

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：35413

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07974

研究課題名(和文) アルツハイマー病におけるタウ蛋白凝集機構のモデル細胞確立

研究課題名(英文) Development of cellular models of Alzheimer-type tauopathy with tau aggregates

研究代表者

高橋 哲也 (Takahashi, Tetsuya)

広島国際大学・総合リハビリテーション学部・教授

研究者番号：00435942

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)：アルツハイマー病の原因物質の一つである細胞外のアミロイド ペプチド(A β)が細胞内に移行することによって細胞毒性を発揮すると仮定しその移行様式について解析を行った。A β は主にそのオリゴマーが細胞膜におけるHSPG、脂質ラフトの存在下でRac1依存性のマクロピノサイトーシスにより細胞内に移行することが明らかになった。細胞内移行後のA β の輸送ルートを明らかにするためにA β で被覆された常磁性のナノ粒子を開発し解析中である。またマクロピノサイトーシスに伴って細胞内に誘導される小胞と同じ特性を持つ物質を、タウ蛋白を高発現する細胞に導入したところ凝集体様の構造物が多数電子顕微鏡にて観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルツハイマー病では細胞毒性を持つとされるアミロイドベータという物質が脳に蓄積します。元々この物質は細胞の外に発見されましたが、私達は細胞が特定の方法で能動的にアミロイドベータを細胞内に取り込むことを明らかにしました。つまり細胞内のアミロイドベータが細胞毒性を発揮している可能性が示されことになりました。また細胞内に侵入したアミロイドベータが細胞内のどこに移動するのかを明らかにするためのナノ粒子を開発しました。これらの解析を通じてアミロイドベータ毒性の詳細を明らかにすることは、その毒性を低減する治療薬の開発の上で重要であると考えています。

研究成果の概要(英文)：Under the hypothesis that the extracellularly generated amyloid-beta (A β) peptides exert a cytotoxic effect after internalization into cells, we examined the mechanism by which A β enters cells. We found that the oligomeric form of A β is preferentially internalized by Rac-1 mediated macropinocytosis under the presence of HSPG and lipid raft on the plasma membrane. Subsequently, we developed an A β -coated paramagnetic nanoparticle and using this nanoparticle and are currently monitoring the traffic route after the internalization of A β . Since macropinocytosis generates vacuoles inside the cells, we introduced several materials with similar properties to such vacuoles into tau protein-expressing cells. We found the appearance of aggregates-like structures under electron microscopy.

研究分野：脳神経内科学

キーワード：アルツハイマー病 アミロイドベータ

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脳では変性した神経細胞内にタウ蛋白の凝集体である「神経原線維変化」が観察される。細胞外に蓄積するアミロイド B ペプチド (A β) がこの神経原線維変化を促進する因子であると考えられているが、促進機序の詳細は不明である。これまでの検討において神経原線維変化の内部にタウ蛋白の凝集体とリン脂質の密度の高い小胞群が共存していることを見出し、この小胞群がタウ蛋白を凝集させ線維状の構造物に変換させる「ドライバー」として機能し神経原線維変化を促進しているとの仮説について検討を行った

2. 研究の目的

アルツハイマー病の変性過程は A β の蓄積から神経原線維変化に至るまでに年単位の時間を要するため、モデル細胞として A β を外的に投与した上で細胞内の変化を観察するという手法は妥当ではない。そこで本研究では、①外的に投与した A β が細胞に内在化される過程と、②タウ蛋白を高発現する細胞に人為的にリン脂質の密度の高い小胞群と同等の性質をもつ物質を導入した後の細胞内変化、の2つの素過程に分けて観察を行った。①では A β を投与した培養細胞の中にエンドサイトーシスの結果陰性に帯電した小胞(エンドソーム)が出現するのかが確認した。またエンドサイトーシス後の細胞内輸送経路を明らかにすることを目的として A β で表面を被覆した常磁性体のナノ粒子の作成を行った。②においては物質の導入が細胞内でタウ蛋白の凝集を誘導しうるのかについて検討した。

3. 研究の方法

(1) A β 内在化様式についての検討

FITC ないし **TMR** で蛍光標識した合成 A β をオリゴマー化し、培養液に添加した状態で細胞 (**Neuro2A**、**SH-SY5Y**) を培養した。このとき A β 内在化様式を明らかにするため蛍光標識したデキストランを比較対象として同時に添加した。一定時間後に細胞内の A β を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。また細胞が A β を取り込む際に膜ドメインである脂質ラフトが関与しているかを明らかにするためにコレラ毒素のサブユニット (**CTB**) で脂質ラフトを蛍光標識し、シクロデキストリン (**MBCD**) を用いてラフトをあらかじめ崩壊させたのちに取り込み実験を行った。次に細胞表面に存在するヘパラン硫酸プロテオグリカン (**HSPG**) の関与を明らかにするため、**HSPG** の阻害剤ヘパリン投与ならびにトリプシン処理より **HSPG** を切断する前処置を行ったのち、同様の実験を行った。最後に、脂質ラフトや **HSPG** が関与するエンドサイトーシスの下流の制御因子として低分子量 **GTPase** である **ADP** リボシル化因子タンパク質 **6** (**Arf6**) や **Rac1** が関与することから、A β 投与後の **Arf6**、**Rac1** の活性を吸光度ベースの活性化アッセイにより経時的に測定した。

(2) A β の細胞内トラフィックについての検討—ナノ粒子合成の試み

予備的な検討では、A β は投与 72 時間後に **LAMP1** 陽性のリソソームと考えられる区画に集積していた。このことから A β はエンドソームからリソソームに至る経路を輸送されることが示唆されたが、その途中の経路は明らかではない。そこで前記(1)の検討にて特定した A β 内在化後の細胞内トラフィックの詳細を明らかにするためにナノ粒子を作成した。ナノ粒子は **Fe3O4** をコアとしシリカでコーティングした後に表面を A β オリゴマーで被覆した。この A β ナノ粒子を A β オリゴマー単体と同じように細胞に内在化させた後にホモジナイズして、ナノ粒子を内在化した細胞内小胞をマグネットにより回収することを、このナノ粒子の用途とした。

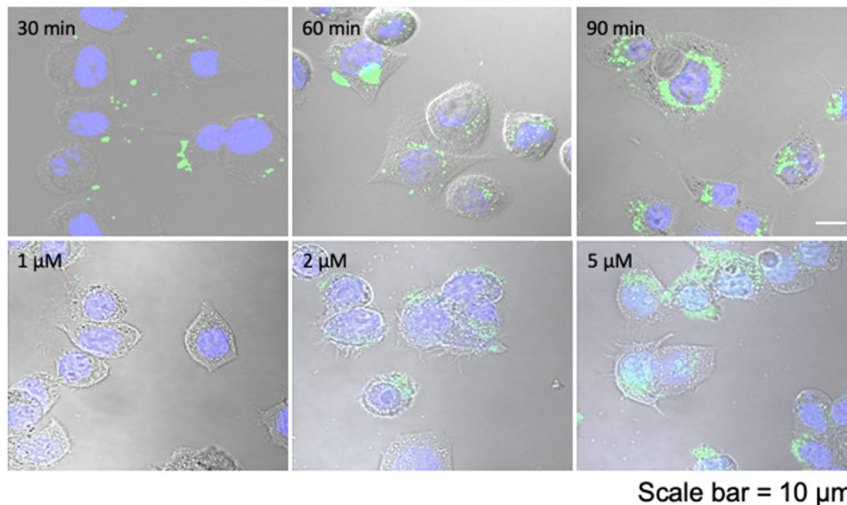
(3) タウ蛋白高発現細胞を用いた *in vivo* タウ蛋白凝集に関する検討

長崎大学から提供頂いた全長 (**2N4R**) のタウ蛋白と 4 リピートタウの微小管結合部位 (**K18**) 両者を高発現する **Neuro2A** 細胞を用いて検討した。この細胞に陰性に帯電した量子ドット、細胞内で陰性に帯電する試薬 (**calcein**) を導入することにより細胞内のタウ蛋白周囲が陰性の環境となるようにすることが、タウ蛋白の凝集を誘導する結果になるのかチオフラビン染色ならびに電子顕微鏡観察により検討した。

4. 研究成果

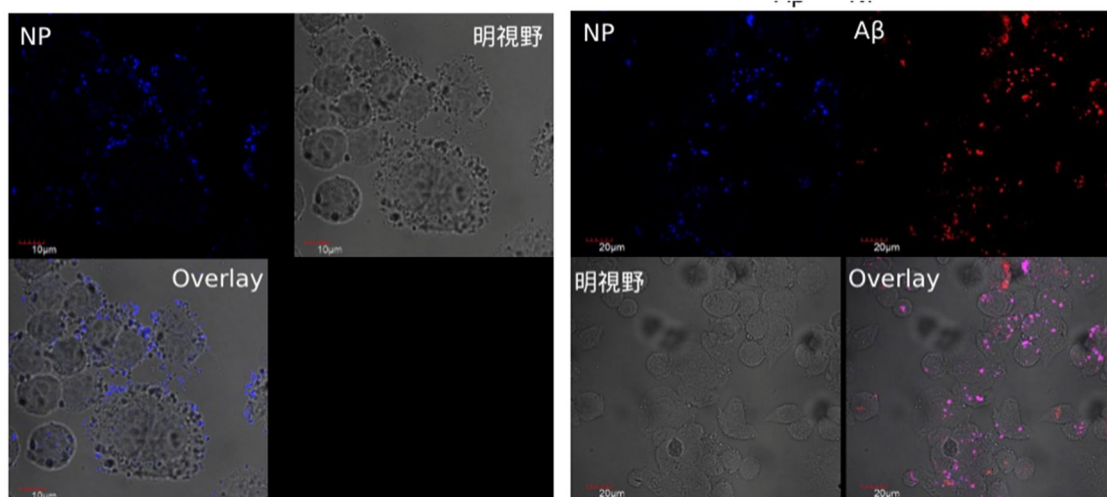
(1) **Neuro2A**、**SH-SY5Y** 細胞はいずれも濃度依存的かつ時間依存的に A β を内在化した。内在化したオリゴマー A β の量は、モノマー A β のそれと比較して有意に高かった。エンドサイトーシスの様式の一つであるマクロピノサイトーシスを標識するデキストランと共に A β を投与したところ、デキストランと A β は細胞内で共局在していた。他の細胞種 **HEK293**、**HeLa** 細胞でも結果は同じであった(下図)。

Neuro2A cells



そこで、マクロピノサイトーシス阻害剤である **Ethyl-IsoPropyl Amiloride** ならびに **Wortmannin** 処理を行ったところ Aβ の内在化は抑制された。すなわち Aβ はマクロピノサイトーシスにより内在化することが示唆された。さらに、脂質ラフトを崩壊させる条件では **17.5%** まで、**HSPG** をヘパリンで阻害もしくはトリプシンで切断した条件下でもそれぞれ **14.5%**、**14.9%** まで Aβ の内在化が阻害された。マクロピノサイトーシスの際は低分子量 **GTPase** の **Arf6** や **Rac1** の活性が一過性に上昇することから Aβ 投与後にそれらの活性を測定したところ、**Arf6** 活性に有意な変化は見られなかった一方、**Rac1** の活性が 7 分後に **3.0** 倍上昇した。さらに、**Arf6**、**Rac1** それぞれの阻害剤を添加すると、後者でのみ **Neuro2A** 細胞における Aβ の内在化が約 **6** 割減少した。以上の結果から、Aβ は、脂質ラフト、**HSPG** 依存性に **Rac1** 制御性のマクロピノサイトーシスにより細胞に取り込まれることが明らかになった。

(2)(1)の結果から細胞は選択的な方法により能動的に Aβ を細胞内に取り込むことが明らかになったもののその後の Aβ のルートは明らかではない。細胞内小器官を標識する各種抗体を用いた蛍光染色により細胞内トラフィックを追跡することは可能であるが多数の抗体を用意する必要がある。そこで、Aβ で表面を被覆した磁性体のナノ粒子を用いて、Aβ を内包する小胞を磁気により回収し質量分析を行うべくナノ粒子の作成を試みた。最終的に作成し得た粒子は、それ自体は青色の蛍光を発生し、その表面に赤色に蛍光標識された Aβ を結合した **50nm** 程の大きさのナノ粒子 (**NP**) である。水溶液中では分散状態を維持し、培養液中に添加すると単独の Aβ 同様速やかに細胞に取り込まれた (下図)。このナノ粒子を用いることで Aβ を内包する小胞の構成成分を質量分析により網羅的に解析できるものと考えられた。



(3) **2N4R** と **K18** を高発現する細胞に各種物質を導入すると、蛍光顕微鏡にてチオフラビン陽性の顆粒状の構造物が核周囲に集積しているのが確認された。同じように処理した細胞を電子顕微鏡で観察するとやはり核周囲に電子密度の高い類円形の顆粒状物質を多数認められた。その出現頻度は量子ドット > **calcein** > **wortmannin** の順であった。蛍光顕微鏡と電子顕微鏡で認められた構造物については直径がそれぞれ **2μm** 前後、**0.5μm** 前後と異なっておりその異同に関して更なる検討が必要である。一方これらの細胞内には神経原線維変化でみられるようなフィブ

リル構造は認められず、細胞内の陰性電荷を増やすことがタウ蛋白のフィブリル構造を直接増加させる要因にならないことが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Keyoumu Nazere, Tetsuya Takahashi, Naoyuki Hara, Kazuki Muguruma, Masahiro Nakamori, Yu Yamazaki, Hiroyuki, Morino Hirofumi, Maruyama	4. 巻 -
2. 論文標題 Amyloid Beta Is Internalized via Macropinocytosis, an HSPG- and Lipid Raft-Dependent and Rac1-Mediated Process	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnmol.2022.804702	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔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	大古 善久 (Yoshihisa Oko) (10304007)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・エネルギー・環境領域・主任研究員 (82626)	

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