

α -synuclein 伝播仮説における神経細胞及び
オリゴデンドロサイト変性の機序に関する研究 (29-38)

主任研究者 佐々木 飛翔 国立長寿医療研究センター 流動研究員

研究要旨

レビー小体型認知症 (DLB) やパーキンソン病 (PD)、多系統萎縮症 (MSA) は認知症を伴う神経変性疾患であり、原因分子である α -synuclein (α -syn) は異常に重合・凝集・蓄積し、神経細胞の変性・脱落を起こす。しかし、その蓄積は DLB・PD においては神経細胞に、MSA においてはオリゴデンドロサイトに優位に局在しており、病理学的に異なる病態の進行が観察される。近年、細胞内・細胞外における α -syn の分泌、取り込みに焦点を当て、 α -syn がプリオン様に病態を広げる役割を担っているという伝播仮説について盛んに研究が行われている。しかし、オリゴデンドロサイトにおける研究はされていない。これまではオリゴデンドロサイトに α -syn を強制発現させた MSA モデル Tg マウスの解析を行うことにより MSA における神経細胞の変性を阻止する研究を行ってきた。しかし本研究ではこれらの研究の知見をヒントに、過剰発現系ではなく組換え α -syn を用いて伝播仮説をマウス脳初代培養細胞で検証することにより、これまで不明であった DLB、PD 及び MSA という異なる α -syn の蓄積が引き起こされる機序について明らかにする。この実験により、神経細胞及びオリゴデンドロサイトにおける α -syn の役割の違いを観察することで、それぞれの治療方針へと発展させることが期待される。本研究は動物実験および組換え DNA に関する実験を行うにあたり、各々のガイドラインを遵守して行う。また、本研究は2年間で行い、平成30年度には精製した組換え α -syn の単量体およびプロトフィブリルをマウス脳初代培養細胞への導入を行い、神経細胞とオリゴデンドロサイトに分けて評価を行う。

A. 研究目的

α -syn は DLB や PD、MSA において観察される異常凝集体の主要構成成分である。正常では神経細胞に分布する可溶性タンパク質である α -syn が異常に重合・凝集し、可溶性多量体またはプロトフィブリルと呼ばれる分子種となり神経毒性を発揮すると考えられている。DLB および PD では神経細胞においてレビー小体と呼ばれる異常細胞質内封入体が観察される。一方、MSA ではオリゴデンドロサイトに glial cytoplasmic inclusion (GCI) の形成と、周辺神経細胞に α -syn の蓄積が認められる。神経細胞での蓄積は主に軸索・シナプスに認められ、細胞体にはレビー小体とは異なる蓄積が観察される。これらの事実から、DLB、PD と MSA

では異なる神経変性の機序により発病することが示唆される。近年、 α -synの伝播仮説について盛んに研究が行われている。伝播仮説とは細胞内・外における α -synの分泌、取り込みに焦点を当て、 α -synがプリオン様に病態を広げる役割を担っているという考えである（参考文献1）。この際、 α -synの重合・凝集による構造や分子サイズの変化による不溶化促進への効果は異なることが報告されているが、 α -synの伝播における神経細胞とオリゴデンドロサイトでの違いは明らかではない。

そこで、本研究ではマウス脳初代培養細胞を用いて α -synの伝播過程における神経細胞及びオリゴデンドロサイトの異なる変性機序を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

組換え α -synの精製及びプロトフィブリルの作製

ヒト由来 α -synの大腸菌発現用ベクターへのサブクローニングを行った。大腸菌発現用ベクターにはGST融合タンパク質発現用ベクターであるpGEXベクター（GEヘルスケア）を用いた。作製したコンストラクトを用いて大腸菌にて融合タンパク質を発現させ、GSTタグを用いてアフィニティークロマトグラフィーにより精製を行った。精製した α -synは37度で浸透させながらインキュベートすることでプロトフィブリルを作製した。

神経細胞優位培養および未成熟オリゴデンドロサイトの単離培養、オリゴデンドロサイト優位培養の確立

マウス脳初代培養細胞にグリア細胞の増殖を抑制するDNA合成阻害剤AraCを添加し、神経細胞優位培養を確立した。未成熟オリゴデンドロサイトはマウス脳初代培養細胞の10日目に37度で160rpmで1時間振盪を行うことにより神経細胞およびマイクログリアの除去を行い、さらに220rpmで16時間の振盪を行うことによりアストロサイトから単離した。単離した未成熟オリゴデンドロサイトは成熟因子を添加した培地でさらに7日間培養することによりオリゴデンドロサイト優位培養を確立した。

（倫理面への配慮）

本研究では動物実験と組換えDNAに関する実験を行った。

動物実験に関する研究は日本学術会議「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」を遵守して行った。本研究が実施する動物実験に関する研究は国立長寿医療研究センター実験動物倫理委員会の承認を得た。（29年度承認番号動 29-31）

組換えDNAに関する研究は「遺伝子組み換え生物等の使用等の規則による生物の多様性の確保に関する法律（カルタヘナ法）」を遵守し、国立長寿医療研究センター遺伝子組み換え実験安全委員会の承認を得た。（29年度承認番号遺 29-20）

C. 研究結果

平成 29 年度前半にかけて精製 α -syn の作製を計画した。そのうえで、現時点で、精製 α -syn の作製は完了し、マウス脳初代培養細胞においても、オリゴデンドロサイトの単離培養について進めている。

α -syn タンパク質を発現させるための cDNA 領域(*Snca*)は C57BL/6J Jms Slc マウスの脳から得た total RNA を逆転写し、pT7Blue ベクターにサブクローニングした。*Snca* pT7Blue から *Snca* 配列を制限酵素処理により pGEX-6P-1 ベクターにサブクローニングした。得られた *Snca* pGEX-6P-1 はシーケンサーにより配列を確認した。pGEX-6P-1 ベクターは大腸菌内で Glutathione S-transferase (GST) と目的遺伝子の融合タンパク質として発現させるためのシステムとして用いた。*Snca* pGEX-6P-1 を大腸菌株 BL21 に形質転換し、Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) により GST 融合 α -syn タンパク質を発現させた。GST 融合 α -syn タンパク質は大腸菌のタンパク質抽出液から GST タグを利用したアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。精製した GST 融合 α -syn タンパク質はプロテアーゼ処理により GST 部位と α -syn 部位の間で切断し、再度 GST タグを利用したアフィニティークロマトグラフィーにより α -syn タンパク質のみを単離精製した。得られた α -syn タンパク質は SDS-PAGE 及びウエスタンブロットにより確認を行った。

マウス脳初代培養細胞においては既に確立してある神経細胞及びグリア細胞混合培養において手技的なロスを減らし、実験回数の最大化を行った。また、混合培養からのオリゴデンドロサイト前駆細胞の単離条件について検討した。その結果、神経細胞、マイクログリア、アストロサイトの除去を確認し、オリゴデンドロサイト前駆細胞が 95% を超える単離条件について確立した。更に、培養液に各種成長因子や甲状腺ホルモン等の添加をすることにより、数日間の培養と成熟オリゴデンドロサイトへの成長誘導を行った。

D. 考察と結論

α -syn タンパク質を得るための精製系を確立したが、プロトフィブリル作製には多量の α -syn タンパク質が高濃度が必要である。そのため、GST 融合 α -syn タンパク質を大腸菌株 BL21 において最大限の発現を行わせるために IPTG 濃度及び発現誘導時間を検討した。しかし、タンパク質発現量の大幅な向上は得られなかった。次に GST タグによるアフィニティークロマトグラフィーによる精製を吸着効率の高い GSTrap HP を用いてカラム法にて行ったが、サンプルのロードに大きく時間を取られ、かつ一度に得られる精製産物は多くなかった。そのため吸着させるための担体を glutathione sepharose 4B へと変更し、一度に多量のサンプルの処理を行えるバッチ法へと変更した。

マウス脳初代培養細胞においてはこれまで 6well plate にカバーガラスを入れて細胞の播種を行っていたが、24well plate にカバーガラスを入れて行うように変更した。この結果、一度の細胞の播種により行える実験回数を増加させた。ラット脳初代培養と比べ、マウス

脳初代培養細胞からのオリゴデンドロサイト培養は技術的に困難とされていたが、振盪方法の検討やその後の培地成分の検討を行うことによりこれまでほとんど培養が続かなかったのに比べ、生細胞の単離が格段に上昇した。

今後は得られたマウス脳由来の初代培養細胞への精製 α -syn の単量体およびプロトフィブリルの導入を行い、神経細胞およびオリゴデンドロサイトの α -syn に対する変性機序の違いを明らかにし DLB や PD と MSA の発症機序がどのように異なるかを明らかとする。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Arawaka S, Sato H, Sasaki A, Koyama S, and Kato T. Mechanisms underlying extensive Ser129-phosphorylation in α -synuclein aggregates. *Acta Neuropathologica Communications*. 5(1), 48. (2017)査読有

2. 学会発表

- 1) 佐々木飛翔 (ポスター)、金成花、矢澤生. 多系統萎縮症モデルマウスにおけるオリゴデンドロサイトの α -synuclein 蓄積のメカニズム. 2017年度生命科学系学会合同年次大会、神戸ポートアイランド、2017年12月7日

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし