

令和 6 年 4 月 15 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03564

研究課題名（和文）ケモカインクロストーク制御によるアルツハイマー病発症分子機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of chemokine cross-talk underlying pathogenesis of Alzheimer's disease

研究代表者

斉藤 貴志（Saito, Takashi）

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・教授

研究者番号：90360552

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,800,000円

研究成果の概要（和文）：アルツハイマー病（AD）など神経変性疾患の克服は、社会的要請の大きな世界的課題である。そのため、発症分子機構を明らかにし、創薬標的を早急に提示する必要がある。これまでの神経細胞中心に着目した研究の限界が世界規模で懸念されており、脳内環境として神経細胞以外のグリア細胞と神経細胞の相互作用の解析が着目されはじめているが、その複雑性から解析は遅れている。本研究計画では、ADモデルマウスを用いて、炎症起点となるグリア応答ネットワークの理解と制御を目的に研究を遂行した。その結果、AD初期病態の形成において炎症応答は関与せず、非炎症性のグリア応答が重要である可能性を見だし、新たな作業仮説の提唱に至った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、これまで通説のように考えられてきたインフラマソームによる炎症応答は、前臨床期におけるアミロイド病理形成には関与していないことが示された。さらに、AD発症プロセスにおいて、炎症性ではなく、非炎症性のグリア応答が重要な役割を果たしているという新たな着想がもたらされた。これは、ADの複雑な発症メカニズムを解明するために重要な意義をもたらす。また、インフラマソームの阻害がアルツハイマー病に対する薬剤標的とも考えられてきたが、これを再考する必要があるとも考えられる。今後、ADの発症メカニズムを明らかにし、適切な創薬標的を見いだしていく必要があり、本研究は強くその一助になると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Overcoming neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease (AD) is a global challenge for which there is a great social demand. Therefore, it is important to clarify the molecular and cellular mechanisms underlying the pathogenesis of AD and to identify drug targets as soon as possible. For a long time, AD has been considered a neuronal dysfunction. Recently, the importance of glial cells, which are non-neuronal cells, in neurodegenerative diseases has been focused on. In this research project, we have developed a mouse model of AD to understand and regulate the glial response network, which is the starting point of inflammation. As a result, we found that inflammatory responses are not involved in the early pathogenesis of AD, and that non-inflammatory glial responses may be important, leading to the proposal of a new working hypothesis.

研究分野：神経生化学

キーワード：認知症 アルツハイマー病 神経炎症 グリア応答

1. 研究開始当初の背景

認知症・アルツハイマー病（AD）は、世界規模で早急に克服すべき社会問題である。にもかかわらず、有望視されていた医薬品候補も臨床治験でことごとく断念せざる終えない状況である。その背景には、AD 病態形成の分子機構が未だに明らかになっておらず、妥当性の高い創薬標的が見いだせていないことに帰結する。長年の病理解析から見いだされた作業仮説“アミロイドカスケード仮説”は、AD 患者脳内の病理変化としてアミロイドβペプチド（Aβ）の蓄積（老人斑）から、微小管結合タンパク質 Tau の蓄積（特に過剰リン酸化 Tau の蓄積：神経原線維変化）、そして最終的な神経変性・細胞死へ至る時系列に則っているとされる。しかし、Aβ蓄積から Tau の蓄積、そして神経変性・細胞死の各イベントを繋ぐ分子機構が全く不明であり、神経細胞を中心に着目した研究に限界が生じている。近年、神経細胞をとりまくグリア細胞の役割が注目されている。特に、末梢と隔離された脳内の免疫担当細胞としてのミクログリアと神経への栄養供給から環境調節作用を担うとされるアストロサイト、それぞれの正常時と病態時の役割の違いが重要であると考えられるようになってきた。特に、病態時のミクログリアとアストロサイトの活性化を神経炎症として捉えるようになってきた。しかし、神経-グリア連関として捉えられる神経炎症は、その複雑性から世界的にも研究は遅れている。そこで、AD 病態形成における神経炎症の役割・意義を明らかにする必要がある。グリア応答は、様々な神経変性疾患においても認められているが、疾患を規定する神経炎症応答に共通性があるのか否かを見いだすことができれば、AD 以外の神経変性疾患研究との共通性・非共通性の探索にも有用であり、将来的に、神経変性疾患全体を俯瞰した創薬研究に展開できると期待できる。

2. 研究の目的

AD における神経炎症は、まずアミロイドβ（Aβ）の蓄積に呼応してグリア細胞が Aβ 凝集対に集簇することから始まると考えられる。既報においては、神経炎症＝病態増悪要因として捉えられてもいる。しかし、本来の「炎症」としての定義を考えると、病態増悪だけでなく、成体保護的な意味合いもあり、実際の炎症応答の役割に介入できた解析は少ないとも考えられる。そこで、炎症応答に関与する因子を活性化、および抑制することによる Aβ 病理形成への影響を明らかにすることを目的に研究計画を構築した。特に、我々が独自に開発した Aβ 病理を呈するモデルマウス：Amyloid precursor protein (*App*) knock-in (KI) マウス (*App*^{W-GF} マウス：Saito T, et al. *Nature Neurosci* 2014) を用いて解析を進めることで、独自性を保った解析が可能であると考えられる。*App*^{W-GF} マウスは、その有用性が高く認識されるに至っており、これまでに国内外約 500 件の共同研究として提供しており Aβ 病理を呈するモデルとしての新たな世界基準モデルマウスに至ったと思われる。一方で、客観性を担保するためにも一つの系統だけでなく、別のモデルマウスを用いることも重要であり、APP/PS1 マウスも用いて解析を行い、AD 初期病態形成における炎症惹起のサイトカイン/ケモカインのクロストークを制御する神経炎症応答の役割を明らかにしていく。

3. 研究の方法

AD 病態形成における神経炎症の役割を明らかにするために、上述した Aβ アミロイドーシスモデルマウスを基盤に、サイトカイン/ケモカインのクロストークの根幹となる炎症応

答の鍵シグナル系として知られる NF- κ B 経路およびインフラマソームの構成因子に着目して解析を進める。具体的には、炎症を活性化する系として NF- κ B 経路の抑制因子 A20 のコンディショナルノックアウトマウスを用いて、炎症状態を増悪させた状況での A β 病理への影響を検討する。次に、インフラマソーム構成因子である NLRP3 および Caspase-1 の欠損モデルを用いて、インフラマソーム抑制による効果の検証を進める。これらマウスモデルは、ベルギー-Ghent University の Geert Van Loo 教授らとの共同研究としてマウスの提供を受け解析を行う。

4. 研究成果

まず初めに、炎症によるアミロイド病理の増悪効果を検証するために、NF- κ B 経路の抑制分子 A20 のコンディショナルノックアウトマウスを作製した。ミクログリア特異的に A20 を欠損させ NF- κ B 経路の活性化を誘導した結果、*App*^{NL-G-F} マウスだけでなく野生型マウスでも炎症性サイトカインの発現が高まり炎症状態を増強することができた。しかし、予想に反して *App*^{NL-G-F} マウス脳内のアミロイド β の蓄積は増悪していなかった。

次に、アミロイド病理形成に対する炎症の抑制効果を検証するために、インフラマソーム活性化の鍵分子 Caspase-1 をミクログリア特異的に欠損させるコンディショナルノックアウトマウスを作製し解析を行った。

ミクログリア特異的インフラマソームの抑制とアミロイド病理

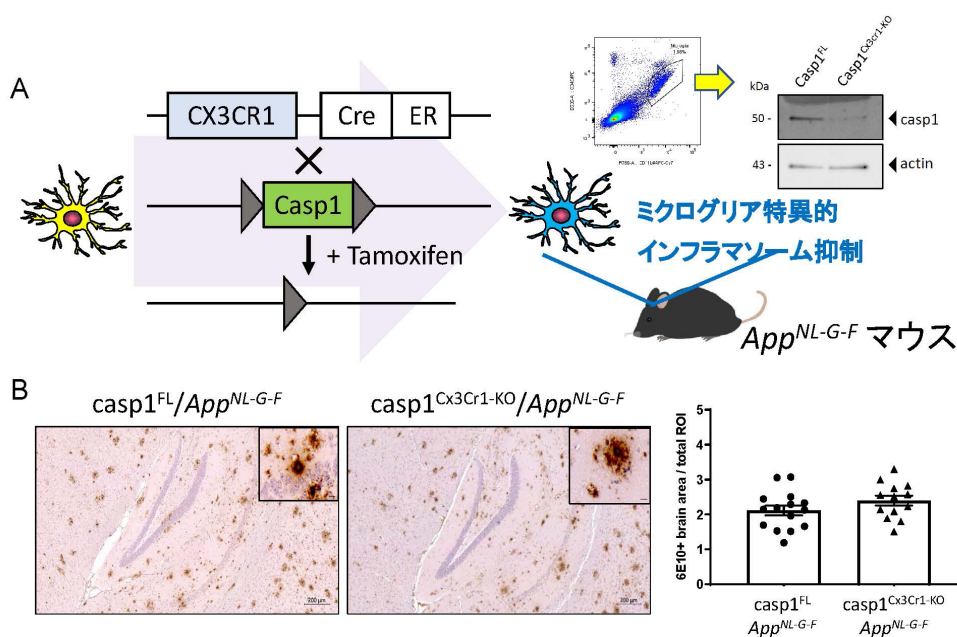


図 1. (A)ミクログリア特異的に Caspase-1 を欠損させた *App*^{NL-G-F} マウスの開発。(B) アミロイド β の免疫組織化学的解析の結果、アミロイド β の蓄積に差は認められなかった。*casp1*^{FL}は対照マウス、*casp1*^{Cx3Cr1-KO}

その結果、ミクログリア特異的に Caspase-1 を欠損（インフラマソームを抑制）させても A β の蓄積は変化（改善）しないことが明らかになった。

さらに、ミクログリアにおける限定的なインフラマソームの抑制効果の検証だけでなく、全身性にインフラマソームを抑制させるために Caspase1/11 ノックアウトマウスと *App^{NL-G-F}* マウスの交配マウスを作製し解析を行った。

全身性インフラマソーム抑制によるアミロイド病理

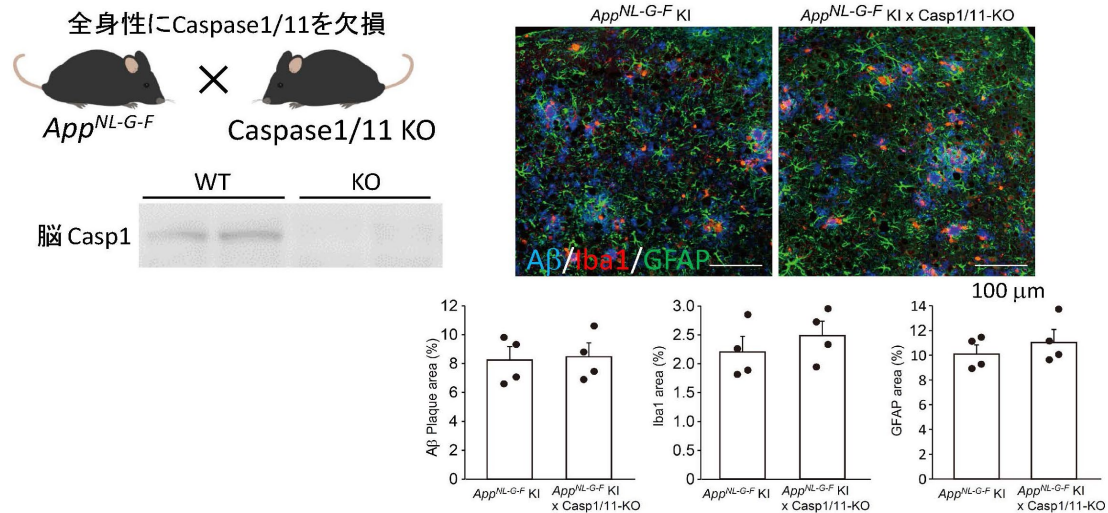


図 2.全身性に Caspase-1/11 を欠損した *App^{NL-G-F}* マウスでもアミロイドβの蓄積に差は認められなかった。免疫組織化学的染色では青：アミロイドβ蓄積、赤：ミクログリア(Iba1)、緑：アストロサイト(GFAP)を表す。

その結果、全身性のインフラマソーム抑制においても Aβ の蓄積は変化（改善）しないことが明らかになった。

これら一連の結果は、2013 年のドイツのグループからの報告に反する結果となった。このような結果になったのは、使用したモデルマウスの違いに依るかもしれないため、アミロイド病理を呈する既報同様のモデルマウス (APP/PS1 マウス) を用いて、また既報同様にインフラマソーム構成分子 NLRP3 の欠損マウスとの交配マウスも樹立して解析も行った。さらにこれらマウスでのシングルセル RNAseq 解析も行ったが、APP/PS1 マウスでも NF-κB およびインフラマソーム関連遺伝子の発現は高まっておらず、アミロイド病理形成に NLRP3 の発現の有無は関与していないことが明らかとなった。

最後に、*App^{NL-G-F}* マウス脳内で変動するサイトカイン/ケモカインの発現を網羅的に解析した結果、Aβ 病理の蓄積に連動してケモカイン CCL3 の発現が高まることが明らかになった。CCL3 が炎症性に誘導されるか否かを検証するために、Caspase-1/11 欠損 *App^{NL-G-F}* マウスにおける CCL3 のレベルを検証した結果、*App^{NL-G-F}* マウスと同等であることが定量的に示され、CCL3 はいわゆる「炎症」に応答した発現を示すのではなく、非炎症性のグリア応答、および Aβ 病理形成に関与する因子であることが示唆された。以上の解析から、AD 初期病態の形成において炎症応答は関与せず、非炎症性のグリア応答が重要である可能性を見だし、新たな作業仮説の提唱に至った。

本研究により、これまで通説のように考えられてきたインフラマソームによる炎症応答は、前臨床期におけるアミロイド病理形成には関与していないことが示された。さらに、AD 発症プロセスにおいて、炎症性ではなく、非炎症性のグリア応答が重要な役割を果たしているという新たな着想がもたらされた。これは、AD の複雑な発症メカニズムを解明するために重要な意義をもたらす。また、インフラマソームの阻害がアルツハイマー病に対する薬剤標的とも考えられてきたが、これを再考する必要があるとも考えられる。今後、AD の発症

メカニズムを明らかにし、適切な創薬標的を見いだしていく必要があり、本研究は強くその一助になると考えられる。これら一連の解析結果は、Frontiers in Immunology 誌に掲載された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hijioka Masanori, Manabe Tatsuya, Saito Takashi	4. 巻 14
2. 論文標題 Multifactorial glial responses and their contributions to Alzheimer's disease continuum	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Neuroimmunology	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cen3.12745	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sasaguri H, Hashimoto S, Watamura N, Sato K, Takamura R, Nagata K, Tsubuki S, Ohshima T, Yoshiki A, Sato K, Kumita W, Sasaki E, Kitazume S, Nilsson P, Winblad B, *Saito T, *Iwata N, *Saido TC	4. 巻 16
2. 論文標題 Recent advances in the modeling of Alzheimer's disease.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 8074743
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnins.2022.807473	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Srinivasan S, Kancheva D, De Ren S, Saito T et al	4. 巻 15
2. 論文標題 Inflammasome signaling is dispensable for β -amyloid-induced neuropathology in preclinical models of Alzheimer's disease	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1323409
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2024.1323409	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 3件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 斉藤貴志
2. 発表標題 Role of glial response underlying pathogenesis of Alzheimer's disease
3. 学会等名 The 1st Fujita International Symposium on Brain Science（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 斉藤貴志
2. 発表標題 Role of microglial inflammatory platforms in AD pathogenesis
3. 学会等名 Neuro2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 斉藤貴志
2. 発表標題 アルツハイマー病モデルマウスの開発とその問題点、そして今後の展開
3. 学会等名 第55回日本実験動物技術者協会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 斉藤貴志
2. 発表標題 グリア応答/神経炎症とアルツハイマー病
3. 学会等名 第40回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 斉藤貴志
2. 発表標題 アルツハイマー病病態における脳内環境の理解と制御
3. 学会等名 医療薬学フォーラム2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 斉藤貴志
2. 発表標題 Role of glial response underlying pathogenesis of Alzheimer ' s disease
3. 学会等名 The 3rd International Stroke-Immunology Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 斉藤貴志
2. 発表標題 アルツハイマー病 [※] におけるグリア応答と脳内環境
3. 学会等名 日本生化学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 斉藤貴志
2. 発表標題 アルツハイマー病におけるグリア応答の役割と脳内環境
3. 学会等名 International Conference of Neuroscience and Osteoimmunology (国際学会)
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 Somatostatin Receptor	発明者 斉藤貴志、西道隆 臣、松葉翔子、他5 名	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/037086	取得年 2022年	国内・外国の別 外国

〔その他〕

脳神経科学研究所・認知症科学分野HP
<https://ncs-saitolab.com/>
 名古屋市立大学脳神経科学研究所HP
<https://ibs.med.nagoya-cu.ac.jp/>
 Prof. Geert Van Loo
<https://vib.be/labs/van-loo-lab>
 Dr. Per Nilsson
<https://ki.se/en/nvs/per-nilsson-group>

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			
ベルギー	VIB Center for Inflammation Research	Ghent University		
スウェーデン	Karolinska Institutet			
ドイツ	University of Freiburg			