クライオ電子線トモグラフィー法を用いたシヌクレイノパチー病態機構の解明

In situ visualization of synucleinopathy-associated pathogenesis by cryo-electron tomography

所属機関：東京都医学総合研究所　代表研究者氏名：樽谷　愛理
研究期間：2022 年 4 月 1 日～2023 年 3 月 31 日
滞在研究機関：　Institute of Neuropathology, University Medical Center Göttingen
Göttingen, 37077, Germany
共同研究者等：　Prof. Rubén Fernández-Busnadiego

Synucleinopathies are a subset of neurodegenerative diseases characterized by α-synuclein (α-syn) aggregates in neurons and/or glial cells. In Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies, α-syn accumulates in neuronal cell bodies and neurites as Lewy bodies and Lewy neurites, while in multiple system atrophy, α-syn is observed as glial cytoplasmic inclusions in oligodendrocytes. Distribution and spreading of these α-syn pathologies have been reported to be closely correlated with clinical symptoms. A possible mechanism to explain this intracerebral expansion of α-syn pathology is prion-like propagation, in which α-syn aggregates self-amplify and spread in the brain. Although the molecular mechanism of prion-like propagation is poorly understood, numerous reports of experimental α-syn aggregation and propagation *in vitro* and *in vivo* support this hypothesis. Recently, it has also been proposed that the clinicopathological diversity in synucleinopathies can be explained by the formation of structural polymorphisms of α-syn aggregates. In this study, I performed *in situ* visualization of neurons differentiated from embryonic stem cells by cryo-electron tomography and establishment of α-syn aggregation model in differentiated neurons to clarify the mechanism of α-syn aggregation in different cell types.

研究目的

アルツハイマー病やパーキンソン病等の神経変性疾患患者脳では、疾患ごとに特徴的な異常型タンパク質病変が神経細胞やグリア細胞で観察される。異常型タンパク質病変の脳内分布と広がりは臨床症状と強く相関することが示されている。異常型タンパク質がプリオンのように自己増殖し、細胞間伝播するプリオン様伝播は、この病変拡大を説明するメカニズムとして提唱され、実験的に証明されている。さらに、異常型タンパク質病変を構成する病因タンパク質はアミロイド様線維に構造変化しており、その構造多型が同一プロテイノパチー内の臨床病理学的多様性に関与すると考えられる。本研究では、αシヌクレイン(α-syn)の蓄積を特徴とするシヌクレイノパチーの病態形成に寄与する細胞環境因子を明らかにすることを目的として、胚性幹細胞から分化した神経細胞及びオリゴデンドロサイトのクライオ電子線トモグラフィー法による解析、及びこれらの細胞を用いたα-syn 凝集モデルの確立を行う。

研究経過

米国の共同研究先より供与された遺伝子改変型ヒト胚性幹細胞(H9-NGN2 細胞, Fig. 1a)についてドキシサイクリン存在下における神経細胞誘導を行った。NGN2 の過剰発現により、10 日前後で H9-NGN2 細胞が MAP2 陽性の神経細胞に分化することを確認した(Fig. 1b)。まず、これらの分化した神経細胞をポリオルニチン/ラミニンコーティングした Au もしくはシリコン(SiO_2)メンブレングリッド上で培養した。数週間の培養後、SiO_2 グリッド上においてより高い生

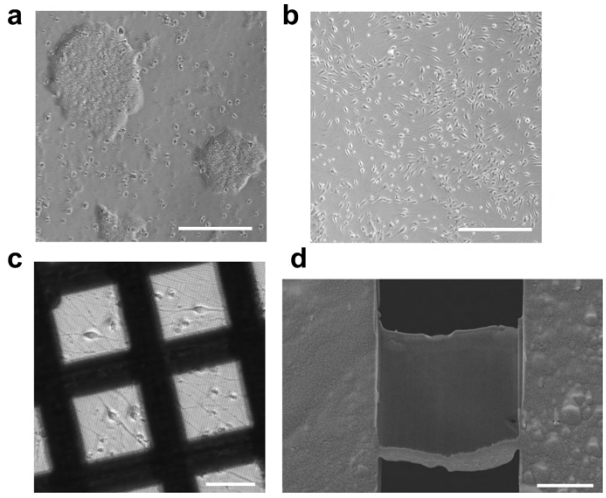

Fig. 1 Electron microscopy sample preparation using differentiated neurons from H9-NGN2 cells **a.** Image of H9-NGN2 before differentiation. Scale bar, 300 μm. **b.** Image of differentiated neurons 10 days after doxycycline-induced differentiation. Scale bar, 300 μm. **c.** Culture of differentiated neurons on a SiO_2 TEM grid. Scale bar, 50 μm. **d.** Lamella from differentiated neurons by focused ion beam milling. Scale bar, 3 μm.

存率が確認された(Fig. 1c)。よって神経細胞を培養した SiO_2 グリッドを Vitrobot により瞬間凍結した。さらに、凍結グリッド上の神経細胞体を標的部位とし、クライオ収束イオンビーム(FIB)走査型電子顕微鏡を用いたグリッド試料の加工を行った。これによりクライオ電子線トモグラフィー観察に適した厚さである 100-200nm 程の FIB 試料を得た(Fig. 1d)。これらの FIB 試料の連続傾斜像(-45 度から +45 度)はクライオ電子顕微鏡を用いて撮影され、得られた二次元像を基に三次元像(トモグラム)を再構築した。その結果、神経細胞を構成する主要なオルガネラである核、ミトコンドリア、ゴルジ体、リボソーム、微小管等が観察された(Fig. 2)。

次に H9-NGN2 細胞から分化した神経細胞におけるα-syn 凝集をクライオ電顕トモグラフィー法により観察するために、α-syn 凝集モデルの確立を行った。大量培養した大腸菌からリコンビナントヒト野生型及び変異型 A53Tα-syn を精製し、37 度における 5 日間の震盪により線維化α-syn を調製した。これらを細胞内でα-syn 凝集を誘導するシードとし、分化開始後 14 日目の神経細胞へ添加した。しかしながら、線維化α-syn の添加から 14 日後の免疫組織染色においてリン酸化α-syn 陽性細胞は検出されなかった。分化した神経細胞のイムノブロット及び質量分析によりα-syn 発現量がヒト脳に比べて低く、その発現量は分化開始から経時的に増加することが明らかとなった。そこで分化から 30 日経過した神経細胞に線維化α-syn を添加し、リン酸化α-syn 陽性凝集体が形成されるかを検討した。線維化α-syn の添加から 14 日ではリン酸化α-syn 陽性細胞は観察されなかったが、添加から 30 から 45 日後にリン酸化α-syn 陽性細胞が観察された。しかしながら、凝集体を保持する細胞数が少なく観察標的としては不十分であることから、α-syn を一過性に発現させた神経細胞を用いて同様の実験を行った。GFP-α-syn を発現する神経細胞に線維化α-syn を添加すると、添加から 4 日後にリン酸化α-syn 陽性細胞が検出され、添加から 14 日後においても GFP シグナル及びリン酸化α-syn が検出された。よって SiO2 グリッド上の神経細胞に GFP-α-syn を発現させ、2 日後に線維化α-syn の添加を行った。線維化α-syn の添加から 14 日後のグリッドを凍結し、クライオ蛍光顕微鏡を用いた観察を行った。その結果、神経細胞体及び突起において、GFP 陽性のパンクタが多数見られた。免疫組織染色により、これらのパンクタがリン酸化α-syn 陽性であることが確認された。よって今後は、これらの GFP 及びリン酸化α-syn 陽性パンクタを標的とした FIB 試料の作製及びクライオ電子顕微鏡による連続傾斜像の撮影、

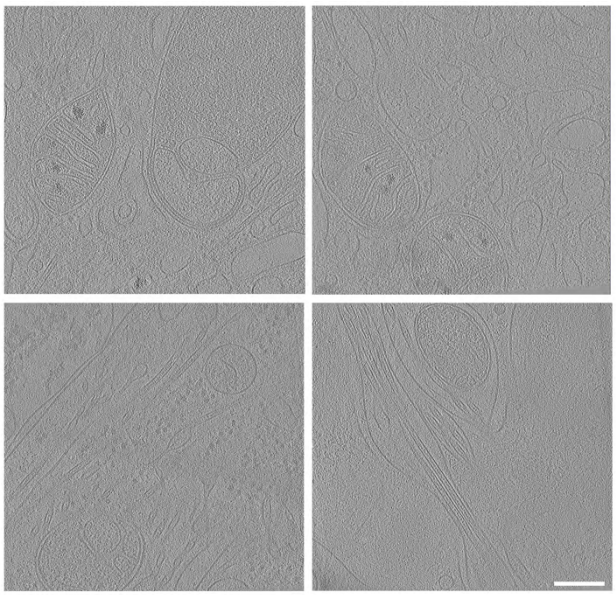

Fig. 2 Cryotomographic slices obtained from differentiated neurons from H9-NGN2 cells. Scale bar, 200 nm.

三次元再構築を行い、神経細胞内α-syn 凝集に寄与するオルガネラ及び細胞内環境を明らかにする。さらに、オリゴデンドロサイトの株化細胞及び遺伝子改変型ヒト胚性幹細胞から分化したオリゴデンドロサイトを用いたα-syn 凝集モデルの確立を行い、神経細胞とオリゴデンドロサイトにおける細胞環境の違いがα-syn 凝集に与える影響について、比較検討を行う。

考察

H9-NGN2 細胞から分化した神経細胞体から得られたトモグラムにおいて多数のオルガネラが確認され、同様のアプローチが神経細胞内に蓄積するα-syn 凝集体及び細胞環境の観察に有用であることが示された。また GFP-α-syn が線維化α-syn の添加によりリン酸化α-syn 陽性のパンクタを形成したことは、GFP-α-syn が凝集体を形成し、これらを標的とした FIB 試料作製によりα-syn 凝集体を可視化できることを示唆する。同様のパンクタが線維化α-syn の添加によりオリゴデンドロサイト内で形成される場合には、神経細胞とオリゴデンドロサイトにおける細胞環境の比較が可能になり、細胞内で形成されたα-syn 凝集体の構造学的、生化学的性質の違いを検討する。

研究の発表

誌上発表

1.「クライオ電子線トモグラフィ法を用いた神経変性疾患の病態解明」 樽谷愛理、Rubén Fernández-Busnadiego、医学のあゆみ Vol. 283, 2022. 12. 24