

平成 31 年 4 月 23 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15446

研究課題名(和文)アルツハイマー病におけるミクログリア脂質シグナル経路の病的意義の解明

研究課題名(英文) Involvement of microglial lipid signaling in the pathomechanism of Alzheimer disease

研究代表者

高鳥 翔 (Takatori, Sho)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・助教

研究者番号：80624361

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病(AD)の病態においては、アミロイドの蓄積病変(A斑)の周囲にミクログリアが集簇し、神経保護的な働きを示すことが示唆されている。この過程にはミクログリアの発現する受容体TREM2が不可欠であるが、下流シグナルの詳細は明らかでない。本研究では、ADの遺伝学的リスク因子である脂質ホスファターゼINPP5Dの関与について、遺伝子欠損マウスを用いて検討を行った。その結果、ミクログリアのA斑への集簇過程において、INPP5DがTREM2のシグナル伝達経路を負に制御している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルツハイマー病病態におけるミクログリアの役割については不明の点が多く、特にミクログリアがA斑に集簇し神経保護作用を発揮するメカニズムに関しては分子レベルの知見が不足していた。本研究では、この過程に必須の受容体であるTREM2の下流にINPP5Dが関与する可能性を提示したという点で意義が大きい。また本研究では、ミクログリアによる神経保護作用の発現においてINPP5Dに依存しない経路が重要である可能性を提唱した。この事実は、これまで同一視されてきた、A斑への集簇と神経保護作用の2つの事象がそれぞれ異なる分子経路により制御されている可能性を示唆するものであり新規性が高い。

研究成果の概要(英文)：In the pathomechanism of Alzheimer disease (AD), microglia cluster around amyloid (A) plaques and mitigate the neurotoxicity of A. TREM2, an AD risk gene that encodes a microglial receptor, is crucially important in this process, although its downstream signals remain unknown. Here we investigated the involvement of INPP5D, another AD risk gene that encodes a lipid phosphatase and is specifically expressed in microglia in the brain. We found that heterodeficiency of Inpp5d partially reverted impaired microglial clustering in TREM2 loss-of-function mice, suggesting that INPP5D has an inhibitory role in the TREM2 signaling pathway.

研究分野：病態細胞生物学

キーワード：アルツハイマー病 ミクログリア ホスホイノシチド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病 (AD) の発症機序として、神経細胞から産生されたアミロイド (A β) が脳内に蓄積・凝集して神経障害性を発揮するという「アミロイド仮説」が広く支持されている。しかし近年、ミクログリアに発現する膜受容体 TREM2 とその結合分子 TYROBP をコードする遺伝子の多型が AD の遺伝学的リスク因子であることが報告され、非神経細胞の重要性が明らかにされた。これまでに、A β 斑の周囲にミクログリアが集簇し A β を隔離するように働くことは知られていた (Condello, Nat Commun 2015)。一方で、リスク多型の保因者や Trem2、Tyrobp を欠損したマウスの脳内では、共通してミクログリアの集簇・活性化の不全が見出されることから (Yuan, Neuron 2016) これらの過程に TREM2/TYROBP シグナルが重要であり、ミクログリアが A β に適切に応答することが AD 発症に対して抑制的な役割を果たしていると考えられた。しかし、このようなミクログリアの活性化機序については分子レベルの知見が不足しており、TREM2 や TYROBP 以外にこの過程を制御する分子について注目が集まっていた。

これまでに研究代表者らは AD の遺伝学的リスク因子の機能解明を行ってきており、神経細胞に発現する PICALM が A β 代謝に影響し、病態形成に関わることを明らかにしていた (Kanatsu, Hum Mol Genet 2016)。一方で、AD の遺伝学的リスク因子には前述の TREM2をはじめ、ミクログリアに特異的に発現するものも数多く知られている (INPP5D、CD33 など)。これらはミクログリアの病態関与を明らかにするための重要な手がかりになると考えられ、これらの機能解明に着手した。

2. 研究の目的

INPP5D は SHIP1 とも呼ばれ、中枢神経系においてはミクログリアに特異的に発現し、ホスホイノシチド PI(3,4,5)P₃ を代謝して PI(3,4)P₂ に変換するホスファターゼである。INPP5D のイントロン内部には AD 発症リスクと連鎖した多型が報告されており、INPP5D の発現量の増加または減少が AD 発症と関連すると予想された。そこで、Inpp5d 欠損マウスを得て予備的な解析を行ったところ、このマウスではミクログリアが恒常的に活性化し増殖亢進していることを見出した。これは Trem2、Tyrobp 欠損の表現型とは対照的な結果であった。一方、TREM2 は末梢由来の細胞では PI(3,4,5)P₃ を介してシグナル伝達することが知られ (Peng, Sci Signal 2010) TREM2 と INPP5D が共通のホスホイノシチドシグナルを正負に制御している可能性が想定された。そこで本研究では、AD 病態モデルにおいて INPP5D の機能を解明し、ミクログリアにおけるホスホイノシチドシグナルの意義を明らかにすることを企図した。

3. 研究の方法

A β の蓄積病態を示す AD モデルマウス (App^{NL-G-F/NL-G-F}; Saito, Nat Neurosci 2014; 理研・西道隆臣チームリーダーより譲受) と Inpp5d 欠損マウス (東京医科歯科大学・佐々木雄彦教授より譲受) とを交配して病理学的・生化学的解析を行い、ミクログリアの A β 応答に対する影響を詳細に明らかにする。

4. 研究成果

AD モデルマウスと Inpp5d 欠損マウスとの交配においては、Inpp5d ホモ欠損マウスが 2~3 ヶ月齢で致死となったため、ヘテロ欠損マウスを用いて解析を行った。はじめに、App^{NL-G-F/NL-G-F} マウスにおいては、4~6 ヶ月齢の時点から A β 斑周囲にミクログリアが集簇し始めることを確認した。そこで、6 ヶ月齢の時点において Inpp5d 欠損の影響について生化学的、免疫組織化学的解析を行った。この解析過程においてはさらに、蛍光免疫染色の画像を自動定量化する手法を確立して応用した。その結果、Inpp5d のヘテロ欠損により、A β の生化学的・組織化学的な蓄積の程度には有意な変化がなかった一方で、A β 斑の周囲に集簇しているミクログリアの数が増加していることを見出した。

脳内で凝集、蓄積した A β は神経障害性を有するとされ、その周囲に集簇したミクログリアは神経細胞に対して保護的な働きを示すことが示唆されている (バリア機能)。興味深いことにごく最近、AD の遺伝学的リスク因子である TREM2 と TYROBP がこの過程に必須であることが報告され、注目を集めている。そこで実際に Tyrobp 欠損マウス (東北大学・高井俊行教授より譲受) を得て、前述の AD モデルマウスと交配し、免疫組織化学的解析を行ったところ、A β 斑周囲へのミクログリアの集簇の程度が著明に減弱していることを追認した。この表現型は、Inpp5d の欠損による表現型とは対照的であるといえ、Tyrobp と Inpp5d が共通のシグナル経路を正負に制御している可能性が改めて示唆された。

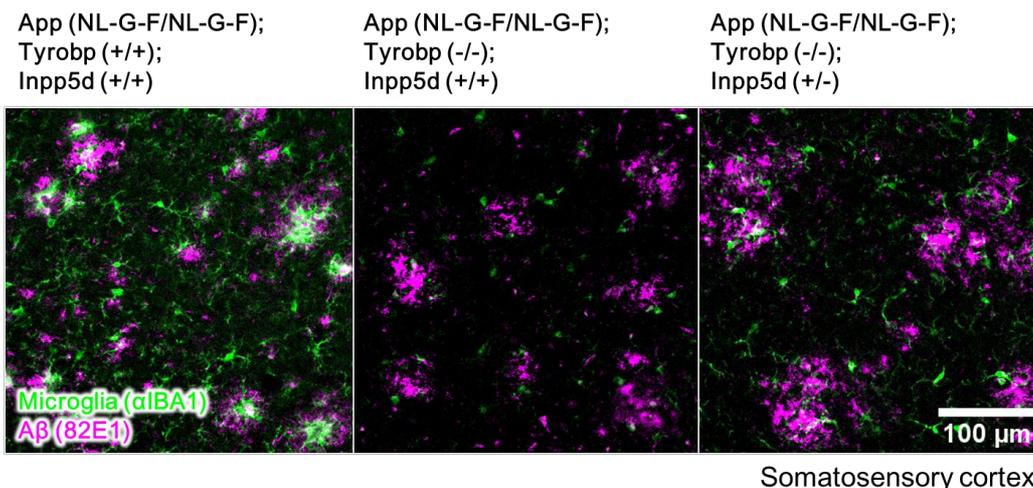
そこでこの可能性を検証するため、Tyrobp と Inpp5d の二重欠損マウス (App^{NL-G-F/NL-G-F}; Tyrobp^{-/-}; Inpp5d^{+/-}) を作出し、両者の遺伝学的相互作用について解析を行った。その結果、二重欠損マウスでは、Tyrobp 単独欠損の場合と比べて、A β 蓄積の程度には変化がなかったが、ミクログリアによる A β 斑への集簇が有意に回復していた (図 1)。一方、A β 斑近傍の神経障害性の指標である変性神経突起に関しては、予想に反し、二重欠損による回復傾向は認められなかった。このことから、Inpp5d 欠損により集簇化したミクログリアはバリア機能に貢献していないことが示唆された。

以上の結果より、INPP5D の制御する過程は TREM2/TYROBP 下流のシグナル伝達経路と一部オーバーラップしていることが明らかとなったが、他方ではバリア機能の発揮には異なる経

路の役割も重要であることが示唆された。このことはまた、従来は同一視されてきた、ミクログリアによる A β 斑への集簇とバリア機能が異なる分子機序により制御されていることを初めて明らかにしたという点でも極めて新規性の高い知見であるといえる。

なお本研究において、AD モデルマウスのミクログリアにおいてホスホイノシチドの動態・分布の変化を捉える実験系の構築にも取り組んだが、期間中の実用化は叶わなかった。今後の研究の課題は、INPP5D が実際にホスホイノシチド代謝を介して TREM2/TYROBP シグナル伝達経路を制御しているか否かを明らかにすることにあると考えている。

図1. Tyrobp/Inpp5dの二重欠損によりミクログリアのA β 斑への集簇が回復した



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

- 1) **Takatori S**, Wang W, Iguchi A, Tomita T. Genetic risk factors for Alzheimer disease: Emerging roles of microglia in disease pathomechanisms. *Adv Exp Med Biol* 2019; 1118: 83-116. DOI: 10.1007/978-3-030-05542-4_5
- 2) Tsuji T*, **Takatori S***, Fujimoto T. Definition of phosphoinositide distribution in the nanoscale. *Curr Opin Cell Biol* 2018; 57: 33-39. DOI: 10.1016/j.ceb.2018.10.008 (* co-first author)
- 3) **Takatori S**, Tomita T. AP180 N-terminal Homology (ANTH) and Epsin N-terminal Homology (ENTH) domains: Physiological functions and involvement in disease. *Adv Exp Med Biol* 2018: 1-22. DOI: 10.1007/5584_2018_218
- 4) Kidana K, Tatebe T, Ito K, Hara N, Kakita A, Saito T, **Takatori S**, Ouchi Y, Ikeuchi T, Makino M, Saido TC, Akishita M, Iwatsubo T, Hori Y, Tomita T. Loss of kallikrein-related peptidase 7 exacerbates amyloid pathology in Alzheimer's disease model mice. *EMBO Mol Med* 2018; e8184. DOI: 10.15252/emmm.201708184
- 5) Aktar S, **Takatori S**, Tsuji T, Orii M, Ohsaki Y, Cheng J, Fujimoto T. A new electron microscopic method to observe the distribution of phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate. *Acta Histochem Cytochem* 2017; 50(5): 141-7. DOI: 10.1267/ahc.17025
- 6) Tsuji T, Fujimoto M, Tatematsu T, Cheng J, Orii M, **Takatori S**, Fujimoto T. Niemann-Pick type C proteins promote microautophagy by expanding raft-like membrane domains in the yeast vacuole. *eLife* 2017; 6: e25960. DOI: 10.7554/eLife.25960

〔学会発表〕(計5件)

- 1) 藤田隆弘, 王文博, **高島翔**, 富田泰輔: アルツハイマー病リスク遺伝子 RIN3 のミクログリアにおける病的機能の解明. 第40回神経組織培養研究会(静岡県熱海市), 2018年11月
- 2) 井口明優, **高島翔**, 木村新伍, 佐々木純子, 斉藤貴志, 西道隆臣, 高井俊行, 佐々木雄彦, 富田泰輔: アルツハイマー病リスク遺伝子 INPP5D の病理学的役割の解明. 第40回神経組織培養研究会(静岡県熱海市), 2018年11月
- 3) 荒木美保, **高島翔**, 伊藤弦太, 富田泰輔: 層板小体の恒常性維持における LRRK2 の役割. 第41回日本分子生物学会(神奈川県横浜市), 2018年11月
- 4) 吉田文明, 長友亮太, 木村美咲, 伊藤弦太, **高島翔**, 富田泰輔: パルプロ酸母体投与自閉症モデルマウスにおいて興奮性シナプス形成異常をもたらす分子メカニズムの解明. 第41回日本分子生物学会(神奈川県横浜市), 2018年11月
- 5) **Takatori S**: Analysis of the effects of INPP5D/SHIP1 deficiency on amyloid pathology in

Alzheimer model mice. **EMBO/EMBL Symposium: Mechanisms of Neurodegeneration** (ドイツ・ハイデルベルク), 2017年6月

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: 自閉症発症機構に関連する接着分子

発明者: 富田泰輔、伊藤弦太、高鳥翔、長友亮太、吉田文明

権利者: 同上

種類: 特許

番号: US62/800601

出願年: 2019年

国内外の別: 外国

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等: 東京大学大学院薬学系研究科機能病態学
(<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~neuropsych/tomita/>)

6. 研究組織

(1) 研究分担者

(2) 研究協力者

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。