

神経変性疾患の原因となる小胞輸送系の異常と、  
小胞輸送系制御による疾患治療への応用に関する研究

2023

大西恭弥

## ■ 目次

本論文で用いた省略形.....	2
第1章 SNARE タンパク質に着目した, 老化脳におけるオートファジー活性低下メカニズムの解明	
1-1. 緒論.....	4
1-2. 実験結果.....	7
1-3. 考察.....	22
第2章 小胞輸送系制御による, より効果的な遺伝子治療法の開発	
2-1. 緒論.....	25
2-2. 実験結果.....	27
2-3. 考察.....	40
第3章 実験試料及び方法.....	44
参考文献.....	52

## ■ 本論文で用いた省略形

AAV	Adeno-associated virus
ANOVA	Analysis of variance
BSA	Bovine serum albumin
BW	Body weight
CALM	Clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia
Cdc42	Cell division cycle 42
CDK5	Cyclin dependent kinase 5
CLIC/GEEC	Clathrin-independent carriers/ Glycosylphosphatidylinositol-anchored-protein-enriched endosomal compartment
CMV	Cytomegalovirus
COPII	Coat protein II
DHE	Dihydroethidium
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EEA1	Early endosome antigen 1
EGF	Epidermal growth factor
EIPA	5-(N-Ethyl-N-isopropyl)-Amiloride
FBS	Fetal bovine serum
FIP200	FAK family-interacting protein of 200 kDa
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GFP	Green fluorescent protein
GM130	Golgi matrix protein 130 kDa
GSK3 $\beta$	Glycogen synthase kinase 3 $\beta$
GWAS	Genome-wide association study
HEK293	Human embryonic kidney cell 293
IRGM	Immunity related GTPase M
ITR	Inverted terminal repeat
LAMP1	Lysosomal-associated membrane protein 1
LAMP2	Lysosomal-associated membrane protein 2
LC3	Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3
mTORC1	Mammalian target of rapamycin complex 1
NeuN	Neuronal nuclei
PAS	Pre-autophagosomal structure
PCC	Pearson's correlation coefficient
PBS	Phosphate-buffered saline

PBS-T	0.1% Tween 20/PBS
PFA	Paraformaldehyde
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
PVDF	Polyvinylidene difluoride
p38 MAPK	p38 mitogen-activated protein kinase
q-PCR	quantitative polymerase chain reaction
Rab5	Ras-related protein Rab-5
Rac1	Ras-related C3 botulinus toxin substrate 1
Rubicon	Run domain protein as Beclin 1 interacting and cysteine-rich containing
SMN1	Survival motor neuron 1
SNAP29	Synaptosomal-associated protein 29
SNARE	soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor
SPF	Species of pathogen free
STX17	Syntaxin 17
STX7	Syntaxin 7
TBS	Tris-buffered saline
TBS-T	0.1% Tween 20/TBS
TMR	Tetra methyl rhodamine
ULK1	Unc-51 like autophagy activating kinase
VAMP8	Vesicle-associated membrane protein 8
vg	Vector genome
WIPI4	WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 4
WPRE	Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element

## ■ 第1章 SNARE タンパク質に着目した、老化脳におけるオートファジー活性低下メカニズムの解明

### 1-1 緒論

オートファジーは酵母からヒトに至るまで高度に保存された細胞内成分の分解機構であり、生体の恒常性維持において重要な機能を担っている。オートファジーによる分解においては、まず隔離膜と呼ばれる構造体が細胞内成分を取り囲むことでオートファゴソームを形成し、オートファゴソームがリソソームと融合することで、リソソーム内部の加水分解酵素の働きによって内容物を分解する (Fig. 1)。

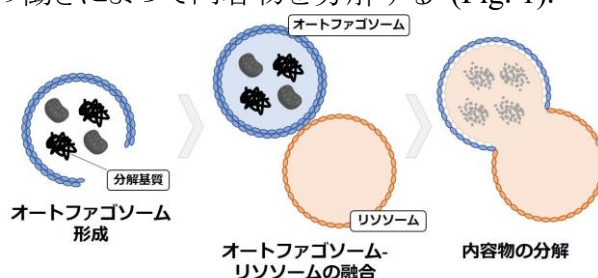


Fig. 1. オートファジーの概要

富栄養条件ではオートファジーによる分解はキナーゼ複合体である Mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1)の働きにより抑制されているが、飢餓等の刺激に伴い mTORC1 の活性が低下すると Unc-51 like autophagy activating kinase (ULK1), ATG13, FAK family-interacting protein of 200 kDa (FIP200), ATG101 から成る複合体の活性化が起こり、隔離膜形成の一連の反応が開始される<sup>1)</sup>。隔離膜はオメガソームと呼ばれる小胞体上のミトコンドリアと近接する領域から出芽し<sup>2)</sup>、ATG5-ATG12-ATG16L1 複合体等の働きにより、正常なオートファゴソームへと成熟する<sup>3)</sup>。成熟したオートファゴソームはその後、リソソームと融合するが、このオートファゴソーム-リソソームの融合は、オートファゴソームに局在する soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor (SNARE)タンパク質である YKT6, Syntaxin 17 (STX17)が リソソームに局在する SNARE タンパク質である Syntaxin 7 (STX7), Vesicle-associated membrane protein 8 (VAMP8)とそれぞれ細胞質に存在する Synaptosomal-

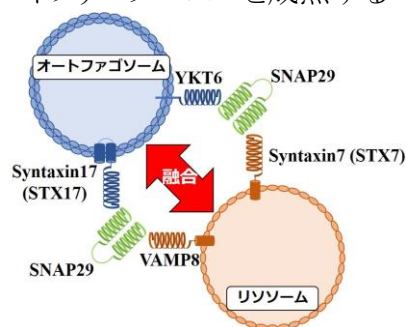


Fig. 2. オートファジーに関わる SNARE タンパク質

associated protein 29 (SNAP 29)を介した複合体を形成することにより誘導される (Fig.2) <sup>4), 5)</sup>.

オートファジーの異常はアルツハイマー病やパーキンソン病などに代表される様々な神経変性疾患の発症との関わりが考えられている。実際に神経系細胞特異的なオートファジー不全マウスは、オートファジーによる分解基質の細胞内での蓄積に加え、振戦や運動機能の低下といった神経変性疾患と類似した表現型を呈する <sup>6)</sup>。また、mTORC1 阻害剤投与によるオートファジー活性化はアルツハイマー病モデルマウスにおける認知機能の低下を予防することが報告されている <sup>7), 8)</sup>。これらの報告はオートファジーの異常が神経変性疾患の発症と密接に関わっていることを示すものである。

オートファジーによる分解機能が低下する原因の 1 つに細胞の老化がある。老化は神経変性疾患の最大の危険因子であり <sup>9)</sup>、老化によってオートファジーによる分解活性が低下することで、 $\beta$ -アミロイドやリン酸化タウタンパク質、 $\alpha$ -シヌクレインなどの凝集タンパク質が蓄積し <sup>6), 10)</sup>、神経細胞が障害されることで神経変性疾患の発症に至ると考えられている <sup>11)</sup>。老化細胞においてはオートファジーの進行に重要な ATG5-12 や Beclin1 の発現低下や <sup>12)</sup>、オートファゴソームとリソソームの融合の抑制 <sup>13)</sup>、オートファジー抑制因子として知られる Run domain protein as Beclin 1 interacting and cysteine-rich containing (Rubicon)の増加が報告されており <sup>14)</sup>、オートファジーによる分解機能が低下していることが知られている。以上のように老化によるオートファジー活性低下は現在までに様々な研究が行われてきており、神経変性疾患の有望な治療標的と考えられているものの、未だ詳細なメカニズムは明らかとなっていない。

これまでの老化によるオートファジーの研究では、オートファジー特異的なオルガネラであるオートファゴソームに着目した研究が多数行われてきている。一方で、近年では神経変性疾患におけるオートファジー研究において、オートファジーに関わる SNARE タンパク質に着目した研究が行われている。アルツハイマー病ではリソソームに局在する SNARE タンパク質である VAMP8 の <sup>15)</sup>、パーキンソン病ではオートファゴソームに局在する SNARE タンパク質である YKT6 の局在異常が報告されている <sup>16)</sup>。リソソーム性加水分化酵素の欠損により発症する神経変性疾患である GM2 ガングリオシドーシスにおいてはリソソームに局在する STX7, VAMP8 の両方の SNARE タンパク質の局在異常が報告されている <sup>17)</sup>。また、ダウン症では STX17, VAMP8 の発現量低下によるオートファジー異常が報告されている <sup>18)</sup>。このように一部の神経変性疾患においてはオートファゴソームやリソソームのようなオルガネラの直接の変化によらないオートファジー活性低下機構が報告されている。そこで私は、神経変性疾患の最

大の危険因子である老化によってもオートファジーに関わる SNARE タンパク質の発現量や細胞内局在が変化することでオートファジーが障害されるのではないかと仮説を立てた.

本研究では, 様々な神経変性疾患の共通の発症原因であると考えられる, 老化脳におけるオートファジー活性低下メカニズムの解明を目指して, オートファジーに関わる SNARE タンパク質の老化による変化に着目した解析を行った.

## 1-2 実験結果

### 1-2-1 老化脳においても SNARE タンパク質の発現量に変化は無い

まず、オートファジーに関わる SNARE タンパク質の発現量に老化による変化が見られるかを解析した。5 ヶ月齢, 14 ヶ月齢, 23 ヶ月齢マウスをそれぞれ若齢 (Young), 中齢 (Middle), 老齢 (Old) マウスとして使用し, 解析を行った。各マウスの脳抽出液を用いて Western blotting によりオートファジーに関わる SNARE タンパク質の検出を行った結果, YKT6, STX17, SNAP29, STX7, VAMP8 のいずれの SNARE タンパク質についても月齢による発現量の変化は見られなかった (Fig. 3-A, B)。このことから, 老化脳におけるオートファジー活性低下は, オートファジーに関わる SNARE タンパク質の発現低下によるものではないことが明らかになった。一方で, 細胞質で機能する SNAP29 以外の SNARE タンパク質はオートファゴソームあるいはリソソームに適切に局在化することが, その機能の発現には重要であると考えられる。そこで, 次にこれらの SNARE タンパク質の細胞内局在が加齢により変化するかを解析した。

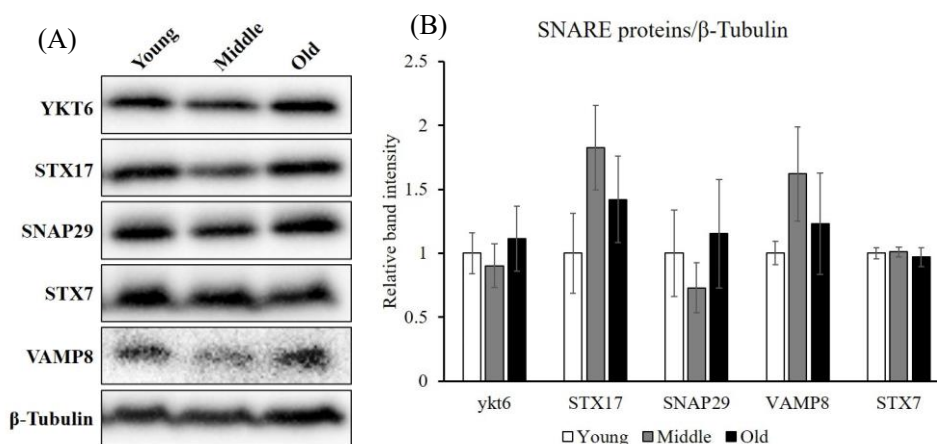


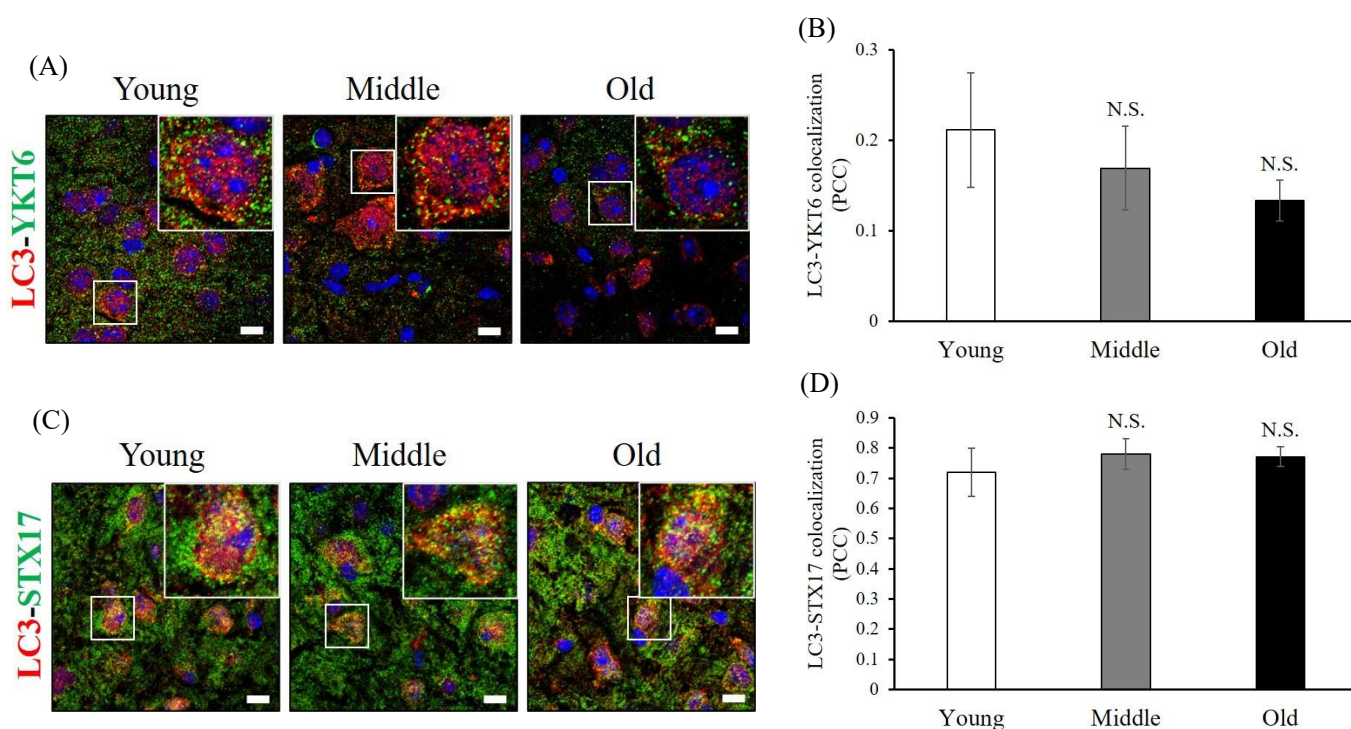
Fig. 3. マウス脳における SNARE タンパク質の発現解析

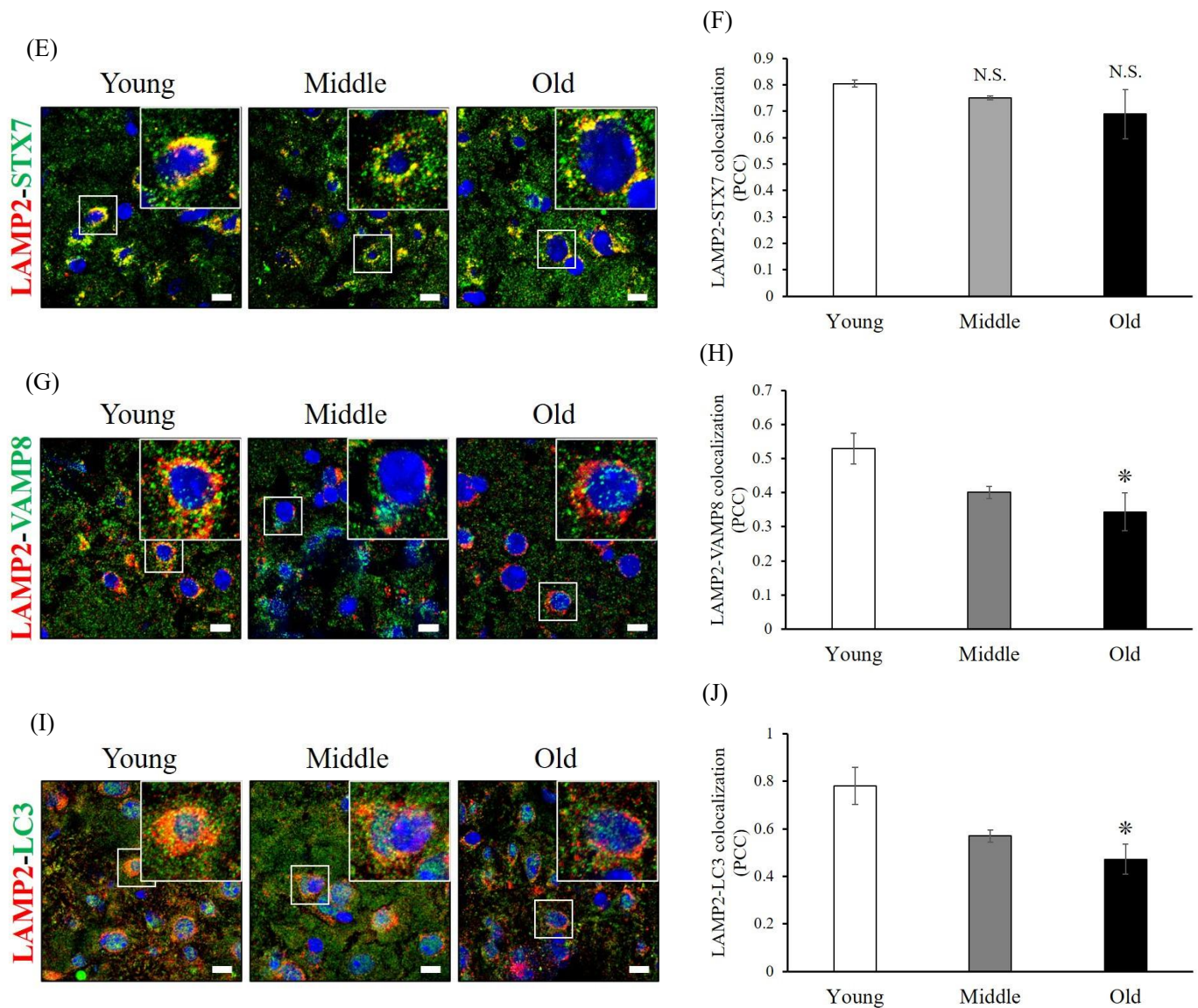
(A, B) マウス左脳抽出液を用いて Western blotting によって YKT6, STX7, SNAP29, STX7, VAMP8 の検出を行い, 各 SNARE タンパク質/ $\beta$ -Tubulin のバンド強度を解析した.  $n=3$ , One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett test, (vs Young).

### 1-2-2 老化脳では VAMP8 のリソソーム局在が減少し, リソソームとオートファゴソームの融合が抑制される



若齢, 中齢, 老齢マウス脳凍結切片を用いて, 免疫染色によってオートファジーに関わる SNARE タンパク質とオルガネラマーカールの共染色を行うことで, SNARE タンパク質の細胞内局在を解析した. その結果, オートファゴソームに局在して機能する YKT6, STX17 とオートファゴソームマーカーである Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3 (LC3)の共局在に月齢による変化は見られなかった (Fig. 4-A, B, C, D). よって, オートファゴソーム局在性の SNARE タンパク質である YKT6, STX17 のオートファゴソーム局在に加齢による変化は無いことが明らかとなった. 次にリソソームに局在して機能する STX7, VAMP8 とリソソームマーカーである Lysosomal-associated membrane protein 2 (LAMP2)の共局在を解析した結果では, STX7 と LAMP2 の共局在に変化は無かったが, VAMP8 と LAMP2 の共局在は月齢を経るにしたがって減少した (Fig. 4-E, F, G, H). これらの結果から, 老齢マウス脳においてはオートファジーに関わる SNARE タンパク質の 1 つである VAMP8 のリソソーム局在が減少することが示唆された. VAMP8 はリソソームとオートファゴソームの融合に必須の因子の 1 つであるため, 次に各マウス脳におけるリソソームとオートファゴソームの融合能について解析した. リソソームマーカー LAMP2 とオートファゴソームマーカー LC3 を共染色し, これらの共局在を解析した結果, 月齢を経るにしたがって LAMP2 と LC3 の共局在は減少した (Fig. 4-I, J). このことから, 老齢マウス脳では VAMP8 のリソソーム局在減少に起因すると考えられるリソソームとオートファゴソームの融合抑制が起こっていることが示唆された.



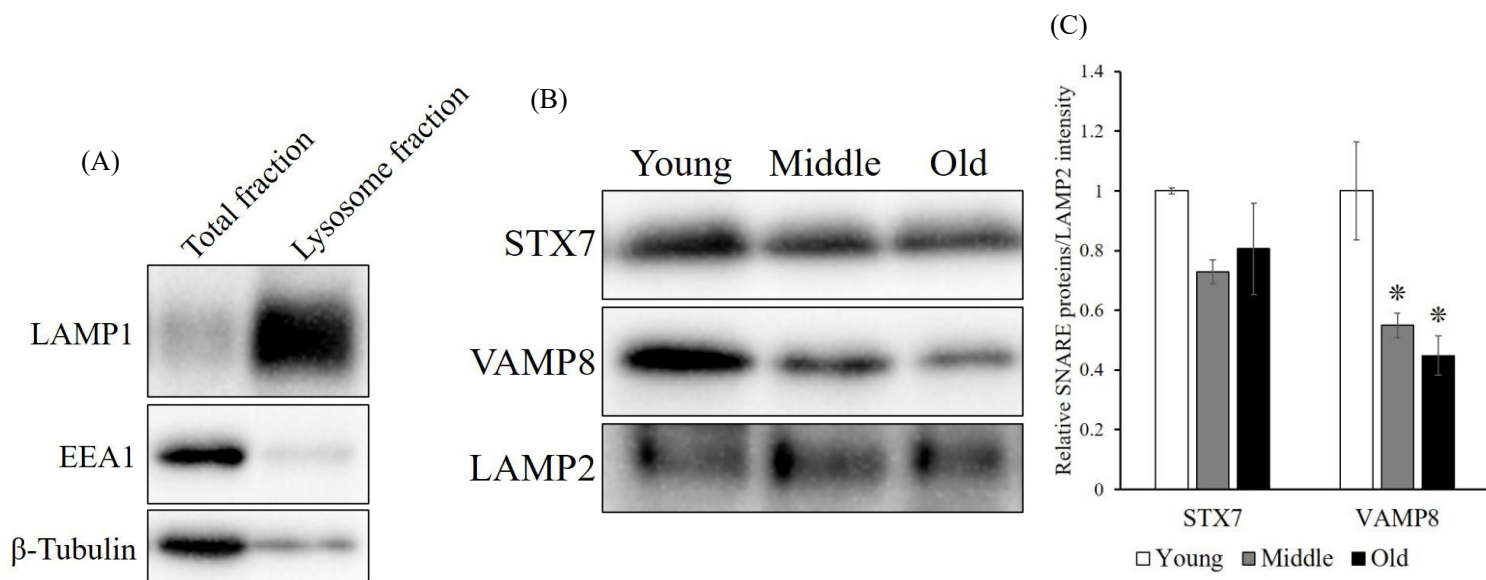


**Fig. 4.** マウス脳における SNARE タンパク質局在解析

(A, C, E, G, I) マウス脳凍結切片を用いて、免疫染色により各 SNARE タンパク質とオルガネラマーカ―又はリソソームマーカ―LAMP2 とオートファゴソームマーカ―LC3 を共染色し、大脳皮質を観察した。Red: LC3 (A, C), LAMP2: (E, G, I), Green: YKT6 (A), STX17 (C), STX7 (E), VAMP8 (G), LC3 (I). Blue: Nucleus. Scale bar: 10  $\mu$ m. (B, D, F, H, J) 各 SNARE タンパク質とオルガネラマーカ―又はリソソームマーカ―LAMP2 とオートファゴソームマーカ―LC3 の共局在係数を解析した。n=3, One-way ANOVA followed by Dunnett test, \* $P < 0.05$ , (vs Young).

以上の解析から、老齢マウス脳のリソソームにおいて SNARE タンパク質の局在変

化が示唆されたため、次にこれらのマウス脳からリソソームを単離することで、SNAREタンパク質の局在変化をより詳細に解析した。マウス大脳を等張液中で穏和に破碎し、リソソームの主要な膜タンパク質である Lysosomal-associated membrane protein 1 (LAMP1)に対する抗体を用いた免疫沈降を行うことで、マウス大脳からリソソームに富んだ画分 (Lysosome fraction)を獲得した。この画分を用いて Western blotting によってオルガネラマーカ―を検出した結果、大脳総抽出液 (Total fraction)と比較して、Lysosome fraction ではリソソームマーカ―である LAMP1 が増加した一方で、エンドソームマーカ―である Early endosome antigen 1 (EEA1)や細胞質タンパク質である  $\beta$ -Tubulin は減少した (Fig. 5-A)。よって抗 LAMP1 抗体を用いた免疫沈降によって獲得した Lysosome fraction にはリソソームが高度に濃縮されていることが確認できた。この Lysosome fraction を用いて Western blotting によってリソソームに局在する SNAREタンパク質である STX7と VAMP8 の検出を行った結果、STX7 は各月齢間で変化は見られなかったのに対して、VAMP8 は月齢を経るにしたがって減少し (Fig. 5-B)、免疫染色での共局在解析と同様の結果が得られた。よって以上の結果より、老齢マウス脳においては VAMP8 のリソソーム局在が減少することが明らかになり、これが老化脳におけるオートファジー活性低下の一因であることが示唆された。



**Fig. 5.** リソソーム画分における SNARE タンパク質発現量解析

(A) 若齢マウス大脳 Total fraction, Lysosome fraction を用いて Western blotting により、LAMP1, EEA1,  $\beta$ -Tubulin を検出した。(B, C) 各マウス大脳 Lysosome fraction を用いて Western blotting により STX7, VAMP8 の検出を行い、STX7/LAMP2 および

VAMP8/LAMP2 の相対バンド強度を解析した.  $n=3$ , One-way ANOVA followed by Dunnett test,  $*P<0.05$ , (vs Young).

### 1-2-3 酸化ストレスはエンドサイトーシスを抑制し、リソソームへの物質の輸送を妨げる

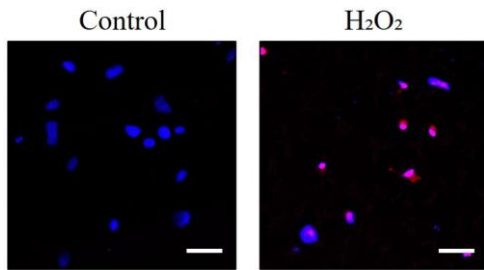
以上の解析から、老化脳において VAMP8 のリソソーム局在が減少することが明らかになったので、次にその局在変化メカニズムについて解析した. VAMP8 はクラスリンアダプタータンパク質である Clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia (CALM) と相互作用することでエンドサイトーシスによってリソソームに輸送されることが知られている<sup>19)</sup>. 実際に、CALM をノックダウンし、エンドサイトーシスを抑制した細胞では VAMP8 の細胞内局在が変化し、オートファジーが障害されることが報告されている<sup>15)</sup>. さらに、このように VAMP8 のリソソームへの局在化に重要だと考えられるエンドサイトーシスが老化細胞の特徴的な形質である酸化ストレスによって抑制されることも報告されている<sup>20), 21), 22)</sup>. そこで、老化脳における酸化ストレスがエンドサイトーシスを抑制することで、VAMP8 の局在を変化させているのではないかと考え、酸化ストレスがエンドサイトーシスや SNARE タンパク質局在に与える影響について解析した.

ヒト神経芽腫細胞株 (SH-SY5Y) に対して  $H_2O_2$  を処理することで、酸化ストレスを誘導した. この細胞における酸化ストレスの原因である活性酸素種 (Reactive oxygen species: ROS) の増加を ROS の検出プローブである Dihydroethidium (DHE) を用いて解析した結果、 $H_2O_2$  を処理した細胞において DHE の蛍光が増加することが明らかになり (Fig. 6-A, B),  $H_2O_2$  処理によって酸化ストレスを誘導できていることを確認した. 次に、酸化ストレスがエンドサイトーシスを抑制するかを解析するため、蛍光標識 Cholera toxin subunit B (CtxB) を用いたエンドサイトーシスアッセイを行った. CtxB は細胞表面の GM1 ガングリオシドと結合してエンドサイトーシスによって取り込まれ、リサイクリングエンドソームを介してゴルジ体へと輸送される<sup>23)</sup>. そこで、エンドサイトーシスによる CtxB のゴルジ体への輸送を、CtxB とゴルジ体マーカーである Golgi matrix protein 130 kDa (GM130) の共局在解析により評価した. その結果、Control では 10 分以内に CtxB と GM130 の共局在が観察され、20 分後にはプラトーに達したが、 $H_2O_2$  を処理した細胞では 20 分経過後も CtxB と GM130 の共局在の増加は観察され無かった (Fig. 6-C, D). このことから、酸化ストレスの誘導によってエンドサイトーシスによる細胞内輸送が抑制されることが明らかになった. また、エンドサイトーシスによるリソソームへの物質の輸送を解析するため、蛍光標識 Dextran によるエンドサ

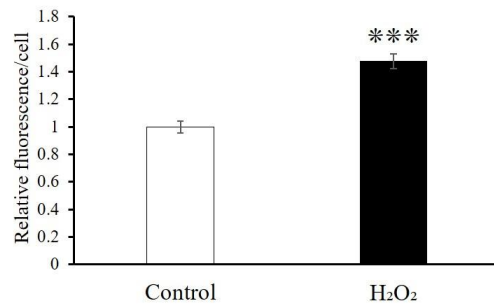


イトーシスアッセイを行った。細胞に添加された Dextran はエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれた後、リソソームまで輸送されるため、添加後の Dextran のリソソーム局在を解析することでエンドサイトーシスを評価した。細胞に蛍光標識 10 kDa Dextran を添加し、リソソームマーカー LAMP2 との共局在を解析した結果、Control の細胞と比較して H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を処理した細胞では Dextran と LAMP2 の共局在が減少していることが明らかになり (Fig. 6-E, F), 酸化ストレスによってエンドサイトーシスによるリソソームへの物質輸送が抑制されていることが確認できた。

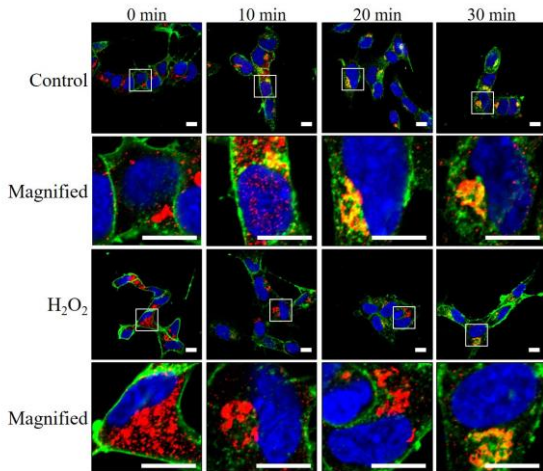
(A) **DHE**



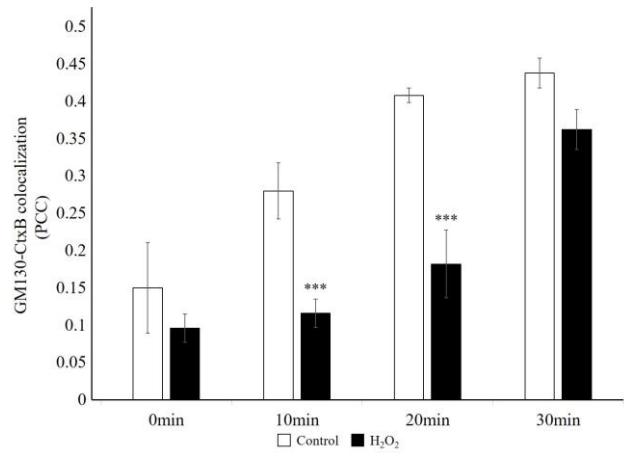
(B)



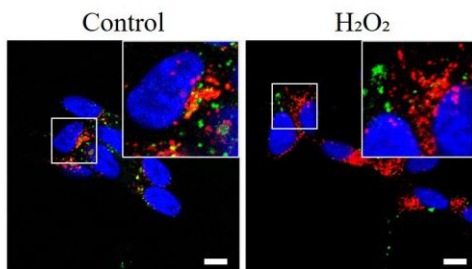
(C) **GM130-CtxB**



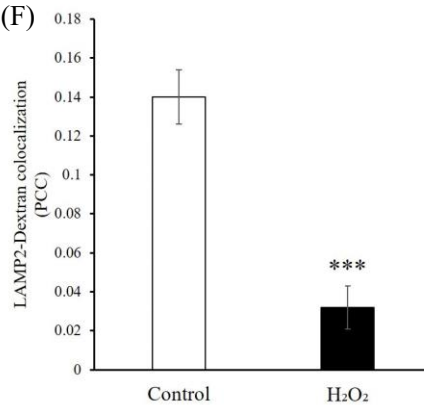
(D)



(E) **LAMP2-Dextran**



(F)



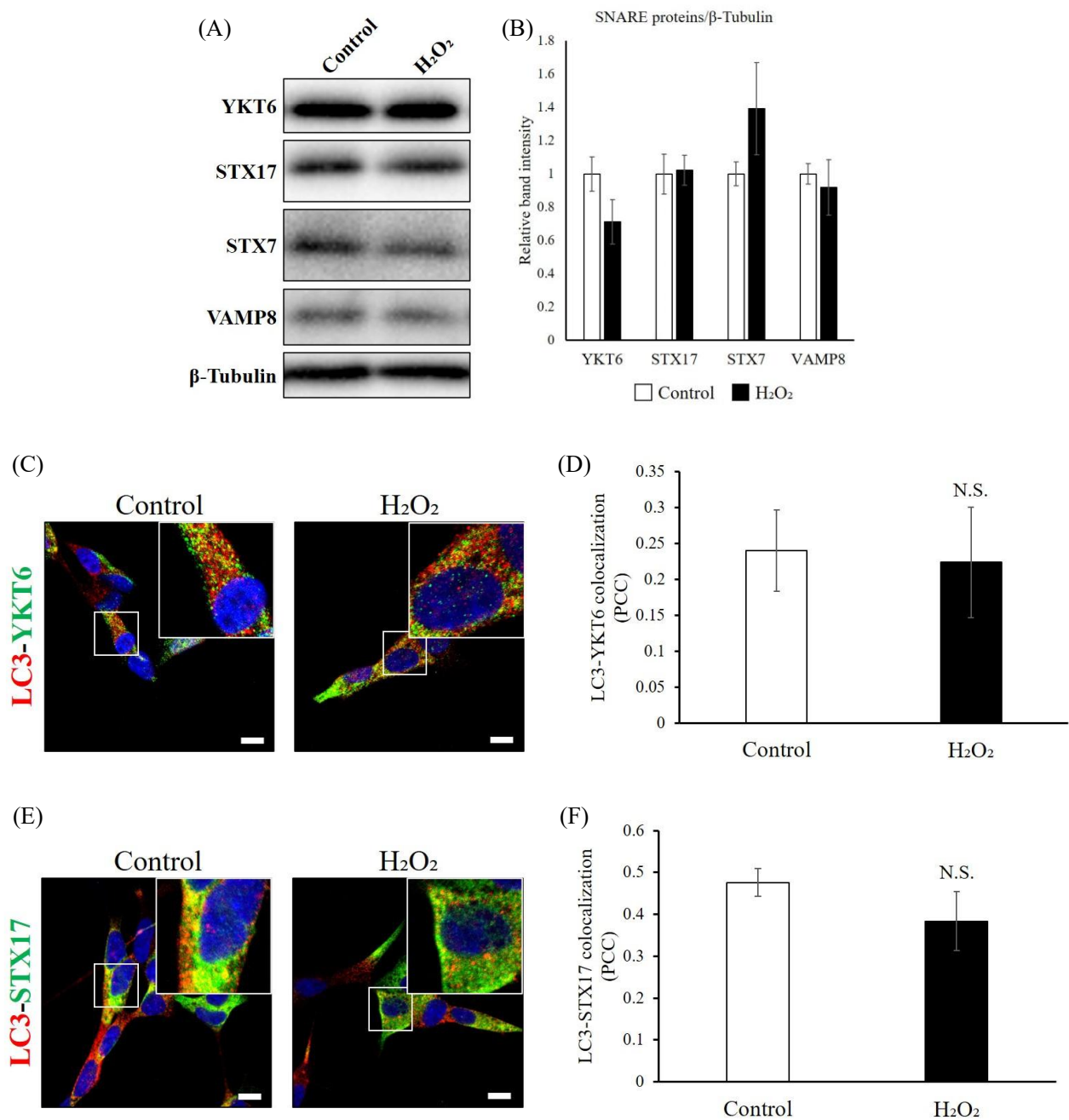
### Fig. 6. 酸化ストレス誘導時におけるエンドサイトーシスの解析

(A, B) SH-SY5Y に  $H_2O_2$  を処理し, 48 時間後に DHE を用いて細胞内の ROS を検出, 定量した. Red: DHE, Blue: Nucleus. Scale bar: 50  $\mu m$ .  $n=5$ , Student's T-test, \*\*\*  $P < 0.005$  (vs Control). (C, D) SH-SY5Y に  $H_2O_2$  を処理し, 48 時間後に蛍光標識 CtxB を処理し, CtxB のゴルジ体への輸送を解析することでエンドサイトーシスを評価した. Red: GM130, Green: CtxB, Blue: Nucleus. Scale bar: 10  $\mu m$ .  $n=5$ , Student's T-test, \*\*\*  $P < 0.005$  (vs Control). (E, F) SH-SY5Y に  $H_2O_2$  を処理し, 48 時間後に蛍光標識 10 kDa Dextran を処理し, 10 kDa Dextran のリソソームへの輸送を解析することでエンドサイトーシスを評価した. Red: LAMP2, Green: 10 kDa Dextran, Blue: Nucleus. Scale bar: 10  $\mu m$ .  $n=5$ , Student's T-test, \*\*\*  $P < 0.005$  (vs Control).

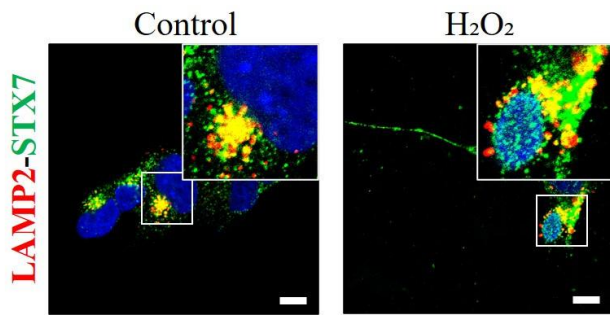
#### 1-2-4 酸化ストレスは VAMP8 のリソソーム局在を減少させる

酸化ストレスがエンドサイトーシスを抑制することが確認できたので, 次に酸化ストレスによるエンドサイトーシスの抑制が, オートファジーに関わる SNARE タンパク質に与える影響を解析した. Western blotting によって各 SNARE タンパク質の発現量を解析した結果では, YKT6, STX17, STX7, VAMP8 のいずれの SNARE タンパク質も  $H_2O_2$  処理によって発現量は変化しなかった (Fig. 7-A, B). よって老齢マウス脳での結果と同様に酸化ストレスの負荷によっても SNARE タンパク質の発現量は変化しないことが明らかになった. 次に, 免疫染色によって各 SNARE タンパク質とオルガネラマーカールの共染色を行うことで, SNARE タンパク質の細胞内局在を解析し結果, オートファゴソームに局在する YKT6, STX17 とオートファゴソームマーカー LC3 の共局在には  $H_2O_2$  処理による変化は見られず (Fig. 7-C, D, E, F), オートファゴソーム局在性の SNARE タンパク質である YKT6, STX17 のオートファゴソーム局在に酸化ストレスによる変化は無いことが明らかとなった. 一方で, リソソームに局在する STX7, VAMP8 とリソソームマーカー LAMP2 の共局在を解析した結果では, STX7 と LAMP2 の共局在に変化は無かったが, VAMP8 と LAMP2 の共局在は  $H_2O_2$  処理によって減少した (Fig. 7-G, H, I, J). よって老齢マウス脳での結果と同様に VAMP8 のリソソーム局在のみが酸化ストレスによって減少することが示唆されたため, VAMP8 局在変化をより詳細に解析した.  $H_2O_2$  処理後の VAMP8 の局在変化を経時的に解析した結果,  $H_2O_2$  処理後の時間依存的に VAMP8 と LAMP2 の共局在は減少した (Fig. 7-K, L). 以上の

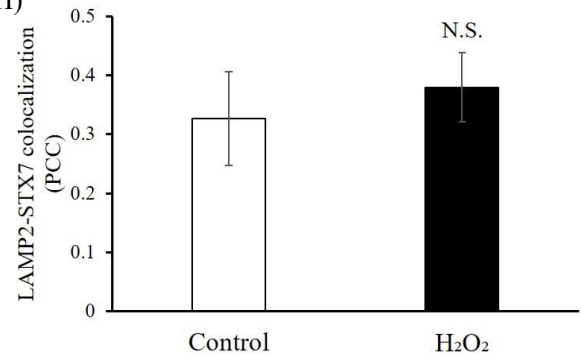
結果から、酸化ストレスはエンドサイトーシスを抑制することでオートファジーに関わる SNARE タンパク質の 1 つである VAMP8 のリソソーム局在を減少させることが考えられる。



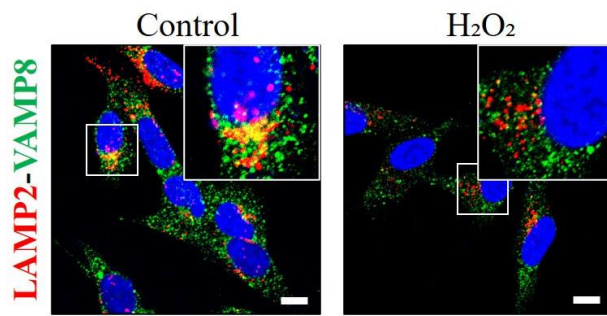
(G)



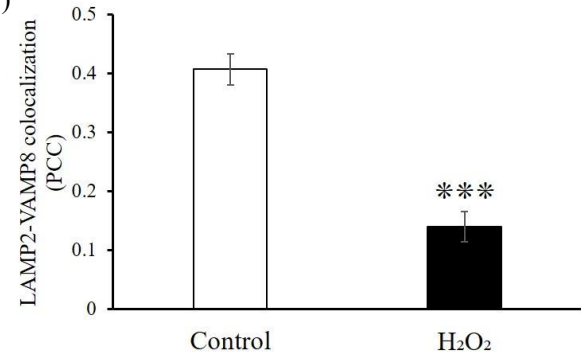
(H)



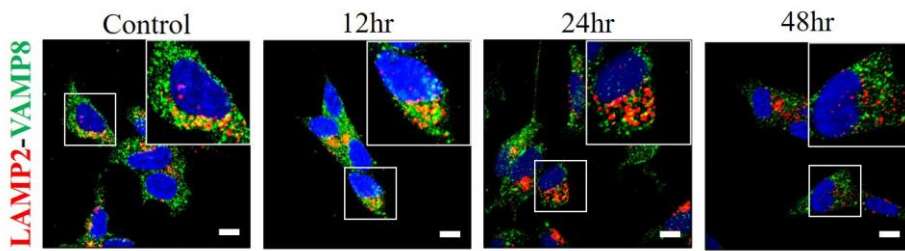
(I)



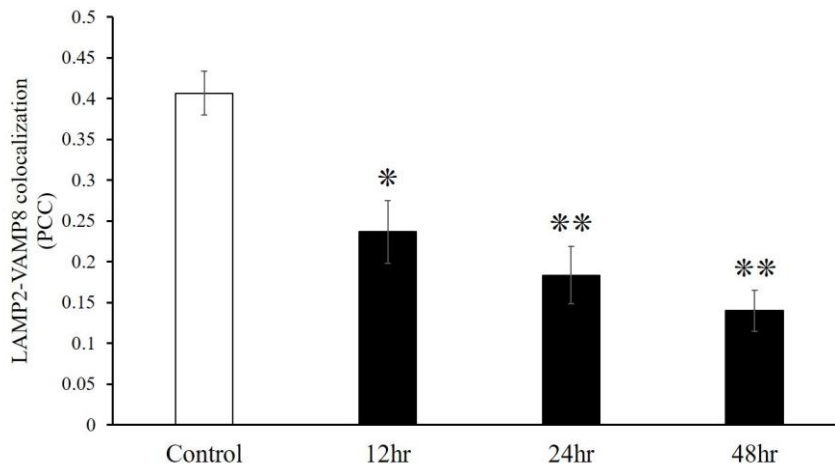
(J)



(K)



(L)



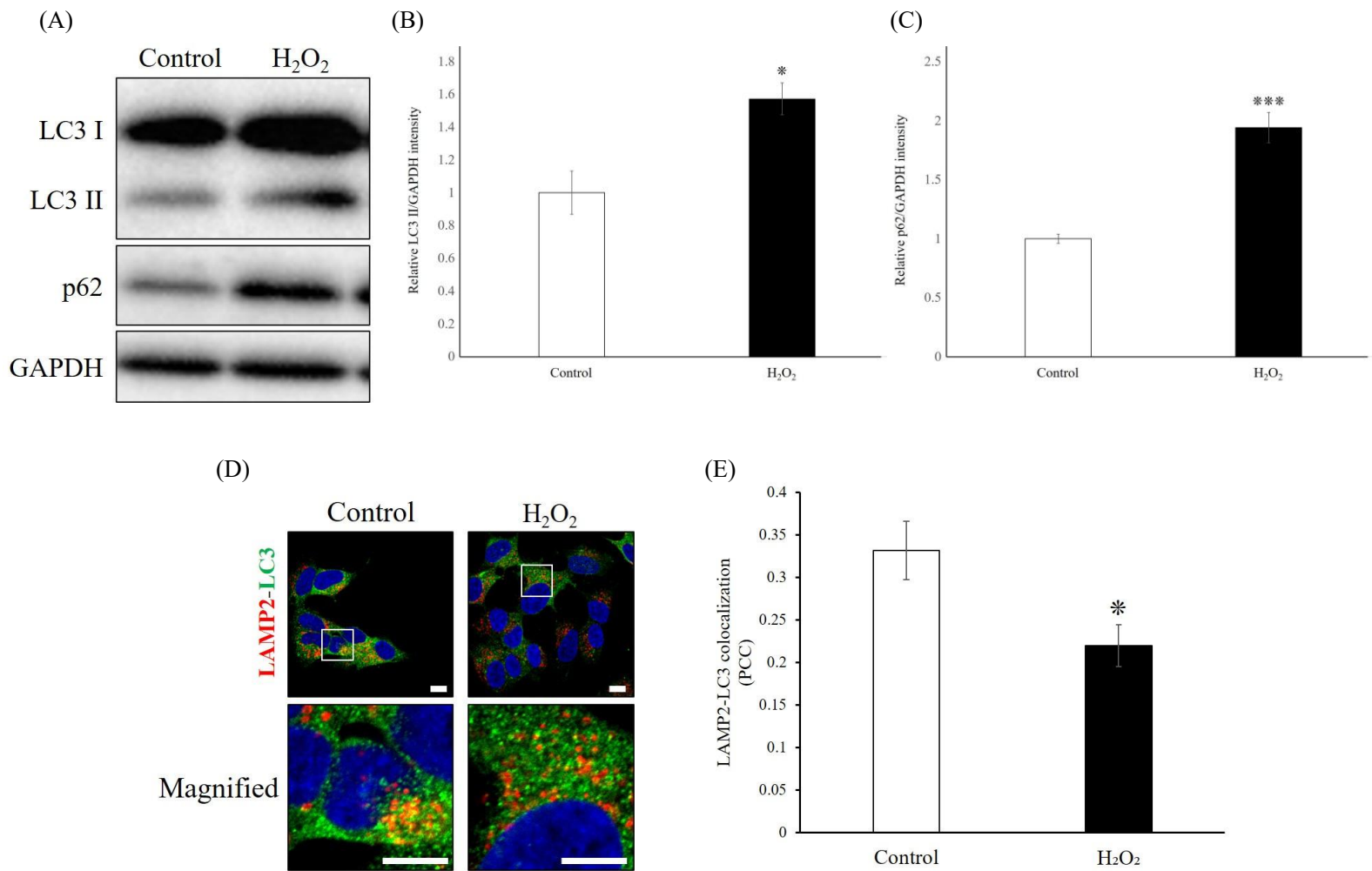


### Fig. 7. 酸化ストレス誘導時における SNARE タンパク質局在解析

(A, B) SH-SY5Y に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を処理し, 48 時間後に Western blotting によって YKT6, STX17, STX7, VAMP8 の検出を行い, 各 SNARE タンパク質/ $\beta$ -Tubulin の相対バンド強度を解析した. n=3, Student's T-test (vs Control). (C, E, G, I) SH-SY5Y に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を処理し, 48 時間後に免疫染色によって各 SNARE タンパク質とオルガネラマーカールの共染色を行った. Red: LC3 (C, E), LAMP2 (G, I), Green: YKT6 (C), STX17 (E), STX7 (G), VAMP8 (I), LC3 (I). Blue: Nucleus. Scale bar: 10  $\mu$ m. (D, F, H, J) 各 SNARE タンパク質とオルガネラマーカールの共局在係数を解析した. n=5, Student's T-test, \*\*\* $P$  < 0.005 (vs Control). (K, L) SH-SY5Y に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を処理し, 12, 24, 48 時間後に免疫染色によって VAMP8 と LAMP2 の染色を行い, 共局在係数を解析した. Red; LAMP2, Green; VAMP8, Blue; Nucleus. Scale bar: 10  $\mu$ m. n=5, One-way ANOVA followed by Dunnett test, \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01 (vs Control).

### 1-2-5 酸化ストレスはリソソームとオートファゴソームの融合を抑制する

以上の解析から酸化ストレスによるエンドサイトーシス抑制がオートファジーに関わる SNARE タンパク質である VAMP8 のリソソーム局在を減少させることが示唆されたため, この VAMP8 の局在変化がオートファジーに影響を与えるかを解析した. Western blotting によってオートファジー活性の指標として知られる LC3II, p62 の検出を行った結果, Control と比較し H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理によって LC3II, p62 ともに増加した (Fig. 8-A, B, C). 一般的に, オートファゴソーム膜タンパク質である LC3II の増加は, オートファゴソーム合成の活性化またはオートファゴソーム分解の抑制が考えられ, またオートファジーによって選択的に分解される p62 の増加は, オートファジー分解活性の低下が示唆される. そこで, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理による LC3II, p62 の増加がオートファジー活性の低下に起因するか確認するため, リソソームとオートファゴソームの融合を免疫染色によって解析した. リソソームマーカー LAMP2 とオートファゴソームマーカー LC3 を染色し, 共局在解析を行った結果, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理により LAMP2 と LC3 の共局在は減少した (Fig. 8-D, E). よって酸化ストレスの誘導はリソソームとオートファゴソームの融合を抑制することが明らかになった. 以上の結果から, 酸化ストレスはエンドサイトーシスを抑制することで, VAMP8 のリソソーム局在を減少させ, リソソームとオートファゴソームの融合を低下させることが示唆された.

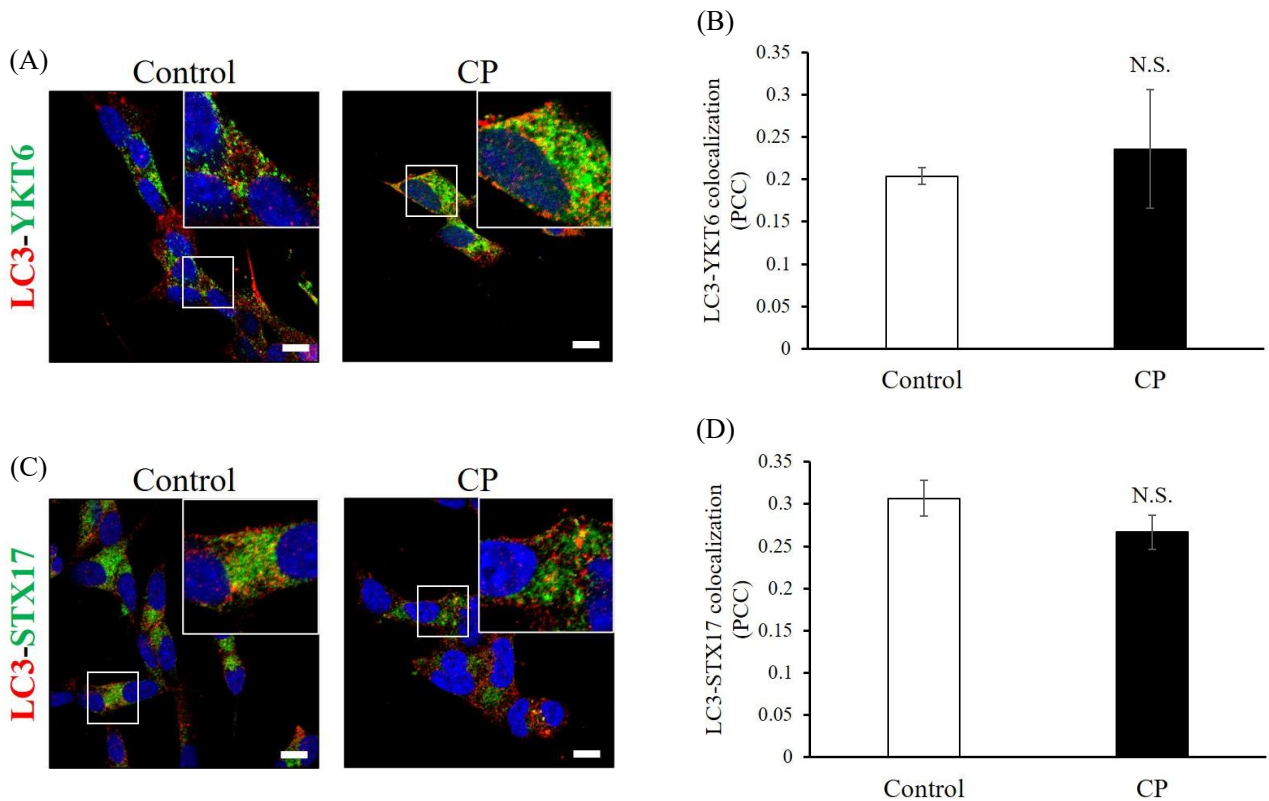


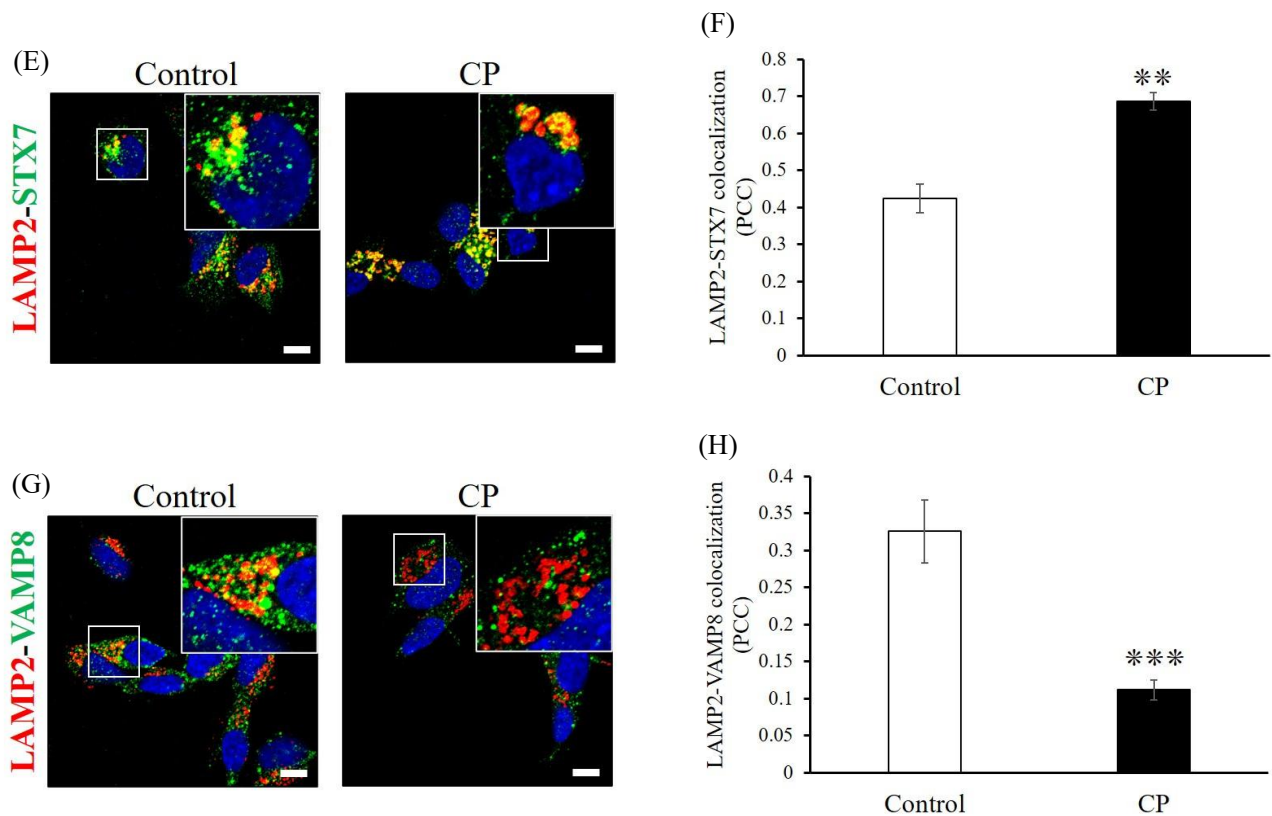
**Fig. 8. 酸化ストレス誘導時におけるオートファジーの解析**

(A, B, C) SH-SY5Y に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を処理し, 48 時間後に Western blotting によって LC3, p62 の検出を行い, LC3II/GAPDH, p62/GAPDH の相対バンド強度を解析した. n=3, Student's T-test, \**P*<0.05, \*\*\**P*<0.005 (vs Control). (D, E) SH-SY5Y に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を処理し, 48 時間後に Torin-1 を 2 時間処理することでオートファジーを誘導し, 免疫染色によって LAMP2, LC3 の染色を行い, 共局在係数を解析した. Red: LAMP2, Green: LC3, Blue: Nucleus. Scale bar: 10 μm. n=5, Student's T-test, \**P*<0.05 (vs Control).

**1-2-6 エンドサイトーシスの抑制は VAMP8 のリソソーム局在を減少させる**

酸化ストレスが VAMP8 のリソソーム局在を減少させることでオートファジーを障害することが示唆されたため、次に酸化ストレスによる VAMP8 のリソソーム局在減少がエンドサイトーシスの抑制に起因するのかを解析した. SH-SY5Y にエンドサイトーシス阻害剤である Chlorpromazine (CP) を処理することでエンドサイトーシスを抑制し、免疫染色によって各 SNARE タンパク質の局在を解析した. その結果、オートファゴソームに局在する YKT6, STX17 とオートファゴソームマーカー LC3 の共局在には CP 処理による変化は見られず (Fig. 9-A, B, C, D), オートファゴソーム局在性の SNARE タンパク質である YKT6, STX17 の局在にエンドサイトーシス抑制による変化は無いことが明らかとなった. 一方で、リソソームに局在する STX7, VAMP8 とリソソームマーカー LAMP2 の共局在を解析した結果では、STX7 と LAMP2 の共局在は減少しなかったが、VAMP8 と LAMP2 の共局在は CP 処理によって減少した (Fig. 7-E, F, G, H). よってエンドサイトーシス阻害剤の処理によっても VAMP8 のリソソーム局在のみが減少したことから、酸化ストレスはエンドサイトーシスの抑制を介して VAMP8 のリソソーム局在を減少させることが考えられる.





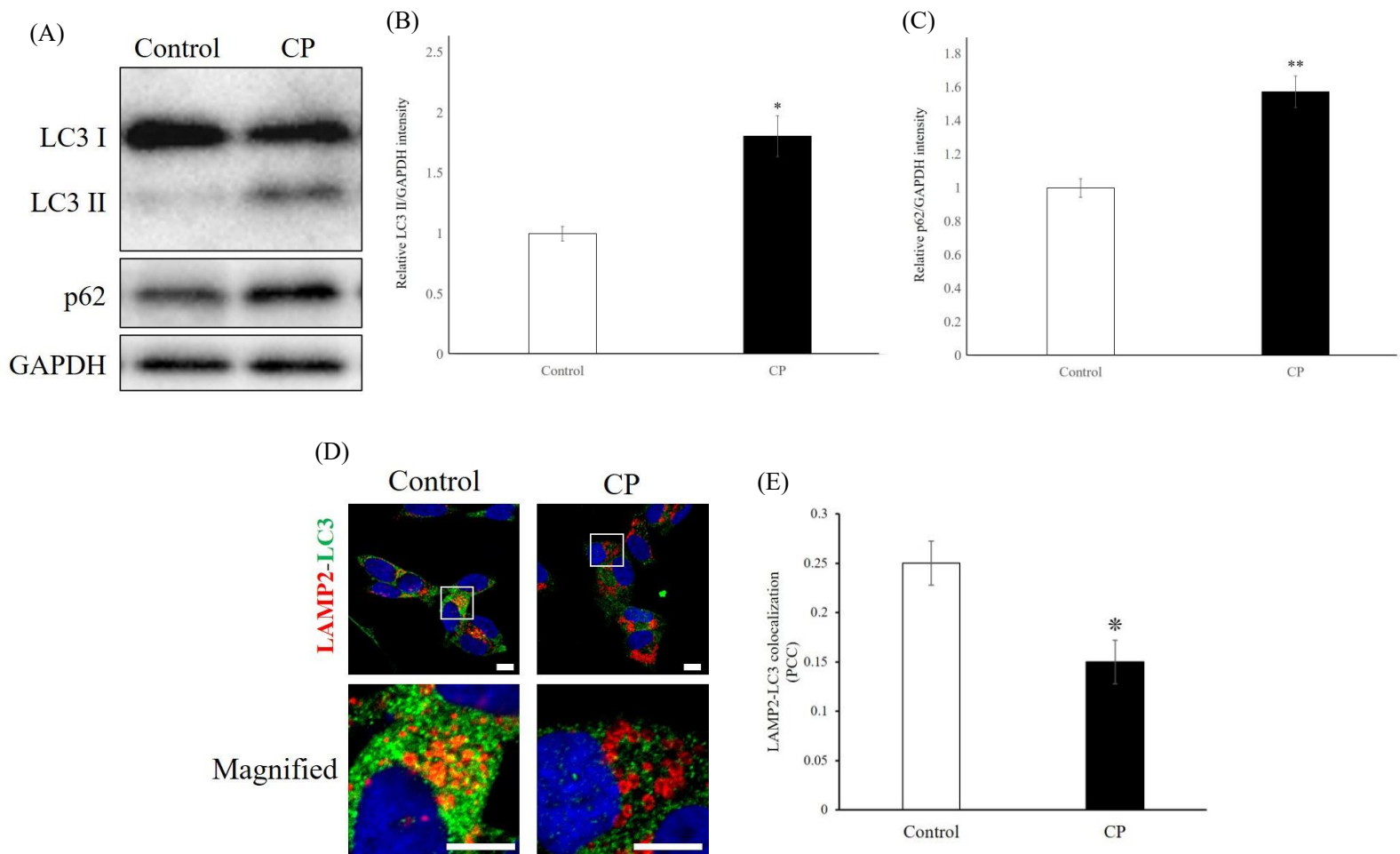
### Fig. 9. エンドサイトーシス抑制時における SNARE タンパク質局在解析

(A, C, E, G) SH-SY5Y に CP を処理し, 24 時間後に免疫染色によって各 SNARE タンパク質とオルガネラマーカースの共染色を行った. Red: LC3 (A, C), LAMP2 (E, G), Green: YKT6 (A), STX17 (C), STX7 (E), VAMP8 (G). Blue: Nucleus. Scale bar: 10  $\mu$ m. (B, D, F, H) 各 SNARE タンパク質とオルガネラマーカースの共局在係数を解析した. n=5, Student's T-test, \*\*\* $P < 0.005$  (vs Control).

### 1-2-7 エンドサイトーシスの抑制はリソソームとオートファゴソームの融合を抑制する

老齢マウス脳や酸化ストレスを誘導した細胞と同様に, エンドサイトーシスの抑制によってもオートファジーに関わる SNARE タンパク質である VAMP8 のリソソーム局在を減少させることが示唆されたため, この VAMP8 の局在変化がオートファジーに影響を与えるかを解析した. Western blotting によって LC3II, p62 の検出を行った結果, Control と比較し CP 処理によって LC3II, p62 ともに増加した (Fig. 10-A, B, C). 次に,

CP 処理による LC3II, p62 の増加がオートファジー活性の低下に起因するか確認するため、リソソームとオートファゴソームの融合を免疫染色によって解析した。リソソームマーカー LAMP2 とオートファゴソームマーカー LC3 を染色し、共局在解析を行った結果、CP 処理により LAMP2 と LC3 の共局在は減少した (Fig. 10-D, E)。よってエンドサイトーシスの抑制はリソソームとオートファゴソームの融合を抑制することが明らかになった。以上の結果から、エンドサイトーシスの抑制は VAMP8 のリソソーム局在を減少させることで、リソソームとオートファゴソームの融合を妨げることが示唆された。同様の VAMP8 のリソソーム局在減少や、これに起因すると考えられるリソソーム-オートファゴソームの融合低下は老齢マウス脳や老化細胞の特徴である酸化ストレスを負荷した細胞においても観察されたことから、老化脳においては酸化ストレスによってエンドサイトーシスが抑制されることで、VAMP8 のリソソームへの輸送が減少し、リソソームとオートファゴソームの融合が抑制されることが考えられる。



**Fig. 10. エンドサイトーシス抑制時におけるオートファジーの解析**

(A, B, C) SH-SY5Y に CP を処理し, 24 時間後に Western blotting によって LC3, p62 の検出を行い, LC3II/GAPDH, p62/GAPDH の相対バンド強度を解析した. n=3, Student's T-test, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  (vs Control). (D, E) SH-SY5Y に CP を処理し, 24 時間後に Torin-1 を 2 時間処理することでオートファジーを誘導し, 免疫染色によって LAMP2, LC3 の染色を行い, 共局在係数を解析した. Red: LAMP2, Green: LC3, Blue: Nucleus. Scale bar: 10  $\mu\text{m}$ . n=5, Student's T-test, \* $P < 0.05$  (vs Control).

### 1-3 考察

老化脳におけるオートファジー活性の低下は、神経変性疾患の発症と密接に関係していると考えられている<sup>6,10)</sup>。本研究では、この老化脳におけるオートファジー活性低下メカニズムの解明を目指して、オートファジーに関わる SNARE タンパク質に着目した解析を行った。脳におけるオートファジーに関わる SNARE タンパク質の発現量を月齢間で比較した結果では、若齢マウスと老齢マウスにおいて発現量に変化はなかった。一方で、これらの SNARE タンパク質の細胞内局在を解析したところ、リソソームに局在して機能する VAMP8 のリソソーム局在が若齢マウスと比較し、老齢マウスにおいて減少していた。さらに老齢マウス脳においてはリソソームとオートファゴソームの融合抑制が見られた。以上の結果は、老化脳において VAMP8 のリソソーム局在が減少することを初めて示すものであり、これが老化脳におけるオートファジー活性低下の一因であることが考えられる。VAMP8 はオートファジーにおいてリソソームとオートファゴソームの融合に関わる因子であり、VAMP8 をノックアウトした細胞ではオートファジーが障害されることが示されている<sup>15)</sup>。老化脳においては局在の変化によって VAMP8 が適切に機能できなくなっていることが考えられるため、この局在の変化がオートファジーを障害することは十分に考えられる。従って、VAMP8 のリソソーム局在を正常化することによって老化脳におけるオートファジー活性低下を改善させることが可能であると考えられる。実際に、VAMP8 を過剰発現させることによって、神経変性疾患におけるオートファジー活性低下が抑制されることや<sup>18)</sup>、凝集タンパク質の蓄積が抑制されることが報告されている<sup>24)</sup>。

老化が神経変性疾患の原因となるもう一つの要因として、老化細胞における酸化ストレスの亢進がある<sup>25)</sup>。酸化ストレスは、細胞内の活性酸素種 (ROS) の増加によって引き起こされる。ROS は DNA やタンパク質、脂質、オルガネラなどの損傷を介して神経細胞死を引き起こし、神経変性疾患の発症に関与することが示唆されているが<sup>26)</sup>、<sup>27)</sup>、神経変性疾患の原因タンパク質の蓄積に酸化ストレスが関与しているかは不明である。本研究では酸化ストレスを誘導した培養神経細胞において、老齢マウス脳と同様の VAMP8 のリソソーム局在減少や、リソソームとオートファゴソームの融合が抑制されることを明らかにしている。そのため、老化細胞における酸化ストレスが VAMP8 の局在を変化させることでオートファジーを障害し、凝集タンパク質の蓄積を促進するという、これまでに報告されてきた ROS による細胞障害とは異なるメカニズムで神経変性疾患の発症につながる事が考えられる。

また本研究では、酸化ストレスの誘導によってエンドサイトーシスが阻害されることを

示し、さらにエンドサイトーシスの抑制によって VAMP8 のリソソームへの輸送が阻害され、リソソームとオートファゴソームの融合が阻害されることを見出した。この VAMP8 の局在変化やオートファジーの障害は酸化ストレスの亢進している老齢マウス脳や、酸化ストレスを誘導した細胞においてもみられたことから、老化による酸化ストレスによってエンドサイトーシスが抑制されることで、VAMP8 のリソソームへの輸送が減少し、リソソームとオートファゴソームの融合が低下することが考えられる。このことは酸化ストレスによるエンドサイトーシス抑制が神経変性疾患の発症に寄与することを示唆しており、これまでに報告の無い新たな老化脳におけるオートファジー活性低下メカニズムであると考えられる。近年では、Genome-wide association study (GWAS) により、様々なエンドサイトーシス関連遺伝子が神経変性疾患の危険因子として同定されている<sup>28), 29), 30)</sup>。これらの遺伝子変異が神経変性疾患の発症に繋がる詳細なメカニズムは明らかになっていないが、本研究で示されたようにエンドサイトーシス抑制に伴う VAMP8 の輸送減少を通じてオートファジーを抑制することで、神経変性疾患の発症につながる事が考えられる。実際に、エンドサイトーシス関連遺伝子の一つであり、アルツハイマー病危険因子として同定された CALM をノックダウンすると、VAMP8 の細胞内局在が変化することで、オートファジーが阻害され、リン酸化タウタンパク質の蓄積が起こることが報告されている<sup>15)</sup>。

興味深いことに、酸化ストレスの誘導やエンドサイトーシス阻害剤処理によってエンドサイトーシスを抑制すると、オートファジーに関わる SNARE タンパク質である YKT6, STX17, STX7, VAMP8 のうち VAMP8 でのみ局在の変化が観察された。この局在変化の有無はそれぞれの SNARE タンパク質のオルガネラへの輸送経路の違いに起因していると考えられる。VAMP8 は既にクラスリンアダプタータンパク質と相互作用することで、エンドサイトーシス経路でリソソームに輸送されることが知られており、このためにエンドサイトーシス抑制によって局在が変化したと考えられる。一方で、YKT6 は小胞体から Coat protein II (COPII)小胞を介して Pre-autophagosomal structure (PAS)に輸送されることで、オートファゴソームに局在することが報告されている<sup>31)</sup>。STX17 の場合は Immunity-related GTPase M (IRGM)を介してオートファゴソーム膜タンパク質である LC3 と相互作用することで、オートファゴソームに局在する<sup>32)</sup>。よって、これらの SNARE タンパク質はエンドサイトーシスとは別の経路によってオートファゴソームに局在化するため、エンドサイトーシス抑制の影響を受けなかったことが考えられる。STX7 のリソソーム局在化機構については未だ報告は無いが、YKT6 や STX17 と同様にエンドサイトーシス抑制による局在の変化が見られなかったことから、エンドサイトー



ーシス以外の経路でリソソームに輸送されていることが考えられる。

本研究では、酸化ストレスによるエンドサイトーシス抑制が老化脳におけるオートファジー活性低下の一因であることを示しているが、酸化ストレスがどのようなメカニズムでエンドサイトーシスを抑制するかは未だ不明である。過去の研究では、酸化ストレスの誘導が p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK)の活性化を介してエンドサイトーシスを阻害することが報告されている<sup>22)</sup>。p38 MAPK はエンドサイトーシス制御因子である Rab5 の局在を調節することでエンドサイトーシスを制御することから<sup>33)</sup>、酸化ストレスによる p38 MAPK の異常活性化がエンドサイトーシスによる輸送を変化させることが考えられる。また、酸化ストレスはエンドサイトーシス実行因子である Dynamin 1 をリン酸化することにより不活性化し、エンドサイトーシスを抑制的に制御する Cyclin-dependent kinase 5 (CDK5)<sup>34)</sup>や Glycogen synthase kinase 3  $\beta$  (GSK3 $\beta$ )<sup>35)</sup>を活性化させることが報告されている<sup>36), 37)</sup>。そのため、本研究で示した酸化ストレスによる VAMP8 輸送阻害には、CDK5 や GSK3 $\beta$  の活性化によるエンドサイトーシスの抑制が関与していることが考えられる。実際に、CDK5 や GSK3 $\beta$  の活性化はアルツハイマー病の発症に寄与することが報告されていることから<sup>38), 39)</sup>、これらの分子の老化による活性の変化が神経変性疾患の発症に関連することが考えられる。

本研究を総括すると、老化脳において VAMP8 のリソソーム局在が減少することを初めて示し、これが老化脳におけるオートファジー活性低下の一因であることが示唆された。さらに、老化脳における VAMP8 局在変化メカニズムとして酸化ストレスを介したエンドサイトーシス抑制が示唆された。本研究成果は酸化ストレスが VAMP8 のリソソームへの輸送を減少させることでオートファジーを障害するという、老化脳における新規のオートファジー活性低下メカニズムを示すものであり、VAMP8 輸送正常化という新たなオートファジー活性化方法の開発に繋がると期待される。

## ■ 第2章 小胞輸送系制御による、より効率的な遺伝子治療法の開発

### 2-1. 緒論

第1章で述べたようなアルツハイマー病やパーキンソン病に代表される神経変性疾患はいずれも難治性の疾患であり、薬物による対症療法は存在するものの、その進行を完全に抑制する方法は未だ存在しない。そこで近年、これらの神経変性疾患の新たな治療法として遺伝子治療が研究されている<sup>40), 41), 42), 43)</sup>。遺伝子治療は遺伝子を用いて疾患の治療を行う技術であり、ベクター等を用いて生体に直接遺伝子を導入する *in vivo* 遺伝子治療と、細胞を一度体内から取り出し、遺伝子を導入した後に患者体内に戻す *ex vivo* 遺伝子治療に大別される。遺伝子治療は遺伝子を用いるという性質から神経変性疾患だけでなく、遺伝子変異が主たる発症要因である先天性疾患やがんの新規治療法としても研究されている<sup>44), 45)</sup>。遺伝子治療に用いるベクターの一種にアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターがある<sup>46), 47), 48)</sup>。AAVはパルボウイルス科に属するエンベロープを持たない一本鎖DNAウイルスであり、ヒトに感染しても非常に小さな免疫応答しか誘導せず、現在まで病原性は知られていない。AAVには組織指向性の異なる複数の血清型が存在し、野生型AAVでは13種類、遺伝子改変により作製された改変型AAVも含めるとその数は100種類以上にも及ぶ<sup>49), 50)</sup>。そのため、AAVベクターを用いた遺伝子治療では標的とする組織や細胞種に応じて最適な血清型を選択することが重要となっている。現在では、世界中で様々な疾患に対するAAVベクターを用いた遺伝子治療の臨床試験が実施されており、本邦においても脊髄筋萎縮症治療薬としてAAVベクターにSurvival motor neuron 1 (SMN1)遺伝子を搭載したゾルゲンスマ<sup>40), 41)</sup>が既に承認され、臨床の場で使用されている。このようにAAVベクターは優れた性質と将来性を有しているが、その製造に際して莫大な費用が掛かることが問題点として存在する。AAVベクターは哺乳類細胞であるHuman embryonic kidney cell 293 (HEK293)に遺伝子導入することで作製されるが、細胞の維持に費用が掛かることやAAVベクターの作成効率が他のウイルスベクターと比較して低いことが、AAVベクターの高い作成コストの要因となっている。実際に、既に臨床応用されているAAVベクター製剤であるゾルゲンスマは患者1人当たり、承認された2020年時で患者一人当たり1億5千万円と過去最高額の薬価が付加されることとなっている。このような高額な製造コストに起因する高額な臨床試験の費用がAAVベクターの臨床応用を妨げる一因となっている。

一般的にレトロウイルスなどのエンベロープを有するウイルスはエンベロープと細胞

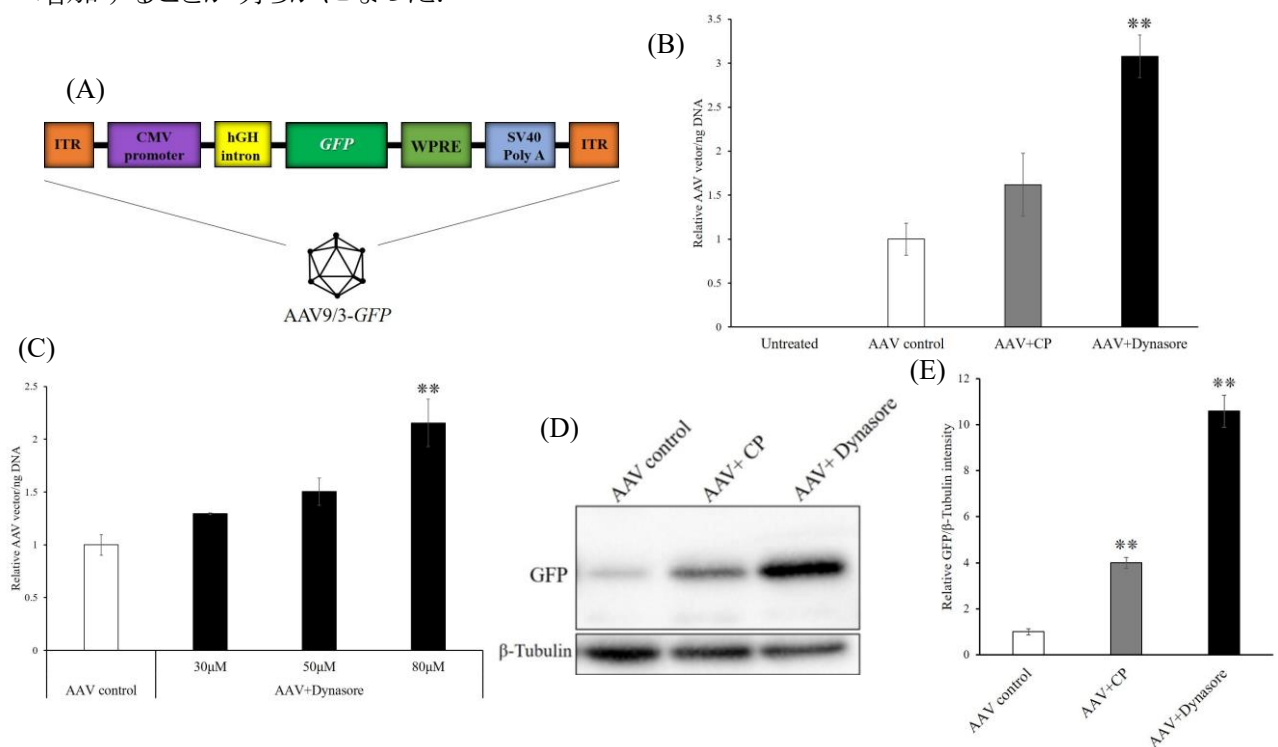
膜の融合によって細胞内に侵入する<sup>51)</sup>。一方で、エンベロープを持たないウイルスの細胞内への取り込みは細胞の小胞輸送経路の働きによって行われると考えられている。実際にエンベロープを持たないウイルスである AAV もクラスリン依存性エンドサイトーシスあるいはマクロピノサイトーシスのような小胞輸送系の働きによって細胞内に取り込まれることで遺伝子を導入することが報告されている<sup>52), 53), 54)</sup>。そのため、AAV ベクターによる遺伝子導入効率は細胞の小胞輸送系による AAV の取り込み効率に依存していると言える。そこで安価な低分子化合物を用いて細胞の小胞輸送系による AAV ベクターの細胞内取り込みを促進することが出来れば、より効率的に遺伝子治療を行うことが可能になると考えられる。

本研究では低分子化合物を用いた小胞輸送系の制御による、より効果的な遺伝子治療法の開発を目的に、AAV ベクターの細胞内取り込みを促進する化合物の探索、及び化合物処理時の AAV ベクターの細胞内取り込みにおける分子メカニズムの解析を行った。

## 2-2. 実験結果

### 2-2-1. エンドサイトーシス阻害剤は AAV9/3 ベクターの細胞内取り込みを促進する

まず AAV ベクターの細胞内取り込みを促進する化合物の探索を行った。Cytomegalovirus (CMV)プロモーター下流に Green fluorescent protein (GFP)をコードする遺伝子を配置し、神経細胞指向性の AAV9/3 ベクター<sup>55)</sup> に搭載した AAV9/3-GFP を作製し(Fig. 11-A), ヒト神経芽腫細胞株 (SH-SY5Y)に小胞輸送関連化合物とともに添加した。この細胞から DNA を抽出し、q-PCR によって AAV9/3-GFP 中の遺伝子を定量することで、細胞内に取り込まれた AAV9/3-GFP 量を評価した。また細胞抽出液を用いて Western blotting によって発現 GFP を定量することで AAV9/3-GFP による遺伝子発現を評価した。種々の化合物を検討した結果、興味深いことにエンドサイトーシス阻害剤である CP や Dynasore を共処理することで AAV9/3 ベクターの細胞内取り込みが増加することが明らかになった(Fig. 11-B)。また Dynasore を異なる処理濃度で添加し、同様の実験を行った際にも、Dynasore の処理濃度依存的に AAV9/3 ベクターの細胞内取り込みは増加した(Fig. 11-C)。Western blotting によって発現 GFP を定量した結果においても、CP や Dynasore の共処理によって GFP の発現量が増加することが明らかになり(Fig. 11-D, E), エンドサイトーシス阻害剤処理によって AAV9/3 ベクターの細胞内取り込みが促進され、これに伴い遺伝子発現産物も増加することが明らかになった。



### Fig. 11. AAV9/3 ベクター細胞内取り込み及び導入遺伝子発現の評価

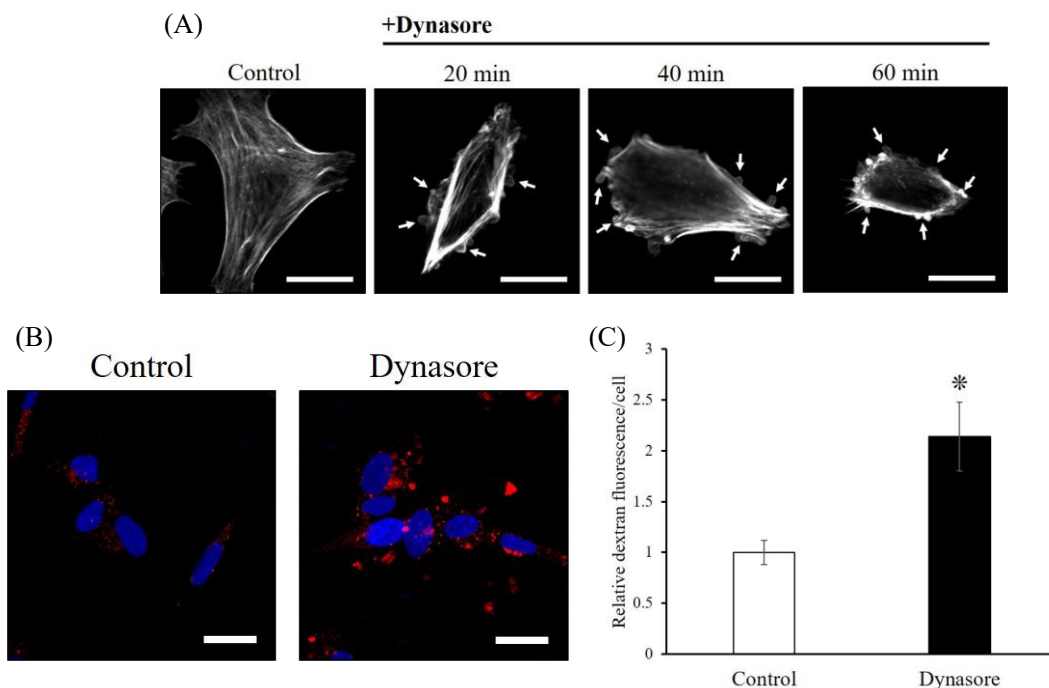
(A) AAV9/3-*GFP* のベクター情報. (B) SH-SY5Y に対して AAV9/3-*GFP*  $3 \times 10^4$  vg/cell と 20  $\mu$ M CP または 80  $\mu$ M Dynasore を共処理し, q-PCR 法により AAV9/3-*GFP* の細胞内取り込みを評価した.  $n=3$ , One-way ANOVA followed by Dunnett test,  $**P < 0.01$  (vs AAV control). (C) SH-SY5Y に対して AAV9/3-*GFP*  $3 \times 10^4$  vg/cell と 30, 50, 80 $\mu$ M Dynasore を共処理し, q-PCR 法により AAV9/3-*GFP* の細胞内取り込みを評価した.  $n=3$ , One-way ANOVA followed by Dunnett test,  $**P < 0.01$  (vs AAV control). (D, E) SH-SY5Y に対して AAV9/3-*GFP*  $3 \times 10^4$ vg/cell と 20  $\mu$ M CP または 80  $\mu$ M Dynasore を共処理し, Western blotting により発現 GFP を検出し, GFP/ $\beta$ -Tubulin の相対バンド強度を解析した.  $n=3$ , One-way ANOVA followed by Dunnett test,  $**P < 0.01$  (vs AAV control).

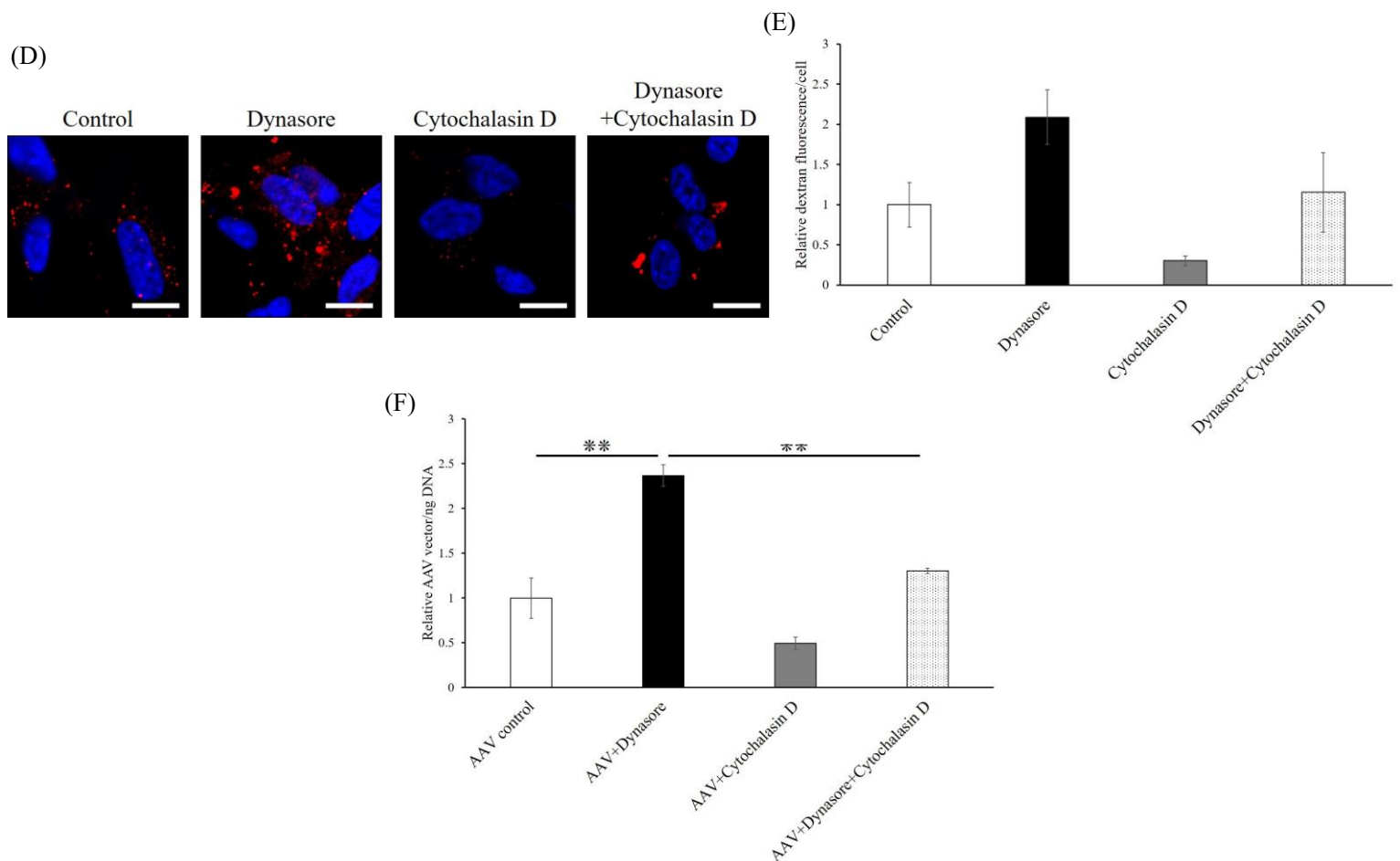
#### 2-2-2. エンドサイトーシス阻害剤はマクロピノサイトーシスを活性化することで AAV9/3 ベクターの細胞内取り込みを促進する

一般的に AAV ベクターの細胞内取り込みはエンドサイトーシスによって行われることが報告されているため, エンドサイトーシス阻害剤処理による AAV9/3 ベクターの細胞内取り込み促進はこれまでの通説とは異なる現象である. そこで, エンドサイトーシス阻害による AAV9/3 ベクター細胞内取り込み促進時の詳細なメカニズムを解析した. 今回使用した CP はクラスリン依存性エンドサイトーシスの阻害剤であり, Dynasore はクラスリン依存性及びカベオラエンドサイトーシスの阻害剤である. そのため, これらの阻害剤処理時にはクラスリンやカベオリンに依存しない取り込み経路が促進されているのではないかと考え, その経路の 1 つであるマクロピノサイトーシスに着目した解析を行った. マクロピノサイトーシスは細胞骨格の構成タンパク質である F-Actin によって駆動される取り込み経路であり<sup>56)</sup>, 一部のウイルスではマクロピノサイトーシスを介して細胞内に侵入することが報告されている<sup>57), 58)</sup>. マクロピノサイトーシスが誘導されると F-Actin の働きによって細胞膜が大きく変形し, ラッフル膜と呼ばれる構造が形成される<sup>56)</sup>. そこでエンドサイトーシス阻害剤処理時にマクロピノサイトーシスが誘導されるかを解析するため, ラッフル膜の形成を解析した. SH-SY5Y にエンドサイトーシス阻害剤である Dynasore を処理し, 蛍光標識 Phalloidin を用いて F-Actin の染色を行った結果, Dynasore を処理した細胞では処理後 20 分の時点から細胞膜が外側に突き出

したラッフル膜と考えられる構造が観察された(Fig. 12-A). よってエンドサイトーシス阻害剤処理によってマクロピノサイトーシスが誘導されることが示唆された. 次に実際のマクロピノサイトーシスによる物質の細胞内取り込みを解析するため, マクロピノサイトーシスの指標となる 70 kDa Dextran を SH-SY5Y に処理し, その細胞内取り込みを解析した. その結果, Dynasore を処理した細胞において 70 kDa Dextran の蛍光が増加し, 70 kDa Dextran の細胞内取り込みが促進されていることが明らかになった(Fig. 12-B, C). また Dynasore 処理による 70 kDa Dextran の細胞内取り込み促進はマクロピノサイトーシス阻害剤である Cytochalasin D の共処理によっては抑制されたことから(Fig. 12-D, E), Dynasore 処理による 70 kDa Dextran の取り込み促進はマクロピノサイトーシスを介していることが確認できた. よって Phalloidin 染色によって明らかになった細胞の形態の変化と合わせて, エンドサイトーシス阻害はマクロピノサイトーシスによる物質の細胞内取り込みを促進することが明らかになった.

次に, このエンドサイトーシス阻害剤によるマクロピノサイトーシス活性化が AAV9/3 ベクターの細胞内取り込み促進に寄与しているのかを解析するため, SH-SY5Y に AAV9/3-*GFP*, Dynasore, Cytochalasin D を共処理し, q-PCR による AAV9/3 ベクター細胞内取り込みを解析した. その結果, Dynasore 処理を行った細胞では AAV9/3 ベクターの細胞内取り込みは促進され, この取り込み促進は Dynasore と Cytochalasin D の共処理によっては抑制された(Fig.12-F). このことからエンドサイトーシス阻害はマクロピノサイトーシスを活性化させることで, AAV9/3 ベクターの細胞内取り込みを促進していることが明らかになった.





**Fig. 12.** エンドサイトーシス阻害時におけるマクロピノサイトーシスの評価と AAV9/3 ベクター取り込み促進への寄与の解析

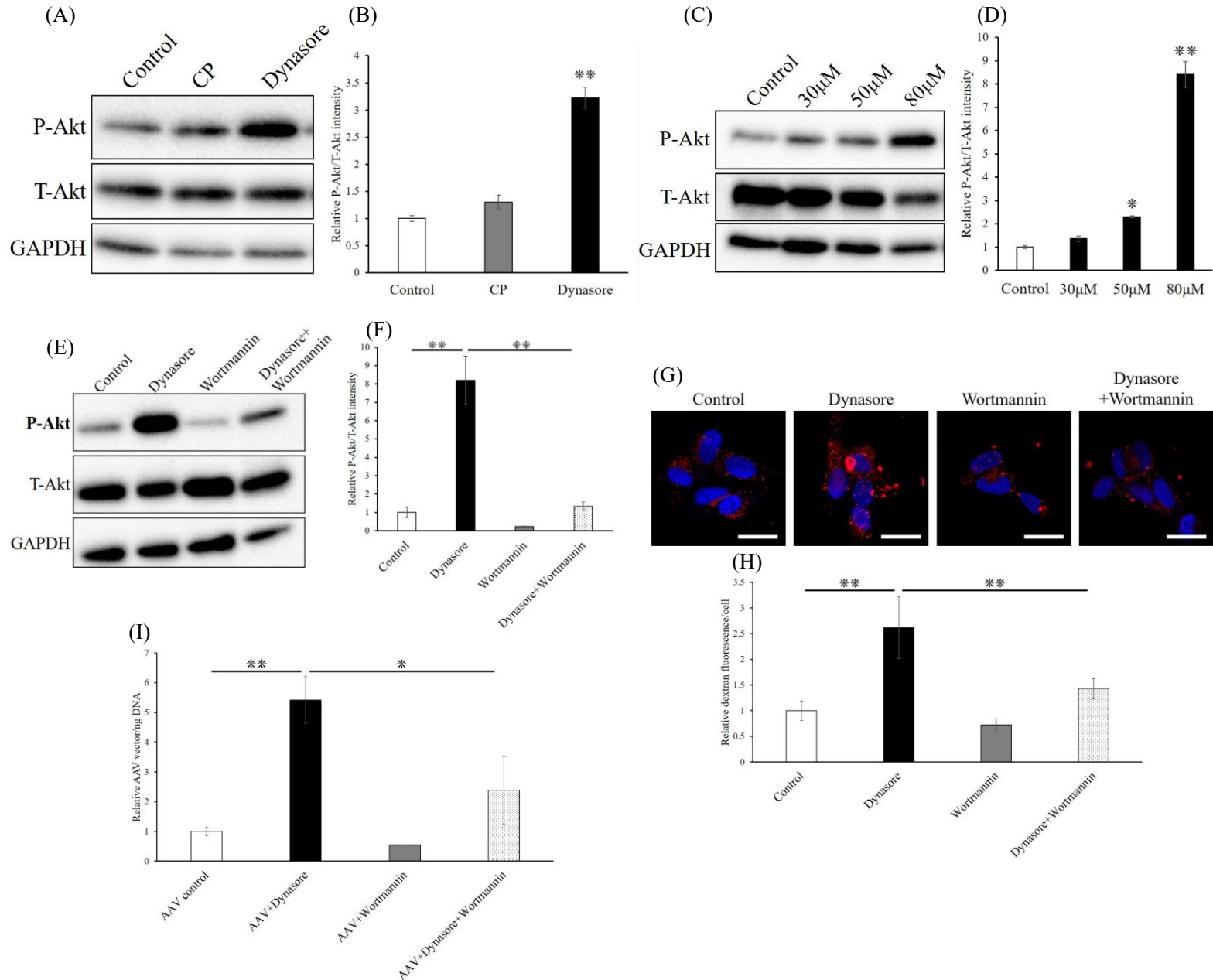
(A) SH-SY5Y に対して、80  $\mu$ M Dynasore を 20, 40, 60 分間処理し、Phalloidin を用いて F-Actin を染色した。矢印はラッフル膜と考えられる構造を示す。Scale bar: 10  $\mu$ m. (B, C) SH-SY5Y に対して、0.5 mg/mL 70 kDa Tetra methyl rhodamine (TMR)-Dextran と 80  $\mu$ M Dynasore を共処理し、1 時間後の 70 kDa TMR-Dextran の蛍光輝度を解析した。Red: 70 kDa TMR-Dextran, Blue: Nucleus. Scale bar: 10  $\mu$ m. n=5, Student's T-test, \* $P$ <0.05 (vs Control). (D, E) SH-SY5Y に対して、0.5 mg/mL 70 kDa TMR-Dextran と 80  $\mu$ M Dynasore または 2  $\mu$ M Cytochalasin D を共処理し、1 時間後の 70 kDa TMR-Dextran の蛍光輝度を解析した。Red: 70 kDa TMR-Dextran, Blue: Nucleus. Scale bar: 10  $\mu$ m. n=3. (F) SH-SY5Y に対して AAV9/3-*GFP*  $3 \times 10^4$  vg/cell と 80  $\mu$ M Dynasore または 2  $\mu$ M Cytochalasin D を共処理し、q-PCR 法により AAV9/3-*GFP* の細胞内取り込みを評価した。n=3, One-way ANOVA followed by Tukey-Kramer test, \*\* $P$ <0.01.

### 2-2-3. エンドサイトーシス阻害剤は PI3K を活性化することによって、マクロピノサイトーシスによる AAV9/3 ベクターの細胞内取り込みを促進する

エンドサイトーシス阻害剤処理によってマクロピノサイトーシスが活性化されることが明らかになったため、続いてこの時の分子メカニズムの解析を行った。マクロピノサイトーシスが誘導される際には、Phosphoinositide 3-kinase (PI3K)が活性化されることによって、下流の Ras-related C3 botulinus toxin substrate 1 (Rac1), Cell division cycle 42 (Cdc42)など Actin の重合に関わる分子が活性化される<sup>59), 60)</sup>。そこでマクロピノサイトーシスの誘導において中心的な役割を果たす PI3K 活性のエンドサイトーシス阻害による変化を解析した。PI3K 活性の指標としては PI3K の下流でリン酸化を受ける Akt のリン酸化を解析することで評価した<sup>61)</sup>。SH-SY5Y に CP, Dynasore を処理し、Western blotting によって Akt のリン酸化を解析した結果、CP, Dynasore の処理によって Akt のリン酸化が増加することが明らかになった(Fig. 13-A, B)。また Dynasore を異なる処理濃度で処理した場合においても、Dynasore の処理濃度依存的に Akt のリン酸化が増加した(Fig. 13-C, D)。次に、この Akt リン酸化の増加が PI3K 活性化によるものか確認するため、SH-SY5Y に Dynasore と PI3K 阻害剤である Wortmannin を共処理し、Western blotting によって Akt のリン酸化を解析した結果、Dynasore 処理による Akt リン酸化の増加は Wortmannin との共処理によっては抑制された(Fig. 13-E, F)。このことから、エンドサイトーシス阻害剤処理による Akt リン酸化の増加は PI3K 活性化に起因することが確認でき、エンドサイトーシス阻害剤が PI3K を活性化させることが明らかになった。次に、この PI3K の活性化が実際にマクロピノサイトーシス活性化に寄与しているか解析するため、SH-SY5Y に Dynasore と Wortmannin を共処理し、マクロピノサイトーシスの指標となる 70 kDa Dextran の細胞内取り込みを解析した。その結果、Dynasore を処理した細胞では 70 kDa Dextran の細胞内取り込みが増加し、またこの取り込みの増加は Wortmannin の共処理によっては抑制された (Fig. 13-G, H)。このことからエンドサイトーシス阻害は PI3K を活性化させることで、マクロピノサイトーシスによる物質の細胞内取り込みを促進することが明らかになった。さらに、エンドサイトーシス阻害による PI3K-マクロピノサイトーシスの活性化が AAV9/3 ベクターの細胞内取り込み促進に寄与しているか解析するため、SH-SY5Y に対して AAV9/3-GFP と Dynasore, Wortmannin を共処理し、q-PCR によって AAV9/3 ベクターの細胞内取り込みの変化を解析した。その結果、Dynasore 処理によって AAV9/3 ベクターの細胞内取り込みは増加し、この取り込みの増加は Wortmannin との共処理によっては抑制さ



れた(Fig. 13-I). このことからエンドサイトーシス阻害剤は PI3K-マクロピノサイトーシスを活性化させることで, AAV9/3 ベクターの細胞内取り込みを促進する事が明らかになった.



**Fig. 13. エンドサイトーシス阻害時における PI3K 活性の評価と AAV9/3 ベクター取り込み促進への寄与の解析**

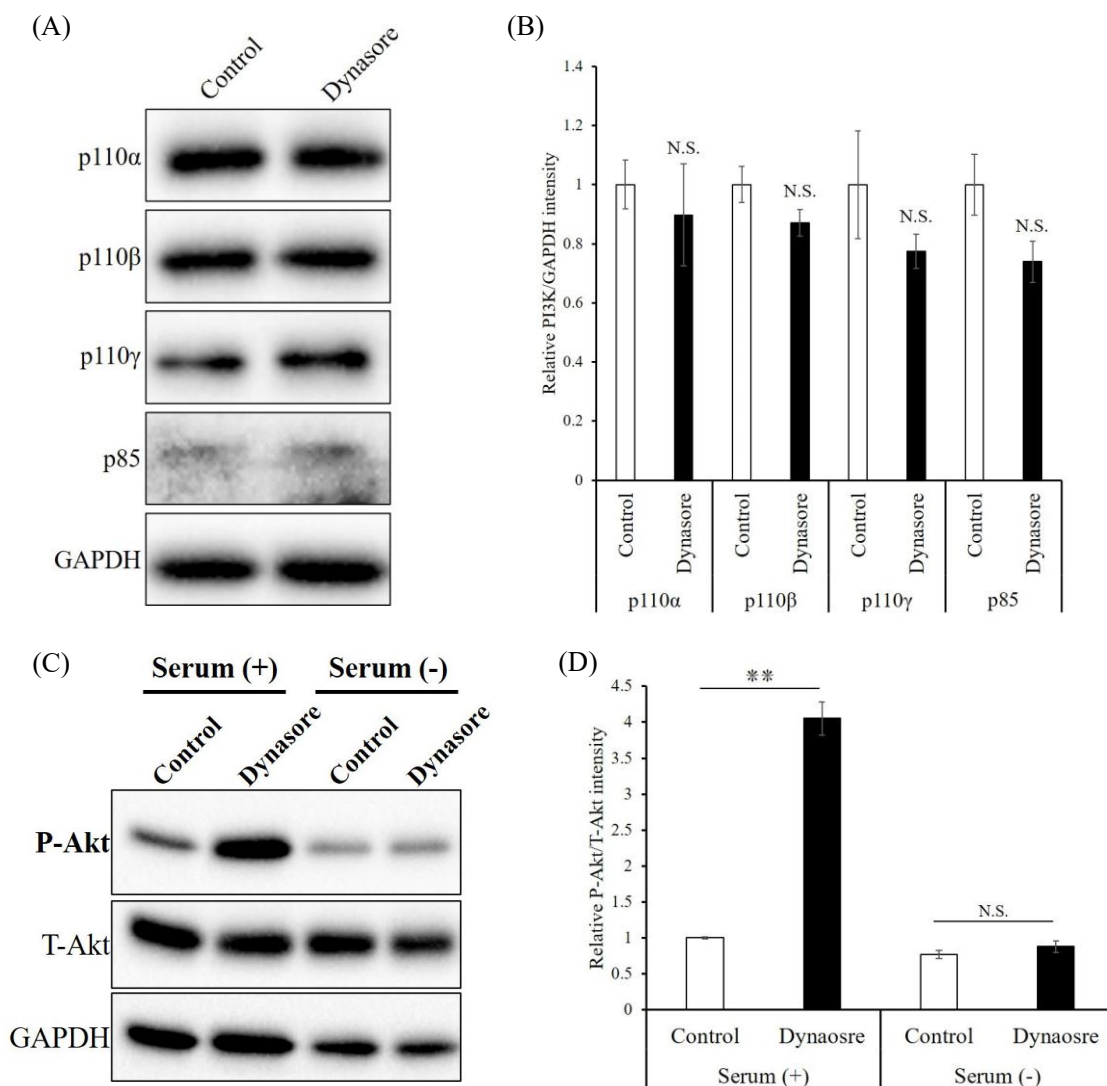
(A, B) SH-SY5Y に対して, 20 μM CP または 80 μM Dynasore を処理し, Western blotting によりリン酸化 Akt の検出を行い, P-Akt/T-Akt の相対バンド強度を解析した. n=3, One-way ANOVA followed by Dunnett test, \*\* $P < 0.01$  (vs Control). (C, D) SH-

SH-SY5Y に対して, 30, 50, 80  $\mu$ M Dynasore を処理し, Western blotting によりリン酸化 Akt の検出を行い, P-Akt/T-Akt の相対バンド強度を解析した.  $n=3$ , One-way ANOVA followed by Dunnett test,  $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$  (vs Control). (E, F) SH-SY5Y に対して, 80  $\mu$ M Dynasore と 5  $\mu$ M Wortmannin を処理し, Western blotting によりリン酸化 Akt の検出を行い, P-Akt/T-Akt の相対バンド強度を解析した.  $n=3$ , One-way ANOVA followed by Tukey-Kramer test,  $**P<0.01$ . (G, H) SH-SY5Y に対して, 0.5 mg/mL 70kDa TMR-Dextran と 80  $\mu$ M Dynasore, 5  $\mu$ M Wortmannin を共処理し, 1 時間後の 70kDa TMR-Dextran の蛍光輝度を解析した. Red: 70 kDa TMR-Dextran, Blue: Nucleus. Scale bar: 10  $\mu$ m.  $n=5$ , One-way ANOVA followed by Tukey-Kramer test,  $**P<0.01$ . (I) SH-SY5Y に対して AAV9/3-*GFP*  $3\times 10^4$  vg/cell と 80  $\mu$ M Dynasore または 5  $\mu$ M Wortmannin を共処理し, q-PCR 法により AAV9/3-*GFP* の細胞内取り込みを評価した.  $n=3$ , One-way ANOVA followed by Tukey-Kramer test,  $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$ .

#### **2-2-4. エンドサイトーシス阻害剤は受容体刺激による PI3K 活性化を促進する**

PI3K は活性サブユニットである p110 と制御サブユニットである p85 のヘテロダイマーとして機能する. また p110 は主要なサブユニットとして p110 $\alpha$ , p110 $\beta$ , p110 $\gamma$  が存在する. そこで, これらの PI3K サブユニットの発現量におけるエンドサイトーシス阻害による影響を解析した. SH-SY5Y に Dynasore を処理し, Western blotting によって各 PI3K サブユニットの発現量を解析した結果, いずれのサブユニットにおいても Dynasore 処理によって発現量に変化は見られなかった(Fig. 14-A, B). このことから, エンドサイトーシス阻害による PI3K の活性化は PI3K の発現量増加によるものではないことが明らかになった. そこでエンドサイトーシス阻害が PI3K の活性化過程に影響を与えているのではないかと考えた. PI3K は Insulin や Epidermal growth factor (EGF) などの成長因子受容体からの刺激によって活性化される<sup>62), 63)</sup>. これらの成長因子受容体にリガンドが結合すると受容体の自己リン酸化が起こり, このリン酸化された受容体と PI3K が p85 サブユニットを介して結合することで, PI3K が細胞膜に局在化し, 活性化する. そこで, エンドサイトーシス阻害による PI3K 活性化が成長因子受容体による刺激を介しているか解析するため, SH-SY5Y に対して Dynasore を成長因子が含まれない無血清条件で処理し, PI3K 活性を解析した. Western blotting によって PI3K 活性の指標となる Akt のリン酸化を解析した結果, 血清を含む条件では

Dynasore 処理によって Akt リン酸化の増加, すなわち PI3K の活性化が見られたが, 無血清条件では Dynasore 処理によっても PI3K の活性化は見られなかった(Fig. 14-C, D). このことから, エンドサイトーシス阻害は成長因子受容体刺激による PI3K の活性化を促進していることが明らかになった.



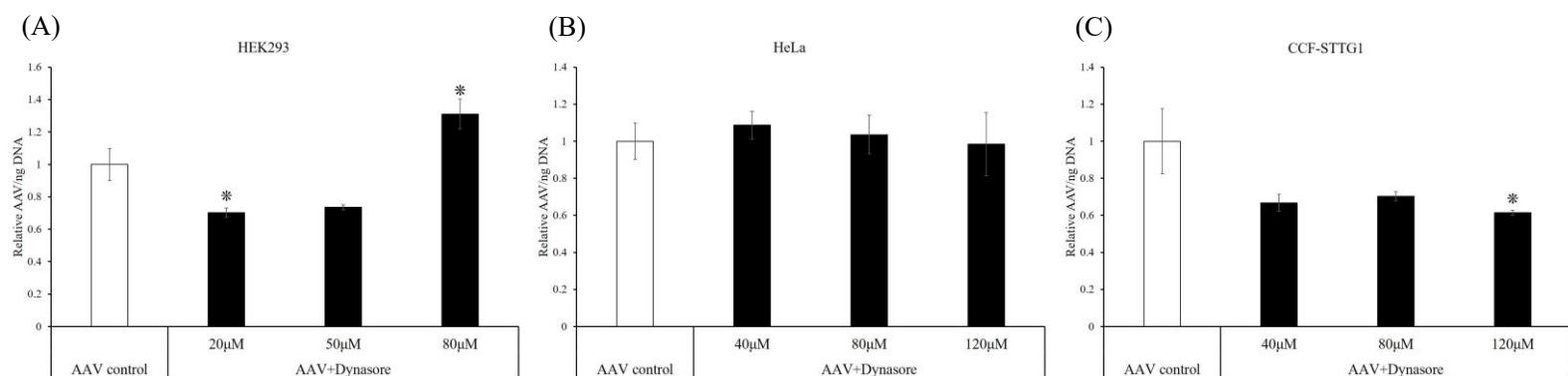
**Fig. 14. エンドサイトーシス阻害による PI3K 活性化メカニズムの解析**

(A, B) SH-SY5Y に対して, 80  $\mu$ M Dynasore を 24 時間処理し, Western blotting によって PI3K サブユニットを検出し, 各 PI3K サブユニット/GAPDH の相対バンド強度を解析した. n=3, Student's T-test. (C, D) SH-SY5Y に対して, 血清を含む(1%)または含まない条件で 50  $\mu$ M Dynasore を 24 時間処理し, Western blotting によってリン酸化 Akt を検出し, P-Akt/T-Akt の相対バンド強度を解析した. n=3, One-way ANOVA

followed by Tukey-Kramer test,  $**P < 0.01$ .

### 2-2-5. AAV9/3 ベクターの細胞内取り込みにおける、エンドサイトーシス阻害剤の効果は細胞種によって異なる

以上の解析から、エンドサイトーシス阻害剤は SH-SY5Y, すなわち神経細胞においては AAV9/3 ベクターの細胞内取り込みを促進することを明らかになった. そこで次に、この現象があらゆる細胞種で共通して見られる現象であるかを解析した. 一般的な細胞実験に用いられる細胞株である HEK293, ヒト子宮頸癌細胞(HeLa), また SH-SY5Y と同じ中枢神経系の細胞であるヒトアストロサイトーマ (CCF-STTG1)を用いて解析を行った. これらの細胞に対して、AAV9/3-*GFP* と Dynasore を共処理し、q-PCR によって AAV9/3 ベクターの細胞内取り込みの変化を解析した. その結果、HEK293 では 80 $\mu$ M の Dynasore 処理によって AAV9/3 ベクターの細胞内取り込みが増加したが(Fig. 15-A), いずれの処理濃度でも HeLa では変化せず(Fig. 15-B), CCF-STTG1 では減少した(Fig. 15-C). よって興味深いことに、エンドサイトーシス阻害による AAV9/3 ベクターの細胞内取り込みに対する効果は細胞種によって異なることが明らかになった.



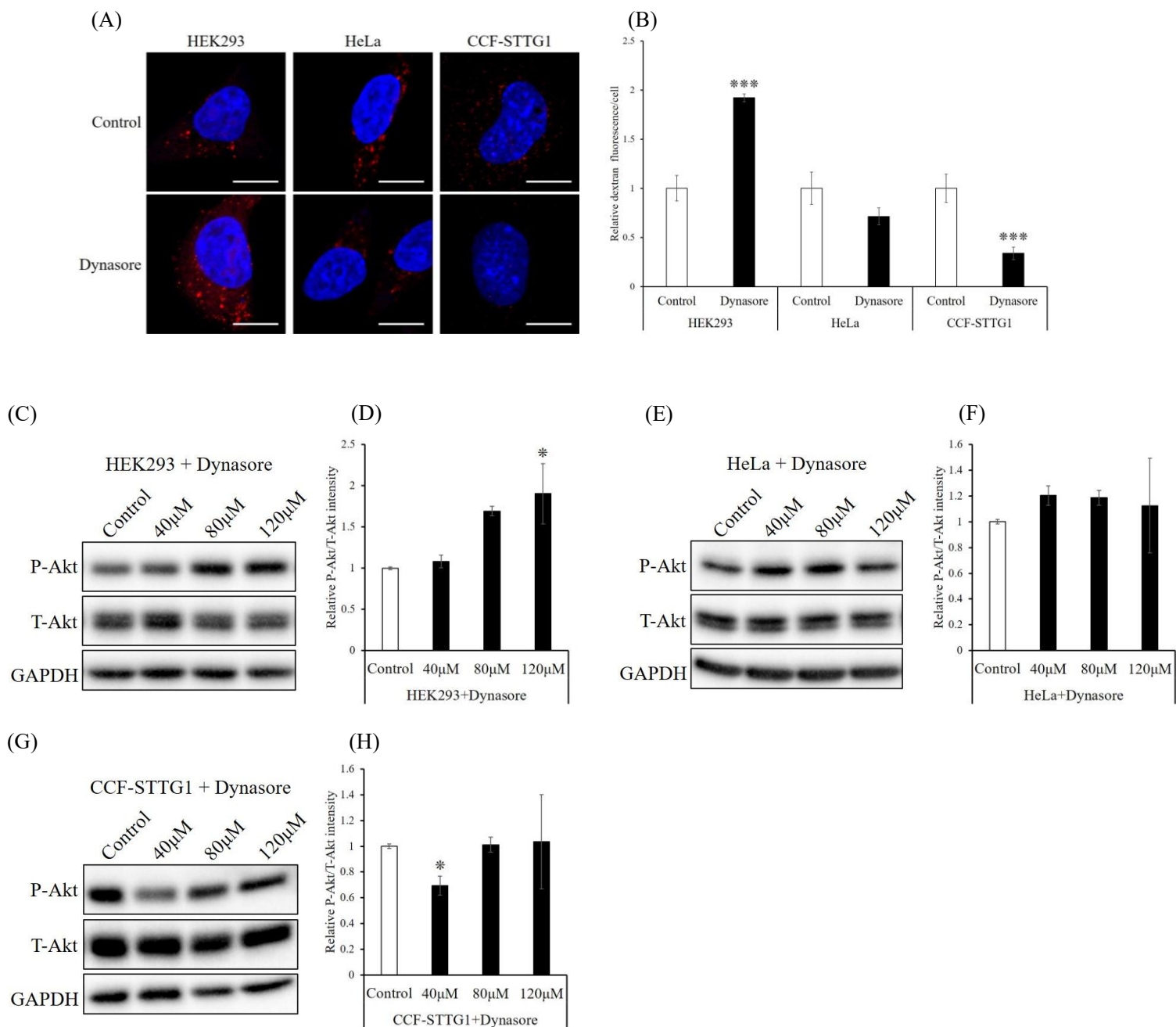
**Fig. 15.** 異なる細胞種におけるエンドサイトーシス阻害が AAV9/3 ベクターの細胞内取り込みに与える影響の解析

(A) HEK293 に対して AAV9/3-*GFP*  $3 \times 10^4$  vg/cell と 20, 50, 80  $\mu$ M Dynasore を共処理し、q-PCR 法により AAV9/3-*GFP* の細胞内取り込みを評価した.  $n=3$ , One-way ANOVA followed by Dunnett test,  $*P < 0.05$  (vs AAV control). (B) HeLa に対して AAV9/3-*GFP*  $3 \times 10^4$  vg/cell と 40, 80, 120  $\mu$ M Dynasore を共処理し、q-PCR 法により

AAV9/3-*GFP* の細胞内取り込みを評価した. n=3, One-way ANOVA followed by Dunnett test. (C) CCF-STTG1 に対して AAV9/3-*GFP*  $3 \times 10^4$  vg/cell と 40, 80, 120  $\mu$ M Dynasore を共処理し, q-PCR 法により AAV9/3-*GFP* の細胞内取り込みを評価した. n=3, One-way ANOVA followed by Dunnett test, \* $P < 0.05$  (vs AAV control).

#### 2-2-6. AAV9/3 ベクターの細胞内取り込みにおける, エンドサイトーシス阻害剤の効果は PI3K-マクロピノサイトーシス活性化に依存する

次に上記の細胞種毎の応答の違いが何に起因しているかを解析した. エンドサイトーシス阻害によって AAV9/3 ベクターの取り込みが促進される SH-SY5Y ではエンドサイトーシス阻害がマクロピノサイトーシスを活性化することで AAV9/3 ベクターの取り込みを促進することを明らかにしている. そこで, HEK293, HeLa, CCF-STTG1 ではエンドサイトーシス阻害によってマクロピノサイトーシスに変化が見られるかを解析した. 細胞に Dynasore と 70 kDa Dextran を処理し, 70 kDa Dextran の細胞内取り込みを解析した結果, HEK293 では Dynasore 処理によって 70 kDa Dextran の細胞内取り込みは増加したが, HeLa や CCF-STTG1 では変化が無い, または減少した(Fig.16-A, B). よって HEK293 においてはエンドサイトーシス阻害によってマクロピノサイトーシスの活性化が起こるが, HeLa や CCF-STTG1 では起こらないことが明らかになった. また, これらの細胞におけるマクロピノサイトーシスの実行に必須の PI3K 活性の変化を解析するため, Western blotting によって Akt リン酸化を解析した結果, HEK293 では Dynasore の処理濃度依存的に Akt リン酸化の増加が見られたのに対して, HeLa や CCF-STTG1 ではいずれの処理濃度でも Akt リン酸化の増加は見られなかった(Fig. 16-C, D). よって HEK293 ではエンドサイトーシス阻害によって PI3K が活性化されるが, HeLa や CCF-STTG1 では PI3K 活性は変化しないことが明らかになった. エンドサイトーシス阻害によって PI3K-マクロピノサイトーシスが活性化される HEK293 では SH-SY5Y と同様にエンドサイトーシス阻害によって AAV9/3 ベクターの細胞内取り込みが促進されることから, エンドサイトーシス阻害によって AAV9/3 ベクターの細胞内取り込みが促進されるかの細胞種による違いは, PI3K-マクロピノサイトーシスが活性化されるかに依存することが考えられる.



**Fig. 16.** エンドサイトーシス阻害時におけるマクロピノサイトーシス及び PI3K 活性の評価

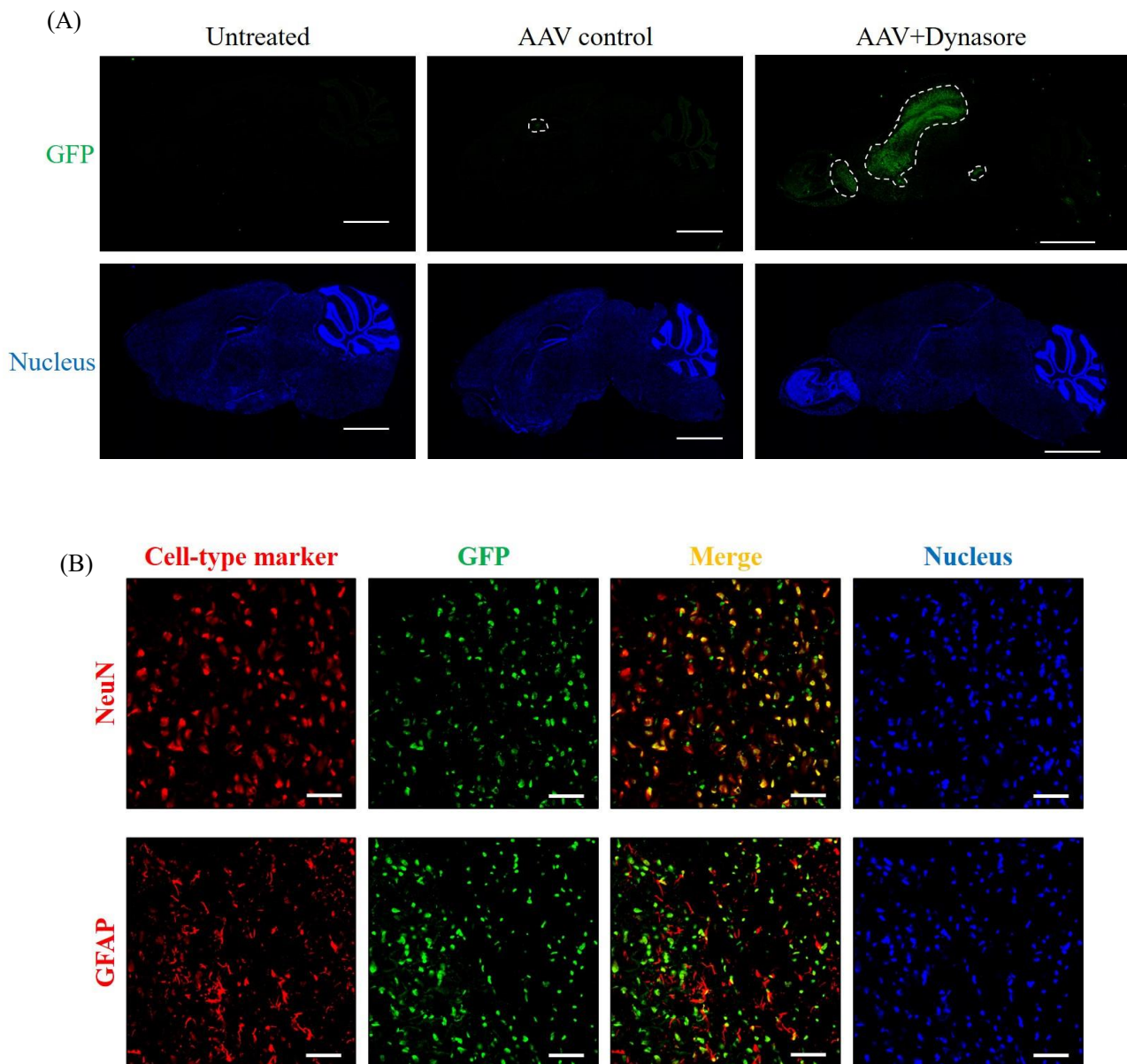
(A, B) HEK293, HeLa, CCF-STTG1 に対して, 0.5 mg/mL 70 kDa TMR-Dextran と 120  $\mu$ M Dynasore を共処理し, 1 時間後の 70 kDa TMR-Dextran の蛍光輝度を解析した. Red: 70 kDa TMR-Dextran, Blue: Nucleus. Scale bar: 10  $\mu$ m. n=5, Student's T-test,

\*\*\* $P < 0.005$  (vs Control). (C, D) HEK293 に対して, 40, 80, 120  $\mu\text{M}$  Dynasore を処理し, Western blotting によりリン酸化 Akt の検出を行い, P-Akt/T-Akt の相対バンド強度を解析した.  $n=3$ , One-way ANOVA followed by Dunnett test, \* $P < 0.05$ , (vs Control). (E, F) HeLa に対して, 40, 80, 120  $\mu\text{M}$  Dynasore を処理し, Western blotting によりリン酸化 Akt の検出を行い, P-Akt/T-Akt の相対バンド強度を解析した.  $n=3$ , One-way ANOVA followed by Dunnett test, \* $P < 0.05$ , (vs Control). (G, H) HEK293 に対して, 40, 80, 120  $\mu\text{M}$  Dynasore を処理し, Western blotting によりリン酸化 Akt の検出を行い, P-Akt/T-Akt の相対バンド強度を解析した.  $n=3$ , One-way ANOVA followed by Dunnett test, \* $P < 0.05$ , (vs Control).

### 2-2-7. エンドサイトーシス阻害剤はマウス脳における AAV9/3 ベクターの細胞内取り込みを促進する

ここまでの解析から, 培養細胞系においてエンドサイトーシス阻害剤処理が AAV9/3 ベクターの細胞内取り込みを促進することが明らかとなったため, *in vivo* においても同様の現象が見られるかを検討した. 8 週齢雄性マウス (C57BL/6  $\times$  129sv) に対して AAV9/3-GFP  $3.2 \times 10^{12}$  vg/kg Body weight (BW) 及び Dynasore 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  BW を脳室内投与によって同時投与し, 2 週間後に組織を回収し, GFP 発現を解析することで, AAV9/3 ベクターの細胞内取り込みを評価した. 脳切片を用いた免疫染色によって発現 GFP を検出した結果, AAV 単独投与マウス (AAV control) と比較し, Dynasore を同時投与したマウス (AAV+Dynasore) では GFP の発現量が増加し, またより広範な脳領域において GFP の発現が確認された (Fig. 17-A). よって培養細胞系での実験と同様に, *in vivo* においてもエンドサイトーシス阻害剤処理によって AAV9/3 ベクターの細胞内取り込みが促進されることが明らかになった. AAV9/3 ベクターは中枢神経系への投与によって脳の神経細胞に遺伝子導入が可能であることが知られているため<sup>55)</sup>, エンドサイトーシス阻害剤の共処理によって遺伝子が導入される細胞種に変化が見られるかを解析した. AAV+Dynasore マウス脳切片を用いて各種セルタイプマーカーとの共染色によって GFP が発現している細胞種を解析した結果では, GFP 陽性細胞の多くは神経細胞マーカーである Neuronal nuclei (NeuN) 陽性細胞であり, アストロサイトマーカー Glial fibrillary acidic protein (GFAP) 陽性細胞では一部のみであった (Fig. 17-B). よって, AAV9/3 ベクターとエンドサイトーシス阻害剤の共処理は神経細胞に効率的に遺伝子を導入することが可能であることが明らかになった.





**Fig. 17.** マウス脳における、エンドサイトーシス阻害剤が AAV9/3 ベクター細胞内取り込みに与える影響の解析

(A) マウス脳室内に AAV9/3-GFP と Dynasore を同時投与し、免疫染色によって発現 GFP の染色を行った. Green: GFP, Blue: Nucleus, 白点線で囲った領域は GFP の発現領域を示す. Scale bar: 2 mm. (B) AAV9/3-GFP, Dynasore 同時投与マウスの脳切片を用いて免疫染色によって発現 GFP とセルタイプマーカーの共染色を行い、大脳を観察した. Red: NeuN, GFAP, Green: GFP, Blue: Nucleus, Scale bar: 50 $\mu$ m.



### 2-3. 考察

AAV ベクターを用いた遺伝子治療は現在、様々な疾患に対する根本的治療法として大きな注目を集めている。本研究では低分子化合物を併用することで、AAV ベクターの細胞内取り込みを促進し、より効率的な遺伝子治療法を確立することを目指して、AAV ベクターの細胞内取り込みを促進する化合物の探索を行い、またその際の分子メカニズムの解明を行った。神経細胞指向性の AAV9/3 ベクターと種々の小胞輸送関連化合物を SH-SY5Y へ同時処理し、AAV9/3 ベクターの細胞内取り込みを促進する化合物を探索した結果、興味深いことに AAV の細胞内取り込みを担っていると考えられているエンドサイトーシスの阻害剤を共処理することによって AAV9/3 ベクターの細胞内取り込みが促進されることを明らかにした。さらに、このエンドサイトーシス阻害による AAV9/3 ベクター細胞内取り込み促進のメカニズムを解析した結果、エンドサイトーシス阻害剤によってマクロピノサイトーシスが活性化されることで AAV9/3 ベクターの細胞内取り込みが促進されていることを明らかにした。過去の研究では Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger 阻害剤である 5-(N-Ethyl-N-isopropyl)-Amiloride (EIPA) やプロテアソーム阻害剤である MG132 の処理によって AAV ベクターによる遺伝子導入が促進されることが報告されている<sup>53), 64)</sup>。EIPA は細胞内に侵入した AAV ベクターの核内への送達を促進することで、MG132 はプロテアソーム阻害による細胞内 AAV ベクターの分解抑制によって遺伝子導入を促進する。上記のように細胞内に取り込まれた後の AAV ベクターの輸送や分解を標的とした遺伝子導入の促進方法は知られているが、本研究では AAV ベクターの細胞内への取り込み過程に着目し、エンドサイトーシス阻害剤の処理によって AAV ベクターの細胞内取り込みが促進されることを明らかにしており、これまでに報告の無い新規のメカニズムによる遺伝子導入促進方法であると考えられる。

本研究では SH-SY5Y の他に、HEK293, HeLa, CCF-STTG1 の 4 種類の細胞種における AAV9/3 ベクター細胞内取り込みに対するエンドサイトーシス阻害剤の効果を検討しており、エンドサイトーシス阻害剤の共処理によって SH-SY5Y, HEK293 では AAV9/3 ベクターの細胞内取り込みは促進され、HeLa では変化は無く、CCF-STTG1 では抑制された。このように AAV9/3 ベクター細胞内取り込みにおけるエンドサイトーシス阻害剤の効果は細胞種毎によって異なることを示している。細胞によって発現する受容体も異なっているため、細胞種の違いによっても取り込み経路が異なってくることが考えられる。実際にクラスリン依存性エンドサイトーシスで細胞内に取り込まれると報告されている AAV2 においても、クラスリン非依存性エンドサイトーシスである

Clathrin-independent carriers/ Glycosylphosphatidylinositol-anchored-protein-enriched endosomal compartment (CLIC/GEEC)エンドサイトーシスによって細胞に取り込まれることも報告されており<sup>65)</sup>, 同じ血清型の AAV ベクターであっても細胞種によっては異なる経路で細胞内に取り込まれることが考えられる. AAV9 においては N 型糖鎖末端 Galactose 残基と, ラミニン受容体が受容体として同定されている<sup>66), 67)</sup>. このうちラミニン受容体はエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれることが知られているため<sup>68)</sup>, AAV9/3 ベクターにおいてもマクロピノサイトーシスだけでなくエンドサイトーシス経路によっても細胞内に取り込まれることが考えられる. そのため, エンドサイトーシス阻害剤処理によっても AAV9/3 ベクターの細胞内取り込み促進が見られなかった HeLa や CCF-STTG1 では AAV9/3 ベクターの細胞内取り込みにおいてエンドサイトーシスの寄与が大きいことが考えられる.

エンドサイトーシス阻害剤と AAV9/3 ベクターの併用は神経細胞モデルである SH-SY5Y においては AAV9/3 ベクター取り込みを促進したが, アストロサイトモデルである CCF-STTG1 では逆に抑制した. アストロサイトの異常が病態の形成に重要である筋萎縮性側索硬化症などの一部の神経変性疾患に対する遺伝子治療ではアストロサイトへの遺伝子導入が重要となるが<sup>69)</sup>, 多くの神経変性疾患では神経細胞に遺伝子を導入することが治療において重要となる. そのため, エンドサイトーシス阻害剤による神経細胞への遺伝子導入の促進, アストロサイトへの遺伝子導入の抑制は多くの神経変性疾患に対する遺伝子治療において有用であると考えられる. 現在では遺伝子改変によって組織特異性の異なる様々な改変型 AAV ベクターが作成されている. 本研究では低分子化合物の共処理によって特定の細胞種においてのみ AAV ベクターの細胞内取り込みを促進することが可能であることが示唆されたことから, 将来的には低分子化合物による AAV 組織特異性の制御が可能になることが期待される.

培養細胞系だけでなくマウス脳室内への AAV9/3 ベクターとエンドサイトーシス阻害剤の同時投与実験の結果においても, エンドサイトーシス阻害剤処理によって AAV9/3 ベクターの細胞内取り込みが促進されることを明らかにした. このことから, エンドサイトーシス阻害剤は *in vivo* においても AAV9/3 ベクターの細胞内取り込みを促進することが明らかになり, エンドサイトーシス阻害剤と AAV9/3 ベクターの併用はより少量のベクターでの遺伝子治療を可能にし, 遺伝子治療の費用を削減することが出来ると期待される. また本研究ではエンドサイトーシス阻害剤として Chlorpromazine や Dynasore を使用したが, Chlorpromazine は既に臨床で使用されている薬物であり, Dynasore に関しても同様の作用機序を有する Sertraline が臨床で使用されている<sup>70)</sup>.

そのためこれらのエンドサイトーシス阻害剤の安全性は既に確認されており、AAV ベクターとの併用によっても重篤な副作用は起こらないことが期待される。またドラッグリポジショニングによって AAV ベクターとの併用が安価に実現可能であることもメリットとして考えられる。現在では様々な疾患に対して AAV ベクターを用いた遺伝子治療による新規治療法の開発研究が行われている。AAV ベクターは病原性を持たないウイルスであることから、生体に投与しても AAV ベクター由来の副作用は起こらないと考えられてきた。一方で、AAV を用いた遺伝子治療の臨床研究が進んだ結果、大量の AAV ベクターの投与が肝臓に対して毒性を発現することが明らかになってきており<sup>71)</sup>、臨床応用に際して肝毒性の低減又は回避が大きな課題となっている。本研究で示したエンドサイトーシス阻害による AAV ベクターの細胞内取り込み促進は、肝臓への AAV ベクターの暴露の低減に繋がると考えられ、遺伝子治療の費用の削減だけでなく副作用の低減にもつながることが期待される。

本研究ではエンドサイトーシス阻害剤が AAV9/3 ベクターの細胞内取り込みを促進するメカニズムを解析する過程で、エンドサイトーシス阻害によって PI3K が活性化され、これによってマクロピノサイトーシスが活性化されることを初めて示した。エンドサイトーシスとマクロピノサイトーシスはいずれも細胞外物質の細胞内への輸送機構として知られているが、エンドサイトーシスは受容体に依存した選択的な輸送経路であるのに対して、マクロピノサイトーシスは特定に受容体には依存しない非選択的な輸送経路であることが知られている<sup>56)</sup>。本研究で示したエンドサイトーシス阻害によるマクロピノサイトーシスの活性化は異なる輸送経路同士のクロストークが存在していることを示唆していると考えられる。実際にエンドサイトーシスとマクロピノサイトーシスは分子機構が異なるものの、どちらもアミノ酸などの細胞生存に必須の成分の細胞内への取り込みを担っていることが知られており<sup>72)</sup>、なんらかの原因でエンドサイトーシスによるアミノ酸の取り込みが抑制されたときに、異なる経路であるマクロピノサイトーシスが代償的に活性化されることは十分に考えられる。

近年では、新規モダリティとして抗体医薬品が注目されており、抗癌剤や神経変性疾患治療薬として期待されている。一方で、抗体医薬品は膜透過性の低い高分子であるため、細胞表面に発現する分子しか標的にできないことが問題点としてある。そこで膜透過型ペプチドを用いた抗体分子の細胞内送達技術が研究されているが、この膜透過型ペプチドによる抗体分子の送達はマクロピノサイトーシス経路を利用していることが考えられている<sup>73), 74)</sup>。そのため本研究で示したエンドサイトーシス阻害によるマクロピノサイトーシス活性化は AAV ベクターの細胞内取り込み促進だけでなく、抗体

医薬品の細胞内送達にも応用可能であることが考えられる。また、新規の薬物輸送担体として細胞外小胞であるエクソソームが注目されているが、エクソソームの細胞内取り込みもマクロピノサイトーシス経路が関連していることが報告されており<sup>75)</sup>、エンドサイトーシス阻害によるマクロピノサイトーシス活性化が応用可能であることが考えられる。以上のように本研究明らかにしたエンドサイトーシス阻害によるマクロピノサイトーシス活性化は AAV ベクターだけでなく様々な物質の細胞内送達へ応用可能であることが考えられる。

本研究を総括すると、低分子化合物の併用による、より効果的な遺伝子治療法の開発を目指して、AAV ベクターの細胞内取り込みを促進させる化合物を探索した結果、エンドサイトーシス阻害剤が AAV ベクターの細胞内取り込みを促進することを明らかにした。この時の分子メカニズムを解析した結果、エンドサイトーシス阻害が PI3K を活性化させることで、マクロピノサイトーシスによる AAV ベクターの取り込みを促進することを明らかにした。よって以上の内容から、エンドサイトーシス阻害剤は AAV ベクターの細胞内取り込みを促進させることが可能であり、小胞輸送系の制御による、より効果的な遺伝子治療法の開発に繋がると期待される。

## ■ 第3章 実験試料及び方法

### 実験動物

5 ヲ月齡, 14 ヲ月齡, 23 ヲ月齡雄性マウス (C57BL/6J)は日本チャールス・リバー株式会社から購入し, Species of pathogen free (SPF)環境下で 1 週間飼育した後, 実験に使用した. 8 週齡雄性マウス (C57BL/6 × 129sv)は SPF 環境下で飼育していたものを使用した. マウスを用いた実験は徳島大学動物実験委員会から承認を受け, 徳島大学 先端研究推進センター 動物資源研究部門の施設において, 徳島大学動物実験指針に則って行った.

### 培養細胞

ヒト神経芽細胞腫細胞株 (SH-SY5Y)は, 10% Fetal bovine serum (FBS) (Biosera), 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Streptomycin (Sigma-Aldrich), および 70  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Penicillin G (Sigma-Aldrich)を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)/Nutrient mixture F-12 Ham (Sigma-Aldrich)培地中で, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>条件下で培養した. 各実験の前に SH-SY5Y は, 1% FBS, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Streptomycin, 70  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Penicillin G, および 10 $\mu\text{M}$  retinoic acid を含む DMEM/Nutrient mixture F-12 Ham 培地中で 3 日ごとに培地を交換しながら, 7~10 日間培養することで神経細胞へ分化させ<sup>76)</sup>, 使用した. ヒト胎児腎細胞(HEK293)及びヒト子宮頸癌細胞(HeLa)は 10% FBS, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Streptomycin, および 70  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Penicillin G を含む DMEM high glucose (Sigma-Aldrich)培地中で, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>条件下で培養した. ヒトアストロサイトーマ(CCF-STTG1)は 10% FBS, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Streptomycin, および 70  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Penicillin G を含む RPMI1640 (Sigma-Aldrich)培地中で, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>条件下で培養した.

### AAV ベクター

AAV9/3-CMV-GFP は自治医科大学 村松慎一教授に作製, 供与頂いたものを実験に使用した.

### 培養細胞への試薬, AAV ベクター処理

酸化ストレス誘導のため, SH-SY5Y を 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Wako)を含む培地で, 37°C, 30 分間培養した. その後, 培地を交換し, 12 時間, 24 時間, 48 時間培養を行った後, 各種解析を行った. エンドサイトーシス阻害剤としては Chlorpromazine (Santa Cruz Biotechnology)を, 終濃度 12  $\mu\text{M}$  で 24 時間 SH-SY5Y 細胞に処理した. オートファジ

一誘導のためには、SH-SY5Y を終濃度 1  $\mu$ M の Torin-1 (Santa Cruz Biotechnology) で 2 時間処理した。

AAV ベクターと化合物の共処理では、AAV9/3-*GFP* を  $1.0\sim 3.0 \times 10^4$  vg/cell, Chlorpromazine を終濃度 20  $\mu$ M, Dynasore (Abcam) を終濃度 20~120  $\mu$ M, Cytochalasin D (Wako) を終濃度 2  $\mu$ M, Wortmannin (Funakoshi) を終濃度 5  $\mu$ M で 24 時間処理後、培地を交換し、24 時間 (DNA 抽出) 又は 48 時間 (細胞抽出液) 培養後に解析を行った。

### マウスへの AAV ベクター投与

8 週齢雄性マウス (C57BL/6  $\times$  129sv) を麻酔した後、頭頂部の皮膚を切開することで頭蓋骨を露出させた。矢状縫合と冠状縫合の接点であるブレグマから横方向に 1 mm, 尾側に 0.5 mm の位置にマウス脳室内投与用二段針 (Hoshiseido) を用いて AAV ベクター溶液 25  $\mu$ L (AAV9/3-*GFP*  $3.2 \times 10^{12}$  vg/kg BW + Dynasore 10  $\mu$ g/kg BW) を右側脳室内投与し、2 週間飼育した後に臓器を回収し、解析を行った。

### 抗体

一次抗体:

抗体名	メーカー, 製品番号	希釈倍率: Western blotting	希釈倍率: 免疫染色
抗 Akt 抗体	CST, #4691	1000	-
抗 Phospho-Akt(S473) 抗体	CST, #4060	1000	-
抗 $\beta$ -Tubulin 抗体	CST, #2128	1000	-
抗 EEA1 抗体	CST, #3288	1000	-
抗 GAPDH 抗体	Santa Cruz Biotechnology, sc032233	1000	-
抗 GFAP 抗体	Sigma-Aldrich, G9269	-	400
抗 GFP 抗体	Clontech, 632381	1000	
抗 GFP 抗体	Nacalai Tesque, 04404-26	-	500
抗 GM130 抗体	BD biosciences, 610822	-	200
抗 LAMP1 抗体	Abcam, ab24170	1000	-
抗 LAMP2 抗体	Abcam, ab25631	-	200

抗 LAMP2 抗体	Santa Cruz Biotechnology, sc19991	1000	200
抗 LC3 抗体	CST, #3868	1000	-
抗 LC3 抗体	MBL, M152-3	-	100
抗 NeuN 抗体	Millipore, ABN78	-	400
抗 PI3K p110 $\alpha$ 抗体	CST, #4249	1000	-
抗 PI3K p110 $\beta$ 抗体	CST, #3011	1000	-
抗 PI3K p110 $\gamma$ 抗体	CST, #5405	1000	-
抗 PI3K p85 抗体	CST, #4257	1000	-
抗 p62 抗体	BD biosciences, 610833	1000	-
抗 SNAP-29 抗体	Abcam, ab181151	1000	-
抗 Synataxin17 抗体	Sigma-Aldrich, HPA001204	1000	200
抗 Synataxin7 抗体	NOVUS, NBP1-87497	1000	200
抗 VAMP8 抗体	Abcam, ab76021	1000	-
抗 VAMP8 抗体	Sigma-Aldrich, HPA006882	1000	100
抗 ykt6 抗体	Sigma-Aldrich, HPA030818	1000	100

二次抗体:

抗体名	メーカー, 製品番号	希釈倍率: Western blotting	希釈倍率: 免疫染色
抗 mouse IgG, Alexa fluor® 488	Abcam, ab150113	-	1000
抗 mouse IgG, Alexa fluor® 555	Abcam, ab150114	-	1000
抗 rabbit IgG, Alexa fluor® 488	Abcam, ab150077	-	1000
抗 rat IgG, Alexa fluor® 555	Abcam, ab150158	-	1000
抗 mouse IgG, HRP linked antibody	CST, #7076	1000	-



抗 rabbit IgG, HRP linked antibody	CST, #7074	1000	-
抗 rat IgG, HRP linked antibody	CST, #7077	1000	-

### 組織及び細胞抽出液の作成

矢状方向に分割したマウス左脳または分割後の大脳, 小脳, 脳幹の湿重量 100 mg に対して 500  $\mu$ L の各種 Protease 阻害剤 (1  $\mu$ M Pepstatin A, 20  $\mu$ M Leupeptin, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF)及び Phosphatase 阻害剤カクテル (Nacalai tesque, 1/100 dilution)を添加した RIPA Buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 150 mM NaCl, 1% Nonidet P40, 0.5 % Sodium Deoxycholate, 0.1% SDS)を加え, 超音波処理により組織を破碎し, 4°C, 12000 g, 15 分間遠心後, 上清を組織抽出液として回収した.

細胞を氷冷した PBS で洗浄した後, スクレーパーで細胞を剥がし, PBS で回収した. 回収した細胞懸濁液を 4°C, 2000 g で 5 分間遠心し, ペレットを各種 Protease 阻害剤および Phosphatase 阻害剤カクテルを添加した RIPA buffer 50  $\mu$ L で再懸濁した. 超音波処理によって細胞を破碎し, 4°C, 12000 g で 15 分間遠心後, 上清を細胞抽出液として回収した. 組織及び細胞抽出液のタンパク質濃度は, ウシ血清アルブミン (BSA)を標準として DC<sup>TM</sup> protein assay kit (Bio-Rad) で測定した.

### マウス脳凍結切片の作製

矢状方向に分割したマウス右脳を Tissue-Tek O.C.T. compound (Sakura Finetek) に包埋し, クライオスタット CM3050S (Leica) を用いて 10  $\mu$ m 厚の切片を作製し, APS コートスライドガラス (MATSUNAMI GLASS IND.) に張り付け, -80°Cで保存した.

### DNA 抽出

細胞を氷冷した PBS で洗浄した後, スクレーパーで細胞を剥がし, PBS で回収した. 回収した細胞懸濁液を 4°C, 2000 g で 5 分間遠心し, 上清を除いた. ペレットを 500  $\mu$ g/mL Proteinase K (Merck)を含む DNA 抽出 Buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 20 mM EDTA, 2% SDS)で懸濁し, 55°Cで 1 時間反応させた. NaCl を終濃度 1.3 M になるように加え, 4°C, 13200 g で 10 分間遠心し, 上清を回収した. この上清に EtOH を終濃度 70%で加え, 4°C, 13200 g で 10 分間遠心し, 上清を除いた. ペレットに対し, -30°Cに冷却した 70% EtOH を加え, 4°C, 13200 g で 10 分間遠心し, 上清を除いた.

ペレットを Speed Vac (Savant) で乾燥させた後, Tris-EDTA (TE) buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (pH 8.0)) で溶解し, DNA 抽出液とした. 抽出液中の DNA 濃度は Nano Drop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher SCIENTIFIC) を用いて測定した.

### **q-PCR**

AAV9/3-*GFP* 中の WPRE 配列に対する Primer を用いて, 以下の組成で Reaction mix を調製し, CFX Connect Real-Time System (Bio-Rad) で PCR 反応を行った. 検量線サンプルとしては  $2.2 \times 10^4 \sim 2.2 \times 10^9$  vg の AAV9/3-*GFP* を用いた. 得られた Cq 値からサンプル中の相対 AAV vector 量を算出した.

Reaction mix: 1 × iQSYBR (Bio-Rad)

各 500 nM Primer

50 ng サンプル DNA

Primer: WPRE Fw 5'-ATTGCTTCCCGTATGGCTTTCA-3'

WPRE Rv 5'-TCAGCAAACACAGTGCACACCA-3'

反応条件: 95°C 3 min

95°C 15 sec } × 40

60°C 1 min

### **免疫沈降法によるリソソーム画分の獲得**

免疫沈降法によるリソソーム画分の獲得は Tanaka らの方法に従って行った<sup>17)</sup>. マウス大脳をダウンスホモジナイザーに移し, 0.25 M Sucrose-5 mM Sodium phosphate buffer /PBS を加え, 氷上で 100 回ストロークすることで, 組織を破碎した. 4°C, 1800 g で 5 分間遠心し, 上清を回収した. ペレットに 0.25 M Sucrose-5 mM Sodium phosphate buffer /PBS を加え, 同様の操作を 2 回行った. 回収した上清を 4°C, 18500 g で 30 分間遠心し, 上清を除いた. ペレットは 0.25 M Sucrose-5 mM Sodium phosphate buffer /PBS で再懸濁後, 4°C, 18500 g で 30 分間遠心することで洗いを行った. ペレットを 0.25 M Sucrose-5 mM Sodium phosphate buffer /PBS で再懸濁後, 一次抗体として抗 LAMP1 抗体 (abcam, ab24170, 100 倍希釈) を添加し, 4°C で一晩反応させた. 4°C, 18500 g で 30 分間遠心後, ペレットを 0.25 M Sucrose-5 mM Sodium phosphate buffer /PBS で再懸濁し, 二次抗体として抗 Rabbit IgG Biotinylated (Vector Laboratories, Ba-1000, 30 倍希釈) を添加し, 室温で 1 時間反応させた. 4°C, 18500 g

で 30 分間遠心後、ペレットを 0.25 M Sucrose-5 mM Sodium phosphate buffer /PBS で再懸濁し、三次プローブとして抗 Streptavidin particle Plus-DM (BD biosciences, 557812, 10 倍希釈)を添加し、室温で 1 時間反応させた。チューブを BD IMagnet (BD biosciences)にセットし、室温 30 分間静置した。上清を除き、チューブ壁面に付着した LAMP1 陽性画分を PBS で回収し、4°C, 18500 g で 30 分間遠心した。上清を除いたペレットを各種 Protease 阻害剤および Phosphatase 阻害剤カクテルを添加した RIPA buffer 50  $\mu$ L で再懸濁した。超音波処理によってペレットを破碎し、4°C, 12000 g で 15 分間遠心後、上清をリソソーム画分として回収した。

### **Western blotting**

組織または細胞抽出液を 6 $\times$  SDS sample buffer (125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 4% SDS, 20% Glycerol, 0.01% BPB, 10% 2-Mercaptoethanol) と混合し、100°Cで 3 分間加熱した。SDS-PAGE は、SDS バッファー (25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0.1% SDS) 中で 7.5%または 15%ポリアクリルアミドゲルで行った。電気泳動後のポリアクリルアミドゲルを TRANS-Blot SD SEMI-DRY TRANSFER CELL (Bio-Rad) を用いて Blotting buffer (25 mM Tris, 192 mM Glycine, 20% Methanol) 中で PVDF 膜に転写した。転写後の PVDF 膜を TBS-T で洗った後、5%スキムミルク/TBS-T で室温 1 時間ブロッキングした。TBS-T で洗った後、5% BSA/TBS-T で希釈した一次抗体を 4°Cで一晩処理した。PVDF 膜を TBS-T で洗浄後、5% BSA/TBS-T で希釈した二次抗体を室温 1 時間処理した。PVDF 膜を TBS-T で再度洗浄し、Western Lightning Plus-ECL (Perkin Elmer, U.S.A) または Western Lightning Ultra (Perkin Elmer) で処理し、ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad) で HRP のシグナルを検出した。

### **免疫組織染色**

マウス脳凍結切片は室温で 30 分間解凍、乾燥させ、4% PFA/PBS で室温 1 時間固定した。抗 GFP 抗体 (Nacalai Tesque)を用いた染色の際は固定後に-30°Cで MeOH を 10 分間処理することで、透過処理を行った。PBS で洗浄後、5% Goat serum,1%BSA/PBS で室温 1 時間ブロッキングを行った後、ブロッキング液で希釈した一次抗体溶液を添加し、4°Cで一晩反応させた。PBS-T で洗浄した後、ブロッキング液で希釈した二次抗体溶液と Hoechst33258 (Wako, 1/200 dilution)を遮光下、室温 1 時間処理した。PBS-T で洗浄後、50% Glycerol/PBS を滴下して封入し、共焦点レーザー顕微鏡 LSM700 (ZEISS)で観察した。老齢マウス脳切片を用いた実験の際には、老

齢マウス組織由来の自家蛍光を消光するため、PBS-T で洗浄後に 70% エタノールで 20 倍希釈した True Black を室温、1 分間処理し、PBS で洗浄後に封入、観察を行った。共局在解析には、Image J を用いて Pearson's correlation coefficient (PCC) を算出した。

### 免疫細胞染色

SH-SY5Y を 3 mg/mL Atelocollagen (Koken) でコートした 8-well Lab-Tek chamber slides (Thermo Fisher SCIENTIFIC) に  $5 \times 10^4$  cells の密度で播種した。試薬処理後、4% Paraformaldehyde (PFA)/PBS で 4°C、一晩固定した。固定した細胞を PBS で洗浄し、5% Goat serum, 1% BSA/PBS で室温 1 時間ブロッキングした。ブロッキング液で希釈した一次抗体を 4°C で一晩処理した。細胞を PBS-T で洗浄し、ブロッキング液で希釈した二次抗体と Hoechst33258 (Wako, 1/200 dilution) を遮光して室温 1 時間処理した。細胞を PBS-T で洗浄し、50% Glycerol/PBS で封入した。染色した細胞は LSM700 (Zeiss) を用いて撮影した。共局在解析には、Image J を用いて PCC を算出した。

### DHE を用いた ROS の検出

ROS の検出を行う際は、細胞を 5  $\mu$ M DHE (Funakoshi), Hoechst33258 (1/200) を含む培地で 37°C、1 時間培養し、その後 PBS で洗浄を行った。50%グリセロール/PBS で封入した後に LSM700 で観察を行った。

ROS の定量を行う際は、細胞に Cell counting kit-8 (DOJINDO) 中の WST-8 試薬を 10 倍希釈になるように加え、37°C、1 時間培養した後、450 nm の吸光度を測定することで相対細胞数を算出した。その後、5  $\mu$ M DHE を含む培地に交換し、37°C、1 時間培養を行った後、励起波長 500 nm、蛍光波長 585 nm の蛍光を測定し、相対細胞数で補正を行うことで、相対 ROS 量を算出した。

### Cholera toxin subunit B (CtxB) を用いたエンドサイトーシスアッセイ

細胞を 4°C で 5 分間置くことで、エンドサイトーシスを停止させた。その後、1  $\mu$ g/mL CtxB Alexa fluor<sup>TM</sup> 488 Conjugate (Thermo Fisher SCIENTIFIC) を含む培地で 4°C、30 分間処理した。PBS で洗浄後、37°C に加温した培地に交換し、37°C で 10, 20, 30 分間インキュベートした。その後、4% PFA/PBS を用いて 4°C で一晩固定し、免疫細胞染色によってゴルジ体マーカーである GM130 の染色を行った。その後、LSM700 を用い

て観察を行い, Image J を用いた CtxB と GM130 の共局在解析によって, CtxB のゴルジ体への輸送を評価した.

### **10 kDa Dextran を用いたエンドサイトーシスアッセイ**

細胞を 0.1 mg/mL 10 kDa Dextran Alexa Fluor™488 (Invitrogen) を含む培地で 37°C, 3 時間インキュベートした. その後, 4% PFA/PBS を用いて 4°C で一晩固定し, 免疫細胞染色によってリソソームマーカーである LAMP2 の染色を行った. その後, LSM700 を用いて観察を行い, Image J を用いた Dextran と LAMP2 の共局在解析によって, Dextran のリソソームへの輸送を評価した.

### **70 kDa Dextran を用いたマクロピノサイトーシスアッセイ**

細胞を 0.5 mg/mL 70 kDa TMR-Dextran (Invitrogen) を含む培地で 37°C, 1 時間インキュベートした. その後, 4% PFA/PBS を用いて 4°C で一晩固定した. PBS で洗浄し, 5% Goat serum, 1% BSA/PBS で室温 1 時間ブロッキングを行った後, Hoechst33258 (1/200) を室温 1 時間反応させることで, 細胞の核を染色した. 細胞を PBS で洗浄し, 50% Glycerol/PBS で封入し, LSM700 を用いて撮影した. Image J を用いて 70 kDa TMR-Dextran の蛍光輝度を算出し, 70 kDa TMR-Dextran の細胞内取り込み量を評価した.

### **Phalloidin 染色**

細胞を 80  $\mu$ M Dynasore を含む培地で 37°C, 20~60 分間インキュベートした. その後, 4% PFA/PBS を用いて 4°C で一晩固定した. PBS で洗浄し, 5% Goat serum, 1% BSA/PBS で室温 1 時間ブロッキングを行った後, Alexa fluor™ 488 Phalloidin (Invitrogen, 1/400), Hoechst33258(1/200) を室温 1 時間反応させた. 細胞を PBS で洗浄し, 50% Glycerol/PBS で封入し, LSM700 を用いて撮影した.

### **統計解析**

各データ値は, 平均値±標準誤差として表記した. 統計学的有意差は 2 群間の比較には Student's T-test を, 3 群間以上の比較には One-way ANOVA followed by Dunnett test または One-way ANOVA followed by Tukey-Kramer test を用いて解析した. *P* 値が 0.05 未満であった場合を統計学的に有意な差があると判断した.

## ■ 参考文献

- 1) Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y, The role of Atg proteins in autophagosome formation., *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 27, 107-132, (2011)
- 2) Hamasaki M, Furuta N, Matsuda A, Nezu A, Yamamoto A, Fujita N, Oomori H, Noda T, Haraguchi T, Hiraoka Y, Amano A, Yoshimori T, Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites., *Nature*, 495, 389-393, (2013)
- 3) Kabeya Y, Mizushima N, Yamamoto A, Oshitani-Okamoto S, Ohsumi Y, Yoshimori T, LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation., *J. Cell Sci.* 117, 2805-2812, (2004)
- 4) Itakura E, Kishi-Itakura C, Mizushima N, The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes., *Cell*, 151, 1256-1269, (2012)
- 5) Matsui T, Jiang P, Nakano S, Sakamaki Y, Yamamoto H, Mizushima N, Autophagosomal YKT6 is required for fusion with lysosomes independently of syntaxin 17., *J. Cell Biol.*, 217, 2633-2645, (2018).
- 6) Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, Yokoyama M, Mishima K, Saito I, Okano H, Mizushima N, Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice., *Nature*, 441, 885-889, (2006)
- 7) Caccamo A, Majumder S, Richardson A, Strong R, Oddo S, Molecular interplay between mammalian target of rapamycin (mTOR), amyloid-beta, and Tau: effects on cognitive impairments., *J. Biol. Chem.*, 285, 13107-13120, (2010)
- 8) Caccamo A, Maldonado MA, Majumder S, Medina DX, Holbein W, Magri A, Oddo S, Naturally secreted amyloid-beta increases mammalian target of rapamycin (mTOR) activity via a PRAS40-mediated mechanism., *J. Biol. Chem.*, 286, 8924-8932, (2011)

- 9) Hou Y, Dan X, Babbar M, Wei Y, Hasselbalch SG, Croteau DL, Bohr VA, Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease., *Nat. Rev. Neurol.*, 10, 565-581, (2019)
- 10) Nixon RA, The role of autophagy in neurodegenerative disease., *Nat. Med.*, 8, 983-97, (2013)
- 11) Ross CA, Poirier MA, Protein aggregation and neurodegenerative disease., *Nat. Med.*, 10 (Suppl.), S10-7, (2004)
- 12) Ott C, König J, Höhn A, Jung T, Grune T, Macroautophagy is impaired in old murine brain tissue as well as in senescent human fibroblasts., *Redox Biol.*, 10, 266-273, (2016)
- 13) Tashiro K, Shishido M, Fujimoto K, Hirota Y, Yo K, Gomi T, Tanaka Y, Age-related disruption of autophagy in dermal fibroblasts modulates extracellular matrix components., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 443, 167-172, (2014)
- 14) Nakamura S, Oba M, Suzuki M, Takahashi A, Yamamuro T, Fujiwara M, Ikenaka K, Minami S, Tabata N, Yamamoto K, Kubo S, Tokumura A, Akamatsu K, Miyazaki Y, Kawabata T, Hamasaki M, Fukui K, Sango K, Watanabe Y, Takabatake Y, Kitajima ST, Okada Y, Mochizuki H, Isaka Y, Antebi A, Yoshimori T, Suppression of autophagic activity by Rubicon is a signature of aging., *Nat. Commun.*, 10, 847, (2019)
- 15) Moreau K, Fleming A, Imarisio S, Ramirez LA, Mercer LJ, Jimenez-Sanchez M, Bento FC, Puri C, Zavodszky E, Siddiqi F, Lavau PC, Betton M, J O'Kane C, Wechsler SD, Rubinsztein CD, PICALM modulates autophagy activity and tau accumulation., *Nat. Commun.*, 5, 4998, (2014)
- 16) Cuddy LK, Wani WY, Morella ML, Pitcairn C, Tsutsumi K, Fredriksen K, Justman CJ, Grammatopoulos TN, Belur NR, Zunke F, Subramanian A, Affaneh A, Lansbury PT Jr, Mazzulli JR, Stress-Induced Cellular Clearance Is Mediated by the SNARE Protein ykt6 and Disrupted by  $\alpha$ -Synuclein., *Neuron*, 104, 869-884, (2019)



- 17) Tanaka H, Tsuji D, Watanabe R, Ohnishi Y, Kitaguchi S, Nakae R, Teramoto H, Horii Y, Itoh K, Aberrant autophagy in lysosomal storage disorders marked by a lysosomal SNARE protein shortage due to suppression of endocytosis., *J. Inherit. Metab. Dis.*, 45, 1191-1202, (2022)
- 18) Aivazidis S, Jain A, Rauniyar AK, Anderson CC, Marentette JO, Orlicky DJ, Fritz KS, Harris PS, Siegel D, Maclean KN, Roede JR, SNARE proteins rescue impaired autophagic flux in Down syndrome., *PLoS One*, 14, e0223254, (2019)
- 19) Miller SE, Sahlender DA, Graham SC, Höning S, Robinson MS, Peden AA, Owen DJ, The molecular basis for the endocytosis of small R-SNAREs by the clathrin adaptor CALM., *Cell*, 147, 1118-1131, (2011)
- 20) Aguilar-Gaytan R, Mas-Oliva J, Oxidative stress impairs endocytosis of the scavenger receptor class A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 305, 510-517, (2003)
- 21) Cheng J, Vieira A, Oxidative stress disrupts internalization and endocytic trafficking of transferrin in a human malignant keratinocyte line., *Cell Biochem. Biophys.*, 45, 177-184, (2006)
- 22) Kano F, Arai T, Matsuto M, Hayashi H, Sato M, Murata M, Hydrogen peroxide depletes phosphatidylinositol-3-phosphate from endosomes in a p38 MAPK-dependent manner and perturbs endocytosis., *Biochim. Biophys. Acta*, 1813, 784-801, (2011)
- 23) Wernick NL, Chinnapen DJ, Cho JA, Lencer WI, Cholera toxin: an intracellular journey into the cytosol by way of the endoplasmic reticulum., *Toxins (Basel)*, 2, 310-325, (2010)
- 24) Pilliod J, Desjardins A, Pernègre C, Jamann H, Larochelle C, Fon EA, Leclerc N, Clearance of intracellular tau protein from neuronal cells via VAMP8-induced secretion., *J. Biol. Chem.*, 295, 17827-17841, (2020)

- 25) Kim GH, Kim JE, Rhie SJ, Yoon S, The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases., *Exp. Neurobiol.*, 24, 325-340, (2015)
- 26) Gupta S, You P, SenGupta T, Nilsen H, Sharma K, Crosstalk between Different DNA Repair Pathways Contributes to Neurodegenerative Diseases., *Biology (Basel)*, 10, 163, (2021)
- 27) Brunk UT, Terman A, The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging: accumulation of damaged mitochondria as a result of imperfect autophagocytosis., *Eur. J. Biochem.*, 269, 1996-2002, (2002)
- 28) Shi H, Belbin O, Medway C, Brown K, Kalsheker N, Carrasquillo M, Proitsi P, Powell J, Lovestone S, Goate A, Younkin S, Passmore P; Genetic and Environmental Risk for Alzheimer's Disease Consortium, Morgan K; Alzheimer's Research UK Consortium, Genetic variants influencing human aging from late-onset Alzheimer's disease (LOAD) genome-wide association studies (GWAS)., *Neurobiol. Aging*, 33, 1849, (2012)
- 29) Naj AC, Jun G, Beecham GW, Wang LS, Vardarajan BN, Buross J, Gallins PJ, Buxbaum JD, Jarvik GP, Crane PK, Larson EB, Bird TD, Boeve BF, Graff-Radford NR, De Jager PL, Evans D, Schneider JA, Carrasquillo MM, Ertekin-Taner N, Younkin SG, Cruchaga C, Kauwe JS, Nowotny P, Kramer P, Hardy J, Huentelman MJ, Myers AJ, Barmada MM, Demirci FY, Baldwin CT, Green RC, Rogaeva E, St George-Hyslop P, Arnold SE, Barber R, Beach T, Bigio EH, Bowen JD, Boxer A, Burke JR, Cairns NJ, Carlson CS, Carney RM, Carroll SL, Chui HC, Clark DG, Corneveaux J, Cotman CW, Cummings JL, DeCarli C, DeKosky ST, Diaz-Arrastia R, Dick M, Dickson DW, Ellis WG, Faber KM, Fallon KB, Farlow MR, Ferris S, Frosch MP, Galasko DR, Ganguli M, Gearing M, Geschwind DH, Ghetti B, Gilbert JR, Gilman S, Giordani B, Glass JD, Growdon JH, Hamilton RL, Harrell LE, Head E, Honig LS, Hulette CM, Hyman BT, Jicha GA, Jin LW, Johnson N, Karlawish J, Karydas A, Kaye JA, Kim R, Koo EH, Kowall NW, Lah JJ, Levey AI, Lieberman AP, Lopez OL, Mack WJ, Marson DC, Martiniuk F, Mash DC, Masliah E, McCormick WC, McCurry SM, McDavid AN, McKee AC,

Mesulam M, Miller BL, Miller CA, Miller JW, Parisi JE, Perl DP, Peskind E, Petersen RC, Poon WW, Quinn JF, Rajbhandary RA, Raskind M, Reisberg B, Ringman JM, Roberson ED, Rosenberg RN, Sano M, Schneider LS, Seeley W, Shelanski ML, Slifer MA, Smith CD, Sonnen JA, Spina S, Stern RA, Tanzi RE, Trojanowski JQ, Troncoso JC, Van Deerlin VM, Vinters HV, Vonsattel JP, Weintraub S, Welsh-Bohmer KA, Williamson J, Woltjer RL, Cantwell LB, Dombroski BA, Beekly D, Lunetta KL, Martin ER, Kambh MI, Saykin AJ, Reiman EM, Bennett DA, Morris JC, Montine TJ, Goate AM, Blacker D, Tsuang DW, Hakonarson H, Kukull WA, Foroud TM, Haines JL, Mayeux R, Pericak-Vance MA, Farrer LA, Schellenberg GD, Common variants at MS4A4/MS4A6E, CD2AP, CD33 and EPHA1 are associated with late-onset Alzheimer's disease., *Nat. Genet.*, 43, 436-441, (2011)

30) Harold D, Abraham R, Hollingworth P, Sims R, Gerrish A, Hamshere ML, Pahwa JS, Moskvina V, Dowzell K, Williams A, Jones N, Thomas C, Stretton A, Morgan AR, Lovestone S, Powell J, Proitsi P, Lupton MK, Brayne C, Rubinsztein DC, Gill M, Lawlor B, Lynch A, Morgan K, Brown KS, Passmore PA, Craig D, McGuinness B, Todd S, Holmes C, Mann D, Smith AD, Love S, Kehoe PG, Hardy J, Mead S, Fox N, Rossor M, Collinge J, Maier W, Jessen F, Schürmann B, Heun R, van den Bussche H, Heuser I, Kornhuber J, Wiltfang J, Dichgans M, Frölich L, Hampel H, Hüll M, Rujescu D, Goate AM, Kauwe JS, Cruchaga C, Nowotny P, Morris JC, Mayo K, Sleegers K, Bettens K, Engelborghs S, De Deyn PP, Van Broeckhoven C, Livingston G, Bass NJ, Gurling H, McQuillin A, Gwilliam R, Deloukas P, Al-Chalabi A, Shaw CE, Tsolaki M, Singleton AB, Guerreiro R, Mühleisen TW, Nöthen MM, Moebus S, Jöckel KH, Klopp N, Wichmann HE, Carrasquillo MM, Pankratz VS, Younkin SG, Holmans PA, O'Donovan M, Owen MJ, Williams J, Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease., *Nat. Genet.*, 41, 1088-1093, (2009)

31) Gao J, Kurre R, Rose J, Walter S, Fröhlich F, Piehler J, Reggiori F, Ungermann C, Function of the SNARE Ykt6 on autophagosomes requires the Dsl1 complex and the Atg1 kinase complex. *EMBO Rep.*, 21, e50733, (2020)

32) Kumar S, Jain A, Farzam F, Jia J, Gu Y, Choi SW, Mudd MH, Claude-Taupin A,

Wester MJ, Lidke KA, Rusten TE, Deretic V, Mechanism of Stx17 recruitment to autophagosomes via IRGM and mammalian Atg8 proteins. *J. Cell Biol.*, 217, 997-1013, (2018)

33) Cavalli V, Vilbois F, Corti M, Marcote MJ, Tamura K, Karin M, Arkinstall S, Gruenberg J, The Stress-Induced MAP Kinase p38 Regulates Endocytic Trafficking via the GDI:Rab5 Complex. *Mol. Cell*, 7, 421-432, (2001)

34) Reis CR, Chen PH, Srinivasan S, Aguet F, Mettlen M, Schmid SL, Crosstalk between Akt/GSK3 $\beta$  signaling and dynamin-1 regulates clathrin-mediated endocytosis. *EMBO J.*, 34, 2132–2146, (2015)

35) Ferreira APA, Casamento A, Carrillo Roas S, Halff EF, Panambalana J, Subramaniam S, Schützenhofer K, Chan Wah Hak L, McGourty K, Thalassinos K, Kittler JT, Martinvalet D, Boucrot E, Cdk5 and GSK3 $\beta$  inhibit fast endophilin-mediated endocytosis. *Nat. Commun.*, 12, 2424, (2021)

36) Strocchi P, Pession A, Dozza B, Up-regulation of cDK5/p35 by oxidative stress in human neuroblastoma IMR-32 cells. *J. Cell. Biochem.*, 88, 758-765, (2003)

37) Rojo AI, Sagarra MR, Cuadrado A, GSK-3 $\beta$  down-regulates the transcription factor Nrf2 after oxidant damage: relevance to exposure of neuronal cells to oxidative stress. *J. Neurochem.*, 105, 192–202, (2008)

38) Liu SL, Wang C, Jiang T, Tan L, Xing A, Yu JT, The Role of Cdk5 in Alzheimer's Disease. *Mol. Neurobiol.*, 53, 4328-4342, (2016)

39) Llorens-Martín M, Jurado J, Hernández F, Avila J, GSK-3 $\beta$ , a pivotal kinase in Alzheimer disease. *Front. Mol. Neurosci.*, 7, 46, (2014)

40) Mendell JR, Al-Zaidy SA, Lehman KJ, McColly M, Lowes LP, Alfano LN, Reash NF, Iammarino MA, Church KR, Kleyn A, Meriggioli MN, Shell R, Five year extension

results of the phase 1 START trial of onasemnogene abeparvovec in spinal muscular atrophy. *JAMA Neurol*, 78, 834-841, (2021)

41) Day JW, Finkel RS, Chiriboga CA, Connolly AM, Crawford TO, Darras BT, Iannaccone ST, Kuntz NL, Peña LDM, Shieh PB, Smith EC, Kwon JM, Zaidman CM, Schultz M, Feltner DE, Tauscher-Wisniewski S, Ouyang H, Chand DH, Sproule DM, Macek TA, Mendell JR. Onasemnogene abeparvovec gene therapy for symptomatic infantile-onset spinal muscular atrophy in patients with two copies of SMN2 (STRIVE): an open-label, single-arm, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Neurol*, 20, 284-289, (2021)

42) Abeliovich A, Hefti F, Sevigny J, Gene Therapy for Parkinson's Disease Associated with GBA1 Mutations. *J. Parkinsons Dis.*, 11, S183-S188, (2021)

43) Khan S, Barve KH, Kumar MS, Recent Advancements in Pathogenesis, Diagnostics and Treatment of Alzheimer's Disease. *Curr. Neuropharmacol.*, 18, 1106-1125, (2020)

44) Itoh K, Tsuji D, Ohnishi Y, Watanabe R, Asai K, Muramatsu S, In vivo gene therapy for Tay-Sachs and Sandhoff diseases by utilizing AAV9 vector encoding modified HEXB. *Mol. Genet. Metab.*, 126, S78, (2019)

45) Reghupaty SC, Sarkar D, Current Status of Gene Therapy in Hepatocellular Carcinoma. *Cancers*, 11, 1265, (2019)

46) Atchison RW, Casto BC, Hammon WM, ADENOVIRUS-ASSOCIATED DEFECTIVE VIRUS PARTICLES. *Science*, 149, 754-756, (1965)

47) Hoggan MD, Blacklow NR, Rowe WP, Studies of small DNA viruses found in various adenovirus preparations: physical, biological, and immunological characteristics. *PNAS*, 55, 1467-1474, (1966)

48) Carter BJ, Adeno-associated virus and the development of adeno-associated virus vectors: a historical perspective. *Mol. Ther.*, 10, 981-989, (2004)

- 49) Asokan A, Schaffer DV, Samulski RJ, The AAV vector toolkit: poised at the clinical crossroads. *Mol. Ther.*, 20, 699-708, (2012)
- 50) Korneyenkov MA, Zamyatnin AA Jr, Next Step in Gene Delivery: Modern Approaches and Further Perspectives of AAV Tropism Modification. *Pharmaceutics*. 13, 750, (2021)
- 51) Chernomordik LV, Melikyan GB, Chizmadzhev YA, Biomembrane fusion: a new concept derived from model studies using two interacting planar lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta*, 906, 309-352, (1987)
- 52) Dhungel BP, Bailey CG, Rasko JEJ, Journey to the Center of the Cell: Tracing the Path of AAV Transduction. *Trends Mol. Med.*, 27, 172-184, (2021)
- 53) Weinberg MS, Nicolson S, Bhatt AP, McLendon M, Li C, Samulski RJ, Recombinant adeno-associated virus utilizes cell-specific infectious entry mechanisms. *J. Virol.*, 88, 12472-12484, (2014)
- 54) Pillay S, Meyer NL, Puschnik AS, Davulcu O, Diep J, Ishikawa Y, Jae LT, Wosen JE, Nagamine CM, Chapman MS, Carette JE, An essential receptor for adeno-associated virus infection. *Nature*. 530, 108-112, (2016)
- 55) Iida A, Takino N, Miyauchi H, Shimazaki K, Muramatsu S, Systemic delivery of tyrosine-mutant AAV vectors results in robust transduction of neurons in adult mice. *Biomed. Res. Int.*, 2013, 974819, (2013)
- 56) Kay RR, Macropinocytosis: Biology and mechanisms. *Cells Dev.*, 168, 203713, (2021)
- 57) Mercer J, Schelhaas M, Helenius A, Virus entry by micropinocytosis. *Annu. Rev. Biochem.*, 79, 803-833, (2010)

- 58) Rossman JS, Leser GP, Lamb RA, Filamentous influenza virus enters cells via micropinocytosis. *J. Virol.*, 86, 10950-10960, (2012)
- 59) Kunitomi H, Oki Y, Onishi N, Kano K, Banno K, Aoki D, Saya H, Nobusue H, The insulin-PI3K-Rac1 axis contributes to terminal adipocyte differentiation through regulation of actin cytoskeleton dynamics. *Genes Cells*, 25, 165-174, (2020)
- 60) Beemiller P, Zhang Y, Mohan S, Levinsohn E, Gaeta I, Hoppe AD, Swanson JA, A Cdc42 Activation Cycle Coordinated by PI 3-Kinase during Fc Receptor-mediated Phagocytosis. *Mol. Biol. Cell*, 21, 470-480, (2010)
- 61) Burgering BM, Coffey PJ, Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature*, 376, 599-602, (1995)
- 62) Molinaro A, Becattini B, Mazzoli A, Bleve A, Radici L, Maxvill I, Sopsakis VR, Molinaro A, Bäckhed F, Solinas G, Insulin-Driven PI3K-AKT Signaling in the Hepatocyte Is Mediated by Redundant PI3K $\alpha$  and PI3K $\beta$  Activities and Is Promoted by RAS. *Cell Metab.*, 29, 1400-1409, (2019)
- 63) Stefani C, Miricescu D, Stanescu-Spinu II, Nica RI, Greabu M, Totan AR, Jinga M, Growth Factors, PI3K/AKT/mTOR and MAPK Signaling Pathways in Colorectal Cancer Pathogenesis: Where Are We Now? *Int. J. Mol. Sci.*, 22, 10260, (2021)
- 64) Berry GE, Asokan A, Chemical Modulation of Endocytic Sorting Augments Adeno-associated Viral Transduction. *J. Biol. Chem.*, 291, 939-947, (2016)
- 65) Nonnenmacher M, Weber T, Adeno-associated virus 2 infection requires endocytosis through the CLIC/GEEC pathway. *Cell Host Microbe*, 10, 563-576, (2011)
- 66) Shen S, Bryant KD, Brown SM, Randell SH, Asokan A, Terminal N-linked galactose is the primary receptor for adeno-associated virus 9. *J. Biol. Chem.*, 286, 13532-13540,

(2011)

67) Akache B, Grimm D, Pandey K, Yant SR, Xu H, Kay MA, The 37/67-Kilodalton Laminin Receptor Is a Receptor for Adeno-Associated Virus Serotypes 8, 2, 3, and 9. *J. Virol.*, 80, 9831-9836, (2016)

68) Gopalakrishna R, Gundimeda U, Zhou S, Bui H, Davis A, McNeill T, Mack W, Laminin-1 induces endocytosis of 67KDa laminin receptor and protects Neuroscreen-1 cells against death induced by serum withdrawal. *BBRC*, 495, 230-237, (2018)

69) Philips T, Robberecht W, Neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis: role of glial activation in motor neuron disease. *Lancet Neurol.*, 10, 253-263, (2011)

70) Takahashi K, Miyoshi H, Otomo M, Osada K, Yamaguchi N, Nakashima H, Suppression of dynamin GTPase activity by sertraline leads to inhibition of dynamin-dependent endocytosis. *BBRC*, 391, 382-387, (2010)

71) Hinderer C, Katz N, Buza EL, Dyer C, Goode T, Bell P, Richman LK, Wilson JM, Severe Toxicity in Nonhuman Primates and Piglets Following High-Dose Intravenous Administration of an Adeno-Associated Virus Vector Expressing Human SMN. *Hum. Gene Ther.*, 29, 285-298, (2018)

72) Shibutani S, Okazaki H, Iwata H, Dynamin-dependent amino acid endocytosis activates mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1). *J. Biol. Chem.*, 292, 18052-18061, (2017)

73) Futaki S, Nakase I, Cell-Surface Interactions on Arginine-Rich Cell-Penetrating Peptides Allow for Multiplex Modes of Internalization. *Acc. Chem. Res.*, 50, 2449-2456, (2017)

74) Iwata T, Hirose H, Sakamoto K, Hirai Y, Arafiles JVV, Akishiba M, Imanishi M, Futaki S, Liquid Droplet Formation and Facile Cytosolic Translocation of IgG in the



Presence of Attenuated Cationic Amphiphilic Lytic Peptides. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 60, 19804-19812, (2021)

75) Costa Verdera H, Gitz-Francois JJ, Schiffelers RM, Vader P, Cellular uptake of extracellular vesicles is mediated by clathrin-independent endocytosis and micropinocytosis. *J. Control. Release*, 266, 100-108, (2017)

76) Cheung YT, Lau WK, Yu MS, Lai CS, Yeung SC, So KF, Chang RC, Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as in vitro model in neurotoxicity research. *Neurotoxicology*, 30, 127-135, (2009)