

<研究課題>アルツハイマー病におけるエクソソームの輸送機構の解明 —治療への応用とバイオマーカー探索

代表研究者 帝京大学医学部生理学講座 講師 磯尾 紀子
共同研究者 帝京大学医学部生理学講座 教授 林 俊宏
東京大学大学院薬学系研究科機能病態学教室 教授 富田 泰輔
帝京大学医学部附属溝口病院第四内科 講師 磯尾 直之

【まとめ】

アルツハイマー病の疾病進展に関与するタウ内包エクソソームの輸送機構を明らかにするため、新たに樹立した蛍光標識タウ発現細胞からタウを内包するエクソソームを回収する方法を確立した。タウ内包エクソソームは細胞への uptake 能を有することが明らかになり、エクソソームの病理性タウ細胞間伝播への寄与が示唆された。細胞内でのタウの凝集体形成へ及ぼす影響をより詳細に解析してタウ内包エクソソームの病的意義を検証する。

1. 研究の目的

アルツハイマー病患者の脳内で形成されるタウ病変は、異常リン酸化タウの凝集がその本態であり、神経細胞脱落とそれに引き続く認知機能低下をもたらす。この異常リン酸化タウはエクソソームを介した輸送で脳内を伝播し、疾病の進展に大きく関与する可能性が示唆されている。そこで、本研究では、タウ内包エクソソームの標的細胞への輸送機構を解明し、その経路の選択的遮断の治療法としての有効性を検証することを目的とする。そのために、①細胞内でタウ凝集体を形成する細胞株をアルツハイマー病の疾患モデル細胞として新たに樹立し、②その培養上清から病原性をもつタウが内包されたエクソソームを回収し、③その特性について、細胞への uptake 能や uptake 後の細胞内での凝集能などを疾患モデル細胞を用いて解析し、病原性タウの細胞間伝播への寄与を明らかにする。

2. 研究方法と経過

2-1 細胞内タウ凝集体形成細胞株の作製

Neuro2a 細胞に対して蛍光タンパク質 (Venus もしくは mCherry) を付加した P301S 変異を有するタウを恒常発現させたモノクローナル細胞株 (蛍光標識タウ発現細胞) を取得した。さらに P301S 変異を有するタウのリピードドメイン部分のリコンビ

ナントタンパク質をへパリン添加で線維化させた凝集核をこの蛍光標識タウ発現細胞にトランスフェクションし、細胞内にタウ凝集体を形成する細胞を取得した。次にドキシサイクリン存在下で目的遺伝子の転写が活性化されてタンパク発現が生じる Tet-One システムを導入し、タウのリピードドメインの発現を制御する細胞株の作製に着手している。現在は凝集性の異なる4種類のタウのリピードドメインを発現するプラスミドを作製し、蛍光標識タウ発現細胞にトランスフェクションしてモノクローナル細胞株を取得中である。

2-2 蛍光標識タウ発現細胞からのエクソソームの精製・回収

2-1 で作製した蛍光標識タウ発現細胞の培養上清から分画遠心法によりエクソソーム粗画分を回収し、同時に回収した細胞溶解液および大型の細胞外小胞画分とともにウェスタンブロット法によりエクソソームマーカー (CD9、CD63、CD81、Flotillin-1、ALIX) の発現を調べた。最近、このエクソソーム粗画分は均一ではなく多様な特性を持つ小胞集団であること、その中には CD9/CD63/CD81 陽性の古典的 'classical' エクソソームと Annexin A1/A2 陽性の非古典的 'non-classical' エクソソームが存在することが明らかになった (Jeppesen et al., Cell, 2019)。そこで、分画遠心法により得られたエクソソーム粗画分をさらに Iodixanol 密度勾配遠心法により、古典的エクソソーム画分と非古典的エクソソーム画分の分離を試み、ウェスタンブロット法によりそれぞれのマーカーの発現を調べた。現在は古典的、非古典的エクソソームそれぞれの病的意義を解析中である。

2-3 蛍光標識エクソソームの細胞内 uptake 能の解析

2-2 と同様の方法で回収したエクソソームの膜を DiI により蛍光標識した上で、蛍光標

識タウ発現細胞 (Venus) の培養上清中に添加し、ライブセルタイムラプスイメージングを実施した。共焦点定量イメージサイトメーターCQ1 (横河電機) を用いてエクソソーム添加後、15分おきに120分まで撮像し、エクソソームの細胞内への uptake 能を解析した。

3. 研究の成果

3-1 タウ凝集体形成細胞

Neuro2a 細胞に蛍光標識 P301S 変異型タウと凝集核としてのタウ線維を発現させて作製した細胞を蛍光顕微鏡下で観察したところ、トランスフェクションの24時間後から、細胞質内に多数のタウ凝集体形成が見られる細胞が得られた (図1)。しかし、数日の経過で細胞死が誘発され、細胞の維持は困難であった。

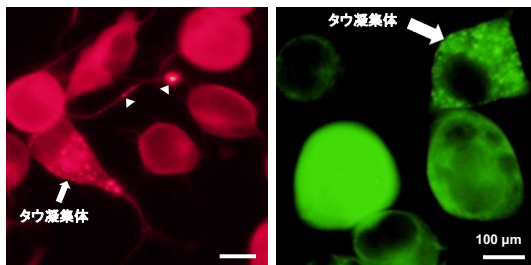


図1 タウ凝集体形成細胞

3-2 古典的エクソソームと非古典的エクソソームの分離

蛍光標識タウ発現細胞から回収した細胞溶解液 (Cell)、大型の細胞外小胞画分 (P15)、エクソソーム粗画分 (P100) におけるエクソソームマーカーの発現をウェスタンブロット法で調べたところ、CD9、CD63、CD81、Flotillin-1、ALIX のいずれもエクソソーム粗画分に高発現しており、超遠心法により分画ができていることが示された (図2)。

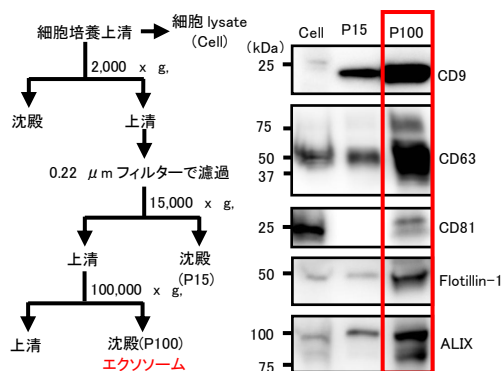


図2 分画遠心法によるエクソソーム回収

さらにエクソソーム粗画分を Iodixanol 密度勾配遠心法により分画すると、CD9/CD63/CD81 陽性の古典的エクソソーム

はより密度の高い画分に、Annexin A2 陽性の非古典的エクソソームはより密度の低い画分に分画され、この2種類のエクソソームを分離することが可能となった (図3)。

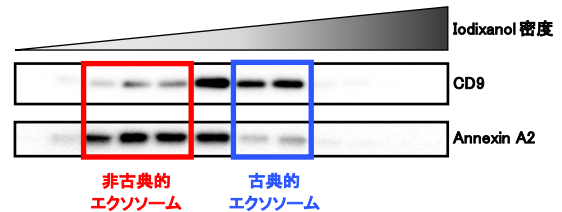


図3 Iodixanol 密度勾配遠心法による分画

3-3 エクソソームの細胞内への uptake

蛍光標識タウ発現細胞 (Venus) の培養上清に添加された DiI 標識エクソソームは時間とともに細胞内に uptake され、120分後には細胞質内局在が観察された (図4)。したがって、Neuro2a 細胞から分泌されたタウ内包エクソソームは、Neuro2a 細胞への uptake 能を有していた。このことからタウ内包エクソソームの細胞間伝播への関与が示唆された。

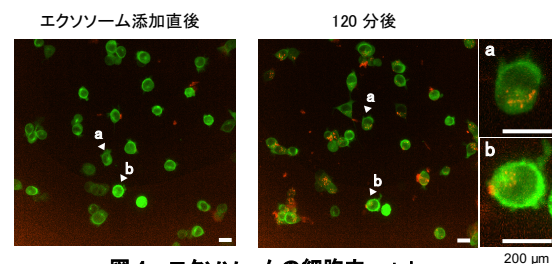


図4 エクソソームの細胞内 uptake

4. 今後の課題

アルツハイマー病の疾患モデル細胞から得られた古典的、非古典的エクソソームについてマウス脳内での細胞間伝播能を検証した上で、エクソソーム膜上に発現するタンパク質の網羅的プロテオミクス解析を行い、エクソソームの輸送先を規定する因子の探索を行う。さらに同定した因子に対する阻害剤投与や遺伝学的ノックアウトで機能阻害したエクソソームがタウの脳内伝播に与える影響を解析し、病態改善効果が得られるかどうかを検証する。

5. 研究成果の公表方法

上記の研究成果をまとめて、国内外の学会で発表するとともに、学術誌への投稿を予定している。

以上