

論文内容要旨

Amyloid Beta Is Internalized *via* Macropinocytosis,
an HSPG- and Lipid Raft-Dependent and
Rac1-Mediated Process

(アミロイドベータは HSPG および脂質ラフト依存
性に Rac1 が媒介するマクロピノサイトーシスの経路
により内在化される)

Frontiers in Molecular Neuroscience, Volume 15,
804702, 2022

主指導教員：丸山 博文 教授

(医系科学研究科 脳神経内科学)

副指導教員：川上 秀史 教授

(原爆放射線医科学研究所 分子疫学)

副指導教員：山崎 雄 講師

(医系科学研究科 脳神経内科学)

NAZERE KEYOUMU

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

【目的】

アルツハイマー病は最も頻度の高い認知症疾患であるが、その治療法は存在しない。病理学的に、神経細胞外に存在する老人斑と神経細胞内の神経原線維変化がその特徴であり、老人斑の主成分は 42 個のアミノ酸からなるアミロイド β ペプチド (Aβ42) である。Aβ は容易に重合および凝集し脳内で不溶化することから、老人斑としての脳内沈着を介しアルツハイマー病の病態が進行すると考えられている (アミロイド仮説)。一方、不溶化した Aβ に加え、オリゴマー化した可溶性の Aβ (oAβ42) も神経細胞を障害する作用を有すること、さらに oAβ42 が細胞外だけでなく細胞内にも存在することが最近の研究によって明らかとなり、神経細胞におけるその代謝・蓄積メカニズムについての検討が活発に行われている。細胞内に oAβ42 が存在する機序については、①細胞内で産生された oAβ42 が先に細胞内 Aβ42 として蓄積した後に細胞外に排出され、不溶性の老人斑として蓄積する可能性と、②細胞外で産生された可溶性 oAβ42 が老人斑の形成後にも残存して、細胞内に取り込まれる可能性、の 2 つが考えられる。本研究では、後者に着目し、特定のエンドサイトーシス機構が oAβ42 の内在化に関与しているか細胞実験系をもちい検討した。

【方法】

蛍光標識された合成 Aβ42 ペプチドを Stine らの標準的な方法によってオリゴマー化し、oAβ42 を作成した。実験対照として、モノマー化した Aβ42 (mAβ42) をもちいた。mAβ42 と oAβ42 の品質確認は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって行った。異なる濃度・時間で、mAβ42 ならびに oAβ42 を神経系の Neuro2A、SH-SY5Y 細胞株に添加し、細胞内の Aβ42 取り込みを蛍光顕微鏡で観察し、定量した。oAβ42 の取り込みに、膜ドメインである脂質ラフトが関与するのかを明らかにするため、脂質ラフトをコレラ毒素のサブユニット (CTB) で標識し、シクロデキストリン (MβCD) をもちいてラフトをあらかじめ崩壊させたのち、同様の実験を行った。さらに、細胞表面に存在するヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) の関与を明らかにするため、HSPG の阻害剤ヘパリン投与ならびにトリプシン処理より HSPG を切断する前処置を行ったのち、同様の実験を行った。最後に、脂質ラフトや HSPG が関与するエンドサイトーシスの下流の制御因子として低分子量 GTPase である ADP リボシル化因子タンパク質 6 (Arf6) や Rac1 が関与することから、oAβ42 投与後の Arf6、Rac1 の活性を吸光度ベースの活性化アッセイにより経時的に測定した。

【結果】

Neuro2A、SH-SY5Y 細胞はいずれも濃度依存的かつ時間依存的に oAβ42 を内在化した。内在化した oAβ42 の量は、mAβ42 のそれと比較して有意に高かった。エンドサイトーシスの様式の一つであるマクロピノサイトーシスを標識するデキストランと共に oAβ42 を投与したところ、デキストランと oAβ42 は細胞内で共局在していた。そこで、マクロピノサイトーシス阻害剤である ethyl-isopropyl amiloride ならびに Wortmannin 処理を行ったところ oAβ42 の内在化は抑制された。以上より、oAβ42 はマクロピノサイトーシスにより内在化することが示唆された。さらに、脂質ラフトを崩壊させる条件 (20mM MβCD 添加) では 17.5%まで、HSPG をヘパリ

ンで阻害もしくはトリプシンで切断した条件下でもそれぞれ 14.5%、14.9%まで oA β 42 の内在化が阻害された。マクロピノサイトーシスの際は低分子量 GTPase の Arf6 や Rac1 の活性が一過性に上昇する。そこで、oA β 42 投与後にそれらの活性を測定したところ、Arf6 活性に有意な変化は見られなかった一方、Rac1 の活性が 7 分後に 3.0 倍上昇した。さらに、Arf6、Rac1 それぞれの阻害剤を使用した実験では、後者でのみ Neuro2A 細胞における oA β 42 の内在化が 61.4%減少した。以上の結果から、oA β 42 は、脂質ラフト、HSPG 依存性に Rac1 制御性のマクロピノサイトーシスにより細胞に取り込まれることが明らかになった。

【結論】

本研究により、細胞外の可溶性 oA β 42 がマクロピノサイトーシスにより神経細胞に取り込まれることが示された。本結果は、①アルツハイマー病脳で観察される細胞内 oA β 42 蓄積が起こるメカニズムに洞察を与え、②アルツハイマー病における細胞内 oA β 42 の病原性を仮定すれば、脂質ラフト、HSPG 依存性の oA β 42 エンドサイトーシスがアルツハイマー病治療戦略の一つとして今後探索され得ることを示す。

- 2 ページ目（当該ページ）より要旨の本文を入力してください。
 - 要旨本文については、日本語の場合は 2,000 字以内、英文の場合は 1,000word 以内で作成してください。
 - 論文の abstract そのままを提出しないでください。
 - 図表は使用しないでください。
 - 要旨本文は、ワープロ打ちの横書きで、必ず A4 版 2 枚以内で作成してください。フォントは「MS 明朝」とし、英数字は「Century」の半角を使用し、10 ポイントで作成してください。
 - 要旨の書き方に上記以外の決まりはありません。書き出しを「初めに～」、「目的」、「私は～」など、どのようにしても問題ございません。指導教員とご相談ください。
-
- Please start content of the abstract from the second page.
 - The title of the thesis, the name of the journal and Japanese translation etc. on the front page must be exactly the same as written on ③Abstract (論文目録) including font, font size and punctuation marks.
 - If you are not sure which department your supervisors belong to, please ask the Student Support Group
 - The abstract must contain no more than 2,000 characters in Japanese or 1,000 words in English.
 - The abstract here must be prepared separately from the one with the thesis applied to a journal.
 - Tables and charts must not be included.
 - The abstract must be written horizontally and limited to two sheets of A4 size paper. Alphanumeric characters must be written in 10 points “Century” and others must be written in 10 pints “MS 明朝”.
 - There is no fixed format other than the above in the way of writing the abstract. You may start a sentence with “First of all,” “Purpose,” “I,” or any others. Please consult with your academic supervisors.