

β -アミロイド誘発性神経細胞死におけるオートファジー・ライソゾームシステムの制御機構

Regulatory mechanisms of autophagy-lysosome system on β -amyloid-induced neuronal cell death

佐々木 世佳 (Seika Sasaki)

指導：木村 一郎

<序論・目的>

神経細胞は一部を除いて再生しないためこれら神経変性疾患における神経細胞死の機序解明とその防衛が中枢神経疾患研究の急務であると考えられている。神経変性疾患に認められる神経細胞死は、当初アポトーシスであるという報告が散見されたが、近年『プログラムされた細胞死』の一つである autophagic cell death の関与が注目を集めている。Autophagic cell death は細胞内蛋白質分解系のうち、特にオートファジー・ライソゾーム系と深く関連していると考えられ、オートファゴソームが細胞質に多量に出現し、死に至るものである。

β -アミロイドは神経変性疾患の一つであるアルツハイマー病において特徴的形態変化である老人斑への蓄積が見られ、アミロイド前駆蛋白質の遺伝子変異は家族性アルツハイマー病の原因遺伝子のひとつとして特定されているため、その神経毒性が注目されてきた。

本研究では、特に蛋白質分解を受けにくくオートファジー・ライソゾーム系を介した神経毒性が示唆される β -アミロイドの変異体 $A\beta$ 1-42 を用いてライソゾームを介する神経細胞死の分子制御機構を検討した。

<実験方法と材料>

胎生 14 日目の C57BL/6J マウスの大脳皮質を用いて初代神経細胞培養を行い、 $A\beta$ 1-40、 $A\beta$ 1-42、3-methyladenine (オートファゴソームの形成阻害剤)、Z-VAD (アポトーシスの実行因子である caspase の阻害剤)、rapamycin (オートファジー亢進剤) 暴露および siRNA による Atg7, Beclin1 (オートファゴソーム形成因子) の発現抑制を施し、その効果を検討するため LDH/ATP アッセイによる細胞死亡率の測定、LysoTracker によるライソゾームの形態変化観察、蛍光免疫細胞化学染色によるエンドゾーム・ライソゾーム関連蛋白質の発現と局在の観察、ウェスタンブロットティングによる関連蛋白質の発現量の測定を行った。

<結果・考察>

初代培養神経細胞を $A\beta$ 1-40 および $A\beta$ 1-42 に 5, 10, 20 μ M でそれぞれ 0, 24, 48 時間暴露し、死亡率を測定したと

ころ、 $A\beta$ 1-42 のみが濃度、時間依存的に神経細胞死を誘導した。この細胞死は 3-methyladenine や Beclin1 の発現阻害によって抑制され、rapamycin により亢進されたが、Z-VAD では抑制されずむしろ亢進された。

$A\beta$ 1-42 による細胞死におけるライソゾームの形態を観察したところ、通常均一かつびまん性に染色されるライソゾームが巨大顆粒状に変化していた。3-methyladenine を暴露した場合にはこれらの所見は見られないことから、巨大な顆粒状に染色されるのはオートライソゾームであると推測された。

$A\beta$ 1-42 およびエンドゾーム・ライソゾーム関連蛋白質の蛍光免疫細胞化学染色の結果から、 $A\beta$ 1-42 はエンドゾーム系細胞内小器官に存在せず、時間の経過に伴ってオートファゴソーム・ライソゾームとの局在の一致が見られた。

ウェスタンブロットティングの結果 $A\beta$ 1-42 暴露細胞では $A\beta$ 1-42 の経時的な凝集体の増加が認められ、この反応は 3-methyladenine によって抑制された。また $A\beta$ 1-42 暴露によりオートファジー関連蛋白質である LC3 のオートファゴソームの形成を示す LC3-II のバンドが認められた他ライソゾーム膜蛋白質 LAMP1、LAMP2、ライソゾーム由来加水分解酵素である cathepsin D の発現も上昇しており、これらオートファジー・ライソゾーム経路の亢進と $A\beta$ 1-42 の凝集、細胞死への関与が示唆された。

以上の結果より、 $A\beta$ 1-42 による神経細胞死はオートファジー依存的であり caspase 非依存的であることや、ライソゾームの形態変化、オートファゴソームの蓄積を伴い、オートファジー・ライソゾーム系関連蛋白質の発現も増加していることから、autophagic cell death の特徴を多く有していた。それと同時に caspase 活性の亢進や Z-VAD による細胞死の代償的な増加等アポトーシス経路との密接な関係が示唆され、autophagic cell death とアポトーシスの間に分子レベルでのクロストークがある可能性が考えられた。また暴露された $A\beta$ 1-42 はエンドゾーム系小胞輸送経路を介さず細胞内に取り込まれ、オートファゴソームに補足されライソゾームへ輸送されること、また 3-methyladenine による $A\beta$ 1-42 の凝集阻害効果などライソゾーム系による代謝経路とその神経毒性の相関性が窺われた。