

長寿医療研究開発費 平成30年度 総括研究報告（総合報告及び年度報告）

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 特任研究員

研究要旨

2年間全体について

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いて α -synが蓄積する理由については明らかでない。これまでに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。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、 α -synの蓄積の原因がどこにあるのかを確認する。

平成30年度について

平成29年度に作成した組換え α -synの精製方法に従い大量の α -synの精製、およびプロトフィブリルの作成を行った。精製 α -synおよびプロトフィブリルをマウス脳初代神経培養細胞に導入を検討し、比較対象としてオリゴデンドロサイト特異的にヒト α -synを発現させるトランスジェニックマウスを用いて検討した。その結果、 α -synが蓄積したオリゴデンドロサイトからはcystatin Cタンパク質が細胞外に分泌されていることが明らかになった。さらに検討を進めると、神経細胞の細胞外からcystatin Cタンパク質が取り込まれると内因性の α -synの蓄積が誘導されることが明らかになった。これらの事実からオリゴデンドロサイトの α -syn蓄積に起因して神経細胞の α -syn蓄積が誘導され、神経変性が引き起こることが示唆された。

主任研究者

佐々木 飛翔 国立長寿医療研究センター 特任研究員

研究期間 平成29年4月1日～平成31年3月31日

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스에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。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

2年間全体について

本研究は2年間で行い、平成29年度では精製 α -synの作成と神経細胞優位培養、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を行った。平成30年度では実験に使用する α -synのラージスケールでの精製及びプロトフィブリルの作成を行い、また各種マウス脳初代培養細胞への精製 α -syn単量体及びプロトフィブリルの導入を行い、神経細胞及びオリゴデンドロサイトへの導入効率の違いと変性への影響を検討した。さらにcystatin Cタンパク質の神経細胞における α -syn蓄積についてどのような機序で誘導されるのか検討した。

平成30年度について

組換え α -synのラージスケールでの精製及びプロトフィブリルの作成

マウス脳初代培養細胞への導入のため α -synのラージスケールにおける精製及びプロトフィブリルの作成を行った。

Cystatin Cによる神経細胞への α -syn蓄積の検討

Cos-7細胞を用いて組換えcystatin Cタンパク質の精製を行った。得られたcystatin Cタンパク質をマウス神経芽細胞腫由来Neuro2a細胞に添加し、 α -synタンパク質の発現量の変化を観察した。また、cystatin Cを発現するプラスミドをNeuro2a細胞に導入し、 α -synタンパク質の発現量の変化を観察した。

マウス脳初代培養細胞への導入

マウス脳初代培養細胞は神経細胞優位培養、未成熟オリゴデンドロサイト単離培養、オリゴデンドロサイト優位培養、神経細胞及びグリア細胞混合培養に分けて実験を行っている。それぞれのマウス脳初代培養ごとに精製 α -synの単量体及びプロトフィブリルの導入を行っている。 α -synの導入は、培養液への添加、トランスフェクション試薬を用いて行い各種細胞における α -syn取り込みの違いについて検討した。

(倫理面への配慮)

2年間全体について

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、30年度承認番号動 30-36)

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、30年度承認番号遺 30-4)

C. 研究結果

2年間全体について

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生後0-1日齢のTgマウス脳の大脳皮質から初代培養細胞を行った。この際、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、実験回数を2.5倍にすることに成功した。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、培養液にオリゴデンドロサイト前駆細胞の増殖を誘導するPDGF-AAやFGFといった各種成長因子や甲状腺ホルモンT3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。

平成29年度分についてはおよそ予定通りに実験を行うことができた。平成30年度分のマウス脳初代培養細胞への導入については神経細胞優位培養、未成熟オリゴデンドロサイト単離培養、オリゴデンドロサイト優位培養の確立をした。 α -syn の導入を行うことにより細胞の生育期間が短くなってしまい導入後の細胞への影響の検討に至れていない。神経細胞及びグリア細胞混合培養においては精製 α -syn の単量体及びプロトフィブリルの導入の検討を行い、それぞれの細胞ごとへの導入効率の違いについて評価した。

Cystatin C タンパク質を用いた実験では Neuro2a に培養液中から取り込まれた外因性の cystatin C タンパク質は α -syn 発現量の増加を誘導した。しかし、プラスミドを用いて内因性の cystatin C を増加させても α -syn 発現量に変化は観察されなかった。

平成30年度について

マウス脳初代培養細胞への導入のため平成29年度にかけて作成した手順に従い、組換え α -synをGST融合タンパク質として大腸菌にて合成し、バッチ法を用いてラージスケールにおける精製及びプロトフィブリルの作成を行った。

得られた精製 α -synはマウス脳初代培養細胞に導入を行った。神経細胞優位培養、未成熟オリゴデンドロサイト単離培養、オリゴデンドロサイト優位培養、神経細胞及びグリア細胞混合培養に分けて実験を行った。 α -synの導入は、培養液への添加、トラン

スフェクション試薬を用いて行い各種細胞における α -syn取り込みの違いについて検討した。また、オリゴデンドロサイトに α -synが導入されたモデルとしてヒト α -synをオリゴデンドロサイト特異的に発現するトランスジェニックマウスを用いて解析を行った。その結果、オリゴデンドロサイトに α -synが発現されるとcystatin Cタンパク質がオリゴデンドロサイトから細胞外へ分泌されていた。

Cos-7細胞を用いて組換えcystatin Cタンパク質の精製を行った。得られたcystatin Cタンパク質をマウス神経芽細胞腫由来Neuro2a細胞の培養液中に添加し、 α -synタンパク質の発現量の変化を観察した。Cystatin Cを培養液に添加すると α -synタンパク質の発現量が増加した。さらに、Cystatin Cを発現するプラスミドをNeuro2a細胞にトランスフェクションにより導入し、 α -synタンパク質の発現量の変化を観察したが、 α -synタンパク質の発現量に変化は観察されなかった。

D. 考察と結論

2年間全体について

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で必要である。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。

Cystatin C を用いた実験では細胞の外から導入される cystatin C タンパク質は神経細胞において α -syn タンパク質の発現量を増加させることが確認できたが、内因性の cystatin C タンパク質は α -syn タンパク質の発現量に影響を与えていなかった。このことからオリゴデンドロサイトから分泌された cystatin C タンパク質が神経細胞の α -syn 蓄積の原因となっていることが示唆された。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

平成29年度

- 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

平成30年度

- 2) 矢澤生、佐々木飛翔、金成花. 「非定型パーキンソニズム. 基礎と臨床」下畑享良編集、Ⅲ. 「病態解明と治療法の確立に向けて」動物モデル, 文光堂 査読有
ISDN: 978-4-8306-1547-4

2. 学会発表

平成29年度

- 1) Yazawa I, Jin C, Sasaki A, Iwase T. Mouse models contribute to develop a therapeutic strategy for multiple system atrophy (MSA). XXIII World Congress of Neurology (WCN2017), Kyoto, September 18, 2017.
- 2) 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

平成30年度

- 1) 佐々木飛翔 (ポスター)、金成花、岩瀬環、矢澤生. Role of oligodendrocyte maturation for alpha-synuclein accumulation in a mouse model of multiple system atrophy. 第41回日本神経科学大会、神戸コンベンションセンター、2018年7月28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