

称号及び氏名 博士（獣医学） 河邊 憲司

学位授与の日付 平成29年3月31日

論文名 中枢グリア細胞のトランスグルタミナーゼによる
細胞機能変化

論文審査委員 主査 中村 洋一
副査 竹内 正吉
副査 岡田 利也

論文要旨

緒言

アルツハイマー病(AD)は記憶や認知機能の障害を呈する神経変性疾患であり、AD患者脳では大脳皮質や海馬にアミロイドβ(Aβ)凝集体が沈着した老人斑の形成や、ニューロンの脱落が観察される。AD発症機序として広く支持されているものに「アミロイド仮説」がある。無毒のAβモノマーが、オリゴマーやフィブリルなどの凝集体となることで毒性を発揮して、ニューロンの脱落を惹起するとされるが、アミロイド仮説に対する疑問も残されている。ひとつは、Aβの凝集の度合いや凝集形態により毒性が異なることが報告されており、*in vitro*で観察される凝集形態が*in vivo*では存在しないことであり、毒性を発揮するAβ凝集の機序も不明である。もうひとつは、AD患者やモデル動物において、脳内に蓄積するAβはnMオーダーであるのに対し、*in vitro*で毒性を惹起するにはμMオーダーの高濃度Aβ凝集体を必要とし、*in vivo*での病態を再現できていないことがあげられる。

第一の疑問を解決するために蛋白質架橋酵素であるトランスグルタミナーゼ(TG)に着目した。TGはCa²⁺依存的に活性化して、蛋白質のグルタミン残基と第1級アミンを縮合し架橋を形成する酵素活性を持つ。哺乳類では8種類のアイソザイムが知られており、中枢ではTG1, TG2, TG3 および血液凝固XIII因子の4種類が発現

している。AD 患者脳解析からアストロサイトにおいて TG2 発現が上昇すること、および TG2 は A β を基質として凝集形成を促進させることが TG2 の精製酵素を用いて示されている。アストロサイトは中枢の大部分を構成し、A β 凝集に与えるその TG 活性の影響は大きいと考えられるが、培養細胞を用いた TG2 による A β の凝集体形成の解析は行われていない。

第二の疑問について、近年、ニューロン/グリア混合培養系に nM オーダーの A β を添加することによってニューロン死が誘導されること、およびミクログリアの枯渇や貪食関連分子の阻害によりニューロン死が抑制されることが報告された。これは生体内濃度の A β 凝集体によるニューロン死はその直接毒性ではなく、ミクログリアの貪食活性上昇を介した間接的な毒性であることを示唆しており、ミクログリアの貪食機構の解明は重要である。マクロファージの貪食において TG2 蛋白が食細胞と被食細胞を介在することにより細胞認識を容易にしていることが報告されており、ミクログリアの貪食においても TG2 が関与することが予想される。

以上を踏まえ、「アストロサイト由来の TG により A β 凝集が促進され、A β 凝集体によって活性化したミクログリアが TG2 によりニューロンを認識し貪食する」という仮説を立てた。本研究ではこの仮説の検証を行う目的で、A β 暴露時のグリア細胞の TG 機能の解析をするとともに他の貪食関連分子についても検討を加えた。

第一章：アストロサイト由来のトランスグルタミナーゼによる A β 凝集の促進

A β は凝集条件により様々な形態を持つことが知られているが、*in vitro* で形成される凝集体が必ずしも *in vivo* で観察されるわけではない。そのため、脳内でおこる A β 凝集形成は周囲の細胞機能により影響を受けていると考えられるが、培養細胞を用いて A β 凝集を観察した例は少ない。そこでアストロサイトが A β 凝集形成に与える影響を検討した。ラット大脳皮質由来培養アストロサイトに用時調製した A β を添加し、経時的に 7 日までの培養上清を回収してウエスタンブロット法により凝集を観察したところ、A β モノマーの減少は観察されたが、オリゴマーの形成には変化はなかった。アストロサイトによって A β が取り込まれたと考えられる。次に、アストロサイトの培養上清から遠心分離により細胞を除去し、アストロサイト・コンディションド・メディウム (ACM) を作製して ACM 中での A β オリゴマー形成を観察した。ACM 中では A β オリゴマーの形成が促進されることが確認できた。また TG 活性阻害剤であるシスタミンを加えたところ、オリゴマー形成が抑制された。従って、アストロサイトが分泌する TG により A β 凝集体形成が促進されることが示唆された。

第二章：ミクログリアの TG2 発現変化とその機能解析

TG2^{-/-}のマクロファージは貪食能が低下していることが報告されており、また、TG2 蛋白はマクロファージの “eat me signal” 受容体との結合能を持つことから、

食細胞と被食細胞間の接着を介在し、細胞認識を容易にしていると考えられている。しかし、ミクログリアによる貪食に **TG2** が関与するかは検討されていない。そこでグリア細胞を活性化することが知られているリポポリサッカライド (**LPS**) で刺激し、ミクログリアの **TG2** 発現とエンドサイトーシスの変化を調べ、**TG** 活性阻害剤の影響を検討した。**BV-2** 細胞 (マウスミクログリア株化細胞) を **LPS** で刺激すると濃度依存的に **TG2** 発現は増加した。また、**TG** 基質としてビオチン標識ペンチルアミンを用いて細胞内 **TG** 活性を測定したところ、**LPS** 刺激により増加した。次に **LPS** 刺激によるエンドサイトーシスの変化を検討した。**LPS** 刺激により、ビーズを取り込む飲作用と死細胞を取り込む食作用ともに上昇し、両者はシスタミンにより抑制された。以上の結果から、ミクログリアは活性化に伴って **TG2** 発現が上昇し、**TG** 活性がエンドサイトーシスを制御していることが示唆される。

さらに初代培養のニューロン/グリア混合細胞系において、用時調製した **A β** で 3 日間刺激したところ、核が矮小化したアポトーシス様形態のニューロン (**β III-tubulin** 陽性) の割合が増加する傾向が見られ、シスタミンの同時投与により正常ニューロン割合が回復した。このときニューロン貪食ミクログリア (**Iba-1** 陽性) の数に変化はなかった。また、ミクログリアは **A β** 貪食活性を示し、**A β** 刺激 3 日目では殆どのミクログリアが **A β** を取り込んでおり、シスタミンの同時投与により取り込みは有意に抑制された。以上の様に混合培養系においてもミクログリアの貪食に対する **TG** の関与が示唆された。

第三章：グリア細胞における貪食関連分子 **MFG-E8** の発現とその機能

A β 刺激により活性化したミクログリアの貪食の機序として、**milk fat globule EGF factor 8 (MFG-E8)** の関与が既に報告されている。**MFG-E8** は、“eat me signal” であるフォスファチジルセリン (**PS**)、およびミクログリアに発現する “eat me signal” 受容体であるフィブロネクチン受容体 (**FR**) の両者と結合し、**PS/MFG-E8/FR** の系によってミクログリアは異物を認識する。そこで初代培養ニューロン/グリア混合細胞系に用時調製した **A β** を添加し 3 日後に **MFG-E8** と **A β** の免疫染色を行ったところ、**MFG-E8** と **A β** が共局在する細胞が観察された。ミクログリアが **MFG-E8** を利用して **A β** を取り込んでいることが示唆される。

MFG-E8 は主に食細胞から分泌されるとされており、アストロサイトにもその発現が認められているものの、その詳細はわかっていない。そこで、中枢における **MFG-E8** の分泌細胞を同定するために、培養アストロサイトと培養ミクログリアを用いて、**MFG-E8** の発現を確認し、**A β** 刺激に対するその変化を検討した。まず、ミクログリアでの **MFG-E8** 発現をウエスタンブロット法により確認したところ、**L 型 (56 kDa)** のみの発現であり、**A β** 凝集体 (**37°C** で 1 週間静置して作製) による刺激ではその発現に変化はなかった。一方、培養アストロサイトでは、**MFG-E8** の **L 型** と **S 型 (50 kDa)**

の 2 種類の発現が見られ、 $A\beta$ 凝集体の刺激によって、L 型の発現に変化はなかったが、S 型の発現は増加する傾向がみられた。これらのことから中枢においてはアストロサイトが **MFG-E8** を主に分泌し、ミクログリアがそれを利用している可能性が示唆される。

MFG-E8 は **TG2** との結合が報告されており、**PS/MFG-E8/TG2/FR** の一連の構造体ができることによって、より異物の認識が容易になると考えられている。培養ミクログリアを用いて **MFG-E8** 抗体で免疫沈降を行い、**TG2** 抗体で検出を試みたところ、**TG2** のバンドが検出され **MFG-E8** と **TG2** の結合が確認された。従ってミクログリアは **MFG-E8/TG2** を介することにより異物を貪食することが示唆される。

総括

1. アストロサイトが分泌する **TG** によって $A\beta$ 凝集が促進する。
2. 活性化されたミクログリアの貪食作用には **TG** が関与する。
3. アストロサイトは貪食関連分子である **MFG-E8** を分泌し、ミクログリアがそれを介して $A\beta$ を貪食している。

以上の結果を得て、**AD** における $A\beta$ 仮説の矛盾を解消しうる「アストロサイト由来の **TG** により $A\beta$ 凝集が促進し、活性化したミクログリアは **TG** 蛋白を介して貪食を行う。またその貪食にはアストロサイト由来の **MFG-E8** が深く関与している」という新しい病因機序が明らかとなった。

審査結果の要旨

アルツハイマー病 (**AD**) は記憶や認知機能の障害を呈する神経変性疾患であり、大脳皮質や海馬でアミロイド β (**A β**) 凝集体の沈着による老人斑の形成や、ニューロン脱落が特徴的である。**AD** 発症機序として広く支持されている「アミロイド仮説」では、無毒の **A β** がオリゴマーやフィブリルなどの凝集体となることで毒性を発揮してニューロン脱落を惹起するとされるが、いくつか疑問も残されている。ひとつは **A β** の凝集の度合いや凝集形態により毒性が異なることで、毒性のある **A β** 凝集機序も不明である。もうひとつは **AD** 患者髄液中の **A β** は **nM** オーダーであるが、*in vitro* で毒性を惹起するには **μ M** オーダーの高濃度 **A β** を必要とすることである。

本研究では第一の疑問を解決するためにトランスグルタミナーゼ (**TG**) に着目している。**TG** は蛋白質の **Gln** 残基と **Lys** 残基を縮合し架橋形成する酵素活性を持ち、

哺乳類中枢では TG1, 2, 3 および血液凝固 X III 因子の 4 種類が発現している。AD 患者脳ではアストロサイトの TG2 発現が上昇すること、および精製 TG2 は A β 凝集を促進させることが示されている。アストロサイトは中枢の大部分を構成し、A β 凝集に対するその TG 活性の大きな影響が予想されるが、培養アストロサイトを用いた詳細な解析は行われていない。

第二の疑問について、ニューロン/グリア混合培養系では低濃度 A β によってニューロン死がおこること、またミクログリアの枯渇や貪食阻害によりニューロン死が抑制されることが近年報告された。これらは低濃度 A β によるニューロン死がミクログリアの貪食活性を介した間接的な毒性によることを示唆している。マクロファージの貪食では TG2 蛋白が介在して被食細胞を認識することが報告されており、ミクログリアの貪食でも TG2 が関与することが予想される。

本研究では、以上を踏まえ、「アストロサイト由来の TG により A β 凝集が促進され、A β 凝集体によって活性化したミクログリアが TG2 によりニューロンを認識し貪食する」という仮説を立て、第 1, 2 章で A β 暴露時のグリア細胞の TG 機能解析によりこの仮説の検証を行うとともに、第 3 章で他の貪食関連分子についても検討を加えている。

第一章：アストロサイト由来のトランスグルタミナーゼによる A β 凝集の促進

脳内でおこる A β 凝集は周囲の細胞機能により影響を受けていると考えられるが、培養細胞を用いて A β 凝集を観察した報告はない。ラット大脳皮質由来培養アストロサイトに添加した A β モノマーは細胞に取り込まれて減少し、オリゴマーの形成はみられなかったが、アストロサイトの培養上清(ACM)中では A β オリゴマーの形成が促進された。また TG 活性阻害剤であるシスタミンでオリゴマー形成が抑制された。アストロサイトが分泌する TG により A β 凝集体形成が促進されることが示唆される。

第二章：ミクログリアの TG2 発現変化とその機能解析

ミクログリアによる貪食に TG2 が関与するかについては報告がない。リポポリサッカライド(LPS)で刺激して活性化した BV-2 細胞(マウスミクログリア株化細胞)では TG2 発現と細胞内 TG 活性が増加した。また飲作用(ビーズ取込)と食作用(死細胞取込)も上昇し、シスタミンにより抑制された。さらにニューロン/グリア混合培養細胞を A β で 3 日間刺激したところ、アポトーシス様形態のニューロンの割合が増加し、シスタミンにより正常ニューロン割合が回復した。またミクログリアは A β 貪食活性を示し、その貪食はシスタミンにより抑制された。ミクログリアは活性化に伴って TG2 発現が上昇し、TG 活性がエンドサイトーシスを制御していることが示唆される。

第三章：グリア細胞における貪食関連分子 MFG-E8 の発現とその機能

Milk fat globule EGF factor 8 (MFG-E8)は、“eat me”シグナルであるフォスファチジルセリンおよび食細胞上のビトロネクチン受容体の両者と結合し、これらの連結で食細胞は異物を認識するとされる。ニューロン/グリア混合細胞系にA β 添加3日後にMFG-E8とA β が共局在する細胞が免疫染色により観察された。ミクログリアがMFG-E8を利用してA β を取り込んでいることが示唆される。

中枢におけるMFG-E8の分泌細胞を同定するために、培養アストロサイトと培養ミクログリアを用いてMFG-E8の発現をウエスタンブロット法により確認し、A β 刺激による変化を検討した。ミクログリアでのMFG-E8発現はL型(56 kDa)のみであり、A β 刺激ではその発現に変化はなかった。一方、培養アストロサイトでは、MFG-E8のL型とS型(50 kDa)の2種類の発現が見られ、A β の刺激によりS型が増加した。アストロサイトがMFG-E8を主に分泌しミクログリアがそれを利用している可能性が示唆される。

以上の結果より、ADにおけるA β 仮説の矛盾を解消しうる「アストロサイト由来のTGによりA β 凝集が促進し、活性化したミクログリアはTG蛋白を介して貪食を行う。またその貪食にはアストロサイト由来のMFG-E8が深く関与している」という新しい病因機序が明らかとなった。これらの研究成果は、獣医学および医学における中枢神経障害機構解明の新たな展開に資するものであり、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、博士(獣医学)の学位を授与することを適当と認める。