

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：13601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06143・19K21258

研究課題名(和文)細胞内におけるリポ蛋白質代謝過程に基づいたアミロイドーシス病態機序の解明

研究課題名(英文) Involvement of intracellular lipoprotein metabolic process in the amyloidosis pathology

研究代表者

宮原 大貴 (Miyahara, Hiroki)

信州大学・先鋭領域融合研究群バイオメディカル研究所・助教(特定雇用)

研究者番号：90823287

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：高比重リポ蛋白質(HDL)はアミロイド病原蛋白質を多数含む血液成分である。本研究は、培養細胞系を用いてHDLの代謝過程やアミロイドとの相互作用を検討することで、アミロイドーシス病態における蛋白質の病原性獲得の分子機序の解明を目指す研究課題である。マウスマクロファージ細胞にHDLを添加することで、細胞内に脂質の蓄積とともにアポリポ蛋白質群を含む凝集体が形成された。また、マクロファージはアミロイドを細胞内で分解する作用を示し、これはライソゾーム経路の阻害剤により抑制された。以上の成果から、アミロイドーシス病態においてマクロファージ細胞はアミロイド形成と除去の両方に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アミロイドーシスは様々な病原蛋白質に起因する加齢性疾患であり、その病態機序の解明と治療戦略の開発は喫緊の課題である。本研究により、アポリポ蛋白質群や脂質などのアミロイドと共沈着する分子が多数含まれる高比重リポ蛋白質(HDL)は、アミロイドの分解を阻害する作用や、マクロファージ細胞内のアポリポ蛋白質群陽性の凝集体の形成を誘導することを明らかとした。これらの成果は、正常な蛋白質の代謝過程において、アミロイドに変性する区画が細胞内に存在する可能性を示唆する。また、生体にはマクロファージ細胞によってアミロイドを分解する機構が備わっていることが分かり、食細胞の機能維持による新たな治療戦略が示唆された。

研究成果の概要(英文)：High-density lipoprotein (HDL) is a circulating particle composed of various kinds of amyloidogenic proteins. To reveal a molecular mechanism of the pathogenic protein in the amyloidosis pathology, we analyzed metabolic processes of HDL in a macrophage and interaction between HDLs and amyloid fibrils. Addition of the HDL fraction to murine macrophage cells leads to intracellular accumulation of lipids and apolipoproteins positive materials. The macrophage cells also showed amyloid degradation activity in cytoplasm, and it was suppressed by inhibition of endosomal or lysosomal function. These results suggest that macrophage cells could play important roles in both amyloid formation and clearance.

研究分野：実験病理学

キーワード：アミロイドーシス アポリポ蛋白質A-II マクロファージ細胞 高比重リポ蛋白質 ライソゾーム

## 1. 研究開始当初の背景

アミロイドーシスは疾患特異的な病原蛋白質が線維状構造に凝集し、組織に沈着する変性疾患群である。高比重リポ蛋白質 (HDL) はアポリポ蛋白質 A-I, A-II, A-IV, C-II, C-III, SAA などのアミロイド病原蛋白質と、アポリポ蛋白質 E やクラスτεリンなどのアミロイドと共沈着する蛋白質が多数含まれる血漿成分である。これまでに、アポリポ蛋白質群で共通する両親媒性  $\alpha$  ヘリックス領域に高いアミロイド原性を持つことや (Das, *Adv Exp Med Biol*, 2015)、ゲノムワイド相関解析によってアポリポ蛋白質 E やクラスτεリンの遺伝子多型が遅発性アルツハイマー病の強力な危険因子であることが報告されている (Lambart, *Nat Genet*, 2013)。しかしながら、これらのアポリポ蛋白質群の病原性獲得の分子機序というアミロイドーシス発症の根本の分子基盤については明らかとなっていない。

これまでに研究代表者らは、血液中のアポリポ蛋白質 A-II (ApoA-II) が加齢に伴ってアミロイド線維 (AApoAII) として沈着するマウス老化アミロイドーシスを発見し、アミロイドーシス好発系の *Apoa2* 遺伝子の導入による病態モデルマウスの開発、ならびにアミロイド抽出物の投与や糞尿を介したアミロイドのプリオン病様の伝播現象を報告した。また、AApoAII 沈着組織のプロテオミクス解析結果から、脂質代謝関連因子とアミロイドーシス病態の関係を見出し、リポ蛋白質の代謝過程が病態機序に関与するという仮説を構築するに至った (Miyahara, *J Proteomics*, 2018)。

アミロイドは病理組織学的には古典的に細胞外の沈着と定義され、前駆蛋白質の細胞内代謝と病変形成との関係は着目されてこなかった。しかしながら、近年の研究から前駆蛋白質を細胞に代謝させることでアミロイド凝集体の形成に成功し (Claus, *EMBO Rep*, 2017) にわかに細胞内でのアミロイド形成の重要性が指摘された。特に、前駆蛋白質を積極的に代謝する細胞種や、ライソゾームのような酸性環境かつ高濃度の蛋白質溶液区画は、変性蛋白質が生じやすい場として注目されている。一方で、沈着後のアミロイドに対する細胞の応答として、病理組織学的にアミロイド沈着周囲でマクロファージ細胞やミクログリアなどの食細胞が観察される。食細胞の活性化がアミロイドの隔離やクリアランスに寄与すると考えられているが、その病理変化の意義は未だ不明である。

## 2. 研究の目的

前駆蛋白質が生体内で代謝プロセスを経て病原性を獲得するのか、逆に既に形成されてしまったアミロイドに対する細胞の作用という問題は、アミロイドーシスの発症や病態の進展を抑制するうえで解明すべき課題である。本研究では、マウス AApoAII アミロイドーシスをモデルに、培養細胞系を用いて HDL の代謝過程におけるアミロイド形成について検討することで、アミロイドーシス発症の分子基盤を明らかにすることを目的とする。また、生体由来のアミロイドと細胞への影響を解析することで、病態の進展や組織障害の機序について検討する。

## 3. 研究の方法

- マウスマクロファージ様細胞株 (J774A.1) に、AApoAII アミロイドーシスモデルマウス (SAMR1C マウス、2~10 ヶ月齢) の血清から分画した HDL を添加することで AApoAII 沈着の形成反応を検討した。HDL は、プール血清から 3 種類の比重液 (A :  $\rho=1.006$  g/mL, B :  $\rho=1.182$  g/mL, C :  $\rho=1.478$  g/mL) を用いた超遠心分画法により分画し、脱塩および濃縮ののち、最終濃度 1.0 mg/mL (総蛋白質) に調整し培地へ添加した。
- 抗アポリポ蛋白質抗体 (ApoA-II, ApoA-I, ApoE) やアミロイド特異的な蛍光染色 (コンゴレッド染色、チオフラビン T 染色) により、前駆蛋白質の細胞内動態やアミロイド線維形成の有無を検討した。
- マウス AApoAII アミロイド (AApoAII アミロイドーシスを発症したマウスの肝臓からの Pras 法による抽出物) を J774A.1 細胞へ添加し、細胞を介したアミロイド分解作用と細胞毒性について検討した。

## 4. 研究成果

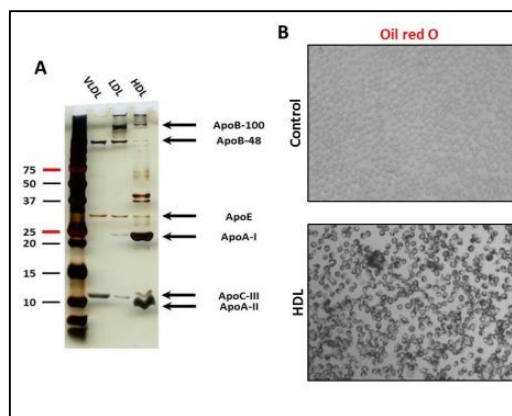
### HDL 代謝過程におけるアポリポ蛋白質群陽性の細胞内区画の形成

70% コンフルエント ( $1.0 \times 10^5$  cells/mL の細胞液を播種した 2 日後) に達した J774A.1 細胞に HDL 分画を 1.0 mg/mL で添加し、その後 48 時間培養した。マクロファージ細胞内にオイルレッド O 陽性の脂質蓄積が認められ (図 1)、アポリポ蛋白質群陽性の細胞内凝集体の形成が観察された (図 2)。細胞内凝集体は、アミロイドの線維構造に対して特異的に結合する蛍光色素であるチオフラビン T では染色されなかったことから、アミロイド構造体ではないことが示唆された。我々は、AApoAII アミロイドが試験管内および生体内でアミロイド形成を促進すること、いわゆるプリオン病様の伝播現象を報告している。これを踏まえ、細胞内凝集体を形成した細胞にマウス AApoAII アミロイドを継続投与することで培養細胞系におけるアミロイド沈着モデルの確立を目指したが、添加した AApoAII の付着が観察されるのみで細胞による新規アミロイド形成は観察できなかった。また、最長 2 週間の長期の HDL 投与においてもアミロイド沈着形成には至らなかった。

以上の結果から、マクロファージ細胞による HDL の代謝過程において、細胞内にアポリポ蛋白質群が密に存在する区画が生じることを明らかとした。生体内のアミロイド沈着は、アミ

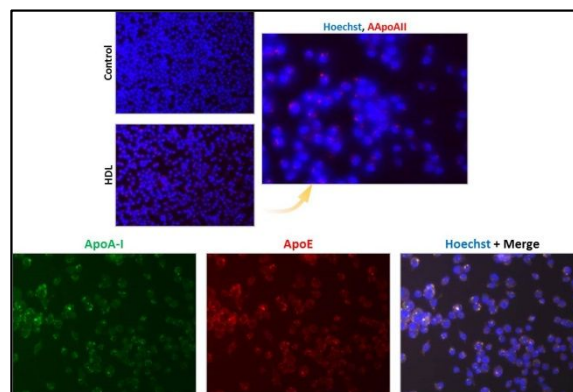
ロイド線維蛋白質の他に、アポリポ蛋白質群をはじめとする関連蛋白質、脂質、細胞外マトリックスで構成される。本試験で観察された、これらの一部を内包する細胞内凝集体は、更なる細胞内外での断片化や重合化などの代謝プロセスを経てアミロイドに至る可能性が考えられる。なお本研究において、極微小領域を単離可能な改良型レーザーマイクロダイセクション装置による細胞内凝集体の回収にも取り組んだが、期間中の実現は叶わなかった。細胞内凝集体の共存分子の同定や微細構造解析などの体系的な解析システムの構築は、細胞内のアミロイド形成機構の解明を目指す上で実現すべき課題である。

また興味深いことに、対照とした HDL で処理していない J774.1 細胞では、細胞に付着した AApoAII が時間経過とともに減少した。この結果から、マクロファージ細胞によるアミロイド分解機構が存在すると推察し、以下の検証を実施した。



**図 1. HDL の採取と J774A.1 細胞への添加**

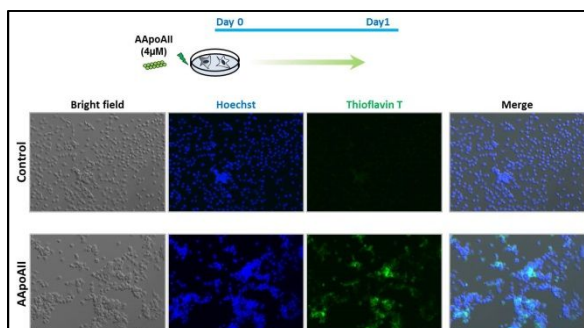
(A) SAMR1C マウスのプール血清から超遠心分離したリポ蛋白質分画 (左から VLDL, LDL, HDL) の SDS-PAGE。HDL 分画は主に ApoA-I, A-II, C-III, E を含む。(B) HDL を添加したマクロファージでは脂質の蓄積が認められた。



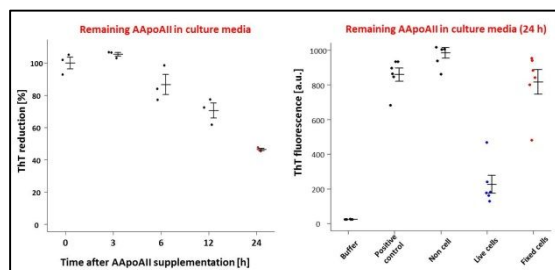
**図 2. HDL 投与によるアポリポ蛋白質群陽性の凝集体形成**  
HDL 添加培地で 48 時間培養することで、細胞内に ApoA-II 陽性の凝集体の形成が観察された。ApoA-I, ApoE も含むことが認められた。

### マクロファージ細胞によるアミロイド分解作用の検証

70% コンフルエントに達した J774A.1 細胞に AApoAII 線維分画 4  $\mu$ M を添加し、その後 24 時間培養した。チオフラビン T 染色により、投与したアミロイドは細胞周囲へ付着とともに細胞の凝集が観察された (図 3)。付着したアミロイドは、コンゴレッド染色 (病理診断に用いるアミロイド染色法) によっても染色され、偏光下で緑色蛍光を呈した。また、電子顕微鏡による観察像から、細胞周囲への線維状構造物の付着が観察された。チオフラビン T を用いた蛍光測定法により培地中の AApoAII 量を測定したところ、投与した AApoAII は時間経過に伴って減少した (図 4)。この現象は、細胞の非存在下および固定細胞では観察されなかったことから、培地中からのアミロイドの消失には何らかの細胞を介した機序が関与することが示唆された。AApoAII の濃度依存的に細胞生存率の有意な減少と増殖の抑制が認められた。また、アポトーシス抑制遺伝子の *Bcl2* 遺伝子にも有意な発現量の減少が認められ、細胞毒性としてアポトーシスが誘導される可能性が示唆された。



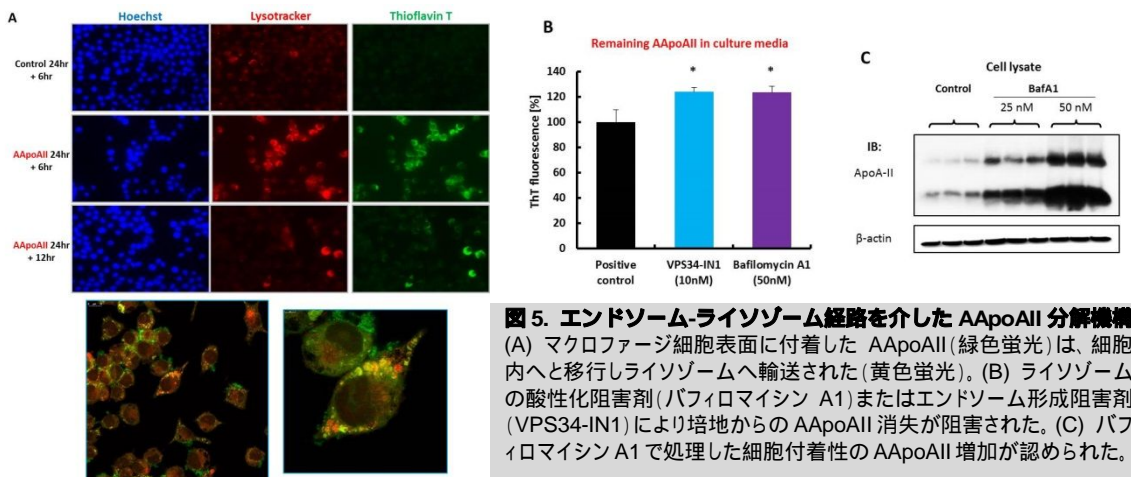
**図 3. J774A.1 細胞へのマウス AApoAII アミロイド投与**  
投与した AApoAII のマクロファージ細胞の表面への付着し細胞塊の形成が観察された。



**図 4. 細胞の存在下における培地中の AApoAII の消失**  
培地中の AApoAII は時間経過とともに消失した。培地のみ (Non cell) やパラホルムアルデヒドで処理した細胞のウエル (Fixed cell) では、蛍光の減少は見られなかった。

その後、培地を交換し、AApoAII を含まない培地で更に培養を続けた結果、時間経過とともに細胞周囲のアミロイドは細胞内へ移行し、12 時間後にはチオフラビン T の蛍光は大きく減少

した。そこで、取り込んだアミロイドの分解経路として、細胞内の様々な生体高分子の分解を担うライソゾームに着目し、ライソゾーム機能とアミロイド分解作用の関係を検証した。LysoTracker (Invitrogen)を用いたライソゾームの染色により、細胞質の AApoAII はライソゾームに局在することが観察された。また、バフィロマイシン A1 (ライソゾームの酸性化阻害剤) または VPS34-IN1 (エンドソーム膜のリン脂質生合成阻害剤) によりエンドソーム-ライソゾーム経路を阻害した上で AApoAII を投与したところ、培地中からの AApoAII の消失は有意に阻害された。バフィロマイシン A1 により処理した細胞では、投与 24 時間後に細胞に付着した AApoAII が分解されずに滞留することが観察された (図 5)。以上の結果に基づいて、*Apoa2* ノックアウトマウスに AApoAII アミロイドを投与したところ、投与 2 時間後に肝臓の抗 F4/80 抗体陽性のクッパー細胞によって貪食され、24 時間後にはほぼ消失することが認められた。



**図 5. エンドソーム-ライソゾーム経路を介した AApoAII 分解機構**  
 (A) マクロファージ細胞表面に付着した AApoAII (緑色蛍光) は、細胞内へと移行しライソゾームへ輸送された (黄色蛍光)。 (B) ライソゾームの酸性化阻害剤 (バフィロマイシン A1) またはエンドソーム形成阻害剤 (VPS34-IN1) により培地からの AApoAII 消失が阻害された。 (C) バフィロマイシン A1 で処理した細胞付着性の AApoAII 増加が認められた。

本研究により、生体にはマクロファージ細胞を介したアミロイド分解機構が備わっている可能性が示唆された。今回の研究成果は、前駆蛋白質の発現や安定性に干渉する治療薬と並行したアミロイドシスの新しい治療戦略として、食細胞の機能維持によるアミロイド分解機構の保護が有効である可能性を示唆するものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Hiroki Miyahara, Jian Dai, Xiaoran Cui, Yuichi Igarashi, Masayuki Mori, Keiichi Higuchi
2. 発表標題 A cell culture model for analysing amyloid deposit derived from mouse AApoAII amyloid fibril and serum high-density lipoprotein
3. 学会等名 3. Ulm Meeting - Biophysics of Amyloid Formation (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮原 大貴, 代 健, 崔 小冉, 五十嵐 佑一, 劉 暢, 森 政之, 樋口 京一
2. 発表標題 培養細胞系におけるAApoAIIアミロイド沈着モデルの確立
3. 学会等名 第7回日本アミロイドーシス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroki Miyahara, Xiaoran Cui, Yuichi Igarashi, Ying Li, Jian Dai, Masayuki Mori, Keiichi Higuchi
2. 発表標題 A cell culture system of mouse AApoAII amyloid deposition
3. 学会等名 Towards a cure for amyloid diseases, a successful example of precision and translational medicine (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroki Miyahara
2. 発表標題 Proteomic Analysis of Mouse AApoAII Amyloidosis
3. 学会等名 The 10th Institute for Biomedical Sciences International Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroki Miyahara, Masayuki Mori, Keiichi Higuchi
2. 発表標題 Comprehensive proteomic analysis of mouse AApoAll amyloidosis
3. 学会等名 Asian Pacific Prion Symposium 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroki Miyahara, Jian Dai, Xiaoran Cui, Yuichi Igarashi, Masayuki Mori, Keiichi Higuchi
2. 発表標題 A cell culture model for analysing amyloid deposit derived from mouse AApoAll amyloid fibril and serum high-density lipoprotein
3. 学会等名 3. Ulm Meeting - Biophysics of Amyloid Formation (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	樋口 京一  (Higuchi Keiichi)  (20173156)		
研究協力者	八谷 如美  (Hachiya Naomi)  (30408075)		
研究協力者	亀谷 富由樹  (Kametani Fuyuki)  (70186013)		