\alpha$ -synuclein 聚集沈積的情形。結果顯示， $A\beta$  確實會透過影響  $\alpha$ -synuclein 的轉譯後修飾來促進其在神經細胞中的聚集與沈積，此外  $A\beta$  也會透過干擾細胞內的自噬過程來抑制  $\alpha$ -synuclein 的蛋白質降解作用。我們認為此研究結果將能用於解釋  $A\beta$  在 DLB 病程進展中如何扮演促進者的角色，除了可以闡明  $A\beta$  與  $\alpha$ -synuclein 在 DLB 分子致病機轉中的交互作用外，也能有助於在未來發展出新型的 DLB 治療策略。

中文關鍵詞：路易氏體失智症、阿茲海默症、 $\alpha$ -Synuclein、 $\beta$  類澱粉蛋白、自噬性降解。

英文摘要：Dementia with Lewy bodies (DLB) and Alzheimer's disease (AD) are two common causes of geriatric cognitive impairments. They are pathologically characterized by amyloid  $\beta$  ( $A\beta$ ) depositions and  $\alpha$ -synuclein aggregates in the brain respectively. It is interesting that most patients with DLB also show cerebral AD-type pathology. Similarly, it is well known that  $\alpha$ -synuclein and  $A\beta$  are frequently colocalized in Lewy bodies. In fact, growing evidence supports the concept that DLB and AD share some similar characteristics. As a possibility, the formation of Lewy bodies may be initiated by apparition of certain promotion factor such as aging and  $A\beta$  in the pathogenesis of DLB. However, it is not clear how  $A\beta$  contributes to  $\alpha$ -synuclein aggregation, clearance and neurotoxicity in molecular mechanisms. In light of these properties, we have

developed an in vitro conditional  $\alpha$ -synuclein expression system which can mimic the aggregation of  $\alpha$ -synuclein as DLB. According to our results,  $A\beta$  really promoted  $\alpha$ -synuclein aggregation and accumulation through modulating post-translational modification. Moreover,  $A\beta$  also decreased the degradation of aggregated  $\alpha$ -synuclein by interfering intracellular autophagic processes. These results confirm and extend the role of  $A\beta$  as contributing factors in DLB pathogenesis, and also provide the basis for new mechanisms interplayed between  $A\beta$  and  $\alpha$ -synuclein, which provides an insight in a new DLB therapeutic strategies in future.

英文關鍵詞： Dementia with Lewy bodies (DLB), Alzheimer' s disease (AD),  $\alpha$ -Synuclein, Amyloid  $\beta$  ( $A\beta$ ), Autophagic degradation

# 行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

(期中進度報告/期末報告)

## 探討 $\beta$ 類澱粉蛋白對於 $\alpha$ -Synuclein 所導致神經毒性之 分子機轉研究

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 102-2314-B-040-005

執行期間：102 年 8 月 1 日至 103 年 7 月 31 日

執行機構及系所：中山醫學大學 醫學研究所

計畫主持人：賴德仁教授

共同主持人：李俊德講師、林志立助理教授

計畫參與人員：鄭毓仕碩士生、張琇涵碩士生、李欣樺博士生

本計畫除繳交成果報告外，另含下列出國報告，共 1 份：

執行國際合作與移地研究心得報告

出席國際學術會議心得報告

期末報告處理方式：

1. 公開方式：

非列管計畫亦不具下列情形，立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權，一年二年後可公開查詢

2. 「本研究」是否已有嚴重損及公共利益之發現：否 是

3. 「本報告」是否建議提供政府單位施政參考 否 是，\_\_\_\_\_（請列舉提供之單位；本會不經審議，依勾選逕予轉送）

中 華 民 國 103 年 10 月 30 日

## 中文摘要及關鍵詞

路易氏體失智症(Dementia with Lewy bodies, DLB)及阿茲海默症(Alzheimer's disease, AD)是兩種常見的老年認知障礙疾病，其病理特徵是患者腦部分別會有 amyloid  $\beta$  ( $A\beta$ )沈積或  $\alpha$ -synuclein 蛋白質聚集的現象。然而令人感到興趣的是，多數的 DLB 病患會顯現與 AD 腦部相似的病理特徵，同時分析 DLB 的路易氏體成分也會發現  $\alpha$ -synuclein 與  $A\beta$  這兩個蛋白是經常性的共位聚集。事實上越來越多的證據已指出，DLB 與 AD 兩者之間似乎存在著某些相似的致病過程，特別是  $A\beta$  與老化這兩個因素很可能在誘發路易氏體生成作用中扮演著關鍵性的促進角色，然而目前對於  $A\beta$  是如何影響細胞內  $\alpha$ -synuclein 的聚集、廓清與神經毒性等分子機制並不十分明瞭。為了釐清以上的問題，我們利用實驗室自行發展出來的  $\alpha$ -synuclein 條件表現細胞培養模式，用來模擬 DLB 的病程進展中  $\alpha$ -synuclein 聚集沈積的情形。結果顯示， $A\beta$  確實會透過影響  $\alpha$ -synuclein 的轉譯後修飾來促進其在神經細胞中的聚集與沈積，此外  $A\beta$  也會透過干擾細胞內的自噬過程來抑制  $\alpha$ -synuclein 的蛋白質降解作用。我們認為此研究結果將能用於解釋  $A\beta$  在 DLB 病程進展中如何扮演促進者的角色，除了可以闡明  $A\beta$  與  $\alpha$ -synuclein 在 DLB 分子致病機轉中的交互作用外，也能有助於在未來發展出新型的 DLB 治療策略。

關鍵字：路易氏體失智症、阿茲海默症、 $\alpha$ -Synuclein、 $\beta$ 類澱粉蛋白、自噬性降解。

## Abstract and Keywords

Dementia with Lewy bodies (DLB) and Alzheimer's disease (AD) are two common causes of geriatric cognitive impairments. They are pathologically characterized by amyloid  $\beta$  ( $A\beta$ ) depositions and  $\alpha$ -synuclein aggregates in the brain respectively. It is interesting that most patients with DLB also show cerebral AD-type pathology. Similarly, it is well known that  $\alpha$ -synuclein and  $A\beta$  are frequently colocalized in Lewy bodies. In fact, growing evidence supports the concept that DLB and AD share some similar characteristics. As a possibility, the formation of Lewy bodies may be initiated by apparition of certain promotion factor such as aging and  $A\beta$  in the pathogenesis of DLB. However, it is not clear how  $A\beta$  contributes to  $\alpha$ -synuclein aggregation, clearance and neurotoxicity in molecular mechanisms. In light of these properties, we have developed an *in vitro* conditional  $\alpha$ -synuclein expression system which can mimic the aggregation of  $\alpha$ -synuclein as DLB. According to our results,  $A\beta$  really promoted  $\alpha$ -synuclein aggregation and accumulation through modulating post-translational modification. Moreover,  $A\beta$  also decreased the degradation of aggregated  $\alpha$ -synuclein by interfering

intracellular autophagic processes. These results confirm and extend the role of A $\beta$  as contributing factors in DLB pathogenesis, and also provide the basis for new mechanisms interplayed between A $\beta$  and  $\alpha$ -synuclein, which provides an insight in a new DLB therapeutic strategies in future.

Key words: Dementia with Lewy bodies (DLB), Alzheimer's disease (AD),  $\alpha$ -Synuclein, Amyloid  $\beta$  (A $\beta$ ), Autophagic degradation.

## 前言

路易氏體失智症(Dementia with Lewy bodies, DLB) 首先於 1961 年由 Okazaki 等人描述，是一種臨床及病理表現上重疊於巴金森氏症(Parkinson's disease, PD)與阿茲海默症(Alzheimer's disease, AD)之間的中樞神經退化性疾病。DLB 在所有 dementia 中其發生率僅次於 AD，但臨床上並沒有辦法完全區分 DLB AD 或 PD 的差異；此外目前對 DLB 的瞭解與研究進展均十分有限，迄今也沒有存在任何有效藥物，為謀求此類病人的健康，我們有必要投入更多精力與資源於 DLB 的基礎研究之中。根據目前對 DLB 致病過程的瞭解，Lewy bodies 的主要是由不正常折疊的  $\alpha$ -synuclein 所構成，待因不明原因變性後會相互聚集形成不溶性的蛋白纖維團塊並沈澱於神經元中。但是大多數的情況裡 sporadic DLB 並未發現  $\alpha$ -synuclein 存在有任何內生性的分子遺傳缺陷，這表示蛋白質突變並不是  $\alpha$ -synuclein 產生聚集與沈積的主要原因，一定還存在著某些  $\alpha$ -synuclein 遺傳突變以外的因素，使其改變蛋白折疊構型並聚集沈積導致神經毒性。此外  $\alpha$ -synuclein 是一種小型的非結構性蛋白質，這種物質特性通常會與其他蛋白質交互作用(e.g. chaperon)，透過影響特定的調節蛋白(例如各種細胞內的蛋白質磷酸激酶)而產生不同的構型或功能。由於相當比率的 DLB 患者其 Lewy bodies 是同時由  $\alpha$ -synuclein 與 A $\beta$  兩種蛋白相互糾結構成，再加上 DLB 與 AD 之間在臨床診斷上的眾多相關性，暗示著兩者之間確實存在著某種相依的分子致病機轉。

## 研究目的

DLB 在所有退化性失智症中的發生率僅次於 AD，但目前仍缺乏有效的藥物來減緩神經元持續的退化或阻滯疾病的進程，即使給予病人良好的照護與處置，臨床上對於 DLB 病患的治療的效果仍是十分有限，面對當前的狀況，致力於發展機制性的策略將是治療 DLB 極其重要的關鍵。然而 DLB 的臨床特徵十分複雜，經常同時具有類似 AD 的失智症表現又合併類似 PD 的運動功能障礙，且在其他 biomarkers

方面的檢查包括基因、血液或腦脊髓液等方面也都還沒有很好的診斷指標。因此若能透過執行本計畫，詳細釐清 DLB 的分子致病機轉，將有助益於未來開發包括 DLB 之 synucleinopathy 相關疾病的預防、診斷與治療策略。我們先前的曾發現 A $\beta$  會影響  $\alpha$ -synuclein 並形成聚集與沈澱，並會透過抑制 autophagy 活性的方式來增強  $\alpha$ -synuclein 所誘發的神經毒性，但其聚集與毒性機制還需深入探討。因此我們假設 Lewy bodies 的形成，是因 A $\beta$  會透過影響  $\alpha$ -synuclein 的轉譯後修飾作用，誘導其產生不溶蛋白纖維聚集沈澱於細胞中，並協同抑制 autophagy 的活性作用來引起神經元退化的情況，但其機轉是否是透過影響 senescence 及其下游訊息傳遞仍未知。為了證實這個假設，在本計劃書中我們將深入探討 A $\beta$  與  $\alpha$ -synuclein 之轉譯後修飾、沈積與廓清的關係關係，並希望透過細胞、動物及人體檢體模式，探討 DLB 的分子致病機轉並評估利用調控 autophagy 的活性之策略來治療 DLB 的可行性。透過執行本計畫，我們可以獲知 (i) A $\beta$  是否影響到  $\alpha$ -synuclein 的聚集與沈積 (ii) A $\beta$  是否影響了  $\alpha$ -synuclein 的廓清作用 (iii) aging process 在 DLB 中所發揮的影響 (iv)  $\alpha$ -synuclein、autophagy 與 aging 等相關的 biomarkers 是否有助於 DLB 的診斷及預後 (v) autophagic degradation 是否能作為 DLB 的治療策略。希望透過執行本計畫除可進一步釐清 DLB 的分子致病機轉外，並能有助於在未來開發設計出的新型預防或治療 DLB 的天然物或藥物，業以克服目前 DLB 治療上困難以造福人群。

## 研究方法

主要包括兩個部分：

【實驗一】以 in vitro 實驗模式探討 A $\beta$  如何協同過量表現之  $\alpha$ -synuclein 誘發神經毒性的分子機轉

1. 建立  $\alpha$ -synuclein 條件表現(conditional expression)載體的細胞株：在本實驗設計中，我們將透過內生性產生  $\alpha$ -synuclein 的方式，模擬在自然情況下細胞內  $\alpha$ -synuclein 生合成與聚集堆積的情形。本實驗我們將選擇人類的神經細胞株 SK-N-MC 作為實驗材料，SK-N-MC 是一種由人類 CNS 分離出來的神經母細胞瘤(neuroblastoma)，根據 ATCC 的資料具有中等程度的 dopaminergic characteristics，因此相當適合作為分析 DLB 或 PD 等 synucleinopathies 相關疾病的神經學試驗材料。由於正常的人類神經元細胞難以獲取，因此不得已必須採用細胞株來進行實驗，以模擬人類神經元細胞在過量  $\alpha$ -Synuclein 時遭遇 A $\beta$  的反應。目前世界上大部分類似的研究中採用都是能持續表現過量  $\alpha$ -synuclein 載體的方式(e.g. pcDNA3, Invitrogen®)，雖確實能成功表現  $\alpha$ -synuclein，但僅能用於暫時性的轉染作用(transient transfection)。然而由於受限於現在的技術能力，每批次進行暫時轉染的基因表現率並不會完全相同，長期下來會影響到實驗數據的穩定度，

因此並不適宜作為長久的實驗材料(我們無法確定長期過量表現  $\alpha$ -synuclein 對神經細胞是不是會有其他未知的影響)。為了解決這個問題，我們嘗試自行建立能條件表現  $\alpha$ -synuclein 的細胞株，並透過 mifepristone 誘導的方式促使  $\alpha$ -synuclein 隨實驗條件來控制其表現 (GeneSwitch™ system, Invitrogen®)，目前這個穩定細胞株(stable clone)已經建立完成，在未來我們也將會利用此以系統進行各項實驗分析，並繼續以此細胞株模式作為將來建立對抗 synucleinopathies 藥物開發所需之核心快速篩檢平台。

2. 透過外加  $A\beta_{1-42}$  於各種神經細胞株的方式，探討正常或過量表現  $\alpha$ -synuclein 情況下  $A\beta$  對其所造成神經毒性之影響：在本實驗中，我們將觀察細胞在處理較低濃度的  $A\beta_{1-42}$ (1~5  $\mu$ M)之後， $\alpha$ -synuclein 基因本身表現及其聚集沈積造成細胞凋亡的狀況，並同時觀察凋亡訊息下游各標的分子的變化包括 PI3K-Akt、GSK3 $\beta$  及細胞凋亡訊息途徑(caspases、PARP)之分析等。另外本部分我們也會特別著重於分析細胞在處理  $A\beta$  之後  $\alpha$ -synuclein 所受到的轉譯後修飾情形，包括分析 acidic C-terminal 區域特定磷酸化的位點(包括目前 Ser<sup>87</sup> 與 Ser<sup>129</sup> 這兩個已知會引發  $\alpha$ -synuclein 聚集反應的位點)，及 ubiquitination 及 sumoylation 在處理  $A\beta$  之後的變化。
3. 已知 DLB 與 AD 在病理上其 tau 的過磷酸化現象並不一致，tau 的過磷酸化現象在 AD 中是經常發生，但這個情況在 DLB 中則相對罕見，至今其機轉仍不明確。因此在本部分的實驗中，我們也將分析  $\alpha$ -synuclein 如何影響“ $A\beta$ -to-tau signaling”的分子機轉，以探討並解釋為何 tau 的過磷酸化現象在 DLB 與 AD 中不一致的現象。本部分我們會著重於分析影響 tau hyperphosphorylation 的標的蛋白，包括 CDK5/p25、GSK3 $\beta$  以及 phosphatases (e.g. PP2A and PP2B)對 tau 過磷酸化調控的影響。

**【實驗二】** 以 *in vitro* 實驗模式探討 autophagic degradation 機制與  $\alpha$ -synuclein 之聚集與廓清之間的關聯性，並測試是否能透過活化 autophagy 的方式減少  $\alpha$ -synuclein 沈積所造成之神經毒性

1. 已知  $A\beta$  除會干擾 lysosome system 外，並會透過抑制 AMPK 來活化 mTOR 以降低 autophagic degradation 的作用，並可能因此加重  $\alpha$ -synuclein 沈積後所造成的細胞毒性，但其干擾 autophagy 的分子機制目前並不清楚。因此本實驗將探討  $A\beta$  如何調控並減低 autophagy 的活性，我們將分析關於 autophagy 中一系列包括 AMPK、mTOR、ULK1、Beclin-1、Atgs、LC3 I/II 等訊息因子，並透過 lysosomal 螢光染色標定的方式來追蹤瞭解 autophagic degradation 受影響的情況以及 aggregated  $\alpha$ -synuclein 在胞內代謝的情形。
2. 除了  $A\beta$  影響的假說外，目前也有研究指出  $\alpha$ -synuclein 本身的結構或後修飾變化也可能會影響



autophagy，但是還不清楚其真正參與在 autophagy 的哪一個詳細步驟。所以本實驗主要著重在當細胞過量表現  $\alpha$ -synuclein 時，細胞自噬作用是否受到其影響，特別是在  $A\beta$  處理之下，氧化壓力、粒腺體活性及  $\alpha$ -synuclein 的轉譯後修飾等是否會影響 autophagy 的功能並因此影響了  $\alpha$ -synuclein 的廓清作用。

3. 由於提高 autophagic degradation 活性被認為具有增加清除過量沈積  $\alpha$ -synuclein 的效果，因此若能設法找尋適合的化合物來調控 autophagy，對於未來發展 DLB 的治療藥物將頗具價值。因此在本部分的實驗中，我們會測試已知的數種化合物(例如 5-amino-1- $\beta$ -D-ribofuranosyl-imidazole-4-carboxamide, metformin 及 resveratrol 等可活化 AMPK 的藥物，和我們實驗室目前正在研究的數種 autophagy inducers (e.g. BC3EE2,9B Carbazole)等可促進 autophagic degradation 的化合物來增進  $\alpha$ -synuclein 的廓清作用，以評估這些化合物將來是否有潛力作為對抗 DLB 的 lead compounds。

## 結果與討論

研究結果中，我們發現  $A\beta$  確實會直接影響  $\alpha$ -synuclein 所導致的神經毒性，直接促成  $\alpha$ -synuclein 在細胞內產生聚集與沈積的現象，並干擾其細胞內的廓清作用。這些初步結果說明在 DLB 的患者腦部  $A\beta$  可能會誘發  $\alpha$ -synuclein 形成 Lewy bodies 的沈澱，且可能會透過影響  $\alpha$ -synuclein 的轉譯後修飾及抑制細胞自噬活性來產生毒性。是故我們不但說明  $A\beta$  確實參與了  $\alpha$ -synuclein 的神經毒性作用，並據此推演 AD 與 DLB 在分子致病機轉上的可能的關聯性。此外本年度我們也先進行了小規模的人體實驗，發現與 AD 患者相比較下，DLB 患者其老化現象與 AD 相似(PBMC 表現 Sirt1 的量相當，但都明顯少於對照組)，但  $TNF\alpha$  及 SOD1 的表現量卻明顯較 AD 組要低，因此雖然  $A\beta$  確實可能參與了 DLB 的致病過程，但與其在 AD 中分子機轉似乎存在著不小的差異。此外值得一提的是，在我們本年度的研究進度中，有另外一個較為特殊的結果，便是已成功的建立能進行條件表現(conditional expression)  $\alpha$ -synuclein 的穩定細胞株(stable clone)。在先前全世界所有關於 DLB 的 *in vitro* experimental model 中，都是以 transient transfection 在神經細胞過度表現  $\alpha$ -synuclein 的方式來進行研究，此方法雖確實能成功表現  $\alpha$ -synuclein，但僅能用於暫時性的轉染作用，並不適宜作為長期穩定的表現方式(因長期穩定表現  $\alpha$ -synuclein 對神經細胞仍然可能具有未知程度的毒性，不利於後續研究進行)。而在本年度的實驗中，我們不但將  $\alpha$ -synuclein 基因構築出來，並據此發展了透過 mifepristone 誘導的方式促使  $\alpha$ -synuclein 表現的穩定神經細胞株。就我們目前所知，這是全世界第一個 DLB *in vitro* cell conditional expression model，

待後續的實驗進一步證實此細胞株於 DLB 致病模式上的正確性之後，除有助於今後提供細胞模式使國內外各專家學者對 DLB 研究能更易進行外，也有益於在未來建立 DLB 的快速篩選平台。我們已將這些結果整理完畢，並將部分的內容撰寫成 manuscript 並投稿至 SCI 雜誌，目前正接受審稿中，進一步的內容可詳閱附件檔的 PDF file。

### 報告內容參考文獻

1. Andersson, F.I., et al., 2011. The effect of Parkinson's-disease-associated mutations on the deubiquitinating enzyme UCH-L1. *J. Mol. Biol.* 407, 261-72.
2. Bolognin, S., et al., 2013. beta-Amyloid-aluminum complex alters cytoskeletal stability and increases ROS production in cortical neurons. *Neurochem. Int.* 62, 566-74.
3. Buysse, D.J., et al., 1989. The Pittsburgh Sleep Quality Index: a new instrument for psychiatric practice and research. *Psychiatry Res.* 28, 193-213.
4. Colla, E., et al., 2012. Endoplasmic reticulum stress is important for the manifestations of alpha-synucleinopathy in vivo. *J. Neurosci.* 32, 3306-20.
5. Colom-Cadena, M., et al., 2013. Confluence of alpha-Synuclein, Tau, and beta-Amyloid Pathologies in Dementia With Lewy Bodies. *J. Neuropathol. Exp Neurol.* 72, 1203-12.
6. Crews, L., et al., 2009. Role of synucleins in Alzheimer's disease. *Neurotox. Res.* 16, 306-17.
7. Deleidi, M., Maetzler, W., 2012. Protein clearance mechanisms of alpha-synuclein and amyloid-Beta in lewy body disorders. *Int. J. Alzheimers Dis.* 2012, 391438.
8. Dulovic, M., et al., 2013. The protective role of AMP-activated protein kinase in alpha-synuclein neurotoxicity in vitro. *Neurobiol. Dis.* (In press)
9. Edrey, Y.H., et al., 2014. Oxidative damage and amyloid-beta metabolism in brain regions of the longest-lived rodents. *J. Neurosci. Res.* 92, 195-205.
10. Fujita, M., et al., 2012. Possible Alterations in beta-Synuclein, the Non-Amyloidogenic Homologue of alpha-Synuclein, during Progression of Sporadic alpha-Synucleinopathies. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 11584-92.
11. Giorgi, F.S., et al., 2006. A short overview on the role of alpha-synuclein and proteasome in experimental models of Parkinson's disease. *J. Neural. Transm. Suppl.* 105-9.

12. Goedert, M., et al., 2012. 100 years of Lewy pathology. *Nat. Rev. Neurol.* 9, 13-24.
13. Haggerty, T., et al., 2011. Hyperphosphorylated Tau in an alpha-synuclein-overexpressing transgenic model of Parkinson's disease. *Eur. J. Neurosci.* 33, 1598-610.
14. Imamura, K., et al., 2005. Cytokine production of activated microglia and decrease in neurotrophic factors of neurons in the hippocampus of Lewy body disease brains. *Acta. Neuropathol.* 109, 141-50.
15. Irwin, D.J., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., 2013. Parkinson's disease dementia: convergence of alpha-synuclein, tau and amyloid-beta pathologies. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 626-36.
16. Kasuga, K., Nishizawa, M., Ikeuchi, T., 2012. alpha-Synuclein as CSF and Blood Biomarker of Dementia with Lewy Bodies. *Int. J. Alzheimers Dis.* 2012, 437025.
17. Kawakami, F., et al., 2011. Stimulatory effect of alpha-synuclein on the tau-phosphorylation by GSK-3beta. *FEBS J.* 278, 4895-904.
18. Lee, J.H., et al., 2012. Radiating amyloid fibril formation on the surface of lipid membranes through unit-assembly of oligomeric species of alpha-synuclein. *PLoS One.* 7, e47580.
19. Marsh, S.E., Blurton-Jones, M., 2012. Examining the mechanisms that link beta-amyloid and alpha-synuclein pathologies. *Alzheimers Res. Ther.* 4, 11.
20. Orr, M.E., Oddo, S., 2013. Autophagic/lysosomal dysfunction in Alzheimer's disease. *Alzheimers Res. Ther.* 5, 53.
21. Patanella, A.K., et al., 2010. Correlations between peripheral blood mononuclear cell production of BDNF, TNF-alpha, IL-6, IL-10 and cognitive performances in multiple sclerosis patients. *J. Neurosci. Res.* 88, 1106-12.
22. Shimada, H., et al., 2013. beta-amyloid in lewy body disease is related to Alzheimer's disease-like atrophy. *Mov. Disord.* 28, 169-75
23. Stefani A, et al., 2012. CSF and clinical hallmarks of subcortical dementias: focus on DLB and PDD. *J. Neural. Transm.* 119, 861-75.
24. Tanji, K., et al., 2012. Alteration of autophagosomal proteins in the brain of multiple system atrophy. *Neurobiol. Dis.* 49C, 190-198.
25. Wakabayashi, K., et al., 2013. The Lewy body in Parkinson's disease and related neurodegenerative disorders. *Mol. Neurobiol.* 47, 495-508.

Elsevier Editorial System(tm) for Neurobiology of Aging  
Manuscript Draft

Manuscript Number: NBA-14-858

Title: Amyloid  $\beta$  (A $\beta$ ) Inhibits Autophagy and Exacerbates Neurotoxicity in  $\alpha$ -Synuclein Overexpressed SK-N-MC Cells

Article Type: Regular Article

Section/Category: Alzheimer's Disease & Other Dementias

Keywords:  $\alpha$ -Synuclein; amyloid  $\beta$  (A $\beta$ ); dementia with Lewy bodies (DLB); autophagy; oxidative stress.

Corresponding Author: Prof. Te-Jen Lai, M.D., Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Chung Shan Medical University Hospital

First Author: Chih-Li Lin, Ph. D.

Order of Authors: Chih-Li Lin, Ph. D.; Yu-Shih Cheng; Hsin-Hua Li; Pai-Yi Chiu, M. D.; Te-Jen Lai, M.D., Ph.D.

Manuscript Region of Origin: TAIWAN

**Abstract:** Dementia with Lewy bodies (DLB) is the second most common cause of neurodegenerative dementia. The hallmark of DLB is Lewy bodies contain large amounts of aggregated  $\alpha$ -Synuclein. Therefore,  $\alpha$ -Synuclein is thought to be a key pathogenic protein involved in pathogenesis of DLB. Prior studies demonstrated that amyloid  $\beta$  (A $\beta$ ), a central factor in Alzheimer's disease (AD), might promote aggregation and toxicity of  $\alpha$ -Synuclein. However, the possible mechanisms of A $\beta$  contributes to  $\alpha$ -Synuclein-induced neurodegeneration remain unclear. In the present study, we investigated whether A $\beta$  promotes aggregation and enhances the cellular toxicity of  $\alpha$ -Synuclein. Our results showed that overexpression of wild-type  $\alpha$ -Synuclein is not toxic to neuronal cells, whereas it displayed a greater neurotoxicity exposure to A $\beta$ . In addition, A $\beta$  resulted in an increase the predominant monoubiquitination of  $\alpha$ -Synuclein, along with increased propensity toward aggregation. This is correlated with a reduced autophagic response, as seen in parallel with inhibition of AMPK-mTOR pathway. Further neuronal damage was suggested by greater mitochondrial deficit and oxidative stress, and downregulated Sirt1 and SOD1 antioxidative stress downstream signaling was also demonstrated both in vitro and in vivo. Our findings demonstrate that A $\beta$  promotes the aggregation of  $\alpha$ -Synuclein, and this is associated with impairing both ubiquitin-dependent and autophagic protein clearance pathways. Thus, our results provide the information that A $\beta$  may play a synergistic role in the  $\alpha$ -Synuclein pathology and accelerate its neurotoxicity.

## 國科會補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現（簡要敘述成果是否有嚴重損及公共利益之發現）或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以 100 字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文：已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利：已獲得 申請中 無

技轉：已技轉 洽談中 無

其他：（以 100 字為限）

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性），如已有嚴重損及公共利益之發現，請簡述可能損及之相關程度（以 500 字為限）

# 國科會補助專題研究計畫出席國際學術會議心得報告

日期：103 年 8 月 20 日

計畫編號	NSC 102-2314-B-040-005		
計畫名稱	探討 $\beta$ 類澱粉蛋白對於 $\alpha$ -Synuclein 所導致神經毒性之分子機轉研究		
出國人員姓名	林志立/李欣樺	服務機構及職稱	中山醫學大學醫學研究所 助理教授/博士候選人
會議時間	103 年 5 月 7 日 至 103 年 5 月 9 日	會議地點	Kyoto, Japan
會議名稱	(中文)第 3 屆國際自然科學與工程學術會議  (英文)The 3rd International Congress on Natural Sciences and Engineering		
發表題目	(中文)設立利用 C99 蛋白片斷條件式表現阿茲海默症相關之類澱粉前驅蛋白之模式  (英文) Generation of Alzheimer's Disease-associated amyloid precursor protein C99 conditional expression model in a human neuronal cell line SK-N-MC		

## 一、參加會議經過

ICNSE 為每年舉辦一次的世界性定期會議，今年選擇在日本京都的 Kyoto Research Park 舉辦，本次研討會的研究報告都是以摘要的形式先行投稿，經審閱後被接受刊登的研究性論文約二至三百篇左右。本次發表的壁報論文經大會編號為 ICNSE-731，展出時間於 5 月 8 日全日。整體而言，本次來自台灣發表的論文篇數相對數量不算少，內容也都相當精彩完整，經由參與這種學術活動進行國際交流深具學術價值，應更能提高台灣之後在本領域的國際能見度與貢獻度。

## 二、與會心得

本研討會開會的會場在京都的 Kyoto Research Park 舉辦，。而本次大會只要是在 1 樓大廳及 3、4 樓的會展中心進行。會中發言討論相當踴躍，整體而言參加本次研討會的收穫非常有意義，其中，此次會議中較令我印象深刻的一場演講為 University of North Carolina at Chapel Hill 的 Dr. Elena V. Batrakova (5 月 8 日)：Dr. Batrakova 提出了一個極為新穎的理念，在 Parkinson's disease 的治療中，由於血腦障壁的存在，使得藥物向中樞神經系統的傳輸效率一直都不是很好。而 Dr. Batrakova 則認為，若能透過基因改造周邊血液的 macrophages，可將欲對抗疾病的基因藉此輸入到 macrophages 中，並藉由病人腦中的微發炎反應吸引這些 macrophages 穿越 BBB 到達患部，以對受損神經組織進行修復，並防止進一步的凋亡發生。Dr. Batrakova 這個理念非常的創新，同時她也顯示初步的動物實驗結果，證明這個方法在臨床應用上的潛力。

### 三、發表論文全文或摘要

## ICNSE-731 Generation of Alzheimer's Disease-associated Amyloid Precursor Protein C99 Conditional Expression Model in a Human Neuronal Cell Line SK-N-MC

Hsin-Hua Li, Te-Jen Lai, Chih-Li Lin\*

Institute of Medicine, Chung Shan Medical University, Taiwan.

\*E-mail address: dll@csmu.edu.tw

### Abstract

Alzheimer's disease (AD) is the most common neurodegenerative disorder caused by accumulation of amyloid  $\beta$  ( $A\beta$ ) plaques deposit in brains.  $A\beta$  is originated by the proteolytic processing of a transmembrane glycoprotein called amyloid precursor protein (APP) via the coordination of several secretases. To investigate the relationship between  $A\beta$  production and neuronal degeneration, we established a conditional expression system in a human neuroblastoma cell line SK-N-MC. Two plasmids pSwitch and pGene/V5-His-APP-C99 were constructed and co-transfected into SK-N-MC cells which can induce endogenous  $A\beta$  generation in response to mifepristone stimulation. Our results showed that the GAL4-DBD/hPR-LBD/p65-AD fusion protein expressed by pSwitch was successfully activated and induced the expression of APP-C99 protein in engineered cells while administration of mifepristone. Besides, these cell exhibited a reduced cellular growth rate and displayed  $A\beta$ -mediated neurotoxicity compared to control group. Moreover, the cells also displayed some specific characteristics highly resemblance to neuronal degeneration found in Alzheimer's patients. Our findings suggested this novel conditional expression system is useful for neuronal  $A\beta$  generation which can be applied on the studies of AD molecular mechanisms. This is the first report of cytotoxic effects mediated by conditional expression of engineered-APP-C99 metabolic intermediate in neuronal cells. Our results provide a cell-based alternative to widely used in experimental AD research and may be a suitable pre-clinical model for AD therapeutics drugs screening in future.

Keyword: Alzheimer's disease (AD), amyloid beta ( $A\beta$ ), amyloid precursor protein (APP), neuronal degeneration, conditional expression

### 四、建議

本次會議的流暢性以及深入性皆有相當的專業水準，比較起來，國內大型會議還是

有一些尚可進步之處，包括：

(1) 雖然本次會議參加人數十分眾多，但報到流程、會場動線、櫃臺數目、各處標



幟等皆十分完善與醒目，因此雖然參與人數不亞於國內大型會議，但一點都沒有混亂感與壓迫感，註冊等待時間也相當合理。

(2) 大會有特地規劃休息區及用餐區，並很貼心的幫與會學者，特別是外國人代定餐點，這點對於人生地不熟的我們十分受用。

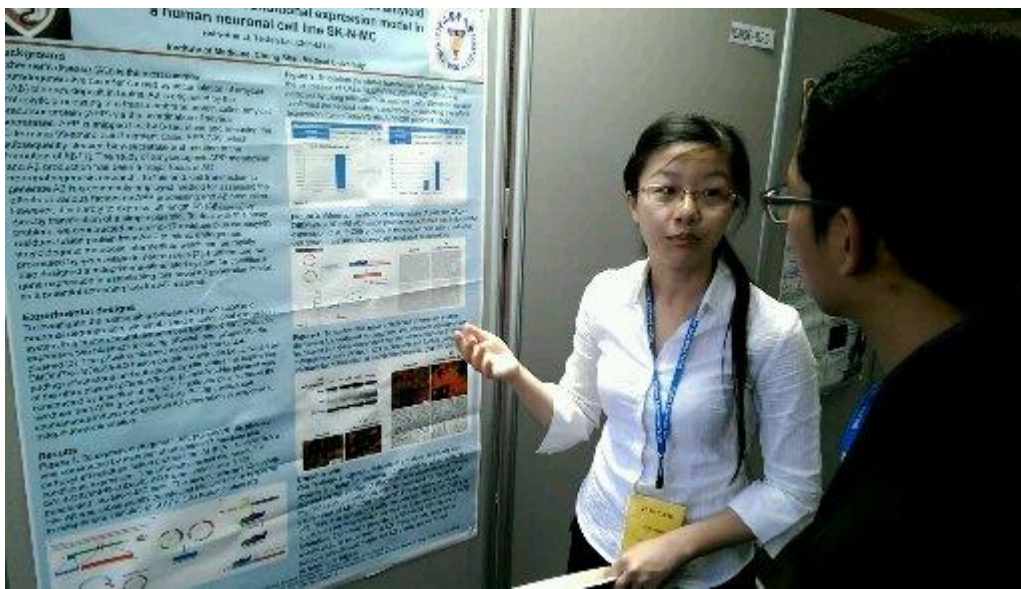
以上各點為我觀察到國內大型研討會不同之處最後，本人由衷地感謝科技部能補助個人及博士班學生參加本次論文發表的費用，此行的收穫確實可對未來的研究有極大的影響與助益。

## 五、攜回資料名稱及內容

1. 大會會議手冊
2. 大會發表論文摘要
3. 藥廠及儀器商所提供之相關資料

## 六、其他

參與大會之照片



博士班學生李欣樺正在與他國學者交換意見



大會入口報到處之海報

# 科技部補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2014/10/31

科技部補助計畫	計畫名稱: 探討 $\beta$ 類澱粉蛋白對於 $\alpha$ -Synuclein 所導致神經毒性之分子機轉研究
	計畫主持人: 賴德仁
	計畫編號: 102-2314-B-040-005- 學門領域: 精神科
無研發成果推廣資料	

102 年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：賴德仁		計畫編號：102-2314-B-040-005-				計畫名稱：探討β類澱粉蛋白對於α-Synuclein所導致神經毒性之分子機轉研究	
成果項目		量化			單位	備註（質化說明：如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等）	
		實際已達成數（被接受或已發表）	預期總達成數（含實際已達成數）	本計畫實際貢獻百分比			
國內	論文著作	期刊論文	1	1	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	2	1	100%		
		專書	0	0	100%		
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（本國籍）	碩士生	2	2	100%	人次	
		博士生	1	1	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		
國外	論文著作	期刊論文	1	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	1	1	100%		
		專書	0	0	100%		章/本
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（外國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		

<p style="text-align: center;">其他成果</p> <p>(無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)</p>	<p style="text-align: center;">無</p>
---	--------------------------------------

	成果項目	量化	名稱或內容性質簡述
科 教 處 計 畫 加 填 項 目	測驗工具(含質性與量性)	0	
	課程/模組	0	
	電腦及網路系統或工具	0	
	教材	0	
	舉辦之活動/競賽	0	
	研討會/工作坊	0	
	電子報、網站	0	
	計畫成果推廣之參與(閱聽)人數	0	

# 科技部補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以 100 字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文： 已發表  未發表之文稿  撰寫中  無

專利： 已獲得  申請中  無

技轉： 已技轉  洽談中  無

其他：（以 100 字為限）

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）（以 500 字為限）

研究結果中，我們發現 A $\beta$  確實會直接影響  $\alpha$ -synuclein 所導致的神經毒性，直接促成  $\alpha$ -synuclein 在細胞內產生聚集與沈積的現象，並干擾其細胞內的廓清作用。這些初步結果說明在 DLB 的患者腦部 A $\beta$  可能會誘發  $\alpha$ -synuclein 形成 Lewy bodies 的沈澱，且可能會透過影響  $\alpha$ -synuclein 的轉譯後修飾及抑制細胞自噬活性來產生毒性。是故我們不但說明 A $\beta$  確實參與了  $\alpha$ -synuclein 的神經毒性作用，並據此推演 AD 與 DLB 在分子致病機轉上的可能的關聯性。此外本年度我們也先進行了小規模的人體實驗，發現與 AD 患者相比較下，DLB 患者其老化現象與 AD 相似(PBMC 表現 Sirt1 的量相當，但都明顯少於對照組)，但 TNF $\alpha$  及 SOD1 的表現量卻明顯較 AD 組要低，因此雖然 A $\beta$  確實可能參與了 DLB 的致病過程，但與其在 AD 中分子機轉似乎存在著不小的差異。本計畫研究結果除可進一步釐清 DLB 的分子致病機轉外，並能有助於在未來開發設計出的新型預防或治療 DLB 的天然物或藥物，業以克服目前 DLB 治療上困難以造福人群。