

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K08524

研究課題名(和文) オートファジーとアルツハイマー病の アミロイドペプチド蓄積機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of relationship between beta amyloid accumulation and autophagic pathway

研究代表者

高橋 礼典 (Takahashi, Reisuke)

東京医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50453725

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：神経変性疾患の発症にはオートファジーの機能不全・低下が関与している。そのため、アルツハイマー病(AD)においてもオートファジーの機能が低下していると考えられ、ADモデルマウス Tg2576の加齢に伴うオートファジーの機能低下が予想された。そこで、Tg2576の脳神経細胞におけるオートファジー関連蛋白Beclin 1の加齢に伴う変化を検討したが、発現低下は確認できなかった。一方、認知症を伴う高齢者脳組織では発現低下を確認できた。ADの発症に伴う神経細胞内におけるオートファジー機能の変化を解析するには、モデルマウスよりもヒトを対象とする研究が適しているとの結果が導かれた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在の高齢化社会においてADの早期診断法の確立は社会的に極めて重要な課題である。オートファジーの変化に着目したAD早期診断法の確立のためには、ADモデルマウス脳組織よりもヒト脳組織を用いた解析が有効であることが本研究により明らかとなった。このことは今後のADとオートファジーの関連を解明するためにも学術的な意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：It had previously reported that loss of autophagy was involved in neurodegeneration even in the absence of any mutant proteins. Therefore, it was predicted that autophagy function is lost or attenuated in AD, and intraneuronal accumulation of A β could induce dysfunction of autophagy in AD transgenic mouse brain with aging. Employing Tg2576 mouse we observed intraneuronal expression of Beclin 1, autophagic protein, with aging. However, the reduction of intraneuronal Beclin 1 was not observed in Tg2576 mouse brain tissue by immunohistochemical labelling. In contrast, remarkable reduction of intraneuronal Beclin 1 was observed in brain tissue from patients with dementia. These results might be able to conclude that human brain tissue is more available to investigate intraneuronal autophagic dysfunction than mouse tissue.

研究分野：医学

キーワード：認知症 神経病理 アルツハイマー病 -アミロイド 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 (AD) の病理組織学的特徴の 1 つには、 β -アミロイドペプチド (A β) から形成される老人斑がある。AD の発症には、A β の中でも 42 残基のアミノ酸から構成される A β 42 が重要な役割を担っていると考えられているが、分子レベルでの発症機構は未だ明らかではない。我々はこれまでに、分子細胞生物学的手法を用いて、神経細胞内における A β 42 の蓄積が AD 発症に関与することを裏付けてきた^{1,2}。最初に、野生株マウス・ラットおよび認知症状のないヒト脳組織の神経細胞内で、蛋白の輸送や分解に携わる後期エンドソームに相当する多胞体 (MVB: multivesicular body) やエンドソーム由来の小胞 (EV: endosomal vesicle) に A β 42 が局在していることを免疫電子顕微鏡的手法 (免疫電顕法) により証明した¹。さらに、AD モデルマウスを用い、加齢とともに A β 42 が神経突起やシナプス終末で増加していることを示した^{1,2}。また、神経突起・シナプス終末で蓄積・凝集した A β の近傍においての細胞骨格の破壊や変性も観察した²。これらのことから、AD モデルマウスの加齢とともに神経細胞内 A β 42 が神経突起・シナプス終末で増加・蓄積し、シナプス終末に変性や消失をきたすことにより、記憶障害が引き起こされ、AD が発症するのではないかと推察した。

神経突起やシナプス終末の MVB・EV で加齢とともに A β が蓄積することが、AD の発症に関与することを示してきたが、A β が蓄積する機序に関しては未だに不明のままである。近年、細胞内での浄化作用や栄養供給をつかさどるオートファジーという細胞内分解機構が、神経変性疾患において関与しているとの報告がなされている³。パーキンソン病と並び、AD においてもオートファジーの機能不全が AD 発症の原因に深く関連しているともいわれている⁴。シナプスの変性・消失を引き起こす MVB・EV への A β 蓄積の原因はオートファジーの障害によって細胞内の浄化ができなくなったためと仮定し、両者の関係性を検討する。オートファジーの障害が A β 蓄積の原因に関与している場合には、オートファジーの促進、誘導を目標とする AD の治療薬が期待される。

2. 研究の目的

現代社会では高齢化が進みつつあり、それに伴い認知症患者が増加を続けている。したがって、高齢者認知症の代表的疾患である AD の原因や発症機構を解明し、有効な早期診断法、治療法や予防法を開発していくことは、極めて重要かつ有益な課題である。

AD は、原因蛋白とされている A β が脳内に蓄積して脳機能に障害を与えることにより発症する考えられている。そのため、A β が蓄積する原因を解明し、蓄積を阻害することが重要である。近年、細胞機能を維持していくために重要な役割を果たしているオートファジーの異常が、神経変性疾患に関与しているとの報告が多くなされている。しかし、神経変性疾患の一つである AD においてはオートファジーがどのように関与しているかは明らかにされていない。AD の発症において重要な役割を果たす A β の分解にはオートファジーも関与していると考えられ、AD ではオートファジー関連蛋白が減少していると推察している。細胞内の不要な成分を自ら分解するオートファジーの機能が、加齢もしくは AD を含めた認知症の進行に伴い低下し、神経細胞内の A β が蓄積することが AD の発症に関与しているのではないかと我々は推測している。AD 患者脳組織において、オートファジー関連蛋白が健常者脳組織と比較してどのように変化しているかを検討し、その変化が神経細胞内の A β 蓄積にどのような影響を与えているかも調べる。AD に特異的なオートファジー機能の変化に着目し、早期診断法、治療法を開発することが本研

究の目的である。

3. 研究の方法

AD のモデルとなるトランスジェニックマウス (AD モデルマウス) 脳組織、およびその初代培養神経細胞 (AD モデル細胞) を利用して、加齢や培養日数とともに増加する神経細胞内 A β とオートファジーとの関係を形態学的、生化学的に解析する。2-20 ヶ月齢の AD モデルマウス脳を形態学的解析のために、灌流固定後、切片を作製して保存する。生化学的解析のためにはマウス脳を摘出し、液体窒素で凍結後、保存する。AD モデルマウス胎児脳の初代培養神経細胞は必要時に適宜用意する。形態学的解析法として、免疫染色法、蛍光染色法、免疫電顕法を用い、生化学的解析法としては、ウエスタンブロット (WB) 法、シナプトソーム法を用いる。

具体的には次の 2 点を解析する。

(1) AD モデルマウスの加齢に伴うオートファジーの機能変化

(2) AD モデル細胞を用いてのオートファジーと細胞内 A β 蓄積との相関関係

AD モデルマウスの 1 つである Tg2576 は 14-15 ヶ月齢で AD に特徴的な病理像であるアミロイド斑が著明に出現する。アミロイド斑出現前の早期病変時での変化を解析することが AD 発症のメカニズムの解明に重要であると考えられる。そこで、アミロイド斑が出現していない健常期 (3-5 ヶ月齢)、出現直前の病変早期 (9-11 ヶ月齢)、出現後の病変後期 (14-17 ヶ月齢) における Tg2576 脳組織を解析する。一方、Tg2576 胎児脳初代培養神経細胞における A β 蓄積量の経時的変化から AD 細胞モデルを過去に樹立しており、健常 (幼若) 期は培養 5-7 日目、病変早期は培養 10-12 日目、病変後期は培養 19-21 日目に相当すると各時期を既に設定している²。

(1) AD モデルマウスの加齢に伴うオートファジーの機能変化：

Tg2576 では加齢とともに神経細胞内 A β の蓄積が増加することは既に示している^{1,2}。Tg2576 の加齢とともにオートファジーの機能がどの様に変化するかを観察するために、オートファジー関連蛋白の 1 つである Beclin 1 に着目する。ヒトでは Beclin 1 が早期の AD で減少していると報告は既にある⁵。健常期、病変早期、病変後期の Tg2576 脳組織切片を Beclin 1 抗体で免疫染色し、加齢に伴う Beclin 1 の量的変化を検討する。

(2) AD モデル細胞を用いてのオートファジーと細胞内 A β 蓄積との相関関係：

オートファジーと細胞内 A β 蓄積との相関関係を調べるため、オートファジー阻害剤 (クロロキン) を用いて、人為的にオートファジーを抑制し、神経細胞内 A β の蓄積量変化を調べる。A β の変化を観察しやすい病変早期に相当する培養 10-12 日目の AD モデル細胞にクロロキンを投与して解析する。

4. 研究成果

Tg2576 の加齢とともにオートファジーの機能は低下し、オートファジー関連蛋白の発現は減少すると予測していたが、実際は Beclin 1 の染色濃度は 6、11、18 ヶ月齢と加齢とともにやや増加しており、有意なオートファジー関連蛋白の発現低下は確認できなかった (図 1)。AD モデルマウスでは AD 早期に相当する 11 ヶ月齢において Beclin 1 の有意な減少は確認できなかった。そのため、AD モデルマウス胎児脳の初代培養神経細胞においても培養日数の経過に伴う Beclin 1 の有意な低下は認められないと予測され、AD モデルマウスを用いる研究はこの段階で中止することとした。一方、ヒトでは AD 早期で Beclin 1 が減少しているとの報告がなされているため⁵、ヒト脳組織の神経細胞における Beclin 1 の変化を検討した。すると、過去の報告と一致し、認知症を伴わないヒト脳組織神経細胞に比べ、認知症を伴う脳組織内神経細胞で Beclin 1 の発現

は、低下する傾向が認められた (図 2)。



図 1 6 ヶ月齢 Tg2576 (左) の脳組織における Beclin 1 の発現を示した免疫組織染色像である。大脳皮質に散在している神経細胞が Beclin 1 抗体で顆粒状に染色されている。顆粒状にみられる神経細胞における Beclin 1 の発現は 11 ヶ月齢 (中) 18 ヶ月齢 (右) Tg2576 でやや増加している。 (x100)

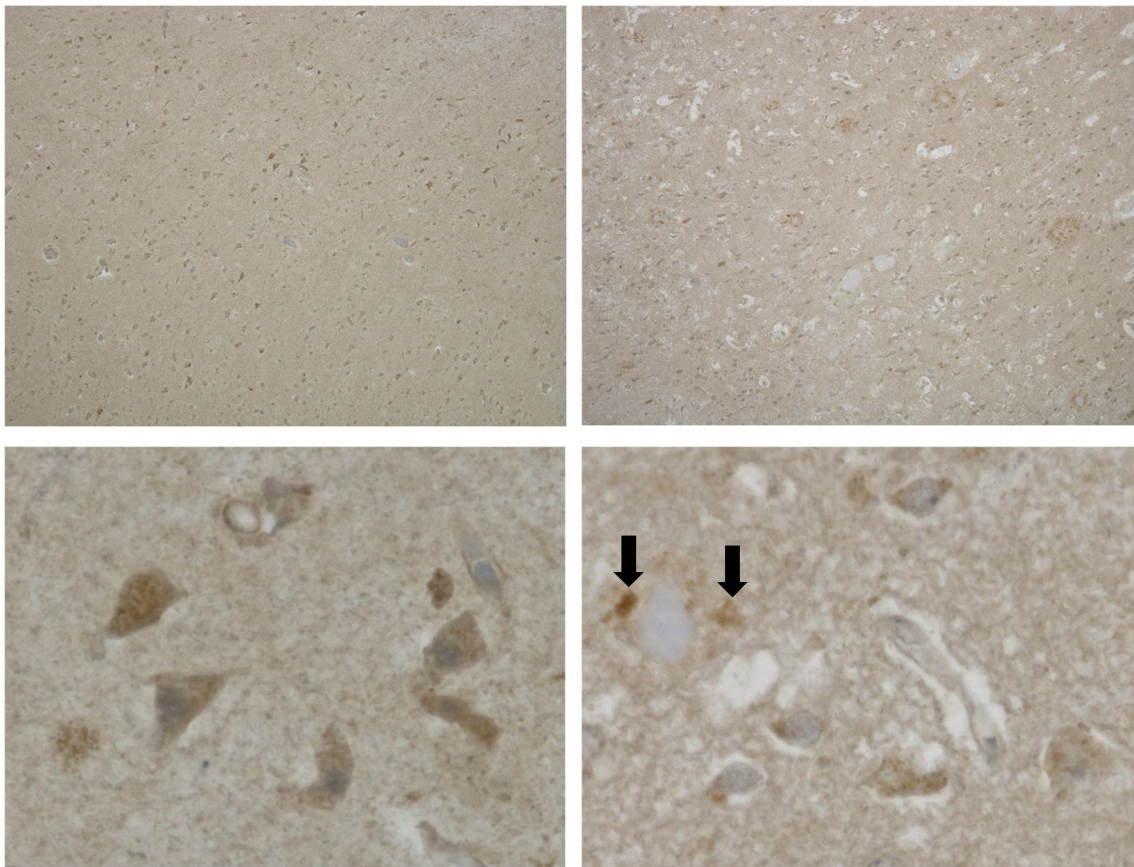


図 2 認知症を伴わない高齢患者から採取した脳組織切片の神経細胞には Beclin 1 の発現が認められる (左側 上下段) 。一方、認知症を伴う高齢患者からの脳組織切片における神経細胞では Beclin 1 の発現は著明に低下している (右側 上下段) 。また、老人斑周囲の神経変性突起においては Beclin 1 の強い発現が認められる (矢印) 。 (上段 x100、下段 x400)

老人斑でアミロイド斑のコア周囲に形成される神経変性突起においては Beclin 1 の強い発現が認められ (図 2 矢印) 、 Beclin 1 の凝集が予想される。過去に報告された AD 脳組織での Beclin 1 発現の低下はウエスタンブロットで確認されているため⁵、この神経変性突起における Beclin 1 の凝集も測定されている。そのため、免疫組織形態学的手法による神経細胞のみにおける Beclin 1 の発現を非認知症患者からの脳組織と比較することにより、AD における更なる著明な Beclin 1 低下を確認できる可能性がある。

これらの実験結果から、AD におけるオートファジー機能の変化を検討するには AD モデルマウスは適当ではないことが予測された。少なくとも AD モデルマウスの一つである Tg2576 における

オートファジー関連蛋白 Beclin 1 の発現は AD 様症状の発症とともに減少しないことを確認できた。AD とオートファジーの関連を検討するにはヒト脳組織の神経細胞に着目することが必要であるという結果を得ることができた。

<引用文献>

1. Takahashi RH, et al. Am J Pathol 2002.
2. Takahashi RH, et al. J Neurosci 2004.
3. Komatsu M, et al: J Cell Biol 2005.
4. Ulamek-Koziol M, et al. Neurochem Res 2013.
5. Pickford F, et al. J Clin Invest 2008.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Takahashi Reisuke H., Yokotsuka Mayumi, Tobiume Minoru, Sato Yuko, Hasegawa Hideki, Nagao Toshitaka, Gouras Gunnar K.	4. 巻 -
2. 論文標題 Accumulation of cellular prion protein within amyloid oligomer plaques in aged human brains	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain Pathology	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) 10.1111/bpa.12941	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 該当する
1. 著者名 Matsunaga R, Takahashi Y, Takahashi RH, Nagao T, Shishido T, Tateiwa T, Pezzotti G, Yamamoto K.	4. 巻 99
2. 論文標題 A New Method for Diagnosing Biochemical Abnormalities of Anterior Cruciate Ligament (ACL) in Human Knees: A Raman Spectroscopic Study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Biomaterialia	6. 最初と最後の頁 284-294
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.actbio.2019.09.016	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 該当する
1. 著者名 Willen K, Sroka A, Takahashi RH, Gouras GK	4. 巻 60
2. 論文標題 Heterogeneous Association of Alzheimer's Disease-Linked Amyloid- and Amyloid- Protein Precursor with Synapses.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Alzheimers Dis	6. 最初と最後の頁 511-524
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3233/JAD-170262	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 該当する
1. 著者名 Takahashi RH, Nagao T, Gouras GK	4. 巻 67
2. 論文標題 Plaque formation and the intraneuronal accumulation of -amyloid in Alzheimer's disease.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Pathol Int	6. 最初と最後の頁 185-193
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.12520	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 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高橋礼典
2. 発表標題 高齢者脳組織におけるびまん性老人斑への 正常プリオン蛋白の特異的集積
3. 学会等名 日本病理学会
4. 発表年 2022年

〔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	内原 俊記 (Uchihara Toshiki) (10223570)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・特任教授 (12602)	

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
---------	---------