

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：37409

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K11222

研究課題名（和文）高齢期の認知機能におけるチロシン脱リン酸化酵素SHP-1の機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of tyrosine phosphatase SHP-1 in Alzheimer's disease model mice

研究代表者

田中 貴士（TANAKA, Takashi）

熊本保健科学大学・保健科学部・准教授

研究者番号：30734694

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：認知症の大半を占めるアルツハイマー型認知症（AD）の予防・改善には海馬での神経新生や脳に蓄積するアミロイドの除去を促すことが必要と考え、チロシン脱リン酸化酵素（SHP-1）に着目した。SHP-1は神経新生やミクログリアによる貪食シグナルを阻害すると報告されるため、ADマウスでのSHP-1抑制効果を検証した。ADマウスとSHP-1欠損マウスの交配、またADマウスへのSHP-1阻害剤の投与により、海馬におけるアミロイドの蓄積が緩和された。また、自発的運動で脳内のSHP-1が減少することが明らかになり、運動による海馬の神経新生やアミロイドの排出促進にSHP-1が寄与している可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

認知症患者の脳、特に海馬では、神経新生数の減少やミクログリアの貪食能の低下が報告されており、正常な機能を取り戻すことは容易ではない。これら2要因をともに改善させることは、認知機能低下の改善策として有効であると考えられるが、確立された方法は存在しない。本研究の意義は、海馬での神経新生やミクログリアによる貪食の両者を制御しているSHP-1を抑制することで、認知症の予防・改善を目指すことである。SHP-1の抑制が認知症を改善できることが実証されれば、認知症患者や予備群の方々に対する治療法につながる可能性が期待される。

研究成果の概要（英文）：Alzheimer's disease (AD), which accounts for majority of dementia cases, is thought to be prevented and improved by promoting neurogenesis in the hippocampus and the removal of amyloid accumulated in the brain. We focused on the tyrosine phosphatase SHP-1, which has been reported to inhibit signals such as neurogenesis and phagocytosis by microglia. We proceeded with the verification of the effect of SHP-1 inhibition in AD model mice. By crossing AD mice with SHP-1 knockout mice, or administering SHP-1 inhibitors to AD mice, it was shown that the accumulation of amyloid in brain tissue and the hippocampus was alleviated. Furthermore, it was revealed that SHP-1 expression in the brain decreases with voluntary running in mice, suggesting that SHP-1 may contribute to the promotion of neurogenesis in the hippocampus and the expulsion of amyloid by exercise.

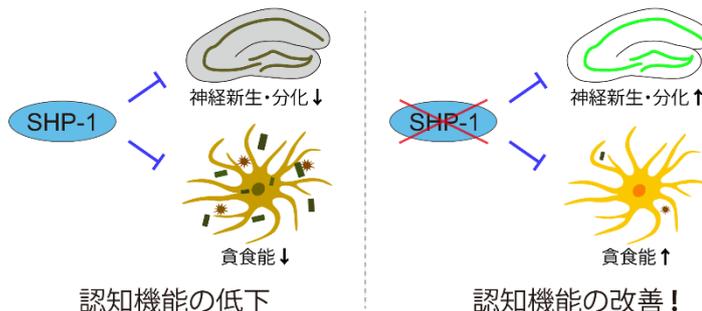
研究分野：神経形態学

キーワード：アルツハイマー型認知症 チロシン脱リン酸化酵素 海馬 アミロイド ミクログリア 貪食 神経新生 自発的運動

1. 研究開始当初の背景

我が国では高齢者の約 14%が認知症を発症しているが、認知症に対する有効な治療法は未だ確立されていない。認知症の改善を目指すにあたり、①海馬での神経新生の増加、②脳に蓄積した代謝性廃棄物の除去、を促すことが重要である。本研究で着目しているチロシン脱リン酸化酵素 Src homology 2-containing phosphatase (SHP) -1 は、神経新生やミクログリアの貪食能を抑制することが報告されているため、認知症に対する有効な治療の標的分子となる可能性がある。しかし、特に認知症の脳において上記 2 要因に SHP-1 がどのように作用し、認知機能に影響を及ぼすのか、これまで検証されていない。本研究によって、神経新生やミクログリアによる代謝性廃棄物の除去に対する SHP-1 の関与が実証されれば、認知症の治療法の一助として国民の健康増進への貢献が期待される。

申請者らはこれまでに、脳損傷後の炎症に伴って SHP-1 の発現が増加することや、この増加の抑制によって脳損傷後の機能回復が促されることを示してきた (Cell Death Dis. 2013, e567; Neurorehabil Neural Repair. 2020,558-70)。本研究で着目する SHP-1 は、神経栄養因子 (NGF) の受容体 (TrkA) を抑制することで神経新生の阻害や (J Cell Biol. 2003, 999-1010)、ミクログリアによる貪食を抑制することが示されている (Nature. 2019, 187-92)。しかし、これらの報告は *in vitro* もしくは認知症モデル動物ではない研究の結果であり、認知症マウスでの検証は行われていなかった。そこで我々は、SHP-1 の抑制が海馬での神経新生を促し、ミクログリアの貪食能も高めるのではないかという仮説を立て、これを検証するに至った。



2. 研究の目的

本研究では、海馬での神経新生やミクログリアによる代謝性廃棄物の貪食の両者に関わる SHP-1 を遺伝学および薬理的に抑制するとともに、臨床応用が簡便な身体運動にも着目することで、認知症の進行を予防・改善できるか明らかにすることを目的とした。

認知症患者の脳、特に海馬では、神経新生数の減少やミクログリアの貪食能の低下が生じており、正常な機能を取り戻すことは容易ではない。これら 2 要因をともに改善することは、認知症に対する改善策として有効であると考えられるが、未だ確立された方法は存在しない。本研究の目的かつ最大の特色は、海馬における神経新生とミクログリアによる貪食の両者を制御している SHP-1 を抑制することで、認知症の予防・改善を目指すことにある。本研究によって、SHP-1 の抑制が認知症を改善できることが実証されれば、高齢期の認知症患者および軽度認知症者の方々に対する治療法の基盤形成につながることを期待できる。

3. 研究の方法

本研究では、遺伝学および薬理的な介入、身体運動などの方法を用いて SHP-1 を抑制・阻害することで、海馬での神経新生やミクログリアによる代謝性廃棄物 (アミロイド β : $A\beta$) の貪食における SHP-1 の役割を詳細に解析し、認知症の改善が得られるか検証した。

(1) 実験に使用した動物

- ・アルツハイマー病のトリプルトランスジェニックモデル (3×Tg-AD) マウス (Neuron. 2003, 409-21; C57BL/6, 雄, 16~23 月齢) を用いた [研究分担者の加藤から提供]。
*3×Tg-AD マウスの脳内には 12~13 月齢で $A\beta$ や Tau が顕著に蓄積することが報告されている (Neuron. 2003, 409-21)。
- ・遺伝学的実験により、AD ホモ型過剰発現マウスと SHP-1 ヘテロ型欠損マウス (Nat Genet. 1993, 124-9) を掛け合わせたマウスを使用し、AD ヘテロ型/SHP-1 ヘテロ型 (SHP-1 が欠損した AD マウス) と AD ヘテロ型/SHP-1 野生型 (WT) を作製した。
- ・薬理学的実験には、AD ホモ型過剰発現マウスの脳室内に SHP-1 阻害剤 (200 mM, NSC-87877, Calbiochem 社) を浸透圧ポンプ (Model 1002, Alzet 社) を用いて 1 ヶ月間持続的に投与した。

(2) 海馬におけるアミロイド β の発現変化

- ・方法(1)で作製した AD ヘテロ型/SHP-1 ヘテロ型マウスと AD ヘテロ型/WT の海馬において、 $A\beta$ 発現の程度をウエスタンブロッティングにより評価した。
- ・方法(1)の AD ホモ型過剰発現マウスに SHP-1 阻害剤を持続的に投与した群と薬剤投与のな

いコントロール群において、海馬における A β の発現量をウエスタンブロッティングにより比較した。

(3) 身体運動による SHP-1 の発現変化

- ・身体運動には自走式の回転運動ケージ (MK-713, 室町機械) を用いて、日々の運動量を測定した (24 時間/日、7 日/週、2 ヶ月; Neurorehabil Neural Repair. 2020, 558-70)。
- ・3 \times Tg-AD マウスを若齢群と高齢の運動群、非運動群の計 3 群に分けた。
- ・3 群において、海馬における SHP-1 の発現量をリアルタイム PCR により評価した。

4. 研究成果

(1) アミロイド β の蓄積の程度

野生型および 3 \times Tg-AD ホモ型マウス (19 月齢) の海馬において、アミロイド β の発現量をウエスタンブロッティングにより解析した結果、AD ホモ型マウスでは海馬のアミロイド β が顕著に増加していることが確認された (図 1)。

AD ヘテロ型/WT および AD ヘテロ型/SHP-1 ヘテロ型欠損 (KO) マウス (20 月齢) の海馬において、アミロイド β や SHP-1 の発現量をウエスタンブロッティングにより評価した。SHP-1 が減少しているマウスにおいて、アミロイド β の発現量が減少傾向にあることが示された (図 2)。

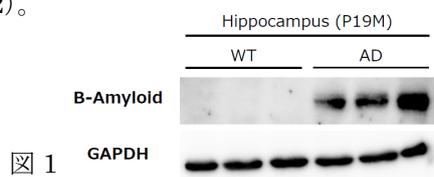


図 1

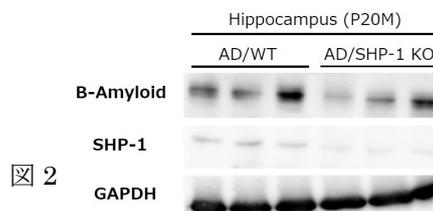


図 2

続いて、AD ホモ型マウスの脳室内に SHP-1 阻害剤を 1 ヶ月間持続的に投与した結果、海馬のアミロイド β の発現量が減少する可能性が示された (図 3)。

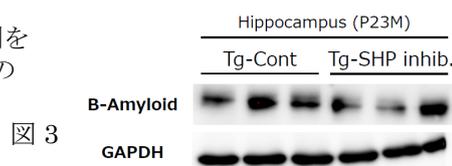
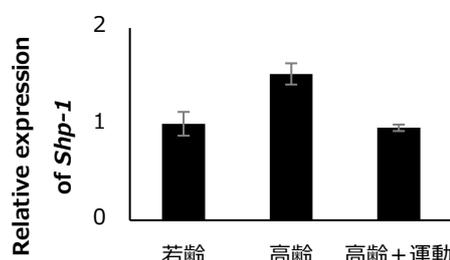


図 3

(2) 自発的運動による SHP-1 の発現の変化

加齢によって増加する脳内の *Shp-1* mRNA の発現量が自発的運動によって減少することが明らかになった。一方、タンパクレベルでの発現やリン酸化活性の程度については解析できていない。また、運動量と SHP-1 の発現減少に相関があるのか、SHP-1 の減少や活性阻害によってミクログリアの食食能が増加した結果アミロイド β が減少したのか、などについても検証が不十分である。



本研究課題期間中の研究者の所属変更に伴い、実験に使用していた 3 \times Tg-AD マウスの提供に関する同意書 (MTA) の継続が困難となった。現在は、異なる系統のアルツハイマー病モデルマウスの MTA を別施設と締結し、上記と同様の結果が出るのか再検証を進めている。さらに、海馬でのミクログリアによるアミロイド β の食食能や神経新生に SHP-1 が真に関与しているのか、組織学的な解析を含め、研究を進めていく。

<引用文献>

- ① Tanaka, et al. Suppression of SHP-1 promotes corticospinal tract sprouting and functional recovery after brain injury. Cell Death Dis. e567, 2013.
- ② Tanaka, et al. Combinational approach of genetic SHP-1 suppression and voluntary exercise promotes corticospinal tract sprouting and motor recovery following brain injury. Neurorehabil Neural Repair. 558-570, 2020.
- ③ Marsh, et al. SHP-1 negatively regulates neuronal survival by functioning as a TrkA phosphatase. J Cell Biol. 999-1010, 2003.
- ④ Pluvinae, et al. CD22 blockade restores homeostatic microglial phagocytosis in ageing brains. Nature. 187-192, 2019.
- ⑤ Oddo, et al. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. Neuron. 409-421, 2003.
- ⑥ Tsui, et al. Motheaten and viable motheaten mice have mutations in the haematopoietic cell phosphatase gene. Nat Genet. 124-129, 1993.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中 貴士
2. 発表標題 先端科学に基づく脳損傷病態の理解と理学療法教育
3. 学会等名 九州理学療法士学術大会2023（招待講演）
4. 発表年 2023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
研究分担者	加藤 伸郎 (KATO Nobuo) (10152729)	金沢医科大学・医学部・教授 (33303)	
研究分担者	上野 将紀 (UENO Masaki) (40435631)	新潟大学・脳研究所・教授 (13101)	

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
---------	---------