

平成21年 4月30日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19700340

研究課題名（和文） S S T—R E Xによるミクログリア由来A $\beta$ 結合蛋白質  
の発現クローニングと機能解析研究課題名（英文） Cloning of A $\beta$ -binding membrane protein in microglia  
by using SST-REX method

研究代表者

伊藤 佐知子(ITO SACHIKO)

名古屋大学・大学院医学系研究科・COE特任助教

研究者番号：70447845

研究成果の概要：

アルツハイマー病(AD)の主な病因物質であるアミロイド $\beta$ (A $\beta$ )が、ADの発症または制御に関与していると考えられているミクログリアに作用する機序を解明する為に、A $\beta$ と結合するミクログリア膜表面蛋白質について解析した。膜蛋白質選択的に分離できるという特徴をもつSST-REX法を用いて、ミクログリア膜蛋白質を発現する細胞群を作製し、その中から、A $\beta$ と結合する細胞を単離し、ミクログリア細胞表面のA $\beta$ 結合膜蛋白質を同定、解析した。

交付額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2007年度 | 1,600,000 | 0       | 1,600,000 |
| 2008年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
|        |           |         |           |
|        |           |         |           |
| 総計     | 3,100,000 | 450,000 | 3,550,000 |

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：神経生物学・ミクログリア・アミロイド $\beta$ ・シグナル伝達

## 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病(AD)でみられる病理学的変化の一つに老人斑の形成があげられるが、その主要成分はアミロイド $\beta$ 蛋白質(A $\beta$ )でありADの発症の主な病因と考えられている。一方、老人斑の周りには活性化したミクログリアが多数集積し活性化していることが知られている。A $\beta$ の刺激により活性化されたミクログリアは、TNF $\alpha$ や活性酸素を産生して炎症性反応を誘発し神経細胞死を引き起こす場合と、神経毒性を持つA $\beta$ を貪食排除して神経細胞に保護的に作用する場合

があり、ミクログリアのADにおける役割は十分解明されていない。しかし少なくともA $\beta$ がミクログリアを活性化し様々な作用を誘発する場合にはA $\beta$ がミクログリア細胞膜上の何らかの膜蛋白質に相互作用する。これまでの研究からA $\beta$ とミクログリアの相互作用についてはTLR(Toll like receptor)ファミリー、スカベンジャー受容体ファミリー、CD14、RAGEなどが関与すると考えられてきたが、これらの受容体のみではADにおけるミクログリアの多様性は必ずしも説明できない。

代表者はこれまでに単離培養マイクログリアおよび株化マイクログリアを用いて、 $A\beta$ 刺激によりマイクログリアでM-CSFの発現が増加し、細胞の増殖に関与していること、また、 $A\beta$ 刺激によりいくつかのケモカイン(CCL)の発現が誘導され、マイクログリアが活性化することを明らかにした。さらに、その細胞内シグナル伝達経路について、MAPK, AKT, NF- $\kappa$ Bといった経路に関与していることを明らかにした(Ito S., Sawada M., Isobe K. 他 Neurosci. Res. 2006. in press: Ito S., Sawada M., Isobe K. 他 FEBS Lett. 579(9):1995-2000, 2005)。しかし、これらのシグナル伝達経路において、その入り口である細胞膜表面の $A\beta$ の受容体については、十分に解析されていない。これらの $A\beta$ 刺激によるマイクログリアの活性化に関与する細胞膜受容体を解析することは、ADにおけるマイクログリアの役割を解明する上でも重要である。

これまで、代表者の所属する研究室では、マイクログリアについて、炎症性サイトカインや活性酸素の産生の違いにより、神経毒性作用を示すものと、神経保護作用を示すいくつかの性質の異なるサブタイプが存在することを確認し、異なる性質を維持したマイクログリアを株化している。これらの細胞では、 $A\beta$ 刺激においてもマイクログリアの神経毒性作用の違いが認められた。しかし、この毒性作用の違いについては解明されておらず、このような機構を解明することは、ADでのマイクログリアの毒性作用を抑える上でも役立つと考えられる。また活性化したマイクログリアの機能に関わる膜蛋白質を同定することは、ADの病態におけるマイクログリアの役割を知ることにつながる。さらに病態との関わりを知ることにより、病気の抑制、治療に利用できると考えられる。

## 2. 研究の目的

アルツハイマー病(AD)の主な病因と考えられているアミロイドベータ蛋白質( $A\beta$ )の神経毒性にはマイクログリアの活性化が重要な関わりを持つことがわかってきた。 $A\beta$ は神経細胞により産生され神経細胞外に蓄積するため $A\beta$ がマイクログリアに作用を表す場合には細胞膜を介した接触が必要となる。そこで本研究では、特に両者の相互作用のインターフェースとなるマイクログリア膜蛋白質に注目し、膜蛋白質を選択的に分離できるSST-REX法(signal sequence trap by retrovirus-mediated expression screening system)を用いて、マイクログリア細胞株における細胞特異的な膜蛋白質を解析し、 $A\beta$ の受

容体を同定するとともに、 $A\beta$ によるマイクログリア活性化、マイクログリアの神経保護、または神経毒性作用との関わりについて解析を行うことを目的とした。

ADにおいて、 $A\beta$ がマイクログリアを活性化し、様々な作用を誘発するには、 $A\beta$ がマイクログリアの細胞表面の膜蛋白質と相互作用することが必要である。 $A\beta$ とマイクログリアの相互作用についてはこれまでの研究でいくつかの膜蛋白質が関与すると考えられてきたが、これらのみでは、ADにおけるマイクログリアの役割を十分に説明できない。そこで本研究は、マイクログリア細胞株を $A\beta$ 刺激し、マイクログリアに特徴的な膜蛋白質をSST-REX法により発現クローニングして同定する。得られた膜蛋白質について、 $A\beta$ との結合能を確認し、マイクログリアのフェノタイプと細胞内シグナル伝達系の活性化の解析を行うことにより、 $A\beta$ によるマイクログリアの活性化に関わるもの、神経毒性に関わるもの、神経保護的作用の発現に関与する膜蛋白質を解析することを目的とした。また、同定した遺伝子に対してsiRNAにより発現抑制を行い、 $A\beta$ 刺激したマイクログリア活性化における変化を調べ、得られた膜蛋白質のマイクログリアの機能における役割を解析することを目的とした。

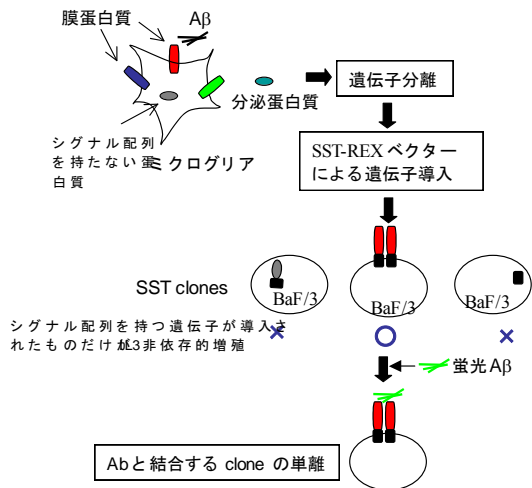
## 3. 研究の方法

(1) SST-REX法によるマイクログリア膜蛋白質発現BaF/3細胞群の作製

マイクログリアの細胞膜表面において $A\beta$ と結合する膜蛋白質をクローニングする方法として、細胞内全蛋白質からではなく、細胞表面に発現する膜蛋白質を効率よく得る為に、N末端側にシグナル配列をもち細胞表面に発現する膜蛋白質を選択的に分離できるSST-REX法を用いたクローニングを行った。具体的には、マイクログリア細胞株Ra2に $AB1-42$ を添加し、細胞からRNAを抽出し、cDNAライブラリーを作製した。作製したcDNAライブラリーをレトロウィルスベクターであるpMX-SSTベクターに組み込み、SST-REXライブラリーを作製した。これをレトロウィルス法によりBaF/3細胞に遺伝子導入した。同時に、GFP発現ベクターを遺伝子導入し、導入効率を蛍光顕微鏡により確認した。SST-REX法の特徴として、N末端側のシグナル配列を持ったマイクログリア由来遺伝子が組み込まれたベクターがBaF/3細胞に遺伝子導入され発現すると、IL-3依存的であるBaF/3細胞がIL-3非依存的に増殖を示すようになる。このことから、遺伝子導入したBaF/3細胞をIL-3非存在化で培養し、増殖した細胞

胞を用いることにより選択的にマイクログリア由来膜蛋白質を発現する BaF/3 細胞群（マイクログリア膜蛋白質発現 BaF/3, BaF/3-Ra2）を得た（図1）。

図1 SST-REX 法を用いた Aβ結合膜蛋白質のクローニング



(2) ミクログリア膜蛋白質発現 BaF/3 細胞と Aβ結合の解析

IL-3 非依存的に増殖するマイクログリア膜蛋白質発現 BaF/3 細胞から Aβと結合する膜蛋白質を発現する細胞を選択する為に、蛍光標識した Aβを用いることにより、膜蛋白質を発現する細胞と Aβとの結合を蛍光顕微鏡、または Flow cytometer (FACS) で解析を行うことができる。このことから、蛍光標識した Aβを用いて解析を行った。

IL-3 非存在化で増殖したマイクログリア膜蛋白質発現 BaF/3 細胞に、biotin-Aβを添加し、細胞回収後、biotin と結合する streptavidin-APC により蛍光標識し(蛍光 Aβ, Aβ-APC)、FACS により蛍光 Aβと結合する BaF/3 細胞群の解析を行った。また、マイクログリア膜蛋白質発現 BaF/3 細胞に Aβを添加し、anti-Aβ 抗体、anti-mouse IgG-CY3 蛍光標識抗体を用いた免疫蛍光染色により Aβを蛍光染色し、蛍光顕微鏡で細胞と Aβの結合を調べた。

(3) Aβ結合マイクログリア膜蛋白質発現 BaF/3 細胞のクローニング

Aβと結合するマイクログリア膜蛋白質発現 BaF/3 細胞のクローニングの第一段階として、蛍光 Aβと結合する BaF/3 細胞群の割合を増やす為に、FACSvantage により蛍光 Aβと結合する BaF/3 細胞群を分離した。これらの細胞群を培養し、再び FACSvantage による分離を行った。次に、得られた Aβ結合 BaF/3 細胞群を

96 well plate を用いてクローニングし、各々の細胞について、蛍光 Aβとの結合を FACS により解析した。

(4) Aβ結合マイクログリア膜蛋白質の同定

クローニングして得られた Aβ結合 BaF/3 細胞で発現するマイクログリア由来膜蛋白質の同定を行った。クローニングした BaF/3 細胞から DNA を抽出し、SST-REX ベクター特異的プライマーを用いて PCR を行い、組み込まれたマイクログリア由来遺伝子の長さを確認した。PCR 産物を抽出し、配列の解析を行った。

(5) ミクログリアでの発現の解析

得られた PCR 産物の配列情報から、マイクログリア由来膜蛋白質の同定を行い、膜蛋白質特異的な primer を作製し、マイクログリアにおける Aβ刺激時の遺伝子発現の変化について PCR による解析を行った。また、western blotting により Aβ刺激時の蛋白質発現の変化についても解析を行った。

4. 研究成果

(1) SST-REX 法によるマイクログリア膜蛋白質発現 BaF/3 細胞群の作製

Aβ刺激したマイクログリア細胞株 Ra2 から cDNA ライブラリーを作製し、N 末端側にシグナル配列をもつ分泌蛋白質、膜蛋白質を選択的に分離することができる SST-REX 法により BaF/3 細胞に遺伝子導入し、マイクログリア膜蛋白質発現 BaF/3 細胞を作製した。IL-3 を含まない培養液で培養した結果、遺伝子導入していない BaF/3 細胞は増殖しなかったが、SST-REX 法により遺伝子導入したものでは IL3 非依存的な細胞の増殖が見られ、マイクログリア由来の N 末シグナル配列を含む遺伝子が BaF/3 細胞に導入されたことが確認できた。また、同時に GFP を発現するベクターを遺伝子導入したことから、蛍光顕微鏡により IL3 非依存的に増殖した細胞を観察した結果、GFP を発現していることが確認できた。

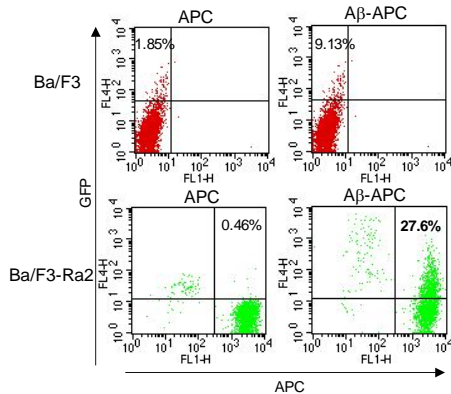
(2) ミクログリア膜蛋白質発現 BaF/3 細胞と Aβ結合の解析

①FACS による解析

IL-3 非存在化で増殖したマイクログリア膜蛋白質発現 BaF/3 細胞 (BaF/3-Ra2) に、biotin-Aβ を添加し、細胞回収後、streptavidin-APC により蛍光標識し (Aβ-APC)、FACS により Aβ-APC と結合する BaF/3 細胞群の解析を行った。その結果、BaF/3-Ra2 への Aβの添加により APC の蛍光をもつ細胞群が検出された。コントロールとして、BaF/3 細胞に Aβを加えたもの、BaF/3-Ra2 に APC のみ加えたものに比べ、BaF/3-Ra2 に Aβ-APC を加えたものでは APC の蛍光が有意に

増加していた (図2)。このことから、ミクログリア膜蛋白質発現 BaF/3 細胞に A $\beta$  と結合する膜蛋白質が存在する可能性が示唆された。

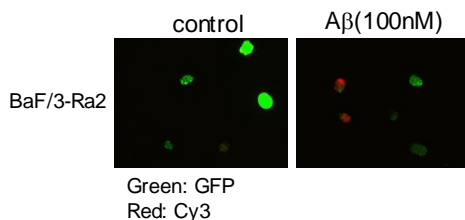
図2 蛍光 A $\beta$  と BaF/3-Ra2 の結合の FACS による解析



## ② 蛍光顕微鏡による解析

ミクログリア膜蛋白質発現 BaF/3 細胞群 (BaF/3-Ra2) と A $\beta$  との結合を調べる為に、A $\beta$  を添加後、免疫蛍光染色法により A $\beta$  を Cy3 蛍光標識し、蛍光顕微鏡で観察した。その結果、A $\beta$  の添加により、Cy3 蛍光をもつ細胞が観察された (図3)。このことから、ミクログリア膜蛋白質発現 BaF/3 細胞群に A $\beta$  と結合する膜蛋白質が存在する可能性が示唆された。

図3 蛍光 A $\beta$  と BaF/3-Ra2 の結合の蛍光顕微鏡による解析



鏡による解析

## (3) A $\beta$ 結合ミクログリア膜蛋白質発現 BaF/3 細胞のクローニング

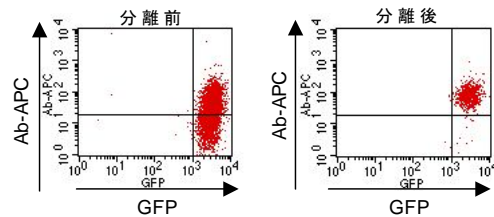
FACS 解析により A $\beta$  と結合するミクログリア膜蛋白質発現 BaF/3 細胞群が確認できたことから、A $\beta$  と結合するミクログリア膜蛋白質発現 BaF/3 細胞をクローニングする為に、FACSvantage により A $\beta$ -APC と結合する BaF/3 細胞群を分離した (図4)。

これらの細胞群を 96well plate を用いてクローニングし、各々の細胞について FACS により A $\beta$  との結合を確認した。その結果、6 個の A $\beta$ -APC と結合するクローンを得た。

図4 A $\beta$  結合ミクログリア膜蛋白質発現

## BaF/3 細胞の分離

### BaF/3-Ra2+ A $\beta$ -APC



## (4) A $\beta$ 結合ミクログリア膜蛋白質の同定

クローン化して得られた A $\beta$  結合ミクログリア膜蛋白質発現 BaF/3 細胞が発現するミクログリア由来膜蛋白質を同定するために、PCR を行った結果、1100bp のミクログリア由来遺伝子が組み込まれていることが確認できた。これらの PCR 産物を抽出し配列を調べ、解析を行った結果、A $\beta$  と結合する可能性のあるクローン由来のものは全て prosaposin であることが確認できた。これまで、prosaposin は分泌蛋白質、膜構成成分として存在することが知られている。また、A $\beta$  と結合しなかったいくつかのクローンについても解析を行った結果、lysosomal-associated membrane protein1 (Lamp1)、interleukin 17 receptor A (IL17ra) といった膜蛋白質であることが確認できた。今回用いた SST-REX 法は N 末にシグナル配列を持つ蛋白質を選択的に発現するという特徴をもつが、今回の結果から、膜蛋白質を効率的に得られることが確認できた。

## (5) ミクログリアでの発現の解析

A $\beta$  と結合する可能性のある蛋白質として同定された prosaposin についてミクログリアでの発現の解析を行った。A $\beta$  刺激したミクログリアでの prosaposin の発現を PCR により解析した。その結果、A $\beta$  刺激による発現の有意な変化は見られなかった。また、western blotting による蛋白質レベルでの解析についても A $\beta$  刺激による発現の変化は観察されなかった。

今回の解析で prosaposin は A $\beta$  刺激による発現の変化は認められなかったが、prosaposin は、これまでに、in vitro において神経突起伸長を刺激し、in vitro で神経を虚血によるダメージから保護するといった神経保護作用を持つことが報告されている (O'Brien JS et al, 1994)。このことから、A $\beta$  刺激によるミクログリアの活性化による神経保護作用にも何らかの関与をもつ可能性が示唆された。ミクログリアの神経保護作用に関与する可能性のある蛋白質について解析することは、ミクログリアの AD 発症に

おける役割の解明、また、ADの病気の抑制治療に利用できる可能性を持つと考えられた。

今後の展望として、prosaposinとミクログリアの機能との関わりについて調べる為に、ミクログリアにおいてprosaposinをsiRNAにより発現抑制、または、発現ベクターにより過剰発現させた状態で、 $A\beta$ 刺激し、サイトカインのサイトカイン産生能、活性酸素産生能、またリソゾーム活性の測定、シグナル伝達経路、食食能の変化の解析を行うことは重要であり、これにより、prosaposinとミクログリア活性化、神経保護または神経毒性作用との関わりが明らかになることを期待した。また、今回は、 $A\beta$ と結合する膜蛋白質として同定されたものはprosaposinのみであったことから、今後さらに、 $A\beta$ と結合する膜蛋白質のクローニングを進め、ミクログリアの機能に参与する膜蛋白質を解明し、AD発症におけるミクログリアの関与が明らかになることを期待した。

#### 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 2件)

- ① Ken-ichi Isobe, Naomi Nishio, Sachiko Ito. Age-related decline of immune function and age-related diseases, Nihon Rinsyo, 2009, in press, 査読無
- ② Kimura K, Ito S, Nagino M, Isobe K. Inhibition of reactive oxygen species down-regulates protein synthesis in RAW 264.7. Biochem Biophys Res Commun. 2008, 372(1):272-275, 査読有

[学会発表] (計 1件)

- ① 伊藤佐知子、磯部健一 Amyloid- $\beta$ 刺激によるミクログリア活性化と炎症性物質の産生 第31回日本基礎老化学会、2008年6月13日松本、日本

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

伊藤 佐知子 (ITO SACHIKO)

名古屋大学・大学院医学系研究科・

COE特任助教

研究者番号：70447845