

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H04667

研究課題名(和文) ダウン症候群iPS細胞を用いたアルツハイマー病初期病態の解明

研究課題名(英文) Early Alzheimer-like pathogenic events in endocytic membrane traffic in Down Syndrome iPSC-derived neurons

研究代表者

櫻井 隆 (Sakurai, Takashi)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：70225845

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：神経細胞のエンドソームにおける輸送障害はアルツハイマー病及び共通病態を示すダウン症候群の初期変化である。これにはアミロイド前駆体蛋白質の切断産物であるC末端断片(CTF)が関与しているが、その詳細は明らかではない。我々はCTF依存性エンドソーム障害に関わるタンパク質候補としてTMEM30aを報告した。TMEM30aはエンドソームにおいてCTFに結合し、その肥大化、輸送障害を引き起こす。神経細胞におけるTMEM30aの関与を明らかにするため、ダウン症候群iPS細胞由来神経細胞を用いて解析を試みた。先行して確立した海馬スライス培養系を用いた病態モデルと合わせて解析を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルツハイマー病においては、細胞外のアミロイドの産生過剰、分解・排出低下を背景とした凝集体形成が、細胞内のタウ凝集促進・伝搬、神経細胞死を惹起すると考えられている。しかし、大多数を占める孤発例においては、初期病変のエンドソーム障害がどのように凝集体形成につながるか明らかではない。また、アミロイド仮説にもとづく疾患修飾薬が期待されているが、アミロイド病理は発症の20年程前から始まっており、早期介入や効果判定のためのバイオマーカーが求められている。現在解明されていない初期病態の進展メカニズムを明らかにすることは、今後の予防、早期介入のために重要な知見となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Endosomal traffic dysfunction in neurons is known as the earliest pathogenic event both in Alzheimer's disease and Down syndrome. Recent evidence suggests that one of the amyloid-precursor protein metabolites, beta-carboxyl-terminus fragment (CTF), accumulates in endosomes and would be responsible for the impairment of endocytic trafficking, but the mechanistic details remain unclear. We identified TMEM30a, a subcomponent of lipid flippase that translocates phospholipids from the outer to inner leaflet of the lipid bilayer, as a candidate partner for CTF toxicity. TMEM30a interacts with CTF in endosomes, and this complex impaired retrograde trafficking, leading to abnormally enlarged endosomes. We tried to demonstrate that the complex formation between TMEM30a and CTF would be involved in the endosomal traffic dysfunction in Down syndrome iPSC-derived neurons and an organotypic hippocampal slice culture model of Alzheimer's disease.

研究分野：神経薬理学

キーワード：脳神経疾患 認知症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

厚生労働省研究班の推計では、65歳以上の認知症は2025年には700万人以上に増加し、65歳以上の5人に1人が認知症を発症するとされている。介護者の精神的・肉体的負担も大きい。認知症の医療・介護に関する社会的コストが今後急増すると予想される。中でもアルツハイマー病は、認知症の原因の50%以上を占めており、その予防、早期診断・治療効果判定のためのバイオマーカーの確立、治療法の開発は社会的急務となっている。

アルツハイマー病において、老人斑と呼ばれる細胞外沈着の主要構成成分であるアミロイド (A) は、アルツハイマー病の病理に中心的な役割を果たすと考えられている。A は、1回膜貫通タンパク質であるアミロイド前駆体タンパク質 (amyloid precursor protein, APP) が細胞外の膜貫通部位近傍に位置する サイト、引き続いて膜貫通領域の サイトで2段階切断を受けることにより産生される。それぞれ、膜結合型のプロテアーゼである BACE1、セクレターゼが切断を行う。A は 切断部位の違いによる 38-43 程度のアミノ酸からなるが、特に 42 アミノ酸からなる A₄₂ は凝集しやすい。若年発症の家族性アルツハイマー病では、APP または セクレターゼの活性中心を形成するプレセニリンに変異が見られるが、その多くは主要な産物である A₄₀ に対する A₄₂ の産生比率が増加する変異であることが知られており、A₄₂ 凝集体形成が病態発現に重要と考えられる。一方、大部分を占める孤発性アルツハイマー病においては、加齢に伴う A 分解・排出の低下や酸化ストレスに伴う BACE1 発現亢進による A 産生増加等を背景に凝集体が形成されると考えられている。A 凝集体形成後の共通病態として、タウタンパク質の異常リン酸化、神経細胞内凝集体形成、神経回路に沿ったタウ凝集体の伝搬とそれに対応した広がりを見せる神経細胞死に至るとするアミロイド仮説が有力視されている。

ダウン症候群の脳においては、30歳代以降アルツハイマー病と同様の脳病理を呈することが知られている。21トリソミーのため、21番染色体上に存在する APP 遺伝子の発現が 1.5 倍となっていることが、ダウン症候群脳における病態発現に重要な役割を果たしていると考えられており、ダウン症候群脳の解析がアルツハイマー病早期病態の解明に有用と考えられている。ダウン症候群の脳においては、最初期変化としてエンドソームの拡大が報告されており、アルツハイマー病脳における初期変化と共通している。この背景にはエンドソームの輸送障害があり、この障害は A ではなく、APP の 切断産物である CTF のエンドソーム蓄積が原因であることが Nixon らのグループにより示された。さらに、ダウン症患者由来の iPS 細胞から誘導した神経細胞が、アルツハイマー病と同様のフェノタイプを示し、初期病態解明に有用であることが示されていた。

我々は 切断のコレステロール依存性に注目し、細胞膜のミクロドメインが A 産生の場合であるとの仮説に基づいて APP 及び BACE1 が局在するミクロドメインを解析した。低温下の界面活性剤による可溶性の違いを利用してミクロドメインに相当する膜分画を調製し、特異的抗体を用いた免疫沈降により APP、BACE1 局在ミクロドメインを単離した。質量分析を用いた各ミクロドメイン局在タンパク質の同定により A 産生制御タンパク質候補の探索を進めてきた。神経細胞においては、細胞体における合成後、APP、BACE1 は主に軸索中を順行性に輸送されるが、APP と BACE1 は異なる膜ミクロドメインに存在し、軸索 輸送中の切断は抑制されている可能性を示した。一旦、軸索終末の細胞膜表面まで輸送され、細胞膜からエンドサイトーシスされた後、APP と BACE1 は初期エンドソーム中にて会合すると考えられている。至適 pH が酸性である BACE1 はエンドソーム内で APP を切断し、A の直接の前駆体となる CTF を生じる。しかしながら、APP の発現増加により CTF のエンドソーム蓄積と輸送障害を引き起こすメカニズムは明らかでなかった。我々は、その過程に関わるタンパク質候補探索のため、APP 局在ミクロドメイン中に同定されたタンパク質からシナプス前部に局在し、小胞輸送、エンドサイトーシスの制御に関与しうるタンパク質を選び、APP 切断に与える効果について検討を進めていた。

2. 研究の目的

本研究では、上記の解析過程で見出したリン脂質フリッパーゼ P4-ATPase のサブユニットである TMEM30a の神経細胞における CTF のエンドソーム蓄積・輸送障害と A 産生に与える効果を解析することを目指した。フリッパーゼは、リン脂質を ATP 依存性に脂質二重層の外層から内層へと転移させる膜タンパク質であり、輸送小胞の出芽にも関わることが示されている。また、TMEM30a は直接 A と結合し、細胞膜上で A の受容体として機能する可能性が示唆されている。TMEM30a の APP 輸送や代謝制御、エンドソーム障害との関連を解析し、アルツハイマー病初期病態への関与を明らかにすることを目的として解析を行った。

神経細胞における TMEM30a のエンドソーム輸送障害への関与を明らかにするため、iPS 細胞から分化させた神経細胞を利用することとした。また、神経活動により A 産生が亢進することが示されているが、シナプス前終末におけるエンドサイトーシスの促進がその機序とされている。このように、神経細胞における APP 切断、A 産生は神経細胞の構造・機能およびその基盤となる小胞輸送に密接に関連しており、シナプスの形成・維持に関わるグリア細胞と合わせて、シナプス・回路・組織構築を維持した環境でなければ解析が難しいと考えられる。これらの条件を満たし、A 産生や輸送障害の結果引き起こされるシナプス機能障害の解析も可能な実験系として、組織構築や回路を維持したまま数ヶ月維持可能である海馬のスライス培養系が有用であると考え、並行して解析を試みた。

3. 研究の方法

(1) TMEM30a の発現抑制、各種変異体発現、APP 相互作用阻害ペプチドの作製

ラット及びヒト TMEM30a の cDNA clone をもとに、各種変異を導入し、発現用プラスミドを調製した。数種類のノックダウン用 siRNA を合成し、導入による発現抑制効果を確認した。C 末端細胞内ドメインに相当するペプチドを合成し、キャリアタンパク質にコンジュゲーション後にウサギに免疫して抗体を得た。固定化したペプチドを用いてアフィニティー精製を行い、特異性を確認した後、解析に用いた。変異体発現、内在性発現レベルの低下による APP 切断、細胞内局在・輸送の変化をウエスタンブロット法および蛍光抗体法を用いて解析した。

2 回膜貫通タンパク質である TMEM30a は細胞外ドメインを介して APP と結合することが想定されたことから、大腸菌にて細胞外ドメインを発現、精製し、APP および A_β との結合を検討した。結合部位をさらに絞り込むために短いペプチドを発現させ、同様に解析を行った。

(2) 特異的抗体を用いた APP-TMEM30a 複合体の免疫共沈による解析

培養細胞に TMEM30a, APP 等のタンパク質を発現させ、界面活性剤を用いて細胞のライセートを調製した。あらかじめ磁気ビーズに固定化した特異抗体を用いて、TMEM30a または APP の免疫沈降を行った。SDS による可溶性化後にウエスタンブロットを行い、共沈するタンパク質を解析した。

(3) iPS 細胞の培養と神経細胞への直接誘導法

連携研究者である iPS 細胞細胞研究所 井上治久教授より iPS 細胞の分与を受け、近藤らの方法¹⁾に従い神経細胞への直接分化誘導を行った。分化させた細胞について、神経細胞マーカー及び APP の発現について確認を行い、固定後にエンドソーム関連タンパク質の染色を行った。

(4) 海馬スライス培養法

生後 7-8 日のラット脳から海馬を摘出し、ティッシュチョッパーにて厚み 400 μm のスライスを作製して多孔膜上に広げ、25%ウマ血清を含む培養液と気相の界面で培養を行った (Kami kubo, 2017)。経時的に培養上清、スライスを回収し、ELISA による A_β の定量、ウエスタンブロット法による APP 及び切断産物、BACE1 の発現量の検討を行った。

4. 研究成果

(1) TMEM30a の APP 切断・エンドソーム輸送に与える影響について

TMEM30a について、APP, TMEM30a の変異体、BACE1 等の発現による APP 切断の変化、産物の局在解析を行った結果、以下が明らかとなった。

- ・ P4-ATPase の分子シャペロンとして機能する 2 回膜貫通型の TMEM30a が細胞外ドメインを介して APP と直接結合する。CTF と TMEM30a は結合を示す一方、A_β の N 末端領域を欠く CTF とは結合が弱いことから、A_β 領域を介した相互作用が関与することが示唆された。大腸菌で発現した TMEM30a の細胞外ドメインと A_β および APP との結合が *in vitro* でも確認され、さらに結合部位を絞り込むことに成功した。これは、結合阻害ペプチドとして機能することが期待される。
- ・ TMEM30a を APP と共発現させることによりエンドソームの肥大化が引き起こされる。rab5 だけでなく rab11, rab7 も陽性であることから、肥大化したエンドソームは小胞輸送障害の結果と考えられた。また、CTF だけでなく、APP 及び CTF の細胞内蓄積が見られることから、初期エンドソームからライソゾームへの輸送が障害されている可能性がある。
- ・ TMEM30a と APP の共発現により、エンドソームを介して細胞膜とトランスゴルジネットワーク間を小胞輸送により循環している TGN38 の肥大化エンドソームへの蓄積が引き起こされた。エンドソームからトランスゴルジネットワークへの輸送の障害が想定された。
- ・ TMEM30a と APP の共発現により、エンドソーム肥大化が起こった状態に BACE1 を追加発現することにより、TMEM30a-CTF が集積した輸送障害部位に BACE1 が蓄積し、A_β 産生が増大することが示された (Takasugi, 2018)。APP と CTF 相互作用によるエンドソーム障害と CTF の蓄積が A_β 産生の亢進につながる可能性が示された。

(2) iPS 細胞由来神経細胞におけるエンドソーム解析について

iPS 細胞を直接神経細胞へ分化させる *iN* 法を用いて誘導された神経細胞の形態及び分化マーカーの発現、細胞内局在を解析した。さらに、内在性の rab5, rab7, rab11 の抗体染色を実施し、エンドソームの形態解析を行った。

タグを細胞外に導入した APP を発現させ、抗タグ抗体の細胞表面における結合により、エンドサイトーシスを可視化、評価する手法を初代培養神経細胞において検討し、確立した。

(3) 培養海馬スライスを用いた APP 切断産物及び TMEM30a の解析について

海馬スライス培養系における解析により、培養開始当初は一過性の神経細胞死およびシナプスの変化が起こるが、その後回復し、2 カ月以上にわたり組織構築、シナプス・神経回路だけでなく、APP, BACE1 の発現、分布がほぼ維持されており、一定量の APP 切断産物が培養上清中に遊離されることが明らかになった。TMEM30a による APP 切断制御、輸送障害およびその制御機序を解明するために有用な実験系であることが示された。

海馬スライスに APP トランスジェニックマウス脳由来の A β 凝集シード及び化学合成 A β を添加することにより、A β 凝集体を形成し、プラーク近傍における神経細胞内輸送障害を引き起こすモデルを確立した。

今後、上記モデル系を用い A β 産生・凝集、輸送障害への TMEM30a の関与の解析を進めることが可能であることが示された。

<引用文献>

1) Kondo T, Imamura K, Funayama M, Tsukita K, Miyake M, Ohta A, Woltjen K, Nakagawa M, Asada T, Arai T, Kawakatsu S, Izumi Y, Kaji R, Iwata N, Inoue H, iPSC-based compound screening and in vitro trials identify a synergistic anti-amyloid combination for Alzheimer's disease. Cell Rep., 21:2304-2312, 2017

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 15件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 6件）

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Kaneshiro Nanaka, Imaoka Ryosuke, Komai Masato, Kashiya Taku, Sakurai Takashi, Uehara Takashi, Takasugi Nobumasa | 4. 巻 501 |
| 2. 論文標題 Functional analysis of juxta- and intra-membrane domains of murine APP by genome editing in Neuro2a cells | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications | 6. 最初と最後の頁 1023 ~ 1028 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.05.102 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Takasugi Nobumasa, Araya Runa, Kamikubo Yuji, Kaneshiro Nanaka, Imaoka Ryosuke, Jin Hao, Kashiya Taku, Hashimoto Yoshie, Kurosawa Masaru, Uehara Takashi, Nukina Nobuyuki, Sakurai Takashi | 4. 巻 13 |
| 2. 論文標題 TMEM30A is a candidate interacting partner for the -carboxyl-terminal fragment of amyloid-precursor protein in endosomes | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 PLOS ONE | 6. 最初と最後の頁 e0200988 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0200988 | 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 - |
| 1. 著者名 Kamikubo Yuji, Yamana Tomohito, Hashimoto Yoshie, Sakurai Takashi | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Induction of Oxidative Stress and Cell Death in Neural Cells by Silica Nanoparticles | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 ACS Chemical Neuroscience | 6. 最初と最後の頁 304 ~ 312 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acchemneuro.8b00248 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Kamikubo Y, Takasugi N, Niisato K, Hashimoto Y, Sakurai T | 4. 巻 56 |
| 2. 論文標題 Consecutive Analysis of BACE1 Function on Developing and Developed Neuronal Cells | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 J Alzheimers Dis | 6. 最初と最後の頁 641-653 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3233/JAD-160806 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計25件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 山下 直也, 櫻井 隆 |
| 2. 発表標題 トランスサイトosisを介したTrkAシグナル複合体の軸索への局在化 |
| 3. 学会等名 NEURO2019 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Kamikubo Y, Niisato K, Jingo K, Jin H, Sakurai T |
| 2. 発表標題 Continuous inhibition of secretase regulates synapse formation. |
| 3. 学会等名 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (Kyoto) (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 上窪裕二, 新里和恵 坂入伯駿, 橋本祥江, 櫻井 隆 |
| 2. 発表標題 セクレターゼはシナプス発達と成熟を制御する |
| 3. 学会等名 第41回日本神経科学大会 (神戸) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 山下直也、櫻井隆 |
| 2. 発表標題 トランスサイトosisを介したTrkAおよびTrkA相互作用分子の軸索への局在化 |
| 3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会 (大阪) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 金 浩、上窪 裕二、神後宏一、橋本 祥江、櫻井 隆 |
| 2. 発表標題 海馬スライス培養標本におけるセクレターゼの持続的阻害の効果 |
| 3. 学会等名 第36回日本認知症学会学術集会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 金浩、上窪裕二、新里和恵、橋本祥江、櫻井隆 |
| 2. 発表標題 海馬スライス培養を用いた セクレターゼ活性とAPP切断産物の解析 |
| 3. 学会等名 第90回日本薬理学会年会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 櫻山拓、橋本祥江、櫻井隆 |
| 2. 発表標題 神経細胞におけるニューレグリン-3の切断と細胞内局在の解析 |
| 3. 学会等名 第90回日本薬理学会年会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|------------------------------------|
| 1. 発表者名 神後宏一、上窪裕二、新里和恵、橋本祥江、櫻井隆 |
| 2. 発表標題 セクレターゼ阻害によるシナプス形成への影響 |
| 3. 学会等名 第90回日本薬理学会年会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 上窪裕二、金浩、新里和恵、櫻井隆 |
| 2. 発表標題 海馬スライス培養標本を用いた セクレターゼの経時的解析 |
| 3. 学会等名 第39回日本神経科学大会 |
| 4. 発表年 2016年 |

〔図書〕 計1件

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Kamikubo Y, Sakurai T | 4. 発行年 2018年 |
| 2. 出版社 Humana Press, New York, NY | 5. 総ページ数 16 |
| 3. 書名 Co-Immunoprecipitation Methods for Brain Tissue. Neuromethods, vol 144 | |

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|---|
| <p>順天堂大学大学院細胞・分子薬理学 膜マイクロドメイン依存性 アミロイド産生調節メカニズムの解明 http://pharmacology.sakura.ne.jp/jp/research/microdomain_res/microdomain_res.html</p> |
|---|

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 | 貫名 信行 (Nukina Nobuyuki) (10134595) | 同志社大学・脳科学研究科・教授 (34310) | |

6. 研究組織（つづき）

| | 氏名 (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|--|---------------------------------------|----|
| 研究協力者 | 山下 直也 (Yamashita Naoya) (40508793) | 順天堂大学・医学部・助教 (32620) | |
| 研究協力者 | 金 浩 (Jin Hao) | | |
| 連携研究者 | 井上 治久 (Inoue Haruhisa) (70332327) | 京都大学・iPS細胞研究所・教授 (14301) | |
| 連携研究者 | 新井 平伊 (Arai Heii) (50167988) | 順天堂大学・医学研究科・教授 (32620) | |
| 連携研究者 | 高杉 展正 (Takasugi Nobumasa) (60436590) | 岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授 (15301) | |
| 連携研究者 | 上窪 裕二 (Kamikubo Yuji) (80509670) | 順天堂大学・医学部・助教 (32620) | |
| 連携研究者 | 榎山 拓 (Kashiyama Taku) (90338343) | 順天堂大学・医学部・助教 (32620) | |