

## 論文の内容の要旨

氏名:岡林 佐知

論文題目:

The function of LGI3 in the brain: a brand-new endocytosis-associated protein in the central nervous system

(中枢神経系における新規エンドサイトーシス因子 LGI3 の機能解析に関する研究)

アルツハイマー病 (AD) は、老人斑 (SP) および神経原線維変化 (NFT) を主病変とする加齢性神経変性疾患の 1 つであり、その病態機構の全容は未だ不明のままである。SP は、アミロイド前駆体蛋白 (APP) の切断によって産生されるアミロイドβ 蛋白 (Aβ) の凝集沈着病変である。その凝集過程において形成される Aβ オリゴマーが強い神経毒性を持つこと、さらには Aβ が NFT 形成の引き金となる可能性も指摘されていることから、アミロイドカスケード (= 不要な Aβ の蓄積が AD の原因となる) と呼ばれる病態仮説が大いに支持されており、Aβ の産生抑制、または蓄積した Aβ の効率的な除去が、AD 治療薬開発の焦点となっている。近年、脳内での Aβ 除去にはグリア細胞が重要な役割を果たしているとの報告が相次いでおり、とくに脳内で最も豊富な細胞であるアストログリアの Aβ 除去機能について関心が高まっている。

そこで本研究では、アストログリアにおいて Aβ 反応性に発現上昇することが確認されている LGI3 (Leucine-rich glioma inactivated 3) に着目し、同因子がアストログリアによる Aβ 除去機能のみならず、エンドサイトーシスと呼ばれる細胞内輸送機能そのものに必須の因子であることを解明した (第 1・2 章)。さらに、ヒトに近縁な霊長類であり AD の主病変が加齢性に再現されるカニクイザル脳組織を用いて、LGI3 と Aβ 病態との関係について *in vivo* レベルでの検索を行った (第 3 章)。

### (第 1 章)

LGI3 は、ロイシンリッチリピート構造を持つ膜貫通型蛋白質の 1 つであるが、その生理学的機能は未だ解明されていない。*In vitro* 系を用いた過去の検索によって、LGI3 はアストログリアにおいて Aβ 反応性に発現上昇すること、そしてアストログリアに貪食された Aβ が細胞膜近辺にて LGI3 と共存することから、LGI3 はアストログリアによる Aβ 貪食に関与している可能性が示唆されている。グリア細胞による Aβ 貪食は、エンドサイトーシスと呼ばれる一連の膜融合輸送系によって支配されており、LGI3 が神経系細胞のエンドサイトーシス機能自体に関与している可能性が考えられる。そこで、Aβ 貪食の *in vitro* モデルとして広く用いられているラットアストログリア初代培養系を用いて、LGI3 とエンドサイトーシスおよび Aβ 貪食機能との関係について検索した。

まず免疫染色によって LGI3 の細胞内局在を検索したところ、主に細胞膜近辺に顆粒状に確認された。エンドサイトーシス小胞の細胞内輸送を阻害する薬剤 (ただし、エンドサイトーシスに

よる取り込みそのものには直接関与しない) であるクロロキンや 塩化アンモニウムを培養液に添加したところ、LGI3 の小胞内蓄積が確認された。このことから、LGI3 が実際にエンドサイトーシス経路に局在することが証明された。

次に、LGI3 が A $\beta$  貪食およびエンドサイトーシス機能に関与しているかどうかを検索するため、LGI3 に特異的な配列の siRNA を作製してラットアストログリア細胞に導入し、RNA 干渉法による解析を行った。その結果、siRNA の導入により A $\beta$  貪食が著しく低下したことから、LGI3 がアストログリアによる A $\beta$  貪食機能に必須の因子であることが明らかになった。さらに、LGI3 の発現を抑制するとトランスフェリンの細胞内取り込みも著しく低下することが明らかになった。近年の研究成果により、A $\beta$  の取り込みとトランスフェリンの取り込みは異なるエンドサイトーシス経路によって支配されていると考えられている。これらのことから、LGI3 は A $\beta$  貪食のみならず、エンドサイトーシス機能そのものにも必須の因子である可能性が示唆された。

AD 病態下におけるアストログリア反応は炎症性サイトカインとの関連性が指摘されており、そのうち最も中心的な役割を果たすのが IL-1 $\beta$  であると考えられている。そこで、ラットアストログリア細胞の培養液中に IL-1 $\beta$  を添加して LGI3 蛋白の発現量変化を調べたところ、予想に反して有意な変化は認められなかった。このことから、A $\beta$  刺激に対する LGI3 の反応は、炎症性ではなく生理的なものであることが示唆された。

## (第 2 章)

アストログリアにおける LGI3 の機能が明らかとなったが (第 1 章)、神経細胞でも同じ機能を持つか否かは不明である。そこで、神経細胞系セルラインである Neuro2a 細胞を用いて RNA 干渉法による検索を行ったところ、同細胞においても LGI3 がエンドサイトーシスに必須の因子であることが明らかとなった。さらに、マウス脳を用いて *in vivo* での LGI3 局在を免疫組織化学的に検索したところ、灰白質・白質を問わず、神経細胞やグリア細胞の細胞膜を中心に発現していることが明らかとなり、第 1 章で確認した *in vitro* での局在性と一致していた。

エンドサイトーシスには様々な経路が存在しており、トランスフェリンはクラスリン依存性であることが知られている。一方、A $\beta$  のエンドサイトーシス経路については議論が続いているが、近年の研究報告では非クラスリン依存性・脂質ラフト依存性経路である可能性が指摘されている。このことから、LGI3 はクラスリンのみならず、脂質ラフトとも共役してエンドサイトーシスに関与しているものと考えられる。そこで次に、LGI3 とエンドサイトーシス関連蛋白との関係性を明らかにするため、Neuro2a 細胞を用いてクラスリンおよびフロチリン 1 (=脂質ラフト依存性経路の重要蛋白) と LGI3 との共在性を確認した。その結果、LGI3 とクラスリンは細胞膜近辺でのみ部分的に共在していたのに対し、フロチリン 1 は細胞全域においてほぼ完全に LGI3 と共在することが明らかとなった。*In vivo* における両者の関係性を確認するためマウス脳を用いて同様の検索を行ったところ、LGI3 はマウス脳においてもフロチリン 1 とほぼ完全に共在していることが確認された。さらに両者の結合性を確認するため、マウス脳抽出物を用いて免疫沈降試験を行ったところ、LGI3 がフロチリン 1 と複合体を形成していることが明らかとなった。一

方、クラスリンとの間には明確な複合体の存在は確認されなかった。

LG13 とフロチリン 1 の複合体（以降、LG13/Flo1 とする）について、Neuro2a 細胞を用いてより詳細な検索を行ったところ、LG13 の発現抑制はフロチリン 1 の蛋白量減少を引き起こし、フロチリン 1 の発現抑制もまた LG13 の蛋白量減少を誘導した。このことから、LG13 とフロチリン 1 は、複合体を形成することによって蛋白構造の安定性を維持していることが示唆された。一方、LG13 を発現抑制してもクラスリンの蛋白量には変化が見られなかった。

近年、APP からの A $\beta$  切断産生にエンドサイトーシスが関与しているとの報告が増加しており、脂質ラフトもまた A $\beta$  切断産生の場合として注目を浴びている。そこで、LG13/Flo1 と A $\beta$  産生との関係を検索したところ、LG13/Flo1 の発現抑制はエンドサイトーシス抑制のみならず、APP の細胞内局在を変化させることで A $\beta$  産生を低下させることが明らかとなった。これらの結果から、LG13 はフロチリン 1 との複合体形成を介して、APP の細胞内輸送にも関与することが明らかとなった。

### （第 3 章）

第 3 章では、ヒトに近縁な霊長類であり、SP や NFT が加齢性に再現されるカニクイザルの脳組織を用いて、LG13 と加齢性 AD 病変との関係について検索した。免疫染色の結果、カニクイザル脳組織においても LG13 の局在が確認され、加えてクラスリンやフロチリン 1 との共在も確認された。さらに、アストログリアに貪食された A $\beta$  と LG13 の共在も確認されたことから、*in vivo* でも LG13 がアストログリアによる A $\beta$  貪食に関与していることが明らかになった。一方、SP との共在は確認されなかったことから、LG13 は SP 形成には関与していないと考えられた。

カニクイザル脳抽出物を用いた生化学的検索の結果、脳内では加齢に伴って LG13 が増加することが明らかとなった。カニクイザル脳組織では、加齢に伴いエンドサイトーシス機能が低下し、A $\beta$  が蓄積することが確認されている。即ち、エンドサイトーシス機能低下とアストログリアによる LG13 の発現量上昇が、複合的に LG13 増加を促している可能性が示唆された。

カニクイザル脳抽出物を用いた免疫沈降試験の結果、LG13 がフロチリン 1 のみならずクラスリンとも結合していることが明らかとなった。この結果から、LG13 がクラスリン依存性経路と脂質ラフト依存性経路の双方に関与していると考えられた。

以上の結果から、LG13 は神経系細胞における新規エンドサイトーシス関連因子であることが証明され、アストログリアにおける A $\beta$  貪食と、神経細胞における A $\beta$  産生の両面において、AD 病態に深く関与している可能性が示唆された。これらのことから、本研究によって LG13 が AD 治療の新たな創薬ターゲットとなる可能性が示唆されたとともに、エンドサイトーシスという生理学的機能そのものの解明にも大きく貢献できたと考えた。