

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16503

研究課題名（和文）脳内のA β 貪食除去を担う神経細胞の機能解析研究課題名（英文）Study on the function of neurons in A β -ta phagocytosis in the brain

研究代表者

藤田 融 (Fujita, Yu)

岩手医科大学・薬学部・助教

研究者番号：80714675

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,600,000円

研究成果の概要（和文）：アルツハイマー病の治療・予防において、原因分子であるA β を取り除くメカニズムの解明は重要である。これまでに脳内のA β 除去は、食細胞であるミクログリアが受容体を介して行っている事が報告されている。我々の研究により、ミクログリアだけではなく神経細胞やアストロサイトもA β を貪食している事、またそれらの細胞による貪食受容体MEGF10を介したA β 貪食メカニズムが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、アルツハイマー病（AD）は有効な治療法がなく、進行を遅らせる薬のみが治療に用いられている。高齢化社会である日本において、ADは、今後増加する事が予想される疾患であるため、AD治療薬の開発が急務となっている。これまでにADの原因分子としてアミロイド 蛋白質（A β ）の沈着が考えられている。そのため、A β の脳内からの除去メカニズムを明らかにする事が、治療薬開発の戦略の一つとなる。我々の研究によって新しい脳内のA β 貪食除去システムが明らかとなったため、AD治療や予防の開発に貢献できたと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Amyloid- β proteins (A β), including A β 42 and A β 43, are known pathogenesis factors of Alzheimer's disease(AD). It is important to clarify a mechanism of A β elimination in the brain for the treatment and prevention of AD. Recent study has reported that microglia, a phagocytes in the brain, engulfs A β through a phagocytosis receptor. Our studies clarified that neurons and astrocytes engulfed A β 42 and A β 43 via Multiple-EGF like domains 10 (MEGF10), which was known a phagocytosis receptor in the brain.

研究分野：生化学

キーワード：貪食 アミロイド 蛋白質

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病 (AD) は、有効な治療法がなく、現在は進行を遅らせる薬が治療に用いられている。超高齢化社会である日本において、AD は今後 65 歳以上の 5 人に 1 人が罹患し、増加する見込みと推計されている疾患である。これまでに AD の発症原因として脳内のアミロイド β 蛋白質 (Aβ) の沈着と蓄積が考えられているが、Aβ の沈着を阻害しても AD の症状の改善は認められていない。そこで、現在は AD の予防および根本的治療のためには、沈着が起こる前に Aβ を除去する事が有効な手段であると捉えられている。

Aβ は、アミロイド前駆体蛋白質 (APP) が分解されて産生され、アミノ酸数の異なる Aβ40、Aβ42、Aβ43 が産生される。そのうち、Aβ42、Aβ43 は蓄積性・沈着性が高く、AD の発症原因と考えられている。産生された Aβ は、脳内で異物として認識され、脳内の食細胞であるミクログリアあるいはアストロサイトによって受容体を介して貪食除去され、沈着や凝集が抑えられている。

これまでの我々の先行研究において、アポトーシス細胞の貪食受容体として報告されている Multiple-EGF like domains 10 (MEGF10) が脳内の神経細胞およびアストロサイトに発現する事が明らかとなった。そこで、脳内の神経細胞およびアストロサイトにおいて、貪食受容体である MEGF10 を介して Aβ の貪食除去に関わっている可能性が高いと考えて本研究を進めるに至った。

2. 研究の目的

これまで脳内の Aβ を含めた異物の貪食除去に関わる研究は、ミクログリアに着目された研究が多く、一方で異物貪食したミクログリアは活性化されて脳に炎症を引き起こし、ダメージを与える事も知られていた。しかしながら、神経細胞が Aβ 貪食除去に関わる報告はほとんどなく、またアストロサイトにおいても MEGF10 を介して Aβ を貪食している事も知られていない。そこで、本研究は、MEGF10 に着目し、神経細胞およびアストロサイトによる Aβ の貪食除去メカニズムを明らかにする事を目的として研究を行う事にした。

3. 研究の方法

(1) MEGF10 を介した神経細胞およびアストロサイトの Aβ 貪食機構の解明

MEGF10 の発現が認められている神経株細胞 (B103 細胞) およびアストロサイト株細胞 (KT-5 細胞) を用いて、FITC で蛍光標識した Aβ40、Aβ42、および Aβ43 を反応させ、細胞内に取り込むかどうかを検討した。同時に、核を蛍光色素で染色し、FITC の蛍光を持つ二重陽性細胞を、Aβ 細胞内に貪食した細胞と判定し、貪食程度を算出した。

マウス線維芽細胞に MEGF10 過剰発現ベクターを形質転換し、MEGF10 の発現程度をウェスタンブロット法により検出した。空ベクター導入細胞では MEGF10 の発現が認められず、一方で、発現ベクター導入細胞では MEGF10 の過剰発現が認められたため、と同様の方法で各種 Aβ の細胞内取り込みを検討した。

野生型マウスの胎児の脳から、初代培養神経細胞およびアストロサイトを調製し、MEGF10 の発現をウェスタンブロット法により検出した。MEGF10 の発現が調製した神経細胞およびアストロサイトに認められたため、と同様の方法で、各種 Aβ の細胞内取り込みを検討した。

AD モデルマウス (Aβ 沈着が認められる 8~9 ヶ月齢) の凍結脳切片をクリオスタットを用いて作製し、抗 Aβ40、抗 Aβ42、抗 Aβ43 抗体と神経細胞マーカー (MAP2、βIII-Tubulin、NeuN) 抗体とアストロサイトマーカー (GFAP) との二重蛍光染色を行った。Aβ と神経細胞およびアストロサイトの蛍光が重なった二重陽性細胞を Aβ を貪食した細胞と判定し、貪食割合 (%) を算出した。

(2) Aβ による MEGF10 を介した貪食シグナルカスケードの解明

MEGF10 の発現が認められている神経株細胞 (B103 細胞) およびアストロサイト株細胞 (KT-5 細胞) を用いて、Aβ40、Aβ42、および Aβ43 を一定時間反応させた。その後、細胞抽出液を作製し、抗 MEGF10 抗体で免疫沈降し、沈降したサンプルを抗リン酸化チロシン抗体でウェスタンブロットを行い、各種 Aβ による MEGF10 のチロシンリン酸化が起こるかどうか検討した。また、同様の方法で得た抽出液について Phos-tag gel 電気泳動法でリン酸化体を分離し抗 MEGF10 抗体でウェスタンブロットを行い、MEGF10 のリン酸化が各種 Aβ によって起こるかどうかを検討した。

4. 研究成果

本研究により、神経細胞及びアストロサイトは、沈着性・凝集性の高いAβ42、およびAβ43を貪食除去している事が明らかとなった。一方で、沈着性・凝集性の低いAβ40については神経細胞およびアストロサイトによりほとんど取り込まれない事が明らかとなった。さらに、Aβ42、Aβ43は神経細胞およびアストロサイトに発現するMEGF10のリン酸化を促進させ、Aβ40は、それに比べてほとんど促進させない事が明らかとなった。また、MEGF10を過剰に発現した細胞では、発現しない細胞と比べてAβ42、およびAβ43を多く取り込む事が明らかとなった。これらの結果を合わせると、脳内の神経細胞およびアストロサイトは貪食受容体MEGF10を介してAβ42、Aβ43を貪食除去する可能性が高いと考えられた。この研究成果は、査読付きの国際誌に投稿され、受理された (Neuroscience, 443, 1-7 : 2020)。

これまでの国内外の研究において、ミクログリアやアストロサイトによるAβ貪食に関する研究は多くあるが、神経細胞によるAβ貪食除去のメカニズムや貪食受容体MEGF10に着目したAβ貪食のメカニズムについてはほとんど報告はなく、さらにADモデルマウスの脳内で、Aβ42よりも早期に沈着に関わり、神経毒性の強いAβ43の貪食除去において解析された研究報告はこれまでにない。したがって、本研究成果は新規性が非常に高いと考えている。また、現在までに治療薬のないADに対して、治療法や予防法の開発の手がかりに貢献できたという点においては、インパクトの大きい研究成果であると言える。今後においては、MEGF10ノックアウト神経細胞やアストロサイトを用いて脳内でのAβ貪食除去におけるMEGF10の依存性を検討する事や、ADモデルMEGF10ノックアウトマウスを作製し、記憶力に対するMEGF10の関係性、さらにAβ貪食除去における神経細胞、アストロサイト、ミクログリアの位置づけについて研究を進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Fujita Yu, Maeda Tomoji, Sato Chiharu, Sato Masaya, Hatakeyama Hatsune, Ota Yume, Iwabuchi Nozomi, Tatesawa Komaki, Nomura Ayako, Zou Kun, Komano Hiroto	4. 巻 443
2. 論文標題 Engulfment of Toxic Amyloid β -protein in Neurons and Astrocytes Mediated by MEGF10	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1~7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuroscience.2020.07.016	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤田融
2. 発表標題 2. 神経細胞およびアストロサイトにおけるMEGF10を介したアミロイド 蛋白質（A β ）の取り込み
3. 学会等名 日本生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤田融
2. 発表標題 2. 神経細胞およびアストロサイトにおけるMEGF10を介したアミロイド 蛋白質（A β ）の取り込み
3. 学会等名 日本薬学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤田融
2. 発表標題 2. 神経細胞およびアストロサイトにおけるMEGF10を介したアミロイド 蛋白質（A β ）の取り込み
3. 学会等名 日本薬学会東北支部会
4. 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----

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