

## 長寿医療研究開発費 2019年度 総括研究報告

### Rab11 陽性小胞に着目した軸索変性メカニズムの解明 (19-47)

主任研究者 鯉沼 真吾 国立長寿医療研究センター アルツハイマー病研究部  
病因遺伝子研究室 (流動研究員)

#### 研究要旨

アルツハイマー病 (AD) に代表される認知症患者の脳内では、神経細胞の脱落に先行して軸索変性が生じることが知られているが、詳細なメカニズムは未だ不明である。近年、軸索変性時には軸索再生時と同じシグナル伝達系が関与していることを示唆する報告がなされ、神経軸索の変性と再生におけるメカニズム上の共通性が注目を集めている。

RabファミリーGタンパク質に属するRab11は、小胞輸送を介して軸索再生の促進に働く因子であり、Rab11陽性小胞が軸索内に存在するか否かが軸索再生の可否に重要であることが報告されている。一方、申請者の所属研究室はこれまでの研究成果により、脳内では老化に伴い逆行性軸索輸送モータータンパク質ダイニンの機能が低下することを明らかにしている。ダイニンは逆行性輸送を介して軸索からRab11陽性小胞の流入を抑制する働きがあることから、ダイニンの機能低下はRab11の局在に影響を与えると考えられる。これらのことから、老化に伴うダイニンの機能低下はRab11陽性小胞の軸索内流入を引き起こし、その結果として不必要な軸索再生シグナルが軸索内で発生することで軸索変性を引き起こす原因となるのではないかという仮説を考案した。

そこで本研究は、Rab11の局在変化とそれに伴うシグナル伝達系の変化に着目し、老化に伴う軸索変性メカニズムの解明に向けた研究を行った。その結果、Rab11リサイクリング小胞は老化に伴い軸索内に流入すること、さらにこのRab11陽性小胞の異所局在は老化に伴うダイニンの機能低下により引き起こされることがわかった。また、軸索基始部が持つ軸索への小胞の選択機構においてダイニンが主要な役割を担っていることが示唆された。

主任研究者

鯉沼 真吾 国立長寿医療研究センター アルツハイマー病研究部  
病因遺伝子研究室（流動研究員）

#### A. 研究目的

アルツハイマー病（AD）に代表される認知症患者の脳内では、神経細胞の脱落に先行して軸索変性が生じることが知られているが、詳細なメカニズムは未だ不明である。軸索変性は認知機能低下の直接的原因となりうることから、軸索変性の分子メカニズムを解明することができれば、病態進行に伴う神経細胞死を抑制して認知症の発症や進行を阻止するという新しい治療および介入戦略の発展につながる可能性が期待できる。近年、軸索変性時には軸索再生時と同じシグナル伝達系が関与していることを示唆する報告がなされており、神経軸索の変性と再生におけるメカニズム上の共通性が注目を集めている。

RabファミリーGタンパク質に属するRab11は、小胞輸送を介して軸索再生の促進に働く因子であり、Rab11陽性小胞が軸索内に存在するか否かが軸索再生の可否に重要であることが報告されている。一方、申請者の所属研究室ではこれまでの研究成果により、脳内では老化に伴い逆行性軸索輸送モータータンパク質ダイニンの機能が低下することを明らかにしている。ダイニンは逆行性輸送を介して軸索からRab11陽性小胞の流入を抑制する働きがあることから、ダイニンの機能低下はRab11の局在に影響を与えると考えられる。これらのことから、老化に伴うダイニンの機能低下はRab11陽性小胞の軸索内流入を引き起こし、その結果として不必要な軸索再生シグナルが軸索内で発生し、軸索変性を引き起こす原因となるのではないかという仮説を考案した。

そこで本研究は、Rab11の局在変化とそれに伴うシグナル伝達系の変化に着目し、老化に伴う軸索変性メカニズムの解明に向けた研究を行った。

#### B. 研究方法

Rab11陽性小胞の局在が老化に伴い変化するか否かをカニクイザル脳組織やラット初代培養神経細胞を用いて検討を行った。若齢サル（4歳）と老齢サル（36歳）の脳組織を用いて免疫組織化学的解析と生化学的解析を行った。また、培養21日目の十分に成熟したラット初代培養神経細胞にダイニンのATPaseの特異的阻害剤であるciliobrevin D（CbD）を50 $\mu$ Mの濃度で3日間添加して、ダイニンの機能低下がRab11の局在に変化を及ぼすか否かを免疫染色により検証した。

(倫理面への配慮)

実験動物を用いた研究については、「動物の愛護及び管理に関する法律」に基づいた動物福祉規定に則り、実験動物の飼育・安楽殺・実験作業を遂行した。具体的には、動物を飼育する場所・ケージ・管理方法に配慮し、可能な限り動物の使用数減少と被る苦痛の減退に努め、所属機関の動物実験規定を遵守して研究を行った。

### C. 研究結果

まず、若齢および老齢カニクイザルの脳切片を作製し、大脳皮質神経細胞の軸索束である脳梁における Rab11 陽性小胞の数を比較した。若齢のカニクイザルでは軸索マーカーである Neurofilament 陽性の繊維上にほとんど Rab11 陽性小胞が観察されなかった。一方、老齢のカニクイザルの脳梁ではよそう予想通り Rab11 陽性小胞が若齢サルよりも多く存在していた。さらに、組織検索を行った同じ個体から採取した脳より神経終末画分(軸索を含む画分)を調整し、ウェスタンブロット法を用いて Rab11 の蛋白質発現レベルを比較したところ、老化に伴い Rab11 の蛋白質レベルが有意に上昇することを確認した。

次に、この Rab11 陽性小胞の異所局在が老化に伴うダイニンの機能低下によるものであるか否か明らかにするため、培養後 21 日以上を経て成熟したラット初代培養神経細胞にダイニン阻害剤である Ciliobrevin D (CbD)を添加し、軸索内への Rab11 陽性小胞の流入が引き起こされるか否かを検証した。コントロールの細胞では培養後 21 日の時点で軸索内に Rab11 陽性小胞がほとんど見られなかったのに対し、CbD を 3 日間添加した細胞では軸索基始部を越え、軸索の末端に至るまで Rab11 陽性小胞が存在することを明らかにした。

### D. 考察と結論

カニクイザルの脳組織を用いた検索およびラット初代培養細胞を用いた解析により、Rab11 陽性小胞は老化に伴い軸索内に流入すること、さらにこの Rab11 陽性小胞の異所局在は老化に伴うダイニンの機能低下により引き起こされることが示唆された。また、軸索基始部が持つ軸索への小胞の選択機構においてダイニンが主要な役割を担っていることが示唆された。

Rab11 陽性小胞は様々な受容体 (AMPA 受容体や Tfn 受容体など) や接着分子 ( $\beta$ 1-Integlin や N-Cadherin など) を輸送することが知られている。したがって Rab11 小胞の異所局在はこのような受容体や接着因子の局在に変化を与える可能性があり、神経軸索内のシグナル伝達経路や機能に大きな影響を与えられられる。老化に伴う Rab11 陽性小胞の異所局在が、実際に様々なシグナル分子の局在にどのような変化を与えるのか、またその変化によって軸索にどのような影響を与えるのかは今後の重要な課題である。所属研究室のこれまでの研究成果により、小胞の積荷は老化

に伴い変化する可能性が示唆されており、老化に伴う Rab11 の異所局在と併せて解析することで神経細胞の老化を理解するうえで新たな切り口になるのではないかと考えている。

#### E. 健康危険情報

無し

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

無し

##### 2. 学会発表

(1) 木村展之, 鯉沼真吾, 下澤律浩, 保富康弘.

オートファジーの促進はエンドサイトーシス障害を増悪して細胞内 A $\beta$  の蓄積を増加する.

第 38 回日本認知症学会, 2019 年 11 月 7 日, 東京都新宿区

(2) 木村展之, 鯉沼真吾, 下澤律浩, 保富康弘.

エクソソームを介したオートファジーによる細胞内・外 A $\beta$  レベルのコントロール.

第 92 回日本生化学会, 2019 年 9 月 19 日, 神奈川県横浜市

(3) Kimura N, Koinuma S, Shimoszawa N, Yasutomi Y.

Upregulation of autophagy interrupts exosome secretion to augment endocytic disturbance and enhance intracellular accumulation of abeta.

Society for Neuroscience 2019, 2019 年 10 月 20 日, Chicago (US)

(4) Koinuma S, Shimoszawa N, Yasutomi Y, Kimura N. Autophagy Induction

Augments Intracellular Accumulation of A $\beta$  via Reduction in Exosome Secretion. NEURO2019 (第 62 回日本神経化学会、第 42 回日本神経科学会

合同大会), 2019 年 7 月 25~26 日, 新潟県新潟市

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し