

A_β凝集による細胞運動の阻害とロスマリン酸によるその緩和効果の評価

Evaluation of A_β Aggregation-Induced Inhibition of Cell Migration and Its Alleviation by Rosmarinic Acid

○茂泉燈1、藤原綾香2、倉賀野正弘2、徳樂清孝2、

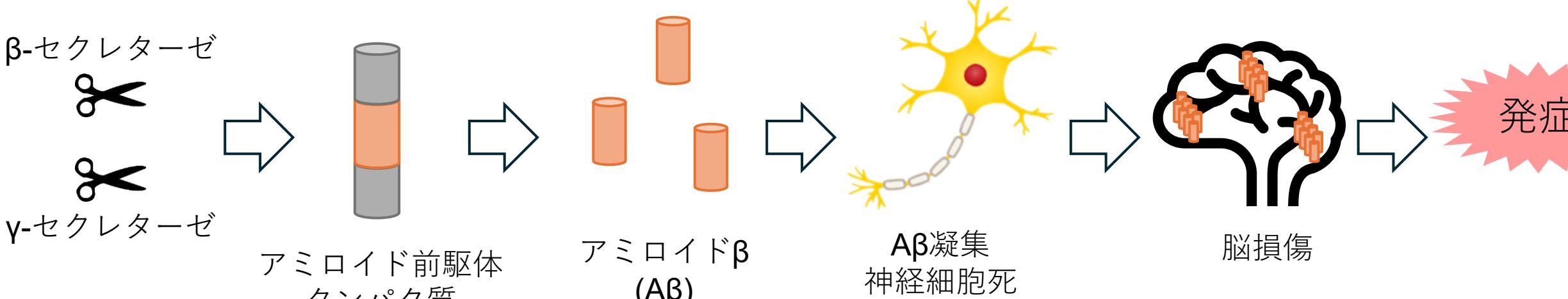
1室蘭工業大学理工学部、2室蘭工業大学大学院工学研究科

1 Faculty of Science and Engineering, 2 Graduate School of Engineering, Muroran Institute of Technology

Introduction

アルツハイマー病 (J. Hardy et al., 2002)

- 進行性の記憶障害などを特徴とする神経変性疾患
- アミロイド前駆体タンパク質から切り出されたアミロイド β が脳内に凝集・蓄積することで神経細胞死を誘発し、脳の一部が損傷して発症すると考えられている



神経細胞の遊走 (L.C. Abbott et al., 2020) (N. Kaneko et al., 2009) (N. Kaneko et al., 2010)

新生ニューロン ... 新たに生成された神経細胞のこと

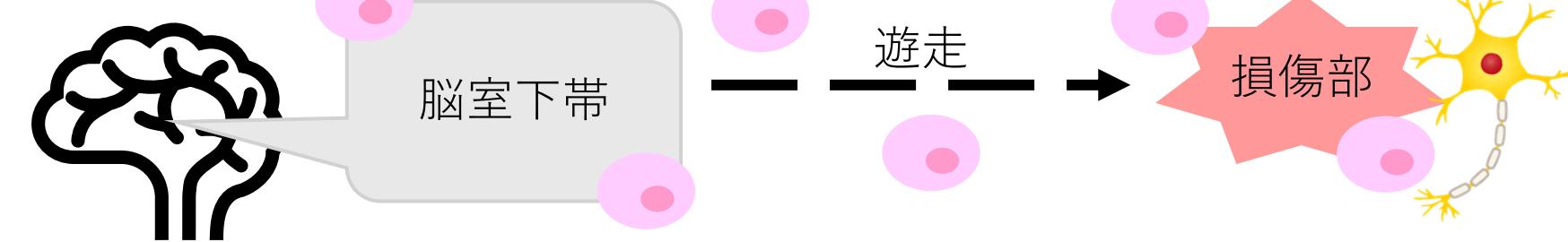
以前...

成体脳では新しいニューロンは形成されない

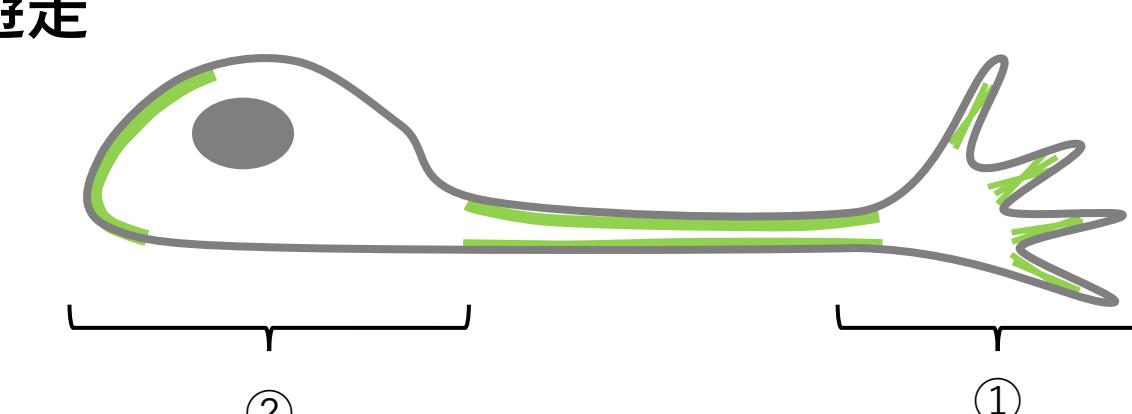
近年...

成体脳でも、海馬と脳室下帯の神経幹細胞で新生ニューロン

が産生される



細胞遊走



・神経細胞の遊走 : 成長円錐の伸長と体節の移動の二段階 (M. Kengaku et al., 2018)

①先端に先行突起を形成 (A.J. Ridley et al., 2003) (A. Steinbecke et al., 2014)

アクチン線維からなるラメリポディアやフィロポディアを持つ

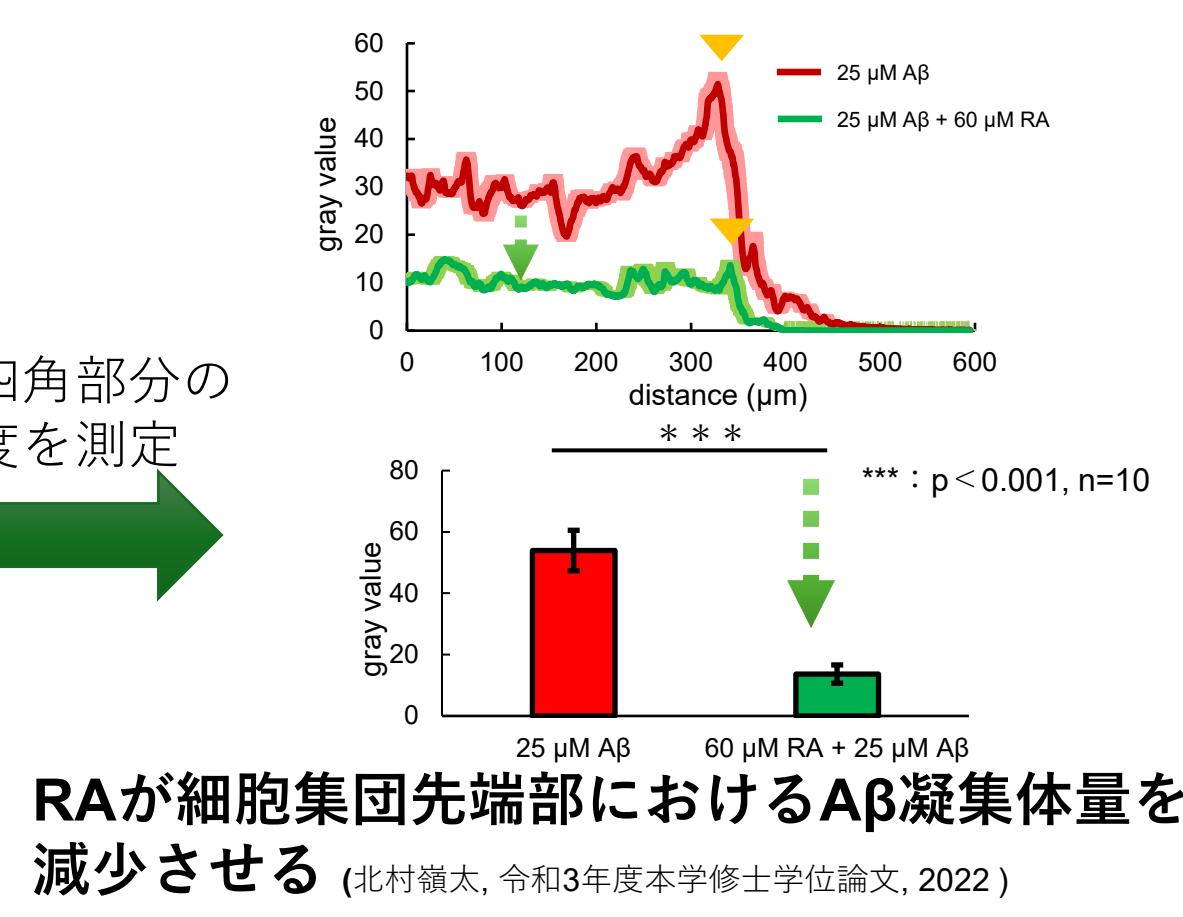
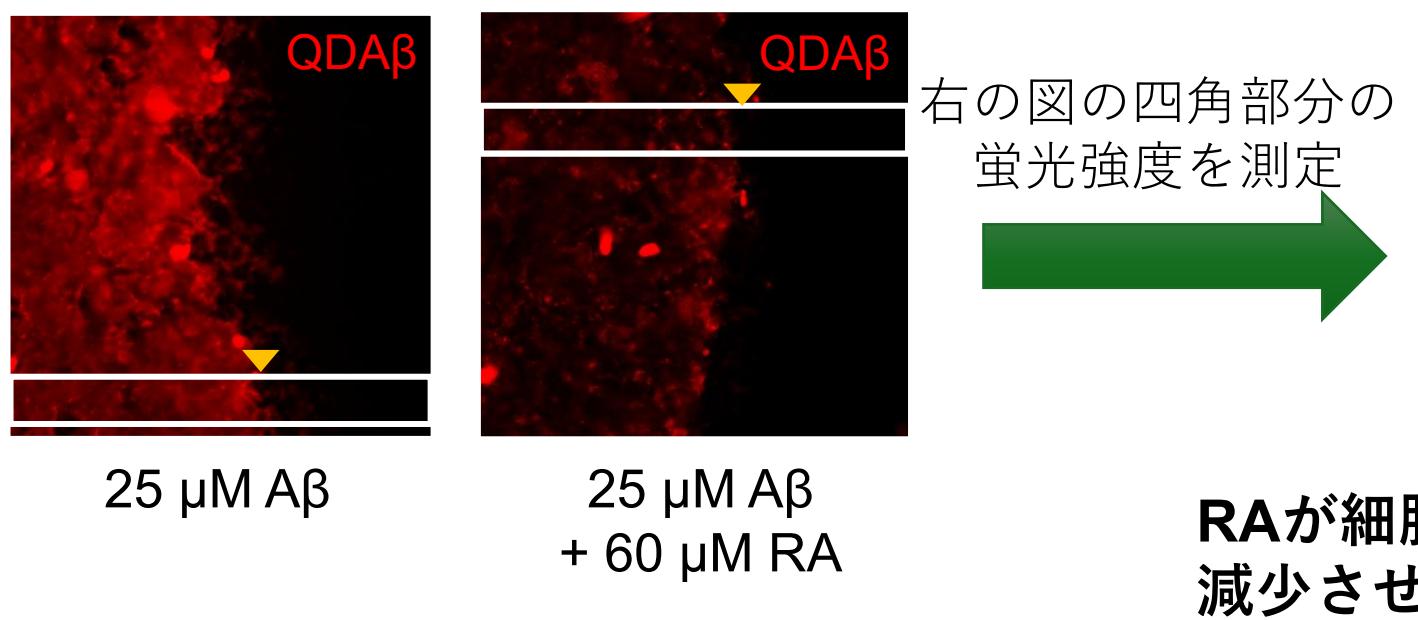
②核の移動 (M. Kengaku et al., 2018) (A. Steinbecke et al., 2014)

アクチン線維などの細胞骨格の力が核や細胞体の移動を駆動

細胞の遊走にはアクチン線維が重要な役割

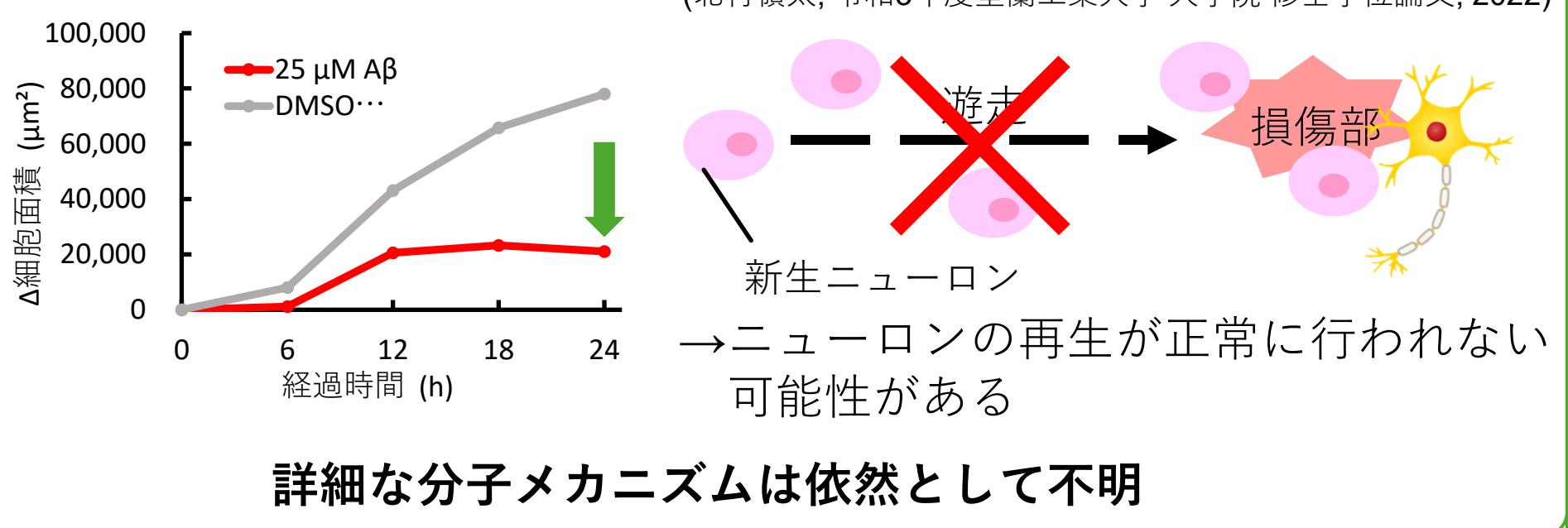
ロスマリン酸 (RA)

- シソ科植物に含まれるポリフェノール
- A_β凝集阻害活性を示す (Y. Ishigaki et al., 2013)



A_β凝集体による細胞遊走の阻害

当研究室では過去にPC12細胞の遊走が細胞表面へのA_β凝集体の沈着によって阻害されることを明らかにしている (北村慎太, 令和3年度室蘭工業大学 大学院修士論文, 2022)



目的

- 細胞表面へのA_β凝集体の沈着が細胞運動に関わるアクチンの重合状態に及ぼす時空間的影響を解析
- A_β凝集阻害活性が知られているロスマリン酸を用いることで、遊走能力を回復できるかどうかを検討

PC12細胞

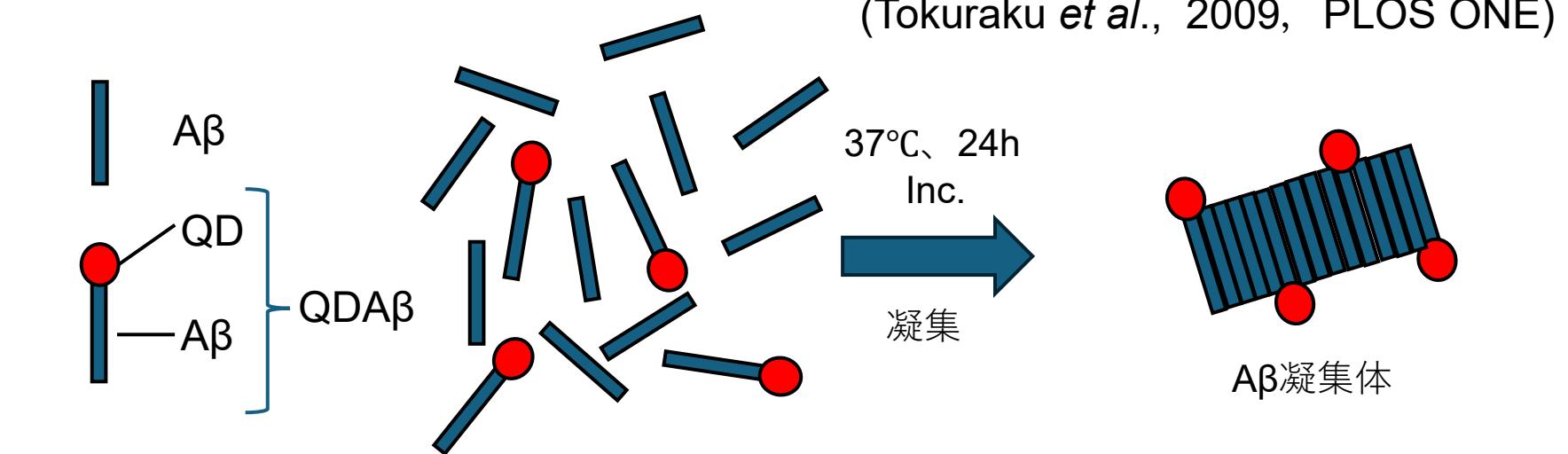
...神経モデル細胞であるラット副腎髓質褐色細胞腫

ウェルプレートに播種したPC12細胞にNGF (Never growth factor) を添加することで、PC12細胞を神経化させる。

Method

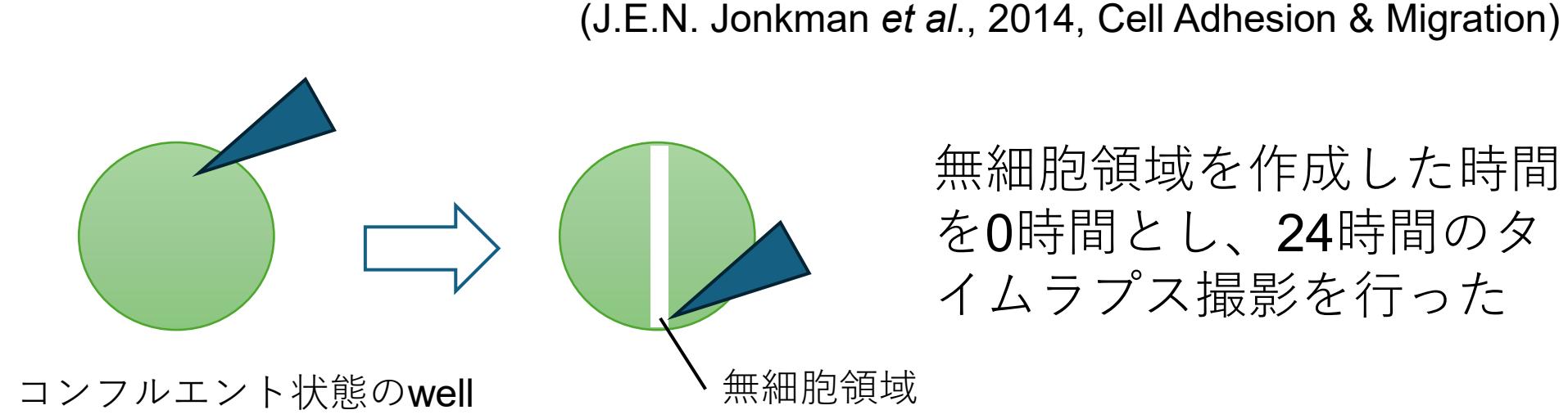
量子ドットによるA_β凝集体の可視化

量子ドット (QD) とA_βを化学架橋し、QDA_βを作成
QDA_βと未標識A_βを混合することで、蛍光顕微鏡による
A_β凝集体形成過程の観察が可能になる



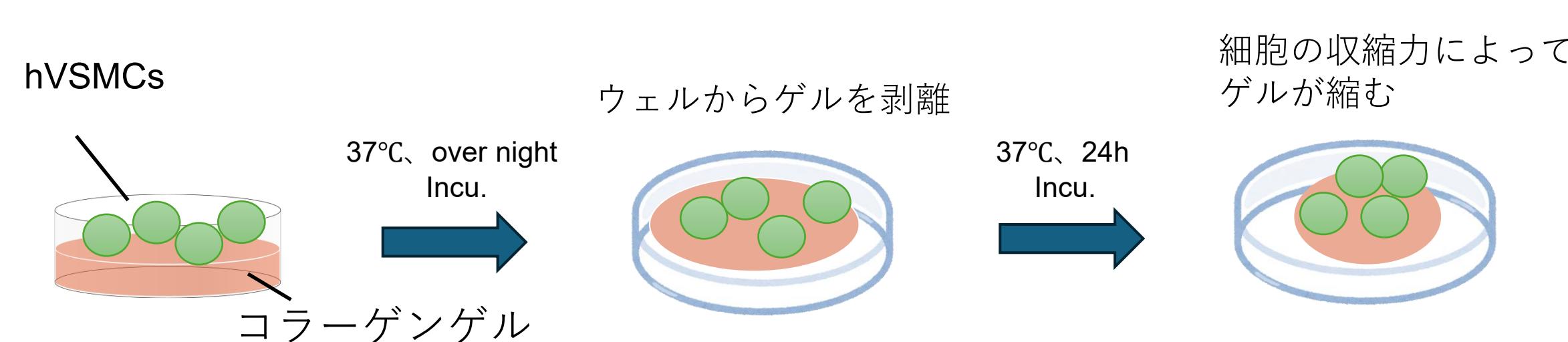
Wound healing Assay (WHA)

細胞の遊走能力を評価する手法
コンフルエント状態の単層培養細胞層の中心に爪楊枝で傷をつけ、無細胞領域を作成し、細胞が遊走する様子を観察する



Gel contraction assay (GCA)

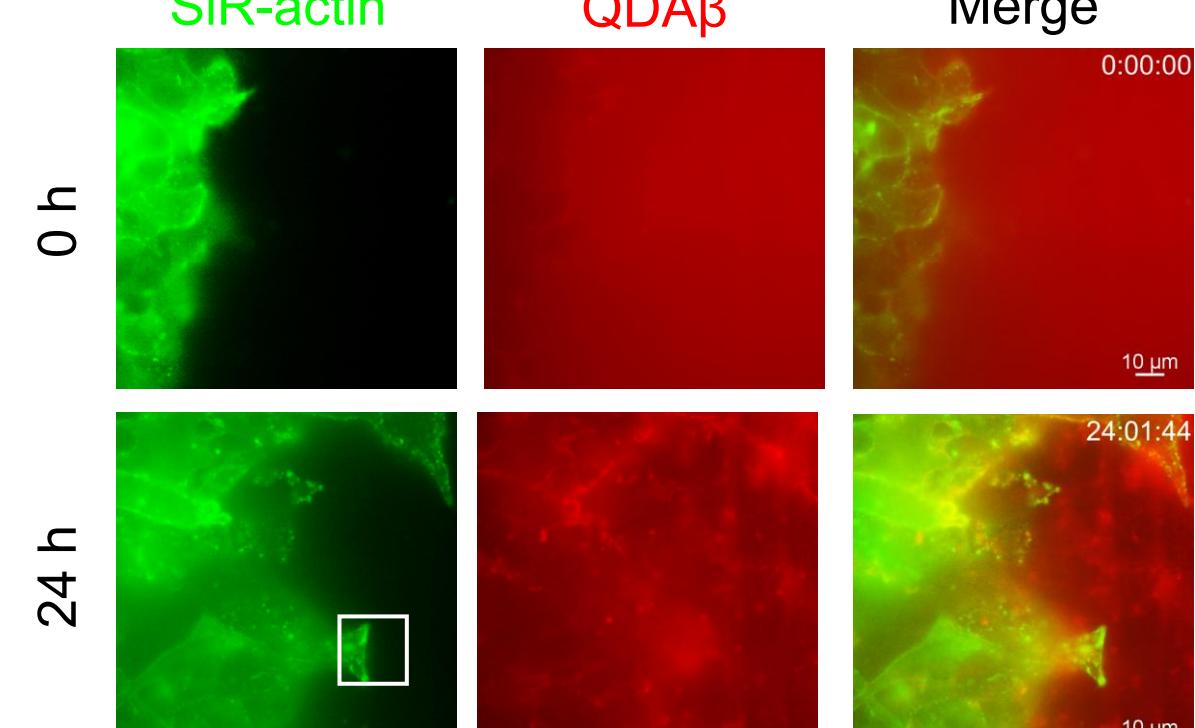
細胞収縮性を評価する方法 (Qing Zhang et al., 2022, European Journal of Cell Biology)
今回の実験では、コラーゲンゲル Type I-A上に細胞を播種した



Results

遊走時のアクチン細胞骨格とA_β凝集

20 μM A_βと25 nM QDA_βを加えて、24時間インキュベートした後WHAを行った。

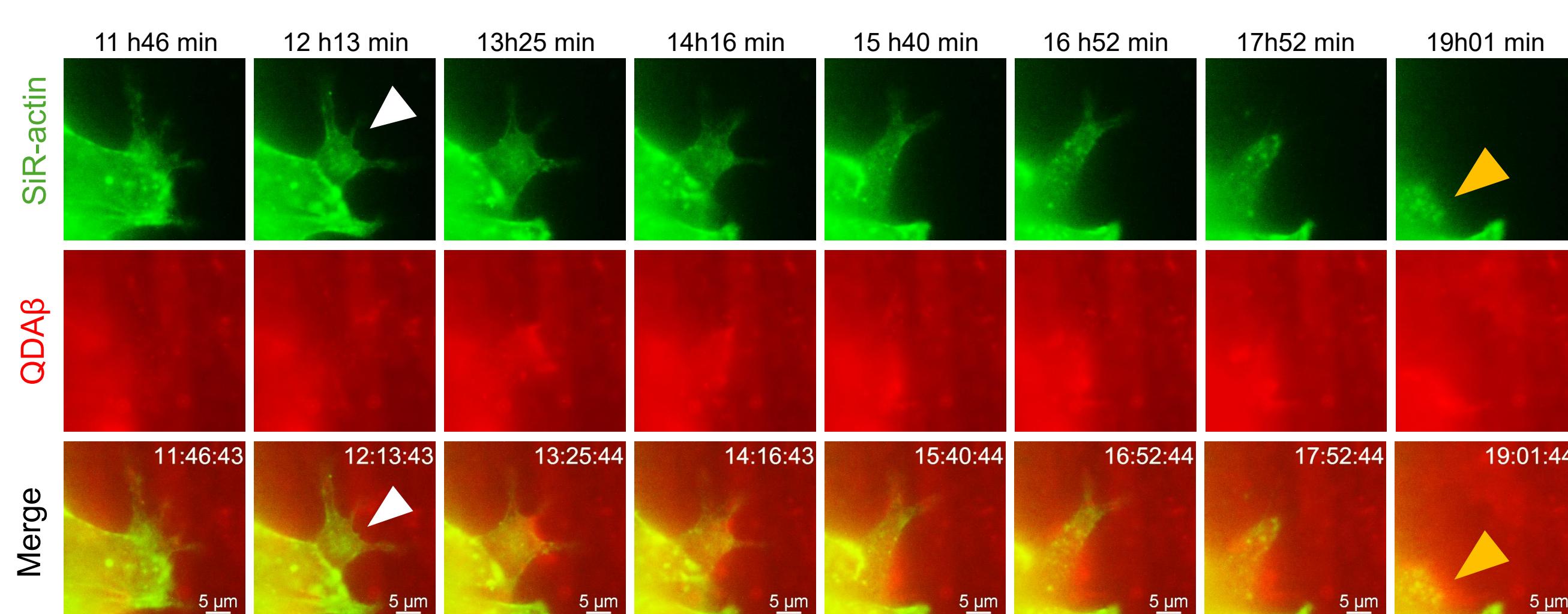


SiR-actin (Lukinavicius et al., 2014, Nature Methods) を用いて生細胞のF-actinとA_β凝集体を同時に可視化した。

SiR-actin
✓細胞透過性
✓低毒性

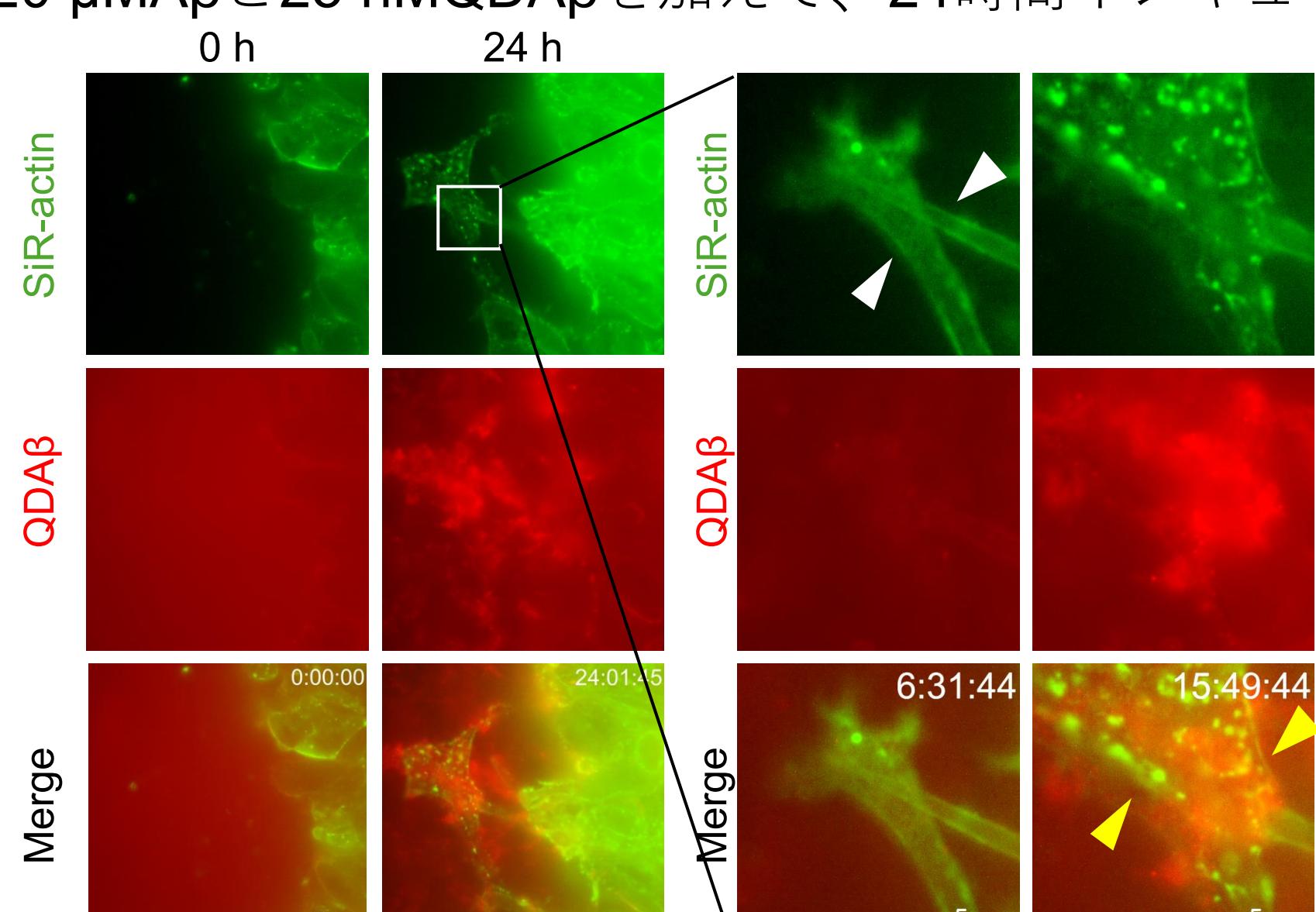
細胞周辺でA_βが凝集

上の図の白い四角で囲んだ部分を拡大し、時系列順に並べた



突起部分にA_βが凝集(白矢印)後、突起が退縮(黄矢印)
突起形成の抑制により遊走が阻害

20 μM A_βと25 nM QDA_βを加えて、24時間インキュベートした際のアクチンの様子を観察した



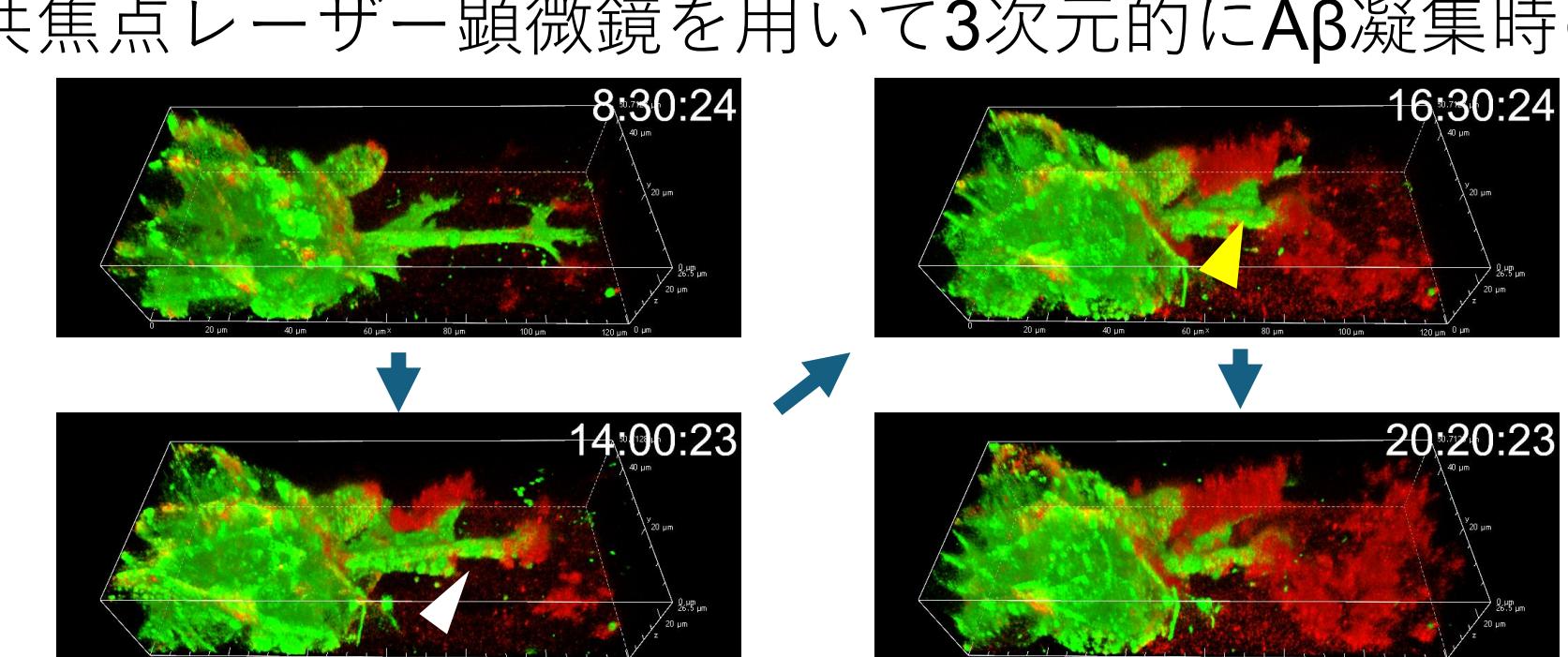
A_β添加直後の神経突起周辺において、ストレスファイバーが存在していた(白矢印)

A_β凝集体が細胞表面に沈着

ストレスファイバーが崩壊し、アクチンの異常な凝集を確認(黄矢印)

ストレスファイバー
細胞の遊走と形態維持に重要な役割を示す

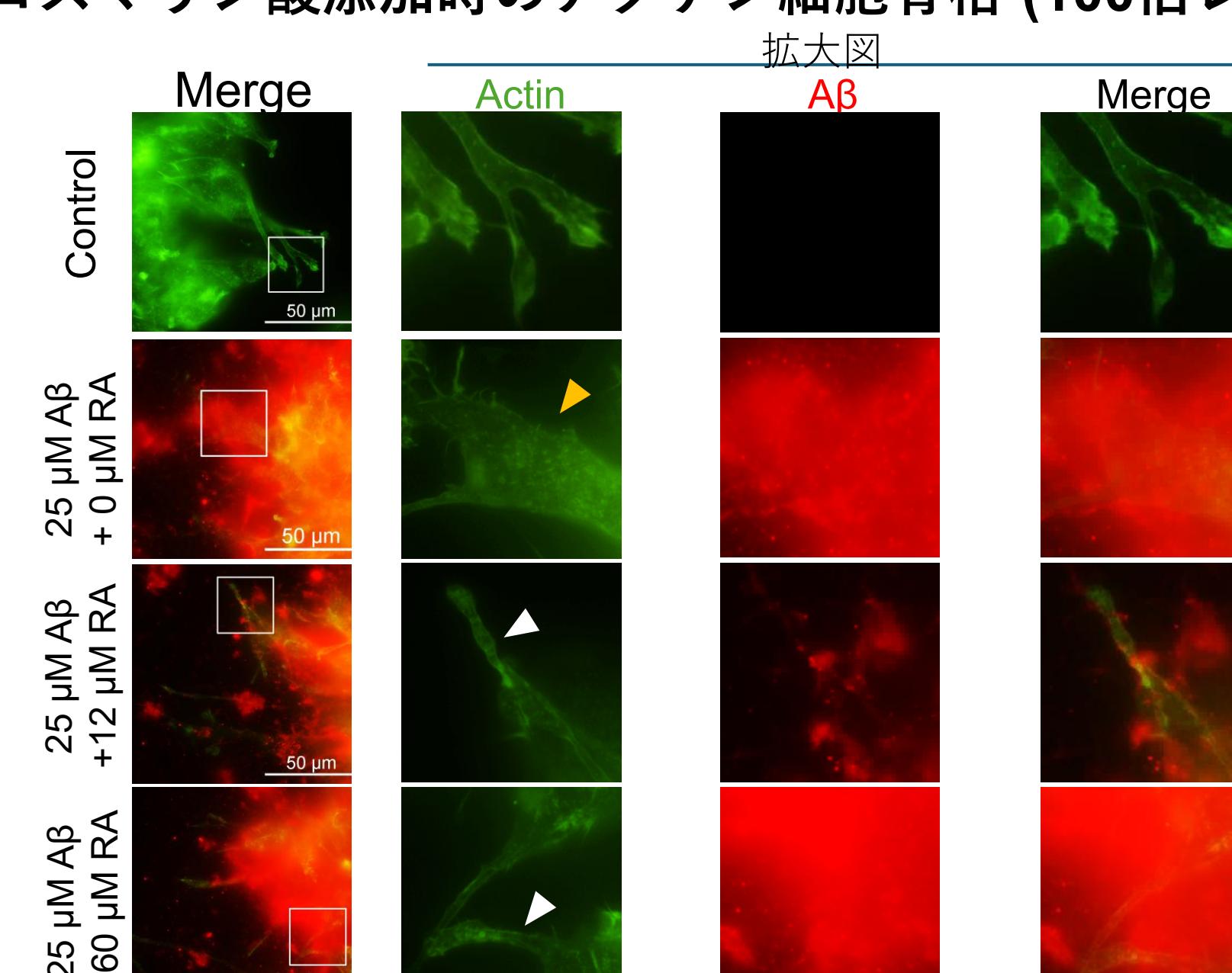
共焦点レーザー顕微鏡を用いて3次元的にA_β凝集時のアクチンの様子を観察した



3次元でも突起部分でA_βが凝集し(白矢印)、突起部分が退縮する様子を観察
突起周辺に凝集したA_β凝集体が退縮する突起と共に細胞側へ引き寄せられていいく様子を観察(黄矢印)

細胞突起の運動がさらなるA_β凝集体の蓄積を招く可能性を示唆

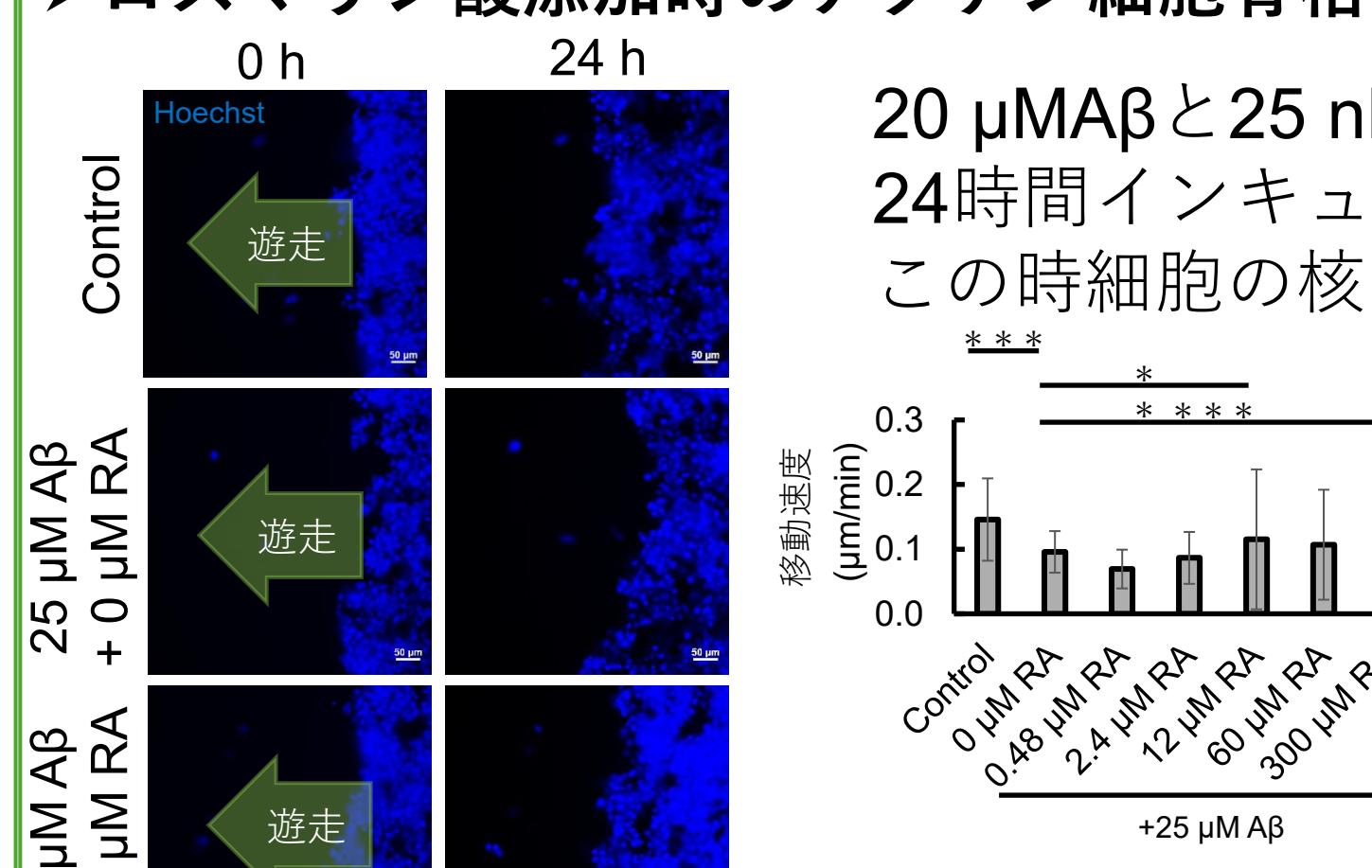
ロスマリン酸添加時のアクチン細胞骨格 (100倍レンズ)



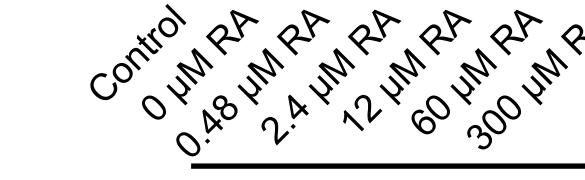
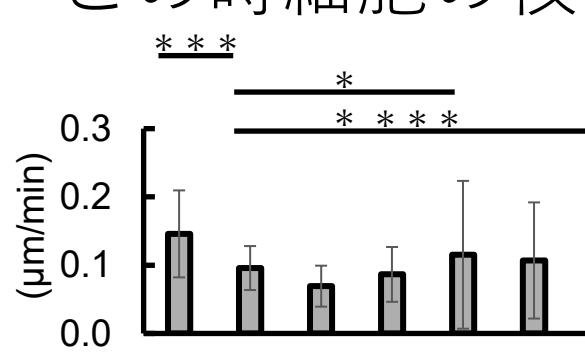
- 25 μM A_β存在下ではアクチン繊維が崩壊している様子が確認できた(黄矢印)
- 12 μM RA、60 μM RAの存在下ではアクチン線維が確認できた(白矢印)

12 μM RA、60 μM RAにはA_β凝集によるアクチン線維の崩壊を防ぐこと効果ある可能性が示された

ロスマリン酸添加時のアクチン細胞骨格 (100倍レンズ)



20 μM A_βと25 nM QDA_βと同時にRAを加えて、WHAを行い、24時間インキュベートした後観察した
この時細胞の核をヘキストを用いて染色した



$$\text{方向持続性} = \frac{\text{直線距離}}{\text{移動距離}}$$

これらの値を量化し評価

*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001

*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001

*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001

*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001

*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001

*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001

*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001

*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001

*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001

*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001

*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001

*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001

*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001

*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001

*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001

*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001

*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001

*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001

*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001

*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001

*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001

*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001

*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001

*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001

*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001

*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001

*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001

*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001

*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001

*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001

*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001

*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001

*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001

*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001

*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001

*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001

*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001

*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001

*p < 0.05, **p <