

令和元年6月24日現在

機関番号：32620

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07095

研究課題名(和文) A 産生抑制を規定するコレステロール引き抜き経路の同定

研究課題名(英文) Identification of cholesterol efflux pathway which regulates amyloid beta production

研究代表者

矢野 康次 (yano, kouji)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・博士研究員

研究者番号：40802955

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではアルツハイマー病患者由来iPS細胞をアルツハイマー病好発部位である前脳領域とそれ以外の中脳領域それぞれに分化することに成功した。また、これら神経細胞のコレステロール含有量を増減させる方法を確認し、アルツハイマー病とコレステロール代謝との関係を示すための新たなツールとなる可能性を示した。また、コレステロールの運搬に関与するトランスポーターの発現解析を可能とし、iPS細胞由来神経細胞の有用性を示した研究である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルツハイマー病は認知症患者の中で最も割合が高く、高齢化を迎えた本邦においては今後社会的な問題になることが強く予想される。他方で、アルツハイマー病の有効な治療薬は存在しない。これらの原因として、適切なモデル動物・細胞が存在しないことが挙げられる。ヒトiPS細胞を用いたことでヒト遺伝情報を持った神経細胞による病態解析を行える点において学術的に非常に意義が高い。さらに、食分化の変化とともに脂質異常症は日本でも問題である一方で脂質異常とアルツハイマー病との関連を示した研究は非常に少なく、本研究による検討はこれまでにない視点から解析を行った点において社会的に意義が高い。

研究成果の概要(英文)：In this study, we succeeded in differentiating Alzheimer's disease patient-derived iPS cells into the forebrain neuron, which is the site of predilection for Alzheimer's disease is, and midbrain regions. We also established a method to increase and decrease the cholesterol content of both neurons, and showed the possibility to be a new tool to show the relationship between Alzheimer's disease and cholesterol metabolism. In addition, it is possible to analyze the expression of transporters involved in cholesterol transport. These results shows the usefulness of iPS cell-derived neurons.

研究分野：脂質代謝

キーワード：コレステロール iPS細胞 アルツハイマー病 神経細胞

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

認知症患者は平成37年には約700万人を超えると予想されている。特に高齢者における認知症は介護を必要とするため国への経済的負担もさることながら、家族への精神的・経済的負担は計り知れない。認知症は大きく分類して4種類の認証に分類できる。アルツハイマー病型認知症、前頭側頭型認知症、レビー小体型認知症、脳血管性認知症である。中でも最も発症頻度が高いアルツハイマー病型認知症は記憶を司る海馬を中心として広範囲に脳が委縮し、記憶障害や判断力低下などの症状が現れる。多くが高齢者で発症するが中には40歳以前には発症する若年性アルツハイマー病もある。しかしながら、多額の投資がなされているにもかかわらずアルツハイマー病の根本的な治療薬は存在しない。2019年には最有力候補として期待されていた新薬の臨床試験も中止が発表され世界中に衝撃が走った。

他方で、数多くの研究から病態メカニズムについてはいくつかの仮説が挙げられている。その中の一つで元も有力とされているのがアミロイド (A $\beta$ ) 蛋白の沈着である (アミロイド仮説)。A $\beta$  は40~42のアミノ酸からなるペプチドであり、またはセクレターゼによって前駆タンパク質 APP (amyloid protein precursor) から切断され産生される。通常の切断であれば問題なく代謝を受けるが、何らかの原因により通常の長さとは異なる A $\beta$  が産生されると、これらは難溶性であるため脳組織へ沈着し組織を破壊すると考えられている。一方で、脳内の脂質代謝においても重要な役割を担うリポタンパク質新生に関わるアポリポプロテイン E がアルツハイマー病発症と強く関連があること、血中コレステロール量増加がアルツハイマー病発症と関連すること、など脂質代謝異常とアルツハイマー病発症との関連についてはこれまで検討がなされてきてはいるが未解明な点が多い。さらには、コレステロール降下薬であるスタチンがアルツハイマー病治療薬として期待されたが、複数の臨床試験で全て無効であった。以上の報告から、アルツハイマー病病態に関する一貫した発症メカニズムは未だに発表されておらず新薬開発の障害となっていると言える。

### 2. 研究の目的

これまで新薬開発に繋がった研究の多くが、モデル動物を用いた研究であった。しかし、モデル動物による検討はヒト神経細胞の代謝を正しく反映しているかどうか疑問である。例えばヒトは高コレステロール食により動脈硬化が進展するが、マウスでは動脈硬化へ進展させることが実験的に概して困難である。さらには、ヒトの血中コレステロールの主体が LDL (低比重リポ蛋白) であるのに対してマウスは HDL (高比重リポ蛋白) が主体であるなど他にも相違する点が多い。より適切なモデルを構築すべきである。

そこで、本研究では認知症患者遺伝情報を有する iPS 細胞を用いる。iPS 細胞は正しいヒト遺伝情報を有する状態で種々の細胞へ分化させることが出来る。さらにはヒトより脳内神経細胞を生検し実験に用いることは困難であり、他方で iPS 細胞はヒト線維芽細胞またはリンパ球から容易に作製が可能でありこの点を克服できる。本研究の目的は、これら iPS 細胞から神経細胞に分化誘導すること・さらには細胞内部コレステロール量と A $\beta$  産生量の関係について明らかにすることを目的とした。

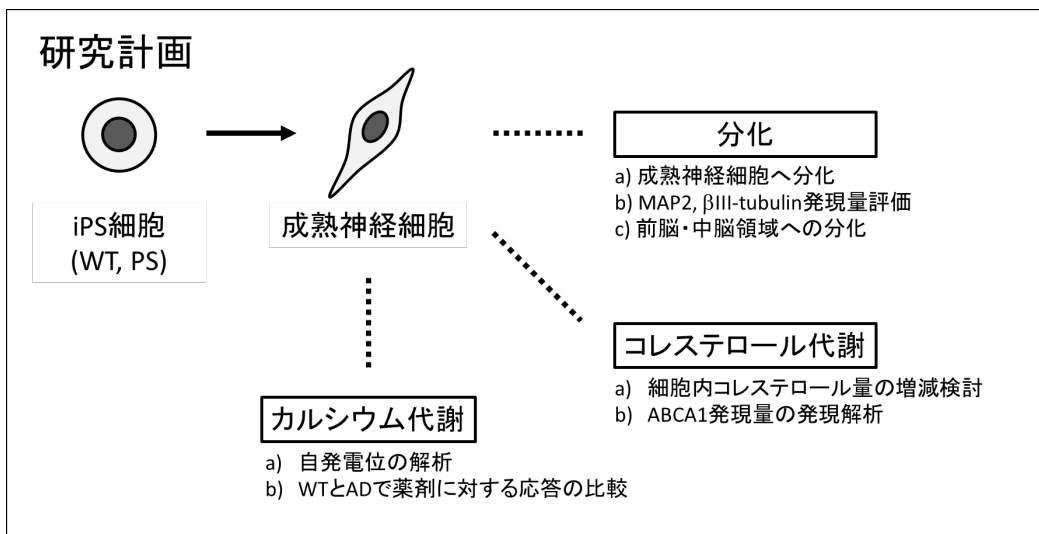
### 3. 研究の方法

野生型 (WT) およびアルツハイマー病型 (Presenilin; PS 変異株) iPS 細胞をそれぞれ CHIR99021 (GSK-3 阻害剤)、SB431542 (ALK 阻害剤)、Dorsomorphin (AMPK signal inhibitor)、bFGF (線維芽細胞増殖因子)、Y27632 (Rock inhibitor) 等により培養を行い、前脳と中脳領域の神経幹細胞 (Neurosphere) をそれぞれ作製した。これら神経幹細胞に対してさらに BDNF (脳由来神経栄養因子)、GDNF (グリア細胞由来神経栄養因子)、Ascorbic acid、dbcAMP (Dibutyryl adenosine cyclic monophosphate)、TGF- $\beta$ 3 (Transforming growth factor)、DAPT (Difluorophenacetyl alanyl phenylglycine butyl ester) 等を添加することにより神経細胞へ分化誘導を行った。これら分化神経細胞は成熟神経細胞マーカーである  $\beta$ -tubulin および MAP2 による免疫染色を行い成熟の程度を評価した。

次に、これら成熟神経細胞に対して細胞内コレステロール量を増減可能な系を確立することを目的とした実験を行った。メチル サイクロデキストリン (M $\beta$ CD) 添加により細胞内コレステロール量の減少を、メチル サイクロデキストリン-コレステロール複合体 (M $\beta$ CD-Chol complex) 添加により細胞内コレステロール量を増加させられるか検討を行った。それぞれ、成熟分化誘導に成功した神経細胞に対して至適濃度によるインキュベーションを行った。細胞内コレステロール量は folch の抽出により脂質分画のみを分離し酵素法を原理としたコレステロール濃度定量を行い、filipin (コレステロール蛍光染色試薬) を用いた顕微鏡下による評価も並行して行った。

また、細胞内コレステロール量を調整する上で最も重要である ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) の発現を免疫染色により評価を行った。ABCA1 は神経細胞に限らずマクロファージ等にも発現するトランスポーターであるが、代謝半減期が2分と短い。代謝過程の1つにカルシウムにより活性化を受けるカルパインにより切断・代謝が挙げられる。ABCA1 発現にカルシウム濃度が影響しているかどうかを明らかにするためにカルシウム動態 (電気生理学的特性) についてマルチ電極アレイ解析 (MEA) を用いて解析を行った。この時、よりドラステックな変化を検証するため、カルシウムチャネルを活性化する forskolin を添加するこ

とにより、薬剤に対する応答についても検討を行った。



#### 4. 研究成果

上述の方法により、WTおよびPS変異株iPS細胞を神経細胞へ分化誘導することに成功した。当初、前脳領域への分化誘導が困難であり、培養時のflaskを低接着flaskに変更することにより分化効率が飛躍的に向上した。しかし、前脳細胞への分化促進因子は未だ明確ではないため更なる検証が必要であると考えられる。これら成熟神経細胞への分化はIII-tubulinとMAP2がともに発現していることから証明した。

コレステロール代謝解析ではiPS細胞由来神経細胞内のコレステロール量を増減させることに成功した。神経細胞内のコレステロール量はA産生の場合でもある脂質ラフトの構造に重要な成分の一つでもあるため、A産生に影響を及ぼすことが予想される。まず初めに、成熟神経細胞に対してMCDの処理を行ったところ、神経細胞のラフト構造が崩壊していることが確認できた。一方でfilipinによる蛍光染色では蛍光強度が非常に弱く、細胞に含まれるコレステロール量が少ないことが示唆された。これらの原因を調査するために、培養に用いる培地全ての脂質成分を超速心分離およびアガロースゲル電気泳動により調査したところ、脂質成分含有量が非常に少ないことが明らかとなった。神経細胞は細胞外からの脂質成分供給が活動に重要であり、培養液への脂質成分の不足が原因であることが分かった。よって、細胞内コレステロールを減少させる以前に細胞内に定常的にコレステロールを供給できる系の構築が必要である。そこで、MCD-Chol complexを培養液に添加したところ、30分のインキュベーションで約1.2倍、24時間で約2倍に細胞内コレステロール含有量が増加した。Filipinによる染色でも同様にコレステロールが増加していることが確認できた。以上の結果から、iPS細胞由来神経細胞の細胞内コレステロール量を増減させることに成功した。WTとPSモデルでのコレステロール含有量比較も合わせて行ったが、分析分解能レベルで有意な差はこれまで認められていない。しかしながら、培養液への脂質成分組成を変更し、脂質解析に適した培養条件を調査し比較する必要があると考えられる。

ABCA1発現量における検討では、iPS細胞由来神経細胞においてWTおよびPSモデルの両者で発現を認めた。しかしながら、WTとPSモデルとの発現量比較ではこれまでのところ一定の差は認められていない。また、電位解析ではWTおよびPSモデルはともに自発的な電気活動を認めることを明らかにした。さらに、WTに比較してPSモデルにおいてforskolinによる電気生理学的活動増加の反応性が高いことが示唆される結果を得た。アルツハイマー病では病態形成の初期段階において異常な電氣的興奮が認められることが近年報告されている。当結果は、アルツハイマー病病態を反映した結果である可能性が高い。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

Soluble LR11 competes with amyloid  $\beta$  in binding to cerebrospinal fluid-high-density lipoprotein. Yano K, Hirayama S, Misawa N, Furuta A, Ueno T, Motoi Y, Seino U, Ebinuma H, Ikeuchi T, Schneider WJ, Bujo H, Miida T. Clinica Chmica Acta, 2018

Characterization of the cholesterol efflux of apolipoprotein E-containing high-density lipoprotein in THP-1 cells. Horiuchi Y, Ohkawa R, Lai SJ, Yamazaki A, Ikoma H, Yano K, Kameda T, Tozuka M. Biological chemistry, 2018

Validation and application of a novel cholesterol efflux assay using immobilized liposomes as a substitute for cultured cells. Horiuchi Y, Lai SJ, Yamazaki A, Nakamura A, Ohkawa R, Yano K, Kameda T, Okubo S, Shimano S, Hagihara M, Tohda S, Tozuka M.

〔学会発表〕(計 10 件)

可溶性 LR11 は髄液中高比重リポタンパクに結合しアミロイド 蛋白のクリアランスを阻害する. 矢野康次, 平山哲, 上野剛, 海老沼宏幸, 武城英明, 三井田孝. 第 58 回 日本臨床化学会年次学術集会, 2018

Establishment of neuroelectrophysiological model for Alzheimer disease derived from human iPSCs. Yano K, Ai T, Shiga T, Akamatsu W, Hirayama S, Miida T. 第 50 回 日本動脈硬化学会 総会・学術集会, 2018

Loading of Ca<sup>2+</sup> indicator in the human iPSC-derived neurons with PSN1/2 mutations. Yano K, Sasamoto K, Ai T, Shiga T, Okano H, Akamatsu W, Hirayama S, Miida T. 第 49 回 日本動脈硬化学会 総会・学術集会, 2017

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名 :

ローマ字氏名 :

所属研究機関名 :

部局名 :

職名 :

研究者番号 (8 桁):

### (2)研究協力者

研究協力者氏名 :

ローマ字氏名 :

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。