

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25461288

研究課題名(和文)細胞モデルでのアミロイド 蛋白オリゴマーによるアルツハイマー病態の解明と治療探索

研究課題名(英文) Mutations in the APP in familial Alzheimer's disease increase Abeta oligomer production in cellular models

研究代表者

大島 洋一 (Yoichi, Ohshima)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50516060

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：今回家族性アルツハイマー病のAPP変異遺伝子をFlp-In T-Rex-293 (T-REx)細胞に導入し、細胞内外のA β モノマー、A β オリゴマーの産生量を解析した。細胞外A β モノマー量はスウェーデン型で野生型よりA β 1-40、A β 1-42量の高値を示した。オランダ型APPでは野生型と変わらず、ロンドン型APPではA β 1-42/A β 1-40比が増加していた。細胞外A β オリゴマー量はオランダ型A β 、ロンドン型APPで野生型よりも有意に高値を示し、スウェーデン型で高い傾向を示した。今回細胞外A β オリゴマー量増加がアルツハイマー病発症の共通メカニズムになりうる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：We herein employed the Flp-In T-Rex 293 (T-REx293) cellular system transfected with a single copy of wild-type, Swedish-, Dutch-, or London-type APP, and quantified the levels of A β monomers (A β 1-40 and A β 1-42) and A β Os using ELISA. The levels of extracellular A β Os were significantly higher in Dutch- and London-type APP-transfected cells than in wild-type APP-transfected cells. Increased levels were also observed in Swedish-type APP-transfected cells. On the other hand, intracellular levels of A β Os were unaltered among wild-type and mutant APP-transfected cells. Intracellular levels of A β monomers were undetectable, and no common abnormality was observed in their extracellular levels or ratios (A β 1-42/A β 1-40) among the cells examined. We herein demonstrated that increased levels of extracellular A β Os are the common phenotype in cellular models harboring different types of APP mutations. Our results suggest that extracellular A β Os play a key role in the pathogenesis of AD.

研究分野：アルツハイマー病

キーワード：アルツハイマー病 A β オリゴマー A β モノマー アミロイド前駆蛋白

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病 (AD)は認知症の原因疾患として最も頻度が高く、その原因解明と治療法の開発は急務となっている。これまでのアルツハイマー病研究では、アミロイド (A β)の産生と分解のバランスが破綻した結果、A β が凝集・蓄積する「アミロイド仮説」をアルツハイマー病の原因としてきた。しかし A β 1-42 / A β 1-40 比の増加を根拠とする「アミロイド仮説」にはいくつかの矛盾点があった。Holmesらの報告では、A β ワクチン開発中止後の長期的事後検証試験において A β 1-42 ペプチドワクチンが、アルツハイマー病患者脳のアミロイド斑を除去するが、神経変性の進行を妨げないことが明らかになった。

現在、アルツハイマー病の発症機序については、可溶性 A β オリゴマーがシナプスを障害するオリゴマー仮説が主流となっている。しかし、細胞レベルにおける A β オリゴマーの動態は未だ十分検討されていない。

2. 研究の目的

今回家族性アルツハイマー病 (FAD)の原因の一つであるアミロイド前駆蛋白 (APP) 変異遺伝子を Flp-In T-REx (T-REx 293) 細胞に導入し、A β 1-42, A β 1-40, A β オリゴマーの産生量を定量した。Flp-In T-REx システムでは、単一コピーの遺伝子を細胞に導入できるため、より生理的な蛋白発現を解析できる。

また A β オリゴマーを測定するためのオリゴマー-ELISA はすでに開発済みである。これら培養細胞系と ELISA 系を用いて FAD に共通する A β 蛋白の動態を検討した。

3. 研究の方法

(1) 変異型 APP に Swedish 型 (K670NM671L), Dutch 型 (E693Q), London 型 (V717I) を選択し、これら変異遺伝子を持つ APP を pcDNA5/FRT/TO vector に導入した。野生型 APP と変異型 APP を発現する細胞間における A β の産生量を比較するために、野生型 APP と変異型 APP を発現する T-REx 293 細胞の stable cell line を作製した。

T-REx 293 細胞内の APP 局在を調べるために、抗 APP-C 抗体を用いて T-REx 293 細胞の免疫染色を行った。

(2) T-REx 293 細胞を 2 日間 37℃ 無血清で培養後、培地と細胞成分を回収した。ウェスタンブロット法を用いて、野生型 APP, 各 APP 変異遺伝子導入細胞の APP, A β monomer, A β oligomer 量を抗 APP-C 抗体, 抗 β -amyloid (6E10) 抗体を用いて解析した。

(3) T-REx 293 細胞を 2 日間 37℃ 無血清で培養後、培地・細胞を回収した。ELISA 法を用いて、野生型 APP, 各 APP 変異遺伝子間で細胞

内外の A β 1-42, A β 1-40, A β oligomer 量を比較検討した。

4. 研究成果

(1) 野生型, Swedish, Dutch, London 型 APP を導入した細胞における total APP の発現を免疫染色で観察した。APP の局在は野生型 APP と各変異型 APP を導入した細胞間で発現量・分布とも差を認めなかった。

(2) T-REx 293 cell の細胞成分 (5 μ g/lane) についてウェスタンブロットを行ったところ、野生型, Swedish, Dutch, London type APP を導入した細胞で total APP のバンドを検出した。各バンドの pixel count を Image J で計測した結果、total APP の発現量は野生型, 各変異型 APP 遺伝子を発現した細胞の間で有意な差はみられなかった。

培地中に含まれる A β モノマーの産生量を抗 β -amyloid (6E10) 抗体を用いたウェスタンブロットにより野生型と各変異型 APP で A β モノマーのバンドを観察した。各変異型 APP 間で比較した結果、野生型 APP と変異型 APP を導入した細胞の培地で A β monomer の位置にバンドを検出した。A β monomer のバンドの intensity は Swedish 型 APP で最も強くみられた。20-80kDa に存在するオリゴマーに相当するバンドは野生型 APP と各変異型 APP 間で明らかな差はみられなかった。

(3) A β モノマー-ELISA にて測定した Swedish 型 APP は野生型と比較して培地中 A β 1-40, A β 1-42 量が高値を示した。Dutch 型 APP では野生型と変わらず、London 型 APP では A β 1-42 / A β 1-40 比が増大していた (図 1)。

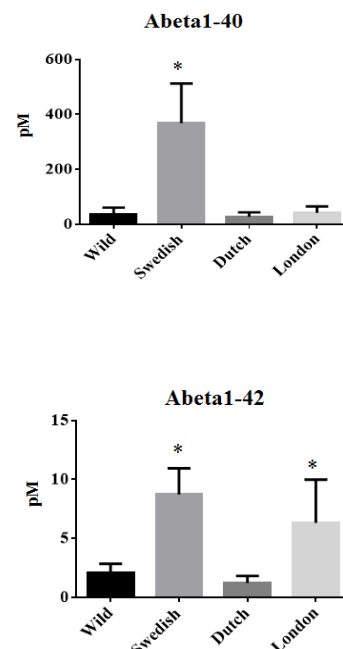


図 1. 細胞外 A β 1-40, A β 1-42 量

細胞内 A β monomer 量は野生型, 変異型 APP 導入細胞間で差はみられなかった。

A オリゴマー量は APP 変異遺伝子を導入した細胞の培地で高い傾向を示し, オランダ型 APP ($p < 0.05$), ロンドン型 APP ($p < 0.01$)で野生型よりも有意に高値を示した(図 2)。

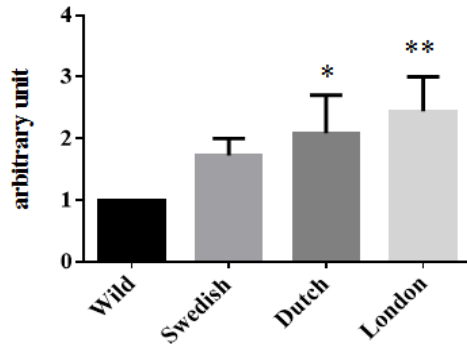


図 2. 細胞外 A β oligomer 量

今回 FAD mutation を導入した細胞において共通して A オリゴマー量が増加する結果が得られた。A monomer ELISA の結果では, Swedish 型 APP 導入細胞では細胞外 A $_{1-40}$, A $_{1-42}$ の顕著な増加, Dutch 型 APP 導入細胞では野生型 APP 導入細胞と同等, London 型 APP 導入細胞では A $_{1-42}$ / A β_{1-40} 比が増加しており, A monomer 産生量に関しては変異型 APP に共通な特徴はみられなかった。遺伝子を単一コピーで導入可能な細胞モデルを用いることで, より生理的な環境下で細胞内外の A オリゴマー, モノマーの検出を試み細胞外 A モノマー量, A $_{1-42}$ / A $_{1-40}$ 比高値よりも, A オリゴマー量増加がアルツハイマー病発症の共通メカニズムになりうる可能性を示した。これまで細胞内外の A monomer, A オリゴマーを定量するに辺り, 強制発現系での報告は多くされていたが, 今回 Flp-In T-REx システムを用いることで, アルツハイマー病の病理学的変化をより正確に解析することが可能となり, 細胞外 A オリゴマーが AD 発症の有力な候補分子であることを示唆することができた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 6 件)

大島洋一, 徳田隆彦, 田口勝敏, 水田依久子, 亀谷富由樹, 田中雅樹, 水野敏樹, 矢部千尋. Increased secretion of Abeta-oligomers harboring mutants in cells linked to FAD. 第 56 回日本神経学会学術大会. 2015 年 5 月 20 日. 新潟.

Ohshima Y, Tokuda T, Taguchi K, Mizuta I, Kametani F, Tanaka M, Mizuno T, Yabe-Nishimura C. The common biochemical phenotypes of cells expressing APP-mutants linked to familial Alzheimer's disease is increase in the secretion of Abeta-oligomers. The 12th International Conference on Alzheimer's & Parkinson's Disease (AD/PD) 2015. 2015/3/18, Nice.

大島洋一, 徳田隆彦, 田口勝敏, 水田依久子, 田中雅樹, 水野敏樹, 矢部千尋. 家族性アルツハイマー病に共通するアミロイド蛋白動態の検討. 第 35 回日本臨床薬理学会学術総会. 2014 年 12 月 6 日. 愛媛.

大島洋一, 徳田隆彦, 田口勝敏, 富山貴美, 亀谷富由樹, 田中雅樹, 水野敏樹, 中川正法, 矢部千尋. 家族性アルツハイマー病に共通するアミロイド蛋白の産生量の検討. 第 124 回日本薬理学会近畿部会. 2013 年 11 月 1 日. 京都.

大島洋一, 徳田隆彦, 田口勝敏, 水田依久子, 渡邊義久, 水野敏樹, 富山貴美, 亀谷富由樹, 森啓, 田中雅樹, 中川正法, 矢部千尋. 多様な細胞モデルでのアミロイド蛋白オリゴマーのアルツハイマー病態発現機序の検討. 第 54 回日本神経学会学術大会. 2013 年 5 月 30 日, 東京.

Ohshima Y, Tokuda T, Taguchi K, Mizuta I, Watanabe Y, Tomiyama T, Mizuno T, Kametani F, Tanaka M, Mori H, Nakagawa M. Exploring the common biochemical phenotypes of the A $_{\beta}$ -protein formation in cells with mutants linked to familial Alzheimer's disease. The 11th International Conference on Alzheimer's & Parkinson's Disease (AD/PD) 2013. 2013/3/9, Florence.

〔図書〕(計 0 件)

出願状況 (計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

大島 洋一 (Ohshima, Yoichi)
京都府立医科大学医学研究科・助教
研究者番号： 50516060

(2)研究分担者

徳田 隆彦 (Tokuda, Takahiko)
京都府立医科大学・医学研究科・教授
研究者番号： 80242692

笠井 高士 (Kasai, Takashi)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号： 70516062