

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09790

研究課題名(和文)オートファジーと神経原線維変化：顆粒空胞変性とシアル化への注目

研究課題名(英文) Effects of autophagy on neurofibrillary tangle formation: a role of granulovacuolar degeneration and sialylation

研究代表者

山崎 恒夫 (Tsuneo, Yamazaki)

群馬大学・大学院保健学研究科・教授

研究者番号：80200658

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病は脳内のアミロイド 蛋白(A β)の沈着が端緒となり、神経細胞内でのタウの沈着、神経細胞死へ繋がるのが発症の要因とされている。しかし、A β 沈着がタウ沈着を誘発するメカニズムは不明である。本研究はこれらの蛋白沈着に共通する構造物を形態学的に同定することを目的とした。自らの過去の研究から、両蛋白の沈着にはオートファゴソームの関与が疑われたことから、アルツハイマー病患者の脳切片を初期のオートファジー関連蛋白であるATG9Aを認識する抗体で免疫染色を行った。その結果、A β 沈着周囲に出現する変性神経突起が、両蛋白の沈着に関与している可能性が判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルツハイマー病の発症メカニズムの解明は治療法の開発のために必要だが、未だ不明の部分も多い。特にアミロイドカスケードセオリーにおける、アミロイド 蛋白とタウ蛋白沈着の関連解明は重要な課題と考えられる。本研究は両蛋白沈着の初期の共通構造物をオートファゴソームに求め、その結果神経変性突起の関与の可能性を指摘することができた。

研究成果の概要(英文)：According to the amyloid cascade theory of Alzheimer's disease, intracellular tau deposition is induced by extracellular amyloid β deposition. However, this mechanism is still yet unknown. In this study, I tried to search putative common pathological structures which connect both protein deposition by immunohistochemistry. My former studies clearly showed that autophagic vacuoles are related to amyloid β production, then paraffin sections of Alzheimer's brains were stained by anti-ATG9A antibody which recognizes primary stages of autophagic vacuoles. In results, ATG9A is expressed in degenerative neurites and the expressed pattern might be changed in different stages of amyloid β deposition.

研究分野：認知症

キーワード：アルツハイマー病 変性神経突起 オートファジー

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病の原因はアミロイドβ蛋白 (Aβ) とリン酸化タウの脳内沈着と考えられている。過去の研究から Aβ の脳内沈着が先行し、続いてリン酸化タウが神経原線維変化として神経細胞内に沈着することで、神経細胞死を誘発するとされている。しかし、2つの沈着病変を結びつけるメカニズムは未だに解明されていない大きな疑問のままである。

私は長年培養細胞を用いて Aβ の細胞内産生機構を研究し、Aβ 産生に細胞内空胞、特に後期エンドソームが密接に関連していることを明らかにしてきた。さらに後期エンドソームがオートファゴソームの性質をもち、薬剤によってオートファジーを増加あるいは抑制することで、Aβ の産生量も変化することを明らかにした。

一方、ヒトの脳内では顆粒空胞変性がオートファゴソームの形態的特徴をもつことが知られていることから、ヒト組織切片で顆粒空胞変性を染め出すマーカを検討した。その結果、自ら作成した抗 TDP-43 抗体が顆粒空胞変性を特異的に検出することを見出した。この抗体で検索するとアルツハイマー病脳では顆粒空胞変性が明らかに増加しており、従来顆粒空胞変性が認められるとされていた海馬以外にも広く大脳皮質に分布していることが判明した。さらに抗シアル酸抗体も脳内の顆粒空胞変性を特異的に染め出すことを見出した。興味深いことに同抗体は顆粒空胞変性のみならず神経原線維変化も特異的に検出し、染色性はアルツハイマー病のリン酸化タウと強く関連することも判明した。

以上より、顆粒空胞変性を含めた脳内のオートファゴソーム系の細胞内小器官が Aβ 産生とリン酸化タウ沈着を結びつける共通の鍵となる細胞内構造物である可能性を考えた。

2. 研究の目的

上記の経過から、顆粒空胞変性を中心としたオートファジーを営む細胞内構造物が、Aβ 産生とタウのリン酸化に共通の鍵構造物である可能性をさらに検討することとし、研究を大きく2つに分けた。

①. シアル化とリン酸化タウの関連性をより深く検証する：

1. 光顕観察で観察した抗シアル酸抗体陽性の顆粒空胞変性の超微形態を免疫電子顕微鏡を用いて検討する。また、神経原線維変化の線維構造上にシアル酸抗体の存在を確認し、タウとシアル酸の特異的関係を電子顕微鏡レベルで確認する。
2. 上記1でリン酸化タウのシアル化の特異性が確認できれば、アルツハイマー病患者の髄液中のシアル化タウの検出を試みる。

②. アルツハイマー病脳内でのオートファジー関連蛋白の分布、特に初期のオートファゴソームを検討することで、Aβ やタウ沈着との関連性を検討する。

3. 研究の方法

研究①

1. 光顕で観察された抗シアル酸抗体陽性構造物の超微形態を免疫電子顕微鏡にて検索する。
2. 神経原線維変化とシアル酸抗体反応の特異性の確認を形態学的に行う。このために免疫電顕法を用いた超微形態観察を行う。
3. 髄液中のシアル化タウの検出できる ELISA 法の開発を試みる。

研究②

アルツハイマー病の剖検脳、ホルマリン固定、パラフィン包埋切片を用いて、免疫組織学的染色を行う。抗体には既存のオートファジー関連蛋白抗体を用いる。

4. 研究成果

研究①の1：ヒト剖検脳における顆粒空胞変性とシアル化の関連を、免疫電子顕微鏡による形態学的観察にて明らかにしようと試みた。本研究期間中に新規の剖検脳を得るこ

とはできなかったため、既存の固定脳をもちいて DAB 染色による pre-embedding 法を試みた。しかしながら、試みたいずれの標本も膜構造が破壊されており、膜構造である顆粒空胞変性の同定は困難であった。これは剖検までの死後時間の影響で、膜構造が破壊されてしまったためと考察した。

一例ながら膜構造の保存が良好なエポン包埋標本を用いて post-embedding 法にて抗シアル酸抗体染色を行ったが、観察可能な陽性反応を得ることはできなかった。

研究①の 2：上記と同様に post-embedding 法による観察を行った。第 2 抗体の金コロイドは標本全体に非特異的に散在しており、神経原線維変化との特異性は判断困難であった。これはシアル酸抗体の免疫反応がオスミウム固定の影響で阻害されたためと考察した。

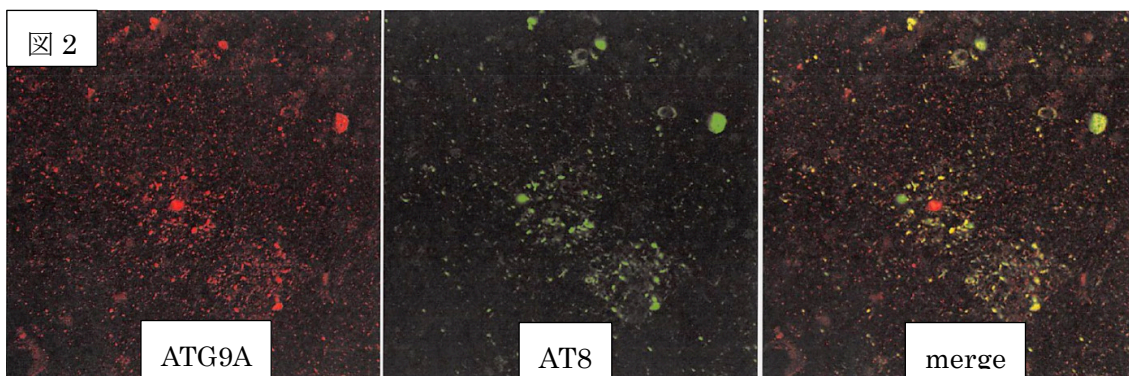
研究①の 3：既存のリン酸化タウを検出する ELISA キットをもちいて、患者髄液のリン酸化タウを固層化し、抗シアル酸抗体で検出を試みたが、特異的な反応を得ることはできなかった。理由は不明であるが、抗シアル酸抗体の反応性が線維形成をした不溶性タウと髄液中の可溶性タウとは異なる可能性を考えた。

研究②：アルツハイマー病の脳内で形成される最初期のオートファゴソームを検出する目的で、10 例のホルマリン固定・パラフィン包埋の海馬切片を用いた。オートファジー関連蛋白は現在までに多数報告されているが、形成最初期に関連する蛋白として ATG9A が知られている。ATG9A は膜タンパクであり、すでに脳（マウス）にも発現が確認されている。そこで 4 種類の抗 ATG9A 抗体で切片の反応性を検討した。用いた抗体は Millipore 6A11.2 (モノクロー抗体)、NOVUS NB110-56893 (ポリクロー抗体)、abcam ab108338 (ポリクロー抗体)、GeneTex GTX128427 (ポリクロー抗体) である。切片はいずれもオートクレーブで前処置を行った。図 1 に示すように、いずれの抗体も脳内に陽性構造物を見出した。染色性は NOVUS 社のものがやや劣り他の 3 社のものは同等だった。

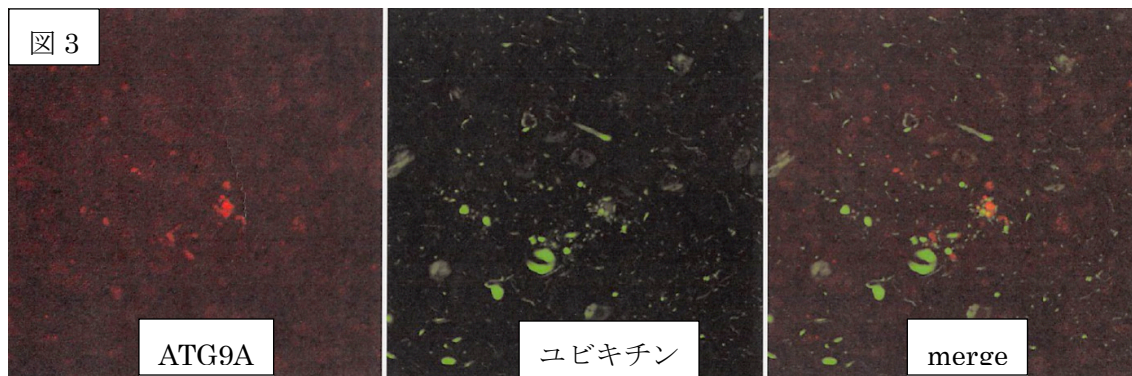


その後 Millipore 社の抗体は販売中止となったため、以後の研究には主として abcam 社、GeneTex 社のものを使用した。抗体の反応性はすべての AD 切片で認めたが、一部反応性の弱い切片も存在した。これは固定条件の相違によるものと考えた。

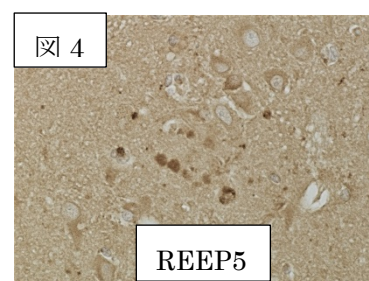
陽性構造物は皮質に点状に集簇する傾向をもち、変性神経突起の可能性が考えられた。そこで、同一切片での抗タウ抗体 (AT8) との 2 重染色を試みた。図 2 に示すように ATG9A とリン酸化タウは共局在を示した。疾患との特異性をみるために、少数例ながら進行性核上性麻痺などのタウ沈着との関連を検討したが、ATG9A 抗体との関連性はみられなかった。



この研究をすすめる中で、アルツハイマー病モデルマウスでのアミロイド沈着と変性神経突起内蛋白の関連を検討した論文が発表された (Molecular Psychiatry 24:1369-)。同論文によるとアミロイド沈着の進行にともなって、変性神経突起内に出現する蛋白が時系列で変化するとされている。ATG9Aは最初期であり、ユビキチンは後期に出現する。我々の事前の検討でも ATG9A とユビキチンとは、図 3 に示すようにほとんど共局在を示さなかった。モデルマウスではタウ沈着が認められないことから、アルツハイマー脳でも同様の時系列変化が生じているかどうか検討することとした。

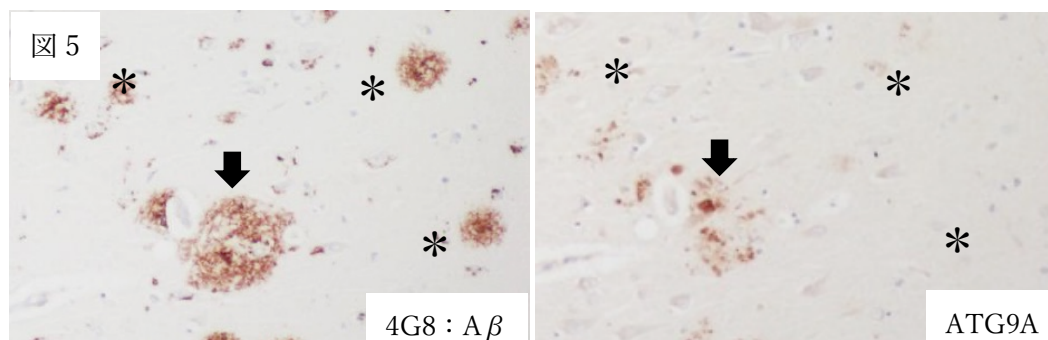


まず ATG9A 以外に初期に出現するとされる REEP5、後期に出現するとされる LC3、Rab7 の反応性をパラフィン切片で検討したが、図 4 に示すように REEP5 は特異的に染色されるものの、LC3 と Rab7 は不定だった。



次に老人斑の成熟にともなって周囲に出現する神経突起内の蛋白が時系列で変化する可能性を検討することとした。同一切片での蛍光 2 重染色をするためには、A β 染色で必須のギ酸処理を施す必要がある。そこでギ酸処理後の各種オートファジー蛋白の反応性を検討したが、ギ酸処理は抗原性を低下させていた。そこで、A β -オートファジー蛋白の順で染色した 2 枚の連続切片を用いて観察を行うこととした。

その結果、図 5 に示す如く、↓のような神経細胞を取り囲む大きな慢性老人斑の周囲には ATG9A の反応がみられたが、*のような小型でより辺縁の明らかな A β 沈着には ATG9A の反応が乏しかった。少数例の検討でありいまだ結論付けることはできないが、この結果は A β の沈着過程 (老人斑の成熟過程) によってオートファジー関連蛋白の出現が経時的に変化する可能性を示していると考えられる。



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	池田 佳生 (IKEDA YOSIO) (00282400)	群馬大学・大学院医学系研究科・教授 (12301)	