

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：34512

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07192

研究課題名(和文) 脳内免疫の賦活化はアルツハイマー型認知症の新たな治療戦略となるのか

研究課題名(英文) Is activation of brain immunity a novel therapeutic strategy for Alzheimer's disease?

研究代表者

力武 良行 (Rikitake, Yoshiyuki)

神戸薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：50419488

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：血管内皮特異的に細胞老化を示すTIE2-TERF2DN-Tgマウスとアルツハイマー病(AD)モデルマウスであるAPP/PS1マウスを交配して血管内皮細胞老化ADモデル(APP/PS1;TERF2DN)マウスを作成し、APP/PS1;TERF2DNマウスでは対照となるAPP/PS1マウスに比べて、神経突起変性は軽度で認知機能低下は軽減していることを見出した。その理由として、ミクログリアのアミロイド- $(A\beta)$ オリゴマー貪食能が亢進していること、さらに脳内A β プラークへのミクログリア被覆化が亢進してプラーク圧密化が生じ、脳内A β プラーク形成が抑制されていることが関与していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルツハイマー病(AD)の病態形成における脳内免疫細胞であるミクログリアの活性化の意義に関しては、病態形成に対して促進的と保護的の正反対の見解があり一定していない。これまでに高齢AD患者でみられる血管内皮細胞老化を伴う状況下におけるミクログリアの活性化の意義を検討した報告はなく、血管内皮細胞老化マウスを作成してADの病態形成や脳表現型を解析したとの報告もなかった。本研究成果により、血管内皮細胞老化に伴うミクログリアの機能変容は、ADの病態形成に対して保護的に働くことが初めて明らかになったことで、ミクログリアの機能変容という新しい視点での治療戦略開発への足がかりが得られたと考えられた。

研究成果の概要(英文)：TIE2-TERF2DN-Tg mice, which exhibit vascular endothelial-specific senescence, and APP/PS1 mice, an Alzheimer's disease (AD) model mouse, were crossed to generate vascular endothelial-specific senescent AD model (APP/PS1; TERF2DN) mice. We found that APP/PS1; TERF2DN mice had mild neurite degeneration and attenuated cognitive decline compared to control APP/PS1 mice. The reason for this is that the ability of microglia to phagocytose amyloid- $(A\beta)$ oligomers was enhanced, and furthermore, microglial coverage of cerebral A β plaques was enhanced, resulting in plaque compaction and suppression of cerebral A β plaque formation.

研究分野：血管生物学

キーワード：アルツハイマー病 血管内皮細胞老化 ミクログリア

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー型認知症(AD)では脳内免疫担当細胞であるミクログリアの活性化がみられるが、ADの病態形成におけるミクログリア活性化の意義に関しては、病態形成に促進的と保護的の正反対の見解があり一定していない。また、高齢AD患者では血管内皮細胞老化がみられると報告されているが、血管内皮細胞老化を伴う状況下におけるミクログリア活性化の意義やADの病態形成に果たす血管内皮細胞老化の役割は不明であった。そのため、ミクログリア活性化誘導による脳内免疫の賦活化がADの治療戦略となるのか明らかではなかった。

2. 研究の目的

持続的なミクログリアの活性化がみられる血管内皮細胞老化マウスをADモデルマウスと交配して血管内皮細胞老化ADモデルマウスを作出し、認知機能やADの病態形成を解析することで、血管内皮細胞老化を伴う状況下におけるミクログリア活性化の意義や、ADの病態形成に果たす血管内皮細胞老化の役割とその作用機構を解明することを目的とした。ミクログリア活性化誘導による脳内免疫の賦活化がADの治療戦略となるのか明らかにすることで、新しい視点での治療戦略開発への足がかりをつかめると考えた。

3. 研究の方法

(1) マウス

血管内皮特異的に細胞老化を示すマウス(TIE2-TERF2DN-Tgマウス)とADモデルマウスのAPP/PS1マウスを交配して血管内皮細胞老化ADモデル(APP/PS1;TERF2DN)マウスを作出した。

(2) 認知機能

Y字迷路試験によって短期記憶(空間作業記憶)を、モリス水迷路試験によって長期記憶(空間参照機能)を評価した。

(3) 蛍光免疫染色

マウスから脳組織切片を作製して各種抗体あるいはチオフラビンを用いて染色した後、共焦点レーザー顕微鏡あるいはオールインワン蛍光顕微鏡を用いて観察した。アミロイド(A)プラークは、抗A抗体とチオフラビンによる二重染色の結果にしたがってdiffuse、filamentous、compact、inertの4形態に分類した。

(4) 免疫電顕

マウスから脳組織切片を作製して抗アクアポリン4(AQP4)抗体を用いて免疫電顕をおこなった。

(5) 血中A β 濃度測定

ヒトA β を特異的に認識し測定可能なELISAキットを用いて血中A β 濃度を測定した。

(6) 脳細胞の単離

マウスから摘出した脳から神経組織分散キットを用いて脳細胞の懸濁液を作成し、その懸濁液からACSA-2抗体、CD11b抗体及びCD31抗体を用いた磁気ビーズ法により、それぞれアストロサイト、ミクログリア及び脳血管内皮細胞を単離した。

(7) ミクログリアのA β オリゴマー貪食能

マウスから単離したミクログリアの培養液中に蛍光色素標識したA β オリゴマーを添加して培養し、ミクログリア内の蛍光を測定した。

(8) 定量PCR

脳組織や単離細胞からRNAを抽出し、逆転写によりcDNAを作成した後、リアルタイムPCR法により遺伝子発現を評価した。

(9) 細胞老化関連分泌現象(SASP)

マウスから単離したミクログリアの培養液中に、マウスから単離した脳血管内皮細胞の培養液を添加して培養した後、ミクログリアからRNAを抽出してリアルタイムPCR法により遺伝子発現を評価した。

(10) シングルセル RNA シーケンス

10X Genomics 社のシングルセル解析プラットフォームを用いてライブラリーを作成し、次世代シーケンサーを用いてシングルセル RNA 解析をおこなった。

4. 研究成果

(1) 血管内皮細胞老化マウスの脳表現型

血管内皮細胞老化マウスから単離した脳血管内皮細胞では、野生型マウスから単離した脳血管内皮細胞に比べて細胞老化マーカー分子の p16 や p21、炎症性サイトカインの IL-1 や IL-6、単球接着分子の VCAM-1 や ICAM-1 の遺伝子発現が増加しており、血管内皮細胞老化として矛盾しない結果が得られた。野生型マウスに比べて血管内皮細胞老化マウスでは、大脳皮質においてアストロサイトのマーカー分子である S100 の免疫染色シグナルが増強しており、海馬においてアストロサイトのマーカー分子である GFAP のシグナルが増強していた。しかしながら、両マウスからアストロサイトを単離し、遺伝子発現プロファイルを網羅的に調査したところ、S100 や GFAP の遺伝子発現は変わらなかった。S100 シグナルや GFAP シグナルの増強は、脳の障

害時などに生じる肥大した反応性アストロサイトで見られることから、血管内皮細胞老化マウスでは、反応性アストロサイトと同様なアストロサイトの肥大が生じていることが明らかになった。

さらに、野生型マウスに比べて血管内皮細胞老化マウスでは、大脳皮質深層部において AQP4 及び AQP4 の局在に関わるジストログリカンとそのリガンドであるラミニンの微小血管周囲への局在が減少していた(図 1)。こうした微小血管周囲への局在の減少は、大脳皮質浅層部ではみられなかった。老化した血管内皮細胞では、ラミニンの分解酵素の1つであるマトリックスメタロプロテアーゼ-2(MMP-2)の発現が増加していたことから、ラミニンはこの MMP-2 によって分解されるために減少した可能性が考えられた。AQP4 やジストログリカン、ラミニンのシグナルが減少する一方で、微小血管周囲に存在する周皮細胞は増加していた。周皮細胞は血管周囲への AQP4 の発現を増やすことが報告されていることから、AQP4 局在の減少を代償するために周皮細胞が増加した可能性も考えられた。

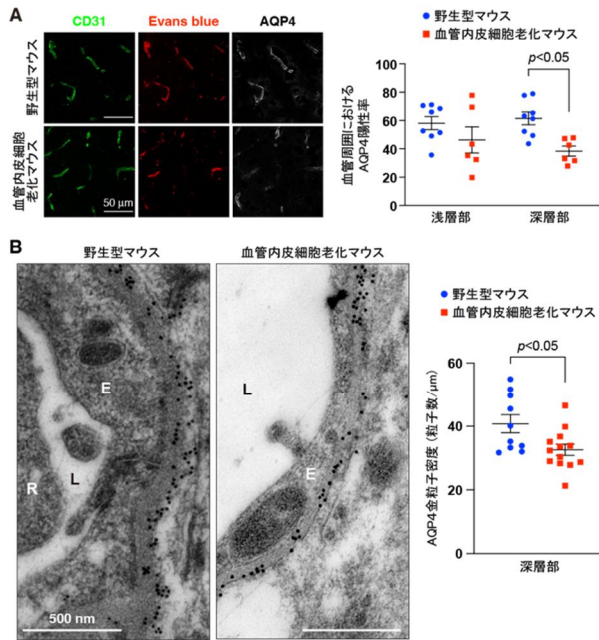


図 1. 血管内皮細胞老化マウスにおける大脳皮質微小血管周囲への AQP4 局在の減少
A. 蛍光免疫染色。左：染色結果の代表例、右：定量。
B. 免疫電子顕微鏡像。左：染色結果の代表例、右：定量。
E: 血管内皮細胞, L: 血管内腔, R: 赤血球。

(2) 血管内皮細胞老化 AD モデルマウスの脳表現型

血管内皮細胞老化マウスにおいて微小血管周囲への AQP4 の局在が減少していたことから、血管内皮細胞老化 AD モデルマウスでは、対照となる AD モデルマウスに比べ、A のクリアランスが低下して AD の病態形成が促進されると予想された。しかし、その予想とは対照的に、血管内皮細胞老化 AD モデルマウスでは、AD モデルマウスで見られる短期記憶と長期記憶の低下が軽減しており、野生型マウスと同程度の認知機能となっていた(図 2A)。AD モデルマウスに比べて血管内皮細胞老化 AD モデルマウスでは、脳内 A プラークの形成は抑制されており(図 2B)、Iamp-1 染色陽性で示される神経突起変性も抑制されていた。また、AD モデルマウスに比べて血管内皮細胞老化 AD モデルマウスでは、神経毒性が高いとされる filamentous プラークの割合が減少し、神経毒性が低いとされる compact プラークの割合が増加するプラーク圧密化が生じており、ミクログリアによる compact プラークへの被覆化が亢進していた。シングルセル RNA シーケンスの結果、AD モデルマウスに比べて血管内皮細胞老化 AD モデルマウスでは、恒常性(homeostatic)ミクログリアの割合が増加し、疾患関連(disease-associated)ミクログリアの割合が減少していることも確認された。

ところで、AD モデルマウスに比べて血管内皮細胞老化 AD モデルマウスでは、血中 A 濃度が低値であった。血管内皮細胞老化マウスから単離培養したミクログリアでは、野生型マウスから単離培養したミクログリアと比較して A オリゴマーの貪食に関わる TREM2 や CD36 の遺伝子発現が有意に増加しており、実際培養系において評価した A オリゴマー貪食能は亢進していた。さらに血管内皮細胞老化マウスでは、野生型マウスと比較して脳内ミクログリアは、活性化を示す形態変化を示し、脳から単離したミクログリアにおいても炎症性サイトカインやケモカインの mRNA 発現が野生型マウスに比べて上昇していたことから、活性化していることが明らかになった。野生型マウス及び血管内皮細胞老化マウスから脳血管内皮細胞を単離培養し、その培養液中で野生型マウスから単離したミクログリアを培養した実験から得られた結果から、ミクログ

リアの活性化には SASP が関与していると考えられた。

以上の結果より、血管内皮細胞老化によってミクログリアは活性化して A β 貪食能や A β プラーク被覆化が亢進するとともにプラーク圧密化が生じた結果、AD モデルマウスに比べて血管内皮細胞老化 AD モデルマウスでは、神経細胞傷害が軽減し、認知機能低下が軽度になったと考えられた。

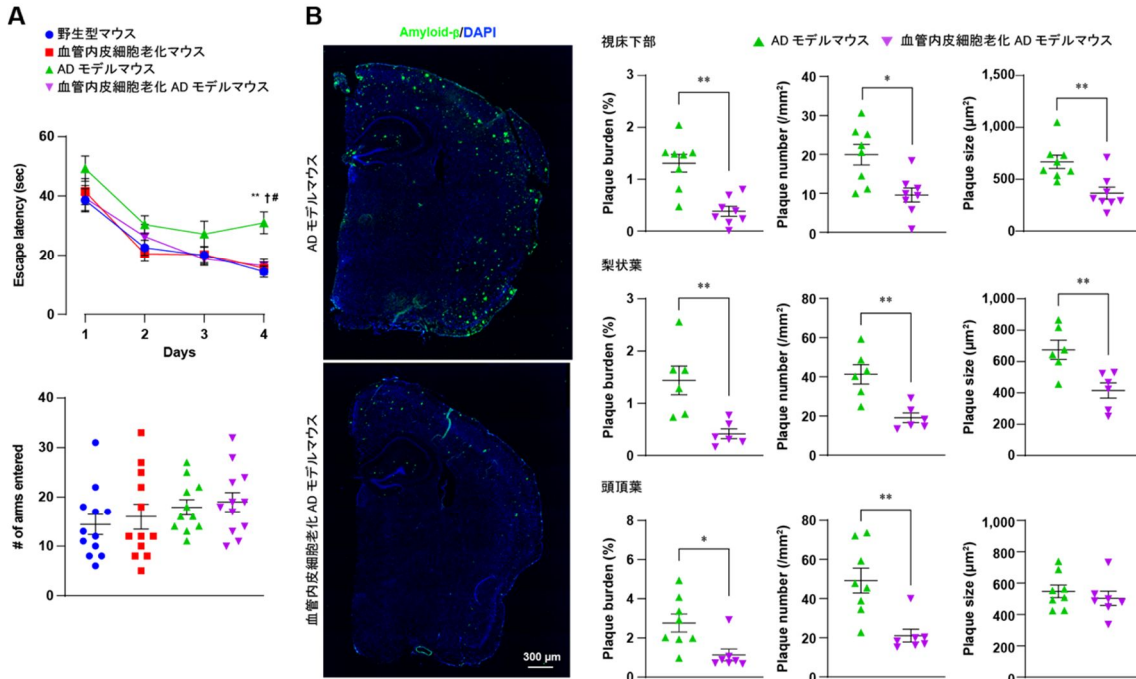


図 2. 血管老化 AD モデルマウスにおける認知機能低下とアミロイドプラーク形成の抑制

A. 認知機能低下の抑制. 上: モリス水迷路試験による長期記憶, 下: Y 字迷路試験による短期記憶.

B. アミロイドプラーク形成の抑制. 左: 蛍光免疫染色の代表例, 右: 定量.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kawauchi Shoji, Mizoguchi Taiji, Horibe Sayo, Tanaka Toru, Sasaki Naoto, Ikeda Koji, Emoto Noriaki, Hirata Ken ichi, Rikitake Yoshiyuki	4. 巻 71
2. 論文標題 Gliovascular interface abnormality in mice with endothelial cell senescence	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Glia	6. 最初と最後の頁 467 ~ 479
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/glia.24287	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 溝上真生、堀部紗世、神田弥音、駒林和可菜、坂口ともみ、成松芽衣、前田桂子、河内正二、佐々木直人、池田宏二、江本憲昭、平田健一、力武良行
2. 発表標題 血管内皮細胞老化はアルツハイマー病モデルマウスにおける認知機能低下を抑制する
3. 学会等名 日本分子生物学会第44回（2021年）年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 前田桂子、堀部紗世、神田弥音、駒林和可菜、坂口ともみ、成松芽衣、溝上真生、河内正二、田中亨、佐々木直人、池田宏二、江本憲昭、平田健一、力武良行
2. 発表標題 血管内皮細胞老化によるアルツハイマー病モデルマウスの認知機能低下の抑制
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 成松芽衣、堀部紗世、神田弥音、駒林和可菜、坂口ともみ、前田桂子、溝上真生、河内正二、田中亨、佐々木直人、池田宏二、江本憲昭、平田健一、力武良行
2. 発表標題 糖尿病と認知症の相互連関における血管内皮細胞老化の役割
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋彩加、堀部紗世、清水裕美子、田中友理、土肥なな子、田中亨、佐々木直人、池田宏二、江本憲昭、平田健一、力武良行
2. 発表標題 血管内皮細胞老化によるアルツハイマー病モデルマウスにおける認知機能低下の抑制機序
3. 学会等名 第72回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2022年

〔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
---------	---------