

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02815

研究課題名（和文）in vitro変性神経突起モデルを用いたアルツハイマー病病態進展機序の解明

研究課題名（英文）Elucidating the Mechanisms of Alzheimer's Disease Pathogenesis Using an In Vitro Dystrophic Neurite Model

研究代表者

櫻井 隆（Sakurai, Takashi）

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：70225845

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：アルツハイマー病の主要病理の1つである老人斑の近傍では、神経突起中に輸送障害小胞やオルガネラが蓄積し膨化した変性神経突起が生じる。近年、変性神経突起は、神経回路に沿って広がり神経細胞死を引き起こすタウ凝集体の形成と細胞間伝播を促進する場として注目されているが、その発生機序や病態への関与は明らかでない。そのため、本研究では培養海馬スライスを用いて老人斑様凝集体を再現し神経突起変性の過程を経時的に観察可能なモデルを確立することを目指した。今後、このモデルを用いて変性神経突起発生機序とタウ病態との関連を解析する予定である。

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細胞外のアミロイド（A β ）凝集体が引き金となりタウの細胞内凝集体からなる神経原線維変化を生じ神経細胞死に至るとするアミロイド仮説が有力である。神経細胞死の拡大は神経回路に沿って起こることからタウ凝集体の細胞間伝播が重要とされている。A β を主要構成成分とする老人斑の周囲に生じる変性神経突起は、A β とタウの接点としてタウ凝集体の形成と伝播促進の場となる可能性が示されている。in vitroモデルを用いて、変性神経突起発生機序とタウ病理との関連を解析することは、今後の治療戦略開発のために重要な知見となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Alzheimer's disease is characterized by the presence of dystrophic and swollen neurites, which contain various vesicles and organelles, in the vicinity of senile plaques. Research suggests that dystrophic neurites contribute to tau aggregation and propagation within the neuronal network, potentially leading to neuronal cell death. However, the mechanisms underlying their formation and role in Alzheimer's disease pathophysiology remain unclear. This study aims to address this gap by establishing an in vitro model using cultured hippocampal slices that reproduces plaque-like beta-amyloid aggregates, enabling time-lapse analysis of dystrophic neurites. We plan to use this model to elucidate the mechanisms of these neurites and their relationship with tau pathology in Alzheimer's disease.

研究分野：神経薬理学

キーワード：アルツハイマー病 アミロイド 小胞輸送障害 オートファジー

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

厚生労働省研究班の推計では、65 歳以上の認知症は 2040 年には 584.2 万人に増加し、65 歳以上の 6.7 人に 1 人が認知症を発症するとされている。介護者の精神的・肉体的負担だけでなく認知症の医療・介護にかかわる社会的コストが大きく増加すると予想される。中でもアルツハイマー病は、認知症の原因の 50% 以上を占めており、その治療法の開発は社会的急務となっている。

アルツハイマー病において、老人斑と呼ばれる細胞外沈着の主要構成成分であるアミロイド β ($A\beta$) が、アルツハイマー病の病理に中心的な役割を果たすと考えられている。 $A\beta$ は、1 回膜貫通タンパク質であるアミロイド前駆体タンパク質 (amyloid precursor protein, APP) が膜結合型プロテアーゼである BACE1、セクレターゼにより 2 段階の切断を受けることにより産生され細胞外に放出される。 $A\beta$ は第 2 段目の γ 切断部位の違いにより 38-43 程度のアミノ酸からなるペプチドであるが、比較的産生量が多いものの中では 42 アミノ酸からなる $A\beta$ 1-42 が凝集しやすい性質を持つ。若年発症の家族性アルツハイマー病では、APP または γ セクレターゼの活性中心を形成するプレセニリンに変異が見られるが、その多くは主要な産物である $A\beta$ 1-40 に対する $A\beta$ 1-42 の産生比率を増加させる変異であることが知られており、 $A\beta$ 凝集体形成が病態発現に重要と考えられる。アルツハイマー病は $A\beta$ 凝集体が引き金となり、高度リン酸化タウの細胞内凝集体からなる神経原線維変化を生じ神経細胞死に至るとするアミロイド仮説が有力である。神経細胞死の拡大は神経回路に沿って起こることから、タウ凝集体の細胞間伝播が重要とされている。

$A\beta$ の沈着はアルツハイマー病発症の 20 年ほど前から始まっており、その局在や沈着量と症状は必ずしも対応していない。一方、タウ凝集体には神経回路に沿った広がりが見られ、その局在や沈着量と神経細胞死や症状が関連していることが知られている。その過程では、タウ凝集体形成の核となるシード(種)と呼ばれる異常構造をもつ小さな凝集体がシナプスを介して次の神経細胞に移行し、新たな細胞内で正常構造をもつタウタンパク質の構造変換・凝集を誘導し、そこを起点として凝集シードが神経回路に沿って次々と広がっていくというプリオン様伝播仮説が広く受け入れられている。アルツハイマー病ではタウには疾患の原因となる変異は見出されておらず $A\beta$ 凝集体によりタウ病理が引き起こされると考えられているが、 $A\beta$ とタウの接点となる部位や $A\beta$ がタウ凝集体の形成・細胞間伝播を促進する機序は病態進展の上での謎となっている。 $A\beta$ 病理への介入は発症前早期に行うことが重要と考えられ、現在バイオマーカーの探索・検討が進められているが、 $A\beta$ によるタウ病理トリガメカニズムの解明は、発症初期にも適用可能な新たな治療戦略開発につながる重要な知見をもたらすと期待される。しかしながら、 $A\beta$ とタウの接点となる現象は脳内のどこでの時期に起こるか不明確であり、タウ病理も長期間かけて神経回路に沿って拡大するため、その詳細は解析されていなかった。

2. 研究の目的

老人斑の周囲の神経突起には、輸送障害小胞や各種のオルガネラが蓄積し膨化した変性神経突起と呼ばれる構造が観察される。この現象は、家族性アルツハイマー病の変異をもつ APP を高発現するモデルマウス (APP-Tg マウス) の脳内でも起こり、変性神経突起形成初期に蓄積する「マーカータンパク質」が報告されている。変性神経突起は小胞によるシナプスタンパク質や脂質のシナプス終末への輸送障害、オートファジーにより分解されるシナプス由来基質の蓄積等を介して神経機能異常を引き起こすとともに、シードによるタウ凝集体形成やその細胞間伝播を促進する場となる可能性が示されている。アルツハイマー病由来タウ凝集シードを APP-Tg マウス脳内にインジェクションした実験において、変性神経突起形成以前の時期ではタウ凝集体は形成されるものの細胞間の伝播は限られているが、変性神経突起形成期では、まず変性神経突起内にシードによるタウ凝集体の蓄積が起こり、細胞間の伝播も促進されるという結果に基づいたものである。このように変性神経突起は、細胞外の $A\beta$ 凝集体からなる老人斑と神経細胞内で引き起こされるタウ病理の接点であり、遺伝的リスクファクターとなる分子群を発現するミクログリアが集積する場でもあることから、 $A\beta$ によるタウ病理のトリガーとなる現象が変性神経突起を場として起こる可能性が高いと考えられている。

本研究の目的は、培養海馬スライスを用いて、*in vitro* で老人斑と変性神経突起を再現するモデルを構築し、そのモデルを用いて神経突起変性の機序とタウ病理・病態進展との関連を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 海馬スライスの培養

生後 6 日齢のラットを安楽死させ、全脳を摘出した。酸素化し氷冷した生理的塩溶液中で海馬を単離し、ティッシュチョッパーを用いて海馬の長軸に対して垂直に 400 μ m の厚さで薄切した。ポリテトラフルオロエチレン多孔膜を底面としたフィルターカップ (Millicell CM, Millipore) に海馬スライスを置き、培地 (50% 最小必須培地 (MEM), 25% ハンクス液、25% ウマ血清) と

空気の界面で培養した。培地の交換は、一週間に2回行った。

(2) 培養海馬スライスにおける老人斑様凝集体と変性神経突起の再現

凍結保存した12~21ヶ月齢のAPP-Tgマウス脳をPBS中で破砕し、低速遠心後の上清をA β 凝集シードとして用いた。さらに超音波、界面活性剤、プロテアーゼ等で処理し、より精製度の高いA β 凝集シードも調製した。その一部はアミノ基反応性のビオチン標識試薬で処理を行った。培養海馬スライスにA β 凝集シードを添加するか任意の部位にインジェクションし、化学合成ヒトA β 1-40とヒトA β 1-42の混合物またはヒトA β 1-42またはヒトA β 1-40のみを培地中に加えて1~8週間培養した。

(3) 培養海馬スライスの蛍光抗体法による染色

培養海馬スライスは4%パラホルムアルデヒドにて固定し、PBSで洗浄後、Triton X-100を含むPBSで透過処理を行った。ブロッキング後に変性神経突起マーカータンパク質に対する一次抗体と4°C暗所で一晚、蛍光標識された二次抗体と室温暗所で3時間反応させた。必要に応じて1-fluoro-2, 5-bis(3-carboxy-4-hydroxystyryl) benzene (FSB) 溶液を用いてアミロイドの蛍光染色を行った。その後、封入剤を用いてスライドガラスにマウントし蛍光顕微鏡にて観察した。

(4) 光-電子相関顕微鏡法 (CLEM)

ビオチン標識したAPP-Tgマウス脳由来A β 凝集シードを添加し、化学合成ヒトA β 存在下、非存在下で培養した。グルタルアルデヒドを加えたパラホルムアルデヒド溶液で固定後、蛍光標識ストレプトアビジンによる染色、後固定、包埋、薄切を行い、ビオチン標識A β 凝集シードと関連づけて周囲の神経軸索の微細構造を観察した (In-resin CLEM法)。

(5) 培養海馬スライスにおけるライブイメージング解析の検討

培養海馬スライス中の神経細胞への遺伝子導入には神経細胞特異的なプロモータであるシナプシンプロモータによりEGFPを発現するアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを用いた。必要に応じて培養海馬スライスの特定の領域にガラス針で微量注入した。APP-Tgマウス脳由来A β 凝集シードおよび化学合成ヒトA β 存在下で一定期間培養後、アミロイド結合性蛍光色素 methoxy-X04を培地に添加して老人斑様凝集体をライブ染色し、EGFPを発現している神経細胞の投射先の軸索形態変化を凝集体の周囲で観察した。その後スライスを固定して変性神経突起マーカータンパク質を蛍光免疫染色し観察した。

4. 研究成果

(1) 培養海馬スライスにおける老人斑様凝集体の再現

海馬スライスにAPP-Tgマウス脳由来A β 凝集シードを添加し、化学合成ヒトA β の存在下および非存在下で培養した後、固定してFSBで染色を行ったところ、A β 非存在下ではA β 凝集シードの縮小が見られた。一方A β 存在下で培養した場合はFSBで染色されるA β 凝集体のサイズが増大したことから、添加したシードを核として化学合成ヒトA β が凝集し、凝集体が成長したものと考えられた。

(2) 培養海馬スライスにおける変性神経突起の再現

APP-Tgマウス脳由来A β 凝集シードおよび化学合成ヒトA β で1~8週間程度処理した培養海馬スライスを固定し、変性神経突起のマーカーとして用いられているAPP、ATG9A、ニューロフィラメント等の免疫染色を行った。A β 凝集シード添加のみの場合には、残存しているシードの周囲に変性神経突起のマーカーの蛍光シグナルは確認されなかった。A β 凝集シードおよび化学合成ヒトA β で処理した場合には、FSB陽性老人斑様凝集体の周囲の膨化した神経突起に対応してAPP、ATG9Aの強いシグナルが観察された。その一部はニューロフィラメントの蓄積・膨化部位と共同在していた。リン酸化タウ抗体としてAT8を用いて染色したところ、リン酸化タウが老人斑様凝集体周囲の変性神経突起の一部に蓄積していることが明らかになった。光-電子相関顕微鏡法により老人斑様凝集体周囲の変性神経突起の微細構造を確認したところ、膨化した軸索内に異常オートファジー小胞や各種オルガネラが蓄積し、変性神経突起に類似した構造を持つことが明らかになった。

(3) 培養海馬スライスにおけるライブイメージング解析の検討

経時的な観察を容易にするため、短期間に老人斑様凝集体周囲に変性神経突起を誘導することを目的として凝集シードの処理や培地に添加するA β の組成等の条件を変えて至適化を試みたところ、1週間程度での誘導が可能となった。培養海馬スライスに維持されている特定の回路に変性神経突起を誘導しその形態変化をライブ観察するため、AAVを注入し軸索をEGFPにて可視化したところ、methoxy-X04にて標識された凝集体周囲に軸索の膨化が誘導された。

(4) まとめ

ATG9A、APP、ニューロフィラメントは神経突起変性の初期に蓄積することが示されていることから、培養海馬スライス上に老人斑様凝集体を形成・成長させ、その近傍に神経突起変性の初

期段階を再現することができたと考えられる。また、組換え AAV による蛍光タンパク質発現および methoxy-X04 による凝集体のライブ染色により神経突起形成の初期過程を経時的に観察する条件が整ったと思われる。今後、本モデルを用いて蓄積タンパク質の輸送解析による神経突起変性過程の詳細な観察、阻害薬や遺伝子発現操作による変性メカニズムの解析を行うとともに、タウリン酸化および凝集体形成促進についても検討を進める予定である。本モデルを用いて解析を行うことで、新たな治療戦略につながる知見がもたらされると期待される。

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 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Okamoto Kazuki, Kamikubo Yuji, Yamauchi Kenta, Okamoto Shinichiro, Takahashi Megumu, Ishida Yoko, Koike Masato, Ikegaya Yuji, Sakurai Takashi, Hioki Hiroyuki	4. 巻 13
2. 論文標題 Specific AAV2/PHP.eB-mediated gene transduction of CA2 pyramidal cells via injection into the lateral ventricle	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 323
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-27372-8	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 -
1. 著者名 Kamikubo Yuji, Jin Hao, Zhou Yiyao, Niisato Kazue, Hashimoto Yoshie, Takasugi Nobumasa, Sakurai Takashi	4. 巻 15
2. 論文標題 Ex vivo analysis platforms for monitoring amyloid precursor protein cleavage	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1068990
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnmol.2022.1068990	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 -
1. 著者名 Kaneshiro N, Komai M, Imaoka R, Ikeda A, Kamikubo Y, Saito T, Saido TC, Tomita T, Hashimoto T, Iwatsubo T, Sakurai T, Uehara T, Takasugi N.	4. 巻 25
2. 論文標題 Lipid flippase dysfunction as a therapeutic target for endosomal anomalies in Alzheimer's disease.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 103869
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2022.103869	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 -
1. 著者名 Komai Masato, Noda Yuka, Ikeda Atsuya, Kaneshiro Nanaka, Kamikubo Yuji, Sakurai Takashi, Uehara Takashi, Takasugi Nobumasa	4. 巻 65
2. 論文標題 Nuclear SphK2/S1P signaling is a key regulator of ApoE production and A uptake in astrocytes	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Lipid Research	6. 最初と最後の頁 100510
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jlir.2024.100510	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 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 大久保洋平, 並木繁行, 浅沼大祐, 櫻井隆, 廣瀬謙造
2. 発表標題 脳組織内部におけるシナプス分子動態の1分子イメージング
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 古川涼音, 小林瑞季, 林克儀, 中村史雄, 櫻井隆, 五嶋良郎, 山下直也
2. 発表標題 成体脳におけるセマフォリン3A発現を定量するELISAシステムの確立
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 関口拓己, 櫻井隆, 山下直也
2. 発表標題 Semaphorin3A-PlexinAシグナルがアミロイド 前駆タンパク質の機能や代謝に与える影響
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 周 藝瑤, 上窪 裕二, 石田 葉子, 日置 寛之, 櫻井 隆
2. 発表標題 脳スライス培養を用いたアミロイドプラーク形成と神経突起変性の解析
3. 学会等名 第147回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 坂入 伯駿、上窪 裕二、櫻井 隆
2. 発表標題 代謝型グルタミン酸受容体とGABAB受容体における異種GPCR間相互作用
3. 学会等名 第147回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yamashita N, Sakurai T
2. 発表標題 Axonal targeting of TrkA-APP complex via transcytosis
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会 / CJK第1回国際会議 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Okamoto K, Kamikubo Y, Yamauchi K, Okamoto S, Takahashi M, Ishida Y, Sakurai T, Koike M, Ikegaya Y, Hioki H
2. 発表標題 Hippocampal CA2 labeling with an AAV2/PHP.eB vector
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会 / CJK第1回国際会議 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 関口 拓己、櫻井 隆、山下 直也
2. 発表標題 Semaphorin3A-PlaxinA シグナルによるアミロイド 前駆タンパク質の機能及び代謝制御
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂入 伯駿、上窪 裕二、田端 俊英、櫻井 隆
2. 発表標題 1型代謝型グルタミン酸受容体とGABAB受容体における異種GPCR間複合体形成と双方向シグナル調節
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山下 直也、水谷 由衣、實木-高橋 葵、林 克儀、中村 史雄、櫻井 隆、五嶋 良郎
2. 発表標題 成体脳におけるセマフォリン3A発現を定量するELISAシステムの確立
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 周藝瑤, 上窪裕二, 石田葉子, 日置寛之, 櫻井隆
2. 発表標題 海馬スライス培養を用いたアミロイドプラーク形成と神経突起変性の経時的解析
3. 学会等名 第46回日本神経科学大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 上窪裕二, 周藝瑤, 櫻井隆
2. 発表標題 脳器官培養法を用いたアミロイド 分泌とアミロイド斑形成の経時的解析
3. 学会等名 第53回日本神経精神薬理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大久保洋平, 並木繁行, 浅沼大祐, 櫻井隆, 廣瀬謙造
2. 発表標題 脳組織内部における1分子イメージング
3. 学会等名 第97回日本薬理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 杉山黎, 林克儀, 中村史雄, 櫻井隆, 五嶋良郎, 山下直也
2. 発表標題 成体脳におけるセマフォリン3A発現を定量するELISAシステムの確立
3. 学会等名 第97回日本薬理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kawase M, Matsuda T, Umemura Y, Oishi H, Sakurai T, Hattori M
2. 発表標題 Phospholipid flippases ATP8A1 and ATP8A2 regulate the functional expression of synaptic proteins in hippocampal neurons
3. 学会等名 Neuroscience 2023, Washington DC, USA (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Kamikubo Y, Wakisaka K, Imai Y, Sakurai T	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Humana, New York, NY.	5. 総ページ数 7
3. 書名 Experimental Models of Parkinson's Disease. Methods in Molecular Biology, vol 2322	

〔産業財産権〕

〔その他〕

脳組織培養法を用いた神経機能の長期連続的な解析と病態再現モデルの構築
http://pharmacology.sakura.ne.jp/jp/research/HC_slice_res/HC_slice_res.html

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	内山 安男 (Uchiyama Yasuo) (10049091)	順天堂大学・医学部・特任教授 (32620)	
研究分担者	岩田 淳 (Iwata Atsushi) (40401038)	地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員 (82674)	

	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
研究協力者	日置 寛之 (Hioki Hiroyuki) (00402850)	順天堂大学・医学部・教授 (32620)	
研究協力者	本井 ゆみ子 (Motoi Yumiko) (60338407)	順天堂大学・大学院医学研究科・特任教授 (32620)	
研究協力者	上窪 裕二 (Kamikubo Yuuji) (80509670)	順天堂大学・医学部・准教授 (32620)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	大久保 洋平 (Okubo Yohei) (40422282)	順天堂大学・医学部・准教授 (32620)	
研究協力者	山下 直也 (Yamashita Naoya) (40508793)	神奈川工科大学・工学部・准教授 (32714)	

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