

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15397

研究課題名(和文)アルツハイマー病モデルにおける骨髄間葉系幹細胞の作用機序/病態解明

研究課題名(英文) Analysis of the biologic effects and the therapeutic mechanisms of bone marrow mesenchymal stem cell in the in vitro Alzheimer's disease model

研究代表者

松村 晃寛 (Matsumura, Akihiro)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：20464498

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)：本研究は骨髄間葉系幹細胞(BMSC)治療のin vitroアルツハイマー病(AD)環境モデルにおける応答を解析し、またBMSCとミクログリア共培養系の確立を試みてin vitro AD環境モデルにおけるBMSCのミクログリアに対する作用、炎症や酸化ストレスへの作用を解析し、その治療理論を解明することを目的に開始した。ラット由来BMSC(rBMSC)の培養系にヒトリコンピナントアミロイド(A)としてオリゴマー型A(oA)と線維型A(fA)を添加したところoA、fAともrBMSCに取り込まれている様子が確認された。ミクログリアのマーカーであるCD11bは陰性のままであった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経変性疾患モデルに対する骨髄間葉系幹細胞(BMSC)治療については神経再生以外にも神経保護作用や免疫調整作用など様々な治療機序が想定されている。中にはBMSCがミクログリアを制御することを示唆する報告もある。今回、まずin vitro AD環境モデルにおけるBMSCの応答を確認したところBMSCがアミロイド(A)を取り込む様子が確認された。従来、AD病態においてミクログリアがAを貪食することが知られている。BMSCはミクログリアと同じ中胚葉由来の細胞であり、Aに対して共通性のある反応を示したことで今後、BMSCのミクログリアに対する作用を考える上での参考になる結果が得られたと考える。

研究成果の概要(英文)：In order to reveal therapeutic theory of bone marrow mesenchymal stem cell (BMSC) treatment for Alzheimer's disease (AD), I planned to investigate the response of cultured BMSC in the in vitro experimental model of AD and to define how BMSC co-cultured with microglia respond to microglia, inflammation and oxidative stress in the in vitro experimental model of AD. When recombinant human amyloid- (A) oligomers (oA) and fibrillar A (fA) were added to the cultured BMSC derived from rats (rBMSC), both oA and fA were observed to be taken up by rBMSCs. In these rBMSCs taking up A, the microglial marker CD11b remained negative.

研究分野：医歯薬学

キーワード：アルツハイマー病 骨髄間葉系幹細胞 ミクログリア アミロイド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病(AD)は約 60-70%を占め、80 歳以上の高齢者の 20%にみられる有病率の高い疾患である。AD は病理学的にアミロイド β (A β)を主成分とする老人斑、リン酸化タウを主成分とする神経原線維変化および著しい神経細胞死を特徴とし、アミロイドカスケード仮説において A β が最上流の原因とされる^{Hardy, 2002 #162}。しかしその病因は未だ不明であり、治療法も対症療法に限られている。A β に対する生体反応としては、脳内免疫細胞であるミクログリアが沈着した A β により活性化し、TNF- α や IL-1 β などの炎症性サイトカインや、活性酸素種(reactive oxygen species:ROS)といった神経毒性・炎症促進性因子を産生して AD を増悪させるという報告がある^{Combs, 2001 #176}。一方、ROS などの酸化ストレスはアミロイド前駆蛋白(APP)プロセシング酵素である β -secretase や γ -secretase 活性を上昇させて A β 産生を増加させるという報告^{Guglielmotto, 2010 #175}もあり、AD 脳においては脳内 A β 増加 酸化ストレス増加 A β 増加という悪循環が生じている可能性が考えられる。また、AD において病初期から酸化ストレスマーカーが観察されるとの報告もあり^{Nunomura, 2001 #781}、AD の病態とミクログリア、酸化ストレスの関連について注目している。このように、AD においては根治療法が確立していないが、それゆえ新規治療法の開発が試みられ続けている。このうち、骨髄間葉系幹細胞(BMSC)治療は神経再生以外にも神経の保護作用や免疫調整作用をはじめとする様々な治療機序から、AD に対する治療薬としての可能性がある。実験レベルでは AD モデル動物において BMSC 治療が認知機能の改善をもたらすとする報告が複数あり^{Ruzicka, 2016 #873;Khairallah, 2014 #877}、ある報告では BMSC がミクログリアを制御することが示唆されている^{Hegyí, 2014 #1617}。しかし、その病態改善の機序は根本的には明らかになっておらず、BMSC と AD におけるミクログリア活性化様式の変化、および脳内酸化ストレスとの関係に着目した研究報告はこれまで無かった。

2. 研究の目的

上記背景から、AD における病態とミクログリア、脳内酸化ストレス、および BMSC の作用との関連を明らかにするために以下の研究を計画した。まず、(1) BMSC 培養系を用いた in vitro AD 環境モデルにおける BMSC の応答について生化学的手法、免疫組織学的手法により解析する。また(2) BMSC とミクログリア共培養系の確立を試み、それを用いて in vitro AD 環境モデルにおける BMSC のミクログリアに対する作用、炎症や酸化ストレスへの作用を生化学的手法、免疫組織学的手法により解析し、治療メカニズムの解明を試みる。さらに(3) 各種治療介入の併用による in vitro AD 環境モデルにおける BMSC のミクログリアへの影響を解析する。他方、AD に対する実際の BMSC 治療は自家移植が想定されるため(4) AD モデル動物由来の BMSC 培養系、および BMSC とミクログリアの共培養系の確立を試み、同様の解析を実施する。これらの結果を踏まえ、AD 病態における BMSC の作用機序/治療理論を解明する他、AD におけるミクログリアの作用・動態を中心に捉えた切り口から AD の病態解明も試みることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)BMSC 培養系を用いた in vitro AD モデルの解析

in vitro で AD 環境における BMSC の応答を評価する目的でラットやマウス由来 BMSC 培養系にヒトリコンビナント A β ペプチドを添加するモデルを作成し、BMSC に発現する細胞マーカーや培養液中の炎症性・抗炎症性サイトカイン、酸化ストレスマーカーなどを免疫組織学

的手法、生化学的手法により評価・解析する計画を立てた。

(2)BMSC とミクログリアの共培養系の確立と、これを用いた in vitro AD モデルの解析

続いて、AD 環境におけるラットやマウス由来 BMSC とミクログリアの関連、相互作用を調査する目的で、BMSC とミクログリアの共培養系の確立を試み、そこにヒトリコンピナント A β ペプチドを添加した in vitro AD 環境モデルにおける BMSC に発現する細胞マーカーやミクログリアの活性化状況、培養液中の炎症性・抗炎症性サイトカイン、酸化ストレスマーカーなどを免疫組織学的手法、生化学的手法により評価・解析する計画を立てた。

(3)BMSC/ミクログリア共培養系に A β を添加した in vitro AD モデルに対する α 7nAChR 刺激治療介入および抗酸化ストレス的治療介入併用評価

過去に α 7nAChR に対し allosteric potentiating ligand (APL)作用のある抗認知症薬ガランタミンが A β の貪食を促進するという報告⁸⁾ や、脳虚血モデル動物において α 7nAChR 刺激による ROS 産生減少の報告⁹⁾があることから、BMSC/ミクログリア共培養系に A β を添加した in vitro AD モデルに対し α 7nAChR 刺激治療および抗酸化ストレス的治療を併用し、BMSC に発現する細胞マーカーやミクログリアの活性化状況、培養液中の炎症性・抗炎症性サイトカイン、酸化ストレスマーカーなどを免疫組織学的手法、生化学的手法により評価・解析する計画を立てた。

(4)AD モデル動物由来の BMSC 培養系、およびミクログリアの共培養系の確立と、これを用いた in vitro AD モデルの解析

AD に対する実際の BMSC 治療は自家移植が想定されるため、家族性 AD の変異型 APP 遺伝子、変異型プレセニリン 1 遺伝子を導入した APdE9 マウス由来の BMSC 培養系、およびミクログリアとの共培養系を確立し、上記(1)~(3)と同様の評価・解析を行う計画を立てた。

4. 研究成果

(1)まずはラット由来骨髄間葉系幹細胞(rBMSC)の培養を開始し、検鏡観察目的に24 well plate に丸型ガラスディスクを入れた環境での培養も試みた。24 well plateへの1 wellあたりの播種数は当初、 1×10^5 /wellで開始し、その後、 $0.5 \sim 0.1 \times 10^5$ /wellなどの濃度で培養を試みた。概ね 0.5×10^5 /well程度の濃度での播種で良好な培養結果が得られることを確認した。次に、培養した細胞が本当にrBMSCと判断しうるものか、プロファイリング目的にBMSCに発現するとされる細胞表面マーカーCD73、CD90、CD105、および陰性マーカーとされるCD45、CD11b、およびミクログリアのマーカーであるIba-1について免疫染色で確認した。結果は、CD73、CD90、CD105において細胞の染色性が確認された一方、CD45、CD11b、Iba-1については染色を認めなかったことから、本培養において得られた細胞はrBMSCと判断されるものと考えた。

次に、本培養系にヒトリコンピナントアミロイド β (A β)を添加してrBMSCの応答を検証する実験を行った。添加するA β は前処置によりオリゴマー型A β (o A β) と線維型A β (fA β) の2種類を用意し、添加24時間後のrBMSCの状況についてCD73およびCD11bによる細胞免疫染色にて確認した。結果はoA β 、fA β ともrBMSCに取り込まれている様子が確認された。一方、細胞表面マーカーに変化はなくミクログリアのマーカーであるCD11bは陰性のままであった。その後、ミクログリアの初代培養系の確立を試みたが期間内に確立することができなかった。従って、上記「3. 研究の方法」に記載した研究計画のうち(2)~(4)については期間内に遂行することができず、(1)の生化学的手法による評価も遂行できなかった。

今回、まず *in vitro* AD 環境モデルにおける BMSC の応答を確認したところ BMSC が アミロイド β(Aβ)を取り込む様子が確認された。従来、AD 病態においてミクログリアが Aβ を貪食することが知られている。BMSC はミクログリアと同じ中胚葉由来の細胞であり、Aβ に対して共通性のある反応を示したことで今後、BMSC のミクログリアに対する作用を考える上での参考になる結果が得られたと考える。

<引用文献>

- (1) Hardy J, Selkoe DJ: The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297:353-356, 2002
- (2) Combs CK, Karlo JC, Kao SC et al.: beta-Amyloid stimulation of microglia and monocytes results in TNFalpha-dependent expression of inducible nitric oxide synthase and neuronal apoptosis. *J Neurosci* 21:1179-1188, 2001
- (3) Guglielmotto M, Giliberto L, Tamagno E et al.: Oxidative stress mediates the pathogenic effect of different Alzheimer's disease risk factors. *Front Aging Neurosci* 2:3, 2010
- (4) Nunomura A, Perry G, Aliev G et al.: Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 60:759-767, 2001
- (5) Ruzicka J, Kulijewicz-Nawrot M, Rodriguez-Arellano JJ et al.: Mesenchymal Stem Cells Preserve Working Memory in the 3xTg-AD Mouse Model of Alzheimer's Disease. *International journal of molecular sciences* 17, 2016
- (6) Khairallah MI, Kassem LA, Yassin NA et al.: The hematopoietic growth factor "erythropoietin" enhances the therapeutic effect of mesenchymal stem cells in Alzheimer's disease. *Pak J Biol Sci* 17:9-21, 2014
- (7) Hegyi B, Kornyei Z, Ferenczi S et al.: Regulation of mouse microglia activation and effector functions by bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem cells and development* 23:2600-2612, 2014
- (8) Takata K, Kitamura Y, Saeki M et al.: Galantamine-induced amyloid-β clearance mediated via stimulation of microglial nicotinic acetylcholine receptors. *J Biol Chem* 285:40180-40191, 2010
- (9) Parada E, Egea J, Buendia I et al.: The microglial alpha7-acetylcholine nicotinic receptor is a key element in promoting neuroprotection by inducing heme oxygenase-1 via nuclear factor erythroid-2-related factor 2. *Antioxidants & redox signaling* 19:1135-1148, 2013

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------