

機関番号：10101
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21770128
 研究課題名（和文） エクソソーム結合性ガングリオシドのアミロイドベータ蛋白質重合への影響
 研究課題名（英文） Effect of exosome-associated gangliosides on the assembly of amyloid- β protein
 研究代表者
 湯山 耕平 (YUYAMA KOHEI)
 北海道大学・大学院先端生命科学研究院・特任助教
 研究者番号：80415546

研究成果の概要（和文）：アミロイド β 蛋白質(A β)の重合体形成は、現在有効な治療法のないアルツハイマー病の病態発生において中核となる現象であると考えられており、その形成メカニズムの解明が待たれている。本研究課題では、A β 重合の核となることが知られている膜脂質ガングリオシドの分泌顆粒による細胞外放出および細胞外での A β 重合に対する影響について検討した。その結果、ガングリオシド GM1 は、マウス初代培養神経細胞からエクソソームと呼ばれる顆粒に結合したかたちで細胞外に放出され、このエクソソーム結合型 GM1 は、A β 重合を促進する能力を有することを見出した。

研究成果の概要（英文）：Alzheimer's disease is pathologically featured by extraneuronal deposition of amyloid fibrils, which are composed of amyloid- β protein (A β). However, it still remains to be clarified how soluble monomeric A β assemble into fibrils. In the present study, we found that ganglioside GM1 is release from mouse primary cortical neurons, in the association with exosome. Furthermore, the exosome-associated GM1 accelerated the assembly of synthetic A β in vitro.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：糖質、ガングリオシド、アルツハイマー病

1. 研究開始当初の背景

ガングリオシドは、シアル酸を含むスフィンゴ糖脂質の総称で、特に脊椎動物の脳神経系に豊富に存在し、主に細胞表面に存在するが、エクソソームと呼ばれる顆粒に結合するかたちで、ガングリオシドが細胞外放出される例が報告された。エクソソームは、様々な種類の哺乳類の細胞から放出される直径

50-90 nm の二重膜の細胞外顆粒で、由来はエンドソームの膜である (They et al, Nat. Rev. Immuno., 2, 569-79, 2002)。細胞内におけるエクソソーム形成過程の概略は、エンドソーム膜の一部が内腔側に陥入し、Intraluminal vesicle (ILV) となり、Multivesicular Body (MVB) とよばれる多胞体が形成される。その後、MBV は通常リソ

ソームまで輸送され融合し、ILV はリソソーム中で分解されるが、MVB の一部は細胞表面まで運ばれ細胞膜と融合し、その結果、ILV は細胞の外に放出される。この細胞外に出された ILV がエクソソームと呼ばれる。ガングリオシドはエクソソーム膜上で外に糖鎖を露出する形で存在する。脳神経細胞からのエクソソーム放出に関しては、近年、ラット大脳培養神経細胞で報告されている(Faure et al, *Mol. Cell. Neurosci.*, 31, 642-8, 2006)。私たちの研究室ではこれまでに、塩基性薬剤のクロキニン処理によって分化型 PC12 細胞のエンドサイトーシスを阻害するとガングリオシド GM1 がエンドソーム膜に蓄積すること(Yuyama et al, *FEBS Lett.*, 580, 6972-6, 2006)、さらに、この細胞に脱分極刺激をあたえると蓄積した GM1 の一部がエクソソームに結合した形で細胞外放出されることを見出した(Yuyama et al, *J. Neurochem.*, 105, 217-24, 2008)。さらに我々は、エクソソーム結合性 GM1 がアミロイド β 蛋白質(A β)を重合させる能力を持つか検討した。A β は脳内において、細胞外で重合、沈着することによりアルツハイマー病の主要な病変である老人斑を形成することが知られている。この A β 重合開始メカニズムは未だ不明であるが、初期アルツハイマー病患者脳内でガングリオシド GM1 と結合した A β (GM1-bound A β , GA β)が存在することが報告され(Yanagisawa et al, *Nat. Med.*, 1, 1062-6, 1995)、これまでの一連の報告から「GA β がシード(種)となり A β の重合を促進し、老人斑形成の起点になる」というシード仮説が提唱されている。しかし脳内における GA β の形成部位ははっきりしていない。我々の検討の結果、エンドサイトーシスを誘導した PC12 細胞から放出されたエクソソーム結合性 GM1 が、A β 重合を促進することを見出した(Yuyama et al, *J. Neurochem.*, 105, 217-24, 2008)。私はこれらの PC12 細胞を用いた実験結果から、脳神経細胞においてエンドサイトーシス障害が起こるとエンドソーム膜に蓄積した GM1 の一部がエクソソームとして細胞外へ放出され、細胞外に浮遊する A β と結合し GA β が形成され、その結果、A β 重合が促進されるのではないかと考えている。哺乳類の脳神経細胞において、加齢によるエンドサイトーシス障害が数多く観察されており、さらに神経突起においてエクソソームの前駆オルガネラである MVB の形成増加が見られるという報告がなされている(Stokin et al, *Science*, 307, 1282-8, 2005)。さらに近年、アルツハイマー患者脳の老人斑にエクソソームマーカータンパク質 Alix が濃縮されているという報告がなされ、実際に脳内でも A β 重合にエクソソームが関与する可能性が示唆されている(Rajendran et al,

PNAS, 103, 11172-7, 2006)。

2. 研究の目的

上記の背景をふまえ本研究課題では、エンドサイトーシス障害を誘導したマウス脳初代培養神経細胞を用い、エクソソーム結合性ガングリオシドの量および種類の解析、および、エクソソーム結合性ガングリオシドの A β 重合促進能について評価する。加齢マウス脳標本を用いて神経細胞内におけるエクソソーム前駆オルガネラである MVB の形成状況および MVB 内のガングリオシド発現の観察を行う。これらの研究結果をふまえて、アルツハイマー病の老人斑形成におけるガングリオシドの役割について考察する。

3. 研究の方法

(1)神経細胞を用いたエクソソーム結合型ガングリオシド放出と A β 重合への関与の解析

培養細胞は、マウス脳神経細胞由来細胞株 Neuro2a、およびマウス大脳皮質初代培養神経細胞を用いた。

①各種エンドサイトーシス障害誘導処理時における細胞内ガングリオシドの局在を、特にエクソソーム形成経路に関して観察する。観察は、特異的抗体および毒素を用いて染色を行った後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。エンドサイトーシス障害誘導には、これまでに PC12 細胞でのエクソソーム放出促進が確認されている塩基性薬剤のクロキニン、NH₄Cl 処理を用いて行った。

②細胞外へのガングリオシド放出の引き金となる刺激の種類を探索した。予備的な実験として高濃度 KCl 処理で PC12 細胞からガングリオシド GM1 が放出されることを確認している。本研究ではこの他に、電気パルス刺激、および脱分極により細胞内 Ca²⁺レベルの上昇が見られることから Ca²⁺ ionophore 処理による刺激も試み、神経細胞からのエクソソーム放出が脱分極刺激によって促進されるというスキームを確立する。

③細胞外ガングリオシドがエクソソームに結合しているか解析した。解析は、シヨ糖密度勾配遠心を用いてこれまで報告されているエクソソームと同等の密度画分から回収されることを確認した。このガングリオシドを含む画分からこれまで知られているエクソソームマーカータンパク質(Alix、Tsg101)が検出されるか確認する。また、電子顕微鏡観察による細胞外ガングリオシド存在様式の解析を行った。

④細胞外へ放出されたエクソソーム結合型ガングリオシドが、A β 重合を促進する能力を

有するか検討する。採取したエクソソームと合成 Aβ1-40 ペプチドを混ぜ、一定時間インキュベートした後、形成されたアミロイド繊維の量をチオフラビン T 蛍光法で測定する。エクソソームによる Aβ 重合の促進が見られた場合、抗ガングリオシド抗体による重合抑制実験を行い、重合促進に対するガングリオシドの影響を調べた。

(2) 加齢動物を用いたエクソソーム結合性ガングリオシド放出およびその Aβ 重合への関与の解析

加齢動物は、国立長寿医療センター研究所の動物施設で維持されており入手可能である加齢マウスを用いる予定であったが、研究代表者の所属移転により使用ができなくなったため、マウス初代培養細胞の培養期間の違いによるガングリオシド放出量および Aβ 重合への関与の違いについて検討した。

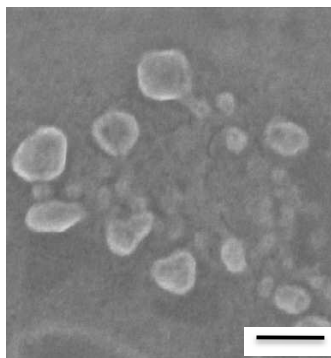
① 培養期間の異なるマウス大脳皮質初代神経細胞の培養液から回収されたエクソソームが Aβ 重合を促進する能力を有するか検討する。採取したエクソソームと合成 Aβ1-40 ペプチドを混ぜ、一定時間インキュベートした後、形成されたアミロイド繊維の量をチオフラビン T 蛍光法で測定する。エクソソームによる Aβ 重合の促進が見られた場合、抗ガングリオシド抗体による重合抑制実験を行い、重合促進に対するガングリオシドの影響を調べた。

4. 研究成果

(1) 実験結果

① 神経細胞からのエクソソーム放出

マウス脳神経細胞由来細胞株 Neuro2a 細胞およびマウス大脳皮質初代培養神経細胞(培養後 7 日目)を用い、培地交換から 24 時間後に培養液中のエクソソーム画分を、連続的



Scale bar, 100 nm

図 1. Neuro2a 由来エクソソーム

な遠心(They et al, *Curr. Protoc. Cell. Biol.*, **3**, 1-29, 2006)を用いて調整した。この画分からは、エクソソームマーカー蛋白質(Alix、

Tsg101)、およびガングリオシド GM1 が検出された。また、ショ糖密度勾配遠心を用いてこの画分を密度分離したところ、これまで報告されているエクソソームの密度と同等の密度画分からエクソソームマーカー蛋白質(Alix、Tsg101)およびガングリオシド GM1 が回収されることを確認した。さらにこの画分を電子顕微鏡観察したところ、直径 30~100nm の顆粒であった(図 1)。これはこれまで報告されているエクソソームのサイズと一致する。Neuro2a 細胞と初代培養神経細胞由来エクソソームのサイズおよび形態はほぼ同じであった。これらの結果から、神経細胞からは構成的にエクソソームが分泌されており、ガングリオシド GM1 は、エクソソームに結合したかたちで細胞外に放出されていることがわかった。

エクソソーム放出において細胞内 Ca²⁺流入が引き金となる報告がある。本研究では神経細胞からのエクソソーム放出に Ca²⁺依存性がみられるか検討した。Ca²⁺ ionophore 刺激後に放出されるエクソソーム量を調べたが、変化は見られなかった。Neuro2a 細胞と初代培養神経細胞からのエクソソーム放出に関しては Ca²⁺非依存性である可能性が考えられる。また、エンドサイトーシス輸送障害を誘導する刺激であるクロロキンおよび NH₄Cl 処理では、エクソソーム産生量は顕著に増加した。

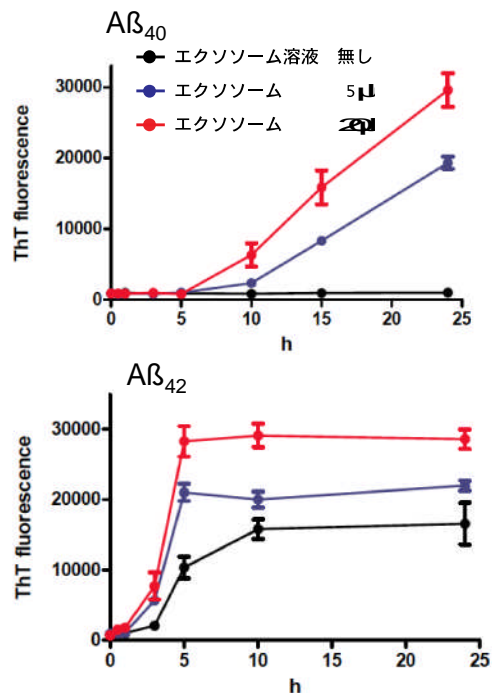


図 1. 初代培養神経細胞由来エクソソームの Aβ 繊維形成に対する効果

また、初代培養神経細胞の培養日数におけるエクソソーム放出量の変動を調べたところ(DIV3~28)、有意な変化は観察されなかった。

②神経細胞由来エクソソームによる AB 重合の促進

Neuro2a 細胞および初代培養神経細胞由来エクソソームが AB 重合促進能を有するか、合成 AB を用いて検討した。培養液中から採取したエクソソーム画分を、合成 AB40 および AB42(脳内で発現が見られる主要な AB isoform)と混合し一定時間インキュベートした後、溶液中のアミロイド繊維量をチオフラビン色素を用いて検出した。その結果、Neuro2a 細胞および初代培養細胞由来エクソソーム共に重合促進効果を示した(図 2)。また、この効果は AB40、AB42 両分子に対して見られた。

③エクソソーム依存性 AB 重合促進におけるガングリオシドの関与

神経細胞由来エクソソームによる AB 重合促進効果にガングリオシド GM1 が関与しているか検討した。エクソソーム画分と AB を混合する際にガングリオシド GM1 結合毒素であるコレラ毒素を添加し、形成されるアミロイド繊維量に変化があるか調べた。その結果、AB40 および AB42 量分子に対する重合促進効果に対して、部分的ではあるが有意な阻害効果が認められた。また、エクソソームの表面に、リン脂質の一種であるフォスファチジルセリン(PS)が露出していることがわかった。PS 結合蛋白質 annexin V には、コレラ毒素のような AB 重合促進を抑制するような効果は認められなかった。

(2)今後の展望

本研究課題で扱った神経変性疾患であるアルツハイマー病の日本における患者数は、100 万人規模で存在し、加齢性疾患という性質上、高齢化社会の発展に伴い患者数はさらに増加すると推定されている。さらに、これらの疾患は認知症が付随することから社会への負担も大変大きく、高齢化社会のピークを迎える 2050 年前後に確実な社会実装効果をもたらすために、診断・治療法開発のための早急な研究が必要である。本研究では、アルツハイマー病の発症メカニズムの中核である AB 重合体形成に影響を与える可能性のある因子として、細胞外エクソソームを見出した。今回得られた知見を応用すると、新たなメカニズムに基づく(例えば、エクソソームの産生量調節)治療法、創薬の開発につながる事が期待できる。

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 4 件)

1. Yuyama K., Sekino-Suzuki N, Yamamoto N, & Kasahara K. (2011) Ganglioside GD3 monoclonal antibody-induced paxillin tyrosine phosphorylation and filamentous actin assembly in cerebellar growth cones. *J. Neurochem.*, **116**, 845-50. 査読有り

2. Yuyama K., & Yanagisawa K. (2010) Sphingomyelin accumulation provides a favorable milieu for GM1 ganglioside-induced assembly of amyloid β -protein. *Neurosci. Lett.*, **481**, 168-172. 査読有り

3. 湯山耕平, 柳澤勝彦 (2009) アルツハイマー病におけるエンドサイトーシス障害. *Dementia Japan*, **23**, 47-54. 査読無し

[学会発表] (計 7 件)

1. 湯山耕平 (2010.11.5-7) 神経細胞 endocytosis 障害による GM1 ガングリオシド誘導性アミロイド β 蛋白質重合の促進 第 29 回日本認知症学会 (愛知県名古屋、ウイנק愛知)

2. Kohei Yuyama (2010.9.2-9.4) Involvement of sphingomyelin in the generation of an endogenous seed for Alzheimer amyloid, GAB 第 53 回日本神経化学会 (兵庫県神戸、神戸コンベンションセンター)

3. Kohei Yuyama (2010.6.29-7.2) Endocytic pathway perturbation as a putative cause of GM1-ganglioside-induced amyloid fibril formation in Alzheimer's disease. The 27th Naito Conference on Membrane Dynamics and Lipid Biology [I] (Sapporo, Hokkaido, Japan)

4. 湯山耕平 (2010. 7. 16-17) エンドサイトーシス障害による GM1 ガングリオシド蓄積とアミロイド β 蛋白質の重合促進 第 5 回スフィンゴセラピー研究会 (鳥取県米子、米子市観光センター)

5. 湯山耕平 (2009. 9. 9-11) エンドサイトーシス障害における GM1 ガングリオシド依存性アミロイド β 蛋白質重合 第 29 回日本糖質学会年会 (岐阜県高山市、飛騨・世界生活文化センター)

6. 湯山耕平 (2009. 6. 22) アルツハイマー病における GM1 ガングリオシド誘導アミロイド β 蛋白質重合に関与する後期エンドサイトーシス障害 第 52 回日本神経化学会 (群馬県渋川市、ホテル天坊)

[その他]
ホームページ等
<http://biomem.pharm.hokudai.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

湯山 耕平 (YUYAMA KOHEI)
北海道大学・大学院先端生命科学研究院・
特任助教
研究者番号：80415546

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし